

PEDECIBA Biología
Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas
Subárea Neurociencias

ENTENDIENDO LAS BASES DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON: CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS NEUROTÓXICAS ASOCIADAS CON NEURODEGENERACIÓN DOPAMINÉRGICA *IN VIVO*

Lic. Agustina Dapuelo

Laboratorio de Mecanismos de Neurodegeneración y Neuroprotección,
Departamento de Neurobiología y Neuropatología, Instituto de
Investigaciones Biológicas Clemente Estable.

Junio 2024

Orientadora:
Dra. Giselle Prunell



Ministerio
de Educación
y Cultura



cap COMISIÓN
ACADÉMICA
DE POSGRADO

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	3
LISTADO DE ABREVIATURAS	4
RESUMEN	7
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1. Antecedentes generales	9
1.1.1. Enfermedades neurodegenerativas	9
1.1.2. Enfermedad de Parkinson	11
1.1.2.1. Generalidades	11
1.1.2.2. Sistemas dopaminérgicos y EP.....	12
1.1.2.3. Patogénesis de la enfermedad.....	14
1.1.2.4. Tratamientos	18
1.1.2.5. Acercamientos experimentales para su estudio	18
1.1.3. Rol de las células gliales en la homeostasis del SNC	19
1.2. Antecedentes específicos	23
1.2.1. Mecanismos no autónomos celulares en la EP	23
1.2.2. Antecedentes particulares del grupo	25
2. HIPÓTESIS DE TRABAJO	26
3. OBJETIVOS	26
3.2. Objetivo general	26
3.3. Objetivos específicos	26
4. ESTRATEGÍA EXPERIMENTAL	26
5. MATERIALES Y MÉTODOS	28
5.1. Materiales	28
5.2. Animales	28
5.3. Inyección de 6-hidroxidopamina	29
5.4. Cultivos celulares	29
5.4.1. Cultivo primario de la SN, CE e Hc de ratas inyectadas con 6-OHDA.....	30
5.4.2. Cultivo primario de glía mixta	30
5.5. Experimentos <i>in vitro</i>	31
5.5.1. Evaluación del rendimiento y morfología del cultivo de GRDD	31
5.5.2. Preparación de la GRDD para determinación de su estirpe celular	31
5.5.3. Preparación de GRDD para experimentos <i>in vivo</i> y la evolución temporal del cultivo <i>in vitro</i>	31
5.5.4. Evaluación de la evolución temporal en cultivo	32
5.5.5. Cocultivos.....	32
5.5.6. Inmunocitoquímica	33
5.6. Experimentos <i>in vivo</i>	35
5.6.1. Inyección de células.....	35
5.6.2. Comportamiento.....	36

5.6.2.1.	Test de cilindro	36
5.6.2.2.	Test de rotación	36
5.6.3.	Procesamiento de animales para análisis inmunohistoquímico	37
5.6.4.	Inmunohistoquímica.....	37
5.7.	Análisis de datos	38
5.7.1.	Cuantificación del rendimiento del cultivo de GRDD	38
5.7.2.	Análisis morfológico de la GRDD	38
5.7.3.	Determinación de la estirpe celular de la GRDD	39
5.7.4.	Evolución temporal del número de células en cultivo	39
5.7.5.	Viabilidad de PC12 en cocultivo	39
5.7.6.	Inflamación en ratas inyectadas con 6-OHDA	39
5.7.7.	Comportamiento.....	40
5.7.8.	Integridad de la vía nigro-estriatal	40
5.7.8.1.	Conteo de las neuronas dopaminérgicas en la SN	40
5.7.8.2.	Cuantificación de las fibras dopaminérgicas en el CE.....	40
5.7.9.	Estadística.....	40
6.	RESULTADOS	41
6.1.	Microambiente neurodegenerativo a los 3 días del tratamiento con 6-OHDA.....	41
6.2.	Caracterización <i>in vitro</i> de los cultivos primarios de SN, CE y Hc de ratas tratadas con 6-OHDA	43
6.2.1.	Rendimiento de los cultivos	43
6.2.2.	Morfología de las células obtenidas en cultivo.....	46
6.2.3.	Fenotipo celular de la GRDD al tercer día <i>in vitro</i>	48
6.2.4.	Evolución temporal del cultivo de GRDD	49
6.3.	Potencial neurotóxico <i>in vitro</i> de la GRDD	50
6.4.	Potencial neurotóxico <i>in vivo</i> de la GRDD.....	51
6.4.1.	Efectos histológicos	53
6.4.2.	Efectos comportamentales	53
7.	DISCUSIÓN	54
7.1.	Impacto del microambiente neurodegenerativo inducido por 6-OHDA sobre la población glial	54
7.2.	Fenotipo celular de la GRDD	55
7.3.	Propiedades neurotóxicas de la GRDD.....	56
7.4.	GRDD en relación a células gliales neurotóxicas obtenidas de otros modelos de daño ..	58
8.	CONCLUSIONES.....	60
9.	PERSPECTIVAS	60
10.	REFERENCIAS.....	62

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer a mi tutora Giselle Prunell, no solo por la excelencia profesional que la caracteriza y todas las enseñanzas compartidas durante los últimos seis años, sino también por su calidez humana y la gran empatía con la que me acompañó durante todo este proceso.

También a Silvia Olivera por estar siempre dispuesta a ayudar en todos los aspectos experimentales del proyecto con su vasto conocimiento sobre células gliales, al tribunal por sus valiosos aportes y a mis compañeros del “Laboratorio de Mecanismos de Neurodegeneración y Neuroprotección” por las risas, los almuerzos y esos momentos de dispersión que alivianan los momentos difíciles del recorrido científico.

Gracias a mis amigos que siempre están ahí para festejar cada logro, pero sobre todo para escuchar y dar aliento durante los momentos de crisis. En particular a Xime, que me ha acompañado en todas las etapas vividas en las últimas dos décadas. A Cami y Andy, los mejores regalos que me dejó la Facultad de Ciencias, por esas tardes de películas malas y comida chatarra que siempre me recargan las baterías. Y a “Las trastornadas de Velaris” que todos los días escalan la montaña conmigo, gracias por las aventuras.

En especial, gracias a mi mamá, mi mayor ejemplo a seguir en esta vida y la persona a la que le debo gran parte de lo que soy. Nada de esto sería posible sin su apoyo constante y amor incondicional.

Y finalmente, un agradecimiento a Estrella, Peeta, Luna, Mia y Poppy, mis bebés peludos. A los que ya no puedo ver, pero sé que iluminarán mi cielo hasta el final, y a los que siguen en el suelo para ahuyentar la soledad. Son la alegría de mi existencia y mis más grandes compañeros.

LISTADO DE ABREVIATURAS

%Area	Porcentaje del área total ocupada por la señal
6-OHDA	6-hidroxidopamina
AbA	Astrocitos aberrantes
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AP	Eje anteroposterior
AQP4	Acuaporina 4
ATP	Adenosín trifosfato
BHE	Barrera hematoencefálica
CE	Cuerpo estriado
CEUA	Comisión de Ética en el Uso de Animales
Cx43	Conexina 43
DA	Dopamina
DAB	Diaminobencidina
DAMP	Patrones moleculares asociados a daños
DBS	Estimulación cerebral profunda
DIV	Días <i>in vitro</i>
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
EA	Enfermedad de Alzheimer
EH	Enfermedad de Huntington
ELA	Esclerosis lateral amiotrófica
EO	Estrés oxidativo
EP	Enfermedad de Parkinson
FBS	Suero fetal bovino
GB	Ganglios basales
GDNF	Factor neurotrófico derivado de la glía
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GPe	Globo Pálido externo
GPi	Globo Pálido interno

GRDD	Glía reactiva derivada del daño
Hc	Hipocampo
IB4	Isolectina B4
Iba-1	Molécula adaptadora de unión de calcio ionizado 1
IBCE	Instituto de investigaciones biológicas Clemente Estable
IDA	Astroцитos derivados de isquemia
IL-1β	Interleucina 1 β
IL-16	Interleucina 16
IL-18	Interleucina 18
L	Eje lateral
MAOB	Monoaminooxidasa B
MGV	Intensidad de la señal medida como el valor de gris promedio dentro de la selección
MPP+	Metil-fenilpiridinio
MPTP	N-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
MSN	Neuronas espinosas medias
NLRP3	Familia de receptores tipo NOD conteniendo el dominio pirina 3
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	Buffer salino de fosfatos
PFA	Paraformaldehído
RE	Retículo endoplásmico
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
S100β	Proteína B fijadora de calcio S100
SD	Cepa de ratas Sprague Dawley
SN	Sustancia nigra
SNC	Sistema nervioso central
SNc	Sustancia nigra <i>pars compacta</i>
SNr	Sustancia nigra <i>pars reticulada</i>
STN	Núcleo subtalámico

TH	Tirosina hidroxilasa
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
UPS	Sistema de ubiquitina-proteosoma
V	Eje dorsoventral
VTA	Área tegmental ventral
α-sin	Alfa-sinucleína
α-tub	Alfa-tubulina
β-tub III	Beta-tubulina III

RESUMEN

La enfermedad de Parkinson (EP) es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por la degeneración progresiva de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra (SN), causando una disminución de la dopamina en el caudado-putamen. La etiología de la EP es desconocida para la mayoría de los casos y los tratamientos clínicos disponibles son sintomáticos y presentan efectos secundarios adversos.

Aunque desde hace varias décadas se reconoce la importancia de la glía reactiva neuroinflamatoria en la muerte neuronal, las evidencias que muestran claramente el papel de las células gliales en la patogénesis de la EP son limitadas. Para contribuir con esta temática, nuestro grupo de investigación comenzó a investigar la capacidad neurotóxica de células gliales obtenidas de la SN de ratas inyectadas unilateralmente con la toxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA), un modelo experimental de EP ampliamente validado. A partir de estos animales, se lograron aislar células de la SN que proliferaron en cultivo y que, en estudios preliminares, mostraron ser capaces de inducir degeneración de neuronas dopaminérgicas cuando son inyectadas en la SN de animales control. Este hallazgo sugiere que la glía obtenida del ambiente degenerativo de la SN podría tener propiedades neurotóxicas. Por este motivo, profundizar en el conocimiento de la biología de esta glía reactiva derivada del daño (GRDD) y sobre sus particularidades podría contribuir a un mejor entendimiento de las bases fisiopatológicas de la EP.

En este contexto, este trabajo pretende aportar evidencias a la hipótesis que predice que las células gliales desempeñan un rol significativo en la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la EP. En forma más específica, el objetivo fue aportar conocimiento sobre las características de estas células con propiedades neurotóxicas y completar la caracterización del novedoso modelo de EP inducido por la inyección de células gliales obtenidas del entorno dañado por 6-OHDA.

Para ello, inyectamos unilateralmente 6-OHDA en la SN de ratas adultas mediante cirugía estereotáxica y luego de tres días, diseccionamos el tejido de la SN para obtener un cultivo primario de GRDD a partir de estos animales. En conjunto, también se cultivaron muestras del cuerpo estriado (CE) y el hipocampo (Hc) para evaluar la producción de GRDD en otras regiones, eligiendo al CE por estar estrechamente asociada a la SN y el Hc como región control. De esta forma se obtuvieron dos tipos de cultivos a partir de cada región: uno proveniente del lado inyectado con la toxina o ipsilateral y otro del lado no tratado o contralateral. Posteriormente, se precedió a la caracterización de las células obtenidas en cultivo mediante inmunocitoquímica y otros métodos de tinción para evaluar aspectos como: número de células, tamaño e inmunorreactividad a diferentes marcadores celulares para determinar su fenotipo. Por otro lado, estudiamos el potencial neurotóxico de la GRDD, tanto *in vitro* al cocultivarlas con células PC12, como *in vivo* inyectándolas unilateralmente en la SN de ratas control y analizando la integridad de la vía nigroestriatal a los 30 días del tratamiento mediante inmunohistoquímica contra tirosina hidroxilasa y tests comportamentales para evaluar el rendimiento motor.

Nuestros resultados de los estudios *in vitro* muestran que, el número de células obtenidas del entorno degenerativo de la SN fue significativamente mayor en comparación con el lado de control (contralateral). Interesantemente, el rendimiento de los cultivos del CE ipsilateral a la inyección de 6-OHDA también fue mayor comparado con el lado contralateral y con el Hc de ambos lados, aunque el número de células obtenidas fue menor que el obtenido de la SN. A su vez, estas células tienden a ser de mayor tamaño tanto en la SN como en el CE. Esto es esperable ya que al momento del cultivo la inflamación es superior en el sitio de inyección de la toxina y esto podría ser la causa de la mayor presencia de glía reactiva. La población glial residente se encuentra exacerbada en el sitio donde la neurodegeneración es mayor, en este caso la SN, pero también a nivel del CE donde se encuentran las terminales dopaminérgicas degenerantes, aunque en menor medida.

Por otro lado, los estudios sobre el fenotipo de la GRDD obtenida a partir de la SN tratada con la toxina, indican que son positivas tanto para marcadores de astrocitos como para marcadores de microglía. Esta característica es particularmente sorprendente porque rara vez se observa un

fenotipo mixto o híbrido de este tipo y podría ser indicativo de que la GRDD posee características de ambos tipos de células gliales. Se ha observado que este fenómeno puede ocurrir en ciertas condiciones fisiológicas o patológicas, como durante la inflamación, en tumores o en respuesta a lesiones cerebrales y podría estar explicando en parte los mecanismos moleculares que le confieren las propiedades particulares.

Finalmente, los experimentos sobre el potencial neurotóxico mostraron que la GRDD produce una reducción en la viabilidad de células PC12 en cocultivo y en los experimentos *in vivo*, su inyección en la SN de animales control fue suficiente para provocar la degeneración ipsilateral de la vía nigroestriatal en comparación al lado contralateral y a tratamientos control como la inyección de glía mixta normal o vehículo. Esto es indicativo de que las células gliales extraídas del ambiente degenerativo expresan un fenotipo que las aleja de sus funciones homeostáticas clásicas, generando una ganancia de funciones neurotóxicas que por sí solas son capaces de producir muerte neuronal.

En conjunto, estos hallazgos contribuyen a una mejor comprensión de las bases fisiopatológicas de la EP, evidenciando un vínculo directo entre disfunción glial con neurodegeneración y posicionando a la modulación de estas células gliales neurotóxicas como una posible diana terapéutica novedosa y atractiva.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes generales

1.1.1. Enfermedades neurodegenerativas

Las enfermedades neurodegenerativas son un conjunto de afecciones a nivel del sistema nervioso, caracterizadas por la pérdida progresiva de poblaciones neuronales vulnerables y su consecuente daño a las funciones neurológicas. Estas condiciones abarcan un amplio espectro de patologías, entre las que se incluyen, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad de Parkinson (EP), la enfermedad de Huntington (EH) y la esclerosis lateral amiotrófica (ELA). A lo largo de la historia, estas enfermedades han sido objeto de intensa investigación, debido a su impacto devastador en la calidad de vida de los pacientes y a la creciente carga que representan para los sistemas de salud en todo el mundo.¹⁻⁵

Los principales factores de riesgo para las enfermedades neurodegenerativas incluyen una combinación de factores genéticos, ambientales y de estilo de vida. El envejecimiento es el principal factor de riesgo para muchas enfermedades neurodegenerativas, como la EA, la EP y la ELA, donde se observa un aumento de la probabilidad de desarrollar estas condiciones a medida que las personas envejecen (Fig. 1). Algunas enfermedades neurodegenerativas tienen una fuerte predisposición genética, donde ciertas mutaciones genéticas están directamente asociadas con el desarrollo de la enfermedad, como en el caso de la EH. La exposición a ciertas toxinas ambientales o productos químicos también puede aumentar el riesgo de desarrollar enfermedades neurodegenerativas, donde, por ejemplo, la exposición a metales pesados como el plomo o el mercurio se ha relacionado con un mayor riesgo de EP. Otros factores como la falta de actividad física, una dieta poco saludable, el tabaquismo, el consumo excesivo de alcohol y el estrés crónico, junto con algunas condiciones médicas, como la diabetes, la hipertensión arterial y la obesidad, también pueden aumentar el riesgo de desarrollar enfermedades neurodegenerativas.⁶

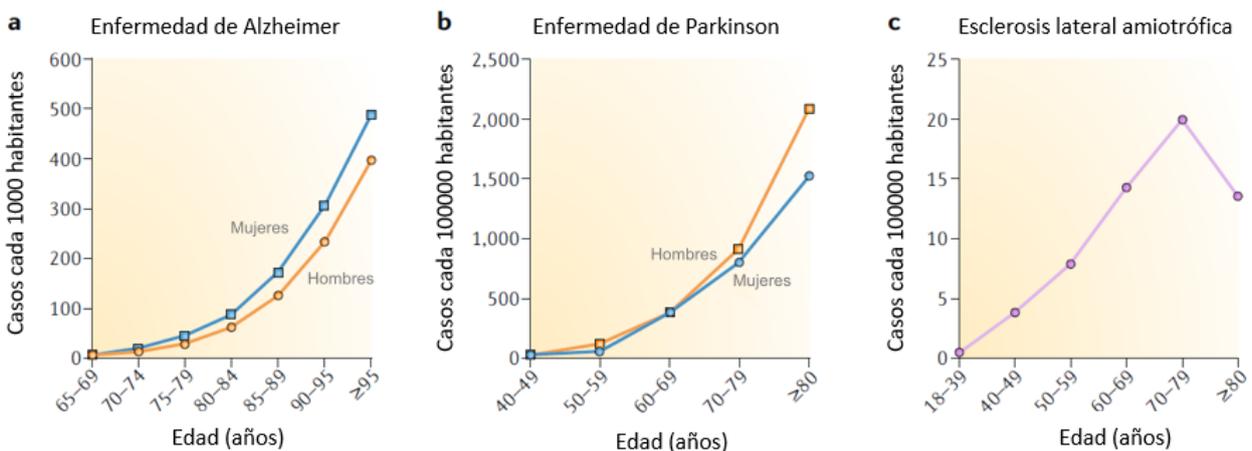


Figura 1: Prevalencia de enfermedades neurodegenerativas. (a) Prevalencia de la enfermedad de Alzheimer por cada 1000 hombres y mujeres respecto a la edad en EE.UU. (b) Prevalencia de la enfermedad de Parkinson por cada 100.000 hombres y mujeres respecto a la edad a nivel mundial. (c) Prevalencia de esclerosis lateral amiotrófica (ELA) por cada 100.000 habitantes en los EE. UU. en 2014. [Adaptado de Hou et al., 2019]⁷.

El envejecimiento de la población debido a los avances en la medicina moderna representa un desafío cada vez mayor en relación con las enfermedades neurodegenerativas. A medida que la esperanza de vida aumenta y más personas alcanzan edades avanzadas, la incidencia de estas enfermedades aumenta. Este incremento en la incidencia de enfermedades neurodegenerativas en una población envejecida plantea importantes desafíos socioeconómicos y de salud pública, dado que la falta de terapias efectivas hace que estas enfermedades requieran una atención a largo plazo

y cuidados intensivos, lo que puede ejercer una presión significativa sobre los sistemas de atención médica y los recursos familiares.⁸ Por este motivo, se requieren desesperadamente tratamientos más eficaces, pero estos sólo se conseguirán con un conocimiento profundo de las causas y mecanismos de cada enfermedad, lo que remarca la necesidad de continuar investigando sobre estas patologías en un marco de ciencia básica.

El estudio de las enfermedades neurodegenerativas existe desde antes de la medicina moderna, teniendo sus raíces en la antigüedad, con registros que datan de la época de Hipócrates y Galeno, quienes describieron síntomas similares a los observados en algunas de estas enfermedades en la actualidad⁹. Sin embargo, el avance significativo en la comprensión y el abordaje terapéutico de estas condiciones se ha producido en tiempos más recientes, especialmente desde el siglo XX. Durante gran parte del siglo pasado, la investigación se centró en la descripción clínica de los síntomas y en la identificación de las características neuropatológicas de estas enfermedades mediante técnicas de neuroimagen y estudios post mortem. Fue en la década de 1980 cuando se produjo un cambio de paradigma con el descubrimiento de la implicación de procesos neuroquímicos específicos en la fisiopatología de estas enfermedades. Por ejemplo, en el caso del Parkinson, se identificó la deficiencia de dopamina (DA) como un factor clave en la degeneración de las células nerviosas en la sustancia nigra (SN) del cerebro.¹⁰

Una forma de estudiar enfermedades es mediante el uso de modelos que recapitulen las características distintivas de la condición de interés. Para el estudio de enfermedades neurodegenerativas específicamente, se han utilizado una gran variedad de organismos como modelos experimentales, desde roedores a invertebrados⁶. Una de las herramientas más utilizadas en esta área es el uso de animales genéticamente modificados para inducir características específicas de una enfermedad neurodegenerativa. Algunos ejemplos de esto son los ratones transgénicos que expresan mutaciones asociadas con la acumulación de placas de beta-amiloide en el cerebro¹¹ o que sobreexpresan proteínas como alfa-sinucleína¹², para modelar la EA y EP respectivamente, o también invertebrados como la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* y el gusano nematodo *Caenorhabditis elegans*, que son útiles debido a su corto ciclo de vida y su practicidad para la manipulación genética^{13,14}. Los cultivos celulares son otra herramienta importante que permite estudiar las enfermedades neurodegenerativas en un entorno más controlado, donde, por ejemplo, se utilizan líneas celulares modificadas genéticamente o de forma más novedosa, células madre pluripotentes inducidas derivadas de células humanas diferenciadas que permiten generar modelos humanos¹⁵. Más recientemente, también se están desarrollando modelos de sistemas complejos que reflejan un contexto más fisiológico que las células aisladas, basados en el cultivo en tres dimensiones de células madre, para producir organoides que representan diversos tejidos humanos, incluido el cerebro^{16,17}.

Gracias a ese tipo de aproximaciones y con el avance de la biotecnología y las técnicas moleculares en las últimas décadas, se ha logrado un mayor entendimiento de los mecanismos subyacentes a estas enfermedades a nivel celular y molecular. Se han identificado diversos factores genéticos, ambientales y epigenéticos que contribuyen al desarrollo y progresión de estas patologías, lo que ha abierto nuevas vías para el desarrollo de terapias dirigidas y la identificación de biomarcadores para el diagnóstico temprano.¹⁸ En la actualidad, la investigación en enfermedades neurodegenerativas se encuentra en un punto crucial, donde convergen avances en neurociencia, genómica, biotecnología y medicina personalizada, donde el desarrollo de terapias que puedan frenar o revertir el curso progresivo de estas condiciones representa uno de los mayores desafíos y objetivos en este campo¹⁹⁻²¹.

Una de las características más intrigantes y desafiantes de las enfermedades neurodegenerativas es su heterogeneidad. A pesar de manifestarse de manera diferente y afectar diferentes regiones del cerebro, se cree que muchas de estas enfermedades comparten mecanismos de muerte neuronal en común. Específicamente, la acumulación anormal de proteínas mal plegadas, como las placas de beta-amiloide en la EA o los cuerpos de Lewy en la EP, es una característica común en varias enfermedades neurodegenerativas.²² Además, se ha observado que procesos como la neuroinflamación, la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo y la excitotoxicidad neuronal están implicados en la patogénesis de múltiples enfermedades neurodegenerativas. Estos procesos

pueden interactuar de manera compleja, desencadenando cascadas patológicas que culminan en la pérdida irreversible de células neuronales.²³⁻²⁵ La comprensión de estos mecanismos compartidos es crucial, ya que podría conducir al desarrollo de terapias que tengan un efecto beneficioso en varias patologías.

Sin embargo, la complejidad de estos mecanismos y la variabilidad entre pacientes plantean desafíos significativos para la investigación y el desarrollo de tratamientos efectivos. Por este motivo, a pesar de grandes avances gracias a décadas de estudio, la problemática de no conocer con exactitud los mecanismos exactos que conducen a la muerte neuronal en enfermedades neurodegenerativas aún persiste. Interesantemente, en respuesta a los esfuerzos cada vez mayores por parte de las investigaciones sobre la comprensión de estos mecanismos moleculares y celulares que subyacen a las enfermedades neurodegenerativas, en los últimos años se ha acumulado evidencia que sugiere que muchas enfermedades neurodegenerativas no son simplemente enfermedades de neuronas que mueren, sino que las células no neuronales del cerebro, como las células gliales, que son incluso más abundantes en el sistema nervioso central (SNC) que las neuronas, desempeñan un papel importante en la progresión de este tipo de enfermedad.²⁶ Esto ha generado un desplazamiento en el foco de las investigaciones desde las poblaciones neuronales degenerantes hacia el microambiente celular, posicionado a las células gliales, principalmente astrocitos y microglía, como blancos de estudio particularmente interesantes.²⁷ Esto abre las puertas a nuevas perspectivas y remarca la necesidad de continuar investigando esta temática desde una visión más integrativa para poder avanzar hacia terapias más precisas.

1.1.2. Enfermedad de Parkinson

1.1.2.1. Generalidades

La EP es la enfermedad neurodegenerativa más común luego de la enfermedad de Alzheimer, con una prevalencia estimada del 0,3% de la población general, siendo aproximadamente el 2% en mayores de 65 años²⁸, donde los hombres parecen verse más afectados que las mujeres (Fig. 1b). Debido al aumento de la esperanza de vida gracias a la medicina moderna, esta prevalencia ha ido en crecido en los últimos años y se espera que el número pacientes se duplique entre los años 2005 y 2030²⁹⁻³¹, pero a pesar de esto los tratamientos clínicos disponibles son sintomáticos y presentan efectos secundarios adversos³².

La etiología exacta de la enfermedad aun es desconocida ya que la mayoría de los casos son esporádicos.³³ Si bien se propone que la causa de la EP es multifactorial, se han descrito factores genéticos y ambientales como los más relevantes. Mientras que las formas exclusivamente genéticas de la enfermedad, representan menos del 10% de los casos, se han encontrado varios factores de riesgo que parecen estar involucrados con la aparición de esta patología. Entre ellos, vivir en zonas rurales, consumir agua de pozo, estar expuesto a pesticidas o haber sufrido traumatismos encefálicos, son algunos factores que han mostrado asociación con la EP, mientras que el consumo de cafeína, algunas drogas anti inflamatorias y fumar tabaco, parecen proteger contra ella.³⁴

Esta enfermedad, afecta principalmente a la vía nigro-estriatal y se caracteriza por la degeneración progresiva de las neuronas dopaminérgicas ubicadas en la SN, una estructura subcortical del cerebro que forma parte de los ganglios basales (GB). La degeneración axonal de estas neuronas a nivel del núcleo caudado y el putamen, que juntos forman el cuerpo estriado (CE), genera una disminución de la dopamina en esta zona, explicando la consiguiente alteración de la transmisión dopaminérgica que causa los síntomas motores de la enfermedad.³³ Otra de las características principales de esta patología es la presencia de inclusiones celulares en las neuronas dopaminérgicas que sobreviven, denominada cuerpos de Lewy, compuestos principalmente por la proteína alfa-sinucleína (α -sin).³⁵

En la mayoría de los pacientes la EP se manifiesta como anormalidades prominentes en los movimientos, incluyendo temblor en reposo, rigidez muscular, lentitud de movimiento

(bradiquinesia) y dificultad o fallo de iniciación de movimiento (aquinesia). Muchos de estos síntomas comienzan de forma unilateral, pero al tratarse de un desorden neurodegenerativo progresivo que afecta al sistema motor, con el tiempo progresa hacia el otro hemisferio. La presencia de esta constelación de síntomas motores es la principal herramienta de diagnóstico de la enfermedad, aunque el diagnóstico definitivo requiere confirmación patológica.³⁶

Si bien es difícil pasar por alto las características motoras de la enfermedad, el espectro clínico también contiene muchos componentes menos visibles, incluidas características no motoras, como disfunciones autonómicas, perturbaciones en el modo de andar y la postura, deterioro cognitivo, depresión y dolor, que contribuyen sustancialmente a la discapacidad de los individuos afectados.³⁷ Interesantemente, muchos de estos síntomas no motores preceden a los síntomas motores, provocando que las primeras etapas de la EP sean difíciles de reconocer, como lo refleja el largo retraso (un promedio de 10 años) que típicamente separa la aparición del primer síntoma perceptible del diagnóstico final.³⁸ Los primeros síntomas incluyen estreñimiento como el síntoma más común, actuar los sueños durante la fase del sueño de movimientos oculares rápidos (REM), hiposmia, dolor vago y asimétrico en el hombro y depresión en alrededor del 50% de los pacientes.³⁹

1.1.2.2. Sistemas dopaminérgicos y EP

Los sistemas dopaminérgicos son un conjunto de circuitos neuronales que utilizan DA como neurotransmisor principal. La DA es un neurotransmisor monoaminérgico y una catecolamina, debido a su estructura química y al hecho de que contiene un núcleo catecol. Su biosíntesis consiste en la conversión de tirosina a L-DOPA por la enzima tirosina hidroxilasa (TH), seguida de la del pasaje de L-DOPA a dopamina por la enzima DOPA-descarboxilasa. Hay diversas áreas del cerebro donde se concentran las neuronas dopaminérgicas productoras de DA. Las más importantes son la SN y el área tegmental ventral (VTA) en el mesencéfalo. Otras áreas incluyen el hipotálamo, el bulbo olfatorio y la retina.⁴⁰

La DA tiene su efecto actuando sobre receptores pertenecientes a la superfamilia de receptores acoplados a proteína G y hay al menos 5 tipos de receptores de DA que se dividen en 2 subtipos principales: los receptores tipo D1 (que incluye a los de tipo D1 y D5) y los receptores tipo D2 (que incluye a los de tipo D2, D3 y D4). Al igual que cualquier otro neurotransmisor modulador, la función de la DA es compleja ya que es capaz de actuar de varias formas en relación al tipo de receptor que active, el tipo celular involucrado y la región del sistema nervioso de la que se trate.⁴⁰

Existen varias grandes vías dopaminérgicas que llevan DA desde las regiones de concentración mencionadas en el párrafo anterior, hacia otras partes del cerebro: la vía nigroestriatal, la vía mesolímbica y la vía mesocortical (Fig. 2). La vía nigroestriatal, consta de neuronas dopaminérgicas que residen en la SN, cuyos axones se proyectan hacia el CE, y está involucrada en la función motora y el aprendizaje asociativo, entre otros. La vía mesolímbica, que consta de neuronas dopaminérgicas que se proyectan desde el VTA hasta el CE, principalmente al núcleo accumbens, es esencial en el procesamiento de recompensas y la aversión. Finalmente, la vía mesocortical, cuyas neuronas dopaminérgicas también se originan en el VTA, pero se proyectan principalmente a la corteza prefrontal, está implicada en el funcionamiento ejecutivo y cognitivo.⁴¹

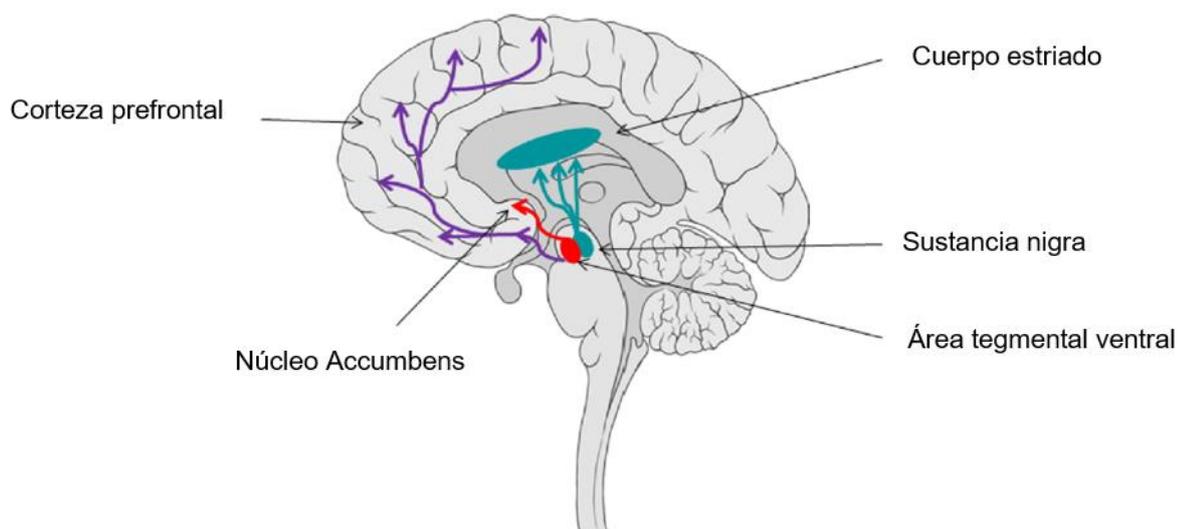


Figura 2: Sistemas dopaminérgicos. Representación esquemática de las principales vías dopaminérgicas del cerebro: la vía nigroestriatal (verde), la vía mesolímbica (rojo) y la vía mesocortical (violeta). [Adaptado de Reneman et al., 2021]⁴¹.

Como sucede con cualquier otro sistema, el sistema dopaminérgico puede verse afectado por una enorme diversidad de factores, alterando la cantidad de dopamina presente en el sistema nervioso y con múltiples consecuencias funcionales. Como se mencionó anteriormente, una de las principales patologías asociada al sistema dopaminérgico es la EP. Si bien esta es una afección que involucra a varios sistemas, los síntomas clínicos que conducen a los pacientes de esta enfermedad a la consulta médica, son generalmente problemas motores causados por una degeneración de la vía nigroestriatal en un patrón espacio-temporal característico de la EP.

Para comprender mejor las consecuencias de la degeneración de la vía nigroestriatal es necesario describir en mayor detalle las regiones involucradas: la SN y el CE. La SN se compone de dos partes: la *pars compacta* (SNc), de ubicación posterior y apariencia oscura, en la que se encuentran neuronas juntas con melanina en gran cantidad; y la *pars reticulada* (SNr) de ubicación anterior y apariencia más clara, que ocupa mayor espacio, pero con muchas menos neuronas. Por otro lado, el CE es una estructura en forma de C en el cerebro, que en primates está compuesta por dos regiones principales, el núcleo caudado y el putamen. Tanto la SN como el CE forman parte del sistema de GB, integrados además por otros núcleos subcorticales como los segmentos externo e interno del Globo Pálido (GPe, GPi, respectivamente) y el núcleo subtalámico (STN).⁴² Según modelos simplificados que describen las conexiones entre estos núcleos, se define que la salida de los GB está determinada por el equilibrio entre la vía directa y la vía indirecta, que se originan a partir de distintas poblaciones de neuronas espinosas medias (MSN) del CE y se proyectan a diferentes estructuras de salida (Fig. 3)⁴³. Se cree que estos circuitos tienen efectos opuestos sobre el movimiento. Específicamente, se postula que la actividad de las MSN de la vía directa promueve el movimiento, mientras que se supone que la activación de las MSN de la vía indirecta lo inhibe, aunque investigaciones anatómicas posteriores revelaron que la organización real es bastante más compleja⁴⁴.

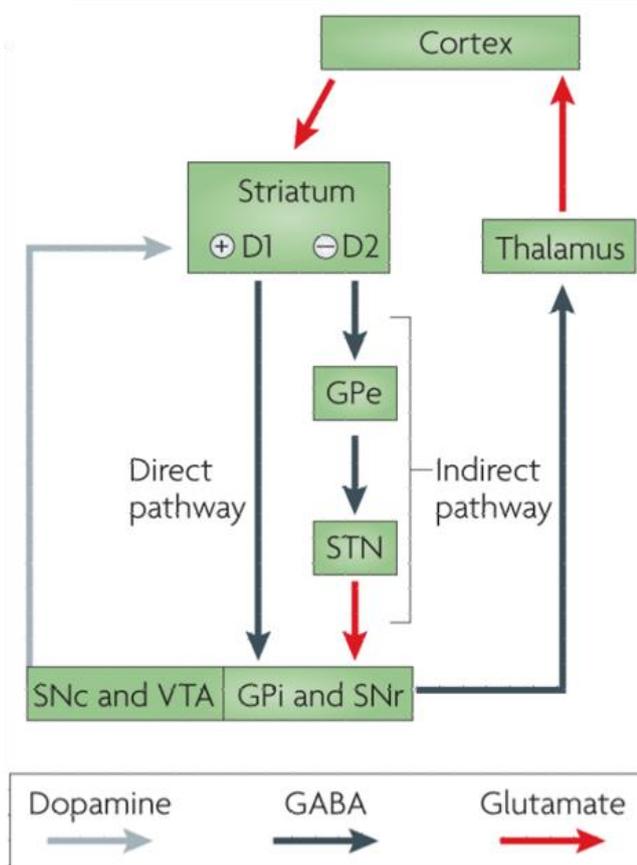


Figura 3: Organización circuital simplificada de los ganglios basales. Esquema representativo de un modelo de funcionamiento de los GB, donde se observan las interconexiones entre los diferentes núcleos junto con los neurotransmisores involucrados. Cortex: Corteza, Striatum: CE, Thalamus: Tálamo, GPe: Globo Pálido externo, GPi: Globo Pálido interno, STN: Núcleo Sub Tálamico, SNc: Sustancia Nigra pars compacta, SNr: Sustancia Nigra pars reticulada, VTA: Área Tegmental Ventral. [Extraído de Redgrave et al., 2010]⁴⁴.

La EP está relacionada con un desbalance entre las vías directa e indirecta a nivel estriatal como consecuencia de la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la SN. Específicamente se postula que la pérdida de dopamina provoca hipoactividad de la vía directa e hiperactividad de la vía indirecta. En consecuencia, la actividad excesiva de la vía indirecta suprime la activación de GPe, aumenta la actividad de STN e impulsa un aumento en la inhibición talámica mediada por GPi. Al mismo tiempo, la disminución de la activación de la vía directa desinhibe las neuronas GPi, lo que favorece la supresión del tálamo y la corteza. En suma, esto conduce a una supresión del movimiento y provoca las anomalías del comportamiento motor observadas clínicamente.⁴⁵

1.1.2.3. Patogénesis de la enfermedad

En condiciones fisiológicas normales, la muerte neuronal es altamente restringida en el cerebro adulto, incluso en individuos añosos⁴⁶. Si bien durante el desarrollo del SNC, la neurogénesis es usualmente acompañada por pérdidas neuronales masivas como parte necesaria de la construcción de un centro de comandos funcionalmente adecuado⁴⁷, la neurodegeneración extensiva raramente ocurre en el SNC maduro⁴⁶. Sin embargo, en enfermedades neurodegenerativas como la EP, se produce un aumento significativo de la pérdida neuronal en comparación con los controles de la misma edad, que se correlaciona con la progresión de la enfermedad⁴⁸⁻⁵⁵.

Los mecanismos moleculares subyacentes a la muerte neuronal en enfermedades neurodegenerativas aún no son bien comprendidos. Para abordar esta temática en el marco de la EP, es importante mencionar que las neuronas de la SN, están dentro de las células más vulnerables del cerebro debido a una deficiencia relativa en factores neuroprotectores, como el antioxidante glutatión, y porque están expuestas a un alto nivel de estrés oxidativo causado por la presencia del metabolismo dopaminérgico y el gran gasto energético para mantener un extenso árbol axonal, entre otros factores^{56,57}. De forma interesante, a pesar de esta vulnerabilidad al daño, los síntomas clínicos de la EP, aparecen recién cuando aproximadamente el 50% de las neuronas dopaminérgicas de la SN y el 80% de la dopamina estriatal han sido perdidas. Esto se explica por el hecho de que el sistema nervioso responde de forma adaptativa a eventos ambientales internos y externos que

podrían llegar a afectar su funcionamiento, con cambios moleculares, celulares, sistémicos y comportamentales. Es así, que se ha vuelto evidente que muchos de esos mismos mecanismos son utilizados en respuesta a enfermedades, incluyendo a las enfermedades neurodegenerativas como la EP.⁵⁸

A pesar de estos esfuerzos, dada la naturaleza progresiva de la enfermedad, se alcanza un umbral en el que estos mecanismos compensatorios ya no son suficientes para mitigar el efecto de la neurodegeneración, remarcando la necesidad de comprender con mayor exactitud los procesos moleculares que conducen a la muerte neuronal y así poder identificar tratamientos que al menos detengan su progresión.

Como generalidad, la muerte neuronal ocurre luego de que la célula activa programas bien orquestados para terminar su existencia, un proceso que puede desencadenarse debido a señales internas o externas, a lo largo de toda la vida de la célula. Este proceso, es la solución final para una neurona, que ocurre únicamente cuando se apilan múltiples estresores a un nivel superior a la capacidad de recuperación de la célula, una circunstancia que se observa comúnmente en las enfermedades neurodegenerativas y otros incidentes traumáticos como la isquemia.⁵⁹

A lo largo de la vida de una neurona, existen factores que actúan como estresores dentro de la célula y en el caso de las enfermedades neurodegenerativas, sus características fisiopatológicas a menudo incluyen la acumulación de proteínas mal plegadas y la formación de agregados de alto orden⁶⁰⁻⁶². Esto tiene como consecuencia una serie de eventos citotóxicos comunes, que incluyen estrés oxidativo (EO) por un aumento del número de especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS), excitotoxicidad (mecanismo de daño celular inducido por la sobreactivación de los receptores de glutamato), disfunciones sinápticas, alteraciones en los sistemas de degradación de proteínas dañados, estrés de retículo endoplásmico (RE), daño en el ácido desoxirribonucleico (ADN), disfunción mitocondrial, neuroinflamación y reentrada al ciclo celular⁶³. Todos estos son importantes desafíos neuronales y su mal manejo eventualmente conduce a la muerte neuronal, donde la apoptosis y la necrosis son las vías de muerte principales^{64,65}.

En particular para la EP, los mecanismos patogénicos (Fig. 4) no son la excepción a lo discutido en el párrafo anterior y se propone que estos no son mutuamente exclusivos, sino que interactúan y se combinan para culminar en procesos neurodegenerativos⁶⁶. A continuación, discutiremos los principales mecanismos en mayor profundidad en un contexto de EP.

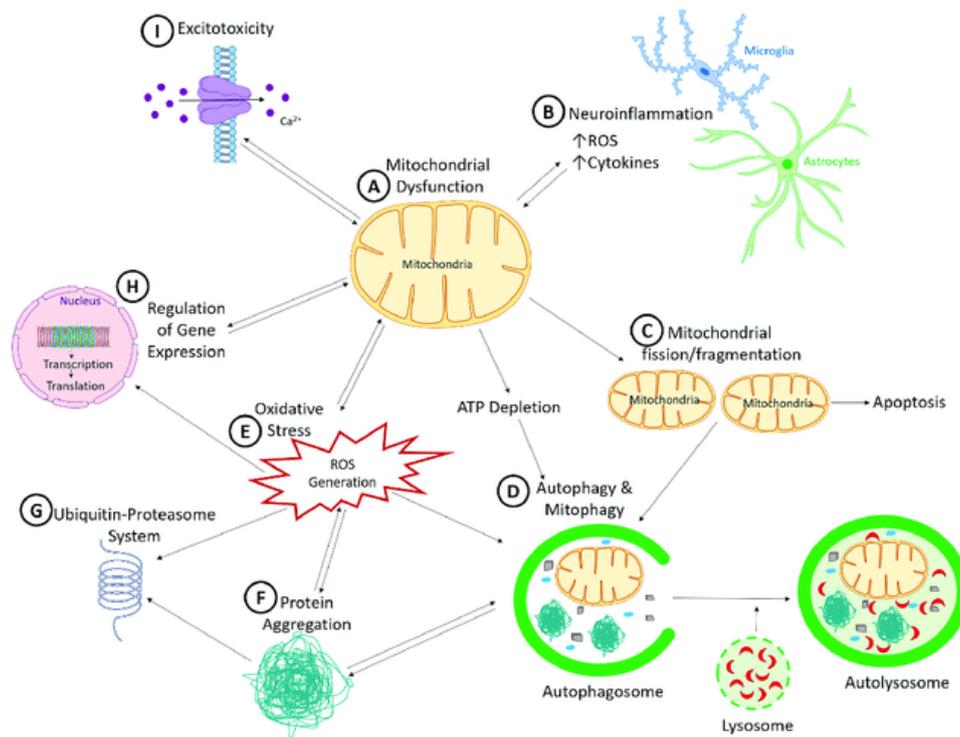


Figura 4: Mecanismos patogénicos que contribuyen a la muerte de neuronas dopaminérgicas en la enfermedad de Parkinson. Todos estos mecanismos se cruzan y culminan en procesos neurodegenerativos en la EP. **(A)** La disfunción mitocondrial, da como resultado una cascada de disfunción celular interconectada. **(B)** Neuroinflamación, facilitada por la microglía y astrocitos, que liberan factores neurotóxicos. **(C)** Aumento de la fisión y fragmentación mitocondrial, que puede iniciar la muerte celular apoptótica al inducir la liberación de citocromo C. **(D)** Debido a que la autofagia y el sistema ubiquitina-proteosoma (UPS) son procesos dependientes de ATP, la reducción de ATP reduciría la eliminación autofágica de proteínas y organelos dañados. Este proceso también es sensible a las especies reactivas de oxígeno (ROS). **(E)** Generación de ROS, que tiene la capacidad de promover la formación de oligómeros tóxicos y agregados de proteínas **(F)**, que alteran la función del UPS **(G)** e inducen daño al ADN (tanto nuclear como mitocondrial). **(H)** El daño al ADN produce alteración de la función nuclear, inestabilidades genómicas y disfunción mitocondrial. **(I)** El Ca^{2+} celular desregulado está influenciado por la disfunción mitocondrial, porque las mitocondrias ayudan a regular los niveles de Ca^{2+} intracelular. Cuando se dañan, las mitocondrias liberan más Ca^{2+} al citosol, aumentando así la excitotoxicidad celular. La sobreactivación de los receptores excitadores también produce excitotoxicidad debido al influjo de Ca^{2+} que luego produce defectos posteriores como la despolarización mitocondrial inducida por Ca^{2+} . [Extraído de Helley et al., 2017]⁶⁶.

Varias líneas de investigación sustentan las implicancias de la disfunción mitocondrial como un factor importante en la muerte de neuronas dopaminérgicas, llegando a proponerla como el objeto patogénico común más importante para esta enfermedad por su relación con varias de las principales mutaciones genéticas y tóxicos ambientales asociadas a la EP⁶⁶. Este fenómeno se refiere a un deterioro en el funcionamiento normal de las mitocondrias, las estructuras celulares responsables de producir la mayor parte de la energía (ATP) necesaria para el funcionamiento de las células⁶⁷. Se ha observado que mitocondrias provenientes de individuos con EP son más susceptibles al daño inducido por la neurotoxina metil-fenilpiridinio (MPP+), lo que sugiere una disfunción mitocondrial inherente⁶⁸. Además, las neuronas dopaminérgicas son más sensibles que otras células a la inhibición del complejo I de la cadena de transporte de electrones por sustancias como la rotenona, que además de conducir a la neurodegeneración en la SN, reproduce la formación de cuerpos de Lewy^{69,70}. Se cree que la disfunción mitocondrial participa directamente en la muerte celular a través de la activación de caspasas y la liberación de proteínas proapoptóticas, lo que finalmente resulta en fragmentación del ADN, alteraciones en el citoesqueleto celular y muerte celular. Además, la

inhibición del complejo I puede resultar en la acumulación de ROS y otros oxidantes poderosos, que causan daño a los contenidos celulares y perpetúan el ciclo de daño.⁷¹

Por otro lado, la deposición anormal de proteínas en el tejido nervioso se considera una de los principales factores patogénicos de la EP. Como ya se mencionó, la α -sin se acumula en los cuerpos de Lewy y mutaciones en el gen que la codifica se asocian como formas genéticas de la enfermedad. Se especula que esta acumulación está relacionada con un fallo o mal funcionamiento del sistema de ubiquitina-proteosoma (UPS), la principal vía de degradación de la mayoría de las proteínas intracelulares. El UPS involucra la conjugación de ubiquitina a sustratos diana, seguido de la degradación de las proteínas etiquetadas por el proteosoma 26S. Los cuerpos de Lewy generados en la EP son el resultado de una inhibición del proteosoma que conduce a la acumulación de proteínas ubiquitinadas intracelulares y causa la muerte. Es posible que esto esté reflejando intentos fallidos por el UPS de remover proteínas dañadas/anormales que han sido etiquetadas para su destrucción, pero debido a un mal funcionamiento o sobrecarga del UPS, o por cambios específicos asociados a la patología en los sustratos proteicos, se detiene la degradación. A su vez, este sistema está ligado a la respuesta de estrés de retículo ya que el RE, como sitio de síntesis y plegado de proteínas, es el encargado de enviarle al UPS las proteínas para su degradación. El estrés de RE resulta en la acumulación y agregación de proteínas mal plegadas y como consecuencia, la célula reacciona mediante la implementación de la respuesta a proteínas desplegadas (UPR), que consiste en la detención de la síntesis de proteínas, la inducción de proteínas chaperonas que ayudan al plegamiento de las proteínas que ya están en el sistema y la degradación de las proteínas que no pueden ser plegadas por el RE. Aunque la activación de la UPR es ante todo una respuesta neuroprotectora, una activación prolongada de esta respuesta como la que se ha observado en la EP y otros desordenes neurodegenerativos, puede desencadenar la muerte celular.⁷²

Si bien se desconoce el mecanismo molecular por el que la α -sin puede llegar a inducir muerte celular, se ha asociado su expresión en neuronas dopaminérgicas con disfunción mitocondrial y EO. Por un lado, la α -sin es requerida para el control de la homeostasis mitocondrial y puede resultar en la fragmentación de la membrana mitocondrial, lo que conduce a una disminución en la comunicación entre la mitocondria y el RE, afectando múltiples funciones e incitando la muerte celular.³⁵ Por el otro, los agregados de α -sin son capaces de romper la membrana de los lisosomas al entrar a la célula por endocitosis, aumentando los niveles de ROS y produciendo EO³⁵, que es el resultado de un desbalance entre la producción de radicales libres y defensas celulares antioxidantes, donde las altas cantidades de ROS atacan proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, alteran vías de señalización y metabólicas, inducen disfunción mitocondrial, destruyen membranas y organelos subcelulares y finalmente conducen a la apoptosis celular⁷³. En paralelo, el metabolismo de la DA presente en las neuronas de la SN, está fuertemente relacionado con el EO, ya que la degradación de DA genera ROS y su oxidación puede conducir a la producción de neurotoxinas endógenas, volviendo a las neuronas dopaminérgicas particularmente vulnerables a desequilibrios en la homeostasis redox⁷⁴.

Finalmente, uno de los mecanismos asociados a la muerte neuronal más estudiado de los últimos años es el de la neuroinflamación. Este es un proceso inflamatorio que ocurre en el SNC que se caracteriza por la activación de células del sistema inmunológico, como microglía y astrocitos, en respuesta a lesiones, infecciones, enfermedades neurodegenerativas u otros factores desencadenantes. Aunque la neuroinflamación puede ser una respuesta inicialmente protectora, si se vuelve crónica o excesiva como ocurre en enfermedades neurodegenerativas, puede contribuir a daño neuronal y exacerbar el problema.⁷⁵ Particularmente en el caso de la EP, este deterioro de la respuesta inflamatoria fue evidenciado en exámenes post mortem de cerebros de pacientes con la enfermedad, que revelaron altos niveles de neuroinflamación, con una fuerte presencia de astrogliosis y de microglía activada⁷⁶. Se postula que la liberación de potentes mediadores inflamatorios y otros mecanismos celulares alterados, pueden ser importantes mediadores de la muerte de las células dopaminérgicas⁷⁶, pero este punto será discutido en detalle en un capítulo posterior, dedicado específicamente al rol de la glía inflamatoria en la EP.

1.1.2.4. Tratamientos

Si bien las opciones de tratamiento para la EP se han vuelto mucho más sofisticadas con el pasar de los años, los medicamentos más utilizados actualmente a nivel mundial, se enfocan en tratar los síntomas y no en detener o enlentecer la neurodegeneración dopaminérgica. Hasta la fecha, el medicamento más eficaz para el tratamiento de esta patología, es la L-DOPA, precursor metabólico de la dopamina. Esta droga es utilizada para reaprovisionar al CE de dopamina, lo que en un principio alivia la mayoría de los síntomas. Sin embargo, rápidamente se descubrió que, con los años, el tratamiento provoca movimientos involuntarios en los pacientes, que son difíciles de controlar y comprometen la calidad de vida de quienes los padecen.⁷⁷

Por este motivo, las investigaciones actuales están enfocadas en la prevención de la degeneración de neuronas dopaminérgicas. Sin embargo, el primer obstáculo para el desarrollo de drogas neuroprotectoras es la falta de conocimiento sobre la etiología exacta de la EP. Considerando algunas de las disfunciones celulares que anteriormente se discutieron como importantes para la patogénesis de la EP, se han probado una variedad de tratamientos neuroprotectores enfocados en ellas, como la administración de factores tróficos como el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF), tratamiento con coenzima Q10 para aumentar la función mitocondrial, reductores de excitotoxicidad, drogas para reducir la agregación de α -sin, pero la mayoría han mostrado modestos resultados por variadas razones.⁴²

Otras opciones de tratamiento incluyen nuevos agonistas de dopamina, terapia génica enfocada en generar neuroprotección o en la proveer de dopamina al CE e implantación de neuronas dopaminérgicas derivadas de células madre en el CE, aunque hasta el momento, nada de esto ha sido completamente efectivo⁴², lo que nuevamente remarca la necesidad de innovación a la hora de estudiar enfermedades neurodegenerativas.

Para los pacientes en los que los tratamientos farmacológicos ya no son adecuados, las aproximaciones quirúrgicas son una opción altamente beneficiosa. Existen dos tipos de aproximaciones quirúrgicas principales: lesiones localizadas (ablaciones) de áreas específicas del cerebro (tálamo y GPi) y la estimulación cerebral profunda (DBS). En este marco, la terapia de DBS es el tratamiento quirúrgico más utilizado y ha mostrado ser capaz de reducir algunos de los síntomas asociados a la EP. Esta consiste en una estimulación de alta frecuencia mediante electrodos tanto a nivel del STN como del GPi y tiene la ventaja de ser un procedimiento ajustable y reversible, a diferencia de las ablaciones.^{42,78}

1.1.2.5. Acercamientos experimentales para su estudio

Para lograr avanzar en el estudio de los mecanismos patogénicos de la EP y evaluar la eficacia de posibles terapias, es necesario el uso de modelos preclínicos para perturbar las funciones del sistema dopaminérgico en el cerebro. Los modelos más utilizados para el estudio de esta patología son predominantemente los inducidos por toxinas selectivas para las neuronas dopaminérgicas, aunque más recientemente, se han hecho avances importantes utilizando modelos genéticos.⁷⁹

Los modelos basados en toxinas han sido un medio importante para investigar la biología subyacente de la EP. En particular, en roedores, inyecciones de 6-hidrodopamina (6-OHDA) en la vía nigroestriatal, o tratamiento con inhibidores del complejo I mitocondrial como la rotenona o el N-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), son los modelos animales con toxinas más utilizados para causar daño en las neuronas dopaminérgicas.⁷⁹

La inyección local de 6-OHDA en la SN de ratas y ratones provoca una degeneración aguda de las neuronas dopaminérgicas. La molécula de 6-OHDA es un análogo hidroxilado de la DA que comparte algunas similitudes estructurales con la DA y noradrenalina, lo que permite que sea reconocida por las neuronas dopaminérgicas como DA y absorbida por la célula. Con su entrada en el citoplasma,

la 6-OHDA expresa su toxicidad y destruye selectivamente las células monoaminérgicas, por una combinación de efectos de ROS y quinonas tóxicas (producto de su propia degradación).⁸⁰ Ratas con lesiones unilaterales de 6-OHDA en la SN presentan un síndrome motor característico que incluye un comportamiento de rotación ipsilateral al lado de la lesión, ya sea espontáneamente o en respuesta a agentes liberadores de DA como la amfetamina.⁸¹

Por otro lado, el síndrome parkinsoniano causado por la toxina MPTP fue descubierto accidentalmente en humanos.^{82,83} El parkinsonismo inducido por MPTP se presenta con los signos clínicos típicos de temblor, rigidez y bradicinesia, al igual que la enfermedad de Parkinson idiopática. La molécula MPTP parece ser selectivamente neurotóxica para humanos y otros primates. Se ha demostrado que, una vez dentro de la célula, el MPTP se oxida a MPP+ y esa es la forma tóxica para las neuronas dopaminérgicas, que inhibe el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, causando un aumento de radicales libres y una disminución en la producción de ATP, conduciendo a la muerte neuronal.^{33,84}

Aunque es importante mencionar que, si bien estos modelos replican características cardinales de la EP como la degeneración de la vía nigroestriatal y sus consecuentes alteraciones motoras, no emulan exactamente los mismos comportamientos motores anormales observados en humanos con EP, ni logran reproducir los cambios cognitivos más sutiles. Además, muchos de los modelos tóxicos no están asociados con la formación de cuerpos de Lewy a pesar de que estos son un sello distintivo de la enfermedad. Por este motivo, es importante tener en cuenta esas diferencias a la hora de explotar la capacidad de estos modelos para ayudar a describir la patogénesis de la enfermedad real y predecir terapias efectivas.

Por otra parte, los modelos genéticos son innovaciones más recientes que se basan en la sobreexpresión de proteínas y la mutación de genes que han sido identificados como responsables de la EP familiar. En particular, se han desarrollado varios modelos de animales transgénicos que intentan reproducir las características de la enfermedad a través de la sobreexpresión de α -sin y la mutación de genes como PARKIN, PINK1 y DJ-1. Si bien logran capturar una amplia gama de manifestaciones patológicas de la EP, incluida la formación de cuerpos de Lewy, también tienen limitaciones asociadas, entre ellas el alto costo de su implementación.⁸⁵⁻⁸⁷

1.1.3. Rol de las células gliales en la homeostasis del SNC

La glía, también conocida como neuroglia, es un componente fundamental del sistema nervioso junto con las neuronas. En todas las partes del sistema nervioso, las células gliales superan en número a las neuronas y constituyen una gran parte del tejido nervioso, por ejemplo, ocupando aproximadamente la mitad del volumen del cerebro. Estas células llevan a cabo muchas funciones indispensables, tanto en el desarrollo como durante el funcionamiento normal del sistema maduro⁸⁸ y también son actores importantes en la reacción del sistema nervioso ante enfermedades y traumas.

El término "glía" engloba una categoría amplia de células que se compone de varios subtipos dentro del SNC. Se divide en macroglía y microglía, en relación a su tamaño y su origen embrionario, donde la macroglía es la más grande con un origen ectodérmico y la microglía es de menor tamaño con un origen mesodérmico. La macroglía es mayoritaria, representando el 85-90% de la glía total, mientras que la microglía representa el 10-15% restante. A su vez, dentro de la macroglía, los astrocitos son las células mayoritarias. En un cerebro adulto en condiciones basales encontramos que los astrocitos representan el 80% de la población glial total, oligodendrocitos 5% y microglía 10-15%.^{89,90}

Si bien las células gliales no producen impulsos eléctricos y se las consideraba células de soporte para las neuronas, se ha revelado que las células gliales son superiores a las neuronas en diversidad y función celular, siendo claves en regular la actividad neuronal. La microglía y los astrocitos cumplen diversas funciones, incluidas las respuestas inmunes innatas en el cerebro.⁸⁹ Tradicionalmente, ambos pueden clasificarse en dos fenotipos opuestos: neurotóxico y neuroprotector. Diversos

autores dividen a la microglía en los fenotipos M1 (activación clásica, neuroprotectora) y M2 (activación alternativa, neurotóxica) según su estado de activación. Al igual que la microglía, los astrocitos pueden producir mediadores inmunorreguladores o proinflamatorios, según el fenotipo que adopten (A1 o A2, respectivamente). Sin embargo, los cambios en los fenotipos de la microglía y los astrocitos, su pérdida de funciones neuroprotectoras y su ganancia de funciones neurotóxicas son más complicados que esto y pueden diferir según el estadio de las enfermedades neurodegenerativas, la gravedad y la región involucrada. Por lo tanto, la clasificación dicotomizada simple no puede reflejar los diversos fenotipos de microglía y astrocitos y deben considerarse más como parte de un espectro, en lugar de dos poblaciones discretas.⁹¹

Las microglías están presentes en todas las regiones del SNC y si bien históricamente se han descrito como los fagocitos del SNC, los avances en las técnicas de investigación en las últimas décadas han demostrado que cumplen una gran variedad de funciones (Fig. 5). Están fuertemente involucradas en la regulación de la homeostasis, encargándose del mantenimiento fisiológico, que incluye la migración a los sitios lesionados, la remodelación de las sinapsis y el mantenimiento de la homeostasis de la mielina⁹². Por otra parte, son las principales células inmunes innatas y las primeras en responder a las agresiones patológicas, protegiendo al SNC mediante la exploración constante de su entorno en busca de posibles daños al tener la capacidad de detectar estímulos nocivos, incluidos los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) y los patrones moleculares asociados a daños (DAMP)⁹³. En respuesta a tales estímulos, la microglía produce citocinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina 16 (IL-16), interleucina 18 (IL-18) y quimiocinas, para reclutar células adicionales y eliminar agentes patológicos⁹². Sin embargo, aunque la neuroinflamación es un mecanismo neuroprotector, la neuroinflamación sostenida puede inducir neurotoxicidad y está relacionada con la neurodegeneración⁹⁴. A lo largo de la vida, la microglía tiene la capacidad de autorrenovarse mediante proliferación, mientras que durante condiciones patológicas este proceso cambia hacia la expansión clonal dependiendo de la necesidad local de microglía⁹⁵. Esta proliferación de microglía está asociada con procesos de apoptosis que elimina el exceso de microglía para mantener el número de células bajo control⁹⁶. Esta capacidad de autorrenovación indica que la microglía está sujeta a cambios constantes independientemente de la enfermedad o las actividades homeostáticas. Después de una lesión, la microglía sufre cambios morfológicos y transcripcionales para adaptar su comportamiento en respuesta al tipo de lesión.⁹⁷

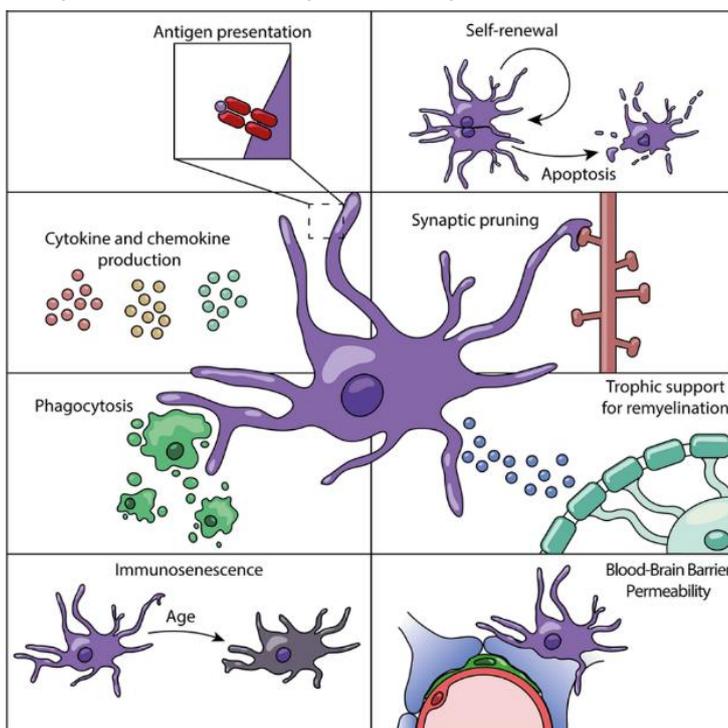


Figura 5: Funciones microgliales en el SNC. La microglía tiene muchas funciones inmunológicas en el sistema nervioso central al presentar antígenos, secretar citocinas y quimiocinas y fagocitar restos de mielina o células muertas. La microglía también se renueva automáticamente mediante proliferación y apoptosis coordinadas. Durante el desarrollo, la microglía es importante para el desarrollo neuronal mediante la poda sináptica. También proporciona apoyo trófico para mantener la integridad de la mielina y la remielinización. Durante el envejecimiento la microglía adopta un perfil más proinflamatorio. La microglía también desempeña un papel en el mantenimiento e influencia de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica. [Extraído de Amor et al., 2022]⁹⁷

Por otra parte, los astrocitos son las células gliales más comunes en el SNC. Son arreglos globoides tridimensionales heterogéneos tanto morfológicamente como en expresión de marcadores, expresión génica y proteínas, que desempeñan funciones activas y esenciales en la homeostasis del SNC (Fig. 6). La mayoría de los astrocitos tienen polaridad funcional, ya que es usual encontrarlos en la cercanía de las neuronas y al mismo tiempo con sus prolongaciones contactando los vasos sanguíneos. En los capilares del sistema nervioso los pies de los astrocitos se encuentran cubriendo más del 95%.⁹⁸ Por este motivo, cuando se habla de la estructura y funcionamiento del sistema nervioso, no se puede dejar de considerar el rol de los astrocitos. A través de la comunicación bidireccional con otros tipos de células, incluidas neuronas, pericitos, células endoteliales y otras células no neuronales, los astrocitos afectan casi todos los aspectos del funcionamiento saludable del SNC. Regulan los procesos de mielinización y el crecimiento de neuritas a través de la secreción de factores y componentes de la matriz extracelular⁹⁹⁻¹⁰¹ e interactúan con la microglía durante el desarrollo participando en los procesos de sinaptogénesis y poda de sinapsis¹⁰⁰. Además, contribuyen a la inducción y mantenimiento de la barrera hematoencefálica (BHE)¹⁰² y a la regulación del flujo sanguíneo¹⁰³. Los astrocitos también participan en la producción y el reciclaje de varios neurotransmisores, incluido el glutamato, a través de los transportadores GLAST y GLT-1¹⁰⁴. Además, liberan gliotransmisores para enviar señales a las neuronas¹⁰⁵, influyendo en la neurotransmisión y la plasticidad¹⁰⁴. Desempeñan funciones importantes en la homeostasis ion-agua, incluida la amortiguación espacial de potasio, que es de particular importancia para un funcionamiento saludable de la sustancia blanca¹⁰⁶⁻¹⁰⁸. Los astrocitos también sirven como proveedores de energía mediante la captación de glucosa del torrente sanguíneo y el almacenamiento de glucógeno, una función exclusiva de los astrocitos en el SNC¹⁰⁴. El glucógeno derivado de los astrocitos se libera en forma de lactato y se entrega a los axones neuronales para satisfacer sus altas demandas metabólicas^{104,109} y a los oligodendrocitos para usarlos como sustrato para la producción de mielina¹¹⁰. También proporcionan muchos factores tróficos y de crecimiento, incluido el hierro, para apoyar a las células circundantes^{106,111}. Todas estas funciones complejas ilustran su importancia para el funcionamiento saludable del SNC.

Los astrocitos forman un gran entramado que actúa como un sincitio funcional, debido a la existencia de un acoplamiento entre las células a través de uniones intercelulares como las que se describen en la sinapsis eléctrica, donde a su vez cada astrocito tiene su propio dominio delimitado.⁹⁸ Esto ocurre en condiciones normales, pero cuando comienzan a ocurrir fallos en el SNC, ese sincitio funcional empieza a desacoplarse, perdiéndose esa delimitación y desencadenando una serie de problemas, donde los astrocitos en vez de comunicarse con sus pares, comienzan a comunicarse con el medio y a enviar señales que generalmente pueden tener efectos negativos, pudiendo convertirse en una condición patológica. Al igual que la microglía, tienen subpoblaciones proinflamatorias e inmunorreguladoras (neuroprotectoras), donde los astrocitos reactivos proinflamatorios regulan positivamente varios genes e inducen factores proinflamatorios como IL-1 β , TNF- α y óxido nítrico, que se sabe que tienen funciones dañinas, y los astrocitos reactivos neuroprotectores regulan positivamente muchos factores neurotróficos y trombospondinas.¹¹²

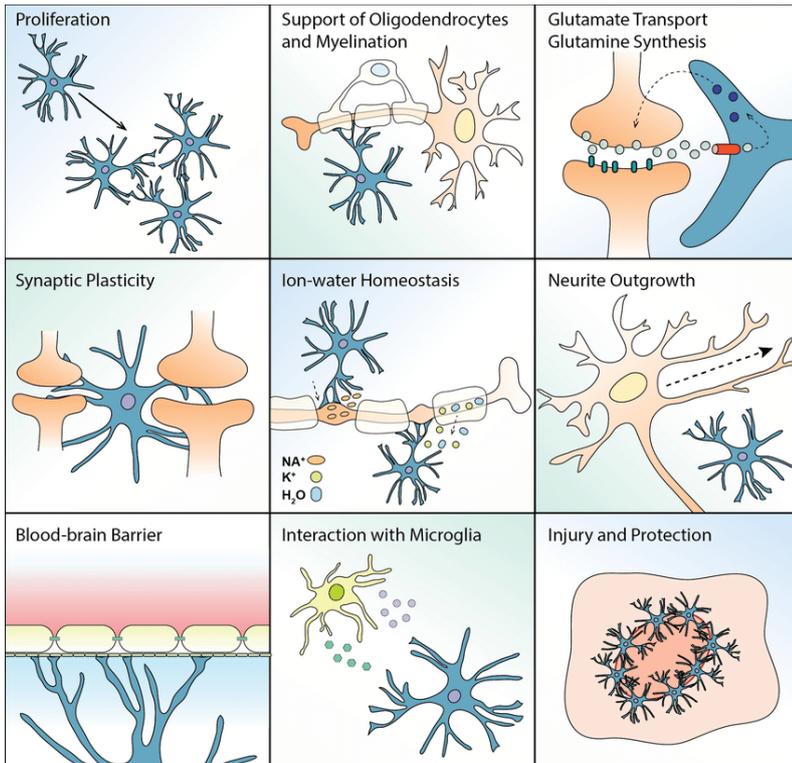


Figura 6: Funciones astrocíticas en el SNC. Los astrocitos desempeñan funciones esenciales en el SNC, tratándose de células con capacidad de proliferación, que brindan soporte a oligodendrocitos y los procesos de mielinización de los axones, participan en el transporte de glutamato y síntesis de glutamina, regulan la neurotransmisión y plasticidad sináptica, controlan la homeostasis de iones y agua, regulan el crecimiento de neuritas, mantienen la barrera hematoencefálica, interactúan con la microglía para inducir respuestas inmunes innatas y respuestas a lesiones y protección del tejido sano, incluida la formación de la cicatriz glial que rodea el área dañada. [Extraído de Bugiani et al., 2022].¹⁰¹

Por último, el oligodendrocito es un tipo de célula glial que tiene la función principal de producir mantener la mielina, una sustancia que recubre y aísla las fibras nerviosas (axones) para facilitar la transmisión eficiente de los impulsos eléctricos entre las neuronas, en un proceso denominado mielinización (Fig. 7). La mielina actúa como un aislante eléctrico que acelera la velocidad de conducción de los impulsos nerviosos, por lo que los oligodendrocitos son esenciales para el funcionamiento adecuado del sistema nervioso y la comunicación neuronal. En el contexto de enfermedades neurológicas y trastornos del SNC, también pueden contribuir a la neurodegeneración cuando se dañan o se ven afectados de manera adversa. Su disfunción puede dar lugar a la desmielinización, inflamación y otros procesos que contribuyen a la degeneración neuronal y a la progresión de las enfermedades neurodegenerativas.¹¹³

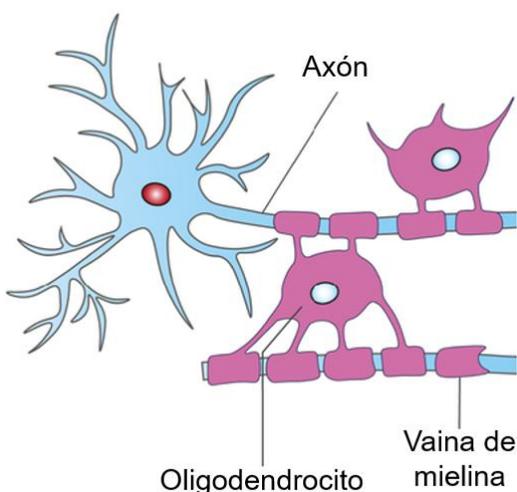


Figura 7: Mielinización en el SNC. Cada oligodendrocito en el SNC puede extender proyecciones citoplasmáticas para formar múltiples vainas de mielina multicapa (rosa) alrededor de diferentes axones neuronales (celeste). [Adaptado de Chen et al., 2021]¹¹⁴.

Algo muy interesante es que a diferencia de lo que pasa con las poblaciones neuronales que están bastante conservadas a lo largo de toda la escala zoológica, la glía es una especialización que va en paralelo con la complejidad del sistema nervioso. De hecho, el humano tiene tipos de astrocitos que las demás especies no tienen, son más cantidad, más complejos y más grandes.¹¹⁵

1.2. Antecedentes específicos

Las enfermedades del cerebro humano son atribuidas casi de manera universal a malfuncionamiento o pérdida de células nerviosas. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, a pesar de décadas de investigación, aún se desconocen las causas que llevan a la muerte neuronal en enfermedades neurodegenerativas y tampoco hay disponibilidad de tratamientos efectivos para prevenir o curarlas. Una posible causante de esto, es la perpetuación de una visión neurocentrista muy limitada, que no permite estudiar al cerebro como un conjunto numeroso de actores que interactúan de forma compleja entre sí. Esto ha contribuido al desplazamiento del foco de las investigaciones desde las poblaciones neuronales degenerantes, hacia el microambiente celular y ha posicionado a las células gliales, principalmente astrocitos y microglía en su rol de glía inflamatoria, como importantes blancos de estudio y potenciales dianas terapéuticas.²⁷

1.2.1. Mecanismos no autónomos celulares en la EP

A pesar de que la neurona es la única célula apta para descargar potenciales de acción en el SNC, no es capaz de vivir por sí sola y presenta una gran dependencia hacia el resto de las células para sobrevivir, evidenciado por el gran número de células gliales en relación al número de neuronas presentes en el sistema. Por esto, resulta imprescindible tomar en cuenta a la glía al estudiar la neurodegeneración. En concordancia, la evidencia experimental muestra que la muerte neuronal podría ser explicada en gran parte por mecanismos “no autónomos celulares”, es decir, que se trata de un proceso dependiente en el que para que la muerte neuronal ocurra debe haber daño en las neuronas y en la población glial también^{26,116}.

Considerando la abundancia de células gliales en el SNC y las numerosas funciones que desarrollan, en los últimos años las investigaciones sobre glía y enfermedades neurodegenerativas han desarrollado la hipótesis de que estas juegan un rol esencial en la patogenia de estas enfermedades, posicionándolas como actores fundamentales a la hora de exacerbar o aliviar la progresión de la enfermedad. Se propone que la progresión de la mayoría (si no todas) las enfermedades neurodegenerativas del SNC, está determinada por la capacidad de la glía para mantener la homeostasis cerebral en condiciones de estrés, y el fallo en mantener este balance señala un daño irreparable y finalmente la muerte del tejido nervioso.

En particular, en los últimos años, se ha comenzado a recolectar evidencia que sugiere que la disrupción de la biología normal de las células gliales está involucrada en la degeneración de neuronas dopaminérgicas en la EP. Se ha descrito que la muerte de neuronas dopaminérgicas es acompañada de gliosis en la SN¹¹⁷ y se reconoce la importancia de la glía reactiva neuroinflamatoria en la muerte neuronal^{118,119}. Estudios recientes sugieren que astrocitos y microglía sufren cambios morfológicos y funcionales, alterando la homeostasis y contribuyendo activamente a la aparición/progresión de la EP¹¹⁸⁻¹²¹.

Dado su papel como mediadoras de la inmunidad y especialmente por su capacidad para iniciar la neuroinflamación en respuesta a moléculas proinflamatorias, la microglía ha sido un gran foco en los estudios sobre la patogénesis de la EP y otras enfermedades neurodegenerativas.¹²² Si bien tradicionalmente se ha asumido que la neuroinflamación es un fenómeno que acompaña a las enfermedades neurodegenerativas pero que no tiene influencia sobre ellas, existen muchos estudios que identifican vínculos causales entre estos estados. La neuroinflamación y la microglía reactiva asociada se han reconocido desde hace mucho tiempo como elementos de la EP¹²³, pero ha sido problemático descifrar cualquier relación causal.

En la EP, se produce una activación crónica y persistente de la microglía, causando la liberación de una serie de moléculas proinflamatorias, como TNF- α y citocinas como IL-1 β y IL-18, junto con ROS y RNS, que promueven la neuroinflamación y exacerban el daño neuronal en la EP¹²⁴. La evidencia sobre el papel de la señalización proinflamatoria microglial en la patogénesis de la EP está fuertemente respaldada por una serie de estudios recientes que muestran la participación del inflamasoma microglial de la familia de receptores tipo NOD conteniendo el dominio pirina 3 (NLRP3), un componente importante del sistema inmunológico innato que media la activación de caspasa-1 y la secreción de IL-1 β y IL-18, ya que esta vía puede ser disparada tanto por la α -sin dada la participación de la microglía en su fagocitosis y la eliminación, o directamente por la muerte celular dopaminérgica¹²⁵⁻¹²⁹. En decir, que la interacción entre α -sin y microglía juega un papel importante en la patogénesis de la EP. Además, la inflamación derivada de la microglía puede a su vez inducir a los astrocitos a adoptar funciones neurotóxicas o a perder la funcionalidad neurotrófica o sinaptotrófica, favoreciendo aún más al daño neuronal¹³⁰.

En condiciones de daño, los astrocitos pueden responder mediante cambios en la morfología, la expresión genética y/o las funciones^{131,132}, en un fenómeno denominado reactividad astrocítica¹³³. Esta respuesta compleja suele provocar la pérdida de las principales funciones homeostáticas de estas células y la ganancia de propiedades tóxicas que pueden favorecer la formación de cicatrices, la producción de citoquinas proinflamatorias y especies oxidativas, alterar la captación de glutamato y perjudicar la síntesis de neurotransmisores, y una amplia gama de defectos que terminan promoviendo el daño de las neuronas dopaminérgicas en un contexto de EP¹¹².

El marcador tradicional para estudiar la reactividad de los astrocitos es el de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), pero más recientemente, la acuaporina 4 (AQP4) y la proteína B fijadora de calcio S100 (S100 β), han ganado relevancia a la hora de estudiar la fisiopatología de la EP¹³⁴. El enfoque en AQP4 es especialmente intrigante, ya que esta proteína desempeña múltiples funciones claves en el SNC, incluyendo la regulación del equilibrio hídrico y la transducción de señales de calcio en los astrocitos. Se ha observado que pacientes con EP muestran una disminución en la expresión de AQP4, lo que podría tener consecuencias importantes para la salud neuronal¹³⁵⁻¹³⁸, lo que puede aumentar la vulnerabilidad de las neuronas dopaminérgicas al daño y la neurotoxicidad, así como provocar una mayor activación de las células gliales exacerbando procesos inflamatorios¹³⁹⁻¹⁴⁴. Por otro lado, S100 β es una proteína que se expresa en los astrocitos, particularmente en los del cuerpo estriado, y desempeña diversas funciones, como la regulación del calcio, el metabolismo energético, la proliferación celular y la estructura celular¹⁴⁵⁻¹⁴⁸. Niveles bajos de S100 β pueden tener efectos neuroprotectores, pero en concentraciones elevadas puede ser perjudicial para las neuronas, causando sobrecarga de calcio, apoptosis, daño oxidativo y neuroinflamación excesiva^{145,146}. Los niveles de S100 β aumentan en la SN post mortem de pacientes con EP y en modelos animales de la enfermedad^{147,149-151}, donde se ha podido correlacionar este aumento con muerte celular¹⁵²⁻¹⁵⁵. Además, el aumento sostenido de los niveles de S100 que puede inducir la activación y migración de la microglía, amplificando la neuroinflamación, el daño oxidativo y la alteración del metabolismo de los neurotransmisores, todos ellos mecanismos subyacentes a la patogénesis de la EP¹⁴⁶. Pero estas no son las únicas proteínas presentes en astrocitos que han sido asociadas con neurodegeneración en la EP. Otro ejemplo de esto es la monoaminoxidasa B (MAOB), cuyos niveles aumentan significativamente en los astrocitos SN en la EP^{121,156,157}, contribuyendo a la patogénesis de la enfermedad mediante una mayor degradación de DA y otros sustratos, lo que resulta en una sobreproducción de H₂O₂ y el consecuente EO¹⁵⁸. Por otro lado, en modelos animales de la enfermedad, los astrocitos muestran una mayor formación de hemicanales, especialmente los conformados por la proteína conexina-43 (Cx43), lo que conduce a una señalización nociva en el medio extracelular mediada por calcio¹¹².

Interesantemente, la acumulación de α -sin presente en las neuronas dopaminérgicas degenerantes de pacientes con EP, se observa también en los astrocitos, probablemente como consecuencia de una saturación de la actividad fagocítica de estas células luego del intento de eliminar la proteína mal plegada¹⁵⁹⁻¹⁶³. Esta acumulación altera su correcta función celular y desencadena la liberación de

citoquinas que activan vías proinflamatorias que contribuyen a la degeneración neuronal¹¹². Otro factor que contribuye a la patología de la EP es la disfunción de los transportadores astrocíticos de glutamato a través de la excitotoxicidad resultante¹⁶⁴. Se ha observado una reducción en la recaptación de glutamato y en la expresión de ciertos transportadores en modelos animales de la enfermedad, que facilita el daño excitotóxico y también compromete la capacidad de soporte metabólico y antioxidante de los astrocitos¹⁶⁴⁻¹⁶⁶. Por tanto, los astrocitos presentan numerosas alteraciones en el contexto de la EP que pueden afectar directa o indirectamente a la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas.

Interesantemente, en los últimos años se ha descrito la aparición de células gliales con propiedades neurotóxicas en diferentes modelos de enfermedades neurodegenerativas. Particularmente, en un modelo animal de ELA, investigadores del entonces Laboratorio de Neurobiología Celular y Molecular del IIBCE, describieron una subpoblación de células astrocíticas anormales o aberrantes (denominadas “células AbA”), cuyo número aumenta significativamente durante la progresión de la enfermedad y con una capacidad de proliferación inusual, que resultó ser altamente tóxica para motoneuronas en cultivo¹⁶⁷. Mas recientemente, investigadores del Centro Uruguayo de Imagenología Molecular, exploraron este mismo fenómeno en la EA utilizando un modelo de ratones transgénicos. En concordancia con lo observado en el modelo de ELA, se encontró una población de astrocitos en estos ratones, con una alta tasa de proliferación, que resultaron ser neurotóxicos para neuronas en cultivo¹⁶⁸. Aunque aún no hay publicaciones que evidencien la emergencia de poblaciones gliales neurotóxicas en modelos de EP, estos datos sugieren que este podría ser un fenómeno común a diferentes enfermedades neurodegenerativas y que su estudio podría ayudar a comprender mejor este tipo de patologías.

En suma, el papel de las células gliales en el daño al SNC es complejo y aún no se comprende completamente. Aunque estas células desempeñan funciones cruciales en el soporte y mantenimiento del sistema nervioso, su disfunción puede contribuir a generar un ambiente tóxico que promueve la degeneración de las neuronas. La liberación de proteínas agregadas al espacio extracelular que ocurre en muchas enfermedades neurodegenerativas, conduce tanto a astrocitos como a la microglía a un cambio fenotípico proinflamatorio y neurotóxico. Por esta razón, la investigación en curso busca descifrar los mecanismos exactos que subyacen a la relación entre las células gliales y las diferentes formas de daño al SNC con el objetivo de identificar nuevas dianas terapéuticas para estas afecciones.

1.2.2. Antecedentes particulares del grupo

El Laboratorio de Mecanismos de Neurodegeneración y Neuroprotección del actual Departamento de Neurobiología y Neuropatología del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), que integro, proviene de una larga historia de dedicación al estudio de los complejos procesos que conducen a la degeneración neuronal, con el objetivo de arrojar luz sobre las enfermedades neurodegenerativas más desafiantes de nuestro tiempo, como la EP. Reconociendo la inmensa brecha que persiste entre el espectacular avance de la longevidad humana y la falta de terapias efectivas para estas afecciones cerebrales, nos enfocamos en identificar blancos terapéuticos mediante la investigación exhaustiva de los mecanismos fisiopatológicos subyacentes. Además, exploramos el vasto repertorio de moléculas presentes en la naturaleza en busca de compuestos con potencial neuroprotector, con el objetivo de hallar nuevas herramientas terapéuticas que puedan mejorar la calidad de vida de quienes padecen estas enfermedades neurológicas.¹⁶⁹⁻¹⁷⁶

En relación a los estudios planteados en esta tesis, hace algunos años nuestro grupo de investigación inició una colaboración con investigadores del entonces Laboratorio de Neurobiología Celular y Molecular del IIBCE, quienes reportaron la emergencia de las células AbAs en un modelo de ELA, para investigar la generación de este tipo de células gliales con capacidad neurotóxica en el marco de la EP. Para ello utilizamos ratas inyectadas unilateralmente en la SN con la toxina 6-OHDA, modelo de EP en el cual tenemos amplia experiencia^{173,176-179}.

En estudios preliminares, se lograron aislar células de la SN dañada (pero no del lado contralateral) que sobrevivieron y proliferaron en cultivo. Las condiciones del cultivo y la morfología sugieren fuertemente que las células sobrevivientes tienen fenotipo glial. De forma interesante, estudios piloto sugirieron que esta glía reactiva derivada del daño (GRDD) podría ser capaz de inducir neurodegeneración de neuronas dopaminérgicas cuando son inyectadas en la SN de animales controles. De confirmarse este hallazgo podría sugerir que las células obtenidas de este ambiente degenerativo adquieren un fenotipo perjudicial para las neuronas de su entorno y mantienen este fenotipo una vez aisladas y reimplantadas en tejido nervioso sano. Por este motivo, resulta imperativo confirmar las observaciones preliminares y continuar la profundización en el conocimiento de la biología de estas células gliales derivadas del daño, ya que podría contribuir al entendimiento de las bases fisiopatológicas de la EP y su modulación podría ser un novedoso blanco terapéutico.

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Las células gliales juegan un papel significativo en la patogénesis de la EP, donde la neurodegeneración podría estar fuertemente asociada a la emergencia de fenotipos gliales patológicos en la SN favorecidos por la generación de un microambiente proinflamatorio. Estas células gliales ganan funciones tóxicas y/o pierden funciones tróficas y su presencia es suficiente para producir la neurodegeneración.

3. OBJETIVOS

3.2. Objetivo general

Estudiar las implicancias de la glía en el inicio y progresión de la EP utilizando el modelo de 6-OHDA, para contribuir al conocimiento sobre las bases fisiopatológicas de la enfermedad.

3.3. Objetivos específicos

- 1- Describir el microambiente neurodegenerativo producido por la 6-OHDA, a partir del cual se obtiene la GRDD.
- 2- Caracterizar los cultivos primarios de células gliales obtenidas a partir de ratas inyectadas con 6-OHDA.
- 3- Evaluar el potencial neurotóxico de la GRDD *in vitro*.
- 4- Contribuir a la evaluación del potencial neurotóxico de la GRDD *in vivo*.

4. ESTRATEGÍA EXPERIMENTAL

Para cumplir con los objetivos se siguió un plan de trabajo (Fig. 8) que parte de la inyección unilateral de ratas Sprague Dawley (hembras y machos) de 230 a 260 gramos (alrededor de dos meses de vida) con 6-OHDA a nivel de la SN, mediante cirugía estereotáxica. La dosis de este tratamiento fue de 6 o 12 μg dependiendo del objetivo a trabajar y luego de tres días desde el momento de la lesión, se utilizaron los cerebros de estos animales para llevar a cabo los diferentes protocolos experimentales que se detallarán a continuación.

Para cumplir con el primer objetivo, se realizaron ensayos de inmunohistoquímica en la SN de ratas inyectadas con 12 μg de 6-OHDA y sacrificadas luego de 3 días, momento en que se obtienen las células de interés. A partir de cortes histológicos se estudió la expresión de marcadores gliales como

indicadores de reactividad glial a nivel de la SN: GFAP y S100 β para visualizar astrocitos e Iba-1 para microglía. También se evaluó la expresión de TH a nivel de la SN y el CE para determinar la integridad de la vía nigro-estriatal. En los estudios de reactividad glial, se cuantificó la intensidad de la señal y el área ocupada por ella para cada marcador, mientras que la integridad de la vía se evaluó cuantificando el número de neuronas dopaminérgicas en la SN y el área ocupada por las fibras dopaminérgicas en el CE. En todos los casos, los resultados se obtuvieron comparando el lado ipsilateral a la inyección con el lado contralateral.

Para cumplir con el segundo objetivo, los animales unilateralmente tratados con 6 o 12 μ g de 6-OHDA fueron procesados para obtener cultivos celulares primarios al tercer día de la lesión. Se cultivaron muestras de tejido de la SN, CE y el hipocampo (Hc), para evaluar la producción de GRDD tanto en el sitio lesionado y como en otras regiones, eligiendo al CE por estar estrechamente asociada a la SN y el Hc como región control. Luego de tres días *in vitro* se cuantificó el número de células obtenidas a partir de cada región y condición, y esos datos se evaluaron en relación al sexo de los animales y la dosis de toxina utilizada para seleccionar los parámetros de mejor rendimiento y así producir la mayor cantidad posible de células para utilizarlas en el resto de los objetivos. En paralelo, se realizaron ensayos de inmunocitoquímica y otros métodos de tinción para poder evaluar características sobre su morfología y su estirpe celular. En cuanto a la morfología, se describió la forma y el tamaño de las células provenientes de la SN, el CE y el Hc, tiñendo las células vivas con naranja de acridina y midiendo el largo y el área de cada una en fotografías de microscopía de fluorescencia. Los estudios sobre el fenotipo celular fueron realizados únicamente sobre células fijadas provenientes de la SN ipsilateral a la lesión y se evaluó la presencia de proteínas de expresión astrocítica como GFAP, S100 β y Cx43 y de expresión microglial como Iba-1 e Isolectina B4 (IB4), para cuantificar el número de células positivas para cada marcador en relación al número de células totales marcadas con alfa-tubulina (α -tub). A su vez, se analizó la evolución temporal del cultivo de la SN ipsilateral, evaluando cambios en el número de células mantenidas en cultivo a diferentes tiempos *in vitro* y su fenotipo una vez alcanzada la confluencia luego de 14-17 días en cultivo, para detectar cambios en la expresión de Iba-1 y GFAP en relación a los datos obtenidos al día tres.

Para cumplir con el tercer objetivo, se sembraron células PC12 sobre GRDD o sustratos control (colágeno o glía mixta). Luego de 24 h, se fijaron los cultivos y se determinó el número de células PC12 viables positivas para β -tubulina III (β -tubIII) mediante inmunocitoquímica para cada condición.

Para cumplir con el cuarto objetivo, se evaluaron los efectos del tratamiento con GRDD a diferentes dosis (0, 1000, 10000, 40000 y 60000 células/inyección), al inyectarlas unilateralmente en la SN de ratas control mediante cirugía estereotáxica. A su vez, se realizaron tratamientos con glía mixta normal (60000 células/inyección) y 6-OHDA (12 μ g) como controles. A los 30 días de la cirugía se analizó la integridad de la vía nigroestriatal mediante tests comportamentales para evaluar el desempeño motor y a continuación los animales fueron fijados por perfusión intracardiaca y sus cerebros fueron procesados para ensayos de inmunohistoquímica contra TH para la posterior cuantificación del número de neuronas dopaminérgicas en la SN y el área ocupada por las fibras dopaminérgicas en el CE. Igual que en el caso del primer objetivo, los resultados se obtuvieron comparando el lado tratado con el no tratado en cada cerebro.

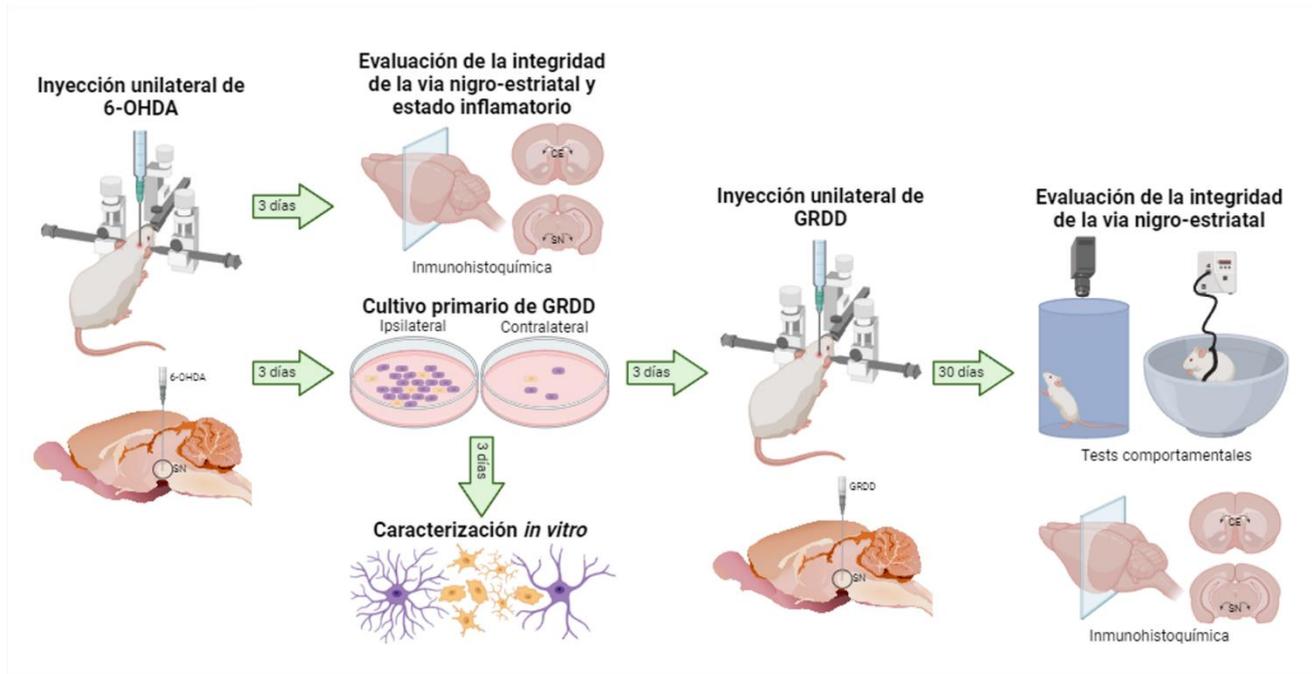


Figura 8: Esquema de la estrategia experimental. Se muestran los principales protocolos utilizados para cumplir con los objetivos de trabajo, incluyendo el momento de la línea temporal en que se llevó a cabo cada uno. Creado con BioRender. 6-OHDA: 6-hidroxidopamina. CE: cuerpo estriado. GRDD: glía reactiva derivada del daño. SN: sustancia nigra.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Materiales

El medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, 12100-061), la enzima para la disgregación celular (TrypLE Express, 12604-013), el suero de caballo inactivado (HS, 26050088) y el suero fetal bovino (FBS, 12657011) utilizado para células gliales fueron comprados a GIBCO. El FBS (FBS-11A) utilizado para la mantención de la línea celular PC12 fue obtenido de Capricorn. Todo el material plástico como botellas, tubos, placas de Petri y multipocillo fueron comprados a Biología. El medio RPMI (R6504) y los demás reactivos como la albúmina sérica bovina (BSA, A2153), el ácido ascórbico (A-7631), la 6-OHDA (H4381), el HEPES (H3375), paraformaldehído (PFA, 158127), Tritón X-100 (1000945815), D.P.X. (317616), ácidos, bases, sales y otros, fueron comprados a Sigma. Los anticuerpos y sondas fluorescentes utilizados se detallan en las Tablas 1, 2 y 3. El colágeno se obtuvo de cola de rata mediante extracción en el laboratorio, según protocolo adaptado de Green et al., 1998¹⁸⁰. Para los insumos que no han sido detallados en esta sección, se especificará el proveedor y el código de producto si corresponde al momento de su primera mención.

5.2. Animales

Se utilizaron ratas macho y hembra de la cepa Sprague Dawley (SD). Los animales fueron criados en el bioterio del IIBCE y mantenidos en cajas con alimento y agua ad libitum, con un régimen controlado de temperatura (20-22°C) y ciclos de luz/oscuridad de 12 horas. Todos los protocolos experimentales aplicados en animales fueron aprobados por la Comisión de Ética en el Uso de Animales (CEUA) del IIBCE (números de registro: 002/03/2011, 002/05/2012 y 001/01/2014) en conformidad con la ley de Experimentación Animal (Ley N° 18.611). Para todos los experimentos de estereotaxia se emplearon ratas con un peso de 230-260 g y para los cultivos primarios de glía mixta se utilizaron animales de entre 28-44 días de vida independientemente de su peso.

5.3. Inyección de 6-hidroxidopamina

Para reproducir experimentalmente algunas de las principales características de la EP, el modelo animal más utilizado es el de lesión inducida por neurotoxinas y particularmente, la inyección intracerebral de 6-OHDA, mediante un procedimiento quirúrgico denominado cirugía estereotáxica³³. Esta intervención utiliza un marco de referencia tridimensional para localizar con precisión estructuras dentro del cerebro, en este caso la SN, región donde residen las neuronas dopaminérgicas que degeneran en la EP.

Los animales fueron anestesiados por vía intraperitoneal con Ketamina/Xilacina a una dosis de 1,8 mL/Kg y 0,25 mL/Kg respectivamente. Una vez anestesiados, se colocaron en un aparato estereotáxico (D. Kopf, California, EEUU) para inyectar 2 μ L de la toxina en el lado derecho de la SN del animal, a una concentración de 3 y 6 μ g/ μ L diluida en vehículo, dejando el lado izquierdo como control sin lesión. Como vehículo se utilizó una solución de ácido L-ascórbico (2 mg/mL) y 0,05% de líquido cefalorraquídeo artificial (NaCl 0.3 M, KCl 2.3 M, CaCl₂ 0.03 M y MgCl₃ 0.05 M) en agua estéril apirógena.

Para esto, primero se realizó una incisión en la piel de la cabeza para exponer el cráneo y poder identificar Bregma, el punto donde se encuentran el hueso parietal y el hueso frontal del cráneo, que funciona como referencia anatómica para las coordenadas espaciales en el cerebro de roedores según el atlas de Paxinos y Watson¹⁸¹. Las coordenadas de inyección en la SN fueron -5 mm en el eje anteroposterior (AP), -2,2 mm en el eje lateral (L) y -7,2 mm en el eje dorsoventral (V), respecto de Bregma. Luego de localizar la posición de la SN en los ejes AP y L, se perforó el cráneo para poder introducir la aguja de una jeringa Hamilton acoplada a una unidad de microinyección (D. Kopf) hasta la posición V correcta. Una vez inyectado el volumen de toxina deseado, se dejó perfundir la gota durante 4 minutos sin mover la aguja para luego retirarla y proceder a la sutura de la incisión inicial. Después de la cirugía, los animales fueron mantenidos bajo observación hasta que se recuperaron de la anestesia antes de ser trasladados al bioterio del IIBCE y monitoreados diariamente hasta el momento de su sacrificio a los 3 días luego de la lesión en el caso de aquellos grupos destinados a cultivos celulares y estudios de inflamación o a los 30 días en el caso de los grupos destinados a estudios comportamentales y sobre la integridad de la vía nigroestriatal.

5.4. Cultivos celulares

El cultivo celular es una herramienta esencial para la investigación científica que consiste en el crecimiento y mantenimiento de células en condiciones controladas fuera de su entorno natural. El desarrollo de este proyecto implicó realizar una variedad de cultivos celulares, en particular de tipo primario, constituidos por células obtenidas directamente de tejidos u órganos de un organismo vivo. Con este tipo de cultivo celular se obtienen células con características y funciones más cercanas a las células *in vivo*, lo que las vuelve un modelo de estudio más realista respecto a las líneas celulares inmortalizadas, por ejemplo. Si bien tienen la desventaja de mantener un número finito de divisiones celulares que les confiere una vida útil limitada en el laboratorio por no haber pasado por un proceso de inmortalización, son ideales para estudios a corto plazo como los que se llevaron a cabo en esta investigación¹⁸².

En todos los casos, los animales fueron sacrificados por decapitación. Inmediatamente después, se inició con el protocolo de disección, que debe realizarse lo más rápido posible, con herramientas estériles y en hielo para optimizar el rendimiento del cultivo. En primer lugar, se extrajo el cerebro de la cabeza, se colocó en un recipiente con NaCl al 0.9% en hielo y se dejó enfriar unos minutos para endurecer el tejido y facilitar su manipulación, para luego disecar las regiones de interés.

Una vez finalizado el procedimiento de obtención de los cultivos, los mismos fueron mantenidos en estufa de cultivo a 37°C, con una atmósfera saturada de agua, 95% de aire y 5% de CO₂, hasta la culminación.

5.4.1. Cultivo primario de la SN, CE e Hc de ratas inyectadas con 6-OHDA

Las ratas inyectadas unilateralmente con 6-OHDA fueron sacrificadas al tercer día luego de la operación por decapitación. Para diseccionar la SN, el CE y el Hc, primero se colocó el cerebro sobre una matriz cerebral de cortes transversales y se cortaron 2 rodajas de 2 mm de espesor: una a la altura de la SN (con la cuchilla más posterior donde comienza el hipocampo posterior en la vista ventral) y otra más anterior a la altura del CE. De la rodaja posterior se disecó la SN y el Hc de ambos lados, perforando con un punzón hueco de 2mm de diámetro y de la rodaja anterior se disecó el CE de la misma forma. El tejido extraído se colocó en tubos eppendorf con buffer fosfato salino (PBS, 10 mM, pH=7,4), previamente etiquetados y separando las muestras por región, por animal y por lado (derecho/ipsilateral e izquierdo/contralateral a la lesión) para trasladarlas al cuarto de cultivo y continuar con el resto del protocolo.

Dentro del cuarto, cada muestra de tejido se cortó en trozos pequeños con bisturí sobre una placa de Petri que luego se traspasó a tubos eppendorfs nuevos con 500 µL de PBS limpio para un breve lavado. Una vez que los trozos de tejido decantaron al fondo del tubo, se descartó el PBS y se procedió a la disgregación enzimática agregando 300 µL de una enzima recombinante utilizada para disociar una amplia gama de células adherentes de mamíferos (TrypLE Express, GIBCO). Las muestras se dejaron disgregar durante 25 minutos a temperatura ambiente y una vez pasado el tiempo, se descartó la solución enzimática y se detuvo la reacción adicionando 400 µL de medio de cultivo para glías (DMEM alto en glucosa y suplementado con 15% de FBS, 3,6 g/L HEPES, 100 IU/mL de penicilina y 100 IU/mL de estreptomycin). Luego se completó la disgregación celular de forma mecánica, pipeteando unas 15 veces cada muestra sin generar burbujas. A continuación, se plaqueó sobre plástico o vidrio la suspensión celular según los requerimientos de cada experimento y las células fueron mantenidas en estufa de cultivo a 37°C, con una atmósfera saturada de agua, 95% de aire y 5% de CO₂, hasta la culminación.

5.4.2. Cultivo primario de glía mixta

Dado que a partir de la SN contralateral prácticamente no se obtienen células en cultivo, surgió la necesidad de realizar cultivos gliales heterogéneos (mezcla de astrocitos y microglía) de ratas adultas para poder utilizarlos como células control o glía normal. Esos cultivos primarios de glía mixta fueron obtenidos a partir de corteza cerebral de ratas SD de 28-44 días de vida. En primer lugar, los animales fueron sacrificados mediante decapitación en guillotina y la cabeza se sumergió en un recipiente con alcohol al 70% para luego poder retirar los pelos sin contaminar. A continuación, se colocó el cráneo en un recipiente con PBS para trasladarlo al cuarto de cultivo y continuar con el resto del protocolo en condiciones estériles. Inmediatamente después, se extrajo el cerebro en cámara de flujo laminar, se diseccionaron las hemi-cortezas y se retiraron las meninges. El tejido se cortó en trozos con bisturí, luego se suspendió en 2 mL medio de cultivo de glías para completar la disgregación de forma mecánica por pipeteo. La suspensión celular se filtró en una malla de 80 µm sobre una placa de Petri de 60 mm donde se adicionaron 2 mL de medio de cultivo para glía, llegando a un volumen final de 4 mL. Las células fueron mantenidas en una estufa de cultivo a 37°C, con una atmósfera saturada de agua, 95% de aire y 5% de CO₂. A las 48 h de sembrar las células se adicionaron 500 µL de medio de cultivo fresco sin descartar el medio viejo y luego de 48 h más la mitad del medio de cultivo fue sustituido por medio fresco. A partir del sexto día *in vitro* los cultivos se alimentaron cada 48 h, cambiando la totalidad del medio de cultivo cada vez, hasta que las células llegaron a confluencia alrededor de 2 semanas luego de realizado el cultivo, donde quedaron listas para utilizarse en los diferentes experimentos.

5.5. Experimentos *in vitro*

Se realizaron una serie de experimentos *in vitro*, definidos como aquellos que se llevan a cabo en un entorno fuera de un organismo vivo y permiten estudiar fenómenos biológicos en un ambiente aislado y controlado.

5.5.1. Evaluación del rendimiento y morfología del cultivo de GRDD

Para evaluar el rendimiento y la morfología de los cultivos celulares obtenido a partir de la SN, CE y Hc de ratas inyectadas unilateralmente con 6-OHDA, se colocó el macerado de células obtenido en el punto 5.4.1 directamente sobre portaobjetos de microscopio Tef-Tek (PORLAB, D116-0620-1020), diseñados con pocillos humectables y particiones hidrofóbicas. Se sembró un volumen de 50 μ L de células por pocillo (por duplicado por condición) y se mantuvieron en cámara húmeda dentro de la estufa de cultivo durante 72 h. Al tercer día *in vitro*, primero se descartó el medio de cultivo de cada pocillo y se hizo un breve lavado con PBS para eliminar los restos de tejido y suero, para luego teñir las células vivas con naranja de acridina (Tabla 3), un colorante catiónico fluorescente. Para ello, se incubaron las células en una solución de 1 mg/mL de colorante en DMEM sin suero durante 20 minutos a 37 °C. A continuación, se realizaron 3 lavados con PBS y manteniéndolas en esa solución salina fueron inmediatamente trasladadas a un microscopio de fluorescencia confocal (LSM ZEISS 800) para fotografiarlas. Se excitaron las muestras con luz azul (láser de 488 nm) y se tomaron 4 fotos por pocillo, seleccionando los campos en cruz, a un aumento de 20x para el posterior conteo y análisis morfológico de las células. Además, se tomaron algunas fotos a mayor aumento para ilustrar más detalladamente la morfología del cultivo.

5.5.2. Preparación de la GRDD para determinación de su estirpe celular

Se cultivó el macerado de células obtenido en el punto 5.4.1 directamente sobre placas de 96 pocillos, sembrando un volumen de 50 μ L de células por pocillo. Estas células se mantuvieron en estufa de cultivo hasta el tercer día *in vitro*, donde fueron fijadas con PFA 4% en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente y luego de lavados fueron mantenidas en PBS a 4°C hasta el momento de iniciar el protocolo de inmunohistoquímica con marcadores específicos para determinar su estirpe celular.

5.5.3. Preparación de GRDD para experimentos *in vivo* y la evolución temporal del cultivo *in vitro*

Para obtener el mayor número de GRDD por animal posible y reducir el número de animales necesarios para los tratamientos *in vivo*, algunos animales fueron inyectados con 6-OHDA bilateralmente, permitiendo disecar el doble de tejido para realizar el cultivo. Esto se hizo siguiendo el mismo protocolo del punto 5.3 pero agregando un segundo sitio de inyección del lado izquierdo, moviendo la aguja únicamente en el eje L a la posición +2,2 mm. Luego se llevó a cabo el protocolo de cultivo descrito en el punto 5.4.1 con la salvedad de que en cada instancia de cultivo se agruparon las muestras de dos animales, sin separar entre izquierda y derecha. El macerado de células obtenido de esa agrupación de tejido fue directamente cultivado sobre una placa de Petri de 35 mm y mantenido en estufa de cultivo hasta el tercer día *in vitro*. En ese momento se prepararon las células en suspensión para los experimentos *in vivo* (ver más adelante) y para el replaqueo necesario para estudiar la evolución temporal del cultivo *in vitro*.

Para ello, primero se descartó el medio de los cultivos y luego de un breve lavado con PBS, se levantaron las células enzimáticamente con TrypLE Express durante 20 minutos a 37°C. Una vez pasado el tiempo de incubación, se centrifugó la mezcla de células y TrypLE Express a 2000 rpm durante 10 minutos, reservando 20 μ L de la mezcla para contar el número de células en cámara de Neubauer mientras transcurre el centrifugado. Luego se descartó el sobrenadante y se resuspendió

el pellet en un volumen adecuado de DMEM sin suero para el tratamiento seleccionado y de allí se destinó una parte del volumen de células en suspensión para inyectar animales y el resto fue replaqueado para mantener el cultivo.

5.5.4. Evaluación de la evolución temporal en cultivo

A la suspensión de células obtenida en el punto anterior se le agregó medio de cultivo de glías y se sembró directamente sobre placas multipocillo de 24. Dado que se le dio prioridad a tener las células suficientes para los tratamientos *in vivo* por sobre el estudio de la evolución del cultivo, el número de células disponibles para estos experimentos fue variable en cada ocasión y como consecuencia el número de células de partida (al tercer día *in vitro*) no fue igual en todos los casos. Se plaquearon células en al menos 6 pocillos por experimento y el número de células sembradas por pocillo dependió del sobrante disponible resultando en un rango de entre 13.000 y 50.000 células por pocillo. Estos cultivos fueron mantenidos en estufa de cultivo en condiciones estándar, cambiando el medio en su totalidad cada 48 h.

Para evaluar la evolución temporal del cultivo, se analizaron cambios en el número de células en función del tiempo *in vitro* y también se buscó determinar si existían cambios en la expresión de los marcadores utilizados para determinar su estirpe celular una vez que el cultivo alcanzara la madurez. Para esto, primero se realizaron conteos seriados para determinar el número de células presentes por pocillo a diferentes tiempos *in vitro*, realizando conteos en al menos tres puntos temporales diferentes entre el tercer día en cultivo y el día número 18. Cada uno de estos conteos se llevó a cabo en un pocillo diferente de los inicialmente plaqueados y para ello, primero se descartó el medio del pocillo seleccionado y luego de un breve lavado con PBS, se levantaron las células enzimáticamente con TrypLE Express durante 20 minutos a 37°C. Una vez pasado el tiempo de incubación, se despegaron las células del plástico mecánicamente por pipeteo y se tomó una muestra para contarlas en cámara de Neubauer. Luego, se procuró que al final de los conteos quedaran al menos dos pocillos intactos por experimento, disponibles para ensayos de inmunohistoquímica. Entre el día 17 y el día 18 *in vitro* fueron fijados con PFA 4% en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente y luego de lavados fueron mantenidas en PBS a 4°C hasta el momento de iniciar el protocolo de inmunomarcación como cultivo maduro.

5.5.5. Cocultivos

Para evaluar el potencial neurotóxico de la GRDD *in vitro* se realizaron cocultivos con células PC12, una línea celular derivada de un feocromocitoma de rata, conocida por su capacidad de diferenciarse en células similares a las neuronas y que además son catecolaminérgicas al igual que las neuronas que degeneran en la EP, lo que las vuelve ideales para este propósito. En paralelo, también se cocultivaron PC12 con astrocitos y con glía mixta a modo de control.

Para esto, se prepararon pocillos con GRDD en placas multipocillo de 96 de la misma forma que en el punto anterior, con la salvedad que al tercer día *in vitro*, se procedió a cultivar PC12 sobre ellos. En el caso del control de glía mixta, primero se realizó un replaqueo las células cultivadas en placa de Petri al final del punto 5.4.2, las que se decoloraron tratándolas enzimáticamente (TrypLE Express, GIBCO) durante siete minutos, deteniendo la reacción agregando medio de cultivo para glías y colectando las células por centrifugación a 2000 rpm durante 10 minutos. A continuación, se resuspendieron en medio fresco y se plaquearon 3000 células de glía mixta por pocillo en placas de 96 pocillos, número similar al observado en los cultivos de GRDD y se agregaron las PC12 al día siguiente.

En paralelo se prepararon las células PC12 sometiendo a un periodo de adaptación al cambio de medio, previo al cocultivo. Esta línea celular en condiciones estándar es mantenida en botellas de 25 cm² con medio PC12 (RPMI suplementado con 10% HS inactivado, 5% FBS, 100 IU/mL de penicilina y 100 IU/mL de estreptomina), pero para estos experimentos fueron mantenidas en medio para glía en placa de Petri de 35 mm previamente tratada con colágeno como sustrato, por al menos una

semana antes del cocultivo. Esto nos permite asegurar que cualquier efecto sobre ellas va a estar siendo determinado por la presencia de las otras células y no por el cambio de medio. Las PC12 mantenidas en medio de glía fueron alimentadas cambiando la mitad del medio cada 3-4 días por medio fresco y replaqueadas una vez por semana.

Una vez llegado el momento del cocultivo, se levantaron las PC12 por pipeteo mecánico, se contaron con cámara de Neubauer y se diluyeron hasta tener una concentración aproximada de 12500 células/mL. De esta forma, al sustituir el medio de las placas preparadas para cocultivo por 80 µL de la dilución de PC12, se sembraron alrededor de 1000 PC12 por pocillo sobre la GRDD y glía mixta. A modo de control, también se sembraron PC12 sobre pocillos sin células, previamente tratados con colágeno como sustrato de buena adhesión para estas células. Cada condición se realizó por duplicado en cada experimento. Finalmente, a las 24 h los cocultivos fueron fijados con PFA 4% en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente y luego de lavados fueron mantenidas en PBS a 4°C hasta el momento de iniciar el protocolo de inmunohistoquímica para el número de PC12 que se pegó y sobrevivió en cada condición.

5.5.6. Inmunocitoquímica

La marcación por inmunofluorescencia es una técnica utilizada en biología y medicina que utiliza anticuerpos para detectar la presencia de proteínas específicas en células (inmunocitoquímica) o tejidos (inmunohistoquímica). Se basa en la capacidad de los anticuerpos para unirse de manera selectiva a proteínas específicas, lo que permite visualizar y estudiar la distribución de esas proteínas en muestras biológicas mediante técnicas de tinción¹⁸³. En este proyecto se utilizó inmunocitoquímica para dos propósitos, por un lado, para determinar la estirpe de las células obtenidas a partir de la SN de ratas inyectadas con 6-OHDA evaluando su inmunoreactividad para marcadores específicos de astrocitos y microglía, y por el otro para visualizarlas en los cocultivos detallados en el punto anterior y cuantificar su potencial neurotóxico *in vitro*.

Para ello, se permeabilizaron las células previamente fijadas con Tritón X-100 al 0,1% en PBS durante 20 minutos, se bloquearon con BSA 5% en PBS durante 30 minutos y se incubaron con los anticuerpos primarios y/o sondas conjugadas correspondientes durante toda la noche a 4°C. Para los experimentos de estirpe, los marcadores que se utilizaron fueron α-Tub como proteína de expresión constitutiva en todos los tipos celulares; S100β, GFAP y Cx43 como marcadores específicos de astrocitos; y finalmente Iba-1 y IB4 para marcar microglía (especificaciones en Tabla 1 y 3). En el caso de los experimentos de evolución temporal del cultivo se utilizó la misma marcación, excluyendo Cx43 y IB4. Todos los pocillos fueron incubados con α-Tub en conjunto con cada uno de los marcadores específicos por separado y en duplicado por experimento. Para los cocultivos se marcaron las células PC12 con β-Tub III como marcador neuronal (Tabla 1) junto con GFAP como marcador de astrocitos o Iba-1 como marcador de DDRG (basándonos en resultados previamente obtenidos sobre su estirpe) y glía mixta según correspondiera, también por duplicado en cada experimento. A continuación, se realizaron lavados con PBS y se incubaron las células con los anticuerpos secundarios correspondientes (Tabla 2) durante 90 minutos a temperatura ambiente. Luego las células se lavaron con PBS, se incubaron durante 10 minutos con Hoechst (Tabla 3) a una concentración de 1 µg/mL en PBS para marcar los núcleos y luego de otro lavado se mantuvieron en esa solución salina a 4°C hasta el momento de la obtención de imágenes mediante el microscopio de fluorescencia confocal (LSM ZEISS 800). Al igual que en el punto 5.5.1, se fotografiaron 4 campos por pocillo a un aumento de 20x para el posterior conteo de células positivas para cada marcador y en algunos casos también a 40x para visualizar más precisamente la marcación.

Tabla 1: Lista de anticuerpos primarios utilizados

Antígeno	Tipo	Dilución	Huésped	Blanco	Fabricante	Código
----------	------	----------	---------	--------	------------	--------

S100 β	Monoclonal	1:200	Conejo	Astroцитos	abcam	ab52642
GFAP	Policlonal	1:500	Conejo	Astroцитos	SIGMA	G9269
Iba-1	Policlonal	1:500	Conejo	Microglia	Wako Chemicals	019-19741
Cx43	Policlonal	1:750	Conejo	Astroцитos	abcam	ab11370
β -Tub III	Monoclonal	1:1000	Ratón	PC12	SIGMA	T8578
α -Tub	Monoclonal	1:1000	Ratón	Células	SIGMA	T6199
TH	Policlonal	1:750	Conejo	Neuronas/ terminales dopaminérgicas	abcam	ab112

Tabla 2: Lista de anticuerpos secundarios utilizados

Anticuerpo	Fluoróforo/Conjugado	Dilución	Fabricante	Código
Cabra anti-conejo IgG	Alexa Fluor 488 Alexa Fluor 594	1:500	Thermo Fisher Scientific	A-11008 A-11012
Cabra anti-ratón IgG	Alexa Fluor 488 Alexa Fluor 594	1:500	Thermo Fisher Scientific	A-11001 A-11005
Cabra anti-conejo IgG	Biotina	1:600	Invitrogen	A16114

Tabla 3: Sondas fluorescentes utilizados

Nombre	Concentración	Excitación	Emisión	Blanco	Fabricante	Código
Naranja de acridina	1 mg/mL	460-502 nm	525 nm 650 nm	Células	SIGMA	A-2886
Hoechst	1 μ g/mL	350 nm	461 nm	Núcleos	SIGMA	B-2262

IB4	10 µg/mL	488 nm	525 nm	Microglía	Thermo Fisher Scientific	L21411
-----	----------	--------	--------	-----------	--------------------------	--------

5.6. Experimentos *in vivo*

Se realizaron una serie de experimentos *in vivo*, definidos como aquellos que se realizan en un organismo vivo para estudiar fenómenos biológicos en un contexto más natural y complejo. En este caso se utilizaron para describir el estado inflamatorio a partir del cual se extrae la GRDD y para estudiar el potencial neurotóxico de la GRDD luego de ser inyectadas en la SN de animales control, determinando efectos comportamentales del tratamiento y evaluando la integridad de la vía nigro-estriatal.

5.6.1. Inyección de células

Para evaluar el potencial neurotóxico *in vivo* de la GRDD, estas fueron inyectadas unilateralmente en la SN de ratas sanas mediante cirugía estereotáxica. A su vez se inyectaron animales con astrocitos y con glía mixta a modo de control. Dado que uno de los objetivos específicos de esta sección del proyecto fue caracterizar este modelo novedoso de EP, fue necesario determinar con exactitud el número de células a inyectar para poder correlacionar ese valor con la potencial neurotoxicidad observada. Por este motivo, decidimos inyectar diferentes subgrupos dentro de cada tipo de tratamiento (GRDD, glía mixta o vehículo) con distinto número de células y así poder establecer una especie de curva de dosis-respuesta. En todos los casos, se utilizaron células en suspensión para la inyección, con DMEM sin suero como vehículo. En el caso de la GRDD se establecieron cuatro subgrupos y se inyectaron 1000, 10.000, 40.000 y 60.000 células por animal. En el caso de la glía mixta, nos basamos en resultados preliminares sobre las propiedades neurotóxicas *in vivo* de la GRDD y seleccionamos el tratamiento de 60000 células/animal como mejor control.

En primer lugar, se prepararon las células en suspensión para inyectar. Para ello, se utilizaron cultivos de GRDD al tercer día *in vitro* a partir del protocolo 5.4.1 y cultivos confluentes de glía mixta obtenidos de la forma descrita en el punto 5.4.2. Se descartó el medio de los cultivos y luego de un breve lavado con PBS, se levantaron las células enzimáticamente con TrypLE Express durante 20 minutos a 37°C. Una vez pasado el tiempo de incubación, se centrifugó la mezcla de células y TrypLE Express a 2000 rpm durante 10 minutos, reservando 20 µL de la mezcla para contar el número de células en cámara de Neubauer mientras transcurre el centrifugado. Luego se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en DMEM sin suero de forma de que al inyectar 2 µL de solución se tenga el número de células deseados para el tratamiento seleccionado. Se destinaron al menos 3 µL de células para inyectar cada animal, conservándolas en un tubo eppendorf estéril a 37°C hasta el momento de la inyección y en los casos en los que el número de células fuera el suficiente, se utilizó el sobrante para replaquear para otros experimentos o mantener el cultivo.

Rápidamente se procedió a la cirugía, utilizando el mismo protocolo estereotáxico que para la inyección de 6-OHDA, procurando optimizar la velocidad para que las células en suspensión no perdieran viabilidad. Brevemente, los animales fueron anestesiados por vía intraperitoneal con Ketamina/Xilacina y colocados en el aparato estereotáxico. Luego de ubicar la aguja en la posición seleccionado de la SN derecha se inyectaron 2 µL de células (GRDD o glía mixta), se dejó perfundir la gota durante 4 minutos sin mover la aguja para luego retirarla y suturar. Después de la cirugía, los animales fueron mantenidos bajo observación hasta que se recuperaron de la anestesia antes de ser trasladados al bioterio del IIBCE y monitoreados diariamente hasta el momento de su sacrificio a los 30 días de la operación.

5.6.2. Comportamiento

Los estudios comportamentales en animales de investigación buscan comprender cómo los animales se comportan en su entorno natural o en condiciones controladas de laboratorio y permiten que los investigadores observen, registren y analicen una variedad de comportamientos, que van desde la alimentación, reproducción y el movimiento, hasta la comunicación, interacciones sociales y otras funciones cognitivas superiores¹⁸⁴.

En este caso se utilizaron dos tipos de estudios comportamentales para evaluar el desempeño motor de los animales luego del tratamiento con GRDD: el test de cilindro y el test de rotación. Ambas pruebas fueron realizadas entre el día 27 y el día 29 post tratamiento, en el orden de mención y de forma consecutiva. Primero se trasladaron los animales desde el bioterio del IIBCE hasta un cuarto destinado por ese día exclusivamente a estudios comportamentales y se dejaron aclimatar al cambio de ambiente por al menos 15 minutos antes de comenzar con las pruebas, procurando una temperatura ambiente de 22°C y la menor contaminación sonora posible. Una vez completadas las pruebas, los animales fueron trasladados nuevamente al bioterio hasta el momento de su sacrificio al día 30 desde la operación.

5.6.2.1. Test de cilindro

El test de cilindro es una prueba utilizada en investigaciones con roedores, especialmente ratas, para evaluar el uso de las extremidades anteriores y la coordinación motora. Este test es comúnmente empleado en estudios relacionados con lesiones cerebrales o intervenciones que pueden afectar la función motora. La prueba ayuda a identificar asimetrías en el uso de las extremidades anteriores, lo que puede indicar posibles déficits funcionales, especialmente útil para evidenciar el efecto de lesiones unilaterales como en este caso¹⁸⁴. Este test nos permitió evaluar discrepancias en el uso del tren anterior de cada animal en un ambiente novedoso que favorece la exploración vertical mediante un comportamiento denominado como “rearings”, que se da cuando el animal se para sobre sus patas traseras y realiza toques o apoyos con sus patas delanteras sobre la pared del cilindro.

Para ello, se pintó la pata derecha de cada animal para facilitar su visualización y el posterior conteo de los toques y luego se los colocó individualmente en un cilindro de 60 cm de altura y 15 cm de diámetro con una cámara en la parte superior del cilindro sostenida con un trípode para permitir una toma cenital del animal. Se grabaron videos de 4 minutos a partir del momento en el que el animal entra en el cilindro para ser analizados posteriormente. Luego de un descanso de 15 minutos nuevamente en la jaula, se dio inicio al siguiente test comportamental.

5.6.2.2. Test de rotación

Para determinar si los tratamientos *in vivo* tuvieron éxito en generar una lesión en la vía nigroestriatal, se estudió la conducta rotacional inducida por anfetamina (este agonista dopaminérgico induce un comportamiento rotacional hacia el lado contralateral a la lesión). El test de rotación es uno de los test comportamentales más utilizados en investigación para evaluar la actividad dopaminérgica y el comportamiento motor en modelos animales, especialmente en el contexto de estudios relacionados a la EP. Brevemente consiste en administrar una sustancia que estimula el sistema dopaminérgico y observar el comportamiento de la rata, específicamente las rotaciones que realiza en un periodo de tiempo determinado. Tiene como objetivo identificar el desequilibrio de dopamina entre el hemisferio cerebral derecho e izquierdo en animales con una lesión de la vía nigroestriatal como la producida por 6-OHDA.¹⁸⁴

Para ello, primero se le administró a cada animal anfetamina por vía intraperitoneal a una dosis de 5 mg/Kg disuelta en cloruro de sodio al 0.9%, de forma de estimular el sistema dopaminérgico. Inmediatamente después, se sujetó al animal con un arnés conectado a un contador mecánico. Los animales fueron rápidamente colocados en un rotómetro de plástico, una semiesfera de 50 cm de diámetro y luego se otorgaron 15 minutos para permitir que la anfetamina surtiera efecto. Pasado

ese tiempo, se inició el recuento de las rotaciones, monitoreando la asimetría rotacional durante 15 minutos más, contando las rotaciones en sentido horario y antihorario automáticamente con el contador mecánico como sistema de seguimiento. Una vez terminada la prueba, se registraron los valores obtenidos para su posterior análisis.

5.6.3. Procesamiento de animales para análisis inmunohistoquímico

El grupo de animales de 3 días post-inyección de 6-OHDA y el grupo de 30 días post-tratamiento con 6-OHDA, GRDD, glía mixta y vehículo, fueron anestesiados por vía intraperitoneal con Ketamina/Xilacina al momento de cumplirse los plazos recién mencionados y seguidamente fijados por perfusión intracardiaca, primero con PBS conteniendo 0,04% de citrato de sodio y luego con PFA al 4% en PBS. Una vez finalizada la perfusión, los cerebros fueron disecados y post-fijados durante 10 días con PFA 4% a 4°C y luego mantenidos en PBS hasta su procesamiento. Para obtener los cortes histológicos se realizaron cortes coronales consecutivos de 30 µm de espesor, desde el inicio del CE anterior hasta el final de la SN posterior con vibrátomo (Leica VT1000S). Los cortes se mantuvieron flotando en azida de sodio al 0,05% en PBS a 4°C hasta el inicio del protocolo de inmunohistoquímica.

5.6.4. Inmunohistoquímica

Se utilizó la marcación por inmunohistoquímica en dos tipos de muestras, con diferentes propósitos y por metodologías moderadamente distintas. Por un lado, sobre los cortes de ratas inyectadas con 6-OHDA a los tres días de la operación se realizó inmunohistoquímica con revelado por inmunofluorescencia para evaluar el estado de inflamación del tejido en el momento en el que se extraen las células para cultivo. Por otro lado, sobre los cortes de las ratas tratadas con GRDD (más sus controles) se realizó inmunohistoquímica con diaminobencidina (DAB) para determinar la integridad de la vía nigro-estriatal. Ambas técnicas serán descritas a continuación.

Para el revelado por fluorescencia, se eligieron tres cortes de SN por animal para evaluar su reactividad a marcadores gliales a los 3 días de la inyección unilateral de 6-OHDA, pudiendo comparar el lado lesionado con el lado control sin inyectar dentro del mismo corte. Los ensayos se realizaron con los cortes en flotación y el protocolo comenzó con dos lavados en PBS de 10 minutos cada uno para eliminar los restos de azida, seguido de un paso de permeabilización con Tritón X-100 al 0,3% en PBS. Nuevamente se hicieron dos lavados de PBS de 10 minutos y se bloquearon los sitios inespecíficos con BSA al 5% en PBS durante 60 minutos para posteriormente incubar con el anticuerpo primario durante 48 h a 4°C. En este caso se seleccionaron Iba-1, GFAP y S100β (Tabla 1) como buenos indicadores de neuroinflamación y se utilizaron individualmente (cada marcador en un corte separado). Pasado el tiempo de incubación, se realizaron tres lavados de 10 minutos con PBS y se procedió a incubar con el anticuerpo secundario fluorescente durante 90 minutos. Para finalizar, se realizaron tres lavados de 10 minutos con PBS y se montaron los cortes con glicerol 50% y Hoescht (Tabla 3) en PBS. Los cortes montados fueron conservados a 4°C hasta el momento de obtener las imágenes mediante el microscopio de fluorescencia confocal (LSM ZEISS 800), donde se tomaron 6 micrografías por corte a un aumento de 10x, 3 abarcando la totalidad de la SN ipsilateral a la lesión y 3 de la SN contralateral. También se tomaron algunas fotografías a mayor aumento destinadas al armado de figuras representativas.

En los estudios de inmunohistoquímica para analizar la integración de la vía nigroestriatal se utilizó un protocolo de inmunomarcación con anticuerpos secundarios unidos a biotina y utilizando DAB para revelar la marca. El DAB es un sustrato cromogénico que produce un precipitado de color marrón visible al microscopio¹⁸⁵.

Para ello, se seleccionaron dos cortes por cada animal para analizar, comprendiendo el CE y la SN, procurando una concordancia espacial entre animales, para que los cortes de cada región fueran tomados del mismo nivel y así optimizar el estudio comparativo. Estos ensayos fueron realizados por

flotación y en primer lugar los cortes fueron lavados con PBS y luego se bloqueó la peroxidasa endógena con H_2O_2 al 1% en PBS. A continuación, se lavaron los cortes con PBS (3 lavados de 10 minutos) y se procedió a bloquear los sitios inespecíficos y permeabilizar en simultáneo, incubando con BSA 5% en PBS Tritón X-100 al 0,3% durante 60 minutos. Pasado ese tiempo, se incubaron los cortes con anticuerpo primario toda la noche, a temperatura ambiente y en agitación orbital. En este caso, la población celular a estudiar fue la de las neuronas dopaminérgicas, por lo que se seleccionó un anticuerpo primario para tirosina hidroxilasa (TH, Tabla 1) como marcador.

Al día siguiente, se recuperó el anticuerpo primario y se realizaron 5 lavados con PBS Tritón X-100 al 0,3% de 3, 5, 7, 7 y 10 minutos en ese orden, para luego incubar durante 90 minutos con el anticuerpo secundario biotinilado (Tabla 2) en BSA 5% en PBS Tritón X-100 al 0,3%. Luego se realizaron nuevamente 5 lavados igual a los anteriores y en simultáneo se preparó el reactivo ABC a partir de las soluciones A y B del Kit ABC VectaStain Elite (VectorLabs, PK-6100), diluyendo ambas a una relación 1/300 en PBS (A y B forman C en un plazo de 15 a 30 minutos). A continuación, se incubaron los cortes con el reactivo ABC durante 60 minutos y luego se hicieron tres lavados con PBS de 10 minutos cada uno. Posteriormente, se hizo el revelado incubando con una solución de DAB al 0,02% y H_2O_2 al 0,003% en H_2O destilada, durante 10 minutos o hasta observar una buena coloración marrón en la zona correspondiente. Para detener la reacción se realizaron dos lavados de 10 minutos, el primero con H_2O destilada y el segundo con PBS. Luego los cortes fueron colocados sobre un portaobjeto por animal, se dejaron secar sin cubrir durante un par de días protegidos del polvo y finalmente se terminaron de montar con D.P.X. y cubreobjeto. Para terminar, se fotografiaron los cortes mediante un microscopio estereoscópico Nikon (SMZ745T) a diferentes aumentos para su posterior análisis.

5.7. Análisis de datos

En esta sección se detallará el proceso de análisis empleado para examinar, interpretar y obtener resultados a partir de los experimentos previamente descritos y el recopilado de datos obtenidos. Implica utilizar técnicas estadísticas y herramientas analíticas para identificar patrones, tendencias o relaciones significativas en los datos, permitiendo respaldar o refutar la hipótesis de investigación. Este es un paso crucial a la hora de obtener resultados confiables y fundamentar las conclusiones, por lo que a continuación se precisará este proceso para cada uno de los experimentos realizados.

5.7.1. Cuantificación del rendimiento del cultivo de GRDD

El rendimiento de los cultivos de ratas inyectadas con 6-OHDA se calculó mediante conteos de células a partir de las fotografías obtenidas al final del punto 5.5.1. El conteo de las células se realizó con el programa de libre acceso Fiji (ImageJ) empleando el plugin de "cell counter" y se contabilizaron manualmente todas las células presentes en cada foto. Luego se realizó la sumatoria de los valores provenientes de fotos provenientes de la misma región y mismo animal, para tener un único valor que engloba el número total de células para cada condición. Los datos se expresaron como número de células por unidad de área, en relación a cada región evaluada.

5.7.2. Análisis morfológico de la GRDD

Se eligieron dos parámetros de tamaño para evaluar la morfología de los cultivos, el área y el largo celular. Estos parámetros también fueron estudiados utilizando las mismas fotografías del punto anterior en el programa Fiji (ImageJ). En todos los casos se midió de forma manual el tamaño de todas las células presentes en cada fotografía. Para ello se trazó en cada célula el perímetro a mano alzada con la herramienta de dibujo del programa para delimitar el área y una línea recta de extremo a extremo (el de mayor longitud posible) para definir como el largo celular (Fig. 9). Posteriormente se extrajeron los valores numéricos con la herramienta de medición automática con la escala previamente configurada para cada fotografía. Los datos fueron promediados por región y por experimento y posteriormente expresados en gráficos de barras.

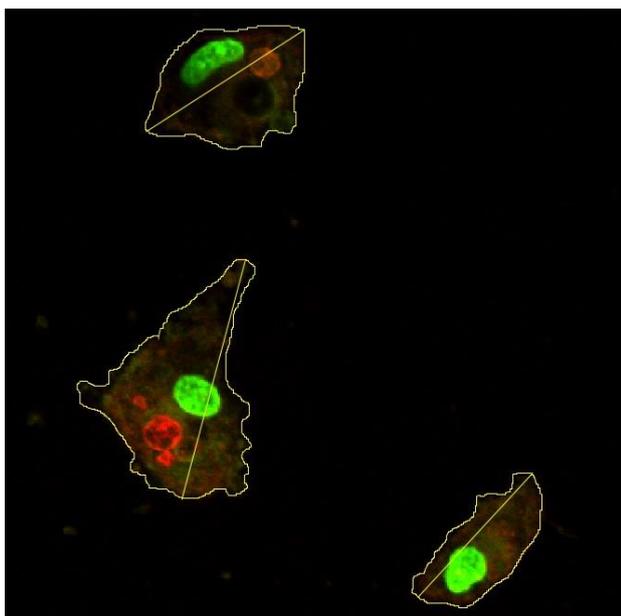


Figura 9: Imagen representativa sobre el análisis morfológico de los cultivos. Se muestra a modo de ejemplo un recorte de tres células marcadas con naranja de acridina y en amarillo se muestran las líneas trazadas para definir el área y el largo de cada célula sobre las cuales se extrajeron las medidas morfológicas

5.7.3. Determinación de la estirpe celular de la GRDD

Se evaluó la expresión de Iba-1, IB4, S100 β , GFAP y Cx43 contando manualmente la cantidad de células positivas para cada marcador de igual forma que en el punto anterior. Los datos se expresaron como porcentaje de células positivas para cada marcador específico en relación al número de células totales positivas para α -Tub.

5.7.4. Evolución temporal del número de células en cultivo

Los datos sobre el número de células en cultivo obtenidos a través de los conteos seriados a diferentes tiempos *in vitro* se graficaron como el porcentaje de células por pocillo respecto al número de células plaqueadas inicialmente en función de la cantidad de días en cultivo. Se realizaron cuatro experimentos independientes para este propósito que fueron representados gráficamente como grupos de datos separados pero superpuestos.

Por otro lado, la expresión de los diferentes marcadores celulares se determinó contabilizando el número de células de la misma forma que en el punto 5.7.1 con el programa Fiji. Se estableció el porcentaje de células que expresan cada marcador específico y se expresaron los datos de igual forma que en el punto anterior.

5.7.5. Viabilidad de PC12 en cocultivo

Para determinar la viabilidad de células PC12 en los diferentes tipos de cocultivo se cuantificó el número de células positivas para Tub-III y se graficó en función del tipo de sustrato de cada experimento (colágeno, glía mixta o GRDD).

5.7.6. Inflamación en ratas inyectadas con 6-OHDA

Para evaluar el nivel de inflamación medido por la reactividad glial se seleccionaron dos parámetros: el porcentaje de área ocupada por la señal (%Area) y la intensidad de la señal (MGV por sus siglas en inglés). En análisis se realizó con el programa Fiji y para ello primero se importaron las imágenes y se cambió el tipo de imagen a 8-bit. Luego se midió automáticamente en cada foto el MGV dentro de dos cuadrados distintos con la herramienta de medición, un primer cuadrado que engloba la totalidad de la foto y un segundo cuadrado más pequeño que cubriera un área donde no había señal.

Esto permitió tener un valor de intensidad de la señal total junto con un valor de señal de fondo específicos para cada fotografía que finalmente se convirtió en un valor de intensidad total al restar la señal de fondo.

Por otro lado, para medir el %Area se utilizó la misma herramienta de medición que para el parámetro anterior, solo que fue necesario establecer un umbral para cada foto. El umbral determina qué píxeles se considerarán parte del área de interés y cuáles no. Para ajustarlo es necesario decidir manualmente qué secciones de la imagen de trabajo tienen señal y elegir los valores más adecuados para optimizar el análisis de las imágenes. Se utilizó el mismo umbral para todas las imágenes provenientes del mismo animal.

Luego los datos fueron expresados en gráficos de barras para su análisis comparativo.

5.7.7. Comportamiento

Sobre los videos grabados durante el test de cilindro, se cuantificó el número de veces que el animal tocó la pared del cilindro con cada pata delantera cuando se alza sobre sus patas traseras (los "rearings") sólo en los primeros 3 minutos de grabación, a partir del momento en el que el animal ingresa al cilindro. Luego los datos se expresaron como el porcentaje de veces que el animal utiliza su pata afectada por la lesión (pata izquierda) en relación al número de toques totales (usos de la pata izquierda sumado a las veces que utiliza la pata derecha no afectada por la lesión). Por otro lado, a partir de los datos obtenidos mediante el test de rotación, se calculó el porcentaje de giros ipsilaterales a la inyección y se graficó ese valor para cada tipo de tratamiento.

5.7.8. Integridad de la vía nigro-estriatal

5.7.8.1. Conteo de las neuronas dopaminérgicas en la SN

Para evaluar la integridad de la vía nigro-estriatal se cuantificó el número de neuronas dopaminérgicas a nivel de la SN mediante el mismo procedimiento que en el punto 5.7.1.

5.7.8.2. Cuantificación de las fibras dopaminérgicas en el CE

Como una aproximación para evaluar la degeneración de axones dopaminérgicos, se realizó la cuantificación de la disminución de axones dopaminérgicos remanentes en el CE, mediante la utilización de imágenes de inmunohistoquímica con DAB para TH y se cuantificó el porcentaje de área ocupada por la señal TH positiva.

Utilizando el programa Fiji se siguieron los mismos pasos que en el punto 5.7.6 con la salvedad de que para seleccionar el área de tejido a cuantificar se utilizó la herramienta de polígono para delimitar los bordes del CE. Una vez seleccionada el área a medir abarcando todo CE dorsal, lateral y medial, se ajustó el umbral de la imagen a escala de blancos y negros y se obtuvo el porcentaje de área ocupada por la señal TH positiva.

5.7.9. Estadística

El análisis estadístico de los datos fue realizado con el programa GraphPad Prism 8. Para las comparaciones entre dos conjuntos de datos se utilizó el test *t* de Student, mientras que para comparar tres o más conjuntos de datos entre sí se utilizó el análisis de varianza de una sola vía (One-way ANOVA) seguido del test de comparaciones múltiples de Tukey. Se consideraron como significativas las diferencias entre grupos con valores de $p < 0,05$ y se representaron los valores gráficamente como la media \pm SEM (error estándar de la media).

6. RESULTADOS

6.1. Microambiente neurodegenerativo a los 3 días del tratamiento con 6-OHDA

En la Fig. 10 se muestran los resultados de ensayos inmunohistoquímicos sobre cortes histológicos de 30 μm de espesor de animales inyectados unilateralmente con 12 μg de 6-OHDA a nivel de la SN al tercer día de la lesión (Fig. 10A). En estos experimentos se estudió, por un lado, la expresión de marcadores astrocíticos (GFAP y S100 β) y microgliales (Iba-1), cuya variación se utilizó como indicador de neuroinflamación (Fig. 10A y B, n=3) y por el otro lado, la expresión de TH a nivel de la SN (n=8) y el CE (n=6) para determinar el grado de neurodegeneración (Fig. 10C).

Los resultados muestran que el tratamiento con 6-OHDA induce un aumento significativo en la expresión de Iba-1 en la SN ipsilateral comparado con el lado contralateral (Fig. 10B), siendo la intensidad 1,9 veces más alta (11,3 \pm 1,3 ipsilateral vs. 6,1 \pm 0,9 contralateral) y el área ocupada por la señal 3,7 veces mayor (4,8 \pm 0,8 ipsilateral vs. 1,3 \pm 0,7 contralateral). Por otro lado, los marcadores de astrocitos también exhiben una tendencia similar donde la intensidad y el área ocupada por la señal son mayores del lado ipsilateral (Fig. 10B), pero esta diferencia es estadísticamente significativa solo en el caso del área ocupada por GFAP que muestra ser 2,3 veces mayor del lado lesionado (16,6 \pm 2,5 ipsilateral vs. 7,1 \pm 1,4 contralateral). En el caso de la intensidad de GFAP, la tendencia es a ser 1,8 veces mayor del lado inyectado (26,8 \pm 7,7 ipsilateral vs. 14,5 \pm 4,0 contralateral), mientras que para S100 β el área es 2,3 veces más grande (6 \pm 2,8 ipsilateral vs. 2,6 \pm 1,3 contralateral) y la intensidad es 1,7 veces mayor (18,7 \pm 5,4 ipsilateral vs 10,9 \pm 1,2 contralateral), arrojando una tendencia bien marcada, aunque no estadísticamente significativa para este número de experimentos.

En la Fig. 10C se observan cortes coronales enteros, representativo de cerebros de ratas inyectadas unilateralmente con 6-OHDA, sobre los que se determinó el número de células dopaminérgicas a nivel de la SN (n=8) y el área ocupada por sus terminales dopaminérgicas a nivel del CE (n=6). Los resultados de la cuantificación indican que si bien al tercer día de realizado el tratamiento con la toxina hay una tendencia a la reducción del número de neuronas dopaminérgicas en la SN (75 \pm 20 ipsilateral vs. 126 \pm 14 contralateral) y una consecuente disminución en el área ocupada por sus terminales dopaminérgicas en el CE (48,2 \pm 13,2 ipsilateral vs. 73,5 \pm 11,9 contralateral), esta degeneración ipsilateral de la vía nigro-estriatal no es estadísticamente significativa.

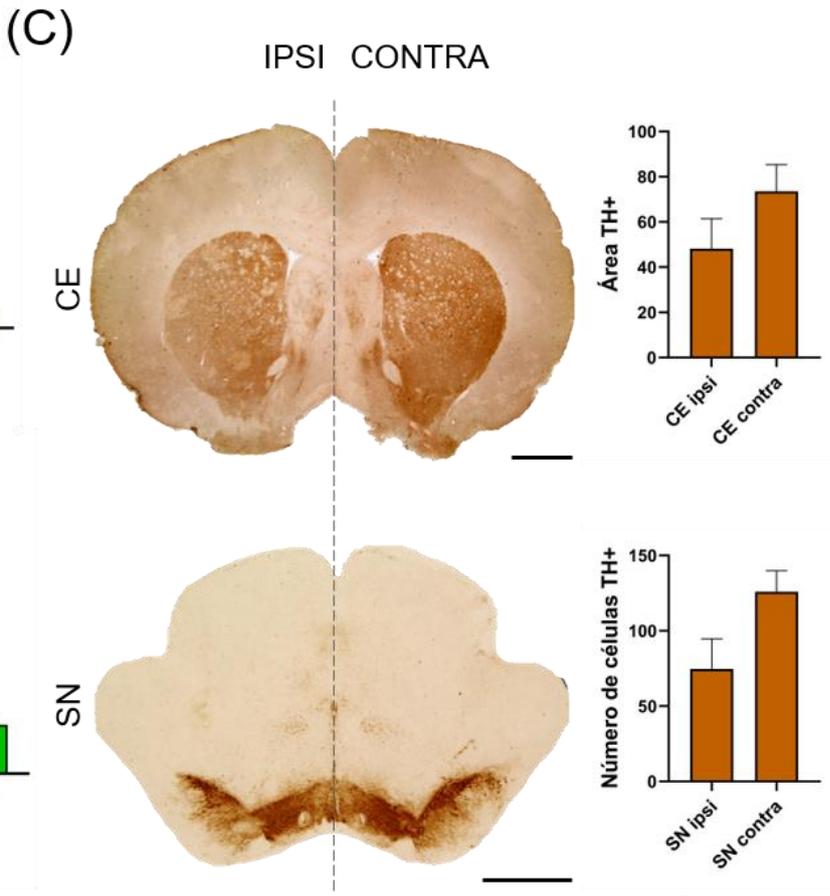
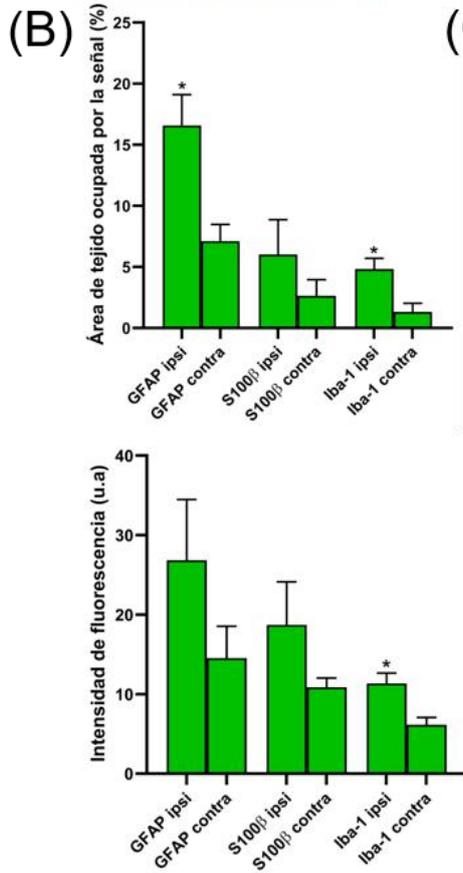
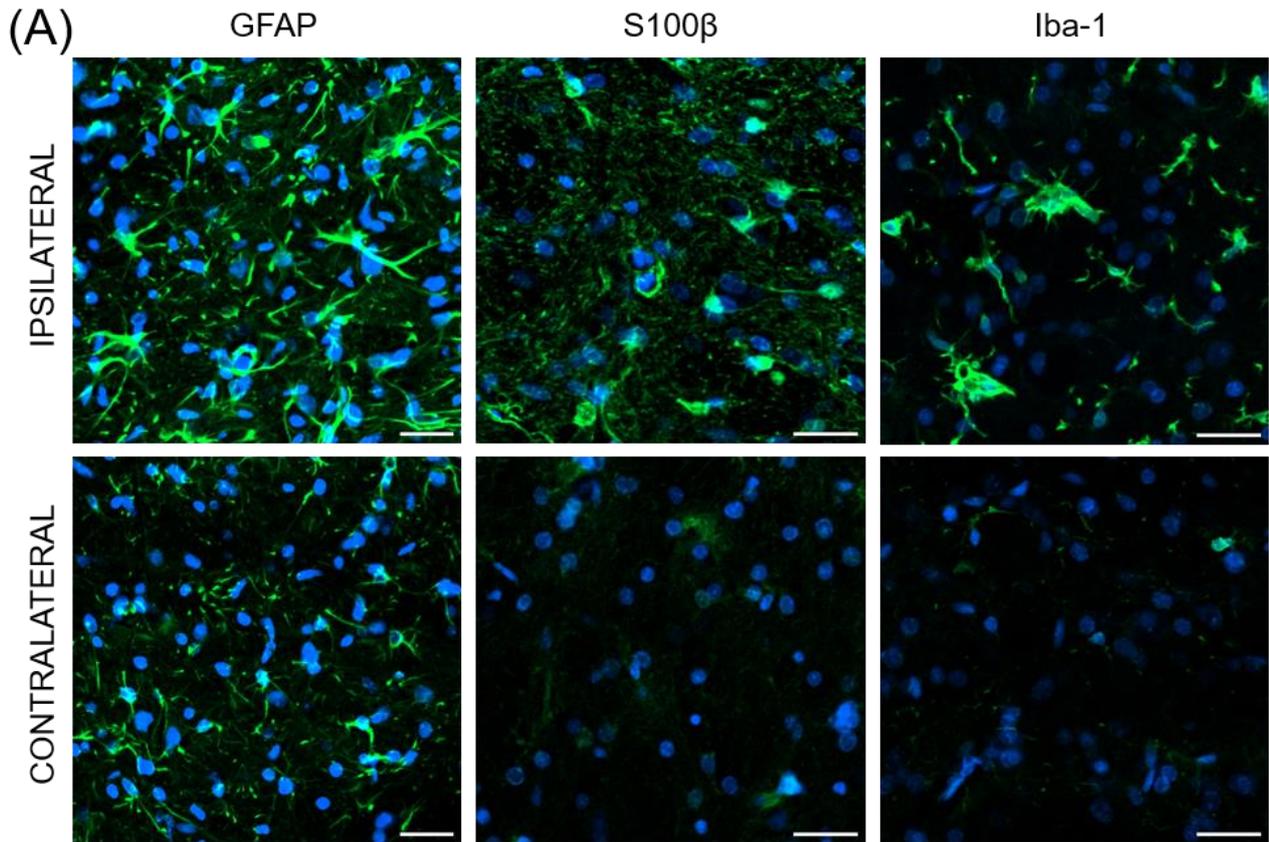


Figura 10: SN de ratas inyectadas unilateralmente con 6-OHDA a los tres días de la lesión. En (A) se observan imágenes representativas de cortes coronales de la SN de ratas tratadas con una dosis de 12 μ g de 6-OHDA, donde se ven marcados en verde astrocitos (GFAP y S100 β) y microglías (Iba-1) como indicadores

de neuroinflamación y en azul los núcleos celulares teñidos con Hoechst. En los tres paneles superiores se muestran imágenes provenientes del lado lesionado (ipsilateral/ipsi) y en los tres paneles inferiores las del lado no inyectado (contralateral/contra). Escala=30 μm . En **(B)** se muestra gráficamente el análisis de las imágenes anteriores, donde se cuantificó la intensidad de la señal y el área ocupada por ella para cada marcador (n=3). * = $p < 0.05$ respecto al mismo marcador del lado contrario. En **(C)** se observan sobre la izquierda cortes coronales de la SN y el CE de ratas tratadas con 6-OHDA, donde se ven marcadas en color marrón las neuronas dopaminérgicas a nivel de la SN y sus respectivas terminales a nivel del CE. En ambos cortes el lado lesionado (ipsi) es el de la izquierda y el lado contrario es el no inyectado o control (contra). Escala = 2 mm. A la derecha de los cortes se muestra la cuantificación de la señal observada para cada región, donde se determinó la integridad de la vía nigroestriatal, evaluando el número de células dopaminérgicas a nivel de la SN (n=8) y el área ocupada por sus terminales dopaminérgicas a nivel del CE (n=6). 6-OHDA: 6-hidroxidopamina. CE: cuerpo estriado. GFAP: proteína ácida fibrilar glial. Iba-1: molécula adaptadora de unión de calcio ionizado 1. S100 β : proteína B fijadora de calcio S100. SN: sustancia nigra.

6.2. Caracterización *in vitro* de los cultivos primarios de SN, CE y Hc de ratas tratadas con 6-OHDA

6.2.1. Rendimiento de los cultivos

A los tres días de la cirugía estereotáxica, se procesaron ratas adultas (machos y hembras) inyectadas unilateralmente a nivel de la SN con 6 o 12 μg de 6-OHDA para obtener cultivos primarios de células gliales. A partir de estos cerebros se cultivaron muestras de tejido tanto del sitio lesionado (SN), como de regiones asociadas (CE) o control (Hc), que fueron mantenidas *in vitro* durante tres días para la posterior cuantificación del número de células obtenidas a partir de cada región y condición (Fig. 11).

En la Fig. 11A se pueden observar imágenes representativas de las células que surgieron a partir de los cultivos previamente mencionados, teñidas con el colorante naranja de acridina, donde a simple vista se puede apreciar que si bien la morfología y patrón de marcación de las células parece ser muy similar en todas las regiones tanto del lado ipsilateral a la inyección de 6-OHDA como del lado contralateral, hay una clara diferencia en cuanto al número de células obtenidos a partir de la SN ipsilateral respecto a todas las demás condiciones. Ese tipo de imágenes se utilizaron para hacer cuantificaciones sobre el rendimiento de los cultivos y esos datos se evaluaron en relación al sexo de los animales y la dosis de toxina utilizada (Fig. 11B).

Los resultados de estos experimentos mostraron que, el número de células evaluado en función del sexo de los animales, no presenta diferencias significativas entre machos y hembras comparando los datos provenientes de igual región y condición (SN ipsilateral machos, n=6, 132 ± 40 céls. vs. SN ipsilateral hembras, n=4, 151 ± 63 céls.; SN contralateral machos, n=6, 28 ± 10 céls. vs. SN contralateral hembras, n=4, 32 ± 11 céls.; CE ipsilateral machos, n=4, 68 ± 14 céls. vs. CE ipsilateral hembras, n=4, 56 ± 16 céls.; CE contralateral machos, n=4, 27 ± 3 céls. vs. CE contralateral hembras, n=4, 24 ± 9 céls.; Hc ipsilateral machos, n=4, 29 ± 4 céls. vs. Hc ipsilateral hembras, n=4, 49 ± 20 céls.; Hc contralateral machos, n=4, 29 ± 3 céls. vs. Hc contralateral hembras, n=4, 36 ± 13 céls.). A su vez, el número de células obtenidas a partir de la SN y el CE ipsilateral es mayor en comparación a su contraparte control y también en relación a las células obtenidas del Hc de ambos lados, para ambos sexos, pero es estadísticamente significativa solo en machos, probablemente debido a un menor número experimental en hembras y un consecuente mayor desvío de los datos. En base a esto, determinamos que el rendimiento de los cultivos manifiesta el mismo patrón, independientemente del sexo del animal y por ello se utilizaron machos y hembras indiferentemente para el resto de los experimentos.

En cuanto al rendimiento de los cultivos en relación a la dosis de 6-OHDA utilizada, se observó que duplicar la dosis de la toxina produce un aumento exponencial del rendimiento de los cultivos para todas las regiones y condiciones evaluadas (SN ipsilateral 6 μg , n=10, 140 ± 33 vs. SN ipsilateral 12 μg , n=3, 4116 ± 709 ; SN contralateral 6 μg , n=10, 30 ± 7 vs. SN contralateral 12 μg , n=3, 163 ± 11 ; CE

ipsilateral 6 μg , n=8, 62 ± 10 vs. CE ipsilateral 12 μg , n=3, 547 ± 43 ; CE contralateral 6 μg , n=8, 26 ± 4 vs. CE contralateral 12 μg , n=3, 167 ± 61 ; Hc ipsilateral 6 μg , n=8, 39 ± 10 vs. Hc ipsilateral 12 μg , n=3, 303 ± 71 ; Hc contralateral 6 μg , n=8, 33 ± 6 vs. Hc contralateral 12 μg , n=3, 228 ± 57). A su vez, la diferencia entre la SN ipsilateral y contralateral para la dosis de 6 μg es de 4,7 veces mayor del lado inyectado, mientras que para la dosis de 12 μg el número de células de la SN ipsilateral es 25,3 veces mayor que su contraparte control. Algo similar pero no tan marcado sucede en el caso del CE, donde el rendimiento del cultivo del lado inyectado es 2,4 y 3,3 veces mayor del lado tratado con 6-OHDA, para la dosis de 6 y 12 μg respectivamente. El Hc no muestra diferencias significativas según la condición para ninguna de las dos dosis estudiadas.

En resumen, el número de células obtenidas del entorno degenerativo de la SN fue significativamente mayor en comparación con el del lado control, independientemente del sexo del animal. Lo mismo sucedió con el rendimiento de los cultivos del CE, aunque en menor medida, dado que el número de células obtenidas fue menor que el obtenido de la SN. Estos efectos se vieron fuertemente potenciados al duplicar la dosis de 6-OHDA, no solo induciendo un aumento general del número de células obtenido en todas las regiones, sino que quintuplicando el cociente de relación ipsilateral/contralateral para la SN. En base a los datos obtenidos, se seleccionó la dosis de 12 μg de 6-OHDA tanto en machos como en hembras para el resto de los experimentos.

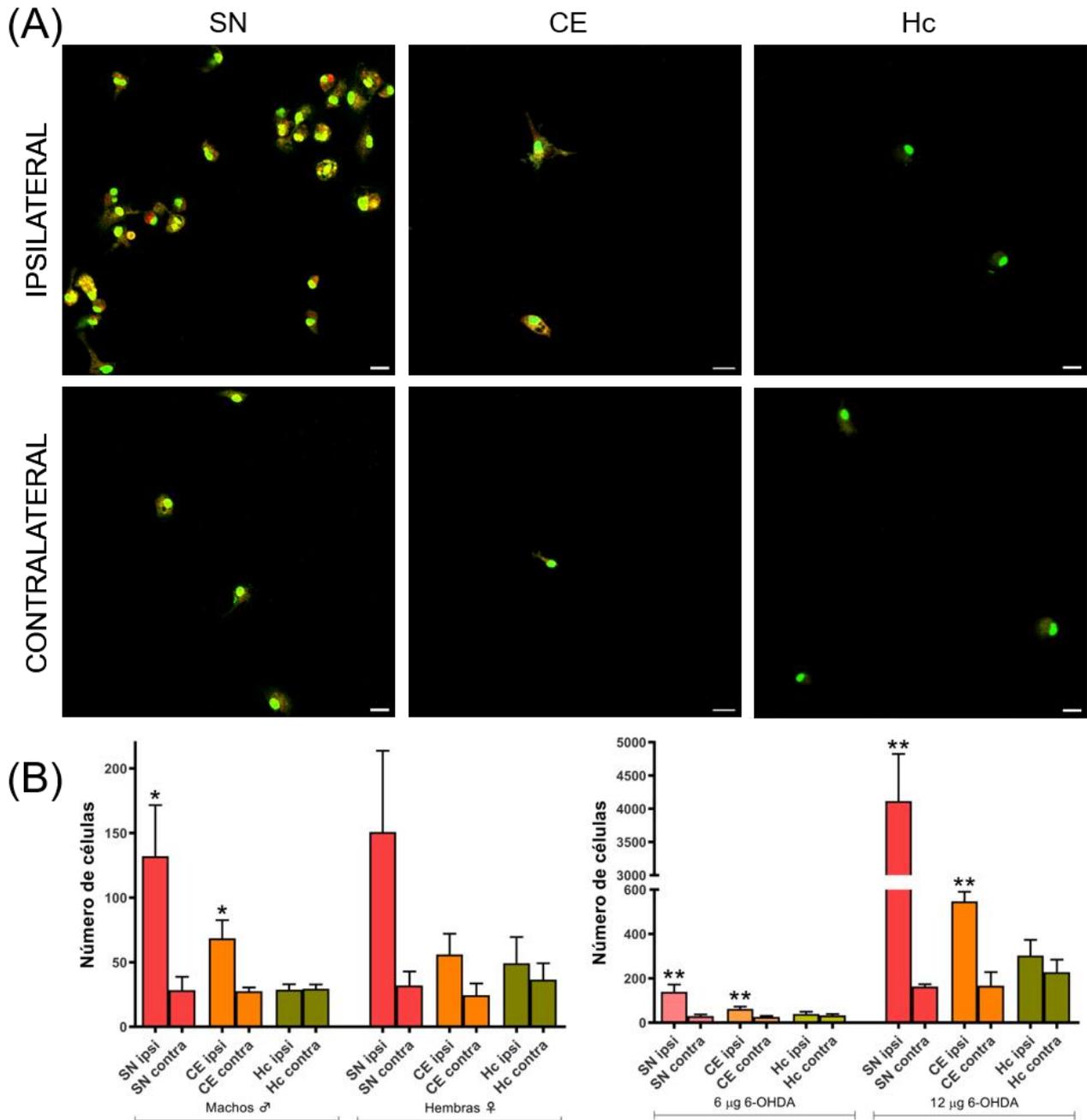
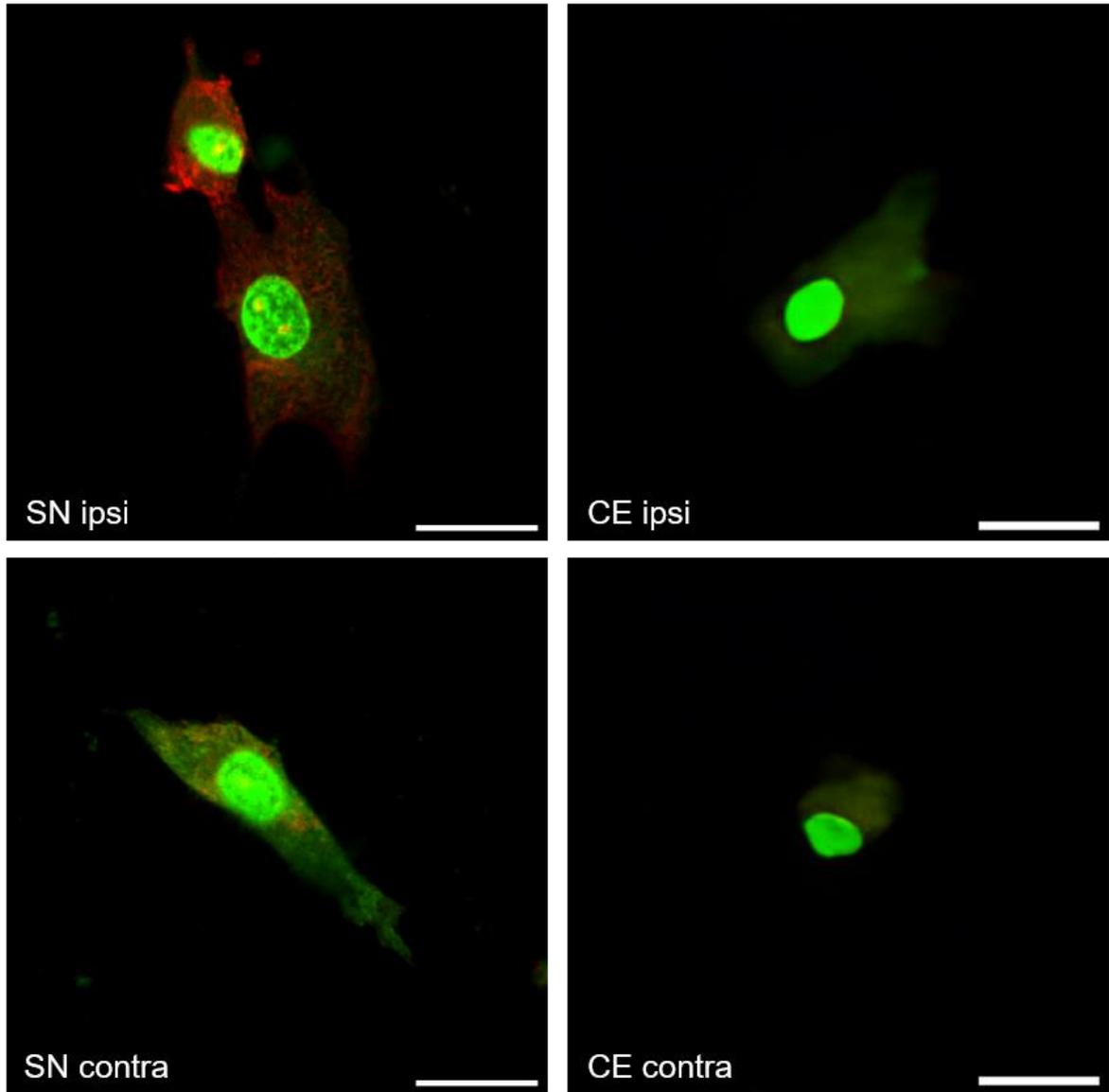


Figura 11: Cultivos celulares obtenidos de ratas inyectadas unilateralmente con 6-OHDA al tercer día *in vitro*. En (A) se observan imágenes representativas de células cultivadas a partir de la SN, el CE y el Hc, teñidas con el colorante naranja de acridina. En los tres paneles superiores se encuentran las células obtenidas del lado inyectado con 6-OHDA (ipsilateral/ipsi) para cada región y en los tres paneles inferiores las provenientes del lado no inyectado (contralateral/contra). Escala = 20 µm. En (B) se muestran representaciones gráficas sobre el rendimiento del cultivo calculado como el número de células obtenidas en cada región y condición, en un área de 4,16 mm². En el gráfico de la izquierda se compara el rendimiento de los cultivos obtenidos a partir de machos (n=6 para SN y n=4 para CE y Hc) o hembras (n=4 para todas las regiones) tratados con una dosis de 6 µg de 6-OHDA. En el gráfico de la derecha se compara el rendimiento de los cultivos obtenidos a partir de ratas tratadas con una dosis de 6 µg (n=10 para SN y n=8 para CE y Hc) o 12 µg (n=3 para todas las regiones) de 6-OHDA, independientemente del sexo. * = p<0.05 y ** = p<0.01 en relación a los datos del lado contralateral. 6-OHDA: 6-hidroxidopamina. CE: cuerpo estriado. Hc: hipocampo. SN: sustancia nigra.

6.2.2. Morfología de las células obtenidas en cultivo

Se analizaron características morfológicas de las células obtenidas en cultivo y teñidas con naranja acridina (Fig. 12). Mediante observaciones a simple vista se pudo apreciar que al tercer día *in vitro*, las células gliales en cultivo presentan una apariencia mayoritariamente ameboide que no parecen estar en contacto estrecho entre sí, aunque en algunos casos se puede distinguir algún proceso celular corto o formas levemente más alargadas (Fig. 12A). Al medir el tamaño de estas células (Fig. 12B), se pudo determinar que tienen un largo de ~20-35 μm (SN ipsilateral, n=10, 28 ± 2 μm ; SN contralateral, n=8, 25 ± 3 μm ; CE ipsilateral, n=8, 30 ± 3 μm ; CE contralateral, n=8, 28 ± 4 μm ; Hc ipsilateral, n=8, 25 ± 4 μm ; Hc contralateral, n=8, 24 ± 2 μm) y un área de ~250-500 μm^2 (SN ipsilateral, n=10, 434 ± 71 μm^2 ; SN contralateral, n=8, 393 ± 82 μm^2 ; CE ipsilateral, n=8, 418 ± 72 μm^2 ; CE contralateral, n=8, 347 ± 55 μm^2 ; Hc ipsilateral, n=8, 313 ± 71 μm^2 ; Hc contralateral, n=8, 308 ± 42 μm^2). Interesantemente, las células provenientes de la SN y el CE ipsilateral a la inyección son levemente más grandes que las del lado contralateral, mostrando una diferencia moderada pero estadísticamente significativa en los parámetros evaluados, donde las células de la SN son mínimamente más largas y las del CE tienen un área un mayor.

(A)



(B)

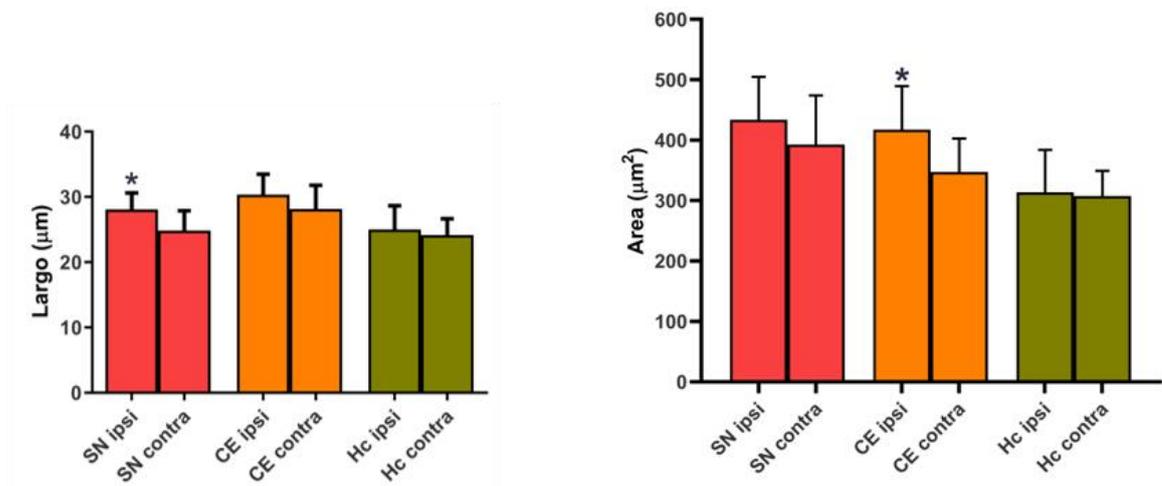


Figura 12: Morfología de las células cultivadas a partir de ratas inyectadas unilateralmente con 6-OHDA al tercer día *in vitro*. En (A) se observan imágenes representativas de células cultivadas a partir de la SN y el

CE del lado de la lesión (ipsi) con 6-OHDA y del lado control (contra), teñidas con el colorante naranja de acridina. Escala=20µm. En **(B)** se muestran los resultados del análisis morfológico de las células provenientes de la SN (n=10), del CE (n=8) y del Hc (n=8), donde se utilizó el área y el largo celular como parámetros para evaluar el tamaño de las células. * = p<0.05. 6-OHDA: 6-hidroxidopamina. CE: cuerpo estriado. Hc: hipocampo. SN: sustancia nigra.

6.2.3. Fenotipo celular de la GRDD al tercer día *in vitro*

Se evaluó el fenotipo celular de la GRDD estudiando la presencia de marcadores astrocíticos (GFAP, S100β y Cx43) y microgliales (Iba-1 e IB4). Sorprendentemente, en lugar de poder determinar la pertenencia a una única estirpe celular, los resultados de la Fig. 13 indican que la mayoría de las células son positivas tanto para ambos grupos de marcadores (GFAP, n=17, 83±6%; Cx43, n=13, 88±4%; S100β, n=4, 65±7%; IB4, n=13, 97±2%; Iba-1, n=4, 100±0%), cuantificado como el porcentaje de células positivas para cada marcador en relación al número de células totales marcadas con α-tub.

En cuanto a las características de la señal para cada proteína, se pudo observar que mientras los marcadores de microglía exhiben una señal intensa de distribución difusa por todo el citoplasma, los marcadores de astrocitos presentan una distribución diferencial. En particular, es muy interesante la señal de GFAP, que está organizada en paquetes agregados distribuidos en procesos filamentosos e irregulares que parecen estar concentrados en la periferia de las células y entrar en contacto con células vecinas. Por otro lado, la señal de Cx43 se muestra mayoritariamente limitada a agregados que forman botones a nivel de la membrana plasmática y S100β muestra una señal difusa de baja intensidad.

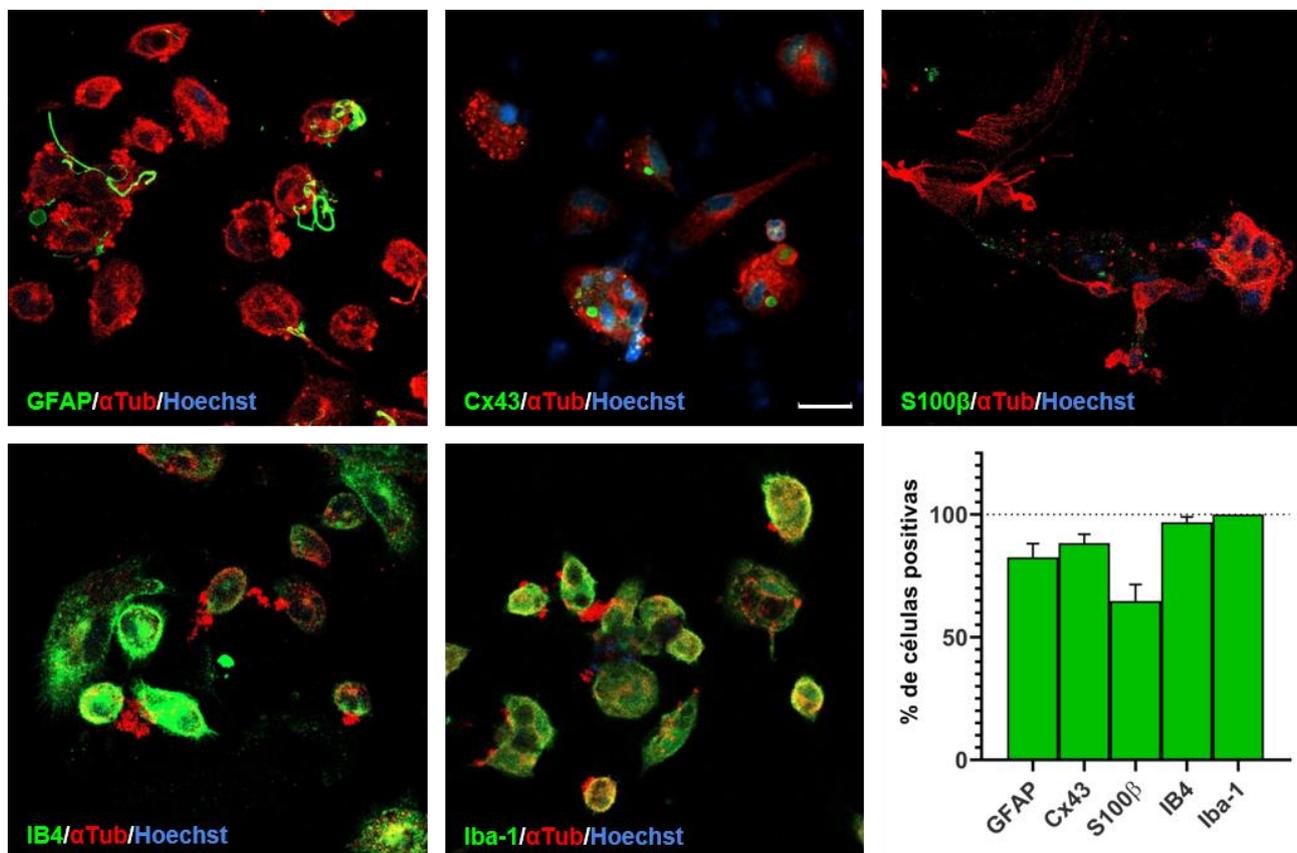


Figura 13: Fenotipo de las células obtenidas del ambiente neurodegenerativo al tercer día en cultivo. Se muestran imágenes representativas de la GRDD obtenida a partir de la SN dañada con 6-OHDA, marcadas con marcadores gliales clásicos (GFAP [n=17], Cx43 [n=13], S100β [n=4], IB4 [n=13] e Iba-1 [n=4]) en verde, α-tub en rojo y núcleos celulares teñidos con Hoechst en azul. Escala = 20 micras. En la esquina inferior derecha se encuentra la cuantificación del porcentaje de GRDD positiva para cada marcador glial respecto al

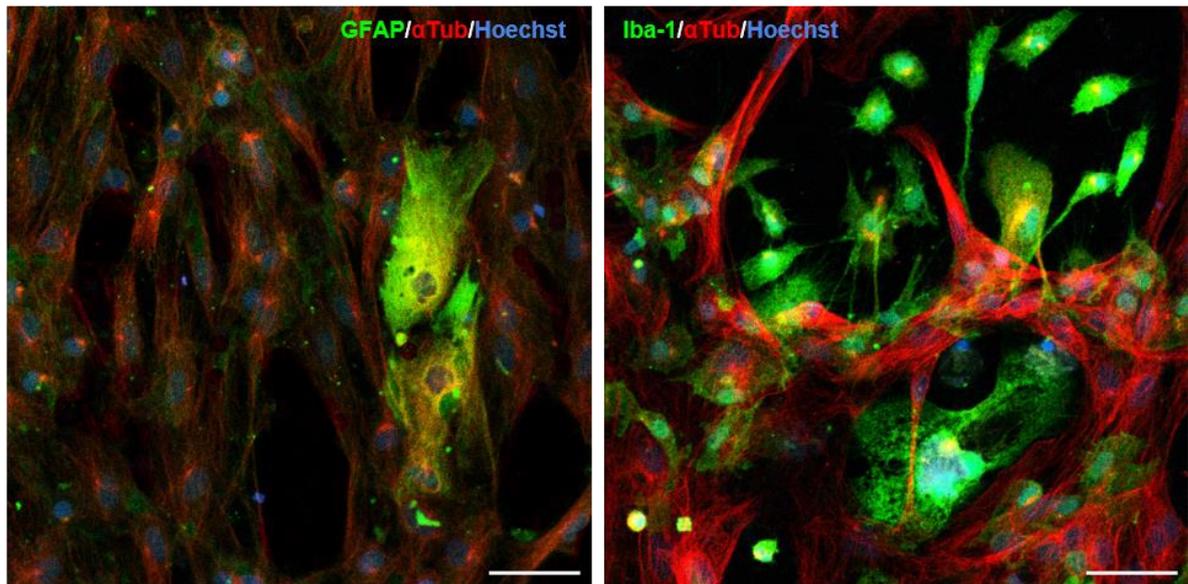
número de células totales marcadas con α -tub. 6-OHDA: 6-hidroxidopamina. Cx43: Conexina 43. GRDD: glía reactiva derivada del daño. GFAP: proteína ácida fibrilar glial. IB4: Isolectina B4. Iba-1: molécula adaptadora de unión de calcio ionizado 1. S100 β : proteína B fijadora de calcio S100. SN: sustancia nigra. α -tub: alfa-tubulina.

6.2.4. Evolución temporal del cultivo de GRDD

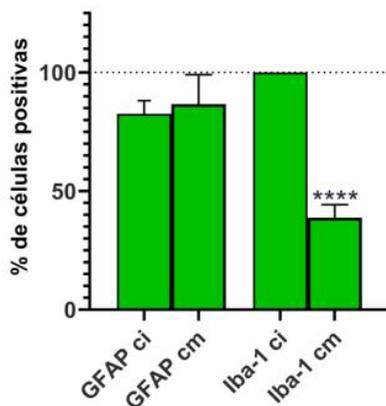
Los resultados obtenidos al analizar la evolución temporal del cultivo de GRDD, muestran una dinámica interesante, manifestada como cambios en el número de células mantenidas en cultivo a diferentes tiempos *in vitro* y también en su fenotipo una vez alcanzada la confluencia luego de 14-17 días en cultivo en relación a los datos obtenidos al día tres (Fig. 14). En la Fig. 14A se puede observar la apariencia del cultivo maduro (14-17 días *in vitro* -DIV-) y su inmunorreactividad para marcadores gliales, donde a simple vista se pueden apreciar claros cambios en el tamaño y desarrollo de las células, además de que se las ve más estrechamente vinculadas entre sí, en relación a lo observado en los cultivos inmaduros (3 DIV). En la Fig. 14B se observa que en los cultivos maduros ($n=2$), el porcentaje de células positivas para GFAP es del $86,6 \pm 12,4\%$, mientras que el porcentaje de células positivas para Iba-1 es del $38,8 \pm 5,5\%$. Al contrastar estos datos con los provenientes de los cultivos inmaduros, se pudo determinar que si bien el porcentaje de células positivas para GFAP no es significativamente diferente entre las células de 3 DIV y las de 14-17 DIV, el porcentaje de células positivas para Iba-1 muestra una considerable disminución con el pasar del tiempo, que es estadísticamente significativa.

Por otro lado, en la Figura 14C se evidencia la variabilidad en el comportamiento temporal de los cultivos en diferentes experimentos. Dos de los experimentos muestran un declive progresivo lineal en el número de células a lo largo del tiempo, indicando una pérdida gradual de células. Sin embargo, en los otros dos experimentos se observan patrones distintos: uno muestra un decrecimiento inicial seguido de un aumento en el número de células alrededor del día 10 *in vitro*, mientras que el otro experimento exhibe un aumento progresivo en el número de células al principio, seguido de una caída en el día 12 que en al final del periodo estudiado tiende a igualarse con el número de células de partida.

(A)



(B)



(C)

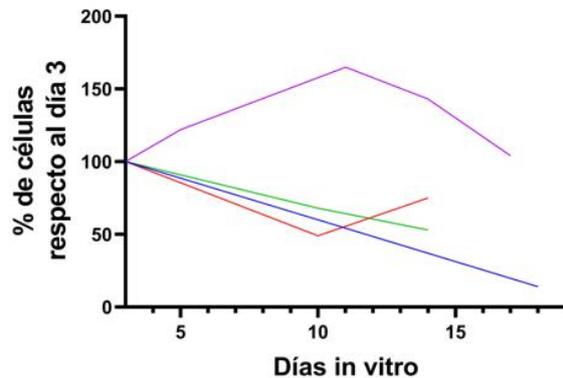


Figura 14: Evolución temporal de la GRDD mantenida en cultivo. En (A) se muestran imágenes representativas de ensayos de inmunocitoquímica sobre las células obtenidas del ambiente neurodegenerativo luego de ser mantenidas durante dos semanas *in vitro* (cultivo maduro, cm). La inmunorreactividad observada corresponde a Iba-1 y GFAP en verde como marcadores gliales, α -tub en rojo como marcador constitutivo y en azul los núcleos celulares teñidos con Hoechst. Escala = 50 micras. En (B) se observa gráficamente la cuantificación del porcentaje de GRDD positivas para cada marcador glial respecto al número de células totales marcadas con α -tub en el cm (n=2), en comparación a lo observado en el cultivo inmaduro (ci [n=17 para GFAP y n=4 para Iba-1], tres días *in vitro*). **** = p<0,0001 respecto al porcentaje de células positivas para el mismo marcador a los tres días en cultivo. En (C) se muestra gráficamente el cambio en el número de GRDD que sobreviven y se mantienen en cultivo en función del tiempo para experimentos independientes (n=4). 6-OHDA: 6-hidroxidopamina. GRDD: glía reactiva derivada del daño. GFAP: proteína ácida fibrilar glial. Iba-1: molécula adaptadora de unión de calcio ionizado 1. SN: sustancia nigra. α -tub: alfa-tubulina.

6.3. Potencial neurotóxico *in vitro* de la GRDD

Como se muestra en la Figura 15, los resultados obtenidos muestran una reducción significativa en la viabilidad de las células PC12 cuando se cultivan con GRDD en comparación a las células PC12 crecidas sobre colágeno o glía mixta normal. Específicamente, el promedio del número de células PC12 presentes en la unidad de área cuantificada es significativamente menor en los cocultivos con GRDD, con un valor de $2 \pm 0,4$ (n=9), en comparación con 9 ± 1 para colágeno (n=12) y 7 ± 1 para glía mixta normal (n=8).

A su vez, al analizar en detalle los cocultivos de GRDD con PC12, se observa que la GRDD positiva para Iba-1 presenta inclusiones intracelulares positivas para β -tubIII, marcador de células PC12. Estas inclusiones muestran una distribución mayoritariamente perinuclear y también se detectan algunos agregados de esta proteína en el espacio extracelular. Por otro lado, las pocas células PC12 con apariencia viable observadas en los cocultivos con GRDD se encuentran aisladas, mientras que las que se encuentran en la cercanía de la GRDD parecen tener una mala integridad de la membrana plasmática y en algunos casos, se las observa con la GRDD que parecería estar en proceso de envolverlas.

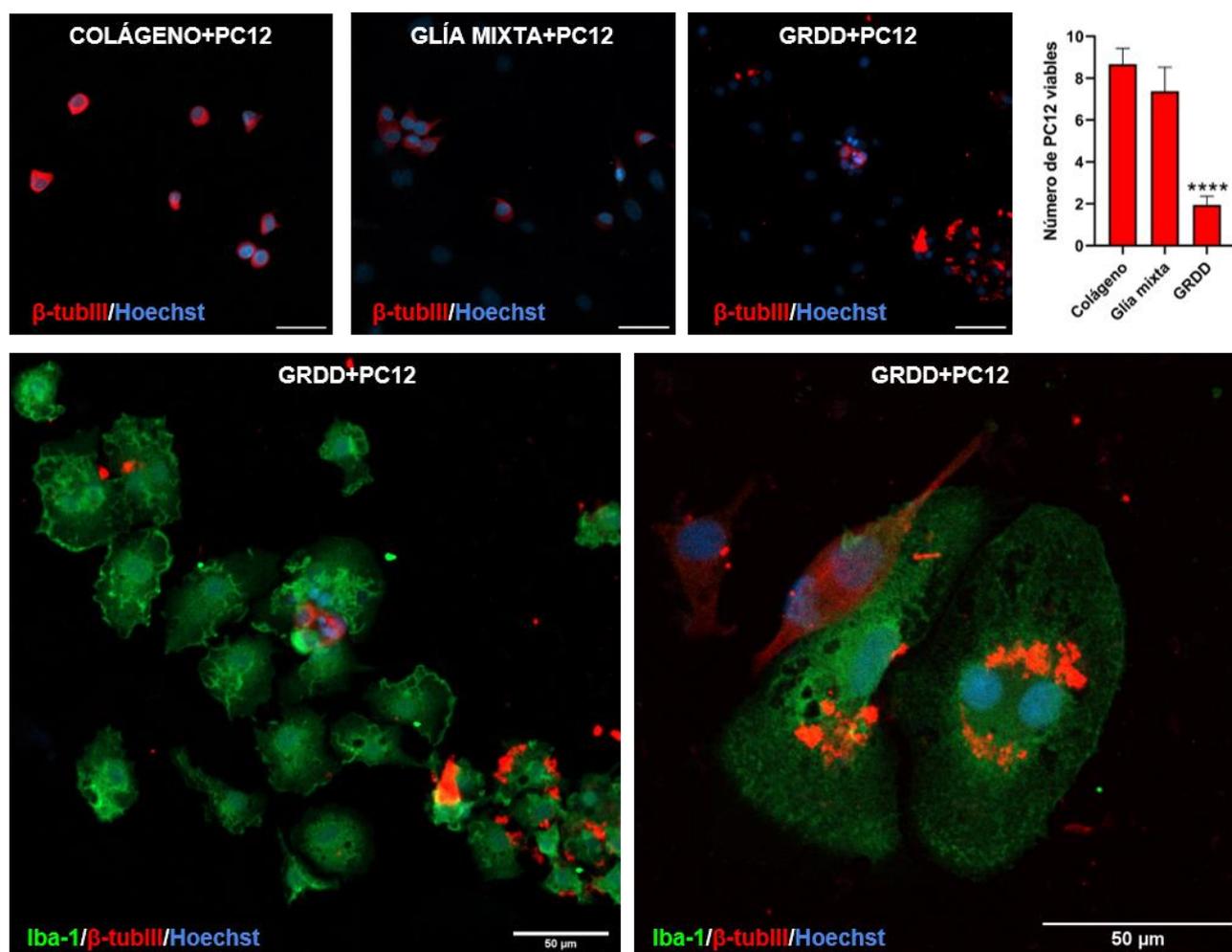


Figura 15: Sobrevida de células PC12 luego de ser cocultivadas con GRDD. En los paneles superiores se muestran imágenes representativas de cocultivos de células PC12 con GRDD o con sustratos control (colágeno y glía mixta normal). Se observan en rojo las células PC12 positivas para β -tubIII y en azul todos los núcleos celulares teñidos con Hoechst. A la derecha se encuentra la representación gráfica del número promedio de PC12 viables en un área de $0,1 \text{ mm}^2$ para cada condición ($n=12$ para colágeno, $n=8$ para glía mixta y $n=9$ para GRDD). En los paneles inferiores se muestra en mayor detalle el cocultivo GRDD+PC12 donde además de las PC12 positivas para β -tubIII, también se visualiza en verde la GRDD positiva para Iba-1. Escala = $50 \mu\text{m}$. GRDD: glía reactiva derivada del daño. Iba-1: molécula adaptadora de unión de calcio ionizado 1. β -tub III: beta-tubulina III.

6.4. Potencial neurotóxico *in vivo* de la GRDD

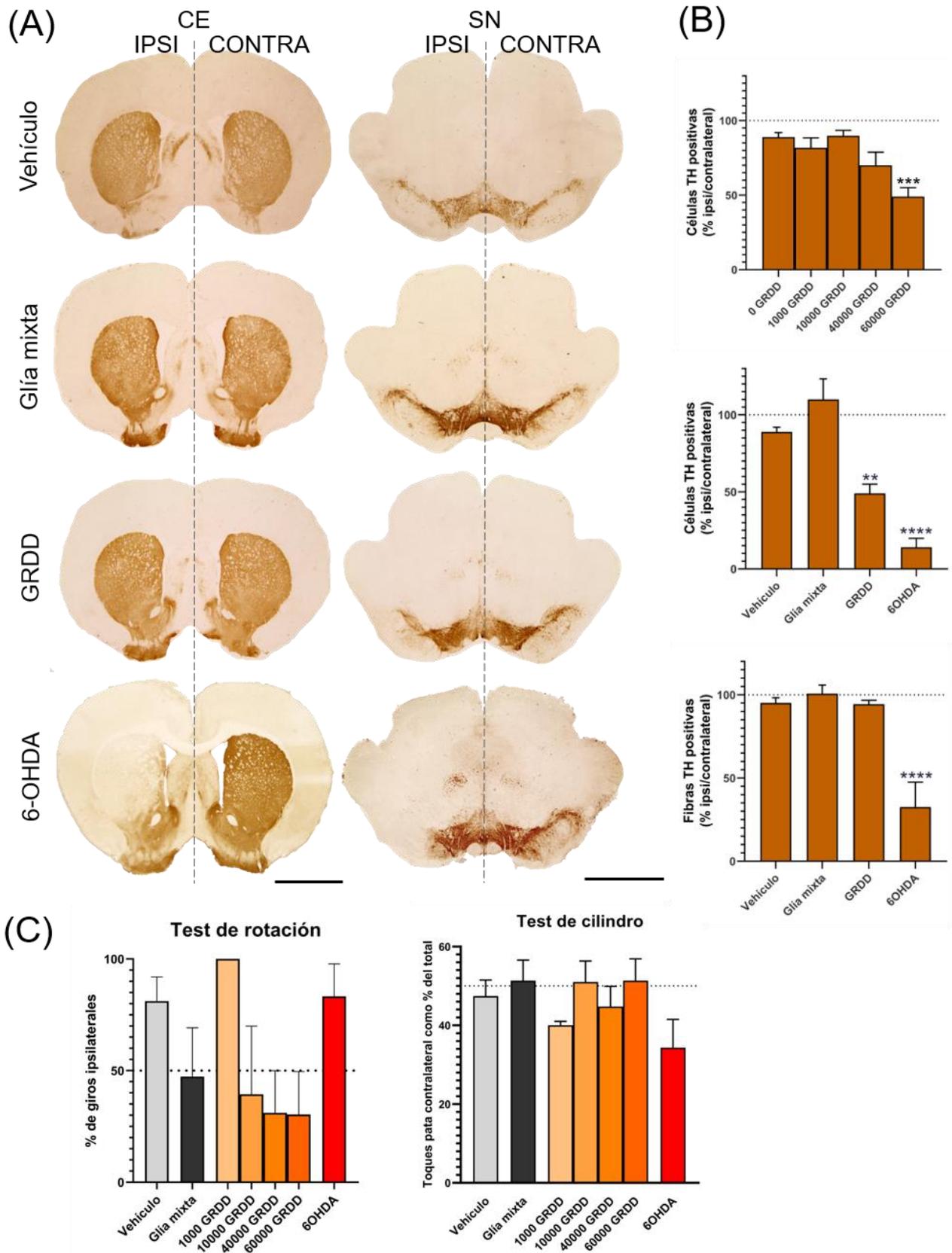


Figura 16: Integridad de la vía nigroestriatal a los 30 días de la inyección unilateral de GRDD en la SN. Se evaluaron los efectos del tratamiento con GRDD a diferentes dosis (1000 [n=4], 10000 [n=5], 40000 [n=4] y 60000 [n=3] células/inyección) y del tratamiento con vehículo (0 GRDD [n=8]), glía mixta normal (60000 células/inyección [n=3]) y 6-OHDA (12 μ g [n=4]) como inyecciones control. En **(A)** se muestran cortes coronales

de cerebro de ratas correspondientes a los cuatro tipos de tratamientos con la GRDD a la dosis máxima, donde las neuronas dopaminérgicas y sus respectivas terminales positivas para TH están marcadas en marrón en la SN y el CE respectivamente. En todos los casos el lado tratado es el que se observa sobre la izquierda del corte (ipsi) y el no tratado es el de la derecha (contra). Escala = 2 mm. En **(B)** se muestra en la gráfica superior la cuantificación del efecto sobre el número de células dopaminérgicas en la SN de las distintas dosis de GRDD. En las gráficas inferiores se muestra la cuantificación de las células y fibras dopaminérgicas correspondiente a los cuatro tipos de tratamientos con la GRDD en su dosis máxima. ** = 0,01, **** = 0,0001 respecto al vehículo. *** = $p < 0,001$ respecto a 0 GRDD. En **(C)** se muestra gráficamente el comportamiento motor de los diferentes grupos experimentales, evaluado mediante el test de rotación (izquierda) y el test de cilindro (derecha). 6-OHDA: 6-hidroxidopamina. CE: cuerpo estriado. GRDD: glía reactiva derivada del daño. SN: sustancia nigra. TH: tirosina hidroxilasa.

6.4.1. Efectos histológicos

Los resultados de la Figura 16 revelan que la inyección unilateral de 60.000 GRDD en la SN de animales desencadenó la degeneración ipsilateral de la vía nigroestriatal en comparación con el lado contralateral y con la inyección de glía mixta normal o vehículo (Fig. 16A).

En primer lugar, al evaluar el efecto de la inyección de diferentes dosis de GRDD a nivel de la SN de animales produce una disminución en el número de neuronas dopaminérgicas en la SN, expresado como porcentaje en relación al lado contralateral (Fig. 16B). Esta disminución es dosis-dependiente, siendo indetectable a dosis bajas y más pronunciada en las dos dosis más altas de GRDD, alcanzando valores estadísticamente significativos en la dosis de 60000 GRDD (0 GRDD, $n=8$, $89 \pm 3\%$; 1000 GRDD, $n=4$, $82 \pm 7\%$; 10000 GRDD, $n=5$, $90 \pm 4\%$; 40000 GRDD, $n=4$, $70 \pm 9\%$; 60000 GRDD, $n=3$, $30 \pm 19\%$). Esta degeneración ipsilateral producida por la inyección de 60000 GRDD, se validó comparando este efecto con el producido por la inyección de vehículo o igual número de glía mixta normal, que no produjeron un cambio significativo en el número de neuronas dopaminérgicas de la SN ipsilateral y también con la inyección de 6-OHDA como tratamiento modelo de neurodegeneración (vehículo, $n=8$, $89 \pm 3\%$; glía mixta normal, $n=3$, $110 \pm 13\%$; GRDD, $n=3$, $30 \pm 19\%$; 6-OHDA, $n=4$, $14 \pm 6\%$). Extrañamente, al cuantificar el área ocupada por las terminales dopaminérgicas en el CE, el único tratamiento que produjo una reducción significativa en el área ocupada por las fibras dopaminérgicas fue el de 6-OHDA, ya que no se observaron diferencias entre los otros controles y los tratamientos con GRDD en los cortes seleccionados (vehículo, $n=8$, $95 \pm 3\%$; glía mixta normal, $n=3$, $101 \pm 5\%$; GRDD, $n=3$, 94 ± 2 ; 6-OHDA, $n=4$, $32 \pm 15\%$).

6.4.2. Efectos comportamentales

Los resultados de los estudios comportamentales que se muestran en la Fig. 16C, indican que tanto la inyección de GRDD y como los tratamientos control, tienen un impacto altamente variable en el comportamiento motor de los animales. Los datos sobre el porcentaje de giros ipsilaterales correspondiente al test de rotación (vehículo, $n=9$, $81 \pm 11\%$; glía mixta normal, $n=3$, $47 \pm 22\%$; 1000 GRDD, $n=4$, $100 \pm 0\%$; 10000 GRDD, $n=3$, $39 \pm 31\%$; 40000 GRDD, $n=4$, $31 \pm 19\%$; 60000 GRDD, $n=3$, $30 \pm 19\%$; 6-OHDA, $n=3$, $83 \pm 14\%$) y los datos sobre el número de toques con la pata contralateral como porcentaje de los toques totales correspondientes al test de cilindro (vehículo, $n=7$, $47 \pm 4\%$; glía mixta normal, $n=3$, $51 \pm 5\%$; 1000 GRDD, $n=3$, $40 \pm 1\%$; 10000 GRDD, $n=5$, $51 \pm 5\%$; 40000 GRDD, $n=4$, $44 \pm 5\%$; 60000 GRDD, $n=3$, $51 \pm 5\%$; 6-OHDA, $n=3$, $4 \pm 7\%$), tienen desvíos considerablemente altos debido a una gran variabilidad entre experimentos que no permitió encontrar diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes condiciones.

En el test de rotación, se observa un aumento considerable en el número de rotaciones ipsilaterales en las ratas tratadas con la dosis más baja de GRDD en relación al 50% esperable, comparable con el observado en respuesta al tratamiento con vehículo y 6-OHDA, pero esta tendencia desaparece para las demás dosis y se transforma en una reducción dosis-dependiente, que disminuye a medida que aumenta el número de células inyectadas. Por otro lado, en el test de cilindro, los datos correspondientes al tratamiento con vehículo o glía mixta normal se encuentran dentro de los parámetros esperables cercanos al 50% y se observa una tendencia hacia una menor exploración

del ambiente con la pata contralateral en las ratas tratadas con la dosis más baja de GRDD, comparable con la observada para el tratamiento con 6-OHDA. Sin embargo, esta tendencia desaparece a dosis más altas.

7. DISCUSIÓN

En este trabajo, se investigó el impacto del microambiente neurodegenerativo inducido por el tratamiento con 6-OHDA, un modelo animal ampliamente validado de EP, sobre la población glial. Se evaluó la reactividad glial y la neurodegeneración de la SN y el CE, el rendimiento y fenotipo de los cultivos primarios de células gliales obtenidas del microambiente patológico, y el potencial neurotóxico de estas células. En esta discusión, analizaremos en detalle los resultados obtenidos y su relevancia para nuestra comprensión de la EP y el desarrollo de tratamientos futuros.

7.1. Impacto del microambiente neurodegenerativo inducido por 6-OHDA sobre la población glial

El microambiente neurodegenerativo observado a los 3 días del tratamiento con 6-OHDA revela cambios significativos en la expresión de marcadores gliales a nivel de la SN cuando la neurodegeneración aún no está completamente establecida. Por un lado, la cuantificación de las neuronas dopaminérgicas en la SN y el área ocupada por sus terminales en el CE reveló una reducción en ambos parámetros que, aunque no fue una reducción estadísticamente significativa, sugiere un inicio temprano de la neurodegeneración en la vía nigroestriatal. Por otro lado, los resultados de nuestros ensayos inmunohistoquímicos revelaron un aumento significativo en la expresión de marcadores de astrocitos y microglía a nivel de la SN en ese mismo punto temporal. En conjunto, estos resultados proporcionan una comprensión importante de los eventos que ocurren después de la lesión inducida por la neurotoxina, donde una respuesta inflamatoria podría contribuir al inicio y progresión del daño neuronal observado en la vía nigroestriatal, y son consistentes con estudios previos que han implicado la inflamación y la activación glial en la patogénesis de la EP⁷⁶.

Más específicamente, los resultados de los ensayos inmunohistoquímicos revelaron un aumento significativo en la expresión de Iba-1, un marcador de microglía activada, en la SN ipsilateral al tratamiento con 6-OHDA. El aumento en la expresión de Iba-1 sugiere una respuesta inflamatoria temprana en la SN, consistente con la evidencia acumulada que sugiere un papel crucial de la microglía en la patogénesis de la EP⁷⁶. La microglía, como principal célula inmune del sistema nervioso central, juega un papel clave en la respuesta inflamatoria y se ha demostrado que su activación puede conducir a la producción de ROS y a la liberación de citoquinas proinflamatorias, que son particularmente perjudiciales para las neuronas dopaminérgicas¹⁸⁶. Además, se observó un aumento en la expresión de marcadores astrocíticos, como GFAP y S100 β , en la SN ipsilateral. Aunque la diferencia en la intensidad de GFAP no fue estadísticamente significativa, el área ocupada por la señal de GFAP fue significativamente mayor en el lado lesionado, sugiriendo una activación de los astrocitos en respuesta al daño neuronal. Esto también es consistente con estudios previos que han implicado a los astrocitos en la respuesta inflamatoria y la neurodegeneración en la EP, ya que al igual que la microglía, los astrocitos también desempeñan un papel importante en la respuesta inflamatoria y la neurodegeneración. Si bien los astrocitos activados pueden secretar factores neurotróficos que promueven la supervivencia neuronal, se ha demostrado que su activación puede contribuir al microambiente neurodegenerativo al secretar factores inflamatorios y neurotóxicos, así como al modular la homeostasis del glutamato y la supervivencia neuronal.^{76,112,186}

Nuestro siguiente objetivo fue caracterizar las células gliales reactivas derivadas del microambiente neurodegenerativo (GRDD) de la SN en cultivo. Observamos un aumento significativo en el número de células obtenidas de la SN ipsilateral en comparación con las otras condiciones. Esto es esperable en base al estado inflamatorio del tejido a partir del cual se cultivan las células y sugiere una proliferación/reclutamiento y activación selectiva de las células gliales en el sitio de la lesión, que se

transmite en menor medida hacia el CE donde se encuentran las terminales dopaminérgicas degenerantes. Esto es consistente con estudios previos que han demostrado la capacidad de las células gliales para responder y proliferar en respuesta al daño neuronal¹⁸⁷. Estos resultados también brindaron información sobre la relación entre el rendimiento de los cultivos con la dosis de 6-OHDA administrada. La observación de que la diferencia en el número de células obtenidas entre la SN ipsilateral y contralateral aumenta de manera exponencial con la dosis de 6-OHDA sugiere que la respuesta glial está directamente relacionada con el grado de neurodegeneración inducido por la toxina. Estos resultados son consistentes con estudios anteriores que han demostrado que la neuroinflamación y la activación glial son respuestas comunes a lesiones neurodegenerativas y están asociadas con la liberación de factores proinflamatorios y neurotóxicos que contribuyen al daño neuronal⁹⁴. Por otro lado, la falta de diferencias significativas en el rendimiento de los cultivos en función del sexo de los animales sugiere que la respuesta glial inducida por la 6-OHDA es independiente del sexo, en concordancia con estudios previos que han investigado las diferencias de género en modelos de EP y han encontrado que, aunque puede haber diferencias en la susceptibilidad a la enfermedad entre machos y hembras, las respuestas gliales parecen ser similares en ambos sexos¹⁸⁸.

En cuanto a la morfología de las células obtenidas en cultivo al tercer día *in vitro*, las células muestran características típicas de cultivos mixtos en estadios tempranos, con células de tamaño reducido y de forma redondeada o amebode con pocos procesos cortos. Sin embargo, en este punto temporal del cultivo, aunque dadas las condiciones del cultivo podemos afirmar que se observan células gliales, distinguir entre astrocitos y microglía basándose únicamente en su forma y tamaño puede ser complicado, lo que resalta la necesidad de técnicas adicionales como la inmunocitoquímica para su correcta identificación, como se discutirá más adelante.^{189–191} Además, se observó una diferencia moderada pero estadísticamente significativa en el tamaño de las células entre regiones ipsilaterales y contralaterales tanto en la SN como en el CE, lo que sugiere una mayor respuesta inflamatoria y glial en áreas con mayor neurodegeneración. Esto es coherente con la idea de que la activación glial es una respuesta adaptativa a la lesión neuronal, relacionada con la eliminación de células apoptóticas y la promoción de procesos de reparación tisular¹⁹².

En suma, los resultados presentados en este estudio confirman que la respuesta glial es una característica prominente en modelos de neurodegeneración inducida por 6-OHDA y que el microambiente proinflamatorio y neurodegenerativo generado fomenta la producción de células gliales reactivas que proliferan y se mantienen en cultivo. Esta respuesta es independiente del sexo del animal y está fuertemente influenciada por la dosis de la toxina.

7.2. Fenotipo celular de la GRDD

Los resultados obtenidos en relación al fenotipo celular de la GRDD proporcionan una visión interesante y novedosa sobre la plasticidad de las células gliales en respuesta a la neurodegeneración. La presencia de marcadores tanto astrocíticos (GFAP, S100 β y Cx43) como microgliales (Iba-1 e IB4) en la mayoría de las células evaluadas en cultivo a los 3 DIV sugiere un fenotipo mixto o híbrido. Esto es particularmente interesante e indica una respuesta compleja y adaptativa de la población glial en el contexto de la EP. La coexpresión de marcadores astrocíticos y microgliales podría reflejar una transición fenotípica o un estado intermedio entre ambos tipos celulares, lo que sugiere una plasticidad fenotípica significativa en estas células en respuesta a la neurodegeneración. Esta observación es consistente con estudios previos que han demostrado que las células gliales exhiben una respuesta dinámica ante el daño cerebral¹⁹³ y tienen la capacidad para adoptar fenotipos diversos en diferentes contextos patológicos¹³⁰. Un antecedente destacable sobre glía con fenotipo mixto en un contexto de neurodegeneración es el observado en la medula espinal de ratas SOD1^{G93A}, un modelo de ELA hereditaria, donde se ha comprobado que alrededor de las motoneuronas degenerantes proliferan células microgliales que coexpresan Iba-1 y GFAP durante una transición fenotípica hacia astrocitos aberrantes¹⁹⁴. Asimismo, se ha observado que este fenómeno puede ocurrir en ciertas condiciones fisiológicas o patológicas, como durante la

inflamación, en tumores o en respuesta a lesiones cerebrales y podría estar explicando en parte los mecanismos moleculares que le confieren a la GRDD sus propiedades particulares¹⁹⁵⁻¹⁹⁷.

Por otro lado, la localización celular de los marcadores en la GRDD también es interesante de discutir, particularmente la correspondiente a GFAP. A los 3 DIV, la señal de GFAP mostró una distribución espacial particularmente peculiar, en agregados localizados en procesos filamentosos e irregulares. Este extraño patrón de marcación, podría ser indicativo de una formación y organización anormal o inmadura de la red de filamentos de GFAP¹⁹⁸, que parece ser característica de estadios tempranos de estos cultivos, ya que no se observa lo mismo en los estadios más maduros de la GRDD o a nivel de las células gliales en tejido luego de 6-OHDA. Es sabido que, a nivel celular, GFAP forma una extensa red de filamentos de alta plasticidad que sufre remodelaciones en respuesta a las agresiones¹⁹⁹. Además, los agregados de proteínas intracelulares que contienen GFAP y otras proteínas de filamentos intermedios son un sello distintivo de ciertas enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alexander, una patología causada por mutaciones de GFAP que alteran su ensamblaje^{200,201}. Por este motivo, es particularmente llamativo observar estructuras similares en la GRDD, aunque no queda claro si se trata de un fenómeno directamente asociado al ambiente neurodegenerativo o más bien, es artefacto del pasaje desde el tejido vivo al cultivo *in vitro*.

La evolución temporal del cultivo de GRDD también es intrigante y es indicativa de una dinámica compleja en la respuesta glial a lo largo del tiempo. La observación de un declive progresivo en el número de células en algunos experimentos y de una estabilización o aumento en otros, sugiere una respuesta glial muy variable que puede atribuirse a diferencias en las condiciones de cultivo (velocidad de disección, lote de las soluciones utilizadas, etc.) o a la respuesta individual de las células a los estímulos del medio ambiente *in vitro*. Por este motivo, es necesario aumentar el número de experimentos y utilizar una estrategia más controlada para poder hacer inferencias más certeras sobre la tasa de proliferación de estas células en cultivo. Además, la observación de células gliales más grandes y desarrolladas junto con cambios en la expresión de marcadores gliales en los cultivos maduros, en comparación con los cultivos inmaduros, indica una diferenciación y maduración celular progresiva en el cultivo de GRDD. En particular, la observación de una disminución en el porcentaje de células positivas para el marcador microglial Iba-1 con el tiempo, junto con la conservación del nivel de expresión de GFAP en la mayoría de las células y su cambio hacia una distribución más uniforme, sugiere una posible transición fenotípica de las células gliales desde un fenotipo mixto inmaduro hacia uno predominantemente astrocítico.

En suma, los resultados de esta sección destacan la plasticidad fenotípica de las células gliales en respuesta al daño y revelan una coexpresión de marcadores astrocíticos y microgliales por parte de la GRDD que sugiere un fenotipo mixto en etapas temprana del cultivo, mientras que su evolución temporal señala una diferenciación progresiva hacia un fenotipo predominantemente astrocítico.

7.3. Propiedades neurotóxicas de la GRDD

Los resultados obtenidos en esta investigación ofrecen una visión novedosa sobre el papel potencialmente crítico de la GRDD en la patogénesis de la EP. En primer lugar, se observó una reducción significativa en la viabilidad de las células PC12 cuando se cultivaron con GRDD en comparación con condiciones control, lo que las posiciona, al menos, como un sustrato hostil. En concordancia, la administración *in vivo* de GRDD provocó una disminución ipsilateral en el número de neuronas dopaminérgicas en el sitio de la inyección. Estos datos respaldan la hipótesis de que las células gliales pueden desempeñar un papel clave en la degeneración dopaminérgica característica de la EP mediante un efecto neurotóxico directo.

Más específicamente, los estudios sobre neurotoxicidad *in vitro* indican un posible efecto adverso de la GRDD en la integridad celular de las células PC12, en concordancia con estudios previos que demostraron que astrocitos con un fenotipo aberrante generados en un modelo de ELA hereditaria,

son capaces de inducir daño en neuronas motoras en cultivo²⁰². Sin embargo, la observación de una reducción significativa en la viabilidad de estas células cuando se cultivaron con GRDD plantea interrogantes importantes sobre los mecanismos subyacentes a este efecto. En primer lugar, es crucial considerar la posibilidad de que el fenómeno observado esté relacionado con la calidad de la GRDD como sustrato, ya que es conocido que las células PC12 son sensibles a las condiciones del sustrato de cultivo²⁰³, y es posible que la GRDD no provea un ambiente adecuado para su adhesión y crecimiento, resultando en la muerte o pérdida de las células mal pegadas en cualquier punto del experimento. Esto por sí mismo sería una característica distintiva de la GRDD ya que no se observa lo mismo cuando las PC12 son cultivadas con glía mixta normal, que demostró ser un sustrato tan adecuado como el colágeno. En segundo lugar, es necesario considerar la posibilidad de que la disminución en la viabilidad de las células PC12 se debe a un efecto neurotóxico de la GRDD, que puede ser directo mediante una interacción intercelular o indirecto a través de mediadores químicos. Las observaciones de inclusiones intracelulares positivas para el marcador neuronal β -tub III en la GRDD, en conjunto con células PC12 con apariencia de estar siendo envueltas por GRDD, sugieren la posibilidad de una interacción física entre ambos grupos de células que podría implicar un mecanismo de fagocitosis por parte de las GRDD, resultando en la eliminación de las células PC12. La otra posibilidad es una liberación de agentes neurotóxicos por parte de las GRDD al medio de cultivo, que ocasiona la muerte de las células PC12 donde la GRDD simplemente estaría fagocitando los detritos resultantes, explicando las inclusiones β -tub III positivas observadas. En suma, es posible que la reducción en la viabilidad de las células PC12 detectada en nuestros experimentos sea el resultado de un conjunto de mecanismos diferentes o incluso una combinación de varios de ellos, por lo que son necesarios futuros estudios dirigidos a desentrañar los mecanismos específicos involucrados en la toxicidad de la GRDD.

Respecto a los estudios sobre las propiedades neurotóxicas *in vivo*, los resultados obtenidos en el novedoso modelo de EP inducido por la administración de GRDD, revelan aspectos importantes sobre su efecto neurotóxico, así como algunas limitaciones en la interpretación de los datos. En primer lugar, la observación de una muerte ipsilateral de las neuronas dopaminérgicas en la SN después de la inyección de GRDD demuestra un efecto directo y dosis-dependiente de estas células gliales en la degeneración neuronal. La comparación con la inyección de 6-OHDA como modelo bien establecido de neurodegeneración en la EP, muestra la existencia de similitudes en la magnitud de la degeneración neuronal ocasionada por ambos tratamientos, aunque no alcanza a ser idéntica, sugiriendo que aumentar el número de células inyectadas podría conducir a una degeneración dopaminérgica similar a la inducida por la toxina. Además de la dosis de células, otro factor que podría estar explicando las diferencias observadas en relación al tratamiento con 6-OHDA es el mecanismo de muerte inducido, que en el caso de la GRDD es desconocido y podría tratarse de un mecanismo distinto, con un curso temporal diferente, por lo que evaluar la neurodegeneración inducida por GRDD a diferentes tiempos también sería interesante. Por otra parte, se observa una falta de concordancia entre la degeneración en la SN y las fibras dopaminérgicas en el CE en los animales tratados con GRDD, pero no en el grupo de 6-OHDA, lo cual es extraño pero dada la estrategia experimental utilizada no invalida los datos obtenidos sobre la SN. Esta discrepancia podría atribuirse a la necesidad de alcanzar un umbral crítico de muerte neuronal en la SN para que sea detectable en un único corte histológico mediante la metodología utilizada, probablemente debido a que el CE es una estructura extensa que requiere analizar y promediar los datos de varias secciones diferentes para obtener resultados más representativos.

Por otro lado, los resultados comportamentales también presentan desafíos importantes para su interpretación. En estos estudios utilizamos dos test comportamentales ampliamente usados para evaluar la integridad de la vía nigro-estriatal, el test de rotación y el del cilindro. En el test de rotación se observó que la inyección de vehículo no se corresponde con el valor de 50% de giros ipsilaterales esperado, lo que sería indicativo de una afectación motora ipsilateral, pero al no corresponderse con los datos histológicos, simplemente indica una gran limitación en este ensayo específico. Dado que este es el tratamiento control más importante, este dato invalida el resto de los resultados. Algo similar pero no tan marcado, ocurre en el test de cilindro, donde la falta de diferencias estadísticamente significativas entre el tratamiento con vehículo y la inyección de 6-OHDA plantea

interrogantes sobre la sensibilidad de este ensayo para detectar cambios en el comportamiento motor, que como consecuencia impide la interpretación de los datos observados para el tratamiento con GRDD. Estos problemas nacen de la gran variabilidad de los datos observada en ambos tests y se deben a que los estudios comportamentales suelen acarrear una serie de desafíos y limitaciones que afectan su fiabilidad y reproducibilidad, por factores como la variabilidad individual, la sensibilidad a las condiciones experimentales, el efecto de la experiencia previa, la sensibilidad a la fatiga y el estrés, entre otros^{204–206}. Esto se vuelve especialmente notorio en estudios con un número experimental reducido como el del presente trabajo, ya que los desvíos altos dificultan detectar diferencias estadísticamente significativas entre los datos. A su vez, es posible que las condiciones experimentales bajo las que se llevaron a cabo los estudios comportamentales no fueran las más apropiadas y probablemente fueron variables en el tiempo ya que los datos se obtuvieron a lo largo de varios años. Todo esto destaca la importancia de considerar cuidadosamente estos aspectos al diseñar y analizar experimentos comportamentales, remarcando la necesidad de aumentar el n experimental y controlar más rigurosamente las condiciones cuando se trata de este tipo de ensayos.

En suma, nuestros resultados apoyan la hipótesis de que las células gliales reactivas desempeñan un papel significativo en la patogénesis de la EP. Se demostró que las células gliales extraídas del ambiente degenerativo expresan un fenotipo que provoca una posible ganancia de funciones neurotóxicas, que por sí solas son capaces de producir neurodegeneración tanto *in vitro* como *in vivo*. Estos hallazgos nos permiten afirmar que el tratamiento con GRDD se trata de un novedoso modelo de EP *in vivo* que permite profundizar en la comprensión de los mecanismos celulares involucrados en la patogénesis de la EP. Este novedoso modelo de EP mediado por células gliales neurotóxicas, es a la fecha el primer ejemplo de muerte neuronal *in vivo* por acción directa de células gliales provenientes de un modelo de una enfermedad neurodegenerativa ampliamente validado. El tratamiento con GRDD genera una respuesta dosis dependiente que permite adaptar el modelo para abordar diferentes problemáticas mediante la regulación del grado de neurodegeneración producido. Si bien aún se necesitan estudios adicionales para caracterizar los efectos sobre el comportamiento motor, este modelo tiene una gran potencialidad para estudiar en profundidad los mecanismos por los cuales las células gliales sufren una pérdida de sus funciones homeostáticas clásicas en favor de un fenotipo neurotóxico, un fenómeno común a varias enfermedades neurodegenerativas y otras formas de daño al SNC. También permite evaluar posibles tratamientos para revertir este funcionamiento glial alterado, habilitando su utilización para la búsqueda de terapias novedosas con la disfunción glial como blanco y facilitando la investigación en esta área del conocimiento que ha ganado protagonismo en las últimas décadas pero que aún se encuentra bastante inexplorada.

7.4. GRDD en relación a células gliales neurotóxicas obtenidas de otros modelos de daño

Como se mencionó al final de la introducción, la GRDD es el primer ejemplo de células gliales neurotóxicas obtenidas a partir de modelos de EP, pero no de daño al SNC. En esta sección haremos una breve comparación entre la GRDD obtenida del modelo de EP y otras células gliales neurotóxicas provenientes de modelos de ELA, isquemia y EA, con el objetivo de proporcionar una visión más amplia sobre las similitudes y diferencias en su fenotipo, comportamiento y posible contribución a la patogénesis de estas enfermedades.

En un modelo en ratas de ELA, la muerte de las motoneuronas y la rápida progresión de la parálisis se asocian con la aparición de células AbA que proliferan en la médula espinal en degeneración, que son tóxicas para motoneuronas en cultivo. Interesantemente, las AbAs al igual que la GRDD, expresan simultáneamente marcadores astrocíticos junto con marcadores microgliales.^{167,194} Estos autores pudieron demostrar que las células AbA se originan a partir de células microgliales inflamatorias que experimentan una transición fenotípica hacia astrocitos aberrantes¹⁹⁴, un fenómeno no muy diferentes a lo observado durante la evolución temporal de la GRDD en cultivo desde un fenotipo mixto inmaduro hacia uno predominantemente astrocítico. Sin embargo, una diferencia distintiva entre las AbAs y la GRDD, es que la GRDD no parece tener una alta tasa de proliferación

en cultivo, mientras que las AbAs se caracterizan por una marcada capacidad proliferativa con pérdida permanente de la inhibición por contacto y falta de senescencia replicativa¹⁶⁷. Otras características que exhiben las células AbA son estrés exacerbado de RE junto con una abundancia significativa de gotitas de lípidos, así como vesículas autofágicas y secretoras, todos rasgos característicos de estrés celular y de la activación inflamatoria²⁰⁷. Estos parámetros específicos aún no han sido evaluados en la GRDD, pero estos resultados los colocan como interesantes blancos de estudio, ya que es altamente probable encontrar más similitudes.

Otro ejemplo de glía neurotóxica es el descubierto a partir de un modelo de isquemia en ratas producido por devascularización cortical, donde se pudieron aislar astrocitos, bautizados como IDA (del inglés ischemia-derived astrocytes), que proliferan *in vitro* con una alta tasa de división celular, muestran una mayor capacidad migratoria y tienen una senescencia replicativa reducida. Se observó que el medio condicionado por estas células, indujo fuertemente la activación de astrocitos primarios inactivos y potenció la muerte neuronal isquémica en cultivo. Además, al ser reimplantados en cerebros de ratas normales, migraron alrededor del lugar de la inyección e indujeron una gliosis reactiva focal. Interesantemente, en los estadios tempranos del cultivo se observa que estas células son pequeñas y redondeadas con un fenotipo de macrófago/microglía y con el transcurso de los DIV, disminuye el porcentaje de células positivas para Iba-1 y aumenta el porcentaje de células positivas para S100 β . Estos autores proponen que los IDA representan un subtipo astrogliial indiferenciado, proinflamatorio, altamente replicativo y migratorio que emerge del microambiente neurodegenerativo y que puede contribuir a la expansión de la gliosis reactiva.²⁰⁸ En relación a la GRDD, no solo comparten las propiedades neurotóxicas *in vitro*, sino que también parecen sufrir la misma transición fenotípica desde un estadio inmaduro de características microglía hacia un estadio con mayor expresión de marcadores astrocíticos, al igual que lo que se observó en las células AbA. De igual forma que en la comparación anterior, la GRDD difiere de los IDAs en su tasa de replicación. Por otro lado a pesar de que ambos tipos celulares fueron re implantados en cerebros sanos, no se evaluó la muerte neuronal luego del tratamiento con IDAs para poder determinar si difieren con la GRDD en la capacidad neurotóxica *in vivo* o si se trata de otro fenómeno compartido.

Finalmente, el último punto de comparación de esta sección es con una población de astrocitos con propiedades neurotóxicas *in vitro*, cuya aparición está ligada a la progresión de los eventos patológicos que ocurren un modelo transgénico de EA, y que, al igual que las AbAs y los IDAs pero a diferencia de la GRDD, mostraron una alta tasa de proliferación en cultivo. Estos astrocitos fueron neurotóxicos para cultivos neuronales primarios tanto en cocultivos como cuando se añadió su medio condicionado. Los autores proponen que su aparición está relacionada con el medio neuroinflamatorio que evoluciona durante la progresión de la enfermedad en estos animales y promueve la transición fenotípica de precursores a la generación de estas células.¹⁶⁸ Estos astrocitos comparten con la GRDD la toxicidad *in vitro* en cocultivos y posicionan al estudio del efecto de los medios condicionados con GRDD como una perspectiva de estudio futuro interesante.

De esta forma podemos ver que la aparición de células gliales neurotóxicas se da en varios escenarios distintos de daño al SNC y esta aparición probablemente está fuertemente vinculada al proceso de inflamación, donde participan la activación de interacciones específicas entre las neuronas dañadas, las células gliales y el microambiente neurodegenerativo. En luz de todo lo que hemos discutido a lo largo del presente trabajo, es apropiado decir que, en la fisiopatología de las enfermedades neurodegenerativas, la interacción entre las neuronas y las células adyacentes del sistema glial, endotelial e inmunológico es altamente compleja y las perturbaciones en este sistema pueden gatillar una amplia variedad de respuestas que interactúan entre sí y en muchos casos, se retroalimentan. En ese contexto, dentro de un ambiente neurodegenerativo donde la función de las neuronas se ve afectada, las células gliales pueden proliferar y adoptar un fenotipo reactivo, con el objetivo inicial de contrarrestar o al menos prevenir la degeneración neuronal. Sin embargo, cuando la respuesta glial regenerativa se ve alterada por la aparición de fenotipos de glía neurotóxica como los discutidos en este capítulo, la intervención de estas nuevas células perturba el equilibrio homeostático de la unidad funcional neurona-glía, induciendo una condición patológica que perpetúa la pérdida de neuronas, exacerbando el problema. Esto abre nuevas vías de investigación para

encontrar poblaciones de células gliales que tengan fenotipos disfuncionales con toxicidad intrínseca en otros modelos de daño al SNC, ya que, aunque existen similitudes en el comportamiento neurotóxico y la plasticidad fenotípica de las células gliales obtenidas a partir de los modelos recién discutidos, es importante tener en cuenta que cada uno de ellos tiene características específicas que reflejan el contexto patológico subyacente. Comprender en mayor detalle estas diferencias y similitudes puede proporcionar información valiosa para el desarrollo de estrategias terapéuticas dirigidas específicamente a modular la actividad de las células gliales anormales y detener o ralentizar la progresión de la neurodegeneración.

8. CONCLUSIONES

En este trabajo, se proporcionó información sobre el rol de las células gliales en el contexto de la EP. A través de una combinación de estudios *in vitro* e *in vivo*, se exploraron los efectos de estas células en la neurodegeneración y disfunción motora, así como algunas de sus características fenotípicas y potencial neurotóxico.

En primer lugar, se evidenció que, el microambiente neurodegenerativo del cual se obtienen las GRDD se caracteriza por un alto nivel de neuroinflamación y degeneración dopaminérgica incipiente. Este microambiente alterado es probablemente determinante para la generación de GRDD en el sitio de la lesión.

La caracterización *in vitro* de las GRDD a los 3 DIV demostró que presentan un fenotipo mixto, expresando marcadores tanto de astrocitos como de microglía, lo cual es particularmente interesante y sugiere una plasticidad fenotípica glial en respuesta al daño neurodegenerativo. Además, se observó que el comportamiento temporal de los cultivos es variable, donde se evidenciaron cambios en el fenotipo celular hacia un dominio de características astrocitarias con el tiempo, lo que sugiere una posible diferenciación o maduración celular durante el proceso de cultivo con una dinámica compleja en la activación y respuesta de estas células. Por otra parte, estas células no mostraron una tasa de proliferación alta en cultivo.

Finalmente, se encontró que la GRDD exhibe propiedades neurotóxicas tanto *in vitro* como *in vivo*, induciendo una reducción en la viabilidad de células PC12 en cultivo y provocando la degeneración ipsilateral de la vía nigroestriatal en ratas control, respectivamente. De esta forma, fue posible poner a punto un novedoso modelo *in vivo* de EP inducido por la administración de GRDD que confirmó su capacidad para desencadenar una degeneración progresiva de las neuronas dopaminérgicas de la SN. Sin embargo, no se observó disminución de los terminales dopaminérgicos del CE y los efectos en el comportamiento motor de los animales fueron variables.

En conjunto, estos estudios proporcionan nuevas perspectivas sobre el papel de las células gliales en la EP, destacando su complejidad fenotípica, su capacidad neurotóxica y su implicación directa en la neurodegeneración. Estos hallazgos subrayan el papel crítico de las células gliales reactivas en la patogénesis de la EP y sugieren su potencial como diana terapéutica novedosa y prometedora.

9. PERSPECTIVAS

Dados los resultados obtenidos durante la caracterización del modelo animal de EP inducido por la GRDD, consideramos necesario continuar profundizando sobre el daño inducido en la SN por las células inyectadas. Para ello, planteamos ampliar la dosis del tratamiento *in vivo* mediante un incremento de la cantidad de GRDD inyectadas *in vivo*, con el objetivo de poder estandarizar este novedoso modelo. Esperamos que con una dosis de 100000 GRDD se podrá alcanzar un nivel de neurodegeneración relativamente igual al producido por 6-OHDA, y así poder llegar a ver un efecto en el comportamiento motor de los animales. A su vez, sería interesante poder identificar la presencia de un proceso inflamatorio asociado a la neurodegeneración inducida por la GRDD y describirlo en

relación a la dosis del tratamiento, analizando también posibles cambios en el tiempo. Estas aproximaciones permitirán evaluar cómo la cantidad de GRDD afecta al microambiente neurodegenerativo que se genera en la SN de estos animales y proporcionará información crucial para optimizar las estrategias del tratamiento, completando la puesta a punto del modelo.

Otro aspecto interesante de evaluar es la posibilidad de obtener GRDD a partir de cultivos primarios de la SN de ratas previamente inyectadas con GRDD, al igual que se obtienen de los animales inyectados con 6-OHDA. Esto permitirá determinar si el microambiente neurodegenerativo generado por los dos tipos de tratamientos es capaz de inducir el mismo cambio fenotípico en la población glial residente y abrir nuevas perspectivas para la generación y estudio de este tipo celular. A su vez, esta aproximación no solo permitiría explorar en mayor profundidad cómo la GRDD interactúa con el microambiente neuronal *in vivo*, sino que también arrojará datos relevantes sobre la transmisión y evolución temporal del fenómeno neurotóxico observado.

Por otro lado, en cuanto a los estudios de neurotoxicidad *in vitro*, será importante determinar si la baja en la viabilidad de células PC12 observada en los cocultivos, se debe a una interacción intercelular directa o se trata de un efecto indirecto mediado por la liberación de sustancias neurotóxicas al medio extracelular por parte de la GRDD. Para ello, planeamos explorar si los medios condicionados por la GRDD poseen propiedades neurotóxicas por sí solos, información que también será útil para identificar estrategias que puedan mitigar cualquier neurotoxicidad asociada.

También consideramos de suma importancia estudiar los mecanismos moleculares que le brindan a la GRDD sus características, identificando marcadores asociados a su fenotipo patológico. Para ello proponemos una primera aproximación que permita determinar la presencia de diferentes marcadores de daño, vinculados al estado metabólico de las células neurotóxicas incluyendo la evaluación de los niveles de mediadores inflamatorios, de estrés oxidativo y de retículo, autofagia, disfunción mitocondrial, alteraciones en la sumoilación y degradación de proteínas, modificaciones de la matriz extracelular y apoptosis. Esta información será de particular importancia para identificar posibles estrategias para modular específicamente estas vías patogénicas e intentar prevenir o revertir la acción neurotóxica de estas células. Como segunda aproximación, no se descarta la posibilidad de realizar otros estudios ómicos para describir aspectos genéticos, transcriptómicos, proteómicos y/o metabólicos, comparando la GRDD con glía mixta normal y así identificar otras características de expresión diferencial entre ambos tipos celulares.

Finalmente, de la mano con los resultados que se obtengan en las partes anteriores, planteamos como objetivo a largo plazo poder identificar tratamientos farmacológicos que logren frenar o revertir el potencial neurotóxico de la GRDD. Para ello, se seleccionará una serie de compuestos que actúen sobre las vías que hayan mostrado estar más afectadas en la GRDD (hipotéticamente masitinib como antiinflamatorio que puede modular su proliferación²⁰⁹, cannabinoides como neuroprotectores²¹⁰ y violaceína que está en estudio en el grupo como proapoptótico²¹¹ específico para AbAs, podrían ser candidatos interesantes). En primer lugar, se evaluará el efecto neuroprotector *in vitro* utilizando cultivos de células PC12 con GRDD y en base a esos estudios se seleccionará la intervención farmacológica con mejor potencial neuroprotector para ser evaluada en el modelo *in vivo*.

10. REFERENCIAS

1. Stephenson, J., Nutma, E., van der Valk, P. & Amor, S. Inflammation in CNS neurodegenerative diseases. *Immunology* vol. 154 204–219 Preprint at <https://doi.org/10.1111/imm.12922> (2018).
2. Ishola, A. A., Oyinloye, B. E., Ajiboye, B. O. & Kappo, A. P. Molecular docking studies of flavonoids from *Andrographis paniculata* as potential acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and monoamine oxidase inhibitors towards the treatment of neurodegenerative diseases. *Biointerface Res Appl Chem* **11**, 9871–9879 (2021).
3. Liu, Z., Zhou, T., Ziegler, A. C., Dimitrion, P. & Zuo, L. Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: From Molecular Mechanisms to Clinical Applications. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* vol. 2017 Preprint at <https://doi.org/10.1155/2017/2525967> (2017).
4. Volkman, R. & Offen, D. Concise Review: Mesenchymal Stem Cells in Neurodegenerative Diseases. *Stem Cells* vol. 35 1867–1880 Preprint at <https://doi.org/10.1002/stem.2651> (2017).
5. Busnatu, Ștefan *et al.* Clinical Applications of Artificial Intelligence—An Updated Overview. *Journal of Clinical Medicine* vol. 11 Preprint at <https://doi.org/10.3390/jcm11082265> (2022).
6. Gitler, A. D., Dhillon, P. & Shorter, J. Neurodegenerative disease: Models, mechanisms, and a new hope. *DMM Disease Models and Mechanisms* vol. 10 499–502 Preprint at <https://doi.org/10.1242/dmm.030205> (2017).
7. Hou, Y. *et al.* Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease. *Nature Reviews Neurology* vol. 15 565–581 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0244-7> (2019).
8. Heemels, M.-T. Neurodegenerative diseases. *Nature* **539**, 179–179 (2016).
9. Vivian Nutton. *Ancient Medicine*. (Routledge, 2023).
10. Ramesh, S. & Arachchige, A. S. P. M. Depletion of dopamine in Parkinson's disease and relevant therapeutic options: A review of the literature. *AIMS Neuroscience* vol. 10 200–231 Preprint at <https://doi.org/10.3934/NEUROSCIENCE.2023017> (2023).
11. Gengler, S., Hamilton, A. & Hölscher, C. Synaptic Plasticity in the Hippocampus of a APP/PS1 Mouse Model of Alzheimer's Disease Is Impaired in Old but Not Young Mice. *PLoS One* **5**, (2010).
12. Hendrickx, D. M. *et al.* A New Synuclein-Transgenic Mouse Model for Early Parkinson's Reveals Molecular Features of Preclinical Disease. *Mol Neurobiol* **58**, 576–602 (2021).
13. Auluck, P. K., Chan, H. Y. E., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M. Y. & Bonini, N. M. Chaperone suppression of α -synuclein toxicity in a *Drosophila* model for Parkinson's disease. *Science* (1979) **295**, 865–868 (2002).
14. Link, C. D. *Expression of Human F8-Amyloid Peptide in Transgenic Caenorhabditis Elegans*. *Neurobiology* vol. 92 (1995).
15. Han, S. S. W., Williams, L. A. & Eggan, K. C. Constructing and Deconstructing Stem Cell Models of Neurological Disease. *Neuron* vol. 70 626–644 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.05.003> (2011).
16. Marton, R. M. & Pașca, S. P. Neural Differentiation in the Third Dimension: Generating a Human Midbrain. *Cell Stem Cell* vol. 19 145–146 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.07.017> (2016).
17. Pasca, A. M. *et al.* Functional cortical neurons and astrocytes from human pluripotent stem cells in 3D culture. *Nat Methods* **12**, 671–678 (2015).
18. Hardy, J. & Selkoe, D. J. The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics. *Science* (1979) **297**, 353–356 (2002).
19. Poewe, W. *et al.* Parkinson disease. *Nat Rev Dis Primers* **3**, 1–21 (2017).

20. Ross, C. A. *et al.* Huntington disease: Natural history, biomarkers and prospects for therapeutics. *Nature Reviews Neurology* vol. 10 204–216 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2014.24> (2014).
21. Turner, M. R. *et al.* Mechanisms, models and biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* **14**, 19–32 (2013).
22. Vaquer-Alicea, J. & Diamond, M. I. Propagation of Protein Aggregation in Neurodegenerative Diseases. *Annu Rev Biochem* **18**, 54 (2019).
23. Smith, J. A., Das, A., Ray, S. K. & Banik, N. L. Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases. *Brain Research Bulletin* vol. 87 10–20 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2011.10.004> (2012).
24. Lin, M. T. & Beal, M. F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* vol. 443 787–795 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nature05292> (2006).
25. Singh, A., Kukreti, R., Saso, L. & Kukreti, S. Oxidative stress: A key modulator in neurodegenerative diseases. *Molecules* vol. 24 Preprint at <https://doi.org/10.3390/molecules24081583> (2019).
26. Ilieva, H., Polymenidou, M. & Cleveland, D. W. Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders: ALS and beyond. *Journal of Cell Biology* vol. 187 761–772 Preprint at <https://doi.org/10.1083/jcb.200908164> (2009).
27. Verkhratsky, A. *et al.* Neurological diseases as primary gliopathies: A reassessment of neurocentrism. *ASN Neuro* vol. 4 131–149 Preprint at <https://doi.org/10.1042/AN20120010> (2012).
28. Pringsheim, T., Jette, N., Frolkis, A. & Steeves, T. D. L. The prevalence of Parkinson’s disease: A systematic review and meta-analysis. *Movement Disorders* vol. 29 1583–1590 Preprint at <https://doi.org/10.1002/mds.25945> (2014).
29. Dorsey, E. R. *et al.* Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. *Neurology* **68**, 384–386 (2007).
30. Ray Dorsey, E. *et al.* Global, regional, and national burden of Parkinson’s disease, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol* **17**, 939–953 (2018).
31. Lix, L. M. *et al.* Socioeconomic variations in the prevalence and incidence of Parkinson’s disease: A population-based analysis. *J Epidemiol Community Health* (1978) **64**, 335–340 (2010).
32. Connolly, B. S. & Lang, A. E. Pharmacological treatment of Parkinson disease: A review. *JAMA* vol. 311 1670–1683 Preprint at <https://doi.org/10.1001/jama.2014.3654> (2014).
33. Dauer, W. & Przedborski, S. Parkinson’s Disease: mechanisms and models. *Neuron* **39**, 889–909 (2003).
34. Olanow, C. W. The pathogenesis of cell death in Parkinson’s disease - 2007. in *Movement Disorders* vol. 22 (2007).
35. Spillantini, M. G. *et al.* α -Synuclein in Lewy bodies. *Nature* **388**, 839–840 (1997).
36. Jankovic, J. Parkinson’s disease: Clinical features and diagnosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* vol. 79 368–376 Preprint at <https://doi.org/10.1136/jnnp.2007.131045> (2008).
37. Santos García, D. *et al.* Non-motor symptoms burden, mood, and gait problems are the most significant factors contributing to a poor quality of life in non-demented Parkinson’s disease patients: Results from the COPPADIS Study Cohort. *Parkinsonism Relat Disord* **66**, 151–157 (2019).

38. Gaenslen, A., Swid, I., Liepelt-Scarfone, I., Godau, J. & Berg, D. The patients' perception of prodromal symptoms before the initial diagnosis of Parkinson's disease. *Movement Disorders* **26**, 653–658 (2011).
39. Armstrong, M. J. & Okun, M. S. Diagnosis and Treatment of Parkinson Disease: A Review. *JAMA - Journal of the American Medical Association* vol. 323 548–560 Preprint at <https://doi.org/10.1001/jama.2019.22360> (2020).
40. Klein, M. O. *et al.* Dopamine: Functions, Signaling, and Association with Neurological Diseases. *Cellular and Molecular Neurobiology* vol. 39 31–59 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s10571-018-0632-3> (2019).
41. Reneman, L., van der Pluijm, M., Schranter, A. & van de Giessen, E. Imaging of the dopamine system with focus on pharmacological MRI and neuromelanin imaging. *Eur J Radiol* **140**, (2021).
42. Wichmann, T. & DeLong, M. R. Neurotransmitters and Disorders of the Basal Ganglia. in *Basic Neurochemistry* 856–871 (Elsevier, 2012). doi:10.1016/B978-0-12-374947-5.00049-3.
43. Albin, R. L., Young, A. B. & Penney, J. B. *The Functional Anatomy of Basal Ganglia Disorders*. (1989).
44. Redgrave, P. *et al.* Goal-directed and habitual control in the basal ganglia: Implications for Parkinson's disease. *Nature Reviews Neuroscience* vol. 11 760–772 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nrn2915> (2010).
45. McGregor, M. M. & Nelson, A. B. Circuit Mechanisms of Parkinson's Disease. *Neuron* vol. 101 1042–1056 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.03.004> (2019).
46. Marzban, H. *et al.* Cellular commitment in the developing cerebellum. *Frontiers in Cellular Neuroscience* vol. 8 1–26 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00450> (2015).
47. Dekkers, M. P. J. & Barde, Y. A. Programmed cell death in neuronal development. *Science* vol. 340 39–41 Preprint at <https://doi.org/10.1126/science.1236152> (2013).
48. Caccamo, A. *et al.* Necroptosis activation in Alzheimer's disease. *Nat Neurosci* **20**, 1236–1246 (2017).
49. Brettschneider, J. *et al.* TDP-43 pathology and neuronal loss in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord. *Acta Neuropathol* **128**, 423–437 (2014).
50. West, M. J., Coleman, P. D., Flood, D. G. & Troncoso, J. C. Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease. *The Lancet* **344**, 769–772 (1994).
51. Reiner, A. & Deng, Y. P. Disrupted striatal neuron inputs and outputs in Huntington's disease. *CNS Neuroscience and Therapeutics* vol. 24 250–280 Preprint at <https://doi.org/10.1111/cns.12844> (2018).
52. Kole, A. J., Annis, R. P. & Deshmukh, M. Mature neurons: equipped for survival. *Cell death & disease* vol. 4 Preprint at <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.220> (2013).
53. Salehi, A., Delcroix, J. D. & Swaab, D. F. Alzheimer's disease and NGF signaling. *Journal of Neural Transmission* vol. 111 323–345 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s00702-003-0091-x> (2004).
54. Guo, Z. *et al.* Striatal neuronal loss correlates with clinical motor impairment in Huntington's disease. *Movement Disorders* **27**, 1379–1386 (2012).
55. Schulz, J. B. Neuronal pathology in Parkinson's disease. *Cell Tissue Res* **320**, 211–211 (2005).
56. Dias, V., Junn, E. & Mouradian, M. M. The role of oxidative stress in parkinson's disease. *Journal of Parkinson's Disease* vol. 3 461–491 Preprint at <https://doi.org/10.3233/JPD-130230> (2013).
57. Matsuda, W. *et al.* Single nigrostriatal dopaminergic neurons form widely spread and highly dense axonal arborizations in the neostriatum. *Journal of Neuroscience* **29**, 444–453 (2009).

58. Fearnley, J. M. & Lees, A. J. *AGEING AND PARKINSON'S DISEASE: SUBSTANTIA NIGRA REGIONAL SELECTIVITY*. *Brain* vol. 114 <http://brain.oxfordjournals.org/> (1991).
59. Chi, H., Chang, H. Y. & Sang, T. K. Neuronal cell death mechanisms in major neurodegenerative diseases. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 19 Preprint at <https://doi.org/10.3390/ijms19103082> (2018).
60. Michel, P. P., Hirsch, E. C. & Hunot, S. Understanding Dopaminergic Cell Death Pathways in Parkinson Disease. *Neuron* vol. 90 675–691 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.03.038> (2016).
61. Soto, C. Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* **4**, 49–60 (2003).
62. Blokhuis, A. M., Groen, E. J. N., Koppers, M., Van Den Berg, L. H. & Pasterkamp, R. J. Protein aggregation in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathologica* vol. 125 777–794 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s00401-013-1125-6> (2013).
63. Seward, M. E. *et al.* Amyloid- β signals through tau to drive ectopic neuronal cell cycle re-entry in alzheimer's disease. *J Cell Sci* **126**, 1278–1286 (2013).
64. Lossi, L. & Merighi, A. In vivo cellular and molecular mechanisms of neuronal apoptosis in the mammalian CNS. *Progress in Neurobiology* vol. 69 287–312 Preprint at [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(03\)00051-0](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(03)00051-0) (2003).
65. Gorman, A. M. Neuronal cell death in neurodegenerative diseases: Recurring themes around protein handling: Apoptosis Review Series. *J Cell Mol Med* **12**, 2263–2280 (2008).
66. Helley, M. P., Pinnell, J., Sportelli, C. & Tieu, K. Mitochondria: A common target for genetic mutations and environmental toxicants in Parkinson's disease. *Frontiers in Genetics* vol. 8 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fgene.2017.00177> (2017).
67. Brand, M. D. & Nicholls, D. G. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochemical Journal* vol. 435 297–312 Preprint at <https://doi.org/10.1042/BJ20110162> (2011).
68. Esteves, A. R. F. *et al.* Mitochondrial function in Parkinson's disease cybrids containing an nt2 neuron-like nuclear background. *Mitochondrion* **8**, 219–228 (2008).
69. Greenamyre, J. T., Sherer, T. B., Betarbet, R. & Panov, A. V. *Critical Review Complex I and Parkinson's Disease*. *IUBMB Life* vol. 52 (2001).
70. Greenamyre, J. T., Betarbet, R. & Sherer, T. B. The rotenone model of Parkinson's disease: Genes, environment and mitochondria. in *Parkinsonism and Related Disorders* vol. 9 59–64 (Elsevier BV, 2003).
71. Hodaie, M., Neimat, J. S. & Lozano, A. M. The dopaminergic nigrostriatal system and Parkinson's disease: Molecular events in development, disease, and cell death, and new therapeutic strategies. *Neurosurgery* vol. 60 17–28 Preprint at <https://doi.org/10.1227/01.NEU.0000249209.11967.CB> (2007).
72. Ghemrawi, R. & Khair, M. Endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response in neurodegenerative diseases. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 21 1–25 Preprint at <https://doi.org/10.3390/ijms21176127> (2020).
73. Tsang, A. H. K. & Chung, K. K. K. Oxidative and nitrosative stress in Parkinson's disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* vol. 1792 643–650 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2008.12.006> (2009).
74. Meiser, J., Weindl, D. & Hiller, K. *Complexity of Dopamine Metabolism*. *Cell Communication and Signaling* vol. 11 <http://www.biosignaling.com/content/11/1/34> (2013).
75. Teleanu, D. M. *et al.* An Overview of Oxidative Stress, Neuroinflammation and Neurodegenerative Diseases. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 23 Preprint at <https://doi.org/10.3390/ijms23115938> (2022).

76. Hirsch, E. C. & Hunot, S. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *The Lancet Neurology* vol. 8 382–397 Preprint at [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70062-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70062-6) (2009).
77. Cotzias, G. C., Papavasiliou, P. S. & Gellene, R. Modification of Parkinsonism — Chronic Treatment with L-Dopa. *New England Journal of Medicine* **280**, 337–345 (1969).
78. Przedborski, S. *et al.* The parkinsonian toxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): a technical review of its utility and safety. *J Neurochem* **76**, 1265–1274 (2001).
79. Dovonou, A. *et al.* Animal models of Parkinson's disease: bridging the gap between disease hallmarks and research questions. *Translational Neurodegeneration* vol. 12 Preprint at <https://doi.org/10.1186/s40035-023-00368-8> (2023).
80. Ungerstedt, U. 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J Pharmacol* **5**, 107–110 (1968).
81. Ungerstedt, U. & Arbuthnott, G. W. Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res* **24**, 485–493 (1970).
82. Burns, R. S. *et al.* A Primate Model of Parkinsonism: Selective Destruction of Dopaminergic Neurons in the Pars Compacta of the Substantia Nigra by N-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine (Dopamine/Homovanilic Acid/5-Hydroxyindoleacetic Acid/3-Methoxy-4-Hydroxyphenylethylene Glycol). *Neurobiology* vol. 80 (1983).
83. Douglas Knowles, W., Traub are at, R. D., S Wong, R. K. & William Langston Recogntuon, J. *MPTP and Parkinson's Disease*. *Proc Nail Acad Sci USA* vol. 42 (1985).
84. Le, W., Sayana, P. & Jankovic, J. Animal Models of Parkinson's Disease: A Gateway to Therapeutics? *Neurotherapeutics* vol. 11 92–110 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s13311-013-0234-1> (2014).
85. Schapira, A. H. V. & Tolosa, E. Molecular and clinical prodrome of Parkinson disease: Implications for treatment. *Nature Reviews Neurology* vol. 6 309–317 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2010.52> (2010).
86. Antony, P. M. A., Diederich, N. J. & Balling, R. Parkinson's disease mouse models in translational research. *Mammalian Genome* **22**, 401–419 (2011).
87. Schapira, A. H. V. Etiology of Parkinson's disease. *Neurology* **66**, (2006).
88. Jessen, K. R. & Richardson, W. D. *Glial Cell Development: Basic Principles and Clinical Relevance*. (Oxford University Press, 2001).
89. Kettenmann, H. & Ransom, B. R. *Neuroglia*. (Oxford University Press, 2006).
90. Mittelbronn, M., Dietz, K., Schluesener, H. J. & Meyermann, R. Local distribution of microglia in the normal adult human central nervous system differs by up to one order of magnitude. *Acta Neuropathol* **101**, 249–255 (2001).
91. Kwon, H. S. & Koh, S. H. Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes. *Translational Neurodegeneration* vol. 9 Preprint at <https://doi.org/10.1186/s40035-020-00221-2> (2020).
92. Yin, J., Valin, K. L., Dixon, M. L. & Leavenworth, J. W. The Role of Microglia and Macrophages in CNS Homeostasis, Autoimmunity, and Cancer. *Journal of Immunology Research* vol. 2017 Preprint at <https://doi.org/10.1155/2017/5150678> (2017).
93. Eric Thomas, W. & Charffcte, W. E. *Characterization of the Dynamic Nature of Microglial Cells*. *Brain Research Bull~rin* vol. 25 (1990).
94. Block, M. L., Zecca, L. & Hong, J. S. Microglia-mediated neurotoxicity: Uncovering the molecular mechanisms. *Nature Reviews Neuroscience* vol. 8 57–69 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nrn2038> (2007).

95. Tay, T. L. *et al.* A new fate mapping system reveals context-dependent random or clonal expansion of microglia. *Nat Neurosci* **20**, 793–803 (2017).
96. Askew, K. *et al.* Coupled Proliferation and Apoptosis Maintain the Rapid Turnover of Microglia in the Adult Brain. *Cell Rep* **18**, 391–405 (2017).
97. Amor, S. *et al.* White matter microglia heterogeneity in the CNS. *Acta Neuropathologica* vol. 143 125–141 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s00401-021-02389-x> (2022).
98. Bushong, E. A., Martone, M. E., Jones, Y. Z. & Ellisman, M. H. Protoplasmic Astrocytes in CA1 Stratum Radiatum Occupy Separate Anatomical Domains. *The Journal of Neuroscience* **22**, 183–192 (2002).
99. Qian, J., Bull, M. S. & Levitt, P. Target-derived astroglia regulate axonal outgrowth in a region-specific manner. *Dev Biol* **149**, 278–294 (1992).
100. Reemst, K., Noctor, S. C., Lucassen, P. J. & Hol, E. M. The indispensable roles of microglia and astrocytes during brain development. *Front Hum Neurosci* **10**, (2016).
101. Bugiani, M., Plug, B. C., Man, J. H. K., Breur, M. & van der Knaap, M. S. Heterogeneity of white matter astrocytes in the human brain. *Acta Neuropathol* **143**, 159–177 (2022).
102. Obermeier, B., Daneman, R. & Ransohoff, R. M. Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nature Medicine* vol. 19 1584–1596 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nm.3407> (2013).
103. Attwell, D. *et al.* Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature* vol. 468 232–243 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nature09613> (2010).
104. Weber, B. & Barros, L. F. The astrocyte: Powerhouse and recycling center. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **7**, (2015).
105. Harada, K., Kamiya, T. & Tsuboi, T. Gliotransmitter release from astrocytes: Functional, developmental, and pathological implications in the brain. *Frontiers in Neuroscience* vol. 9 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00499> (2016).
106. Li, J. *et al.* Astrocytes in oligodendrocyte lineage development and white matter pathology. *Frontiers in Cellular Neuroscience* vol. 10 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00119> (2016).
107. Simard, M. & Nedergaard, M. The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. *Neuroscience* **129**, 877–896 (2004).
108. Lundgaard, I., Osório, M. J., Kress, B. T., Sanggaard, S. & Nedergaard, M. White matter astrocytes in health and disease. *Neuroscience* vol. 276 161–173 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.10.050> (2014).
109. Baltan, S. Can lactate serve as an energy substrate for axons in good times and in bad, in sickness and in health? *Metab Brain Dis* **30**, 25–30 (2015).
110. Rinholm, J. E. *et al.* Regulation of oligodendrocyte development and myelination by glucose and lactate. *Journal of Neuroscience* **31**, 538–548 (2011).
111. Kita, Y., Kawakami, K., Takahashi, Y. & Murakami, F. Development of Cerebellar Neurons and Glia Revealed by in Utero Electroporation: Golgi-Like Labeling of Cerebellar Neurons and Glia. *PLoS One* **8**, (2013).
112. Prunell, G. & Olivera-Bravo, S. A Focus on Astrocyte Contribution to Parkinson’s Disease Etiology. *Biomolecules* vol. 12 Preprint at <https://doi.org/10.3390/biom12121745> (2022).
113. Kipp, M. Oligodendrocyte physiology and pathology function. *Cells* vol. 9 1–5 Preprint at <https://doi.org/10.3390/cells9092078> (2020).
114. Chen, C. Z., Neumann, B., Förster, S. & Franklin, R. J. M. Schwann cell remyelination of the central nervous system: Why does it happen and what are the benefits?: Schwann cell remyelination of the CNS. *Open Biology* vol. 11 Preprint at <https://doi.org/10.1098/rsob.200352> (2021).

115. Oberheim, N. A., Goldman, S. A. & Nedergaard, M. Heterogeneity of astrocytic form and function. *Methods in Molecular Biology* **814**, 23–45 (2012).
116. Clement, A. M. *et al.* Wild-Type Nonneuronal Cells Extend Survival of SOD1 Mutant Motor Neurons in ALS Mice. *Science* (1979) **302**, 113–117 (2003).
117. Cuenca, L. *et al.* Parkinson's disease: A short story of 200 years. *Histology and Histopathology* vol. 34 573–591 Preprint at <https://doi.org/10.14670/HH-18-073> (2019).
118. Booth, H. D. E., Hirst, W. D. & Wade-Martins, R. The Role of Astrocyte Dysfunction in Parkinson's Disease Pathogenesis. *Trends in Neurosciences* vol. 40 358–370 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.tins.2017.04.001> (2017).
119. di Domenico, A. *et al.* Patient-Specific iPSC-Derived Astrocytes Contribute to Non-Cell-Autonomous Neurodegeneration in Parkinson's Disease. *Stem Cell Reports* **12**, 213–229 (2019).
120. Subramanyam, C. S., Wang, C., Hu, Q. & Dheen, S. T. Microglia-mediated neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *Seminars in Cell and Developmental Biology* vol. 94 112–120 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2019.05.004> (2019).
121. Mallajosyula, J. K. *et al.* MAO-B elevation in mouse brain astrocytes results in Parkinson's pathology. *PLoS One* **3**, (2008).
122. Kam, T. I., Hinkle, J. T., Dawson, T. M. & Dawson, V. L. Microglia and astrocyte dysfunction in parkinson's disease. *Neurobiology of Disease* vol. 144 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.105028> (2020).
123. McGeer, P. L., Itagaki, S., Boyes, B. E. & McGeer, E. G. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology* **38**, 1285–1285 (1988).
124. Stefanova, N. Microglia in Parkinson's Disease. *Journal of Parkinson's Disease* vol. 12 S105–S112 Preprint at <https://doi.org/10.3233/JPD-223237> (2022).
125. Pike, A. F. *et al.* α -Synuclein evokes NLRP3 inflammasome-mediated IL-1 β secretion from primary human microglia. *Glia* **69**, 1413–1428 (2021).
126. Panicker, N. *et al.* Fyn kinase regulates misfolded α -synuclein uptake and NLRP3 inflammasome activation in microglia. *Journal of Experimental Medicine* **216**, 1411–1430 (2019).
127. Scheiblich, H. *et al.* Microglial NLRP3 Inflammasome Activation upon TLR2 and TLR5 Ligation by Distinct α -Synuclein Assemblies. *The Journal of Immunology* **207**, 2143–2154 (2021).
128. Trudler, D. *et al.* Soluble α -synuclein–antibody complexes activate the NLRP3 inflammasome in hiPSC-derived microglia. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **118**, (2021).
129. Gordon, R. *et al.* Inflammasome inhibition prevents α -synuclein pathology and dopaminergic neurodegeneration in mice. *Sci Transl Med* **10**, 31 (2018).
130. Liddelow, S. A. *et al.* Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature* **541**, 481–487 (2017).
131. Sofroniew, M. V. & Vinters, H. V. Astrocytes: Biology and pathology. *Acta Neuropathologica* vol. 119 7–35 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0619-8> (2010).
132. Mulica, P., Grünewald, A. & Pereira, S. L. Astrocyte-Neuron Metabolic Crosstalk in Neurodegeneration: A Mitochondrial Perspective. *Frontiers in Endocrinology* vol. 12 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.668517> (2021).
133. Escartin, C. *et al.* Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. *Nature Neuroscience* vol. 24 312–325 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41593-020-00783-4> (2021).
134. Kessler, J. P., Salin, P. & Kerkerian-Le Goff, L. Glutamate transporter 1-expressing glia in the rat substantia nigra—Morphometric analysis and relationships to synapses. *Glia* **68**, 2028–2039 (2020).

135. Avola, R., Graziano, A. C. E., Pannuzzo, G., Albouchi, F. & Cardile, V. New insights on Parkinson's disease from differentiation of SH-SY5Y into dopaminergic neurons: An involvement of aquaporin4 and 9. *Molecular and Cellular Neuroscience* **88**, 212–221 (2018).
136. Benga, O. & Huber, V. J. Brain water channel proteins in health and disease. *Molecular Aspects of Medicine* vol. 33 562–578 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.03.008> (2012).
137. Küppers, E. *et al.* AQP4 expression in striatal primary cultures is regulated by dopamine - Implications for proliferation of astrocytes. *European Journal of Neuroscience* **28**, 2173–2182 (2008).
138. Thenral, S. T. & Vanisree, A. J. Peripheral assessment of the genes AQP4, PBP and TH in patients with Parkinson's disease. *Neurochem Res* **37**, 512–515 (2012).
139. Aoki-Yoshino, K. *et al.* Enhanced expression of aquaporin 4 in human brain with inflammatory diseases. *Acta Neuropathol* **110**, 281–288 (2005).
140. Fan, Y. *et al.* Hypersensitivity of aquaporin 4-deficient mice to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and astrocytic modulation. *Neurobiol Aging* **29**, 1226–1236 (2008).
141. Sun, H. *et al.* Aquaporin-4 mediates communication between astrocyte and microglia: Implications of neuroinflammation in experimental Parkinson's disease. *Neuroscience* **317**, 65–75 (2016).
142. Zhang, J. *et al.* Aquaporin-4 deficiency diminishes the differential degeneration of midbrain dopaminergic neurons in experimental Parkinson's disease. *Neurosci Lett* **614**, 7–15 (2016).
143. Bancroft, E. A. & Srinivasan, R. Emerging Roles for Aberrant Astrocytic Calcium Signals in Parkinson's Disease. *Frontiers in Physiology* vol. 12 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.812212> (2022).
144. Tamtaji, O. R., Behnam, M., Pourattar, M. A., Jafarpour, H. & Asemi, Z. Aquaporin 4: A key player in Parkinson's disease. *Journal of Cellular Physiology* vol. 234 21471–21478 Preprint at <https://doi.org/10.1002/jcp.28871> (2019).
145. Donato, R. *et al.* S100B's double life: Intracellular regulator and extracellular signal. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* vol. 1793 1008–1022 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.11.009> (2009).
146. Angelopoulou, E., Paudel, Y. N. & Piperi, C. Emerging role of S100B protein implication in Parkinson's disease pathogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences* vol. 78 1445–1453 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03673-x> (2021).
147. Sathe, K. *et al.* S100B is increased in Parkinson's disease and ablation protects against MPTP-induced toxicity through the RAGE and TNF- α pathway. *Brain* **135**, 3336–3347 (2012).
148. Olivera, S. *et al.* Astrocytic proliferation and mitochondrial dysfunction induced by accumulated glutaric acidemia I (GAI) metabolites: Possible implications for GAI pathogenesis. *Neurobiol Dis* **32**, 528–534 (2008).
149. Jiang, P. & Dickson, D. W. Parkinson's disease: experimental models and reality. *Acta Neuropathologica* vol. 135 13–32 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1788-5> (2018).
150. Rydbirk, R. *et al.* Cytokine profiling in the prefrontal cortex of Parkinson's Disease and Multiple System Atrophy patients. *Neurobiol Dis* **106**, 269–278 (2017).
151. Morales, I., Sanchez, A., Rodriguez-Sabate, C. & Rodriguez, M. The astrocytic response to the dopaminergic denervation of the striatum. *J Neurochem* **139**, 81–95 (2016).
152. Iuvone, T. *et al.* Cannabinoid CB1 receptor stimulation affords neuroprotection in MPTP-induced neurotoxicity by attenuating S100B up-regulation in vitro. *J Mol Med* **85**, 1379–1392 (2007).
153. Liu, J. *et al.* S100B transgenic mice develop features of parkinson's disease. *Arch Med Res* **42**, 1–7 (2011).

154. Wang, Y., Tadayon, R. & Shaw, G. S. Monitoring interactions between S100B and the dopamine D2 receptor using NMR spectroscopy. in *Methods in Molecular Biology* vol. 1929 311–324 (Humana Press Inc., 2019).
155. Batassini, C. *et al.* Striatal injury with 6-OHDA transiently increases cerebrospinal GFAP and S100B. *Neural Plast* **2015**, (2015).
156. Heo, J. Y. *et al.* Aberrant Tonic Inhibition of Dopaminergic Neuronal Activity Causes Motor Symptoms in Animal Models of Parkinson's Disease. *Current Biology* **30**, 276-291.e9 (2020).
157. An, H., Heo, J. Y., Justin Lee, C. & Nam, M. H. The pathological role of astrocytic MAOB in parkinsonism revealed by genetic ablation and over-expression of MAOB. *Exp Neurobiol* **30**, 113–119 (2021).
158. Segura-Aguilar, J. *et al.* Protective and toxic roles of dopamine in Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry* vol. 129 898–915 Preprint at <https://doi.org/10.1111/jnc.12686> (2014).
159. Braak, H., Sastre, M. & Del Tredici, K. Development of α -synuclein immunoreactive astrocytes in the forebrain parallels stages of intraneuronal pathology in sporadic Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* **114**, 231–241 (2007).
160. Sonninen, T. M. *et al.* Metabolic alterations in Parkinson's disease astrocytes. *Sci Rep* **10**, (2020).
161. Wakabayashi, K., Hayashi, S., Yoshimoto, M., Kudo, H. & Takahashi, H. NACP/ α -synuclein-positive filamentous inclusions in astrocytes and oligodendrocytes of Parkinson's disease brains. *Acta Neuropathol* **99**, 14–20 (2000).
162. Tremblay, M.-E., Cookson, M. R. & Civiero, L. Glial phagocytic clearance in Parkinson's disease. *Mol Neurodegener* **14**, 16 (2019).
163. Loria, F. *et al.* α -Synuclein transfer between neurons and astrocytes indicates that astrocytes play a role in degradation rather than in spreading. *Acta Neuropathol* **134**, 789–808 (2017).
164. Zhang, Y., Tan, F., Xu, P. & Qu, S. Recent Advance in the Relationship between Excitatory Amino Acid Transporters and Parkinson's Disease. *Neural Plasticity* vol. 2016 Preprint at <https://doi.org/10.1155/2016/8941327> (2016).
165. Farrand, A. Q., Gregory, R. A., Bäckman, C. M., Helke, K. L. & Boger, H. A. Altered glutamate release in the dorsal striatum of the MitoPark mouse model of Parkinson's disease. *Brain Res* **1651**, 88–94 (2016).
166. Feng, Y., Zhou, S. & Sun, J. Exercise increases striatal Glu reuptake and improves motor dysfunction in 6-OHDA-induced Parkinson's disease rats. *Exp Brain Res* **239**, 3277–3287 (2021).
167. Díaz-Amarilla, P. *et al.* Phenotypically aberrant astrocytes that promote motoneuron damage in a model of inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 18126–18131 (2011).
168. Díaz-Amarilla, P. *et al.* Isolation and characterization of neurotoxic astrocytes derived from adult triple transgenic Alzheimer's disease mice. *Neurochem Int* **159**, (2022).
169. Echeverry, C. *et al.* Neuroprotective Effect of a Pharmaceutical Extract of Cannabis with High Content on CBD Against Rotenone in Primary Cerebellar Granule Cell Cultures and the Relevance of Formulations. *Cannabis Cannabinoid Res* **9**, e907–e916 (2024).
170. Echeverry, C. *et al.* A Comparative In Vitro Study of the Neuroprotective Effect Induced by Cannabidiol, Cannabigerol, and Their Respective Acid Forms: Relevance of the 5-HT_{1A} Receptors. *Neurotox Res* **39**, 335–348 (2021).
171. Santi, M. D. *et al.* Neuroprotective effects of prenylated flavanones isolated from Dalea species, in vitro and in silico studies. *Eur J Med Chem* **206**, 112718 (2020).
172. Rivera, F. *et al.* Reduction of ischemic brain damage and increase of glutathione by a liposomal preparation of quercetin in permanent focal ischemia in rats. *Neurotox Res* **13**, 105–114 (2008).

173. Costa, G., Abin-Carriquiry, J. A. & Dajas, F. Nicotine prevents striatal dopamine loss produced by 6-hydroxydopamine lesion in the substantia nigra¹Published on the World Wide Web on 1 December 2000. *Brain Res* **888**, 336–342 (2001).
174. Echeverry, C. *et al.* Cytoprotection by Neutral Fraction of Tannat Red Wine against Oxidative Stress-Induced Cell Death. *J Agric Food Chem* **52**, 7395–7399 (2004).
175. Arredondo, F. *et al.* After cellular internalization, quercetin causes Nrf2 nuclear translocation, increases glutathione levels, and prevents neuronal death against an oxidative insult. *Free Radic Biol Med* **49**, 738–747 (2010).
176. Mouhape, C. *et al.* Nicotine-Induced Neuroprotection in Rotenone In Vivo and In Vitro Models of Parkinson's Disease: Evidences for the Involvement of the Labile Iron Pool Level as the Underlying Mechanism. *Neurotox Res* **35**, 71–82 (2019).
177. Abin-Carriquiry, J. A. *et al.* In vivo modulation of dopaminergic nigrostriatal pathways by cytisine derivatives: Implications for Parkinson's Disease. *Eur J Pharmacol* **589**, 80–84 (2008).
178. Urbanavicius, J. *et al.* Nicotine induces tyrosine hydroxylase plasticity in the neurodegenerating striatum. *J Neurochem* **102**, 723–730 (2007).
179. Dajas, F. *et al.* *Neuroprotection by Flavonoids. Brazilian Journal of Medical and Biological Research* vol. 36 (2003).
180. Greene, L. A., Farinelli, S. E., Cunningham, M. E. & Park, D. S. Culture and Experimental Use of the PC12 Rat Pheochromocytoma Cell Line. in *Culturing Nerve Cells* 161–188 (The MIT Press, 1998). doi:10.7551/mitpress/4913.003.0013.
181. Paxinos, G. & Watson, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. (Academic Press, 2013).
182. Verma, A., Verma, M. & Singh, A. Animal tissue culture principles and applications. in *Animal Biotechnology: Models in Discovery and Translation* 269–293 (Elsevier, 2020). doi:10.1016/B978-0-12-811710-1.00012-4.
183. Giepmans, B. N. G., Adams, S. R., Ellisman, M. H. & Tsien, R. Y. The fluorescent toolbox for assessing protein location and function. *Science* vol. 312 217–224 Preprint at <https://doi.org/10.1126/science.1124618> (2006).
184. Asakawa, T. *et al.* Animal behavioral assessments in current research of Parkinson's disease. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* vol. 65 63–94 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.03.016> (2016).
185. Gallyas, F., Göröcs, T. & Merchenthaler, I. High-grade intensification of the end-product of the diaminobenzidine reaction for peroxidase histochemistry. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **30**, 183–184 (1982).
186. Colombo, E. & Farina, C. Astrocytes: Key Regulators of Neuroinflammation. *Trends in Immunology* vol. 37 608–620 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.06.006> (2016).
187. Gomes-Leal, W. Microglial physiopathology: How to explain the dual role of microglia after acute neural disorders? *Brain Behav* **2**, 345–356 (2012).
188. Balestrino, R. & Schapira, A. H. V. Parkinson disease. *European Journal of Neurology* vol. 27 27–42 Preprint at <https://doi.org/10.1111/ene.14108> (2020).
189. Güler, B. E., Krzysko, J. & Wolfrum, U. Isolation and culturing of primary mouse astrocytes for the analysis of focal adhesion dynamics. *STAR Protoc* **2**, (2021).
190. Gibbons, H. M. *et al.* Cellular composition of human glial cultures from adult biopsy brain tissue. *J Neurosci Methods* **166**, 89–98 (2007).
191. Schildge, S., Bohrer, C., Beck, K. & Schachtrup, C. Isolation and culture of mouse cortical astrocytes. *J Vis Exp* (2013) doi:10.3791/50079.
192. Colton, C. A. & Wilcock, D. M. *Assessing Activation States in Microglia. CNS & Neurological Disorders-Drug Targets* vol. 9 (2010).

193. Huang, Y. *et al.* Repopulated microglia are solely derived from the proliferation of residual microglia after acute depletion. *Nat Neurosci* **21**, 530–540 (2018).
194. Trias, E. *et al.* Phenotypic transition of microglia into astrocyte-like cells associated with disease onset in a model of inherited ALS. *Front Cell Neurosci* **7**, (2013).
195. Huysentruyt, L. C., Akgoc, Z. & Seyfried, T. N. Hypothesis: Are neoplastic macrophages/microglia present in glioblastoma multiforme? *ASN Neuro* vol. 3 183–193 Preprint at <https://doi.org/10.1042/AN20110011> (2011).
196. Fiedorowicz, A., Figiel, I., Zaremba, M., Dzwonek, K. & Oderfeld-Nowak, B. The ameboid phenotype of NG2 (+) cells in the region of apoptotic dentate granule neurons in trimethyltin intoxicated mice shares antigen properties with microglia/macrophages. *Glia* **56**, 209–222 (2008).
197. Persson, A. & Englund, E. Phagocytic properties in tumor astrocytes. *Neuropathology* **32**, 252–260 (2012).
198. Hol, E. M. & Pekny, M. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. *Current Opinion in Cell Biology* vol. 32 121–130 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.02.004> (2015).
199. De Pablo, Y., Nilsson, M., Pekna, M. & Pekny, M. Intermediate filaments are important for astrocyte response to oxidative stress induced by oxygen-glucose deprivation and reperfusion. *Histochem Cell Biol* **140**, 81–91 (2013).
200. Quinlan, R. A., Brenner, M., Goldman, J. E. & Messing, A. GFAP and its role in Alexander disease. *Experimental Cell Research* vol. 313 2077–2087 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2007.04.004> (2007).
201. Sosunov, A. A., McKhann, G. M. & Goldman, J. E. The origin of Rosenthal fibers and their contributions to astrocyte pathology in Alexander disease. *Acta Neuropathol Commun* **5**, 27 (2017).
202. Díaz-Amarilla, P. *et al.* Phenotypically aberrant astrocytes that promote motoneuron damage in a model of inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 18126–18131 (2011).
203. Murnane, A. C., Brown, K. & Keith, C. H. Preferential initiation of PC12 neurites in directions of changing substrate adhesivity. *J Neurosci Res* **67**, 321–328 (2002).
204. Balcombe, J. P., Barnard, N. D. & Sandusky, C. Laboratory routines cause animal stress. *Contemp Top Lab Anim Sci* **43**, 42–51 (2004).
205. Würbel, H. Ideal homes? Housing effects on rodent brain and behaviour. *Trends Neurosci* **24**, 207–211 (2001).
206. Clark, P. J. *et al.* Running reduces uncontrollable stress-evoked serotonin and potentiates stress-evoked dopamine concentrations in the rat dorsal striatum. *PLoS One* **10**, (2015).
207. Jiménez-Riani, M. *et al.* Ultrastructural features of aberrant glial cells isolated from the spinal cord of paralytic rats expressing the amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1G93A mutation. *Cell Tissue Res* **370**, 391–401 (2017).
208. Villarreal, A. *et al.* Isolation and Characterization of Ischemia-Derived Astrocytes (IDAs) with Ability to Transactivate Quiescent Astrocytes. *Front Cell Neurosci* **10**, (2016).
209. Trias, E. *et al.* Post-paralysis tyrosine kinase inhibition with masitinib abrogates neuroinflammation and slows disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuroinflammation* **13**, (2016).
210. Buhmann, C., Mainka, T., Ebersbach, G. & Gandor, F. Evidence for the use of cannabinoids in Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission* vol. 126 913–924 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s00702-019-02018-8> (2019).

211. Bromberg, N. *et al.* Growth inhibition and pro-apoptotic activity of violacein in Ehrlich ascites tumor. *Chem Biol Interact* **186**, 43–52 (2010).