

Tesis Doctoral

La sobre-expresión crónica del factor de necrosis tumoral alfa en la substantia nigra induce neurodegeneración y síntomas motores

De Lella Ezcurra, Ana Laura

2010

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

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

Cita tipo APA:

De Lella Ezcurra, Ana Laura. (2010). La sobre-expresión crónica del factor de necrosis tumoral alfa en la substantia nigra induce neurodegeneración y síntomas motores. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

De Lella Ezcurra, Ana Laura. "La sobre-expresión crónica del factor de necrosis tumoral alfa en la substantia nigra induce neurodegeneración y síntomas motores". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2010.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**LA SOBRE-EXPRESIÓN CRÓNICA DEL FACTOR DE
NECROSIS TUMORAL ALFA EN LA *SUBSTANTIA NIGRA*
INDUCE NEURODEGENERACIÓN Y SÍNTOMAS MOTORES**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de ciencias biológicas

Ana Laura De Lella Ezcurra

Director de tesis: Dr. Fernando J. Pitossi

Consejero de estudios: Dra. Graciela Lidia Boccaccio

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

Buenos Aires, 2010

La sobre-expresión crónica del factor de necrosis tumoral alfa en la *substantia nigra* induce neurodegeneración y síntomas motores

La neuroinflamación es considerada una característica neuropatológica de la enfermedad de Parkinson. Se ha observado activación de microglía y niveles elevados de citoquinas pro-inflamatorias, entre las que se encuentra el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), en la *substantia nigra*, una de las principales regiones del cerebro afectadas en esta enfermedad. Sin embargo, el rol funcional de la activación microglial y la sobre-expresión de TNF- α no es claro en la enfermedad de Parkinson.

El objetivo de este trabajo fue determinar los efectos de la sobre-expresión crónica de TNF- α en la *substantia nigra*, e identificar moléculas candidatas a mediar ese efecto. Para ello, se inyectó en la *substantia nigra* de ratas adultas un adenovector que expresa TNF- α (AdTNF α), pudiendo detectarse la citoquina recombinante hasta 14 días p.i. La expresión crónica de TNF- α indujo una pérdida progresiva de neuronas en la *substantia nigra*, que comenzó el día 14 y se acentuó a los 21 y 28 días p.i., comparado con animales controles inyectados con un adenovector que expresa β -galactosidasa (Ad β gal). La sobre-expresión de TNF- α produjo la aparición de síntomas motores a los 14 días p.i.; y la activación de la microglía y/o reclutamiento de macrófagos de la periferia desde el día 7 luego de la inoculación. No se pudo detectar inducción de IL-1 β , ni evidencias de apoptosis. En cambio, se observó un aumento en los niveles de ciclooxigenasa tipo 2 (COX-2) y en la actividad de la óxido nítrico sintasa (NOS) en los animales que sobre-expresan TNF- α , por lo que dichas moléculas podrían estar participando de la muerte neuronal inducida por la citoquina. Por otro lado, se llevó a cabo un estudio de los genes regulados por TNF- α utilizando la técnica de *microarrays*. Entre los genes que se encontraron diferencialmente expresados entre los animales tratados con AdTNF α y Ad β gal, estaban significativamente representados procesos relacionados con la respuesta inmune y el metabolismo. Se validó por RT-PCR en tiempo real la expresión disminuida de la proteína quinasa C tipo delta (nPKC-delta) y el regulador de la señalización por proteína G 3 (RGS3) en los animales que sobre-expresan TNF- α con respecto a los controles.

En conclusión, podemos decir que la expresión prolongada de niveles pro-inflamatorios de TNF- α es suficiente para producir un efecto tóxico en las neuronas de la *substantia nigra*, con la aparición de síntomas motores y una respuesta glial característica. Los niveles y la duración de la expresión de esta citoquina son variables importantes para que ejerza un efecto neurodegenerativo. Se generó un modelo

animal que permite estudiar los mediadores del efecto tóxico de TNF- α , como lo demuestran los resultados de genómica funcional, sentando las bases para estudios futuros que puedan identificar blancos para una posible terapia contra la enfermedad de Parkinson.

Palabras clave: enfermedad de Parkinson, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), neuroinflamación, microglía, citoquinas, neurodegeneración, aquinesia, óxido nítrico sintasa (NOS), ciclooxigenasa tipo 2 (COX-2), adenovector, genómica funcional.

Chronic overexpression of tumor necrosis factor alpha in the *substantia nigra* elicits progressive neurodegeneration and motor symptoms

Neuroinflammation is regarded as a neuropathological characteristic of Parkinson's disease. Microglia activation and high levels of pro-inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor alpha (TNF- α), have been reported in the *substantia nigra*, one of the main brain regions affected in this disease.

The aim of this study was to determine the effects of the chronic overexpression of TNF- α in the *substantia nigra*, and to identify candidates to mediate that effect. To achieve this, an adenovector expressing TNF- α (AdTNF α) was injected in the *substantia nigra* of adult rats. We have been able to detect the recombinant protein until 14 days p.i. The chronic expression of TNF- α induced a progressive loss of neurons in the *substantia nigra*, which started 14 days p.i. and was more evident at 21 and 28 days p.i., compared to control animals injected with an adenovector expressing β -galactosidase (Ad β gal). Chronic overexpression of TNF- α caused motor symptoms, appearing at 14 days p.i.; and activation of microglia and/or recruitment of macrophages from the periphery from day 7 after adenoviral inoculation. We could not detect induction of IL-1 β expression, or evidences of apoptosis. On the other hand, we could observe increased levels of cyclooxygenase type-2 (COX-2) and increased activity of nitric oxide synthase (NOS) in animals overexpressing TNF- α , which suggests that these molecules could participate in the neuronal death induced by the cytokine. On the other hand, we studied the genes regulated by TNF- α using microarrays technology. We found that processes related to immune response and metabolism were significantly represented among de genes differentially expressed in AdTNF α and Ad β gal injected animals. Using real time RT-PCR, we validated the downregulation of protein kinase C delta type (nPKC-delta) and regulator of G-protein signaling 3 (RGS3) in animals over-expressing TNF- α , compared to controls.

Thus, we conclude that long-lasting expression of pro-inflammatory levels of TNF- α is sufficient to produce a toxic effect on neurons in the *substantia nigra*, as well as motor symptoms and a characteristic glial response. Levels and duration of TNF- α expression are important variables to establish its neurodegenerative effect. This study provides an animal model to study the mediators of the toxic effect of TNF- α , as shown by the results of functional genomics, laying the foundations for future studies with the final objective of identifying possible therapeutic targets for Parkinson's disease.

Keywords: Parkinson's disease, tumor necrosis factor alpha (TNF- α), neuroinflammation, microglia, cytokines, neurodegeneration, akinesia, nitric oxide synthase (NOS), cyclooxygenase type-2 (COX-2), adenovector, functional genomics.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todos los que, de un modo u otro, hicieron posible esta tesis:

- A Fernando Pitossi, por darme un lugar en su laboratorio. Por darme libertad para trabajar, y estar ahí para dirigir ese trabajo. Por sus palabras de aliento en mis momentos de desesperación. Por preocuparse y apoyarme siempre. Muchas gracias Fernando.
- A Mariela, por acompañarme en mis primeros pasos en el laboratorio, por enseñarme buena parte de las técnicas que usé en esta tesis, por su infinita paciencia.
- A Juan Cruz, por acompañarme y ayudarme en la recta final, con los *microarrays* y las PCR, incluso desde lejos. Espero que valides funcionalmente muchos genes.
- A Pablo y Joaquín, por el último esfuerzo en que salieran las PCR, por toda su ayuda.
- A Mariana, por la ayuda en los últimos experimentos del paper, en la preparación de la tesis, y en muchas otras cosas.
- A Pato, Clara, Vero, Rodolfo, Lu, Isa, Debi, Vale, Ana, Amaicha, Carina, Dani, porque de todos alguna vez recibí una mano.
- A Ariel, por el análisis de los *arrays*, por su paciencia al explicarme una y otra vez, por responder tan rápido a mis pedidos.
- A Mariano Salibe, por su ayuda con los *microarrays*, desde que empecé con los primeros intentos hasta los últimos que hicimos con las muestras.
- A Mariano Álvarez, por su ayuda con los primeros análisis de *microarrays*.
- A la gente del 107, por la ayuda recibida de muchos, y por la buena onda en los pasillos.
- A la Comisión de Seguimiento, porque fueron muy útiles las preguntas, sugerencias y discusiones a lo largo de la tesis.
- A todos los que alguna vez me dieron una mano y a los que con su buena onda hicieron más amenas y agradables las horas de trabajo.
- A la gente de biblioteca, por responder siempre a mis pedidos, lo que hizo realmente mucho más fácil la escritura de esta tesis.
- A Dora, por recibirme siempre con una sonrisa.
- A la gente de compras, droguero, mantenimiento, bioterio, sistemas, administración, limpieza, que también contribuyeron en el día a día del trabajo.

- Al Instituto Leloir, porque es un placer trabajar acá.

Y a las personas que forman una parte importante de mi vida, y me dieron las fuerzas y la alegría para seguir trabajando:

- A Cami, mi gordita hermosa, por llenarme de alegría y de amor; porque cada día con vos es una divertida aventura; por bancarme que te deje tantas horas para trabajar; porque te amo con todo mi ser.
- A Diego, mi amor, por tu apoyo, por tu amor; por todo lo que vivimos juntos, por todo lo que compartimos; porque sos un marido, un compañero y un padre excepcional; porque sin tu constante aliento y soporte todo esto no hubiera sido posible.
- A mi mamá, por estar siempre al lado mío, apoyándome y orientándome, por ser un ejemplo de mujer, de madre, de vida; por todo el amor que me diste siempre; porque me ayudaste a ser quien soy.
- A mi papá, por todo tu amor, tu fuerza, tu energía; por apoyarme siempre en mis decisiones y ayudarme a encontrar mi camino; por enseñarme, con tu ejemplo, que en la vida hay que seguir siempre nuestros sueños, siempre con alegría, a pesar de los obstáculos que puedan surgir.
- A Leo, mi hermano, porque un hermano no se compara con nada, y vos sos uno espectacular.
- A Fede, mi hermanito, por llenarnos de cariño y alegría.
- A mis amigas de toda la vida, Mariana, Marina, Diana, Natalia, Carla, Ana, Mariel, por tantos y tantos años de amistad, por tantas cosas que pasamos juntas. Porque sé que siempre puedo contar con ustedes.
- A Vero, Isa, Ana, Moni, Esteban, por todas las horas de cursada y de estudio, que finalmente llevaron a esta tesis. Y también tantas horas que la pasamos tan bien juntos.
- A Silvina, Naty, Andy, Mariana, Marina, Rodolfo, porque siempre es lindo compartir la vida con amigos como ustedes; por estar ahí cuando necesitamos una mano.
- A mi familia política, por todos los momentos compartidos y todo el cariño que he recibido.
- A mi familia, tíos, primos, abuelos que ya no están, por todas las cosas que vivimos juntos y todos los hermosos recuerdos.

*A Cami,
por hacer de mi vida una aventura, por hacerme feliz*

*A Diego,
por nuestro amor, por la hermosa familia que formamos juntos*

*A mamá y papá,
por apoyarme siempre, por ayudarme a encontrar mi camino*

PUBLICACIONES

El trabajo realizado en la presente tesis doctoral dio lugar a la siguiente publicación en una revista internacional con referato:

Chronic expression of low levels of Tumor necrosis factor- α in the substantia nigra elicits progressive neurodegeneration, delayed motor symptoms and microglia/macrophage activation. Ana Laura De Lella Ezcurra, Mariela Chertoff, Mariana Graciarena, Fernando Pitossi. *Neurobiology of Disease*, Marzo de 2010, 37(3):630-40.

ABREVIATURAS

6-OHDA: 6-hidroxidopamina

ADN: ácido desoxirribonucleico

AdTNF α : adenovector que expresa TNF- α de ratón

Ad β gal: adenovector que expresa β -galactosidasa

COX: ciclooxigenasa

GFAP: proteína ácida fibrilar glial

GSA: lectina Griffonia Simplicifolia

IL-1 β : interleuquina-1 beta

iNOS: óxido nítrico sintasa inducible

LPS: lipopolisacárido

MFB: fascículo prosencefálico medial

MHC clase II: complejo mayor de histocompatibilidad clase II

MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida

NO: óxido nítrico

NOS: óxido nítrico sintasa

nPKC-delta: proteína quinasa C tipo delta

NSAID: anti-inflamatorio no esteroideo

p.i.: post-inyección

RGS: regulador de la señalización por proteína G

SFB: suero fetal bovino

SNC: sistema nervioso central

TBP: proteína de unión a TATA box

TH: tirosina hidroxilasa

TNFR1: receptor de TNF tipo 1

TNFR2: receptor de TNF tipo 2

TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa

INDICE

Resumen en castellano	1
Resumen en inglés	3
Agradecimientos	5
Publicaciones	8
Abreviaturas	9
1. Introducción	16
1.1. Enfermedad de Parkinson	17
1.1.1. Epidemiología	17
1.1.2. Signos y síntomas	17
1.1.3. Fisiopatología	18
1.1.3.1. Neurodegeneración en la <i>substantia nigra</i>	18
1.1.3.2. Disfunciones extra-nigrales	19
1.1.3.3. Cuerpos de Lewy	20
1.1.3.4. Los ganglios basales	20
1.1.4. Diagnóstico	22
1.1.5. Tratamiento	23
1.1.6. Etiología	24
1.1.6.1. Forma familiar de la enfermedad de Parkinson	24
1.1.6.2. Forma esporádica de la enfermedad de Parkinson	25
1.1.7. Patogénesis	26
1.1.8. Modelos animales	27
1.2. Neuroinflamación	28
1.2.1. Privilegio inmunológico en el sistema nervioso central	28
1.2.2. Componentes celulares	29
1.2.3. Mediadores moleculares	32
1.2.4. Neuroinflamación y enfermedad de Parkinson	34
1.3. Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)	37
1.3.1. Aspectos generales de la biología de TNF- α	37
1.3.2. Receptores y cascadas de señalización	38
1.3.3. Funciones biológicas en la periferia	39
1.3.4. TNF- α en el sistema nervioso central	40
1.3.5. TNF- α en enfermedades neurodegenerativas	41
1.4. TNF- α y la enfermedad de Parkinson	42

1.4.1. Evidencias que vinculan al TNF- α con la enfermedad de Parkinson	42
1.4.2. Moléculas candidatas a mediar los efectos neurodegenerativos de TNF- α	45
1.5. Transferencia génica en el sistema nervioso central: adenovectores	47
1.6. La tecnología de <i>microarrays</i>	48
2. Hipótesis y objetivos	51
2.1. Hipótesis	52
2.2. Objetivo general	52
2.3. Objetivos particulares	52
3. Materiales y métodos	53
3.1. Producción y controles de los stocks de adenovectores	54
3.1.1. Amplificación de los stocks de adenovectores	54
3.1.2. Cuantificación de los adenovectores	56
3.1.3. Extracción del ADN viral	56
3.1.4. Caracterización de los vectores por mapeo de restricción	57
3.1.5. Verificación de la ausencia de virus replicativos	57
3.1.6. Determinación de la presencia de LPS	58
3.1.7. Dot blot para estudiar la expresión de TNF- α recombinante <i>in vitro</i>	58
3.2. Animales y cirugía	60
3.2.1. Cuidado y uso de los animales	60
3.2.2. Inyección estereotáxica de los adenovectores	60
3.3. Test del cilindro	61
3.4. Análisis histológicos	61
3.4.1. Perfusión y procesamiento del tejido para histología	61
3.4.2. Tinción de Nissl con Violeta de Cresilo	62
3.4.3. Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia	62
3.4.3.1. Inmunohistoquímica para detectar tirosina hidroxilasa (TH, marcador de neuronas dopaminérgicas) y TNF- α	62
3.4.3.2. Fluorescencia doble con la lectina Griffonia Simplicifolia (GSA, marcador de microglía) y un anticuerpo para detectar TH	63
3.4.3.3. Inmunofluorescencia doble para detectar el complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC clase II, marcador de microglía activada) y TH	64

3.4.3.4. Inmunofluorescencia doble para detectar la proteína ácida fibrilar glial (GFAP, marcador de astrocitos) y TH	65
3.4.4. Ensayo de X-gal (detecta actividad de β -galactosidasa) y cuantificación de células X-gal positivas	65
3.4.5. Tinción de Hoechst y cuantificación de núcleos apoptóticos	66
3.4.6. Ensayo de actividad de NADPH diaforasa (indicativo de la actividad de NOS)	67
3.5. Cuantificación de las neuronas de la <i>substantia nigra</i>	67
3.5.1. Conteo manual de neuronas tirosina hidroxilasa positivas	67
3.5.2. Cuantificación de neuronas tirosina hidroxilasa positivas usando estereología	68
3.5.3. Cuantificación de neuronas totales en una tinción de Nissl usando estereología	68
3.6. Cuantificación de la inflamación en la <i>substantia nigra</i>	69
3.6.1. Cuantificación del infiltrado inflamatorio	69
3.6.2. Cuantificación de la microglía activada	70
3.6.2.1. Estadios de activación morfológica de la microglía	70
3.6.2.2. Cuantificación de las células GSA positivas	70
3.6.2.3. Cuantificación de las células MHC clase II positivas	71
3.6.3. Cuantificación de las células GFAP positivas	71
3.7. Análisis a nivel proteico	72
3.7.1. Decapitación y extracción de proteínas	72
3.7.2. ELISA para detectar citoquinas en la <i>substantia nigra</i>	72
3.7.3. Western blot para detectar caspasa 3 y COX-2 en la <i>substantia nigra</i>	72
3.8. Estudio de <i>microarrays</i>	73
3.8.1. Decapitación y extracción de ARN	73
3.8.2. Calidad del ARN	74
3.8.3. Técnica de <i>microarrays</i>	74
3.8.4. Análisis de los datos	75
3.9. PCR en tiempo real	77
3.9.1. Transcripción reversa	77
3.9.2. RT-PCR en tiempo real para detectar el ARNm de los genes de referencia (<i>housekeeping</i>), TNF- α , nPKC-delta y RGS3	78
3.9.2.1. Análisis de la estabilidad de la expresión de los genes de referencia (<i>housekeeping</i>)	80

3.9.2.2. Análisis de los niveles del ARNm de TNF- α , nPKC-delta y RGS3	81
3.10. Análisis estadístico	82
4. Resultados	83
4.1. Producción y controles de los stocks de adenovectores	84
4.1.1. Cuantificación y controles de calidad de los adenovectores	84
4.1.2. Expresión de TNF- α recombinante <i>in vitro</i>	87
4.2. Determinación del sitio de inyección y la dosis de los adenovectores	87
4.2.1. Inyección de los adenovectores en el fascículo prosencefálico medial (MFB)	87
4.2.2. Inyección de los adenovectores en la <i>substantia nigra</i>	94
4.3. Expresión de TNF- α <i>in vivo</i>	97
4.3.1. Cuantificación de la expresión de TNF- α recombinante en la <i>substantia nigra</i>	97
4.3.2. Cuantificación de la expresión de TNF- α endógeno en la <i>substantia nigra</i>	98
4.3.3. Difusión del adenovector en la <i>substantia nigra</i> y regiones adyacentes	99
4.4. Efecto de la sobre-expresión crónica de TNF- α en la viabilidad de las neuronas de la <i>substantia nigra</i>	101
4.4.1. Conteo manual de neuronas tirosina hidroxilasa positivas	101
4.4.2. Conteo de neuronas tirosina hidroxilasa positivas usando estereología	102
4.4.3. Conteo de neuronas totales en una tinción de Nissl	105
4.5. Déficit motores causados por la sobre-expresión de TNF- α en la <i>substantia nigra</i>	107
4.6. Caracterización de la respuesta inflamatoria desencadenada por la sobre-expresión de TNF- α en la <i>substantia nigra</i>	108
4.6.1. Infiltrado inflamatorio	109
4.6.2. Activación de la microglía	112
4.6.2.1. Activación morfológica de la microglía	113
4.6.2.2. Expresión de marcadores de superficie en microglía activada	117
4.6.3. Activación de la astrogliá	121
4.7. Mecanismos moleculares involucrados en la muerte neuronal inducida por la sobre-expresión de TNF- α : estudio de moléculas candidatas	124

4.7.1. Muerte neuronal por apoptosis	124
4.7.2. Citoquinas pro-inflamatorias: TNF- α e IL-1 β endógenos	126
4.7.3. Ciclooxygenasa tipo 2 (COX-2)	127
4.7.4. Óxido nítrico sintasa (NOS)	129
4.8. Estudio de los genes regulados por TNF- α utilizando la técnica de <i>microarrays</i>	130
4.8.1. Diseño experimental	131
4.8.2. Controles de calidad	133
4.8.2.1. Test del cilindro	133
4.8.2.2. Calidad del ARN	134
4.8.2.3. Niveles de expresión de TNF- α	135
4.8.2.3.1. Validación de los genes de referencia (<i>housekeeping</i>)	136
4.8.2.3.2. PCR en tiempo real para detectar los niveles de TNF- α	140
4.8.3. Puesta a punto: autohibridación	143
4.8.4. Identificación de genes candidatos a mediar los efectos de TNF- α utilizando la técnica de <i>microarrays</i>	145
4.8.4.1. Análisis de la imagen	147
4.8.4.2. Análisis de los datos	149
4.8.5. Validación por RT-PCR en tiempo real	156
5. Discusión	158
5.1. TNF- α se sobre-expresa en forma crónica en la <i>substantia nigra</i> luego de la inyección adenoviral	159
5.1.1. Expresión crónica de TNF- α	159
5.1.2. Niveles de expresión	160
5.2. La sobre-expresión crónica de TNF- α tiene un efecto neurodegenerativo progresivo en la <i>substantia nigra</i>	161
5.3. La sobre-expresión crónica de TNF- α produce déficits motores	162
5.4. La sobre-expresión crónica de TNF- α induce una respuesta inflamatoria en la <i>substantia nigra</i>	162
5.4.1. Curso temporal de la respuesta inflamatoria	163
5.4.2. Activación de la microglía	164
5.4.3. Activación de la astrogliá	165
5.5. La sobre-expresión crónica de TNF- α en la <i>substantia nigra</i> permitió generar un modelo de neurodegeneración	165

5.6. Mecanismos moleculares involucrados en la muerte neuronal	166
5.6.1. Muerte por apoptosis	166
5.6.2. La red de citoquinas en el cerebro está alterada con respecto a la periferia	168
5.6.3. Candidatos a mediar los efectos de TNF- α : NOS y COX-2	169
5.6.4. Estudio de <i>microarrays</i>	171
5.6.4.1. Análisis de genes relacionados previamente con TNF- α	172
5.6.4.2. Análisis de categorías funcionales detectadas por GO	175
5.6.4.3. Genes candidatos a mediar los efectos de TNF- α validados por RT-PCR en tiempo real	177
5.7. Conclusiones finales	178
6. Bibliografía	183

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson fue descrita y documentada en 1817 por el médico británico James Parkinson, en su ensayo “An Essay on the Shaking Palsy”. La enfermedad se conoció desde entonces como *paralysis agitans* o *shaking palsy* (en español “parálisis con temblor”), hasta que setenta años después el neurólogo francés Charcot enfatizó que el temblor podía no estar presente, y sugirió que se llamara al desorden “enfermedad de Parkinson” (Fahn, 2003).

1.1.1. Epidemiología

La enfermedad de Parkinson es el segundo desorden neurodegenerativo más común, luego del mal de Alzheimer. La prevalencia está estimada en un 1% de la población mayor de 60 años, y un 4% de la gente mayor de 80 años (de Lau and Breteler, 2006). Dado que la enfermedad afecta principalmente a los mayores de 50 años, aumentando los índices de prevalencia e incidencia con la edad, es probable que el fenómeno de envejecimiento de la población mundial tenga como resultado un aumento dramático en el número de personas diagnosticadas con enfermedad de Parkinson (Pahwa and Lyons, 2010). En un 5-10% de los casos, sin embargo, se da un comienzo temprano de la enfermedad, entre los 20 y los 50 años de edad (Samii et al., 2004). Este comienzo precoz suele estar asociado con las formas heredables o familiares de la enfermedad, ligadas a mutaciones en genes específicos (Tansey et al., 2007) (ver sección 1.1.6.1).

1.1.2. Signos y síntomas

La enfermedad de Parkinson se caracteriza por cuatro signos cardinales: temblor en reposo, bradiquinesia (lentitud en los movimientos voluntarios), rigidez muscular e inestabilidad postural (Jankovic, 2008). El temblor es característico en las partes distales de las extremidades, pero se presenta también en otras partes del cuerpo, y suele desaparecer con la actividad o durante el sueño. Se presenta en aproximadamente el 75% de los pacientes. La bradiquinesia es el signo más

característico de la enfermedad de Parkinson, e implica una dificultad en el planeamiento, el inicio y la ejecución de los movimientos. La rigidez suele estar asociada a dolor, y el dolor de hombros suele ser una de las manifestaciones más tempranas de la enfermedad. La inestabilidad postural, debida a la pérdida de reflejos posturales, se manifiesta generalmente en los estadios tardíos de la enfermedad (Jankovic, 2008).

Otros signos y síntomas motores incluyen aquinesia (bloques en el movimiento o *freezing*), postura flexionada, disfagia (dificultad al tragar), hipofonía (tono suave al hablar), sialorrea (excesiva producción de saliva), problemas oftalmológicos (como aumento en el parpadeo, irritación en la superficie del ojo y alucinaciones visuales). Además de las clásicas manifestaciones motoras, esta patología se presenta también con signos y síntomas no motores. Entre ellos se observan alteraciones en las funciones autonómicas (hipotensión ortostática, disfunciones en la sudoración, constipación y problemas urinarios), alteraciones cognitivas y del comportamiento (demencia, apatía, ansiedad, alucinaciones, bradifrenia o lentitud del pensamiento, comportamiento obsesivo-compulsivo, comportamiento impulsivo), desórdenes del sueño y anormalidades sensoriales (disfunción olfatoria, parestesia o sensación de hormigueo, dolor) (Hamani and Lozano, 2003, Jankovic, 2008).

1.1.3. Fisiopatología

1.1.3.1. Neurodegeneración en la *substantia nigra*

La característica fisiopatológica cardinal de la enfermedad de Parkinson es la muerte progresiva de las neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra pars compacta*. Estas neuronas tienen sus cuerpos celulares en la *substantia nigra pars compacta* y extienden sus prolongaciones hacia el estriado, donde hacen sinapsis con las neuronas estriatales (circuito nigroestriatal) (Figura 1-1) (Tansey et al., 2007). Por lo tanto, la pérdida de neuronas en la *substantia nigra* tiene como consecuencia una disminución de dopamina en el estriado. Tanto la *substantia nigra* como el estriado forman parte de los ganglios de la base, que se encuentran asociados con diversas funciones, entre ellas el control motor (ver sección 1.1.3.4). De este modo, la degeneración del circuito nigroestriatal lleva a la aparición de los principales y más tempranos signos motores de la enfermedad (temblor, bradiquinesia y rigidez). Existen mecanismos compensatorios, como la hipersensibilidad de los receptores dopaminérgicos, de modo que los síntomas de la enfermedad se manifiestan cuando

hay una reducción de dopamina en el estriado de alrededor de un 80% o una pérdida de neuronas dopaminérgicas en la *substantia nigra* de un 60%. Estos signos y síntomas resultan de la deficiencia de dopamina en el estriado, por los que suelen ser (al menos en primera instancia) respondedores al tratamiento con levodopa (un precursor de la dopamina) y agonistas dopaminérgicos (ver sección 1.1.5) (Fahn, 2003).

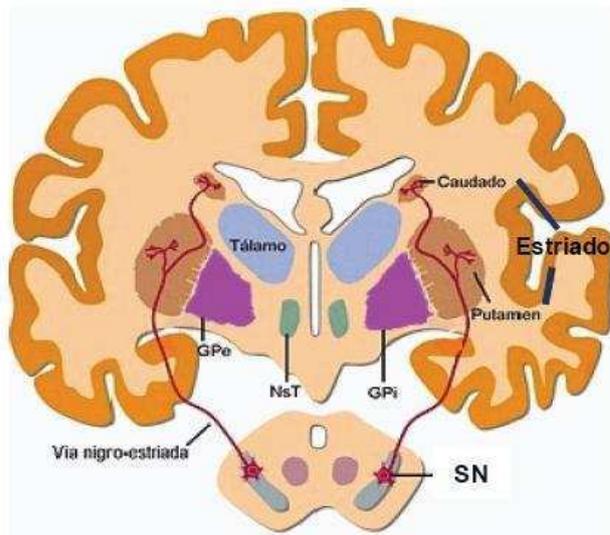


Figura 1-1. *Circuito nigroestriatal.* Las neuronas dopaminérgicas que tienen los somas en la *substantia nigra pars compacta* (SN) extienden sus prolongaciones hacia el estriado (formado por los núcleos caudado y putamen). Se muestra una representación de cortes coronales en la región de la *substantia nigra pars compacta* y del estriado. Adaptado de http://neuro-science.blogspot.com/2007_05_01_archive.html.

1.1.3.2. Disfunciones extra-nigrales

Sin embargo, como ocurre en otras enfermedades neurodegenerativas, la neuropatología de la enfermedad de Parkinson no se restringe a un sólo circuito, y se han descrito disfunciones en otros sistemas además del nigroestriatal (Vila and Przedborski, 2004). Hay sistemas no dopaminérgicos comprometidos (como el sistema noradrenérgico en el *locus coeruleus*, las neuronas colinérgicas del *nucleus basalis* y el sistema serotoninérgico del *raphe nuclei*) y de hecho existe evidencia de pérdida de neuronas, así como también de anomalías histológicas (como cuerpos de Lewy, que se describen más adelante), en otras regiones como el bulbo olfatorio, el nervio vago, la corteza, el hipocampo (región CA2), los ganglios simpáticos, el tálamo, la

amígdala y el tronco encefálico (Braak et al., 2003, Hamani and Lozano, 2003, Halliday and McCann, 2010). Esta disfunción extra-nigral es la causa más importante de la mayoría de los signos y síntomas no motores, así como también de algunas manifestaciones motoras como postura flexionada y pérdida de reflejos posturales. Por lo tanto, estos signos y síntomas generalmente no responden bien al tratamiento con levodopa y agonistas dopaminérgicos. Si bien algunas de estas manifestaciones no motoras pueden preceder los síntomas motores (como la anosmia o pérdida de olfato), típicamente los signos extra-nigrales son característicos de las etapas tardías de la enfermedad de Parkinson (Fahn, 2003, Schapira, 2009).

1.1.3.3. Cuerpos de Lewy

Otra característica neuropatológica de la enfermedad es la presencia de cuerpos de Lewy, inclusiones citoplasmáticas compuestas fundamentalmente por α -sinucleína que se observan en los cuerpos neuronales. Esta proteína, que se encuentra normalmente en las terminales pre-sinápticas, forma también filamentos anormales en los procesos neuronales, a los que se denomina neuritas de Lewy (Dickson et al., 2009). Estos cuerpos y neuritas de Lewy se han detectado tanto en la *substantia nigra* como en otras regiones. De hecho, se ha propuesto que estos agregados insolubles se depositan en primera instancia en regiones extra-nigrales y serían responsables de los primeras manifestaciones clínicas de la enfermedad (disfunciones olfatorias y autonómicas), que aparecerían incluso antes que los primeros síntomas motores más característicos del mal de Parkinson (Braak et al., 2003, Braak et al., 2006, Halliday and McCann, 2010).

Sin embargo, no todos los pacientes con enfermedad de Parkinson desarrollan cuerpos o neuritas de Lewy. Por ejemplo, se ha visto que los pacientes con una mutación homocigota en el gen de parkina, que desarrollan la enfermedad (ver sección 1.1.6.1), presentan neurodegeneración en la *substantia nigra* sin cuerpos de Lewy (Fahn, 2003).

1.1.3.4. Los ganglios basales

Los ganglios basales o ganglios de la base están compuestos por los núcleos caudado y putamen (a los que se denomina en su conjunto “estriado”), los segmentos externo e interno del globo pálido, el núcleo subtalámico y las porciones compacta y reticulada de la *substantia nigra*. Como se mencionó anteriormente, la principal región afectada

en la enfermedad de Parkinson es la *substantia nigra pars compacta*, a la que nos referiremos en adelante simplemente como *substantia nigra*.

Estas estructuras forman un circuito complejo dedicado al procesamiento de información proveniente de la corteza cerebral. El resultado de ese procesamiento es devuelto a la corteza a través de los núcleos talámicos. El procesamiento de la información cortical en los ganglios de la base es modulado en gran medida por la dopamina proveniente de la *substantia nigra*, hasta el punto de que déficits en la transmisión dopaminérgica tienen como consecuencia severos trastornos motores (Dvorkin, 2003).

El estriado es el principal punto de entrada de información proveniente de otras regiones del cerebro, principalmente la corteza, a los ganglios de la base (Figura 1-2). El estriado está constituido básicamente por neuronas gabaérgicas (inhibitorias) de proyección. Los núcleos de salida de los ganglios de la base son el segmento interno del globo pálido y la *substantia nigra pars reticulata*, cuyas neuronas gabaérgicas, proyectan al tálamo, el cual a su vez tiene fuertes proyecciones excitatorias a la corteza motora. El estriado influye sobre los núcleos de salida de los ganglios de la base a través de dos circuitos. En la vía directa, una subpoblación de neuronas estriatales (que además de GABA sintetizan sustancia P) proyecta al segmento interno del globo pálido y la *substantia nigra pars reticulata*. En la vía indirecta, otra subpoblación de neuronas del estriado (que sintetizan GABA y encefalinas) proyecta al segmento externo del globo pálido, el cual a su vez proyecta al núcleo subtalámico, que lo hace sobre el segmento interno del globo pálido y la *substantia nigra pars reticulata* (Dvorkin, 2003) (Figura 1-2).

Distintas evidencias sugieren que los ganglios de la base participan en la selección e iniciación de respuestas motoras voluntarias. Esta estructura participaría en la detección de claves ambientales beneficiosas, y dispararía la respuesta conductual que permita acceder al beneficio. Asimismo, los ganglios de la base estarían involucrados en el aprendizaje y selección de los patrones conductuales más apropiados para un determinado contexto ambiental y motivacional (Dvorkin, 2003).

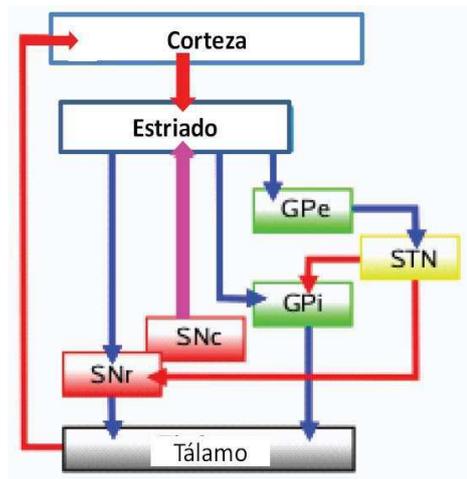


Figura 1-2. *Los ganglios de la base.* Los ganglios basales están compuestos por el estriado, los segmentos externo e interno del globo pálido (GPe y GPi), el núcleo subtalámico (STN) y las porciones compacta y reticulada de la *substantia nigra* (SNc y SNr). El diagrama muestra los circuitos glutamatérgicos excitatorios en rojo, los circuitos gabaérgicos inhibitorios en azul y los dopaminérgicos moduladores en rosa. Adaptado de http://www.absoluteastronomy.com/topics/Basal_ganglia.

1.1.4. Diagnóstico

No existen pruebas o exámenes concluyentes para el diagnóstico de la enfermedad de Parkinson, por lo que el diagnóstico se basa en criterios clínicos. Históricamente, la confirmación patológica de cuerpos de Lewy en la autopsia se consideraba el criterio estándar para el diagnóstico definitivo. Sin embargo, esto se encuentra en discusión, debido a que, como se mencionó anteriormente, existen casos de enfermedad de Parkinson sin cuerpos de Lewy (Jankovic, 2008).

En la práctica médica, el diagnóstico diferencial se realiza basándose en la presencia de una combinación de los signos cardinales de la enfermedad (temblor, bradiquinesia, rigidez e inestabilidad postural), así como de manifestaciones clínicas asociadas. Son también importantes para el diagnóstico los signos y síntomas de exclusión, que descartan el diagnóstico de Parkinson. La respuesta a levodopa es también un indicio importante de que se está frente a un caso de esta enfermedad. Distintas organizaciones (como UK Parkinson's Disease Society Brain Bank and The National Institute of Neurological Disorders and Stroke) han desarrollado criterios diagnósticos, con el objetivo de facilitar y estandarizar el diagnóstico (Jankovic, 2008).

1.1.5. Tratamiento

Es importante destacar que el tratamiento de la enfermedad de Parkinson es en la actualidad meramente sintomático. No existen terapias neuroprotectoras, que enlentescan o detengan el curso de la enfermedad; y tampoco existe ninguna terapia regenerativa.

El principal enfoque para tratar esta enfermedad consiste en una terapia de reemplazo dopaminérgico, utilizando fundamentalmente levodopa (L-3,4-dihidroxifenilalanina) y agonistas dopaminérgicos. La dopamina no cruza la barrera hematoencefálica, por lo que se administra levodopa, que es el precursor inmediato de la dopamina, y es capaz de atravesar la barrera por transporte facilitado. La levodopa es la droga oral más potente para el tratamiento de los síntomas motores de la enfermedad de Parkinson (Schapira, 2009). Desafortunadamente, el tratamiento crónico con levodopa está acompañado por el desarrollo de severos efectos motores adversos. Después de un período de máximo beneficio que dura generalmente de tres a cinco años, suele observarse una pérdida de efectividad (en alrededor del 60% de los pacientes inicialmente respondedores), fluctuaciones en el control de los síntomas y disquinesias. Las disquinesias se desarrollan en un 60-80% de los pacientes, y se caracterizan por ser movimientos involuntarios y caóticos, principalmente de la boca, las mejillas, la cara y las extremidades (Hagan et al., 1997). No se conocen las causas por las que aparecen estos efectos adversos, pero pueden ser tan incapacitantes como los síntomas mismos de la enfermedad. Como alternativa, pueden emplearse agonistas dopaminérgicos. Los efectos secundarios de la levodopa y los agonistas dopaminérgicos incluyen náuseas, hipotensión, sueños vívidos, edemas en las piernas, alucinaciones (especialmente en los pacientes mayores, con problemas cognitivos) y somnolencia (estos tres últimos son menos comunes al emplear levodopa que agonistas dopaminérgicos) (Samii et al., 2004).

También existe la posibilidad de un tratamiento quirúrgico. La principal estrategia quirúrgica consiste en la supresión de la actividad neuronal anormal en los circuitos de los ganglios basales. Esto se puede lograr lesionando la estructura involucrada, o bien bloqueando la actividad patológica mediante una estimulación eléctrica constante, llamada estimulación cerebral profunda (o *deep-brain stimulation*). Esta última suele ser la opción más utilizada, debido principalmente a su carácter reversible. Estas intervenciones se realizan principalmente a nivel del tálamo, el globo pálido y el núcleo subtalámico (Hamani and Lozano, 2003).

Por otro lado, el tratamiento de los síntomas no motores de la enfermedad es muy limitado, pero existen intervenciones farmacológicas que pueden ser de ayuda en ciertos casos (Schapira, 2009).

1.1.6. Etiología

1.1.6.1. Forma familiar de la enfermedad de Parkinson

Sólo en un 5-10% de los casos de enfermedad de Parkinson se han descrito mutaciones en genes específicos como causantes de la enfermedad. Se han identificado mutaciones en los genes de α -sinucleína, quinasa 2 con repeticiones ricas en leucina (LRRK2, del inglés *leucine-rich repeat kinase 2*), parkina, quinasa inducida por PTEN (PINK1, del inglés *PTEN-induced putative kinase-1*), DJ-1, y ubiquitina hidrolasa carboxi-terminal L1 (UCH-L1, del inglés *ubiquitin C-terminal hydrolase-L1*). La proteína α -sinucleína se encuentra normalmente en las terminales pre-sinápticas, y estaría involucrada en el tráfico intracelular en el retículo endoplasmático/Golgi. Se han descrito tres mutaciones puntuales en el gen de α -sinucleína, que se relacionan con una enfermedad de Parkinson familiar o monogénica, que se heredan en forma autosómica dominante. También se han encontrado duplicaciones y triplicaciones de este *locus* en distintos grupos con mal de Parkinson familiar. La inyección de vectores virales que sobre-expresan α -sinucleína endógena o mutante en el sistema nigroestriatal de ratas y monos produjo neurodegeneración asociada con cuerpos de Lewy. Estas observaciones sugieren que las mutaciones en el gen de α -sinucleína operan por un mecanismo tóxico de ganancia de función. También se han identificado varias mutaciones en LRRK2 que producen mal de Parkinson que se hereda en forma dominante. Esta es una proteína larga con múltiples dominios ubicada en estructuras membranosas, que jugaría un rol en el crecimiento neuronal. La mutación más común tiene una frecuencia de un 4% en los pacientes con Parkinson. Por su lado, mutaciones con pérdida de función en el gen de parkina producen una forma del mal de Parkinson que se hereda de manera recesiva. La parkina es una E3 ubiquitina ligasa. El comienzo de la enfermedad de Parkinson relacionada con parkina suele ocurrir antes de los 30 años de edad, y se caracteriza por estar asociada a pérdida de las neuronas nigroestriatales, pero típicamente no se observan cuerpos de Lewy. A su vez, mutaciones recesivas en PINK1 también son responsables de una forma familiar de parkinsonismo de comienzo temprano. Se trata de una quinasa mitocondrial, y once

de las catorce mutaciones reportadas caen en el dominio quinasa. Por otro lado, DJ-1 es un regulador positivo de la transcripción dependiente del receptor de andrógenos; y tendría también funciones antioxidantes. Se han descrito once mutaciones que afectan DJ-1, que se han relacionado a una forma autosómica recesiva de la enfermedad. Finalmente, se ha encontrado una mutación dominante de UCH-L1, que es una hidrolasa C-terminal de ubiquitina, que ha sido relacionada con el desarrollo de Parkinson familiar (Vila and Przedborski, 2004, Schapira, 2009, Dawson et al., 2010). Por lo tanto, las alteraciones genéticas observadas en las formas familiares de la enfermedad de Parkinson sugieren como posibles mecanismos de la muerte neuronal la disfunción mitocondrial y el daño oxidativo, así como también un sistema de degradación de proteínas defectuoso y acumulación de proteínas mal plegadas. De hecho, estos mecanismos podrían estar interconectados, ya que se ha propuesto que una de las formas por las que los agregados de α -sinucleína producen toxicidad sería mediante una disfunción mitocondrial (Dauer and Przedborski, 2003, Dawson et al., 2010).

1.1.6.2. Forma esporádica de la enfermedad de Parkinson

En la gran mayoría de los casos de enfermedad de Parkinson no se han podido identificar mutaciones responsables de la enfermedad. De este modo, la etiología o causa de la enfermedad en estos casos es desconocida, y se habla de mal de Parkinson idiopático, esporádico o no familiar.

Diversos estudios epidemiológicos han relacionado la exposición a ciertas toxinas con la enfermedad de Parkinson. Estas toxinas incluyen pesticidas, como el herbicida paraquat, el insecticida rotenona y el fungicida maneb (Brown et al., 2006, Dick, 2006, Abdulwahid Arif and Ahmad Khan, 2010). Tal vez la evidencia más directa de una toxina ambiental como causante del mal de Parkinson está relacionada con el 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP). El MPTP es un producto secundario de la síntesis ilegal de 1-metil-4-fenil-4-propionpiperidina (MPPP), una droga sintética con efectos opioides similares a los de la meperidina. En los años 80 se observó en Estados Unidos que un grupo de adictos que había consumido esta droga desarrolló un síndrome que se manifestaba como el mal de Parkinson, tanto clínica como patológicamente (Olanow and Tatton, 1999). Además de las evidencias epidemiológicas, existen observaciones experimentales que vinculan estas toxinas con la enfermedad de Parkinson. Todas ellas, al ser administradas en animales, inducen características patológicas similares a las observadas en el mal de Parkinson, y de

hecho se utilizan para generar modelos animales de la enfermedad (Bove et al., 2005) (ver sección 1.1.8).

Por lo tanto, si bien existen casos en los que se ha identificado un único factor, ya sea ambiental o genético, como causa de la enfermedad, en la gran mayoría de los pacientes con enfermedad de Parkinson la etiología es desconocida, como se mencionó anteriormente. La visión actual más aceptada es que las causas de la enfermedad son multifactoriales, con predisposiciones genéticas y factores ambientales como factores definitorios en el inicio y la progresión de la enfermedad (Nagatsu and Sawada, 2006, Tansey et al., 2007).

1.1.7. Patogénesis

Más allá de la/s causa/s que llevan a desarrollar el mal de Parkinson, se han descrito distintos factores que juegan un rol importante en la patogénesis de la enfermedad.

Existen evidencias de disfunción mitocondrial, con una disminución específica del 30-40% de la actividad catalítica del complejo I de la cadena de transporte de electrones, en la *substantia nigra* de pacientes y modelos animales de la enfermedad. El defecto en el complejo I mitocondrial podría contribuir a la muerte neuronal mediante la producción de radicales libres, o bien por una disminución en la síntesis de ATP, causando una falla bioenergética en la célula, y en última instancia la inducción de apoptosis (Olanow and Tatton, 1999, Abdulwahid Arif and Ahmad Khan, 2010).

Por otro lado, se ha observado en forma consistente y sistemática inflamación en el cerebro, o neuroinflamación, tanto en pacientes como en modelos animales de Parkinson. Esta neuroinflamación está caracterizada por activación de la microglía, producción de citoquinas pro-inflamatorias, especies reactivas de oxígeno y otros mediadores que pueden producir daño y muerte celular. Este aspecto será discutido con mayor profundidad en la sección 1.2.4.

El estrés oxidativo podría revestir gran importancia en la enfermedad de Parkinson, debido a las características particulares de las neuronas dopaminérgicas. El metabolismo de la dopamina produce peróxido de hidrógeno y radicales superóxido, y la auto-oxidación de la dopamina produce dopamina-quinona, una molécula capaz de inducir daño en las proteínas al reaccionar con sus residuos de cisteína. El estrés oxidativo puede ser consecuencia de los defectos en el complejo I de la cadena de transporte de electrones mitocondrial o de procesos inflamatorios, así como también de un aumento en la tasa de recambio (*turnover*) de la dopamina o una disminución en los niveles de glutatión (un importante agente antioxidante que se ha encontrado

disminuido en la *substantia nigra* de pacientes de Parkinson) (Olanow and Tatton, 1999, Dauer and Przedborski, 2003).

1.1.8. Modelos animales

Los modelos animales de enfermedad de Parkinson más utilizados son los inducidos por toxinas, entre los que encuentran los producidos por las neurotoxinas 6-hidroxdopamina (6-OHDA), MPTP, rotenona y paraquat.

La 6-OHDA posee una estructura similar a la dopamina y la norepinefrina, por lo que es capaz de entrar en las neuronas dopaminérgicas y noradrenérgicas, tanto en el sistema nervioso central como periférico, infligiendo daño neuronal. En cuanto a su mecanismo de acción, la 6-OHDA induce la muerte en las neuronas por un efecto combinado de especies reactivas de oxígeno y quinonas. Al disolverse en un ambiente aeróbico, la 6-OHDA se oxida, produciendo peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y paraquinona. El modelo más utilizado consiste en inyectar la toxina en forma intracerebral y unilateral. Para dañar específicamente el sistema nigroestriatal, la inyección se realiza en la *substantia nigra*, el fascículo prosencefálico medial (MFB, del inglés medial forebrain bundle) o el estriado. Al realizar la inyección en la *substantia nigra* o el MFB, las neuronas dopaminérgicas comienzan a morir dentro de las primeras 24 hs. Los niveles de dopamina en el estriado alcanzan la máxima reducción luego de tres o cuatro días, y en casi todos los estudios el contenido de dopamina es menos del 20% con respecto a los controles. Cuando se inyecta en el estriado, la 6-OHDA produce un daño más progresivo, con una degeneración retrógrada del sistema nigroestriatal, que puede llevar de una a tres semanas. La gliosis es una característica prominente del modelo de 6-OHDA. No se ha podido demostrar la formación de cuerpos de Lewy en este modelo, siendo ésta una de sus principales deficiencias. Esta neurotoxina se ha empleado principalmente para generar modelos en ratas, pero también se ha usado en ratones y monos (Sauer and Oertel, 1994, Bove et al., 2005).

Otro modelo ampliamente utilizado es el que emplea la toxina MPTP, que es un inhibidor del complejo I de la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Este modelo se ha utilizado en una gran variedad de especies, desde primates hasta invertebrados. Se ha usado ampliamente en primates no humanos, ratones y ratas; e incluso existen datos en humanos, que se intoxicaron accidentalmente con este compuesto (ver sección 1.1.6.2). Tanto en humanos como en monos, la neuropatología indica que el MPTP causa un daño en el sistema nigroestriatal idéntico al que se observa en la enfermedad de Parkinson. Se manifiesta también con temblor,

bradiquinesia y rigidez muscular. La administración de MPTP por diferentes rutas y usando distintos regímenes de dosis ha llevado al desarrollo de una serie de modelos, cada uno con características bioquímicas y comportamentales propias. La ruta de administración más usada en monos y ratones es la sistémica (subcutáneo, intramuscular, intraperitoneal o intravenoso). Las ratas son relativamente más resistentes a esta toxina, por razones que no están claras, y la forma de administración más común es la infusión intracerebral. Numerosos estudios en ratas, y sobre todo en ratones, muestran que el MPTP causa daño al sistema nigroestriatal con la aparición de síntomas motores. Como en el caso de la 6-OHDA, no se han detectado en forma convincente cuerpos de Lewy en el parkinsonismo inducido por MPTP. Además, los modelos que utilizan MPTP tienen como desventaja su alta variabilidad según la cepa de animal a utilizar, la posible reversibilidad del daño neuronal y el riesgo para el operador, ya que es una toxina activa en humanos (Przedborski et al., 2001, Bove et al., 2005).

A diferencia de lo observado en los modelos que emplean 6-OHDA y MPTP, en animales tratados con rotenona y paraquat se han observado inclusiones de proteínas en las neuronas, que como los cuerpos de Lewy contienen α -sinucleína. La rotenona es también un inhibidor del complejo I mitocondrial, y si bien el mecanismo exacto de acción del paraquat no es conocido, se sabe que ejerce sus efectos mediante estrés oxidativo. Ambas toxinas suelen administrarse en forma sistémica. En ambos modelos se ha reportado una pérdida de neuronas dopaminérgicas en la *substantia nigra* y una disminución de dopamina en el estriado, acompañados por síntomas motores. Sin embargo, estos modelos son poco reproducibles, por lo que será necesario un mayor esfuerzo para establecerlos en forma sistemática. Por otro lado, se ha reportado que el fungicida maneb es capaz de potenciar los efectos del paraquat en el sistema nigroestriatal de ratones (Bove et al., 2005, Abdulwahid Arif and Ahmad Khan, 2010).

1.2. Neuroinflamación

1.2.1. Privilegio inmunológico en el sistema nervioso central

El sistema nervioso central (SNC) ha sido considerado un sitio inmunológicamente privilegiado por largo tiempo. Inicialmente, este inmunoprivilegio se concebía como una falta de respuesta inmune en el SNC, dada por el aislamiento del sistema inmunológico por la barrera hematoencefálica, la ausencia de sistema linfático y una

microglía aparentemente inmunoincompetente. Actualmente, ha cambiado dramáticamente esta visión, y existen numerosas evidencias de que el SNC no está aislado ni es pasivo en su interacción con el sistema inmune. Los leucocitos de la periferia pueden cruzar la barrera hematoencefálica intacta, se observan antígenos del SNC en los ganglios linfáticos cervicales y el líquido cefalorraquídeo, y la microglía es claramente inmunocompetente, capaz de activarse y secretar diversos factores frente a variados estímulos pro-inflamatorios. También se ha observado que la barrera hematoencefálica es capaz de transportar en forma activa citoquinas desde la periferia, a través de transportadores específicos. 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. De este modo, determinados estímulos producen en el SNC una robusta respuesta inmune que se asemeja en algunos factores, y difiere en otros, de la observada en la periferia (Carson et al., 2006, Quan and Banks, 2007). La respuesta inmune en las meninges, los ventrículos y el plexo coroideo es muy similar a la observada en la periferia. Estas regiones tienen todos los componentes celulares, vasculares y linfáticos del sistema inmunológico periférico, incluyendo células dendríticas (Lowenstein et al., 2007). Sin embargo, en el parénquima cerebral, la respuesta inmune muestra algunas características particulares que difieren de lo observado en la periferia, como patrones diferentes de reclutamiento leucocitario, una red de citoquinas alterada, y una respuesta menos extendida y más difícil de iniciar (Anthony et al., 1997a, Anthony et al., 1997b, Blond et al., 2002). Por ejemplo, luego de la inyección de LPS, TNF- α o IL-1 β en la periferia, se observa un rápido reclutamiento de neutrófilos y macrófagos. Sin embargo, hay evidencias de que en el SNC IL-1 β recluta principalmente neutrófilos, mientras que TNF- α recluta casi exclusivamente macrófagos (Anthony et al., 1997b, Blond et al., 2002, Ferrari et al., 2004, Depino et al., 2005, Ferrari et al., 2006). Por otra parte, una respuesta inflamatoria innata en el parénquima cerebral no lleva necesariamente a una activación de una respuesta inmune adaptativa. De hecho, el parénquima no posee células dendríticas ni un sistema linfático convencional (Lowenstein et al., 2007).

1.2.2. Componentes celulares

La neuroinflamación es una respuesta compleja a injurias en el SNC, que involucra activación de la glía, reclutamiento de células inmunes de la periferia y la liberación de

mediadores inflamatorios en el parénquima cerebral (este último punto se discutirá con más detalle en la sección 1.2.3).

La microglía y los astrocitos, junto con los oligodendrocitos, conforman las células gliales del cerebro. Estas células cumplen una gran variedad de funciones: los oligodendrocitos forman la capa de mielina sobre los axones, y la microglía y astrogía tienen roles que incluyen participar de la respuesta inmune, modular la neurotransmisión, y proveer soporte, nutrientes y oxígeno a las neuronas.

La microglía, junto con los macrófagos perivasculares, constituyen los macrófagos residentes en el SNC. Las células de la microglía derivan de un precursor mieloide, que entra al SNC durante el desarrollo embrionario (Perry et al., 2010). Estas células constituyen el 10% de las células de la glía. Se caracterizan por tener una vida extremadamente larga, y una muy baja tasa de división celular local mantiene el número de células microgliales residentes en el cerebro normal de roedores. En cambio, los macrófagos perivasculares muestran una rápida tasa de recambio. La microglía en reposo se caracteriza por su morfología alargada y ramificada, con finos y largos procesos que forman una red en el parénquima cerebral (Perry et al., 2010). Aunque se habla de que la microglía se encuentra normalmente “en reposo”, estas células ejercen una vigilancia inmunológica constante, y continuamente exploran el microambiente con procesos altamente móviles (Nimmerjahn et al., 2005). La microglía sería la primera línea de defensa del SNC. Prácticamente cualquier manipulación o injuria que perturbe la homeostasis del cerebro tiene como consecuencia la activación de la microglía. De este modo, estas células pasan de un fenotipo en reposo a un fenotipo activado, que se caracteriza por cambios morfológicos y síntesis *de novo* de una variedad de moléculas de superficie y citoplasmáticas, y adquieren finalmente capacidad fagocítica (Perry et al., 2010). Morfológicamente, esta activación se caracteriza por una hipertrofia del cuerpo celular, un ensanchamiento de los procesos proximales y una reducción de las ramificaciones distales. Se han descrito cuatro estadios de activación en base a la morfología celular. En el estadio 1, o microglía en reposo, las células tienen un soma alargado y procesos finos y ramificados. En el estadio 2 (microglía activada ramificada) el cuerpo celular continúa siendo alargado (aunque comienza a detectarse la hipertrofia), y los procesos son más anchos. En el estadio 3, la microglía tiene una morfología ameboide, con un cuerpo redondeado, y procesos cortos y gruesos. En el estadio 4, son células redondas, y no pueden observarse procesos en el microscopio óptico. Estas células redondas tienen capacidad fagocítica (Kreutzberg, 1996, Ferrari et al., 2006) (Figura 1-3). Por otro lado, una de las moléculas cuya expresión aumenta en la microglía activada es el complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC, del

inglés *major histocompatibility complex*, clase II) (Kim and Joh, 2006). Los niveles de esta molécula, así como del MHC clase I, son particularmente bajos en el SNC en condiciones normales (McMenamin and Wood, 2010) y en la microglía en reposo, por lo que se utiliza como marcador de activación (Ferrari et al., 2006).

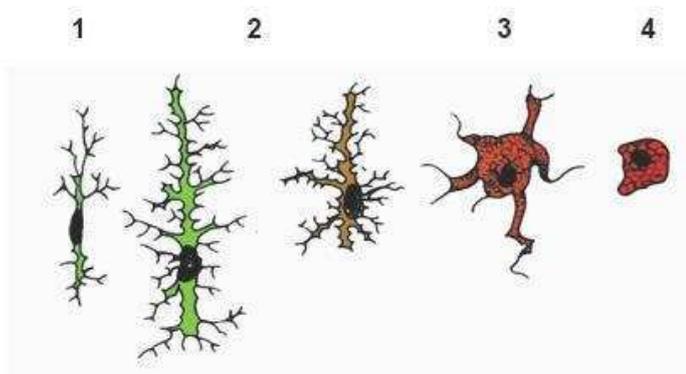


Figura 1-3. Activación morfológica de la microglía. Frente a muy diversos estímulos, la microglía es capaz de activarse, modificando su morfología. Se muestran los cuatro estadios de activación de la microglía, en base a sus cambios morfológicos. Modificado de Kreutzberg et al., 1996.

Los astrocitos son las células gliales más abundantes, y constituyen el 20-50% del volumen cerebral, superando en más de cinco veces al número de neuronas. Son células de origen ectodérmico, con una morfología típicamente estrellada, con múltiples procesos finos y ramificados. Estas células se encuentran distribuidas en todo el SNC, y ejercen variadas funciones de gran importancia en el cerebro sano. Entre ellas se encuentran regular el flujo sanguíneo, mantener la concentración de iones y el pH, proveer de nutrientes a las neuronas y formar parte de la barrera hematoencefálica. También tienen funciones en el desarrollo y roles en la función sináptica (por liberación de gliotransmisores en respuesta a actividad sináptica neuronal, los cuales pueden a su vez alterar la excitabilidad neuronal). Los astrocitos responden a todo tipo de daño en el SNC mediante un proceso que se denomina “astroglisis reactiva”. Los astrocitos reactivos aumentan la expresión de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP, del inglés *glial fibrillary acid protein*) y otros genes, modifican su morfología y migran al sitio de la injuria. En los casos más leves de astroglisis no se observa proliferación, que sí puede darse en los casos más severos. En estos últimos puede ocurrir una reorganización estructural del tejido, que lleva a la formación de una cicatriz. La expresión de GFAP se ha transformado en el marcador prototípico para identificar astrocitos por inmunohistoquímica. Sin embargo, es importante tener

en cuenta que muchos astrocitos del SNC sano no expresan GFAP; además la expresión de este marcador presenta una gran variabilidad regional, y es dinámicamente regulado por diversas señales (Sofroniew and Vinters, 2010).

Si bien el rol de la microglía es beneficioso en cuanto a la defensa ante distintos tipos de injuria y remoción de restos celulares, e incluso se ha reportado que puede producir factores tróficos como el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF, del inglés *brain-derived neurotrophic factor*), frente a estímulos prolongados o exacerbados puede tornarse perjudicial, con producción de agentes nocivos para las neuronas como especies reactivas de oxígeno (ver secciones 1.2.3 y 1.2.4). Por su lado, la astrogliía ha sido ligada clásicamente a un rol neurotrófico o protector, y de hecho existe una amplia evidencia de que los astrocitos son capaces de secretar factores tróficos para las neuronas, como el factor neurotrófico derivado de una línea celular glial (GDNF, del inglés *glial cell-line-derived neurotrophic factor*), el factor neurotrófico derivado de astrocitos mesencefálicos (MANF, del inglés *mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor*) y BDNF (McGeer and McGeer, 2008). Sin embargo, se ha observado que son capaces también de inducir inflamación y especies reactivas de oxígeno, como se detalla en la siguiente sección. Por lo tanto, el efecto final de cada tipo celular dependerá del contexto en el que se desarrolle la respuesta.

En los procesos inflamatorios del SNC, la activación de microglía y astrocitos suele estar acompañada por un aumento en el número de leucocitos infiltrantes. Generalmente estas células entran al cerebro por ruptura de la barrera hematoencefálica, aunque (como ya se mencionó) los leucocitos pueden entrar al SNC a través de una barrera intacta. Estas células inmunes provenientes de la periferia son también capaces de liberar distintos mediadores, y pueden jugar un rol importante en la respuesta inflamatoria del cerebro (Hein and O'Banion, 2009). Es interesante destacar que en un contexto de neuroinflamación, incluso las neuronas son capaces de liberar mediadores inflamatorios, como citoquinas y prostaglandinas (Kim and Joh, 2006, Hein and O'Banion, 2009).

1.2.3. Mediadores moleculares

Las citoquinas son mediadores clave de la respuesta inmune, tanto innata como adaptativa. Son un amplio y heterogéneo grupo de proteínas y polipéptidos que regulan la comunicación intercelular. Se caracterizan por ser altamente pleiotrópicos, y sus efectos finales dependen de múltiples factores, como el estímulo recibido y el contexto celular (Trotta, 1991). Distintos tipos celulares, como leucocitos infiltrantes,

microglía, astrogliá y neuronas, han sido identificados como fuentes de citoquinas en el SNC. La microglía y la astrogliá secretan citoquinas pro-inflamatorias, como TNF- α , interleuquina-6 (IL-6), interleuquina-1 beta (IL-1 β) e interferón gama (IFN γ) durante la respuesta inflamatoria del SNC. Sin embargo, se ha observado que también son capaces de producir citoquinas con actividad anti-inflamatoria, como interleuquina-10 (IL-10), factor de crecimiento tumoral beta (TGF- β , del inglés *transforming growth factor beta*) y el antagonista del receptor de IL-1 (IL-1Ra) (Tansey et al., 2008). La liberación de mediadores anti-inflamatorios podría estar relacionada con la supresión de la respuesta pro-inflamatoria, para prevenir los efectos potencialmente detrimentales de una inflamación prolongada o exacerbada (Tansey et al., 2007).

Otros componentes moleculares presentes durante un proceso inflamatorio en el cerebro son las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. Luego de ser activada, la microglía es capaz de ejercer toxicidad celular y actividad antimicrobiana produciendo y liberando productos derivados del oxígeno y el nitrógeno, a través de lo que se conoce como estallido respiratorio (*respiratory burst*). Este mecanismo de las células fagocíticas se basa en la inducción regulada de varios sistemas enzimáticos, entre los que se encuentran la NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida) oxidasa, la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y la mieloperoxidasa (MPO), llevando a la producción de anión superóxido (O₂⁻), óxido nítrico (NO, del inglés *nitric oxide*) y ácido hipocloroso (HOCl). Estas especies pueden combinarse y reaccionar para producir otras especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, que pueden producir daño celular. También se han encontrado niveles altos de MPO e iNOS en astrocitos, por lo que este tipo celular estaría también relacionado con la producción de especies reactivas potencialmente dañinas para las neuronas (Hirsch and Hunot, 2009).

Otra molécula clásicamente ligada a procesos inflamatorios es la ciclooxigenasa (COX). Existen dos isoformas de esta enzima: una variante constitutiva, la ciclooxigenasa tipo 1 (COX-1), y otra inducible, la tipo 2 (COX-2). Se ha descrito una tercer isoforma, COX-3, que es una variante de *splicing* alternativo de COX-1. Aunque la expresión basal de COX-2 en el cerebro es particularmente alta (y jugaría un rol en la regulación sináptica) (Kaufmann et al., 1996), se ha visto que sus niveles aumentan en el SNC frente a una gran variedad de injurias, entre ellas diversos estímulos pro-inflamatorios (Yang and Chen, 2008). COX cataliza la conversión de ácido araquidónico y oxígeno molecular a prostaglandinas, produciendo radicales libres de oxígeno en el proceso (Strauss, 2008). Las prostaglandinas son moléculas pro-inflamatorias, que cumplen múltiples funciones entre las se encuentran controlar la temperatura corporal, inducir vasodilatación, controlar la agregación plaquetaria y la permeabilidad vascular; también actúan como quemoquinas y participan de la

percepción de dolor (Tzeng et al., 2005, Strauss, 2008). Tanto la microglía y la astrogliía activadas como las neuronas son capaces de liberar distintos tipos de prostaglandinas frente a diversos estímulos (Hein and O'Banion, 2009). La ciclooxigenasa es el blanco directo de los anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs, o NSAIDs, del inglés *non-steroidal anti-inflammatory drugs*), como el ibuprofeno y la aspirina (Hirsch and Hunot, 2009).

1.2.4. Neuroinflamación y enfermedad de Parkinson

En los últimos años se ha acumulado extensa evidencia de que la neuroinflamación podría jugar un rol esencial en la patogénesis de la enfermedad de Parkinson, contribuyendo a la cascada de eventos que llevan a la degeneración neuronal (Marchetti and Abbracchio, 2005, Nagatsu and Sawada, 2005, Ferrari et al., 2006, Nagatsu and Sawada, 2006, Hunter et al., 2007, Tansey et al., 2007, Whitton, 2007, Wilms et al., 2007, Agnati et al., 2008, Fuxe et al., 2008, Godoy et al., 2008, McGeer and McGeer, 2008, Tansey et al., 2008, Amor et al., 2010, Perry et al., 2010, Pott Godoy et al., 2010, Tansey and Goldberg, 2010). Estos datos sugieren que la inflamación en el cerebro no es sólo una consecuencia de la neurodegeneración, sino que participaría en la progresión de la muerte neuronal produciendo moléculas tóxicas. De este modo, más allá del factor iniciador de la enfermedad, la neuroinflamación contribuiría a la progresión de la misma (Godoy et al., 2008, Hirsch and Hunot, 2009, Glass et al., 2010). Entre las evidencias que sugieren un rol de la neuroinflamación en la progresión de la enfermedad de Parkinson se encuentran datos que muestran una mayor susceptibilidad de la *substantia nigra* a la inflamación con respecto a otras regiones del cerebro, estudios hechos en pacientes y en modelos animales de la enfermedad que muestran marcadores de inflamación, y evidencias epidemiológicas que vinculan la inflamación y el mal de Parkinson, como se discutirá en detalle a continuación.

La microglía no se distribuye en forma uniforme en las distintas regiones del cerebro, y la *substantia nigra* es la zona con mayor densidad de estas células gliales (Lawson et al., 1990, Kim et al., 2000). A su vez, se ha reportado una mayor susceptibilidad de la *substantia nigra* a la neurotoxicidad inducida por lipopolisacárido (LPS), un componente de las bacterias Gram negativas que es un fuerte inductor de citoquinas. Al inyectar el LPS o endotoxina bacteriana en el hipocampo, la corteza y la *substantia nigra* de ratas adultas, sólo se observó neurodegeneración en esta última región, a pesar de que la dosis empleada en el hipocampo y la corteza era el doble que la

usada en la *substantia nigra* (Kim et al., 2000). Se obtuvieron resultados similares al repetir el experimento en cultivos mixtos de neuronas y glía del hipocampo, corteza y mesencéfalo de rata. Y al complementar los cultivos mixtos de corteza con una mayor cantidad de microglía, éstos se tornaron sensibles al LPS, observándose muerte neuronal (Kim et al., 2000). Por otro lado, como ya se mencionó, las neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra* son especialmente propensas a sufrir daño oxidativo, ya que el metabolismo de la dopamina produce especies reactivas de oxígeno, lo que puede tener como consecuencia la formación de dopamina-quinona, una molécula capaz de inducir daño en las proteínas (Dauer and Przedborski, 2003). Asimismo, la dopamina-quinona puede formarse también como consecuencia de la acción de COX-2, que al catalizar la síntesis de prostaglandina H utiliza a la dopamina como co-factor, oxidándola a dopamina-quinona (la acción de COX-2 se discutirá en detalle en la sección 1.4.2).

Por otro lado, se ha observado en forma sistemática activación de la microglía en la *substantia nigra* de pacientes con enfermedad de Parkinson, tanto en estudios no invasivos por imágenes utilizando tomografía por emisión de positrones (PET, del inglés *positron emission tomography*), realizado en pacientes en la fase temprana de la enfermedad que no habían recibido ningún medicamento (Ouchi et al., 2009), como en muestras *post mortem* (McGeer et al., 1988, Langston et al., 1999, Mirza et al., 2000, Imamura et al., 2003). También se ha observado activación de la microglía en forma consistente en la *substantia nigra* de modelos animales de la enfermedad, en distintas especies y utilizando diferentes modelos, como 6-OHDA, MPTP y rotenona (Cicchetti et al., 2002, Gao et al., 2002a, Depino et al., 2003, Sherer et al., 2003, Sugama et al., 2003)(revisado en McGeer and McGeer, 2008, Hirsch and Hunot, 2009, Perry et al., 2010).

Por su parte, no se ha podido encontrar astrogliosis en forma tan consistente en pacientes con enfermedad de Parkinson o en modelos animales. Si bien Damier y colaboradores reportaron un aumento de un 30% en la densidad de astrocitos en muestras *post mortem* de *substantia nigra* de pacientes con mal de Parkinson (Damier et al., 1993), y también hay reportes de astrogliosis en modelos animales de la enfermedad (Gordon et al., 1997, Kohutnicka et al., 1998), otros autores no pudieron confirmar estas observaciones en estudios hechos tanto en pacientes como en modelos animales (Banati et al., 1998, Mirza et al., 2000, Depino et al., 2003).

También se ha reportado un aumento de diversos mediadores inflamatorios en el líquido cefalorraquídeo (lumbar o ventricular) y en muestras *post mortem* de estriado de pacientes con enfermedad de Parkinson. Entre estas moléculas se encuentran TNF- α (Mogi et al., 1994b), IL-6, IL-1 β , IL-2 y TGF- α (Mogi et al., 1994a, Blum-Degen

et al., 1995, Mogi et al., 1996a, Mogi et al., 1996b). Asimismo se ha observado un aumento de TNF- α , IL-1 β , e IFN γ en muestras *post mortem* de *substantia nigra* de pacientes (Hunot et al., 1999).

Existen también estudios epidemiológicos que apoyan el rol de los procesos neuroinflamatorios en la progresión de la enfermedad de Parkinson. Estudios prospectivos realizados en una cohorte grande (de aproximadamente 180000 hombres y mujeres) en Estados Unidos, mostraron que el riesgo de contraer la enfermedad era menor en gente que tomaba regularmente ibuprofeno (siendo el riesgo relativo de 0.62 para aquellos que tomaban una o más tabletas al día, con respecto a personas que no consumían regularmente este medicamento), y este efecto no se veía con el uso de otros NSAIDs (Chen et al., 2005). Si bien otros autores no pudieron corroborar estos resultados, o reportaron sólo un beneficio limitado de los NSAIDs, estos estudios fueron hechos en cohortes más pequeñas, y algunos no diferenciaban entre los diferentes tipos de NSAIDs (Hernan et al., 2006, Hancock et al., 2007). Por su lado, estudios recientes donde se realizó un meta-análisis reportaron que si bien los NSAIDs como grupo no parecerían modificar el riesgo de contraer la enfermedad, el ibuprofeno brindaría un efecto protector (con un riesgo relativo de 0.76 con respecto a aquellos que no lo utilizan) (Samii et al., 2009).

Otro dato que vincula la enfermedad de Parkinson con la neuroinflamación es el aumento dramático de casos de Parkinson post-encefalitis (encefalitis letárgica o de von Economo) observado tras la pandemia de influenza de principios del siglo 20 (Mortimer, 2009, Tansey et al., 2010). Sin embargo, algunos autores discuten un vínculo causal entre la epidemia de influenza y la de encefalitis letárgica (Dale et al., 2004).

En cuanto a la relación entre la neuroinflamación y la neurodegeneración, se ha propuesto un mecanismo de retroalimentación positiva, en el que la degeneración neuronal activa la microglía u otras células en el cerebro, las cuales secretan sustancias neurotóxicas, que a su vez promueven una mayor neurodegeneración. Y de hecho se ha vinculado la inflamación en el cerebro no sólo con la enfermedad de Parkinson sino también con otras enfermedades neurodegenerativas, como enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica y esclerosis múltiple (Perry et al., 2010). Sin embargo, si bien la neuroinflamación puede contribuir al daño neuronal, no todas las respuestas inmunes en el SNC son perjudiciales, y de hecho en muchos casos pueden contribuir a la reparación y la regeneración (Amor et al., 2010). Como se mencionó anteriormente (secciones 1.2.2 y 1.2.3), la microglía es capaz de secretar factores tróficos y protectores, como BDNF y citoquinas anti-inflamatorias. E incluso se han reportado efectos benéficos de las citoquinas pro-inflamatorias, como TNF- α (ver

sección 1.3.5) e IL-1 β . Además de los efectos tróficos y regenerativos de factores solubles derivados directa o indirectamente de la microglía, la remoción por fagocitosis de los restos celulares es también fundamental para la reparación del tejido dañado. Por ejemplo, los restos de mielina generados durante el proceso de desmielinización deben ser removidos para que la remielinización ocurra en forma eficiente. También existe evidencia de que la microglía remueve los depósitos del péptido β -amiloide, en un modelo de enfermedad de Alzheimer (Neumann et al., 2009). Asimismo, la respuesta inmune es crucial para limitar las infecciones neurotrópicas y remover las células necróticas luego de una isquemia. Por lo tanto, la inflamación en el SNC, y la microglía en particular, ejercen roles duales en los procesos de neurodegeneración, pudiendo actuar como mediadores del daño, pero también como guardianes de la homeostasis cerebral (Amor et al., 2010).

1.3. Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)

1.3.1. Aspectos generales de la biología de TNF- α

Hace aproximadamente 35 años, se identificó una citoquina a la que se denominó “factor de necrosis tumoral” (TNF, del inglés *Tumor Necrosis Factor*) que se liberaba en respuesta a LPS, era capaz de inducir necrosis en tumores trasplantados en ratones, y también tenía un efecto citotóxico en líneas celulares tumorales (Carswell et al., 1975). En 1984 se clonó el ADN (ácido desoxirribonucleico) complementario (ADNc) de TNF, y se descubrió su homología con la linfoxina- α (LT α) (Pennica et al., 1984), denominándose al primero TNF- α y al segundo TNF- β . Con el tiempo se sumaron otros miembros a esta gran familia de citoquinas, que se conoce como la superfamilia de TNF, y de la que TNF- α se considera el miembro prototípico (Wajant et al., 2003).

TNF- α es sintetizado como una proteína de membrana tipo 2, que se inserta en la membrana formando homotrímeros (mTNF- α). La enzima convertidora de TNF- α (TACE, del inglés *TNF- α converting enzyme*), que es una metaloproteasa, cliva la forma unida a membrana para dar lugar a la forma soluble de TNF- α (sTNF- α). Tanto la forma trimérica unida a membrana como el trímero soluble son biológicamente activas. Los trímeros de sTNF- α , que tienen 51 kDa, tienden a disociarse por debajo

de la concentración nanomolar, liberando los monómeros de 17 kDa (Wajant et al., 2003).

1.3.2. Receptores y cascadas de señalización

Tanto mTNF- α como sTNF- α se unen específicamente a dos receptores: el receptor de TNF tipo 1 (TNFRI o p55) y el receptor de TNF tipo 2 (TNFRII o p75). Estos receptores unen también el homotrímero de LT α . Los receptores se encuentran preensamblados en la membrana celular como trímeros, a través de su dominio citoplasmático. El TNFRI se expresa en la mayoría de los tipos celulares, y puede ser activado tanto por mTNF- α como por sTNF- α . Por su parte, el TNFRII se expresa principalmente en células del sistema inmune y endoteliales, y sólo puede ser activado completamente por mTNF- α (McCoy and Tansey, 2008).

El TNFRI es un típico receptor con dominio de muerte. Luego de la unión del ligando, el dominio de muerte de TNFRI recluta la proteína adaptadora TRADD (*TNF receptor associated death domain* o dominio de muerte asociado al receptor de TNF), permitiendo el reclutamiento de otras proteínas adaptadoras como la proteínas de interacción con receptores (RIP, del inglés *receptor interacting protein*) y el factor asociado al receptor de TNF 2 (TRAF2, del inglés *TNF receptor associated factor 2*). Este complejo puede activar la señalización por NF- κ B. La activación de esta vía depende de degradación por parte del proteosoma del inhibidor de NF- κ B (I κ B), que normalmente retiene a este factor de transcripción en el citoplasma en las células no estimuladas. La degradación de este inhibidor lleva a la traslocación de NF- κ B al núcleo y a la expresión de una serie de genes, fundamentalmente ligados con la supervivencia (como factores anti-apoptóticos), la proliferación celular, y la producción de factores inflamatorios como citoquinas. Este complejo unido al TNFRI es capaz también de activar la quinasa N-terminal de c-Jun (JNK, del inglés *c-Jun N-terminal kinase*). Luego de ser activadas, las quinasas JNK traslocan al núcleo y aumentan la actividad transcripcional de determinados factores de transcripción, ligados a procesos de proliferación y diferenciación, y que en distintos contextos pueden participar tanto en la inducción como en la prevención de la apoptosis. Otra proteína adaptadora, denominada dominio de muerte asociado a Fas (FADD, del inglés *Fas-associated death domain*), también es capaz de unirse al TNFRI, iniciando una serie de eventos que llevan a la muerte por apoptosis. Por ejemplo, la caspasa 8 es reclutada por FADD al complejo del TNFRI, donde se activa por autoclivaje, e inicia la cascada apoptótica.

La activación de la caspasa 8 puede llevar a una activación robusta de la caspasa 3, y a la fase de ejecución de la apoptosis. O bien, puede inducir apoptosis por la vía mitocondrial, activando los miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2, Bax y Bid (Chen and Goeddel, 2002, Wajant et al., 2003, McCoy and Tansey, 2008).

El TNFRII no contiene dominio de muerte, y es un receptor de unión a TRAF. Este receptor es capaz de reclutar las moléculas adaptadoras TRAF-1 y TRAF-2 y activar la vía de NF- κ B, con la consiguiente inducción de genes primordialmente pro-inflamatorios y anti-apoptóticos. Por otro lado, el TNFRII es capaz de aumentar la actividad del TNFRI, reclutando ligando que finalmente señalará por el TNFRI, por un fenómeno denominado *ligand passing* (McCoy and Tansey, 2008).

Por lo tanto, la señalización de TNF- α , tanto por el TNFRI como por el TNFRII, puede llevar a una enorme variedad de respuestas celulares, incluyendo inflamación, proliferación, migración, apoptosis o necrosis. La respuesta final dependerá de muchos factores, como el contexto celular y molecular, el estado metabólico de la célula, etc. (McCoy and Tansey, 2008).

1.3.3. Funciones biológicas en la periferia

TNF- α es una citoquina pro-inflamatoria prototípica, a la que se la considera un mediador clave en la respuesta inflamatoria, con la capacidad adicional de inducir apoptosis (Wajant et al., 2003). Esta citoquina, expresada en forma sistémica en altas concentraciones, juega un rol importante en el desarrollo del shock séptico. Por otro lado, bajas concentraciones de TNF- α en forma prolongada puede producir caquexia (un estado de extrema debilidad, fatiga, anorexia y desnutrición) (Dvorkin, 2003, Wajant et al., 2003).

TNF- α tiene efectos pro-inflamatorios locales, como aumentar la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales y del sistema inmune, aumentando la extravasación de los leucocitos al tejido. También participa de la activación de diferentes leucocitos, e induce la producción de diversas moléculas pro-inflamatorias. Además de su efecto local, TNF- α puede pasar a la circulación y tener un efecto endócrino. Esta citoquina es capaz de actuar sobre el hipotálamo induciendo fiebre. Y también tiene un efecto sobre el hígado, estimulando la síntesis de proteínas de fase aguda, como proteína C-reactiva, lectina, fibrinógeno o factores del complemento, que son parte del mecanismo de defensa del organismo. De persistir esta respuesta se desarrolla un cuadro clínico que se denomina síndrome de respuesta inflamatoria

sistémica (SIRS). Si este cuadro no se resuelve, puede producirse shock séptico y falla multiorgánica (Mak and Saunders, 2006).

1.3.4. TNF- α en el sistema nervioso central

TNF- α puede ser producido por las células inmunes de la periferia e impactar sobre el SNC, o bien expresarse dentro del cerebro. Existe extensa evidencia de que esta citoquina ejerce una gran variedad de funciones en el SNC, tanto en condiciones normales como patológicas.

TNF- α producido en la periferia durante una respuesta inmune puede regular diversas respuestas fisiológicas, comportamentales y neuroendocrinas en el SNC, incluyendo fiebre, sueño y distintos comportamientos relacionados con la enfermedad, así como también la activación del eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA). Las citoquinas pueden atravesar la barrera hematoencefálica a través de transportadores específicos, o por difusión pasiva en los órganos circunventriculares. También pueden ejercer sus efectos a través del nervio vago, o estimulando a las células endoteliales del cerebro a producir mensajeros secundarios, como óxido nítrico (Sternberg, 1997, Perry et al., 2002).

Por otro lado, TNF- α se expresa en forma constitutiva e inducible en el SNC (Pitossi et al., 1997). En el cerebro, TNF- α es producido por la microglía, los astrocitos y algunas neuronas. Su expresión es inducida frente a gran cantidad de estímulos, como proteínas virales y bacterianas. El LPS, que modela experimentalmente algunos aspectos de una infección bacteriana, es también un potente inductor de esta citoquina en el cerebro. Se ha demostrado que TNF- α tiene diferentes y variadas funciones en el SNC, incluyendo activación de microglía y astrocitos luego de una injuria y regulación de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica. Y sorprendentemente tiene roles que no están relacionados con la respuesta inmune, participando en el desarrollo neuronal, la transmisión sináptica, la homeostasis iónica y modulando la señalización por una gran variedad de mensajeros secundarios en las neuronas. En cuanto a su rol en la regulación sináptica, se han reportado efectos por ejemplo en la síntesis y liberación de monoaminas y glutamato, la plasticidad sináptica y el *scaling* (un mecanismo regulatorio de la plasticidad). También modula la expresión de canales iónicos, alterando la sensibilidad de las neuronas a los neurotransmisores. Y se han observado efectos de TNF- α sobre las corrientes iónicas de calcio, sodio y potasio, y

sobre los potenciales de membrana (Perry et al., 2002, McCoy and Tansey, 2008, Park and Bowers, 2010).

1.3.5. TNF- α en enfermedades neurodegenerativas

Se han encontrado niveles elevados de TNF- α en distintas enfermedades neurodegenerativas, como esclerosis múltiple, Alzheimer, isquemia, trauma cerebral, esclerosis lateral amiotrófica y enfermedad de Parkinson (la relación entre TNF- α y el mal de Parkinson se discutirá en más detalle en la siguiente sección). Sin embargo, no está claro si esta citoquina induce o limita el daño neuronal, y en qué circunstancias podría ejercer estos efectos (McCoy and Tansey, 2008). De hecho, se ha descrito un rol dual de TNF- α en diferentes patologías del SNC, habiéndose observado tanto efectos neurodegenerativos como protectores (Rothwell and Hopkins, 1995, Stoll et al., 2000, McCoy and Tansey, 2008).

Un ejemplo emblemático del rol dual de TNF- α en el SNC es la evidencia obtenida en modelos animales de esclerosis múltiple. Por un lado, la sobre-expresión de TNF- α (en ratones transgénicos que sobre-expresan la citoquina específicamente en el SNC) tuvo como resultado la apoptosis de oligodendrocitos y el desarrollo de un cuadro desmielinizante (Probert et al., 1995, Akassoglou et al., 1998). Además, la neutralización de TNF- α con anticuerpos resultó protectora en un modelo de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE, del inglés *experimental autoimmune encephalomyelitis*) (Selmaj et al., 1991, Selmaj and Raine, 1995). Estos resultados llevaron a realizar un ensayo clínico con moléculas que neutralizaban la acción de esta citoquina en pacientes con esclerosis múltiple. Sin embargo, contrariamente a lo esperado, el bloqueo sistémico de TNF- α tuvo resultados perjudiciales para los pacientes tratados (van Oosten et al., 1996). Años más tarde se describió en modelos animales de esclerosis múltiple, que los ratones *knock-out* para TNF- α mostraban una reducción en la proliferación de progenitores de oligodendrocitos y un retraso en la remielinización (Arnett et al., 2001), así como también una falla en la regresión de la actividad de linfocitos T contra la mielina (Kassiotis and Kollias, 2001). Estos efectos neuroprotectores de TNF- α podrían explicar el fracaso de los ensayos clínicos anti-TNF- α .

En cuanto a la enfermedad de Alzheimer, existen evidencias en ratones transgénicos de que la neuroinflamación, y en particular TNF- α , podrían contribuir a la progresión de la enfermedad. Estos ratones transgénicos (3xTgAD), que se usan como modelos

animales de la enfermedad, tienen tres mutaciones asociadas a casos hereditarios de Alzheimer. La inhibición de TNF- α soluble en estos ratones, ya sea por infusión crónica de un dominante negativo o por una inyección intracerebroventricular de un lentivirus que expresa un dominante negativo de esta molécula, llevó a una reducción en la acumulación inducida por LPS de fragmentos C-terminales de la proteína precursora amiloidea (APP, *amyloid precursor protein*) en el hipocampo, la corteza y la amígdala (McAlpine et al., 2009). Otras evidencias *in vitro* también asocian al TNF- α con un rol neurodegenerativo (Combs et al., 2001, Floden et al., 2005), pero Barger y colaboradores reportaron que el pre-tratamiento de cultivos de hipocampo con TNF- α reduce significativamente la degeneración neuronal inducida por el péptido β -amiloide (Barger et al., 1995).

En modelos animales de isquemia, de oclusión de la arteria cerebral media (MCAO, *middle cerebral artery occlusion*), también se han reportado efectos contrapuestos de TNF- α . La neutralización de la acción de la citoquina con anticuerpos monoclonales resultó en una disminución en el volumen del infarto. Sin embargo, el área infartada en ratones *knock-out* para ambos receptores de TNF- α resultó mayor que en los controles (Shohami et al., 1999).

En conjunto, estos datos sugieren que TNF- α podría actuar en forma diferente sobre la viabilidad neuronal dependiendo de una serie de variables que aún no están claramente definidas, pero podrían incluir el estadio de progresión de la enfermedad, el grado de activación de la señalización por TNF- α y la presencia de otros mediadores moleculares (Shohami et al., 1999, Park and Bowers, 2010).

1.4. TNF- α y la enfermedad de Parkinson

1.4.1. Evidencias que vinculan al TNF- α con la enfermedad de Parkinson

Además de los datos que relacionan la enfermedad de Parkinson y la neuroinflamación (que se discutieron en la sección 1.2.4), existen diversas evidencias histopatológicas y genéticas, así como también estudios *in vitro* e *in vivo* en modelos animales, que vinculan específicamente la expresión de TNF- α con esta enfermedad (revisado en Tansey et al., 2007).

Se ha observado expresión de los receptores de TNF- α en la *substantia nigra*, tanto en microglía como en neuronas dopaminérgicas (Tartaglia et al., 1993, Boka et al., 1994,

Dopp et al., 1997, McGuire et al., 2001). Por otro lado, como se mencionó anteriormente, se han detectado niveles elevados de TNF- α en el líquido cefalorraquídeo (tanto lumbar como ventricular) y en muestras *post mortem* de cerebro (tanto *substantia nigra* como estriado) de pacientes con enfermedad de Parkinson (Boka et al., 1994, Mogi et al., 1994b, Hunot et al., 1999, Nagatsu et al., 2000). En modelos animales de la enfermedad se ha detectado sobre-expresión de TNF- α en etapas tempranas. Sriram y colaboradores encontraron niveles elevados de TNF- α en el estriado entre las 2 y 24 hs luego de la administración sistémica de MPTP (Sriram et al., 2002, 2006), y Ferger y colaboradores reportaron un aumento de la citoquina a las 2 y 3 hs luego de administrar MPTP (Ferber et al., 2004). También se ha reportado un aumento de la citoquina en el estriado y la *substantia nigra* de ratas inyectadas con 6-OHDA (Mogi et al., 1999), pero esta observación no pudo ser confirmada por otros autores (Depino et al., 2003).

Por otro lado, se ha visto que existe una asociación entre polimorfismos de nucleótido simple (SNPs, del inglés *single nucleotide polymorphisms*) en el promotor del gen de TNF- α y la enfermedad de Parkinson. Se ha reportado una mayor frecuencia de un alelo polimórfico en la posición -1031, que tiene como consecuencia una mayor expresión de TNF- α , en pacientes con enfermedad de Parkinson con comienzo temprano que en pacientes con un comienzo tardío o controles (Nishimura et al., 2001). Otros autores también observaron una asociación entre este polimorfismo y la enfermedad de Parkinson (Chen et al., 2007). También se ha visto que otro polimorfismo en el promotor de TNF- α (en la posición -308), que regula los niveles basales de la citoquina, se encuentra diferencialmente representado en enfermos con mal de Parkinson y controles (Kruger et al., 2000, Wahner et al., 2007). Si bien sería importante un meta-análisis para establecer la validez y significancia de estas asociaciones, estos datos genéticos en humanos sugieren una relación entre polimorfismos en el promotor de TNF- α , que llevan a un aumento en su expresión, y el riesgo de contraer la enfermedad de Parkinson.

Otra evidencia de que la inflamación en el cerebro, y posiblemente TNF- α , podrían estar involucrados en la degeneración de las neuronas de la *substantia nigra* proviene de los modelos inflamatorios de enfermedad de Parkinson, que se basan en la administración de LPS, un potente inductor de citoquinas. Por un lado, la exposición a LPS *in utero* provoca una disminución en el número de neuronas dopaminérgicas (tirosina hidroxilasa -TH- positivas) en el cerebro de las ratas en el día post-natal 21. El tratamiento prenatal con LPS también produjo un aumento significativo en los niveles de TNF- α en el estriado (Ling et al., 2002). Los mismos autores demostraron que los

efectos del LPS administrado en forma prenatal se mantenían en la rata adulta (de 120 días). Estos animales tenían 33% menos neuronas TH positivas en la *substantia nigra* que los controles, y los niveles de TNF- α en el estriado estaban aumentados. Además, al administrar 6-OHDA en el estriado (al día 99) a ratas que habían recibido LPS *in utero*, se observó una mayor pérdida neuronal y un mayor aumento en los niveles estriatales de TNF- α que con ambas toxinas por separado (Ling et al., 2004). Por otro lado, como ya se mencionó, la inyección de LPS en la *substantia nigra* de ratas adultas produjo una reducción en el número de neuronas TH positivas en esa región del cerebro. En este modelo, la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la *substantia nigra* está también acompañada por activación de la microglía (Castano et al., 1998, Herrera et al., 2000, Kim et al., 2000, Gao et al., 2002b, Irvani et al., 2002). Sin embargo, la inyección en la *substantia nigra* de TNF- α en forma aguda (como proteína) no pudo reproducir el efecto observado con LPS (Castano et al., 2002).

Finalmente, existen resultados experimentales controversiales acerca del efecto de TNF- α sobre las neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra*. Diferentes autores han demostrado un efecto tóxico de TNF- α sobre las neuronas dopaminérgicas *in vitro* (McGuire et al., 2001, Clarke and Branton, 2002, Gayle et al., 2002). Por otro lado, la neutralización *in vivo* de TNF- α soluble mediante la infusión crónica de un dominante negativo en la *substantia nigra* redujo en un 50% la muerte de neuronas dopaminérgicas inducida por 6-OHDA. La administración del dominante negativo se realizó mediante una cánula, inmediatamente después de la inyección de 6-OHDA en el estriado, y el número de somas tirosina hidroxilasa (TH) positivos se estimó en la *substantia nigra* luego de tres semanas (McCoy et al., 2006). Sin embargo, los estudios hechos con ratones *knock-out* mostraron resultados controversiales. La ablación genética de TNF- α (así como también la inhibición farmacológica de su síntesis usando talidomida) redujo la depleción de dopamina y la disminución en la densidad de TH en el estriado, inducidas por MPTP (Ferber et al., 2004). Asimismo, los ratones *knock-out* para ambos receptores de TNF- α (TNFR1 y TNFR2), tratados con MPTP también mostraron una menor pérdida de dopamina y TH en el estriado que la cepa silvestre (Sriram et al., 2002, 2006). Los mismos autores reportaron que la activación de la microglía en el estriado inducida por MPTP estaba atenuada en los animales *knock-out* para ambos receptores de TNF- α , con respecto a compañeros de camada no transgénicos. Sin embargo, los ratones deficientes en los receptores de TNF- α mostraron un daño exacerbado frente a MPTP en el hipocampo, evidenciado por la tinción con Fluoro-Jade B de neuronas en degeneración, lo que sugiere que TNF- α tiene efectos neuroprotectores en esa región del cerebro (Sriram et al., 2006).

Por su lado, Leng y colaboradores no encontraron diferencias en los niveles de dopamina en el estriado entre los ratones *knock-out* para cada uno de los receptores de TNF- α y los compañeros de camada no transgénicos (Leng et al., 2005). En contradicción con lo expuesto, Rousselet y colaboradores reportaron una mayor disminución en los niveles de dopamina estriatales, inducida por MPTP, en los dobles *knock-out* para los receptores de TNF- α que en la cepa silvestre, asignando a esta citoquina un rol protector sobre las terminales dopaminérgicas (Rousselet et al., 2002). Por lo tanto, se ha descrito un rol dual de TNF- α en el SNC (ver también la sección 1.3.5), y en la enfermedad de Parkinson en particular, existiendo evidencias tanto de efectos nocivos como benéficos. Si bien el rol de TNF- α se ha asociado generalmente a un efecto degenerativo en el mal de Parkinson, las variables que llevan a un efecto definitivamente tóxico de esta citoquina no han sido definidas aún (Rothwell and Hopkins, 1995, Stoll et al., 2000, Perry et al., 2002, McCoy and Tansey, 2008). En particular, es destacable que la administración aguda de concentraciones patofisiológicas de esta citoquina en la *substantia nigra* no tiene efectos degenerativos, por lo que se podría especular que otros factores o la duración de la expresión de esta citoquina son importantes para determinar su efecto final sobre las neuronas de esta región.

1.4.2. Moléculas candidatas a mediar los efectos neurodegenerativos de TNF- α

Como se mencionó anteriormente, TNF- α es capaz de inducir la síntesis de una gran variedad de moléculas, algunas de las cuales podrían ser mediadores de los efectos de la citoquina sobre la viabilidad neuronal. Entre estas moléculas se encuentran la óxido nítrico sintasa (NOS) y la ciclooxigenasa tipo 2 (COX-2), que además de ser inducidas por TNF- α se encuentran fuertemente ligadas a la enfermedad de Parkinson por diversas evidencias que se discutirán en detalle, y sus productos (el óxido nítrico y las prostaglandinas) pueden ejercer efectos tóxicos sobre las neuronas.

La NOS cataliza la síntesis de NO y L-citrulina a partir de L-arginina y oxígeno molecular (O₂), requiriendo la presencia de co-factores como NADPH. Se han identificado y clonado tres isoformas de esta enzima: la neuronal (nNOS o NOS I), la endotelial (eNOS o NOS III) y la inducible (iNOS o NOS II). Las dos primeras son constitutivas, mientras que la tercera es inducible (y su expresión aumenta por LPS y citoquinas en una gran variedad de tipos celulares) (Forstermann et al., 1994). Existe evidencia de que TNF- α es capaz de inducir actividad de NOS (medida como

acumulación de nitritos, un indicador de producción de NO, y que por lo tanto puede corresponder a cualquiera de las tres isoenzimas) (Romero et al., 1996), así como también expresión de iNOS (Hunot et al., 1996, Lianxu et al., 2006). Por otro lado, se ha observado un aumento en la expresión de iNOS en la *substantia nigra* de pacientes con enfermedad de Parkinson (Hunot et al., 1996), y en modelos animales de ratones tratados con MPTP (Liberatore et al., 1999). Asimismo, la inhibición farmacológica de NOS (utilizando 7-nitroindazole), resultó protectora en ratones tratados con MPTP, los cuales mostraron una menor pérdida de dopamina estriatal y de neuronas TH positivas en la *substantia nigra* (Przedborski et al., 1996). Ratones *knock-out* para nNOS (Przedborski et al., 1996) y para iNOS (Liberatore et al., 1999) resultaron ser también significativamente más resistentes al tratamiento con MPTP que sus compañeros de camada silvestres. Estos datos sugieren que NOS, y su producto NO, podrían participar de la muerte neuronal. Está ampliamente descrito que el NO puede producir daño celular por estrés oxidativo. Por ejemplo, puede combinarse con anión superóxido (O_2^-) para producir peroxinitrito ($ONOO^-$), que es un fuerte agente oxidante y nitrosilante. El peroxinitrito puede oxidar lípidos y proteínas, y producir daño al ADN; y además, es capaz de producir la nitración de proteínas, formando por ejemplo residuos de nitrotirosina, que se consideran un marcador del estrés oxidativo por NO (Przedborski et al., 1996).

En cuanto a COX-2, como ya se mencionó anteriormente (sección 1.2.3), es la isoforma inducible de COX, la enzima responsable de la síntesis de prostaglandinas. Se ha visto que TNF- α es capaz de inducir la síntesis de COX-2 en distintos tipos celulares (Teismann et al., 2003b, Lianxu et al., 2006, Ke et al., 2007). Por otro lado, se ha reportado un aumento en la expresión de COX-2 en las neuronas de la *substantia nigra* de pacientes con enfermedad de Parkinson, y en modelos animales de la enfermedad tratados con MPTP (Teismann et al., 2003a). También se vio que la inhibición farmacológica específica de COX-2 (con rofecoxib o DuP697), así como su ablación genética, resultaron protectoras frente a la toxicidad inducida por MPTP, tanto a nivel de neuronas TH positivas en la *substantia nigra* como a nivel del estriado (Feng et al., 2002, Teismann et al., 2003a, Wang et al., 2005, Vijitruth et al., 2006). Estos datos sugieren una participación de COX-2 en la muerte neuronal. Un mecanismo por el que esta enzima podría contribuir al daño celular es la síntesis de prostaglandinas, que podrían amplificar la respuesta inflamatoria y la producción de mediadores deletéreos como especies reactivas de oxígeno. Sin embargo, también se han descrito mecanismos de acción independientes de prostaglandinas, que cobran especial importancia en las neuronas dopaminérgicas. COX-2 cataliza la conversión de prostaglandina G_2 a prostaglandina H_2 . Durante esta reacción, la dopamina puede

ser oxidada a dopamina-quinona, que es altamente reactiva con el ADN y los residuos cisteína de las proteínas, pudiendo colaborar al daño celular (Teismann et al., 2003b, Hoang et al., 2009).

1.5. Transferencia génica en el sistema nervioso central: adenovectores

Una forma eficiente de expresar genes de interés en el SNC es a través de vectores virales. Entre los más utilizados se encuentran los vectores basados en adenovirus, herpes simple y parvovirus, todos los cuales tienen un genoma de ADN, o retrovirus, que tienen un genoma de ARN (Ali et al., 1994).

Los adenovirus pertenecen a la familia *adenoviridae*. El principal blanco *in vivo* de estos virus son las células del epitelio respiratorio, por lo que causan fundamentalmente enfermedades respiratorias agudas. Otros sitios de infección incluyen los ojos y los tractos gastrointestinal y urinario. Las partículas virales carecen de envoltura, y tienen una cápside icosaédrica. El genoma viral es una molécula de ADN de doble cadena lineal, y se divide funcionalmente en dos regiones, la temprana y la tardía, en base al momento de transcripción luego de la infección. Existen cuatro regiones tempranas (E1-E4). Una vez que el ADN viral está dentro del núcleo, la transcripción comienza en los promotores de la región E1, que codifica proteínas que regulan todas las otras regiones tempranas, como por ejemplo transactivadores de la transcripción. La región E2 codifica proteínas involucradas en la replicación del ADN viral. Por su lado, E3 codifica polipéptidos que disminuyen el reconocimiento de la célula infectada por las células inmunes. Las proteínas codificadas por E4 disminuyen la expresión de los genes celulares para favorecer la expresión de los genes virales. Finalmente, la región tardía codifica para los polipéptidos que forman la cápside (Ali et al., 1994, Kremer and Perricaudet, 1995).

Los adenovirus tipo 2 y 5 son los más estudiados, y por lo tanto la mayoría de los vectores adenovirales están basados en estos dos serotipos. Los adenovectores no replicativos se construyen substituyendo la región E1 por la secuencia de interés. También es posible deletar la región E3, y la delección conjunta de las regiones E1 y E3 permite la inserción de aproximadamente 7.5 Kb de ADN. Estos adenovirus no replicativos pueden replicar en la línea celular 293, células derivadas de riñón embrionario humano que poseen la región E1 del adenovirus de serotipo 5 (Ali et al., 1994).

Una de las principales ventajas de los adenovectores es que, a diferencia de los retrovirus (otros virus comúnmente utilizados como vectores), pueden transducir células que no se dividen, como las neuronas. De hecho, se ha observado que al inyectarlos en el parénquima cerebral son capaces de transducir neuronas, astrocitos y microglía (Le Gal La Salle et al., 1993). Además pueden ser preparados en altos títulos, lo que permite una transferencia génica eficiente incluso utilizando volúmenes pequeños. Esta característica es de gran importancia si se desea utilizarlos para expresar genes en el SNC, donde se deben inyectar volúmenes pequeños para minimizar una respuesta adversa (Ohmoto et al., 1999). Por otro lado, el genoma de los adenovirus no se integra en los cromosomas de la célula huésped, permaneciendo dentro del núcleo como una entidad no replicativa extra-cromosómica. Esto disminuye los riesgos de mutagénesis, y por lo tanto de activar un oncogen o interrumpir un gen supresor de tumores, lo cual puede ocurrir al utilizar vectores basados en retrovirus, que se integran al azar en los cromosomas. Asimismo, los adenovirus no tienen envoltura, por lo que son más estables que los retrovirus (Ali et al., 1994, Kremer and Perricaudet, 1995).

La inyección de adenovectores en el parénquima cerebral induce una respuesta inflamatoria aguda, que consiste en reclutamiento leucocitario y activación de microglía y astrogliá. Esta respuesta inmune innata es dosis dependiente. Sólo dosis altas, por encima de un nivel umbral, producen inflamación crónica y una citotoxicidad importante (Thomas et al., 2001, Lowenstein et al., 2007). La inflamación puede contribuir a la disminución o pérdida de la expresión del transgén, como se ha observado también en tejidos periféricos. Por otro lado, las condiciones ambientales, así como la exposición previa a un adenovirus, pueden afectar tanto la calidad como la duración de la respuesta inmune a los adenovectores en el cerebro (Ohmoto et al., 1999).

1.6. La tecnología de *microarrays*

La genómica funcional tiene el objetivo de utilizar la vasta acumulación de datos producidos por los "proyectos genoma" de los distintos organismos para describir las funciones de genes. Entre las aproximaciones experimentales empleadas, se encuentra el estudio del transcriptoma (ARNm total transcrito en una circunstancia determinada), utilizando *microarrays* o chips de ADN. Los *microarrays* de ADN son una de las herramientas más poderosas para abordar preguntas globales de genómica

funcional (Shilling and Kelsoe, 2002). Son plataformas de alto rendimiento diseñadas para estudiar la expresión de miles de genes simultáneamente. Se han desarrollado diferentes tipos de *microarrays*, pero la característica común a todos ellos es la detección de transcritos por medio de técnicas de hibridación (Knapen et al., 2009). En un tipo de *microarrays*, de los que el proveedor más conocido es Affymetrix, los oligonucleótidos (de 16-20 pb) son sintetizados directamente en los chips, y cada gen está representado por múltiples sondas. Éstos son “*microarrays* de un color”, ya que en cada chip se hibrida un sólo grupo experimental. El otro gran grupo de *arrays* es el denominado “*microarrays* de dos colores” (que son los que se utilizaron en la presente tesis doctoral). En este tipo de chips, una gran cantidad de sondas (ADNc u oligonucleótidos) son depositadas (por un robot) en un portaobjetos de vidrio (Shilling and Kelsoe, 2002). La figura 1-4 describe los principales pasos de la metodología utilizada en este tipo de *microarrays*. El ARNm extraído de una muestra experimental o un control se convierte en ADNc o ARNc de simple cadena, se marca cada grupo con un fluoróforo diferente y se hibridan sobre el mismo chip. Alternativamente (como se hizo en este trabajo), se puede hibridar en cada *array* un grupo, experimental o control, con ADN de referencia. Luego se realiza la detección de la señal escaneando los chips. Las diferencias en expresión génica se calculan basándose en la cuantificación y el análisis estadístico de las señales fluorescentes emitidas por los ADNc o ARNc marcados (Knapen et al., 2009).

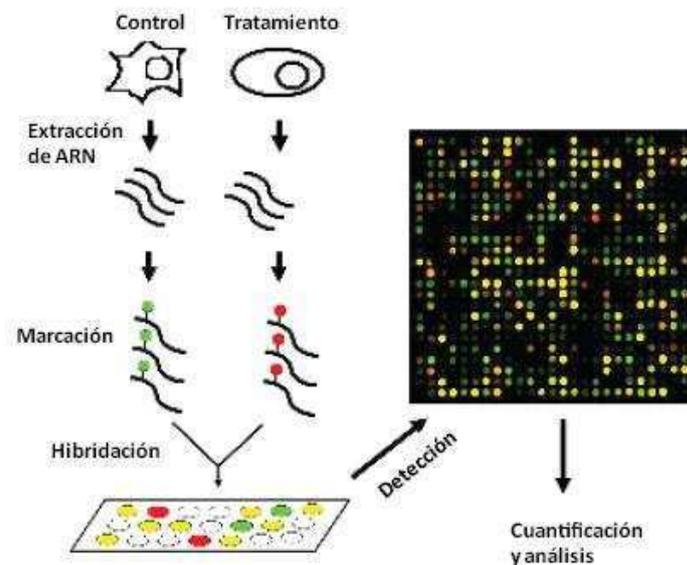


Figura 1-4. Técnica de microarrays de dos colores. Se muestran los principales pasos de esta técnica: extracción de ARN, marcación de las muestras con fluoróforos, hibridación al chip, escaneo, cuantificación y análisis. Adaptado de <http://bach2.biosci.arizona.edu/azcc-microarray/help.php3>.

El uso de la técnica de *microarrays* para detectar perfiles de expresión tiene algunas limitaciones. En primer lugar, puede haber diferencias en expresión génica que no son identificadas (falsos negativos). Esto se debe a que la sensibilidad de este método suele no ser suficiente para detectar transcritos de baja abundancia, que sin embargo pueden tener un rol funcional importante. Otra fuente de falsos negativos está dada por el hecho de que esta técnica es capaz de detectar determinados niveles de cambio, mientras que niveles de cambio más pequeños pueden no ser identificados, aunque pueden ser funcionalmente relevantes. Otra limitación importante es la detección de falsos positivos, debida a la variabilidad experimental. Por otro lado, hay cambios en los niveles de ARNm que pueden no revelar cambios a nivel proteico. También queda fuera del alcance de esta tecnología el análisis de cambios post-traduccionales, que pueden tener relevancia funcional. Una limitación que cobra particular importancia al estudiar el cerebro es la diversidad de tipos celulares, y por lo tanto de perfiles de expresión, que existe en una determinada región o subregión cerebral. Este inconveniente se hace incluso más importante para genes expresados en baja abundancia (Shilling and Kelsoe, 2002). Es por esto que la técnica de *microarrays* suele usarse como un método de *screening*, como una forma de generar hipótesis que luego serán validadas por otras tecnologías (Rosenfeld, 2010). Una de las principales ventajas de esta técnica es que, al realizar un *screening* global, permite identificar genes que no se habían vinculado previamente al proceso que se está estudiando.

A pesar de la complejidad de los experimentos de *microarrays*, y de todas las limitaciones mencionadas, esta técnica ha demostrado ser una herramienta de gran valor. Siguiendo las hipótesis generadas por esta tecnología, se han hecho innumerables descubrimientos en el campo de la biología experimental (Rosenfeld, 2010). Por ejemplo, esta herramienta ha sido utilizada para estudiar los modelos animales de enfermedad de Parkinson. De este modo, al estudiar los genes expresados diferencialmente en la *substantia nigra* y el estriado de animales tratados con 6-OHDA, se encontró evidencias de una fuerte respuesta inflamatoria una y dos semanas después de la inyección de la neurotoxina en el estriado, mientras que a las cuatro semanas esta respuesta disminuyó significativamente (Na et al., 2010). También se han identificado genes relacionados con estrés oxidativo, y con la síntesis, modificación y degradación de proteínas (Holtz et al., 2005). Por otro lado, estudios hechos en el modelo de enfermedad de Parkinson basado en la administración de MPTP han identificado genes relacionados con disfunción mitocondrial, estrés oxidativo (Smith, 2009), inflamación y ciclo celular (Mandel et al., 2000).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

Trabajamos con la hipótesis de que la neuroinflamación juega un papel activo y definitorio en la patogénesis de la enfermedad de Parkinson. En particular, nuestra hipótesis de trabajo fue que la sobre-expresión crónica de la citoquina pro-inflamatoria TNF- α en la *substantia nigra* tiene un efecto neurodegenerativo sobre las neuronas de esta región del cerebro.

2.2. Objetivo general

El objetivo general de la presente tesis doctoral fue determinar los efectos de la sobre-expresión crónica de TNF- α sobre el sistema nigroestriatal e identificar moléculas candidatas a mediar la acción de esta citoquina.

2.3. Objetivos particulares

Los objetivos particulares de la tesis fueron los siguientes:

- Determinar el efecto de la sobre-expresión crónica de TNF- α en la viabilidad de las neuronas de la *substantia nigra*, y sus repercusiones motoras
- Caracterizar la respuesta inflamatoria desencadenada por la sobre-expresión de TNF- α en la *substantia nigra*
- Determinar los mecanismos moleculares involucrados en la muerte neuronal inducida por la sobre-expresión de TNF- α
 - Estudiando moléculas candidatas a mediar los efectos de TNF- α
 - Realizando un estudio a gran escala utilizando la técnica de *microarrays*

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Producción y controles de los stocks de adenovectores

3.1.1. Amplificación de los stocks de adenovectores

Con el objetivo de lograr la expresión crónica de TNF- α en la región de interés, se utilizaron vectores adenovirales recombinantes. Los vectores utilizados son derivados de adenovirus humanos de serotipo 5. Tienen deleciones en la región E1, que es esencial para la replicación, y por lo tanto son adenovectores no replicativos. En consecuencia, la amplificación de estos vectores se realiza en células 293, que es una línea celular derivada de riñón embrionario humano, que poseen la región E1. De este modo, al transducir esas células con los adenovirus, éstos obtienen en *trans* las proteínas necesarias para la replicación y amplificación viral. Estos adenovectores también presentan deleciones en la región E3, relacionada con la evasión de la respuesta antiviral celular, para aumentar el tamaño del transgén a incorporar (Ali et al., 1994).

Se amplificaron dos adenovectores en paralelo: uno expresa TNF- α soluble de ratón (AdTNF α) y el otro, que se utilizó como control, expresa β -galactosidasa (Ad β gal). Ambos adenovirus poseen el promotor RSV dirigiendo la expresión de los transgenes. La amplificación se realizó a partir de alícuotas de los virus, con el objetivo de generar stocks para tener suficiente material para trabajar. Las cuantificaciones y los controles de estos dos adenovectores se hicieron también en paralelo.

En primer lugar, se infectó una placa de 10 cm de diámetro (p100) con el virus proveniente de una alícuota, con el objetivo de generar una "semilla" para realizar luego la infección a gran escala. Esta "semilla" se obtuvo infectando las células de la p100, 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 suero fetal bovino (SFB, Natocor), 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 DMEM alta glucosa con 10% de SFB y se incubó hasta observar efecto citopático. El mismo se manifiesta como células redondeadas y refringentes, que a medida que el efecto citopático 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, de modo que se obtuvo en el sobrenadante la “semilla” del virus.

Por otro lado, se expandieron células 293 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 hasta observar el efecto citopático y se obtuvo el virus lisando las células (con tres ciclos de congelado y descongelado) y precipitando el debris celular por centrifugación.

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 2.5 ml de cloruro de cesio con densidad 1.6 g/ml en la parte inferior y 2.5 ml de densidad 1.3 g/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 35000 g por 90 minutos a 20°C. Al terminar la centrifugación pudieron observarse en el gradiente dos bandas. La superior corresponde a cápsidas vacías y la inferior al virus completo. Por lo tanto, se extrajo con aguja la banda inferior y se colocó en un tubo sobre 5 ml de una solución de cloruro de cesio de densidad 1.34 g/ml. Nuevamente se ultracentrifugó a 35000 g a 20°C, esta vez por 18 hs. La banda con el virus se extrajo con aguja y se pasó por una columna de Sephadex G25 PD-10, previamente estabilizada con 30 ml de Tris 10 mM (pH 7.8), $MgCl_2$ 1 mM y glicerol 10%. Para eluir el virus, se pasaron por la columna 12 alícuotas de 500 μ l de esa solución y se colectaron las 12 fracciones en tubos con 50 μ l de glicerol. Se separó una alícuota de cada una de esas fracciones y se las inactivó agregando una solución de SDS 0.5% y Tris-HCl 0.02 M (pH 7.5) e incubando durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se cuantificó el número de partículas totales mediante densidad óptica a 260 nm (ver sección 3.1.2), y se seleccionó la fracción con el mayor valor de absorbancia para ser alicuotada y congelada a -80°C hasta su uso.

3.1.2. Cuantificación de los adenovectores

Se cuantificó el número de partículas totales midiendo densidad óptica a 260 nm. Una $OD_{260}=1$ corresponde a un título de 1.1×10^{12} partículas totales/ml (AdEasy Vector System). También se determinó la relación de la absorbancia a 260 nm y 280 nm, 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 293. Los stocks de AdTNF α y Ad β gal fueron cuantificados en paralelo. Se sembraron, en multipocillos de 96, 10000 células por pocillo en medio DMEM alta glucosa con 2% de SFB y Hepes 50 mM. 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 1×10^{-8} hasta 1×10^{-14} . Se retiró el medio de la placa y se colocaron 100 μ l 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:

$$TCID_{50} = \alpha \log [d + 0.5 + (6 + n)/6]$$

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.

3.1.3. Extracción del ADN viral

En primer lugar, se obtuvo el ADN viral utilizando un protocolo basado en el método de HIRT (Hirt, 1967). A una alícuota de 5 μ l del virus se le agregaron 30 μ l de SDS 20%, 20 μ l de EDTA 0.5 M, 5 μ l de proteinasa K 20 mg/ml y 340 μ l de PBS, se invirtió suavemente el tubo y se incubó 1 hs a 55°C, con el objetivo de lisar los adenovectores. A continuación se agregaron 100 μ l de NaCl 5 M, se invirtió suavemente, y se colocaron 400 μ l de una mezcla en partes iguales de fenol/cloroformo. Luego de mezclar suavemente, se agregó 1 ml de etanol 100% y se

incubó 30 minutos a -20 °C. Al centrifugar 30 minutos a 13000 rpm, se precipitó el ADN viral, que se lavó con etanol 70% y se dejó secar. Finalmente, se lo resuspendió en 50 µl de agua milliQ autoclavada.

3.1.4. Caracterización de los vectores por mapeo de restricción

Para corroborar la identidad de cada vector, se lo digirió con enzimas de restricción y se compararon los perfiles de restricción con perfiles conocidos. Las digestiones se realizaron con Bgl II y Hind III, por separado. Se incubaron 5 µl de la muestra de ADN viral, 1.5 µl del *buffer* correspondiente y 0.3 µl de la enzima de restricción, en un volumen total de 15 µl, en un baño a 37°C durante 40 minutos. El producto de esta digestión se corrió en un gel de agarosa 1% con bromuro de etidio (0.5 mg/ml) durante toda la noche a 30 V.

3.1.5. Verificación de la ausencia de virus replicativos

Para verificar que los adenovectores, que como ya se mencionó son no replicativos, no hubieran incorporado la región E1 por recombinación con el genoma de las células 293, se llevó a cabo una PCR para detectar dicha región en el ADN viral. Como control positivo, se utilizó una curva de distintas concentraciones (1 ng, 100 pg, 10 pg y 1 pg) del genoma del adenovirus tipo 2 (Gibco), que posee la región E1.

Se utilizó el siguiente protocolo:

	Adenovirus 2	Adβgal	AdTNFα	Blanco
Buffer B (µl)	5	5	5	5
dNTPs 10 mM (µl)	0.5	0.5	0.5	0.5
Primer A 20 µM (µl)	0.5	0.5	0.5	0.5
Primer B 20 µM (µl)	0.5	0.5	0.5	0.5
Muestra (µl)	1	10	10	-
Elongasa (µl)	0.5	0.5	0.5	0.5
Agua (µl)	17	8	8	18

El programa de ciclado fue el siguiente:

	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	N° de ciclos
Desnaturalización inicial	95	5	1
Amplificación	95	1.5	
	68	4	30
Elongación final	68	15	1

Las secuencias de los *primers* utilizados fueron las siguientes:

Primer	Secuencia
A	5'-GACGCCCGACATCACCTGTG-3'
B	5'-CGGCGAGCGCCTTCTGGCGG-3'

Las muestras se corrieron en un gel de agarosa 1% con bromuro de etidio (0.5 mg/ml), y se evaluó la presencia o ausencia de la banda correspondiente al producto de amplificación de la región E1, que tiene aproximadamente 4 Kb.

3.1.6. Determinación de la presencia de LPS

Se estudió si los stocks de adenovectores estaban contaminados con LPS utilizando el test Pyrotell (Pyrolab), que es un test de LAL (del inglés, *Limulus ameobocyte lysate*), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El LAL es un extracto acuoso de amebocitos del cangrejo *Limulus polyphemus*. Estos amebocitos reaccionan con el LPS formando un coágulo, propiedad que es utilizada por el test para evaluar la presencia de LPS en una muestra. Este test fue llevado a cabo por Mariela Chertoff.

3.1.7. Dot blot para estudiar la expresión de TNF- α recombinante *in vitro*

Para corroborar que el adenovector AdTNF α expresara TNF- α recombinante (de ratón), se transdujeron células Hela y se hizo un Dot blot de los medios condicionados.

Las células Hela se crecieron en p100 en medio DMEM alta glucosa con 10% de SFB, hasta una confluencia del 70% aproximadamente. Luego, se transdujeron las células con AdTNF α o Ad β gal, utilizando una multiplicidad de infección de 500. Los adenovectores se diluyeron en medio DMEM alta glucosa con 2% de SFB y se colocaron 2 ml del medio con el virus correspondiente en cada placa. Las placas se incubaron a 37°C durante 3 hs con agitación cada 20 minutos. A continuación, en un par de placas (una para cada adenovirus), se cambió el medio por DMEM alta glucosa sin SFB (para que las proteínas del mismo no intervengan después en el Dot blot), y se recolectaron los medios condicionados luego de 24 hs. En el otro par de placas se cambió el medio por DMEM alta glucosa con 10% de SFB. A las 24 hs se lavaron las placas con PBS y se cambiaron los medios por DMEM alta glucosa sin SFB. Después de 72 hs de la transducción, se recolectaron los medios condicionados. Para obtener los medios condicionados, se centrifugó el medio de las placas a 1000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante se alicuotó y guardó a -80°C hasta su uso.

Para hacer el Dot blot, se cargaron 500 μ l por pocillo de cada medio condicionado en el dispositivo de Dot blot. Las proteínas se transfirieron a la membrana de nitrocelulosa aplicando vacío. Se bloqueó la membrana incubándola en una solución de leche en polvo descremada al 5% peso/volumen (p/v) en PBS con 0.05% volumen/volumen (v/v) de Tween 20 (PBS-Tw), por 3 hs a temperatura ambiente. A continuación, se incubó la membrana a 4°C durante toda la noche con una dilución 1/1000 en la solución de bloqueo de un anticuerpo que detectaba TNF- α de ratón hecho en cabra (Sigma, St. Louis, MI, USA). Luego de tres lavados de 10 minutos en PBS-Tw, se realizó la incubación durante 2 hs a temperatura ambiente con una dilución 1/2000 en PBS-Tw de un anticuerpo anti-cabra hecho en conejo, que se encuentra conjugado a HRP (Jackson, ImmunoResearch Laboratories Inc. West Grove, PA, USA). Luego de cuatro lavados en PBS-Tw, las membranas fueron reveladas por quimioluminiscencia utilizando ECL Plus (GE, Healthcare, USA) y placas fotográficas Kodak. La densidad óptica fue medida usando el programa Image J (Rasband WS.Image J; U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD).

3.2. Animales y cirugía

3.2.1. Cuidado y uso de los animales

Se utilizaron ratas Wistar macho adultas jóvenes, de aproximadamente 12 semanas de edad y con un peso de 250-350 g. Los animales se mantuvieron bajo temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), con un período de luz/oscuridad de 12 hs y con acceso libre a agua y comida. Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo a las normativas para el uso de animales del National Institute of Health (NIH), USA, y fueron aprobados por el comité de ética del Instituto Leloir.

3.2.2. Inyección estereotáxica de los adenovectores

Los adenovectores fueron inoculados en el parénquima cerebral por medio de inyecciones estereotáxicas. Los animales fueron anestesiados con inyecciones intramusculares de clorhidrato de ketamina (80 mg/kg) y, 15 minutos después, xilacina (8 mg/kg). Las ratas se colocaron en un estereotáxico y se realizó un pequeño agujero en el cráneo con un taladro odontológico en el área de inyección. Las inyecciones se realizaron en forma unilateral, en el hemisferio izquierdo. Las coordenadas desde el bregma para la *substantia nigra* fueron -5.3 mm posterior, +2 mm lateral y -7.2 mm ventral desde la dura madre. Y para el MFB fueron -3.6 mm posterior, +2 mm lateral y -8.4 mm ventral desde la dura madre (Paxinos and Watson, 1997). Se inyectó 1 μl de AdTNF α o Ad βgal diluidos en una solución estéril de Tris-HCl 10 mM (pH 7.8) y MgCl $_2$ 1 mM. Las inyecciones se realizaron con un capilar de vidrio, cuya punta no superaba los 50 μm de diámetro, a una tasa de 0.25 $\mu\text{l}/\text{minuto}$; el capilar se dejó en el lugar por un minuto adicional, y se retiró en dos tiempos (con otro minuto de espera). Se realizó la asepsia de la zona con iodopovidona antes de la cirugía y después de la sutura. Las cirugías se realizaron a la mañana para evitar los efectos del ciclo circadiano de los corticoides endógenos en la expresión de citoquinas.

3.3. Test del cilindro

Para evaluar la aparición de aquinesia en los miembros delanteros, se realizó el test del cilindro (Schallert and Jones, 1993). Los animales se colocaron individualmente en un cilindro de acrílico de 20 cm de diámetro y 30 cm de altura. Se contó el número de veces que el animal tocó por primera vez la pared del cilindro al levantarse, con la pata ipsilateral (izquierda) y contralateral (derecha) a la inyección, por un lapso de 5 minutos. Este test motor se realizó el día anterior al sacrificio (6, 13, 20 y 27 días post-inyección, p.i.), siempre por la tarde (que es cuando los animales muestran mayor actividad).

3.4. Análisis histológicos

3.4.1. Perfusión y procesamiento del tejido para histología

Los animales destinados a los estudios histológicos se sacrificaron por perfusión transcardíaca. Las ratas fueron anestesiadas con inyecciones intramusculares de ketamina (80 mg/kg) y xilacina (8 mg/kg). Luego fueron perfundidas transcardíacamente con 50 ml de solución salina heparinizada (2.5 U/ml), seguida de 300 ml de paraformaldehído (PFA) 4% en *buffer* fosfato (PB) 0.1 M (pH 7.2). Después de extraer los cerebros, se removió el cerebelo y se post-fijó en 50 ml 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 0.1 M, en la que los cerebros flotan, y se mantuvieron en esa solución a 4°C hasta que bajaron al fondo del tubo (debido a que la solución penetró en el tejido). Los cerebros fueron congelados colocándolos por 3 minutos en isopentano (J.T. Baker, NJ, USA) enfriado en un baño de etanol y hielo seco, y luego almacenados a -20°C hasta ser cortados.

Los cerebros se cortaron en un criostato (Leica) en forma coronal. Se realizaron cortes seriados de a seis de 40 µm de espesor, a lo largo de toda la *substantia nigra* o el MFB según correspondiera. 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.

3.4.2. Tinción de Nissl con Violeta de Cresilo

Para estudiar el infiltrado inflamatorio, la integridad del tejido, y marcar las neuronas totales (no sólo las dopaminérgicas) de la *substantia nigra*, se realizó una tinción de Nissl. La tinción de Nissl 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 incubándolos durante 2 hs a 37°C o toda la noche a temperatura ambiente. Una vez secos, y por lo tanto adheridos a los portaobjetos, los cortes se rehidrataron 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. 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. La solución de Violeta de Cresilo está compuesta por 0.5 g del colorante en 100 ml de acetato de sodio (AcNa) 0.1 M (pH 3.8).

3.4.3. Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia

Las inmunohistoquímicas e inmunofluorescencias se hicieron en uno de cada seis cortes seriados de 40 µm en solución, sin montar en portaobjetos (*free-floating*).

3.4.3.1. Inmunohistoquímica para detectar tirosina hidroxilasa (TH, marcador de neuronas dopaminérgicas) y TNF-α

Realizamos una inmunohistoquímica para detectar tirosina hidroxilasa (TH), que es la enzima limitante en la síntesis de dopamina y por lo tanto marca las neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra*. El mismo procedimiento fue realizado para detectar TNF-α en cortes de *substantia nigra* de animales inyectados con los adenovectores en el MFB. Luego de un lavado de 10 minutos en PBS y dos lavados de 10 minutos en PBS con 0.1% de Tritón-100 (PBS-Tx) (el Tritón permeabiliza las membranas del tejido), los cortes se incubaron por 20 minutos en una solución 60:1 de metanol:agua oxigenada, con el objetivo de neutralizar las peroxidasas endógenas.

Después de dos lavados de 10 minutos en PBS-Tx, se realizó el bloqueo en una solución de suero de burro al 1% en PBS-Tx durante 45 minutos. A continuación, se incubaron los cortes durante toda la noche a temperatura ambiente con una dilución 1/1000 en la solución de bloqueo de un anticuerpo hecho en conejo que detecta TH de rata (Chemicon, Temecula, CA, USA) o una dilución 1/100 de un anticuerpo hecho en cabra que detecta TNF- α de ratón (Sigma, St. Louis, MI, USA). Al día siguiente, se hicieron dos lavados de 10 minutos en PBS-Tx, y luego se realizó la incubación durante 2 hs a temperatura ambiente con una dilución 1/200 en PBS-Tx del anticuerpo secundario, (anticuerpos hechos en burro anti-conejo o anti-cabra que se encuentran biotinilados, Jackson, ImmunoResearch Laboratories Inc. West Grove, PA, USA). Luego de dos lavados con PB 0.1 M, las secciones se incubaron con el kit ABC Vectastain (complejo avidina-biotina-peroxidasa) (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), durante 2 hs a temperatura ambiente. Se lavó 2 veces con PB 0.1 M y se reveló con 3,3'-diamino-benzidina (DAB) (Sigma, St. Louis, MI, USA) 1/4 en PB 0.1 M, con 5 μ l de cloruro de níquel y 5 μ l de agua oxigenada por ml de solución. Finalmente, se hicieron dos lavados de 15 minutos con PB 0.1 M.

Una vez revelados (se observan las neuronas teñidas de marrón), los cortes se montaron en portaobjetos gelatinizados y luego se secaron incubándolos durante 2 hs a 37°C o toda la noche a temperatura ambiente. Una vez secos, y por lo tanto adheridos a los portaobjetos, los cortes fueron deshidratados pasándolos en forma secuencial (3 minutos en cada uno) por alcoholes de graduación creciente (dos veces por etanol 96% y dos veces por etanol 100%) y finalmente tres veces por xilol. Luego se les colocaron los cubreobjetos utilizando Bálsamo de Canadá.

3.4.3.2. Fluorescencia doble con la lectina Griffonia Simplicifolia (GSA, marcador de microglía) y un anticuerpo para detectar TH

Para estudiar la microglía realizamos una tinción doble con la isolectina B4 de Griffonia Simplicifolia biotinilada (GSA-1B4), que es un marcador de microglía, y un anticuerpo para detectar TH, para delimitar la región de la *substantia nigra*. Luego de dos lavados de 10 minutos en PBS con 0.1% de Tritón-100 (PBS-Tx), se realizó el bloqueo incubando los cortes durante 45 minutos en una solución PBS-Tx con 1% de suero de burro. Después, se incubaron los cortes en la solución de bloqueo conteniendo una dilución 1/1000 de un anticuerpo hecho en conejo que detecta TH de rata (Chemicon, Temecula, CA, USA) y una dilución 1/50 de GSA (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Esta incubación se hizo durante 2 hs a temperatura ambiente y luego durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se hicieron los lavados (uno de 10

minutos en PBS-Tx y uno de 10 minutos en PB 0.1 M) y luego se realizó la incubación durante 2 hs a temperatura ambiente con una dilución 1/200 en PB 0.1 M de un anticuerpo hecho en burro anti-conejo, que se encuentra acoplado a Cy3 (Jackson, ImmunoResearch Laboratories Inc. West Grove, PA, USA), y estreptoavidina acoplada a Cy2 (Jackson, ImmunoResearch Laboratories Inc. West Grove, PA, USA). A partir de este momento es importante proteger a los cortes de la luz. Luego de dos lavados de 10 minutos con PB 0.1 M, los cortes se montaron en portaobjetos gelatinizados y luego se secaron incubándolos durante 2 hs a 37°C o toda la noche a temperatura ambiente. Una vez secos, y por lo tanto adheridos a los portaobjetos, las secciones se rehidrataron en PB 0.1 M y se colocaron los cubreobjetos utilizando Gelvatol (Mowiol 4-88, Calbiochem, glicerina en 0.2 M de Tris pH 8.5). Luego de unos minutos se rodeó el cubreobjetos con esmalte transparente para evitar que se seque el medio de montaje.

3.4.3.3. Inmunofluorescencia doble para detectar el complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC clase II, marcador de microglía activada) y TH

Para estudiar la microglía realizamos una inmunofluorescencia doble con anticuerpos para detectar el complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC clase II), que es un marcador de microglía activada, y un anticuerpo para detectar TH, para delimitar la región de la *substantia nigra*. Luego de dos lavados de 10 minutos en PBS-Tx, se realizó el bloqueo incubando los cortes durante 45 minutos en una solución PBS-Tx con 1% de suero de burro. Después, se incubaron los cortes en la solución de bloqueo conteniendo una dilución 1/1000 de un anticuerpo hecho en conejo que detecta TH de rata (Chemicon, Temecula, CA, USA) y una dilución 1/200 de un anticuerpo hecho en ratón que detecta MHC clase II de rata (Serotec, Raleigh, NC, USA). Esta incubación se hizo durante 48 hs a 4°C. A continuación, se hicieron los lavados (uno de 10 minutos en PBS-Tx y uno de 10 minutos en PB 0.1 M) y luego se realizó la incubación durante 2 hs a temperatura ambiente con una dilución 1/200 en PB 0.1 M de un anticuerpo hecho en burro anti-conejo, que se encuentra acoplado a Cy3 (Jackson, ImmunoResearch Laboratories Inc. West Grove, PA), y un anticuerpo hecho en burro anti-ratón, que se encuentra acoplado a Cy2 (Jackson, ImmunoResearch Laboratories Inc. West Grove, PA, USA). Luego de dos lavados de 10 minutos con PB 0.1 M, los cortes se montaron en portaobjetos gelatinizados y luego se secaron incubándolos durante 2 hs a 37°C o toda la noche a temperatura ambiente. Una vez secos, las secciones se rehidrataron en PB 0.1 M y se colocaron los cubreobjetos utilizando Gelvatol (Mowiol 4-88, Calbiochem, glicerina en 0.2 M de Tris pH 8.5). Luego de unos

minutos se rodeó el cubreobjetos con esmalte transparente para evitar que se seque el medio de montaje.

3.4.3.4. Inmunofluorescencia doble para detectar la proteína ácida fibrilar glial (GFAP, marcador de astrocitos) y TH

Para estudiar la astrogliía realizamos una inmunofluorescencia doble con anticuerpos para detectar la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), que es un marcador de astrocitos, y un anticuerpo para detectar TH, para delimitar la región de la *substantia nigra*. Luego de dos lavados de 10 minutos en PBS-Tx, se realizó el bloqueo incubando los cortes durante 45 minutos en una solución PBS-Tx con 1% de suero de burro. Después, se incubaron los cortes en la solución de bloqueo conteniendo una dilución 1/500 de un anticuerpo hecho en ratón que detecta TH de rata (Chemicon, Temecula, CA, USA) y una dilución 1/700 de un anticuerpo hecho en conejo que detecta GFAP de rata (Dako, Carpinteria, CA, USA). Esta incubación se hizo durante 2 hs a temperatura ambiente y luego durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se hicieron dos lavados de 10 minutos en PB 0.1 M y luego se realizó la incubación durante 2 hs a temperatura ambiente con una dilución 1/200 en PB 0.1 M de un anticuerpo hecho en burro anti-conejo, que se encuentra acoplado a Cy3 (Jackson, ImmunoResearch Laboratories Inc. West Grove, PA, USA), y un anticuerpo hecho en burro anti-ratón, que se encuentra acoplado a Cy2 (Jackson, ImmunoResearch Laboratories Inc. West Grove, PA, USA). Luego de dos lavados de 10 minutos con PB 0.1 M, los cortes se montaron en portaobjetos gelatinizados y luego se secaron incubándolos durante 2 hs a 37°C o toda la noche a temperatura ambiente. Una vez secos, y por lo tanto adheridos a los portaobjetos, las secciones se rehidrataron en PB 0.1 M y se colocaron los cubreobjetos utilizando Gelvatol (Mowiol 4-88, Calbiochem, glicerina en 0.2 M de Tris pH 8.5). Luego de unos minutos se rodeó el cubreobjetos con esmalte transparente para evitar que se seque el medio de montaje.

3.4.4. Ensayo de X-gal (detecta actividad de β -galactosidasa) y cuantificación de células X-gal positivas

El ensayo de X-gal se utiliza para detectar actividad de β -galactosidasa. X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido) es un sustrato de la β -galactosidasa que, al ser hidrolizado, produce un compuesto insoluble de color azul. La reacción de X-gal se realizó en uno de cada seis cortes de 40 μ m en solución, sin montar en portaobjetos

(*free-floating*). Los cortes se incubaron a 37°C por 1 hora en la solución de tinción, compuesta por PBS 0.1 M (pH 7.3), MgCl₂ 2 mM, ferrocianuro de potasio 5 mM (Sigma, St. Louis, MI, USA), ferricianuro de potasio 5mM (Sigma, St. Louis, MI, USA) y 1 mg/ml de X-gal (Sigma, St. Louis, MI, USA). Una vez finalizada la reacción (se observan los núcleos de color azul), los cortes se montaron en portaobjetos gelatinizados y luego se secaron incubándolos durante 2 hs a 37°C o toda la noche a temperatura ambiente. Una vez secos, y por lo tanto adheridos a los portaobjetos, los cortes fueron deshidratados pasándolos en forma secuencial (3 minutos en cada uno) por alcoholes de graduación creciente (dos veces por etanol 96% y dos veces por etanol 100%) y finalmente tres veces por xilol. Luego se les colocaron los cubreobjetos utilizando Bálsamo de Canadá.

Cuando la reacción de X-gal se llevó a cabo en cortes de *substantia nigra*, luego de hacer la incubación en la solución de tinción se hicieron dos lavados de 20 minutos en PB 0.1 M y se realizó una inmunohistoquímica para detectar TH (siguiendo el protocolo que se describió en la sección 3.4.3.1), con el objetivo de delimitar dicha región.

La cuantificación de las células X-gal positivas se realizó en forma manual, en uno de cada seis cortes seriados de 40 µm, bajo un aumento de 10X en un microscopio Olympus CH20. Estas células fueron contadas a lo largo de toda la *substantia nigra* (delimitada por la tinción que detecta TH), el área ventral tegmental (VTA), el núcleo terminal medial del sistema óptico accesorio (MT), y las regiones dorsales y ventrales a la *substantia nigra*, de acuerdo a los límites anatómicos definidos en el atlas de cerebro de rata de Paxinos y Watson (Paxinos and Watson, 1997).

3.4.5. Tinción de Hoechst y cuantificación de núcleos apoptóticos

La tinción con el colorante fluorescente Hoechst marca ADN, y por lo tanto núcleos, por lo que permite visualizar la característica fragmentación nuclear (cariorexix) que se da durante el proceso apoptótico. Uno de cada seis cortes de 40 µm de la *substantia nigra* completa se incubaron en solución (*free-floating*) con una dilución 1/1000 del colorante Hoechst en PB 0.1 M durante 5 minutos. Luego de dos lavados de 10 minutos con PB 0.1 M, los cortes se montaron en portaobjetos gelatinizados y luego se secaron incubándolos durante 2 hs a 37°C. Una vez secos, y por lo tanto adheridos a los portaobjetos, las secciones se rehidrataron en PB 0.1 M y se colocaron los cubreobjetos utilizando Gelvatol. Luego de unos minutos se rodeó el cubreobjetos con esmalte transparente para evitar que se seque el medio de montaje.

Los núcleos apoptóticos a lo largo de la *substantia nigra* se contaron manualmente bajo un aumento de 100X en un microscopio de fluorescencia Olympus CH20.

3.4.6. Ensayo de actividad de NADPH diaforasa (indicativo de la actividad de NOS)

Para estudiar la actividad de NADPH diaforasa (una forma de medir actividad de NOS), realizamos un análisis histológico en cortes de *substantia nigra*. La reacción se llevó a cabo en uno de cada seis cortes de 40 μm en solución, sin montar en portaobjetos (*free-floating*). Los cortes se incubaron a 37°C por 90 minutos en oscuridad, en una solución compuesta por NBT (nitro azul de tetrazolio) 0.2 mg/ml, β -NADPH 1 mg/ml y Tritón-100 0.3% en PB 0.1 M. Se realizaron tres lavados de 15 minutos en PB 0.1 M, y luego se montaron las secciones en portaobjetos gelatinizados. Una vez secos, se colocaron los cubreobjetos utilizando como medio de montaje una solución de PBS:glicerol (1:3).

3.5. Cuantificación de las neuronas de la *substantia nigra*

3.5.1. Conteo manual de neuronas tirosina hidroxilasa positivas

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

3.5.2. Cuantificación de neuronas tirosina hidroxilasa positivas usando estereología

Alternativamente, los cuerpos celulares de las neuronas TH positivas se cuantificaron mediante estereología, usando el programa Stereo Investigator (MicroBrightField Inc., USA), que se combina con un microscopio Nikon Elipse E600 y una cámara CX900 (MicroBrightField Inc., USA). Los cuerpos neuronales TH positivos fueron contados en uno de cada seis cortes seriados de 40 μm , en la *substantia nigra pars compacta* ipsi y contralateral a la inyección de los adenovectores, sin conocer el tratamiento. Analizamos la sección correspondiente al sitio de inyección (identificada en la tinción de Nissl) y las dos adyacentes. Los límites de la *substantia nigra* se delinearon utilizando un objetivo 2X, basándose en la marca de TH y las referencias anatómicas del atlas del cerebro de rata de Paxinos y Watson (Paxinos and Watson, 1997). El programa colocó en forma aleatoria una grilla (de 120x120 μm) sobre el área previamente delimitada, y seleccionó al azar los cuadros para realizar el conteo (*counting frames*, de 50x50 μm), permitiendo un muestreo sistemático y aleatorio del área de interés. El conteo se realizó utilizando un objetivo de inmersión 100X (apertura numérica 1.30). Se establecieron franjas en los extremos superior e inferior de los cortes que no se incluyen en la cuantificación, y sólo se consideraron las neuronas que entraban en foco fuera de esas franjas. Todas las neuronas que cayeron dentro del cuadro de conteo fueron marcadas en forma manual. Si la neurona tocaba alguno de los dos lados de color verde del cuadro de conteo, era marcada; mientras que si tocaba alguno de los dos lados rojos no se marcaba (ver Figura 4-14 A). En base al número de células marcadas, el número de secciones y el grosor de las mismas, el programa extrapoló los datos, y dio como resultado el número total de neuronas en la región de interés. Estos resultados fueron expresados como porcentaje de neuronas remanentes en el hemisferio ipsilateral a la inyección con respecto al contralateral.

3.5.3. Cuantificación de neuronas totales en una tinción de Nissl usando estereología

Para contar el número de neuronas totales (no sólo dopaminérgicas) en la *substantia nigra*, se cuantificaron las neuronas en una tinción de Nissl, usando el programa Stereo Investigator. Con esta tinción se marcan todos los tipos celulares, y las neuronas pueden ser diferenciadas de las células de la glía en base a su morfología. Las áreas de la *substantia nigra pars compacta* delineadas en la inmunohistoquímica

para detectar TH fueron utilizadas en secciones adyacentes teñidas con Violeta de Cresilo. El número de neuronas totales fue contado dentro de dichas áreas. En forma similar al conteo de neuronas dopaminérgicas, la cuantificación se hizo en uno de cada seis cortes seriados de 40 μm , en forma ciega (sin conocer el tratamiento), en la *substantia nigra* ipsi y contralateral a la inyección de los adenovectores. También se analizaron tres secciones, la correspondiente al sitio de inyección y las dos adyacentes. Se utilizaron los mismos parámetros estereológicos, y el mismo procedimiento que el descrito para la cuantificación de neuronas TH positivas (ver sección 3.5.2). Los resultados fueron expresados como porcentaje de neuronas remanentes en el hemisferio ipsilateral a la inyección con respecto al contralateral.

3.6. Cuantificación de la inflamación en la *substantia nigra*

3.6.1. Cuantificación del infiltrado inflamatorio

Para estudiar el infiltrado inflamatorio se realizó una tinción de Nissl. El volumen del infiltrado fue medido en uno de cada seis cortes seriados de 40 μm de la *substantia nigra* ipsilateral a la inyección de los adenovectores. La cuantificación se hizo en forma ciega (sin conocer el tratamiento), utilizando los programas Stereo Investigator y Neurolucida (MicroBrightField Inc., USA), que se combinan con un microscopio Nikon Elipse E600 y una cámara CX900 (MicroBrightField Inc., USA). En todas las secciones donde se observó infiltrado inflamatorio (que se identificó como un agrupamiento de células en el parénquima cerebral, alrededor de los vasos y adentro de los mismos), se delineó su área dentro de la *substantia nigra*, en base a las referencias anatómicas del atlas del cerebro de rata de Paxinos y Watson (Paxinos and Watson, 1997), bajo un aumento de 10X utilizando el programa Stereo Investigator. Estas áreas fueron analizadas con el programa Neurolucida (usando la herramienta *Region and Marker Analyses*), obteniendo de esta forma el volumen del infiltrado inflamatorio a lo largo de toda la *substantia nigra*.

3.6.2. Cuantificación de la microglía activada

3.6.2.1. Estadíos de activación morfológica de la microglía

Clasificamos a la microglía en cuatro estadíos de activación, en base a su morfología, de acuerdo a Kreutzberg (1996), y Ferrari y colaboradores (2006) (ver introducción, sección 1.2.2, página 30) Los cuatro estadíos de activación de la microglía son los siguientes:

Estadío 1: Microglía en reposo. Soma alargado con procesos finos y ramificados.

Estadío 2: Microglía activada ramificada. Cuerpo celular alargado, con procesos largos y más anchos.

Estadío 3: Microglía ameboide. Cuerpo celular redondeado, con procesos cortos y gruesos.

Estadío 4: Células redondas con capacidad fagocítica. Cuerpo celular redondeado, con citoplasma vacuolado; no pueden observarse procesos en el microscopio óptico.

La lectina GSA marca todos estos tipos celulares. Los anticuerpos para detectar MHC clase II marcan todos los estadíos de activación, pero no la microglía en reposo.

3.6.2.2. Cuantificación de las células GSA positivas

Para estudiar la activación de la microglía realizamos una tinción con GSA y una inmunohistoquímica con un anticuerpo para detectar TH (para delimitar el área de la *substantia nigra*). El volumen de microglía/macrófagos estadío 4 (células redondas) GSA positivas fue medido en uno de cada seis cortes seriados de 40 μm de la *substantia nigra* ipsilateral a la inyección de los adenovectores. La cuantificación se hizo en forma ciega (sin conocer el tratamiento), utilizando los programas Stereo Investigator y NeuroLucida (MicroBrightField Inc., USA). Se delineó el área de células redondeadas GSA positivas dentro de la *substantia nigra*, en base a la marca de TH y a las referencias anatómicas del atlas del cerebro de rata de Paxinos y Watson (Paxinos and Watson, 1997), bajo un aumento de 10X utilizando el programa Stereo Investigator. Estas áreas fueron analizadas con el programa NeuroLucida (usando la herramienta *Region and Marker Analyses*), obteniendo de esta forma el volumen de células GSA positivas redondeadas (microglía/macrófagos) a lo largo de toda la *substantia nigra*.

Las células GSA positivas con una morfología característica de los estadios 2 y 3 de activación de la microglía fueron contadas en forma manual a lo largo de toda la *substantia nigra* (definida por la marca de TH y a las referencias anatómicas del atlas del cerebro de rata de Paxinos y Watson, 1997) usando un objetivo 40X en un microscopio Nikon Elipse E600. La cuantificación se hizo también en forma ciega, en uno de cada seis cortes seriados de 40 μm de la *substantia nigra* ipsilateral a la inyección de los adenovectores.

3.6.2.3. Cuantificación de las células MHC clase II positivas

Para continuar con el estudio de la activación de la microglía, realizamos una inmunofluorescencia doble con anticuerpos para detectar MHC clase II y TH (para delimitar la región de la *substantia nigra*). Se contaron en forma manual por un lado las células MHC II positivas con una morfología característica de los estadios 2 y 3 de activación de la microglía, y por otro lado las células MHC II positivas redondeadas (microglía en estadio 4/macrófagos), a lo largo de toda la *substantia nigra* (definida por la marca de TH y a las referencias anatómicas del atlas del cerebro de rata de Paxinos y Watson, 1997). Se utilizó un objetivo 40X de un microscopio Nikon Elipse E600. La cuantificación se hizo en forma ciega (sin conocer el tratamiento), en uno de cada seis cortes seriados de 40 μm de la *substantia nigra* ipsilateral a la inyección de los adenovectores.

3.6.3. Cuantificación de las células GFAP positivas

Para estudiar de la activación de la astrogliá, realizamos una inmunofluorescencia doble con anticuerpos para detectar GFAP y TH (para delimitar la región de la *substantia nigra*). El volumen de células GFAP positivas fue medido en uno de cada seis cortes seriados de 40 μm de la *substantia nigra* ipsilateral a la inyección de los adenovectores. La cuantificación se hizo en forma ciega (sin conocer el tratamiento), utilizando los programas Stereo Investigator y NeuroLucida (MicroBrightField Inc., USA). Se delineó el área de células GFAP positivas dentro de la *substantia nigra*, en base a la marca de TH y a las referencias anatómicas del atlas del cerebro de rata de Paxinos y Watson (Paxinos and Watson, 1997), bajo un aumento de 10X utilizando el programa Stereo Investigator. Estas áreas fueron analizadas con el programa NeuroLucida (usando la herramienta *Region and Marker Analyses*), obteniendo de esta forma el volumen de células GFAP positivas a lo largo de toda la *substantia nigra*.

3.7. Análisis a nivel proteico

3.7.1. Decapitación y extracción de proteínas

Los animales destinados a los estudios a nivel proteico fueron sacrificados por decapitación. Se disecó bajo lupa la *substantia nigra* del hemisferio ipsilateral y contralateral a la inyección, se las congeló por separado en nitrógeno líquido y se las guardó a -80°C hasta su uso.

Para extraer las proteínas, el tejido se homogenizó en hielo en 400 µl de un *buffer* compuesto por Tris-HCl 50 mM (pH 7.3), Tween 20 0.1%, NaCl 150 mM e inhibidores de proteasas (aproteína 10 µg/ml, peptastina 5 µg/ml, leupeptina 5 µg/ml y PMSF 1 mM). Los homogenatos se centrifugaron a 1000 g por 10 minutos a 4°C, y posteriormente se ultracentrifugaron los sobrenadantes a 40000 rpm por 2 hs. Las muestras fueron alicuotadas y guardadas hasta su uso a -80°C. Se cuantificó la cantidad total de proteínas en cada muestra utilizando el ensayo de Bradford (Bradford, 1976).

3.7.2. ELISA para detectar citoquinas en la *substantia nigra*

La expresión de TNF- α recombinante de ratón, y de TNF- α e IL-1 β endógenos de rata, se midió en los extractos anteriormente descritos usando kits comerciales de ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

3.7.3. Western blot para detectar caspasa 3 y COX-2 en la *substantia nigra*

Se realizó un análisis de Western blot para detectar caspasa 3, y estudiar su activación, y para estudiar los niveles de expresión de COX-2. Estos análisis de Western blot fueron hechos por Mariana Graciarena. Como control positivo para el Western blot de caspasa 3 se utilizaron células Hela tratadas con TNF- α y cicloheximida. La extracción de proteínas se llevó a cabo luego de 24 horas de tratamiento. Las células se levantaron, centrifugaron, y resuspendieron en *buffer* de muestra (Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8, SDS 2%, glicerol 10%, DTT 50 mM en agua milliQ) con el agregado de inhibidores de proteasas (apoproteína 10 mg/ml, peptastina 5 mg/ml, leupeptina 5 mg/ml, PMSF 1mM) en hielo. Se realizó una sonicación suave (5

segundos). Se hicieron ensayos de Bradford para determinar la concentración total de proteínas.

Cantidades iguales de muestras proteicas (30 µg) de *substantia nigra* (ver sección 3.7.1) o células Hela fueron separadas en un gel de poliacrilamida-SDS 12%. Luego se hizo la transferencia a una membrana de nitrocelulosa usando un dispositivo de Trans-blot (BioRad, Hercules, CA, USA). Las membranas se bloquearon en una solución de leche descremada en polvo al 5% peso/volumen (p/v) en PBS con 0.05% volumen/volumen (v/v) de Tween 20 (PBS-Tw), por 1 hs a temperatura ambiente. A continuación, se incubó la membrana a 4°C durante toda la noche con la dilución apropiada del anticuerpo primario en la solución de bloqueo (pro-caspasa 3 y caspasa-3 madura 1/2000, Cell Signaling, Boston, MA, USA; COX-2 1/2000, Santa Cruz Biotechnology; β-actina 1/2000, Sigma, St. Louis, MI, USA; todos hechos en conejo). Luego de tres lavados de 10 minutos en PBS-Tw, se realizó la incubación durante 2 hs a temperatura ambiente con una dilución 1/2000 en PBS-Tw de un anticuerpo anti-conejo hecho en cabra, que se encuentra conjugado a HRP (Jackson, ImmunoResearch Laboratories Inc. West Grove, PA). Luego de tres lavados en PBS-Tw, las membranas fueron reveladas por quimioluminiscencia utilizando ECL Plus (GE, Healthcare, USA) y placas fotográficas Kodak. La densidad óptica de las bandas fue medida usando el programa Image J (Rasband WS.Image J; U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD). Los valores fueron normalizados por la carga total de proteína.

3.8. Estudio de *microarrays*

3.8.1. Decapitación y extracción de ARN

Los animales destinados a los estudios a nivel transcripcional fueron sacrificados por decapitación. Se disecó bajo lupa la *substantia nigra* del hemisferio ipsilateral y contralateral a la inyección, se las congeló por separado en nitrógeno líquido y se las guardó a -80°C hasta su uso.

El ARN total se extrajo utilizando el RNeasy Minikit (Qiagen) según las instrucciones de fabricante, y se cuantificó midiendo absorbancia (A) a 260 nm utilizando un espectrofotómetro Nanodrop.

3.8.2. Calidad del ARN

Para determinar la calidad del ARN extraído se midió la absorbancia a 280 nm y 230 nm, y se corrieron las muestras en un gel de agarosa. Una relación A_{260}/A_{280} óptima debe ser superior a 1.8, y una disminución en la misma refleja contaminación con proteínas. Por su lado, los contaminantes orgánicos (como fenol, trizol y otros agentes utilizados en la extracción de ARN) absorben luz a una longitud de onda de 230 nm. Las muestras con una relación baja de A_{260}/A_{230} (por debajo de aproximadamente 1.8) tienen presencia de estos contaminantes. Por otro lado, con el objetivo de corroborar la integridad del ARN y de evaluar si estaba contaminado con ADN genómico, se corrieron las muestras en un gel de 1% de agarosa. El ADN genómico se observaría como una banda de alto peso molecular, que migraría cerca del sitio de siembra o un chorreado. La integridad del ARN se evalúa a través de las bandas correspondientes a los ARN ribosomales (ARNr) 28S y 18S, que deben observarse como dos bandas nítidas, siendo la primera aproximadamente el doble de intensa que la segunda. Otro signo de degradación del ARN es la aparición de un chorreado por debajo de las bandas de ARNr.

3.8.3. Técnica de *microarrays*

Las muestras de ARN de *substantia nigra* de animales inyectados con AdTNF α y Ad β gal, junto con el ARN de referencia de rata (Agilent, GE), se amplificaron y marcaron usando el kit SuperScript Indirect RNA Amplification System (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. Brevemente, se sintetizó la primera cadena de ADNc usando la retrotranscriptasa SuperScript III y un *primer* oligo(dT), que está acoplado a un promotor T7. Luego de la síntesis de la segunda cadena, y de una purificación, el ADNc se utilizó como molde para una transcripción *in vitro* usando la T7 ADN polimerasa. En este paso se amplificó el ARN, generando el ARN antisentido (ARNa), complementario al ARNm original, y se incorporó al ARNa un nucleótido modificado (el aminoallyl UTP). Luego de purificar el ARNa, se lo cuantificó midiendo absorbancia a 260 nm. A continuación, se marcaron 5 μ g de aminoallyl ARNa, utilizando los fluoróforos Alexa Flúor, los cuales poseen un grupo éster que se une covalentemente a los nucleótidos modificados del ARNa. El ARN de referencia se marcó con el fluoróforo Alexa Flúor 555 y los ARNs de las muestras (ya sea de animales inyectados con AdTNF α o con Ad β gal) se marcaron con Alexa Flúor 647.

Luego de la marcación indirecta del ARNa, y de un paso de purificación para eliminar los fluoróforos no incorporados al ARNa, se cuantificó por absorbancia la cantidad de ARNa recuperado y la cantidad de fluoróforo incorporado al mismo. Los *microarrays* se pre-hibridaron incubándolos en una solución de SSC 5X, SDS 0.1% y BSA 0.1% durante 45 minutos a 42°C. Luego de dos lavados con agua milliQ durante 5 minutos, se co-hibridó en cada vidrio 32.5 pmoles de fluoróforo incorporado al ARNa de las muestras (proveniente de animales inyectados con AdTNF α o Ad β gal) junto con 35 pmoles de fluoróforo incorporado al ARNa de referencia, en *buffer* de hibridación (SSC 2X, formamida 50%, ADN de esperma de salmón 1 μ g/ μ l). La hibridación se realizó durante toda la noche a 42°C en cámaras de hibridación. A continuación se hicieron tres lavados sucesivos de 5 minutos cada uno (en estaciones de lavado), utilizando tres *buffers* diferentes (*buffer* 1: SSC 2X, SDS 0.1%, *buffer* 2: SSC 0.1X, SDS 0.1%, *buffer* 3: SSC 0.1X) Finalmente, los chips fueron escaneados en un escáner GenePix 4000B.

3.8.4. Análisis de los datos

El análisis de los datos de los experimentos de *microarrays* fue llevado a cabo por el Dr. Ariel Chernomoretz, utilizando el lenguaje de programación R. El primer paso en el análisis es evaluar la calidad de los *spots* y filtrar aquellos que no son de buena calidad. Para ello, se determinó un índice de calidad para cada *spot*, que tuvo en cuenta distintos parámetros, como tamaño, relación de señal/ruido (*signal to noise ratio*), la variabilidad del *background* local, el nivel de *background* local, la saturación de la señal, el nivel de señal, el coeficiente de variación, y la relación entre la media y la mediana de la señal (media/mediana). El objetivo fue caracterizar en forma cuantitativa diferentes defectos de los *spots* u otras distorsiones experimentales, como partículas de polvo, *spots* en forma de dona, manchas, *outliers* o pixeles saturados o con mucho *background* (Yatskou et al., 2008). De este modo, se obtuvo un índice de calidad para cada *spot*, en cada canal, de cada vidrio. Se utilizaron distintos criterios para combinar los parámetros antes mencionados y formar así diferentes índices de calidad. Los mismos fueron evaluados determinando el coeficiente de correlación de la señal producida por un mismo *spot* en vidrios diferentes de la misma condición, de modo que al descartar los *spots* de baja calidad este coeficiente debería aumentar. En base a esto, se seleccionó el índice que mejor representaba la calidad de los *spots*. Para filtrar los *spots* de mala calidad, fue necesario fijar un umbral de este índice de

calidad, de modo tal que los *spots* con valores por debajo de ese umbral fueran filtrados. Los *spots* filtrados no fueron tenidos en cuenta para los análisis posteriores.

A continuación, se realizó un pre-procesamiento de los datos, que consistió en una corrección por *background*, una normalización intra-chip y una normalización inter-chip. La corrección por *background* es necesaria para eliminar los efectos del pegado de sonda no específico, así como la heterogeneidad espacial a lo largo del *array*. La misma se llevó a cabo de dos formas diferentes. Una de ellas consistió simplemente en restar la intensidad del *background* local a la intensidad de señal para cada *spot*. Alternativamente, se procesaron los valores de *background* utilizando el método *normexp*, que provee ajustes basados en modelos matemáticos (Ritchie et al., 2007). Como último paso antes del análisis estadístico, se realizó la normalización de los datos. Se utilizaron dos métodos para la normalización intra-chip y dos para la normalización inter-chip. Uno de los métodos usados para la normalización **intra-chip** fue *print-tip loess* o *lowess* (*locally weighted scatterplot smoothing*). Este es uno de los métodos más utilizados y recomendados para la normalización de los datos de *microarrays*, y asume que la gran mayoría de los genes no están diferencialmente expresados. Este método corrige por desviaciones en la relación de señal en los dos canales debidas a la intensidad y a la posición en el chip (Smyth and Speed, 2003). El otro método empleado para normalizar dentro de cada *array* fue el denominado *robust spline normalization* (RSN), que combina características de la normalización por loess y por cuantiles. Los métodos utilizados para la normalización **inter-chip** fueron la normalización por cuantiles (*Gquantile normalization*) y *scale normalization*. La normalización por cuantiles ajusta los datos de los diferentes *arrays* a una misma distribución, y es recomendable hacerla en el canal de la referencia (que en nuestro caso es el verde, y por eso se habla de *Gquantile normalization*), donde todos los valores de los distintos *arrays* para un mismo *spot* deberían ser los mismos. La normalización de escala (*scale normalization*) consiste precisamente en ajustar la escala de una serie de *arrays* de modo tal que tengan la misma desviación media (Smyth and Speed, 2003). De este modo, combinando los distintos métodos de corrección de *background*, y normalización intra e inter-chip, se obtuvieron ocho formas diferentes de hacer el pre-procesamiento de los datos. Todas ellas fueron empleadas para procesar los datos y hacer después el análisis estadístico.

Para el análisis estadístico se usó un test de Student modificado, que utiliza un estadístico t moderado (*moderated t-statistic*). Este estadístico tiene la misma interpretación que el estadístico t habitual, pero ha sido modificado para moderar los errores estándar entre genes con un modelo Bayesiano (Smyth, 2004). A continuación, se hizo un ranking según el valor de *p*, para cada una de las ocho formas de pre-

procesamiento de los datos empleadas. Luego se calculó para cada uno de los genes el valor promedio de la posición en el ranking y se los ordenó nuevamente. Finalmente, se eligió la normalización que mejor reflejaba ese ranking, y se continuó trabajando con ella. Se estableció un punto de corte para continuar el análisis de los primeros 25 genes con menor valor de p .

El análisis de Gene Ontology (GO) se hizo para los 25 genes diferenciales con menor valor de p , tomando como *background* todos los genes de *array* que pasaron el filtro de calidad. El análisis estadístico utilizado es el test de Fisher. Para presentar los datos, se seleccionaron los nodos de GO más específicos y luego se hizo un análisis de *clustering*, agrupando a esos nodos en procesos biológicos más generales.

3.9. PCR en tiempo real

3.9.1. Transcripción reversa

La transcripción reversa, en la que se sintetiza el ADN complementario (ADNc), se llevó a cabo utilizando *primers* oligo(dT) y la retrotranscriptasa (RT) SuperScript II. En paralelo, se incluyeron reacciones sin RT, para evaluar cualquier posible contaminación con ADN genómico.

El protocolo utilizado fue el siguiente:

	ADNc	Control sin RT
ARN total (μg)	1	1
oligo(dT) 500 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (μl)	1	1
dNTPs 10 mM (μl)	1	1
Agua	hasta 12 μl	hasta 12 μl
Incubación de 5 minutos a 65°C		
Buffer de primera cadena 5X (μl)	4	4
DTT 0.1 M (μl)	2	2
ARNasa out (μl)	1	1
Incubación de 50 minutos a 42°C		
SuperScript II (μl)	1	-
Agua (μl)	-	1
Incubación de 15 minutos a 72°C		

Las muestras no fueron tratadas con ADNasas, ya que este tratamiento suele implicar una pérdida importante en la cantidad de ARN. Alternativamente, diseñamos los *primers* de modo tal que no amplifiquen ADN genómico o que sean capaces de diferenciar los productos de amplificación del ARNm de los del ADN genómico. Así, se pueden diferenciar estos dos productos en un gel de agarosa, y es posible confirmar que no hay contaminación con ADN genómico si no se observa la banda correspondiente.

3.9.2. RT-PCR en tiempo real para detectar el ARNm de los genes de referencia (*housekeeping*), TNF- α , nPKC-delta y RGS3

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

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

artefactos como dímeros de *primers* tienen una temperatura de disociación menor que los amplicones debido a su tamaño pequeño.

Las RT-PCR en tiempo real se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos, en un volumen final de 25 μ l. Los ADNc (y los controles sin RT) fueron diluidos previamente 1/50 en agua milliQ. Para detectar el ARNm de la proteína de unión a TATA box (TBP, del inglés *TATA box binding protein*), β 2-microglobulina, β -actina, TNF- α , la proteína quinasa C tipo delta (nPKC-delta) y el regulador de la señalización por proteína G 3 (RGS3, *regulator of G-protein signaling 3*) se utilizó el siguiente protocolo:

	Muestras	Control sin RT	Control sin molde
Agua (μ l)	11.45	11.45	16.45
Buffer PCR 10X (μ l)	2.5	2.5	2.5
MgCl ₂ 50 mM	2	2	2
dNTPs 10 mM (μ l)	0.75	0.75	0.75
Primer sentido 5 μ M (μ l)	1	1	1
Primer anti-sentido 5 μ M (μ l)	1	1	1
ROX 5X (μ l)	0.3	0.3	0.3
SYBR Green I 10X (μ l)	0.75	0.75	0.75
Taq ADN polimerasa Platinum (μ l)	0.25	0.25	0.25
Muestra ADNc 1/50 (μ l)	5	-	-
Muestra sin RT 1/50 (μ l)	-	5	-

El programa de ciclado consistió en un ciclo inicial de 5 minutos a 95°C, 40 ciclos de 45 segundos a 95°C, 1 minuto a 58°C (59°C para nPKC-delta y RGS3) (durante el cual se recolectó la información para las curvas de amplificación) y 1 minuto a 72°C, y finalmente un ciclo de 1 minuto a 95°C, un ciclo de 30 segundos a 55°C y un ciclo de 30 segundos a 95°C (durante el cual se recolectó la información para las curvas de disociación).

Las secuencias de los *primers* utilizados fueron las siguientes:

Primer	Secuencia
Sentido TBP	5'-ACCGTGAATCTTGGCTGTAA-3'
Anti-sentido TBP	5'-CCGTGGCTCTCTTATTCTCA-3'
Sentido β2-microglobulina	5'-TCTTTCTGGTGCTTGTCTC-3'
Anti-sentido β2-microglobulina	5'-AGTGTGAGCCAGGATGTAG-3'
Sentido β-actina	5'-TCTGTGTGGATTGGTGGCTCTA-3'
Anti-sentido β-actina	5'-CTGCTTGCTGATCCACATCTG-3'
Sentido TNF-α	5'-TCTCATCAGTTCTATGGCCC-3'
Anti-sentido TNF-α	5'-TTGTCTTTGAGATCCATGCC-3'
Sentido nPKC-delta	5'-CACCACACTACCCGCGCTGG-3'
Anti-sentido nPKC-delta	5'-ATGGGCCTACTCTGCCGGGG-3'
Sentido RGS3	5'-CCAGCCGGCAAGGCAGACAA-3'
Anti-sentido RGS3	5'-GCCTCGGGTGATGCTCTGCA-3'

3.9.2.1. Análisis de la estabilidad de la expresión de los genes de referencia (*housekeeping*)

Para analizar la estabilidad de la expresión de los genes de referencia en nuestro sistema, utilizamos el método de Δ Ct (Silver et al., 2006). Este método consiste en comparar la expresión relativa de pares de genes dentro de cada muestra, con el fin de identificar genes de referencia adecuados, es decir que realmente mantengan su expresión constante. Si el valor de Δ Ct entre dos genes permanece constante al hacer el análisis en diferentes muestras de ARN del modelo de estudio (en nuestro caso *substantia nigra* de animales inyectados con AdTNF α o Ad β gal), significa que ambos genes se expresan en forma estable entre esas muestras, o bien que se encuentran co-regulados. Dado que es poco probable que tres genes que normalmente no varían su expresión se encuentren co-regulados, se asume que si el valor de Δ Ct entre dos genes permanece constante es porque dichos genes se expresan en forma estable. Sin embargo, si el Δ Ct fluctúa, significa que uno o ambos genes varían su expresión. Los datos obtenidos de 21 RT-PCR en tiempo real, en las que se usó como molde ARN de *substantia nigra* de animales inyectados con AdTNF α o Ad β gal y sacrificados 14 días p.i., se utilizaron para calcular los valores de Δ Ct.

3.9.2.2. Análisis de los niveles del ARNm de TNF- α , nPKC-delta y RGS3

Para analizar los datos de las RT-PCR en tiempo real de TNF- α , nPKC-delta y RGS3 se realizó una cuantificación relativa, usando el método de $\Delta\Delta Ct$, corregido para tener en cuenta las eficiencias de las PCR (Pfaffl, 2001). Los resultados se expresaron como cantidad relativa al “calibrador”, que es una muestra a la que se le asigna la cantidad arbitraria de “1” y todas las otras muestras se expresan en términos de niveles de cambio (*fold change*) o cantidad relativa con respecto a ella. En nuestro caso utilizamos como “calibrador” una muestra de *substantia nigra* de ratas sin tratar. Como gen de referencia, o “normalizador”, utilizamos TBP. Por otro lado, se calcularon las eficiencias de las RT-PCR en tiempo real de TBP (116%), TNF- α (85.9%), nPKC-delta (90.9%) y RGS3 (85%), realizando una curva estándar. Los niveles de cambio con respecto al “calibrador” fueron corregidos de acuerdo a dichas eficiencias.

De este modo, la fórmula empleada para calcular la cantidad relativa al “calibrador” para cada muestra fue la siguiente:

$$\text{Cantidad relativa} = \frac{(1 + E_{GI})^{\Delta Ct_{GI}}}{(1 + E_{norm})^{\Delta Ct_{norm}}}$$

Donde:

E_{GI} es la eficiencia de la RT-PCR en tiempo real del gen de interés (GI) (TNF- α , nPKC-delta o RGS3)

E_{norm} es la eficiencia de la RT-PCR en tiempo real del gen de referencia o “normalizador” (TBP)

$\Delta Ct_{GI} = Ct_{cal} - Ct_d$, donde Ct_{cal} es el Ct de la muestra usada como “calibrador” y Ct_d es el Ct de cada muestra “desconocida” a testear, en la RT-PCR en tiempo real del gen de interés (TNF- α , nPKC-delta o RGS3)

$\Delta Ct_{norm} = Ct_{cal} - Ct_d$, donde Ct_{cal} es el Ct de la muestra usada como “calibrador” y Ct_d es el Ct de cada muestra “desconocida” a testear, en la RT-PCR en tiempo real del gen de referencia o “normalizador” (TBP)

3.10. Análisis estadístico

Los resultados se graficaron como la media \pm el error estándar de la media (SEM, *standard error of the mean*). Para comparar dos muestras se utilizó el test de Student de una cola no pareado. Para comparar más de dos muestras, se hizo un análisis de la varianza (ANOVA) de uno o dos factores, según correspondiera, seguido de un test de Fisher de la mínima diferencia significativa (LSD, del inglés *least significant difference*) como test *a posteriori*. Para usar estos tests estadísticos paramétricos, se estudió la normalidad (test de Shapiro-Wilks) y la homogeneidad de varianza (test de Levene). Cuando fue necesario, los datos se transformaron para cumplir con estos supuestos de la estadística paramétrica. O bien se aplicó la corrección de Welch al test de Student en caso de no cumplirse el supuesto de homogeneidad de varianza. El nivel de significancia estadística se estipuló en $p < 0.05$.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Producción y controles de los stocks de adenovectores

4.1.1. Cuantificación y controles de calidad de los adenovectores

Como se mencionó anteriormente, el objetivo del presente trabajo es estudiar el efecto de la sobre-expresión *crónica* de TNF- α sobre el sistema nigroestriatal. Creemos que este marco experimental (contrapuesto a la expresión aguda, que se logra inyectando proteína) representaría mejor lo que ocurre en una enfermedad neurodegenerativa de largo plazo y progresiva como la enfermedad de Parkinson. Una estrategia para lograr la expresión crónica de citoquinas en el sistema nervioso central es la inyección de adenovectores recombinantes que expresan la proteína de interés. Los vectores utilizados son derivados de adenovirus humanos de serotipo 5. Son no replicativos, debido a que tienen deleciones en la región E1, que regula la expresión de proteínas virales tempranas y por lo tanto es esencial para la replicación. Por otro lado, cabe destacar que estos adenovectores son capaces de transducir células post-mitóticas, incluyendo neuronas (Ali et al., 1994).

Con el objetivo de estudiar el efecto de la expresión crónica de TNF- α en la *substantia nigra*, se produjeron stocks de adenovectores que expresan TNF- α soluble de ratón (AdTNF α) y β -galactosidasa (Ad β gal, utilizado como control), para ser inyectados en dicha región del cerebro. Como se describe en detalle en materiales y métodos (página 54), se hicieron preparaciones a gran escala de dichos adenovirus en células 293. Se cuantificó el número de partículas totales mediante densidad óptica a 260 nm, y se determinó la relación de la absorbancia (A) a 260 nm y 280 nm (Tabla 4-1). Una relación A_{260}/A_{280} óptima es de 1.4; puede disminuir por partículas defectivas (que no contienen ADN) y aumentar por impurezas, particularmente ARN. La cuantificación de partículas infectivas se realizó mediante dosis infectiva 50 (TCID₅₀) en células 293 (Tabla 4-1). Es recomendable que la relación de partículas totales/partículas infectivas no sea superior a 10/1, ya que las partículas no infectivas pueden tener un efecto tóxico inespecífico. En nuestro caso, dicha relación fue menor a 5/1 para ambos adenovectores (Tabla 4-1).

Adenovector	Partículas totales (partículas/ml)	Partículas infectivas (TCID₅₀/ml)	Relación partículas totales/infectivas	A₂₆₀/A₂₈₀
AdTNFα	7.6x10 ¹²	1.8x10 ¹²	4.23/1	1.4
Adβgal	5.49x10 ¹²	1.23x10 ¹²	4.5/1	1.4025

Tabla 4-1. *Cuantificación de partículas totales y partículas infectivas de los stocks de adenovectores que expresan TNF- α (AdTNF α) y β -galactosidasa (Ad β gal). Las partículas totales fueron cuantificadas por absorbancia a 260 nm y las partículas infectivas por TCID₅₀. La relación A₂₆₀/A₂₈₀ y partículas totales/partículas infectivas se determinó como parte de los controles de calidad de los vectores.*

Luego de preparar un stock de vectores adenovirales, es necesario hacer controles de calidad en los que se caracteriza el vector por mapeo de restricción, se evalúa la posibilidad de que el virus se haya tornado replicativo y se determina si la preparación se encuentra contaminada con lipopolisacárido (LPS). En primer lugar, se extrajo el ADN viral y se llevaron a cabo dos digestiones con enzimas de restricción diferentes (Hind III y Bgl II). Esto permite la obtención de un patrón de bandas específico para cada adenovector dependiendo del transgén que exprese. El producto de estas digestiones fue corrido en un gel de agarosa a 30 V durante toda la noche (Figura 4-1 A). El patrón de restricción obtenido se comparó con un patrón conocido para el adenovirus correspondiente, corroborándose la identidad de los vectores.

Uno de los principales problemas en la preparación de vectores adenovirales a gran escala es la generación de virus positivos para E1 capaces de replicar. Esto puede ocurrir por recombinación con la región E1 presente en las células 293. La contaminación con virus replicativos resulta altamente perjudicial, debido a que la expresión de genes virales tardíos puede aumentar significativamente respuesta inmunitaria. Ello es especialmente importante al estar trabajando con moléculas del sistema inmune como TNF- α . Por lo tanto, para descartar la aparición de virus replicativos, se determinó por PCR la presencia de la región E1 en el ADN viral obtenido. Como control positivo, se utilizó una curva de distintas concentraciones del genoma del adenovirus tipo 2 (Gibco). En ninguno de los dos adenovirus se observó el producto de amplificación de la región E1 (Figura 4-1 B). En el caso del adenovirus tipo 2, el límite de detección fue de 10 pg, lo cual equivale a 2.6x10⁵ partículas. En la reacción de PCR se utilizaron 7.6x10⁹ partículas totales de AdTNF α y 5.49x10⁹

partículas totales de Ad β gal, por lo que podemos decir que los stocks de adenovectores tenían menos de 1 partícula replicativa por cada 2.9×10^4 y 2.1×10^4 partículas totales de AdTNF α y Ad β gal respectivamente.

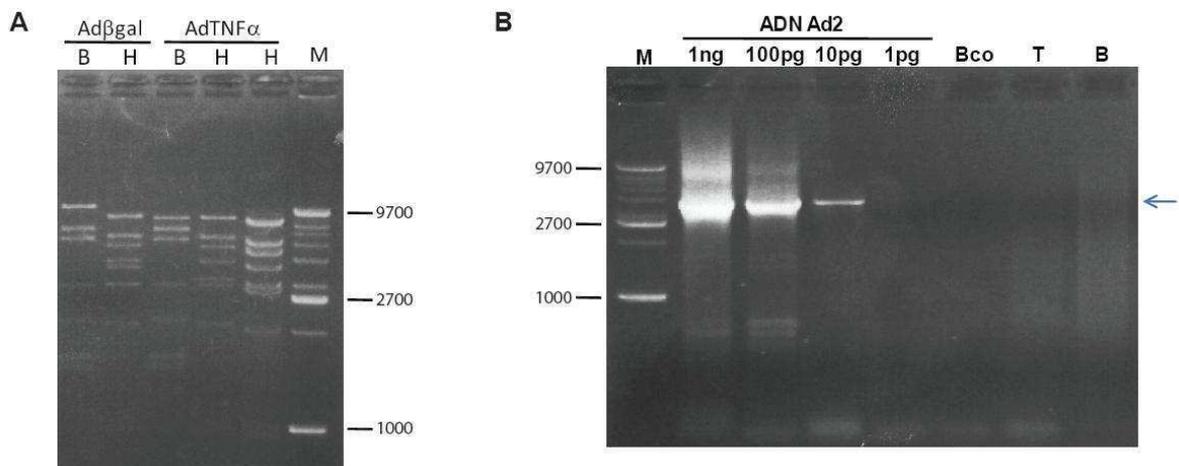


Figura 4-1. Control de calidad de los adenovectores. A) Mapeo de restricción de los adenovectores que expresan las proteínas TNF- α (AdTNF α) y β -galactosidasa (Ad β gal). H: Hind III, B: Bgl II, M: marcadores de peso molecular (se muestran las bandas de 9700, 2700 y 1000 pb). B) Detección por PCR de la región E1 en los stocks de los adenovectores AdTNF α (T) y Ad β gal (B). ADN Ad2: ADN genómico del adenovirus tipo 2 (usado como control positivo); Bco: blanco; M: marcadores de peso molecular (se muestran las bandas de 9700, 2700 y 1000 pb). El producto esperado para la región E1 se indica con una flecha.

Otro problema importante al trabajar con adenovirus *in vivo* es la contaminación con LPS, que también puede inducir una respuesta inmune. Utilizando el test Pyrotell (Pyrolab), pudo determinarse que los adenovectores poseían menos de 0.06 EU/ml (límite de sensibilidad del kit), valor que se considera apropiado para trabajar *in vivo* (Southgate et al., 2001).

Por lo tanto, podemos concluir que los adenovectores obtenidos fueron de buena calidad, en cuanto a la relación partículas totales/partículas infectivas, y la ausencia (niveles por debajo del límite de detección) de partículas replicativas y LPS.

4.1.2. Expresión de TNF- α recombinante *in vitro*

A continuación, se corroboró *in vitro* la expresión de TNF- α recombinante de ratón expresado por el adenovector. Para ello, se transdujeron células Hela con AdTNF α , y Ad β gal como control, con una multiplicidad de infección de 500. Los medios condicionados se recolectaron a las 24 y 72 hs, y se realizó un Dot blot con un anticuerpo que detecta TNF- α de ratón. Efectivamente, pudo confirmarse la expresión de la citoquina en las células transducidas con AdTNF α (siendo 2.4 veces mayor a las 72 hs que a las 24 hs), pero no en los controles (Figura 4-2).

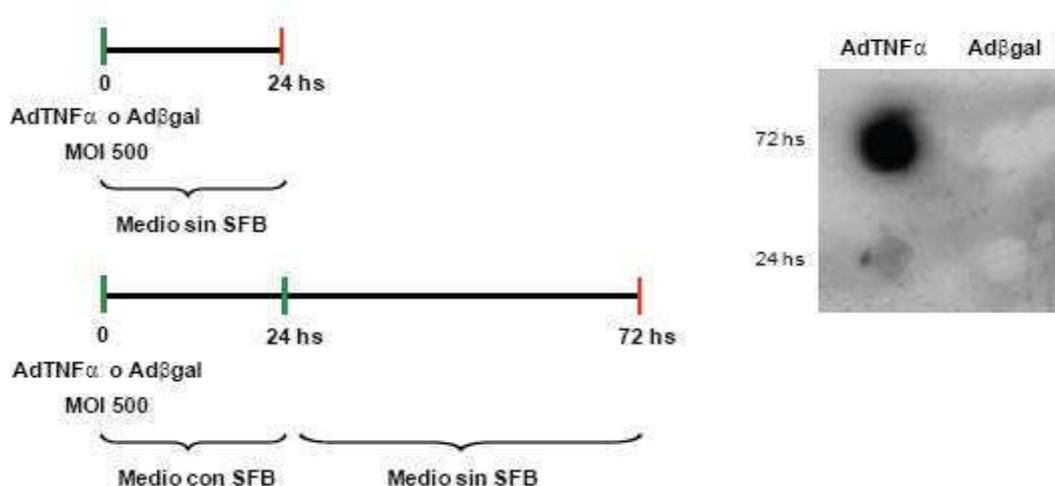


Figura 4-2. La expresión de TNF- α recombinante *in vitro* puede ser detectada mediante Dot blot. Se utilizaron medios condicionados provenientes de células Hela infectadas con AdTNF α y Ad β gal, levantados a las 24 y 72 hs luego de la infección. El anticuerpo utilizado es específico para TNF- α de ratón.

4.2. Determinación del sitio de inyección y la dosis de los adenovectores

4.2.1. Inyección de los adenovectores en el fascículo prosencefálico medial (MFB)

Para estudiar los efectos de la expresión crónica de TNF- α en la *substantia nigra* es necesario establecer un modelo en el que dicha citoquina se exprese en forma crónica en la región de interés. Como se mencionó anteriormente, esto puede lograrse

mediante la inyección en el parénquima cerebral de un adenovector recombinante que expresa TNF- α (AdTNF α), usando siempre como control la misma dosis de un adenovector que expresa β -galactosidasa (Ad β gal). En el presente trabajo utilizamos ratas Wistar macho adultas, y las inyecciones se hicieron en un sólo hemisferio cerebral.

En primer lugar, los adenovectores fueron administrados en el fascículo prosencefálico medial (MFB), 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. Como los adenovirus son capaces de trasladarse en forma retrógrada, podrían llegar hasta los cuerpos celulares en la *substantia nigra* y expresar allí el transgén de interés (Akli et al., 1993). La inoculación de los adenovirus en el MFB (y no directamente en la *substantia nigra*) reduciría la toxicidad inespecífica dada por la inyección en sí misma y por la carga antigénica propia de los adenovectores.

Para determinar si efectivamente el transgén se expresaba en la *substantia nigra* con niveles de toxicidad reducidos, se inyectaron distintas concentraciones (1×10^9 , 1×10^8 y 1×10^7 partículas infectivas) de Ad β gal en el MFB de ratas adultas, y se llevó a cabo el análisis luego de 7 días. Con el fin de corroborar la expresión del transgén en la *substantia nigra*, se llevó a cabo una reacción de X-gal, ensayo que detecta actividad de β -galactosidasa, junto con una inmunohistoquímica para detectar tirosina hidroxilasa (TH). La tirosina hidroxilasa es la enzima limitante en la síntesis de dopamina, y por lo tanto marca las neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra*, y permite delimitar dicha región. Fue posible observar células X-gal positivas en la *substantia nigra* al inyectar 1×10^8 y 1×10^9 partículas infectivas de Ad β gal en el MFB (Figura 4-3 A y B). Cuando se utilizaron 1×10^7 partículas infectivas no se detectaron células X-gal positivas en dicha región. Estos resultados fueron corroborados realizando una inmunofluorescencia doble para detectar β -galactosidasa y TH (Figura 4-3 C). Por otro lado, se llevó a cabo una reacción de X-gal en cortes de MFB, confirmándose la expresión de β -galactosidasa en las tres dosis usadas en el sitio de inyección (Figura 4-3 D-F).

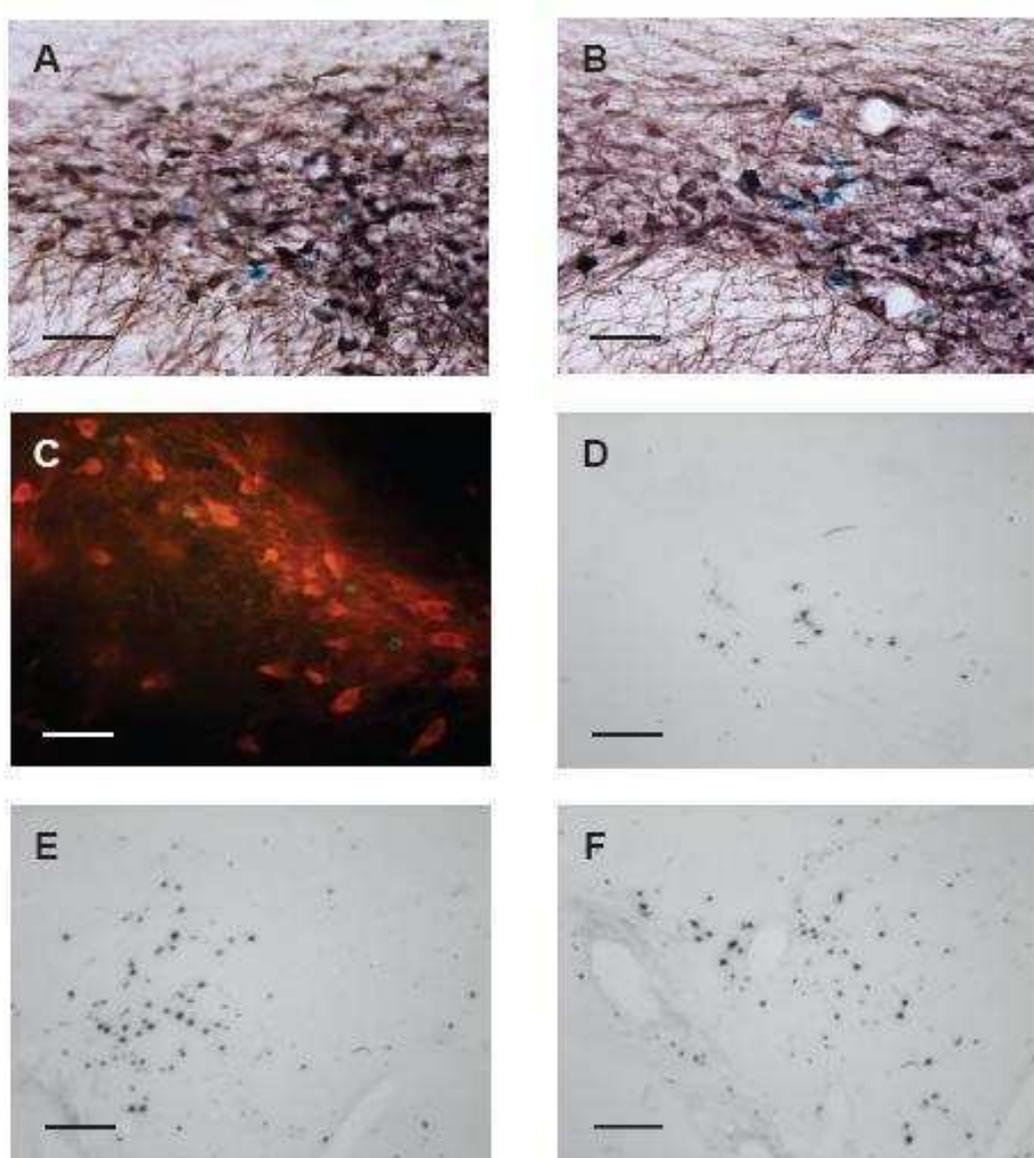


Figura 4-3. *Expresión del transgén 7 días después de la inyección de Adβgal en el MFB.* A-B) Reacción de X-gal (azul), seguido de una inmunohistoquímica para detectar TH (marrón), en la *substantia nigra* de ratas inoculadas con 1×10^8 (A) o 1×10^9 (B) partículas infectivas de Adβgal. Barra de escala: 62.5 μm. C) Inmunofluorescencia doble para detectar β-galactosidasa (verde) y TH (roja) en cortes de *substantia nigra* de animales inyectados con 1×10^9 partículas infectivas de Adβgal. Barra de escala: 62.5μm. D-F) Reacción de X-gal en cortes de MFB luego de la inyección de 1×10^7 (D), 1×10^8 (E) o 1×10^9 (F) partículas infectivas de Adβgal. Barra de escala: 250 μm.

Asimismo, se realizó una tinción de Nissl para evaluar la integridad del tejido, así como la presencia de infiltrado inflamatorio en el sitio de inyección y en la *substantia nigra*. Se observó un infiltrado inflamatorio compuesto principalmente por macrófagos en el MFB en el caso de las dosis más altas (1×10^8 y 1×10^9 partículas infectivas) (Figura 4-4), pero no al inyectar 1×10^7 partículas infectivas. En ningún caso se vio infiltrado en la *substantia nigra*. Con el objeto de determinar si la inyección de Ad β gal en el MFB poseía efectos tóxicos sobre las neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra*, se llevó a cabo una inmunohistoquímica para detectar TH (Figura 4-5 A-B) y se contó el número de neuronas TH positivas remanentes en *substantia nigra* del hemisferio inyectado (expresado como porcentaje del lado contralateral a la inyección). Para las tres dosis utilizadas se observó más de un 90% de neuronas TH positivas en la *substantia nigra* ipsilateral a la inyección (Figura 4-5 C). Por lo tanto, al inyectar Ad β gal en altas dosis en el MFB se observó expresión del transgén en la *substantia nigra*, sin producir una disminución en el número de neuronas TH positivas ni infiltrado inflamatorio en la *substantia nigra*.

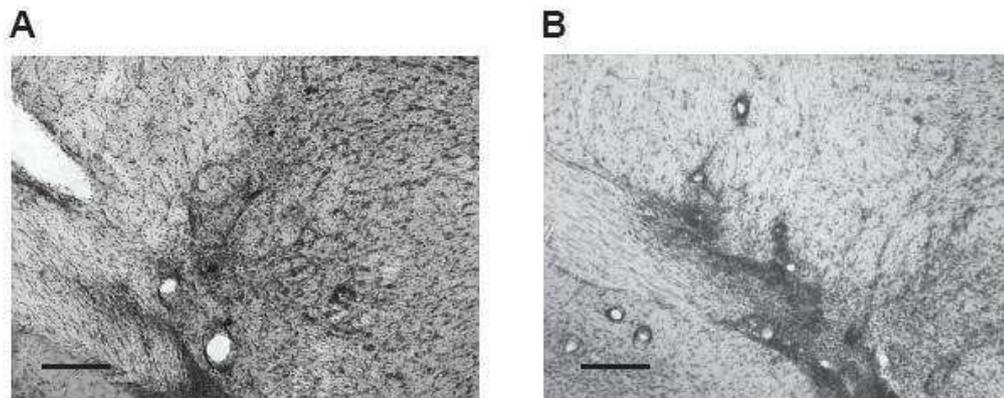


Figura 4-4. Infiltrado inflamatorio 7 días después de la inyección de Ad β gal en el MFB. Tinción de Nissl que muestra el infiltrado inflamatorio en el sitio de inyección de animales inoculados con 1×10^8 (A) y 1×10^9 (B) partículas infectivas de Ad β gal. Barra de escala: 250 μ m.

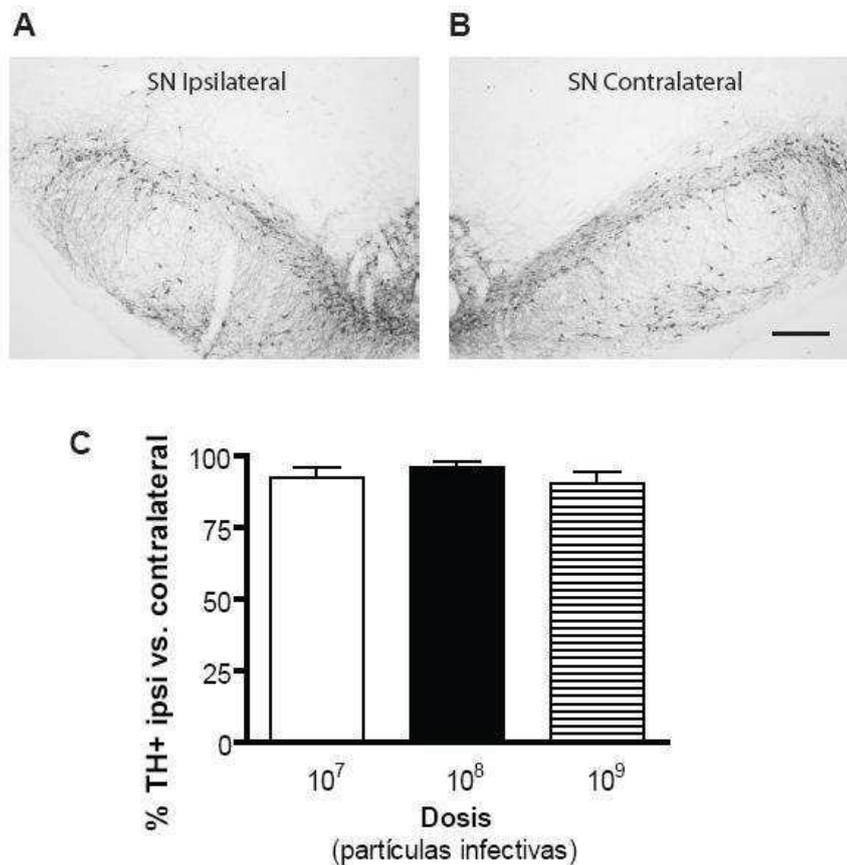


Figura 4-5. La Inyección de Ad β gal en el MFB no produce un efecto tóxico en la substantia nigra 7 días *p.i.* A-B) Inmunohistoquímica para detectar TH en la *substantia nigra* de ratas inoculadas con 1×10^9 partículas infectivas de Ad β gal. Se muestra el hemisferio inyectado (A) y el contralateral a la inyección (B). Barra de escala: 250 μ m. C) Cuantificación de las neuronas TH positivas remanentes en la *substantia nigra* luego de la inyección de 1×10^7 , 1×10^8 y 1×10^9 partículas infectivas de Ad β gal. El resultado está expresado como porcentaje de neuronas en la *substantia nigra* ipsilateral a la inyección con respecto a la contralateral. El ANOVA de un factor, seguido de Fisher como test *a posteriori*, no mostró diferencias significativas. n=3 por grupo.

A continuación se inyectaron 1×10^9 y 1×10^8 partículas infectivas de AdTNF α y Ad β gal en el MFB, con el objetivo de evaluar si TNF- α tenía un efecto neurodegenerativo sobre las neuronas de la *substantia nigra*. Estas dosis fueron elegidas debido a que se observó expresión del transgén en la *substantia nigra* luego de administrar Ad β gal en el MFB, mientras que al usar 1×10^7 partículas infectivas no se detectó β -galactosidasa en la *substantia nigra*. En este caso, el análisis se llevó a cabo 21 días después de la inyección. Para evaluar si el transgén se expresaba en la *substantia nigra*, se llevó a

cabo una inmunohistoquímica para detectar TNF- α de ratón en cortes de *substantia nigra* de animales inyectados con AdTNF α y una reacción de X-gal en el caso de los animales tratados con Ad β gal. Se observó marca para TNF- α recombinante en la *substantia nigra* ipsilateral a la inyección (Figura 4-6 A), pero no en el hemisferio contralateral ni en los controles inyectados con Ad β gal (Figura 4-6 B y C). Por otro lado, se pudieron identificar células X-gal positivas en la *substantia nigra* de los animales inyectados con el adenovector control a los 21 días (Figura 4-6 D).

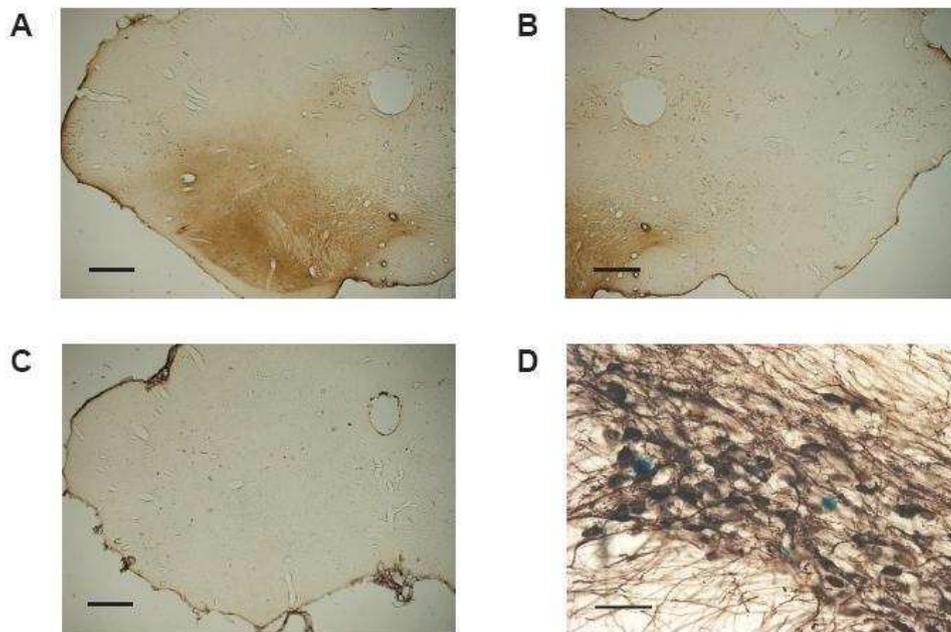


Figura 4-6. *Expresión del transgén en la substantia nigra 21 días luego de inyectar AdTNF α y Ad β gal en el MFB. A-C) Inmunohistoquímica para detectar TNF- α en la substantia nigra ipsilateral (A) o contralateral (B) a la inyección de 1×10^8 partículas infectivas de AdTNF α o Ad β gal (C) en el MFB. Barra de escala: 500 μ m. D) Reacción de X-gal (azul), seguido de una inmunohistoquímica para detectar TH (marrón), en la substantia nigra de ratas inoculadas con 1×10^8 partículas infectivas de Ad β gal. La detección de TH se realiza para delimitar la región de la substantia nigra. Barra de escala: 62.5 μ m.*

Mediante una tinción de Nissl se detectó infiltrado inflamatorio en el sitio de inyección (MFB) con las dos dosis utilizadas, tanto en los animales tratados con AdTNF α como en los controles, siendo mayor en el caso de los animales que sobre-expresan TNF- α (Figura 4-7 A-C). Sin embargo, sólo se observaron células infiltrantes en la *substantia nigra* en los animales inyectados con 1×10^9 partículas infectivas de AdTNF α (Figura 4-7 D).

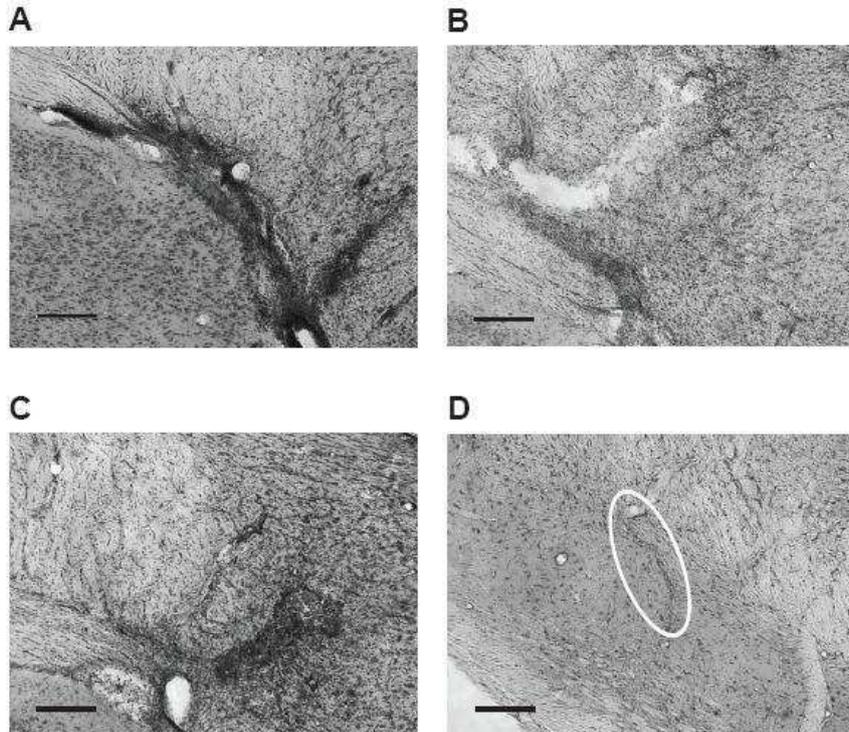


Figura 4-7. La inyección de altas dosis de AdTNF α en el MFB induce infiltrado inflamatorio en la *substantia nigra* 21 días *p.i.* A-C) Infiltrado inflamatorio evidenciado por una tinción de Nissl en cortes de MFB de animales inyectados con 1×10^9 partículas infectivas de AdTNF α (A) o Ad β gal (B), o 1×10^8 partículas infectivas de AdTNF α (C). D) Infiltrado inflamatorio (dentro del óvalo blanco) en la *substantia nigra* de animales inyectados con 1×10^9 partículas infectivas de AdTNF α . Barra de escala: 250 μ m.

Nuevamente, para evaluar si TNF- α tenía un efecto neurodegenerativo sobre las neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra*, se contaron las neuronas TH positivas remanentes en el hemisferio inyectado. El porcentaje de neuronas TH positivas remanentes en la *substantia nigra* ipsilateral a la inyección resultó ser de más de un 90%, tanto en los animales tratados con AdTNF α como en los controles, en ambas dosis utilizadas (Figura 4-8). Por lo tanto, al inyectar AdTNF α en altas dosis en el MFB no se pudo observar un efecto neurodegenerativo de TNF- α sobre las neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra*. Esto podría deberse a que la expresión de la citoquina en la *substantia nigra* no es suficiente para causar dicho efecto. Por lo tanto, se decidió realizar las inyecciones de los adenovectores directamente en la *substantia nigra*, para lograr mayores niveles de expresión.

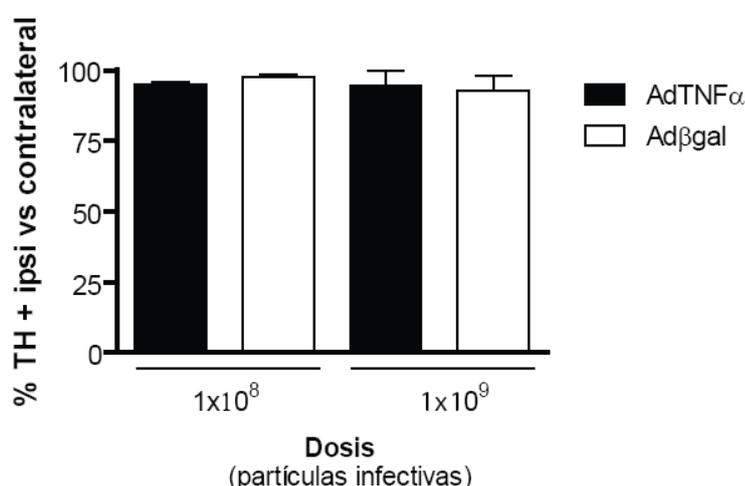


Figura 4-8. La inyección de altas dosis de AdTNF α en el MFB no induce muerte neuronal en la *substantia nigra*. Cuantificación de las neuronas TH positivas, expresado como porcentaje de neuronas remanentes en la *substantia nigra* ipsilateral a la inyección con respecto a la contralateral, 21 días luego de la inoculación de 1×10^8 y 1×10^9 partículas infectivas de AdTNF α o Ad β gal en el MFB. El ANOVA de dos factores no mostró diferencias significativas. n=3 por grupo.

4.2.2. Inyección de los adenovectores en la *substantia nigra*

Con el objetivo de estudiar si la sobre-expresión crónica de TNF- α en la *substantia nigra* tenía un efecto neurodegenerativo, se inyectaron distintas dosis (5×10^6 , 1×10^7 y 5×10^7 partículas infectivas) de los adenovectores AdTNF α y Ad β gal directamente en la

substantia nigra izquierda de ratas macho adultas, y se realizó el sacrificio 21 días luego de la inyección.

Para evaluar el efecto del tratamiento sobre la viabilidad de las neuronas dopaminérgicas, se llevó a cabo una inmunohistoquímica para detectar TH y se contó el número de células TH positivas (dopaminérgicas) remanentes en la *substantia nigra*. Al inyectar 5×10^6 partículas infectivas de los adenovectores en la *substantia nigra*, no se observó un efecto neurodegenerativo de TNF- α , ya que el porcentaje de neuronas del lado inyectado (con respecto al contralateral) no resultó significativamente diferente de los controles (Figura 4-9 A). Por otro lado, al usar 5×10^7 partículas infectivas, el porcentaje de neuronas remanentes en la *substantia nigra* inyectada con AdTNF α disminuyó a prácticamente un 55%. Sin embargo, en este caso el adenovector control mostró también un efecto tóxico importante (con un 47% de neuronas TH positivas remanentes en la *substantia nigra* inyectada) (Figura 4-9 B). Finalmente, al inyectar 1×10^7 partículas infectivas de los adenovectores en la *substantia nigra*, se evidenció un efecto neurodegenerativo de TNF- α , siendo el porcentaje de neuronas TH positivas remanentes del lado inyectado significativamente menor en los animales que sobreexpresan TNF- α que en los controles (Figura 4-9 C). Además, no se observó un efecto neurodegenerativo importante en los controles.

En conclusión, puede decirse que TNF- α tiene un efecto neurodegenerativo sobre las neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra*. Este rol neurodegenerativo pudo evidenciarse al utilizar 1×10^7 partículas infectivas de los adenovectores, ya que con 5×10^6 partículas infectivas no se vio un efecto significativo de TNF- α en la sobrevivencia neuronal, mientras que con 5×10^7 partículas infectivas el adenovector control resultó tóxico. De este modo, se logró una condición experimental donde los efectos inespecíficos del adenovector no ocultan el efecto específico de TNF- α . Por lo tanto, se decidió continuar los estudios inyectando 1×10^7 partículas infectivas de AdTNF α o Ad β gal directamente en la *substantia nigra*.

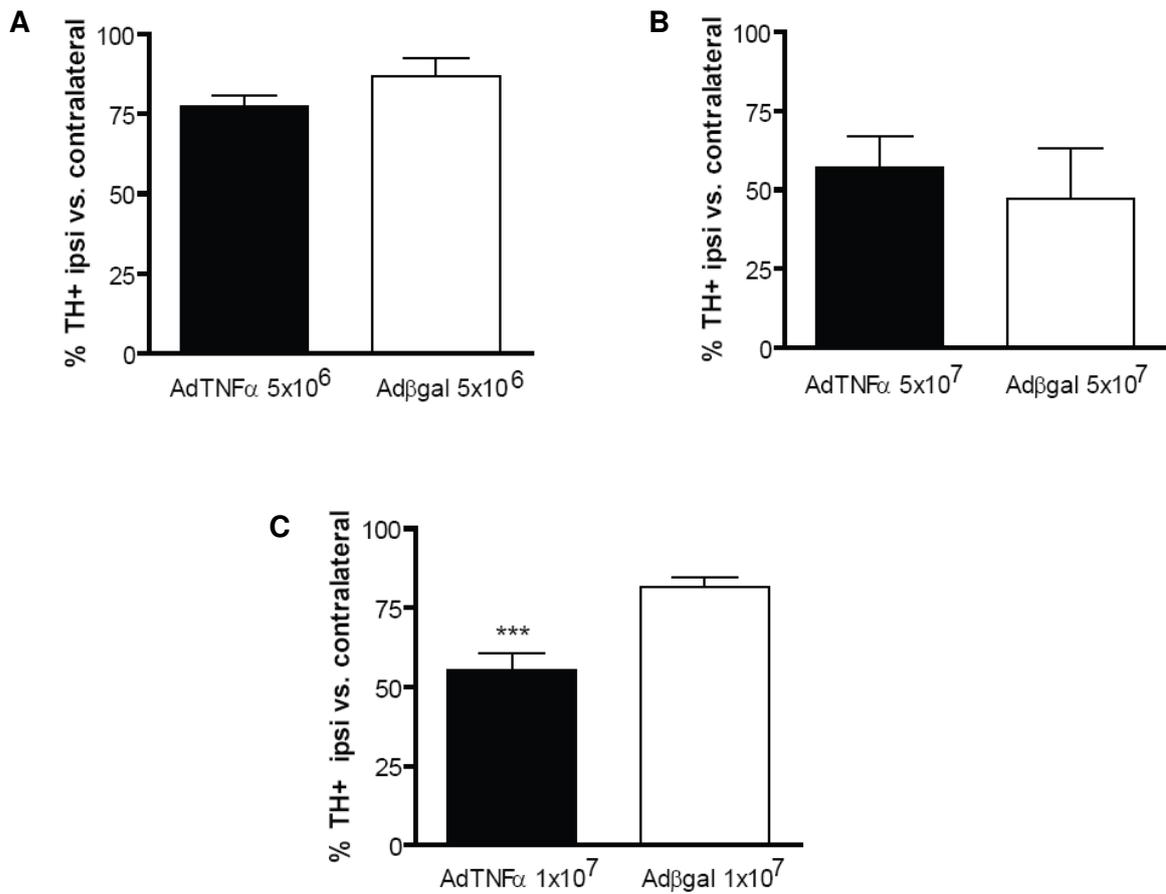


Figura 4-9. La inyección de 1×10^7 partículas infectivas de AdTNF α en la *substantia nigra* tiene un efecto neurodegenerativo. Cuantificación de las neuronas TH positivas, expresada como porcentaje de neuronas remanentes en la *substantia nigra* ipsilateral a la inyección con respecto a la contralateral, 21 días luego de la inoculación de 5×10^6 (A), 5×10^7 (B) y 1×10^7 (C) partículas infectivas de AdTNF α o Ad β gal en la *substantia nigra*. *** $p < 0.001$ animales inyectados con AdTNF α vs. Ad β gal (1×10^7 partículas infectivas). Test de Student de una cola no pareado. n=3-9 por grupo.

4.3. Expresión de TNF- α *in vivo*

4.3.1. Cuantificación de la expresión de TNF- α recombinante en la *substantia nigra*

Como recalcamos con anterioridad, el objetivo de nuestro trabajo es estudiar el efecto de la sobre-expresión *crónica* de TNF- α sobre la *substantia nigra*, ya que este marco experimental (contrapuesto a la expresión aguda) representaría mejor lo que ocurre en las enfermedades neurodegenerativas, que se caracterizan precisamente por ser crónicas y progresivas. Por lo tanto, decidimos evaluar el perfil temporal de expresión de TNF- α recombinante *in vivo*, y determinar si dicha expresión se sostenía en el tiempo. Para ello, se inyectaron ratas con 1×10^7 partículas infectivas de AdTNF α o Ad β gal en la *substantia nigra* y se realizó el sacrificio a distintos tiempos post-inyección (7, 14, 21 y 28 días). Dado que el adenovector AdTNF α expresa TNF- α murino, es posible diferenciar la citoquina inyectada de la endógena. Por lo tanto, para cuantificar la expresión de TNF- α recombinante expresado por el adenovector, se llevó a cabo un ELISA específico para TNF- α de ratón. Para ello, los animales fueron sacrificados por decapitación, y se disecó la *substantia nigra* del hemisferio ipsilateral y contralateral a la inyección. Luego de extraer las proteínas, se llevó a cabo el ensayo de ELISA, de acuerdo a las instrucciones del fabricante (R&D Systems). Se observó sobre-expresión de TNF- α recombinante 7 y 14 días luego de la inyección de AdTNF α . Los niveles de la citoquina fueron aproximadamente cuatro veces más altos en el hemisferio inyectado (un promedio de 19.4 pg/mg de proteína a los 7 días p.i. y 17 pg/mg de proteína a los 14 días p.i.) que en el hemisferio contralateral a la inyección o en los animales controles, diferencia que resulta estadísticamente significativa (Figura 4-10). No pudo detectarse sobre-expresión de TNF- α 21 y 28 días después de la inyección de AdTNF α (Figura 4-10). En conclusión, TNF- α recombinante se expresa en forma crónica en la *substantia nigra* al menos hasta 14 días después de la inyección del adenovector.

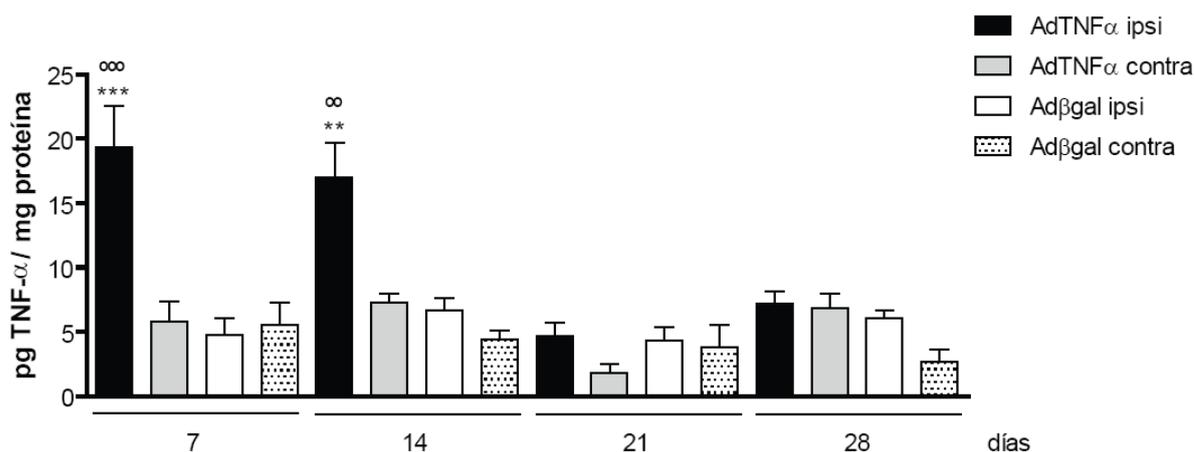


Figura 4-10. La expresión de TNF- α recombinante in vivo puede detectarse hasta los 14 días post-inyección mediante ELISA. Cuantificación de la expresión de TNF- α de ratón, expresado como pg de TNF- α por mg de proteínas totales, en la *substantia nigra* ipsilateral y contralateral a la inyección de AdTNF α o Ad β gal, después de 7, 14, 21 y 28 días. *** p <0.001 hemisferio ipsilateral vs. hemisferio contralateral 7 días p.i. de AdTNF α ; ∞ p <0.001 hemisferio ipsilateral de animales inyectados con AdTNF α vs. animales inyectados con Ad β gal (hemisferio ipsi y contralateral), 7 días p.i.; ** p <0.01 hemisferio ipsilateral vs. hemisferio contralateral 14 días p.i. de AdTNF α ; ∞ p <0.01 hemisferio ipsilateral de animales inyectados con AdTNF α vs. animales inyectados con Ad β gal (hemisferio ipsi y contralateral), 14 días p.i. ANOVA de dos factores, post-test Fisher LSD (los datos fueron transformados usando la raíz cuadrada para cumplir la suposición de igualdad de varianza). n =4-6 por grupo.

4.3.2. Cuantificación de la expresión de TNF- α endógeno en la *substantia nigra*

Existe una amplia evidencia en la literatura de que en tejidos periféricos TNF- α es capaz de inducir su propia síntesis. Para explorar la posibilidad de que TNF- α recombinante (de ratón) estuviera induciendo la síntesis de TNF- α endógeno, se llevó a cabo un ELISA específico para TNF- α de rata. Los animales fueron inyectados con 1×10^7 partículas infectivas de AdTNF α o Ad β gal en la *substantia nigra* y se realizó el sacrificio por decapitación 7 y 21 días p.i. Se obtuvieron las muestras y se hizo el ELISA del mismo modo que se describió en la sección anterior. En este caso, no se detectó un aumento en la expresión de TNF- α de rata en el hemisferio inyectado con AdTNF α con respecto al hemisferio contralateral a la inyección o a los animales controles (Figura 4-11). La curva estándar del kit de ELISA funcionó como control

positivo. Por lo tanto, concluimos que TNF- α no induce su propia síntesis en la *substantia nigra*, lo cual coincide con lo descrito previamente por Blond y colaboradores (Blond et al., 2002). Este resultado sugiere que en el cerebro existe una red alterada de citoquinas, que difiere de lo tradicionalmente descrito en la periferia, como se discutirá con mayor profundidad en la sección 4.7.2.

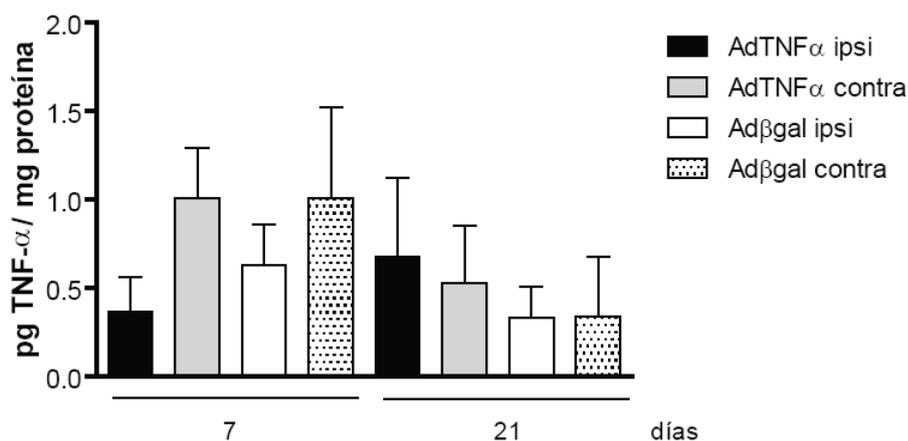


Figura 4-11. No se detecta sobre-expresión de TNF- α endógeno en la *substantia nigra* luego de la inyección de AdTNF α mediante ELISA. Cuantificación de la expresión de TNF- α de rata, expresado como pg de TNF- α por mg de proteínas totales, en la *substantia nigra* ipsilateral y contralateral a la inyección de AdTNF α o Ad β gal, 7 y 21 días p.i. n=3-6 por grupo.

4.3.3. Difusión de los adenovectores en la *substantia nigra* y regiones adyacentes

Con el objetivo de estudiar la especificidad del área transducida por los vectores adenovirales, se llevó a cabo un análisis detallado de la expresión de β -galactosidasa luego de la inyección del adenovector, realizando un ensayo de X-gal en la *substantia nigra* y regiones adyacentes 7 días luego de la inoculación. Dado que AdTNF α y Ad β gal comparten la misma cápside viral, puede suponerse que la difusión de los adenovectores es similar. No fue posible poner a punto la inmunohistoquímica para detectar TNF- α en animales inyectados en la *substantia nigra*, ya que con todos los anticuerpos probados se obtenía una marca inespecífica en la zona del infiltrado inflamatorio, observada también en los animales inyectados con Ad β gal.

Por ello, alternativamente, se analizó la zona de transducción del vector Ad β gal. Se cuantificó el número de células X-gal positivas en la *substantia nigra*, el área ventral tegmental (VTA), el núcleo terminal medial del sistema óptico accesorio (MT), y las regiones dorsales y ventrales a la *substantia nigra*. Se observó una distribución gaussiana de la expresión del transgén, con los mayores niveles en el sitio de inyección (5.3 mm posterior al bregma) y una disminución de los mismos hacia los extremos anterior y posterior de la *substantia nigra* (Figura 4-12). La expresión ectópica en estructuras cercanas a la *substantia nigra* no superó el 12% en los cortes que incluyen el sitio de inyección, y 480 μ m hacia los extremos anterior y posterior. Dicha expresión por fuera de la *substantia nigra* se tornó indetectable a partir de los 720 μ m del sitio de inyección en sentido anteroposterior. No se observaron células X-gal positivas en otras áreas además de las mencionadas anteriormente. En conclusión, puede decirse que el adenovector se distribuye fundamentalmente dentro del área de la *substantia nigra*.

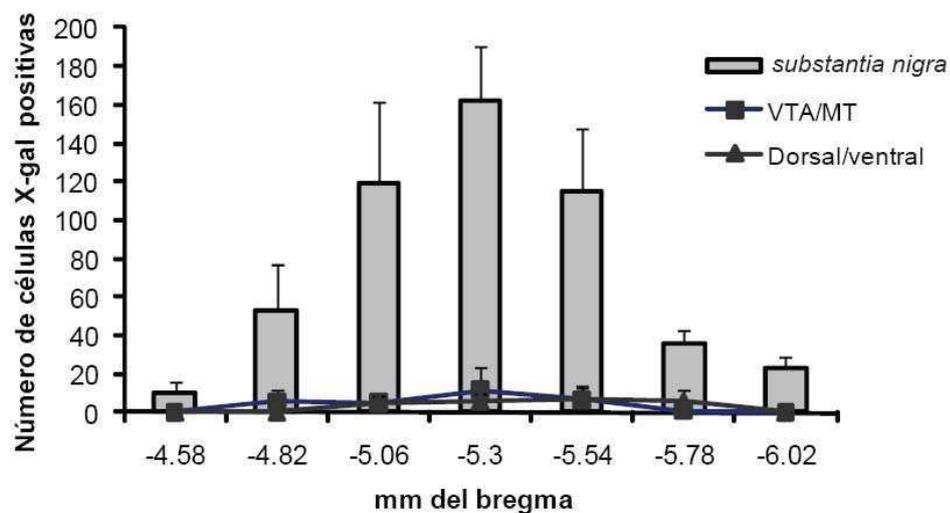


Figura 4-12. Difusión de Ad β gal 21 días p.i. en la *substantia nigra*. Cuantificación del número de células X-gal positivas en uno de cada seis cortes seriados de 40 μ m en la *substantia nigra* y regiones adyacentes (en el área comprendida desde 4.58 a 6.02 mm posterior al bregma). Se observaron células X-gal positivas en la *substantia nigra*, las regiones dorsales y ventrales a la *substantia nigra* (dorsal/ventral), el área ventral tegmental (VTA) y el núcleo terminal medial del sistema óptico accesorio (MT). n=3.

4.4. Efecto de la sobre-expresión crónica de TNF- α en la viabilidad de las neuronas de la *substantia nigra*

4.4.1. Conteo manual de neuronas tirosina hidroxilasa positivas

Con el objetivo de determinar si el efecto neurodegenerativo de TNF- α era progresivo, se inyectaron animales con 1×10^7 partículas infectivas de AdTNF α o Ad β gal en la *substantia nigra* y se realizó el sacrificio por perfusión transcardíaca a distintos tiempos post-inyección (7, 14, 21 y 28 días). Para evaluar el impacto de los tratamientos sobre la viabilidad neuronal, se llevó a cabo una inmunohistoquímica para detectar TH (Figura 4-13 A-B). Los cuerpos celulares de las neuronas TH positivas fueron contados en uno de cada seis cortes seriados de 40 μ m en toda la *substantia nigra pars compacta*, definida por la marca de TH y por las referencias anatómicas del atlas del cerebro de rata de Paxinos y Watson (Paxinos and Watson, 1997). El conteo se realizó en forma manual, usando un objetivo 10X, en ambos hemisferios. Los resultados fueron expresados como porcentaje de neuronas remanentes en la *substantia nigra* ipsilateral a la inyección con respecto a la contralateral (Figura 4-13 C). El porcentaje de neuronas TH positivas remanentes en la *substantia nigra* inyectada no resultó significativamente diferente entre los animales que sobre-expresan TNF- α y los controles 7 días después de la inyección. Sin embargo, luego de 14 días, encontramos una disminución significativa en las neuronas dopaminérgicas de los animales tratados con AdTNF α (70.3%), comparados con los controles (88.9%). El porcentaje de neuronas TH positivas en las ratas que sobre-expresan TNF- α también resultó significativamente menor a los 14 días que a los 7 días p.i. Luego de 21 días, el número de neuronas dopaminérgicas en la *substantia nigra* de los animales inyectados con AdTNF α continuó disminuyendo (54.2%). A los 28 días p.i. el efecto neurodegenerativo de TNF- α se mantuvo pero no aumentó (56.8%). En ningún momento se observó un efecto neurodegenerativo importante del adenovector control (Ad β gal), siendo el porcentaje de neuronas dopaminérgicas remanentes en el hemisferio inyectado siempre superior al 80%. Estos datos indican que la sobre-expresión crónica de TNF- α causa una pérdida parcial y progresiva de neuronas dopaminérgicas en la *substantia nigra pars compacta*.

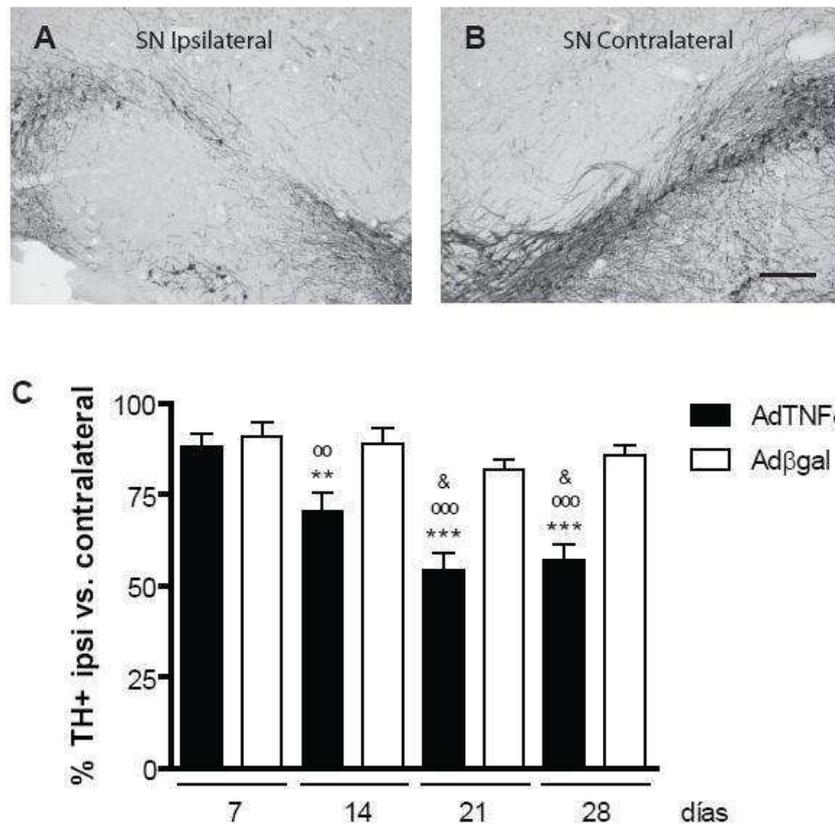


Figura 4-13. La sobre-expresión crónica de $TNF-\alpha$ en la substantia nigra tiene un efecto neurodegenerativo progresivo sobre las neuronas dopaminérgicas. A) Inmunohistoquímica para detectar TH en cortes de *substantia nigra* 21 días después de la inyección de 1×10^7 partículas infectivas de AdTNF α . Se muestra el hemisferio inyectado (A) y el contralateral a la inyección (B). Barra de escala: 250 μ m. C) Recuento manual de neuronas TH positivas en la *substantia nigra*, expresado como porcentaje de neuronas TH positivas en el lado ipsilateral a la inyección con respecto al lado contralateral, después de 7, 14, 21 y 28 días de la inyección de AdTNF α o Ad β -gal. ** $p < 0.01$ animales inyectados con AdTNF α vs. Ad β gal, 14 días p.i.; *** $p < 0.001$ animales inyectados con AdTNF α vs. Ad β gal, 21 y 28 días p.i.; ^{oo} $p < 0.01$ animales inyectados con AdTNF α 14 días p.i. vs. 7 días p.i.; ^{ooo} $p < 0.001$ animales inyectados con AdTNF α 21 y 28 días p.i. vs. 7 días p.i.; & $p < 0.05$ animales inyectados con AdTNF α 21 y 28 días p.i. vs. 14 días p.i. ANOVA de dos factores, post-test Fisher LSD. n=5-9 por grupo.

4.4.2. Conteo de neuronas tirosina hidroxilasa positivas usando estereología

Con el objetivo de corroborar los datos obtenidos en el conteo manual de neuronas dopaminérgicas en la *substantia nigra*, realizamos la cuantificación mediante

estereología, usando el programa Stereo Investigator. La estereología es un método que permite deducir estructuras de tres dimensiones a partir de cortes de dos dimensiones. El programa coloca una grilla sobre el área de interés, y selecciona al azar los cuadros para realizar el conteo, permitiendo un muestreo sistemático y aleatorio. Los cuerpos neuronales TH positivos fueron contados en uno de cada seis cortes seriados de 40 μm , en la *substantia nigra pars compacta* ipsi y contralateral a la inyección de los adenovectores. Analizamos la sección correspondiente al sitio de inyección (identificada en la tinción de Nissl) y las dos adyacentes. Nuevamente, la *substantia nigra* está definida por la marca de TH y por las referencias anatómicas del atlas del cerebro de rata de Paxinos y Watson (Paxinos and Watson, 1997). En este caso, el conteo se realizó utilizando un objetivo de inmersión 100X (Figura 4-14 A). Los resultados se expresaron también como porcentaje de neuronas remanentes en el hemisferio ipsilateral a la inyección con respecto al contralateral.

Los resultados utilizando estereología fueron similares a los obtenidos anteriormente, con el conteo manual (Figura 4-14 B). A los 7 días no se detectó un efecto neurodegenerativo de TNF- α : el porcentaje de neuronas remanentes del lado inyectado no difirió entre los animales inyectados con AdTNF α y los controles. Sin embargo, a los 14 días comenzó a observarse un efecto degenerativo de la citoquina, ya que el porcentaje de neuronas TH positivas remanentes del lado ipsilateral a la inyección con respecto al lado contralateral se tornó significativamente menor en los animales tratados con AdTNF α (55.3%) que en los controles (78.6%), y disminuyó también con respecto a los 7 días (79.8%). Luego de 21 días el efecto neurodegenerativo se tornó más evidente (38%) y a los 28 días se mantuvo (38.7%). Estos datos confirman, utilizando un método de cuantificación objetivo de las neuronas TH positivas, que la sobre-expresión crónica de TNF- α produce una pérdida parcial y progresiva de neuronas dopaminérgicas en la *substantia nigra pars compacta*.

Es importante destacar que al realizar el conteo en sólo tres secciones, el corte donde se encuentra el sitio de inyección y los dos adyacentes, el efecto neurodegenerativo inespecífico dado por la inyección en sí misma es mucho más marcado que si se cuantifican las neuronas TH positivas en toda la *substantia nigra* (como se hizo al hacer el conteo en forma manual, ver figuras 4-13 y 4-14). Es por eso que en este caso el efecto neurodegenerativo del adenovector control (Ad βgal) es más marcado (entre el 72% y el 79% de neuronas dopaminérgicas remanentes en el hemisferio inyectado). Sin embargo, el efecto tóxico de AdTNF α es también más importante (comparándolo con los datos obtenidos al hacer el conteo manual en toda la

substantia nigra), ya que se están evaluando los cortes donde se da la máxima expresión del transgén.

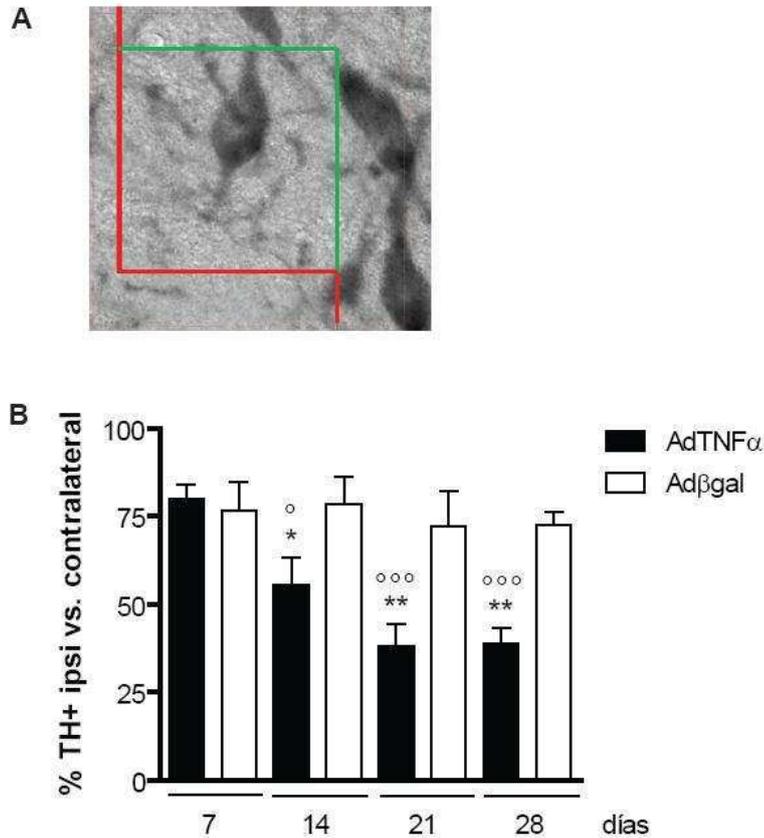


Figura 4-14. La estereología confirma el efecto neurodegenerativo progresivo de la sobreexpresión crónica de $TNF-\alpha$ en la *substantia nigra*. A) Se contaron las neuronas TH positivas utilizando el programa Stereo Investigator. La cuantificación se realizó en los cuadros de conteo elegidos aleatoriamente por el programa, bajo un aumento de 100X, como se muestra en la fotografía. B) Recuento de neuronas TH positivas en la *substantia nigra*, utilizando estereología, después de 7, 14, 21 y 28 días de la inyección de AdTNF α o Ad β -gal. Los resultados fueron expresados como porcentaje de neuronas TH positivas en el lado ipsilateral a la inyección con respecto al lado contralateral. * $p < 0.05$ animales inyectados con AdTNF α vs. Ad β gal, 14 días p.i.; ** $p < 0.01$ animales inyectados con AdTNF α vs. Ad β gal, 21 y 28 días p.i.; $^{\circ}p < 0.05$ animales inyectados con AdTNF α 14 días p.i. vs. 7 días p.i.; $^{\circ\circ\circ}p < 0.001$ animales inyectados con AdTNF α 21 y 28 días p.i. vs. 7 días p.i. ANOVA de dos factores, post-test Fisher LSD. $n = 4-6$ por grupo.

4.4.3. Conteo de neuronas totales en una tinción de Nissl

La *substantia nigra* está compuesta principalmente por neuronas dopaminérgicas, pero hay también neuronas no dopaminérgicas, principalmente gabaérgicas. En un estudio donde se utilizó estereología para cuantificar distintos tipos neuronales en el cerebro medio, Nair-Roberts y colaboradores estimaron que el 29% de las neuronas de la *substantia nigra* eran gabaérgicas (Nair-Roberts et al., 2008). González-Hernández y colaboradores mostraron que casi el 10% de las neuronas dopaminérgicas mesoestriatales expresan también la descarboxilasa de ácido glutámico (la enzima limitante en la síntesis de GABA), pero aun así una proporción significativa de neuronas en la *substantia nigra* son exclusivamente gabaérgicas (Gonzalez-Hernandez et al., 2001).

Por lo tanto, decidimos evaluar si TNF- α ejercía su efecto tóxico específicamente sobre las neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra*, o si otros tipos neuronales también se veían afectados. Para ello, realizamos una tinción de Nissl en cortes de *substantia nigra* de animales sacrificados 21 días luego de la inyección de 1×10^7 partículas infectivas de AdTNF α o Ad β gal, y contamos el número de neuronas totales usando estereología. Con esta tinción se marcan todos los tipos celulares, y las neuronas pueden ser diferenciadas de las células de la glía en base a su morfología. De esta forma, se cuentan tanto neuronas dopaminérgicas como no dopaminérgicas. El conteo se realizó usando el programa Stereo Investigator en forma similar a lo descrito en la sección anterior (4.4.2), y los resultados fueron también expresados como porcentaje de neuronas remanentes en la *substantia nigra* inyectada con respecto a la contralateral.

De este modo, contando el número de neuronas totales en la *substantia nigra* mediante una tinción de Nissl, pudo también evidenciarse el efecto neurodegenerativo de TNF- α , ya que el porcentaje de neuronas totales remanentes del lado ipsilateral a la inyección resultó significativamente menor en los animales tratados con AdTNF α que en los controles (Figura 4-15). Para determinar si el efecto de TNF- α era específico de neuronas dopaminérgicas, comparamos el porcentaje de neuronas remanentes en la *substantia nigra* ipsilateral a la inyección de AdTNF α contadas en la tinción de Nissl y en la inmunohistoquímica para detectar TH (que se muestra también en la figura 4-14 B). Si TNF- α ejerciera su efecto específicamente sobre las neuronas dopaminérgicas, las neuronas gabaérgicas presentes en la *substantia nigra* no se verían afectadas, por lo que la pérdida de neuronas totales (observada en la tinción de Nissl) sería menor que la pérdida de neuronas dopaminérgicas (observada en la inmunohistoquímica para detectar TH). Sin embargo, no pudimos detectar diferencias significativas en el

porcentaje de neuronas remanentes en la *substantia nigra* inyectada entre estos dos grupos (siendo sólo un 5% mayor en el recuento realizado en la tinción de Nissl que en la inmunohistoquímica para detectar TH) (Figura 4-15).

En base a estos resultados, no podemos descartar que la expresión crónica de TNF- α haya afectado también a neuronas gabaérgicas. Por otro lado, esta observación también sugiere que el menor porcentaje de neuronas TH positivas observado en los animales tratados con AdTNF α no se debe a que TNF- α induce una disminución en la expresión de TH, sino que produce realmente muerte neuronal.

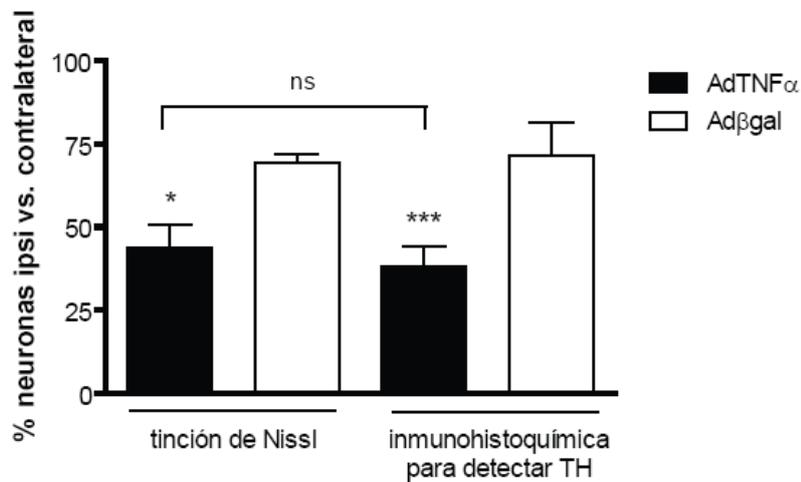


Figura 4-15. La sobre-expresión crónica de TNF- α tiene un efecto neurodegenerativo sobre los distintos tipos neuronales de la *substantia nigra*. Recuento de neuronas en la *substantia nigra*, usando estereología, en una tinción de Nissl (neuronas totales) y en una inmunohistoquímica para detectar TH (neuronas dopaminérgicas), 21 días después de la inyección de AdTNF α o Ad β gal. Los resultados fueron expresados como porcentaje de neuronas en el lado ipsilateral a la inyección con respecto al lado contralateral. * $p < 0.05$ animales inyectados con AdTNF α vs. Ad β gal en la tinción de Nissl; *** $p < 0.001$ animales inyectados con AdTNF α vs. Ad β gal en la inmunohistoquímica para detectar TH. No se observaron diferencias significativas en el número de neuronas remanentes en la *substantia nigra* ipsilateral contadas como células TH positivas o en la tinción de Nissl, en animales inoculados con AdTNF α (ns). ANOVA de dos factores, post-test Fisher LSD. $n = 3-6$ por tratamiento.

4.5. Déficit motores causados por la sobre-expresión de TNF- α en la *substantia nigra*

Como se mencionó en la introducción, los cuerpos celulares de las neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra* extienden sus prolongaciones hacia el estriado, donde hacen sinapsis con las neuronas estriatales. Por lo tanto, la muerte de las neuronas de la *substantia nigra* tiene como consecuencia un déficit de dopamina en el estriado, lo que lleva a la aparición de los principales síntomas motores de la enfermedad cuando se alcanza cierto nivel de muerte neuronal. En los modelos animales, estos síntomas pueden ser evaluados a través de distintos exámenes motores. Uno de ellos es el test del cilindro, que evalúa la aparición de aquinesias en los miembros delanteros (Schallert and Jones, 1993). Brevemente, consiste en colocar al animal dentro de un cilindro de acrílico y contar el número de veces que apoya cada pata en el cilindro al levantarse (ver materiales y métodos, página 61 para la descripción detallada del test). Por lo tanto, para evaluar si la pérdida de neuronas en la *substantia nigra* inducida por TNF- α tenía como consecuencia la aparición de síntomas motores, se realizó el test del cilindro el día anterior al sacrificio (6, 13, 20 y 27 días luego de la inyección de AdTNF α o Ad β gal). Los resultados fueron expresados como porcentaje de toques con la pata contralateral a la inyección, con respecto al número total de toques. Dado que la lesión es unilateral, y las vías motoras están cruzadas, se espera que los animales con un proceso neurodegenerativo en la *substantia nigra* inyectada hagan menos toques con la pata contralateral a la lesión que los controles.

Al realizar el test a los 6 días p.i. de los adenovectores, no se detectaron diferencias en el porcentaje de toques con la pata contralateral a la inyección entre los animales que sobre-expresan TNF- α y los controles (Figura 4-16). Como era de esperar, estos animales, que todavía no muestran un proceso neurodegenerativo en la *substantia nigra* (como muestran las figuras 4-13 C y 4-14 B) realizaron aproximadamente el mismo número de toques con la pata ipsilateral y contralateral a la inyección (el porcentaje de toques con la pata contralateral fue de alrededor del 50%). A los 14 días p.i. comenzó a detectarse un efecto neurodegenerativo de la citoquina, que se ve reflejado en una reducción significativa en el porcentaje de toques con la pata contralateral en los animales inoculados con AdTNF α (35%) con respecto a los controles (61%) al realizar el test 13 días p.i. (Figura 4-16), evidenciando la aparición de aquinesia en los miembros delanteros. A los 21 y 28 días luego de la inoculación de AdTNF α , el efecto neurodegenerativo se acentúa, y este efecto se refleja también en

el test del cilindro llevado a cabo a los 20 y 27 días p.i.: en los animales inyectados con AdTNF α el porcentaje de toques con la pata contralateral a la inyección es significativamente menor que en los controles (alrededor del 20% vs. 50% respectivamente). Por lo tanto, podemos concluir que la pérdida progresiva de neuronas en la *substantia nigra* inducida por TNF- α tiene como consecuencia la aparición de disfunciones motoras.

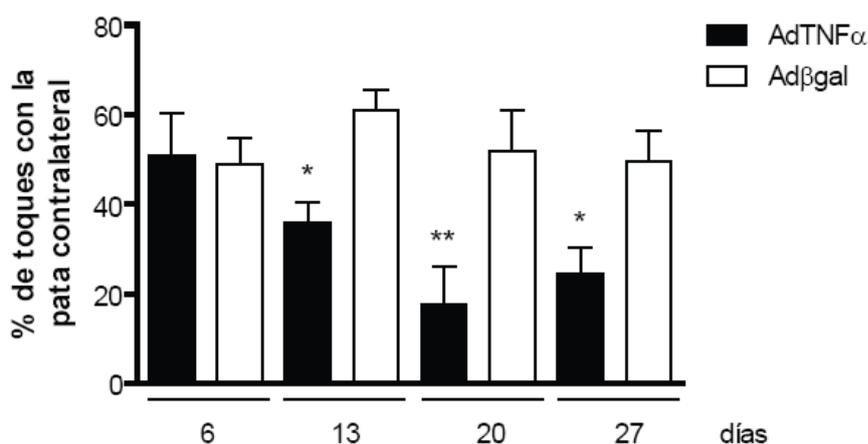


Figura 4-16. La sobre-expresión crónica de TNF- α en la *substantia nigra* produce aquinesia de los miembros delanteros contralaterales a la lesión. Test del cilindro: se colocó al animal en un cilindro de acrílico y se cuantificó el número de toques que hizo con la pata ipsi y contralateral a la inyección de AdTNF α o Ad β gal, a los de 6, 13, 20 y 27 días p.i. Los resultados se expresaron como porcentaje de toques con la pata contralateral a la inyección con respecto al número total de toques. *p<0.05 animales inyectados con AdTNF α vs. Ad β gal, 13 y 27 días p.i.; **p<0.01 animales inyectados con AdTNF α vs. Ad β gal, 20 días p.i. ANOVA de dos factores, post-test Fisher LSD. n=5-9 por grupo.

4.6. Caracterización de la respuesta inflamatoria desencadenada por la sobre-expresión de TNF- α en la *substantia nigra*

Con el objetivo de explorar los mediadores celulares que podrían estar involucrados en la muerte neuronal inducida por la sobre-expresión crónica de TNF- α en la *substantia nigra*, estudiamos la respuesta inflamatoria desencadenada por dicha citoquina. Esta citoquina pro-inflamatoria podría estar induciendo un infiltrado inflamatorio (células inmunes provenientes de la periferia que infiltran el parénquima cerebral), activando la

microglía (macrófagos residentes en el sistema nervioso central) y/o los astrocitos (otros componentes de la glía), todos los cuales son capaces de producir mediadores tóxicos (como citoquinas pro-inflamatorias, prostaglandinas, óxido nítrico, especies reactivas de oxígeno, etc.), que podrían estar participando en inducir la muerte neuronal. Alternativamente, como se discutirá más adelante (sección 4.7), TNF- α podría actuar directamente sobre las neuronas, llevando a la muerte celular (ya sea a través de la producción de sustancias tóxicas para las neuronas o por apoptosis).

4.6.1. Infiltrado inflamatorio

Frente a determinados estímulos, los leucocitos circulantes en sangre son capaces de infiltrar el parénquima cerebral, ya sea por ruptura de la barrera hematoencefálica o incluso a través de una barrera intacta (Carson et al., 2006). Por lo tanto, nos planteamos en primer lugar el objetivo de determinar si la sobre-expresión de TNF- α en la *substantia nigra* inducía un infiltrado inflamatorio. Para ello realizamos una tinción de Nissl en cortes de *substantia nigra* de animales inyectados con AdTNF α o Ad β gal a los diferentes tiempos de estudio. Como se mencionó anteriormente, la tinción de Nissl utiliza Violeta de Cresilo, que es un colorante básico que se une a los componentes ácidos de la célula. Por lo tanto, con esta tinción se marcan todos los tipos celulares, pero es posible distinguir uno de otro en base a su morfología. De este modo, es posible identificar las células inmunes provenientes de la periferia. En particular, los distintos tipos de leucocitos pueden ser también identificados de acuerdo con su morfología. Los neutrófilos se caracterizan por su núcleo segmentado, los linfocitos son más pequeños, con un núcleo redondo y grande (con poco citoplasma), y los macrófagos son de mayor tamaño, y su núcleo es redondo pero más pequeño (Longo, 2008). Esta tinción permite también evaluar la integridad del tejido, y en ningún caso detectamos un daño al tejido evidente.

Pudo observarse reclutamiento leucocitario en la *substantia nigra*, tanto en los animales inyectados con AdTNF α como con Ad β gal, en todos los tiempos estudiados (Figura 4-17). Sin embargo, en los controles el infiltrado estaba totalmente restringido al sitio de inyección (Figura 4-17 A-D) y no se observó vasodilatación. Los animales inoculados con AdTNF α , además del infiltrado inflamatorio (Figura 4-17 E-H), mostraron una evidente vasodilatación (Figura 4-17 G y K). Se realizó un análisis detallado del infiltrado inflamatorio con el objetivo de establecer por qué tipos celulares estaba compuesto. De este modo, pudimos determinar que el infiltrado inflamatorio

estaba compuesto principalmente por macrófagos, y no pudimos detectar la presencia de neutrófilos (Figura 4-17 I-L).

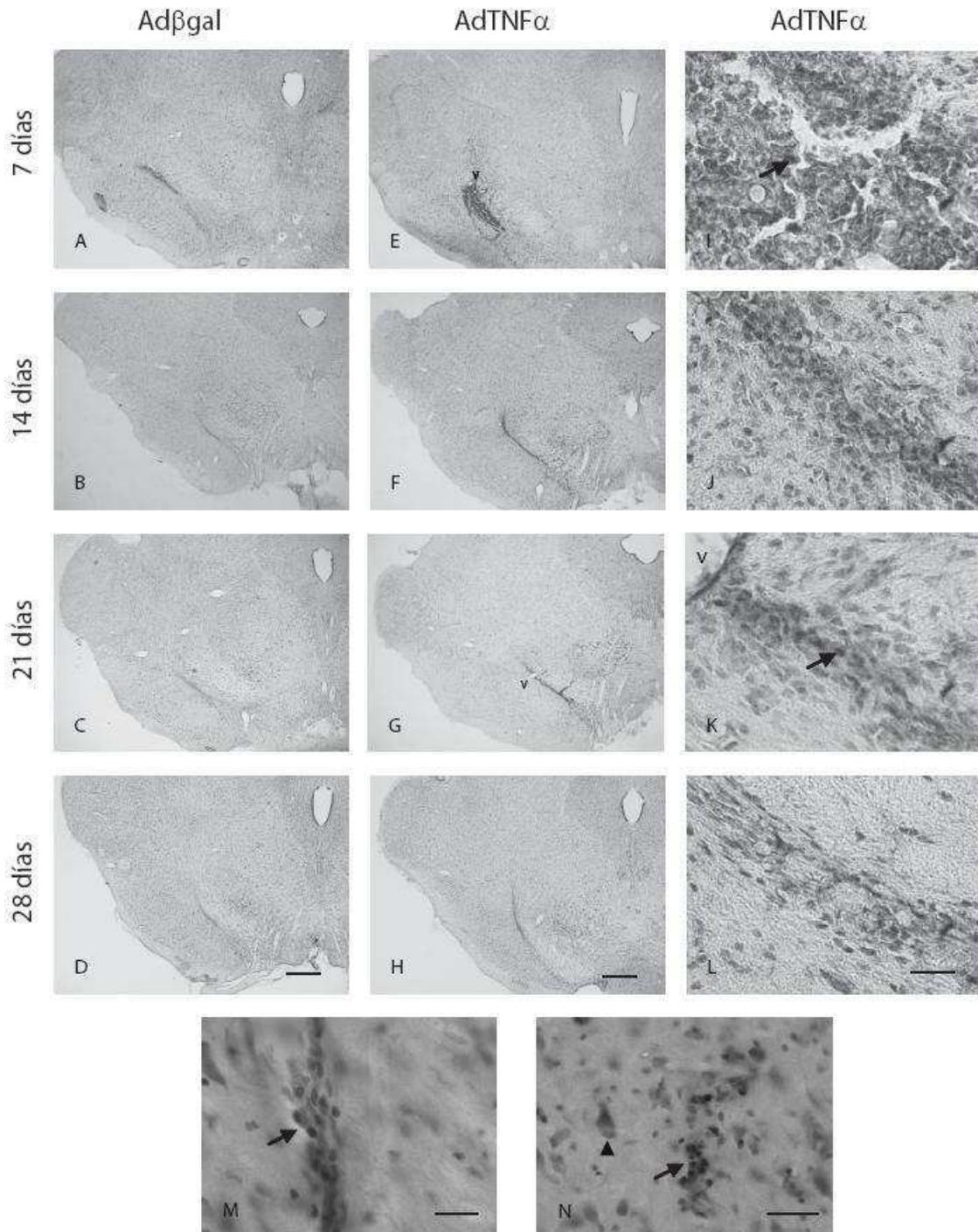


Figura 4-17. La sobre-expresión de $TNF-\alpha$ induce un infiltrado inflamatorio compuesto principalmente por macrófagos. Se realizó una tinción de Nissl (con Violeta de Cresilo) en cortes de *substantia nigra* de animales inyectados con Ad β gal a los 7 (A), 14 (B), 21 (C) y 28 (D) días, o Ad $TNF\alpha$ luego de 7 (E e I), 14 (F y J), 21 (G y K) y 28 (H y L) días post-inyección. Barra de escala A-H: 500 μ m. I-L son detalles de los paneles E-H respectivamente. Barra de escala I-L: 62.5 μ m. Las flechas indican macrófagos. Se muestra la vasodilatación (v) observada al inyectar Ad $TNF\alpha$ (E, G y K). M-N) Se muestra en mayor detalle los macrófagos infiltrantes (flechas), dispuestos en un vaso sanguíneo (M) o en comparación con una neurona (N, la punta de flecha indica la neurona). Barra de escala M: 20 μ m; barra de escala N: 30 μ m.

El volumen de infiltrado inflamatorio en la *substantia nigra* fue cuantificado utilizando los programas Stereo Investigator y NeuroLucida. Brevemente, se delimitó el área de infiltrado inflamatorio en uno de cada seis cortes seriados de 40 μ m en la *substantia nigra* completa, definida por las referencias anatómicas del atlas del cerebro de rata de Paxinos y Watson (Paxinos and Watson, 1997), y el programa determinó el volumen correspondiente utilizando estereología. De este modo, corroboramos que para cada tiempo estudiado el infiltrado es significativamente más extenso en los animales tratados con Ad $TNF\alpha$ que en los controles (Figura 4-18). Asimismo, el volumen de infiltrado inflamatorio disminuye con el tiempo en los animales inyectados con Ad $TNF\alpha$, siendo significativamente menor a los 21 y 28 días p.i. comparado con los 7 días p.i. (Figura 4-18).

Por lo tanto, podemos concluir que la sobre-expresión de $TNF-\alpha$ induce un infiltrado inflamatorio en la *substantia nigra*, que está compuesto principalmente por macrófagos y disminuye con el tiempo.

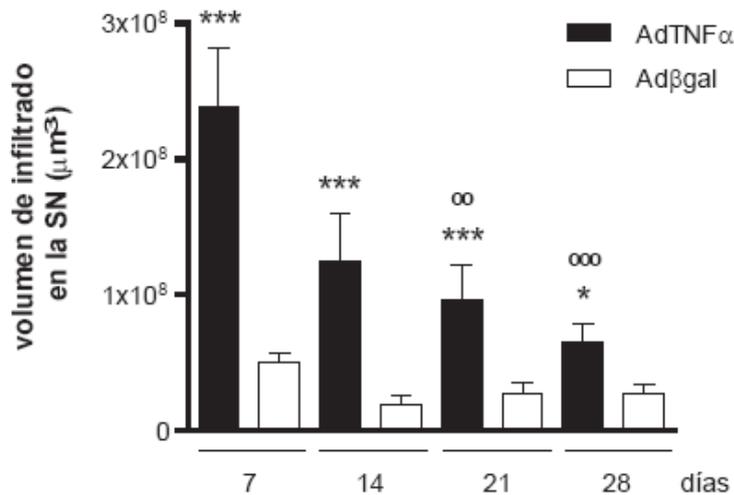


Figura 4-18. La sobre-expresión de *TNF- α* induce un infiltrado inflamatorio en la *substantia nigra* que disminuye con el tiempo. Cuantificación del volumen de infiltrado inflamatorio en toda la *substantia nigra* (SN), usando los programas Stereo Investigator y NeuroLucida, después de 7, 14, 21 y 28 días de la inyección de AdTNF α o Ad β -gal. * $p < 0.05$ animales inyectados con AdTNF α vs. Ad β -gal, 28 días p.i.; *** $p < 0.001$ animales inyectados con AdTNF α vs. Ad β -gal, 7, 14 y 21 días p.i.; °° $p < 0.01$ animales inyectados con AdTNF α 21 días p.i. vs. 7 días p.i.; °°° $p < 0.001$ animales inyectados con AdTNF α 28 días p.i. vs. 7 días p.i. ANOVA de dos factores, post-test Fisher LSD (los datos fueron transformados usando logaritmo para cumplir la suposición de igualdad de varianza). $n = 3-5$ por grupo.

4.6.2. Activación de la microglía

Existen macrófagos residentes en todos los tejidos del cuerpo. En los tejidos periféricos, estos macrófagos son la primera línea de defensa frente a injurias e infecciones. Luego de ser activados, además de tener capacidad fagocítica, pueden reclutar otras moléculas y células efectoras. La población de macrófagos residentes en el sistema nervioso central está compuesta por la microglía (que constituye la población más abundante) y los macrófagos perivasculares. La microglía se caracteriza por encontrarse normalmente en reposo, con morfología típicamente alargada y ramificada. Como consecuencia de enfermedades o injurias en el cerebro, la microglía se activa rápidamente. Esta activación está acompañada por cambios morfológicos, así como también por síntesis *de novo* de moléculas tanto de superficie como citoplasmáticas (Perry et al., 2010). Es importante destacar que, como se mencionó en la introducción, se ha encontrado sistemáticamente microglía activada en

la *substantia nigra* de pacientes con enfermedad de Parkinson y de modelos animales de la enfermedad. A continuación, nos propusimos estudiar la activación de la microglía en la *substantia nigra* en respuesta a la sobre-expresión de TNF- α , tanto por los cambios en su morfología como por la expresión de un marcador de superficie, el complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC clase II).

4.6.2.1. Activación morfológica de la microglía

La microglía cumple en el cerebro un papel de vigilancia inmunológica, y prácticamente cualquier manipulación o injuria que perturba la homeostasis lleva a la activación de estas células gliales, la cual se manifiesta como cambios en su morfología (Perry et al., 2010). Morfológicamente pueden describirse cuatro estadios de activación. La microglía en reposo se caracteriza por su forma alargada y con ramificaciones finas (estadio 1). Al activarse, se observa un acortamiento y ensanchamiento de los procesos, y el cuerpo celular se va redondeando (estadios 2 y 3), hasta llegar a una célula redonda y sin procesos con capacidad fagocítica (estadio 4) (Kreutzberg, 1996, Ferrari et al., 2006) (ver introducción, página 30, y materiales y métodos, página 69) (Figura 4-19 F', F'' y A').

Para analizar la activación morfológica de la microglía, se llevó a cabo una fluorescencia doble utilizando la lectina Griffonia Simplicifolia (GSA, una lectina capaz de unirse a la microglía) y un anticuerpo para detectar TH (para delimitar la región de la *substantia nigra*) en cortes de animales inyectados con AdTNF α o Ad β gal a los distintos tiempos post-inyección de los adenovectores. Se observaron células tipo 4 en el sitio de inyección, y microglía estadio 2 y 3 alrededor del mismo, tanto en los animales inyectados con AdTNF α como con Ad β gal (Figura 4-19 A-H). Sin embargo, en los controles la microglía activada estaba más restringida al sitio de inyección y se observaron menos células en el máximo estadio de activación (estadio 4) (Figura 4-19 A-D).

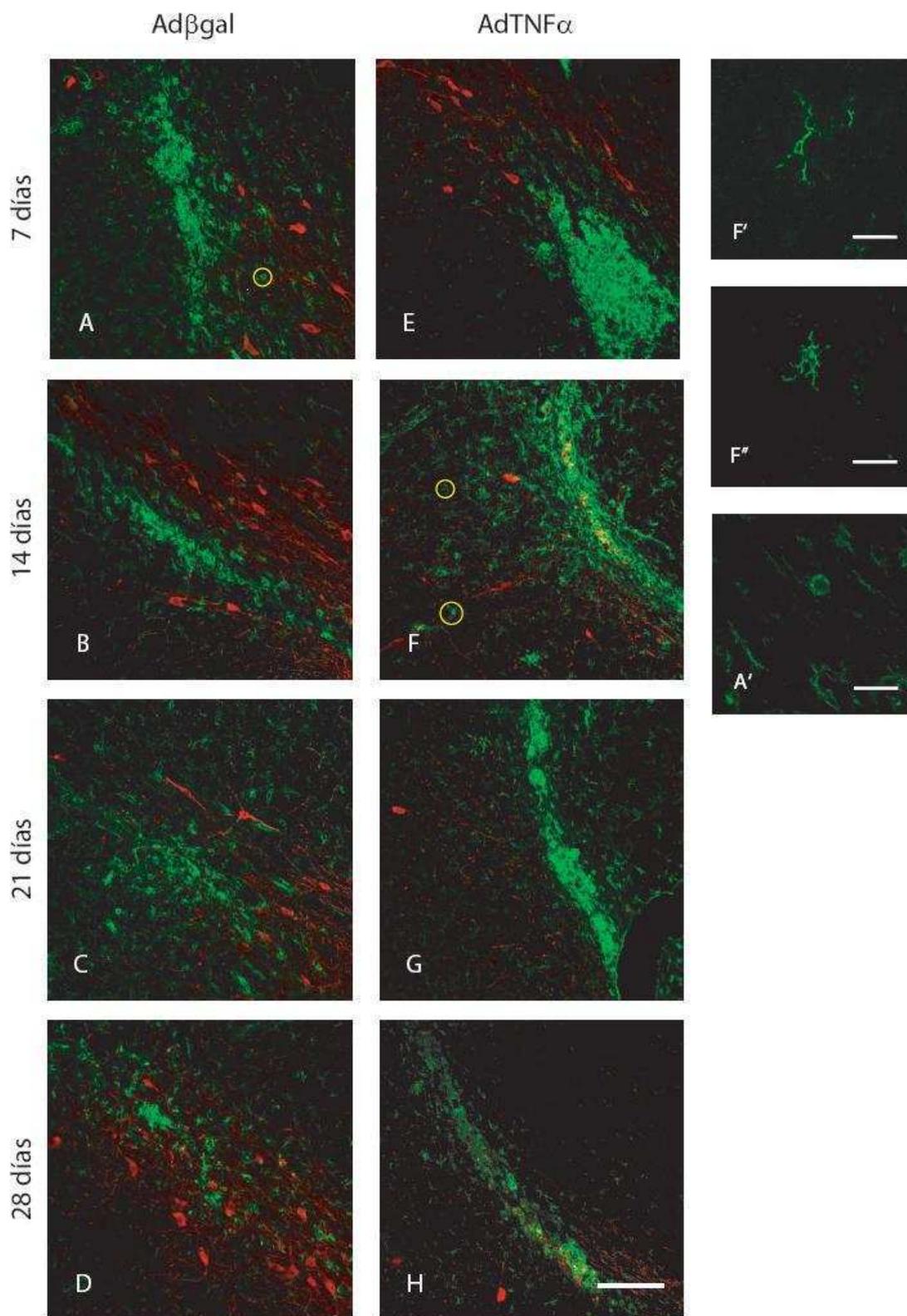


Figura 4-19. Respuesta de la microglía a la sobre-expresión de $TNF-\alpha$ observada por marcación con GSA. Se realizó una tinción doble para detectar GSA (verde) y TH (rojo) en cortes de *substantia nigra* de animales inyectados con Ad β gal a los 7 (A), 14 (B), 21 (C) y 28 (D) días post-inyección; o con Ad $TNF\alpha$ luego de 7 (E), 14 (F), 21 (G) y 28 (H) días. Barra de escala: 100 μ m. F'-F'') Detalle de F (círculos amarillos) mostrando ejemplos de estadios 2 (F') y 3 (F'') de activación de la microglía respectivamente. A') Detalle de A (círculo amarillo) mostrando un ejemplo de estadio 4 de activación de microglía. Barra de escala: 20 μ m.

La microglía estadio 4 y los macrófagos son indistinguibles en cuanto a morfología y marcadores, por lo que GSA marca ambos tipos celulares. Por lo tanto, no es posible diferenciar entre la microglía endógena en el estadio de mayor activación y los macrófagos infiltrantes. El volumen de microglía estadio 4/macrófagos (células redondeadas GSA positivas) en la *substantia nigra* fue cuantificado utilizando los programas Stereo Investigator y Neurolucida. Brevemente, se delimitó el área de células redondeadas GSA positivas en uno de cada seis cortes seriados de 40 μ m en la *substantia nigra* completa, definida por la tinción de TH y las referencias anatómicas del atlas del cerebro de rata de Paxinos y Watson (Paxinos and Watson, 1997), y el programa determinó el volumen correspondiente usando estereología. El volumen de microglía estadio 4/macrófagos dentro de la *substantia nigra* resultó significativamente mayor en los animales inyectados con Ad $TNF\alpha$ que en los controles a los 7 y 14 días p.i. (Figura 4-20 A). Por otro lado, este volumen disminuyó a lo largo del tiempo, siendo menor a los 14, 21 y 28 días que a los 7 días p.i. en animales inoculados con Ad $TNF\alpha$. En los animales inyectados con Ad β gal también se observó una disminución significativa en el volumen de microglía estadio 4/macrófagos a los 14, 21 y 28 días con respecto a los 7 p.i. (Figura 4-20 A). Este efecto inespecífico del adenovector control fue un efecto transitorio, que se detectó sólo a los 7 días luego de la inoculación, e incluso a este tiempo el volumen de microglía estadio 4/macrófagos fue significativamente menor que en los animales que sobre-expresan $TNF-\alpha$. Por otro lado, también se contó el número de células GSA positivas estadios 2 y 3, identificadas por su morfología, en la *substantia nigra*. La cuantificación se realizó en forma manual bajo un aumento de 40X. No se pudieron detectar diferencias significativas entre los animales tratados con Ad $TNF\alpha$ y los controles en ningún tiempo estudiado, ni en los animales inyectados con Ad $TNF\alpha$ entre sí (Figura 4-20 B).

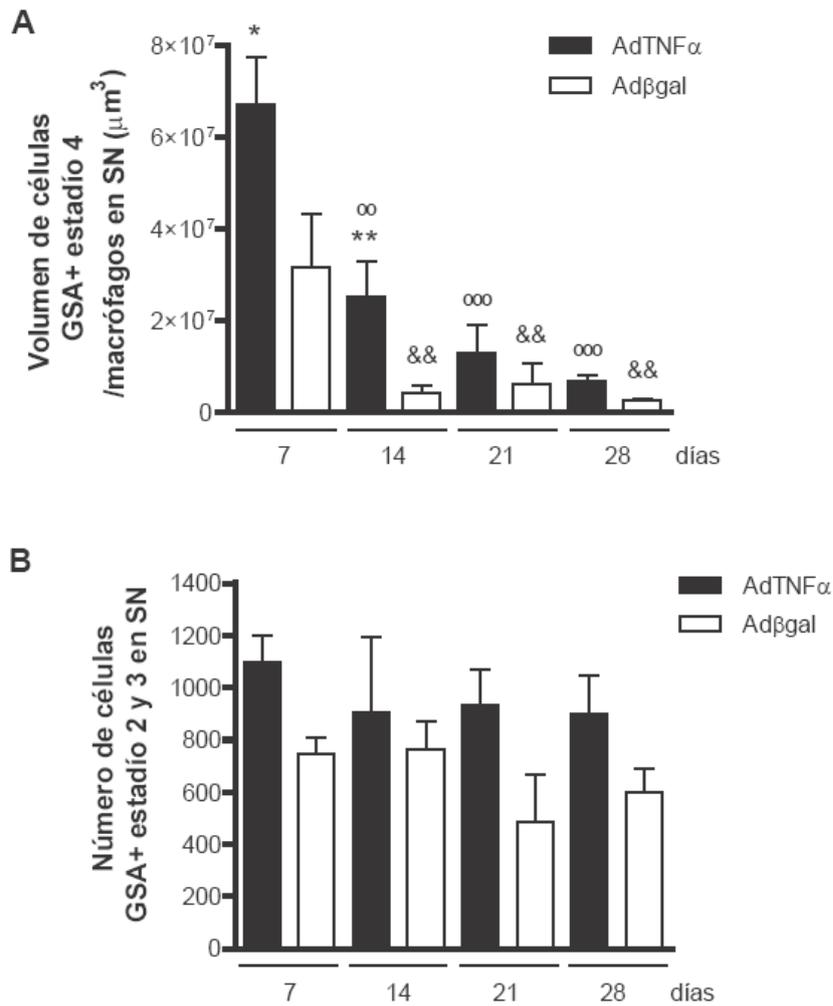


Figura 4-20. Volumen de células GSA positivas en la substantia nigra luego de la sobre-expresión de TNF- α . A) Cuantificación del volumen de células GSA positivas estadio 4/macrófagos en toda la *substantia nigra* (SN), usando los programas Stereo Investigator y NeuroLucida, después de 7, 14, 21 y 28 días de la inyección de AdTNF α o Ad β -gal. * $p < 0.05$ animales inyectados con AdTNF α vs. Ad β -gal, 7 días p.i.; ** $p < 0.01$ animales inyectados con AdTNF α vs. Ad β -gal, 14 días p.i.; °° $p < 0.01$ animales inyectados con AdTNF α 14 días p.i. vs. 7 días p.i.; °°° $p < 0.001$ animales inyectados con AdTNF α 21 y 28 días p.i. vs. 7 días p.i.; && $p < 0.01$ animales inyectados con Ad β -gal 14, 21 y 28 días p.i. vs. 7 días p.i. B) Cuantificación manual del número de células GSA positivas estadios 2 y 3 en la *substantia nigra* (SN). No se observaron diferencias significativas. ANOVA de dos factores, post-test Fisher LSD. n=3-4 por grupo.

4.6.2.2. Expresión de marcadores de superficie en microglía activada

Con el objetivo de profundizar el análisis de la activación de la microglía inducida por la sobre-expresión de TNF- α , estudiamos una de las moléculas cuya expresión aumenta al activarse la microglía: MHC clase II. Para ello, realizamos una inmunofluorescencia doble para detectar MHC clase II (que marca la microglía activada) y TH (para definir la región de la *substantia nigra*) en cortes de *substantia nigra* de animales inyectados con AdTNF α o Ad β gal a los distintos tiempos de estudio. Nuevamente, es importante aclarar que no es posible diferenciar las células microgliales en estadio 4 de activación de los macrófagos que provienen de la periferia, siendo ambas células redondeadas y MHC clase II positivas. En forma similar a lo ocurrido en la inmunofluorescencia con GSA, las células redondeadas MHC clase II positivas (microglía estadio 4/macrófagos) se encontraron principalmente en el sitio de inyección, mientras que la microglía activada a estadio 2 y 3 se observó fundamentalmente alrededor del mismo, tanto en los animales inyectados con AdTNF α como con Ad β gal (Figura 4-21 A-H). Sin embargo, en estos últimos la microglía activada estaba más restringida al sitio de inyección y se detectaron menos células en estadio 4 de activación (Figura 4-21 A-D). Se pudo observar que la marca para MHC clase II estaba más restringida al sitio de inyección que la marca de GSA, y en general (para el mismo tratamiento) se detectaron más células GSA positivas que MHC clase II positivas. Esta observación no es sorprendente, ya que MHC clase II marca microglía activada (y/o células provenientes de la periferia), y por lo tanto se usa como un índice adicional de activación de microglía, mientras que GSA es un marcador general de células microgliales (independientemente de su estadio de activación).

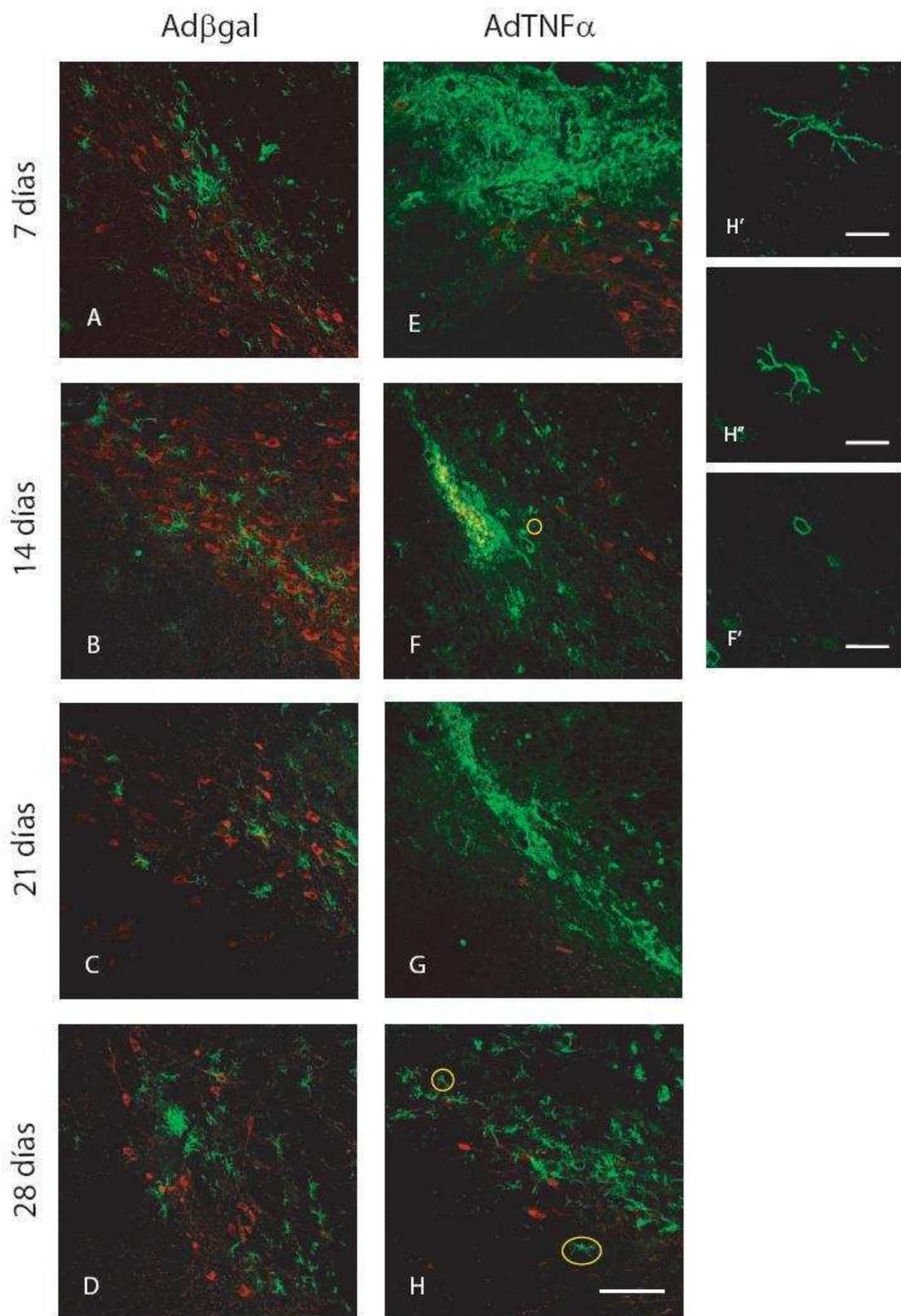


Figura 4-21. Respuesta de la microglía a la sobre-expresión de $TNF-\alpha$ observada por inmunomarcación de MHC clase II. Se profundizó el análisis de la activación de la microglía, llevando a cabo una inmunofluorescencia doble para detectar MHC clase II (verde) y TH (rojo) en cortes de *substantia nigra* de animales inyectados con Ad β gal a los 7 (A), 14 (B), 21 (C) y 28 (D) días post-inyección; o con Ad $TNF\alpha$ luego de 7 (E), 14 (F), 21 (G) y 28 (H) días. Barra de escala: 100 μ m. H'-H'') Detalle de H (círculos amarillos) mostrando ejemplos de estadios 2 (H') y 3 (H'') de activación de la microglía respectivamente. F') Detalle de F (círculo amarillo) mostrando un ejemplo de estadio 4 de activación de microglía. Barra de escala: 20 μ m.

En este caso, fue posible cuantificar el número de células redondeadas MHC clase II positivas (microglía estadio 4/macrófagos) en la *substantia nigra*. En el caso de la tinción con GSA, estas células se encontraban demasiado cercanas, imposibilitando contarlas en forma individual, y por ello se midió el volumen. La marca de MHC clase II fue más discreta, permitiendo hacer el recuento celular. La cuantificación se realizó manualmente con un aumento de 40X, en uno de cada seis cortes seriados de 40 μ m en la *substantia nigra* completa, definida por la tinción de TH y las referencias anatómicas del atlas del cerebro de rata de Paxinos y Watson (Paxinos and Watson, 1997). El número de células de microglía estadio 4/macrófagos MHC clase II positivas en la *substantia nigra* resultó significativamente mayor en animales inyectados con Ad $TNF\alpha$ que en los controles 7, 14 y 21 días después de la inyección (Figura 4-22 A). También disminuyó con el tiempo en animales tratados con Ad $TNF\alpha$, siendo estadísticamente menor a los 14, 21 y 28 días que a los 7 días p.i., y a los 28 días con respecto a los 14 y 21 días p.i. (Figura 4-22 A). Por otro lado, se cuantificó el número de células microgliales en estadios 2 y 3 de activación en la *substantia nigra*. De forma similar a lo ocurrido con la tinción con GSA, no se pudieron detectar diferencias significativas en el número de microglía estadio 2 y 3 MHC clase II positivas entre los animales inyectados con Ad $TNF\alpha$ y Ad β gal en ningún tiempo estudiado, ni al comparar los animales tratados con Ad $TNF\alpha$ entre sí (Figura 4-22 B).

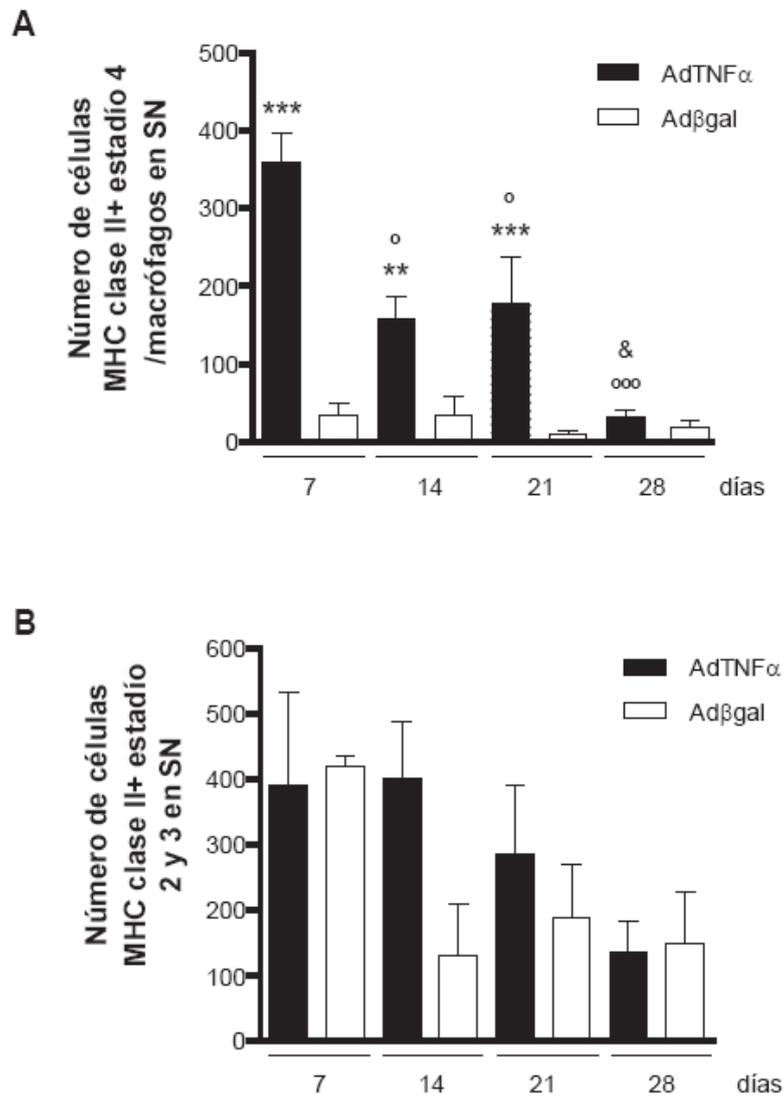


Figura 4-22. Volumen de células MHC clase II positivas en la *substantia nigra* luego de la sobre-expresión de *TNF- α* . A) Cuantificación manual del número de células MHC clase II positivas estadio 4/macrófagos en toda la *substantia nigra* (SN), después de 7, 14, 21 y 28 días de la inyección de AdTNF α o Ad β -gal. ** $p < 0.01$ animales inyectados con AdTNF α vs. Ad β gal, 14 días p.i.; *** $p < 0.001$ animales inyectados con AdTNF α vs. Ad β gal, 7 y 21 días p.i.; ^o $p < 0.05$ animales inyectados con AdTNF α 14 y 21 días p.i. vs. 7 días p.i.; ^{ooo} $p < 0.001$ animales inyectados con AdTNF α 28 días p.i. vs. 7 días p.i.; & $p < 0.05$ animales inyectados con AdTNF α 28 días p.i. vs. 14 y 21 días p.i. B) Cuantificación manual del número de células MHC clase II positivas estadios 2 y 3 en la *substantia nigra* (SN). No se observaron diferencias significativas. ANOVA de dos factores, post-test Fisher LSD. $n = 3-4$ por grupo.

Los resultados obtenidos al estudiar la activación morfológica de la microglía, así como el análisis con marcadores de activación (MHC clase II), sugieren que la sobre-expresión de TNF- α produce activación de la microglía a estadio 4. Si bien no se puede distinguir entre los macrófagos infiltrantes (que, como se describió en la sección 4.6.1, induce la sobre-expresión de TNF- α) y la microglía en su máximo estadio de activación, es posible que las células redondeadas GSA y MHC clase II positivas sean también microglía estadio 4, ya que (como se mencionó anteriormente) prácticamente cualquier injuria en el cerebro induce activación de microglía. El hecho de que no observamos diferencias significativas en el número de células microgliales en estadios de activación 2 y 3 entre los animales tratados con AdTNF α y Ad β gal, sugiere que estas células pasarían rápidamente a un estadio de activación tipo 4, frente a un estímulo pro-inflamatorio fuerte como es TNF- α . Alternativamente, este resultado puede interpretarse como que la mayoría de las células redondeadas GSA y MHC clase II positivas son macrófagos y no microglía en estadio 4 de activación.

4.6.3. Activación de la astrogliá

Los astrocitos constituyen otro tipo de células gliales, que también responden a distintos tipos de injurias. Estas células migran al sitio del daño, desarrollan una morfología hipertrófica y aumentan la expresión de ciertos marcadores como la proteína ácida fibrilar glial (GFAP, del inglés *glial fibrillary acid protein*). Los astrocitos reactivos son capaces de secretar tanto factores anti-inflamatorios como pro-inflamatorios. Y se ha demostrado que producen moléculas neurotróficas, pero también moléculas potencialmente dañinas para las neuronas como especies reactivas de oxígeno (McGeer and McGeer, 2008, Hirsch and Hunot, 2009).

Para estudiar la activación de la astrogliá en respuesta a la sobre-expresión de TNF- α , se hizo una inmunofluorescencia doble para detectar GFAP (que marca astrocitos) y TH (para delimitar la región de la *substantia nigra*) sobre cortes de *substantia nigra* de animales inyectados con AdTNF α o Ad β gal y sacrificados a los distintos tiempos de estudio. Como era de esperar, se pudo observar marca de GFAP en la *substantia nigra pars reticulata* ipsi y contralateral a la inyección, tanto en animales inyectados con AdTNF α como en los controles. Por otro lado, se detectaron células GFAP positivas (con la morfología característica de los astrocitos, de forma estrellada con largas ramificaciones) en la *substantia nigra pars compacta* de todos los animales, pero sólo en el hemisferio inyectado. Pudo observarse una mayor intensidad de marca

de GFAP y mayor cantidad de células GFAP positivas en los animales inyectados con AdTNF α que en los controles (Figura 4-23). Sin embargo, en los animales inoculados con AdTNF α y sacrificados luego de 7 y 14 días, no se observó marca para GFAP en la región del infiltrado inflamatorio (en esa zona hay otros tipos celulares, y por lo tanto no hay astrocitos). En consecuencia, no pudimos cuantificar en forma confiable el volumen de células GFAP positivas en la *substantia nigra*, ya que al hacer la medición dicha región no pudo incluirse dentro del volumen de células GFAP positivas. Por esta razón, a pesar de que en el microscopio se observó claramente una mayor marca de GFAP en los animales inyectados con AdTNF α que en los controles, el volumen de células GFAP positivas en la *substantia nigra* sólo reflejaba esa tendencia, sin alcanzar significancia estadística. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que TNF- α induce la activación de los astrocitos, observándose una tendencia a que haya más astrocitos y mayor marca de GFAP en los animales inyectados con AdTNF α que en los controles.

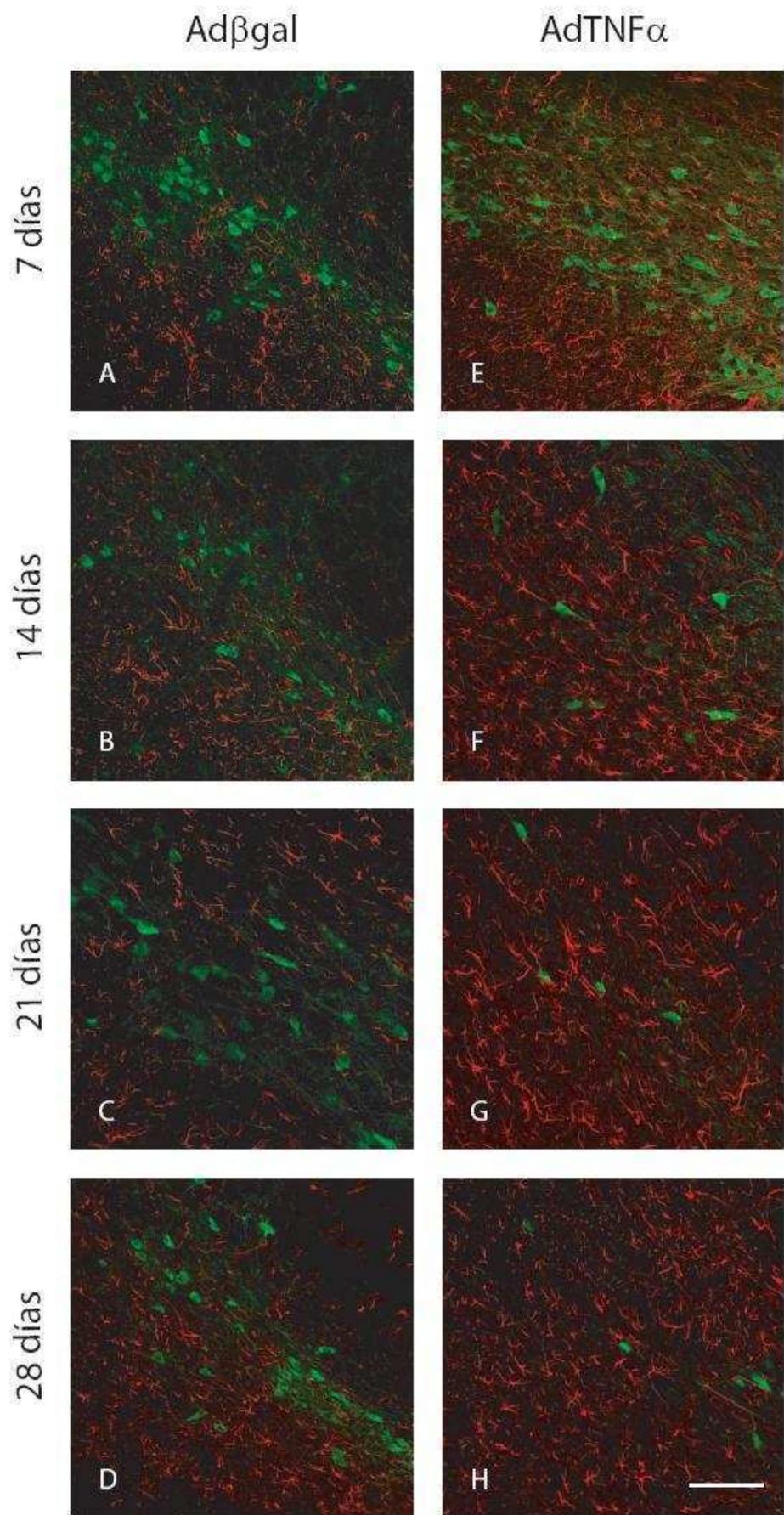


Figura 4-23. Efecto de la sobre-expresión de $TNF-\alpha$ sobre la activación de los astrocitos. Se realizó una inmunofluorescencia doble para detectar TH (verde) y GFAP (rojo) en cortes de *substantia nigra* de animales inyectados con Ad β gal a los 7 (A), 14 (B), 21 (C) y 28 (D) días post-inyección; o con Ad $TNF\alpha$ luego de 7 (E), 14 (F), 21 (G) y 28 (H) días. Barra de escala: 100 μ m.

4.7. Mecanismos moleculares involucrados en la muerte neuronal inducida por la sobre-expresión de $TNF-\alpha$: estudio de moléculas candidatas

A continuación, nos planteamos el objetivo de identificar mediadores moleculares que podrían estar participando en la muerte neuronal inducida por la sobre-expresión crónica de $TNF-\alpha$. Como se planteó anteriormente, esta citoquina pro-inflamatoria podría estar actuando directamente sobre las neuronas, induciendo la muerte neuronal por apoptosis, o podría estar desencadenando una respuesta donde distintos tipos celulares (neuronas, leucocitos infiltrantes, microglía, astrogía) produzcan moléculas tóxicas para las neuronas, como citoquinas pro-inflamatorias, prostaglandinas, óxido nítrico, especies reactivas de oxígeno, etc.

4.7.1. Muerte neuronal por apoptosis

Existen dos receptores para $TNF-\alpha$: el receptor tipo 1 (TNFR1) y el receptor tipo 2 (TNFR2). TNFR1 es un clásico receptor con dominio de muerte, que se une a distintas moléculas adaptadoras para llevar a la activación de las caspasas y finalmente a la muerte celular por apoptosis (Wajant et al., 2003). Por lo tanto, con el fin de estudiar los mecanismos involucrados en la pérdida neuronal inducida por $TNF-\alpha$, estudiamos en primer lugar si $TNF-\alpha$ estaba actuando directamente sobre las neuronas induciendo una cascada apoptótica.

Durante el proceso apoptótico, se produce la característica fragmentación nuclear (cariorrexis), que puede ser visualizada con un colorante que marque ADN, y por lo tanto núcleos, como el colorante fluorescente Hoechst. Por ello, se llevó a cabo una tinción de Hoechst en cortes de *substantia nigra* de animales inyectados con Ad $TNF\alpha$ o Ad β gal y sacrificados 14 días p.i. (Figura 4-24 A). Se cuantificó el número de núcleos apoptóticos (con la característica fragmentación nuclear) en la *substantia nigra*

ipsilateral completa (en uno de cada seis cortes seriados de 40 μm) bajo un aumento de 100X. Tanto en los animales inyectados con AdTNF α como en los controles, se observaron menos de siete núcleos apoptóticos por *substantia nigra*.

Por otro lado, realizamos un Western blot para detectar activación de caspasa 3 en muestras de *substantia nigra* de animales tratados con AdTNF α y controles 7, 14, 21 y 28 días después de la inyección. Los animales fueron sacrificados por decapitación, se disecó la región de la *substantia nigra* y se congeló en nitrógeno líquido. Posteriormente se realizó la extracción de proteínas, en presencia de inhibidores de proteasas, y se llevó a cabo un ensayo de Bradford para cuantificar la cantidad de proteínas totales en cada muestra. El anticuerpo utilizado es capaz de detectar tanto la pro-caspasa 3 como la caspasa 3 clivada (y por lo tanto activada), que se distinguen por su peso molecular (ver control positivo, Figura 4-24 B). En todos los animales, inyectados con AdTNF α o Ad βgal , a los distintos tiempos de estudio, se detectó la presencia de la pro-caspasa, pero en ninguna muestra se observó caspasa 3 clivada (Figura 4-24 B).

En conclusión, no pudimos obtener evidencias de que la muerte neuronal inducida por la sobre-expresión de TNF- α en la *substantia nigra* sea mediante un mecanismo apoptótico.

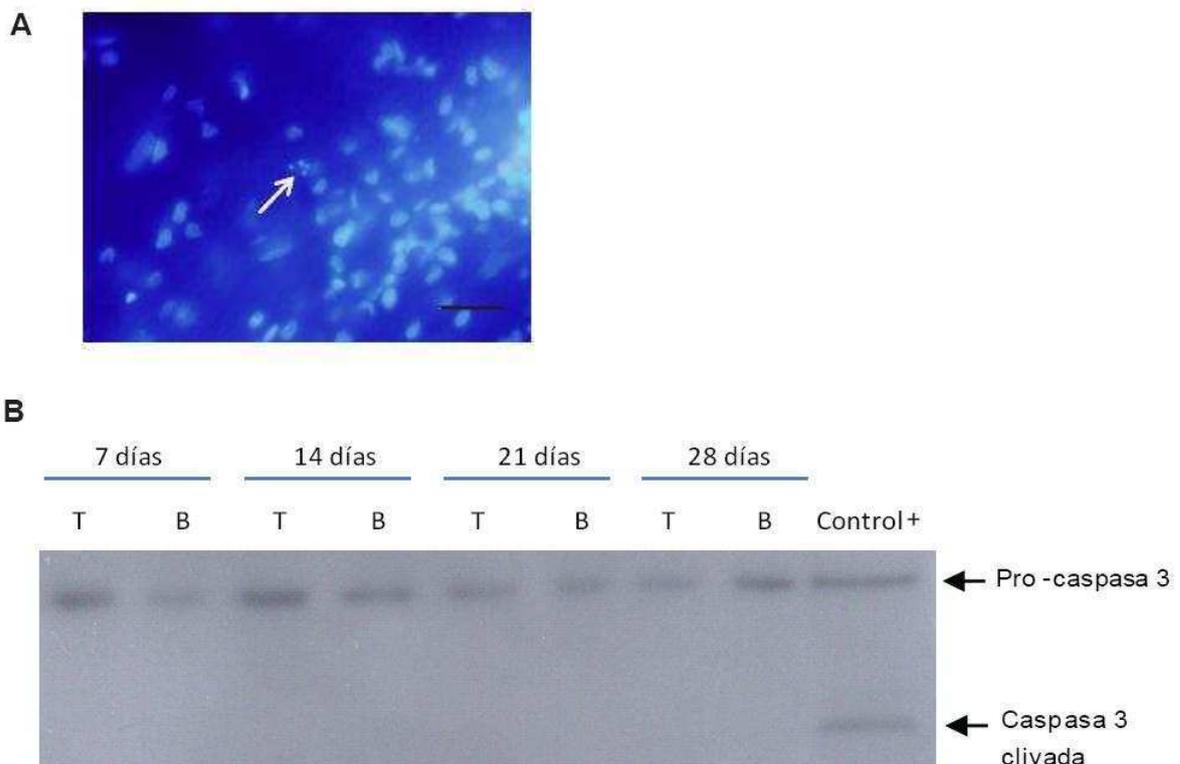


Figura 4-24. Mecanismos de la muerte neuronal: cascada apoptótica. A) Tinción de Hoechst en cortes de *substantia nigra* de animales tratados con AdTNF α , y sacrificados 14 días p.i. Se muestra un núcleo apoptótico (flecha). Barra de escala: 25 μ m. B) Western blot para detectar caspasa 3 en muestras de *substantia nigra* de animales inoculados con de AdTNF α (T) o Ad β gal (B) después de 7, 14, 21 y 28 días de la inyección. Control positivo: células Hela tratadas con TNF- α y cicloheximida. Se indican con flechas las bandas correspondientes a la pro-caspasa 3 y a la caspasa 3 clivada.

4.7.2. Citoquinas pro-inflamatorias: TNF- α e IL-1 β endógenos

Con el objetivo de identificar mediadores moleculares involucrados en la muerte neuronal inducida por TNF- α , nos enfocamos a continuación en las citoquinas pro-inflamatorias. Estas moléculas, además de ejercer un daño directo sobre las neuronas, podrían estar amplificando la respuesta inflamatoria, y por lo tanto la producción de sustancias tóxicas para las neuronas. Existe extensa evidencia de que en la periferia TNF- α e IL-1 β son capaces de inducirse mutuamente, así como también de inducir su propia síntesis. Esto tiene como consecuencia infiltrados inflamatorios mixtos, compuestos tanto por neutrófilos como por macrófagos (Luger and Schwarz, 1990, Groves et al., 1995, Blond et al., 2002, Mak and Saunders, 2006).

Con el objetivo de estudiar si TNF- α recombinante (de ratón) estaba induciendo la síntesis de TNF- α e IL-1 β endógenos, se llevaron a cabo ELISAs específicos para TNF- α (como se describió en la sección 4.3.2) e IL-1 β de rata. Los animales fueron sacrificados por decapitación 7 y 21 días p.i. de AdTNF α o Ad β gal, se disecó la *substantia nigra* de ambos hemisferios y se las congeló en nitrógeno líquido. Luego de extraer las proteínas, se realizaron los ELISAs específicos para detectar TNF- α e IL-1 β de rata utilizando kits comerciales (R&D Systems). Los resultados fueron expresados como pg de IL-1 β por mg de proteínas totales (que fueron cuantificadas por Bradford). Del mismo modo que ocurrió con TNF- α (sección 4.3.2, Figura 4-11), no pudo detectarse un aumento en la expresión de IL-1 β endógena en la *substantia nigra* ipsilateral a la inyección de AdTNF α con respecto al hemisferio contralateral o a los animales controles (Figura 4-25). La curva estándar del kit de ELISA de IL-1 β de rata funcionó como control positivo.

En consecuencia, podemos concluir que TNF- α no induce su propia síntesis ni la de IL-1 β en la *substantia nigra*. Esta observación es consistente con los resultados de Blond y colaboradores, quienes no detectaron síntesis *de novo* de TNF- α o IL-1 β luego

de la inyección de TNF- α en el parénquima cerebral (Blond et al., 2002). Por lo tanto, nuestros resultados proporcionan una evidencia adicional de que en el cerebro existe una red particular de citoquinas (diferente de la descrita en la periferia), en la que TNF- α e IL-1 β inducen distintos perfiles de citoquinas.

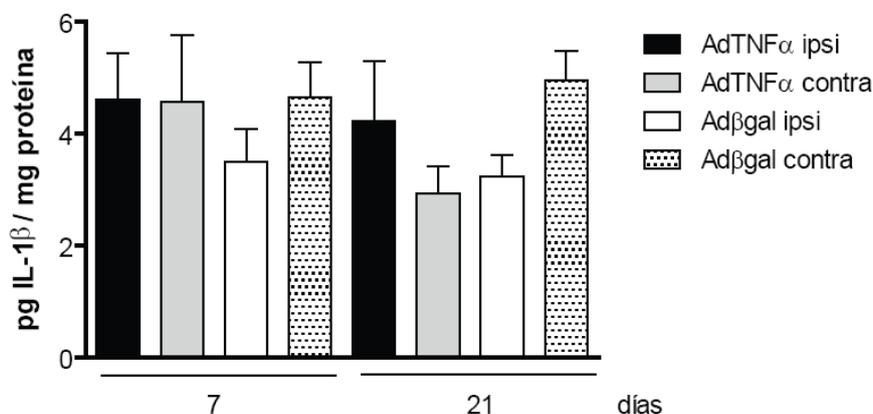


Figura 4-25. Análisis de la expresión de IL-1 β endógena en la *substantia nigra* luego de la inyección de AdTNF α mediante ELISA. Cuantificación de la expresión de IL-1 β de rata, expresado como pg de IL-1 β por mg de proteínas totales, en la *substantia nigra* ipsilateral y contralateral a la inyección de AdTNF α o Ad β gal, 7 y 21 días p.i. n=3-6 por grupo.

4.7.3. Ciclooxygenasa tipo 2 (COX-2)

Para continuar con el estudio de los mediadores moleculares involucrados en la pérdida neuronal inducida por TNF- α , nos centramos en otra molécula inducida por citoquinas pro-inflamatorias, y clásicamente ligada a procesos inflamatorios: la ciclooxygenasa tipo 2. Existen dos isoformas de esta enzima: la ciclooxygenasa tipo 1 (COX-1) y la tipo 2 (COX-2). La primera es constitutiva, mientras que la segunda es inducible, y se ha reportado que TNF- α es capaz de inducir su expresión (Teismann et al., 2003b, Lianxu et al., 2006, Ke et al., 2007). Esta enzima es la responsable de la síntesis de prostaglandinas, moléculas que cumplen múltiples funciones en la respuesta inflamatoria.

Con el objetivo de determinar si TNF- α era capaz de inducir la expresión de COX-2 en nuestro sistema, realizamos un Western blot para estudiar los niveles de expresión de COX-2 en muestras de *substantia nigra* de animales inyectados con AdTNF α o Ad β gal, y sacrificados 7 y 14 días p.i. La cuantificación se realizó midiendo la densidad óptica de las bandas correspondientes a COX-2 y a β -actina, y los resultados se

expresaron como niveles de COX-2 normalizados con respecto a los niveles de β -actina. Luego de 7 días de la inyección de los adenovectores, la sobre-expresión de TNF- α produjo un aumento estadísticamente significativo en los niveles de COX-2 en la *substantia nigra* con respecto al control (Figura 4-26 A). Sin embargo, no se pudieron detectar diferencias significativas en la expresión de COX-2 entre los animales tratados con AdTNF α y los controles 14 días p.i. (Figura 4-26 B).

Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que COX-2 puede ser un mediador temprano de la muerte neuronal inducida por la sobre-expresión de TNF- α en la *substantia nigra*. Por supuesto, harán falta estudios funcionales para corroborar la relevancia del papel de COX-2 en la pérdida de neuronas gatillada por esta citoquina.

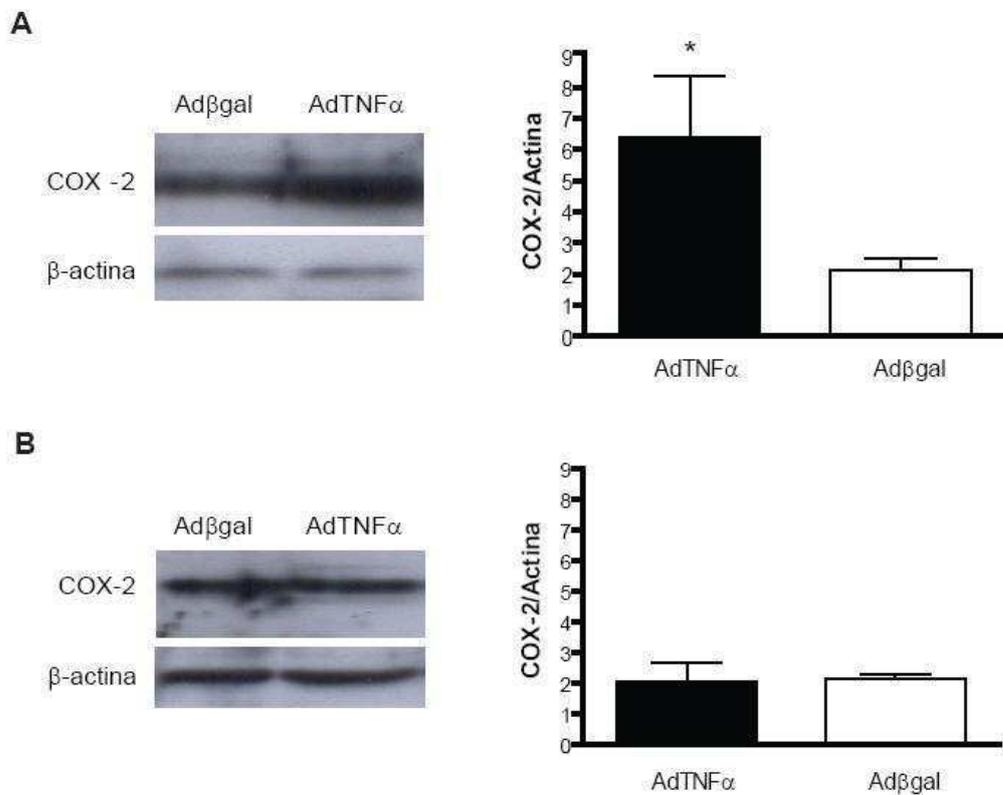


Figura 4-26. Efecto de la sobre-expresión de TNF- α sobre los niveles de COX-2. Western blot para detectar la expresión de COX-2 en muestras de *substantia nigra* de animales inyectados con AdTNF α o Ad β gal 7 (A) y 14 (B) días p.i. Se muestra un gel representativo y la cuantificación de las bandas, que se expresó como densidad óptica de la banda correspondiente a COX-2 sobre la densidad óptica de la banda de β -actina de la misma muestra (medidas con el programa ImageJ). * $p < 0.05$ animales inyectados con AdTNF α vs. Ad β gal, 7 días p.i. Test de Student de una cola no pareado con corrección de Welch (los datos fueron transformados usando la raíz cuadrada para cumplir la suposición de normalidad). $n = 4-5$ por grupo.

4.7.4. Óxido nítrico sintasa (NOS)

Otra molécula que está relacionada con daño celular en procesos inflamatorios es el NO. Estudiamos entonces la enzima que lo sintetiza: la óxido nítrico sintasa. Existen tres isoformas de esta enzima: dos constitutivas (la neuronal y la endotelial, nNOS y eNOS respectivamente) y una inducible (iNOS). Se ha visto que TNF- α induce actividad de NOS (correspondiente a cualquiera de las tres isoformas) (Romero et al., 1996) así como también expresión de iNOS (Hunot et al., 1996, Lianxu et al., 2006).

Para estudiar si la sobre-expresión de TNF- α inducía actividad de NOS en nuestro modelo, hicimos un análisis histológico de la actividad NADPH diaforasa en cortes de *substantia nigra* de animales inyectados con AdTNF α o Ad β gal y sacrificados 14 días p.i. La enzima NOS posee actividad NADPH diaforasa (las diaforasas son deshidrogenasas de NADH y NADPH), y por eso se realiza este ensayo para medir la actividad de NOS (Dawson et al., 1991, Hope et al., 1991). Pudimos observar células NADPH diaforasa positivas en la *substantia nigra* ipsilateral a la inyección de los animales que sobre-expresan TNF- α (Figura 4-27 A). Estas células NADPH diaforasa positivas eran principalmente neuronas, identificadas por su morfología (Figura 4-27 B). Sin embargo, no se observó ninguna célula positiva en la *substantia nigra* del hemisferio contralateral a la inyección de AdTNF α (Figura 4-27 C), ni en la *substantia nigra* de los animales controles (en ninguno de los dos hemisferios) (Figura 4-27 D). Está descrito que en el VTA (región adyacente a la *substantia nigra*) existe en forma constitutiva una importante población de células positivas para NOS (Klejbor et al., 2004). Efectivamente, en todos los cortes pudimos detectar células NADPH diaforasa positivas en el VTA, que funcionaron como control positivo de la reacción.

En consecuencia, nuestros resultados sugieren que NOS también podría estar involucrada en la pérdida de neuronas gatillada por TNF- α en la *substantia nigra*, lo cual apunta al NO como posible mediador de la muerte neuronal. Como en el caso de COX-2, serán necesarios estudios funcionales para corroborar la importancia del NO en la pérdida de las neuronas de la *substantia nigra* inducida por la sobre-expresión de TNF- α .

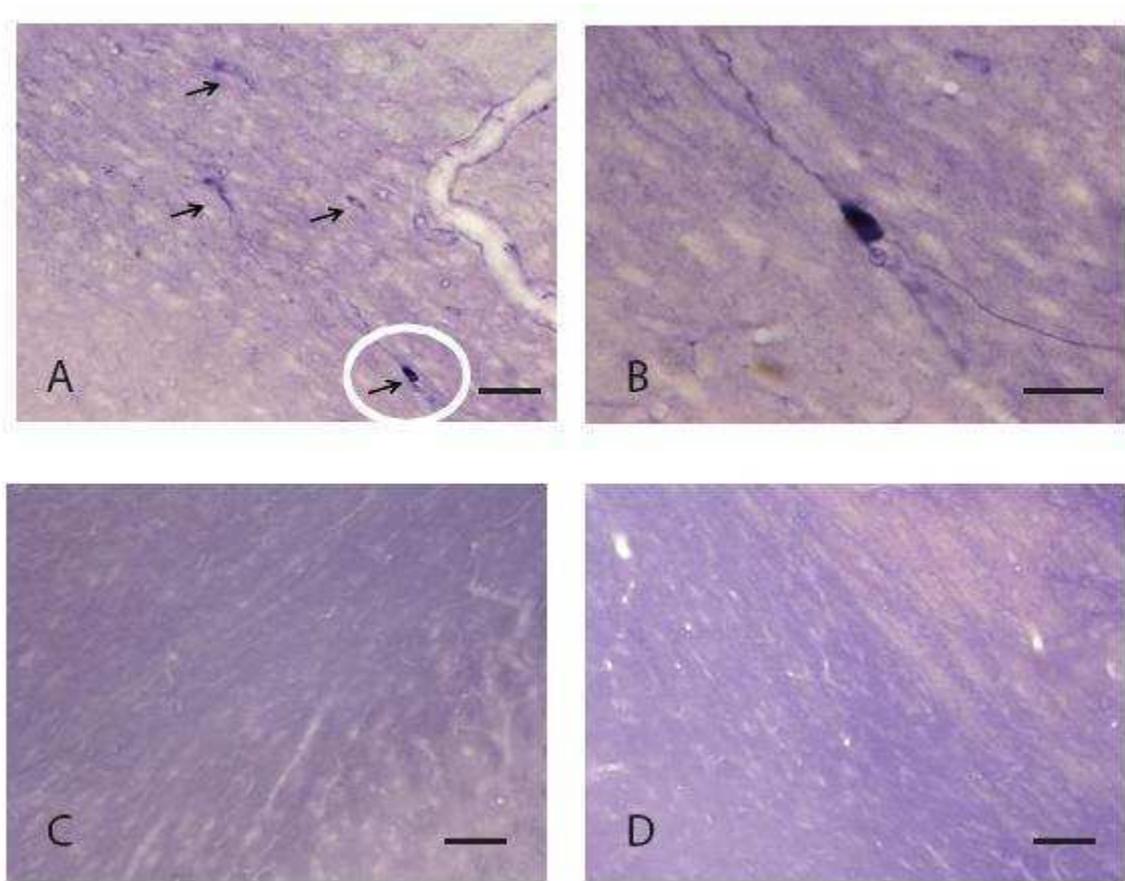


Figura 4-27. Efecto de la sobre-expresión de $TNF-\alpha$ sobre la actividad de NOS. Análisis histológico de actividad NADPH diaforasa en cortes de *substantia nigra* de animales inyectados con $AdTNF\alpha$ o $Ad\beta gal$ a los 14 días p.i. A) Se muestran células NADPH diaforasa positivas (flechas) en la *substantia nigra* ipsilateral a la inyección de $AdTNF\alpha$. Barra de escala: 125 μm . B) Detalle de A (círculo blanco) mostrando una neurona positiva para actividad NADPH diaforasa. Barra de escala: 25 μm . C-D) No se observaron células NADPH diaforasa positivas en la *substantia nigra* contralateral a la inyección de $AdTNF\alpha$ (C) o en la *substantia nigra* de los animales controles (D, se muestra el hemisferio ipsilateral). Barra de escala: 250 μm .

4.8. Estudio de los genes regulados por $TNF-\alpha$ utilizando la técnica de *microarrays*

Con el objetivo de identificar genes relacionados con $TNF-\alpha$, involucrados en su efecto neurodegenerativo sobre las neuronas de la *substantia nigra*, se estudió el perfil de

expresión de genes resultante de la sobre-expresión crónica de esta citoquina en la *substantia nigra* por medio de *microarrays*. Usando esta tecnología es posible identificar genes que están expresados diferencialmente en animales tratados con AdTNF α con respecto a los controles. Al estar expresados en forma diferencial, esos genes son candidatos a participar en los mecanismos de acción de TNF- α . Para realizar este estudio se utilizaron *microarrays* comerciales (Microarrays Inc.), que cuentan con más de 34000 oligonucleótidos de ADN de rata de 70 pb, representando más de 22000 genes (más del 60% del genoma de la rata) y 27000 transcriptos.

4.8.1. Diseño experimental

Con el objetivo de identificar mediadores del efecto neurodegenerativo de TNF- α , se compararon los perfiles de expresión de genes en la *substantia nigra* de animales tratados con AdTNF α o Ad β gal utilizando la tecnología de *microarrays*. Como se mencionó anteriormente, los genes que se encuentren expresados en forma diferencial son candidatos a mediar los efectos de la citoquina.

El estudio se llevó a cabo a los 14 días p.i., ya que es un momento en el que ya se observa el efecto neurodegenerativo de TNF- α (ver figuras 4-13 y 4-14) y todavía se detecta expresión de la citoquina (ver figura 4-10), lo que permite realizar controles de calidad (como se describe en la sección 4.8.2). Sin embargo, aún no se ha llegado a un estadio final de muerte (como ocurre a los 21 días), donde es menos probable que se puedan estudiar los genes responsables de inducir la muerte neuronal (y más probablemente los genes diferenciales estarán relacionados con mecanismos generales de muerte). Por lo tanto, a los 14 días luego de la inyección de los adenovectores, si bien ya hay muerte neuronal, hay neuronas que están en proceso de muerte (ya que a los 21 días el porcentaje de neuronas remanentes en la *substantia nigra* inyectada es menor que a los 14 días), lo que permite estudiar los mediadores de esta pérdida neuronal.

La técnica de *microarrays* de dos colores se basa en co-hibridar sobre un *array* (que tiene *spoteados* oligonucleótidos que representan el genoma de rata) ARNs marcados con dos fluoróforos diferentes. Una posibilidad es hibridar sobre el mismo vidrio ARN de animales tratados vs. ARN de animales controles. Otra posibilidad es utilizar ARN de referencia, que es un ARN que debe representar la mayor cantidad de genes posible. En nuestro caso, utilizamos un ARN de referencia comercial (Agilent, GE), compuesto por el ARN total de 14 líneas celulares de rata, representando distintos

tejidos. En este caso, se marca el ARN de animales tratados o controles con un fluoróforo, y el ARN de referencia con otro fluoróforo, y se hibrida sobre el mismo vidrio el ARN extraído de los animales con el tratamiento vs. el ARN de referencia, o el ARN control vs. el ARN de referencia. La principal ventaja del ARN de referencia es que permite la comparación de múltiples grupos experimentales. En nuestro caso en particular, permitiría hacer en el futuro comparaciones con otros puntos temporales. La inclusión de otros tiempos en este análisis, si bien excede la presente tesis, puede revestir interés para las conclusiones finales del trabajo, por lo que decidimos utilizar ARN de referencia. En particular, el análisis de los mediadores moleculares de la acción de TNF- α a los 7 días p.i. permitirá identificar moléculas involucradas en forma temprana en la muerte neuronal, lo cual podría tener relevancia clínica. Por otro lado, los genes identificados en más de un punto temporal podrían ser mejores candidatos para una posible terapia.

Vale la pena destacar que al utilizar ARN de referencia, no es necesario hacer *dye swap*. Se sabe que existe pegado diferencial de los fluoróforos a ciertos ARNs, por lo que en los experimentos en los que se co-hibrida el ARN proveniente de animales tratados y controles es necesario llevar a cabo un *dye swap*, que consiste en la marcación cruzada de los ARNs provenientes de los dos grupos experimentales. Es decir, se realizan réplicas técnicas, en las que se co-hibrida en primera instancia el ARN correspondiente al tratamiento con un fluoróforo y el control con el otro fluoróforo, y en un segundo experimento se intercambian los fluoróforos. Sin embargo, al utilizar ARN de referencia, como se mencionó anteriormente, el ARN correspondiente a los animales tratados y controles están marcados con el mismo fluoróforo, por lo que este control no es necesario.

Dado que la obtención de material para realizar estos estudios es dificultosa, ya que es necesario realizar operaciones de alta complejidad en los animales, a lo que se le suma la selección de los mismos previamente a ser incluidos en el experimento de *microarrays* (ver sección 4.8.2), decidimos amplificar el ARN extraído. Utilizamos el kit SuperScript Indirect RNA Amplification System (Invitrogen), que amplifica el ARN mediante una transcripción *in vitro*, generando así el ARN antisentido (ARNa) que se utiliza como sonda (ver materiales y métodos, página 74 para más detalles). Por lo tanto, en cada vidrio se hibridó el ARN proveniente de una única rata (tratada con AdTNF α o Ad β gal) con el ARN de referencia. Si no se realizara la amplificación sería necesario juntar el ARN proveniente de al menos cuatro ratas para cada chip.

En cuanto a la cantidad de réplicas biológicas, llevamos a cabo seis réplicas para los animales tratados con AdTNF α y cinco para los controles. En la literatura suelen

encontrarse este número de réplicas (o incluso menores) en trabajos con animales (Marques et al., 2009, Tabakoff et al., 2009).

4.8.2. Controles de calidad

Para incluir a los animales en el estudio de *microarrays*, se llevaron a cabo una serie de controles: calidad del ARN (ver materiales y métodos página 74), test del cilindro y niveles de expresión de TNF- α . Estos dos últimos tienen como objetivo incluir en el experimento sólo aquellos animales que son representativos del modelo.

4.8.2.1. Test del cilindro

Con el fin de corroborar que los adenovectores produjeran el efecto neurodegenerativo esperado (se controla, entre otras cosas, que los vectores se hayan inyectado correctamente), se realizó el test del cilindro el día anterior al sacrificio. Como se mencionó anteriormente (sección 4.5), este examen permite evaluar la aparición de aquinesias en los miembros delanteros. La aparición de este síntoma se debe al déficit de dopamina en el estriado, y por lo tanto responde y refleja la muerte de neuronas en la *substantia nigra*. Brevemente, se coloca al animal en un cilindro de acrílico y se cuenta el número de veces que apoya cada pata en el cilindro al levantarse (ver materiales y métodos, página 61 para la descripción detallada del test). Los resultados se expresaron como porcentaje de toques con la pata contralateral a la inyección, con respecto al número total de toques. Se seleccionaron los animales inyectados con AdTNF α que realizaron menos de un 50% de toques con la pata contralateral a la inyección. En el caso de los animales controles, se seleccionaron aquellos que realizaron más de un 60% de toques con la pata contralateral (Figura 4-28 A). Vale la pena destacar, que incluso incluyendo en el análisis los animales descartados, se observó que los animales que sobre-expresaban TNF- α realizaron un menor porcentaje de toques con la pata contralateral a la inyección que los controles, siendo la diferencia entre estos dos grupos altamente significativa (Figura 4-28 B) y replicando los resultados anteriormente presentados (Figura 4-16).

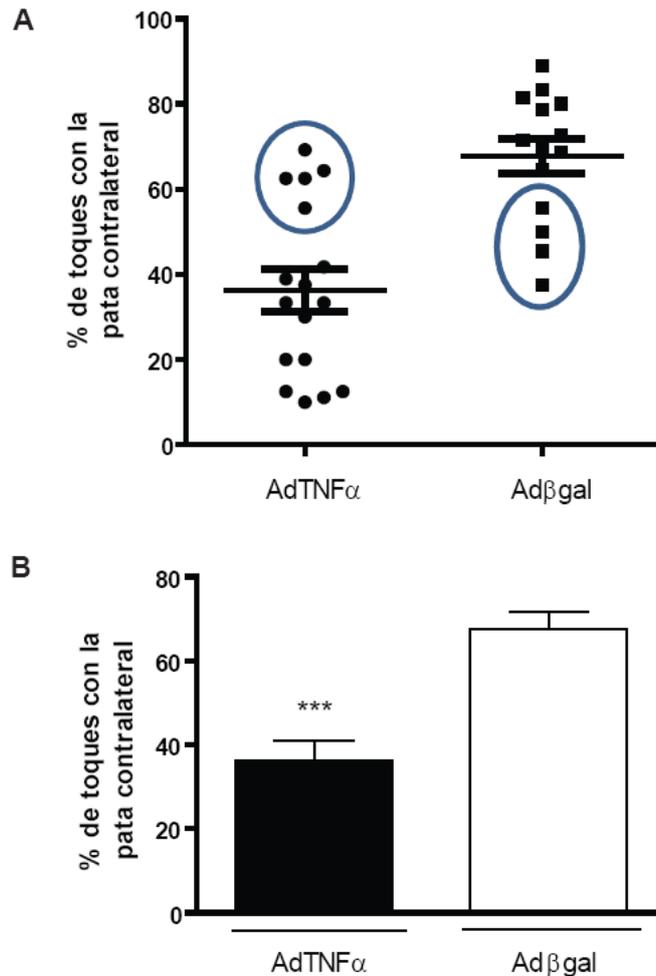


Figura 4-28. Test del cilindro como control del nivel de neurodegeneración en las muestras destinadas al estudio con microarrays. Se colocó al animal en un cilindro de acrílico y se cuantificó el número de toques que hizo con la pata ipsi y contralateral a la inyección de AdTNF α o Ad β gal a los 13 días p.i. Los resultados se expresaron como porcentaje de toques con la pata contralateral a la inyección con respecto al número total de toques. A) Se descartaron las ratas inyectadas con AdTNF α que realizaron más de un 50% de toques y las ratas inoculadas con Ad β gal que hicieron menos de un 60% de toques con la pata contralateral (círculos azules). B) Análisis estadístico del grupo completo. ***p<0.001 animales inyectados con AdTNF α vs. Ad β gal. Test de Student de una cola no pareado. n=14-17 por grupo.

4.8.2.2. Calidad del ARN

Las ratas seleccionadas fueron decapitadas a los 14 días p.i. de los adenovectores y se disecó bajo lupa la *substantia nigra*, que se congeló en nitrógeno líquido. El ARN

total se extrajo utilizando el RNeasy Minikit y se cuantificó midiendo absorbancia a 260 nm. Para determinar la calidad del ARN extraído, se midió la absorbancia a 280 nm y 230 nm, y se seleccionaron las muestras donde las relaciones A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} fueron superiores a 1.8. Por otro lado, se corrieron las muestras en un gel de 1% de agarosa. No se observó una banda de alto peso molecular o un chorreado significativo, por lo que puede decirse que no hay contaminación con ADN genómico. A su vez, se observaron las dos bandas nítidas correspondientes a los ARN ribosomales (ARNr) 28S y 18S, siendo la primera aproximadamente el doble de intensa que la segunda; y no se observó un chorreado por debajo de las bandas de ARNr (Figura 4-29). Todos estos son indicativos de un ARN intacto.

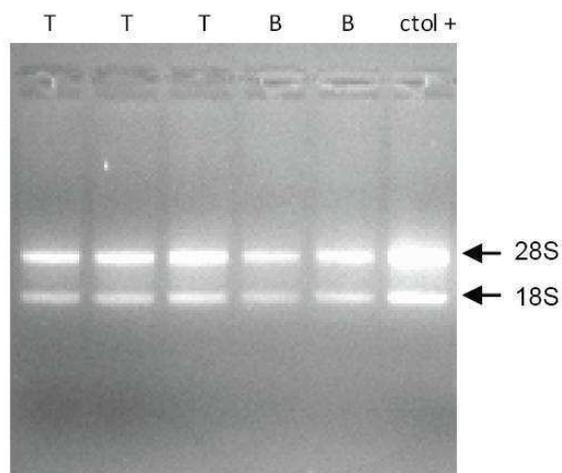


Figura 4-29. Control de calidad de las muestras de ARN destinadas al estudio con microarrays. Muestras de ARN de *substantia nigra* de ratas inyectadas con AdTNF α (T) o Ad β gal (B) y sacrificadas 14 días p.i. se corrieron en un gel de agarosa 1% para corroborar su integridad. Se sembraron 200 ng de ARN total. Control positivo (ctol+): ARN de *substantia nigra* de ratas sin tratar, extraído previamente. Se indican con flechas las bandas correspondientes a los ARNr 28S y 18S.

4.8.2.3. Niveles de expresión de TNF- α

A continuación, como un control de calidad adicional, se realizó una RT-PCR en tiempo real para detectar el ARNm de TNF- α . El objetivo de este análisis es corroborar que los animales inoculados con AdTNF α sobre-expresen la citoquina, e incluir en el estudio de *microarrays* sólo aquellas muestras que lo hagan. En la sección 4.3.1, mostramos que a los 14 días p.i. de los adenovectores puede detectarse expresión de

TNF- α recombinante en la *substantia nigra* mediante ELISA. Por lo tanto, es de esperar que se puedan detectar niveles elevados del ARNm correspondiente.

4.8.2.3.1. Validación de los genes de referencia (*housekeeping*)

Al realizar los experimentos de RT-PCR en tiempo real, la concentración inicial de ADNc en cada muestra puede variar por factores como la eficiencia de la transcripción reversa o errores de pipeteo. Dado que el objetivo es estudiar la expresión relativa de genes entre dos muestras, es fundamental normalizar los datos con un gen de referencia de expresión estable (*housekeeping*), que es representativo de la concentración de ADNc en cada muestra. El gen de referencia está sujeto a los mismos errores o variaciones en la preparación del ADNc que el gen de interés, lo cual lo hace un excelente control de normalización. Sin embargo, los genes de referencia no se expresan en forma estable en cualquier situación. Por lo tanto, es esencial una selección cuidadosa del gen de referencia (*housekeeping*) más estable en cada condición experimental particular. En nuestro caso, nos interesa evaluar que la sobreexpresión de TNF- α no modifique los niveles del gen que utilizamos como referencia. Por lo tanto, estudiamos en nuestras condiciones experimentales la expresión de tres posibles genes de referencia: la proteína de unión a TATA box (TBP, del inglés *TATA box binding protein*), β 2-microglobulina y β -actina.

En primer lugar, se pusieron a punto estas tres RT-PCR en tiempo real utilizando como molde una muestra de *substantia nigra* de ratas sin tratar. Las curvas de amplificación, así como el análisis de los Ct, mostraron una buena reproducibilidad entre triplicados (Figura 4-30 A-C). En caso de que el valor de Ct de uno de los triplicados difiriera en 4 o más ciclos de los otros dos, esa muestra fue descartada. Se incluyó un control sin ADN polimerasa (control de no amplificación) por triplicado, en el que en ningún caso se observó amplificación. A su vez, en todos los casos, la diferencia entre los Ct de las muestras y de los controles sin RT, sin polimerasa y sin molde fue igual o mayor a ocho ciclos (Figura 4-30), por lo que puede decirse que hay $2^8=256$ veces menos producto en los controles negativos que en las muestras. Al analizar las curvas de disociación, se observaron picos únicos, lo que sugiere, como ya se mencionó, la ausencia de productos inespecíficos (Figura 4-31).

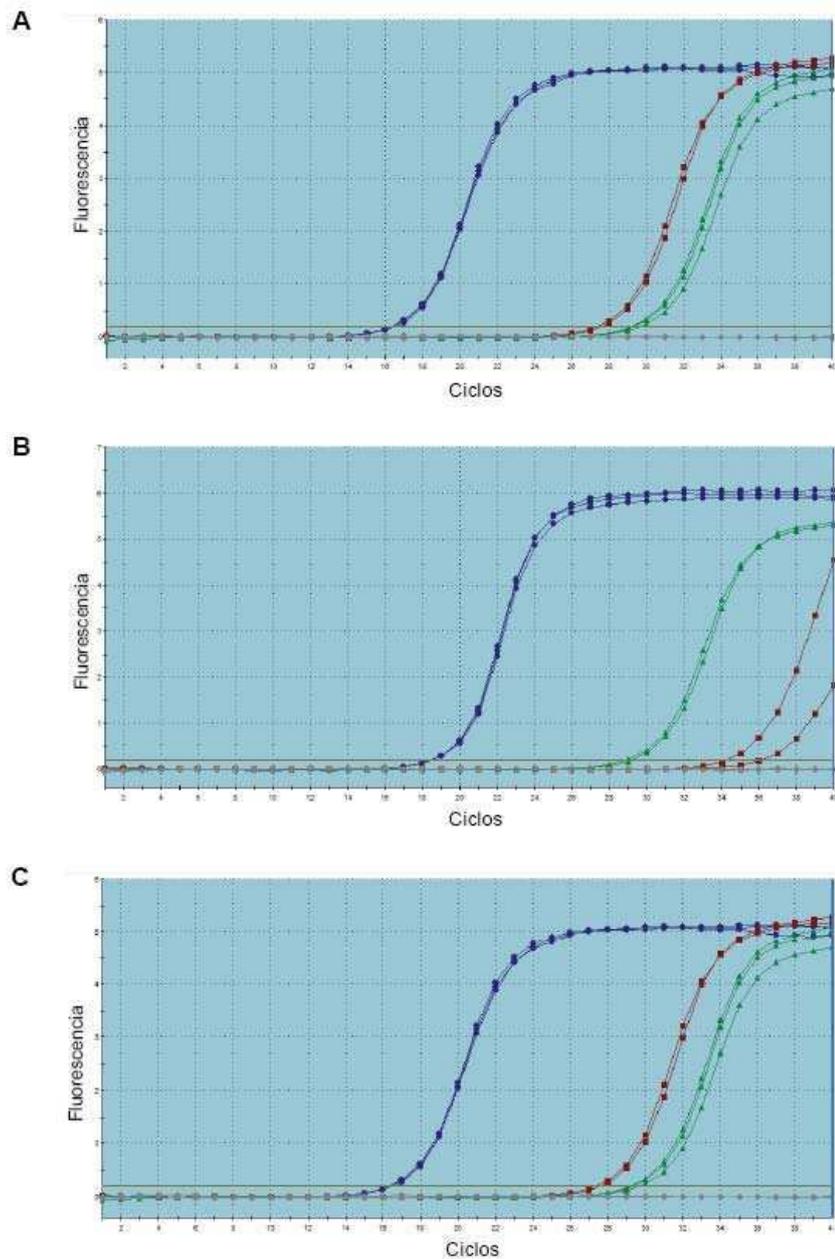


Figura 4-30. Validación de los genes de referencia (housekeeping) para los ensayos de PCR en tiempo real: curvas de amplificación. Curvas de amplificación (fluorescencia vs. número de ciclo) de un ensayo de PCR en tiempo real para detectar TBP (A), β 2-microglobulina (B) y β -actina (C). Se utilizó como molde una muestra control, correspondiente a *substantia nigra* de ratas sin tratar. Pueden observarse las curvas de amplificación correspondientes a la muestra (azules), al control sin RT (verdes) y al control sin molde (rojas). El control sin ADN polimerasa no amplificó en ningún caso. La línea horizontal (naranja) representa el nivel umbral que se utiliza para determinar el Ct.

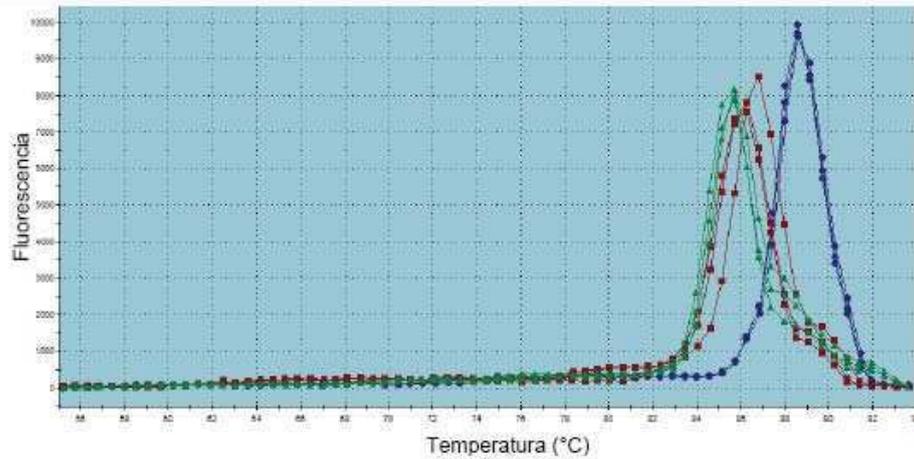


Figura 4-31. Validación de los genes de referencia (housekeeping) para los ensayos de RT-PCR en tiempo real: curvas de disociación. Para poner a punto las RT-PCR en tiempo real de los genes de referencia se utilizó como molde una muestra de *substantia nigra* de ratas sin tratar. Se muestran las curvas de disociación (fluorescencia vs. temperatura) correspondientes a las RT-PCR en tiempo real para detectar TBP (verde), β 2-microglobulina (azul) y β -actina (roja).

Una vez puestas a punto, se llevaron a cabo las RT-PCR en tiempo real para TBP, β 2-microglobulina y β -actina en todas las muestras de *substantia nigra* de animales tratados con AdTNF α o Ad β gal (estas reacciones de RT-PCR en tiempo real fueron llevadas a cabo por Juan Cruz Casabona). Nuevamente, se observó una buena reproducibilidad entre triplicados, una diferencia de al menos 7 ciclos entre las muestras y los controles negativos, y un único pico en la curva de disociación. Para analizar la estabilidad de la expresión de estos genes de referencia en nuestro sistema, utilizamos el método de Δ Ct (Silver et al., 2006) (ver materiales y métodos, página 80 para una descripción detallada del método). Brevemente, este método consiste en comparar la expresión relativa de pares de genes dentro de cada muestra. Si el valor de Δ Ct entre dos genes permanece constante al hacer el análisis en diferentes muestras de ARN, significa que ambos genes se expresan en forma estable entre esas muestras. Se calcularon los valores de Δ Ct para 21 RT-PCR en tiempo real para los distintos genes de referencia a evaluar, usando como molde ARN de *substantia nigra* de animales inyectados con AdTNF α o Ad β gal y sacrificados 14 días p.i. Pudimos observar que la desviación en los valores de Ct entre las 21 muestras fue muy baja para los tres genes estudiados (Figura 4-32). Al analizar el desvío estándar

promedio de los ΔCt para cada gen, pudimos confirmar que los valores son muy bajos para los tres genes de referencia, al compararlos con valores que se consideran aceptados en la literatura (Silver et al., 2006, Galiveti et al., 2010), y muy similares entre sí (Tabla 4-2). Por lo tanto, podemos concluir que estos genes se expresan en forma estable en nuestro modelo de estudio, y por lo tanto pueden ser utilizados como genes de referencia o *housekeeping*, para normalizar los datos obtenidos en reacciones de RT-PCR en tiempo real para los genes de interés.

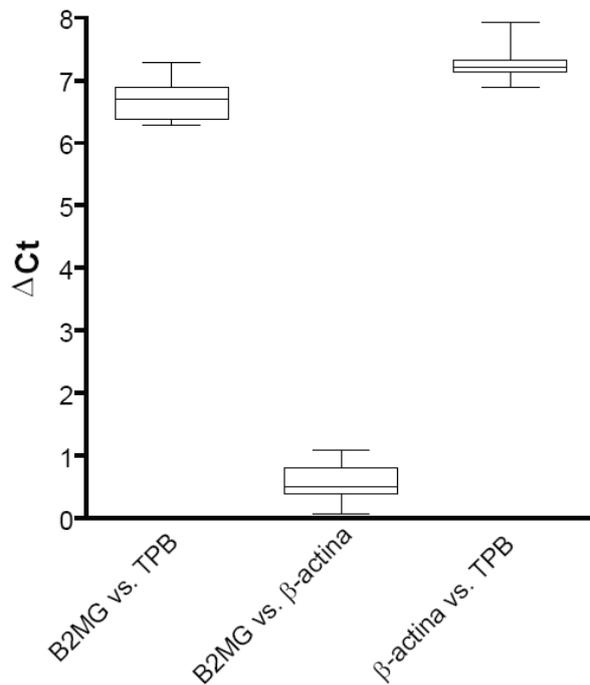


Figura 4-32. Validación de los genes de referencia (*housekeeping*) para los ensayos de RT-PCR en tiempo real: diagrama de cajas. Se analizó la estabilidad de la expresión de tres genes de referencia candidatos: β 2-microglobulina (B2MG), TBP, y β -actina. Se aplicó el método de ΔCt , que se basa en comparaciones de a pares. Para analizar la variabilidad de los ΔCt , los mismos se graficaron en un diagrama de caja (*box plot*), donde se muestra la mediana (línea), los percentilos 25 y 75 (caja), y el mínimo y máximo (brazos o “bigotes”). Se analizaron 21 muestras de *substantia nigra* de animales inyectados con AdTNF α o Ad β gal.

Muestra	Media Δ Ct	SD	SD promedio
B2MG vs. TBP	6.69	0.3	
B2MG vs. β -actina	0.55	0.27	0.285
TBP vs. B2MG	6.69	0.3	
TBP vs. β -actina	7.25	0.2	0.25
β -actina vs. TBP	7.25	0.2	
β -actina vs. B2MG	0.55	0.3	0.25

Tabla 4-2. Validación de los genes de referencia (housekeeping) para los ensayos de RT-PCR en tiempo real. Los valores de la media de Δ Ct corresponden al promedio de la diferencia entre los Ct de los genes para cada muestra, para las 21 muestras de *substantia nigra* de animales inyectados con AdTNF α o Ad β gal. En forma similar, el desvío estándar (SD) corresponde al desvío de los valores de Ct para las 21 muestras. El promedio del desvío estándar (SD promedio) para cada gen, se calculó como la media entre las dos comparaciones correspondientes a ese gen.

4.8.2.3.2. RT-PCR en tiempo real para detectar los niveles de TNF- α

Finalmente, con el objetivo de seleccionar las muestras correspondientes al tratamiento con AdTNF α que efectivamente sobre-expresen la citoquina, se llevó a cabo la RT-PCR en tiempo real para detectar el ARNm de TNF- α en muestras de *substantia nigra* de animales tratados con AdTNF α o Ad β gal sacrificados 14 días p.i. (estas reacciones de RT-PCR fueron llevadas a cabo por Juan Cruz Casabona). Para todas la muestras, la diferencia entre los Ct de las muestras y de los controles sin RT, y sin molde fue igual o mayor a diez ciclos. Al analizar las curvas de disociación se observó un único pico (Figura 4-33 A), y al correr los productos en un gel de agarosa 2% también se detectó una única banda del peso molecular esperado para el producto de amplificación del ARNm de TNF- α (no observándose banda en los controles negativos) (Figura 4-33 B). Estos *primers* son capaces de diferenciar los productos de amplificación del ARNm de los del ADN genómico. De este modo, al correr los productos de la RT-PCR en tiempo real en un gel de agarosa se pudo corroborar que no hubo amplificación del posible ADN genómico contaminante (de 600 pb), y sólo se detectó el correspondiente al ARNm (de 168 pb).

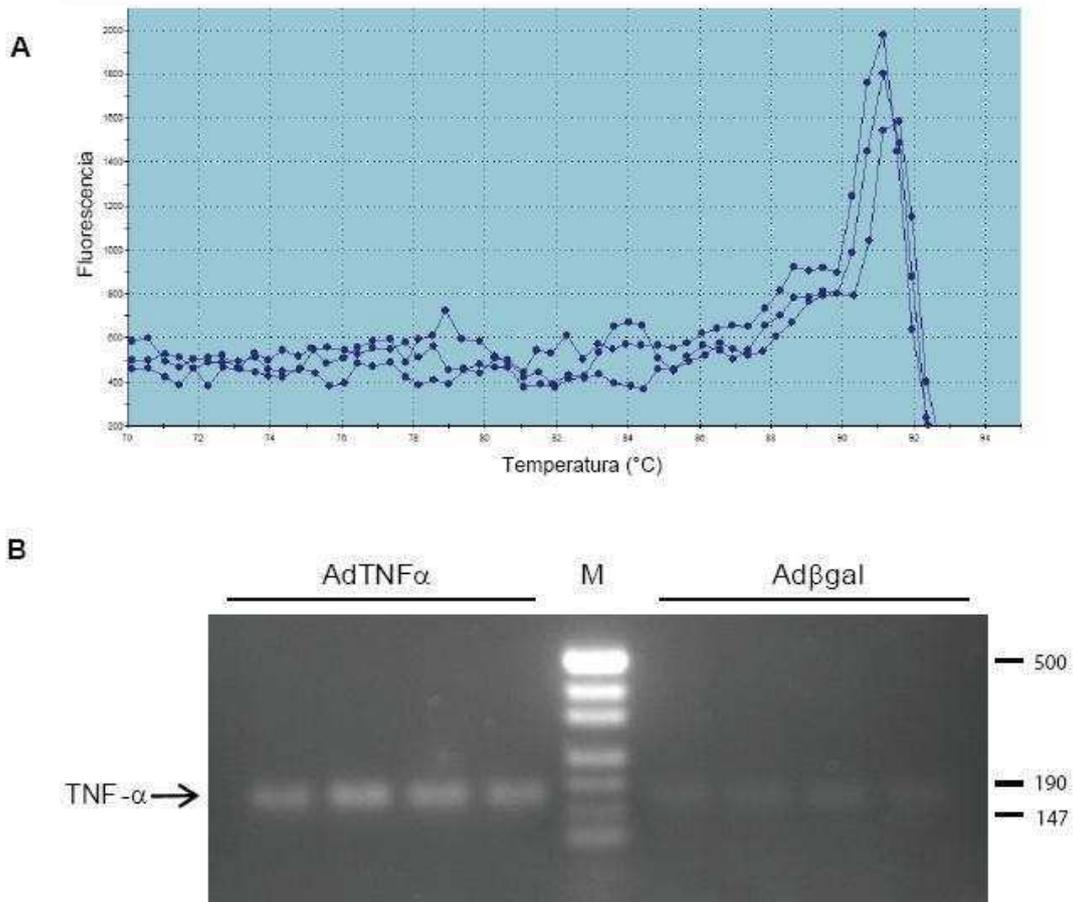


Figura 4-33. RT-PCR en tiempo real para detectar *TNF- α* : especificidad de la reacción. Se llevó a cabo una RT-PCR en tiempo real para detectar *TNF- α* en muestras de *substantia nigra* de animales tratados con *AdTNF α* o *Ad β gal* y sacrificados 14 días p.i. A) Gráfico representativo de curvas de disociación (fluorescencia vs. temperatura) correspondientes a triplicados de una RT-PCR en tiempo real para detectar *TNF- α* . B) Los productos de amplificación de la RT-PCR en tiempo real correspondiente a las muestras de ratas inyectadas con *AdTNF α* o *Ad β gal* se corrieron en un gel de agarosa 2%. M: marcadores de peso molecular (se muestran las bandas de 500, 190 y 147 pb). Se muestra con una flecha el producto esperado para *TNF- α* (168 pb).

Para normalizar los datos de la RT-PCR en tiempo real de *TNF- α* se decidió utilizar como gen de referencia *TBP*, ya que los valores de *Ct* estaban más cercanos a los de *TNF- α* que los de los otros genes *housekeeping* evaluados. Para analizar los datos, se realizó una cuantificación relativa, usando el método de $\Delta\Delta C_t$, corregido para tener en cuenta las eficiencias de las PCR (ver materiales y métodos, página 81) (Pfaffl, 2001). Brevemente, este método permite calcular cantidades relativas del gen de interés, sin

necesidad de hacer una curva estándar en cada corrida. Los resultados se expresan como cantidad relativa al “calibrador”, que en nuestro caso fue una muestra de *substantia nigra* de ratas sin tratar. Por otro lado, se calcularon las eficiencias de las PCR de TBP y TNF- α realizando una curva estándar, y los niveles de cambio con respecto al “calibrador” fueron corregidos de acuerdo a dichas eficiencias. Al llevar a cabo este análisis se pudo observar que los niveles de TNF- α eran significativamente mayores en los animales inyectados con AdTNF α que en los controles (Figura 4-34). Se seleccionaron las seis muestras que tenían mayor expresión de TNF- α en los animales inyectados con AdTNF α , todas las cuales superaban la media más un desvío estándar de los animales inoculados con Ad β gal. Por otro lado, se seleccionaron las muestras controles (inyectadas con Ad β gal) con menor expresión de TNF- α .

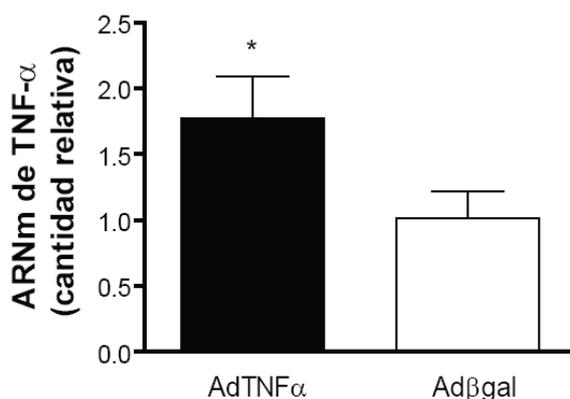


Figura 4-34. RT-PCR en tiempo real para detectar TNF- α . Se llevó a cabo una RT-PCR en tiempo real para detectar TNF- α en muestras de *substantia nigra* de animales tratados con AdTNF α o Ad β gal y sacrificados 14 días p.i. Los datos se analizaron usando el método de $\Delta\Delta$ Ct, corregido por las eficiencias de las PCR. Se utilizó como gen de referencia (*housekeeping*) TBP, y como “calibrador” una muestra de *substantia nigra* de ratas sin tratar. Los resultados se expresaron como cantidad relativa o nivel de cambio (*fold change*) con respecto al “calibrador”. *p<0.05 animales inyectados con AdTNF α vs. Ad β gal. Test de Student de una cola no pareado. n=9-11 por grupo.

Los *primers* utilizados no son capaces de distinguir entre TNF- α de ratón (recombinante) y de rata (endógeno). Es por eso que se pudo detectar TNF- α en los animales inyectados con Ad β gal. El hecho de que no hayamos podido detectar TNF- α endógeno por ELISA puede deberse a que los niveles de la citoquina son muy bajos

para ser detectados por este método, o a una regulación de la expresión de TNF- α que hace que haya un cierto nivel de transcripción pero no traducción. De cualquier modo, esta PCR en tiempo real permitió detectar los niveles aumentados de TNF- α en los animales inyectados con AdTNF α , que al menos parcialmente corresponden a la citoquina recombinante, y por lo tanto seleccionar aquellos animales en los que se verificó dicho aumento.

4.8.3. Puesta a punto: autohibridación

Con el objetivo de probar la calidad de los *microarrays* y de poner a punto la técnica, se llevó a cabo una autohibridación, que consiste en hibridar sobre un *array* el mismo ARN marcado con fluoróforos diferentes (la amplificación, marcación, hibridación y escaneo fueron llevadas a cabo por Pablo Radice). Se extrajo ARN total de la *substantia nigra* de una rata sin tratar utilizando el RNeasy Minikit (Qiagen) y se cuantificó midiendo absorbancia a 260 nm utilizando un espectrofotómetro Nanodrop. Para verificar la calidad del ARN extraído se midió la absorbancia a 280 nm y 230 nm, y se corrieron las muestras en un gel de agarosa. Este ARN fue amplificado usando el kit SuperSript Indirect RNA Amplification System (Invitrogen). La muestra se dividió en dos y se marcó la mitad con el fluoróforo Alexa Flúor 647 y la otra mitad con el fluoróforo Alexa Flúor 555. Luego de cuantificar la cantidad de ARNa recuperado y la incorporación de los fluoróforos por absorbancia, se hibridaron estas dos muestras sobre un mismo vidrio. El escaneo y análisis de la imagen se hizo con un escáner GenePix 4000B. La inspección general de la imagen demostró una morfología apropiada y homogénea de los *spots*, una intensidad de señal adecuada y un *background* bajo (Figura 4-35).

Este experimento de autohibridación nos permitió concluir que los *microarrays* son de buena calidad, por lo que decidimos continuar trabajando con ellos. Por otro lado, se puso a punto la técnica, estableciendo variables como la cantidad inicial de ARN total a utilizar (500 ng) y la cantidad de ARNa marcado para hibridar en cada chip (30 a 35 pmoles totales).

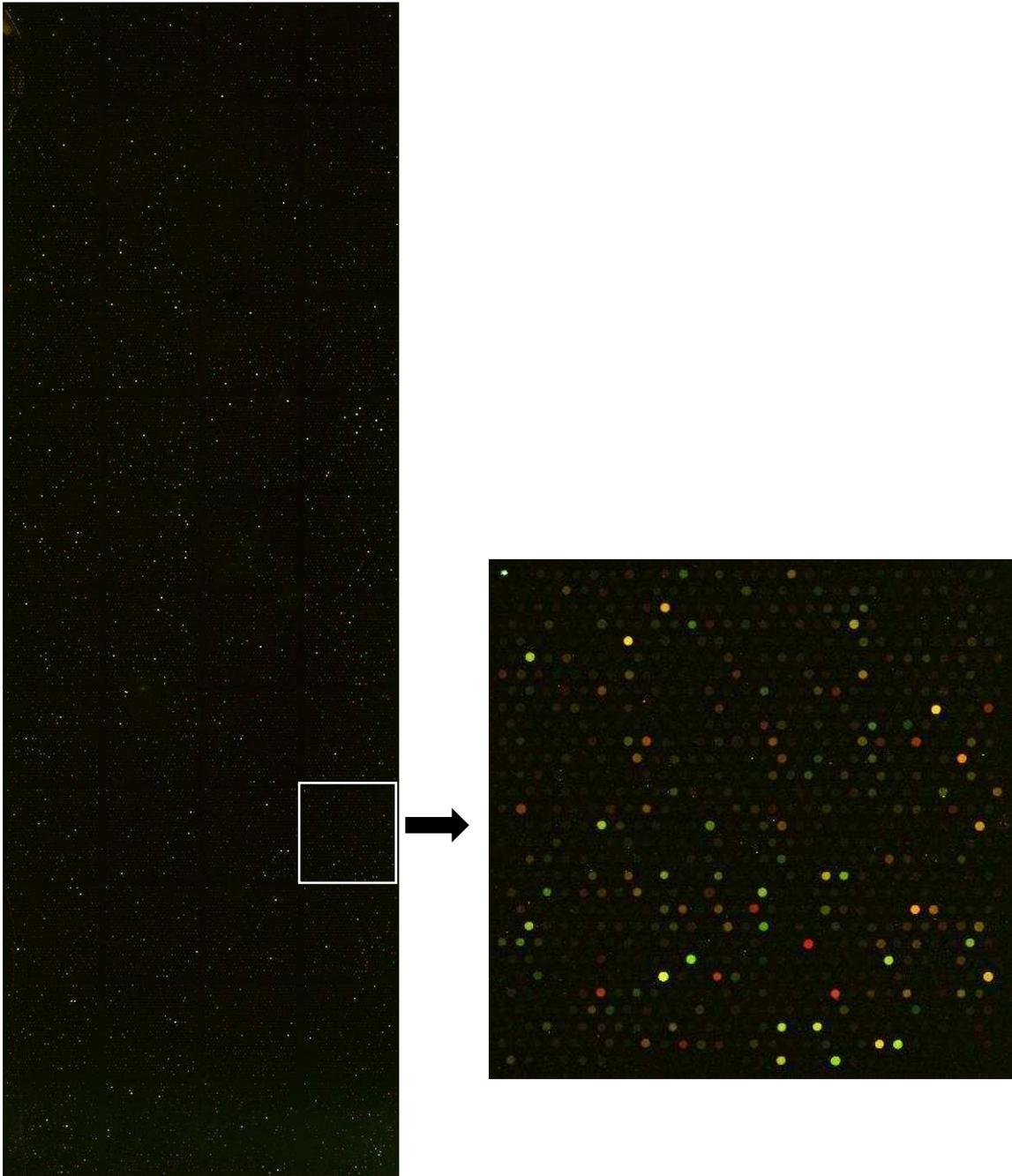


Figura 4-35. *Puesta a punto de la técnica de microarrays: autohibridación.* Una muestra de *substantia nigra* de ratas sin tratar se dividió en dos, se marcó con fluoróforos diferentes y se hibridó sobre el mismo vidrio. Se muestra la imagen del *microarray* completo, que cuenta con más de 34000 sondas representando transcritos de rata, dispuestas en 48 bloques. Uno de estos bloques se muestra ampliado. En esta imagen se encuentran combinados los dos canales: se observan los ARNs marcados con los fluoróforos Alexa Flúor 647 (rojo) y Alexa Flúor 555 (verde).

4.8.4. Identificación de genes candidatos a mediar los efectos de TNF- α utilizando la técnica de *microarrays*

Finalmente, como se mencionó anteriormente, se compararon los patrones de expresión génica de los animales inyectados con AdTNF α o Ad β gal utilizando la técnica de *microarrays*, con el objetivo de identificar moléculas mediadoras del efecto neurodegenerativo de TNF- α sobre las neuronas de la *substantia nigra*.

Se seleccionaron seis muestras de animales inyectados con AdTNF α y cinco de animales tratados con Ad β gal, en base a los controles de calidad antes descritos (sección 4.8.2): el test del cilindro, la calidad de ARN y los niveles de expresión de TNF- α . Estas muestras, junto con el ARN de referencia de rata, se amplificaron y marcaron usando el kit SuperScript Indirect RNA Amplification System (Invitrogen). El ARN antisentido amplificado (ARNa) fue cuantificado midiendo absorbancia a 260 nm (Tabla 4-3). A continuación, el ARN de referencia se marcó con el fluoróforo Alexa Flúor 555 y los ARNs de las muestras (ya sea de animales inyectados con AdTNF α o con Ad β gal) se marcaron con Alexa Flúor 647. La cantidad de ARNa marcado y el fluoróforo incorporado al mismo fueron cuantificados por absorbancia (Tabla 4-3). En cada chip se co-hibridó el ARNa de las muestras (proveniente de animales inyectados con AdTNF α o Ad β gal) con el ARNa de referencia. Finalmente, los chips fueron escaneados en un escáner GenePix 4000B (Figura 4-36).

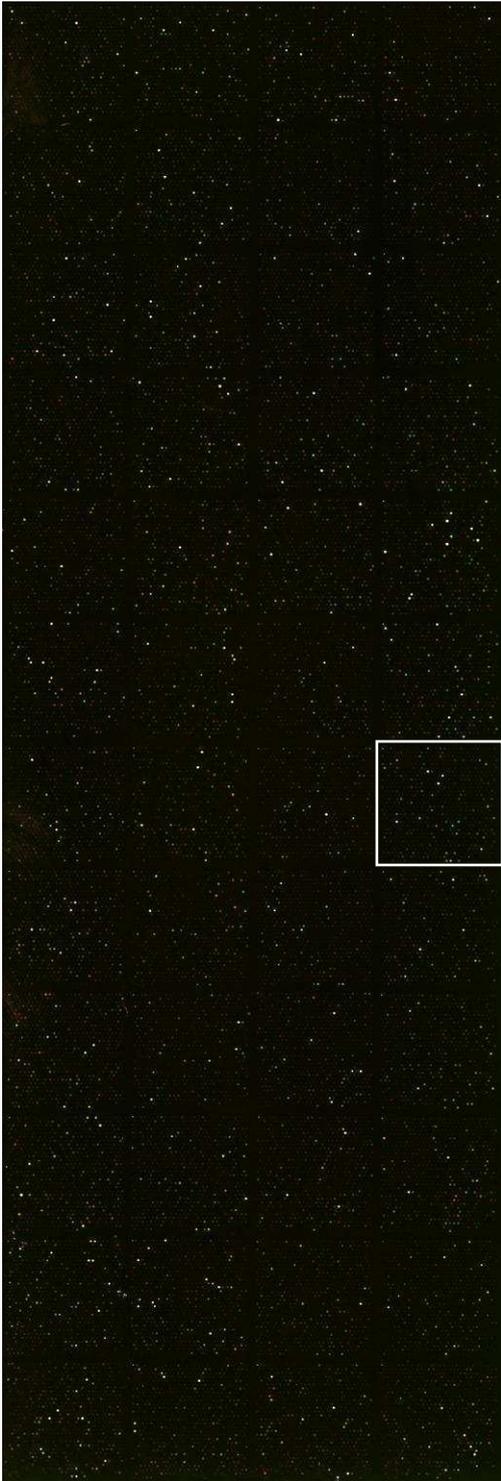
Muestra	Tratamiento	ARNa sin marcar (ng/ μ l)	ARNa marcado (μ g)	Fluoróforo incorporado (pmoles)
596	Ad β gal	153.1	40.4	45.12
602	Ad β gal	263.7	43.9	41.16
604	Ad β gal	353.9	44.9	38.39
618	Ad β gal	180.8	39.4	38
621	Ad β gal	198.7	42.7	46.31
605	AdTNF α	141.9	35	32.06
617	AdTNF α	159.3	46.2	46.31
622	AdTNF α	195.8	39.4	35.23
629	AdTNF α	191.2	49.6	46.31
633	AdTNF α	197.2	40.3	36.42
634	AdTNF α	167.1	39.8	32.46
Ref1		210.9	35.4	52.57
Ref2		137.7	37.8	36.1
Ref3		221.2	34.9	31.67
Ref4		201.5	37.1	35.47
Ref5		179.8	37.8	34.83
Ref1'			37.9	27.23
Ref2'			35	31.67
Ref3'			33.1	28.5
Ref4'			35.9	31.67
Ref5'			72.2	76.63

Tabla 4-3. *Cuantificación del ARN y de la incorporación de fluoróforo en el proceso de amplificación y marcación para generar el ARNa para hibridar en los microarrays.* El ARN total extraído de animales inyectados con AdTNF α o Ad β gal y sacrificados 14 días p.i. fue amplificado y marcado (con el fluoróforo Alexa Flúor 647) usando el kit SuperScript Indirect RNA Amplification System (Invitrogen). Paralelamente, también se amplificó y marcó (con el fluoróforo Alexa Flúor 555) un ARN de referencia de rata (Ref1-5). Luego de la amplificación, estas muestras fueron divididas en dos para la marcación (Ref1 y 1', etc.). Luego de amplificar y purificar el ARN, se cuantificó el ARNa resultante (ARNa sin marcar). Y luego de marcarlo y purificarlo, se cuantificó nuevamente el ARNa recuperado (ARNa marcado), y la cantidad de fluoróforo incorporado.

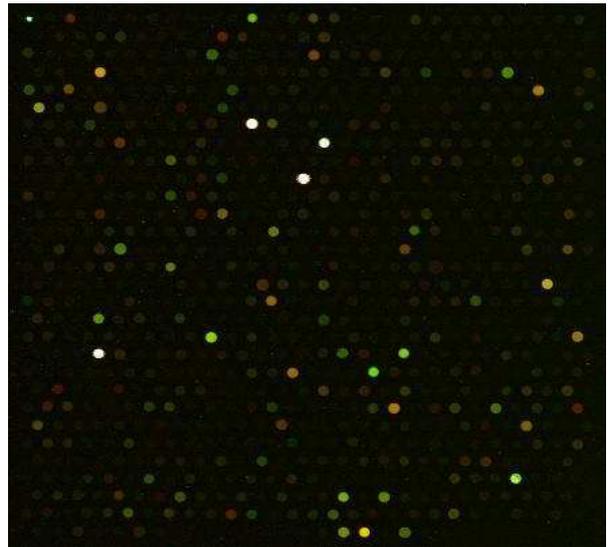
4.8.4.1. Análisis de la imagen

Para obtener un listado de los genes con su intensidad de señal, con el objetivo de hacer el análisis estadístico y determinar los genes que se encuentran diferencialmente expresados entre el tratamiento y el control, el primer paso es analizar la imagen escaneada. Este análisis se llevó a cabo utilizando el programa GenePix Pro. En primer lugar, se colocó sobre la imagen del chip una grilla que delimita los *spots* (*gridding*) (Figura 4-36 C). En algunos casos, fue necesario ajustar la posición de los indicadores de *spots* manualmente. A continuación, el programa realiza la segmentación de la imagen (se diferencia la señal del *background*) y finalmente la cuantificación. Esto da como resultado una tabla de datos crudos, que consisten en una serie de parámetros como datos de posición e identidad del *spot*, datos de la intensidad de señal y de la intensidad del *background* (media, mediana, desvío estándar, coeficiente de variación), en ambos canales por separado o mostrando la relación entre los dos canales. También hay datos como el porcentaje de pixeles saturados y la relación de señal/ruido (*signal to noise ratio*) en cada *spot*, que sirven para hacer el filtrado (ver sección 4.8.4.2).

A



B



C

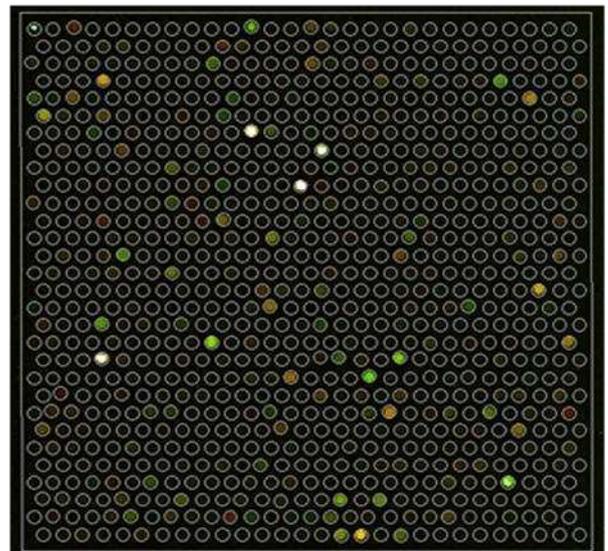


Figura 4-36. *Técnica de microarrays para identificar mediadores de los efectos de TNF- α : análisis de la imagen.* Muestras de ARN de *substantia nigra* de animales inyectados con AdTNF α o Ad β gal y sacrificados 14 días p.i. se co-hibridaron con ARN de referencia de rata. Se muestra la imagen del chip completo (A), que tiene más de 34000 sondas representando transcritos de rata, dispuestas en 48 bloques. Uno de estos bloques se muestra ampliado (B). En esta imagen se encuentran combinados los dos canales: se observan en rojo los ARNs marcados con el fluoróforo Alexa Flúor 647 (de una rata inyectada con Ad β gal) y en verde los marcados con Alexa Flúor 555 (correspondientes al ARN de referencia). El primer paso del análisis de la imagen consiste en colocar la grilla para identificar los *spots*, como se muestra en (C).

4.8.4.2. Análisis de los datos

El análisis de los datos de los experimentos de *microarrays* fue llevado a cabo por el Dr. Ariel Chernomoretz. Este análisis (para más detalles ver materiales y métodos página 75) consiste en determinar la calidad de los *spots*, filtrar los *spots* de mala calidad, pre-procesar los datos (lo cual incluye corrección por *background* y normalización intra e inter-chip), realizar el análisis estadístico y finalmente un análisis de Gene Ontology (GO). Para ello, se utilizó el lenguaje de programación R.

Luego de filtrar los *spots* de mala calidad, eliminándolos del análisis, se continuó trabajando con 18377 genes. El pre-procesamiento de los datos incluyó normalizaciones dentro de cada *array* (intra-chip) y entre *arrays* (inter-chip), cuyo objetivo es corregir los efectos dados por variaciones en la tecnología de *microarrays* y no por diferencias entre las muestras de ARN. Entre las principales variaciones debidas a la técnica se encuentran las variaciones debidas al fluoróforo (diferencias en el acoplamiento de los mismos o en el escaneo), a la posición dentro del *array* (por diferencias al colocar las sondas en el chip, hibridación no uniforme u otros artefactos) y a diferencias entre los *arrays* (que pueden deberse a diferencias al colocar las sondas, en el escaneo o en las condiciones de hibridación) (Smyth and Speed, 2003). Una forma de evaluar si la normalización corrigió los desvíos sistemáticos y logró la uniformidad de los datos es a través de los gráficos MA. Estos son diagramas de dispersión de la relación de la intensidad en el canal rojo/canal verde (M) vs. la intensidad media del spot (A). Matemáticamente, $M = \log_2 R - \log_2 G$ y $A = (\log_2 R + \log_2 G) / 2$, siendo R y G las intensidades corregidas por el *background* en el canal rojo y verde respectivamente (Smyth and Speed, 2003). Luego de la normalización, la mayoría de

los *spots* debe distribuirse alrededor de $M = 0$, que representa igual expresión en los dos canales, como se muestra en la figura 4-37.

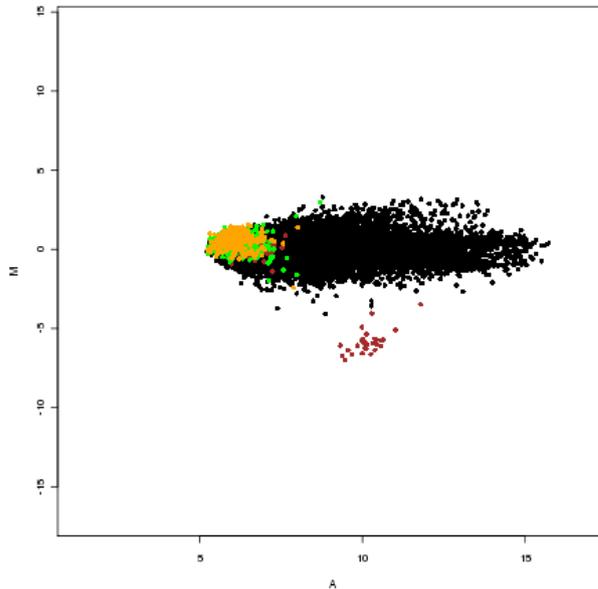


Figura 4-37. Gráfico MA luego de la normalización. Se observa el diagrama de dispersión de M vs. A , donde $M = \log_2 R - \log_2 G$ y $A = (\log_2 R + \log_2 G)/2$, y siendo R y G las intensidades corregidas por el *background* en el canal rojo y verde respectivamente. En color rojo están los marcadores (*dye marker*) que se encuentran al comienzo de cada grilla (para facilitar el colocado de las grillas), que fluorescen sólo en el canal verde (por eso M es menor a cero, formando un grupo claramente distinguible del resto de los genes). En amarillo se muestran los *spots* vacíos, donde se depositó *buffer* en vez de sonda; en verde están los *spots* nulos, donde no se hizo ninguna deposición; y en bordó están los controles negativos, correspondientes a sondas que no son de rata. Por lo tanto, todos estos *spots* tienen muy baja señal (A pequeño). Este gráfico en particular corresponde a un *microarray* donde se hibridó el ARN de una rata tratada con $\text{AdTNF}\alpha$ y el ARN de referencia, y el pretratamiento se hizo corrigiendo el *background* con *normexp* y normalizando por *print-tip loess* y *scale normalization*.

El análisis estadístico utilizado fue un test de Student modificado, que utiliza un estadístico t moderado (*moderated t-statistic*). De este modo, se identificaron 461 genes con $p < 0.05$ (2.5%) y 70 genes (0.38%) con $p < 0.01$, sobre un total de 18377 que pasaron el filtrado, que se encontraban diferencialmente expresados en los animales tratados con AdTNF α con respecto a los controles. Para continuar con el análisis, se seleccionaron los 25 genes con menor valor de p (Tabla 4-4). De estos 25 genes, 13 están sobre-expresados en los animales tratados con AdTNF α con respecto a los controles y 12 están menos expresados en los animales que sobre-expresan TNF- α . De esta lista de 25 genes con menor valor de p , hay 22 genes diferentes con función conocida. Analizamos en la literatura si estos genes se encontraban relacionados con TNF- α , y encontramos evidencias de que esta citoquina es capaz de regular la expresión de 6 de ellos. Como se profundizará en la discusión, trabajos previos demuestran que TNF- α es capaz de inducir la expresión de 3 de estos genes, que también se vieron inducidos por la técnica de *microarrays*: la quemoquina CXCL13 (Ngo et al., 1999, Mandik-Nayak et al., 2001, Ishikawa et al., 2002, Piao et al., 2007), la proteína reguladora de la GTP-ciclohidrolasa I (GFRP, *GTP cyclohydrolase I feedback regulatory protein*) (Ionova et al., 2008) y el receptor tipo toll 2 (TLR2, *toll-like receptor 2*) (Lin et al., 2000, Syed et al., 2007, Kim et al., 2008, Phulwani et al., 2008). Por otro lado, existe evidencia de que TNF- α reprime la expresión de la ATPasa 1 transportadora de calcio de membrana plasmática (PMCA1, *plasma membrane calcium-transporting ATPase 1*) (Souza et al., 2004), del mismo modo que evidenció la técnica de *microarrays*. A su vez, en la literatura está descrito que el regulador de la señalización por proteína G 16 (RGS16, *regulator of G-protein signaling 16*) (Fong et al., 2000) y la proteína quinasa C tipo delta (nPKC-delta) (Suh et al., 2003) son inducidos por TNF- α , mientras que nuestros resultados sugieren que su expresión es reprimida por la citoquina.

Descripción	p	Log ₂ FC
Quemoquina (motivo C-X-C) ligando 13 (CXCL13, <i>chemokine (C-X-C motif) ligand 13</i>)	4,74E-05	-0,92933403
Proteína reguladora de la GTP-ciclohidrolasa I (GFRP, <i>GTP cyclohydrolase I feedback regulatory protein</i>)	0,00037401	-0,56001859
Canal de potasio activado por calcio subunidad beta 4 (<i>calcium-activated potassium channel subunit beta 4</i>)	0,00046504	0,7320176
Regulador de la señalización por proteína G 16 (RGS16, <i>regulator of G-protein signaling 16</i>)	0,00057939	0,49879498
Familia 4 de transportadores de solutos, cotransportador de bicarbonato de sodio, miembro 7 (<i>solute carrier family 4, sodium bicarbonate cotransporter, member 7</i>)	0,00073838	-0,47826872
Receptor tipo toll 2 (TLR2, <i>toll-like receptor 2</i>)	0,00104356	-0,46877793
Transportador de monocarboxilato 4 (MCT4, <i>monocarboxylate transporter 4</i>)	0,0013496	-0,51702508
Gen con dominio "coiled-coil" 136 (Ccdc136, <i>coiled-coil domain containing 136</i>)	0,00202573	0,65011038
Uridiltransferasa de galactosa-1-fosfato (<i>galactose-1-phosphate uridylyltransferase</i>)	0,00206012	-0,43360762
Proteína de muerte relacionada con Bcl-2 de ovario (BOK, <i>Bcl-2-related ovarian killer protein</i>)	0,00216662	0,82462348
Gen con dominio "coiled-coil" 68 (Ccdc68, <i>coiled-coil domain containing 68</i>)	0,0030766	-0,71812876
Proteína nuclear autoantigénica de esperma (NASP, <i>nuclear autoantigenic sperm protein</i>)	0,00333377	0,50889288
Factor 1 de unión de extremos no homólogos (NHEJ, <i>non-homologous end-joining factor 1</i>)	0,00333614	0,52960629
RT1 clase Ib, locus S3 (MHC clase I no clásico)	0,00337072	-0,5473045
Familia GLIS de <i>zinc finger</i> 2 (GLIS2, <i>GLIS family zinc finger 2</i>)	0,00410059	0,42086748
Piruvato quinasa (<i>pyruvate kinase</i>)	0,00482823	0,60858284
LOC499719 hipotético (<i>hypothetical LOC499719</i>)	0,00492704	-0,45054629
PREDICHO: similar al citocromo P450 familia 2, subfamilia J, polipéptido 4) (CYP2J4) (<i>cytochrome P450, family 2, subfamily J, polypeptide 4</i>)	0,00594062	-0,57876011
ATPasa 1 transportadora de calcio de membrana plasmática (PMCA1, <i>plasma membrane calcium-transporting ATPase 1</i>)	0,00598752	0,66448861
Proteína con dominio <i>zinc finger</i> tipo CCCH 8 (ZC3H8, <i>zinc finger CCCH type containing 8</i>)	0,00615851	-0,40987659

Regulador de la señalización por proteína G 3 (RGS3, <i>regulator of G-protein signaling 3</i>)	0,00747248	0,62911181
Proteasa específica de ubiquitina 24 (USP 24, <i>ubiquitin specific protease 24</i>)	0,00832218	-0,53221522
Citocromo P450 familia 26, subfamilia B, polipéptido 1 (CYP26B1, <i>cytochrome P450, family 26, subfamily B, polypeptide 1</i>)	0,00860733	0,57959047
Complejo FACT subunidad SSRP1 (<i>FACT complex subunit SSRP1, facilitates chromatin transcription complex subunit SSRP1</i>)	0,00938639	0,94160112

Tabla 4-4. *Ranking de los primeros 25 genes diferenciales ordenados según su valor de p.* Se indica el valor de p para el test de Student modificado. Log_2FC indica el nivel de cambio, siendo $\text{FC} = \text{B}/\text{T}$, donde B son los valores de intensidad de señal del ARN correspondiente a los animales tratados con Ad β gal con respecto a la referencia, y T son los valores de intensidad de señal del ARN correspondiente a los animales tratados con AdTNF α con respecto a la referencia. De este modo, $\text{log}_2\text{FC} = 0$ representa igual expresión en los animales que sobre-expresan TNF- α con respecto a los controles. $\text{Log}_2\text{FC} = -1$ representa un aumento de 2 veces en los animales tratados con AdTNF α con respecto a los controles, $\text{log}_2\text{FC} = -2$ representa un aumento de 4 veces, y así sucesivamente. Entonces, los valores negativos expresan una mayor expresión en los animales tratados con AdTNF α en relación a los tratados con Ad β gal, y los valores positivos representan una menor expresión en los animales que sobre-expresan TNF- α .

Finalmente, se llevó a cabo un análisis de Gene Ontology (GO). El proyecto de GO es una iniciativa bioinformática que se propone la integración de la vasta información generada por la biología a escala genómica. Esta integración tiene dos aspectos fundamentales: proveer descripciones consistentes de los genes y sus productos, y estandarizar las clasificaciones de los mismos (Harris et al., 2004). El análisis de GO de los resultados de un experimento de *microarrays* permite identificar qué procesos biológicos están significativamente representados por los genes que se están estudiando, en este caso los 25 genes con menor valor de p (los resultados se muestran en negrita en la Tabla 4-5.). Por otro lado, se hizo un análisis de cada uno de los 25 genes seleccionados (ver Tabla 4-4), y se los agrupó de acuerdo a su función molecular (los resultados completan la Tabla 4-5). Puede observarse que están significativamente representados procesos biológicos relacionados con la **respuesta inmune**, lo cual era esperable en un modelo en el que se sobre-expresa una citoquina pro-inflamatoria y aumenta la confiabilidad del estudio de *microarrays*. También están significativamente representados procesos vinculados al metabolismo de moléculas pequeñas y al metabolismo del ADN. Por otro lado, para completar el análisis de los 25 genes con menor valor de p , fue posible agruparlos según su función molecular en otros tres grupos: transportadores y canales de membrana, moléculas involucradas en transducción de señales y factores de transcripción. Finalmente, hay tres genes cuya función es desconocida: gen con dominio “coiled-coil” 68, gen con dominio “coiled-coil” 136 y LOC499719 hipotético.

Función	Descripción
Respuesta inmune	Receptor tipo toll 2 (TLR2) <i>Proteína con dominio zinc finger tipo CCCH 8 (ZC3H8)</i> <i>Proteína quinasa C tipo delta (nPKC-delta)</i> Quemoquina (motivo C-X-C) ligando 13 (CXCL13) <i>Factor 1 de unión de extremos no homólogos (NHEJ)</i> Proteína reguladora de la GTP-ciclohidrolasa I (GFRP) RT1 clase Ib, <i>locus</i> S3 (MHC clase I no clásico)
Metabolismo de moléculas pequeñas	Uridiltransferasa de galactosa-1-fosfato Citocromo P450 familia 26, subfamilia B, polipéptido 1 (CYP26B1) Similar al Citocromo P450 familia 2, subfamilia J, polipéptido 4 (CYP2J4) Piruvato quinasa
Metabolismo del ADN	Proteína nuclear autoantigénica de esperma (NASP) <i>Factor 1 de unión de extremos no homólogos (NHEJ)</i> Complejo FACT subunidad SSRP1
Transportadores y canales de membrana	Canal de potasio activado por calcio subunidad beta 4 Transportador de monocarboxilato 4 (MCT4) Familia 4 de transportadores de solutos, cotransportador de bicarbonato de sodio, miembro 7 ATPasa 1 transportadora de calcio de membrana plasmática (PMCA1)
Transducción de señales	Regulador de la señalización por proteína G 16 (RGS16) Regulador de la señalización por proteína G 3 (RGS3) <i>Proteína quinasa C tipo delta (nPKC-delta)</i>
Factores de transcripción	Familia GLIS de <i>zinc finger</i> 2 (GLIS2) <i>Proteína con dominio zinc finger tipo CCCH 8 (ZC3H8)</i>
Desconocida	Gen con dominio "coiled-coil" 68 Gen con dominio "coiled-coil" 136 LOC499719 hipotético

Tabla 4-5. *Agrupamiento o clustering de los genes seleccionados.* Se analizaron los genes expresados diferencialmente en los animales tratados con AdTNF α con respecto a los controles (se evaluaron los 25 genes con menor valor de p). Los procesos biológicos sobre-representados, y los genes que los componen, fueron determinados por un análisis de GO, y se muestran en negrita. Paralelamente, los 25 genes seleccionados fueron agrupados en base a un análisis individual de su función molecular (estudio que se incluyó en la tabla pero no está en negrita, para diferenciarlo del análisis de GO). Se muestran en itálica los genes que pertenecen a más de una categoría.

4.8.5. Validación por RT-PCR en tiempo real

Como se mencionó en la introducción (sección 1.6), la técnica de *microarrays* se utiliza como un método de *screening* a escala genómica. Los resultados obtenidos deben ser validados por otra técnica, como RT-PCR en tiempo real. Si bien excede el alcance de esta tesis la validación de todos los genes de interés detectados por *microarrays*, se comenzó la validación de la expresión diferencial de genes seleccionados de la lista de 25 genes con menor valor de p (ver Tabla 4-4). Se evaluaron los niveles de expresión de nPKC-delta y RGS3 en la *substantia nigra* de animales inyectados con AdTNF α y Ad β gal y sacrificados 14 días p.i., mediante RT-PCRs en tiempo real utilizando el fluoróforo SYBR Green I (estas reacciones fueron llevadas a cabo por Pablo Radice y Joaquín Golzález). En todos los casos, la diferencia entre los Ct de las muestras y los controles sin RT y sin molde fue igual o mayor a diez ciclos. Para verificar la especificidad de la reacción, se analizaron las curvas de disociación, todas las cuales mostraron un pico único (Figura 4-38). Para analizar los datos, se realizó una cuantificación relativa, usando el método de $\Delta\Delta$ Ct (ver materiales y métodos, página 81). Por lo tanto, los resultados se expresaron como cantidad relativa al “calibrador”, que fue una muestra de *substantia nigra* de ratas sin tratar. Como “normalizador” o gen de referencia (*housekeeping*) se utilizó TBP. Este análisis permitió corroborar una menor expresión de nPKC-delta y RGS3 en los animales que sobre-expresan TNF- α que en los controles, resultados que concuerdan con los obtenidos por la técnica de *microarrays*. Estos resultados sugieren que la sobre-expresión crónica de TNF- α en la *substantia nigra* reprime (directa o indirectamente) la expresión de nPKC-delta y RGS3 (Figura 4-39).

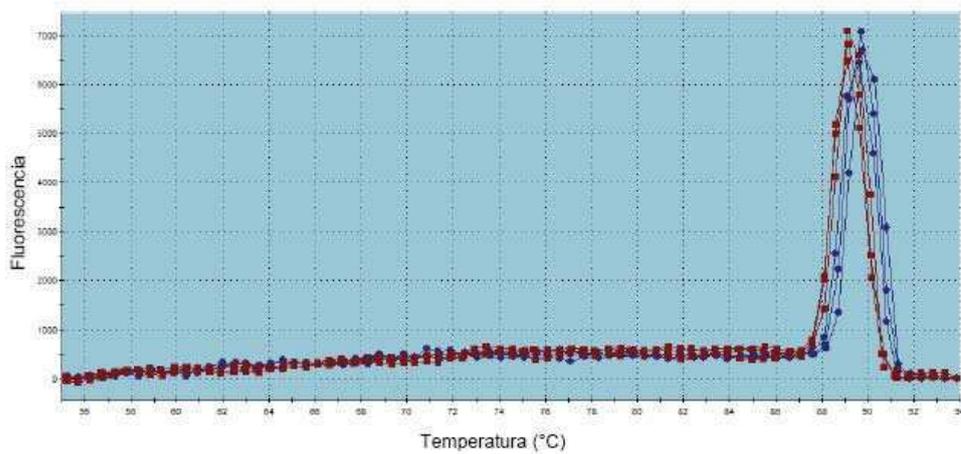


Figura 4-38. RT-PCR en tiempo real para detectar *nPKC-delta* y *RGS3*: curva de disociación. Se llevó a cabo una RT-PCR en tiempo real para detectar *nPKC-delta* y *RGS3* en muestras de *substantia nigra* de animales tratados con $\text{AdTNF}\alpha$ o $\text{Ad}\beta\text{gal}$ y sacrificados 14 días p.i. Se muestra un gráfico representativo de las curvas de disociación (fluorescencia vs. temperatura) correspondientes a triplicados de una RT-PCR en tiempo real para detectar *nPKC-delta* (rojo) y *RGS3* (azul).

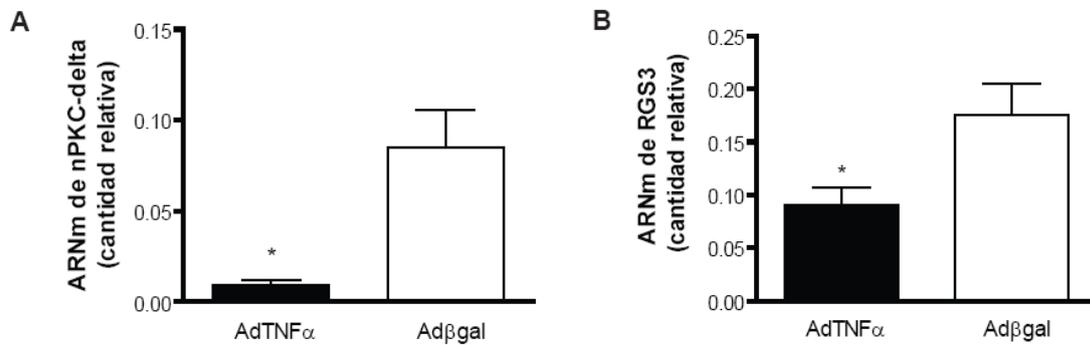


Figura 4-39. RT-PCR en tiempo real para detectar *nPKC-delta* y *RGS3*. Los datos de la RT-PCR en tiempo real para detectar *nPKC-delta* y *RGS3* en muestras de *substantia nigra* de animales tratados con $\text{AdTNF}\alpha$ o $\text{Ad}\beta\text{gal}$ fueron analizadas usando el método de $\Delta\Delta\text{Ct}$. Se utilizó como gen de referencia TBP, y como “calibrador” una muestra de *substantia nigra* de ratas sin tratar. Los resultados se expresaron como cantidad relativa o nivel de cambio (*fold change*) con respecto al “calibrador”. * $p < 0.05$ animales inyectados con $\text{AdTNF}\alpha$ vs. $\text{Ad}\beta\text{gal}$. Test de Student de una cola no pareado para *RGS3* y test de Student de una cola no pareado con corrección de Welch para *nPKC-delta*. $n = 5-6$ por grupo.

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

La presente tesis doctoral demuestra por primera vez que la sobre-expresión crónica de TNF- α en la *substantia nigra* produce una neurodegeneración progresiva, que está acompañada por síntomas motores, infiltración leucocitaria y un aumento en el número de microglía/macrófagos activados. Asimismo, señala a NOS, COX-2, nPKC-delta y RGS3 como posibles mediadores moleculares de estos efectos. Finalmente sienta las bases para estudiar otros genes candidatos a participar de los efectos neurodegenerativos de la citoquina, identificados mediante la técnica de *microarrays*.

5.1. TNF- α se sobre-expresa en forma crónica en la *substantia nigra* luego de la inyección adenoviral

5.1.1. Expresión crónica de TNF- α

Con el objetivo de sobre-expresar en forma crónica la citoquina pro-inflamatoria TNF- α en la *substantia nigra*, se inyectó directamente en esa región del cerebro un adenovector que expresa TNF- α soluble de ratón (AdTNF α). Efectivamente, pudo observarse expresión de la citoquina 14 días p.i. por ELISA. En contraposición a la expresión crónica lograda por la inyección de un adenovector que expresa la proteína recombinante, la inyección en el parénquima cerebral de la proteína lleva a una expresión aguda que no dura más que unas horas. Por ejemplo, Blond y colaboradores inyectaron una dosis alta (330 ng) de la proteína TNF- α en el estriado y dejaron de detectar su expresión por ELISA 24 hs después de la inoculación (Blond et al., 2002). En nuestro caso, ya no pudimos detectar expresión de la citoquina recombinante en los animales tratados con AdTNF α 21 días después de la inyección. Dado que no pudimos obtener evidencias de que el TNF- α recombinante induzca la citoquina endógena, podemos asumir que a los 21 días p.i. ya no hay sobre-expresión de TNF- α en la *substantia nigra* (ni recombinante ni endógeno).

Por otro lado, cabe destacar que TNF- α de ratón tiene un 95% de identidad de aminoácidos con TNF- α de rata (Kwon et al., 1993), lo cual permite suponer que es capaz de activar los receptores específicos del mismo modo que lo hace la citoquina endógena. El hecho de que el TNF- α recombinante sea de otra especie permite estudiar y diferenciar fácilmente la expresión de la citoquina inyectada y la endógena.

Por lo tanto, podemos decir que mediante la inyección de un adenovector que expresa TNF- α de ratón en la *substantia nigra*, se logró la sobre-expresión crónica de esta citoquina en la región de interés. Asimismo, los estudios de difusión del adenovector (se estudió Ad β gal, pero puede suponerse que la distribución de ambos adenovectores es equivalente) sugieren que las células transducidas se encuentran específicamente en la *substantia nigra*, observándose un porcentaje muy bajo (12%) en regiones ectópicas adyacentes a esta región.

5.1.2. Niveles de expresión

La expresión de TNF- α recombinante en la *substantia nigra* de los animales inyectados con AdTNF α (un promedio de 19.4 pg/mg de proteína a los 7 días p.i. y 17 pg/mg de proteína a los 14 días p.i.) fue aproximadamente 3.5 veces mayor que la de los controles (que tienen un promedio de 5.5 pg/mg de proteína, lo cual muestra la línea basal inespecífica del ELISA). Se ha reportado que los niveles proteicos (detectados por ELISA) de TNF- α en el estriado de pacientes parkinsonianos era 3.7 veces mayor que en los controles (Mogi et al., 1994b). Sin embargo, estos datos corresponden a muestras *post mortem*, en estadios finales de la enfermedad, donde un importante porcentaje de las neuronas de la *substantia nigra* ya ha degenerado. Por otro lado, como se mencionó en la introducción, se ha observado un aumento en los niveles de TNF- α en el estriado de ratones inoculados con MPTP en estadios tempranos, sólo unas horas después de la inoculación de la neurotoxina. Si bien en estos casos se midieron los niveles del ARNm y no de proteína, Ferger y colaboradores reportaron un aumento de TNF- α de hasta 4 veces en los animales tratados con MPTP con respecto a los controles (Ferber et al., 2004), mientras que Sriram y colaboradores observaron un aumento de hasta 20 veces (Sriram et al., 2006).

Por otro lado, en otros modelos de injuria cerebral (trauma e isquemia) también se ha observado un aumento temprano de los niveles de TNF- α . En un modelo de trauma cerebral (TBI, *traumatic brain injury*), Vitarbo y colaboradores reportaron un aumento de entre 4 y 5 veces en los niveles proteicos de esta citoquina (medidos por ELISA), en comparación a los controles (con una operación *sham*). Este aumento en los valores de TNF- α se observó 1 y 3 hs después de la injuria (Vitarbo et al., 2004). A su vez, en un modelo de isquemia cerebral, Leker y colaboradores reportaron un aumento de 6 veces en la concentración de TNF- α en el tejido infartado (medida por ELISA), 4

hs después de inducir el daño (también en relación a los controles con una operación *sham*) (Leker et al., 1999).

Por lo tanto, si bien hasta donde nosotros sabemos no existen datos que permitan comparar en forma confiable y precisa los niveles de TNF- α de nuestro trabajo con los niveles que ocurren durante la enfermedad de Parkinson (valores de los niveles proteicos de la citoquina en la *substantia nigra* en estadíos tempranos), podemos decir que en la presente tesis doctoral se trabajó con niveles patofisiológicos de la citoquina.

5.2. La sobre-expresión crónica de TNF- α tiene un efecto neurodegenerativo progresivo en la *substantia nigra*

Luego de la inyección de AdTNF α en la *substantia nigra* se observó una pérdida parcial y progresiva de neuronas en esa región del cerebro. La neurodegeneración inducida por TNF- α comenzó a observarse a los 14 días después de la inoculación de AdTNF α , por lo menos 7 días después de que comenzara a expresarse la citoquina en la *substantia nigra*. Este resultado sugiere que se requiere una expresión crónica de TNF- α para que tenga un efecto neurodegenerativo. Esta observación es consistente con los reportes de Castaño y colaboradores, quienes inyectaron la proteína TNF- α en forma aguda en la *substantia nigra* en una dosis (1000U o 20 ng) considerablemente más alta que la nuestra (un promedio de 500 pg a los 7 días p.i.), y sin embargo no pudieron detectar un efecto neurodegenerativo 7 días después de la inyección (Castano et al., 2002).

Por otro lado, observamos que dosis bajas de TNF- α en la *substantia nigra*, como las obtenidas al realizar la inyección en el MFB o con la dosis menor de AdTNF α inoculada en la *substantia nigra*, no tienen un efecto tóxico. Este resultado sugiere que TNF- α es capaz de gatillar la muerte neuronal sólo cuando pasa un cierto umbral de concentración.

Por lo tanto, podemos concluir que es necesaria la sobre-expresión crónica de TNF- α para producir un efecto tóxico definido en la *substantia nigra*. Asimismo, nuestros resultados sugieren que los niveles y la duración de la expresión de esta citoquina son variables importantes para que ejerza un efecto neurodegenerativo. El hecho de que la neurodegeneración se observó sólo en forma tardía favorece la hipótesis de que TNF- α podría estar induciendo moléculas que contribuyan al efecto nocivo observado.

5.3. La sobre-expresión crónica de TNF- α produce déficits motores

Los síntomas motores fueron evaluados mediante el test del cilindro, que estudia la aparición de aquinesias en los miembros delanteros. Pudimos observar que los déficits motores, detectados con este test, reflejaron la neurodegeneración desarrollada en la *substantia nigra* luego de la inoculación de AdTNF α . Cuando comenzó a observarse el efecto neurodegenerativo de TNF- α , a los 14 días p.i. (con un 53.3% de neuronas TH positivas remanentes en la *substantia nigra* inyectada, contadas por estereología), los animales inoculados con AdTNF α comenzaron a mostrar impedimentos motores, ya que al hacer el test del cilindro a los 13 días p.i. el porcentaje de toques con la pata contralateral a la inyección en estos animales fue significativamente menor que en los controles. A los 21 días p.i., el porcentaje de células TH positivas en la *substantia nigra* ipsilateral a la inyección de AdTNF α disminuyó (38% de neuronas TH positivas remanentes en la *substantia nigra* inyectada, contadas por estereología), y los síntomas motores se hicieron más pronunciados. Esta observación se condice con la anatomía y fisiología del sistema nigroestriatal. Como se mencionó en la introducción, las neuronas dopaminérgicas del circuito nigroestriatal tienen sus cuerpos celulares en la *substantia nigra* y extienden sus prolongaciones hacia el estriado, donde hacen sinapsis con las neuronas estriatales. Por lo tanto, si bien no se han determinado los niveles de dopamina en el estriado, es esperable que la muerte de las neuronas de la *substantia nigra* tenga como consecuencia un déficit de dopamina en el estriado, lo que llevaría a la aparición de los principales síntomas motores de la enfermedad. Podemos concluir que es necesario cierto nivel de neurodegeneración en la *substantia nigra* para producir déficits motores. Esto concuerda con las observaciones hechas en pacientes con mal de Parkinson, donde se ha visto que es necesaria una pérdida de alrededor del 50-60% de las neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra* para que se manifiesten los primeros síntomas motores de la enfermedad (Fahn, 2003, Whitton, 2007).

5.4. La sobre-expresión crónica de TNF- α induce una respuesta inflamatoria en la *substantia nigra*

En cuanto a la respuesta inflamatoria inducida por TNF- α en la *substantia nigra*, nuestros resultados sugieren que esta citoquina induce la activación de

microglía/macrófagos y astrocitos en el parénquima cerebral. Tanto el infiltrado inflamatorio (compuesto principalmente por monocitos/macrófagos), como la microglía, y posiblemente los astrocitos, podrían estar participando de la muerte neuronal producida por la sobre-expresión crónica de TNF- α . Como se discutió en la introducción, existen evidencias de que estas células son capaces de producir mediadores moleculares tóxicos para las neuronas de la *substantia nigra*, y de que la neuroinflamación no es sólo una consecuencia de la neurodegeneración, sino que participaría en la progresión de la muerte neuronal (Hirsch and Hunot, 2009, Glass et al., 2010). Sin embargo, no podemos descartar que, en nuestro modelo, estas células (o algunas de ellas) tengan un rol protector, participando por ejemplo de la remoción de restos celulares de las neuronas muertas (la microglía y los macrófagos, que tienen capacidad fagocítica) o liberando factores tróficos. De cualquier modo, este posible efecto neuroprotector se vería desbordado por la cascada de eventos desencadenada por TNF- α , que lleva finalmente a un efecto neto degenerativo.

5.4.1. Curso temporal de la respuesta inflamatoria

Tanto el infiltrado inflamatorio como las células redondeadas GSA y MHC clase II positivas (microglía estadio 4/macrófagos) mostraron un pico a los 7 días después de la inyección de los adenovectores, y luego comenzaron a declinar con el tiempo. Sin embargo, a los 7 días no se pudo detectar neurodegeneración. A los 14 días p.i., cuando comenzó la pérdida de neuronas dopaminérgicas, la inflamación ya había disminuido. Y continuó disminuyendo a los 21 y 28 días p.i., cuando la neurodegeneración alcanzó su máximo nivel. Estos resultados sugieren que la inflamación, inducida por TNF- α , podría ser responsable de gatillar los eventos iniciales que llevan a la neurodegeneración en la *substantia nigra*.

El hecho de que a los 14 días p.i. la respuesta inflamatoria disminuyó, a pesar de que la expresión de TNF- α continuaba, podría reflejar que a los 7 días la inflamación se debe al efecto combinado de TNF- α y la inyección del adenovector en sí misma (esta última puede ser estudiada analizando el efecto de la inyección del adenovector control, Ad β gal). Esta observación podría deberse también a un mecanismo de regulación negativa de la señalización por TNF- α . Por ejemplo, puede ocurrir una disminución en la síntesis de los receptores, una desensibilización de los receptores, y/o la citoquina podría ser secuestrada por el receptor soluble de TNF- α .

5.4.2. Activación de la microglía

La sobre-expresión de TNF- α produjo un aumento en el volumen de células redondeadas GSA y MHC clase II positivas en la *substantia nigra*. Sin embargo, tanto GSA como MHC clase II pueden marcar tanto microglía como macrófagos provenientes de la periferia. Por lo tanto, no fue posible distinguir entre estos dos tipos celulares al cuantificar las células redondeadas GSA y MHC clase II positivas. Sin embargo, prácticamente cualquier injuria en el SNC induce activación de microglía (Perry et al., 2010), y dado que TNF- α es una citoquina pro-inflamatoria es probable que entre esas células haya microglía en su máximo estadio de activación. El número de células microgliales activadas en estadios 2 y 3 no resultó significativamente diferente entre los animales inyectados con AdTNF α y los controles, resultado que fue consistente al estudiar las células GSA y MHC clase II positivas. Esto sugiere que la microglía pasaría rápidamente a un estadio de activación tipo 4, frente a un estímulo pro-inflamatorio fuerte como es TNF- α . Alternativamente, este resultado puede interpretarse como que la mayoría de las células redondeadas GSA y MHC clase II positivas son macrófagos y no microglía en estadio 4 de activación.

De hecho, como se describió en la introducción, la microglía son los macrófagos residentes del SNC, y derivan de un precursor mieloide que entra al SNC durante el desarrollo embrionario (Perry et al., 2010). Por lo tanto, cuando estas células alcanzan su máximo estadio de activación son redondeadas y con capacidad fagocítica, indistinguibles de un macrófago tanto por su morfología como por sus marcadores de superficie. En consecuencia, para confirmar que TNF- α fue capaz de inducir activación de microglía sería necesario depletar a los animales de macrófagos. De este modo, si se observaran células redondeadas GSA y MHC clase II positivas en la *substantia nigra*, sería posible asegurar que se trata de microglía en su máximo estadio de activación.

Se pudo observar microglía en estadios 2 y 3 de activación a los 28 días p.i., incluso en los animales controles. Esto puede deberse a una respuesta al adenovector, que está presente en la *substantia nigra* por al menos 14 días (ya que se corroboró por ELISA la expresión de TNF- α hasta 14 días después de la inyección.).

5.4.3. Activación de la astrogía

En cuanto a la respuesta de la astrogía a la sobre-expresión de TNF- α en la *substantia nigra*, observamos al microscopio un aumento en la marca de GFAP, tanto en intensidad de marca como en número de células GFAP positivas, en los animales inyectados con AdTNF α comparado con los controles. Sin embargo, no se observó marca de GFAP en la región del infiltrado inflamatorio (en esa zona hay otros tipos celulares, y por lo tanto no hay astrocitos) en los animales que sobre-expresan TNF- α sacrificados a los 7 y 14 días p.i., por lo que dicha zona no pudo incluirse en el volumen de células GFAP positivas al realizar la cuantificación. Por esta razón, el volumen de células GFAP positivas en la *substantia nigra* sólo mostró una tendencia a ser mayor en los animales inyectados con AdTNF α que en los controles, sin alcanzar significancia estadística.

Por lo tanto, podemos decir que nuestros resultados sugieren que la sobre-expresión de TNF- α en la *substantia nigra* induce activación de la astrogía, si bien se trata de una observación cualitativa, ya que no se pudo realizar una cuantificación confiable debido a impedimentos técnicos.

5.5. La sobre-expresión crónica de TNF- α en la *substantia nigra* permitió generar un modelo de neurodegeneración

La inyección unilateral de AdTNF α en la *substantia nigra* permitió generar un modelo de muerte neuronal gatillada por la sobre-expresión crónica de TNF- α en esa región del cerebro. En este modelo, de pérdida neuronal se caracterizó por ser parcial y progresiva, y aparecieron concomitantemente síntomas motores y una respuesta inflamatoria. En muchos sentidos, este modelo es semejante a la inyección unilateral de 6-OHDA en el estriado, que también produce una pérdida parcial y progresiva de neuronas en la *substantia nigra* del hemisferio inyectado (Sauer and Oertel, 1994). En este modelo de 6-OHDA, la muerte neuronal induce también la aparición de síntomas motores ligados con la disminución de dopamina estriatal, que pueden ser evidenciados por test motores como el test del cilindro. Asimismo, como se mencionó en la introducción, la gliosis es una característica prominente del modelo de 6-OHDA. Sin embargo, en dicho modelo las células microgliales activadas tienen una morfología característica de estadios 2 y 3 de activación, no observándose microglía en su

máximo estadio de activación (Depino et al., 2003, Godoy et al., 2008). En cambio, al sobre-expresar TNF- α en la *substantia nigra*, se observaron células de la microglía en estadio 4 de activación. Finalmente, tanto en el modelo inducido por la sobre-expresión de TNF- α en la *substantia nigra* como en el de 6-OHDA, no se pudieron detectar cuerpos de Lewy, que suelen observarse en los pacientes con enfermedad de Parkinson.

Por lo tanto, podemos decir que se ha generado un modelo inflamatorio de neurodegeneración en la *substantia nigra*, que comparte muchas de las características de uno de los modelos de enfermedad de Parkinson más utilizados en rata. Este modelo, donde TNF- α tiene un efecto unívocamente tóxico, es una buena herramienta para estudiar los mecanismos por los cuales la citoquina ejerce su efecto neurodegenerativo. Y aporta un nuevo marco experimental para estudiar la muerte de las neuronas de la *substantia nigra*.

5.6. Mecanismos moleculares involucrados en la muerte neuronal

5.6.1. Muerte por apoptosis

El receptor tipo I de TNF- α es un receptor con dominio de muerte, por lo que es capaz de activar la cascada apoptótica. Por lo tanto, exploramos la posibilidad de que TNF- α estuviera actuando directamente sobre las neuronas induciendo la muerte por un mecanismo apoptótico. Sin embargo, en una tinción de Hoechst, se observaron menos de siete núcleos apoptóticos en toda *substantia nigra*, tanto en los animales que sobre-expresan TNF- α como en los controles. Tampoco pudimos detectar activación de caspasa 3 en muestras de *substantia nigra* de animales inyectados con AdTNF α mediante Western blot. En conclusión, no pudimos obtener evidencias de que la sobre-expresión de TNF- α fuera capaz de inducir apoptosis en la *substantia nigra*.

Estos resultados no son inesperados ya que concuerdan con diversas evidencias que muestran que *in vivo* la apoptosis inducida por TNF- α tendría un rol menor comparado con su función en la regulación de procesos inflamatorios (revisado en Wajant et al., 2003). De hecho, la primera función descrita de esta citoquina, y que le dio el nombre, fue la capacidad de inducir necrosis en tumores y líneas tumorales. Esta capacidad de rechazar tumores *in vivo* es dependiente de una respuesta inflamatoria, y no de la inducción de apoptosis en las células tumorales. Otro efecto característico

de TNF- α es su alta toxicidad sistémica, y su participación en el shock séptico, en los cuales su capacidad de producir apoptosis tampoco jugaría un rol importante, y la mayoría de los efectos estaría relacionada con mediadores como el NO. De este modo, la capacidad de TNF- α de inducir apoptosis estaría enmascarada *in vivo* por la activación concomitante de NF- κ B, y la consecuente activación de diversos genes, principalmente ligados a sobrevivencia celular y a la producción de factores pro-inflamatorios. Estas dos vías, la apoptótica y la de NF- κ B, se inhiben mutuamente. Mientras que NF- κ B regula negativamente el programa apoptótico (principalmente induciendo la síntesis de moléculas antiapoptóticas), la apoptosis es capaz de interferir con la activación de NF- κ B (principalmente mediante el clivaje dependiente de caspasas de varios de los componentes de esta vía). La regulación de este circuito inhibitorio podría ser responsable de que *in vivo* el efecto predominante de TNF- α sea la inducción de NF- κ B, mientras que el de Fas sea la inducción de apoptosis (revisado en Wajant et al., 2003).

Por otro lado, está descrito que el TNFR1, como otros receptores de muerte, es capaz de inducir necrosis en forma dependiente de RIP. Esta forma de muerte celular es independiente de caspasas, bioquímicamente y morfológicamente diferente de la apoptosis, y asociada *in vivo* con inflamación. La producción de especies reactivas de oxígeno tendría un rol fundamental en mediar la muerte por necrosis, creando las condiciones celulares que favorecen este tipo de muerte celular en vez de apoptosis (revisado en Wajant et al., 2003).

En cuanto al tipo de muerte celular que se observa durante la enfermedad de Parkinson, existen resultados controversiales. Si bien algunos autores han encontrado signos de apoptosis en la *substantia nigra* de pacientes con mal de Parkinson (Anglade et al., 1997, Mogi et al., 2000, Tatton et al., 2003), y en modelos animales (He et al., 2000, Marti et al., 2002, Novikova et al., 2006), otros grupos no pudieron obtener evidencias de que la muerte por apoptosis jugara un rol importante en esta enfermedad (Kosel et al., 1997, Banati et al., 1998, Wullner et al., 1999, Jellinger, 2000). También se ha relacionado la necrosis (Ochu et al., 1998, Quigley et al., 2003) y la autofagia (Anglade et al., 1997, Rajawat and Bossis, 2008, Irrcher and Park, 2009, Yang et al., 2009) con la muerte de las neuronas de la *substantia nigra* durante la enfermedad de Parkinson. La autofagia es un tipo de muerte celular programada no apoptótica, independiente de caspasas, caracterizada por inclusión de componentes citoplasmáticos (incluidas organelas y proteínas) en vesículas de doble membrana llamadas autofagosomas. Estos autofagosomas se fusionan con los lisosomas para

formar autolisosomas, donde los componentes celulares son degradados (Tsujimoto and Shimizu, 2005, Elmore, 2007).

En consecuencia, podemos decir que en nuestro modelo no pudimos obtener evidencias de que TNF- α induzca la muerte neuronal en la *substantia nigra* mediante un mecanismo apoptótico. Alternativamente, esta citoquina podría estar produciendo la muerte por necrosis, así como también por otros tipos de muerte celular programada no apoptótica, como autofagia o paraptosis -esta última se caracteriza por ser dependiente de una actividad alternativa de caspasa 9 independiente de Apaf-1, y difiere de la apoptosis en su respuesta a inhibidores, su bioquímica y su morfología, por ejemplo no presenta fragmentación nuclear (Sperandio et al., 2000).

5.6.2. La red de citoquinas en el cerebro está alterada con respecto a la periferia

Existe una extensa evidencia de que en tejidos periféricos TNF- α e IL-1 β son capaces de inducir su propia síntesis, así como de inducirse mutuamente. Como consecuencia, tanto el LPS como TNF- α e IL-1 β inducen un patrón similar de citoquinas y un reclutamiento leucocitario mixto (con presencia de neutrófilos y macrófagos) en la periferia (Luger and Schwarz, 1990, Groves et al., 1995, Blond et al., 2002, Mak and Saunders, 2006). Sin embargo, la respuesta parece ser diferente en el cerebro. El modelo con el que trabajamos nos permite distinguir entre TNF- α recombinante y el endógeno, ya que AdTNF α expresa la citoquina de ratón, que puede diferenciarse del endógeno (de rata) utilizando ensayos de ELISA específicos. Luego de la inyección de AdTNF α , no pudimos detectar expresión de TNF- α e IL-1 β endógenas a nivel proteico. Más aún, observamos un infiltrado inflamatorio en la *substantia nigra* compuesto principalmente por macrófagos, sin la presencia de neutrófilos. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Blond y colaboradores, quienes al inyectar la proteína TNF- α en el cerebro observaron un reclutamiento leucocitario de células mononucleares y no pudieron obtener evidencia de nueva síntesis de TNF- α o IL-1 β . Además, la inyección de IL-1 β en el parénquima tuvo como resultado el reclutamiento de neutrófilos y la inducción de la síntesis de IL-1 β , pero no pudo detectarse síntesis de TNF- α (Blond et al., 2002). Por su lado, resultados de nuestro laboratorio mostraron que la inyección de un adenovector que expresa IL-1 β en la *substantia nigra* indujo un infiltrado inflamatorio compuesto principalmente por neutrófilos; también se detectó la expresión de IL-1 β endógena, pero no pudo observarse inducción de TNF- α (Ferrari et al., 2006). Estos resultados podrían explicar el reclutamiento leucocitario característico

observado luego de la expresión de TNF- α o IL-1 β en el parénquima cerebral: IL-1 β recluta principalmente neutrófilos (Anthony et al., 1997a, Anthony et al., 1997b, Blond et al., 2002, Ferrari et al., 2004, Depino et al., 2005, Ferrari et al., 2006) y TNF- α casi exclusivamente monocitos/macrófagos (Blond et al., 2002).

Por lo tanto, nuestros resultados proveen una evidencia adicional de que en el parénquima cerebral existe una red de citoquinas particular, que difiere de la que está caracterizada en la periferia, donde TNF- α e IL-1 β inducen distintos patrones de citoquinas, y reclutan principalmente macrófagos y neutrófilos respectivamente. Estos resultados sugieren que TNF- α e IL-1 β endógenos no estarían participando, en nuestro modelo, como mediadores o amplificadores de la cascada de eventos desencadenada por la inyección de AdTNF α en la *substantia nigra*, que llevan a la muerte neuronal.

En el presente trabajo no estudiamos la expresión de TNF- α e IL-1 β endógenas a nivel de ARNm, por lo que no podemos descartar que la inyección de AdTNF α en la *substantia nigra* induzca la síntesis de ARNm de estas citoquinas. Sin embargo, utilizamos la técnica más sensible disponible para detectar expresión de las citoquinas a nivel proteico, un ensayo de ELISA, y no pudimos observar un aumento ni de TNF- α ni de IL-1 β endógenas. Como controles de la técnica, contamos con la curva estándar del kit de ELISA, el hecho de que las mismas muestras dieron un resultado positivo usando otro kit (para detectar TNF- α de ratón, lo cual descarta por ejemplo inhibidores internos) y que los kits de ELISA de TNF- α e IL-1 β de rata dieron positivos al utilizar otras muestras. Asimismo, si hubiera expresión a nivel de ARNm de las citoquinas endógenas, esto no cambiaría nuestras conclusiones en cuanto a participación de estas citoquinas en la muerte neuronal, ni en cuanto a la existencia de una red alterada de citoquinas en el cerebro.

5.6.3. Candidatos a mediar los efectos de TNF- α : NOS y COX-2

Otras moléculas involucradas en la neuroinflamación, cuya actividad y expresión es inducida por TNF- α , son la óxido nítrico sintasa (NOS) y la ciclooxigenasa-2 (COX-2) (Hunot et al., 1996, Romero et al., 1996, Teismann et al., 2003b, Lianxu et al., 2006, Ke et al., 2007). Como ya se mencionó, NOS es la enzima responsable de la síntesis de NO, y existen tres isoenzimas, dos constitutivas (eNOS y nNOS) y una inducible (iNOS). Por su lado, COX cataliza la síntesis de prostaglandinas, y existen esencialmente una isoforma constitutiva (COX-1) y una inducible (COX-2). Los

productos de ambas enzimas podrían tener efectos nocivos sobre las neuronas, lo que las sugiere como posibles mediadores del efecto neurodegenerativo de TNF- α . Además, se vio un aumento en la expresión de iNOS y COX-2 en la *substantia nigra* de pacientes con enfermedad de Parkinson y en modelos animales de ratones tratados con MPTP (Hunot et al., 1996, Liberatore et al., 1999, Teismann et al., 2003a). Y la inhibición farmacológica de NOS y COX-2, así como su ablación genética (ratones *knock-out* para iNOS, nNOS y COX-2), redujo la neurotoxicidad dopaminérgica inducida por MPTP (Przedborski et al., 1996, Liberatore et al., 1999, Feng et al., 2002, Teismann et al., 2003a, Wang et al., 2005, Vijitruth et al., 2006).

Para estudiar si la sobre-expresión de TNF- α inducía actividad de NOS, hicimos un análisis histológico de la actividad NADPH diaforasa en la *substantia nigra* (Dawson et al., 1991, Hope et al., 1991). Se detectaron células NADPH diaforasa positivas en la *substantia nigra* ipsilateral a la inyección de AdTNF α , pero no se observó ninguna célula positiva en el hemisferio contralateral ni en los animales controles. Este resultado sugiere que el NO podría estar participando en la toxicidad inducida por TNF- α . Está ampliamente descrito que el NO puede producir daño celular por estrés oxidativo. Por ejemplo, puede combinarse con anión superóxido (O_2^-) para producir peroxinitrito (ONOO $^-$), que es un fuerte agente oxidante y nitrosilante. El peroxinitrito puede oxidar lípidos y proteínas, y producir daño al ADN; y además, es capaz de producir la nitración de proteínas, formando por ejemplo residuos de nitrotirosina, que se consideran un marcador del estrés oxidativo por NO (Przedborski et al., 1996). Si bien el aumento de NOS está generalmente descrito en células inmunes o gliales, como ocurre en los pacientes con enfermedad de Parkinson (Hunot et al., 1996), la morfología de las células NADPH diaforasa positivas observadas en el presente trabajo corresponde principalmente a neuronas. En consecuencia, nuestros resultados sugieren que TNF- α estaría actuando directamente sobre las neuronas para inducir en ellas la producción de NOS, la cual es responsable de la síntesis de NO, que puede producir daño oxidativo en las neuronas.

Por otro lado, estudiamos si TNF- α indujo la expresión de COX-2 mediante un análisis de Western blot. Observamos un aumento significativo en los niveles de COX-2 a los 7 pero no a los 14 días p.i. en los animales inoculados con AdTNF α , con respecto a los controles inyectados con Ad β gal. Esto sugiere que COX-2 sería un mediador temprano de la muerte neuronal inducida por TNF- α . Un mecanismo por el que esta enzima podría contribuir al daño celular es la síntesis de prostaglandinas, que podrían amplificar la respuesta inflamatoria y la producción de mediadores deletéreos como especies reactivas de oxígeno. Sin embargo, también se han descrito mecanismos

de acción independientes de prostaglandinas, que cobran especial importancia en las neuronas dopaminérgicas. COX-2 cataliza la conversión de prostaglandina G₂ a prostaglandina H₂. Durante esta reacción, la dopamina puede ser oxidada a dopamina-quinona, que es altamente reactiva con el ADN y los residuos cisteína de las proteínas, pudiendo colaborar al daño celular (Teismann et al., 2003b, Hoang et al., 2009). Debido a que estudiamos la expresión de COX-2 por medio de un Western blot, no fue posible identificar el tipo celular que la producía. En pacientes con mal de Parkinson y en modelos animales de la enfermedad, está descrito un aumento de COX-2 en células neuronales (Teismann et al., 2003b), donde puede producir daño por oxidación de la dopamina y/o inducir la síntesis de prostaglandinas. Sin embargo, también es posible que los macrófagos infiltrantes y/o las células gliales produzcan esta enzima, con la consiguiente liberación de prostaglandinas y amplificación de la cascada inflamatoria. Por otro lado, en cuanto al curso temporal de expresión de COX-2, el hecho de que esté sobre-expresado a los 7 pero no a los 14 días p.i. de AdTNF α , a pesar de que TNF- α se sigue expresando, sugiere un efecto de regulación negativa de la señalización por TNF- α . Alternativamente, aunque la diferencia en los niveles de TNF- α recombinante detectada por ELISA a los 7 y 14 días p.i. no es grande, es posible que se requiera un cierto nivel de expresión de la citoquina para inducir COX-2, y que a los 7 días p.i. (o antes) se alcance ese umbral, mientras que a los 14 días los niveles de TNF- α estén por debajo de ese límite.

Por lo tanto, podemos decir que los resultados obtenidos, apoyados por datos de la literatura, sugieren a NOS y COX-2 como candidatos a mediar los efectos neurodegenerativos de TNF- α en las neuronas de la *substantia nigra*. Por supuesto, harán falta estudios funcionales para verificar la relevancia funcional de estas dos enzimas, y sus productos, como mediadores moleculares de la toxicidad inducida por TNF- α .

5.6.4. Estudio de *microarrays*

El estudio de *microarrays* se llevó a cabo con el objetivo de realizar un *screening* global en búsqueda de genes regulados por TNF- α y que pudieran estar involucrados en el efecto neurodegenerativo que ejerce esta citoquina sobre las neuronas de la *substantia nigra*. Una de las grandes ventajas de este tipo de estudios es que, además de permitir el análisis simultáneo de miles de genes, posibilitan el estudio de genes nóveles, cuya función no se conoce o no ha sido previamente relacionada con TNF- α ,

neuroinflamación o neurodegeneración. En la presente tesis doctoral se llevó a cabo un estudio preliminar utilizando la técnica de *microarrays*, ya que no se hizo una validación técnica a gran escala (lo que permitiría confirmar la expresión diferencial de una cantidad importante de genes y validar los resultados obtenidos por *microarrays*) ni se llevó a cabo una validación funcional. Sin embargo, sí se validó la expresión diferencial (en los animales tratados con AdTNF α con respecto a los controles) de dos genes: la proteína quinasa C tipo delta (nPKC-delta) y el regulador de la señalización por proteína G 3 (RGS3). Por lo tanto, estos resultados abren las puertas a trabajos futuros, que puedan estudiar si estas moléculas cumplen un rol como mediadores del efecto de la citoquina (validación funcional). Además, se han desarrollado las bases para validar técnica y funcionalmente una gran cantidad de interesantes candidatos a participar en el efecto degenerativo de TNF- α , generados en el estudio de *microarrays*, como se discutirá más adelante en esta sección.

En cuanto al experimento de *microarrays* en sí mismo, se detectaron genes diferencialmente expresados entre los animales tratados con AdTNF α y con Ad β gal que ya habían sido descritos en la literatura como modulados por esta citoquina; además el análisis de GO mostró que uno de los procesos biológicos significativamente representados entre los genes diferenciales era la respuesta inmune. Estas dos evidencias, que se discutirán en profundidad a continuación, validan los resultados obtenidos en el experimento de *microarrays* y la estrategia experimental adoptada (toma de muestra, uso de ARN de referencia, etc.).

5.6.4.1. Análisis de genes relacionados previamente con TNF- α

Como se mencionó en la sección de resultados (sección 4.8.4.2), pudieron identificarse utilizando la tecnología de *microarrays* 461 genes que se encuentran diferencialmente expresados ($p < 0.05$) en los animales tratados con AdTNF α con respecto a los controles. De los 25 genes con menor valor de p , hay 22 genes con función conocida. Existen evidencias previas en la literatura de que la expresión de 6 de estos genes es regulada por TNF- α . Tres de los genes que se vieron inducidos (CXCL13, GFRP y TLR2) y uno de los que se detectaron reprimidos (PMCA1) por la citoquina utilizando la técnica de *microarrays* han sido reportados previamente como inducidos o reprimidos por TNF- α , respectivamente. Los otros dos genes previamente relacionados con TNF- α (RGS16 y nPKC-delta) han sido detectados en nuestro modelo con una expresión en sentido opuesto al reportado anteriormente.

Entre los genes que se detectaron sobre-expresados en los animales tratados con AdTNF α con respecto a los controles y se halla evidencia previa de su relación funcional con TNF- α , se encuentra la quemoquina CXCL13. Existen evidencias de que TNF- α es capaz de producir un aumento en la expresión de esta quemoquina al ser incubado *in vitro* con células dendríticas murinas provenientes de sangre periférica o de médula ósea (Ishikawa et al., 2002). Esta citoquina también indujo la expresión de CXCL13 en fibroblastos embrionarios murinos en cultivo (Piao et al., 2007). Asimismo, los niveles de ARN de la quemoquina estaban reducidos en el bazo de ratones *knock-out* para TNF- α (Ngo et al., 1999, Mandik-Nayak et al., 2001). Y la administración sistémica de un agonista del TNFR1 en ratones *knock-out* para TNF- α , y también en ratones silvestres, indujo un aumento en la producción de CXCL13 en el bazo (Mandik-Nayak et al., 2001).

Otro de los genes que se detectó aumentado en los animales que sobre-expresan TNF- α utilizando la técnica de *microarrays* es la proteína reguladora de la GTP-ciclohidrolasa I (GFRP). La GTP-ciclohidrolasa I (GTPCH) es la primera enzima, y la limitante, en la biosíntesis de tetrahidrobiopterina (BH4), un co-factor esencial para la NOS y la hidroxilasa de aminoácidos aromáticos (AAAH, *aromatic amino acid hydroxylase*). Esta enzima está sujeta a un mecanismo de inhibición por producto final, mediado por la GFRP (Milstien et al., 1996). Sin embargo, si bien en presencia de BH4 la proteína GFRP es capaz de inhibir la actividad enzimática de GTPCH, GFRP media la activación de GTPCH en presencia de fenilalanina (uno de los sustratos de la AAAH) (Blau et al., 2003, Schmidt and Alp, 2007). Existen evidencias de que TNF- α es capaz de inducir la expresión de GFRP y GTPCH en cardiomiocitos en cultivo (Ionova et al., 2008). Por otro lado, se ha reportado que TNF- α , en presencia de IFN γ , induce la expresión de GTPCH en células endoteliales de vena de cordón umbilical (Katusic et al., 1998, Huang et al., 2005). Estos resultados se condicen con nuestras observaciones de que la sobre-expresión de TNF- α en la *substantia nigra* produce un aumento en la actividad de NOS (ver sección 4.7.4).

El tercer gen que se vio inducido por TNF- α tanto en el experimento de *microarrays* como en la literatura es el receptor tipo toll 2 (TLR2). Los receptores tipo toll (TLR) son receptores de reconocimiento de patrones (PRR, *pattern recognition receptor*). Estos receptores reconocen los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, *pathogen-associated molecular patterns*), pero tienen también ligandos endógenos denominados "patrones moleculares asociados a peligro" (DAMPs, *danger-associated molecular patterns*). Estos receptores están asociados a la modulación de una gran cantidad de genes, relacionados con la respuesta inmune innata. Se ha reportado que

la incubación de cultivos primarios de microglía murina con TNF- α tiene como consecuencia un aumento en la expresión de TLR2. Además, al incubar estas células con *Staphylococcus aureus*, se observó un aumento de TLR2, lo cual no ocurrió en microglía proveniente de ratones *knock-out* para TNF- α (Syed et al., 2007). En forma análoga, *Staphylococcus aureus* produjo un aumento en los niveles de TLR2 en astrocitos en cultivo de la cepa silvestre, pero no en los *knock-out* para TNF- α (Phulwani et al., 2008). Asimismo, al tratar adipocitos en cultivo con TNF- α se observó un aumento en TLR2 (Lin et al., 2000). Por su lado, al incubar la línea celular de monocitos humanos THP-1 con TNF- α , se observó también una mayor expresión de TLR2; luego de someter a las células a un estrés mecánico (por centrifugación) el aumento de TLR2 fue mayor en las células previamente tratadas con la citoquina, y no se observó en las células pre-tratadas con un anticuerpo anti-TNF- α (Kim et al., 2008). Por otro lado, en el experimento de *microarrays* se detectó una menor expresión de la ATPasa 1 transportadora de calcio de membrana plasmática (PMCA1) en los animales que sobre-expresan TNF- α con respecto a los controles, resultado que es apoyado por datos de la literatura. Las PMCA son bombas de calcio de la membrana plasmática que son responsables de expulsar el calcio del citosol de todas las células eucariotas (Strehler and Zacharias, 2001). Se ha reportado que TNF- α , en presencia de IFN γ e IL-1 β , es capaz de disminuir la expresión de PMCA 1/2 y 3 *in vitro* (Souza et al., 2004). Por otro lado, nuestros resultados muestran una menor expresión del regulador de la señalización por proteína G 16 (RGS16) y la proteína quinasa C tipo delta (nPKC-delta) en los animales que sobre-expresan TNF- α , mientras que en trabajos previos se ha observado una inducción de estos genes por TNF- α . En cuanto a RGS16, es un acelerador de la actividad GTPasa de la subunidad α de la proteína G (G α), llevando a la reasociación de las subunidades G α y G $\beta\gamma$, y a una disminución en la señalización por receptores acoplados a proteína G (Neubig and Siderovski, 2002). Se ha reportado que TNF- α es capaz de inducir un aumento en la expresión de RGS16 *in vitro* (Fong et al., 2000). A su vez, nPKC-delta (novel PKC-delta), es una isoforma de PKC (serina/treonina quinasas) cuya activación es dependiente de fosfolípidos (fosfatidilserina) y diacilglicerol (DAG) e independiente de calcio (Perego et al., 2002). Está descrito que el tratamiento de queratinocitos en cultivo con TNF- α produjo un aumento en la expresión de nPKC-delta (Suh et al., 2003). Sin embargo, también hay evidencias de que NO inhibe la expresión de nPKC-delta en macrófagos peritoneales (Jun et al., 1994), lo cual concuerda con nuestro modelo, donde observamos un aumento en la actividad de NOS, lo que podría explicar la disminución en la expresión de nPKC-delta. La discrepancia entre la inhibición de estos genes (en nuestro estudio)

o su inducción (en los estudios anteriormente mencionados) por parte del TNF- α puede deberse a varios motivos. Las citoquinas, y en particular el TNF- α , han mostrado efectos paradójales de acuerdo al contexto molecular, la célula en estudio, la duración y la intensidad del estímulo (Rothwell and Hopkins, 1995, Stoll et al., 2000, McCoy and Tansey, 2008). Ninguno de los trabajos anteriormente mencionados ha estudiado la expresión de RGS16 o nPKC-delta luego de la expresión sostenida de niveles pro-inflamatorios de TNF- α en la *substantia nigra*. Es pues interesante esta discrepancia entre nuestros resultados y la literatura previa, e incita al estudio del posible nuevo rol funcional de estas moléculas en el efecto neurodegenerativo de TNF- α . De cualquier modo, estos trabajos muestran que la expresión de dichos genes puede ser regulada por TNF- α , y por eso los incluimos como resultados que se relacionan con los nuestros.

El hecho de que en la literatura haya evidencias de que TNF- α es capaz de regular la expresión de 6 de los 22 genes diferentes con función conocida con menor valor de *p* aumenta la validez de los resultados del *screening* por *microarrays*. De hecho, éste es un número sorprendentemente alto, teniendo en cuenta que nuestros estudios están hechos en cerebro, que puede diferir en varios aspectos de los tejidos periféricos, y que la expresión de TNF- α en nuestro modelo es crónica, mientras que la mayoría de los trabajos evalúa los efectos agudos de la citoquina.

5.6.4.2. Análisis de categorías funcionales detectadas por GO

Por su lado, el análisis de GO mostró una asociación significativa de genes relacionados con la **respuesta inmune**, lo que era esperable al sobre-expresar una citoquina pro-inflamatoria como TNF- α , que genera un estado de neuroinflamación, como se mostró a lo largo de esta tesis. Estos genes podrían estar mediando los efectos de TNF- α ampliando o participando de la cascada inflamatoria. Una molécula interesante que puede agruparse dentro de la respuesta inflamatoria (ya que está ligada a la actividad de NOS) es la proteína reguladora de la actividad de la GTP-ciclohidrolasa I (GFRP). La regulación positiva de la GTP-ciclohidrolasa I (GTPCH) tendría como consecuencia un aumento en la actividad de NOS, con el consecuente aumento de NO, que como ya se discutió anteriormente (sección 5.5.3), podría mediar los efectos neurodegenerativos de TNF- α . Y de hecho en el presente trabajo detectamos un aumento en la actividad de NOS en los animales tratados con AdTNF α , haciendo un análisis histológico de la actividad NADPH diaforasa, también 14 días p.i. de los adenovectores (sección 4.7.4). Como ya se mencionó, el BH4 sintetizado por la

GTPCH no es sólo el co-factor de la NOS, sino también de la hidroxilasa de aminoácidos aromáticos. La hidroxilasa de fenilalanina cataliza la conversión de este aminoácido en tirosina, precursor en la síntesis de distintos neurotransmisores, entre ellos la dopamina. Por lo tanto, un aumento en la actividad de la GTPCH tendría como consecuencia un aumento en la actividad de la hidroxilasa de fenilalanina y en la síntesis de dopamina, lo cual podría constituir un mecanismo compensatorio frente a la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra*.

Otro proceso biológico significativamente representado está relacionado con el metabolismo de moléculas pequeñas, dentro del cual se encuentra representado el metabolismo energético (la uridiltransferasa de galactosa-1-fosfato transforma galactosa en glucosa y la piruvato quinasa participa en la glicólisis), el cual se ha visto modulado en procesos inflamatorios, y en particular por TNF- α , ya que la respuesta inflamatoria requiere gran cantidad de energía (Peters, 2006). Por lo tanto, el análisis de GO evidenció procesos biológicos que dan validez a los resultados obtenidos con la técnica de *microarrays*.

Otro proceso identificado por el análisis de GO está relacionado con el metabolismo de ADN: la proteína nuclear autoantigénica de esperma (NASP) es una proteína de unión a histonas, cuya forma somática se expresa en todas las células en mitosis, el factor 1 de unión de extremos no homólogos (NHEJ) repara daños al ADN, y el complejo FACT subunidad SSRP1 está relacionado con la transcripción. Esta categoría era inesperada *a priori*, y permite generar la hipótesis de que este proceso podría estar relacionado con los efectos de TNF- α en el cerebro.

Además de los procesos biológicos identificados por el análisis de GO, al analizar los 25 genes diferenciales con menor valor de *p* identificados por *microarrays*, es posible identificar moléculas de señalización y factores de transcripción, que podrían estar mediando la acción de la citoquina regulando la expresión de otros genes. Entre estas proteínas involucradas en procesos de señalización se encuentran algunas relacionadas con transducción de señales (nPKC-delta y RGS3, que ya fueron validadas técnicamente y se discutirán en más detalle en la siguiente sección, a las que se suma RGS16) y otras que son factores de transcripción (ZC3H y GLIS2). A su vez, otro grupo identificable de genes pertenecen a transportadores y canales de membrana, entre los que se encuentran el canal de potasio activado por calcio subunidad beta 4, el transportador de monocarboxilato 4 (MCT4) (que es el responsable de expulsar de la célula el ácido láctico producido durante la glicólisis), el miembro 7 de la familia 4 de transportadores de solutos (que es un cotransportador de bicarbonato de sodio) y la ATPasa 1 transportadora de calcio de membrana plasmática (PMCA1, que es una proteína transportadora que remueve calcio de la célula).

Otro gen que se encuentra dentro de los 25 genes diferenciales con menor valor de p es la proteína de muerte relacionada con Bcl-2 de ovario (BOK), que es un miembro pro-apoptótico de la familia de Bcl-2 que se expresa en diferentes tejidos, entre otros el cerebro. Podría hipotetizarse que la inhibición de la expresión de esta proteína podría contribuir a que la muerte neuronal no sea principalmente por la vía apoptótica en nuestro modelo. A su vez, la alteración de la expresión de una proteína del sistema de degradación por proteosoma, la proteasa específica de ubiquitina 24 (USP 24) (que es una enzima que remueve la ubiquitina de las proteínas), podría contribuir también a la toxicidad celular.

Finalmente, 3 de los 25 genes identificados por *microarrays* con menor valor de p son de función desconocida: el gen con dominio “coiled-coil” 68, el gen con dominio “coiled-coil” 136 y el LOC499719 hipotético. El estudio de estos genes en nuestro modelo podría contribuir a dilucidar su función.

5.6.4.3. Genes candidatos a mediar los efectos de TNF- α validados por RT-PCR en tiempo real

En cuanto a posibles mediadores del efecto neurodegenerativo de TNF- α en la *substantia nigra*, el experimento de *microarrays* permite identificar moléculas candidatas, pero estos resultados deben ser validados técnica y funcionalmente. Si bien la validación técnica a gran escala queda fuera de los alcances de esta tesis, pudimos validar por RT-PCR en tiempo real la expresión diferencial de nPKC-delta y RGS3, encontrando una menor expresión de ambas moléculas en los animales que sobre-expresan TNF- α con respecto a los controles. Estas dos moléculas cumplen funciones claves en cascadas de traducción de señales que pueden modular la expresión de diversos genes, por lo que puede hipotetizarse que podrían jugar un rol central en mediar los efectos de TNF- α .

En relación a nPKC-delta, es una quinasa en serina y treonina, que participa en la regulación de diversos procesos biológicos, y es capaz de modular diferentes factores de transcripción (Steinberg, 2004). Por ejemplo, se le ha asignado a esta enzima un rol pro-apoptótico, por lo que puede hipotetizarse que la disminución de su expresión en nuestro modelo podría asociarse a que el tipo de muerte neuronal inducido por TNF- α no sea principalmente apoptótico. Por otro lado, hay evidencias de que nPKC-delta es capaz de fosforilar al TNFRI, regulando negativamente la señalización por TNF- α (Kilpatrick et al., 2000), por lo que una menor expresión de nPKC-delta es concordante con aumentar la señalización por TNFRI. En cuanto a RGS3, se trata de un acelerador

de la actividad GTPasa de la subunidad $G\alpha$ de la proteína G, y por lo tanto modula la señalización de los receptores acoplados a proteína G. La activación de estos receptores lleva a la liberación de GDP y unión de GTP a la subunidad $G\alpha$, lo cual tiene como consecuencia la disociación de las subunidades $G\alpha$ y $G\beta\gamma$, que son capaces de modular la actividad de diversos efectores, entre los que se encuentran la adenilato ciclasa y la fosfolipasa C. Las proteínas RGS aumentan la tasa de hidrólisis de GTP de la subunidad $G\alpha$, lo que lleva a la reasociación de las subunidades $G\alpha$ y $G\beta\gamma$, y a una regulación negativa de la señalización por receptores acoplados a proteína G (Neubig and Siderovski, 2002). De este modo, RGS3 podría mediar los efectos de TNF- α por medio de diversos mecanismos vinculados a proteína G. Por lo tanto, nPKC-delta y RGS3 se suman a COX-2 y NOS (ver sección 5.5.3) como candidatos a participar en los efectos de TNF- α en la *substantia nigra*, resultados que deberán ser validados funcionalmente. Cabe destacar que en el caso de los dos primeros genes se deberá también refrendar el resultado a nivel proteico.

Los resultados obtenidos con la técnica de *microarrays* también abren las puertas para validar técnica y funcionalmente muchas otras moléculas interesantes, que podrían estar mediando el efecto de TNF- α , como se discutió en las secciones anteriores. Es importante recalcar la importancia de validar funcionalmente los genes identificados para poder testear las variadas hipótesis que esta estrategia ha originado. Independientemente de cuál sea el resultado de los experimentos funcionales, la identificación de genes candidatos es un paso fundamental y necesario para la atribución de un rol funcional a los mismos en este modelo. Por ejemplo, si el gen validado funcionalmente prueba ser tóxico será un blanco de inhibición de futuras y posibles estrategias terapéuticas contra la enfermedad de Parkinson con componente inflamatorio. En el caso contrario, si la molécula prueba ser funcionalmente protectora, será su inducción o sobre-expresión la estrategia a seguir para tratar de obtener un beneficio terapéutico.

5.7. Conclusiones finales

Si bien se ha descrito una causa genética en un pequeño porcentaje de los casos, la etiología de la enfermedad de Parkinson es desconocida en la mayoría de los pacientes. La visión más aceptada propone que la etiología de la enfermedad es multifactorial, con predisposiciones genéticas y factores ambientales jugando un rol en

la iniciación y progresión de la enfermedad (Sawada et al., 2006, Tansey et al., 2007). Nuestros resultados apoyan a la neuroinflamación, y en particular la expresión crónica de TNF- α , como un factor de gran importancia en la patogénesis del mal de Parkinson. Existen reportes en modelos animales que muestran la expresión temprana de TNF- α en el estriado de animales a los que se les administró MPTP (Sriram et al., 2002, Ferger et al., 2004, Sriram et al., 2006), sugiriendo un posible rol de esta citoquina en las etapas temprana de la enfermedad. También es probable que TNF- α juegue un papel en la progresión de la misma, por ejemplo exacerbando la patología, como se ha demostrado en el laboratorio que ocurre con IL-1 β en un modelo de ratas inyectadas con 6-OHDA (Godoy et al., 2008).

Sin embargo, como se describió en la introducción, se ha descrito un rol dual de TNF- α en distintas enfermedades neurodegenerativas. Y de hecho existe una experiencia negativa en el campo de la esclerosis múltiple con estrategias terapéuticas que usaron como blanco a TNF- α . Por lo tanto, en base al conocimiento actual de la biología de esta citoquina en el SNC, no sería recomendable una terapia anti-TNF- α para la enfermedad de Parkinson. Muchas variables, que aún no están claramente definidas, podrían estar influyendo en el efecto final de TNF- α en la viabilidad neuronal (neurodegenerativo o neuroprotector), como el contexto celular (qué células están presentes o activadas) y molecular (por ejemplo, la presencia de otros estímulos), el estadio de progresión de la enfermedad y el tipo de estímulo de TNF- α (como el nivel y la duración de la expresión, como sugieren nuestros resultados). En consecuencia, creemos que es fundamental definir los mecanismos moleculares por los cuales esta citoquina pro-inflamatoria ejerce sus efectos sobre la viabilidad neuronal. En este sentido, en el presente trabajo se ha generado un modelo donde TNF- α ejerce un efecto unívocamente tóxico sobre las neuronas de la *substantia nigra*. Este modelo puede ser utilizado para estudiar los mediadores moleculares del efecto neurodegenerativo de TNF- α . La identificación de estos mediadores moleculares podría permitir en un futuro diseñar terapias contra la enfermedad de Parkinson, ya que se podrían usar como blancos terapéuticos moléculas con una acción claramente neurodegenerativa.

Es notable que la expresión de una sola citoquina pueda inducir muerte neuronal, como ocurre en el presente trabajo. Datos obtenidos en el laboratorio muestran que la expresión crónica de IL-1 β en la *substantia nigra* también tiene un efecto neurodegenerativo sobre las neuronas dopaminérgicas de esta región del cerebro (Ferrari et al., 2006). Dado que TNF- α e IL-1 β no se inducen mutuamente en el cerebro, es posible que moléculas inducidas por ambas citoquinas sean mediadores de

la pérdida neuronal. Sería interesante estudiar si otras citoquinas pro-inflamatorias producen efectos similares en la viabilidad neuronal, e identificar las moléculas que son inducidas por todos estos estímulos inflamatorios y que median sus efectos tóxicos sobre las neuronas. Estas moléculas comunes deberían servir como blancos terapéuticos confiables contra la muerte celular mediada por inflamación en la *substantia nigra*.

Creemos que nuestro modelo hace un aporte significativo en el desarrollo del conocimiento de la patogénesis de la enfermedad de Parkinson, apoyando la visión de que la neuroinflamación, y en particular la sobre-expresión crónica de TNF- α , juegan un rol importante en el desarrollo de la enfermedad. Asimismo, en cuanto al papel específico de TNF- α , pudimos determinar que la sobre-expresión de esta citoquina en la *substantia nigra*, en niveles patofisiológicos pero en forma crónica, es capaz de inducir una neurodegeneración progresiva, corroborando la hipótesis de trabajo. Esta muerte neuronal está acompañada por la aparición de síntomas motores y activación de microglía/macrófagos. Nuestros resultados sugieren que la concentración y la duración de la expresión de esta citoquina son variables importantes para que ejerza un efecto tóxico. De este modo, generamos un modelo donde TNF- α tiene un efecto unívocamente neurodegenerativo, e identificamos moléculas candidatas a participar en los efectos de esta citoquina: NOS, COX-2, nPKC-delta y RGS3. Nuestros resultados también aportan una evidencia adicional de que en determinadas circunstancias *in vivo* la capacidad de TNF- α de inducir apoptosis no sería el principal mecanismo por el que esta citoquina ejerce su efecto citotóxico. Además, nuestros resultados sugieren que en cerebro existe una red de citoquinas particular, que difiere de la descrita en la periferia, donde TNF- α no es capaz de inducir su propia síntesis ni la de IL-1 β , lo que lleva a un infiltrado inflamatorio compuesto casi exclusivamente por macrófagos.

Por lo tanto, podemos concluir que TNF- α fue capaz de inducir activación de la microglía hasta su máximo estadio de activación y/o un infiltrado inflamatorio de macrófagos, así como también astrogliosis. Todos estos tipos celulares, y también las neuronas, son capaces de producir mediadores tóxicos, que podrían participar en la muerte neuronal. Y de hecho observamos que TNF- α produce un aumento en los niveles de NOS y COX-2, pero no de TNF- α e IL-1 β endógenos. Alternativamente, TNF- α podría actuar directamente sobre las neuronas de la *substantia nigra* induciendo la muerte por apoptosis, pero no pudimos obtener evidencias de que este fuera el mecanismo predominante de muerte neuronal en nuestro modelo. Asimismo, los niveles de nPKC-delta y RGS3 son menores en los animales que sobre-expresan

TNF- α que en los controles, por lo que estas moléculas podrían participar en la modulación de los efectos de la citoquina (Figura 5-1).

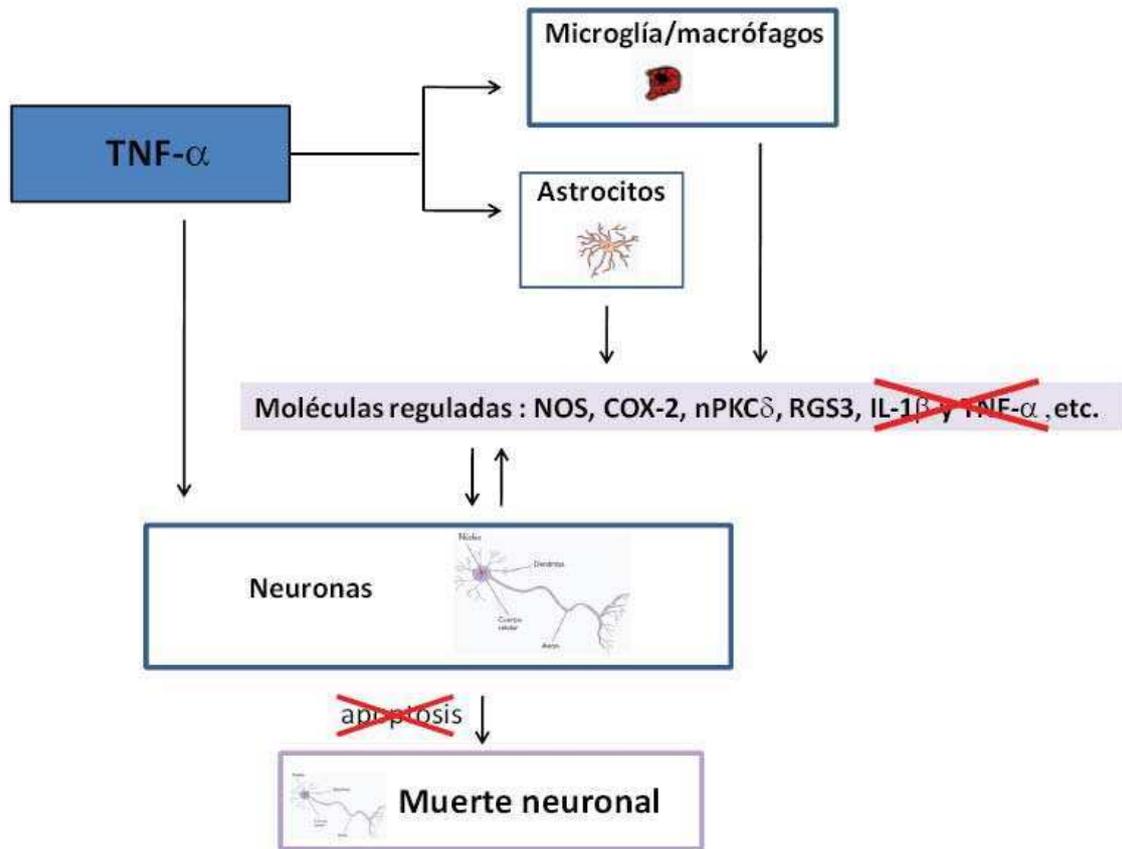


Figura 5-1. Efectos de la sobre-expresión de TNF- α en la substantia nigra.

Esperamos que este modelo de muerte neuronal gatillada por la sobre-expresión crónica de TNF- α en la *substantia nigra* sea útil para dilucidar los mecanismos moleculares por los cuales esta citoquina ejerce su efecto neurodegenerativo confirmando funcionalmente el rol de las moléculas candidatas identificadas. Además, el *screening* de genes diferencialmente expresados en los animales que sobre-expresan TNF- α , utilizando la técnica de *microarrays*, abre las puertas a investigaciones futuras, que validen técnica y funcionalmente diferentes moléculas como mediadoras del efecto neurodegenerativo de TNF- α . De este modo, el modelo establecido en la presente tesis doctoral no sólo permitió ampliar el conocimiento sobre los efectos de esta citoquina pro-inflamatoria en el cerebro, sino que también

generó herramientas para futuros estudios que esperamos ayuden a encontrar blancos terapéuticos contra la enfermedad de Parkinson relacionados con TNF- α .

Lic. Ana Laura De Lella Ezcurra

Dr. Fernando J. Pitossi
Director de tesis

BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abdulwahid Arif I, Ahmad Khan H (2010) Environmental toxins and Parkinson's disease: putative roles of impaired electron transport chain and oxidative stress. *Toxicol Ind Health* 26:121-128.
- Agnati LF, Fuxe KG, Goncharova LB, Tarakanov AO (2008) Receptor mosaics of neural and immune communication: possible implications for basal ganglia functions. *Brain Res Rev* 58:400-414.
- Akassoglou K, Bauer J, Kassiotis G, Pasparakis M, Lassmann H, Kollias G, Probert L (1998) Oligodendrocyte apoptosis and primary demyelination induced by local TNF/p55TNF receptor signaling in the central nervous system of transgenic mice: models for multiple sclerosis with primary oligodendrogliopathy. *Am J Pathol* 153:801-813.
- Akli S, Caillaud C, Vigne E, Stratford-Perricaudet LD, Poenaru L, Perricaudet M, Kahn A, Peschanski MR (1993) Transfer of a foreign gene into the brain using adenovirus vectors. *Nat Genet* 3:224-228.
- Ali M, Lemoine NR, Ring CJ (1994) The use of DNA viruses as vectors for gene therapy. *Gene Ther* 1:367-384.
- Amor S, Puentes F, Baker D, van der Valk P (2010) Inflammation in neurodegenerative diseases. *Immunology* 129:154-169.
- Anglade P, Vyas S, Javoy-Agid F, Herrero MT, Michel PP, Marquez J, Mouatt-Prigent A, Ruberg M, Hirsch EC, Agid Y (1997) Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease. *Histol Histopathol* 12:25-31.
- Anthony DC, Bolton SJ, Fearn S, Perry SW (1997a) age-related effects of interleukin-1b on polymorphonuclear neutrophil-dependent increases in BBB permeability in rats. 101-110.
- Anthony DC, Bolton SJ, Fearn S, Perry VH (1997b) Age-related effects of interleukin-1 beta on polymorphonuclear neutrophil-dependent increases in blood-brain barrier permeability in rats. *Brain* 120 (Pt 3):435-444.
- Arnett HA, Mason J, Marino M, Suzuki K, Matsushima GK, Ting JP (2001) TNF alpha promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination. *Nat Neurosci* 4:1116-1122.
- Banati RB, Daniel SE, Blunt SB (1998) Glial pathology but absence of apoptotic nigral neurons in long-standing Parkinson's disease. *Mov Disord* 13:221-227.
- Bancroft JD, Gamble M (2002) *Theory and Practice of Histological Techniques*. Churchill Livingstone, London 373-375.
- Barger SW, Horster D, Furukawa K, Goodman Y, Kriegstein J, Mattson MP (1995) Tumor necrosis factors alpha and beta protect neurons against amyloid beta-peptide toxicity: evidence for involvement of a kappa B-binding factor and attenuation of peroxide and Ca²⁺ accumulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:9328-9332.
- Blau N, Bonafe L, Krageloh-Mann I, Thony B, Kierat L, Hausler M, Ramaekers V (2003) Cerebrospinal fluid pterins and folates in Aicardi-Goutieres syndrome: a new phenotype. *Neurology* 61:642-647.
- Blond D, Campbell SJ, Butchart AG, Perry VH, Anthony DC (2002) Differential induction of interleukin-1beta and tumour necrosis factor-alpha may account for specific patterns of leukocyte recruitment in the brain. *Brain Res* 958:89-99.
- Blum-Degen D, Muller T, Kuhn W, Gerlach M, Przuntek H, Riederer P (1995) Interleukin-1 beta and interleukin-6 are elevated in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's and de novo Parkinson's disease patients. *Neurosci Lett* 202:17-20.

- Boka G, Anglade P, Wallach D, Javoy-Agid F, Agid Y, Hirsch EC (1994) Immunocytochemical analysis of tumor necrosis factor and its receptors in Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 172:151-154.
- Bove J, Prou D, Perier C, Przedborski S (2005) Toxin-induced models of Parkinson's disease. *NeuroRx* 2:484-494.
- Braak H, Bohl JR, Muller CM, Rub U, de Vos RA, Del Tredici K (2006) Stanley Fahn Lecture 2005: The staging procedure for the inclusion body pathology associated with sporadic Parkinson's disease reconsidered. *Mov Disord* 21:2042-2051.
- Braak H, Del Tredici K, Rub U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E (2003) Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 24:197-211.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Brown TP, Rumsby PC, Capleton AC, Rushton L, Levy LS (2006) Pesticides and Parkinson's disease--is there a link? *Environ Health Perspect* 114:156-164.
- Carson MJ, Dose JM, Melchior B, Schmid CD, Ploix CC (2006) CNS immune privilege: hiding in plain sight. *Immunol Rev* 213:48-65.
- Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B (1975) An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72:3666-3670.
- Castano A, Herrera AJ, Cano J, Machado A (1998) Lipopolysaccharide intranigral injection induces inflammatory reaction and damage in nigrostriatal dopaminergic system. *J Neurochem* 70:1584-1592.
- Castano A, Herrera AJ, Cano J, Machado A (2002) The degenerative effect of a single intranigral injection of LPS on the dopaminergic system is prevented by dexamethasone, and not mimicked by rh-TNF-alpha, IL-1beta and IFN-gamma. *J Neurochem* 81:150-157.
- Cicchetti F, Brownell AL, Williams K, Chen YI, Livni E, Isacson O (2002) Neuroinflammation of the nigrostriatal pathway during progressive 6-OHDA dopamine degeneration in rats monitored by immunohistochemistry and PET imaging. *Eur J Neurosci* 15:991-998.
- Clarke DJ, Branton RL (2002) A role for tumor necrosis factor alpha in death of dopaminergic neurons following neural transplantation. *Exp Neurol* 176:154-162.
- Combs CK, Karlo JC, Kao SC, Landreth GE (2001) beta-Amyloid stimulation of microglia and monocytes results in TNFalpha-dependent expression of inducible nitric oxide synthase and neuronal apoptosis. *J Neurosci* 21:1179-1188.
- Chen CM, Chen IC, Chang KH, Chen YC, Lyu RK, Liu YT, Hu FJ, Chao CY, Lee-Chen GJ, Wu YR (2007) Nuclear receptor NR4A2 IVS6 +18insG and brain derived neurotrophic factor (BDNF) V66M polymorphisms and risk of Taiwanese Parkinson's disease. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 144B:458-462.
- Chen G, Goeddel DV (2002) TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* 296:1634-1635.
- Chen H, Jacobs E, Schwarzschild MA, McCullough ML, Calle EE, Thun MJ, Ascherio A (2005) Nonsteroidal antiinflammatory drug use and the risk for Parkinson's disease. *Ann Neurol* 58:963-967.

- Dale RC, Church AJ, Surtees RA, Lees AJ, Adcock JE, Harding B, Neville BG, Giovannoni G (2004) Encephalitis lethargica syndrome: 20 new cases and evidence of basal ganglia autoimmunity. *Brain* 127:21-33.
- Damier P, Hirsch EC, Zhang P, Agid Y, Javoy-Agid F (1993) Glutathione peroxidase, glial cells and Parkinson's disease. *Neuroscience* 52:1-6.
- Dauer W, Przedborski S (2003) Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 39:889-909.
- Dawson TM, Brecht DS, Fotuhi M, Hwang PM, Snyder SH (1991) Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:7797-7801.
- Dawson TM, Ko HS, Dawson VL (2010) Genetic animal models of Parkinson's disease. *Neuron* 66:646-661.
- de Lau LM, Breteler MM (2006) Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 5:525-535.
- Depino A, Ferrari C, Pott Godoy MC, Tarelli R, Pitossi FJ (2005) Differential effects of interleukin-1beta on neurotoxicity, cytokine induction and glial reaction in specific brain regions. *J Neuroimmunol* 168:96-110.
- Depino AM, Earl C, Kaczmarczyk E, Ferrari C, Besedovsky H, del Rey A, Pitossi FJ, Oertel WH (2003) Microglial activation with atypical proinflammatory cytokine expression in a rat model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci* 18:2731-2742.
- Dick FD (2006) Parkinson's disease and pesticide exposures. *Br Med Bull* 79-80:219-231.
- Dickson DW, Fujishiro H, Orr C, DelleDonne A, Josephs KA, Frigerio R, Burnett M, Parisi JE, Klos KJ, Ahlskog JE (2009) Neuropathology of non-motor features of Parkinson disease. *Parkinsonism Relat Disord* 15 Suppl 3:S1-5.
- Dopp JM, Mackenzie-Graham A, Otero GC, Merrill JE (1997) Differential expression, cytokine modulation, and specific functions of type-1 and type-2 tumor necrosis factor receptors in rat glia. *J Neuroimmunol* 75:104-112.
- Dvorkin MA, Cardinali, D.P. (2003) Best & Taylor: bases fisiológicas de la práctica médica Editorial médica Panamericana Buenos Aires, Argentina.
- Elmore S (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35:495-516.
- Fahn S (2003) Description of Parkinson's disease as a clinical syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 991:1-14.
- Feng ZH, Wang TG, Li DD, Fung P, Wilson BC, Liu B, Ali SF, Langenbach R, Hong JS (2002) Cyclooxygenase-2-deficient mice are resistant to 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine-induced damage of dopaminergic neurons in the substantia nigra. *Neurosci Lett* 329:354-358.
- Ferger B, Leng A, Mura A, Hengerer B, Feldon J (2004) Genetic ablation of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and pharmacological inhibition of TNF-synthesis attenuates MPTP toxicity in mouse striatum. *J Neurochem* 89:822-833.
- Ferrari CC, Depino AM, Prada F, Muraro N, Campbell S, Podhajcer O, Perry VH, Anthony DC, Pitossi FJ (2004) Reversible demyelination, blood-brain barrier breakdown, and pronounced neutrophil recruitment induced by chronic IL-1 expression in the brain. *Am J Pathol* 165:1827-1837.
- Ferrari CC, Pott Godoy MC, Tarelli R, Chertoff M, Depino AM, Pitossi FJ (2006) Progressive neurodegeneration and motor disabilities induced by chronic expression of IL-1beta in the substantia nigra. *Neurobiol Dis* 24:183-193.

- Floden AM, Li S, Combs CK (2005) Beta-amyloid-stimulated microglia induce neuron death via synergistic stimulation of tumor necrosis factor alpha and NMDA receptors. *J Neurosci* 25:2566-2575.
- Fong CW, Zhang Y, Neo SY, Lin SC (2000) Specific induction of RGS16 (regulator of G-protein signalling 16) mRNA by protein kinase C in CEM leukaemia cells is mediated via tumour necrosis factor alpha in a calcium-sensitive manner. *Biochem J* 352 Pt 3:747-753.
- Forstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, Kleinert H (1994) Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension* 23:1121-1131.
- Fuxe KG, Tarakanov AO, Goncharova LB, Agnati LF (2008) A new road to neuroinflammation in Parkinson's disease? *Brain Res Rev* 58:453-458.
- Galiveti CR, Rozhdestvensky TS, Brosius J, Lehrach H, Konthur Z (2010) Application of housekeeping npcRNAs for quantitative expression analysis of human transcriptome by real-time PCR. *RNA* 16:450-461.
- Gao HM, Hong JS, Zhang W, Liu B (2002a) Distinct role for microglia in rotenone-induced degeneration of dopaminergic neurons. *J Neurosci* 22:782-790.
- Gao HM, Jiang J, Wilson B, Zhang W, Hong JS, Liu B (2002b) Microglial activation-mediated delayed and progressive degeneration of rat nigral dopaminergic neurons: relevance to Parkinson's disease. *J Neurochem* 81:1285-1297.
- Gayle DA, Ling Z, Tong C, Landers T, Lipton JW, Carvey PM (2002) Lipopolysaccharide (LPS)-induced dopamine cell loss in culture: roles of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta, and nitric oxide. *Brain Res Dev Brain Res* 133:27-35.
- Glass CK, Saijo K, Winner B, Marchetto MC, Gage FH (2010) Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell* 140:918-934.
- Godoy MC, Tarelli R, Ferrari CC, Sarchi MI, Pitossi FJ (2008) Central and systemic IL-1 exacerbates neurodegeneration and motor symptoms in a model of Parkinson's disease. *Brain* 131:1880-1894.
- Gonzalez-Hernandez T, Barroso-Chinea P, Acevedo A, Salido E, Rodriguez M (2001) Colocalization of tyrosine hydroxylase and GAD65 mRNA in mesostriatal neurons. *Eur J Neurosci* 13:57-67.
- Gordon MN, Schreier WA, Ou X, Holcomb LA, Morgan DG (1997) Exaggerated astrocyte reactivity after nigrostriatal deafferentation in the aged rat. *J Comp Neurol* 388:106-119.
- Groves RW, Allen MH, Ross EL, Barker JN, MacDonald DM (1995) Tumour necrosis factor alpha is pro-inflammatory in normal human skin and modulates cutaneous adhesion molecule expression. *Br J Dermatol* 132:345-352.
- Hagan JJ, Middlemiss DN, Sharpe PC, Poste GH (1997) Parkinson's disease: prospects for improved drug therapy. *Trends Pharmacol Sci* 18:156-163.
- Halliday GM, McCann H (2010) The progression of pathology in Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 1184:188-195.
- Hamani C, Lozano AM (2003) Physiology and pathophysiology of Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 991:15-21.
- Hancock DB, Martin ER, Stajich JM, Jewett R, Stacy MA, Scott BL, Vance JM, Scott WK (2007) Smoking, caffeine, and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in families with Parkinson disease. *Arch Neurol* 64:576-580.
- Harris MA, Clark J, Ireland A, Lomax J, Ashburner M, Foulger R, Eilbeck K, Lewis S, Marshall B, Mungall C, Richter J, Rubin GM, Blake JA, Bult C, Dolan M, Drabkin H, Eppig JT, Hill DP, Ni L, Ringwald M, Balakrishnan R, Cherry JM,

- Christie KR, Costanzo MC, Dwight SS, Engel S, Fisk DG, Hirschman JE, Hong EL, Nash RS, Sethuraman A, Theesfeld CL, Botstein D, Dolinski K, Feierbach B, Berardini T, Mundodi S, Rhee SY, Apweiler R, Barrell D, Camon E, Dimmer E, Lee V, Chisholm R, Gaudet P, Kibbe W, Kishore R, Schwarz EM, Sternberg P, Gwinn M, Hannick L, Wortman J, Berriman M, Wood V, de la Cruz N, Tonellato P, Jaiswal P, Seigfried T, White R (2004) The Gene Ontology (GO) database and informatics resource. *Nucleic Acids Res* 32:D258-261.
- He Y, Lee T, Leong SK (2000) 6-Hydroxydopamine induced apoptosis of dopaminergic cells in the rat substantia nigra. *Brain Res* 858:163-166.
- Hein AM, O'Banion MK (2009) Neuroinflammation and memory: the role of prostaglandins. *Mol Neurobiol* 40:15-32.
- Hernan MA, Logroscino G, Garcia Rodriguez LA (2006) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the incidence of Parkinson disease. *Neurology* 66:1097-1099.
- Herrera AJ, Castano A, Venero JL, Cano J, Machado A (2000) The single intranigral injection of LPS as a new model for studying the selective effects of inflammatory reactions on dopaminergic system. *Neurobiol Dis* 7:429-447.
- Hirsch EC, Hunot S (2009) Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *Lancet Neurol* 8:382-397.
- Hirt B (1967) Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. *J Mol Biol* 26:365-369.
- Hoang T, Choi DK, Nagai M, Wu DC, Nagata T, Prou D, Wilson GL, Vila M, Jackson-Lewis V, Dawson VL, Dawson TM, Chesselet MF, Przedborski S (2009) Neuronal NOS and cyclooxygenase-2 contribute to DNA damage in a mouse model of Parkinson disease. *Free Radic Biol Med* 47:1049-1056.
- Holtz WA, Turetzky JM, O'Malley KL (2005) Microarray expression profiling identifies early signaling transcripts associated with 6-OHDA-induced dopaminergic cell death. *Antioxid Redox Signal* 7:639-648.
- Hope BT, Michael GJ, Knigge KM, Vincent SR (1991) Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:2811-2814.
- Huang A, Zhang YY, Chen K, Hatakeyama K, Keaney JF, Jr. (2005) Cytokine-stimulated GTP cyclohydrolase I expression in endothelial cells requires coordinated activation of nuclear factor-kappaB and Stat1/Stat3. *Circ Res* 96:164-171.
- Hunot S, Boissiere F, Faucheux B, Brugg B, Mouatt-Prigent A, Agid Y, Hirsch EC (1996) Nitric oxide synthase and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Neuroscience* 72:355-363.
- Hunot S, Dugas N, Faucheux B, Hartmann A, Tardieu M, Debre P, Agid Y, Dugas B, Hirsch EC (1999) FcepsilonR2/CD23 is expressed in Parkinson's disease and induces, in vitro, production of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha in glial cells. *J Neurosci* 19:3440-3447.
- Hunter RL, Dragicevic N, Seifert K, Choi DY, Liu M, Kim HC, Cass WA, Sullivan PG, Bing G (2007) Inflammation induces mitochondrial dysfunction and dopaminergic neurodegeneration in the nigrostriatal system. *J Neurochem* 100:1375-1386.
- Imamura K, Hishikawa N, Sawada M, Nagatsu T, Yoshida M, Hashizume Y (2003) Distribution of major histocompatibility complex class II-positive microglia and cytokine profile of Parkinson's disease brains. *Acta Neuropathol* 106:518-526.
- Ionova IA, Vasquez-Vivar J, Whitsett J, Herrnreiter A, Medhora M, Cooley BC, Pieper GM (2008) Deficient BH4 production via de novo and salvage pathways

- regulates NO responses to cytokines in adult cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295:H2178-2187.
- Iravani MM, Kashefi K, Mander P, Rose S, Jenner P (2002) Involvement of inducible nitric oxide synthase in inflammation-induced dopaminergic neurodegeneration. *Neuroscience* 110:49-58.
- Irrcher I, Park DS (2009) Parkinson's disease: to live or die by autophagy. *Sci Signal* 2:pe21.
- Ishikawa S, Nagai S, Sato T, Akadegawa K, Yoneyama H, Zhang YY, Onai N, Matsushima K (2002) Increased circulating CD11b+CD11c+ dendritic cells (DC) in aged BWF1 mice which can be matured by TNF-alpha into BLC/CXCL13-producing DC. *Eur J Immunol* 32:1881-1887.
- Jankovic J (2008) Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 79:368-376.
- Jellinger KA (2000) Cell death mechanisms in Parkinson's disease. *J Neural Transm* 107:1-29.
- Jun CD, Choi BM, Lee SY, Kang SS, Kim HM, Chung HT (1994) Nitric oxide inhibits the expression of protein kinase C delta gene in the murine peritoneal macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 204:105-111.
- Kassiotis G, Kollias G (2001) Uncoupling the proinflammatory from the immunosuppressive properties of tumor necrosis factor (TNF) at the p55 TNF receptor level: implications for pathogenesis and therapy of autoimmune demyelination. *J Exp Med* 193:427-434.
- Katusic ZS, Stelter A, Milstien S (1998) Cytokines stimulate GTP cyclohydrolase I gene expression in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:27-32.
- Kaufmann WE, Worley PF, Pegg J, Bremer M, Isakson P (1996) COX-2, a synaptically induced enzyme, is expressed by excitatory neurons at postsynaptic sites in rat cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:2317-2321.
- Ke J, Long X, Liu Y, Zhang YF, Li J, Fang W, Meng QG (2007) Role of NF-kappaB in TNF-alpha-induced COX-2 expression in synovial fibroblasts from human TMJ. *J Dent Res* 86:363-367.
- Kilpatrick LE, Song YH, Rossi MW, Korchak HM (2000) Serine phosphorylation of p60 tumor necrosis factor receptor by PKC-delta in TNF-alpha-activated neutrophils. *Am J Physiol Cell Physiol* 279:C2011-2018.
- Kim HG, Kim JY, Gim MG, Lee JM, Chung DK (2008) Mechanical stress induces tumor necrosis factor- α production through Ca²⁺ release-dependent TLR2 signaling. *Am J Physiol Cell Physiol* 295:C432-439.
- Kim WG, Mohny RP, Wilson B, Jeohn GH, Liu B, Hong JS (2000) Regional difference in susceptibility to lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in the rat brain: role of microglia. *J Neurosci* 20:6309-6316.
- Kim YS, Joh TH (2006) Microglia, major player in the brain inflammation: their roles in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Exp Mol Med* 38:333-347.
- Klejbor I, Domaradzka-Pytel B, Ludkiewicz B, Wojcik S, Morys J (2004) The relationships between neurons containing dopamine and nitric oxide synthase in the ventral tegmental area. *Folia Histochem Cytobiol* 42:83-87.
- Knapen D, Vergauwen L, Laukens K, Blust R (2009) Best practices for hybridization design in two-colour microarray analysis. *Trends Biotechnol* 27:406-414.
- Kohutnicka M, Lewandowska E, Kurkowska-Jastrzebska I, Czlonkowski A, Czlonkowska A (1998) Microglial and astrocytic involvement in a murine model

- of Parkinson's disease induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Immunopharmacology* 39:167-180.
- Kosel S, Egensperger R, von Eitzen U, Mehraein P, Graeber MB (1997) On the question of apoptosis in the parkinsonian substantia nigra. *Acta Neuropathol* 93:105-108.
- Kremer EJ, Perricaudet M (1995) Adenovirus and adeno-associated virus mediated gene transfer. *Br Med Bull* 51:31-44.
- Kreutzberg GW (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19:312-318.
- Kruger R, Hardt C, Tschentscher F, Jackel S, Kuhn W, Muller T, Werner J, Woitalla D, Berg D, Kuhl N, Fuchs GA, Santos EJ, Przuntek H, Epplen JT, Schols L, Riess O (2000) Genetic analysis of immunomodulating factors in sporadic Parkinson's disease. *J Neural Transm* 107:553-562.
- Kwon J, Chung IY, Benveniste EN (1993) Cloning and sequence analysis of the rat tumor necrosis factor-encoding genes. *Gene* 132:227-236.
- Langston JW, Forno LS, Tetrad J, Reeves AG, Kaplan JA, Karluk D (1999) Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure. *Ann Neurol* 46:598-605.
- Lawson LJ, Perry VH, Dri P, Gordon S (1990) Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 39:151-170.
- Le Gal La Salle G, Robert JJ, Berrard S, Ridoux V, Stratford-Perricaudet LD, Perricaudet M, Mallet J (1993) An adenovirus vector for gene transfer into neurons and glia in the brain. *Science* 259:988-990.
- Leker RR, Shohami E, Abramsky O, Ovadia H (1999) Dexanabinol; a novel neuroprotective drug in experimental focal cerebral ischemia. *J Neurol Sci* 162:114-119.
- Leng A, Mura A, Feldon J, Ferger B (2005) Tumor necrosis factor-alpha receptor ablation in a chronic MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 375:107-111.
- Lianxu C, Hongti J, Changlong Y (2006) NF-kappaBp65-specific siRNA inhibits expression of genes of COX-2, NOS-2 and MMP-9 in rat IL-1beta-induced and TNF-alpha-induced chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 14:367-376.
- Liberatore GT, Jackson-Lewis V, Vukosavic S, Mandir AS, Vila M, McAuliffe WG, Dawson VL, Dawson TM, Przedborski S (1999) Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease. *Nat Med* 5:1403-1409.
- Lin Y, Lee H, Berg AH, Lisanti MP, Shapiro L, Scherer PE (2000) The lipopolysaccharide-activated toll-like receptor (TLR)-4 induces synthesis of the closely related receptor TLR-2 in adipocytes. *J Biol Chem* 275:24255-24263.
- Ling Z, Gayle DA, Ma SY, Lipton JW, Tong CW, Hong JS, Carvey PM (2002) In utero bacterial endotoxin exposure causes loss of tyrosine hydroxylase neurons in the postnatal rat midbrain. *Mov Disord* 17:116-124.
- Ling ZD, Chang Q, Lipton JW, Tong CW, Landers TM, Carvey PM (2004) Combined toxicity of prenatal bacterial endotoxin exposure and postnatal 6-hydroxydopamine in the adult rat midbrain. *Neuroscience* 124:619-628.
- Longo DL (2008) Harrison's principles of internal medicine. The McGraw-Hill Companies, United States of America chapter e11.
- Lowenstein PR, Mandel RJ, Xiong WD, Kroeger K, Castro MG (2007) Immune responses to adenovirus and adeno-associated vectors used for gene therapy of

- brain diseases: the role of immunological synapses in understanding the cell biology of neuroimmune interactions. *Curr Gene Ther* 7:347-360.
- Luger TA, Schwarz T (1990) Evidence for an epidermal cytokine network. *J Invest Dermatol* 95:100S-104S.
- Mak TW, Saunders ME (2006) *The immune response. Basic and clinical principles.* Elsevier London, UK.
- Mandel S, Grunblatt E, Youdim M (2000) cDNA microarray to study gene expression of dopaminergic neurodegeneration and neuroprotection in MPTP and 6-hydroxydopamine models: implications for idiopathic Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl* 117-124.
- Mandik-Nayak L, Huang G, Sheehan KC, Erikson J, Chaplin DD (2001) Signaling through TNF receptor p55 in TNF-alpha-deficient mice alters the CXCL13/CCL19/CCL21 ratio in the spleen and induces maturation and migration of anergic B cells into the B cell follicle. *J Immunol* 167:1920-1928.
- Marchetti B, Abbracchio MP (2005) To be or not to be (inflamed)--is that the question in anti-inflammatory drug therapy of neurodegenerative disorders? *Trends Pharmacol Sci* 26:517-525.
- Marques F, Sousa JC, Coppola G, Geschwind DH, Sousa N, Palha JA, Correia-Neves M (2009) The choroid plexus response to a repeated peripheral inflammatory stimulus. *BMC Neurosci* 10:135.
- Marti MJ, Saura J, Burke RE, Jackson-Lewis V, Jimenez A, Bonastre M, Tolosa E (2002) Striatal 6-hydroxydopamine induces apoptosis of nigral neurons in the adult rat. *Brain Res* 958:185-191.
- McAlpine FE, Lee JK, Harms AS, Ruhn KA, Blurton-Jones M, Hong J, Das P, Golde TE, LaFerla FM, Oddo S, Blesch A, Tansey MG (2009) Inhibition of soluble TNF signaling in a mouse model of Alzheimer's disease prevents pre-plaque amyloid-associated neuropathology. *Neurobiol Dis* 34:163-177.
- McCoy MK, Martinez TN, Ruhn KA, Szymkowski DE, Smith CG, Botterman BR, Tansey KE, Tansey MG (2006) Blocking soluble tumor necrosis factor signaling with dominant-negative tumor necrosis factor inhibitor attenuates loss of dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease. *J Neurosci* 26:9365-9375.
- McCoy MK, Tansey MG (2008) TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain function and neurodegenerative disease. *J Neuroinflammation* 5:45.
- McGeer PL, Itagaki S, Boyes BE, McGeer EG (1988) Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology* 38:1285-1291.
- McGeer PL, McGeer EG (2008) Glial reactions in Parkinson's disease. *Mov Disord* 23:474-483.
- McGuire SO, Ling ZD, Lipton JW, Sortwell CE, Collier TJ, Carvey PM (2001) Tumor necrosis factor alpha is toxic to embryonic mesencephalic dopamine neurons. *Exp Neurol* 169:219-230.
- McMenamin MM, Wood MJ (2010) Progress and prospects: Immunobiology of gene therapy for neurodegenerative disease: prospects and risks. *Gene Ther* 17:448-458.
- Milstien S, Jaffe H, Kowlessur D, Bonner TI (1996) Purification and cloning of the GTP cyclohydrolase I feedback regulatory protein, GFRP. *J Biol Chem* 271:19743-19751.

- Mirza B, Hadberg H, Thomsen P, Moos T (2000) The absence of reactive astrogliosis is indicative of a unique inflammatory process in Parkinson's disease. *Neuroscience* 95:425-432.
- Mogi M, Harada M, Kondo T, Riederer P, Inagaki H, Minami M, Nagatsu T (1994a) Interleukin-1 beta, interleukin-6, epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha are elevated in the brain from parkinsonian patients. *Neurosci Lett* 180:147-150.
- Mogi M, Harada M, Kondo T, Riederer P, Nagatsu T (1996a) Interleukin-2 but not basic fibroblast growth factor is elevated in parkinsonian brain. Short communication. *J Neural Transm* 103:1077-1081.
- Mogi M, Harada M, Narabayashi H, Inagaki H, Minami M, Nagatsu T (1996b) Interleukin (IL)-1 beta, IL-2, IL-4, IL-6 and transforming growth factor-alpha levels are elevated in ventricular cerebrospinal fluid in juvenile parkinsonism and Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 211:13-16.
- Mogi M, Harada M, Riederer P, Narabayashi H, Fujita K, Nagatsu T (1994b) Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) increases both in the brain and in the cerebrospinal fluid from parkinsonian patients. *Neurosci Lett* 165:208-210.
- Mogi M, Togari A, Kondo T, Mizuno Y, Komure O, Kuno S, Ichinose H, Nagatsu T (2000) Caspase activities and tumor necrosis factor receptor R1 (p55) level are elevated in the substantia nigra from parkinsonian brain. *J Neural Transm* 107:335-341.
- Mogi M, Togari A, Tanaka K, Ogawa N, Ichinose H, Nagatsu T (1999) Increase in level of tumor necrosis factor (TNF)-alpha in 6-hydroxydopamine-lesioned striatum in rats without influence of systemic L-DOPA on the TNF-alpha induction. *Neurosci Lett* 268:101-104.
- Mortimer PP (2009) Was encephalitis lethargica a post-influenzal or some other phenomenon? Time to re-examine the problem. *Epidemiol Infect* 137:449-455.
- Na SJ, DiLella AG, Lis EV, Jones K, Levine DM, Stone DJ, Hess JF (2010) Molecular profiling of a 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Neurochem Res* 35:761-772.
- Nagatsu T, Mogi M, Ichinose H, Togari A (2000) Cytokines in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl* 143-151.
- Nagatsu T, Sawada M (2005) Inflammatory process in Parkinson's disease: role for cytokines. *Curr Pharm Des* 11:999-1016.
- Nagatsu T, Sawada M (2006) Cellular and molecular mechanisms of Parkinson's disease: neurotoxins, causative genes, and inflammatory cytokines. *Cell Mol Neurobiol* 26:781-802.
- Nair-Roberts RG, Chatelain-Badie SD, Benson E, White-Cooper H, Bolam JP, Ungless MA (2008) Stereological estimates of dopaminergic, GABAergic and glutamatergic neurons in the ventral tegmental area, substantia nigra and retrorubral field in the rat. *Neuroscience* 152:1024-1031.
- Neubig RR, Siderovski DP (2002) Regulators of G-protein signalling as new central nervous system drug targets. *Nat Rev Drug Discov* 1:187-197.
- Neumann H, Kotter MR, Franklin RJ (2009) Debris clearance by microglia: an essential link between degeneration and regeneration. *Brain* 132:288-295.
- Ngo VN, Korner H, Gunn MD, Schmidt KN, Riminton DS, Cooper MD, Browning JL, Sedgwick JD, Cyster JG (1999) Lymphotoxin alpha/beta and tumor necrosis factor are required for stromal cell expression of homing chemokines in B and T cell areas of the spleen. *J Exp Med* 189:403-412.

- Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F (2005) Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308:1314-1318.
- Nishimura M, Mizuta I, Mizuta E, Yamasaki S, Ohta M, Kaji R, Kuno S (2001) Tumor necrosis factor gene polymorphisms in patients with sporadic Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 311:1-4.
- Novikova L, Garris BL, Garris DR, Lau YS (2006) Early signs of neuronal apoptosis in the substantia nigra pars compacta of the progressive neurodegenerative mouse 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine/probenecid model of Parkinson's disease. *Neuroscience* 140:67-76.
- Ochu EE, Rothwell NJ, Waters CM (1998) Caspases mediate 6-hydroxydopamine-induced apoptosis but not necrosis in PC12 cells. *J Neurochem* 70:2637-2640.
- Ohmoto Y, Wood MJ, Charlton HM, Kajiwara K, Perry VH, Wood KJ (1999) Variation in the immune response to adenoviral vectors in the brain: influence of mouse strain, environmental conditions and priming. *Gene Ther* 6:471-481.
- Olanow CW, Tatton WG (1999) Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Annu Rev Neurosci* 22:123-144.
- Ouchi Y, Yagi S, Yokokura M, Sakamoto M (2009) Neuroinflammation in the living brain of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 15 Suppl 3:S200-204.
- Pahwa R, Lyons KE (2010) Early diagnosis of Parkinson's disease: recommendations from diagnostic clinical guidelines. *Am J Manag Care* 16 Suppl Implications:S94-99.
- Park KM, Bowers WJ (2010) Tumor necrosis factor-alpha mediated signaling in neuronal homeostasis and dysfunction. *Cell Signal* 22:977-983.
- Paxinos G, Watson C (1997) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, Orlando, FL.
- Pennica D, Nedwin GE, Hayflick JS, Seeburg PH, Derynck R, Palladino MA, Kohr WJ, Aggarwal BB, Goeddel DV (1984) Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* 312:724-729.
- Perego C, Porro D, La Porta CA (2002) Differential localisation of nPKC delta during cell cycle progression. *Biochem Biophys Res Commun* 294:127-131.
- Perry SW, Dewhurst S, Bellizzi MJ, Gelbard HA (2002) Tumor necrosis factor-alpha in normal and diseased brain: Conflicting effects via intraneuronal receptor crosstalk? *J Neurovirol* 8:611-624.
- Perry VH, Nicoll JA, Holmes C (2010) Microglia in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol* 6:193-201.
- Peters A (2006) The energy request of inflammation. *Endocrinology* 147:4550-4552.
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:e45.
- Phulwani NK, Esen N, Syed MM, Kielian T (2008) TLR2 expression in astrocytes is induced by TNF-alpha- and NF-kappa B-dependent pathways. *J Immunol* 181:3841-3849.
- Piao JH, Yoshida H, Yeh WC, Doi T, Xue X, Yagita H, Okumura K, Nakano H (2007) TNF receptor-associated factor 2-dependent canonical pathway is crucial for the development of Peyer's patches. *J Immunol* 178:2272-2277.
- Pitossi F, del Rey A, Kabiersch A, Besedovsky H (1997) Induction of cytokine transcripts in the central nervous system and pituitary following peripheral administration of endotoxin to mice. *J Neurosci Res* 48:287-298.
- Pott Godoy MC, Ferrari CC, Pitossi FJ (2010) Nigral neurodegeneration triggered by striatal AdIL-1 administration can be exacerbated by systemic IL-1 expression. *J Neuroimmunol* 222:29-39.

- Probert L, Akassoglou K, Pasparakis M, Kontogeorgos G, Kollias G (1995) Spontaneous inflammatory demyelinating disease in transgenic mice showing central nervous system-specific expression of tumor necrosis factor alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:11294-11298.
- Przedborski S, Jackson-Lewis V, Naini AB, Jakowec M, Petzinger G, Miller R, Akram M (2001) The parkinsonian toxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): a technical review of its utility and safety. *J Neurochem* 76:1265-1274.
- Przedborski S, Jackson-Lewis V, Yokoyama R, Shibata T, Dawson VL, Dawson TM (1996) Role of neuronal nitric oxide in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced dopaminergic neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:4565-4571.
- Quan N, Banks WA (2007) Brain-immune communication pathways. *Brain Behav Immun* 21:727-735.
- Quigney DJ, Gorman AM, Samali A (2003) Heat shock protects PC12 cells against MPP+ toxicity. *Brain Res* 993:133-139.
- Rajawat YS, Bossis I (2008) Autophagy in aging and in neurodegenerative disorders. *Hormones (Athens)* 7:46-61.
- Ritchie ME, Silver J, Oshlack A, Holmes M, Diyagama D, Holloway A, Smyth GK (2007) A comparison of background correction methods for two-colour microarrays. *Bioinformatics* 23:2700-2707.
- Romero LI, Tatro JB, Field JA, Reichlin S (1996) Roles of IL-1 and TNF-alpha in endotoxin-induced activation of nitric oxide synthase in cultured rat brain cells. *Am J Physiol* 270:R326-332.
- Rosenfeld S (2010) Do DNA microarrays tell the story of gene expression? *Gene Regul Syst Bio* 4:61-73.
- Rothwell NJ, Hopkins SJ (1995) Cytokines and the nervous system II: Actions and mechanisms of action. *Trends Neurosci* 18:130-136.
- Rousselet E, Callebert J, Parain K, Joubert C, Hunot S, Hartmann A, Jacque C, Perez-Diaz F, Cohen-Salmon C, Launay JM, Hirsch EC (2002) Role of TNF-alpha receptors in mice intoxicated with the parkinsonian toxin MPTP. *Exp Neurol* 177:183-192.
- Samii A, Etminan M, Wiens MO, Jafari S (2009) NSAID use and the risk of Parkinson's disease: systematic review and meta-analysis of observational studies. *Drugs Aging* 26:769-779.
- Samii A, Nutt JG, Ransom BR (2004) Parkinson's disease. *Lancet* 363:1783-1793.
- Sauer H, Oertel WH (1994) Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: a combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. *Neuroscience* 59:401-415.
- Sawada M, Imamura K, Nagatsu T (2006) Role of cytokines in inflammatory process in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl* 373-381.
- Schallert T, Jones TA (1993) "Exuberant" neuronal growth after brain damage in adult rats: the essential role of behavioral experience. *J Neural Transplant Plast* 4:193-198.
- Schapira AH (2009) Neurobiology and treatment of Parkinson's disease. *Trends Pharmacol Sci* 30:41-47.
- Schmidt TS, Alp NJ (2007) Mechanisms for the role of tetrahydrobiopterin in endothelial function and vascular disease. *Clin Sci (Lond)* 113:47-63.
- Selmaj K, Raine CS, Cross AH (1991) Anti-tumor necrosis factor therapy abrogates autoimmune demyelination. *Ann Neurol* 30:694-700.

- Selmaj KW, Raine CS (1995) Experimental autoimmune encephalomyelitis: immunotherapy with anti-tumor necrosis factor antibodies and soluble tumor necrosis factor receptors. *Neurology* 45:S44-49.
- Sherer TB, Betarbet R, Kim JH, Greenamyre JT (2003) Selective microglial activation in the rat rotenone model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 341:87-90.
- Shilling PD, Kelsoe JR (2002) Functional genomics approaches to understanding brain disorders. *Pharmacogenomics* 3:31-45.
- Shohami E, Ginis I, Hallenbeck JM (1999) Dual role of tumor necrosis factor alpha in brain injury. *Cytokine Growth Factor Rev* 10:119-130.
- Silver N, Best S, Jiang J, Thein SL (2006) Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC Mol Biol* 7:33.
- Smith DJ (2009) Mitochondrial dysfunction in mouse models of Parkinson's disease revealed by transcriptomics and proteomics. *J Bioenerg Biomembr* 41:487-491.
- Smyth GK (2004) Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* 3:Article3.
- Smyth GK, Speed T (2003) Normalization of cDNA microarray data. *Methods* 31:265-273.
- Sofroniew MV, Vinters HV (2010) Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119:7-35.
- Southgate TD, Stone D, Williams JC, Lowenstein PR, Castro MG (2001) Long-term transgene expression within the anterior pituitary gland in situ: impact on circulating hormone levels, cellular and antibody-mediated immune responses. *Endocrinology* 142:464-476.
- Souza KL, Elsner M, Mathias PC, Lenzen S, Tiedge M (2004) Cytokines activate genes of the endocytotic pathway in insulin-producing RINm5F cells. *Diabetologia* 47:1292-1302.
- Sperandio S, de Belle I, Bredesen DE (2000) An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:14376-14381.
- Sriram K, Matheson JM, Benkovic SA, Miller DB, Luster MI, O'Callaghan JP (2002) Mice deficient in TNF receptors are protected against dopaminergic neurotoxicity: implications for Parkinson's disease. *Faseb J* 16:1474-1476.
- Sriram K, Matheson JM, Benkovic SA, Miller DB, Luster MI, O'Callaghan JP (2006) Deficiency of TNF receptors suppresses microglial activation and alters the susceptibility of brain regions to MPTP-induced neurotoxicity: role of TNF-alpha. *Faseb J* 20:670-682.
- Steinberg SF (2004) Distinctive activation mechanisms and functions for protein kinase Cdelta. *Biochem J* 384:449-459.
- Sternberg EM (1997) Neural-immune interactions in health and disease. *J Clin Invest* 100:2641-2647.
- Stoll G, Jander S, Schroeter M (2000) Cytokines in CNS disorders: neurotoxicity versus neuroprotection. *J Neural Transm Suppl* 59:81-89.
- Strauss KI (2008) Antiinflammatory and neuroprotective actions of COX2 inhibitors in the injured brain. *Brain Behav Immun* 22:285-298.
- Strehler EE, Zacharias DA (2001) Role of alternative splicing in generating isoform diversity among plasma membrane calcium pumps. *Physiol Rev* 81:21-50.
- Sugama S, Yang L, Cho BP, DeGiorgio LA, Lorenzl S, Albers DS, Beal MF, Volpe BT, Joh TH (2003) Age-related microglial activation in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced dopaminergic neurodegeneration in C57BL/6 mice. *Brain Res* 964:288-294.

- Suh KS, Tatunchak TT, Crutchley JM, Edwards LE, Marin KG, Yuspa SH (2003) Genomic structure and promoter analysis of PKC-delta. *Genomics* 82:57-67.
- Syed MM, Phulwani NK, Kielian T (2007) Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) regulates Toll-like receptor 2 (TLR2) expression in microglia. *J Neurochem* 103:1461-1471.
- Tabakoff B, Saba L, Printz M, Flodman P, Hodgkinson C, Goldman D, Koob G, Richardson HN, Kechris K, Bell RL, Hubner N, Heinig M, Pravenec M, Mangion J, Legault L, Dongier M, Conigrave KM, Whitfield JB, Saunders J, Grant B, Hoffman PL (2009) Genetical genomic determinants of alcohol consumption in rats and humans. *BMC Biol* 7:70.
- Tansey MG, Frank-Cannon TC, McCoy MK, Lee JK, Martinez TN, McAlpine FE, Ruhn KA, Tran TA (2008) Neuroinflammation in Parkinson's disease: is there sufficient evidence for mechanism-based interventional therapy? *Front Biosci* 13:709-717.
- Tansey MG, Goldberg MS (2010) Neuroinflammation in Parkinson's disease: its role in neuronal death and implications for therapeutic intervention. *Neurobiol Dis* 37:510-518.
- Tansey MG, McCoy MK, Frank-Cannon TC (2007) Neuroinflammatory mechanisms in Parkinson's disease: potential environmental triggers, pathways, and targets for early therapeutic intervention. *Exp Neurol* 208:1-25.
- Tansey RJ, Wragg EA, Herrick AL (2010) Raynaud's phenomenon and hand function in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 37:1358-1359.
- Tartaglia LA, Rothe M, Hu YF, Goeddel DV (1993) Tumor necrosis factor's cytotoxic activity is signaled by the p55 TNF receptor. *Cell* 73:213-216.
- Tatton WG, Chalmers-Redman R, Brown D, Tatton N (2003) Apoptosis in Parkinson's disease: signals for neuronal degradation. *Ann Neurol* 53 Suppl 3:S61-70; discussion S70-62.
- Teismann P, Tieu K, Choi DK, Wu DC, Naini A, Hunot S, Vila M, Jackson-Lewis V, Przedborski S (2003a) Cyclooxygenase-2 is instrumental in Parkinson's disease neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:5473-5478.
- Teismann P, Vila M, Choi DK, Tieu K, Wu DC, Jackson-Lewis V, Przedborski S (2003b) COX-2 and neurodegeneration in Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 991:272-277.
- Thomas CE, Birkett D, Anozie I, Castro MG, Lowenstein PR (2001) Acute direct adenoviral vector cytotoxicity and chronic, but not acute, inflammatory responses correlate with decreased vector-mediated transgene expression in the brain. *Mol Ther* 3:36-46.
- Trotta PP (1991) Cytokines: an overview. *Am J Reprod Immunol* 25:137-141.
- Tsujimoto Y, Shimizu S (2005) Another way to die: autophagic programmed cell death. *Cell Death Differ* 12 Suppl 2:1528-1534.
- Tzeng SF, Hsiao HY, Mak OT (2005) Prostaglandins and cyclooxygenases in glial cells during brain inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 4:335-340.
- van Oosten BW, Barkhof F, Truyen L, Boringa JB, Bertelsmann FW, von Blomberg BM, Woody JN, Hartung HP, Polman CH (1996) Increased MRI activity and immune activation in two multiple sclerosis patients treated with the monoclonal anti-tumor necrosis factor antibody cA2. *Neurology* 47:1531-1534.
- Vijitruth R, Liu M, Choi DY, Nguyen XV, Hunter RL, Bing G (2006) Cyclooxygenase-2 mediates microglial activation and secondary dopaminergic cell death in the mouse MPTP model of Parkinson's disease. *J Neuroinflammation* 3:6.

- Vila M, Przedborski S (2004) Genetic clues to the pathogenesis of Parkinson's disease. *Nat Med* 10 Suppl:S58-62.
- Vitarbo EA, Chatzipanteli K, Kinoshita K, Truettner JS, Alonso OF, Dietrich WD (2004) Tumor necrosis factor alpha expression and protein levels after fluid percussion injury in rats: the effect of injury severity and brain temperature. *Neurosurgery* 55:416-424; discussion 424-415.
- Wahner AD, Sinsheimer JS, Bronstein JM, Ritz B (2007) Inflammatory cytokine gene polymorphisms and increased risk of Parkinson disease. *Arch Neurol* 64:836-840.
- Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P (2003) Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 10:45-65.
- Wang T, Pei Z, Zhang W, Liu B, Langenbach R, Lee C, Wilson B, Reece JM, Miller DS, Hong JS (2005) MPP⁺-induced COX-2 activation and subsequent dopaminergic neurodegeneration. *FASEB J* 19:1134-1136.
- Whitton PS (2007) Inflammation as a causative factor in the aetiology of Parkinson's disease. *Br J Pharmacol* 150:963-976.
- Wilms H, Zecca L, Rosenstiel P, Sievers J, Deuschl G, Lucius R (2007) Inflammation in Parkinson's diseases and other neurodegenerative diseases: cause and therapeutic implications. *Curr Pharm Des* 13:1925-1928.
- Wullner U, Kornhuber J, Weller M, Schulz JB, Loschmann PA, Riederer P, Klockgether T (1999) Cell death and apoptosis regulating proteins in Parkinson's disease--a cautionary note. *Acta Neuropathol* 97:408-412.
- Yang H, Chen C (2008) Cyclooxygenase-2 in synaptic signaling. *Curr Pharm Des* 14:1443-1451.
- Yang Q, She H, Gearing M, Colla E, Lee M, Shacka JJ, Mao Z (2009) Regulation of neuronal survival factor MEF2D by chaperone-mediated autophagy. *Science* 323:124-127.
- Yatskou M, Novikov E, Vetter G, Muller A, Barillot E, Vallar L, Friederich E (2008) Advanced spot quality analysis in two-colour microarray experiments. *BMC Res Notes* 1:80.