



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

**TERAPIA GÉNICA ANTIINFLAMATORIA EN EL ABORDAJE DE
LA NEURODEGENERACIÓN DOPAMINÉRGICA MOTORA**

Tesista: Lic. Eugenia Falomir Lockhart

Directora: Dra. María José Bellini

Directora: Dra. Claudia B. Hereñú

Año: 2020

RECONOCIMIENTO

Al Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP) de la Facultad de Ciencias Médicas (FCM), Universidad Nacional de La Plata (UNLP), por haberme brindado el espacio y los medios para la ejecución de esta Tesis.

Al Instituto de Anatomía de la Universidad de Rostock, Alemania, por haberme abierto las puertas y permitirme realizar dos estancias de investigación de gran importancia para el desarrollo de esta Tesis.

A las Instituciones que han financiado mi trabajo de investigación:

- Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)
- Universidad Nacional de La Plata (UNLP)
- Ministerio de Ciencia y Técnica (MinCyT)
- Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPyT)
- Organización Internacional de Investigación del Cerebro (IBRO)
- Fundación Boehringer Ingelheim

AGRADECIMIENTOS

Sin duda alguna, el desarrollo de la presente Tesis no ha sido un trabajo individual, ya que nada de esto podría haber sido posible sin el apoyo de la gente que me rodea. Es a ellos a quien quiero dedicarles este pequeño apartado.

A mis directoras, Claudia y Jole, por haber compartido conmigo todo su conocimiento y haberme acompañado en esta etapa tan importante de mi vida, tanto profesional como personalmente. Gracias por toda la confianza y el cariño que me dieron todos estos años, no podría haber pedido ser dirigida por otras personas.

A mis amigos del lab, los mejores. A Fran y Maca, los mejores hermanos laboratoriensos que podría haber pedido, que siempre con sólo un mensaje o una miradita, ya nos entendimos. A Ju, la media hermana del Altillo, y a Marti, Nane, Pri, Flor, Nati y Ara las hermanas de 3ro, que siempre están presentes para todo lo que cualquiera necesite, desde un mate o un abrazo hasta charlas delirantes y una cervecita. Arrancar los lunes siempre es más lindo con ustedes al lado. También a Andre, que a pesar de la distancia, siempre la siento cerca, como desde el primer día.

A Paula, Joaquín y Gustavo por toda la ayuda que me dieron cada vez que lo necesité. Gracias también por compartir su conocimiento conmigo.

A mis amigos del colegio, Mari, Lore, Agus, Flor, Juli, Eve, Maxi, Eli y Agus. A ustedes, los de siempre, mi cable a tierra. Gracias por rescatarme de vez en cuando del laboratorio y llevarme al mundo real.

Gracias por tantos momentos y tantas risas compartidas, por estas amistades en las que el paso del tiempo no cuenta y que seguimos sintiendo que estamos en los veinti-poquitos recién cumplidos. Gracias por todos los años compartidos y por todos los que vendrán.

A Leo. Aunque ya no estés, sé que estaría orgullosa de mí. Siempre creíste en mí y sé que me dirías “Te dije que ibas a poder, te dije que la ibas a romper”, como siempre me dijiste.

A Tincho, por el apoyo constante de estos últimos años. Por las risas, las cervezas, los asados y clases a distancia vía Whatsapp de WB.

A Björn, Tamara, Phani, Johannes, Jana y John. Conocerlos fue de lo mejor que me pasó durante el doctorado. Me fui a Alemania pensando sólo en hacer una estancia de investigación y me volví con todos ustedes en mi corazón. Gracias por todo el apoyo que me brindaron, por toda la ayuda, las risas y el glühwein.

A Eze, por acompañarme día a día. Por aguantarme y contenerme en cada pseudocrisis. Por hacerme reír cada día y seguirme en cada locura. Gracias por darme el amor que me das todos los días. Esta etapa no habría sido tan fácil si no lo hubiese vivido con vos. ♥

A mi enorme familia, por ser siempre incondicionales. Gracias por compartir y festejar conmigo cada logro y ayudarme a salir adelante después cada fracaso. En especial, quiero darles las gracias a mis viejos, por los valores y principios que me enseñaron, por estar siempre ahí y darme todo su apoyo día a día, por haberme dado la oportunidad de estudiar y perseguir mi sueño. Este trabajo se los dedico a ustedes, tratando de devolverles así un poquito de todo lo que hacen por mí.

A Euge, por tanta perseverancia, por nunca bajar los brazos y seguir siempre para adelante. Por todo el trabajo que hiciste. Por las horas en el microscopio. Por animarte a salir de tu zona de confort e irte sola a Alemania. Por estar siempre desafiándote. Por todo lo que creciste. Te lo merecés.

A todos, muchas gracias!

Euge

TRABAJOS CIENTÍFICOS EMERGENTES EN FORMA DIRECTA DE LOS RESULTADOS DE LA PRESENTE TESIS DOCTORAL

Publicaciones en revistas con referato:

Falomir-Lockhart Eugenia, Dolcetti FJC, Garcia-Segura LM, Herenu CB, Bellini MJ. (2019). IGF1 gene therapy modifies microglia in the striatum of senile rats. *Frontiers in Aging Neuroscience*, Mar 5;11:48

Falomir-Lockhart E, Hereñú CB, Bellini MJ. "Restauration of age related motor impairment: Role of IGF-1 based gene therapy and microglial activation."

http://www.frontiersin.org/10.3389/conf.fncel.2015.35.00010/event_abstract

Herrera Macarena L., **Falomir-Lockhart Eugenia**, Dolcetti Franco J.C., Arnal Nathalie, Bellini Maria José and Hereñu Claudia B. (2017). Implication of oxidative stress, aging and inflammatory processes in neurodegenerative diseases: growth factors as therapeutic approach. *Psychiatry and Neuroscience Update* 165-176.

Comunicaciones en reuniones científicas nacionales e internacionales:

Falomir-Lockhart E, Hereñú CB, Bellini MJ. "Restauration de la disminución motora asociada a la edad mediante la activación de la microglia por terapia génica para IGF-I [Restauration of age related motor impairment by microglia activation mediated by IGF-I gene therapy]". Poster session presented at: Jornadas de Medicina de la Universidad Nacional de La Plata; 2014 Oct 23-24; La Plata, BA, Argentina.

Falomir-Lockhart E, Hereñú CB, Bellini MJ. "Age-associated motor decline can be partially restored by microglia activation mediated by IGF-I gene therapy". Poster session presented at: LXI Annual Reunion of the Argentine Society for Clinical Investigation (SAIC); 2014 Nov 19-22; Mar del Plata, BA, Argentina.

Falomir-Lockhart E. "Restauration of age related motor impairment: Role of IGF-1 based gene therapy and microglial activation." Oral presentation at the "Latin-American School on glial cells in the diseased brain"; 2015 July 13-17, Bogotá, Colombia.

Falomir-Lockhart E, Hereñú CB, Bellini MJ. "Is microglia one of the mediators of IGF-1 effects on aged rats?". Poster session presented at the "Glia at the round table: Microglia, Oligodendroglia and Astroglia in a Fruitful Dialogue" Symposium and oral presentation at the XXX Annual Congress of SAN; 2015 Sept 27 - Oct 1; Mar del Plata, BA, Argentina.

Falomir-Lockhart E, Millan J; Anesetti-Nelli S, Hereñú CB, Bellini MJ. "Restauration of age related motor impairment: role of IGF-1 based gene therapy and microglial activation" Poster session presented at II International Congress of Medical University; 2015 Nov 12-14; La Plata, BA, Argentina.

Falomir-Lockhart E, Dolcetti Franco JC; Millán, J; Herenu, CB and Bellini, MJ. "Microglia and Astroglia: key clues for motor restauration?" Poster session presented at II FALAN Congress; 2016 Oct 17-20; Buenos Aires, BA, Argentina.

Soledad Anesetti-Nelli1, Gaspar Rodriguez, **Eugenia Falomir-Lockhart**, Franco JC Dolcetti, Fabián Nishida, Claudia Hereñu and María José Bellini. "Modulation on glial cells activation in Parkinson's

Disease model induced by LPS". Poster session presented at Annual Congress of SAN; 2017 Sept 23-27, Mar del Plata, BA, Argentina.

Falomir-Lockhart E, Dolcetti FJC; Herrera ML; Hereñu CB; Bellini MJ. Modulation of microglia by IGF1 and motor improvement in aged rats. Poster presentation at ISN-ASN. Aug 4-8th, 2019. Montreal, Canada.

TRABAJOS CIENTÍFICOS MEDIANTE COLABORACIONES EXPERIMENTALES A LO LARGO DE ESTE PERIODO DE TESIS DOCTORAL

Publicaciones en revistas con referato:

Andrea Soledad Pereyra, Mykhaylyk O, **Falomir-Lockhart E**, Taylor JR, Delbono O, Goya RG, Plank C and Herenu CB. Magnetofection enhances adenoviral vector-based gene delivery in skeletal muscle cells. *J Nanomed Nanotechnol.* 2016 Apr; 7(2): 364.

Herrera Macarena L, **Falomir-Lockhart E**, Dolcetti FJC, Bellini MJ, Hereñu CB. Deterioro cognitive asociado a la patología Parkinsoniana: El rol del hipocampo. (Cognitive impairment in Parkinson's Disease: The role of hippocampus). *Rev. Ciencia In Situ.* 2016, 1(2); 23-27.

Zappa Villar MF, López Hanotte J, **Falomir-Lockhart E**, Trípodi LS, Morel GR, Reggiani PC. (2018). Intracerebroventricular streptozotocin induces impaired Barnes maze spatial memory and reduces astrocyte branching in the CA1 and CA3 hippocampal regions. *J Neural Transm (Vienna).* Dec;125(12):1787-1803.

Herrera ML, Basmadjian OM, **Falomir-Lockhart E**, Dolcetti FJC, Herenu C, Bellini MJ. (2019) Novel adenoviral IGF-I administration modulates the association between depressive symptoms and aging: Does gender matter?. *Behav Brain Res.* Oct 17;372:112050

Herrera Macarena L, Basmadjian OM, **Falomir-Lockhart E**, Dolcetti FJC, Hereñu CB, Bellini MJ. (2020) Sex-frailty differences in aging mice: Neuropathologies and therapeutic projections. *European Journal Neuroscience*, <https://doi.org/10.1111/ejn.14703>.

Nishida F, Zanuzzi CN, Sisti MS, **Falomir-Lockhart E**, Camiña AE, Hereñu CB, Bellini MJ, Portiansky EL. Intracisternal delivery of IGF1 mediated by a recombinant adenovector is neuroprotective for the rat spinal cord excitotoxic damage induced by kainic acid (Under revision)

Comunicaciones en reuniones científicas nacionales e internacionales:

Herrera Macarena Lorena, **Falomir-Lockhart E**, Marchese N, Dolcetti FJC, García-Segura LM, Hereñu CB, Bellini MJ. Effect of IGF-I gene therapy in the inflammatory response of microglia in a traumatic brain injury model." Poster session presented at II FALAN Congress; 2016 Oct 17-20; Buenos Aires, BA, Argentina.

Herrera Macarena Lorena, **Falomir-Lockhart E**, Dolcetti, FJC Bellini MJ, Hereñú CB. "IGF1 gene therapy in an early model of Parkinson's Disease". Poster session presented at ISN-ESN Biennial Meeting, 2017 Aug 20-24, Paris, France.

Herrera ML, **Falomir-Lockhart E**, Dolcetti FJC, Basmadijan MO, Hereñu CB, Bellini MJ. "IGF1 gene therapy in aging mice: comparisons of frailty index between sexes". Poster presentation at 11th FENS Forum of Neuroscience. July 7-11, 2018. Berlin, Germany.

Herrera ML, **Falomir-Lockhart E**, Dolcetti FJC, Calfa GD, Molina VA, Bellini MJ, Hereñu CB. Initial approaches with IGF-1 gene therapy in an animal model of Parkinsonism associated to early cognitive impairments. Poster presentation at International Geneva/Springfield Symposium on Advances in Alzheimer Therapy (AAT) and AD/PD. May 15-18th, 2018. Torino, Italy.

INDICE

ABREVIATURAS	5
RESUMEN	7
SUMMARY	8
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	10
1.1 ENVEJECIMIENTO	10
1.1.1 Datos poblacionales.....	10
1.1.2 Concepto de envejecimiento.....	12
1.1.2 Envejecimiento a nivel cerebral.....	12
1.1.2.1 Cambios estructurales y neurofisiológicos asociados al envejecimiento.	13
1.1.2.2 Alteraciones motoras asociadas al envejecimiento.....	13
1.2 GANGLIOS BASALES Y CONTROL DE LA FUNCIÓN MOTORA	13
1.2.1 Control de la función motora: Regulación corticoestriatal.....	15
1.2.2 Control de la función motora: Regulación nigroestriatal	18
1.2.2 Control de la función motora: Interacción Dopamina - Acetilcolina.....	19
1.3 ENFERMEDAD DE PARKINSON	20
1.3.1 Cambios sinápticos específicos descritos en la enfermedad de Parkinson.....	21
1.3.2 Modelo Parkinsoniano inducido por LPS.....	22
1.4 NEUROINFLAMACIÓN	23
1.4.1 Microglia: conceptos y funciones generales	24
1.4.2 Activación de las células microgliales.....	26
1.4.3 Microglia y envejecimiento.....	28
1.5 TERAPIA GÉNICA	28
1.5.1 Aspectos generales.	28
1.5.2 Vectores Adenovirales	30
1.6 FACTORES TRÓFICOS	34
1.6.1 Factor de Crecimiento similar Insulina tipo 1 (IGF1)	34
1.6.1.1 Funciones fisiológicas del IGF1 en el Sistema Nervioso Central.....	36
1.6.1.2 Terapia génica con IGF1.....	37
CAPÍTULO II: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	40
2.1 HIPÓTESIS	40
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS	43
3.1 Animales	43
3.2 Reactivos	43

3.2.1 Para tratamientos in vivo.....	43
3.2.2 Para el procesamiento del tejido.....	43
3.2.3 Para inmunohistoquímica.....	43
3.2.4 Para la extracción de proteínas y Western Blot.....	44
3.2.4 Para la extracción de ARN, retrotranscripción (RT) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	44
3.3 Equipos.....	45
3.4 Anticuerpos.....	45
3.5 Cebadores para PCR cuantitativa.....	47
3.6 Cirugías Estereotáxicas.....	47
3.6.1 Cirugía Estereotáxica en el modelo de Rata hembra senil.....	47
3.6.2 Cirugía Estereotáxica en el modelo Parkinsoniano inducido por LPS intranigral.....	48
3.7 Diseño Experimental.....	48
3.7.1 Terapia génica con IGF1 en el modelo de rata senil.....	48
3.7.2 Terapia génica con IGF1 en el modelo de Enfermedad de Parkinson inducido por LPS.....	49
3.8 Test comportamentales.....	49
3.8.1 Test comportamentales utilizados en el modelo de rata senil.....	49
3.8.1.1 Desempeño sobre una rampa inclinada.....	49
3.8.1.2 Desempeño en una plataforma giratoria.....	50
3.8.1.3 Comportamiento Exploratorio.....	50
3.8.1.4 Test de enterramiento de canicas.....	50
3.8.2 Test comportamentales utilizados en el modelo de Parkinsoniano inducido por LPS.....	51
3.8.2.1 Comportamiento Exploratorio.....	51
3.8.2.2 Test de colocación de extremidades anteriores evocado por vibrisas.....	51
3.8.2.3. Test de la caminata con un pie.....	51
3.8.2.4 Test de la escalera horizontal.....	52
3.9 Disección de cerebros y procesamiento.....	52
3.10 Inmunohistoquímica.....	52
3.10.1 Marcaje con DAB.....	53
3.10.2 Inmunofluorescencia.....	53
3.11 Obtención y análisis de imágenes.....	53
3.11.1 Densidad celular.....	54
3.11.3 Clasificación morfológica de la microglia.....	56
3.11.4 Densidad de proteínas sinápticas dentro de la microglia.....	56
3.12 Análisis de proteínas por Western Blot.....	57
3.12.1 Preparación de las muestras.....	57
3.12.2 Electroforesis e Inmunotransferencia.....	57

3.12.2 Dot Blot por PathScan®	58
3.13 Análisis de ARN por qRT-PCR	58
3.13.1 Extracción de ARN	58
3.13.2 Retrotranscripción y reacción en cadena de la Polimerasa cuantitativa (qRT-PCR).....	59
3.13.3 Análisis del secuenciamiento de ARN.....	59
4.1.10 Análisis estadístico	60
CAPÍTULO IV: ESTUDIO DE LA MICROGLIA SENESCENTE Y SU RELACIÓN CON EL DESEMPEÑO MOTOR: EFECTO DE LA TERAPIA GÉNICA CON IGF1	
4.1 RESULTADOS.....	62
4.1.1 Efecto de la terapia génica con IGF1 sobre las células microgliales en ratas hembra seniles.	62
4.1.1.1 La terapia génica con IGF1 modifica el número de microglia selectivamente en el Núcleo Estriado.	62
4.1.1.2 La terapia génica con IGF1 aumenta la reactividad de la microglia en el Núcleo Estriado.	62
4.1.2 Efecto de la terapia génica con IGF1 sobre el fenotipo.	62
4.1.3 La terapia con IGF1 mejora el desempeño motor en ratas seniles	65
4.1.3.1 Evaluación de la locomoción de ratas seniles.	65
4.1.3.2 Evaluación del comportamiento innato de enterramiento defensivo.....	66
4.2.3.3 Evaluación de la fuerza motora.	66
4.1.4 Efecto de la terapia génica con IGF1 sobre el sistema dopaminérgico nigroestriatal	68
4.1.5 Estudio de la relación entre el desempeño motor de las ratas seniles con la reactividad y polarización de la microglia.	70
4.2 DISCUSIÓN	73
CAPÍTULO V: CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA MICROGLIA SENESCENTE Y DEL MICROAMBIENTE CIRCUNDANTE EN EL MODELO DE RATA HEMBRA SENIL: EFECTOS DE LA TERAPIA GÉNICA CON IGF1	
5.2 RESULTADOS.....	77
5.2.1 Efecto de la terapia génica para IGF1 sobre la funcionalidad de la microglia senescente.	77
5.2.1.1 La terapia génica con IGF1 incrementa la actividad fagocítica de la microglia senescente y promueve la remodelación sináptica en el Núcleo Estriado.	77
5.2.2 Efecto de la terapia génica para IGF1 sobre la expresión génica y proteica en el Núcleo Estriado de ratas seniles.....	80
5.2.2.1 Efecto sobre la expresión génica	80
5.3 DISCUSIÓN	86
CAPÍTULO VI: MODELO DE ENFERMEDAD DE PARKINSON INDUCIDO POR LPS	
6.1 Puesta a punto del modelo de Enfermedad de Parkinson inducido por la inyección de LPS intranigral.	90
6.1.1 Efecto de la inyección intranigral de LPS sobre la función motora.	90

6.1.1.1 Evaluación de la funcionalidad de las extremidades anteriores	90
6.1.1.2 Evaluación de la asimetría e integración sensomotora.	91
6.1.2 Efecto de la inyección intranigral de LPS sobre la reactividad microglial y la neurodegeneración dopaminérgica.....	94
6.2 Implementación de la terapia génica con IGF1 sobre el modelo de EP-LPS.....	96
6.3 DISCUSIÓN	100
CAPÍTULO VII: DISCUSIÓN	104
CONCLUSIONES	106
BIBLIOGRAFÍA.....	108

ABREVIATURAS

6-OHDA: 6-hidroxidopamina

AAV: vector adeno-asociado

Acb: Núcleo Accumbens

ACh: Acetilcolina

Ad: Adenovirus

ADN: Ácido desoxiribonucleico

AMPC: Adenosín monofosfato cíclico

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

BBB: Barrera hematoencefálica

CAMPs: Patrones moleculares asociados a células apoptóticas

CR: Receptor del complemento⁴

D1: Receptor de dopamina tipo 1

D1R: Receptor de dopamina 1

D2: Receptor de dopamina tipo 2

D2R: Receptor de dopamina 2

D3R: Receptor de dopamina 3

D4R: Receptor de dopamina 4

D5R: Receptor de dopamina 5

DA: Dopamina

DAB: Diaminobenzidina

DAT: Transportador de dopamina

DE: Diferencialmente expresados

EP: Enfermedad de Parkinson

EP-LPS: Enfermedad de Parkinson inducida por LPS

TIM-4: Inmunoglobina musina 4 de células T

FSI: Interneuronas de disparo rápido

GABA: Ácido gamma-aminobutírico

GB: Ganglios basales

GLT1: transportador de glutamato glial 1

Glut: Glutamato

GP: Globo Pálido

GPe: Globo Pálido Externo

GPI: Globo Pálido Interno

ICV: Intracerebroventricular

IFN γ : Interferón gamma

IGF1: Factor de crecimiento insulino similar tipo 1

IGF1-R: Receptor de IGF1

IHQ: Inmunohistoquímica

IL: Interleuquina

iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible

ip: Intraperitoneal

im: Intramuscular

IRS: Receptor de insulina

IGFBP: Proteína de unión a IGF1

L-DOPA: Levodopa

LPS: Lipopolisacárido

M1: microglia pro-inflamatoria

M2: microglia anti-inflamatoria

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

MSN: neuronas espinosas mediana

NC: Núcleo Caudado

NE: Núcleo Estriado o Neostriado

NO: óxido nítrico

NST: Núcleo Subtalámico de Luys (NST)

OF: Prueba de campo abierto

PAMPs: Patrones moleculares asociados a patógenos

PB: Buffer fosfato

PBS: Buffer fosfato salino

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PFA: Paraformaldehído

PFU: Unidades formadoras de placa

PI3K: Fosfatilinositol 3 quinasa

PRRs: Receptores de reconocimiento de patrones

Put: Núcleo Putamen

PVDF: Difluoruro de polivinilideno

qRT-PCR: Retrotranscripción y reacción en cadena de la Polimerasa cuantitativa

RAd: Adenovirus recombinante

SL: Solución de lavado

SN: *Substantia Nigra*

SNC: Sistema nervioso central

SNC: *Substantia Nigra pars compacta*

SNr: *Substantia Nigra pars reticulata*

SR: Receptor scavenger

TAN: neuronas tónicamente activas

TBST: Buffer Tris salino suplementado con Tween

TGF: Factor de crecimiento tumoral

TH: Tirosina hidroxilasa

TLR: Receptor tipo Toll

TLR4: Receptor tipo Toll tipo 4

TNF: Factor de necrosis tumoral

TREM2: Receptor activador 2 expresado en células mieloides

VA/VL: ventrículo anterior y lateral del tálamo

VAcHt: Vesícula transportadora de acetilcolina

VGlut1: Vesícula transportadora de glutamato 1

VGlut2: Vesícula transportadora de glutamato 2

VGlut3: Vesícula transportadora de glutamato 3

α -syn: α -sinucleína

RESUMEN

En las últimas décadas, el promedio en la esperanza de vida de la población mundial ha aumentado debido a la mejora en la atención médica y las condiciones sociales y culturales. Este hecho viene de la mano con el consecuente deterioro motor y cognitivo, así como a un aumento en la incidencia de patologías relacionadas al envejecimiento, como es la Enfermedad de Parkinson. Durante el envejecimiento se observa una pérdida de la homeostasis cerebral y una neuroinflamación crónica, causada principalmente por microglia senescente. Estas células se encuentran polarizadas hacia un fenotipo proinflamatorio y generan una respuesta inmune exacerbada. De hecho, ha sido reportado que la progresión de muchas enfermedades neurodegenerativas depende de la activación de la microglia. Por tanto, es de gran interés diseñar estrategias que permitan modular el fenotipo de estas células gliales. Muchos factores neurotróficos producidos por las células gliales, como el IGF1, pueden polarizarlas hacia un fenotipo neuroprotector M2, promoviendo la supervivencia neuronal. Nuestro grupo de investigación ha fijado como objetivo de estudio combatir los efectos deletéreos del envejecimiento en ratas seniles mediante la implementación de la terapia génica con IGF1. En el presente trabajo de Tesis Doctoral hemos evaluado el efecto de esta terapia sobre la microglia en regiones del cerebro relacionadas con el desempeño motor, y su relación con la mejora en la performance motora debida a la terapia, anteriormente observada. Demostramos que la terapia génica con IGF1 aumenta el número de células microgliales con especificidad en el Núcleo Estriado de ratas seniles. Además, estas células presentan una mayor reactividad y se encuentran polarizadas hacia un fenotipo anti-inflamatorio M2. Observamos también que la microglia del Núcleo Estriado en ratas seniles tratadas con rAd-IGF1 presentan una mayor actividad fagocítica y mayor remodelación sináptica. A su vez, la terapia génica provocó una disminución en la expresión de genes pro-inflamatorios. Postulamos que estos cambios debidos a la sobreexpresión de IGF1, establecen un microambiente propicio para el correcto funcionamiento de las neuronas implicadas en el control motor generando una mejora de la conducta motora.

SUMMARY

In the last decades, the average life expectancy of the world population has increased due to the improvement in medical care and social and cultural conditions. This fact comes hand in hand with the consequent motor and cognitive loss, as well as an increase in the incidence of pathologies related to aging, such as Parkinson's disease. Aging presents a loss of cerebral homeostasis and chronic neuroinflammation, mainly caused by senescent microglia. These cells are polarized towards a proinflammatory phenotype and establish an exacerbated immune response. In fact, it has been reported that the progression of many neurodegenerative diseases depends on the activation of the microglia. Therefore, it is of great interest to design strategies that allow modulating the phenotype of these glial cells. Many neurotrophic factors produced by glial cells, such as IGF1, can polarize them towards an M2 neuroprotective phenotype, promoting neuronal survival. Our research group has set the goal to fight the deleterious effects of aging in senile rats by implementing gene therapy with IGF1. In the present Doctoral Thesis work we have evaluated the effect of this therapy on microglia in regions of the brain related to motor performance, and its relationship with the improvement in motor performance due to therapy, previously observed. We showed that gene therapy with IGF1 increased the number of microglial cells specifically in the Striatum of senile rats. In addition, these cells presented higher reactivity and were polarized towards an M2 anti-inflammatory phenotype. We also observed that the microglia of the Striatum of senile rats treated with RAd-IGF1 presented higher phagocytic activity and greater synaptic remodeling. Moreover, gene therapy caused a decrease in the expression of pro-inflammatory genes. We postulate the observed changes are due to the overexpression of IGF1 and that they establish a propitious microenvironment the proper functioning of the neurons involved in motor control, generating an improvement in motor behavior.

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1.1 ENVEJECIMIENTO

1.1.1 Datos poblacionales

Durante las últimas décadas, como consecuencia del desarrollo científico y tecnológico, la mejora del cuidado médico y las condiciones socio-culturales, se ha producido un aumento de la esperanza de vida. Este hecho, sumado a la disminución en la tasa de fecundidad, ha generado en casi todos los países una inversión de la tendencia demográfica (**Figura 1**). Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y de Naciones Unidas en el informe *World Population Prospects: The 2017 Revision*, en la última década la proporción de personas mayores de 60 años se ha incrementado más rápidamente que cualquier otro grupo etario, a una razón de 3% por año¹. La OMS prevé que la población mundial mayor de 60 años se duplicará para 2050 y triplicará para 2100. Otra de las tendencias previstas es la del denominado *envejecimiento de la población mayor* o también *envejecimiento del envejecimiento*. Este término hace referencia al incremento de la población más anciana, es decir, la que supere los 80 años. Según la misma fuente en 2050 habrá en el mundo cerca de 400 millones de personas con 80 años o más² (**Figura 2**).

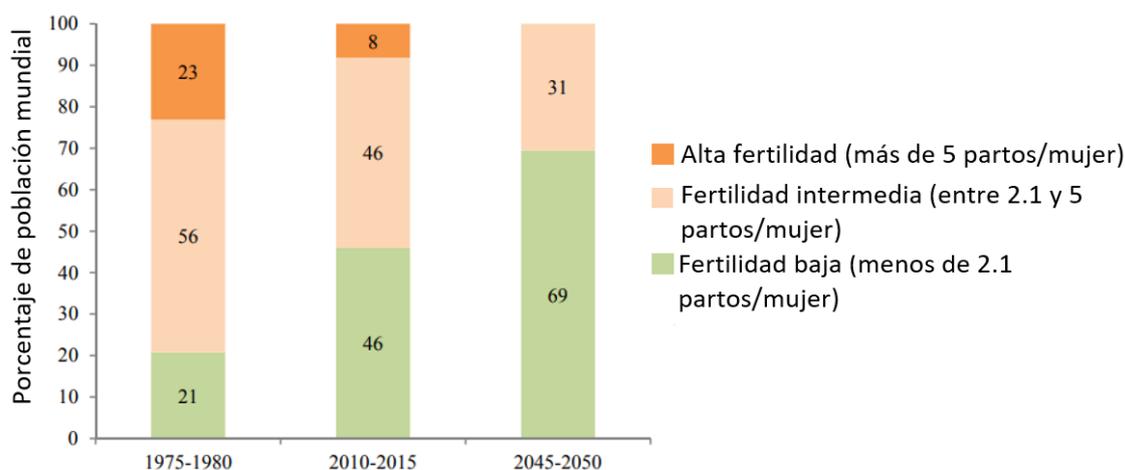
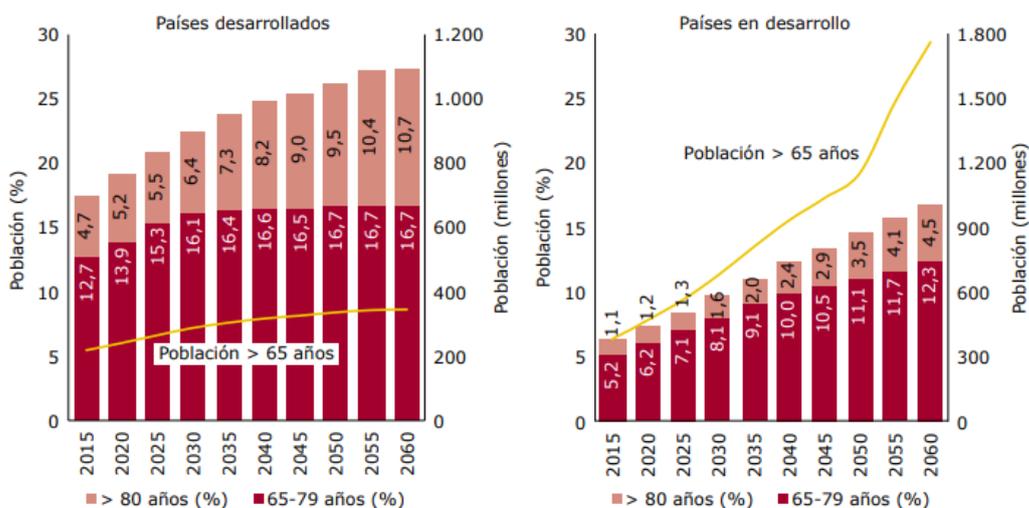


Figura 1: Distribución de la población mundial por nivel de fertilidad entre los años 1975-1980, 2010-2015 y 2045-2050. Modificado de: Naciones Unidas, Departamento de Asuntos Económicos y Sociales, División de Población (2017). Perspectivas de la población mundial: la revisión de 2017¹. Nueva York: Naciones Unidas.

El envejecimiento de la población es un claro indicador de la mejoría de la salud en el mundo. Este fenómeno tiene consecuencias directas para la sociedad, ya que por un lado las personas mayores contribuyen al desarrollo social de distintas maneras, como es la crianza de las futuras generaciones; pero por otro lado el cuidado de este grupo etario puede representar un reto tanto en el ámbito familiar como en la comunidad en general. Teniendo en cuenta esta tendencia, es necesario asegurar la atención médica y asistencial, así como cualquier problema económico que pueda surgir.

Desde un punto de vista biológico, el envejecimiento es la consecuencia de la acumulación de una gran variedad de daños moleculares y celulares a lo largo del tiempo, lo que lleva a un descenso gradual de las capacidades físicas y mentales, un aumento de riesgo de enfermedad y finalmente a la muerte. La OMS destaca en su informe que más del 20 % de los adultos que superan los 60 años sufren de algún trastorno mental o neurológico². Es por ello que es necesario encontrar estrategias para prevenir y tratar las enfermedades crónicas asociadas a la edad y el deterioro fisiológico que acompaña al envejecimiento.



Población mayor de 65 años por regiones, 2015-2060

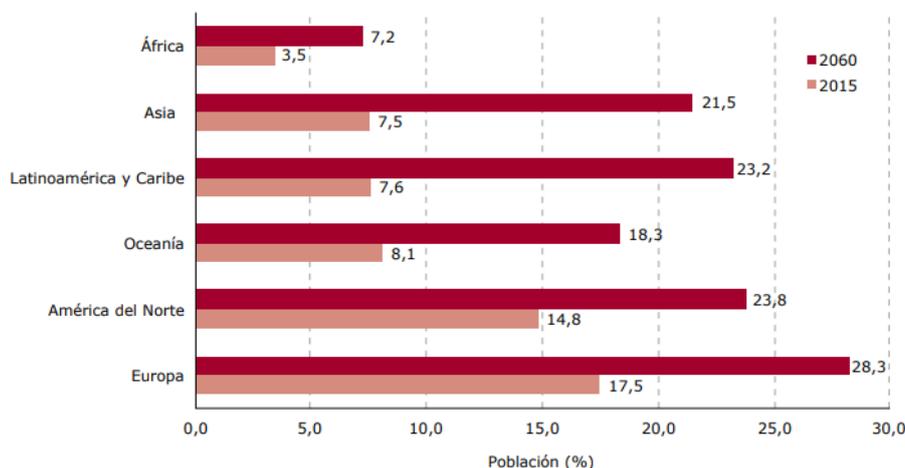


Figura 2: Proyección del envejecimiento de la población mundial en personas de más de 65 años en países desarrollados y en vías de desarrollo. United Nations: World Population Prospects: The 2015 Revision. Imagen extraída de Imsero, 2016³.

1.1.2 Concepto de envejecimiento

Hasta el momento, no existe una definición universalmente aceptada que abarque todos los eventos que ocurren en el proceso de envejecimiento. Sin embargo, en términos generales, el envejecimiento se puede definir como el deterioro funcional asociado al paso del tiempo que afecta a los organismos vivos⁴. El envejecimiento es un proceso universal, complejo y multifactorial que además de causar una progresiva pérdida de funcionalidad, aumenta el riesgo de muerte. El reconocido gerontólogo Bernard Strehler, autor del libro "Time, cells and aging", definió al proceso de envejecimiento a partir de cuatro postulados: 1) es universal: cualquier fenómeno asociado con el envejecimiento ocurre en diferentes grados en todos los individuos de una especie; 2) es intrínseco: las causas que son el origen del envejecimiento deben ser endógenas; no deben depender de factores extrínsecos; 3) es progresivo: los cambios que conducen al envejecimiento deben ocurrir gradualmente a lo largo de la vida (deben también ocurrir en individuos jóvenes, aunque sea en una pequeña proporción); 4) es perjudicial, es decir, un fenómeno asociado al envejecimiento sólo se considerará como parte de tal si es nocivo para el individuo⁵.

El avance científico y tecnológico de los últimos años, ha focalizado la investigación sobre el envejecimiento en el estudio de los mecanismos responsables de este proceso a nivel molecular y celular, centrando su estudio en enfermedades asociadas a esta etapa de la vida⁴.

1.1.2 Envejecimiento a nivel cerebral

Como se mencionó anteriormente, el constante aumento en la esperanza de vida de la población en todo el mundo ha acentuado diversos problemas médicos y socioeconómicos de la población geriátrica. Esto ha llevado a un aumento en la investigación de los cambios acaecidos con la edad tanto a nivel básico como clínico, siendo el envejecimiento cerebral un eje central en dichos estudios. Sin embargo, al ser un proceso multifactorial, la comprensión de los mecanismos celulares y moleculares específicos implicados en el envejecimiento todavía representa uno de los problemas más complejos e integrales que la investigación biológica experimental aún no ha podido superar.

El envejecimiento cerebral se caracteriza por presentar alteraciones celulares y moleculares que comprenden daño oxidativo, disfunción mitocondrial, inestabilidad genómica, acortamiento de los telómeros, senescencia celular replicativa, reducción del número de células madre, modificaciones epigenéticas, pérdida de proteostasis, alteración de la comunicación celular, desregulación energética, del metabolismo de la glucosa y neuroinflamación crónica^{4,6}. Dichas alteraciones cumplen los siguientes requisitos: 1) tienen lugar durante el envejecimiento normal; 2) su empeoramiento de forma experimental acelera el envejecimiento; y 3) su mejoría experimental retarda el proceso de

envejecimiento normal y por lo tanto incrementa la esperanza de vida. Estos cambios aparecen lentamente y se acumulan con el tiempo, contribuyendo así al daño de las células nerviosas que finalmente se reflejan en déficits cognitivos y motores, entre otros. Estos déficits se deben, en parte, a cambios a nivel estructural y neurofisiológico que conllevan a una pérdida de eficacia en la neurotransmisión⁷. A continuación, se resumirán las principales características estructurales y neurofisiológicas más destacadas del deterioro motor.

1.1.2.1 Cambios estructurales y neurofisiológicos asociados al envejecimiento.

Se ha observado que el paso del tiempo provoca una disminución en el volumen cerebral y un aumento del volumen de los ventrículos. La pérdida de volumen cerebral es variable para las distintas regiones del cerebro. Sin embargo, se ha identificado que el hipocampo, la corteza prefrontal, la corteza temporal inferior, el cerebelo y el Núcleo Estriado presentan una disminución más pronunciada que el resto del cerebro con el envejecimiento^{8,9}. Estos cambios se asocian no sólo a la muerte neuronal sino también a alteraciones en las propiedades celulares intrínsecas de las neuronas como la reducción del soma^{10,11}, la regresión o pérdida de espinas dendríticas¹²⁻¹⁷, la disminución en el número sinapsis^{16,17}, alteraciones en los receptores de neurotransmisores o disminución de la respuesta a los mismos¹⁸⁻²³ y desmielinización de los axones, conducen a una alteración de la conductividad neuronal²³ y constituyen las principales fuerzas impulsoras de la disminución del volumen del cerebro asociada al envejecimiento²⁴.

1.1.2.2 Alteraciones motoras asociadas al envejecimiento

La función motora sufre un deterioro caracterizado por la pérdida de fuerza muscular, disminución del equilibrio^{25,26} y coordinación²⁷, debido a disfunciones del sistema nervioso central y periférico, así como del sistema neuromuscular²⁸. La falta de equilibrio y los problemas al andar son algunas de las causas principales de morbilidad en el envejecimiento²⁹. La cantidad de movimientos disminuye un 15-30 % con la edad^{28,30}. Esta disminución parece ser una estrategia en los individuos adultos para ganar exactitud en los movimientos a cambio de perder velocidad³¹. La lentitud para procesar información también afecta la actividad motora debido a la pérdida y funcionalidad sináptica^{32,33}.

1.2 GANGLIOS BASALES Y CONTROL DE LA FUNCIÓN MOTORA

Los ganglios basales (GB) están constituidos por un grupo de núcleos grises situados en la base de los hemisferios cerebrales, en la región ventral del diencefalo³⁴ (**Figura 3**). Estos núcleos comprenden: 1) el

Núcleo Estriado o **Neoestriado (NE)**, conformado a su vez por el **Núcleo Caudado (NC)** y el **Núcleo Putamen (Put)**; 2) el **Globo Pálido (GP)**, el cual se subdivide en **Globo Pálido Interno (GPi)** y **Globo Pálido Externo (GPe)**; 3) el **Núcleo Subtalámico de Luys (NST)**; 4) la **Substantia Nigra (SN)**. Estos núcleos pueden clasificarse en: 1) Núcleos de entrada; 2) Núcleos de salida; y 3) Núcleos intermedios. Los núcleos de entrada son aquellas estructuras que reciben información entrante de diferentes fuentes, principalmente de origen cortical, talámico y nigral, constituidos por el Núcleo Estriado y el Núcleo Accumbens (**Acb**). Los núcleos de salida son aquellas estructuras que envían información de los ganglios basales al tálamo y consisten en el segmento interno del Globo Pálido y la *Substantia Nigra pars reticulata (SNr)*. Finalmente, los núcleos intermedios son aquellos que se encuentran entre los núcleos de entrada y de salida y se encargan del relevo de información. Aquí podemos encontrar al segmento externo del Globo Pálido, el NST y la *Substantia Nigra pars compacta (SNc)*.

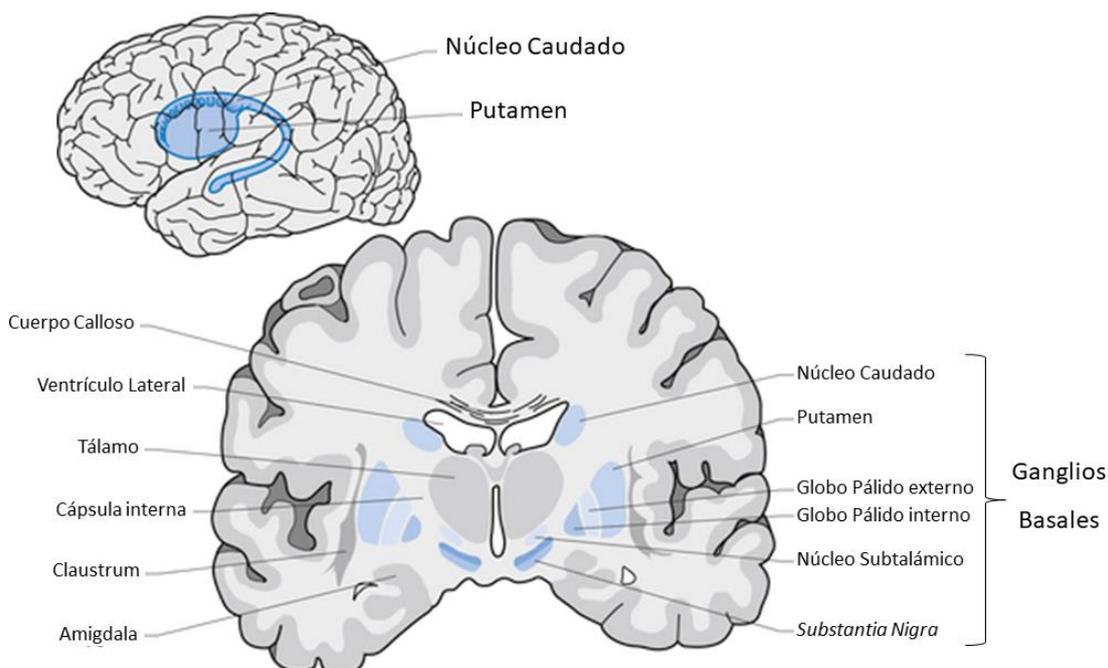


Figura 3. Corte coronal de cerebro con los ganglios de la base en relación a sus estructuras vecinas.

Los GB cumplen una gran variedad de funciones relacionadas con el aprendizaje y la ejecución de movimientos voluntarios, el desarrollo de comportamientos de rutina o hábitos, los cuales nacen de la repetición de una serie de acciones que desembocan en una recompensa³⁵⁻³⁷. Se encargan de procesar información del movimiento y ajustar la actividad de los circuitos cerebrales que determinan la mejor respuesta posible en una situación dada, iniciando los movimientos requeridos a la vez que inhiben los movimientos opuestos.

1.2.1 Control de la función motora: Regulación corticoestriatal

La ejecución de todo movimiento voluntario requiere información acerca del contexto sensitivo en el que se va a realizar (planificación), intención del movimiento a ejecutar (iniciación) y el estado de las partes del cuerpo que lo realizarán (coordinación). Toda esta información es aportada por dos circuitos neurales en paralelo que involucran a los GB y al cerebelo. Estas estructuras modulan su actividad mediante una región central de procesamiento, núcleos intermedios, los cuales como fue mencionado, median la información entre las aferencias y eferencias corticales³⁸⁻⁴⁰.

La región central de procesamiento en los GB es el Núcleo Estriado. Todas las áreas corticales involucradas en la planificación y ejecución de movimientos proyectan sus fibras corticoestriatales glutamatérgicas hacia el NE. Las neuronas espinosas medianas estriatales (MSN, del inglés *medium-sized spiny neurons*) reciben dicha información y luego la envían hacia el GP. Las neuronas MSN representan el 90% de las neuronas estriatales y son todas del tipo inhibitorias GABAérgicas. Estas neuronas pueden dividirse en 2 subgrupos de acuerdo a los blancos de sus proyecciones, dando lugar a 2 vías de acción:

- **Vía Directa:** Las neuronas corticales que proyectan al Núcleo Estriado liberan el neurotransmisor glutamato, excitando así a las neuronas estriatales que inervan al GPi. Estas neuronas al ser excitadas liberan el neurotransmisor inhibitorio GABA. De esta manera la excitación de las neuronas MSN estriatales inhibe las neuronas del GPi. A su vez, las neuronas del GPi, que también son neuronas GABAérgicas, inervan los núcleos motores del tálamo y los ventrículos anterior y lateral (VA/VL). Al estar recibiendo un estímulo inhibitorio por parte de las neuronas estriatales, las neuronas GABAérgicas GPi se encuentran reprimidas, por lo que se activan las neuronas glutamatérgicas del tálamo, las cuales a su vez activan a las neuronas glutamatérgicas de la corteza motora. Finalmente, estas neuronas envían señales excitatorias hacia la médula espinal para dar a lugar al comienzo del movimiento. En resumen, un aumento en el estímulo excitatorio cortical a las neuronas estriatales de la vía directa conducen a un aumento en la actividad corticoespinal que eventualmente conducen un aumento en la actividad de los músculos. Así, la vía directa estimula la actividad motora^{38,41,42} (**Figura 4.A**).
- **Vía Indirecta:** en esta vía, las neuronas MSN estriatales inervan el GPe, inhibiendo su acción. Las neuronas GABAérgicas del GPe proyectan sus axones al núcleo subtalámico, el cual, a su vez, inerva el GPi. Por lo tanto, dado que las neuronas excitatorias subtalámicas se encuentran desinhibidas, las neuronas inhibitorias del GPi se encontrarán activas, inhibiendo así a las neuronas de los núcleos motores del tálamo. En consecuencia, dada la falta de estímulo excitatorio, las neuronas glutamatérgicas corticales son incapaces de enviar señales a la médula espinal. En resumen. Un aumento en el estímulo excitatorio cortical a las neuronas estriatales

de la vía indirecta inducen una disminución en la actividad corticoespinal, conduciendo a una disminución en la actividad de los músculos. Así, la vía indirecta reprime la actividad motora^{38,41,42} (Figura 4.B).

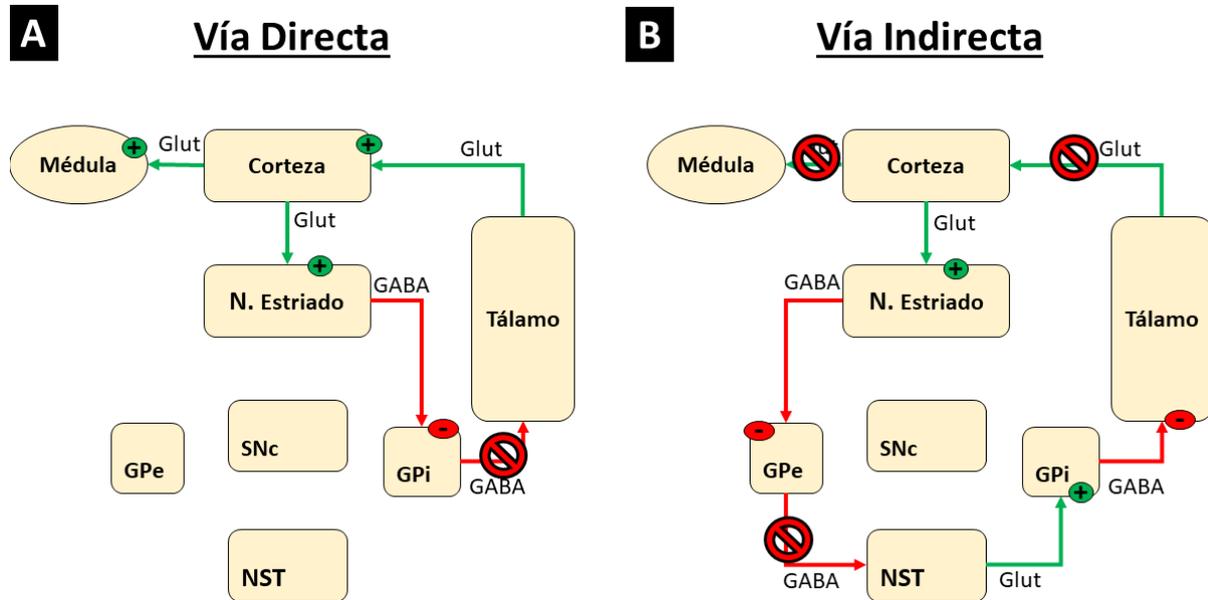


Figura 4. Resumen de la regulación corticoestriatal de la función motora. Los esquemas muestran los tipos neuronales involucrados en la regulación corticoestriatal de la función motora según la vía directa (A) o indirecta (B). Las flechas verdes representan neuronas Glutamatérgicas, mientras que las flechas rojas representan neuronas GABAérgicas. La acción excitatoria o inhibitoria de las neuronas se encuentran representadas por los símbolos “+” o “-” en círculos verdes o rojos, respectivamente. El signo de prohibido indica la acción neuronal que se encuentra bloqueada por el correcto funcionamiento de la vía. Abreviaturas: N. Estriado = Núcleo Estriado; GPe = Globo Pálido Externo; GPI = Globo Pálido Interno; SNc = *Substantia Nigra pars compacta*; Glut = Glutamato.

Existe una segunda población de neuronas en el Núcleo Estriado: las interneuronas. A diferencia de las MSN, las interneuronas presentan dendritas sin espinas. En general, estas neuronas se clasifican en 3 grupos de acuerdo a su perfil neuroquímico y su morfología^{43,44}.

Clase I: consta de grandes neuronas colinérgicas que usan acetilcolina (ACh) como neurotransmisor. Presentan un patrón de actividad de disparo continuo y constante y, por lo tanto, también se conocen como neuronas tónicamente activas (TAN, del inglés *tonically active neurons*). Se las considera las neuronas asociativas más importantes del núcleo.

Clase II: consta de neuronas medianas GABAérgicas. Estas interneuronas son las principales responsables de los mecanismos inhibitorios del Núcleo Estriado. También se denominan interneuronas de disparo rápido (FSI, del inglés *fast-spiking interneuron*).

Clase III: consta de neuronas GABAérgicas medianas que utilizan óxido nítrico (NO, por sus siglas en inglés *Nitric Oxide*) como cotransmisor. El bloqueo de esta síntesis de NO reduce la liberación de todos los neurotransmisores del núcleo (GABA, glutamato, acetilcolina y dopamina). Estas neuronas son importantes para el funcionamiento general del estriado al modular la funcionalidad neuroquímica del mismo.

Cabe destacar que la población de interneuronas colinérgicas del NE establece sinapsis con las neuronas GABAérgicas que inervan el GPi y GPe. La ACh tiene un efecto dual sobre las neuronas estriatales⁴⁵. Por un lado, inhibe las neuronas MSN que inervan el GPi, las cuales consecuentemente reprimen las neuronas del tálamo, disminuyendo así la actividad de las neuronas corticoespinales (**Figura 5.A**). Por otro lado, excita las neuronas MSN que inhiben el GPe, activando de esta forma la vía indirecta que regula la función motora (**Figura 5.B**). En definitiva, el efecto de la acetilcolina inhibe la vía directa y activa la vía indirecta, disminuyendo la actividad motora.

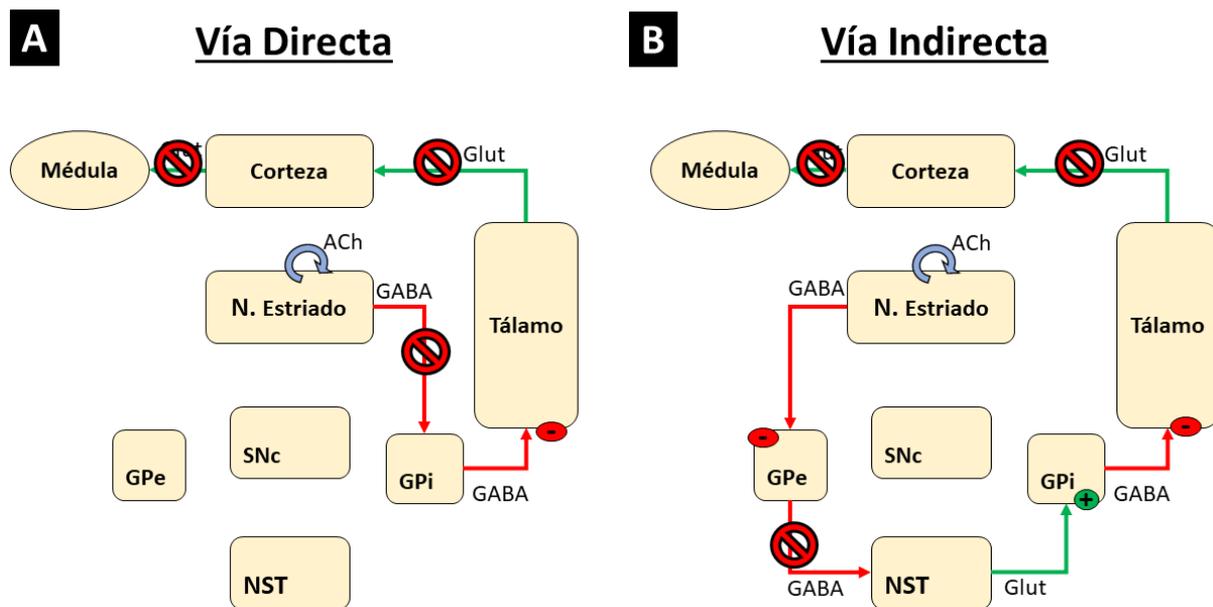


Figura 5. Resumen de la regulación colinérgica de la función motora. Los esquemas muestran los tipos neuronales involucrados en la regulación colinérgica de la función motora según la vía directa (A) o indirecta (B). Las flechas verdes representan neuronas Glutamatérgicas; las flechas rojas representan neuronas GABAérgicas; las flechas celestes representan interneuronas colinérgicas. La acción excitatoria o inhibitoria de las neuronas se encuentran representadas por los símbolos "+" o "-" en círculos verdes o rojos, respectivamente. El signo de prohibido indica la acción neuronal que se encuentra bloqueada por el correcto funcionamiento de la vía. Abreviaturas: N. Estriado = Núcleo Estriado; GPe = Globo Pálido Externo; GPi = Globo Pálido Interno; SNc = *Substantia Nigra pars compacta*; Glut = Glutamato; ACh = Acetilcolina.

1.2.2 Control de la función motora: Regulación nigroestriatal

La dopamina (DA) es el neurotransmisor catecolaminérgico más importante del Sistema Nervioso Central (SNC) de los mamíferos, ya que participa en la regulación de diversas funciones como la conducta motora, la emotividad y afectividad, la comunicación neuroendócrina y la ingestión de agua y alimentos^{46,47}. La síntesis de este neurotransmisor comienza a partir del aminoácido L-tirosina en las terminales nerviosas dopaminérgicas donde se encuentran en alta concentración las enzimas responsables, la tirosina hidroxilasa (TH) y la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos o L-DOPA descarboxilasa⁴⁸. Además, existen mecanismos que regulan de manera muy precisa su síntesis y liberación.

Las neuronas dopaminérgicas pueden agruparse en tres grupos principales, de acuerdo a lo descrito por Dahlstrom y Fuxe⁴⁹: neuronas A10 (área tegmental ventral), neuronas A9 (*Substantia Nigra pars compacta*) y neuronas A8 (región retro-ubral). Las neuronas A9 son de particular interés, ya que son las neuronas dopaminérgicas que envían sus proyecciones al Núcleo Estriado y, por tanto, las que regulan la función motora.

Los receptores dopaminérgicos se encuentran ampliamente distribuidos en diversas áreas del SNC, aunque de manera diferencial, de acuerdo al subtipo, siendo responsables de las diversas acciones fisiológicas de la dopamina. Se han identificado 5 tipos de receptores dopaminérgicos, todos ellos acoplados a proteínas G y divididos en dos familias farmacológicas denominadas D1 y D2⁵⁰. Los receptores de la familia D1 (subtipos D1R y D5R) estimulan la formación de AMPc como principal mecanismo de transducción de señales. Los subtipos pertenecientes a la familia D2 (D2R, D3R y D4R) inhiben la formación de AMPc, activan canales de K⁺ y reducen la entrada de iones de Ca²⁺ a través de canales dependientes de voltaje⁵¹. Los receptores D1R y D2R se expresan en las neuronas MSN estriatales de manera diferencial: mientras que las MSN estriatales de la vía directa expresan D1R, las de la vía indirecta expresan D2R. Este hecho sugiere que la dopamina podría modular de forma independiente la actividad de las vías directa e indirecta del funcionamiento motor y dar lugar a diferentes conductas motoras⁵². De hecho, teniendo en cuenta que la dopamina tiene un efecto excitatorio cuando actúa vía D1R, este neurotransmisor es capaz de promover y activar la vía directa de la regulación de la función motora (**Figura 6.A**). Por el contrario, la dopamina tiene un efecto inhibitorio cuando actúa vía D2R, reprimiendo la actividad de las MSN estriatales de la vía indirecta. Cuando estas neuronas se encuentran reprimidas, las neuronas palidales del GPe se encuentran inhibiendo a las neuronas del núcleo subtalámico. En consecuencia, las neuronas palidales del GPi no reprimirán a las neuronas talámicas y por tanto aumentará la actividad de las neuronas corticoespinal (**Figura 6.B**). En definitiva, el efecto de la dopamina activa la vía directa e inhibe la vía indirecta, incrementando la actividad motora.

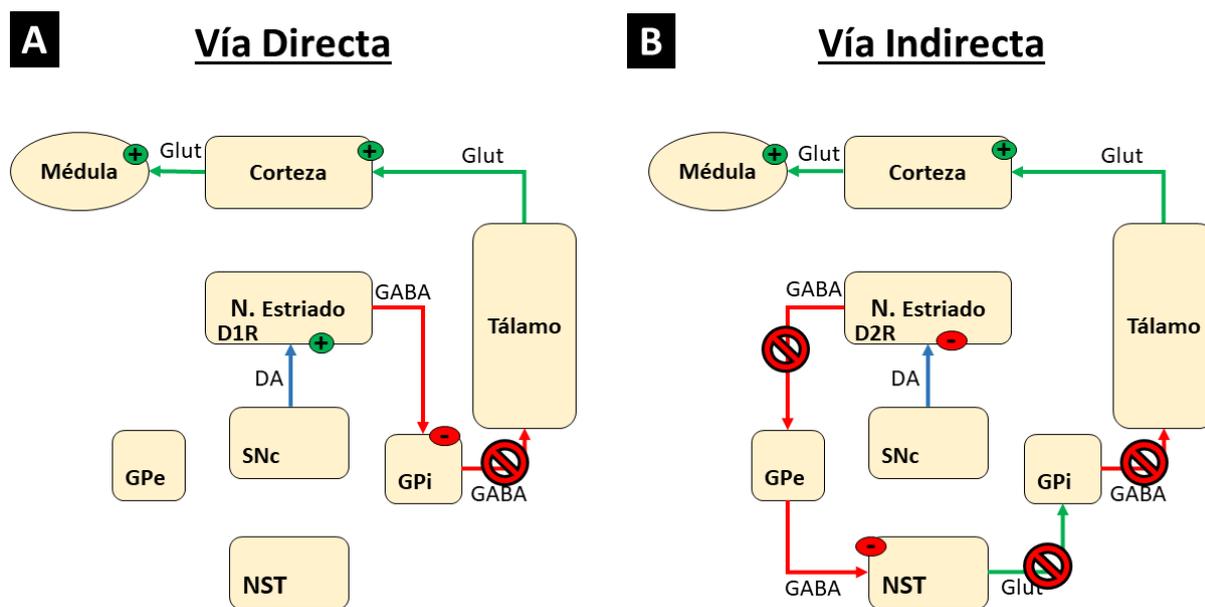


Figura 6. Resumen de la regulación dopaminérgica de la función motora. Los esquemas muestran los tipos neuronales involucrados en la regulación dopaminérgica de la función motora según la vía directa (A) o indirecta (B). Las flechas verdes representan neuronas Glutamatérgicas; las flechas rojas representan neuronas GABAérgicas; las flechas celestes representan neuronas dopaminérgicas. La acción excitatoria o inhibitoria de las neuronas se encuentran representadas por los símbolos “+” o “-” en círculos verdes o rojos, respectivamente. El signo de prohibido indica la acción neuronal que se encuentra bloqueada por el correcto funcionamiento de la vía. Abreviaturas: N. Estriado = Núcleo Estriado; GPe = Globo Pálido Externo; GPi = Globo Pálido Interno; SNc = *Substantia Nigra pars compacta*; Glut = Glutamato; DA = Dopamina.

1.2.2 Control de la función motora: Interacción Dopamina - Acetilcolina

Una adecuada regulación en los balances de DA y ACh en el NE es de vital importancia para asegurar el correcto funcionamiento del control motor^{53,54}. Las terminales neuronales dopaminérgicas y colinérgicas se encuentran muy cercanas entre sí. Se cree que esta localización permite la difusión de neurotransmisores, permitiendo que la DA regule la actividad de las neuronas colinérgicas, y de forma recíproca la ACh regule a las neuronas dopaminérgicas de manera no sináptica⁵⁵⁻⁵⁷. Además, Yan y colaboradores han demostrado que las interneuronas colinérgicas expresan tanto D1R como D2R, siendo la actividad de estos receptores análogos a su función en las neuronas MSN estriales⁵⁸. De este modo, la activación de D2R reduce la excitabilidad de las interneuronas y, por tanto, la liberación de ACh. Por el contrario, la activación de D1R causa el efecto opuesto^{54,56,58,59}. En un modelo animal de lesión, la ablación unilateral de las interneuronas colinérgicas (clase I) en el NE provo-ca los mismos efectos que la lesión unilateral en SNc por inyección de 6-hidroxidopamina (6OHDA), sugiriendo nuevamente que la disfunción colinérgica podría modificar las funciones neuronales dopaminérgicas⁶⁰. Además, se ha demostrado que algunos de los síntomas de la Enfermedad de Parkinson disminuyen al

inhibir la actividad de la ACh⁶¹. En consecuencia, cualquier perturbación en la regulación de la actividad de las neuronas dopaminérgicas y colinérgicas en NE tiene consecuencias en el control motor.

En el envejecimiento se han demostrado alteraciones fisiológicas en el sistema nigroestriatal que conducen a una disfunción motora. Aunque la disminución en el número de células nigrales debido a la edad sigue siendo un tema controversial⁶²⁻⁶⁵, se ha comprobado que existe una disminución en los niveles de DA⁶⁶ y de sus receptores, en particular del subtipo D2R^{67,68} en el NE. Roth y colaboradores demostraron que tanto la síntesis de D2R como la concentración de su ARNm disminuyen con la edad⁶⁹⁻⁷³, y que el incremento en la densidad de receptores de dopamina mediante intervención farmacológica mejora la función motora en ratas seniles⁷⁴.

Respecto al sistema colinérgico-estriatal, se han reportado alteraciones en la interacción entre DA y ACh durante el envejecimiento. Zhang y colaboradores reportaron que gran parte de la disminución en la expresión de D2R se da en interneuronas colinérgicas⁷⁵. De esta manera, esta disminución de D2R conduce a una desinhibición de las neuronas colinérgicas y por tanto mayor liberación de ACh y una menor actividad motora. Sin embargo, numerosos trabajos sugieren que el envejecimiento provoca un deterioro en la actividad colinérgica estriatal⁷⁶⁻⁷⁸. De hecho, se ha demostrado que los niveles de ACh estriatal es menor en ratas envejecidas respecto a su contraparte joven^{79,80}. Además, la actividad de la enzima colinesterasa, que degrada la ACh, se encuentra disminuida en el envejecimiento⁸¹, siendo estos datos controversiales.

Estudios en ratas envejecidas han demostrado que los injertos nigrales en NE en ratas seniles restaura la funcionalidad de interneuronas colinérgicas a través de la activación de receptores de DA^{82,83} a la vez que mejora la coordinación motora⁸⁴. Estos estudios sugieren que un aumento en la densidad de receptores de dopamina en interneuronas colinérgicas podría ser necesario para restaurar el deterioro funcional en las interacciones DA-ACh y mejorar el déficit de la función motora debida a la edad⁸⁵.

1.3 ENFERMEDAD DE PARKINSON

La enfermedad de Parkinson (EP) es el segundo trastorno neurodegenerativo, después de la enfermedad de Alzheimer, caracterizada por una pérdida selectiva y gradual de las neuronas dopaminérgicas de la SNc y sus proyecciones en el Núcleo Estriado, lo cual conlleva a una disminución en la llegada del neurotransmisor dopamina a dicho núcleo⁸⁶. La degeneración progresiva de la vía DA nigroestriatal lleva finalmente al desarrollo de síntomas clínicos de diverso tipo, los mayormente descriptos son los efectos motores, que incluyen bradiquinesia (movimiento lento), inestabilidad postural, rigidez, temblor y marcha defectuosa. También desencadena alteraciones en la función

cognitiva, depresión, dolor y alteraciones en la función del sistema nervioso autónomo. Actualmente, las terapias existentes sólo disminuyen los síntomas, pero no detienen el curso de la neurodegeneración, así como tampoco existen marcadores de detección temprana para arribar a un diagnóstico antes de la aparición de los síntomas motores. El diagnóstico confirmatorio postmortem a menudo detecta una pérdida masiva de neuronas DA en la SN y la presencia de inclusiones citoplasmáticas características llamadas cuerpos de Lewy en las neuronas supervivientes. Otra característica típica de la EP es la neuroinflamación, mediada fundamentalmente por células neurogliales.

La EP afecta entre el 0,1-0,3 % de la población total en países desarrollados, y llega hasta el 3% en la población mayor de 65 años, afectando tanto al sexo masculino como al femenino.

1.3.1 Cambios sinápticos específicos descritos en la enfermedad de Parkinson

En la EP, la degeneración de la vía dopaminérgica nigroestriatal ocasiona profundos cambios a nivel celular, morfológicos y funcionales de las vías aferentes y eferentes hacia y desde el NE, incluyendo la hiperactividad de la vía glutamatérgica corticoestriatal⁸⁷. En el contexto de las disquiinesias, ocurre un incremento de la concentración extracelular de glutamato en la *Substantia Nigra pars reticulata* y el Núcleo Estriado y, como consecuencia, un aumento en la expresión del transportador de glutamato glial (GLT1) y la alteración en la expresión de los genes de transportadores de glutamato vesiculares (VGlut1, VGlut2, VGlut3). Dentro de las numerosas modificaciones en las sinapsis glutamatérgicas estriatales en la EP, varios estudios han reportado alteraciones en la composición de las subunidades de los receptores NMDA en las espinas dendríticas de las neuronas espinosas medianas^{88,89}. Dunah y col. (2000) encontraron una reducción en los niveles de las subunidades GluN1 y GluN2B en las membranas celulares de neuronas estriatales de animales lesionados con 6-hidroxidopamina⁹⁰, hallazgo que podría correlacionarse con una reducción de la plasticidad sináptica corticoestriatal^{91,92}. En particular, GluN2B se encuentra específicamente reducido en fracciones sinápticas purificadas de ratas parkinsonianas⁹¹. GluN2B es una subunidad presináptica de vital importancia para la funcionalidad del receptor NMDA, por lo que resulta interesante resaltar que alteraciones en la misma están asociadas a una reducción en la interacción con la proteína de densidad post-sináptica 95 (*Postsynaptic Density protein 95, PSD95*), determinando la disfuncionalidad sináptica⁹³.

En resumen, en la EP, la degeneración de la vía dopaminérgica nigroestriatal resulta en profundos cambios funcionales y morfológicos de distintos circuitos neuronales, incluyendo las modificaciones en la arquitectura de la sinapsis glutamatérgica^{89,94} y la consecuente pérdida de la plasticidad sináptica nigroestriatal^{41,95,96}.

1.3.2 Modelo Parkinsoniano inducido por LPS

El entendimiento del desarrollo y del proceso de la EP ha avanzado significativamente con el desarrollo de modelos animales. Estos han demostrado ser altamente efectivos reproduciendo algunos de los síntomas de la enfermedad. Además, su uso ha permitido el desarrollo de nuevos tratamientos para los síntomas de esta enfermedad y han resultado de suma utilidad para dilucidar las posibles causas de la misma. Sin embargo, ninguno reproduce en su totalidad la sintomatología y/o déficits prevalentes de la EP, lo que dificulta el desarrollo de estrategias neuroprotectoras y el descubrimiento de biomarcadores para el diagnóstico de la patología en la etapa inicial de la misma.

Entre los distintos modelos animales de la enfermedad de Parkinson, los modelos clásicos emplean neurotóxicos como 6-OHDA, MPTP y pesticidas para inducir la neurodegeneración de neuronas nigroestriatales dopaminérgicas^{97,98}. Sin embargo, estos modelos presentan grandes desventajas: 1) el modelo de 6-OHDA es inespecífico, ya que también induce la degeneración de neuronas noradrenérgicas y serotoninérgicas⁹⁹⁻¹⁰¹, por lo que puede causar daño en otras partes del cerebro; 2) en el caso del MPTP, para llevar a cabo su efecto neurotóxico debe convertirse en el intermediario MPP⁺ el cual puede ser secuestrado dentro de vesículas, por lo que el establecimiento del modelo requiere la continua infusión de MPTP^{102,103}. Además, este modelo no se ha podido establecer en ratas¹⁰⁴; 3) Los modelos que emplean pesticidas como rotenona y Paraquat muestran un alto grado de toxicidad sistémica debido a que son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica¹⁰⁵⁻¹⁰⁸.

Los modelos anteriormente mencionados presentan una desventaja en común, a pesar de provocar una respuesta inflamatoria en el cerebro, es difícil definir si la neuroinflamación es causa o consecuencia del daño causado a las neuronas dopaminérgicas. De hecho, se cree que la neuroinflamación no es la causa primaria de la muerte neuronal, sino que puede ser un evento secundario que perpetúa la neurotoxicidad. En contraposición, el modelo de EP inducido por LPS es el modelo más apropiado para estudiar el papel de la neuroinflamación en la enfermedad.

El lipopolisacárido (LPS) es una endotoxina que se encuentra en la membrana externa de bacterias Gram-negativas. Este componente activa a la microglia a través de la interacción con TLR4, desencadenando la respuesta inflamatoria, mediante la activación de una variedad de vías de señalización intracelular de quinasas que llevan a la transcripción génica de factores pro-inflamatorios y de la enzima Óxido nítrico sintasa inducible (iNOS)¹⁰⁹⁻¹¹¹. A diferencia de los modelos anteriormente mencionados, el LPS no afecta directamente a las neuronas debido a que estas carecen de TLR4¹¹². En este modelo, la neurodegeneración dopaminérgica se da como consecuencia de la acumulación de citoquinas proinflamatorias y especies reactivas del oxígeno secretadas por la microglia¹¹³. Es por ello

que éste es un modelo preferencial para estudiar la degeneración dopaminérgica mediada por inflamación¹¹⁴.

El LPS ha sido administrado por diferentes vías para inducir el daño nigroestriatal, teniéndose así submodelos Parkisonianos inducidos por LPS de acuerdo al sitio de inyección:

- **Inyección sistémica de LPS:** en este modelo, la activación de microglia se da no sólo en SN sino en distintas zonas del cerebro, pudiendo observarse rápidamente, luego de 3 hs post inyección intraperitoneal. La dosis más frecuentemente utilizada es de 5 mg/kg de animal en ratones (aprox 100 µg) en ratones¹¹⁵. Una desventaja de este modelo es que la neurodegeneración dopaminérgica apreciable logra observarse luego de 10 meses post inyección¹¹⁶.
- **Inyección intrapalidal de LPS:** en este modelo, la activación de la microglia se da tanto en el Globo Pálido como en la SN. Además, esta inyección causa un aumento de los niveles de α -sinucleína (α -syn) y su oligomerización. La α -syn induce la activación microglial, lo que puede llegar a provocar una actividad descontrolada de la microglia que cause efectos neurotóxicos sobre las neuronas¹¹⁷. Se utilizan dosis menores, del orden de 10 µg/animal en ratas¹¹⁷.
- **Inyección intraestriatal de LPS:** esta vía de administración, además de inducirse la actividad de la microglia, provoca una disfunción mitocondria de las células en el Núcleo Estriado. La dosis utilizada es de 7,5 µg/animal en ratas^{118,119}.
- **Inyección intranigral de LPS:** esta vía de administración provoca la activación de la microglia en la SN que conduce a una neurodegeneración progresiva, preferencial e irreversible de hasta el 85% de las neuronas DA nigrales^{120,121}, sin afectar a otro tipo de neuronas nigrales^{122,123}. Este modelo ha sido muy utilizado para estudiar la relación entre la neuroinflamación mediada por las células gliales y la neurodegeneración dopaminérgica. La dosis utilizada varía entre 2 y 5 µg por animal en ratas^{124,125}.

1.4 NEUROINFLAMACIÓN

El sistema nervioso central posee una característica única, ajena a cualquier otro órgano: cuenta con su propio sistema inmune comprendido por las células de la glía. Este hecho hace que, ante cualquier perturbación del ambiente, ya sea por lesiones traumáticas, isquemias, agregación proteica o por invasión de microorganismos, se desencadene una respuesta inflamatoria mediada por células gliales.

Durante el envejecimiento, se observa una neuroinflamación crónica provocada por la activación de las células de la glía, principalmente la microglia, en respuesta a la acumulación de daño oxidativo, la disfunción mitocondrial y la pérdida de la proteostasis que conducen a alteraciones en la homeostasis

del SNC. La liberación sostenida en el tiempo de mediadores inflamatorios, constituye un proceso implicado en la progresión de múltiples enfermedades neurodegenerativas. En estas condiciones, las células de la glia sufren cambios genotípicos y morfológicos, aumentan la secreción de mediadores inflamatorios como citoquinas y radicales libres, así como neurotrofinas, factores de crecimiento y proteínas de la matriz extracelular, que pueden favorecer la supervivencia o inducir la muerte de las neuronas cercanas, de las propias células gliales y de otros tipos celulares¹²⁶⁻¹²⁸.

1.4.1 Microglia: conceptos y funciones generales

Las células de la microglia constituyen los macrófagos residentes altamente versátiles en el SNC, comprenden del 5 al 20% de la población total de células gliales¹²⁹. En 1919, Pío del Río-Hortega, discípulo de Ramón y Cajal, reconoció a las células microgliales como un tipo celular diferente de las otras células gliales. También caracterizó la transformación microglial de un fenotipo ramificado en células fagocíticas ameboides parecidas a macrófagos ante ciertas lesiones cerebrales¹³⁰. Estas células derivan de progenitores de origen mesodérmico/mesenquimal provenientes del saco vitelino en el día embrionario 8,5 (E8,5), que migran al encéfalo desde E9,5-10,5 hasta que se forma la barrera hematoencefálica (E13,5-14,5)¹³¹⁻¹³⁴. En esta etapa embrionaria, presentan una morfología ameboide que luego modifican y adquieren un fenotipo ramificado al invadir el parénquima del encéfalo, donde proliferan y se distribuyen¹³⁵.

Las células microgliales vigilan constantemente el microambiente que las circunda y responden ante variaciones en el medio, actuando como la primera línea de defensa del SNC. Para garantizar dicha defensa inmunológica del cerebro y mantener la homeostasis, la microglia es capaz de percibir una gran variedad de estímulos del medio que la rodea a través de múltiples receptores presentes en sus membranas celulares, mediando así procesos pro o anti-inflamatorios. En estos contextos, pueden ejercer un rol protector removiendo agentes patógenos, moléculas tóxicas, restos de matriz extracelular, derivados de mielina y depósitos de proteínas, cuya acumulación contribuye a la inflamación local e inhibe la regeneración y reparación tisular. Además, la microglia produce factores de crecimiento que promueven la remielinización. En otras palabras, las células microgliales constituyen los principales moduladores de la inflamación, cumpliendo un rol fundamental en la resolución de procesos infecciosos, desarrollo de enfermedades autoinmunes, respuesta al trauma, isquemia y en la neurodegeneración relacionada con estos procesos^{136,137}.

La microglia puede recibir dos tipos de señales: una señal de activación “eat me”, la cual desencadena la respuesta de estas células, o una señal de inactivación o permanencia en estado de vigilancia “don’t eat me”¹³⁸⁻¹⁴⁰.

- Señales “Eat me”: presentan diversas naturalezas bioquímicas y origen. Aquí podemos encontrar a patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y patrones moleculares asociados a células apoptóticas (ACAMPs). El reconocimiento de estas señales requiere de la expresión previa de receptores fagocíticos conocidos como receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, por sus siglas en inglés *Pattern Recognition Receptors*)¹³⁵. Los PAMPs son componentes de microorganismos que inducen una fuerte respuesta inmune, como por ejemplo estructuras moleculares asociadas con la pared bacteriana, envoltura viral, o sus respectivos ADNs/ARNs¹⁴¹. Estos patrones son reconocidos por receptores tipo Toll (TLR), receptores scavenger (SR) y receptores del complemento (CR)¹⁴². El reconocimiento de PAMPs desencadena una respuesta proinflamatoria en las células microgliales. Los ACAMPs son señales provenientes de células apoptóticas, como son proteínas oxidadas de baja densidad, alteración en la carga eléctrica de la membrana plasmática, ácidos nucleicos y fosfatidilserina. Estos patrones son reconocidos por receptores SR, la inmunoglobina mucina 4 de células T (TIM-4) de macrófagos, el receptor purinérgico P2Y6¹⁴³, el receptor Fc (FcR) y el receptor desencadenante expresado en las células mieloides (TREM2)¹⁴⁴. El reconocimiento de ACAMPs desencadena una respuesta antiinflamatoria en las células microgliales (**Figura 7**).
- Señales “don’t eat me”: Estas señales se expresan de manera constitutiva y permanente en condiciones fisiológicas normales y mantienen a la microglia en un estado de vigilancia. Pertenecen a esta clasificación la interacción entre distintos pares ligando-receptor presentes en las membranas de las neuronas y las células microgliales, respectivamente: CD200-CD200R¹⁴⁵, CX3CL1-CX3CR1¹⁴⁶ y CD47-SIRP¹⁴⁷, entre otros. En este caso, cualquier insulto que afecte la integridad neuronal e interrumpa alguna de estas señales es reconocido como una alteración de la homeostasis y por tanto desencadena la activación de la microglia^{135,139}.

Otra función reconocida de las células microgliales es el mantenimiento de las sinapsis. Estas células promueven la sinaptogénesis durante el desarrollo mediante la secreción de factores de crecimiento^{148,149}, a la vez que regulan el número de sinapsis, eliminando aquellas que no son efectivas durante el proceso de “poda sináptica” (*synaptic pruning*)^{150,151}. En el SNC adulto, las ramificaciones de la microglia interactúan directamente con las terminales y hendiduras sinápticas, espinas dendríticas y procesos astrocíticos¹⁵²⁻¹⁵⁴. Estas interacciones posibilitan el reconocimiento de la actividad neuronal y/o las alteraciones estructurales en base a las cuales la microglia facilita la eliminación o maduración de las sinapsis¹⁵⁵. De esta forma interviene en la preservación y organización de las redes neuronales.

La microglia expresa receptores para diversos neurotransmisores como glutamato, GABA, noradrenalina, acetil-colina y dopamina y, por consiguiente, puede detectar alteraciones en la concentración fisiológica de cada uno de ellos¹⁵⁶. Un aumento o disminución de estos neurotransmisores es indicativo de una alteración en la actividad neuronal, percibida por la microglia como un signo de lesión. En general, los neurotransmisores actúan como una señal de apagado, a excepción del glutamato, cuya liberación en exceso resulta citotóxica e induce la muerte neuronal (proceso conocido como excitotoxicidad), por lo que promueve la activación de la microglia¹³⁹.

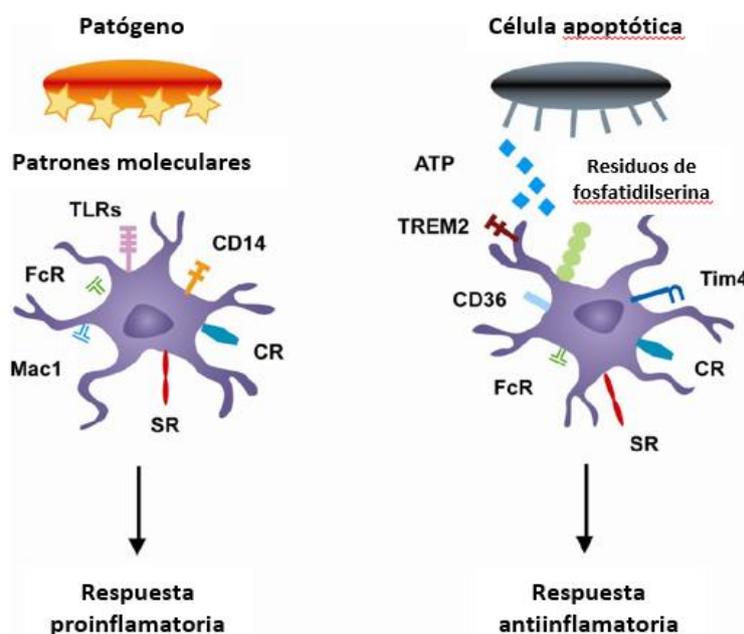


Figure 7 Receptores fagocíticos expresados por las células. La microglia reconoce patrones estructurales específicos mediante diferentes receptores fagocíticos que conducen a una respuesta pro o antiinflamatoria. Los receptores microgliales reconocen diferentes patrones estructurales de patógenos microbianos como PAMP, receptores tipo Toll (TLR), el receptor Fc (FcR), el receptor del complemento (CR) o los receptores scavenger (SR) que conducen a una respuesta proinflamatoria (izquierda). Los ACAMP, incluyendo la fosfatidilserina (PtdSer) expresada por las células apoptóticas, actúan a través de receptores microgliales como el receptor desencadenante expresado en células mieloides (TREM2), los receptores purinérgicos (P2Y6), FcR, Tim4 o SR y conducen a la captación de esas células apoptóticas. En este caso, la fagocitosis se asocia con la respuesta microglial antiinflamatoria. Ilustración modificada de Napoli y Neumann, 2009¹⁴².

1.4.2 Activación de las células microgliales

En el SNC adulto sano, la microglia “en estado de vigilancia” presenta una morfología ramificada. El soma de estas células permanece en un sitio determinado, prácticamente sin migrar. Por el contrario, los procesos celulares presentan una alta motilidad, presentando ciclos continuos de elongación y acortamiento de los mismo. Esta dinámica estructural permite a la microglia examinar continuamente el ambiente que las rodea¹⁴¹. Así, la microglia se distribuye de manera tal que sus ramificaciones cubren gran parte del volumen del parénquima cerebral adulto sin que sus dominios se superpongan¹⁵⁷. Sin embargo, ante un cambio en la homeostasis, ya sea debido a una alteración en la actividad neural, lesión,

infección o enfermedad degenerativa, la microglia responde rápidamente mediante un proceso denominado “activación microglial”, modificando su perfil transcripcional, funcional y morfológico. En contraste con la microglia “en vigilancia”, la microglia “activada” presenta un fenotipo ameboide, con un soma más grande y procesos reducidos^{136,158,159}. Además, esta microglia presenta una elevada capacidad migratoria, que le permite dirigirse al foco de inflamación, y una alta capacidad proliferativa y fagocítica¹³⁵. Dependiendo del balance de las señales detectadas, la microglia puede promover la neurodegeneración en el medio circundante o, por el contrario, cumplir un rol neuroprotector y regenerativo^{160,161}.

Se han propuesto dos categorías de activación microglial: clásica o alternativa^{126,158,160,162}. La activación por la vía clásica se da tras la estimulación de, entre otros, receptores TLR por sus ligandos o por la acción de IFN γ o citoquinas producidas por linfocitos Th1 (como IL-1 β y IL-6). Este proceso desencadena la liberación de citoquinas proinflamatorias y aumenta la expresión de la enzima inducible óxido nítrico sintasa (iNOS), que promueve la síntesis de óxido nítrico. Esta microglia se conoce como proinflamatoria (M1) y se caracteriza por presentar un perfil secretor con elevada expresión de moléculas presentadoras de antígeno (MHCII, CD86, receptores Fc γ), liberación de citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF α) y producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, creando así un entorno citotóxico que conduce a la neurodegeneración del microentorno circundante^{126,160,162,163}. En cuanto a la activación alternativa, se ha descrito que la microglia estimulada con citoquinas producidas por linfocitos Th2 (como IL-4 y IL-13), así como IL-10 y TGF β induce la secreción de más citoquinas antiinflamatorias y aumenta la expresión de receptores relacionados con la inhibición de la inflamación, la recuperación de la homeostasis y la regeneración neuronal^{164,165}. Esta microglia se conoce como antiinflamatoria (M2) y se caracteriza por presentar un perfil secretor con elevada liberación de citoquinas antiinflamatorias (IL-4, IL-10, TGF β , IGF1, VEGF) así como un aumento de la expresión de la enzima Arginasa 1^{126,158,162,166}. Esta enzima compete con la iNOS por el aminoácido L-Arginina y lo metaboliza a L-Ornitina, el cual luego es utilizado para la producción de colágeno y poliaminas empleados en la proliferación y reparación tisular¹⁶⁷⁻¹⁶⁹. De este modo, la microglia M2 disminuye la inflamación del ambiente circundante y promueve la síntesis de los componentes de la matriz extracelular, favoreciendo así los procesos de reparación de tejidos y cicatrización de heridas.

Dados los efectos opuestos de la microglia M1 y M2 sobre el tejido, es de vital importancia que la actividad microglial se encuentre bajo una estricta regulación de modo de asegurar la eliminación de elementos dañinos sin amenazar a las células sanas. En este sentido, los individuos jóvenes y sanos presentan una regulación bien equilibrada de la actividad microglial, mientras que, con el envejecimiento y en condiciones patológicas, se produce un desequilibrio de la misma^{170,171}.

1.4.3 Microglia y envejecimiento

Como se mencionó en la sección 1.1.2 de la introducción, el envejecimiento cerebral presenta alteraciones celulares y moleculares de distintos tipos, siendo las células de la microglia una de las poblaciones afectada. Los estudios pioneros de Streit y colaboradores demostraron que, conforme un individuo envejece, su microglia comienza a adoptar una morfología distrófica o senescente. Estas células están caracterizadas por presentar fragmentación del citoplasma y procesos acortados y tortuosos o sin ramificaciones^{172,173}. Además, la microglia senescente sufre un proceso de degeneración debido a la edad que provoca la pérdida de sus funciones neuroprotectoras, contribuyendo al establecimiento de enfermedades neurodegenerativas¹⁷⁴. Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que la microglia envejecida presenta una capacidad migratoria y fagocítica reducida, menor producción de factores neurotróficos y es más insensible a estímulos^{170,174-179}. Estas alteraciones conducen a una menor vigilancia del medio circundantes y una regulación sináptica deteriorada¹⁷⁸. La microglia envejecida presenta un patrón de activación desbalanceado hacia un estado pro-inflamatorio. Se ha visto que en el envejecimiento hay un marcado incremento en la producción y secreción de IL-1 β , IL-6 y TNF α por parte de la microglia^{170,180} y una mayor expresión de PRRs tales como TLR y CD14¹⁸¹. Se ha observado, además, que esta microglia es incapaz de regular este desbalance y cambiar su estado de activación a un fenotipo antiinflamatorio M2 para regular el ambiente pro-inflamatorio del envejecimiento^{182,183}. En conclusión, las alteraciones que sufre la microglia durante el envejecimiento contribuyen a la pérdida de la homeostasis y al establecimiento de un ambiente pro-inflamatorio característico del envejecimiento.

1.5 TERAPIA GÉNICA

1.5.1 Aspectos generales.

En general, se define a la terapia génica como la transferencia de material genético con fines terapéuticos. Alternativamente, se la puede definir como el tratamiento de enfermedades, hereditarias o adquiridas, mediante la transferencia *in vivo* de polinucleótidos que alteran la expresión de proteínas específicas resultando en un beneficio terapéutico^{184,185}. Este objetivo puede lograrse mediante la producción de una proteína o ARNm, por reemplazo o suplementación del producto de un gen que está ausente o defectuoso¹⁸⁵. Asimismo, el beneficio terapéutico puede lograrse mediante la supresión de genes, ARNm o por la interacción con proteínas (aptámeros) resultando en el bloqueo selectivo de la expresión o de la actividad de una proteína implicada en la enfermedad¹⁸⁶.

La terapia génica puede realizarse por medio de estrategias “*ex vivo*” o “*in vivo*”. En las estrategias “*ex vivo*”, al paciente se le extraen las células blanco o las células madre e *in vitro* se les transfiere el material genético (terapéutico). Luego, estas células son reinsertadas en el organismo. Estos métodos

mejoran la eficiencia de la transferencia génica y minimizan la respuesta inmunológica. Sin embargo, están limitados a las células que están disponibles para su extracción o al cultivo a partir de células madre¹⁸⁷. En las estrategias “*in vivo*”, el material génico se administra directamente al paciente utilizando distintos métodos de transferencia de ácidos nucleicos¹⁸⁸.

Las moléculas terapéuticas codificadas por ácidos nucleicos presentan una ventaja significativa respecto de las drogas actualmente disponibles mediante el reconocimiento selectivo de los blancos moleculares proporcionando una elevada especificidad de acción¹⁸⁶. Por consiguiente, en los casos en los cuales la terapia génica involucra la corrección de la disfunción de un gen a través de la introducción y expresión de su copia correcta, se obtiene como resultado la producción de una única proteína. Análogamente, cuando la terapia génica involucra el silenciamiento de genes, sólo los genes seleccionados son apagados, asegurándose la especificidad en el control de la enfermedad. De este modo, la disponibilidad de proteínas terapéuticas mediante la terapia génica tiene la capacidad potencial de mejorar la eficacia, la conveniencia y la efectividad de costo en el tratamiento de una variedad de enfermedades.

Una limitación de la terapia génica como estrategia terapéutica es que la captación celular de moléculas de ADN desnudo es un proceso ineficiente. Estas moléculas son inestables *in vivo* por ser rápidamente degradadas por exo- y endonucleasas hidrolíticas¹⁸⁶. Consecuentemente, se han desarrollado numerosas estrategias de transferencia de polinucleótidos, tanto *in vitro* como *in vivo*, para facilitar la inserción de estas moléculas en las células blanco y para protegerlas de la degradación celular. El tipo de molécula terapéutica y el propósito clínico que se persigue, determinan la elección de la estrategia a utilizar.

El mayor desafío de la terapia génica es el desarrollo de métodos que transfieran un gen terapéutico (transgén) a las células seleccionadas y que logren una apropiada expresión del gen. Un método óptimo de transferencia génica debe lograr, como mínimo, tres objetivos: (1) proteger al transgén de la degradación por las nucleasas en la matriz extracelular, (2) transportar el transgén a través de la membrana plasmática y, si es necesario, introducirlo al núcleo de las células blanco, y (3) no generar efectos perjudiciales¹⁸⁹.

Los métodos de transferencia de ácidos nucleicos (**Tabla 1**) pueden ser clasificados en físicos y en vectoriales. Generalmente, los métodos físicos inducen lesiones transitorias o defectos en la membrana celular para facilitar el ingreso del ADN a las células blanco¹⁸⁹.

Tabla 1. Principales métodos de transferencia de ácidos nucleicos ^{184,186,189}		
Físicos		Mecánicos: Microinyección y Bombardeo de partículas Eléctricos: Electroporación Ultrasonido Hidrodinámica
Sistemas de transferencia mediados por vectores	No-virales	Sistemas poliméricos (polímeros catiónicos) Sistemas liposomales, por ej.: inmunoliposomas, liposomas catiónicos Híbridos lípido-polímeros Lípidos catiónicos, por ej.: Lipofectamina Nanopartículas, por ej.: poliméricas, de oro, magnéticas
	Virales	Vectores adenovirales Vectores retrovirales y lentivirales Vectores herpéticos Vectores adenoasociados

Los sistemas de transferencia génica vectoriales, como su nombre lo indica, utilizan vectores (vehículos) para administrar los ácidos nucleicos. Los vectores virales provienen de virus que fueron modificados genéticamente con el fin de impedir que se repliquen dentro de las células huésped. A diferencia de los vectores no-virales, estos vectores presentan una elevada eficiencia en la transferencia de ácidos nucleicos. Ésta es la principal ventaja de la utilización de virus como vectores de transferencia génica. Sin embargo, también poseen desventajas, tales como la respuesta inmune que desencadenan, la limitación en el tamaño del transgén que pueden transportar, lo dificultoso de su producción a escala industrial y la potencial mutagénesis insercional que pueden producir (lo cual depende del tipo de vector viral utilizado)^{184,186,189}. Los principales tipos de vectores virales en uso son los retrovirus, adenovirus (Ad), lentivirus (derivados del VIH), vectores herpéticos y vectores adeno-asociados (AAV).

Actualmente, más del 60% de los ensayos clínicos de terapia génica que se están conduciendo emplean vectores virales, de los cuales el 60% son vectores adenovirales y retrovirales (<http://www.abedia.com/wiley/vectors.php>).

1.5.2 Vectores Adenovirales

Las partículas adenovirales consisten en una cápside icosaédrica desnuda de 70 a 100 nm de diámetro, la cual encapsula el ADN genómico de doble cadena¹⁹⁰ (**Figura 8**).

Se han aislado más de 51 serotipos de adenovirus en humanos y no humanos y se los han clasificado en subgrupos (de la A a la F). Los adenovirus pueden infectar células de diversos tejidos, tales como las

vías respiratorias, urinarias, los ojos y el hígado. En humanos, los adenovirus causan infecciones oculares, respiratorias en vías aéreas superiores (subgrupo C) e intestinales y no son oncogénicos.

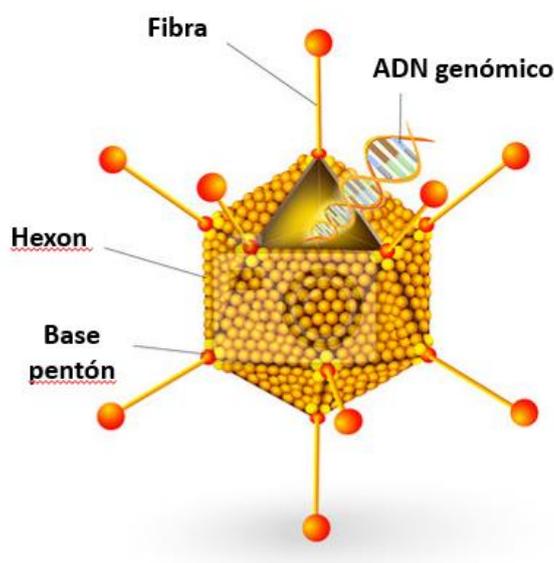


Figura 8. Esquema de la estructura del adenovirus tipo 5.

La infección viral se inicia con el reconocimiento e interacción específica entre proteínas de la cápside viral y receptores de la superficie de la célula blanco. De este modo, el ingreso del virus a las células blanco, mediante este proceso de reconocimiento e interacción altamente selectivo, es un paso limitante para que se desarrolle un ciclo de infección exitoso.

Entre los más de cincuenta serotipos descritos¹⁹¹, el más comúnmente utilizado como vector para la transferencia de genes es el adenovirus serotipo 5 (Ad5)¹⁹². Los Ad5 se unen a la célula blanco por la interacción del botón terminal de la fibra viral con receptores celulares de superficie de alta afinidad para adenovirus y virus coxsackie B, denominados CAR (**Figura 9.A**). Los CAR son un tipo de proteína transmembrana de la superfamilia de las inmunoglobulinas que intervienen en la endocitosis de la mayor parte de los adenovirus¹⁹³, siendo las integrinas ($\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ y $\alpha_3\beta_1$) de la célula hospedadora co-receptores que median también el ingreso de los adenovirus a la célula.

Las vesículas con viriones en su interior se incorporan a la vía endosomal y posteriormente se libera el virión al citoplasma para finalmente, el virión se une específicamente al complejo del poro nuclear y el ADN viral ingresa al núcleo (**Figura 9.A**)¹⁹⁴, donde el genoma viral permanece en un estado no integrado o episómico y comienzan los procesos de transcripción de los genes virales y de replicación del genoma viral.

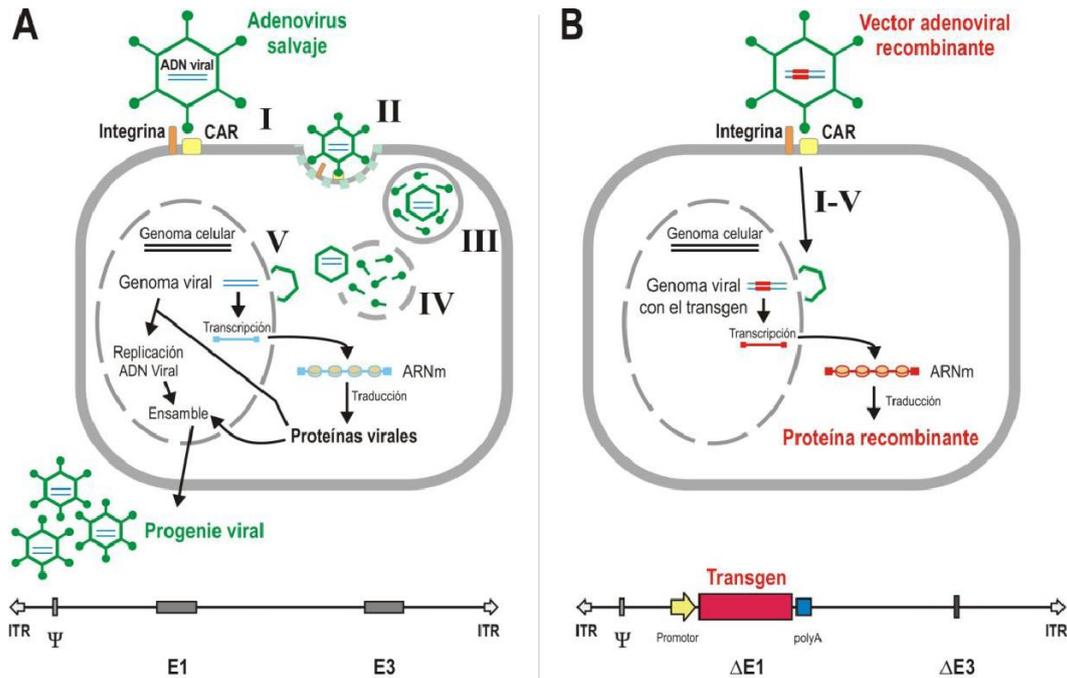


Figura 9. Esquemas del ciclo de infección de los adenovirus salvajes y de vectores adenovirales recombinantes. (A) Los adenovirus salvajes se unen a la superficie celular, primero mediante la interacción CAR-fibra viral y luego por la interacción integrina-pentón base (I), que desencadena una cascada de señales y la endocitosis de los viriones en vesículas recubiertas de clatrina (II). El endosoma se acidifica, lo que causa cambios en la cápside, resultando en la liberación de las fibras, el desensamble de los vértices y la exposición de proteínas estructurales (III). Se produce la lisis de la membrana endosomal y el escape de los viriones parcialmente desensamblados (IV). Estos viriones se unen a proteínas del citoesqueleto y llegan a la membrana nuclear donde se unen al complejo del poro nuclear, lo que resulta en el desensamble de la cápside y en la liberación del genoma viral dentro del núcleo de la célula hospedadora (V). En el núcleo, el genoma viral permanece como un episoma, donde se replica y se traducen sus proteínas. El ADN viral es empaquetado y la cápside se ensambla en el núcleo, de esta manera se genera la progenie viral, que lisa la célula infectada. En la parte inferior de la figura se observa la representación del genoma del adenovirus salvaje que consta de los ITRs, la señal de empaquetamiento (Ψ) y todos los genes, incluyendo las regiones E1 y E3. **(B)** Los RAd entran a la célula blanco mediante los mismos pasos que los Ad salvajes (I a V). Sin embargo, una vez que el ADN viral, portador del transgen de interés, se encuentra como un episoma en el núcleo, no se produce la replicación del ADN (debido a que carecen de la región E1), ni se producen nuevas partículas virales. Por lo tanto, el transgen se expresa produciendo grandes concentraciones de la proteína recombinante (típicamente detectable dentro de las 24 hs). En la parte inferior se observa la representación del genoma del RAd que carece de las regiones E1 y E3 ($\Delta E1$ y $\Delta E3$) y contiene el resto de los genes virales, los ITRs, la señal de empaquetamiento y, en la región $\Delta E1$, el casete de expresión del transgen de interés, con un promotor y una señal de poliadenilación (polyA).

Se han desarrollado diversas estrategias para la generación de vectores adenovirales recombinantes (RAd), las cuales se basan en efectuar modificaciones en el genoma viral en el que subsecuentemente se clona el transgen de interés. Los primeros vectores adenovirales (RAd) en construirse se basaron en adenovirus a los que se les suprimieron genes de expresión temprana E1 o E1 y E3 del genoma viral, denominados *vectores adenovirales de primera generación* (Figura 9.B y Figura 10). La eliminación de la región E1 impide la replicación del virus y generación de progenie^{195,196}, la supresión de la región E3

genera más espacio dentro del genoma para clonar secuencias exógenas (hasta 7,5 kb)¹⁹⁷. En consecuencia, la utilización de estos RAds replicación-defectivos evita una infección viral generalizada.

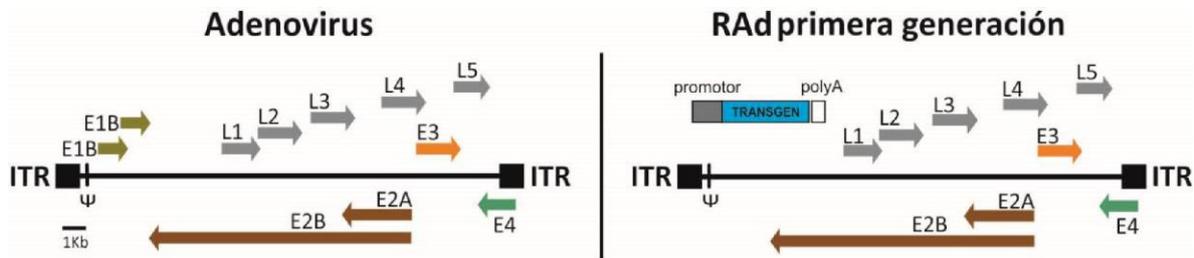


Figura 10. Representación esquemática de la organización genética de los adenovirus y sus respectivos vectores. En los vectores Ad se indica la localización de la inserción del casete portador del transgen. ITR, repeticiones invertidas terminales. Ψ , señal de empaquetamiento. Modificado de **Giacca, 2007**.

El sistema utilizado para construir RAds de primera generación (Microbix Company) se basa en la recombinación homóloga dirigida por la acción de la FLP recombinasa. En este proceso, se recombinan: 1) un plásmido *shuttle*, el cual contiene los extremos ITR del genoma del adenovirus, la señal de encapsidación, el cassette de expresión del transgen en el lugar de la región E1 y el sitio FRT de reconocimiento enzimático y 2) un plásmido *genómico*, el cual consiste en la mayor parte del genoma del adenovirus salvo por las regiones E1 y E3, siendo además portador del cassette de expresión de la FLP recombinasa. La amplificación de estos vectores sólo puede llevarse a cabo en líneas celulares que contengan la región genómica E1 faltante necesaria para iniciar la replicación¹⁹⁸, como la línea transgénica derivada de riñón de embrión humano 293 (HEK293).

Un factor importante a considerar para los estudios *in vivo*, con animales de experimentación, es la duración de la expresión del transgén mediada por los adenovirus. Generalmente, el nivel de expresión del transgén tiene un pico durante los días 1 a 7, dependiendo del tejido y de la zona de inyección y disminuye rápidamente a valores indetectables durante la tercera a quinta semana.

Los RAds cuentan con algunas ventajas respecto a los otros vectores virales: i) son capaces de transducir eficientemente un amplio rango de tejidos y tipos celulares, en estado proliferativo o quiescente; ii) poseen una gran capacidad de clonado; iii) son fáciles de manipular en el laboratorio; iv) son factibles de producirse en títulos elevados; v) el genoma de los RAds no se integra al genoma de la célula huésped, permanece en un estado episómico, descartando el riesgo de mutagénesis insercional; y vi) poseen una alta eficiencia de expresión génica^{190,195,196}. Sin embargo, los vectores Ad poseen una importante limitación, la intensa respuesta inmune que inducen en el hospedador, dirigida contra la partícula viral y las células infectadas. Como consecuencia de dicha respuesta se limita la duración de la

expresión del transgén (la cual generalmente es transitoria). Sin embargo, elegimos para el presente trabajo a los vectores adenovirales de primera generación en base a las siguientes razones:

1) Se consideraron las ventajas, antes mencionadas, de los Ad respecto a los otros vectores virales y se especuló que la respuesta inmune desencadenada por estos vectores, su principal desventaja, podría verse atenuada al implementar la terapia génica en el cerebro, un sitio de inmunoprivilegio.

2) Durante los últimos 15 años hemos desarrollado la tecnología necesaria para la construcción de vectores adenovirales recombinantes de primera generación, por lo que esta tecnología estaba bien establecida en nuestro laboratorio al momento de trazarse los objetivos de esta tesis.

1.6 FACTORES TRÓFICOS

1.6.1 Factor de Crecimiento similar Insulina tipo 1 (IGF1)

El factor de crecimiento insulino similar tipo 1 (IGF1, *Insulin like growth factor 1*) (**Figura 11**) es una hormona polipeptídica que pertenece a la superfamilia de la insulina¹⁹⁹ y es sintetizado en múltiples órganos incluyendo hígado, pulmones, riñones, timo, corazón, músculo, gónadas y cerebro²⁰⁰. Sin embargo, la mayor parte del IGF1 circulante es secretado por el hígado en respuesta a la hormona de crecimiento^{201,202}. De esta forma, el IGF1 media la actividad anabólica y mitogénica de dicha hormona, ejerciendo acción parácrina en los diferentes tejidos²⁰³.

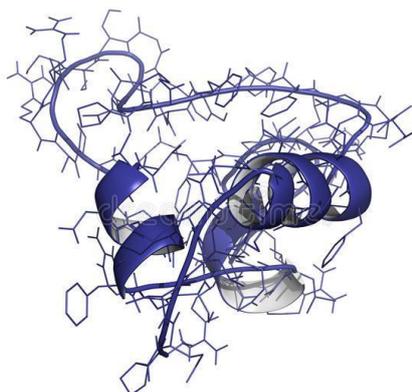


Figura 11. Estructura del IGF1

En el medio extracelular, el IGF1 se une a proteínas de unión a los factores de crecimiento similar insulina (IGFBPs). Aproximadamente el 90% del IGF1 en sangre se encuentra unido a IGFBPs²⁰⁴, por lo que estas proteínas son capaces de regular la cantidad de IGF1 disponible y prolongar su vida media en circulación. Además, las IGFBPs modulan el transporte del IGF1 hacia células y tejidos determinados,

inhiben o facilitan la interacción con sus receptores específicos al regular su disponibilidad y, por ende, la acción mitogénica y anabólica del IGF1 en sus células diana^{205,206}.

La mayoría de las funciones biológicas del IGF1 son mediadas a través de la unión a su receptor IGF1-R: un receptor heterotetramérico compuesto de 2 subunidades α extracelulares y 2 subunidades β transmembrana. Ambas subunidades α poseen sitios de unión al IGF1 y están conectadas por puentes disulfuro, mientras que las cadenas β poseen un dominio extracelular pequeño, un dominio transmembrana y un dominio intracelular con actividad tirosina quinasa, responsable de la transducción de señales²⁰⁷. La unión del IGF1 a su receptor provoca que este último se fosforile activando principalmente la ruta de Akt, pero también otras como mTOR, MAPK, GSK3 β , FOXO, HDM2, Grb2 y Shc. Todas estas rutas se encuentran directamente relacionadas con la supervivencia celular y la proliferación²⁰⁷⁻²⁰⁹. Además, debido a la gran homología que existe con la insulina, el IGF1 es capaz de unirse a su receptor (IR), aunque con menor afinidad, y activarlo. Tanto IR como IGF1-R fosforilan proteínas sustrato del receptor de insulina (IRS, *insulin receptor substrate*), principalmente IRS-1 a IRS-4, y proteínas Shc, activando las dos principales cascadas moleculares²¹⁰:

- 1) Los IRSs fosforilados activan la vía de la enzima fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K), la cual media el transporte de glucosa, síntesis de glucógeno, síntesis proteica y mitogénesis, a la vez que inhibe la apoptosis²¹¹⁻²¹⁴.
- 2) La fosforilación de la proteína adaptadora Grb2 conduce a la activación de la proteína G-Ras, que finalmente activa a la cascada de la vía Erk/MAPK. Esta cascada está relacionada con la diferenciación celular^{215,216} y con la regulación de la maquinaria de apoptosis²¹⁷.

En la figura 12 se muestran las rutas intercelulares mediadas por IGF1.

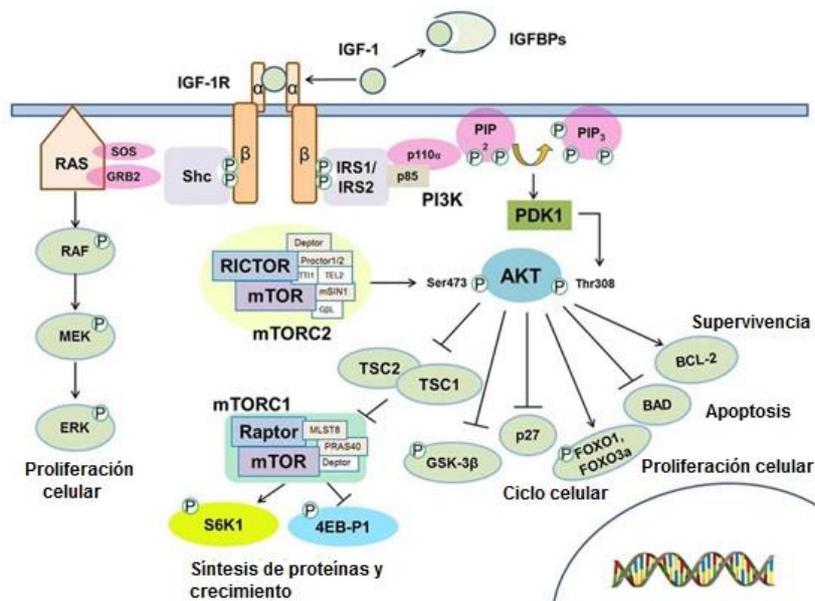


Figura 12. Vías de señalización del IGF1 (Modificado de Jung & Suh, 2014)²¹⁸

1.6.1.1 Funciones fisiológicas del IGF1 en el Sistema Nervioso Central

En el SNC, el IGF1 es producido por distintos tipos celulares, principalmente por las células de la microglia, y en segundo lugar por astrocitos y neuronas. Durante el desarrollo del SNC, los IGFs y IGF-R se expresan ampliamente de una manera temporal específica. La expresión de IGF1 alcanza su punto máximo perinatalmente y disminuye a lo largo de la vida, aunque persiste en regiones cerebrales donde se han descritos nichos neurogénicos, como son el cerebelo, el bulbo olfatorio y el giro dentado. Sin embargo, los niveles son mucho más bajos que en etapas tempranas²¹⁹.

El IGF1 circulante es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica (BBB, por sus siglas en inglés *Blood Brain Barrier*) cuando es requerido²²⁰, este proceso inicia con la liberación de glutamato en regiones activas, induciendo: i) vasodilatación que, al aumentar el flujo sanguíneo promueve la captación de IGF1 y ii) aumento de la actividad de la metaloproteasa 9, la cual cliva la IGFBP unida al IGF1, quedando éste libre para interactuar con su receptor en la célula endotelial. El IGF1 es entonces transportado desde las células endoteliales a las células de la glia, quienes luego lo liberan al medio extracelular²²¹, proceso denominado transcitosis.

Estudios con ratones transgénicos deficientes en IGF1 han demostrado que este factor es esencial para el correcto desarrollo del SNC^{222,223}. En cultivos primarios neuronales y de líneas celulares neuronales, se observó que el IGF1 posee acciones neurotróficas, tales como la proliferación celular, la supervivencia, el crecimiento de las neuritas y la diferenciación²²³⁻²²⁶. También se ha demostrado que el IGF1 es un modulador específico de la formación de sinapsis, la liberación de neurotransmisores y la excitabilidad neuronal^{227,228}.

El IGF1 es un potente factor neurotrófico y neuroprotector de gran interés para el rescate neuronal en procesos neurodegenerativos²²⁹. Se ha demostrado que, en respuesta a diferentes daños, el cerebro aumenta la producción de factores de crecimiento, entre ellos el IGF1²³⁰. Así, la lesión electrolítica del hipocampo induce un aumento del IGF1 extracelular en la zona lesionada²³¹; de manera similar, en condiciones de daño citotóxico del hipocampo, la microglia de esta región aumenta sustancialmente la producción del IGF1²³². Además, se ha reportado que, en situaciones de estrés oxidativo, el IGF1 ejerce una acción protectora sobre los astrocitos colaborando en la neuroprotección²³³. Estos hallazgos han impulsado el estudio de los efectos del IGF1 frente a diversos tipos de injuria.

El descenso progresivo en los niveles cerebrales de IGF1 con la edad está relacionado con el deterioro de las funciones fisiológicas asociadas al envejecimiento y a otras enfermedades neurodegenerativas. En la enfermedad de Parkinson, por ejemplo, el IGF1 demostró estar involucrado en la protección neuronal contra la degeneración que presentan las neuronas dopaminérgicas en esta patología^{234,235}. Además, en la esclerosis lateral amiotrófica, una enfermedad caracterizada por una progresiva

disminución de motoneuronas, estudios preclínicos han evidenciado que el IGF1 es capaz de atenuar la pérdida neuronal y mantener las sinapsis y las uniones neuromusculares²³⁶.

El IGF1 ha sido utilizado en diferentes modelos experimentales con fines neuroprotectores, obteniéndose resultados prometedores. Se ha visto que en ratas seniles la administración del IGF1 restaura la tasa de neurogénesis en el hipocampo²³⁷ y, parcialmente, su déficit cognitivo²³⁸. Además, la inyección de IGF1 en un modelo de ataxia por desafección del cerebelo es capaz de promover la reinervación, recuperándose la actividad motora total²³⁹. Más aún, el IGF1 cumple un rol neuroprotector en modelos de hipoxia-isquemia, donde es capaz de reducir la pérdida de neuronas colinérgicas y GABAérgicas²⁴⁰.

En conclusión, la evidencia existente sobre el empleo de IGF1 como agente neuroprotector, respalda la utilización del mismo con fines terapéuticos.

1.6.1.2 Terapia génica con IGF1

Nuestro grupo de investigación ha fijado como objetivo de estudio combatir los efectos deletéreos del envejecimiento en ratas seniles mediante la implementación de la terapia génica con IGF1, empleando vectores adenovirales recombinantes para administrar el gen. Hemos demostrado que la inyección intracerebroventricular (ICV) de los RAd representa una estrategia efectiva para incrementar los niveles de IGF1 en el LCR. Los RAd inyectados ICV transducen a las células del epéndimo que luego sobreexpresan el transgen transportado por el virus (**Figura 13**). En el caso del RAd-IGF1, la inyección ICV del mismo conduce a la sobreexpresión de IGF1 en las células endimarias que luego lo secretan, aumentando la concentración de este factor hasta 4 veces luego de 20 días de inyección²⁴¹. Desde entonces, hemos implementado terapia ICV con RAd-IGF1 en ratas seniles, obteniendo resultados prometedores: hemos demostrado que la terapia es capaz de mejorar el desempeño motor²⁴²; se evidenció una mejora significativa en la memoria espacial de ratas seniles, junto con un incremento de la neurogénesis y de la arborescencia astrocitaria hipocampal²⁴³. Nuestro grupo también reportó, empleando secuenciación de ARN total de hipocampo, una expresión diferencial de numerosos genes relacionados con la plasticidad sináptica y función neuronal en general en ratas seniles tratadas con RAd-IGF1²⁴⁴.

Complementariamente, demostramos que la terapia génica intrahipotalámica para IGF1 en ratas seniles revirtió de manera efectiva la hiperprolactinemia de los animales a la vez que restauró el número de neuronas dopaminérgicas en el hipotálamo²⁴⁵. En un trabajo adicional de nuestro laboratorio, se estudió el impacto de la terapia génica con IGF1 sobre el eje hipotalámico-ovárico en ratas de mediana

edad, reproductivamente competentes; la sobreexpresión de IGF1 en el hipotálamo medio basal de ratas hembras de mediana edad prolongó la función ovárica²⁴⁶.

En base a estos resultados, consideramos que el estudio de la terapia génica con IGF1 como abordaje terapéutico es de suma utilidad para el estudio de la neurodegeneración dopaminérgica motora.

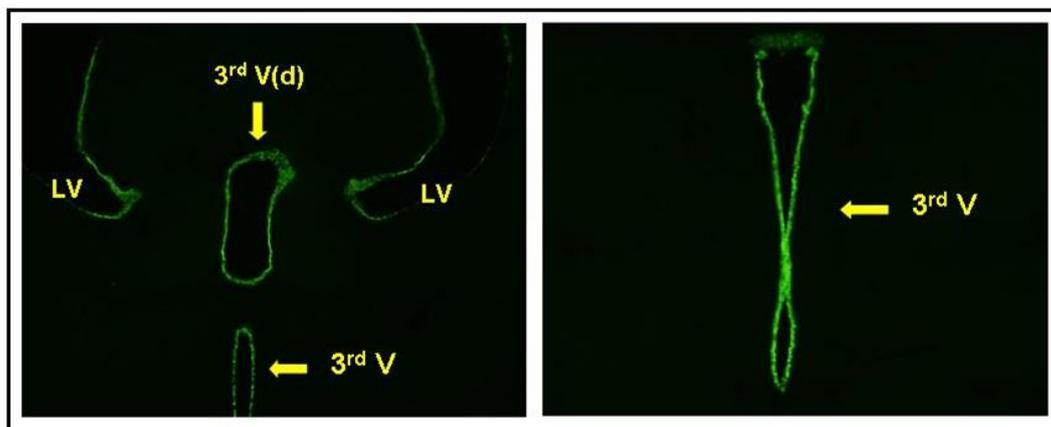


Figura 13. Expresión de RAD-GFP en las células del epéndimo de los ventrículos. El panel de la izquierda muestra una fotografía a 40x de la expresión de GFP en las células del epéndimo de los ventrículos laterales (LV) y en el tercer ventrículo (3V) y dorsal (D3V). En el panel de la derecha se muestra una fotografía de la expresión de GFP en 3V a mayor aumento (100x). Imagen modificada de Hereñu et al., 2009²⁴¹.

CAPÍTULO II: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El objetivo general en el que se enmarca la presente Tesis Doctoral es el estudio de cambios gliales observados en el envejecimiento y en el modelo de Enfermedad de Parkinson inducido por LPS, así como también en el desarrollo de estrategias terapéuticas antiinflamatorias que permitan prevenir y/o subsanar alteraciones funcionales y estructurales relacionadas con la edad y en condiciones patológicas. En este contexto, el uso de terapia génica con potentes moléculas neuroprotectoras, como el IGF1, emergen como abordajes terapéuticos promisorios.

2.1 HIPÓTESIS

Las hipótesis centrales de la presente tesis son:

- El envejecimiento cerebral modifica el número y el fenotipo de las células microgliales.
- La rata hembra senil de 28 meses, constituye un modelo natural de envejecimiento, presentando gliosis en regiones cerebrales involucradas con la Enfermedad de Parkinson.
- La inyección intranigral de LPS causa activación glial hacia un fenotipo pro-inflamatorio.
- Los cambios de la microglia debidos al envejecimiento y a la activación por LPS modifican la homeostasis cerebral pudiendo llevar a neurodegeneración dopaminérgica y alteración conductual.
- La terapia génica con IGF1 constituye una estrategia efectiva para la modulación de las células microgliales senescentes debido a su potencial anti-inflamatorio.
- El IGF1 polariza a la microglia hacia un fenotipo anti-inflamatorio y neuroprotector constituyendo una estrategia neuroprotectora/neurestauradora efectiva para reestablecer la homeostasis cerebral

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Los objetivos específicos propuestos fueron los siguientes:

- 1- Estudiar el efecto de la terapia génica con IGF1 sobre las células microgliales en distintas zonas del cerebro empleando el modelo animal de envejecimiento fisiológico.
 - 1.a Caracterizar morfológica y fenotípicamente a la microglia senescente.
 - 1.b Investigar el efecto sobre el desempeño motor.
- 2- Evaluar el efecto de la terapia sobre las funciones de la microglia y su ambiente circundante.
 - 2.a Estudiar la actividad fagocítica de la microglia.
 - 2.b Caracterizar el patrón de expresión molecular del microambiente.
- 3- Establecer un modelo de enfermedad de Parkinson asociado a neuroinflamación inducida por inyección intranigral de LPS.
 - 3.a Evaluar el déficit motor.
 - 3.b Estudiar el efecto sobre la microglia y las neuronas dopaminérgicas.
 - 3.c Investigar el efecto de la terapia génica con IGF1 una vez establecido el modelo.

CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Animales.

En el presente trabajo de Tesis Doctoral se utilizaron animales generados en el bioterio del Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata “Profesor Doctor Rodolfo R. Brenner” (INIBIOLP, La Plata, Argentina). Los animales experimentales fueron los siguientes:

- **Ratas Sprague-Dawley** hembra de 28 meses de edad. Estos animales se utilizaron en los estudios de terapia génica con IGF1 en el modelo de rata hembra senil.
- **Ratas Sprague-Dawley** machos de 4 meses de edad. Estos animales se utilizaron en los estudios de terapia génica con IGF1 en el modelo Parkinsoniano inducido por inyección de LPS intranigral.

Los animales se alojaron en una habitación con temperatura controlada (22-24 °C), ciclos de 12 hs de luz / 12 hs de oscuridad (luces de 8 am a 8 pm), con alimento y agua disponibles *ad libitum*. Los experimentos se realizaron de acuerdo con las normas de bienestar animal del NIH (A5647-01). Nuestros protocolos animales fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la FCM, UNLP (Protocolo #T09-01-2013).

3.2 Reactivos

3.2.1 Para tratamientos in vivo

- Lipopolisacárido de E. coli isotipo 055:B5 (Sigma-Aldrich, #102M4017V).
- Tramadol (10 mg/kg de peso corporal, ip)
- Ketamina (40 mg/kg de peso corporal, ip)
- Xilacina (8 mg/kg de peso corporal, im)

3.2.2 Para el procesamiento del tejido

- Paraformaldehído (Biopack).
- Sacarosa (Anedra, #AN00711809).
- Etilenglicol (Biopack)

3.2.3 Para inmunohistoquímica

- Na₂HPO₄ (Biopack)
- NaH₂PO₄ (Biopack)
- Solución de Lavado (0,3% Triton X-100 en PB 0,1 M)
- Tritón X-100 (Biopack)
- Metanol (Biopack)
- Peróxido de Hidrógeno (Biopack)

- Suero normal de caballo (Natocor)
- Kit ABC universal Vectastain® (Vector Laboratories, PK-6100)
- 3,3-Diaminobenzidina tetrahidrocloruro (Sigma-Aldrich Química, #SBLF8928V).
- Fluoromount-G (Thermo Fisher Scientific, 00-4958-02)
- Bálsamo de Canadá (Biopack)

3.2.4 Para la extracción de proteínas y Western Blot

- Buffer de extracción de proteínas T-PER Tissue Protein Extraction Reagent (Thermo Fisher Scientific, #78510)
- Inhibidor de proteasas (Cell Signaling, #5871)
- EDTA 0.5 M (Cell Signaling, #7011)
- Kit comercial Pierce BCA Protein Assay (Thermo Scientific, #23225)
- Buffer de siembra Blue Loading Buffer (New England Biolabs, #B7703S)
- 10x Tris/Glycine/SDS Buffer (Bio-Rad, #1610732)
- 10x Tris/Glycine Buffer (Bio-Rad, #1610734)
- Geles Mini-PROTEAN TGX Precast Protein Gels en gradiente de 4-20% (Bio-Rad, #4561095)
- Membrana de transferencia de PVDV (Bio-Rad, #1620174)
- Tris Base (Sigma-Aldrich Saint Louis, MO, EE.UU.)
- Cloruro de Sodio (Merck, #106404)
- Tween-20 (Sigma, #P7949)
- Seroalbúmina bovina (Sigma, # A7030-500G)
- SignaliFire™ Elite ECL Reagent (Cell Signaling #12757S)
- Placa radiográfica (Blue Autoradiography Film, Santa Cruz sc-201696)

3.2.4 Para la extracción de ARN, retrotranscripción (RT) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

- Trizol (Roche, #ET101-01)
- Cloroformo (Biopack)
- Isopropanol (Biopack)
- Etanol (Biopack)
- Monarch® Total RNA Miniprepr Kit (New England Biolabs, #T2010S)
- Retrotranscriptasa MMLV (Promega, cat # 9PIM170).
- Sybr Green (Roche)
- Random Primers (Roche)
- Luna Universal One-Step RT-qPCR Kit (New England Biolabs, #E3005)

3.3 Equipos

- Estereotáxico
- Vibrátomo (Leica Microsystems)
- Agitador orbital TS-1000 (Arcano)
- Microscopio directo de epifluorescencia Olympus BX-51
- Microscopio Confocal Nikon Eclipse E400
- Mini-PROTEAN® Vertical Electrophoresis Cell (Bio-Rad)
- Trans-Blot® Turbo Transfer System (Bio-Rad, #1704150)
- Vortex ZX4 (Velp Scientifica)
- Agitador de movimiento basculante MultiShaker FMS2 (FinePCR)
- Cassette de revelado para Western Blot (Konica)
- Fotómetro para microplacas Multiskan™ FC (Thermo Fisher Scientific)
- Espectrofotómetro NanoDrop™ Lite (Thermo Fisher Scientific)
- ThermoMixer® (Thermo Fisher Scientific)
- Termociclador Mastercycler® Nexus (Eppendorf)
- Termociclador CFX Connect™ Real-Time System (Bio-Rad)
- Termociclador Stratagene Mx3000P (Thermo Fisher Scientific)
- Centrífuga 5415R (Eppendorf)

3.4 Anticuerpos

Anticuerpo	Marcaje	Huésped	Distribuidor	Dilución de trabajo
Iba1	Microglia	Conejo	Wako Chemicals #019-19741	1:1000
Iba1	Microglia	Cobayo	Synaptic Systems #234-004	1:500
Arginasa 1	Microglia M2	Cabra	Santa Cruz Biotechnology #sc- 271430	1:200
TH	Neuronas dopaminérgicas	Conejo	Merck Millipore #AB152	1:500
Homer 1	Proteína postsináptica	Conejo	Synaptic Systems #160-003	1:400
Bassoon	Proteína presináptica	Ratón	Enzo #SAP7F407	1:600
VACHT	Transportador vesicular de ACh	Conejo	Sigma #V5387	1:1000

VGlut1	Transportador vesicular de Glut	Ratón	Merck Millipore #AB1mab550252	1:1000
D2R	Receptor de dopamina	Conejo	Chemicon #AB1558	1:500
Anti-conejo Biotinilado		Cabra	Vector Laboratories #BA-1000	1:1000
Alexa 488 anti-conejo		Cabra	Abcam #AB150077	1:500
Alexa 594 anti-cobayo		Cabra	Abcam #AB150188	1:500
Alexa 594 anti-ratón		Cabra	Abcam #AB150128	1:500
Cy3 anti-cabra		Burro	Jackson Immunoresearch #705-165-147	1:1000

Tabla 2. Anticuerpos empleados para técnicas de inmunohistoquímica.

	Anticuerpo	Huésped	Distribuidor	Dilución de trabajo	Masa Molecular (KDa)
Anticuerpos Primarios	TH	Conejo	Merck Millipore	1:500	62
	Akt	Ratón	Cell Signalling #2920	1:1000	60
	pAkt	Conejo	Cell Signalling #9271	1:500	60
	GSK3 β	Conejo	Cell Signalling #9315	1:1000	46
	pGSK3 β	Conejo	Cell Signalling #9323	1:500	46
	pErk1/2	Conejo	Cell Signalling #4695	1:1000	42/44
	β -Actina	Conejo	Cell Signalling #8457	1:5000	45
Anticuerpos Secundarios	Anti-conejo conj. HRP		Cell Signalling #7074	1:10000	
	Anti-ratón conj. HRP		Cell Signalling #7076	1:10000	
	Anti-rata conj. HRP		Cell Signalling #7077	1:10000	

Tabla 3. Anticuerpos empleados para Western Blot.

3.5 Cebadores para PCR cuantitativa

Los cebadores para la cuantificación de la expresión del ARNm mediante PCR cuantitativa fueron diseñados con la herramienta online “Prime 3 Input” (<http://primer3.ut.ee/>), a partir de las secuencias génicas obtenidas de la base de datos del NCBI. Se evaluó la posibilidad de formación de estructuras secundarias con la herramienta online “Primer Quest” de Integrated DNA Technologies. Además, se evaluó la especificidad de amplificación con la herramienta online “Primer Blast” de NCBI. Se seleccionaron los cebadores con las menores estructuras secundarias.

Gen	Número de Acceso	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (5'-3')	Tamaño de amplicón
TH	NM_012740.3	TCGGAAGCTGATTGCAGAGA	TTCCGCTGTGTATTCCACATG	76
D1R	NM_012546.2	GGAGGACACCGAGGATGA	ATGAGGGACGATGAAATGG	69
D2R	NM_012547.1	TGGGTCAGAAGGGAAGG	GATGATAAAGATGAGGAGGGT	76
Slc6a3 / DAT	NM_012694.2	CCAGCAATTCAGTGATGACATCA	CAGCATAGCCGCCAGTACAG	69
IL1b	NM_031512.2	TACCTATGTCTTGCCCGTGG	TAGCAGGTCGTCATCATCCC	113
IL-4	X16058.2	CAAGGAACACCACGGAGAAC	CAAGCACGGAGGTACATCAC	89
IL-6	M26744.1	CTGCTCTGGTCTTCTGGAGT	TGGAAGTTGGGGTAGGAAGG	173
TGFβ	NM_013174.2	TCTCTGTCCACTTGACCAC	TCTGTCCCCTAATGGCTTCC	73
GAPDH	NM_017008.4	TCACCACCATGGAGAAGGC	GCTAAGCAGTTGGTGGTGCA	169

Tabla 4. Secuencias de los cebadores de rata para amplificación de ARNm.

3.6 Cirugías Estereotáxicas

Todas las cirugías se realizaron en condiciones de asepsia utilizando el material adecuado limpio. En todos los casos, las ratas recibieron una inyección analgésica con tramadol (10 mg/kg de PC, ip) y luego fueron anestesiadas con clorhidrato de ketamina (40 mg/kg de PC, ip) y xilacina (8 mg/kg de PC, im) previo a ser situadas en el aparato estereotáxico. A continuación, se cortó el pelo de los animales e desinfectó el cuero cabelludo, se realizó una incisión en la piel de la calota y se eliminaron las membranas que recubren el cráneo para poder visualizar el bregma y establecer las coordenadas de inyección.

3.6.1 Cirugía Estereotáxica en el modelo de Rata hembra senil.

Para la realización de los experimentos con ratas hembras seniles, los animales se agruparon en 2 grupos experimentales: 1) **Grupo DsRed**, ratas seniles que recibieron una inyección estereotáxica de RAd-DsRed; 2) **Grupo IGF1**, ratas seniles que recibieron una inyección estereotáxica de RAd-IGF1. Se utilizaron distintos lotes de animales que resultaron en un total de 15 a 20 animales por grupo.

Las ratas recibieron una inyección bilateral en los ventrículos laterales utilizando jeringas Hamilton de 10 μL . Las coordenadas utilizadas para la infusión intracerebroventricular fueron: - 0,8 mm anteroposterior; \pm 1,5 mm mediolateral y - 4,2 mm dorsoventral, todas medidas relativas a bregma de acuerdo al Atlas del Cerebro de la Rata de Paxinos²⁴⁷. Las inyecciones fueron de 4 μL por lado de la suspensión viral correspondiente, conteniendo 4×10^{10} unidades formadoras de placas (PFU), a una razón de 1 μL por minuto. Luego de cada inyección, se esperó 2 minutos antes de retirar la aguja para evitar el reflujo de la solución inyectada.

3.6.2 Cirugía Estereotáxica en el modelo Parkinsoniano inducido por LPS intranigral.

Los animales destinados al establecimiento del modelo Parkinsoniano inducido por LPS intranigral fueron sometidos a dos cirugías estereotáxicas. En la primera, los animales recibieron una dosis de LPS o PBS. Aquí, los animales se agruparon en 2 grupos: 1) **Grupo PBS**, ratas hembras y machos que recibieron una inyección intranigral de PBS; 2) **Grupo LPS**, ratas hembras y machos que recibieron una inyección intranigral de LPS.

En segunda cirugía, los animales recibieron una segunda inyección intranigral, en este caso con RAd-DsRed o RAd-IGF1. Así se obtuvieron 4 grupos experimentales: 1) **Grupo PBS-DsRed**, animales que recibieron una inyección intranigral de PBS y una de RAd-DsRed; 2) **Grupo PBS-IGF1**, animales que recibieron una inyección intranigral de PBS y una de RAd-IGF1; 3) **Grupo LPS-DsRed**, animales que recibieron una inyección intranigral de LPS y una de RAd-DsRed; 4) **Grupo LPS-IGF1**, animales que recibieron una inyección intranigral de LPS y una de RAd-IGF1.

Las inyecciones intranigrales se realizaron utilizando agujas Hamilton de 10 μL en las coordenadas - 5,3 mm anteroposterior; -2,0 mm mediolateral y -7,8 mm dorsoventral, todas medidas relativas a bregma de acuerdo al Atlas del Cerebro de la Rata de Paxinos²⁴⁷. Las inyecciones fueron de 5 μL PBS o LPS (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Las inyecciones ICV se realizaron 22 días post inyección de LPS, los animales recibieron una infusión intranigral de 4×10^{10} PFU de RAd-IGF1 o RAd-DsRed contenidos en un volumen de 4 μL .

3.7 Diseño Experimental.

3.7.1 Terapia génica con IGF1 en el modelo de rata senil.

Se definió como “día experimental 0” (D0) al día de la inyección estereotáxica de los adenovirus. Tres días previos a la inyección (D-3), los animales se sometieron a distintos test comportamentales (descritos en la sección 3.8.1). Finalmente, en el D17, los animales se sometieron nuevamente a los test comportamentales con el fin de evaluar el efecto de la terapia. Los animales se sacrificaron en el D18, dando por finalizado el experimento.

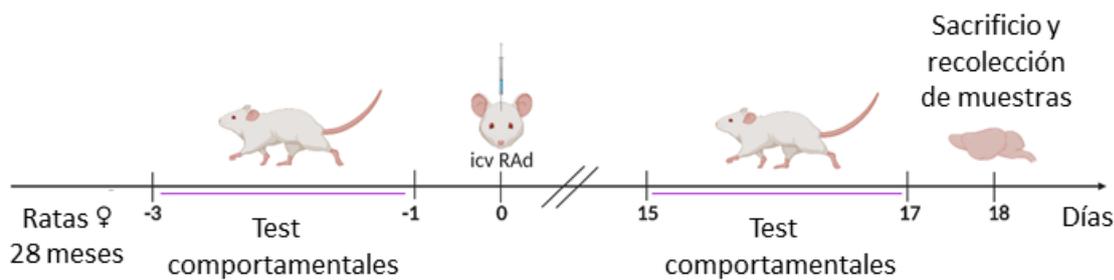


Figura 14. Diseño experimental de la Terapia génica con IGF1 en el modelo de rata senil

3.7.2 Terapia génica con IGF1 en el modelo de Enfermedad de Parkinson inducido por LPS

Se definió como “día experimental 0” (D0) al día de la inyección estereotáxica de LPS. El experimento comenzó 7 días previos a la inyección (D-7), día en el cual los animales se sometieron a tests comportamentales (ver detalles más adelante). En el D0, los animales recibieron una inyección intranigral de PBS o LPS, según correspondiese. Se evaluó el desempeño motor de los animales semanalmente (D7, D14). A continuación, en el D15, se realizó la terapia génica con RAd-IGF1 o RAd-DsRed y se continuó evaluando el desempeño motor semanalmente (D22 y D29). Finalmente, los animales se sacrificaron el D30, dando por finalizado el experimento. Se utilizaron distintos lotes de animales para las distintas evaluaciones, empleando de 4 a 6 animales por grupo/lote.

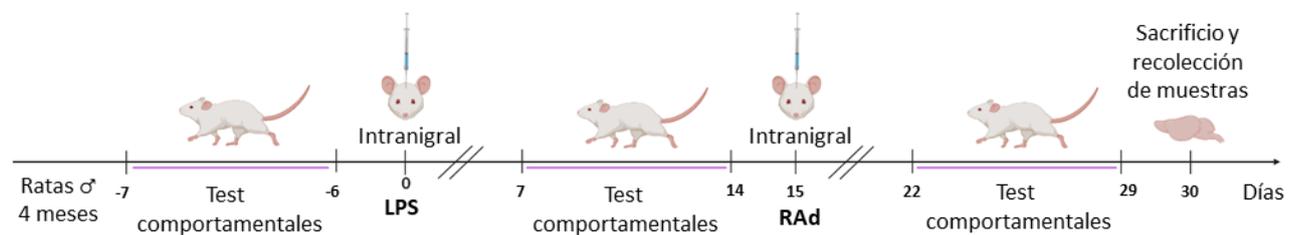


Figura 14. Diseño experimental de la Terapia génica con IGF1 en el modelo de Enfermedad de Parkinson inducido por LPS

3.8 Test comportamentales

3.8.1 Test comportamentales utilizados en el modelo de rata senil

Se evaluó el desempeño motor de las ratas seniles antes y después de la terapia génica utilizando 4 test comportamentales.

3.8.1.1 Desempeño sobre una rampa inclinada.

Este test se basa en la capacidad que tiene la rata de mantener su propio peso y vencer la fuerza de gravedad en un plano inclinado. Para ello, se emplea una rampa metálica (90 cm de largo por 42 cm de ancho) inclinada en un ángulo de 70° respecto al piso. Para evitar que los animales desciendan por la rampa, ésta se encuentra sumergida 15 cm en agua. El análisis comienza cuando se colocan a un animal en el centro de la rampa. A continuación, se procede a medir el tiempo que logran mantenerse agarrados

sin caer al agua. Se fijaron 120 seg como máximo tiempo de evaluación. Las medidas se tomaron por triplicado.

3.8.1.2 Desempeño en una plataforma giratoria.

Este test se basa en la capacidad que tiene la rata de sostenerse y vencer la fuerza centrífuga durante el movimiento de la plataforma. Para ello, se emplea una plataforma cilíndrica elevada (30 cm de alto por 8 cm de diámetro) y un motor que permite el movimiento de esta última a una velocidad constante de 150 rpm. El análisis comienza cuando se colocan a un animal en el centro de la plataforma en movimiento. A continuación, se procede a medir el tiempo que logran mantenerse agarrados sin caer. Se fijaron 120 seg como máximo tiempo de evaluación. Las medidas se tomaron por triplicado.

3.8.1.3 Comportamiento Exploratorio.

El test de campo abierto (OF, por sus siglas en inglés *Open Field*) se desarrolló en una arena cuadrada (65 x 65 x 45 cm), cuyo piso está dividido en 16 cuadrados iguales. Las ratas se colocaron en el centro de la arena y se les permitió explorar libremente durante 5 min. Las variables de comportamiento evaluadas fueron: **a. Grooming**: tiempo invertido por la rata en acicalarse, asearse o rascarse. **b. Líneas cruzadas**: número de líneas de la cuadrícula cruzadas por la rata con sus cuatro patas; **c. Entradas en área central**: frecuencia de entrada de la rata con sus cuatro patas al cuadrante central de la arena.

El test OF proporciona medidas simultáneas de locomoción, exploración y ansiedad²⁴⁸. El grooming es un comportamiento frecuente de los roedores en un entorno novedoso y se espera que disminuya con la exposición repetida a la arena, a medida que decrece la ansiedad²⁴⁹. El número de líneas cruzadas suele usarse como una medida de la actividad locomotora, pero también es una medida de exploración y ansiedad. Una alta frecuencia de este comportamiento indica un aumento de la locomoción y exploración y/o un menor nivel de ansiedad. El número de entradas en el cuadrado central es una medida del comportamiento exploratorio y ansioso. Una alta frecuencia de este parámetro indica un comportamiento exploratorio alto y niveles de ansiedad bajos^{250,251}.

La arena abierta se limpió cuidadosamente con etanol al 10% después de cada prueba individual para eliminar las señales olfativas. El comportamiento se registró utilizando una videocámara conectada a una computadora y el rendimiento de cada individuo se determinó utilizando el software Kinovea v0.7.6 (<http://www.kinovea.org>).

3.8.1.4 Test de enterramiento de canicas.

El test de enterramiento de canicas (MB, por sus siglas en inglés *Marble Burying*) se usa comúnmente para estimar el enterramiento defensivo en roedores²⁵². Se basa en la observación de que los roedores entierran objetos expuestos en sus lechos, por ejemplo, canicas de vidrio. Las ratas fueron colocadas individualmente en una jaula de alojamiento (30 x 30 x 17 cm) con 5 cm de viruta de madera

nueva. Dieciséis canicas de vidrio (1,5 cm de diámetro, dispuestas en un patrón de 4 × 4) fueron espaciadas uniformemente sobre la superficie. Se analizó el número de canicas intactas, movidas, tapadas o enterradas durante un período de 30 min. Se consideró a una canica como tapada si al menos 1/3 de la misma estaba cubierta con viruta y enterrada si 3/3 de ella estaba cubierta por viruta y a una distancia no menor a 3 cm del piso de la jaula²⁵².

3.8.2 Test comportamentales utilizados en el modelo de Parkinsoniano inducido por LPS

Se evaluó el desempeño motor de las ratas los semanalmente días D-7, D7, D14, D21, D28 y D35 utilizando 4 test comportamentales.

3.8.2.1 Comportamiento Exploratorio.

El test del campo abierto se llevó a cabo de acuerdo a como se describió en la **sección 3.8.1.3**

3.8.2.2 Test de colocación de extremidades anteriores evocado por vibrisas.

La prueba de colocación de la extremidad anterior evocada por bigotes/vibrisas (también conocida como la prueba de los bigotes y la pata) se utiliza para evaluar la asimetría en la corteza sensitivo-motora y el Núcleo Estriado. El experimentador sostiene el animal de manera que sólo una extremidad anterior cuelgue libremente. A continuación, las vibrisas ipsilaterales a la extremidad libre son estimuladas por el roce de cada lado contra el borde de una mesa. Esto provoca una respuesta de la extremidad anterior a colocar la pata en la superficie de la mesa. Se realizan diez intentos por vibrisa estimulada y se registra el porcentaje de colocaciones exitosas. Complementariamente, se realizó una variación de esta prueba en la que se evalúa la colocación de la extremidad anterior cruzado la línea media. Aquí, el experimentador gira al animal sobre un lado y mantiene la extremidad anterior del mismo lado hacia atrás para impedir la colocación sobre la mesa. Los bigotes son estimulados y se registra la colocación exitosa de la extremidad anterior opuesta en la superficie de la mesa. Esta variante es útil para evaluar la integración sensomotora a través de los hemisferios derecho e izquierdo. La combinación de las pruebas del mismo lado de la línea media y transversal se ha utilizado en la evaluación de la magnitud del daño a los hemisferios cerebrales causados por diferentes lesiones.

3.8.2.3. Test de la caminata con un pie.

La prueba de caminata con un pie (Stepping Test) es una herramienta utilizada para evaluar la aquinesia (disminución notable de los movimientos espontáneos y lentitud de aquellos que sean voluntarios) en roedores. El experimentador sostiene las extremidades posteriores y una extremidad anterior para restringir su movimiento. El cuerpo se mantiene en una posición horizontal con una extremidad delantera libre sobre una rampa inclinada. A continuación, se guía al animal a través de la rampa y se contabiliza tanto el número de los pasos de ajuste realizados como el tiempo que el animal tarda en recorrer la rampa de 90 cm, siendo el tiempo máximo 120 seg (parámetros primarios). Si el

animal es incapaz de recorrer los 90 cm en el tiempo estipulado, se contabiliza la distancia recorrida. El ensayo se realiza con ambos miembros delanteros, por duplicado. A partir de los parámetros primarios, se calculan la distancia promedio de paso y la velocidad de desplazamiento (parámetros secundarios).

3.8.2.4 Test de la escalera horizontal.

La prueba de la escalera horizontal o prueba de fallos del pie (Walking Ladder) es una herramienta utilizada para evaluar la función locomotora en modelos de trastornos del SNC en roedores. Los animales se colocan en una escalera horizontal elevada y se entrenan para cruzar el dispositivo. Se registran el deslizamiento de las patas a través de los peldaños de la escalera y los cruces. Los errores en los pasos y el tiempo ambulatorio se registran para cada ejecución de la prueba; se contabilizan un total de dos carreras para cada animal. Este test es útil para evaluar modelos experimentales de lesión del SNC, así como la eficacia de tratamientos.

3.9 Disección de cerebros y procesamiento.

Al finalizar el experimento, se procedió a sacrificar a los animales mediante decapitación con una guillotina y los cerebros fueron cuidadosamente removidos.

Los cerebros de ratas seniles fueron divididos en hemisferios derecho e izquierdo. Los hemisferios izquierdos se fijaron en paraformaldehído (PFA) al 4 % (pH 7,4) durante toda una noche a 4°C. Posteriormente, los hemicerebros se mantuvieron en solución criopreservadora (30 % de etilenglicol, 30 % de sacarosa, en PB 0,1 M, pH 7,4) a -20°C hasta su procesamiento para inmunohistoquímica (IHQ). Para ello, estos hemisferios se cortaron coronalmente en secciones de 40 µm de espesor con vibrátomo y se dividieron en 12 series, cada serie contiene una de cada doce secciones. De esta manera se obtiene un conjunto de secciones seriadas no contiguas que abarcaban las distintas zonas del cerebro.

Por otro lado, los hemisferios derechos se disecaron en las siguientes estructuras: Núcleo Estriado, la *Substantia Nigra*, el cerebelo, la corteza que fueron almacenadas a -80 °C hasta su procesamiento por Western Blot o qRT-PCR.

En el caso del modelo Parkinsoniano inducido por LPS, los cerebros se fijaron en PFA durante toda la noche y conservados en solución criopreservadora a -20°C hasta su procesamiento para inmunohistoquímica (IHQ). Los cerebros se cortaron coronalmente en secciones de 40 µm de espesor con vibrátomo y se dividieron en 8 series, cada serie contiene una de cada ocho secciones.

3.10 Inmunohistoquímica

Las IHQ se realizaron en secciones no contiguas por flotación libre. Para cada animal, se procesaron conjuntos separados de 6 secciones.

3.10.1 Marcaje con DAB

Las secciones de cerebro se lavaron con buffer fosfato (PB) 0,1 M (11,4 g/L Na_2HPO_4 , 3,3 g/L NaH_2PO_4) 3 veces durante 10 minutos, se permeabilizaron con Solución de Lavado (SL) (3 lavados de 10 minutos). A continuación, se inhibió la actividad peroxidasa endógena del tejido mediante la incubación con metanol 50% y peróxido de hidrógeno 3% en SL durante 5 minutos, seguido de 3 lavados de 10 minutos con SL. Después, se procedió al bloqueo de uniones inespecíficas mediante la incubación de las secciones durante 15 minutos a temperatura ambiente con una solución al 5% con el suero del animal en el que se ha producido el anticuerpo secundario (Solución de Bloqueo). A continuación, se lavaron los cortes con SL y se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente diluido en Solución de Bloqueo, durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, se retiró el anticuerpo primario y el exceso se lavó con SL y se incubaron las secciones con el anticuerpo secundario durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras retirar el exceso de anticuerpo secundario y lavar con SL, se incubaron los cortes con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (kit ABC) durante 90 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Tras 3 lavados de 10 minutos con SL, se revelaron las secciones con DAB (Diaminobenzidina al 0.025% y H_2O_2 al 0,003% en PB). Cuando la reacción fue visible se paró lavando las secciones repetidas veces con PB. Finalmente, los cortes se colocaron en orden en portas gelatinizados, se deshidrataron y se cubrieron con Bálsamo de Canadá (Vector Laboratories), reservándose para la obtención y análisis de imágenes según lo descrito en 3.11.

3.10.2 Inmunofluorescencia

Las secciones de cerebro se lavaron con PB 3 veces durante 10 minutos, se permeabilizaron con SL (3 lavados de 10 minutos). Tras los lavados, se bloquearon las uniones inespecíficas incubando las secciones durante 1 h a temperatura ambiente con Solución de Bloqueo. A continuación, se lavaron las secciones con SL e las secciones se incubaron con el anticuerpo primario, o la mezcla de anticuerpos primarios correspondientes, durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, se eliminó el exceso de anticuerpo primario por lavados con SL y las secciones se incubaron con el o los anticuerpos secundarios conjugados a un fluoróforo durante 2 horas. Tras lavar el exceso de anticuerpo secundario con PBS, los cortes fueron incubados con el marcador nuclear DAPI durante 5 minutos. Finalmente, los cortes se lavaron y se montaron en portas gelatinizados y se cubrieron con Fluoromount-G, reservándose para la obtención y análisis de imágenes según lo descrito en 3.11

3.11 Obtención y análisis de imágenes

La obtención de imágenes de las secciones con marcaje con DAB y su análisis morfométrico (cuantificaciones y clasificación de la morfología) se llevaron a cabo utilizando un microscopio directo

de epifluorescencia Olympus BX-51 conectado a una cámara de video Olympus DP70 CCD. La obtención de imágenes de las secciones con marcaje con fluoróforos se llevó a cabo utilizando un microscopio confocal Nikon Eclipse E400 conectado a una cámara de fotografía y capturando todos los planos focales del eje Z.

3.11.1 Densidad celular.

Se determinó la densidad celular de la microglia en Núcleo Estriado, *Substantia Nigra pars compacta*, corteza motora y corteza entorrinal dorsal y perirrinal. Las áreas de interés se identificaron con ayuda del Atlas del Cerebro de la Rata de Paxinos²⁴⁷.

Las cuantificaciones de microglia en Núcleo Estriado, corteza motora, corteza entorrinal y corteza perirrinal se realizaron utilizando el método del disector óptico. El mismo consiste en contar la cantidad de objetos presentes en un área delimitada por el disector a medida que se enfocan los distintos planos focales del tejido en el eje Z. En la figura 16 se muestra un marco de conteo típico para el muestreo de partículas (**Figura 16**). El mismo consta de dos líneas de inclusión (límite superior y derecho del cuadrado) y dos líneas de exclusión (límite inferior e izquierdo del cuadrado), que se extienden hasta el infinito hacia arriba y abajo. Cualquier partícula que se encuentre dentro del cuadrado o en contacto con las líneas de inclusión será considerada en el conteo mientras que cualquier partícula en contacto con las zonas de exclusión no será incluida.

La microglia se contó con una magnificación total de 600X empleando un disector de dimensiones 83 μm \times 83 μm , considerando el cuerpo celular de la como partícula, sin considerar las ramificaciones.

En cuanto al conteo de microglia y neuronas dopaminérgicas en *Substantia Nigra*, en lugar del disector óptico se procedió reconstruyendo el área en cuestión a partir de imágenes de alta magnificación y delimitando el área de interés (**Figura 16**), utilizando el software Image-Pro Plus (versión 5.1.0.20). A continuación, se contaron manualmente todas las partículas que se encontrasen dentro del área de interés. La medida de densidad se determinó teniendo en cuenta que el espesor de las secciones era de 40 μm .

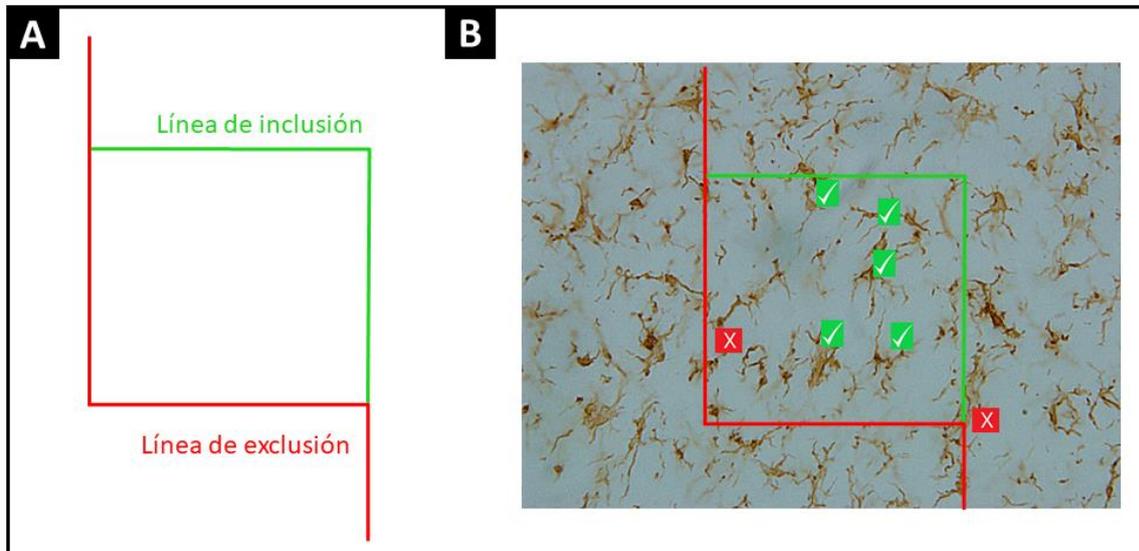


Figura 16. Marco de conteo de partículas. Las líneas rojas delimitan las zonas de exclusión mientras que las líneas verdes delimitan las zonas de inclusión (A). De esta manera, que se encuentre dentro del cuadrado o en contacto con las líneas de inclusión será incluida en el conteo mientras que cualquier partícula en contacto con las zonas de exclusión no será incluida en el conteo (B).

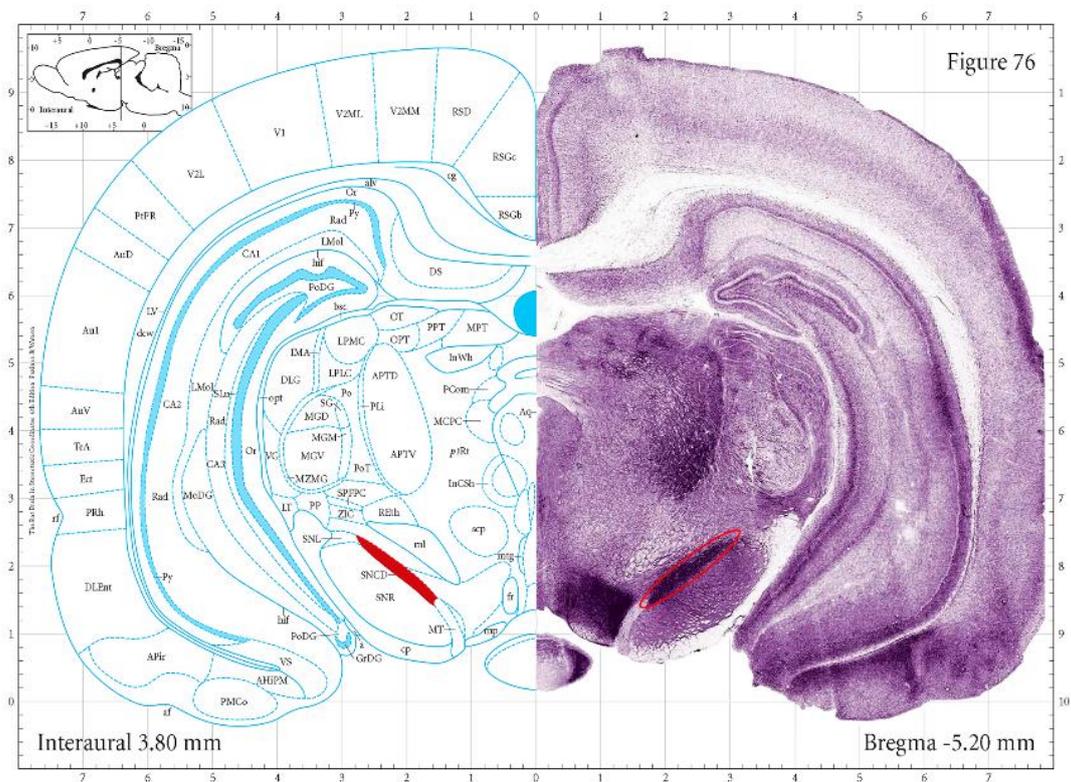


Figura 17. Corte coronal del cerebro de rata. El hemisferio izquierdo corresponde a un esquema del Atlas Paxinos. El hemisferio derecho corresponde a una tinción Nissl. En ambos casos, se encuentra delimitada la zona correspondiente a la *Substantia Nigra*.

La densidad de fibras dopaminérgicas en Núcleo Estriado se determinó utilizando la técnica de la grilla descrita por Mamounas y colaboradores²⁵³. Dicha técnica consiste en superponer una grilla sobre las imágenes del área de interés obtenidas a alto aumento (600X) (**Figura 18.A**). A continuación, se cuenta la cantidad de fibras que interceptan los vértices de la cuadrícula (**Figura 18.B**). En nuestro análisis, utilizamos una cuadrícula de 200 μm^2 de área por cuadrado, teniéndose un total de 256 vértices. La densidad relativa de fibras se expresa como $Q = G_i / G_o$, donde G_i son los vértices de la cuadrícula intersecados por las fibras y G_o es el número total de vértices de la cuadrícula.

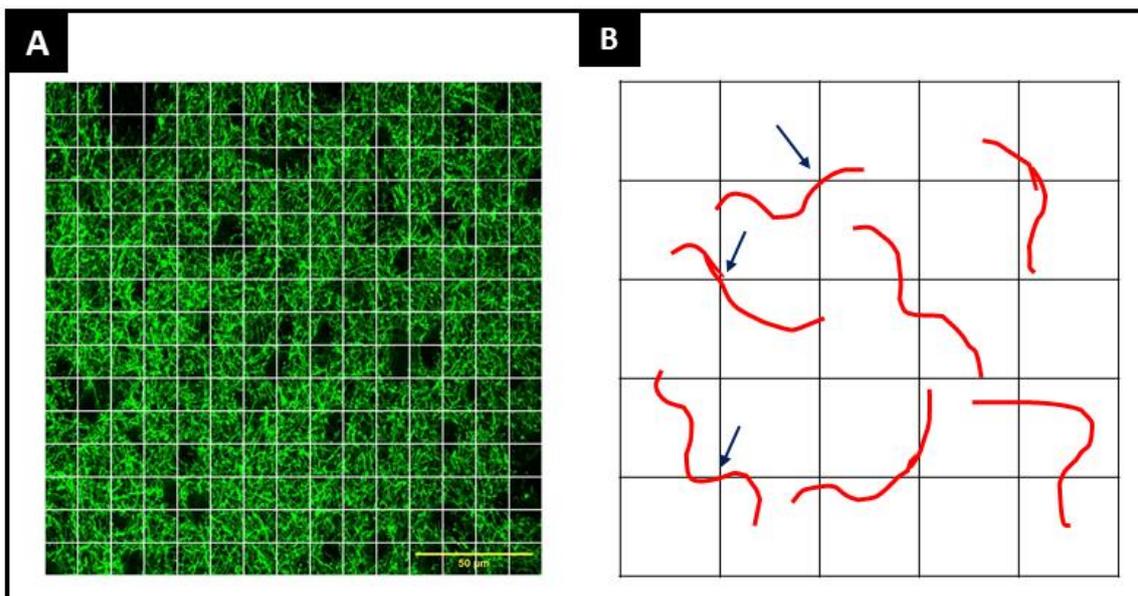


Figura 18. Imagen representativa de una imagen de Núcleo Estriado (Magnificación 600X) con la grilla de análisis de fibras superpuesta (**A**). Esquema representativo del análisis de la técnica de la grilla (**B**). Las flechas indican las fibras que intersecan algún vértice de los cuadrados de la grilla y, por tanto, son contadas.

3.11.3 Clasificación morfológica de la microglia.

Las células microgliales se identificaron como células inmunorreactivas Iba-1 positivas. Estas células se clasificaron morfológicamente: en i) microglia no reactiva/ramificada, células que muestran procesos celulares largos y cuerpo pequeño; ii) microglia reactiva/ameboide, células que muestran numerosos procesos retraídos, soma grande o ameboide e inmunomarcación para Iba1 intensa²⁵⁴.

3.11.4 Densidad de proteínas sinápticas dentro de la microglia.

Se determinó la cantidad de proteína sináptica dentro de las células microgliales en el Núcleo Estriado de ratas seniles. Las imágenes obtenidas se analizaron utilizando el software gratuito Fiji. Dado que las proteínas sinápticas abundan en el tejido neural, la marca fluorescente de éstas se encuentra distribuida de manera homogénea a lo largo de todo el corte. Con el fin de determinar la colocalización de las proteínas sinápticas y la microglia, se procedió a eliminar o “limpiar” la marca de las proteínas sinápticas que no coincidiera con la marca de Iba1 para cada plano focal utilizado. Para ello se utilizaron los

comandos “Create Selection”, para seleccionar sólo la marca de las proteínas sinápticas que coincidieran con la marca positiva del anticuerpo Iba1; y el comando “Clear Outside”, para eliminar la marca de las proteínas sinápticas que no coincidieran con la marca de Iba1. Una vez obtenidos los planos focales “limpios”, se armaron los Z-stacks para cada rata y se cuantificó manualmente la marca de cada proteína por célula microglial.

3.12 Análisis de proteínas por Western Blot

3.12.1 Preparación de las muestras

Se obtuvieron homogenatos de proteínas totales mediante disgregación con pistón de *Substantia Nigra* y Núcleo Estriado con buffer de extracción de proteínas tisular (T-PER, Thermo Scientific) suplementado con inhibidores de proteasas (Cell Signaling). Cada homogenato se agitó suavemente durante 5 minutos a 4°C. A continuación, se centrifugó a 14.000 rpm a 4°C durante 8 minutos. Finalmente, se conservó el sobrenadante, fase en que se encontraban las proteínas. La concentración proteica se determinó mediante el ensayo de Bradford utilizando el Kit comercial Pierce BCA Protein Assay (Thermo Scientific) con albúmina sérica bovina (BSA por sus siglas en inglés) como estándar en un rango de concentración de 0,1-1 mg/ml. Las muestras se alicuotaron y almacenaron a -20°C hasta su utilización.

3.12.2 Electroforesis e Inmunotransferencia

Para la separación de proteínas de cada muestra, se sembraron 20 µg de proteína y se realizó una electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) en gradiente en un rango de 4-20% (Mini-PROTEAN TGX Precast Protein Gels, BioRad). La electroforesis se realizó a 100 mV constantes durante 90 minutos. Luego, se transfirieron las proteínas del gel a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF) (Bio-Rad), por transferencia semi-húmeda en un equipo Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad). Las membranas se bloquearon mediante incubación con suero fetal bovino al 5% en solución buffer salina con 0,05% Tris/Tween-20 (TBST) durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron las membranas 3 veces durante 10 minutos con buffer TBST y se incubaron toda la noche a 4°C con anticuerpos primarios. Al día siguiente, las membranas se lavaron 3 veces durante 10 minutos con TBST e incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente durante 2 hs a temperatura ambiente. Finalmente, tras lavar el exceso de anticuerpo secundarios, se visualizó la detección de las proteínas de interés en las membranas mediante quimioluminiscencia empleando el reactivo SignalFire™ Elite ECL Reagent (Cell Signaling). La señal se capturó mediante exposición a una placa radiográfica (Santa Cruz Biotechnologies) en un cassette de revelado para Western Blot. La

densidad óptica relativa de las bandas de proteína se analizó y cuantificó utilizando el software Image Studio Lite (LI-COR Bioscience).

3.12.2 Dot Blot por PathScan®

Se analizó la modificación por fosforilación y clivaje de moléculas involucradas en procesos de señalización utilizando el kit comercial PathScan® Intracellular Signaling Array Kit (Cell Signaling, 7323#). El mismo consta de un portaobjetos el cual tiene acoplados 16 Dot Blots, cada uno conteniendo por 18 anticuerpos experimentales por duplicado, y un control positivo y un control negativo por triplicado (**Figura 19**). La detección de la señal por quimioluminiscencia se lleva a cabo utilizando HRP conjugado a estreptavidina y LumiGLO® Reagent. Todo el procedimiento se realizó de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

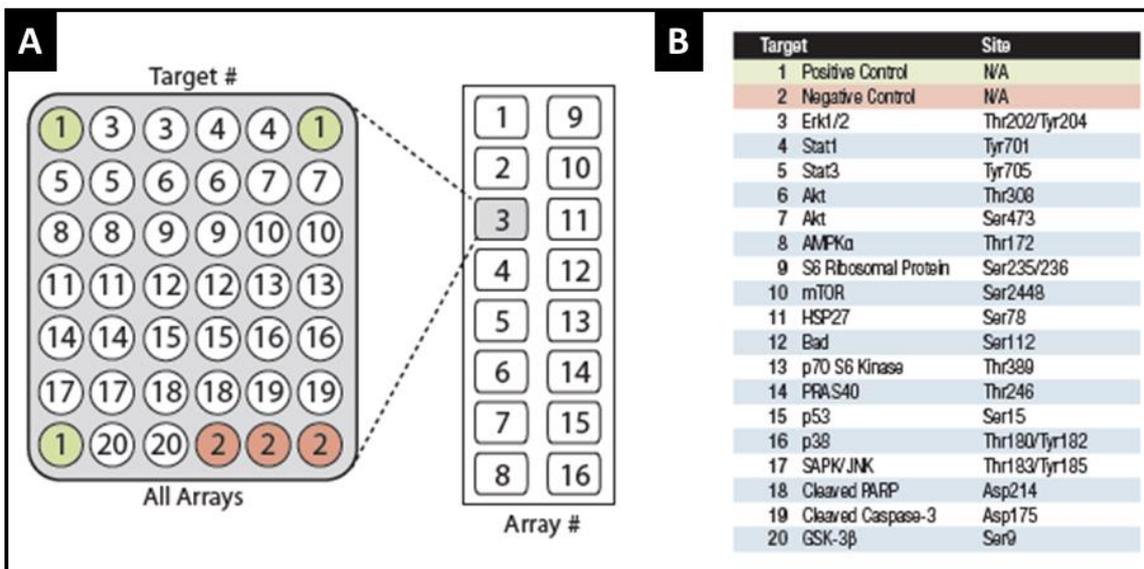


Figura 19. Esquema de la organización de los anticuerpos que componen el kit the análisis por Dot-Blot PathScan® Intracellular Signaling Array Kit.

3.13 Análisis de ARN por qRT-PCR

3.13.1 Extracción de ARN

La extracción de ARN para el análisis de expresión génica de ARNm se realizó mediante el método de trizol utilizando el reactivo TranZol (Roche). Tras disgregar el tejido en trizol, las muestras se incubaron con cloroformo durante 3 minutos a temperatura ambiente y luego se centrifugaron a 12000 g durante 15 minutos a 4°C. Luego, se tomó la fase acuosa y se indujo la precipitación el ARN por incubación durante 10 minutos con isopropanol 100% en una proporción 0,5:1 respecto al volumen de trizol, seguido de una centrifugación de 10 minutos a 12000 g y 4°C. El pellet de ARN se lavó 3 veces con

etanol al 75%. Finalmente, el ARN se resuspendió en agua ultrapura y se conservó a -80°C hasta su utilización.

En el caso de las muestras utilizadas para la secuenciación total de ARN, la extracción se realizó empleando el kit comercial Monarch® Total ARN Miniprep Kit (New England Biolabs) según las instrucciones del fabricante.

3.13.2 Retrotranscripción y reacción en cadena de la Polimerasa cuantitativa (qRT-PCR).

La medida de la expresión génica de TH, receptores de dopamina y la molécula transportadora de dopamina se llevó a cabo utilizando el kit comercial Luna® One-Step (New England Biolabs) siguiendo las instrucciones del fabricante utilizando 200 ng de ARN para los genes de interés y 30 ng para la detección del gen housekeeping. Este kit permite realizar la retrotranscripción de un ARNm a su ADNc y la subsiguiente PCR cuantitativa en un solo paso. Todo el proceso se llevó a cabo utilizando el equipo de PCR en tiempo real CFX Connect Real-Time System (Bio-Rad).

En el caso de la medida de la expresión génica de interleuquinas y citoquinas se llevó a cabo retrotranscribiendo el ARN utilizando la enzima transcriptasa reversa o retrotranscriptasa MMLV (Promega). A continuación, las muestras retrotranscriptas se utilizaron para la PCR cuantitativa utilizando Sybr Green mix (Roche) y el equipo de PCR en tiempo real Stratagene Mx3000P (Thermo Fisher Scientific).

3.13.3 Análisis del secuenciamiento de ARN

Las imágenes fluorescetes del Illumina HiSeq 2000 fueron transformadas a archivos BCL con el software Illumina BaseCaller y las muestras fueron decodificadas a archivos FASTQ con el software CASAVA (versión 1.8.2). La calidad del secuenciamiento se chequeó y aprobó con el software FASTQC. Las secuencias fueron alineadas al genoma de referencia de *Rattus Norvegicus* (RGSC assembly v5.0) utilizando el software de alineamiento STAR²⁵⁵, permitiendo una tasa de mismatch de 2 cada 50 bases. Luego, los archivos SAM resultantes fueron convertidos a archivos BAM. El filtro de hits únicos y el conteo fue llevado a cabo con las herramientas SAMtools, versión 0.1.18²⁵⁶ y HTSeq version 0.6.1p1²⁵⁷. Para identificar los genes diferencialmente expresados (DE) entre las muestras de Núcleo Estriado de ratas seniles tratadas con RAd-IGF1 o RAd-DsRed, se utilizó el algoritmo DESeq2, el cual se basa en el número normalizado de cuentas mapeadas para cada gen²⁵⁸. Este análisis generó una lista de transcritos desregulados entre los grupos (P -adj. <0.05 ; fold changes >2). Inicialmente, se evaluó la asociación de estos genes a procesos biológicos y vías biológicas utilizando la herramienta Panther Classification System de Gene Ontology (<http://www.pantherdb.org/>). Luego, se realizó un análisis de enriquecimiento funcional se realizaron con las herramientas DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>), Enrichr (<http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/>), e InnateDB (<http://www.innatedb.com/>).

4.1.10 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa GraphPad Prism versión 7.0 y 8.0. Los datos se expresan como la media \pm error estándar de la media (SEM). Los análisis de normalidad se realizaron mediante el test de D'Agostino-Pearson o de Kolmogorov-Smirnov y los análisis de igualdad de varianza, mediante los test de F, de Bartlett o de Brown-Forsythe. Luego, el análisis estadístico utilizado dependió de cada condición experimental. Para los análisis estadísticos que involucraron dos grupos experimentales, se utilizó el test t de Student. El test de ANOVA de dos vías, seguido del test *post-hoc* de Bonferroni, se utilizó para comparar dos condiciones experimentales simultáneamente. Los test utilizados en cada caso particular, así como las significancias se especifican en las leyendas de las figuras. Los análisis de correlación se realizaron empleando el test de Correlación de Pearson.

**CAPÍTULO IV: ESTUDIO DE LA MICROGLIA SENESCENTE
Y SU RELACIÓN CON EL DESEMPEÑO MOTOR: EFECTO
DE LA TERAPIA GÉNICA CON IGF1**

4.1 RESULTADOS

4.1.1 Efecto de la terapia génica con IGF1 sobre las células microgliales en ratas hembra seniles.

Como se mencionó en la Introducción, la pérdida de la homeostasis del SNC debida a la edad conduce a una activación crónica de la microglia, estableciéndose un estado de neuroinflamación. Por otro lado, hemos mencionado que el IGF1 ha sido ampliamente utilizado como agente terapéutico en el SNC. En este capítulo, evaluamos cómo la terapia génica intracerebroventricular con IGF1 es capaz de actuar y modificar a la microglia en el cerebro envejecido.

4.1.1.1 La terapia génica con IGF1 modifica el número de microglia selectivamente en el Núcleo Estriado.

En primer lugar, estudiamos el efecto de la terapia génica con IGF1 sobre el número de células microgliales en distintas regiones del cerebro envejecido. Para ello, se contaron las células Iba1 inmunorreactivas en la Corteza Motora, Núcleo Estriado, *Substantia Nigra*, Corteza Entorrinal dorsal y Corteza Perirrinal. Observamos que la terapia génica con IGF1 es capaz de aumentar el número de células microgliales de manera específica en el Núcleo Estriado. (**Figura 20**. ANOVA de 2-vías, $p < 0,0001$). Por el contrario, el número de células Iba1 inmunorreactivas en la Corteza Motora, *Substantia Nigra*, Corteza Entorrinal dorsal y Corteza Perirrinal no se vio afectado luego de 17 días de tratamiento (**Figura 20**).

4.1.1.2 La terapia génica con IGF1 aumenta la reactividad de la microglia en el Núcleo Estriado.

A continuación, nos preguntamos si la terapia génica con IGF1 era capaz de modificar el estado de activación de la microglia. Por lo tanto, procedimos a clasificar a estas células según su morfología en reactivas y no reactivas de acuerdo a lo descrito por Acáz-Fonseca²⁵⁴. Nuevamente, observamos que la terapia génica con IGF1 aumenta de manera significativa la proporción de las células microgliales reactivas en el Núcleo Estriado (**Figura 21**. ANOVA de 2-vías, $p < 0,0001$). Nuevamente, no se observaron diferencias significativas en la proporción de células microgliales reactivas en otras regiones del cerebro analizadas (**Figura 21**).

4.1.2 Efecto de la terapia génica con IGF1 sobre el fenotipo.

Dado que se observó una respuesta área específica de las células microgliales estriatales frente al tratamiento con IGF1, decidimos focalizar y profundizar nuestro estudio en esta zona. Nos propusimos ahondar la caracterización de la microglia en el Núcleo Estriado a fin de profundizar en el conocimiento de su participación en respuesta a la terapia génica con IGF1.

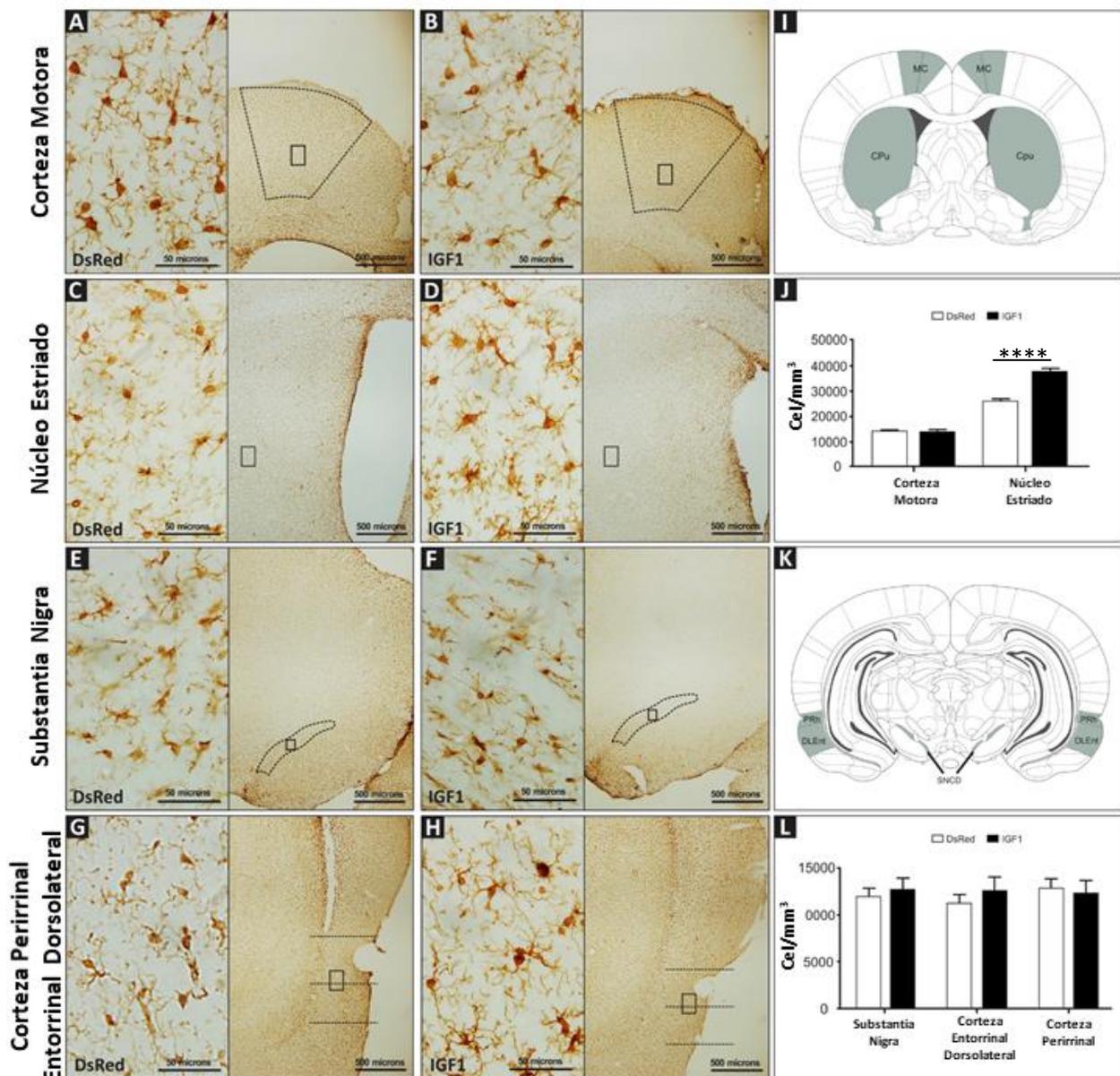


Figura 20. Efecto de la terapia génica con IGF1 sobre el número de células microgliales en el cerebro envejecido. Imágenes representativas de la Corteza Motora (A, B), Núcleo Estriado (C, D), Substantia Nigra pars compacta (E, F) y Corteza Entorrinal lateral y Perirrinial (G, H) de ratas pertenecientes a los grupos DsRed (A, C, E, G) o IGF1 (B, D, F, H) a una magnificación de 40X (barra de escala: 500 micrones) con inserciones a una magnificación de 600X (barra de escala: 50 micrones). Los paneles (I) y (K) muestran representaciones de cortes coronales de cerebro de rata donde se encuentran resaltadas las regiones analizadas. Los paneles (J) y (L) muestran la densidad microglial de ambos grupos experimentales en las regiones analizadas. Los resultados estadísticos indican diferencias significativas entre los grupos experimentales dentro de la misma región del cerebro. Los datos se expresan como media \pm SEM y se analizaron con ANOVA de 2 vías. N=5. ****p<0,0001.

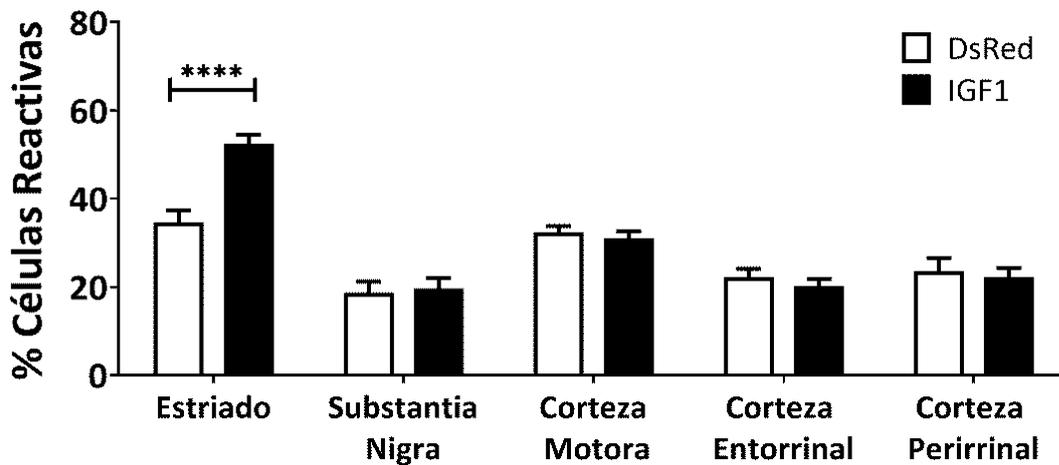
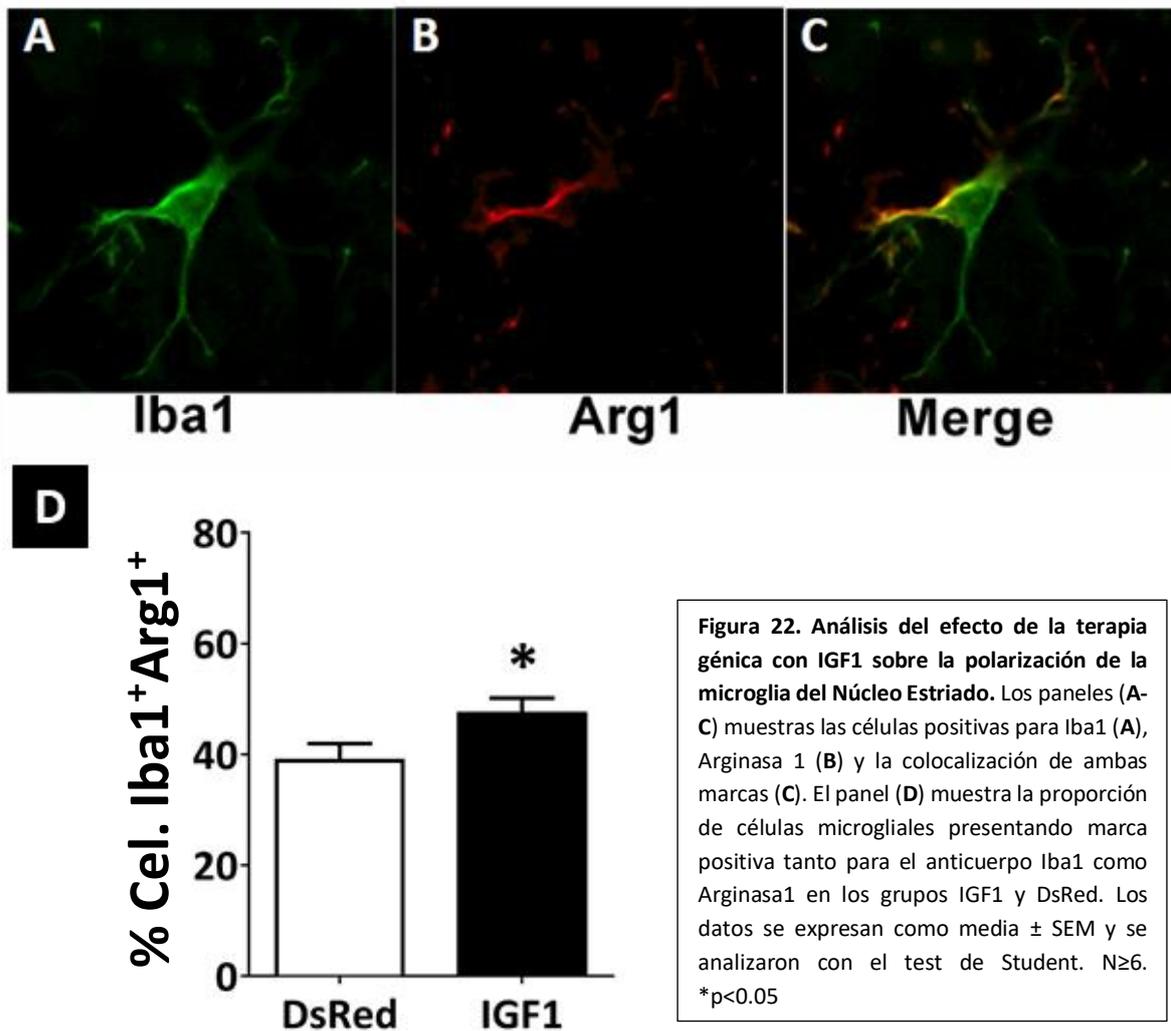


Figura 21. Efecto de la terapia génica con IGF1 sobre la reactividad de la microglia en el cerebro envejecido. Proporción de microglia reactiva, con morfología ameboide y cuerpo celular agrandado en los grupos DsRed e IGF1 en las diferentes regiones analizadas. Los resultados estadísticos indican diferencias significativas entre los grupos experimentales dentro de la misma región del cerebro. Los datos se expresan como media \pm SEM y se analizaron con ANOVA de 2 vías. N=5. ****p<0,0001.

Como se mencionó en la introducción, la microglia presenta 2 posibles fenotipos: un fenotipo pro-inflamatorio denominado M1, y un fenotipo anti-inflamatorio denominado M2. Con el fin de determinar la proporción de microglia M2, se procedió a realizar una doble inmunomarcación con los anticuerpos anti-Iba1 y anti-Arginasa1 y cuantificar el número de células que presentasen doble marcación. Observamos que la terapia génica con IGF1 aumenta la proporción de microglia M2 en el Núcleo Estriado (Figura 22. t-test, P = 0,0462).

En cuanto a la determinación de la proporción de microglia M1, no hemos podido realizar la inmunomarcación de iNOS con el anticuerpo disponible.

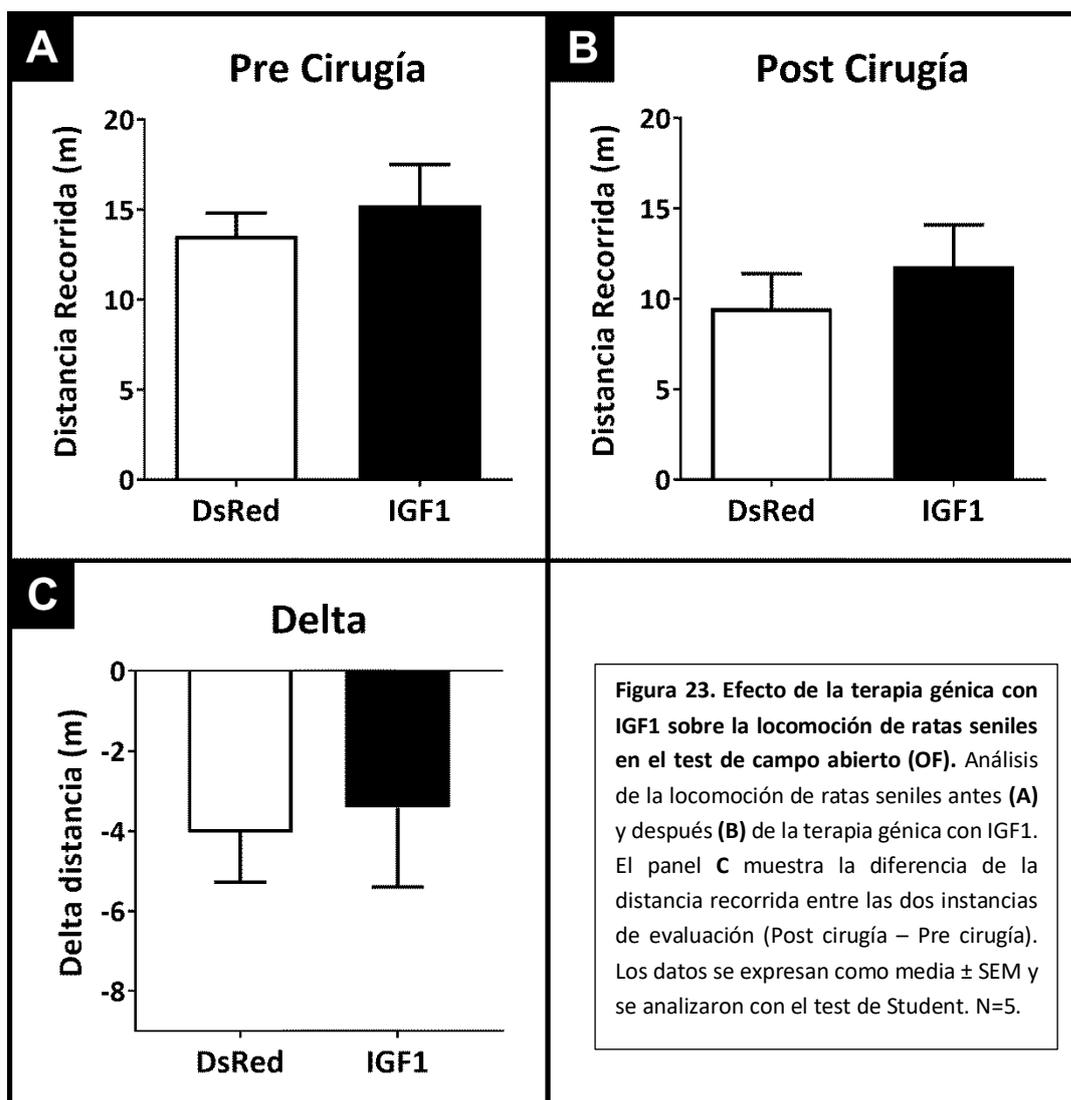


4.1.3 La terapia con IGF1 mejora el desempeño motor en ratas seniles

Como se mencionó en la introducción, el Núcleo Estriado está involucrado en la regulación y habilitación de movimientos voluntarios. Dado que la terapia génica con IGF1 tuvo un efecto específico sobre la microglia de esta zona, decidimos evaluar la relación entre esta observación y el desempeño motor de las ratas seniles. Por lo tanto, se evaluó la locomoción, la conducta y la fuerza motora de los animales empleando una batería de pruebas comportamentales.

4.1.3.1 Evaluación de la locomoción de ratas seniles.

Inicialmente, evaluamos la locomoción de las ratas seniles a través de la medida de la distancia recorrida en la prueba de campo abierto (Open Field) antes y después de la cirugía. No se observaron diferencias significativas en la distancia recorrida entre las ratas de distinto grupo (Figura 23.A, B), demostrando que el tratamiento con IGF1 no provoca una alteración en la locomoción de las ratas seniles. Además, se puede observar que los animales de ambos grupos disminuyen en igual proporción la distancia recorrida (Figura 23.C).



4.1.3.2 Evaluación del comportamiento innato de enterramiento defensivo.

A continuación, se evaluó el comportamiento innato de las ratas a enterrar objetos que se encuentren en su lecho. En el test de enterramiento de canicas (Marble Burying) no se observaron diferencias significativas en el número de canicas movidas, tapadas o enterradas, mostrando que el tratamiento con IGF1 no provoca una alteración de este comportamiento en ratas seniles (Figura 24).

4.2.3.3 Evaluación de la fuerza motora.

Finalmente, evaluamos la fuerza motora de los animales. La prueba de la rampa inclinada y de la plataforma giratoria son dos pruebas motoras que evalúan la funcionalidad de las extremidades anteriores y posteriores de los animales mediante la medida de la fuerza de agarre. El análisis de estas pruebas demostró que la terapia génica con IGF1 es capaz de mejorar significativamente el desempeño

motor de las ratas seniles en ambos test (Test de la Plataforma Giratoria: **Figura 25.A**, $P = 0.0104$; Test de la Rampa Inclinada: **Figura 25.B**, $P = 0.0207$).

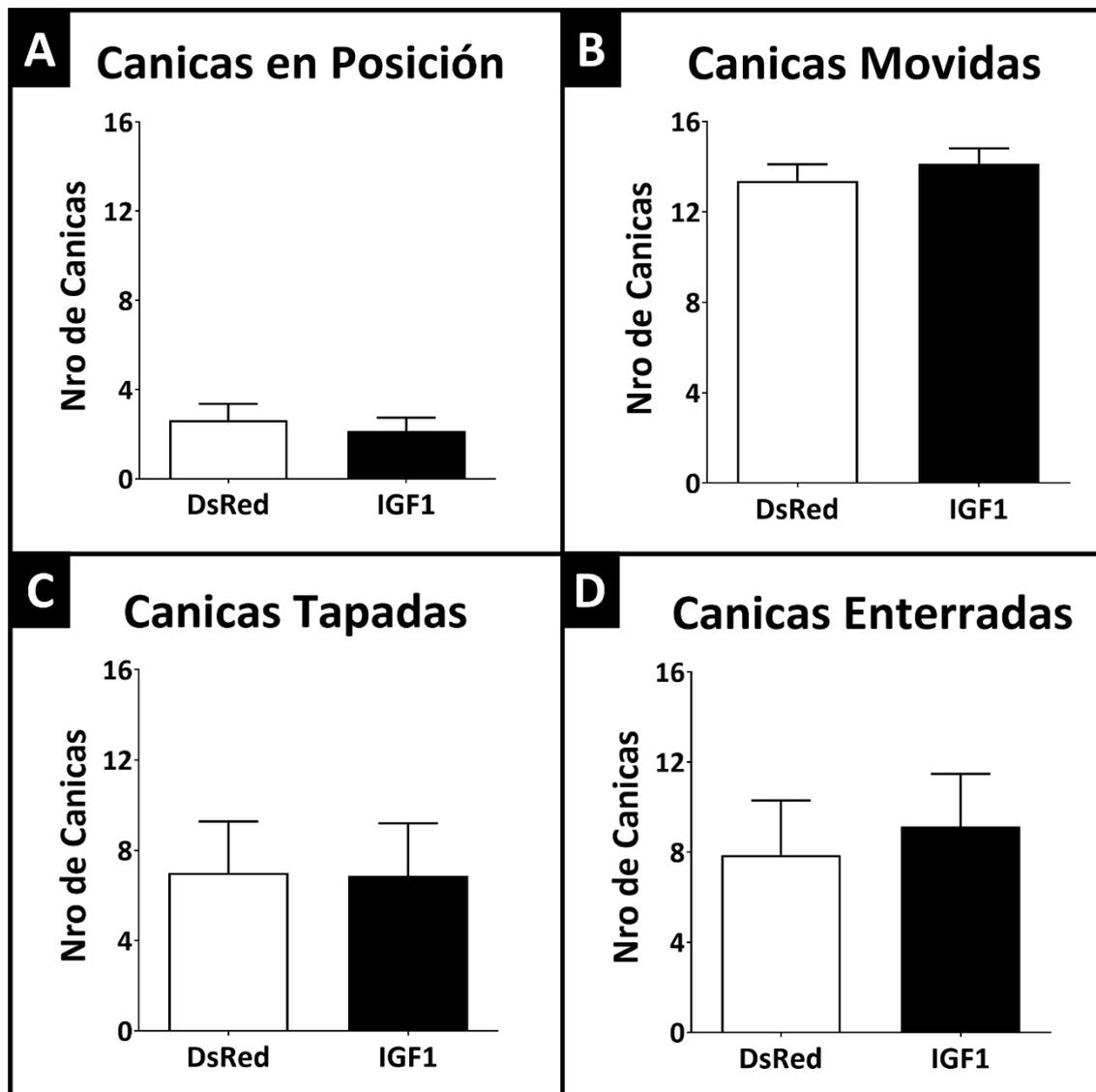


Figura 24. Efecto de la terapia génica con IGF1 sobre el comportamiento innato de enterramiento defensivo. (A) Canicas intactas: expresado como el número de canicas que se encuentran en su posición original. **(B)** Canicas movidas: expresado como el número de canicas que no se encuentran en su posición original. **(C)** Canicas tapadas: expresado como el número de canicas que al menos 1/3 de su totalidad se hallan tapadas con viruta. **(D)** Canicas enterradas: expresado como el número de canicas que se encuentran completamente tapadas por viruta y a una distancia no menor a 3 cm del piso de la jaula. Los datos se expresan como media ± SEM y se analizaron con el test de Student. N=5.

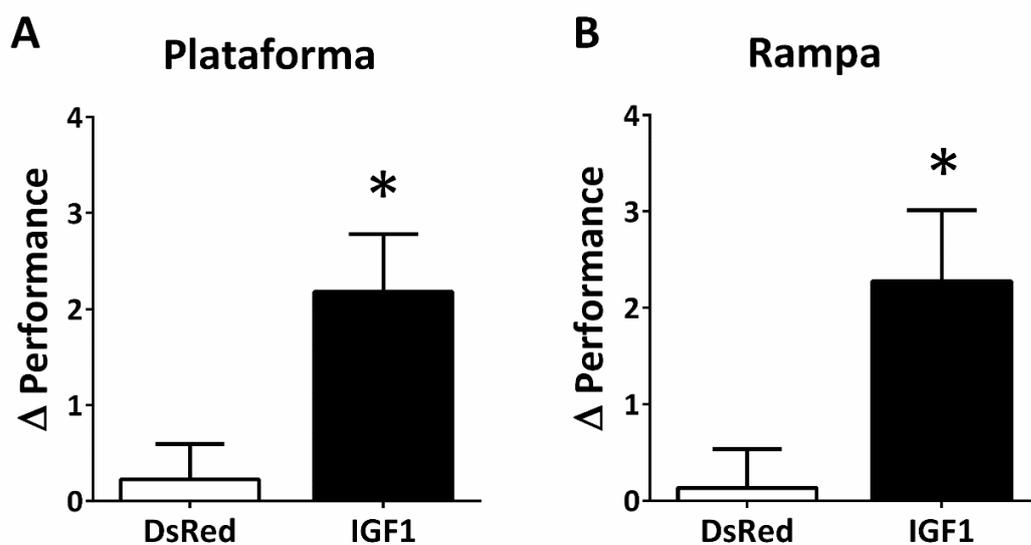


Figura 25. Efecto de la terapia génica con IGF1 sobre el desempeño motor. (A) Desempeño motor sobre una Plataforma Giratoria: se determinó la performance motora de los animales calculando la variación en el tiempo de sostén (post-cirugía – pre-cirugía). **(B)** Desempeño motor sobre una Plataforma inclinada 70°: se determinó la performance motora de los animales calculando la variación en el tiempo de sostén (post-cirugía – pre-cirugía). Los datos se expresan como media ± SEM y se analizaron con el test de Student. N=15. *p<0.05

4.1.4 Efecto de la terapia génica con IGF1 sobre el sistema dopaminérgico nigroestriatal

La mejora observada en el desempeño motor de las ratas seniles tratadas con RAd-IGF1, podría deberse a que la terapia modifique el número de neuronas dopaminérgicas o la síntesis de dopamina. Para indagar al respecto, inicialmente se cuantificó el número de neuronas dopaminérgicas inmunomarcadas con anticuerpo anti-TH en la *Substantia Nigra* y se determinó la densidad de fibras de dichas neuronas en el Núcleo Estriado. No se observaron diferencias significativas en el número de neuronas DA (**Figura 26.A.** t-test, P = 0.6091) ni en la densidad de fibras en el Núcleo Estriado (**Figura 26.B.** t-test, P = 0.8247).

A continuación, evaluamos la expresión de la enzima tirosina hidroxilasa (TH) en *Substantia Nigra* y Núcleo Estriado mediante Western Blot. La actividad de la esta enzima limita la producción del neurotransmisor dopamina, el cual regula funciones de la conducta motora. Nuevamente, no observamos diferencias significativas en la expresión de TH en las zonas analizadas (*Substantia Nigra*: **Figura 27.C.** t-test, P = 0.2246; Núcleo Estriado: **Figura 27.D.** t-test, P = 0.7002).

Finalmente, evaluamos la expresión génica de la enzima TH en Núcleo Estriado mediante qRT-PCR. Una vez más, no observamos diferencias significativas en la expresión del ARNm de TH en Núcleo Estriado (**Figura 27.E.** t-test, P = 0.4291).

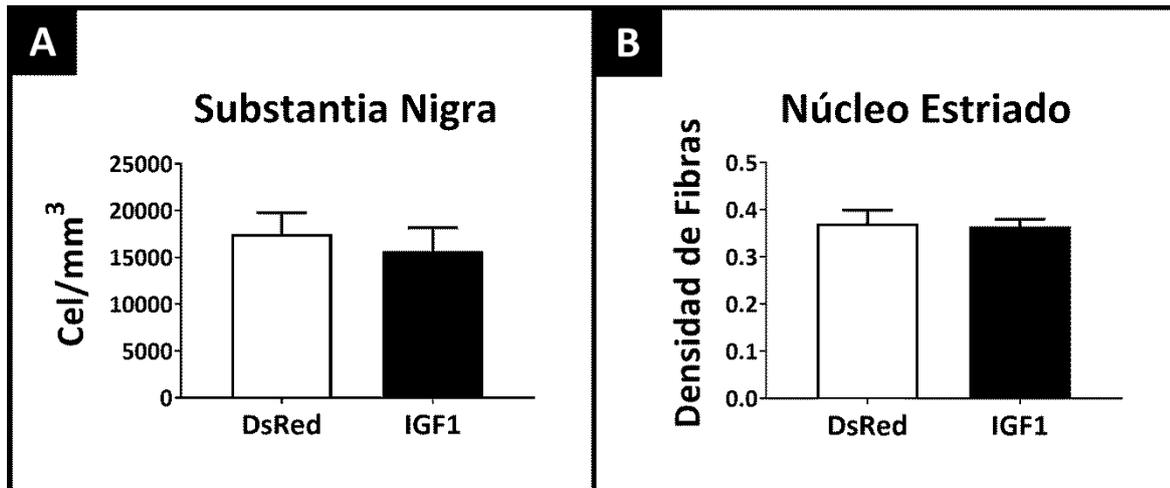


Figura 26. Análisis del efecto de la terapia génica con IGF1 sobre las neuronas dopaminérgicas. (A) Densidad de neuronas dopaminérgicas en *Substantia Nigra* en ambos grupos experimentales. (B) Densidad de fibras de neuronas dopaminérgicas en Núcleo Estriado en ambos grupos experimentales. Los datos se expresan como media \pm SEM y se analizaron con el test de Student. N=5.

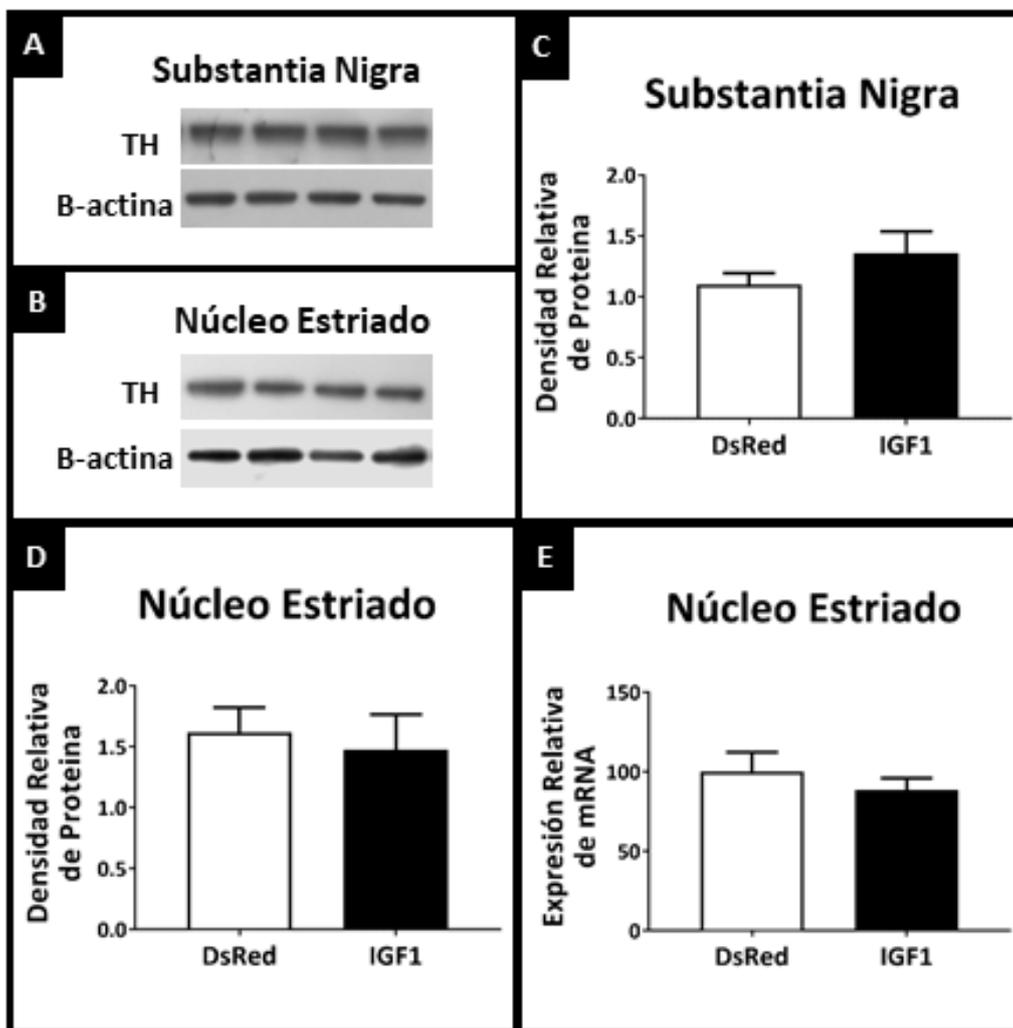


Figura 27. Análisis del efecto de la terapia génica con IGF1 sobre la expresión de la enzima Tirosina Hidroxilasa. Western Blot de TH y β -actina de *Substantia Nigra* (A) y Núcleo Estriado (B), respectivamente. Cuantificación de los niveles de TH en *Substantia Nigra* (C) y Núcleo Estriado (D), respectivamente, normalizados a la densidad relativa de β -actina. Cuantificación de los niveles del mRNA de TH en Núcleo Estriado (E) normalizado a la expresión GAPDH. Los datos se expresan como media \pm SEM y se analizaron con el test de Student. N \geq 4.

4.1.5 Estudio de la relación entre el desempeño motor de las ratas seniles con la reactividad y polarización de la microglia.

Con el fin de buscar conexiones causales entre la reactividad de la microglia, su polarización hacia un fenotipo anti-inflamatorio y la fuerza motora de las ratas seniles, realizamos el análisis de correlación de Pearson. Como se puede observar en la Figura 28, las ratas tratadas con IGF1 (**Figura 28.B**) presentan una correlación positiva entre el porcentaje de microglia reactiva y la performance motora, resultando significativa para el test de la rampa (**Figura 28.B**, $r^2 = 0.0.9294$, $P = 0.0081$; y no así para el test de la plataforma giratoria (**Figura 28.D**, $r^2 = 0.0.2163$, $P = 0.4300$). Por el contrario, los animales tratados con RAd-DsRed no presentaron correlación entre los parámetros analizados en ninguno de los dos tests (**Figura 28.A**, $r^2 = 0.3115$, $P = 0.3282$; **Figura 28.C**, $r^2 = 0.0917$, $P = 0.6204$).

De manera similar, al analizar la correlación entre la fuerza motora de los animales y el grado de polarización de la microglia hacia un fenotipo anti-inflamatorio, observamos que los animales tratados con Rad-IGF1 presentan una correlación positiva entre su desempeño motor y la proporción de microglia antiinflamatoria, siendo estadísticamente significativa solamente para el test de la rampa (**Figura 29.B**, $r^2 = 0.7990$, $P = 0.0163$; **Figura 29.D**, $r^2 = 0.2207$, $P = 0.3472$). En concordancia con lo observado anteriormente, los animales tratados con el vector control no presentaron una correlación estadísticamente significativa (**Figura 29.A**, $r^2 = 0.3777$, $P = 0.1050$; **Figura 29.C**, $r^2 = 0.3054$, $P = 0.1555$).

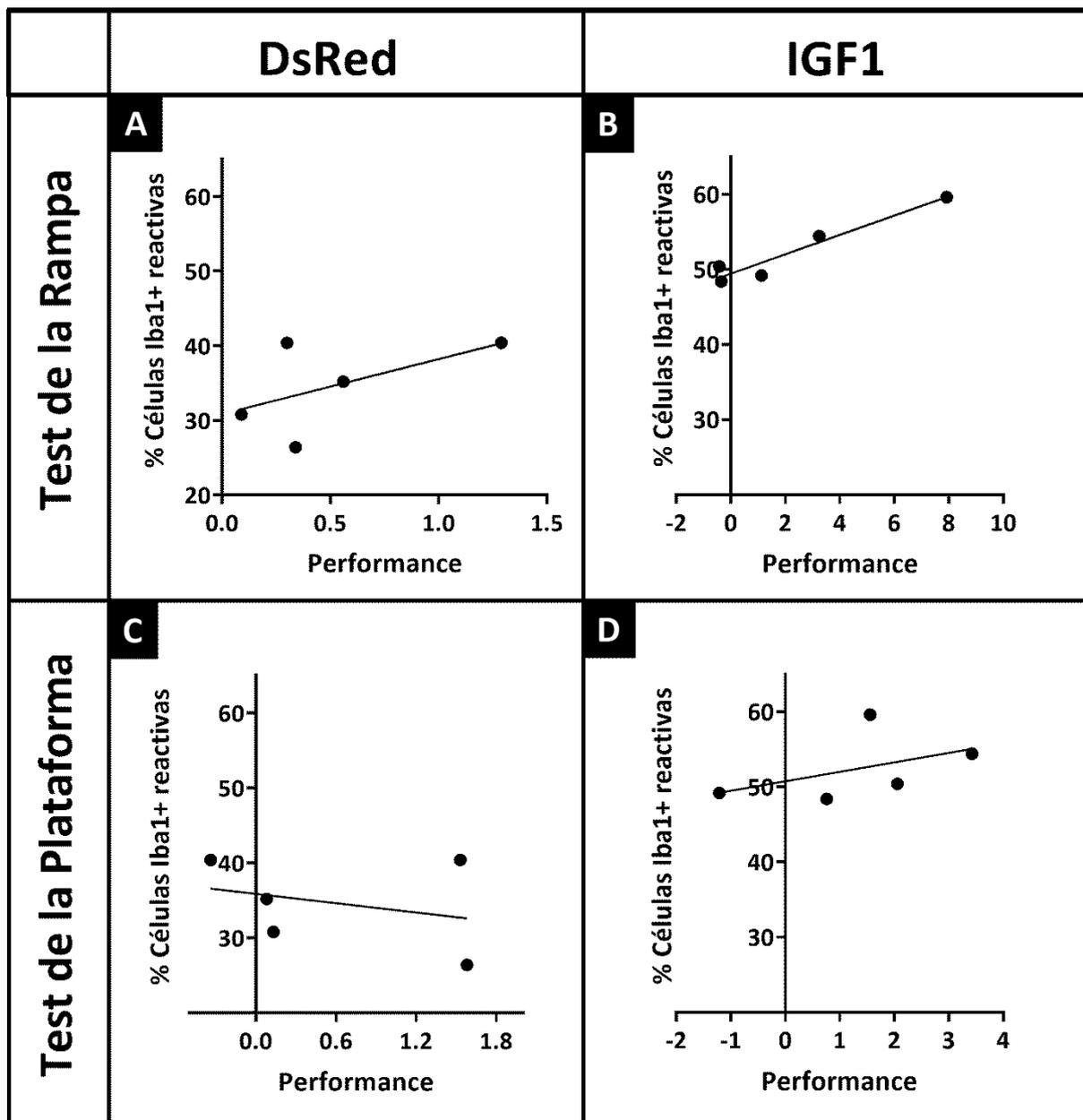


Figura 28. Correlación entre la proporción de microglia reactiva y el desempeño motor de las ratas seniles. Evaluación de la correlación de Pearson entre los valores de proporción de microglia reactiva y el desempeño motor en el Test de la Rampa Inclinada (A, B) y en el Test de la Plataforma Giratoria (C, D) de ratas seniles pertenecientes a los grupos DsRed (A, C) e IGF1 (B, D).

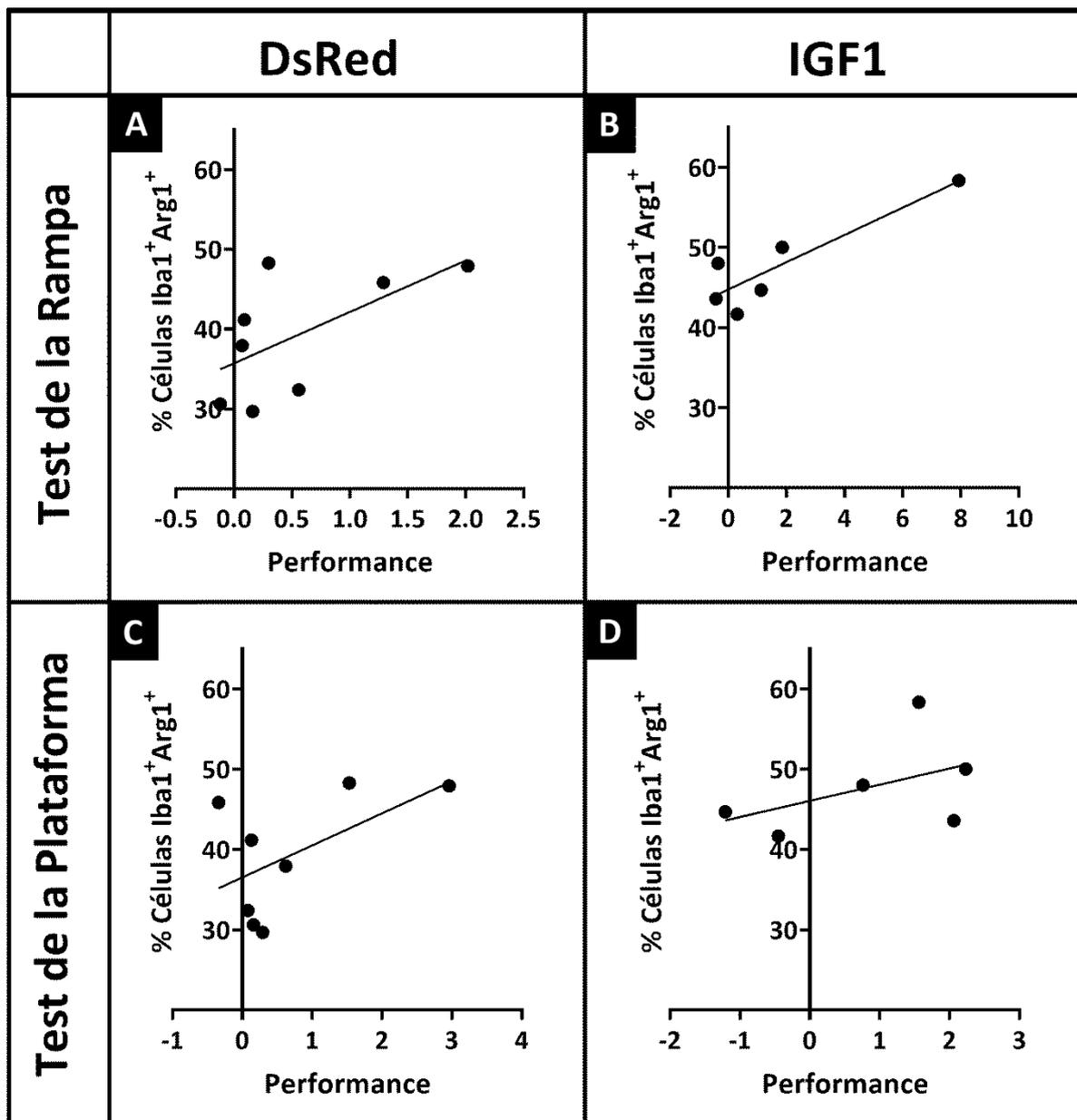


Figura 29. Correlación entre la proporción de microglia antiinflamatoria y el desempeño motor de las ratas seniles. Evaluación de la correlación de Pearson entre los valores de la proporción de microglia antiinflamatoria (Iba1⁺Arg1⁺) y el desempeño motor en el Test de la Rampa Inclinada (A, B) y en el Test de la Plataforma Giratoria (C, D) de ratas seniles pertenecientes a los grupos DsRed (A, C) e IGF1 (B, D).

4.2 DISCUSIÓN

El envejecimiento está relacionado con la aparición de déficits cognitivos y motores. Se ha descrito que estos déficits surgen, en parte, por la neuroinflamación crónica característica del cerebro envejecido, la cual es mediada por células de la glía²⁵⁹⁻²⁶⁴. La identificación de moléculas específicas capaces de regular el fenotipo de la microglia y los astrocitos, así como también su modulación por factores neurotróficos como el IGF1, facilitarían el potencial desarrollo de nuevas terapias y podrían utilizarse para mejorar la respuesta de las actuales. De esta manera, se podría regular la neuroinflamación y reducir los déficits motores asociados al envejecimiento o enfermedades neurodegenerativas.

En la presente tesis doctoral nos propusimos estudiar los potenciales efectos anti-inflamatorios de la terapia génica con IGF1 en el cerebro envejecido. En particular, focalizamos nuestro estudio en la microglia, con el fin de modular su activación. Estas células son una de las más susceptibles a los efectos del envejecimiento debido a su habilidad de responder a los cambios en el microambiente del cerebro^{265,266}. Las células de la microglia se encuentran en un estado de vigilancia en el cerebro sano, manteniendo la homeostasis. Sin embargo, frente a cualquier tipo de perturbación, la microglia responde a los estímulos nocivos y modifica su fenotipo y perfil secretor, atravesando un proceso conocido como “activación”^{267,268}. Como se mencionó en la introducción, la microglia reactiva participa en los procesos neuroinflamatorios mediante la liberación de una amplia variedad de mediadores inflamatorios e inmunes, incluyendo citoquinas/quimioquinas pro- o antiinflamatorias, las cuales subsecuentemente ejercen efectos neurotóxicos o neuroprotectores, respectivamente.

Previamente, otros autores han descrito un aumento en el número de células microgliales en el cerebro envejecido^{269,270}. Además, la microglia adopta un fenotipo senescente pro-inflamatorio durante el envejecimiento^{171-173,271} que afecta sus funciones como la secreción de citoquinas, el control sináptico y la capacidad migratoria. Como consecuencia se observa una pérdida de la homeostasis y una disminución de la plasticidad neuronal y del desempeño motor y cognitivo. Lee y colaboradores, demostraron que la inyección intrahipocampal de moléculas antiinflamatorias (IL-13 e IL-4), incrementan los niveles de expresión de IGF1, promoviendo la polarización de la microglia hacia un estado anti-inflamatorio²⁷¹. Reforzando este concepto, los niveles de producción de IGF1 endógeno fueron directamente asociados a la edad de los animales. En el presente estudio, hemos demostrado que la inyección ICV de rAd-IGF1 en el modelo de rata senil es capaz de aumentar de manera significativa el número de células microgliales específicamente en el Núcleo Estriado de estos animales, las cuales a su vez presentaron un mayor grado de reactividad²⁷². Además, comprobamos que el tratamiento con rAd-IGF1 es capaz de promover la polarización de la microglia del Núcleo Estriado hacia un fenotipo

anti-inflamatorio, evidenciado por un aumento en la proporción de células microgliales presentando doble inmunomarcación Iba1⁺Arg1⁺. Wang y colaboradores demostraron que el tratamiento intraperitoneal con salidroside, un agente que ha demostrado tener efectos anti-inflamatorios, también es capaz de promover la polarización de la microglia hacia un fenotipo M2²⁷³. Por tanto, en concordancia a lo descrito por Lee y colaboradores y por Wang y colaboradores, postulamos que los efectos anti-inflamatorios del IGF1 exógeno administrado mediante terapia génica son los que promueven, en nuestro modelo experimental, la polarización de la microglia tanto morfológica como fenotípicamente hacia un estado antiinflamatorio.

El Núcleo Estriado es el centro responsable de la ejecución de movimientos voluntarios²⁷⁴. Dada la fuerte respuesta de las células de la microglia en esta área, y su polarización hacia un fenotipo anti-inflamatorio, nos propusimos evaluar si la terapia génica con IGF1 es capaz de atenuar o restaurar los déficits motores encontrados en ratas envejecidas. Evaluamos la locomoción, la conducta de enterramiento defensivo y la fuerza motora de los animales empleando una batería de pruebas comportamentales. Nuestros resultados revelaron que el tratamiento empleado no tuvo un efecto sobre la locomoción ni sobre el comportamiento innato de enterramiento defensivo en animales seniles tratados con RAd-IGF1 respecto a aquellos tratados con el virus control. Sin embargo, pudimos observar que la terapia con RAd-IGF1 mejora marcadamente el desempeño de las ratas seniles en los test que evalúan la fuerza motora (Prueba de la Rampa Inclinada y Prueba de la Plataforma Giratoria). Dichos resultados coinciden con resultados previos de nuestro grupo²⁴². Varios autores han asociado una mejora en el desempeño motor con el incremento de dopamina²⁷⁵⁻²⁷⁸. En nuestro trabajo hemos demostrado que la mejora motora observada luego de la terapia génica con IGF1 no está asociada a cambios en el número de neuronas dopaminérgicas en la *Substantia Nigra* ni de fibras dopaminérgicas en el Núcleo Estriado. Tampoco observamos cambios en la expresión de la enzima Tirosina Hidroxilasa, cuya actividad limita la producción de dopamina. Por tanto, podemos concluir que la mejora observada en el desempeño motor no se encuentra relacionada, al menos en forma directa, a alteraciones en el sistema dopaminérgico.

Dado el fuerte efecto de la terapia observado sobre las células microgliales del NE y sobre el desempeño motor, sugerimos una posible relación entre estos resultados. El análisis de correlación de Pearson demostró que tanto el aumento en la proporción de la microglia reactiva como de su polarización hacia un fenotipo anti-inflamatorio se correlaciona de manera positiva con las evaluaciones de la fuerza motora realizadas. En apoyo a nuestra hipótesis, se ha observado anteriormente que agentes anti-inflamatorios, como es la salidroside, también son capaces de polarizar la microglia hacia un fenotipo M2 a la vez que mejoran el desempeño motor en ratas²⁷³. Hernandez-Rabaza y

colaboradores (2016) también demostraron que el tratamiento con sulforafano intraperitoneal promueve la polarización de la microglia hacia un fenotipo anti-inflamatorio en cerebelo, conduciendo a una mejora en la coordinación motora en un modelo de hiperamonemia²⁶². En conjunto y en base a nuestros resultados, proponemos que la terapia con IGF1 en el cerebro envejecido ejerce un efecto antiinflamatorio que resulta en un aumento en la proporción de microglia M2, la cual podría estar mediando la mejora observada en el desempeño motor observada.

**CAPÍTULO V: CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA
MICROGLIA SENESCENTE Y DEL MICROAMBIENTE
CIRCUNDANTE EN EL MODELO DE RATA HEMBRA
SENIL: EFECTOS DE LA TERAPIA GÉNICA CON IGF1**

5.2 RESULTADOS

5.2.1 Efecto de la terapia génica para IGF1 sobre la funcionalidad de la microglia senescente.

Como se mencionó en la introducción, durante el envejecimiento la microglia adopta un fenotipo inflamatorio que afecta su capacidad de establecer comunicaciones y de secretar citoquinas, presentando además una motilidad y actividad fagocítica disminuida. Estas alteraciones tienen consecuencias funcionales de la microglia que conducen, finalmente, a una deficiencia en la plasticidad neuronal. Dada la fuerte modulación de la terapia génica con IGF1 sobre las células microgliales, nos propusimos profundizar en el efecto del tratamiento sobre el funcionamiento de estas células y evaluar cambios en su microambiente.

5.2.1.1 La terapia génica con IGF1 incrementa la actividad fagocítica de la microglia senescente y promueve la remodelación sináptica en el Núcleo Estriado.

Inicialmente, evaluamos la actividad fagocítica de la microglia a través de la cuantificación de la presencia de proteínas sinápticas dentro de la microglia. Para ello, se realizó una doble inmunohistoquímica para el marcador microglial Iba1 y las siguientes proteínas sinápticas: 1) Homer1, localizada en la densidad postsináptica, está involucrada en el tráfico de receptores de glutamato^{279,280}; 2) Bassoon, localizada en la botón presináptico de neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas²⁸¹; 3) VACHT, localizada en la neurona colinérgica presináptica, se encarga de transportar la ACh hasta la terminal sináptica; 4) VGlut1, localizado en neuronas corticoestriatales pero no talamoestriatales²⁸², se encarga de transportar la Glut hasta la terminal sináptica; 5) D2R. En condiciones normales, estas proteínas sólo se encuentran presentes en las terminales sinápticas de las neuronas. Por consiguiente, si la inmunomarcación de dichas proteínas colocaliza con la inmunomarcación de Iba1, se considera que se encuentran dentro de la microglia y, por tanto, han sido fagocitadas.

La cuantificación de proteínas sinápticas dentro de la microglia demostró que el tratamiento con RAd-IGF1 promueve la remodelación de las sinapsis glutamatérgicas a nivel de la densidad postsináptica, evidenciado por un aumento en la fagocitosis de Homer1 (**Figura 30.C. t-test, P < 0.0001**), y de las sinapsis colinérgicas a nivel de la densidad presináptica, evidenciado por un aumento en la fagocitosis de VACHT (**Figura 32.C. t-test, P = 0.0249**) en el Núcleo Estriado. Por el contrario, no se observaron alteraciones en la remodelación de sinapsis GABAérgicas (**Figura 31.C. t-test, P = 0.2851**) o glutamatérgicas a nivel de la densidad presináptica (**Figura 33.C. t-test, P = 0.0655**).

En cuanto a la determinación de receptor de dopamina tipo 2 dentro de la microglia, no se pudo observar inmunomarcación con el anticuerpo anti-D2R disponible. Decidimos entonces evaluar la expresión génica de D1R y D2R y de la proteína transportadora de dopamina DAT en el NE mediante

qRT-PCR. No se obtuvieron diferencias significativas en la expresión génica de los receptores de dopamina ni de la proteína transportadora de dopamina entre los grupos experimentales. Sin embargo, se pudo observar una tendencia a aumentar la expresión génica de D2R en los animales tratados con RAD-IGF1 (**Figura 34.B**. t-test, $P = 0.0595$).

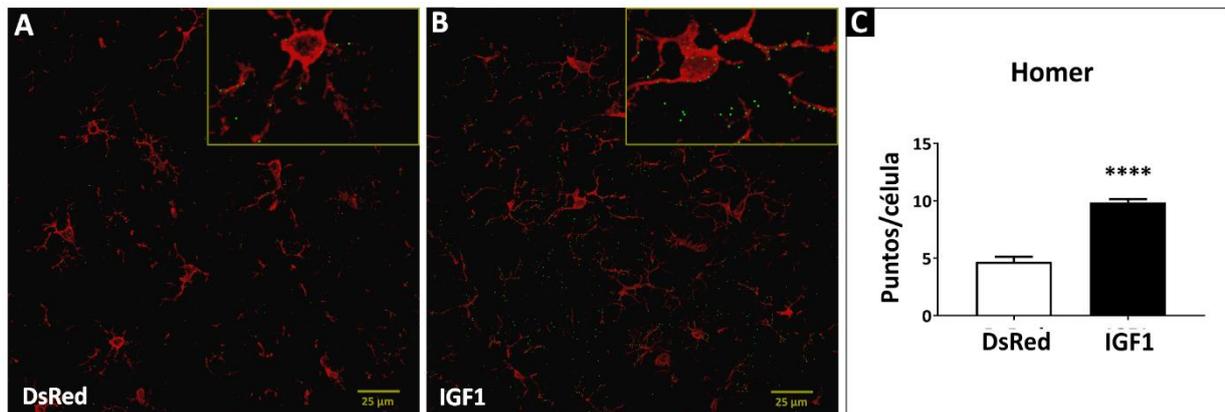


Figure 30. Imágenes representativas de células Iba1⁺ (rojo) que han fagocitado proteína sináptica Homer (verde) en el Núcleo Estriado de ratas tratadas con RAD-DsRed (**A**) o RAD-IGF1 (**B**) a una magnificación de 600X (barra de escala: 25 micrones). El panel **C** muestra la cuantificación de puntos verdes por célula. Los datos expresan como media ± SEM y se analizaron con el test de Student. N = 5.

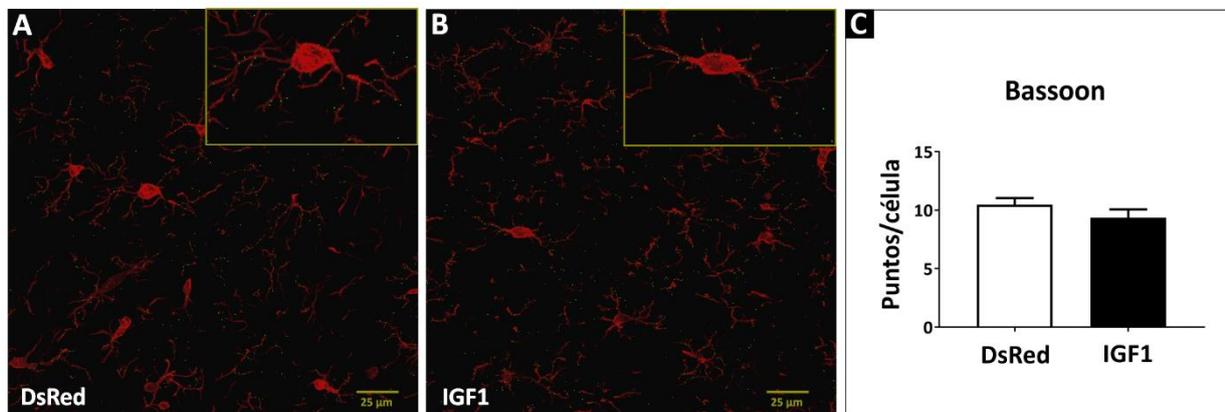


Figure 31. Imágenes representativas de células Iba1⁺ (rojo) que han fagocitado proteína sináptica Bassoon (verde) en el Núcleo Estriado de ratas tratadas con RAD-DsRed (**A**) o RAD-IGF1 (**B**) a una magnificación de 600X (barra de escala: 25 micrones). El panel **C** muestra la cuantificación de puntos verdes por célula. Los datos expresan como media ± SEM y se analizaron con el test de Student. N = 5.

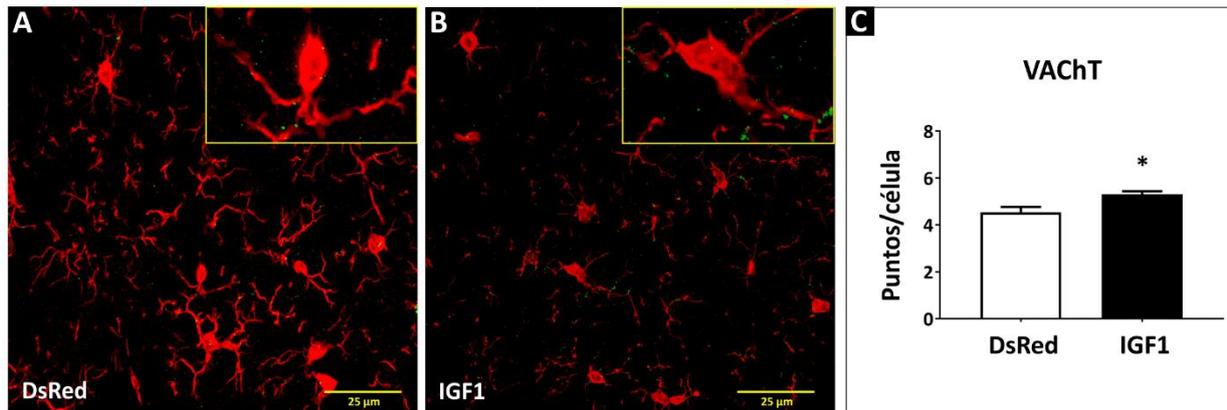


Figure 32. Imágenes representativas de células Iba1⁺ (rojo) que han fagocitado vesícula transportadora VACHT (verde) en el Núcleo Estriado de ratas tratadas con RAd-DsRed (A) o RAd-IGF1 (B) a una magnificación de 600X (barra de escala: 25 micrones). El panel C muestra la cuantificación de puntos verdes por célula. Los datos expresan como media ± SEM y se analizaron con el test de Student. N = 5.

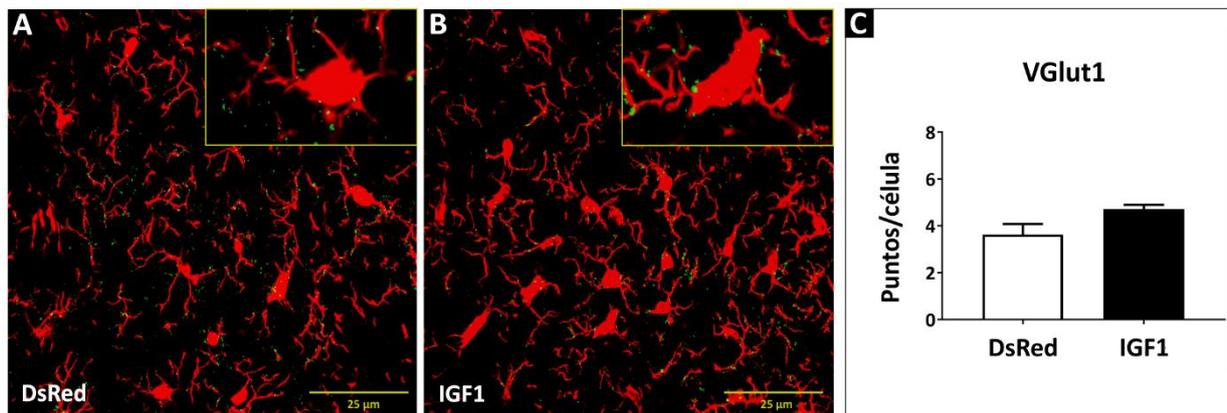
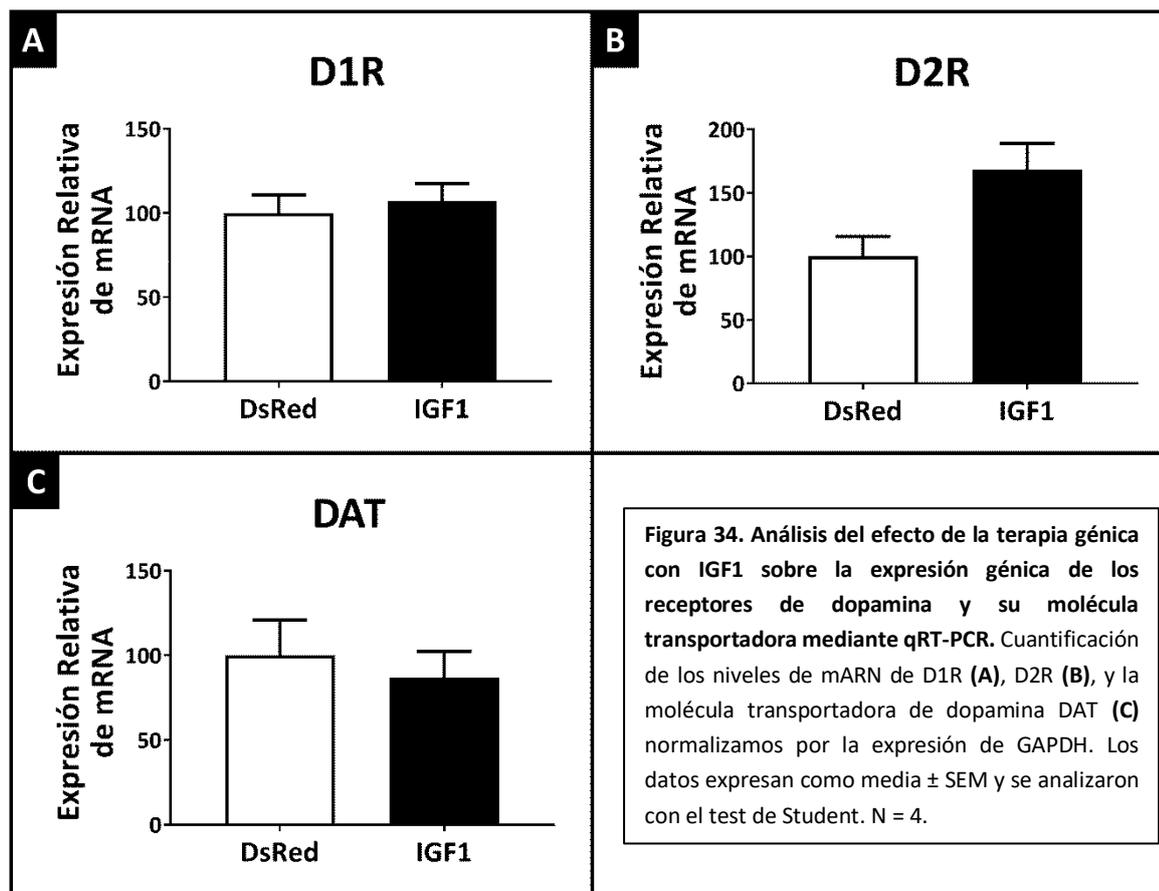


Figure 33. Imágenes representativas de células Iba1⁺ (rojo) que han fagocitado vesícula transportadora VGlut1 (verde) en el Núcleo Estriado de ratas tratadas con RAd-DsRed (A) o RAd-IGF1 (B) a una magnificación de 600X (barra de escala: 25 micrones). El panel C muestra la cuantificación de puntos verdes por célula. Los datos expresan como media ± SEM y se analizaron con el test de Student. N = 5.



5.2.2 Efecto de la terapia génica para IGF1 sobre la expresión génica y proteica en el Núcleo Estriado de ratas seniles.

Hasta el momento hemos demostrado que la terapia génica ICV con IGF1 es capaz de modificar el número, la reactividad y la funcionalidad de la microglia senescente. Además, hemos demostrado que esta terapia es capaz de mejorar el desempeño motor de ratas seniles. Con el objetivo de profundizar en la caracterización del modelo en estudio y debido a que, según nuestro conocimiento, no se ha reportado cómo el IGF1 o la terapia génica para IGF1 afecta la expresión génica y proteica en zonas relacionadas al movimiento, nos propusimos ahondar nuestros estudios en estos parámetros.

5.2.2.1 Efecto sobre la expresión génica

En primer lugar, este estudio se abordó realizando un secuenciamiento total de ARN (ARNseq) con ARN extraído del NE de ratas seniles tratadas con RAD-IGF1 y RAD-DsRed. Las muestras de ARN fueron secuenciadas en el Laboratorio de Análisis Genómico y Transcriptómico de la Universidad de Göttingen, Alemania y analizadas en Argentina con la asistencia de los Dres. Ezequiel Lacunza y Martín Abba del Centro de Investigaciones Inmunológicas Básicas y Aplicadas (CINIBA).

El análisis de enriquecimiento de los datos crudos del secuenciamiento generó una lista de genes diferencialmente expresados (DE) entre los grupos, compuesta por 98 genes ($p\text{-adj}<0.05$; Fold changes >2). De estos genes DE, 97 se encuentran subexpresados en el grupo IGF1.

Inicialmente, esta lista de genes DE se analizó con Panther Classification System de Gene Ontology (<http://www.pantherdb.org/>). Gene Ontology es una base de datos de vías biológicas que permite el análisis de listas de genes en 5 grandes áreas: 1) Función Molecular; 2) Procesos Biológicos; 3) Componentes Celulares; 4) Clase de Proteína; y 5) Vías Biológicas. Nosotros nos focalizamos en analizar la asociación de los genes DE a (1) procesos biológicos y (2) vías biológicas. Este análisis pudo ubicar a 83 de los 98 genes DE en 11 procesos biológicos. Como se puede observar, la gran mayoría de los genes DE se corresponden con procesos biológicos asociados a la respuesta inmune y respuesta a estímulos (**Figura 35**). Cabe destacar que dentro de la categoría “regulación de procesos biológicos”, donde se encuentran asociados una gran cantidad de genes, se agrupan genes asociados a procesos generales, como regulación del sistema inmune, regulación de transducción de señales, regulación de la comunicación celular, regulación del ciclo celular, regulación de la muerte celular, entre otros.

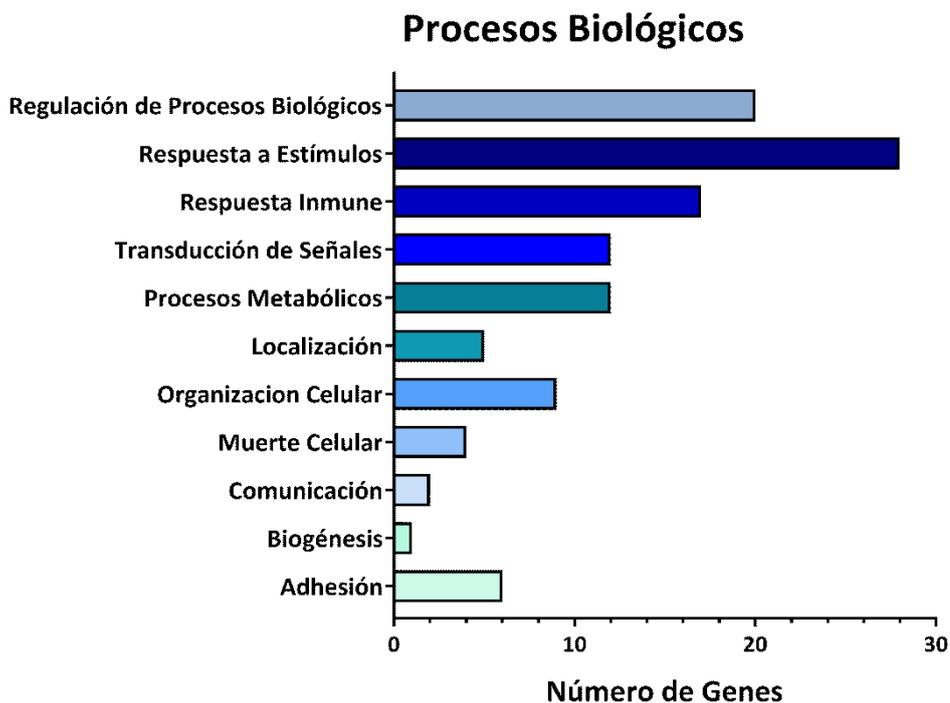


Figura 35. Agrupamiento de los genes DE en procesos biológicos a los cuales se encuentran asociados.

La asociación de los genes DE a vías biológicas por Gene Ontology resultó en 47 genes asociados a 12 vías biológicas. Nuevamente, podemos observar que la gran mayoría de los genes DE fueron ubicados en vías asociadas a la Respuesta Inmune (**Figura 36**), dentro de las cuales podemos destacar Inflamación mediada por citoquinas y quimoquinas, señalización de Interleuquinas, señalización de JAK/STAT, Activación de células T, Activación de células B, Señalización de Interferón γ , Señalización de TLR, entre otros.

Además, se realizó un mapa de enriquecimiento funcional con el programa Cytoscape, en el cual los genes se agrupan en clusters de acuerdo a una función a la cual se los pueda asociar. Una vez más, podemos destacar que los genes DE se agrupan en clusters relacionados a la respuesta del sistema inmune como “Activación de las Células Microgliales”, “Actividad de Receptores de Citoquinas”, “Vía de Señalización del Receptor de células B”, “Respuesta a Interferón γ ”, “Marcadores de macrófagos”, y “Vía de Señalización de Quimoquinas”, todos directamente relacionados con la respuesta inmune (**Figura 37**). La **tabla 5** muestra un subgrupo de genes relacionados con la activación de células microgliales y la actividad de receptores de citoquinas.

De manera complementaria, decidimos investigar de manera específica la expresión de citoquinas inflamatorias en NE. Se evaluó la expresión génica de dos citoquinas proinflamatorias (IL1b e IL6) y dos antiinflamatorias (IL4 y TGF β). Observamos que el tratamiento con RAd-IGF1 es capaz de reducir la expresión de IL1b de manera significativa (**Figura 38.A**. t-test, $P = 0,0114$). A su vez, no se observaron diferencias significativas en la expresión de IL6, IL4 ni TGF β (**Figura 38**).

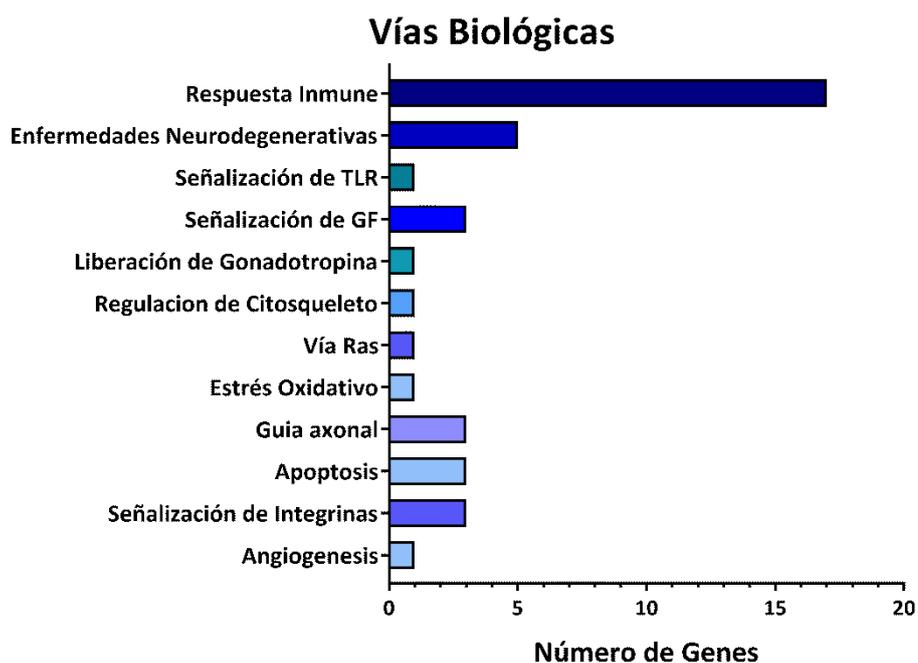


Figura 36. Agrupamiento de los genes DE en vías biológicas a las cuales se encuentran asociados.

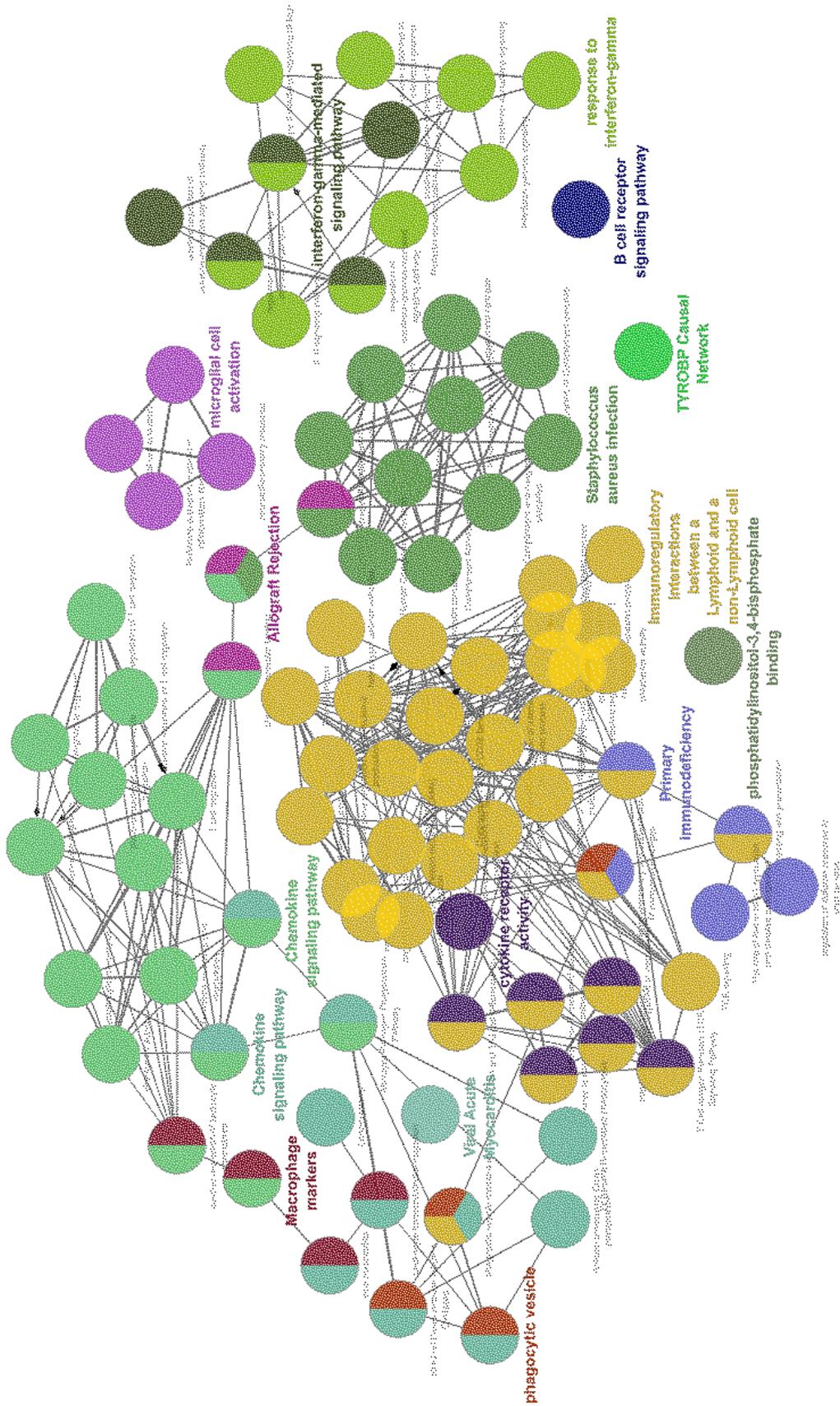


Figura 37. Mapa de enriquecimiento funcional de los genes DE.

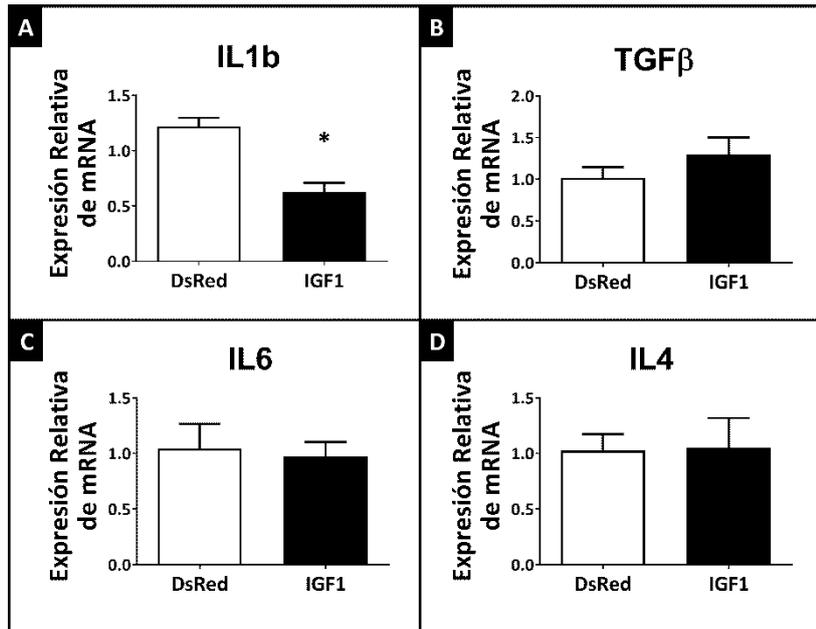


Figura 38. Análisis del efecto de la terapia génica con IGF1 sobre la expresión génica de citoquinas pro y antiinflamatorias mediante qRT-PCR. Cuantificación de los niveles de ARNm de IL1b (A), TGFβ (B), IL6 (C) e IL4 (D) normalizamos por la expresión de GAPDH. Los datos expresan como media ± SEM y se analizaron con el test de Student. N = 4. *p<0,05

Tabla 5. Genes DE relacionados con la activación de células microgliales y la actividad de receptores de citoquinas

Gen	Descripción	log(FC)
UBD/FAT10	Ubiquitina D	-3,99897524
CXCL11	C-X-C motif chemokine ligand 11	-3,0446336
IL15RA	Subunidad alfa del receptor de Interleuquina 15	-2,45425163
IL2RB	Subunidad beta del receptor de Interleuquina 2	-2,38603063
CD74	Cluster de diferenciación 74	-1,97377263
ITGAL	Integrina alfa L	-1,64982867
ITGA4	Integrina alfa 4	-1,62058647
IRF1	Factor regulador de interferón 1	-1,2560172
CD86	cluster de diferenciación 86	-1,24216697
STAT1	Transductor de señal y activador de transcripción 1	-0,99766349

5.2.2.2 Análisis del efecto de la terapia génica con IGF1 sobre la expresión proteica en el Núcleo Estriado de ratas seniles.

A continuación, estudiamos la expresión proteica de moléculas relacionadas con distintas vías de señalización empleando el kit comercial PathScan® de Cell Signaling. Este kit comercial permite la detección simultánea de cambios en la fosforilación o cambios proteolíticos de una gran batería de moléculas involucradas en procesos como proliferación y supervivencia, apoptosis, respuesta inflamatoria, daño del ADN, estrés y metabolismo lipídico. Con esta técnica pudimos observar un aumento significativo en la activación de Akt a nivel de la fosforilación en su residuo de Ser473 (**Figura 39**. ANOVA de 2 vías, $P = 0.01177$), involucrado en procesos de proliferación y supervivencia.

A pesar de no observar diferencias significativas en el análisis del resto de las modificaciones evaluadas, si es posible observar algunas tendencias. Como se muestra en la **figura 39**, los animales tratados con IGF1 presentan una mayor, aunque no estadísticamente significativa, activación por fosforilación de proteínas directamente relacionadas con la proliferación y supervivencia celular, como son las fosforilaciones de Erk en los residuos Thr202 y Tyr 204 y de Akt en el residuo Thr308. A su vez, una mayor fosforilación de PRAS40 en Thr246, Bad en Ser112 y GSK3 β en Ser9 (todos sustratos de pAkt) son resultados consistentes con una mayor activación de Akt. Complementariamente, la activación de mTOR en respuesta a factores de crecimiento, como es el IGF1, puede observarse por una mayor detección de su fosforilación en Ser2448.

Además, con este ensayo pudimos observar que la fosforilación de las proteínas JNK y p38 se encuentra disminuida. Estas proteínas son componentes centrales en vías de transducciones de señales. Son fosforiladas por una cascada de MAPK en respuesta a citoquinas pro-inflamatorias. En nuestra hipótesis de trabajo, postulamos que el efecto anti-inflamatorio del IGF1 es capaz de modular el ambiente pro-inflamatorio producto del envejecimiento en el cerebro de ratas seniles. Por lo tanto, estos resultados son consistentes con nuestra hipótesis.

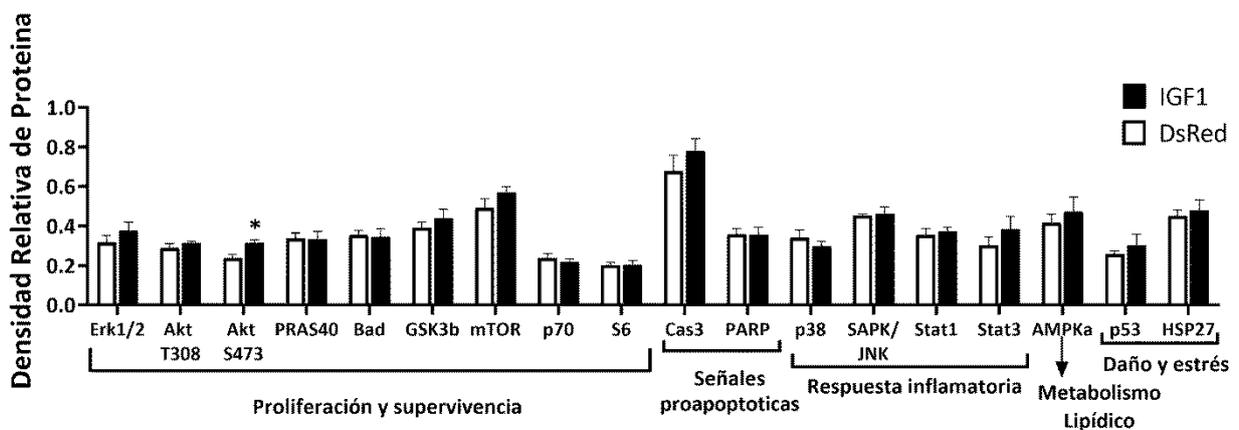


Figura 39. Análisis de la expresión relativa de proteínas con el kit PathScan®. Este kit de señalización intracelular permite la detección de modificaciones por fosforilación o clivaje de moleculas involucradas en procesos de proliferación y supervivencia, apoptosis, respuesta inflamatoria, daño del ADN, estrés y metabolismo lipídico. El gráfico muestra la cuantificación de los niveles de proteína relativos a la densidad del control positivo aportado por el kit. Los datos se expresan como media \pm SEM y se analizaron con ANOVA de 2 vías $N = 3$.

A continuación, con el fin de corroborar estos resultados obtenidos, decidimos reevaluar algunos de estos parámetros mediante la técnica de Western Blot. Realizamos las inmunodetecciones de Akt y pAkt Ser473; GSK3 β y pGSK3 β Ser9 y pErk 1/2. Sin embargo, no hemos podido detectar la presencia de pAkt ni pGSK3 β por esta técnica con los anticuerpos disponibles. Por tanto, no ha sido posible evaluar el efecto del tratamiento sobre la activación de las vías de Akt y GSK3 β . Si hemos podido detectar la señal de pErk1/2. Al igual que en el análisis por dot-blot, no hemos observado diferencias significativas en la expresión de p-Erk1/2 entre los grupos (**Figura 40**. T-test, $P = 0,6919$).

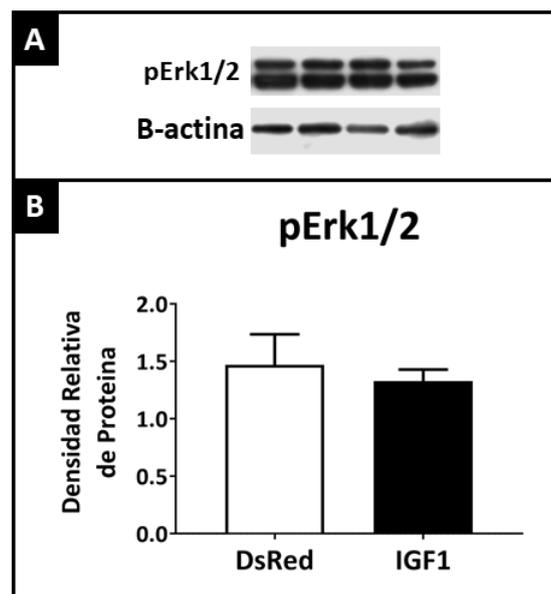


Figura 40. Análisis de la expresión relativa de pErk1/2 en Núcleo Estriado luego de la terapia génica con IGF1. Western Blot de pErk1/2 y β -actina de Núcleo Estriado (**A**). Cuantificación de los niveles de pErk1/2 en Núcleo Estriado (**B**) normalizados a la densidad relativa de β -actina. Los datos se expresan como media \pm SEM y se analizaron con el test de Student. $N \geq 4$.

5.3 DISCUSIÓN

Las primeras semanas de desarrollo postnatales se caracteriza por presentar un alto grado de formación y remodelación sináptica. Inicialmente, las neuronas forman más conexiones sinápticas de las que se mantienen en el cerebro maduro. La microglia son las encargadas de eliminar gran parte de estas sinapsis inmaduras, manteniendo y fortaleciendo un pequeño subgrupo, durante el proceso de poda sináptica (synaptic pruning). Este proceso es esencial para la maduración del circuito neuronal^{150,151}. La microglia mantiene este rol en la remodelación de las sinapsis y control de la plasticidad neural se mantiene durante toda la vida de un individuo. Del mismo modo que durante el desarrollo, se encarga de regular el número de sinapsis y de eliminar aquellas que no se necesitan de

manera momentánea o permanente¹⁵². Sin embargo, se ha visto durante el envejecimiento está función, así como la capacidad fagocítica y la migratoria, se ven deterioradas^{170,174-179}. Las consecuencias funcionales de estos cambios sobre la comunicación de la microglia resultan en una deficiencia en la plasticidad neuronal y en el desempeño motor y cognitivo. Cabe destacar que a excepción de pocos trabajos^{175,178}, la mayoría de estas investigaciones se han llevado a cabo en modelos in vitro. En nuestro modelo experimental de envejecimiento fisiológico, evaluamos la actividad fagocítica y la remodelación sináptica por parte de la microglia del Núcleo Estriado a través de la medida de proteínas sinápticas dentro de la microglia. Observamos que la microglia de ratas tratadas con RAd-IGF1 presentan una mayor remodelación de terminales postsinápticas que reciben estímulos glutamatérgicos, como pueden ser las MSN estriatales, y de terminales presinápticas colinérgicas, evidenciados por un aumento en la fagocitosis de Homer1 y VAcHT dentro de la microglia, respectivamente. No se observaron diferencias significativas en la remodelación de terminales presinápticas corticoestriatales o GABAérgicas, ya que no se observaron diferencias en la fagocitosis de VGlut1 ni Bassoon. Paralelamente, evaluamos la expresión de dos receptores de dopamina, normalmente expresados en las MSN e interneuronas estriatales (D1R y D2R), así como de la proteína transportadora de DA (DAT). En estos estudios, observamos que la expresión de D2R tiende a aumentar en el NE de animales tratados con RAd-IGF1. Como se mencionó en la introducción (sección 1.2.2) los niveles de D2R y su expresión génica disminuyen considerablemente durante la edad, siendo su expresión en interneuronas dopaminérgicas la caída más abrupta⁷⁵, lo cual podría conducir a una desinhibición de estas neuronas y resultar en una inhibición de la actividad motora. Dados nuestros resultados, postulamos que el aumento en la expresión de D2R podría estar dándose en las interneuronas colinérgicas del NE, lo cual conduciría a una menor liberación de ACh. Además, la acción de la ACh podría estar aún más disminuida por la mayor eliminación de botones presinápticos colinérgicos. Además, postulamos que la microglia estriatal se encuentra remodelando sinapsis entre las neuronas corticoestriatales y las MSN estriatales, que podrían no ser funcionales.

La acumulación de daño oxidativo, disfunción mitocondrial y la pérdida de la proteostasis producto del envejecimiento provocan una activación crónica de las células de la glía, estableciendo así una neuroinflamación sostenida en el tiempo. La microglia envejecida se ha caracterizado también por presentar una pérdida de sus funciones neuroprotectoras¹⁷⁴. Estas células presentan una expresión aumentada de PRRs que desencadenan la respuesta pro-inflamatorias, como CD14 y TLRs¹⁸¹ y elevados niveles de expresión de citoquinas pro-inflamatorias como TNF α , IL1 β , IL6^{170,171,180}. En el presente capítulo, evaluamos cómo la terapia génica con RAd-IGF1 afecta la expresión génica en el Núcleo Estriado. Anteriormente, se han llevado a cabo estudios sobre el transcriptoma del NE de ratones en modelos de autismo o de trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH)^{283,284}. Sin embargo,

no se han llevado a cabo estudios sobre el efecto de factores neuroprotectores en el transcriptoma del Núcleo Estriado de ratas viejas. De acuerdo al análisis preliminar de la secuenciación total de ARN, observamos que el tratamiento con RAd-IGF1 disminuye la expresión de genes relacionados con la respuesta inmune y respuesta a estímulos. Además, luego de realizar un mapa de enriquecimiento funcional, observamos que los genes diferencialmente expresados (disminuidos en el grupo IGF1) se encuentran relacionados a procesos como “Activación de las Células Microgliales”, “Actividad de Receptores de Citoquinas” y “Vía de Señalización de Quimoquinas”, entre otros. La terapia génica indujo la subexpresión de genes relacionados con la respuesta pro-inflamatoria: CXCL11, receptor α de IL15 (IL15RA), receptor β de IL2 (IL2RB), ITGAL, ITGA4, IRF1, STAT1, CD86, CD74 y Ubiquitina D (UBD/FAT10). La vía de activación del interferón-gamma (INF- γ) y TLR4 en la microglia proinflamatoria conducen a la activación a los activadores de la transcripción STAT1 e IRF1, los cuales aumentan en la transcripción de citoquinas (CXCL11), receptores de citoquinas (IL15RA e IL2RB), integrinas (ITGAL e ITGA4), y marcadores de superficie (CD86)^{162,285}. Por otro lado, se ha observado que UBD/FAT10 podría estar involucrado en el desarrollo de gliomas^{286,287} y que su expresión en neuronas aumenta en respuesta a señales pro-inflamatoria²⁸⁸. Por último, el cluster de diferenciación CD74 se ha utilizado como marcador de microglia M1 activada ya que actúa como chaperona para las principales moléculas del complejo de histocompatibilidad clase II (MHCII) en las células presentadoras de antígeno, y como un sitio de unión al receptor para el factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF)^{289,290}. Complementariamente, observamos por qPCR que el tratamiento con RAd-IGF1 disminuye de manera significativa la expresión de IL1 β , una de las citoquinas mayormente sobreexpresadas durante el envejecimiento. Postulamos entonces que el efecto anti-inflamatorio del IGF1 logra modular el ambiente pro-inflamatorio característico del envejecimiento.

Finalmente, en este capítulo nos propusimos evaluar la activación o inhibición de distintas vías de señalización asociadas a procesos de proliferación y supervivencia, apoptosis, respuesta inflamatoria, daño del ADN, estrés y metabolismo lipídico en el Núcleo Estriado a través de la medida de fosforilación o clivaje de moléculas claves de dichas vías. Estos experimentos se abordaron empleando la técnica de Western Blot y el kit comercial PathScan® de Cell Signaling. Observamos un aumento en la fosforilación de Akt en el residuo Ser473. Este hecho podría deberse a la activación de la vía de acción del IGF1. Sin embargo, no se observó un aumento significativo de otras proteínas implicadas en esta vía, como mTOR, GSK3 β o BAD. Respecto a los análisis por Western Blot, no se observó inmunomarcación de los anticuerpos pAkt ni pGSK3 β , por lo que la cuantificación de estas proteínas no se pudo llevar a cabo. Sólo se pudo cuantificar la expresión de pErk1/2, sin encontrar diferencias entre las muestras provenientes de NE de ratas seniles tratadas con RAd-IGF1 y RAd-DsRed.

CAPÍTULO VI: MODELO DE ENFERMEDAD DE PARKINSON INDUCIDO POR LPS

6.1 Puesta a punto del modelo de Enfermedad de Parkinson inducido por la inyección de LPS intranigral.

El modelo animal de EP inducido por LPS (EP-LPS) ha sido ampliamente utilizado con el fin de estudiar el efecto de la neuroinflamación sobre la neurodegeneración dopaminérgica. Sin embargo, no ha sido utilizado anteriormente en nuestro laboratorio. Por lo tanto, inicialmente decidimos realizar una puesta a punto de este modelo. Para ello, utilizamos 12 ratas macho Sprague-Dawley de 4 meses de edad, las cuales fueron separadas en 2 grupos: el grupo PBS recibió una dosis de PBS 0,1 M, mientras que el grupo LPS recibió una dosis de LPS (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) intranigral en el hemisferio derecho del cerebro. Estos animales se utilizaron para evaluar la activación microglial, la neurodegeneración dopaminérgica y el deterioro motor.

6.1.1 Efecto de la inyección intranigral de LPS sobre la función motora.

Durante la puesta a punto de este modelo de EP-LPS, evaluamos la función motora de los animales en 3 instancias: previo a la inyección de LPS (día -7, D-7) y post inyección a los días D7 y D14. En estas instancias, la función motora de los animales se evaluó utilizando 4 test motores (ver sección 3.8.2). Sin embargo, aquí sólo mostraremos los resultados de la “Prueba de los Bigotes y la Pata” y la “Prueba de la caminata con un Pie”, ya que el análisis de la “Escalera Horizontal” y del “Comportamiento Exploratorio” no se han completado aún.

6.1.1.1 Evaluación de la funcionalidad de las extremidades anteriores

Como se mencionó en la sección 3.8.2, la prueba de la Caminata con un Pie permite evaluar la aquinesia en roedores a través de la medida de 3 parámetros principales: distancia recorrida con una sola extremidad anterior, tiempo de recorrida y número de pasos de ajuste realizados. La medida de esos parámetros permitió observar que la inyección de LPS intranigral provoca un aumento de la aquinesia principalmente de la extremidad contralateral al sitio de inyección (extremidad izquierda). Los animales inyectados con LPS no fueron capaces de recorrer los 90 cm de recorrido en el tiempo máximo estipulado con el miembro izquierdo al menos hasta 2 semanas post tratamiento con LPS. Además, realizaron una menor cantidad de pasos de ajuste (**Figura 42 A, C, E**. ANOVA de 2 vías, $p < 0,01$). Por el contrario, los animales inyectados con PBS no presentaron complicaciones a la hora de recorrer la distancia estipulada con el miembro izquierdo dentro el tiempo máximo (**Figura 42 A, C, E**). Inesperadamente, observamos que los animales del grupo PBS disminuyen considerablemente el tiempo que tardan en recorrer la distancia estipulada, probablemente debido a un proceso de aprendizaje. A partir de la obtención de los parámetros secundarios, podemos observar que la velocidad de desplazamiento del grupo LPS con la extremidad izquierda disminuye considerablemente, sin

observarse cambios significativos en la distancia de paso (**Figura 43.A, C**), demostrando un aumento de la aquinesia en estos animales. Por otro lado, el grupo PBS presentó una mayor velocidad de desplazamiento y mayor distancia de paso 2 semanas luego de la intervención quirúrgica (**Figura 43.A, C**).

Respecto a la funcionalidad del miembro derecho (miembro ipsilateral respecto a la inyección), observamos que el grupo LPS inicialmente (D7) presentan un aumento de la aquinesia, siendo incapaces de recorrer la distancia estipulada en el tiempo máximo de análisis, una menor cantidad de pasos de ajuste que el grupo PBS (**Figura 42.B, F** ANOVA de 2 vías, $p < 0,01$). Este hecho logra revertirse parcialmente a los 14 días postinyección, instancia en la cual los animales son capaces nuevamente de recorrer la distancia máxima, aunque en un mayor tiempo y con un mayor número de pasos de ajuste (**Figura 42.B, D, F**. ANOVA de 2 vías, $p < 0,01$). Por el contrario, los animales del grupo PBS no mostraron deficiencia en la funcionalidad de su extremidad derecha (**Figura 42.B, D, F**). En cuanto a los parámetros secundarios, nuevamente se puede observar que el grupo LPS presenta una disminución en la velocidad de desplazamiento luego de la inyección de LPS, sin presentar alteraciones en la distancia de paso de la extremidad derecha (**Figura 43.C, D**). Por otro lado, el grupo PBS mostró nuevamente una mayor velocidad de desplazamiento y mayor distancia de paso 2 semanas luego de la intervención quirúrgica (**Figura 43.C, D**).

6.1.1.2 Evaluación de la asimetría e integración sensomotora.

Como se mencionó en la sección 3.8.2, la prueba del Bigotes y la Pata permite evaluar la asimetría entre la corteza sensitivo-motora y el NE y la integración sensomotora a través de los hemisferios derecho e izquierdo a través de la medida del número de colocaciones exitosas luego del estímulo de las vibrisas.

El análisis de esta prueba demostró que la inyección intranigral de LPS no provocó una asimetría a través de la corteza sensitivo-motora, ya que no se observó una disminución significativa en el número de colocaciones exitosas con la extremidad ipsilateral a la estimulación de las vibrisas luego del tratamiento con LPS (**Figura 44.B, D**). Tampoco se vio alterada la integración sensomotora a través del hemisferio derecho, ya que nuevamente se observa una mayoría de colocaciones exitosas con la extremidad anterior derecha luego de la estimulación de las vibrisas izquierdas (**Figura 44.A**). Sin embargo, la inyección de LPS intranigral en el hemisferio derecho sí provocó un déficit en la integración sensomotora a través del hemisferio izquierdo, evidenciado por la falta de respuesta de los animales del grupo LPS a apoyar la extremidad delantera izquierda luego de estimular las vibrisas derechas (**Figura 44.C**. ANOVA de 2 vías, $p < 0,001$).

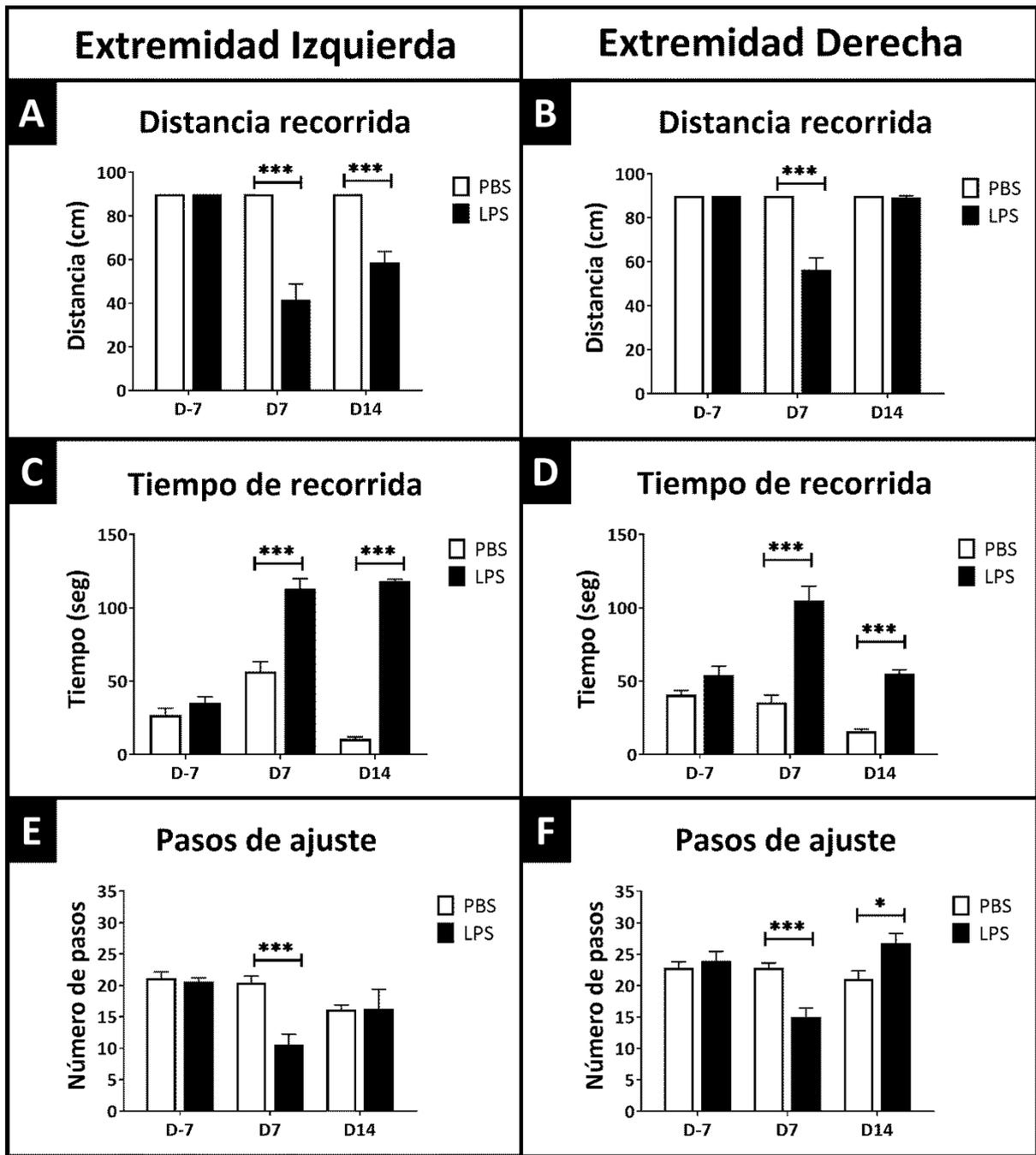


Figura 42. Parámetros primarios de la Prueba de la Caminata con un Pie. Los paneles muestran la evaluación de la distancia recorrida (A, B), tiempo de recorrido (C, D) y número de pasos de ajuste (E, F) para los ensayos de la extremidad contralateral (A, C, E) o ipsilateral (B, D, F) respecto al sitio de inyección de LPS para los animales tratados con PBS o LPS. Los datos se expresan como media ± SEM y se analizaron con ANOVA de 2 días. N=6. Los * muestran diferencias significativas entre los grupos dentro de un mismo tiempo experimental *p<0.05; ***p<0.001. D-7: día experimental -7; D7: día experimental 7; D14: día experimental 14.

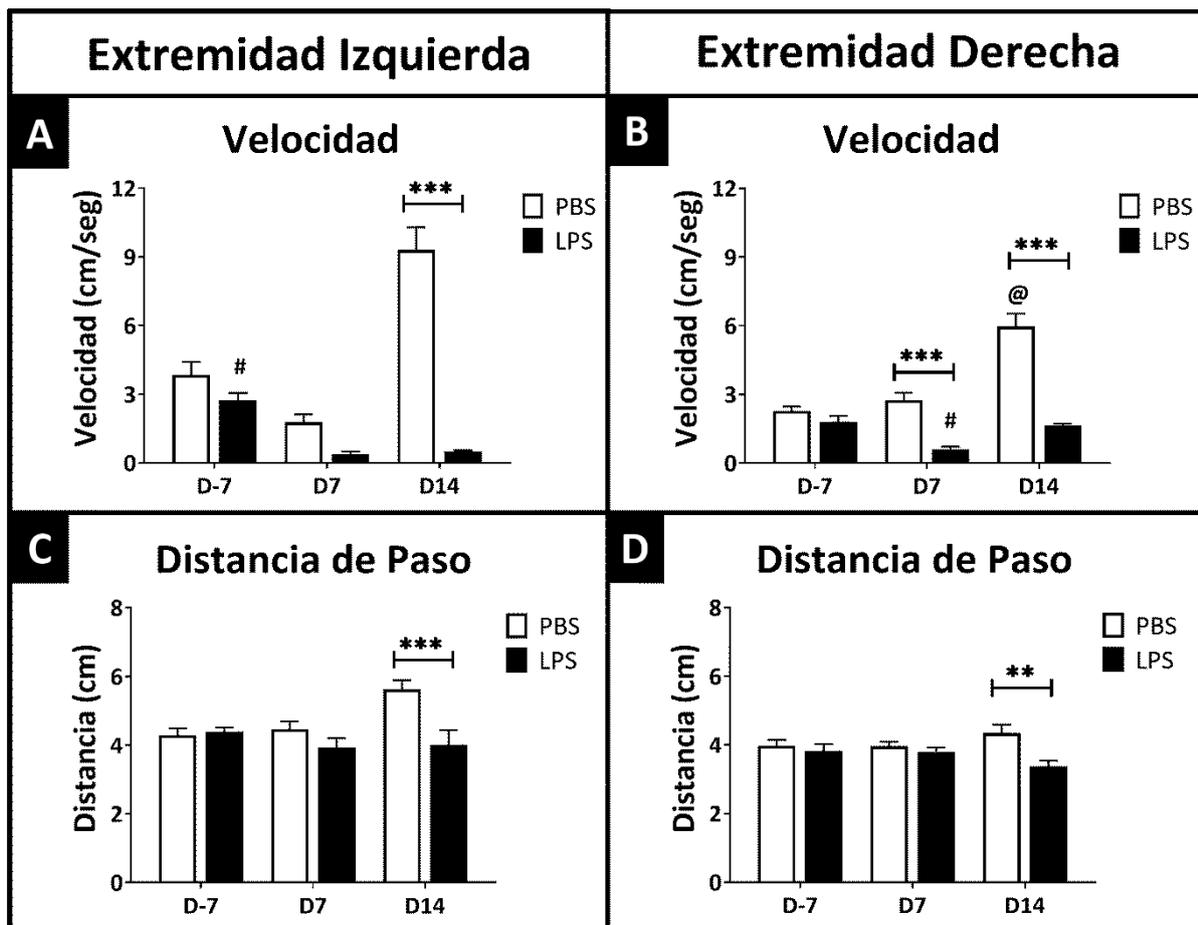


Figura 43. Parámetros secundarios de Prueba de la Caminata con un Pie. Los paneles muestran la evaluación de la velocidad de recorrida (A, B) y de la distancia de paso (C, D) para los ensayos de la extremidad contralateral (A, C) o ipsilateral (B, D) respecto al sitio de inyección de LPS para los animales tratados con PBS o LPS. Los datos se expresan como media \pm SEM y se analizaron con ANOVA de 2 días. N=6. Los * muestran diferencias significativas entre los grupos dentro de un mismo tiempo experimental. Los # muestran diferencias significativas del grupo LPS en los distintos tiempos experimentales. Los “@” muestran diferencias significativas del grupo LPS en los distintos tiempos experimentales. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. D-7; # $< 0,05$; @ $< 0,0001$: día experimental -7; D7: día experimental 7; D14: día experimental 14.

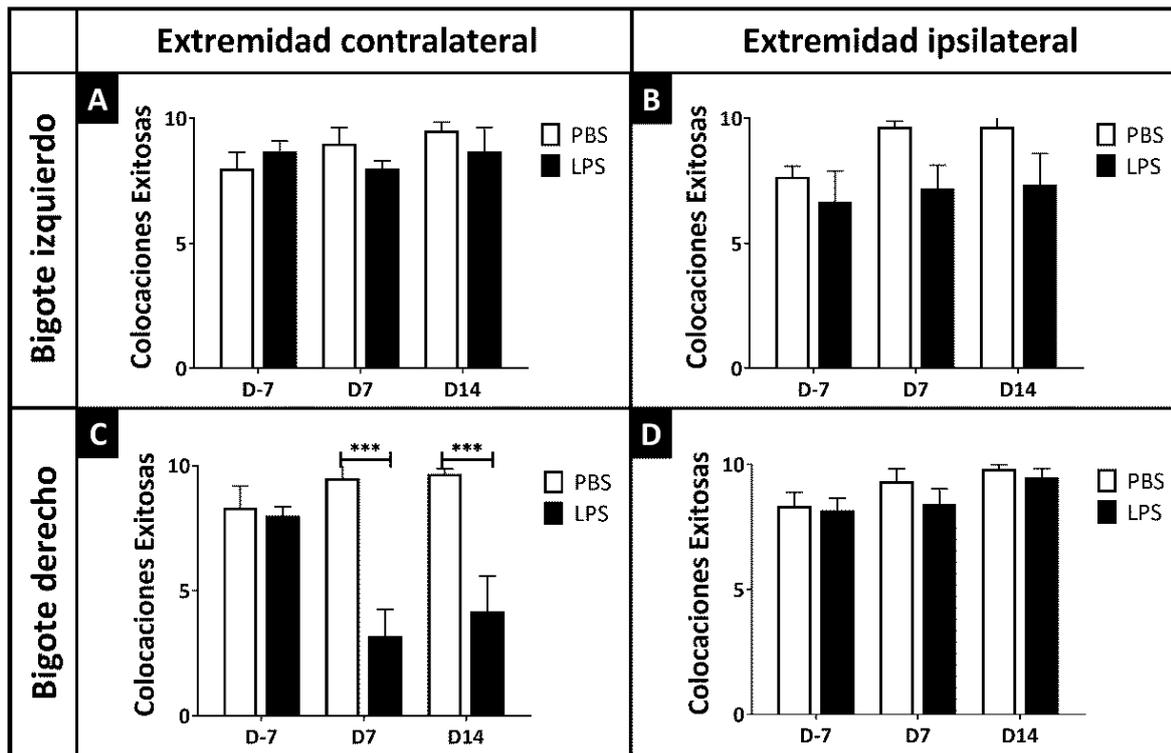


Figura 44. Análisis de la prueba de los bigotes y la pata. Los paneles muestran el número de colocaciones exitosas del miembro contralateral o ipsilateral luego de la estimulación de las vibrisas izquierda (A, C) o de la vibrisa derecha (B, D) para los animales tratados con PBS o LPS. Los datos se expresan como media \pm SEM y se analizaron con ANOVA de 2 días. N=6. *** $p < 0.001$. D-7: día experimental -7; D7: día experimental 7; D14: día experimental 14.

6.1.2 Efecto de la inyección intranigral de LPS sobre la reactividad microglial y la neurodegeneración dopaminérgica.

Como se mencionó en la introducción, el LPS no tiene efecto directo sobre las neuronas ya que estas células carecen del receptor TLR4. Por el contrario, el LPS actúa directamente sobre la microglia, desencadenando una respuesta proinflamatoria, la cual a continuación provoca la neurodegeneración dopaminérgica nigroestriatal. Por ello, decidimos en primera instancia evaluar el estado reactivo de la microglia mediante la inmunomarcación con el anticuerpo Iba1. Dada la alta densidad de microglia reactiva en el hemisferio ipsilateral de las ratas tratadas con LPS, se decidió realizar una evaluación descriptiva en lugar de una cuantitativa. Observamos que la inyección intranigral con LPS en el hemisferio derecho provoca un aumento en la reactividad de la microglia en el hemisferio ipsilateral, sin modificar la reactividad del hemisferio contralateral (Figura 45). Por el contrario, no se observaron alteraciones en la reactividad de la microglia de la SN de ratas tratadas con PBS (Figura 46).

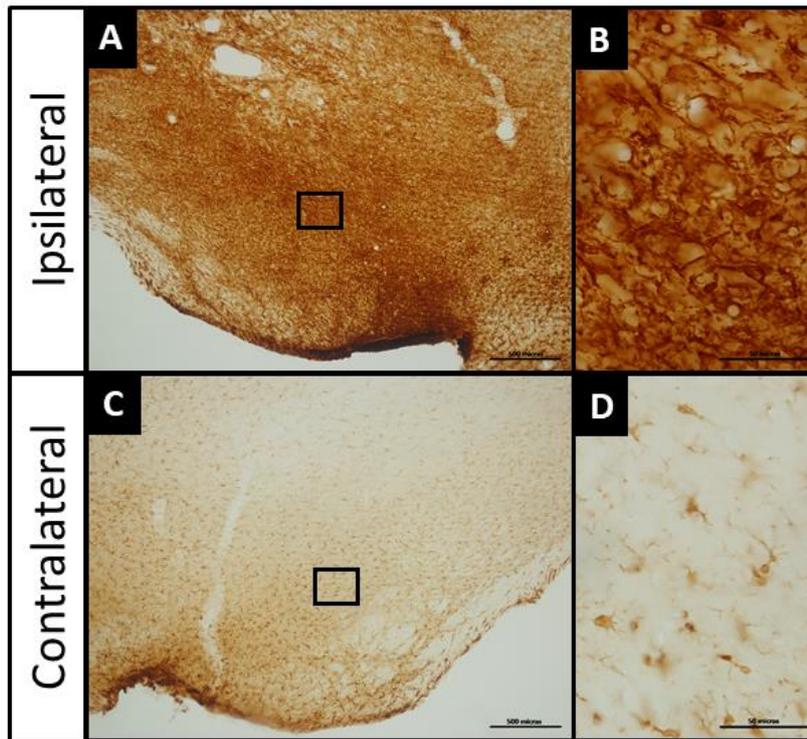


Figura 45. Efecto de la inyección intranigral de LPS sobre la inmunomarcación de microglia en *Substantia Nigra*. Imágenes representativas de *Substantia Nigra* de los hemisferios ipsilateral (A, B) y contralateral (C, D) de ratas macho tratadas con LPS, a una magnificación de 40X (barra de escala: 500 micrones) (A y C) con inserciones a una magnificación de 600X (barra de escala: 50 micrones) (B y D).

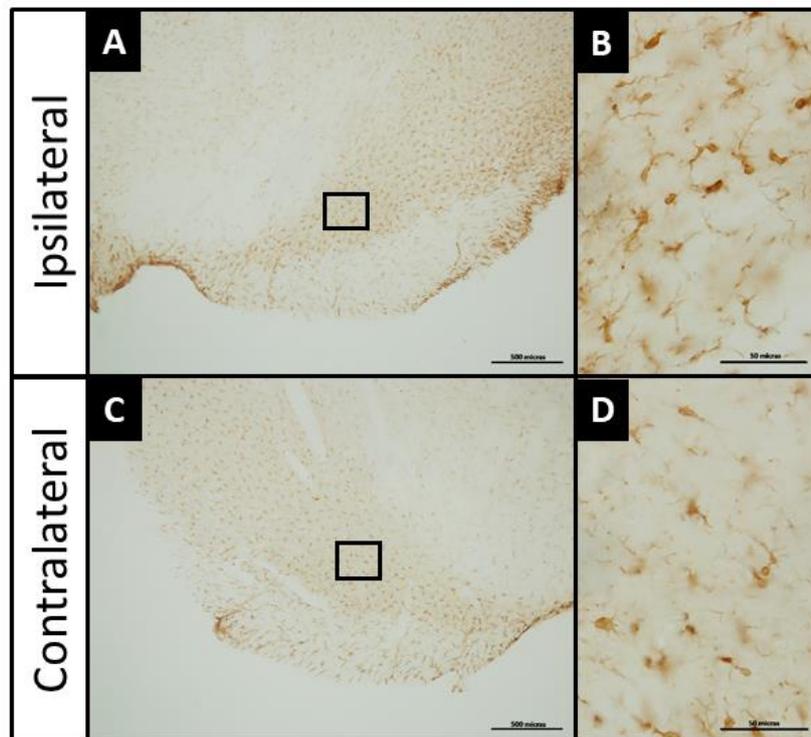


Figura 46. Efecto de la inyección intranigral de PBS sobre la inmunomarcación de microglia en *Substantia Nigra*. Imágenes representativas de *Substantia Nigra* de los hemisferios ipsilateral (A, B) y contralateral (C, D) de ratas macho tratadas con PBS, a una magnificación de 40X (barra de escala: 500 micrones) (A y C) con inserciones a una magnificación de 600X (barra de escala: 50 micrones) (B y D).

A continuación, evaluamos el grado de neurodegeneración dopaminérgica de la *Substantia Nigra*. Para ello, se cuantificó el número de neuronas dopaminérgicas inmunomarcadas con anticuerpo anti-TH en dicha zona. Pudimos observar que los animales tratados con LPS presentan una pérdida significativa en el número de neuronas TH⁺ en el hemisferio ipsilateral al sitio de inyección, sin afectar el número de neuronas DA en el hemisferio contralateral (**Figura 47**. ANOVA de 2 vías, $p = 0,0244$). Por el contrario, no se observaron diferencias significativas en el número de neuronas DA entre los hemisferios de las ratas inyectadas con PBS.

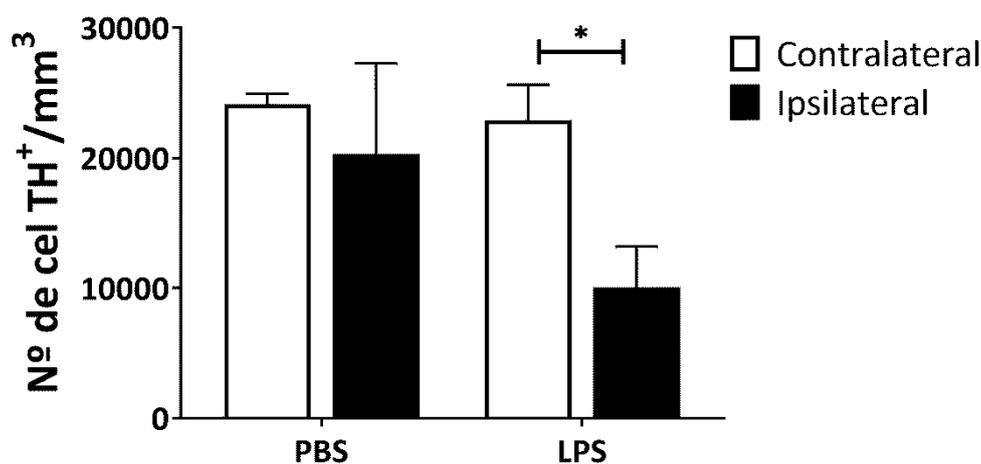


Figura 47. Análisis del efecto de la inyección con LPS sobre las neuronas dopaminérgicas de la *Substantia Nigra*. Densidad de neuronas TH⁺ en los hemisferios ipsi y contralateral al sitio de inyección de LPS en ratas tratadas con LPS o DsRed. Los datos se expresan como media \pm SEM y se analizaron con ANOVA de 2 vías. N = 6. * $p < 0,05$.

Considerando los resultados observados en los test comportamentales y en los análisis inmunohistoquímicos, consideramos que la puesta a punto del modelo de EP-LPS intranigral fue exitosa.

6.2 Implementación de la terapia génica con IGF1 sobre el modelo de EP-LPS.

Una vez puesto a punto el modelo de EP-LPS, decidimos emplear el mismo con el fin de evaluar el efecto de la terapia génica con IGF1 sobre la reactividad microglia, el daño dopaminérgico y el deterioro motor. Con este fin, empleamos dos lotes por separado de ratas Sprague-Dawley macho, las cuales se dividieron al azar en 2 grupos experimentales, al igual que en la puesta a punto: 1) grupo PBS y 2) grupo LPS. El protocolo experimental inicial es idéntico a la puesta a punto, evaluando el desempeño motor de los animales en 3 instancias: D-7, D7 y D14. A continuación, el D15 se realizaría la terapia génica con RAD-IGF1 o RAD-DsRed y se volverá a evaluar el desempeño motor a los días D21 y D28. Sin embargo,

en la primera etapa de estos experimentos, tras la inyección intranigral de LPS, no se observó el déficit motor como se observó en la puesta a punto inicial de este modelo.

En la figura 48 se muestran los parámetros primarios de la Prueba de la Caminata con un Pie. Se puede observar que en estos experimentos todos los animales, tanto aquellos que recibieron una inyección con PBS como con LPS fueron capaces de recorrer los 90 cm de distancia estipulada con ambas extremidades dentro del tiempo máximo. Tampoco se observaron diferencias significativas en el número de pasos de ajuste realizados (**Figura 48**). Coincidentemente, no se observaron diferencias significativas en la medición de los parámetros secundarios de esta prueba (**Figura 49**). Por lo tanto, en estos experimentos la inyección de LPS intranigral no provocó un aumento de la aquinesia en los animales.

De manera análoga, no se observaron diferencias significativas en el número de colocaciones exitosas durante la Prueba del Bigote y la Pata (**Figura 50**). Por tanto, la inyección con LPS tampoco provocó alteraciones en la asimetría entre la corteza motora y el NE, ni en la integración sensomotora a través de los hemisferios.

Dada la ausencia de deterioro motor en estos experimentos, decidimos suspender el progreso del protocolo experimental hasta tanto solucionemos la falta de reproducibilidad en el modelo bajo nuestras condiciones experimentales.

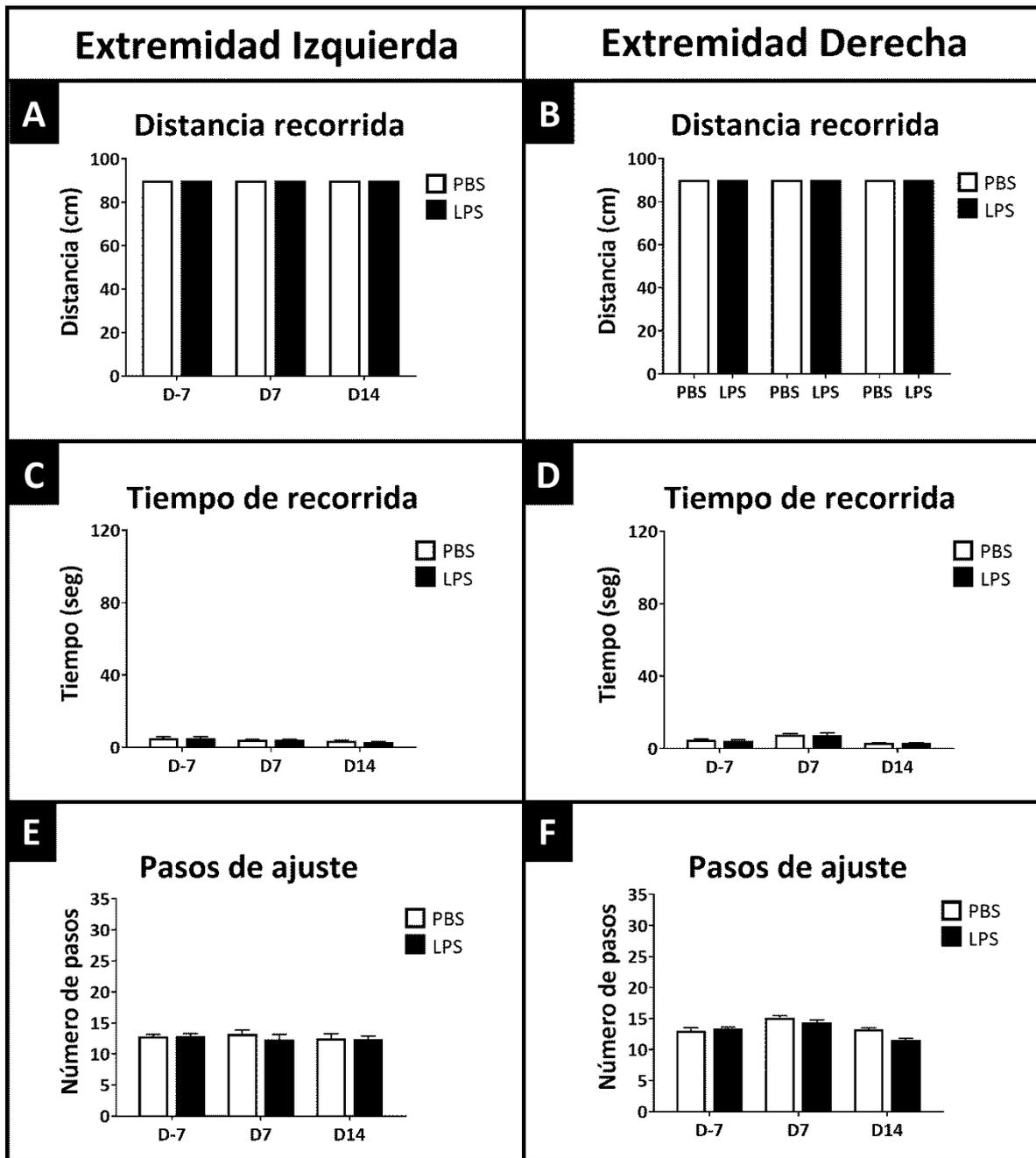


Figura 48. Parámetros primarios de la Prueba de la Caminata con un Pie. Los paneles muestran la evaluación de la distancia recorrida (A, B), tiempo de recorrido (C, D) y número de pasos de ajuste (E, F) para los ensayos de la extremidad contralateral (A, C, E) o ipsilateral (B, D, F) respecto al sitio de inyección de LPS para los animales tratados con PBS o LPS. Los datos se expresan como media \pm SEM y se analizaron con ANOVA de 2 vías. N=10

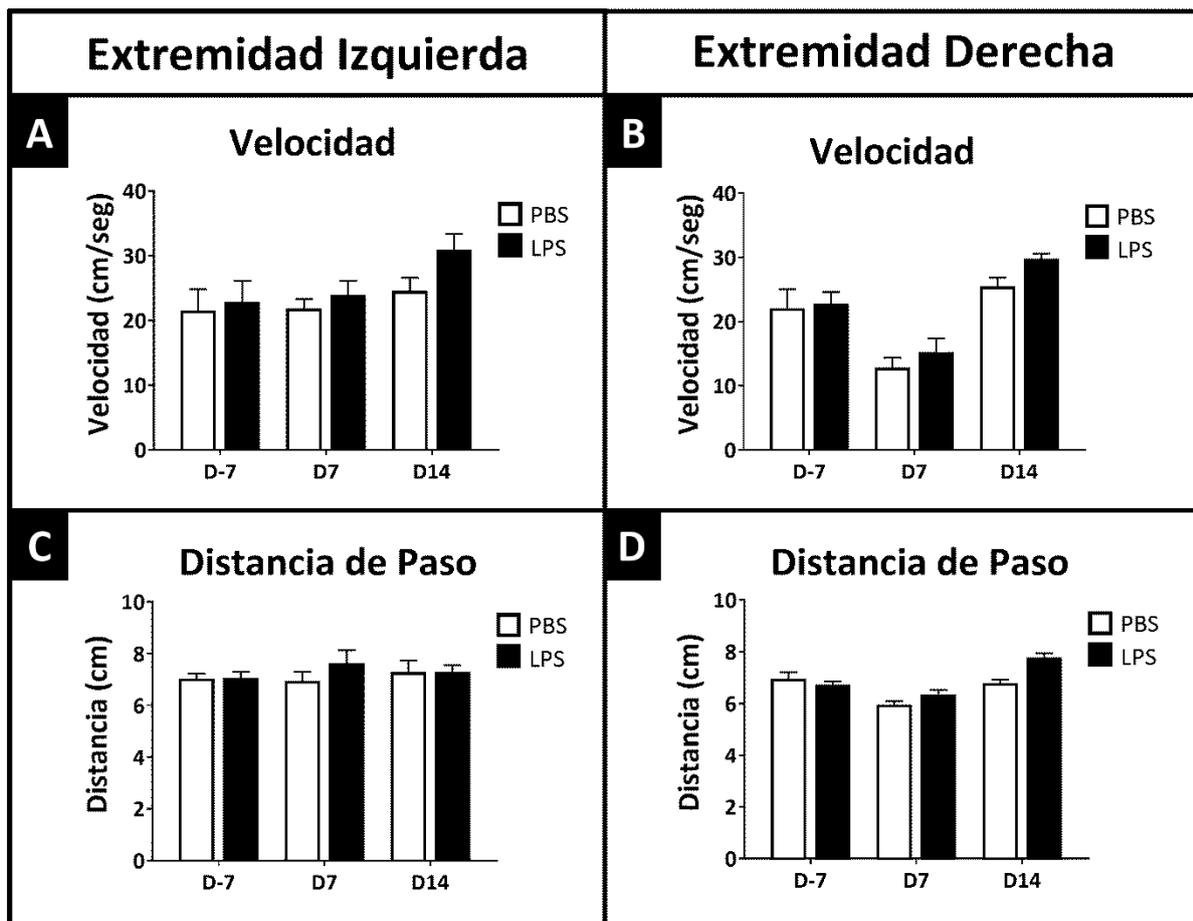


Figura 49. Parámetros secundarios de Prueba de la Caminata con un Pie. Los paneles muestran la evaluación de la velocidad de recorrida (A, B) y de la distancia de paso (C, D) para los ensayos de la extremidad contralateral (A, C) o ipsilateral (B, D) respecto al sitio de inyección de LPS para los animales tratados con PBS o LPS. Los datos se expresan como media \pm SEM y se analizaron con ANOVA de 2 vías. N=10

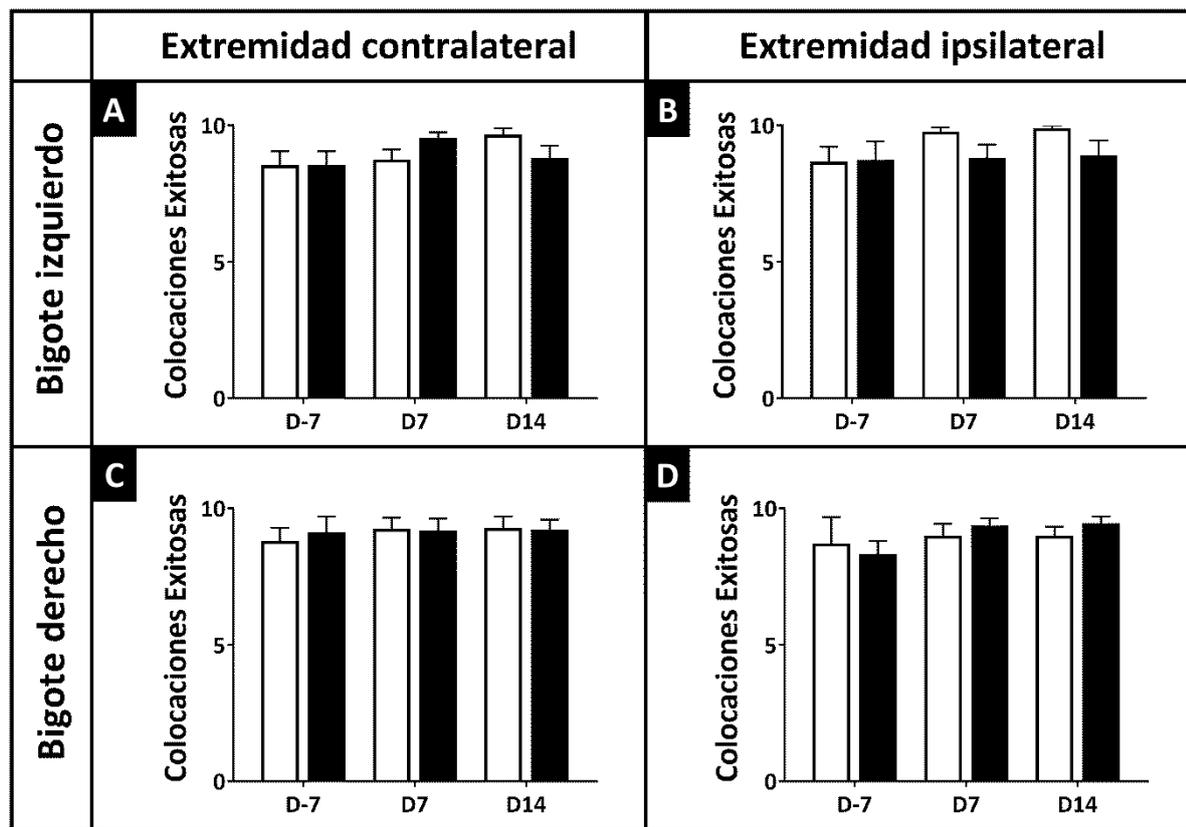


Figura 50. Análisis de la prueba de los bigotes y la pata. Los paneles muestran el número de colocaciones exitosas del miembro contralateral o ipsilateral luego de la estimulación de las vibrisas izquierda (**A, C**) o de la vibrisa derecha (**B, D**) para los animales tratados con PBS o LPS. Los datos se expresan como media \pm SEM y se analizaron con ANOVA de 2 vías. N=10.

6.3 DISCUSIÓN

La investigación en las últimas dos décadas ha develado un papel importante de la neuroinflamación en la degeneración de la vía nigroestriatal dopaminérgica que constituye la base patológica de la enfermedad de Parkinson. La neuroinflamación se caracteriza por la activación de las células gliales del cerebro, principalmente microglia y astrocitos, que liberan radicales libres (especies reactivas de oxígeno y nitrógeno), citoquinas y metabolitos lipídicos. La mayoría de estos factores derivados de la glía son pro-inflamatorios, neurotóxicos y son particularmente perjudiciales para las neuronas DA nigrales, particularmente vulnerables al daño oxidativo. Se han empleado diversos estímulos inmunológicos para inducir directamente la activación glial y modelar la neurodegeneración DA en la Enfermedad de Parkinson. La endotoxina bacteriana lipopolisacárido (LPS) ha sido el activador glial más utilizado para la inducción de la neurodegeneración DA inflamatoria. En el presente capítulo, nos

dedicamos a poner a punto el modelo de Enfermedad de Parkinson inducido por la inyección de LPS intranigral a fin de utilizarlo en el estudio de la modulación de la neuroinflamación por parte de la terapia génica con IGF1. Inicialmente, evaluamos el desempeño motor a lo largo de la puesta a punto del modelo empleando una batería de pruebas motoras. La Prueba de la Caminata con una Pie (Stepping test) y la Prueba de los Bigotes y la Pata han sido ampliamente utilizadas para evaluar la aquinesia y la integración sensoriomotora en modelos animales de Enfermedad de Parkinson²⁹¹⁻²⁹⁸. En nuestras condiciones experimentales observamos que los animales tratados con LPS presentaron un déficit motor caracterizado por un aumento en la aquinesia de la extremidad delantera contralateral al sitio de la inyección y una falta de integración sensoriomotora a través del hemisferio izquierdo. Estas deficiencias se mantuvieron al menos durante 14 días post-inyección de LPS. Por el contrario, los animales que recibieron una dosis de PBS no presentaron deficiencias motoras, descartando así cualquier daño producto de la cirugía estereotáxica.

Como se mencionó en la introducción, el LPS no tiene efecto directo sobre las neuronas ya que estas células carecen del receptor TLR4. Sin embargo, si actúa directamente sobre la microglia, desencadenando una respuesta proinflamatoria que provoca la neurodegeneración dopaminérgica nigroestriatal. En la puesta a punto del modelo, evaluamos cualitativamente la activación de la microglia en la *Substantia Nigra* luego del sacrificio, 15 días post de la inyección intranigral. Observamos que la inyección con LPS intranigral provocó un aumento en la reactividad de la microglia en la zona de inyección sostenida en el tiempo, al menos hasta 15 días post-inyección, en comparación con *Substantia Nigra* del hemisferio contralateral. Por el contrario, los animales tratados con PBS no presentaron cambios cualitativos en la activación de la microglia. Complementariamente, evaluamos el grado de neurodegeneración de neuronas dopaminérgicas nigrales provocado por la activación de las células microgliales mediante la cuantificación de neuronas TH⁺. Observamos que los animales tratados con LPS presentaron una marcada pérdida de neuronas dopaminérgicas en el sitio de inyección en comparación con el hemisferio contralateral. Por el contrario, no se observaron tales diferencias en los animales tratados con PBS, nuevamente descartando cualquier daño que podría haberse inferido durante la cirugía estereotáxica.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los test comportamentales y en los análisis inmunohistoquímicos, consideramos que la puesta a punto del modelo de EP-LPS intranigral fue exitosa (aunque no reproducible con posterioridad). Tras el primer experimento satisfactorio de puesta a punto, decidimos emplear este modelo a fin de evaluar el efecto anti-inflamatorio de la terapia génica con IGF1 sobre la activación microglial inducida por LPS. Sin embargo, durante las primeras 2 semanas de experimentación, período de establecimiento de la activación microglial y neurodegeneración DA, las

evaluaciones motoras no mostraron que los animales tratados con LPS presentaran déficit motor alguno. Este experimento se repitió con un tercer lote de animales, en el cual nuevamente no se observó deterioro motor alguno.

Dada la ausencia de deterioro motor en estos experimentos, decidimos suspender el progreso del protocolo experimental hasta tanto solucionemos la falta de efecto por parte del LPS. Suponemos que la falta reproducibilidad observada puede haberse debido a pérdida de actividad de la droga, o alguna alteración en el estado de los animales.

CAPÍTULO VII: DISCUSIÓN

La mayoría de los estudios focalizados en la neuroinflamación o en déficit cognitivos o motores se han llevado a cabo en modelos animales de lesión o enfermedades neurodegenerativas. En el presente trabajo de Tesis Doctoral, estudiamos la neuroinflamación debida a la edad en un modelo de rata senil, donde el envejecimiento se da de manera fisiológica. Implementamos terapia génica con IGF1 con el objetivo de evaluar su efecto sobre la neuroinflamación cerebral en regiones relacionadas con el desempeño motor, que se ve afectado durante el envejecimiento.

Nuestro interés principal se focalizó en las células de la microglia, dado que la activación y disfunción de este tipo celular han sido vinculadas tanto a la pérdida o alteración de la homeostasis cerebral en el envejecimiento no patológico, como al establecimiento y progresión de enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson y Huntington.

En la terapia génica intracerebroventricular con RAd, los adenovirus transducen a las células del epéndimo de los ventrículos cerebrales. Estas células sobreexpresan y secretan IGF1 tanto al LCR como al parénquima cerebral, facilitando la llegada del péptido a distintas regiones donde ejercerá su efecto. Los resultados obtenidos en la presente tesis demuestran que la terapia génica con IGF1 tiene un efecto selectivo sobre la microglia del Núcleo Estriado. Inicialmente, observamos que el RAd-IGF1 aumenta el número y la reactividad de las células microgliales. Además, probamos que es capaz de modificar el fenotipo de estas células hacia uno anti-inflamatorio M2. Funcionalmente, se evidenció que las células de la microglía presentan una mayor actividad fagocítica y de remodelación de sinapsis en respuesta a la terapia. Este método de análisis, en el cual se estudia y cuantifica simultáneamente la fagocitosis y la remodelación sináptica por parte de la microglia, resulta en un aporte significativo al estudio de la funcionalidad microglial *in vivo*. Nuestro estudio indica que los fenotipos de activación microglial están siendo modificados por la expresión de IGF1. Es importante destacar que nuestros resultados sugieren que la neuroinflamación crónica observada en el envejecimiento puede revertirse, al menos parcialmente, por la regulación de las funciones microgliales por IGF1.

Observamos también que la terapia génica ICV con IGF1 logra disminuir la expresión de moléculas pro-inflamatorias en el Núcleo Estriado de ratas seniles. Consideramos que esta modulación del estado inflamatorio del cerebro envejecido, junto con la activación de la microglia y la remodelación sináptica, promueven el establecimiento de un microambiente propicio para el correcto funcionamiento de las neuronas implicadas en el control motor generando una mejora de la conducta motora.

La comprensión de los mecanismos que profundicen el conocimiento sobre cómo modular la neuroinflamación y modificar el fenotipo microglial permitirá futuras estrategias para el desarrollo de nuevas terapias antiinflamatorias que potencien y faciliten la neuroprotección tanto en el envejecimiento como en enfermedades neurodegenerativas.

Nuestros resultados nos llevan a plantear el siguiente modelo:

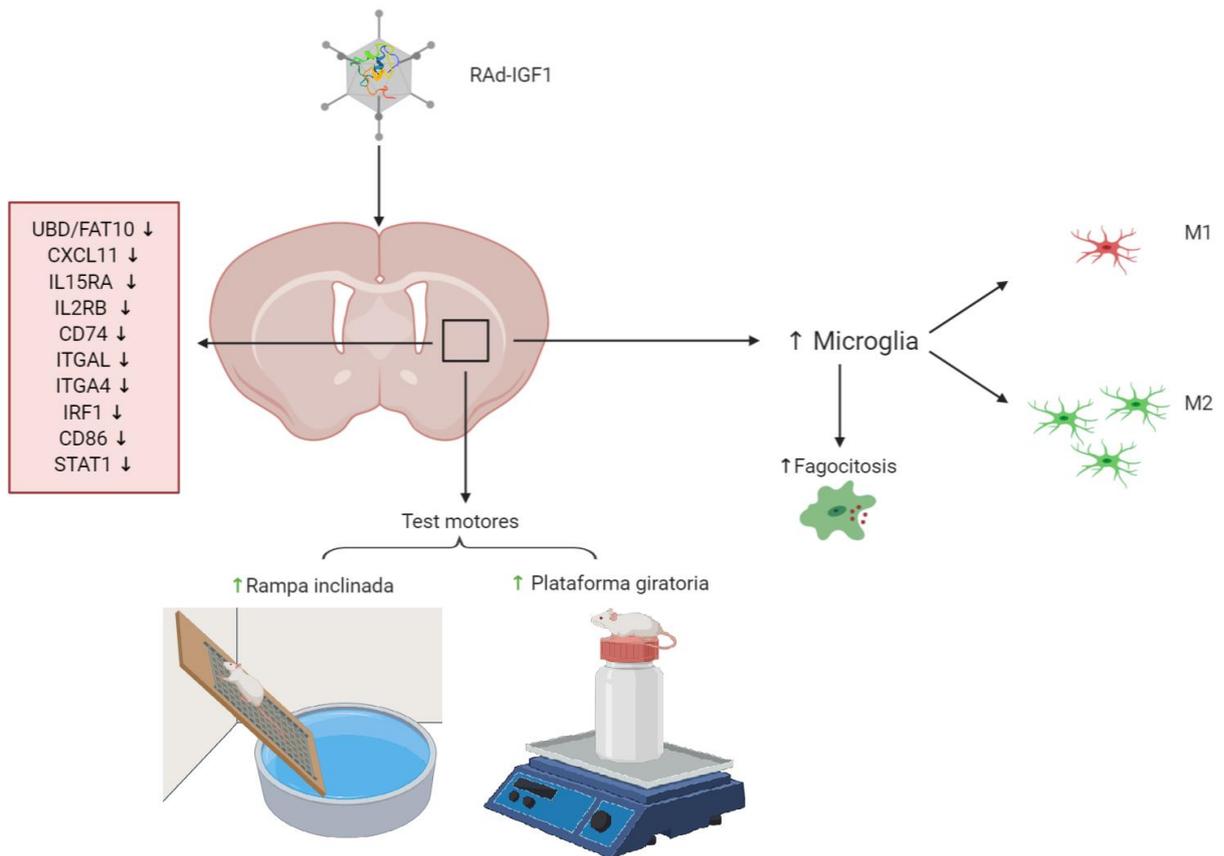


Figura 51. Modelo planteado. La terapia génica ICV con IGF1 provoca un aumento en la expresión de este factor neurotrófico por parte de las células del epéndimo y su secreción tanto al LCR como al parénquima cerebral. El IGF1 actúa directamente sobre la microglía del Núcleo Estriado, aumentando el número y la reactividad de estas células. El IGF1 polariza a la microglía hacia un fenotipo anti-inflamatorio M2 y aumenta su actividad fagocítica, promoviendo la remodelación sináptica. Además, la terapia génica disminuye la expresión de genes pro-inflamatorios en el NE de ratas seniles. De esta manera, se establece un microambiente anti-inflamatorio y neuroprotector que promueve una mejora de la conducta motora.

CONCLUSIONES

- La terapia génica ICV con IGF1 en ratas seniles modifica el número y la reactividad de la microglia del cerebro envejecido de manera región específica.
- La terapia génica ICV con IGF1 en ratas seniles promueve la polarización de la microglia hacia un fenotipo anti-inflamatorio en el Núcleo Estriado.
- La terapia génica ICV con IGF1 en ratas seniles incrementa la actividad fagocítica y la remodelación sináptica por parte de la microglia en el Núcleo Estriado.
- La terapia génica ICV con IGF1 en ratas seniles disminuye la expresión génica de moléculas pro-inflamatorias en el Núcleo Estriado.
- La terapia génica ICV con IGF1 mejora el desempeño motor de ratas seniles en pruebas que evalúan la fuerza motora.
- La inyección con LPS intranigral resultó efectiva en la inducción de la aquinesia y disquinesia, aunque no reproducible aún en nuestras condiciones experimentales, en ratas.

BIBLIOGRAFÍA

1. United Nations, Department of Economic and Social Affairs, P. D. World Population Prospects: The 2017 Revision, Key Findings and Advance Tables. *Work. Pap. No. ESA/P/WP/248* 43 (2017).
2. Salud, O. M. de la. Informe mundial sobre el envejecimiento y la salud. 1.Envejecimiento. ISBN 978 92 4 069487 3 (2015).
3. Vidal Domínguez, M. *et al.* Las personas mayores en España. Datos estadísticos estatales y por comunidades autónomas. 540 (2017).
4. López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M. & Kroemer, G. The hallmarks of aging. *Cell* **153**, 1194–217 (2013).
5. Viña, J., Borrás, C. & Miquel, J. Theories of ageing. *IUBMB Life* **59**, 249–254 (2007).
6. Aunan, J. R., Watson, M. M., Hagland, H. R. & Søreide, K. Molecular and biological hallmarks of ageing. *Br. J. Surg.* **103**, e29–e46 (2016).
7. Randall, P. A., Pardo, M., Nunes, E. J., Ló Pez Cruz, L. & Vemuri, V. K. Dopaminergic Modulation of Effort-Related Choice Behavior as Assessed by a Progressive Ratio Chow Feeding Choice Task: Pharmacological Studies and the Role of Individual Differences. (2012). doi:10.1371/journal.pone.0047934
8. Walhovd, K. B. *et al.* Consistent neuroanatomical age-related volume differences across multiple samples. *Neurobiol. Aging* **32**, 916–932 (2011).
9. Raz, N. *et al.* Regional Brain Changes in Aging Healthy Adults: General Trends, Individual Differences and Modifiers. *Cereb. Cortex* **15**, 1676–1689 (2005).
10. de Brabander JM, Kramers RJ & Uylings, H. Layer-specific dendritic regression of pyramidal cells with ageing in the human prefrontal cortex. *Eur. J. Neurosci.* **10**, 1261–1269 (1998).
11. Wong, T. P. *et al.* Loss of presynaptic and postsynaptic structures is accompanied by compensatory increase in action potential-dependent synaptic input to layer V neocortical pyramidal neurons in aged rats. *J. Neurosci.* **20**, 8596–606 (2000).
12. Jacobs, B., Driscoll, L. & Schall, M. Life-span dendritic and spine changes in areas 10 and 18 of human cortex: A quantitative golgi study. *J. Comp. Neurol.* **386**, 661–680 (1997).
13. Peters, A. The effects of aging on layer 1 in area 46 of prefrontal cortex in the rhesus monkey. *Cereb. Cortex* **8**, 671–684 (1998).
14. Page, T. L. *et al.* Morphological alterations in neurons forming corticocortical projections in the neocortex of aged Patas monkeys. *Neurosci. Lett.* **317**, 37–41 (2002).
15. Duan, H. *et al.* Age-related dendritic and spine changes in corticocortically projecting neurons in macaque monkeys. *Cereb. Cortex* **13**, 950–61 (2003).
16. Chen, K. S., Masliah, E., Mallory, M. & Gage, F. H. Synaptic loss in cognitively impaired aged rats is ameliorated by chronic human nerve growth factor infusion. *Neuroscience* **68**, 19–27 (1995).
17. Wong, T. P., Campbell, P. M., Ribeiro-da-Silva, A. & Cuellar, A. C. Synaptic numbers across cortical laminae and cognitive performance of the rat during ageing. *Neuroscience* **84**, 403–12 (1998).
18. Post-Munson, D. J., Lum-Ragan, J. T., Mahle, C. D. & Gribkoff, V. K. Reduced bicuculline response and GABA_A agonist binding in aged rat hippocampus. *Neurobiol. Aging* **15**, 629–633 (1994).
19. Rosene, D. L. & Nicholson, T. J. Neurotransmitter Receptor Changes in the Hippocampus and Cerebral Cortex in Normal Aging. in 111–128 (Springer, Boston, MA, 1999). doi:10.1007/978-1-4615-4885-0_6
20. Fieber, L. A., Carlson, S. L., Capo, T. R. & Schmale, M. C. Changes in d-aspartate ion currents in the Aplysia nervous system with aging. *Brain Res.* **1343**, 28–36 (2010).
21. Akhmedov, K. *et al.* Decreased response to acetylcholine during aging of Aplysia neuron R15.

PLoS One **8**, e84793 (2013).

22. Kempzell, A. T. & Fieber, L. A. Behavioral aging is associated with reduced sensory neuron excitability in *Aplysia californica*. *Front. Aging Neurosci.* **6**, 84 (2014).
23. Rizzo, V., Richman, J. & Puthanveettil, S. V. Dissecting mechanisms of brain aging by studying the intrinsic excitability of neurons. *Frontiers in Aging Neuroscience* **7**, 337 (2015).
24. Dickstein, D. L. *et al.* Changes in the structural complexity of the aged brain. *Aging Cell* **6**, 275–284 (2007).
25. Darling, W. G., Cooke, J. D. & Brown, S. H. Control of simple arm movements in elderly humans. *Neurobiol. Aging* **10**, 149–157 (1989).
26. Contreras-Vidal, J. L., Teulings, H. L. & Stelmach, G. E. Elderly subjects are impaired in spatial coordination in fine motor control. *Acta Psychol. (Amst)*. **100**, 25–35 (1998).
27. Seidler, R. D. *et al.* Motor Control and Aging: Links to Age-Related Brain Structural, Functional, and Biochemical Effects. *Neurosci Biobehav Rev* **34**, 721–733 (2010).
28. Buckles, V. D. Age-Related Slowing. in *Sensorimotor Impairment in the Elderly 73–87* (Springer Netherlands, 1993). doi:10.1007/978-94-011-1976-4_6
29. Alexander, B. H., Rivara, F. P. & Wolf, M. E. The cost and frequency of hospitalization for fall-related injuries in older adults. *Am. J. Public Health* **82**, 1020–3 (1992).
30. Studenski, S. *et al.* Gait speed and survival in older adults. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* **305**, 50–58 (2011).
31. Seidler-Dobrin, R. D., He, J. & Stelmach, G. E. Coactivation to reduce variability in the elderly. *Motor Control* **2**, 314–30 (1998).
32. Salthouse, T. A. & Somberg, B. L. Isolating the age deficit in speeded performance. *J. Gerontol.* **37**, 59–63 (1982).
33. Salthouse, T. A. Attentional blocks are not responsible for age-related slowing. *J. Gerontol.* **48**, P263-70 (1993).
34. Young, C. B. & Sonne, J. *Neuroanatomy, Basal Ganglia. StatPearls* (StatPearls Publishing, 2019).
35. Hikosaka, O., Nakamura, K., Sakai, K. & Nakahara, H. Central mechanisms of motor skill learning. *Current Opinion in Neurobiology* **12**, 217–222 (2002).
36. Buhusi, C. V. & Meck, W. H. What makes us tick? Functional and neural mechanisms of interval timing. *Nature Reviews Neuroscience* **6**, 755–765 (2005).
37. Yin, H. H. & Knowlton, B. J. The role of the basal ganglia in habit formation. *Nature Reviews Neuroscience* **7**, 464–476 (2006).
38. Yelnik, J. Functional anatomy of the basal ganglia. *Mov. Disord.* **17**, 569–575 (2002).
39. Lanciego, J. L., Luquin, N. & Obeso, J. A. Functional neuroanatomy of the basal ganglia. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2**, (2012).
40. Obeso, J. A. *et al.* Functional organization of the basal ganglia: Therapeutic implications for Parkinson's disease. *Mov. Disord.* **23**, S548–S559 (2008).
41. Calabresi, P., Picconi, B., Tozzi, A., Ghiglieri, V. & Di Filippo, M. Direct and indirect pathways of basal ganglia: A critical reappraisal. *Nature Neuroscience* **17**, 1022–1030 (2014).
42. Kreitzer, A. C. & Malenka, R. C. Striatal Plasticity and Basal Ganglia Circuit Function. *Neuron* **60**, 543–554 (2008).
43. Tepper, J. M. & Bolam, J. P. Functional diversity and specificity of neostriatal interneurons. *Current Opinion in Neurobiology* **14**, 685–692 (2004).
44. Kawaguchi, Y., Wilson, C. J., Augood, S. J. & Emson, P. C. Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends in Neurosciences* **18**, 527–535 (1995).

45. Koós, T. & Tepper, J. M. Dual cholinergic control of fast-spiking interneurons in the neostriatum. *J. Neurosci.* **22**, 529–535 (2002).
46. Fibiger, H. C. Mesolimbic dopamine: An analysis of its role in motivated behavior. *Semin. Neurosci.* **5**, 321–327 (1993).
47. Jackson, D. M. & Westlind-Danielsson, A. Dopamine receptors: Molecular biology, biochemistry and behavioural aspects. *Pharmacology and Therapeutics* **64**, 291–370 (1994).
48. Freund, T. F., Powell, J. F. & Smith, A. D. Tyrosine hydroxylase-immunoreactive boutons in synaptic contact with identified striatonigral neurons, with particular reference to dendritic spines. *Neuroscience* **13**, 1189–1215 (1984).
49. DAHLSTROEM, A. & FUXE, K. EVIDENCE FOR THE EXISTENCE OF MONOAMINE-CONTAINING NEURONS IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM. I. DEMONSTRATION OF MONOAMINES IN THE CELL BODIES OF BRAIN STEM NEURONS. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* SUPPL 232:1-55 (1964).
50. Mishra, A., Singh, S. & Shukla, S. Physiological and Functional Basis of Dopamine Receptors and Their Role in Neurogenesis: Possible Implication for Parkinson's disease. *Journal of Experimental Neuroscience* **12**, (2018).
51. Missale, C., Russel Nash, S., Robinson, S. W., Jaber, M. & Caron, M. G. Dopamine receptors: From structure to function. *Physiological Reviews* **78**, 189–225 (1998).
52. Surmeier, D. J., Ding, J., Day, M., Wang, Z. & Shen, W. D1 and D2 dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons. *Trends in Neurosciences* **30**, 228–235 (2007).
53. Di Chiara, G., Morelli, M. & Consolo, S. Modulatory functions of neurotransmitters in the striatum: ACh/dopamine/NMDA interactions. *Trends in Neurosciences* **17**, 228–233 (1994).
54. Pisani, A., Bonsi, P., Centonze, D., Calabresi, P. & Bernardi, G. Activation of D2-like dopamine receptors reduces synaptic inputs to striatal cholinergic interneurons. *J. Neurosci.* **20**, (2000).
55. Stoof, J. C. Localization and pharmacology of some dopamine receptor complexes in the striatum and the pituitary gland: synaptic and son-synaptic communication. *Acta Morphol. Neerl. Scand.* **26**, 115–30
56. Stoof, J. C., Drukarch, B., de Boer, P., Westerink, B. H. & Groenewegen, H. J. Regulation of the activity of striatal cholinergic neurons by dopamine. *Neuroscience* **47**, 755–70 (1992).
57. Contant, C., Umbriaco, D., Garcia, S., Watkins, K. C. & Descarries, L. Ultrastructural characterization of the acetylcholine innervation in adult rat neostriatum. *Neuroscience* **71**, 937–947 (1996).
58. Yan, Z., Song, W. J. & Surmeier, D. J. D2 dopamine receptors reduce N-type Ca²⁺ currents in rat neostriatal cholinergic interneurons through a membrane-delimited, protein-kinase-C-insensitive pathway. *J. Neurophysiol.* **77**, 1003–1015 (1997).
59. Maurice, N. *et al.* D2 dopamine receptor-mediated modulation of voltage-dependent Na⁺ channels reduces autonomous activity in striatal cholinergic interneurons. *J. Neurosci.* **24**, 10289–10301 (2004).
60. Kaneko, S. *et al.* Synaptic integration mediated by striatal cholinergic interneurons in basal ganglia function. *Science (80-)*. **289**, 633–637 (2000).
61. Berg, M. J. *et al.* Parkinsonism - Drug treatment: Part I. *Drug Intelligence and Clinical Pharmacy* **21**, 10–21 (1987).
62. Stark, A. K. & Pakkenberg, B. Histological changes of the dopaminergic nigrostriatal system in aging. *Cell and Tissue Research* **318**, 81–92 (2004).
63. Kubis, N. *et al.* Preservation of midbrain catecholaminergic neurons in very old human subjects. *Brain* **123**, 366–373 (2000).

64. Alladi, P. A. *et al.* Absence of age-related changes in nigral dopaminergic neurons of Asian Indians: Relevance to lower incidence of Parkinson's disease. *Neuroscience* **159**, 236–245 (2009).
65. Parkinson, G. M., Dayas, C. V. & Smith, D. W. Age-related gene expression changes in substantia nigra dopamine neurons of the rat. *Mech. Ageing Dev.* **149**, 41–49 (2015).
66. Carlsson, A. & Winblad, B. Influence of age and time interval between death and autopsy on dopamine and 3-methoxytyramine levels in human basal ganglia. *J. Neural Transm.* **38**, 271–6 (1976).
67. Morgan, D. G. & Finch, C. E. Dopaminergic changes in the basal ganglia. A generalized phenomenon of aging in mammals. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **515**, 145–60 (1988).
68. Umegaki, H., Roth, G. S. & Ingram, D. K. Aging of the striatum: Mechanisms and interventions. *Age (Omaha)*. **30**, 251–261 (2008).
69. Henry, J. M. & Roth, G. S. Effect of aging on recovery of striatal dopamine receptors following n-ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1, 2-dihydroquinoline (EEDQ) blockade. *Life Sci.* **35**, 899–904 (1984).
70. Henry, J. M., Filburn, C. R., Joseph, J. A. & Roth, G. S. Effect of aging on striatal dopamine receptor subtypes in Wistar rats. *Neurobiol. Aging* **7**, 357–361 (1986).
71. Norman, A. B., Battaglia, G. & Creese, I. Differential recovery rates of rat D2 dopamine receptors as a function of aging and chronic reserpine treatment following irreversible modification: a key to receptor regulatory mechanisms. *J. Neurosci.* **7**, 1484–91 (1987).
72. Della Vedova, F., Fumagalli, F., Sacchetti, G., Racagni, G. & Brunello, N. Age-related variations in relative abundance of alternative spliced D2 receptor mRNAs in brain areas of two rat strains. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **12**, 357–9 (1992).
73. Weiss, B., Chen, J. F., Zhang, S. & Zhou, L. W. Developmental and age-related changes in the D2 dopamine receptor mRNA subtypes in rat brain. *Neurochem. Int.* **20 Suppl**, 49S–58S (1992).
74. JOSEPH, J. A. & ROTH, G. S. Upregulation of Striatal Dopamine Receptors and Improvement of Motor Performance in Senescence. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **515**, 355–362 (1988).
75. Zhang, L., Ravipati, A., Joseph, J. & Roth, G. S. Aging-related changes in rat striatal D2 receptor mRNA-containing neurons: a quantitative nonradioactive in situ hybridization study. *J. Neurosci.* **15**, 1735–40 (1995).
76. Sherman, K. A. & Friedman, E. Pre- and post-synaptic cholinergic dysfunction in aged rodent brain regions: New findings and an interpretative review. *Int. J. Dev. Neurosci.* **8**, 689–708 (1990).
77. Ogawa, O. *et al.* In vivo imaging of adenovirus-mediated over-expression of dopamine D2 receptors in rat striatum by positron emission tomography. *Neuroreport* **11**, 743–748 (2000).
78. Zambrzycka, A., Alberghina, M. & Strosznajder, J. B. Effects of aging and amyloid-beta peptides on choline acetyltransferase activity in rat brain. *Neurochem. Res.* **27**, 277–81 (2002).
79. Wu, C. F., Bertorelli, R., Sacconi, M., Pepeu, G. & Consolo, S. Decrease of brain acetylcholine release in aging freely-moving rats detected by microdialysis. *Neurobiol. Aging* **9**, 357–361 (1988).
80. Wang, L., Albrecht, M. A. & Wurtman, R. J. Dietary supplementation with uridine-5'-monophosphate (UMP), a membrane phosphatide precursor, increases acetylcholine level and release in striatum of aged rat. *Brain Res.* **1133**, 42–48 (2007).
81. Das, A., Dikshit, M. & Nath, C. Profile of acetylcholinesterase in brain areas of male and female rats of adult and old age. *Life Sci.* **68**, 1545–1555 (2001).
82. Herman, J. P. *et al.* Intra-striatal dopaminergic grafts restore inhibitory control over striatal cholinergic neurons. *Exp. Brain Res.* **73**, 236–48 (1988).

83. Jackisch, R. *et al.* Long-Term Survival of Intrastratial Dopaminergic Grafts: Modulation of Acetylcholine Release by Graft-Derived Dopamine. *J. Neurochem.* **57**, 267–276 (1991).
84. Gage, F. H., Dunnett, S. B., Stenevi, U. & Björklund, A. Aged rats: Recovery of motor impairments by intrastratial nigral grafts. *Science (80-.)*. **221**, 966–969 (1983).
85. Puschban, Z. *et al.* Autoradiographic study of striatal dopamine re-uptake sites and dopamine D1 and D2 receptors in a 6-hydroxydopamine and quinolinic acid double-lesion rat model of striatonigral degeneration (multiple system atrophy) and effects of embryonic ventral mesencephalic, striatal or co-grafts. *Neuroscience* **95**, 377–388 (1999).
86. Beitz, J. M. Parkinson's disease: A review. *Frontiers in Bioscience - Scholar* **6 S**, 65–74 (2014).
87. Dejean, C., Gross, C. E., Bioulac, B. & Boraud, T. Dynamic changes in the cortex-basal ganglia network after dopamine depletion in the rat. *J. Neurophysiol.* **100**, 385–396 (2008).
88. Gardoni, F., Ghiglieri, V., Luca, M. di & Calabresi, P. Assemblies of glutamate receptor subunits with post-synaptic density proteins and their alterations in Parkinson's disease. in *Progress in Brain Research* **183**, 169–182 (Elsevier B.V., 2010).
89. Sgambato-Faure, V. & Cenci, M. A. Glutamatergic mechanisms in the dyskinesias induced by pharmacological dopamine replacement and deep brain stimulation for the treatment of Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol.* **96**, 69–86 (2012).
90. Dunah, A. W. *et al.* Alterations in subunit expression, composition, and phosphorylation of striatal N-methyl-D-aspartate glutamate receptors in a rat 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Mol. Pharmacol.* **57**, 342–352 (2000).
91. Gardoni, F. *et al.* A critical interaction between NR2B and MAGUK in L-DOPA induced dyskinesia. *J. Neurosci.* **26**, 2914–2922 (2006).
92. Picconi, B. *et al.* Loss of bidirectional striatal synaptic plasticity in L-DOPA-induced dyskinesia. *Nat. Neurosci.* **6**, 501–506 (2003).
93. Picconi, B. *et al.* Abnormal Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase II function mediates synaptic and motor deficits in experimental parkinsonism. *J. Neurosci.* **24**, 5283–5291 (2004).
94. Mellone, M. & Gardoni, F. Modulation of NMDA receptor at the synapse: promising therapeutic interventions in disorders of the nervous system. *Eur. J. Pharmacol.* **719**, 75–83 (2013).
95. Zold, C. L., Escande, M. V., Pomata, P. E., Riquelme, L. A. & Murer, M. G. Striatal NMDA receptors gate cortico-pallidal synchronization in a rat model of Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* **47**, 38–48 (2012).
96. Gardoni, F. & Bellone, C. Modulation of the glutamatergic transmission by Dopamine: a focus on Parkinson, Huntington and Addiction diseases. *Front. Cell. Neurosci.* **9**, 25 (2015).
97. Tieu, K. A guide to neurotoxic animal models of Parkinson's disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **1**, (2011).
98. Blandini, F. Neural and immune mechanisms in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J. Neuroimmune Pharmacol.* **8**, 189–201 (2013).
99. Ungerstedt, U. 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur. J. Pharmacol.* **5**, 107–110 (1968).
100. Commins, D. L., Shaughnessy, R. A., Axt, K. J., Vosmer, G. & Seiden, L. S. Variability among brain regions in the specificity of 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-induced lesions. *J. Neural Transm.* **77**, 197–210 (1989).
101. Luthman, J., Fredriksson, A., Sundström, E., Jonsson, G. & Archer, T. Selective lesion of central dopamine or noradrenaline neuron systems in the neonatal rat: motor behavior and monoamine alterations at adult stage. *Behav. Brain Res.* **33**, 267–277 (1989).
102. Jackson-Lewis, V. & Przedborski, S. Protocol for the MPTP mouse model of Parkinson's disease.

Nat. Protoc. **2**, 141–151 (2007).

103. Fornai, F. *et al.* Parkinson-like syndrome induced by continuous MPTP infusion: Convergent roles of the ubiquitin-proteasome system and α -synuclein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 3413–3418 (2005).
104. Riachi, N. J., Dietrich, W. D. & Harik, S. I. Effects of internal carotid administration of MPTP on rat brain and blood-brain barrier. *Brain Res.* **533**, 6–14 (1990).
105. Fleming, S. M. *et al.* Behavioral and immunohistochemical effects of chronic intravenous and subcutaneous infusions of varying doses of rotenone. *Exp. Neurol.* **187**, 418–429 (2004).
106. Talpade, D. J., Greene, J. G., Higgins, D. S. & Greenamyre, J. T. In vivo labeling of mitochondrial complex I (NADH:Ubiquinone oxidoreductase) in rat brain using [3H]dihydrorotenone. *J. Neurochem.* **75**, 2611–2621 (2000).
107. Cicchetti, F. *et al.* Systemic exposure to paraquat and maneb models early Parkinson's disease in young adult rats. *Neurobiol. Dis.* **20**, 360–371 (2005).
108. Saint-Pierre, M., Tremblay, M. E., Sik, A., Gross, R. E. & Cicchetti, F. Temporal effects of paraquat/maneb on microglial activation and dopamine neuronal loss in older rats. *J. Neurochem.* **98**, 760–772 (2006).
109. Medvedev, A. E., Kopydlowski, K. M. & Vogel, S. N. Inhibition of Lipopolysaccharide-Induced Signal Transduction in Endotoxin-Tolerized Mouse Macrophages: Dysregulation of Cytokine, Chemokine, and Toll-Like Receptor 2 and 4 Gene Expression. *J. Immunol.* **164**, 5564–5574 (2000).
110. Dentener, M. A., Von Asmuth, E. J., Francot, G. J., Marra, M. N. & Buurman, W. A. Antagonistic effects of lipopolysaccharide binding protein and bactericidal/permeability-increasing protein on lipopolysaccharide-induced cytokine release by mononuclear phagocytes. Competition for binding to lipopolysaccharide. *J. Immunol.* **151**, 4258–65 (1993).
111. Sanlioglu, S. *et al.* Lipopolysaccharide Induces Rac1-dependent Reactive Oxygen Species Formation and Coordinates Tumor Necrosis Factor- α Secretion through IKK Regulation of NF- κ B. *J. Biol. Chem.* **276**, 30188–30198 (2001).
112. Lehnardt, S. *et al.* Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 8514–8519 (2003).
113. Dutta, G., Zhang, P. & Liu, B. The lipopolysaccharide Parkinson's disease animal model: mechanistic studies and drug discovery. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **22**, 453–464 (2008).
114. B., L. *et al.* Role of nitric oxide in inflammation-mediated neurodegeneration. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **962**, 318–331 (2002).
115. Qin, L. *et al.* Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia* **55**, 453–462 (2007).
116. Perry, V. H. The influence of systemic inflammation on inflammation in the brain: Implications for chronic neurodegenerative disease. *Brain, Behavior, and Immunity* **18**, 407–413 (2004).
117. Zhang, J. *et al.* Intrapallidal lipopolysaccharide injection increases iron and ferritin levels in glia of the rat substantia nigra and induces locomotor deficits. *Neuroscience* **135**, 829–838 (2005).
118. Hunter, R. L. *et al.* Inflammation induces mitochondrial dysfunction and dopaminergic neurodegeneration in the nigrostriatal system. *J. Neurochem.* **100**, 1375–1386 (2007).
119. Choi, D. Y. *et al.* Striatal neuroinflammation promotes parkinsonism in rats. *PLoS One* **4**, (2009).
120. Liu, B. *et al.* Systemic infusion of naloxone reduces degeneration of rat substantia nigral dopaminergic neurons induced by intranigral injection of lipopolysaccharide. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **295**, 125–32 (2000).
121. Iravani, M. M., Kashеfi, K., Mander, P., Rose, S. & Jenner, P. Involvement of inducible nitric

- oxide synthase in inflammation-induced dopaminergic neurodegeneration. *Neuroscience* **110**, 49–58 (2002).
122. Arai, H. *et al.* Neurotoxic effects of lipopolysaccharide on nigral dopaminergic neurons are mediated by microglial activation, interleukin-1 β , and expression of caspase-11 in mice. *J. Biol. Chem.* **279**, 51647–51653 (2004).
 123. Herrera, A. J., Castaño, A., Venero, J. L., Cano, J. & Machado, A. 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 (2000).
 124. Sharma, N. & Nehru, B. Characterization of the lipopolysaccharide induced model of Parkinson's disease: Role of oxidative stress and neuroinflammation. *Neurochem. Int.* **87**, 92–105 (2015).
 125. Lu, X., Bing, G. & Hagg, T. Naloxone prevents microglia-induced degeneration of dopaminergic substantia nigra neurons in adult rats. *Neuroscience* **97**, 285–91 (2000).
 126. Laskin, D. L. Macrophages and Inflammatory Mediators in CHEMICAL TOXICITY: Battle of Forces. *Chem. Res. Toxicol.* **22**, 1376–1385 (2010).
 127. John, G. R., Lee, S. C., Song, X., Riviaccio, M. & Brosnan, C. F. IL-1-regulated responses in astrocytes: Relevance to injury and recovery. *Glia* **49**, 161–176 (2005).
 128. González, H., Elgueta, D., Montoya, A. & Pacheco, R. Neuroimmune regulation of microglial activity involved in neuroinflammation and neurodegenerative diseases. *J. Neuroimmunol.* **274**, 1–13 (2014).
 129. Lawson, L. J., Perry, V. H., Dri, P. & Gordon, S. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* **39**, 151–170 (1990).
 130. Del Rio-Hortega, P. El tercer elemento de los centros nerviosos I La microglia en estado normal II Intervención de la microglia en los procesos patológicos III Naturaleza probable de la microglia. *Bol la soc esp biol* **9**, 69–120 (1919).
 131. Ginhoux, F., Lim, S., Hoeffel, G., Low, D. & Huber, T. Origin and differentiation of microglia. *Front. Cell. Neurosci.* **7**, 1–14 (2013).
 132. Kierdorf, K. *et al.* Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1- and Irf8-dependent pathways. *Nat. Neurosci.* **2013** **163** **16**, 273 (2013).
 133. Waisman, A., Ginhoux, F., Greter, M. & Bruttger, J. Homeostasis of Microglia in the Adult Brain: Review of Novel Microglia Depletion Systems. *Trends Immunol.* **36**, 625–636 (2015).
 134. Matcovitch-Natan, O. *et al.* Microglia development follows a stepwise program to regulate brain homeostasis. *Science* (80-.). **353**, aad8670–aad8670 (2016).
 135. Kettenmann, H., Hanisch, U.-K., Noda, M. & Verkhratsky, A. Physiology of Microglia. *Physiol. Rev.* **91**, 461–553 (2011).
 136. Hanisch, U. K. & Kettenmann, H. Microglia: Active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nature Neuroscience* **10**, 1387–1394 (2007).
 137. London, A., Cohen, M. & Schwartz, M. Microglia and monocyte-derived macrophages: Functionally distinct populations that act in concert in CNS plasticity and repair. *Front. Cell. Neurosci.* **7**, (2013).
 138. Elward, K. & Gasque, P. 'Eat me' and 'don't eat me' signals govern the innate immune response and tissue repair in the CNS: Emphasis on the critical role of the complement system. in *Molecular Immunology* **40**, 85–94 (Elsevier Ltd, 2003).
 139. Biber, K., Neumann, H., Inoue, K. & Boddeke, H. W. G. M. Neuronal 'On' and 'Off' signals control microglia. *Trends in Neurosciences* **30**, 596–602 (2007).
 140. Medzhitov, R. & Janeway, C. A. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune

system. *Science* **296**, 298–300 (2002).

141. Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F. & Helmchen, F. Neuroscience: Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science (80-.)*. **308**, 1314–1318 (2005).
142. Napoli, I. & Neumann, H. Microglial clearance function in health and disease. *Neuroscience* **158**, 1030–1038 (2009).
143. Koizumi, S. *et al.* UDP acting at P2Y 6 receptors is a mediator of microglial phagocytosis. *Nature* **446**, 1091–1095 (2007).
144. Takahashi, K., Rochford, C. D. P. & Neumann, H. Clearance of apoptotic neurons without inflammation by microglial triggering receptor expressed on myeloid cells-2. **201**, 647–657 (2005).
145. Barclay, A. N., Wright, G. J., Brooke, G. & Brown, M. H. CD200 and membrane protein interactions in the control of myeloid cells. *Trends Immunol.* **23**, 285–90 (2002).
146. Cardona, A. E. *et al.* Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nat. Neurosci.* **9**, 917–924 (2006).
147. Zhang, H., Li, F., Yang, Y., Chen, J. & Hu, X. SIRP/CD47 signaling in neurological disorders. *Brain Research* **1623**, 74–80 (2015).
148. Bessis, A., Béchade, C., Bernard, D. & Roumier, A. Microglial control of neuronal death and synaptic properties. *GLIA* **55**, 233–238 (2007).
149. Bialas, A. R. & Stevens, B. Glia: Regulating synaptogenesis from multiple directions. *Current Biology* **22**, R833-5 (2012).
150. Paolicelli, R. C. *et al.* Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science (80-.)*. **333**, 1456–1458 (2011).
151. Hong, S., Dissing-Olesen, L. & Stevens, B. New insights on the role of microglia in synaptic pruning in health and disease. *Current Opinion in Neurobiology* **36**, 128–134 (2016).
152. Wake, H., Moorhouse, A. J., Jinno, S., Kohsaka, S. & Nabekura, J. Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *J. Neurosci.* **29**, 3974–3980 (2009).
153. Kettenmann, H., Kirchhoff, F. & Verkhratsky, A. Microglia: New Roles for the Synaptic Stripper. *Neuron* **77**, 10–18 (2013).
154. Tremblay, M.-E. *et al.* The Role of Microglia in the Healthy Brain. *J. Neurosci.* **31**, 16064–16069 (2011).
155. Schafer, D. *et al.* Microglia sculpt postnatal neuronal circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron* **74**, 691–705 (2012).
156. Pocock, J. M. & Kettenmann, H. Neurotransmitter receptors on microglia. *Trends Neurosci.* **30**, 527–35 (2007).
157. Jäkel, S. & Dimou, L. Glial cells and their function in the adult brain: A journey through the history of their ablation. *Frontiers in Cellular Neuroscience* **11**, 24 (2017).
158. Colton, C. A. Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain. (2009).
159. Graeber, M. B. & Streit, W. J. Microglia: Biology and pathology. *Acta Neuropathologica* **119**, 89–105 (2010).
160. Boche, D., Perry, V. H. & Nicoll, J. A. R. Review: Activation patterns of microglia and their identification in the human brain. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **39**, 3–18 (2013).
161. Crain, J. M., Nikodemova, M. & Watters, J. J. Microglia express distinct M1 and M2 phenotypic markers in the postnatal and adult central nervous system in male and female mice. *J. Neurosci. Res.* **91**, 1143–1151 (2013).

162. Orihuela, R., McPherson, C. A. & Harry, G. J. Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *Br. J. Pharmacol.* **173**, 649–665 (2016).
163. Saijo, K. & Glass, C. K. Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 775–787 (2011).
164. Varin, A. & Gordon, S. Alternative activation of macrophages: Immune function and cellular biology. *Immunobiology* **214**, 630–641 (2009).
165. Zhou, X., Spittau, B. & Kriegstein, K. TGF β signalling plays an important role in IL4-induced alternative activation of microglia. *J. Neuroinflammation* **9**, 706 (2012).
166. Kabba, J. A. *et al.* Microglia: Housekeeper of the Central Nervous System. *Cell. Mol. Neurobiol.* **38**, 53–71 (2018).
167. Mills, C. M1 and M2 Macrophages: Oracles of Health and Disease. *Crit. Rev. Immunol.* **32**, 463–488 (2012).
168. Morris, S. M. Arginine Metabolism: Boundaries of Our Knowledge. *J. Nutr.* **137**, 1602S-1609S (2007).
169. Yang, Z. & Ming, X.-F. Functions of Arginase Isoforms in Macrophage Inflammatory Responses: Impact on Cardiovascular Diseases and Metabolic Disorders. *Front. Immunol.* **5**, 533 (2014).
170. Njie, e. M. G. *et al.* Ex vivo cultures of microglia from young and aged rodent brain reveal age-related changes in microglial function. *Neurobiol. Aging* **33**, 195.e1-195.e12 (2012).
171. Sierra, A., Gottfried-Blackmore, A. C., McEwen, B. S. & Bulloch, K. Microglia derived from aging mice exhibit an altered inflammatory profile. *Glia* **55**, 412–424 (2007).
172. Streit, W. J. Dystrophic microglia in the aging human brain. (2004).
173. Wong, W. T. Microglial aging in the healthy CNS: Phenotypes, drivers, and rejuvenation. *Frontiers in Cellular Neuroscience* **7**, (2013).
174. Streit, W. J. & Xue. Life and Death of Microglia. (2009).
175. Damani, M. R. *et al.* NIH Public Access. **10**, 263–276 (2012).
176. Li, W. Phagocyte dysfunction, tissue aging and degeneration. *Ageing Research Reviews* **12**, 1005–1012 (2013).
177. Ma, W. *et al.* Gene expression changes in aging retinal microglia: Relationship to microglial support functions and regulation of activation. *Neurobiol. Aging* **34**, 2310–2321 (2013).
178. Hefendehl, J. K. *et al.* Homeostatic and injury-induced microglia behavior in the aging brain. *Aging Cell* **13**, 60–69 (2014).
179. Caldeira, C. *et al.* Microglia change from a reactive to an age-like phenotype with the time in culture. *Front. Cell. Neurosci.* **8**, 1–16 (2014).
180. Patterson, S. L. Immune dysregulation and cognitive vulnerability in the aging brain: Interactions of microglia, IL-1 β , BDNF and synaptic plasticity. *Neuropharmacology* **96**, 11–18 (2015).
181. Letiembre, M. *et al.* Innate immune receptor expression in normal brain aging. *Neuroscience* **146**, 248–254 (2007).
182. Norden, D. M. & Godbout, J. P. Review: Microglia of the aged brain: primed to be activated and resistant to regulation. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **39**, 19–34 (2013).
183. Streit, W. J. & Xue, Q. S. Alzheimer’s disease, neuroprotection, and CNS immunosenescence. *Front. Pharmacol.* **3 JUL**, (2012).
184. Basarkar, A. & Singh, J. *Nanoparticulate systems for polynucleotide delivery. International Journal of Nanomedicine* **2**, (2007).
185. Dubé, I. D. & Cournoyer, D. Gene therapy: here to stay. *CMAJ* **152**, 1605–13 (1995).

186. Patil, S. D., Rhodes, D. G. & Burgess, D. J. DNA-based therapeutics and DNA delivery systems: a comprehensive review. *AAPS J.* **7**, E61-77 (2005).
187. Raty, J., Pikkarainen, J., Wirth, T. & Yla-Herttuala, S. Gene Therapy: The First Approved Gene-Based Medicines, Molecular Mechanisms and Clinical Indications. *Curr. Mol. Pharmacol.* **1**, 13–23 (2008).
188. Worgall, S. & Crystal, R. G. Gene Therapy. *Princ. Tissue Eng.* 657–686 (2014). doi:10.1016/B978-0-12-398358-9.00034-3
189. Gao, X., Kim, K.-S. & Liu, D. Nonviral gene delivery: What we know and what is next. *AAPS J.* **9**, E92 (2007).
190. Schaffer, D. V, Koerber, J. T. & Lim, K.-I. Molecular Engineering of Viral Gene Delivery Vehicles. doi:10.1146/annurev.bioeng.10.061807.160514
191. Davison, A. J., Ria, M., Benkó², B. & Zs Harrach, B. Genetic content and evolution of adenoviruses. doi:10.1099/vir.0.19497-0
192. Lentz, T. B., Gray, S. J. & Samulski, R. J. Viral Vectors for Gene Delivery to the Central Nervous System. (2011). doi:10.1016/j.nbd.2011.09.014
193. Bergelson, J. M. *et al.* Identification of the integrin VLA-2 as a receptor for echovirus 1. *Science* **255**, 1718–20 (1992).
194. Campos, S. K. & Barry, M. A. *Current Advances and Future Challenges in Adenoviral Vector Biology and Targeting INTRODUCTION: A RATIONALE FOR AD VECTOR TARGETING.*
195. Yeh, P. & Perricaudet, M. Advances in adenoviral vectors: from genetic engineering to their biology. *FASEB J.* **11**, 615–23 (1997).
196. Benihoud, K., Yeh, P. & Perricaudet, M. Adenovirus vectors for gene delivery. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**, 440–447 (1999).
197. Rakkar, A. N. *et al.* A novel adenoviral vector expressing human Fas/CD95/APO-1 enhances p53-mediated apoptosis. *Cell Death Differ.* **6**, 326–33 (1999).
198. Graham, F. L. & Prevec, L. Adenovirus-based expression vectors and recombinant vaccines. *Biotechnology* **20**, 363–90 (1992).
199. Blundell, T. L. & Humbel, R. E. Hormone families: pancreatic hormones and homologous growth factors. *Nature* **287**, 781–787 (1980).
200. Joseph D'ercole, A., Stiles, A. D. & Underwood, L. E. *Tissue concentrations of somatomedin C: Further evidence for multiple sites of synthesis and paracrine or autocrine mechanisms of action (insulin-like growth factor I/growth factor/growth hormone).* *Medical Sciences* **81**, (1984).
201. Sjögren, K. *et al.* Disproportional Skeletal Growth and Markedly Decreased Bone Mineral Content in Growth Hormone Receptor $-/-$ Mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **267**, 603–608 (2000).
202. Ohlsson, C. *et al.* The role of liver-derived insulin-like growth factor-I. *Endocr. Rev.* **30**, 494–535 (2009).
203. Laron, Z. *Insulin-like growth factor 1 (IGF-1): a growth hormone.* *J Clin Pathol: Mol Pathol* **54**, (2001).
204. Yamamoto, H. & Murphy, L. J. Enzymatic conversion of IGF-I to des(1-3)IGF-I in rat serum and tissues: a further potential site of growth hormone regulation of IGF-I action. *J. Endocrinol.* **146**, 141–8 (1995).
205. Clemmons, D. R. & Underwood, L. E. Role of Insulin-Like Growth Factors and Growth Hormone in Reversing Catabolic States. *Horm. Res.* **38**, 37–40 (1992).
206. Firth, S. M. & Baxter, R. C. Cellular Actions of the Insulin-Like Growth Factor Binding Proteins. *Endocr. Rev.* **23**, 824–854 (2002).

207. LEROITH, D., WERNER, H., BEITNER-JOHNSON, D. & ROBERTS, A. T. Molecular and Cellular Aspects of the Insulin-Like Growth Factor I Receptor. *Endocr. Rev.* **16**, 143–163 (1995).
208. Chitnis, M. M., Yuen, J. S. P., Protheroe, A. S., Pollak, M. & Macaulay, V. M. The Type 1 Insulin-Like Growth Factor Receptor Pathway. *Clin. Cancer Res.* **14**, 6364–6370 (2008).
209. Annenkov, A. The Insulin-Like Growth Factor (IGF) Receptor Type 1 (IGF1R) as an Essential Component of the Signalling Network Regulating Neurogenesis. *Mol. Neurobiol.* **40**, 195–215 (2009).
210. Rakatzi, I., Stosik, M., Gromke, T., Siddle, K. & Eckel, J. Differential phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 by insulin and IGF-I receptors. *Arch. Physiol. Biochem.* **112**, 37–47 (2006).
211. Kulik, G., Klippel, A. & Weber, M. J. Antiapoptotic signalling by the insulin-like growth factor I receptor, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 1595–1606 (1997).
212. Shepherd, P. R., Withers, D. J. & Siddle, K. Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *Biochem. J.* **333 (Pt 3)**, 471–90 (1998).
213. Kermer, P., Klöcker, N., Labes, M. & Bähr, M. Insulin-like growth factor-I protects axotomized rat retinal ganglion cells from secondary death via PI3-K-dependent Akt phosphorylation and inhibition of caspase-3 In vivo. *J. Neurosci.* **20**, 2–8 (2000).
214. Yuan, J. & Yankner, B. A. Apoptosis in the nervous system. *Nature* **407**, 802–809 (2000).
215. Kim, B., Cheng, H.-L., Margolis, B. & Feldman, E. L. Insulin Receptor Substrate 2 And Shc Play Different Roles In Insulin-like Growth Factor I Signaling. *J. Biol. Chem.* **273**, 34543–34550 (1998).
216. Kurihara, S., Hakuno, F. & Takahashi, S. Insulin-like growth factor-I-dependent signal transduction pathways leading to the induction of cell growth and differentiation of human neuroblastoma cell line SH-SY5Y: the roles of MAP kinase pathway and PI 3-kinase pathway. *Endocr. J.* **47**, 739–51 (2000).
217. Hwang, H.-J., Kwon, M.-J. & Nam, T.-J. Chemoprotective effect of insulin-like growth factor I against acetaminophen-induced cell death in Chang liver cells via ERK1/2 activation. *Toxicology* **230**, 76–82 (2007).
218. Jung, H. J. & Suh, Y. Regulation of IGF -1 signaling by microRNAs. *Frontiers in Genetics* **5**, (2015).
219. García-Segura, L. M., Pérez, J., Pons, S., Rejas, M. T. & Torres-Alemán, I. Localization of insulin-like growth factor I (IGF-I)-like immunoreactivity in the developing and adult rat brain. *Brain Res.* **560**, 167–174 (1991).
220. Fernandez, A. M. & Torres-Alemán, I. The many faces of insulin-like peptide signalling in the brain. *Nat. Rev. Neurosci.* **13**, 225–239 (2012).
221. Nishijima, T. *et al.* Neuronal Activity Drives Localized Blood-Brain-Barrier Transport of Serum Insulin-like Growth Factor-I into the CNS. *Neuron* **67**, 834–846 (2010).
222. Beck, K. D., Poweli-Braxton, L., Widmer, H.-R., Valverde, J. & Hefti, F. *Igf1 Gene Disruption Results in Reduced Brain Size, CNS Hypomyelination, and Loss of Hippocampal Granule and Striatal Parvalbumin-Containing Neurons.* *Neuron* **14**, (1995).
223. Torres-Aleman, I., Naftolin, F. & Robbins, R. J. Trophic effects of basic fibroblast growth factor on fetal rat hypothalamic cells: interactions with insulin-like growth factor I. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **52**, 253–7 (1990).
224. Werther, G. A., Cheesman, H. & Vincenzo, R. Olfactory bulb organ culture is supported by combined insulin-like growth factor-I and basic fibroblast growth factor. *Brain Res.* **617**, 339–342 (1993).
225. Torres-Aleman, I., Pons, S. & Santos-Benito, F. F. Survival of Purkinje Cells in Cerebellar Cultures is Increased by Insulin-like Growth Factor I. *Eur. J. Neurosci.* **4**, 864–869 (1992).
226. Brooker, G. J. *et al.* Endogenous IGF-1 regulates the neuronal differentiation of adult stem cells.

J. Neurosci. Res. **59**, 332–41 (2000).

227. O’Kusky, J. R., Ye, P. & D’Ercole, A. J. Insulin-like growth factor-I promotes neurogenesis and synaptogenesis in the hippocampal dentate gyrus during postnatal development. *J. Neurosci.* **20**, 8435–42 (2000).
228. Torres-Aleman, I. Insulin-Like Growth Factors as Mediators of Functional Plasticity in the Adult Brain. *Horm. Metab. Res.* **31**, 114–119 (1999).
229. Carro, E. *et al.* Therapeutic actions of insulin-like growth factor I on APP/PS2 mice with severe brain amyloidosis. *Neurobiol. Aging* **27**, 1250–1257 (2006).
230. Kazanis, I., Giannakopoulou, M., Philippidis, H. & Stylianopoulou, F. Alterations in IGF-I, BDNF and NT-3 levels following experimental brain trauma and the effect of IGF-I administration. *Exp. Neurol.* **186**, 221–34 (2004).
231. Yamaguchi, F. *et al.* Increase of extracellular insulin-like growth factor I (IGF-I) concentration following electrolytical lesion in rat hippocampus. *Neurosci. Lett.* **128**, 273–276 (1991).
232. Breese, C. R. *et al.* Expression of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and IGF-binding protein 2 (IGF-BP2) in the hippocampus following cytotoxic lesion of the dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.* **369**, 388–404 (1996).
233. Genis, L. *et al.* Astrocytes require insulin-like growth factor I to protect neurons against oxidative injury. *F1000Research* **3**, 28 (2014).
234. Ebert, A. D., Beres, A. J., Barber, A. E. & Svendsen, C. N. Human neural progenitor cells over-expressing IGF-1 protect dopamine neurons and restore function in a rat model of Parkinson’s disease. *Exp. Neurol.* **209**, 213–223 (2008).
235. Fan, D. *et al.* Supplementation of Blackcurrant Anthocyanins Increased Cyclic Glycine-Proline in the Cerebrospinal Fluid of Parkinson Patients: Potential Treatment to Improve Insulin-Like Growth Factor-1 Function. *Nutrients* **10**, 714 (2018).
236. Lunn, J. S. *et al.* Autocrine production of IGF-I increases stem cell-mediated neuroprotection. *Stem Cells* **33**, 1480–9 (2015).
237. Lichtenwalner, R. . *et al.* Intracerebroventricular infusion of insulin-like growth factor-I ameliorates the age-related decline in hippocampal neurogenesis. *Neuroscience* **107**, 603–613 (2001).
238. Markowska, A. ., Mooney, M. & Sonntag, W. . Insulin-like growth factor-1 ameliorates age-related behavioral deficits. *Neuroscience* **87**, 559–569 (1998).
239. Fernandez, A. M., de la Vega, A. G. & Torres-Aleman, I. Insulin-like growth factor I restores motor coordination in a rat model of cerebellar ataxia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 1253–1258 (1998).
240. Guan, J. *et al.* Selective neuroprotective effects with insulin-like growth factor-1 in phenotypic striatal neurons following ischemic brain injury in fetal sheep. *Neuroscience* **95**, 831–839 (1999).
241. Hereñú, C. B., Sonntag, W. E., Morel, G. R., Portiansky, E. L. & Goya, R. G. The ependymal route for insulin-like growth factor-1 gene therapy in the brain. *Neuroscience* **163**, 442–447 (2009).
242. Nishida, F. *et al.* Restorative effect of intracerebroventricular insulin-like growth factor-I gene therapy on motor performance in aging rats. *Neuroscience* **177**, 195–206 (2011).
243. Morel, G. R. *et al.* Cognitive impairment and morphological changes in the dorsal hippocampus of very old female rats. *Neuroscience* **303**, 189–199 (2015).
244. Pardo, J. *et al.* Insulin-like growth factor-I gene therapy increases hippocampal neurogenesis, astrocyte branching and improves spatial memory in female aging rats. *Eur. J. Neurosci.* **44**, 2120–2128 (2016).

245. Hereñú, C. B. *et al.* Restorative effect of insulin-like growth factor-I gene therapy in the hypothalamus of senile rats with dopaminergic dysfunction. *Gene Ther.* **14**, 237–245 (2007).
246. Rodríguez, S. S. *et al.* Hypothalamic IGF-I gene therapy prolongs estrous cyclicity and protects ovarian structure in middle-aged female rats. *Endocrinology* **154**, 2166–73 (2013).
247. Paxinos, G. & Watson, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. (Elsevier, 2007).
248. Walsh, R. N. & Cummins, R. A. The Open-Field Test: a critical review. *Psychol. Bull.* **83**, 482–504 (1976).
249. Espejo, E. F. Effects of weekly or daily exposure to the elevated plus-maze in male mice. *Behav. Brain Res.* **87**, 233–8 (1997).
250. Tatem, K. S. *et al.* Behavioral and Locomotor Measurements Using an Open Field Activity Monitoring System for Skeletal Muscle Diseases. *J. Vis. Exp.* (2014). doi:10.3791/51785
251. Dong, M.-X. *et al.* Recombinant tissue plasminogen activator induces long-term anxiety-like behaviors via the ERK1/2-GAD1-GABA cascade in the hippocampus of a rat model. *Neuropharmacology* **128**, 119–131 (2018).
252. De Boer, S. F. & Koolhaas, J. M. Defensive burying in rodents: ethology, neurobiology and psychopharmacology. *Eur. J. Pharmacol.* **463**, 145–161 (2003).
253. Mamounas, L. A. *et al.* BDNF promotes the regenerative sprouting, but not survival, of injured serotonergic axons in the adult rat brain. *J. Neurosci.* **20**, 771–782 (2000).
254. Acaz-Fonseca, E., Duran, J. C., Carrero, P., Garcia-Segura, L. M. & Arevalo, M. A. Sex differences in glia reactivity after cortical brain injury. *Glia* **63**, 1966–1981 (2015).
255. Dobin, A. *et al.* Sequence analysis STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. **29**, 15–21 (2013).
256. Li, H. *et al.* The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* **25**, 2078–2079 (2009).
257. Anders, S., Pyl, P. T. & Huber, W. HTSeq-A Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* **31**, 166–169 (2015).
258. Love, M. I., Huber, W. & Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* **15**, 550 (2014).
259. Passamonti, L. *et al.* Neuroinflammation and Functional Connectivity in Alzheimer’s Disease: Interactive Influences on Cognitive Performance. *J. Neurosci.* **39**, 7218–7226 (2019).
260. D’Avila, J. C. *et al.* Age-related cognitive impairment is associated with long-term neuroinflammation and oxidative stress in a mouse model of episodic systemic inflammation. *J. Neuroinflammation* **15**, 28 (2018).
261. Di Benedetto, S., Müller, L., Wenger, E., Düzel, S. & Pawelec, G. Contribution of neuroinflammation and immunity to brain aging and the mitigating effects of physical and cognitive interventions. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* **75**, 114–128 (2017).
262. Hernandez-Rabaza, V. *et al.* Neuroinflammation increases GABAergic tone and impairs cognitive and motor function in hyperammonemia by increasing GAT-3 membrane expression. Reversal by sulforaphane by promoting M2 polarization of microglia. *J. Neuroinflammation* **13**, (2016).
263. Ritzel, R. M. *et al.* Old age increases microglial senescence, exacerbates secondary neuroinflammation, and worsens neurological outcomes after acute traumatic brain injury in mice. *Neurobiol. Aging* **77**, 194–206 (2019).
264. Calabrese, V. *et al.* Aging and Parkinson’s Disease: Inflammaging, neuroinflammation and biological remodeling as key factors in pathogenesis. *Free Radic. Biol. Med.* **115**, 80–91 (2018).
265. Koellhoffer, E. C., McCullough, L. D. & Ritzel, R. M. Old maids: Aging and its impact on microglia function. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 1–25 (2017).
266. Lavin, Y. *et al.* Tissue-resident macrophage enhancer landscapes are shaped by the local

microenvironment. *Cell* **159**, 1312–1326 (2014).

267. Nissen, J. C. Microglial function across the spectrum of age and gender. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, (2017).
268. Streit, W. J. & Xue, Q.-S. Microglial senescence. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* **12**, 763–7 (2013).
269. Mouton, P. R. *et al.* Age and gender effects on microglia and astrocyte numbers in brains of mice. *Brain Res.* **956**, 30–35 (2002).
270. Sharaf, A., Krieglstein, K. & Spittau, B. Distribution of microglia in the postnatal murine nigrostriatal system. *Cell Tissue Res.* **351**, 373–382 (2013).
271. Lee, D. C. *et al.* Aging enhances classical activation but mitigates alternative activation in the central nervous system. *Neurobiol. Aging* **34**, 1610–1620 (2013).
272. Falomir-Lockhart, E., Dolcetti, F. J. C., García-Segura, L. M., Hereñú, C. B. & Bellini, M. J. IGF1 Gene Therapy Modifies Microglia in the Striatum of Senile Rats . *Frontiers in Aging Neuroscience* **11**, 48 (2019).
273. Wang, C. *et al.* Salidroside attenuates neuroinflammation and improves functional recovery after spinal cord injury through microglia polarization regulation. *J. Cell. Mol. Med.* **22**, 1148–1166 (2018).
274. Turner, R. S. & Desmurget, M. Basal ganglia contributions to motor control: A vigorous tutor. *Current Opinion in Neurobiology* **20**, 704–716 (2010).
275. Galvan, A., Floran, B., Erlij, D. & Aceves, J. Intrapallidal dopamine restores motor deficits induced by 6-hydroxydopamine in the rat. *J. Neural Transm.* **108**, 153–166 (2001).
276. Schultz, W. Getting formal with dopamine and reward. *Neuron* **36**, 241–263 (2002).
277. Klein, M. O. *et al.* Dopamine: Functions, Signaling, and Association with Neurological Diseases. *Cellular and Molecular Neurobiology* **39**, 31–59 (2019).
278. Berke, J. D. What does dopamine mean? *Nature Neuroscience* **21**, 787–793 (2018).
279. Xiao, B., Cheng Tu, J. & Worley, P. F. Homer: A link between neural activity and glutamate receptor function. *Current Opinion in Neurobiology* **10**, 370–374 (2000).
280. Shiraishi-Yamaguchi, Y. & Furuichi, T. The Homer family proteins. *Genome Biology* **8**, 206 (2007).
281. Richter, K. *et al.* Presynaptic cytomatrix protein bassoon is localized at both excitatory and inhibitory synapses of rat brain. *J. Comp. Neurol.* **408**, 437–448 (1999).
282. Kaneko, T., Fujiyama, F. & Hioki, H. Immunohistochemical localization of candidates for vesicular glutamate transporters in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* **444**, 39–62 (2002).
283. Lee, Y. *et al.* Transcriptome analyses suggest minimal effects of Shank3 dosage on directional gene expression changes in the mouse striatum. *Animal Cells Syst. (Seoul)*. **23**, 270–274 (2019).
284. Sorokina, A. M. *et al.* Striatal transcriptome of a mouse model of ADHD reveals a pattern of synaptic remodeling. *PLoS One* **13**, e0201553 (2018).
285. Martinez, F. O. & Gordon, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: Time for reassessment. *F1000Prime Rep.* **6**, (2014).
286. Dai, B. *et al.* Upregulation of p-Smad2 contributes to FAT10-induced oncogenic activities in glioma. *Tumor Biol.* **37**, 8621–8631 (2016).
287. Yuan, J. *et al.* Increased expression of FAT10 is correlated with progression and prognosis of human glioma. *Pathol. Oncol. Res.* **18**, 833–839 (2012).
288. Lisak, R. P. *et al.* Cytokines regulate neuronal gene expression: Differential effects of Th1, Th2 and monocyte/macrophage cytokines. *J. Neuroimmunol.* **238**, 19–33 (2011).

289. Hwang, I. K. *et al.* CD74-immunoreactive Activated M1 microglia are shown late in the gerbil hippocampal CA1 region following transient cerebral ischemia. *Mol. Med. Rep.* **15**, 4148–4154 (2017).
290. Zeiner, P. S. *et al.* CD74 regulates complexity of tumor cell HLA class II peptidome in brain metastasis and is a positive prognostic marker for patient survival. *Acta Neuropathol. Commun.* **6**, 18 (2018).
291. Olsson, M., Nikkhah, G., Bentlage, C. & Bjarklund, A. *Forelimb Akinesia in the Rat Parkinson Model: Differential Effects of Dopamine Agonists and Nigral Transplants as Assessed by a New Stepping Test.* *The Journal of Neuroscience* **15**, (1995).
292. Fang, X., Sugiyama, K., Akamine, S. & Namba, H. The stepping test and its learning process in different degrees of unilateral striatal lesions by 6-hydroxydopamine in rats. *Neurosci. Res.* **55**, 403–409 (2006).
293. Blume, S. R., Cass, D. K. & Tseng, K. Y. Stepping test in mice: A reliable approach in determining forelimb akinesia in MPTP-induced Parkinsonism. *Exp. Neurol.* **219**, 208–211 (2009).
294. Zhu, H. *et al.* Parkinson's disease-like forelimb akinesia induced by BmK I, a sodium channel modulator. *Behav. Brain Res.* **308**, 166–176 (2016).
295. Woodlee, M. T. *et al.* Testing forelimb placing 'across the midline' reveals distinct, lesion-dependent patterns of recovery in rats. *Exp. Neurol.* **191**, 310–317 (2005).
296. Woodlee, M. T., Kane, J. R., Chang, J., Cormack, L. K. & Schallert, T. Enhanced function in the good forelimb of hemi-parkinson rats: Compensatory adaptation for contralateral postural instability? *Exp. Neurol.* **211**, 511–517 (2008).
297. Reyes-Corona, D. *et al.* Neurturin overexpression in dopaminergic neurons induces presynaptic and postsynaptic structural changes in rats with chronic 6-hydroxydopamine lesion. *PLoS One* **12**, e0188239 (2017).
298. Fleming, S. M., Ekhtor, O. R. & Ghisays, V. Assessment of sensorimotor function in mouse models of Parkinson's disease. *J. Vis. Exp.* (2013). doi:10.3791/50303