

*“Lee”*

*Es la primera palabra que vino en el Corán, una indicación clara de la importancia de la ciencia en la construcción y el desarrollo de la civilización humana.*





**UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

**FACULTAD DE FARMACIA**

**Dpt. Bioquímica y Biología Molecular**

**EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON METFORMINA EN EL  
SISTEMA DOPAMINÉRGICO NIGROESTRIADO.  
POSIBLE IMPLICACIÓN EN LA ENFERMEDAD DE PARKINSON**

**AFRAH ABDUL KARIM ISMAIEL**

**TESIS DOCTORAL. 2014**





José Manuel Vega Pérez, Decano de la Facultad de Farmacia y Presidente de la Comisión Académica del Programa. Universidad de Sevilla.

CERTIFICA: Que la tesis doctoral titulada **“Efecto del tratamiento con metformina en el sistema dopaminérgico nigroestriado. Posible implicación en la enfermedad de Parkinson”**, presentada por la **Lda. Afrah Abdul karim Ismaiel**, para optar al grado de Doctor en Farmacia, ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, reuniendo los requisitos exigidos.

Y para que así conste, firmo el presente certificado en Sevilla, a veintiuno de Abril de 2014.



FACULTAD DE FARMACIA Fdo: José Manuel Vega Pérez.





Tutora De La Tesis: Carmen Martín Cordero. Profesora Titular Del Departamento De Farmacología.

Directores De La Tesis: Antonio Ayala Gómez, Rocío Martínez De Pablos, Ana M<sup>a</sup> Espinosa Oliva, Catedrático De Universidad, Profesora Contratada Doctora, Profesora Ayudante Doctora; Respectivamente, Del Departamento De Bioquímica Y Biología Molecular; y Mercedes Cano Rodríguez, Profesora Titular De Universidad Del Departamento De Fisiología.

CERTIFICAN: Que la tesis doctoral titulada **“Efecto del tratamiento con metformina en el sistema dopaminérgico nigroestriado. Posible implicación en la enfermedad de Parkinson”**,

presentada por la **Lda. Afrah Abdul karim Ismaiel** para optar al grado de Doctor en Farmacia, ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, bajo nuestra dirección y reuniendo los requisitos exigidos, dando conformidad a su presentación.

Y para que así conste, firmamos el presente certificado en Sevilla, a veintiuno de Abril de 2014.

Fdo: Carmen Martín Cordero

Fdo: Antonio Ayala Gómez

Fdo: Ana M<sup>a</sup> Espinosa Oliva

Fdo: Rocío Martínez de Pablos

Fdo: Mercedes Cano Rodríguez



ධර්මයෙහි

ඉ

සාරයෙහි

*A mi madre mártir y a mi padre*

*A vuestras almas nobles*

*Mi sueño era que estéis conmigo en este día.. Cada día que pasa es mayor el dolor de la ausencia. Es como un gran vacío que no se llena... Me habéis enseñado que la fe en Dios es la paciencia y la alabanza; y ello me da motivos para continuar.*

*A mi hermano Hasan,*

*Y mis hermanas , Jamila, Kala, Rula y Rana..*

## *Agradecimientos:*

*Es difícil entender la importancia de los agradecimientos de una tesis doctoral hasta que no se ha terminado. En ese momento te das cuenta de cuánto tienes que agradecer a tanta gente. Intentaré resumir en unas líneas la gratitud que siento a todas las personas que han estado presentes durante esa etapa, haciendo posible que hoy deje de ser un sueño para convertirse en una realidad.*

*A mis queridas directoras, Rocío de Pablos e Ana M<sup>a</sup> Espinosa, no solamente por toda vuestra ayuda y consejos o la oportunidad que me disteis de participar en vuestro grupo, sino por vuestra amistad que tanto valoro.*

*A mi directora y amiga Mercedes Cano, y mi profesor Antonio Ayala. Les agradezco que me hayan abierto hace ya cuatro años las puertas de su grupo de investigación, dándome la oportunidad de tener una visión más amplia del mundo de la investigación y descubrir cuánto me apasiona.*

*A mi tutora, Carmen Martín, por su apoyo y confianza durante toda esta etapa. Todo lo que me ha enseñado, va a tener como una huella suya en todos mis futuros trabajos.*

*Agradezco también a los otros Profesores, Alberto Machado, Antonio J Herrera, Martiniano Santiago y José Luis Venero, por sus sabios consejos, disponibilidad y colaboración en este trabajo.*

Al todos los profesores de nuestro departamento, y de los demás, con una mención especial a Dr<sup>a</sup> Ana Cameán, por ser la causante de que entrara en este mundo, el mundo de la investigación.

Al mis compañeros/as en el laboratorio,

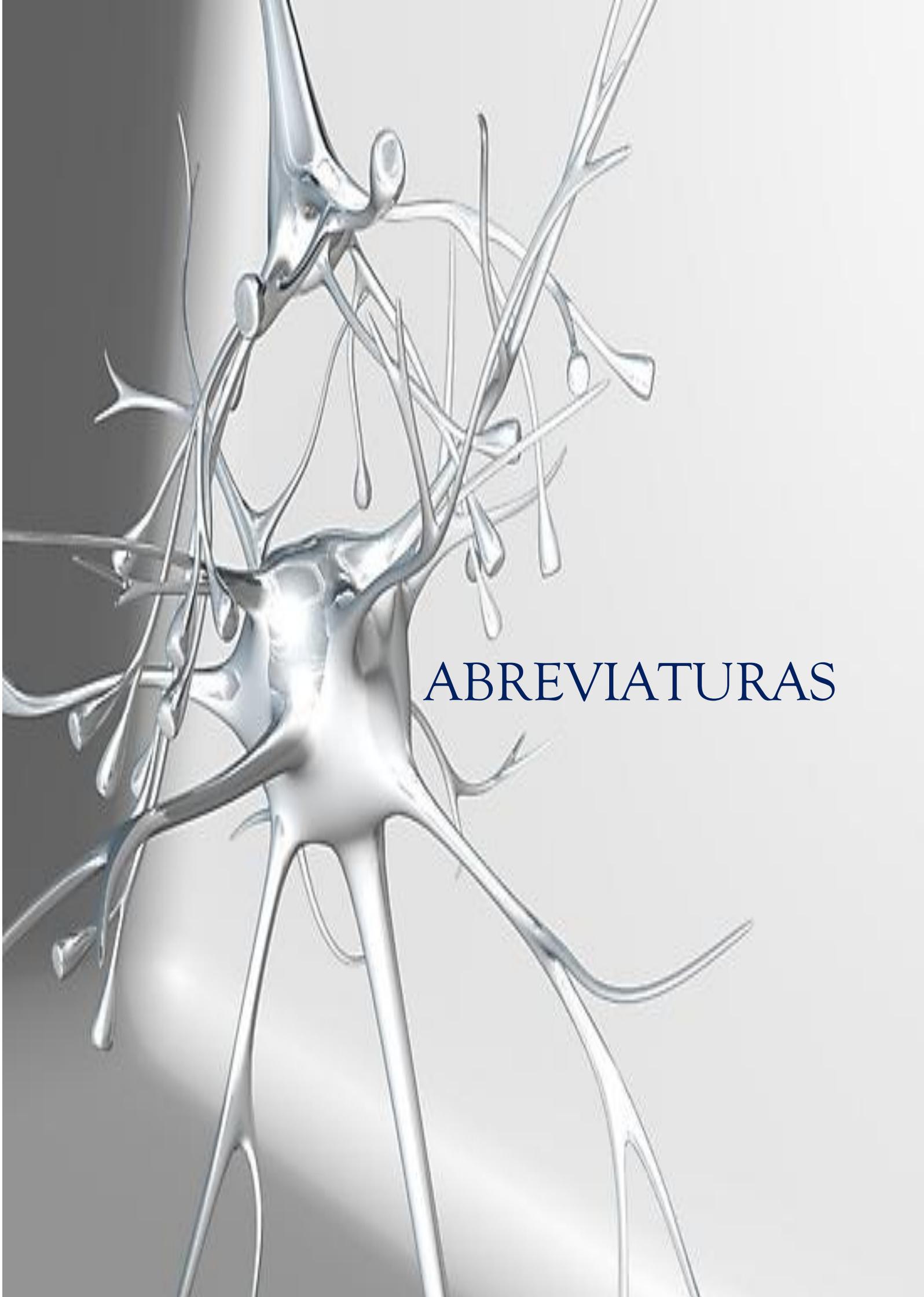
Al todos mis compañeros que he conocido durante estos cuatro años en el laboratorio, por todo nuestro apoyo y los tiempos y detalles buenos o difíciles nos han pasado muy bien porque estaban llenos de colaboración y amistad.

Al mis amigas verdaderas de toda la vida;

Al toda la gente amable que he conocido y me han apoyado durante esta etapa; a las madres de mis amigas; a mis amigos del club Toastmasters Sevilla; a mis compañeros en la facultad, árabes y españoles, a todos vosotros, os doy las gracias una y mil veces a ser mi gran familia aquí en España.

Por último, pero no menos importante, a mi país, mi querida Siria, y a los nobles mártires.





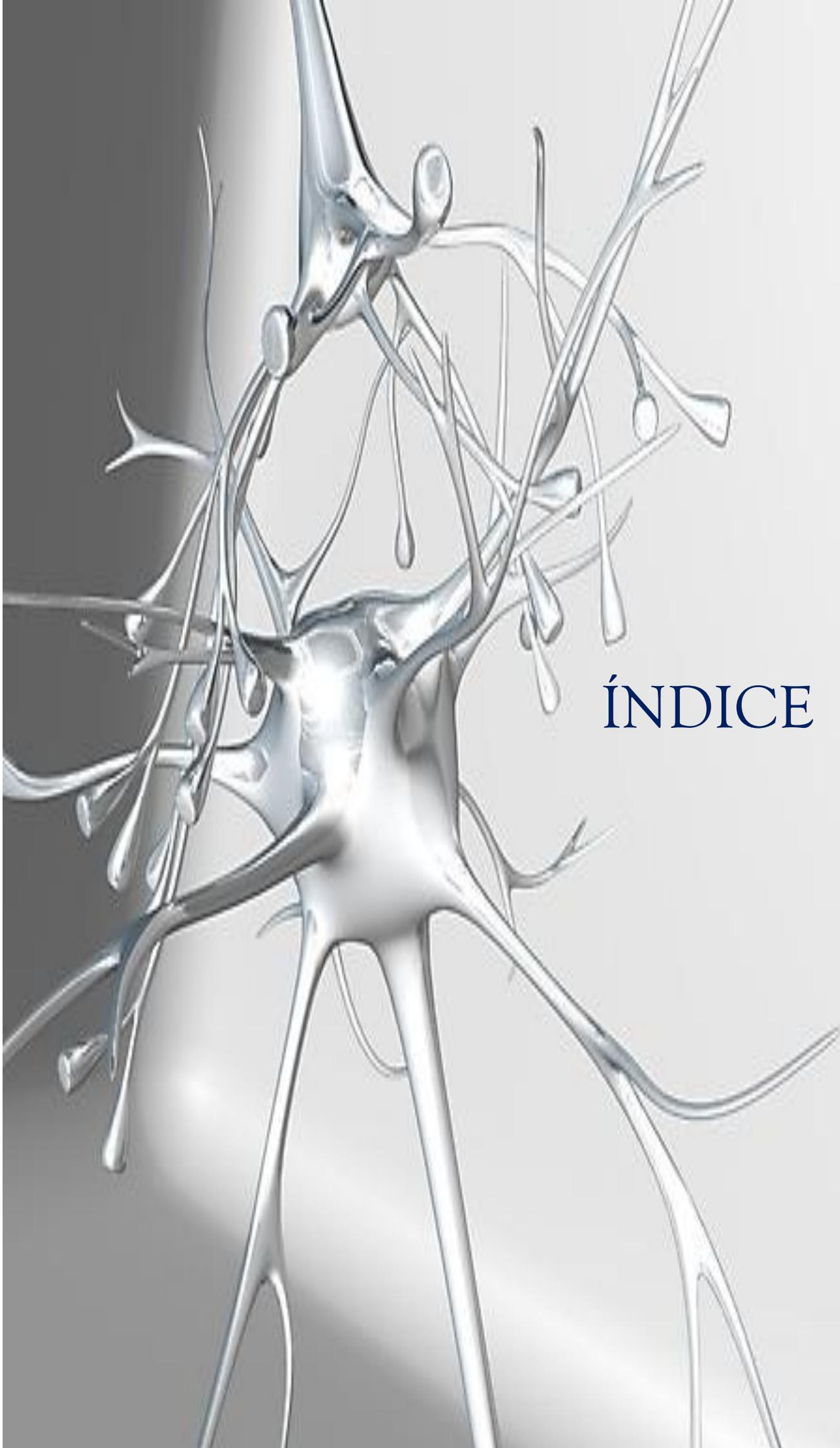
# ABREVIATURAS



<b>6-OHDA</b>	6-hidroxidopamina	<b>MAPK</b>	Proteína quinasa activada por mitógenos
<b>ACH</b>	Acetilcolina	<b>MHC</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato	<b>MPDP<sup>+</sup></b>	1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridina
<b>AICAR</b>	5-amino-4-imidazol-carboxamida ribosa	<b>MPO</b>	Mieloperoxidasa
<b>α-sin</b>	Alfa-sinucleína	<b>MPP<sup>+</sup></b>	1-metil-4-fenilpiridina
<b>AMPc</b>	Adenosín monofosfato cíclico	<b>MPPP</b>	1-metil-4-fenil-4-propionpiperidina
<b>AMPK</b>	Proteína quinasa activada por AMP	<b>MPTP</b>	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
<b>ATV</b>	Área tegmental ventral	<b>MTT</b>	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
<b>BHE</b>	Barrera hematoencefálica	<b>NADPH<sub>ox</sub></b>	NADPH oxidasa
<b>CB</b>	Calbindina	<b>NF-κB</b>	Factor nuclear κB
<b>CR</b>	Calretinina	<b>NMDA</b>	N-metil-D-aspartato
<b>DA</b>	Dopamina	<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>DAT</b>	Transportador de dopamina	<b>NOS</b>	Óxido nítrico sintasa
<b>DE</b>	Desviación estándar	<b>NST</b>	Núcleos subtalámicos
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfóxido	<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>DOPA</b>	Dihidroxifenilalanina	<b>PK</b>	Proteínquinasa
<b>EA</b>	Enfermedad de Alzheimer	<b>PLC</b>	Fosfolipasa C
<b>EP</b>	Enfermedad de Parkinson	<b>PV</b>	Parvoalbúmina
<b>ERK</b>	Quinasa regulada por señales extracelulares	<b>RLOs</b>	Radicales libres de oxígeno
<b>EROs</b>	Especies reactivas de oxígeno	<b>RT-PCR</b>	PCR a tiempo real
<b>FBS</b>	Suero fetal bovino	<b>s.c.</b>	Subcutáneo
<b>GABA</b>	Ácido γ-aminobutírico	<b>SM</b>	Esfingomielasa
<b>Glu</b>	Glutamato	<b>SN</b>	Sustancia negra
<b>GP</b>	Globo pálido	<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>GPe</b>	Globo pálido externo	<b>SNc</b>	Sustancia negra compacta
<b>GPI</b>	Globo pálido interno	<b>SNI</b>	Sustancia negra lateral
<b>GPI</b>	Glicosilfosfatidilinositol	<b>SNr</b>	Sustancia negra reticular
<b>GT1b</b>	Trisialogangliósido	<b>SUP</b>	Sistema ubiquitina-proteosoma
<b>HPM</b>	Haz prosencefálico medial	<b>TBS</b>	Tampón Tris salino
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G	<b>TF</b>	Factor tisular
<b>IL</b>	Interleuquina	<b>TH</b>	Tirosina hidroxilasa
<b>iNOS</b>	Óxido nítrico sintasa inducible	<b>TK</b>	Tirosinquinasa
<b>i.p.</b>	Intraperitoneal	<b>TNF</b>	Factor de necrosis tumoral
<b>IRAK</b>	Quinasa asociada al receptor de IL-1	<b>TNFr</b>	Receptor de TNF
<b>JNK</b>	Proteínquinasa del factor de transcripción c-jun	<b>TPB</b>	Tetrafenilborato
<b>K.O.</b>	Knockout		
<b>LBP</b>	Proteína de unión al LPS		
<b>L-DOPA</b>	Levodopa		
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido		
<b>LRR</b>	Repeticiones ricas en leucina		

---





# ÍNDICE



<b><u>OBJETIVOS.</u></b>	<b>1</b>
<b><u>INTRODUCCION.</u></b>	<b>5</b>
<b>1. GANGLIOS BASALES</b>	<b>5</b>
<b>1.1 Neurotransmisores y Neuromoduladores de los Ganglios Basales</b>	<b>7</b>
<b>1.2 Principales Conexiones de los Ganglios Basales</b>	<b>8</b>
1.2.1 Vía de la Corteza a los Ganglios Basales y de nuevo hacia la Corteza	10
1.2.2 Relaciones de los Núcleos Talámicos Intralaminares y Los Ganglios Basales	11
1.2.3 Tractos de salida de los Ganglios Basales hacia el Tronco Encefálico	12
1.2.4 Vía Nigro-Estriada	12
<b>1.3 Funciones de Los Ganglios Basales</b>	<b>15</b>
1.3.1 Inhibición del tono motor por los Ganglios Basales	15
1.3.2 Función del Núcleo Caudado y Putamen	15
1.3.3 Función del Globo Pálido	16
<b>1.4 Síndromes Clínicos Resultantes del Daño a los Ganglios Basales</b>	<b>17</b>
1.4.1 Enfermedad de Parkinson	17
<b>2. TEORÍAS Y MODELOS DE NEURODEGENERACIÓN</b>	<b>21</b>
<b>2.1 Animales Transgénicos</b>	<b>22</b>
<b>2.2 Modelos Basados En La Inyección de Neurotoxinas</b>	<b>24</b>
2.2.1 Estrés Oxidativo	25
2.2.2 Fallo Energético Mitocondrial	26
2.2.3 Inflamación	26
<b>3. MODELO ANIMAL DE EP POR FALLO ENERGÉTICO MITOCONDRIAL: INYECCIÓN DE MPTP</b>	<b>31</b>
<b>3.1 Descubrimiento del MPTP Como Modelo de la EP</b>	<b>32</b>
<b>3.2 Modelo de MPTP En Ratón</b>	<b>33</b>
<b>3.3 Modo de Acción del MPTP</b>	<b>36</b>
<b>4. MODELO ANIMAL DE EP POR INFLAMACIÓN: INYECCIÓN DE LPS</b>	<b>39</b>
<b>4.1 Lipopolisacárido</b>	<b>39</b>
4.1.1 Interacción Entre el LPS y Proteínas Solubles de Membrana	40
4.1.2 Transducción de Señal Inducida Por el LPS	42
<b>4.2 LPS Como Modelo de la EP</b>	<b>45</b>
<b>5. MECANISMOS MOLECULARES EN LA NEURODEGENERACIÓN</b>	<b>52</b>
<b>6. LA METFORMINA</b>	<b>57</b>
<b>6.1 Mecanismo de Acción de La Metformina</b>	<b>60</b>
<b>6.2 Efecto Anti-Inflamatorio de La Metformina</b>	<b>64</b>
<b><u>MATERIALES Y MÉTODOS</u></b>	<b>71</b>
<b>1. ANIMALES</b>	<b>71</b>
<b>2. CULTIVOS CELULARES</b>	<b>71</b>
<b>3. OPERACIONES QUIRÚRGICAS</b>	<b>73</b>
<b>4. TRATAMIENTOS</b>	<b>74</b>
<b>4.1 Ratas</b>	<b>74</b>
<b>4.2 Ratones</b>	<b>74</b>
<b>4.3 Células N27</b>	<b>75</b>

5. PERFUSIÓN DE LOS ANIMALES	77
6. INMUNOCITOQUÍMICA DE TIROSINA HIDROXILASA, OX-6 E IBA-1	77
7. DESHIDRATACIÓN Y MONTAJE DE LAS SECCIONES	79
8. ANÁLISIS DE LOS DATOS INMUNOHISTOQUÍMICOS	79
9. PCR A TIEMPO REAL	80
10. MEDIDA DE DA Y DOPAC	82
11. ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR	83
11.1 Ensayo del MTT	83
11.2 Ensayo de Muerte Celular	84
12. MEDIDA DE LOS NIVELES DE ATP PARA EVALUAR EL GRADO DE LA INHIBICIÓN DEL COMPLEJO I MITOCONDRIAL	84
13. MEDIDA DE LA PRODUCCIÓN DE EROS	85
14. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	86
15. REACTIVOS	86
<b><u>RESULTADOS</u></b>	<b>91</b>
1. EFECTO DE LA METFORMINA EN LA ACTIVACIÓN MICROGLIAL Y EN LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE TNF- $\alpha$ , IL-1B E INOS.	91
2. EFECTO DE LA METFORMINA EN EL SISTEMA DOPAMINERGICO	99
2.1 Inmunoreactividad De Las Células Dopaminérgicas En SN. Recuento de Células TH	99
2.2 Cuantificación de La Cantidad de Dopamina y DOPAC	104
3. EFECTO DE LA METFORMINA Y EL MPP <sup>+</sup> SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR DE NEURONAS DOPAMINÉRGICAS N27	106
3.1 Ensayo de Viabilidad Celular	106
3.2 Ensayo de Muerte Celular	110
3.3 Efecto de La Metformina y El MPP <sup>+</sup> sobre los niveles de ATP en Las Neuronas N27	111
3.4 Efecto de La Metformina Y El MPP <sup>+</sup> Sobre La Producción de Especies Reactivas de Oxígeno En Las Neuronas N27	114
<b><u>DISCUSIÓN</u></b>	<b>117</b>
1. EFECTO DE LA METFORMINA EN EL MODELO DE LPS	119
1.1 Efecto de La Metformina Sobre La Activación Microglial	119
1.2 Efecto de La Metformina Sobre La Pérdida Neuronal	122
2. EFECTO DE LA METFORMINA EN EL MODELO DE MPTP	125
2.1 Efecto de La Metformina Sobre La Activación Microglial	126
2.2 Efecto de La Metformina Sobre La Pérdida Neuronal	127
3. EFECTO DE LA METFORMINA EN LA VIABILIDAD NEURONAL Y LA PRODUCCIÓN DE ATP	129
4. EFECTO DE LA METFORMINA SOBRE LA PRODUCCIÓN DE EROS	131
5. RELACIÓN ENTRE METFORMINA Y ENFERMEDAD DE PARKINSON	132
<b><u>CONCLUSIONES</u></b>	<b>139</b>
<b><u>BIBLIOGRAFÍA</u></b>	<b>143</b>



# OBJETIVOS



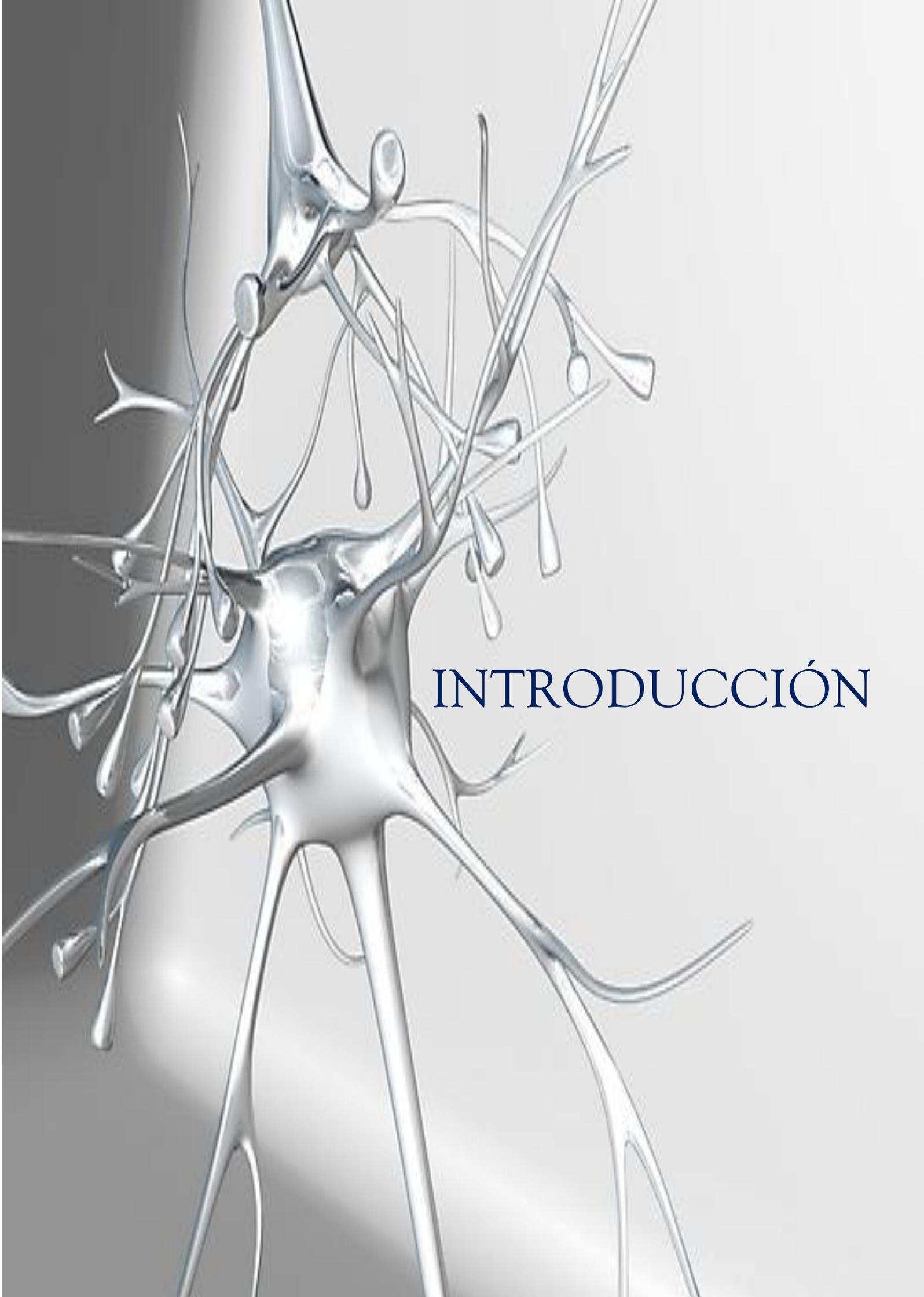
Dada la relevancia de la neuroinflamación en el desarrollo de la enfermedad de Parkinson (EP) y la actividad anti-inflamatoria de la metformina, el objetivo del presente trabajo es determinar si el tratamiento con este fármaco es capaz de proteger a las neuronas Dopaminérgicas (DAérgicas) de la sustancia negra compacta (SNc) de un fuerte estímulo inflamatorio inducido a través de dos modelos animales de EP, el inducido por la inyección intranigral del inflamógeno lipopolisacárido bacteriano (LPS) y el inducido por la inyección intraperitoneal (i.p.) de la neurotoxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP). Para ello, se llevarán a cabo técnicas inmunohistoquímicas combinadas con técnicas estereológicas para determinar el número de neuronas DAérgicas supervivientes tras los dos tratamientos mencionados. Así mismo, se llevarán a cabo técnicas de HPLC para cuantificar el contenido de dopamina (DA) y Dihidroxifenilalanina (DOPAC) en el estriado de los animales, como una medida indirecta de la pérdida neuronal en la SNc.

Varios estudios han mostrado que uno de los posibles mecanismos protectores de la metformina es su capacidad para inhibir la inflamación, por lo que se estudiará el grado de inflamación cerebral tanto a nivel celular como molecular. La densidad de microglía reactiva será cuantificada a partir de criterios morfológicos por inmunohistoquímica de Iba1 y OX-6. Para el estudio de la liberación de citoquinas pro-inflamatorias, tales como el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), la Interleuquina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) o la IL-6, se llevarán a cabo técnicas de PCR a tiempo real (RT-PCR).

Para completar los estudios *in vivo*, se llevarán a cabo estudios *in vitro* a través del cultivo de células DAérgicas N27 a las que se tratarán con diferentes dosis de 1-metil-4-fenilpiridina (MPP<sup>+</sup>) y de metformina. A partir de estos cultivos celulares se estudiará la viabilidad neuronal, la producción de radicales y la producción de Adenosina trifosfato (ATP) bajo los distintos tratamientos. Finalmente, se llevarán a

cabo estudios por citometría de flujo para determinar el tipo de muerte (necrótica o apoptótica) que se produce con los distintos tratamientos ensayados.

Todos estos datos nos permitirán estudiar el efecto del tratamiento con metformina sobre las neuronas DAérgicas de la SN tras un daño originado por dos modelos diferentes.



# INTRODUCCIÓN



## 1. GANGLIOS BASALES.

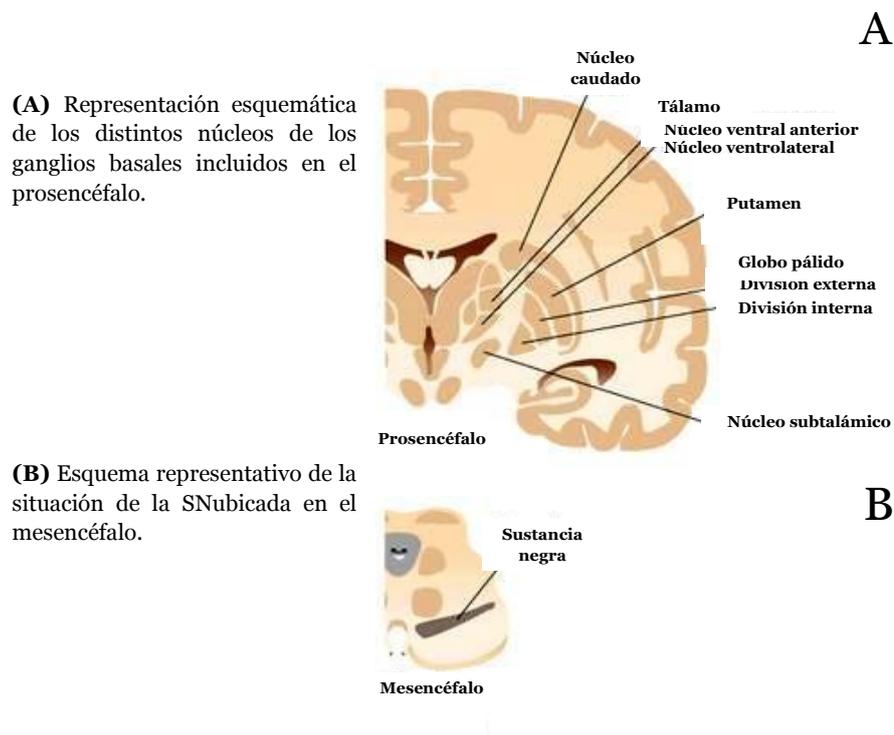
En el 1664, el anatómico inglés Thomas Willis fue el primero en realizar una clara identificación de las distintas estructuras subcorticales. Lo que ahora se conoce funcionalmente como ganglios basales entonces se denominaba *corpus striatum*. Ocupaba una posición central, conectado con una gran variedad de fibras corticales y al tronco cerebral, que en aquel tiempo se creyó que era el “*sensorium commune*” definido por Aristóteles. Se pensaba que esta estructura recibía todas las modalidades sensoriales e iniciaba todos los actos motores. Esta idea parecía estar reforzada anatómicamente por su posición ventral y por los sistemas de fibras ascendentes y descendentes claramente visibles (Parent y Hazrati, 1995).

Dos hechos contribuyeron a relegar al *corpus striatum* a una posición oscura y menos definida: la atractiva organización histológica de la corteza, y la posibilidad de localizar funciones mentales superiores en la misma, lo que llevó a muchos neurólogos de los siglos XVIII y XIX al estudio de la corteza. Aquellos que continuaron estudiando el *corpus striatum*, descubrieron de pronto que muchas de las funciones asignadas originalmente a esta estructura eran, de hecho, propiedad de las rutas corticoespinales vecinas. Como describía Wilson en 1914, “el *corpus striatum* se ha depreciado en su significación fisiológica”. A principios del siglo XX hubo serios intentos de proporcionar una descripción comparativa y detallada del *corpus striatum* (Ramón y Cajal, 1911; Wilson, 1914). Comenzó a ganar importancia de nuevo con el descubrimiento, de que las lesiones de estas áreas en los seres humanos, daban como resultado frecuentemente desórdenes de las funciones motoras. El *corpus striatum* se convirtió en el componente principal del sistema motor extrapiramidal. Este término, de una forma un tanto indefinida, agrupa al *corpus striatum* con una serie de núcleos del tronco cerebral, y refleja la presunción de que esta agrupación constituía una unidad

motora completa e independiente. El término “ganglios basales” se ha usado generalmente para referirse a estos núcleos anatómicos telencefálicos subcorticales en la base del cerebro anterior. Más formalmente, esta definición agrupa al *corpus striatum* (estriado y globo pálido) con la SN y los núcleos subtalámicos (NST).

En sentido estricto, el término ganglios basales agrupa a los núcleos telencefálicos subcorticales; estos núcleos son el cuerpo estriado y el núcleo amigdaloides. Sin embargo, la SN, los NST e importantes partes del tálamo, como la formación reticular, operan en estrecha asociación con aquellos y, en consecuencia, se consideran parte del sistema de los ganglios basales para el control motor (Gerfen, 1992).

Por tanto, se considera que forman parte de los ganglios basales el caudado, el putamen, el globo pálido (GP), los Núcleos subtalámicos (NST), la SN y el área tegmental ventral (ATV) (**Fig.1**). El caudado y el putamen provienen de la misma estructura telencefálica, por lo que están formados por el mismo tipo de células, fusionándose además por la parte anterior; al conjunto se le conoce como cuerpo estriado, nombre que se le da también en la rata, una especie anatómicamente menos diferenciada, donde ambas estructuras constituyen un núcleo único. El GP se divide en dos segmentos, el externo (GPe) y el interno (GPi); en la rata este último se denomina núcleo entopeduncular. La SN se divide en tres zonas: la parte lateral (SNl), la parte reticulada (SNr), que citológicamente se parece al GP, y la parte compacta (SNc), que es dorsal y está más pigmentada, lo que da nombre a esta región. (Parent y Hazrati, 1995)



**Fig. 1. Distribución anatómica de los ganglios basales.** (Leisman y Melillo, 2013)

## 1.1. NEUROTRANSMISORES Y NEUROMODULADORES DE LOS GANGLIOS BASALES.

En los diversos núcleos de los ganglios basales se encuentran presentes muchos de los neurotransmisores clásicos que tienen acciones post-sinápticas rápidas, incluido GABA (ácido gamma-aminobutírico) y el glutamato (Glu), actuando en receptores NMDA (N-metil-D-aspartato). (Moriizumi y Hattori, 1992).

Además, se encuentran muchas sustancias neuromoduladoras con acciones sinápticas lentas, como la DA, la acetilcolina (ACh), al mismo tiempo que el Glu (cuando sí actúa en receptores del tipo NMDA). (Mugnaini, 1985).

El principal neurotransmisor de los ganglios basales es el GABA, que tiene acción inhibitoria. En el estriado, el GABA se halla en las neuronas de proyección, las neuronas espinosas de tipo medio. Estas neuronas, que poseen abundantes espinas dendríticas, proyectan sus axones a los dos segmentos del GP (GPe y GPi) y a la SNr. Además del GABA, las neuronas espinosas medias contienen encefalinas o sustancia P y dinorfinas. Las neuronas de proyección de los segmentos interno y externo del GP y de la SNr contienen también GABA. En consecuencia, el núcleo de salida de los ganglios basales es inhibitorio.

El Glu, considerado un neurotransmisor excitatorio, se encuentra en las neuronas piramidales, siendo la principal aferencia al estriado (el principal núcleo de entrada a los ganglios basales), en las terminales de las neuronas talámicas en el estriado y en las neuronas de proyección de los NST. (Rajakumar, 1994).

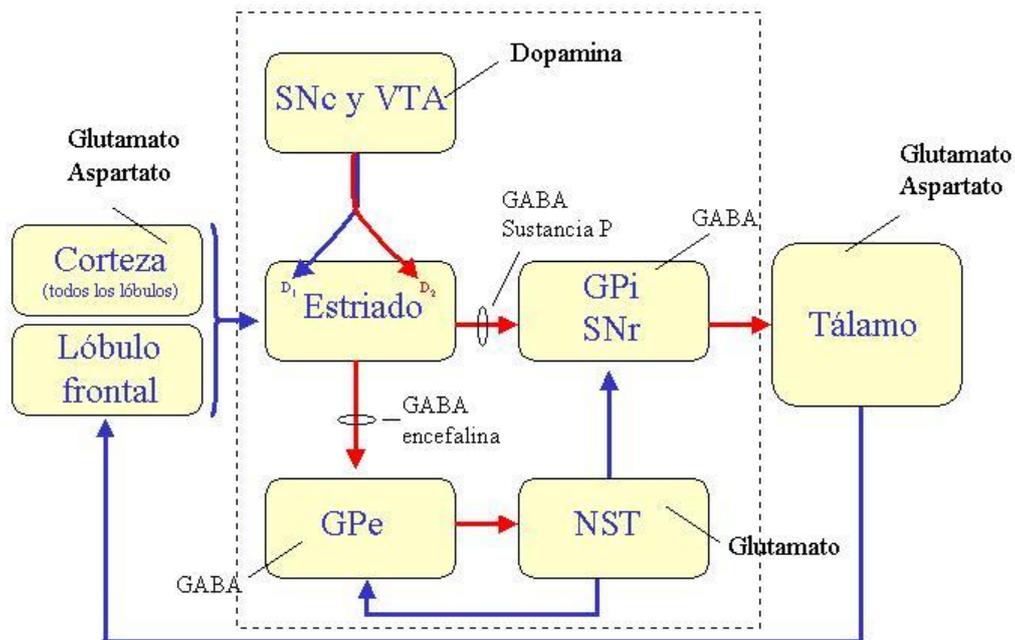
Las neuronas de la parte compacta de la SN y del ATV son dopaminérgicas (DAérgicas). El término “*substantia nigra*” deriva de la presencia del pigmento negro neuromelanina, contenido en las neuronas de la parte compacta. La neuromelanina es un polímero de dihidroxifenilalanina (DOPA), precursor de la DA.

La ACh es también un neurotransmisor habitual en los ganglios basales, encontrándose presente en las interneuronas del estriado, en las que es un neurotransmisor importante para la función de los circuitos neuronales (**Fig. 2**). (Haber, 1968).

### **1.2. PRINCIPALES CONEXIONES DE LOS GANGLIOS BASALES.**

Al contrario que la mayoría de los componentes del sistema motor, los núcleos subcorticales no reciben ni envían ninguna conexión directa con la médula espinal. Su aferencia principal proviene de la corteza cerebral y su eferencia se dirige, a través del

tálamo, de vuelta a la corteza, concretamente a las regiones prefrontal, premotora y motora. Por tanto, los ganglios basales, junto con el cerebelo, constituyen el más importante bucle subcortical del sistema motor.



**Fig. 2. Ilustración de los neurotransmisores de los ganglios basales (en negro) en relación con la organización de los circuitos de estos ganglios.** Las flechas azules indican conexión de tipo excitador mediada por Glu, y las flechas rojas indican conexión de tipo inhibitor mediada por GABA. La conexión entre la SNc y el estriado, que está mediada por DA, puede ser excitadora (si actúa sobre receptores D<sub>1</sub>) o inhibitoria (si actúa sobre receptores D<sub>2</sub>). GABA, ácido  $\gamma$ -aminobutírico; GPi, segmento interno del globo pálido; GPe, segmento externo del globo pálido; SNr, parte reticulada de la SN; SNc, parte compacta de la SN; ATV, área tegmental ventral; NST, Núcleos subtalámicos. (Adaptado de Haber, S.N. 1968).

El cerebelo regula directamente la ejecución del movimiento, mientras que los ganglios basales están implicados en aspectos cognitivos y de orden superior del control motor. Además, debido a las extensas conexiones de la corteza asociativa y estructuras límbicas, los ganglios basales participan en aspectos no relacionados con el movimiento, como las funciones afectivas y cognitivas. (Bourdiol, 1991).

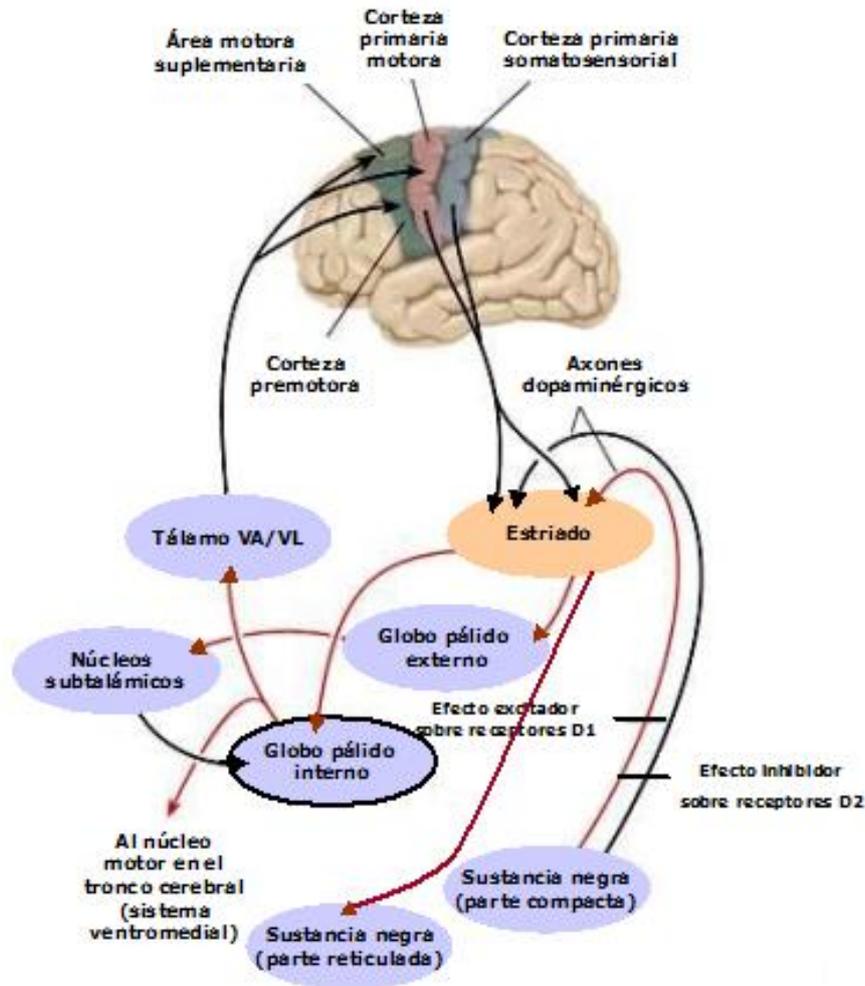
A continuación se describen con más detalle, las distintas conexiones que recorre la señal neuronal desde su aferencia principal, la corteza, hacia los ganglios basales, y de nuevo hacia la corteza una vez procesada la información.

### 1.2.1. VÍA DESDE LA CORTEZA HASTA LOS GANGLIOS BASALES Y DE NUEVO HACIA LA CORTEZA.

La Figura 3 ilustra la vía que compromete el mayor número de fibras nerviosas del sistema de los ganglios basales. Comienza en todas las áreas de la corteza cerebral y pasa a través de las cuatro etapas siguientes:

- 1) Desde la corteza hacia el núcleo caudado y putamen.
- 2) Desde el núcleo caudado y putamen hacia el GP, penetrando finalmente en el segmento medial del GP.
- 3) Desde el segmento medial del GP hasta los núcleos ventroanterior y ventrolateral del tálamo. Hacia estos mismos núcleos talámicos se transmiten también las señales provenientes del cerebelo.
- 4) Desde los núcleos ventroanterior y ventrolateral del tálamo de nuevo hacia todas las áreas de la corteza.

Esencialmente, todas las fibras nerviosas provenientes del caudado y el putamen hacia el GP (etapa 2) son vías inhibitorias que liberan el neurotransmisor GABA de sus terminaciones nerviosas. Debido a este paso inhibitorio, esta vía circular que comienza en la corteza y regresa nuevamente a ésta, forma un circuito de retroalimentación negativa que proporciona estabilidad a muchos aspectos de las interacciones del control motor.



**Fig. 3. Representación esquemática de las principales conexiones de los ganglios basales.** El principal componente de los ganglios basales, el estriado, recibe aferencias de la corteza. Dos vías de salida principales se dirigen al GP y al complejo de la parte reticulada de la SN. Las neuronas de DA de la SN mandan proyecciones al estriado y proporcionan una retroalimentación a través de la vía nigroestriada. (Leisman y Melillo, 2013).

### 1.2.2. INTERRELACIONES DE LOS NÚCLEOS TALÁMICOS INTRALAMINARES Y LOS GANGLIOS BASALES.

Existe un circuito de retroalimentación entre los núcleos intralaminares del tálamo y los ganglios basales que es similar al circuito de retroalimentación entre la corteza cerebral y los ganglios basales. También existe una estrecha relación con la

parte inferior del tronco encefálico. Son, en conjunto, porciones antiguas del sistema nervioso que tienen importancia en el control de los aspectos más primitivos del control motor (Carr, 1989).

### 1.2.3. TRACTOS DE SALIDA DESDE LOS GANGLIOS BASALES HACIA LA PARTE INFERIOR DEL TRONCO ENCEFÁLICO.

Aunque se sabe que los ganglios basales pueden tener efectos importantes sobre las funciones del control motor del tronco encefálico, sorprendentemente existen pocas proyecciones de fibras nerviosas directas desde los ganglios basales hacia la parte inferior del tronco encefálico. No obstante, existen varias vías pequeñas que se dirigen hacia la formación reticular del tronco encefálico. La mayor parte de las señales que provienen del GP pasan a través de los NST o de la SN antes de penetrar en la formación reticular. (Floor, 1998).

### 1.2.4. VIA NIGRO-ESTRIADA.

La SN, aunque presenta una situación más caudal, se incluye dentro de las estructuras de los ganglios basales por su íntima relación anatómica y funcional. Es un núcleo mesencefálico, el cual yace dorsal al *crus cerebri*, un tracto nervioso que se halla entre el cerebro y la médula oblonga, y se extiende hacia el mesencéfalo; juega un papel central en el control del movimiento, y actúa como centro principal de salida y entrada de los ganglios basales (Parent y col 1983; Fink y smith, 1990). Ha sido dividida citoarquitectónicamente en tres partes diferentes: 1) la SNc, formada por una capa horizontal empaquetada de células largas y medias que ocupan 1/3 del dorsal; 2) SNr, una división más difusa y pobre en células, que contiene neuronas medias y pequeñas dispuestas entre las SNc y el pedúnculo cerebral; y 3) SNI, formada por un pequeño

grupo de células medianas que se extienden rostro-caudalmente a lo largo del borde lateral de la SNc y la SNr (Danner y Pfister, 1982; Fallon y Seroogy, 1985; Yelnik y col, 1987; McRitchie y Halliday, 1995; McRitchie y col, 1996).

Los cuerpos neuronales DAérgicos localizados en la SNc proyectan sus axones hacia el núcleo caudado o el putamen (Lindvall y Björklund, 1978). Esta proyección nigro-estriada es principalmente ipsilateral, donde sólo un 5% de sus fibras cruzan al neostriado contralateral (Parent y col, 1983). Estas proyecciones DAérgicas establecen conexiones con diversos sistemas neuronales, entre las que se encuentran las interneuronas colinérgicas (McGeer y McGeer, 1980). Así, del 30 al 50% de las células del núcleo caudado proyectan a la SN (Bunney y Aghajanian, 1976). Además, también hay neuronas del GP que proyectan a la SN (Grofová, 1975). La mayoría de las fibras originadas en el neostriado acaban en la SNr (Grofová, 1975), mientras que las originadas en el GP hacen sinapsis en la SNc (Hattori y col, 1975).

De acuerdo con su neurotransmisor, las neuronas nigrales se clasifican en DAérgicas y GABAérgicas (Dahlström y Fuxe, 1964; Hökfelt y col, 1984; Mugnaini, 1985); ambas están involucradas en los diferentes desórdenes patofisiológicos de los ganglios basales (Albin y col, 1989). Las neuronas GABAérgicas son uno de los más importantes puntos de salida de los ganglios basales proyectando al tálamo, al colículo y al *tegmentum* (Grofová, 1982; Appell y Behan, 1990; Moriizumi y Hattori, 1992; Redgrave y col, 1992), y las neuronas DAérgicas son el origen de la proyección ascendente mesotelencefálica, cuyo principal blanco es el estriado (Lindvall y Björklund, 1978; Fallon y col, 1983; Gerfen y col, 1985). Las neuronas DAérgicas de la SN corresponden al grupo de células de la zona A9 de Dahlström y Fuxe (1964) y mientras estas se encuentran dispuestas cerca del mesencéfalo, la formación reticular retrorrubral y el ATV, se identificaron como A8 y A10 respectivamente. La mayoría de

las neuronas DAérgicas se localizaron en la SNc, algunas en la SNr, y sólo unas pocas de ellas dispuestas en la SNl (Hökfelt y col, 1984; Mugnaini, 1985; Smith y col, 1987; German y Manaye, 1993; Nelson y col, 1996).

Además de la DA y del GABA, se han encontrado en las células de la SN otras sustancias neuroactivas. La colecistoquinina (CCK), un péptido que ha sido propuesto como modulador de la liberación de diferentes neurotransmisores (Crawley, 1991; Wu y Wang, 1994; You y col, 1996), se expresa en una porción significativa de las células DAérgicas (Fallon y col, 1983; Hökfelt y col, 1984; Seroogy y col, 1989). La Calbindina D<sub>28k</sub> (CB), la Calretinina (CR) y la Parvoalbúmina (PV), son tres proteínas unidas a Ca<sup>2+</sup> intracelular (Heizmann, 1984; Baimbridge y col, 1992; Heizmann y Braun, 1992) que se han relacionado con la neuroprotección (Iacopino y col, 1990; Iacopino y col, 1992; Geloso y col, 1998) y con algunas propiedades fisiológicas de las neuronas (Carr y col, 1989). La CB se expresa en las neuronas DAérgicas de la parte medial (McRitchie y Halliday, 1995; McRitchie y col, 1996) y dorsal de la SNc (Gerfen, 1992) y en la SNl (McRitchie y col, 1996; Liang y col, 1996). La CR está presente en aproximadamente el 50% de las neuronas DAérgicas de la SNc, en el 55-80% de la SNl y una pequeña porción de ellas en la SNr (Liang y col, 1996; McRitchie y Halliday, 1995). La PV, por el contrario, sólo está presente en las neuronas GABAérgicas de la SNr y SNl (Reiner y Anderson, 1990; Rajakumar y col, 1994).

Por otra parte, neuronas distribuidas en la SNr y SNl muestran inmunorreactividad a la óxido nítrico sintasa (NOS) (Rodrigo y col, 1994), la enzima responsable de la síntesis del óxido nítrico (NO), una pequeña molécula libre que ha sido involucrada como mensajero intercelular en eventos fisiológicos como la potenciación a largo plazo y la liberación de neurotransmisores (Faber-Zuschratter y Wolf, 1994; Schuman y Madison, 1994; Garthwaite y Boulton, 1995), y como mediador

de procesos neuroprotectores y neurotóxicos (Dawson y col, 1991; Lei y col, 1992), incluyendo aquellos que implican a las neuronas de la SN (Hantraye y col, 1996; Przedborsky coli, 1996; González-Hernández y col, 1997).

### **1.3. FUNCIONES DE LOS GANGLIOS BASALES.**

Para poder definir las funciones de los ganglios basales, describiremos preferiblemente las funciones de ciertas porciones del sistema de ganglios basales, teniendo en cuenta que el sistema realmente opera junto con la corteza motora y el cerebelo como una unidad total, y que no pueden asignarse funciones particulares a las diferentes partes individuales de los ganglios basales.

#### **1.3.1. INHIBICIÓN DEL TONO MOTOR POR LOS GANGLIOS BASALES.**

Uno de los efectos generales de la excitación difusa de los ganglios basales es inhibir el tono muscular en todo el cuerpo. Este efecto es el resultado de señales inhibitorias transmitidas desde los ganglios basales tanto hacia la corteza motora como hacia la parte inferior del tronco encefálico. En consecuencia, cuando se produce una destrucción extensa de los ganglios basales se provoca una rigidez muscular en todo el cuerpo. No obstante, la estimulación de ciertas áreas específicas dentro de estos ganglios puede desencadenar contracciones musculares y a veces patrones complejos de movimientos (Parent y Hazrati 1995).

#### **1.3.2. FUNCIÓN DEL NÚCLEO CAUDADO Y PUTAMEN.**

Parecen funcionar juntos para iniciar y regular movimientos corporales intencionados que normalmente llevamos a cabo de forma inconsciente,

comprometiendo también a la corteza motora. Para llevar a cabo esta función, transmiten impulsos a través de dos vías diferentes: 1) hacia el GP, pasando desde allí al tálamo, hacia la corteza cerebral y finalmente hacia abajo en dirección a la médula espinal por la vía corticoespinal; 2) hacia abajo a través del GP y la SN, por medio de axones cortos hacia la formación reticular y finalmente hacia la médula espinal principalmente a través de los tractos reticuloespinales (Jones y col, 1995).

### 1.3.3. FUNCIÓN DEL GLOBO PÁLIDO.

Prácticamente todo el flujo de salida de señales proveniente de los ganglios basales es canalizado a través del GP en su regreso hacia la corteza o en su vía hacia centros cerebrales inferiores. También tiene otra función que opera en estrecha relación con el subtálamo y el tronco encefálico para ayudar a controlar los movimientos corporales axiales y de la cintura, así como las funciones motoras de las manos y de los pies. Las lesiones en el GP interfieren seriamente en los movimientos asociados a actividades precisas, en los que son necesarios una ubicación concreta y específica de la mano, por lo que resultaría difícil o imposible la utilización de ésta para actividades definidas.

La estimulación eléctrica del GP mientras se está llevando a cabo un movimiento corporal brusco, detendrá a menudo el movimiento en una posición estática, sosteniendo esa posición durante unos segundos mientras la estimulación continua. Por tanto el GP está implicado en algún tipo de sistema de control motor por retroalimentación que es capaz de bloquear las diferentes partes del cuerpo en posiciones específicas (Parent y col, 1983).

## 1.4. SÍNDROMES CLÍNICOS RESULTANTES DEL DAÑO A LOS GANGLIOS BASALES.

Como se ha comentado, existe una notable variedad de disfunciones conductuales que van asociadas a la patología de los ganglios basales. Entre ellas se encuentran la EP, la enfermedad de Huntington, la atenosis y el hemibalismo, entre otras.

### 1.4.1. ENFERMEDAD DE PARKINSON.

La EP es una enfermedad neurodegenerativa progresiva y crónica que afecta a más de seis millones de personas en el mundo. La media de edad ronda los 60 años, siendo la edad un factor de riesgo irrefutable para esta enfermedad idiopática (Rijk y col., 1997). Referencias históricas de síntomas motores similares a los de la EP se encuentran desde el siglo 12 a.C. Sin embargo, hasta que James Parkinson no publicó “Un Ensayo de La Parálisis Agitante” en 1803 y Jean-Martin Charcot no añadió más síntomas a la descripción original de Parkinson, la EP no ganó un reconocimiento como entidad clínica distintiva.

En la EP se produce una severa patología de los ganglios basales, con especial predilección por la zona ventrolateral de la SNc (Tretiakoff, 1919). La aparición de ciertos rasgos clínicos, como la ataxia, reflejan degeneración en otras áreas cerebrales. Estas regiones incluyen al núcleo periamigdalóide, al *locus coeruleus*, al núcleo motor dorsal del vago, a la sustancia innominada, a los núcleos del rafe y al hipotálamo. El síndrome es normalmente asimétrico, con patología de los ganglios basales en el hemisferio contralateral.

En la SNc de estos enfermos no se encuentra presente la neuromelanina. También se encuentran afectadas las neuronas DAérgicas de otras partes del sistema

nervioso central (SNC). Sin embargo, es la pérdida de DA en los ganglios basales la que al parecer produce los signos neurológicos más debilitantes (Patt y col 1991).

Por tanto, la característica neuropatológica fundamental en la EP es el “blanqueo” de la franja de la SN, normalmente gris o negra, debido a la pérdida de las neuronas DAérgicas mielinizadas. Puesto que la enfermedad muestra una especial predilección por la zona ventrolateral de la SNc, es en este tipo de células donde comienza la lesión, para progresar después a la zona dorsal de esta estructura. Se requiere la muerte de al menos el 60-70% de las neuronas de la SN para la manifestación de los síntomas clínicos, lo cual demuestra la alta plasticidad del sistema DAérgico nigroestriado. Aunque inicialmente la pérdida neuronal se localiza en la SN, posteriormente y a medida que la enfermedad progresa, la patología se extiende a otras áreas de los ganglios basales y el tronco cerebral. Sin embargo, otros autores (Braak y col, 1996) han sugerido que la neurodegeneración comienza en la corteza entorrinal, de manera que la cascada de muerte celular se inicia en esta área y continúa con la degeneración de la SN. Consecuentemente y teniendo en cuenta numerosos estudios en los que se muestran los importantes cambios patológicos que ocurren en la SN, parece ser la primera región cerebral atacada por este proceso destructivo.

Además de la distribución especial de pérdida de neuronas pigmentadas en la SNc, otra de las características neuropatológicas de la enfermedad es la presencia de inclusiones eosinófilas, llamadas cuerpos de Lewy, presentes en las neuronas supervivientes (Forno, 1982). Estas inclusiones intracitoplasmáticas contienen fundamentalmente formas filamentosas con un centro denso consistente en filamentos orientados radialmente. Parece ser que su formación es el resultado de una acumulación anormal de proteínas del citoesqueleto dentro de la neurona, así como de alfa sinucleína ( $\alpha$ -sin) y de proteínas ubiquitinadas (Lees y col, 2009). Existe un debate sobre si los

cuerpos de Lewy causan muerte neuronal directamente o quizás aíslan pequeños agregados de tóxicos celulares para así preservar la viabilidad neuronal (Goldberg y Lansbury, 2000). Existen algunas teorías que indican que las inclusiones que se encuentran en tejidos cerebrales con enfermedades neurodegenerativas, entre ellas la EP, son un mecanismo para compartimentalizar las proteínas defectuosas acumuladas e impedir que obstruyan el funcionamiento correcto de la célula.

La causa o causas de las actividades motoras anormales en la EP son casi desconocidas aunque están muy relacionadas con la pérdida de liberación de DA en el núcleo caudado y putamen por las terminaciones nerviosas de la vía nigroestriada. La destrucción de la SN hace que las terminales DAérgicas degeneren y que ya no esté presente la DA normalmente liberada en el núcleo caudado y putamen. Pero aún existe un gran número de neuronas que liberan ACh, y éstas transmiten señales excitadoras en estos núcleos. En ausencia de la liberación de DA, las vías colinérgicas se tornan excesivamente activas, lo que justificaría muchos de los síntomas motores de la EP. (Fallon y col, 1883; 1985).

Desde el punto de vista clínico, la EP se caracteriza por: 1) rigidez de la musculatura en áreas extensas del cuerpo o en áreas aisladas, 2) temblor en reposo de las áreas comprometidas, en la mayoría pero no en todos los casos, y 3) una seria incapacidad de iniciar el movimiento, denominada acinesia. Estos síntomas pueden ser acompañados por síntomas no motores que fueron inicialmente eclipsados por los anteriores. Algunos de estos síntomas no motores, como desórdenes neuropsiquiátricos y del sueño, déficits olfativos, disfunción eréctil, etc (Chaudhuri y col., 2006) suceden pronto en la EP y pueden incluso preceder la diagnosis basada en los signos motores (Tolosa y col., 2009).

La rigidez parkinsoniana es de tipo “plástico”, el movimiento brusco no encuentra habitualmente una resistencia a partir de los reflejos de estiramiento; los músculos tanto sinergistas como antagonistas permanecen fuertemente contraídos a lo largo del movimiento. En consecuencia, se cree que la rigidez característica de esta enfermedad es en gran parte el resultado del exceso de impulsos transmitidos por el sistema corticoespinal. Habitualmente se produce temblor; su frecuencia normalmente es de cuatro a seis ciclos por segundo. Un tipo de tratamiento para el temblor en reposo durante la EP es la destrucción quirúrgica del núcleo ventrolateral del tálamo, que es una de las vías de retroalimentación desde los ganglios basales hacia la corteza motora. Por esto, se presume que la pérdida de la influencia inhibitoria de la DA en los ganglios basales, lleva al estímulo de la actividad del circuito de retroalimentación corticobasal ganglionar-talámico-cortical, provocando una oscilación que produce el temblor muscular. (Forno, 1982).

Aunque la rigidez muscular y el temblor son ambos angustiantes para el paciente parkinsoniano, más seria es la acinesia que se produce en los estadios finales de la enfermedad. Para realizar aún los movimientos más simples, la persona debe ejercer el mayor grado de concentración, y el esfuerzo mental que es necesario para hacer el “arranque” del movimiento está a menudo más allá de la fuerza de voluntad del paciente. Parece ser que la acinesia está motivada por la falta de liberación de DA en el núcleo caudado y putamen por las fibras nigroestriadas, que provoca una actividad excesiva de las neuronas productoras de ACh. La operación normal de los ganglios basales requiere un equilibrio entre las actividades excitatorias e inhibitorias, y la pérdida de este equilibrio lleva a un sistema de ganglios basales no funcional.

El diagnóstico de la EP se basa generalmente en los datos clínicos expuestos. Sin embargo, nuevas y modernas técnicas de imagen, como la tomografía por emisión de

positrones (PET), pueden tener un importante papel en la diferenciación de los distintos síndromes parkinsonianos o en el diagnóstico preclínico de esta enfermedad. (Forno, 1982).

El tratamiento médico de la EP suele ser eficaz y debe continuarse durante el resto de la vida del paciente, siendo variable en cada caso el grado de mejoría alcanzado con los diversos fármacos empleados, especificando que dichos tratamientos, hoy día, no son curativos, sólo paliativos. En general, se fundamenta en las medidas siguientes: *a)* anticolinérgicos; *b)* amantadina; *c)* L-DOPA (o levodopa) y otros fármacos DAérgicos, y *d)* otras medidas generales. Sin embargo, aunque para la mayoría de los pacientes estas medidas mantienen una buena calidad de vida, cuando la enfermedad progresa o cuando estos medicamentos no mejoran la movilidad o producen efectos adversos significativos, debe considerarse el tratamiento quirúrgico, basado fundamentalmente en la palido y talamotomía, y en la estimulación cerebral profunda.

## **2. TEORÍAS Y MODELOS DE NEURODEGENERACIÓN.**

Las enfermedades neurodegenerativas son patologías muy complejas que tienen como características comunes el carácter progresivo de los síntomas y la degeneración paulatina de una parte o partes del sistema nervioso que desemboca en incapacidad física y psíquica.

Las técnicas que se utilizan para el estudio de estas enfermedades son de naturaleza muy distinta. La generación de modelos animales para su estudio ha supuesto un gran avance en el conocimiento de los mecanismos involucrados en el desarrollo de dichas enfermedades, así como en la identificación de dianas terapéuticas. Además, representan la forma más fiel de reproducir la enfermedad y son óptimos para el estudio global de las patologías.

Existe la posibilidad de generar modelos animales químicamente inducidos en aquellos casos en los que la causa de la enfermedad no tenga un origen genético o no se conozca. Los animales más utilizados hasta hace poco en los laboratorios eran los roedores. En la actualidad, cada vez están apareciendo un mayor número de modelos animales generados en mamíferos superiores cuyo sistema nervioso es más similar al de los humanos y el desarrollo de la patología se asemeja más a la que tiene lugar en los pacientes.

### 2.1. ANIMALES TRANSGÉNICOS.

La mayoría de los modelos animales que se generan en la actualidad son modelos genéticos en los cuales se reproduce la enfermedad integrando en el genoma del animal o eliminando del mismo, las mutaciones responsables de la patología.

Recientemente, estudios genéticos humanos han identificado una gran cantidad de genes relacionados con la EP familiar. Los modelos transgénicos se han usado para explorar las funciones de esos genes relacionados con la EP, como por ejemplo el gen de la proteína  $\alpha$ -sin, DJ-1, LRRK2, parkina, UCH-L1, PINK1, etc. Dichos estudios han conseguido reforzar la teoría de que las disfunciones mitocondriales pueden jugar un papel protagonista en la EP, por lo que la manipulación de los genes de la respiración mitocondrial (por ejemplo el factor de transcripción mitocondrial A o FTMA), permite también un fenotipo de animal con EP. El ratón transgénico **MitoPark** tiene eliminado selectivamente el FTMA en las neuronas DAérgicas. Las neuronas DAérgicas de la SN de estos ratones, muestran disfunción en la cadena respiratoria mitocondrial, acompañado del desarrollo de inclusiones intraneuronales y consiguiente muerte celular. Muestran también una pérdida lenta y progresiva de las funciones motoras que acompañan estos cambios celulares.

Ref.	$\alpha$ -syn	Promotor	Fondo	Expresión	Neuropatología	Fenotipo motor (edad)
1	wt	PDGF- $\beta$	C57Bl/6 x DBA/2	10-80%	↓TH; ↓DA; glia+, ubiquitina+	moderado (3-6)
2	A53T	Thy-1	C57Bl/6		degeneración neuronas motoras ubiquitina+	severo (1-2)
3	wt, A30P	Thy-1	C57Bl/6	200%	I: SN, STR, HP, Cx, B	normal
4	wt, A30P, A53T	TH	SW x C57Bl/6/DBA		ubiquitina-	sin analizar (12)
5	wt, A53T	prión	C57Bl/6/C3H	250-300%	I: SC, B, C, Th, STR; GFAP+	parálisis fatal (8-12)
6	wt, A30P, A53T	prión	C3H/HeJ x C57Bl/6J	> 400%	I: M, C, B, SC; GFAP+, ubiquitina+	hipocinesia, ataxia (10)
7	wt, A30P, A53T	TH	C57Bl/6	30-50%	↓DAT; ↓DA, DOPAC, HVA	moderado (9-12)
8	wt	PLP	C57Bl/6 x DBA/2	0,1-1,2 ng/ $\mu$ g	inclusiones oligodendrogiales	normal (12)
9	wt, A30P	Thy-1	C57Bl/6 x DBA/2	10x cantidad en humano		sin analizar (6)
10	wt, A30P, A53T	prión	C57Bl/6J x SJL	>500%	GFAP+	temblor, distonía (6)
11	wt, A53T	prión	FVB/N	>500%	morfología neuronal alterada; acumulación $\alpha$ -SYN	hipocinesia

**Fig. 4. Todas las construcciones de animales transgénicos de  $\alpha$ -sin con el ADNc de la forma humana (wt: forma salvaje; formas mutadas con la mutación A30P o A53T).** “Expresión” indica los niveles de expresión del transgén con respecto a la expresión de la forma murina endógena, salvo alguna excepción indicada de otra forma. “Edad” indica el tiempo de aparición de los síntomas motores, en meses. En “Neuropatología” “+” significa niveles aumentados de la molécula correspondiente. Abreviaturas: B: tronco cerebral, C: cerebelo, Cx: corteza cerebral, DA: dopamina, DAT: transportador de dopamina, HP: hipocampo, I: inclusiones, M: mesencéfalo, SC: corteza espinal, SN: sustancia negra, STR: estriado, T: telencéfalo, Th: tálamo, TH: tiroxina hidroxilasa. Adaptado de Fernagut y Chesselet, 2004. Referencias (Ref.): Masliah y col, 2000; Kahle y col, 2000; Matsuoka y col, 1999; Lee y col, 2002; Gispert y col, 2003.

A parte del modelo animal knockout (K.O.) para el FTMA, se han estudiado más genes relacionados con la EP familiar, como es el caso de ciertos laboratorios que han conseguido obtener ratones K.O. para la parkina, una proteína relacionada con la defensa ante el estrés oxidativo. Se obtuvieron eliminando algunos de sus exones, como el **PARK2**, generando así animales que muestran respiración mitocondrial reducida, y un aumento del daño provocado por estrés oxidativo.

Otro modelo es el animal K.O. para el gen **DJ-1**. Dicho gen está relacionado con procesos que incluyen estrés oxidativo y transformación celular. Sus mutaciones se han relacionado con un desarrollo temprano de la EP. En general, los estudios en ratones con ausencia de expresión de DJ-1, muestran déficit en las funciones motoras y alteraciones de los niveles de DA en la vía nigroestriada.

Las mutaciones en el gen **PINK1** son la segunda causa más frecuente de herencia de EP familiar, y se piensa que su finalidad es la de prevenir la disfunción mitocondrial. De manera que el estudio con ratones K.O. para PINK1 mostraron que actúan en la protección celular contra el estrés oxidativo, al igual que ocurría con DJ-1.

Por último, se ha descrito un grupo de animales transgénicos que sobreexpresan la  **$\alpha$ -sin**, con los que se pretende reproducir en la mayor medida posible la patología humana. Se han generado diferentes cepas de ratones transgénicos, con formas salvajes y/o mutadas de la alfa-sinucleína ( $\alpha$ -sin) humana bajo diferentes promotores (**Fig. 4**). Los resultados han sido animales con un menor número de terminales DAérgicas, inclusiones citoplásmicas de  $\alpha$ -sin y ubiquitina, y depósitos nucleares (Masliah y col, 2000).

### **2.2. MODELOS BASADOS EN LA INYECCIÓN DE NEUROTOXINAS.**

Una de las características de la EP en todos los modelos animales inducidos por toxinas es la neurodegeneración de las neuronas DAérgicas de la SNpc. Cada modelo, sin embargo, tiene sus propias particularidades, dependiendo de las especies involucradas y la toxina utilizada. En otras palabras, la muerte de las células DAérgicas es la piedra angular de estos modelos animales, pero el mecanismo de acción difiere entre ellos.

La EP se puede modelar en niveles histológicos, moleculares, y conductuales. Cuando el objetivo de la investigación es el estudio de las consecuencias de la muerte de células DAérgicas y para probar miméticos de DA u otras estrategias para el tratamiento de los síntomas, el mecanismo de acción de la neurotoxina es irrelevante. Sin embargo, este no es el caso si el objetivo es el estudio de las rutas implicadas en la muerte celular neuronal o el desarrollo de estrategias neuroprotectoras. Para ambas circunstancias, la validación del modelo animal utilizado se basa en la posibilidad de convertir los resultados obtenidos con el modelo en una aplicación clínica para el tratamiento de los pacientes con EP. Respecto al primer caso, estos modelos han hecho posible que la L-DOPA y otras drogas dirigidas a los síntomas se desarrollen como una opción terapéutica. En el segundo caso, los modelos ayudaron a esclarecer algunos aspectos de la patogénesis de la EP, tales como el papel del estrés oxidativo, la apoptosis, la disfunción mitocondrial, la inflamación, el deterioro de las proteínas y las vías de degradación de los orgánulos y la  $\alpha$ -sin (Bové y Perier, 2012).

### 2.2.1. ESTRÉS OXIDATIVO.

La más importante de las teorías de neurodegeneración se refiere al estrés oxidativo como causa del daño a las neuronas del SNC. Este estrés oxidativo podría estar originado por un incremento de los niveles de radicales libres de oxígeno (RLOs) o bien por una disminución de los mecanismos de defensa frente a ellos. El modelo animal de EP por estrés oxidativo más importante es el basado en el uso de la 6-hidroxi dopamina (6-OHDA) como una toxina DAérgica específica. La 6-OHDA destruye las neuronas DAérgicas mediante un mecanismo mediado por radicales libres (Cohen y Heikkila, 1974). La especificidad de la neurotoxicidad de la 6-OHDA está asociada a su recaptación por un mecanismo de transporte específico de las propias neuronas

DAérgicas (el transportador de recaptación de DA; DAT) donde se acumula y oxida para producir peróxido de hidrógeno, superóxido y radicales hidroxilos (Cohen y Heikkila, 1974; Graham, 1978).

### 2.2.2. FALLO ENERGÉTICO MITOCONDRIAL.

Existen numerosos datos que apuntan a la implicación de defectos mitocondriales en la patogénesis de la EP (Beal, 2003), como la actividad reducida del complejo I en el cerebro, las plaquetas y el músculo esquelético de pacientes con EP (Parker y col., 1989; Schapira y col., 1990). Aunque ésta no parece ser la causa primaria de la enfermedad, podría ser un factor importante en su desarrollo.

El modelo animal de EP por fallo energético mitocondrial más habitual e importante es el basado en el uso del MPTP y su metabolito MPP<sup>+</sup>, un compuesto cuyo principal efecto tóxico es la inhibición de la actividad del complejo I mitocondrial (Gu y col, 1998). Su selectividad sobre las neuronas DAérgicas parece ser debida a su recaptación en las terminales nerviosas del sistema DAérgico a través del sistema de recaptación de DA anteriormente mencionado (Chiba y col, 1985; Javitch y col, 1985), con su posterior acumulación en la mitocondria.

### 2.2.3. INFLAMACIÓN.

Desde 1988, cuando McGeer y col. mostraron la presencia de marcadores de inflamación en el SNC de pacientes con EP, se postuló la implicación de los eventos inflamatorios en la patogénesis de esta enfermedad neurodegenerativa. McGeer y col., 1988 a, b). Ellos mostraron la presencia de linfocitos T, supresores citotóxicos, CD<sup>+</sup> y de células microgliales con el complejo mayor de histocompatibilidad clase II activado (MHC II), en el tejido de pacientes con EP.

Además, se han descrito diferentes marcadores inflamatorios en cerebros parkinsonianos (Hunot y Hirsch, 2003):

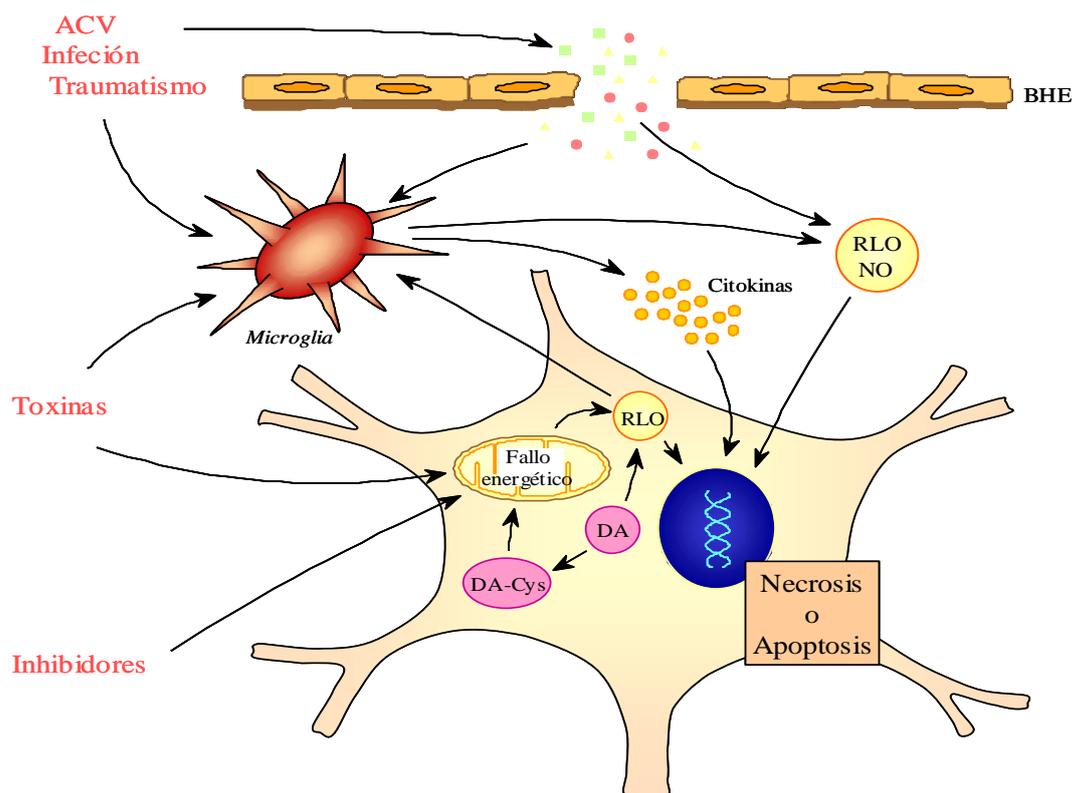
(a) Importantes proliferaciones de macrófagos ameboides y microglía reactiva (McGeer y col., 1988a; Hirsch y col., 1998).

(b) También aparecen en la SN de este tipo de pacientes células gliales activadas que expresan distintas citoquinas proinflamatorias como el TNF- $\alpha$ , la IL-1 $\beta$  y el interferón  $\gamma$  (IFN-  $\gamma$ ) (Mogi y col, 1994; Hunot y col, 1999), junto con una expresión de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) (Hunot y col,1997; Mogi y col, 1998).

(c) Por último, se han encontrado incrementos en la expresión de IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  en el fluido cerebroespinal de pacientes con la EP.

Aunque la activación de la microglía es la mayor defensa del cerebro, ésta produce la liberación de varias citoquinas, radicales libres como el ión superóxido ( $O_2^-$ ) y el NO (Minghetti y col, 1999). Estos factores microgliales pueden incrementar la neurotoxicidad y contribuir a la neurodegeneración en las enfermedades mediadas por inflamación (McGeer y col, 1988a). **(Fig. 5).**

En estas condiciones, los procesos inflamatorios (proliferación y activación de la microglía) podrían ser un evento secundario producido por los procesos degenerativos que ocurren directamente en las neuronas DAérgicas, pero al mismo tiempo podrían ayudar al progreso de la degeneración. Además, existe la posibilidad de que los procesos inflamatorios por sí mismos pudieran ser dañinos para las neuronas DAérgicas en el sistema nigroestriado.



**Fig. 5. Interacciones neurona-glía que podrían llevar a la muerte neuronal.** La inflamación puede estar inducida directamente por diversos factores “externos” como un accidente cerebrovascular (ACV), una infección o un traumatismo, que también podrían producir la rotura de la barrera hematoencefálica (BHE) con la consiguiente extravasación de compuestos que podrían activar las células microgliales y llevar a la formación de RLO. Además, la microglía activada libera varios compuestos, como citoquinas proinflamatorias, NO y RLO, lo que podría llevar a la muerte neuronal. Dentro de la neurona DAérgica, la cadena respiratoria mitocondrial puede estar afectada por toxinas e inhibidores, lo cual llevaría a un fallo energético, a la producción de RLO y a la reducción de la viabilidad de las neuronas. Estos RLO podrían actuar como una señal para la activación de las células microgliales, indicando que las neuronas no están sanas. La DA puede ejercer una acción tóxica a través de sus metabolitos y formar RLO. La DA también puede formar complejos con la cisteína, inhibiendo la cadena respiratoria mitocondrial y produciendo más RLO. La inhibición de la activación microglial puede ser uno de los factores más importantes en la prevención de los procesos neurodegenerativos, ya que la eliminación de la inducción inflamatoria podría disminuir el daño neuronal (Herrera y col, 2005).

Existen diversos inductores fisiológicos/patológicos de neuroinflamación, que podrían estar implicados en la degeneración del sistema DAérgico (**Fig. 5**). Diferentes toxinas, como 6-OHDA, el MPTP/MPP<sup>+</sup> o rotenona, inducen un proceso inflamatorio,

además de sus mecanismos tóxicos específicos. También se ha descrito la relación entre el traumatismo físico y la EP (Lees, 1997; Tansey y col, 2007). Por otro lado, existen compuestos proinflamatorios capaces de producir la activación microglial junto con una inducción de los procesos inflamatorios. Entre estos compuestos destacan las inmunoglobulinas G (IgGs), LPS, trisialogangliósido (GT1b) y trombina.

- (A) *Inmunoglobulinas G*. Las células microgliales también son activadas por IgGs de pacientes parkinsonianos en presencia de membranas celulares DAérgicas modificadas, por bajas dosis de dopa-quinona o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pero no en presencia de membranas celulares colinérgicas (Le y col, 2001). Esta activación requiere del receptor microglial FCgammaR. A pesar de que la activación microglial produce la liberación de varias citoquinas y EROs, sólo el NO y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> parecen mediar en el daño celular DAérgico inducido por la microglía.
- (B) *Lipopolisacárido*. Los LPS de las bacterias Gram-negativas son moléculas glucolipídicas que constituyen la membrana de estos microorganismos. Estas moléculas han sido aisladas de una gran variedad de bacterias Gram-negativas y algunas cianobacterias. Estudios previos en nuestro laboratorio (Castaño y col., 1998; Herrera et al., 2000, 2005, 2008; de Pablos et al., 2005, 2006, 2014; Tomás-Camardiel et al., 2004; Hernández-Romero et al., 2008; Villarán et al., 2009) demostraron que la inyección de 2 µg de LPS en la SN de la rata induce una fuerte activación microglial junto con la inducción de la expresión de diversos mediadores de la inflamación, tales como la iNOS, la IL-1β, la IL-6 y el TNF-α. Esta reacción microglial se acompaña de una fuerte pérdida de neuronas DAérgicas en esta estructura. Esta degeneración es específica ya que la inyección de LPS no afecta en cambio a otras áreas cerebrales ni tampoco a

otros fenotipos neuronales, por lo que se considera al LPS como el modelo de EP por inflamación por excelencia.

(C) *Trisialogangliósido*. El GT1b es un componente abundante en las membranas celulares del sistema nervioso humano. Se ha demostrado que este compuesto induce la muerte de las neuronas DAérgicas en cultivos celulares de mesencéfalo de rata (Chung y col, 2001). Además, Ryu y colaboradores (2002) examinaron los efectos neurotóxicos del GT1b en las neuronas DAérgicas de la SN de ratas y encontraron que 7 días tras la inyección del GT1b se produce la muerte de neuronas nigrales, incluidas las neuronas DAérgicas, y una activación de la microglía presente en esta estructura. La neurotoxicidad ejercida por el GT1b sobre las neuronas DAérgicas de la SN es mediada, al menos en parte, por la liberación de NO de las células microgliales.

(D) *Trombina*. La trombina es una serinproteasa multifuncional producida rápidamente desde la protrombina en los lugares de lesión y de rotura de la BHE, lo que sugiere que podría entrar fácilmente en el SNC. Estudios previos en nuestro laboratorio (Carreño-Müller y col, 2003) demostraron que la inyección de diferentes concentraciones de trombina en la SN de la rata produce una fuerte reacción macrófago/microglial en esta estructura. Además, la inyección de trombina produce un daño selectivo sobre las neuronas DAérgicas de la SN, dejando inalteradas el resto de fenotipos neuronales presentes en esta estructura.

### **3. MODELO ANIMAL DE EP POR FALLO ENERGÉTICO MITOCONDRIAL. INYECCIÓN DE MPTP.**

Como ya se ha comentado el modelo animal de EP por fallo energético mitocondrial más habitual e importante es el basado en el uso del MPTP y su metabolito  $MPP^+$  (*1-metil-4-fenilpiridinium*), un compuesto cuyo principal efecto tóxico es la inhibición de la actividad del complejo I mitocondrial (Gu y col, 1998). Su selectividad sobre las neuronas DAérgicas parece ser debida a su recaptación en las terminales nerviosas del sistema DAérgico a través del sistema de recaptación de DA anteriormente mencionado (Chiba y col, 1985; Javitch y col, 1985), con su posterior acumulación en la mitocondria.

La relación cronológica que existe entre activación microglial y neurodegeneración, demuestra que la microgliosis resultante del tratamiento con MPTP es la que inicia el daño neuronal. Así mismo, la microglía contribuye al daño neuronal, a través de las especies reactivas de oxígeno (EROs) derivadas de la actividad de la *NADPH oxidasa* (NADPHox). Entre todos los factores medidos, la producción de superóxidos extracelulares por parte fundamentalmente de la NADPHox, es la más determinante. Experimentos con el inhibidor de la NADPHox, apomicina, atenúa la neurodegeneración provocada por el MPTP sólo en presencia de glia. Aún más significativo es el hecho de que neuronas DAérgicas de ratón, sin NADPHox, son significativamente más resistentes al daño por MPTP que aquellos cultivos controles (Gao y col, 2003a). La microgliosis reactiva actúa, mediante el daño inducido por MPTP, a través de la NADPHox, mediando la producción de superóxidos. Esto mostraba a su vez a la NADPHox como posible objetivo en terapias de tratamiento de la EP (Gao y col, 2003b).

Debido a que en diversos tratamientos en los que se dañan las neuronas DAérgicas de la SN se produce fundamentalmente el daño a través de una inhibición mitocondrial del complejo I (6-OHDA, MPTP, etc.), parece ser que este paso, el del fallo mitocondrial, podría ser un paso común entre las causas de la patogénesis de la EP tanto en la rama genética como en la epigenética de la enfermedad.

### **3.1. DESCUBRIMIENTO DEL MPTP COMO MODELO DE LA EP.**

En ocasiones la ciencia avanza movida por la casualidad. Los casos de Barry Kidston y el de otros siete heroinómanos conocido como el caso de los adictos paralizados (*The Case of the Frozen Addicts*) ayudaron al descubrimiento del MPTP. Barry Kidston, estudiante de Química de 23 años, era adicto a las drogas. Usando sus conocimientos, sintetizó 1-metil-4-fenil-4-propionpiperidina (MPPP), un opiáceo análogo a la meperidina y con efecto similar a la heroína. En 1976, después de varios meses de administración intravenosa, en una urgencia, elaboró de nuevo el compuesto, pero acortó el método y algo salió mal. Tras varios días de consumo, ingresó en urgencias, manifestaba mutismo, rigidez severa, debilidad, temblores, cara inexpresiva y sensibilidad alterada.

El equipo médico observó que los síntomas eran equivalentes a los que se producen en la EP y le administró L-DOPA, medicación habitual en el Parkinson. Kidston mejoró parcialmente. Con el tiempo desarrolló tolerancia a la L-DOPA, manifestaba lentitud de pensamiento, se deprimió y siguió consumiendo drogas. Dieciocho meses después murió víctima de una sobredosis de cocaína. La autopsia reveló una destrucción masiva de las neuronas de la SN que usan la DA como neurotransmisor. El análisis de los restos de la dosis defectuosa reveló la existencia de

MPPP (el opiáceo deseado) junto con otras sustancias sin determinar claramente. Una inyección de la dosis en ratas produjo una parálisis parcial en el animal, pero el equipo no fue capaz de reproducir los resultados completos (posteriormente se demostró que las ratas son resistentes al compuesto tóxico. (Boyce y col., 1984; Chiueh y col., 1984).

En 1982 un joven ingresó en un hospital de California en estado de parálisis. Poco después lo hizo su novia y en distintos hospitales otros tres jóvenes. Eran incapaces de hablar, pero uno de ellos podía mover la mano. El equipo liderado por William Langston le dio un papel y un lápiz y el joven escribió "heroína". Langston habló por televisión alertando de una partida tóxica de heroína y dos nuevos casos aparecieron, así como el vendedor de la droga que manifestó que era sintética. Investigaron la droga y resultó no ser heroína sino MPPP. Pero el MPPP no es tóxico de modo que no era el responsable del desastre. Alguien en el equipo recordó el caso de Barry Kidston y cotejaron ambas drogas. El análisis reveló una sustancia nueva MPTP, un subproducto indeseado de la síntesis de MPPP. Tras su aplicación en animales (concretamente en monos) y viendo en ellos muerte selectiva de las neuronas DAérgicas en la SN y un síndrome similar a la EP idiopática, se utiliza como un excelente modelo animal para la investigación de fármacos contra la enfermedad (Langston y col., 1984; Langston y Irwin, 1986).

### **3.2. EL MODELO DE MPTP EN RATÓN.**

El modelo de ratón con MPTP, especialmente la cepa C57BL (Heikkila y col., 1990; Arai y col., 1990; Araki y col., 2001; Muthane y col., 1994; Wu y col., 2002), es el modelo clásico utilizado para estudiar las vías moleculares que intervienen en la muerte de células neuronales en la EP y para probar la eficacia de neuroprotectores. Las

ratas se han excluido como modelos de EP con la administración sistémica de MPTP ya que la dosis requerida para inducir una degeneración DAérgica similar a la inducida en ratones implica una alta tasa de mortalidad (Giovanni y col., 1994). Sin embargo, la inyección estereotáxica del metabolito tóxico MPP<sup>+</sup> se ha usado como modelo de EP en ratas (Staal y Sonsalla, 2000). Más recientemente se ha demostrado que la administración intranasal de MPTP desencadena neurodegeneración en la SNpc además de impedimentos motores en ratas (Prediger y col., 2006; 2009) y ratones (Rojo y col., 2006), lo que puede abrir puertas a un nuevo modelo de EP con MPTP en roedores.

Uno de los puntos fuertes del modelo de ratón es la posibilidad de trabajar con ratones modificados genéticamente. Por ejemplo, los efectos deletéreos de  $\alpha$ -sin y Bax en el modelo por MPTP se han demostrado con ratones K.O. de  $\alpha$ -sin y Bax (Vila y col., 2001; Dauer y col., 2002), mientras que la relevancia del receptor de glucocorticoide (GR) microglial se evaluó en la neuroinflamación en ratones tratados con MPTP en los que el gen GR había sido inactivado selectivamente (Ros-Bernal y col., 2011).

Pero es importante tener en cuenta que hay variaciones notables en la sensibilidad a MPTP entre algunas cepas de ratones (Smeyne y col., 2005; Muthane y col., 1994), por lo que la elección de la cepa no puede hacerse al azar.

Junto con la cepa hay varios parámetros tales como el género, la edad y el peso corporal que influyen en la reproducibilidad y la sensibilidad de la lesión en los ratones. Los ratones hembras presentan tasas de mortalidad más altas que los machos, por lo que siempre que sea posible es mejor excluirlos del experimento. Los ratones machos utilizados deben pesar al menos 22 gramos y tener por lo menos 8 semanas de edad (Jackson-Lewis y Przedborski, 2007). Otro tema importante relacionado con las diferencias de cada cepa, es la variación en las tasas de mortalidad debido a la toxicidad periférica y la hipotermia. Por tanto, es aconsejable realizar inyecciones preliminares

para poner a prueba el régimen de la intoxicación con la cepa particular de ratón que se utilizará.

Por otro lado, la magnitud de la lesión y el modo de muerte celular inducida por MPTP dependen del régimen de administración (Przedborski y Vila, 2003). Las rutas más comunes de administración son la i.p. y la subcutánea (s.c.). A la misma dosis, la administración por vía s.c. provoca una lesión más grave del sistema DAérgico que la administración i.p. debido a que se evita el primer paso hepático (Chiba y col., 1988).

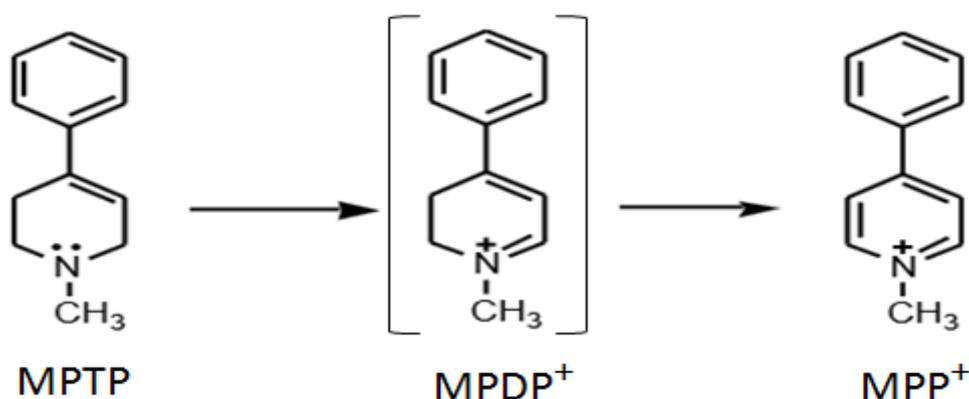
Junto con la vía de administración, la dosis y el tiempo entre inyecciones son los parámetros que van a determinar el grado de muerte celular DAérgica. A pesar de que una gran cantidad de diferentes regímenes de intoxicación se puede encontrar en la literatura, los regímenes mejor caracterizados son los referidos como regímenes agudos y subagudos. El régimen agudo fue desarrollado por Jackson-Lewis y col., y consiste en un total de cuatro inyecciones a una dosis de 20 mg / kg con intervalos de 2 h entre las inyecciones (Jackson-Lewis y col., 1995). Este régimen lleva a una pérdida del 90% de la DA estriatal y a la pérdida aproximadamente del 70% de las neuronas DAérgicas en la SNpc; estas propiedades son estables dentro de los 7 días después de la administración de MPTP. Con el modelo agudo la neurodegeneración DAérgica se produce por un tipo de muerte celular no-apoptótico. Esto contrasta con el régimen sub-agudo establecido por Tatton y Kish que produce una neurodegeneración más progresiva con muerte celular apoptótica (Tatton y Kish, 1997). El régimen sub-agudo implica una inyección i.p. de 30 mg / kg de MPTP al día durante cinco días consecutivos, y provoca un agotamiento del 40-50% de la DA estriatal y una pérdida de células del 30-40% (Perier y col., 2007). La lesión DAérgica se estabiliza a los 21 días después de la administración de MPTP.

También hay que decir que el régimen agudo se ha utilizado principalmente para estudiar el papel de la inflamación asociada con neurodegeneración, mientras que el régimen sub-agudo se ha utilizado principalmente para estudiar las vías moleculares de muerte celular (Vila y col., 2001; Przedborski y Vila, 2003; Perier y col., 2007).

El hecho de que estos regímenes son los más populares no significa que sean mejores que otros. Otros regímenes que traten de imitar mejor la naturaleza progresiva de la EP deben ser considerados (Bezard y col., 1999).

### **3.3. MODO DE ACCIÓN DEL MPTP.**

Cuando se administra sistemáticamente MPTP, éste cruza fácilmente la (BHE) en cuestión de segundos (Markey y col., 1984) debido a su carácter lipófilo (Riachi y col., 1989). Una vez en el cerebro, se convierte rápidamente en MPP<sup>+</sup> en dos pasos: primero el MPTP se somete a una oxidación de dos electrones catalizada por la monoamino oxidasa B (MAO-B, **Fig. 6**), produciendo el intermediario 1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridina (MPDP<sup>+</sup>) (Chiba y col., 1984), probablemente en las células gliales y serotoninérgicas. El MPDP<sup>+</sup> es una molécula inestable que fácilmente experimenta una dismutación espontánea a MPP<sup>+</sup> y MPTP (Chiba y col., 1985; Peterson y col., 1985). El MPP<sup>+</sup> es liberado al espacio extracelular y entra en las neuronas DAérgicas vía DAT, por el cual tiene una gran afinidad. El hecho de que la inhibición farmacológica del DAT o la ablación genética prevengan completamente de la neurotoxicidad del MPTP demuestra la importancia de este paso. (Bezard y col., 1999; Javitch y col., 1985).

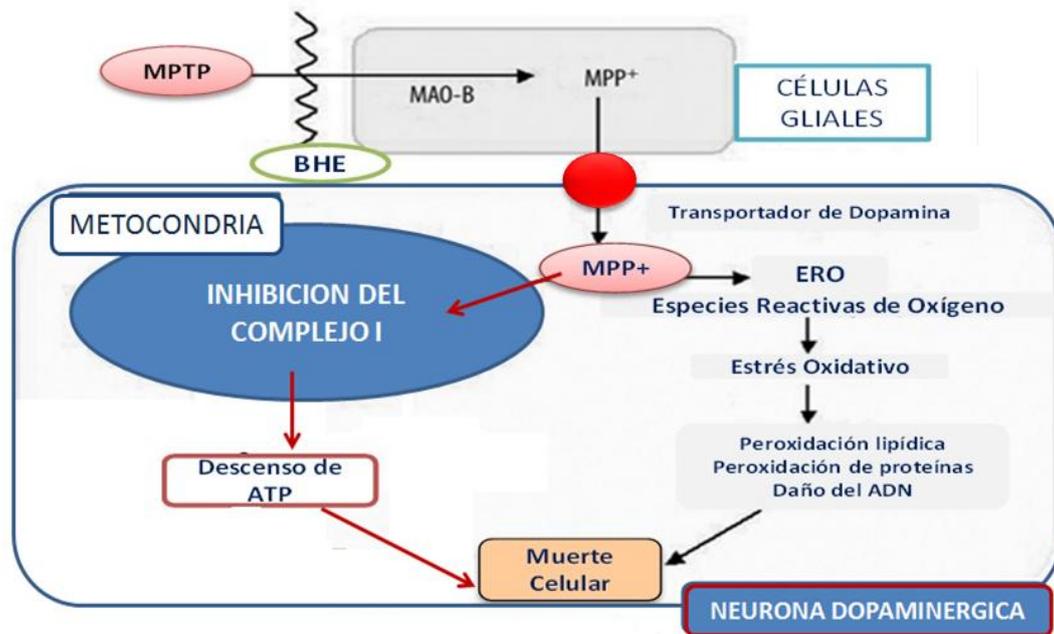


**Fig. 6.** La oxidación de MPTP catalizada por MAO.

Una vez dentro de las neuronas, el MPP<sup>+</sup> puede acumularse en vesículas sinápticas (Liu y col., 1999) y, por medio de transporte pasivo, acumularse en la matriz mitocondrial (Davey y col., 1992; Hoppel y col., 1987). Una vez en la mitocondria, el MPP<sup>+</sup> inhibe el complejo I que desencadena una inhibición transitoria en los niveles de ATP mesencefálicos en torno al 20% *in vivo* (Chan y col., 1991), y un aumento de la producción de EROs (Rossetti y col., 1988; Hasegawa y col., 1990). También se traduce en la disminución del consumo de oxígeno, una alteración de la homeostasis de iones (Vyas y col., 1986; Gluck y col., 1994) y posterior muerte de células neuronales como se muestra en la **Fig. 7**.

Se cree que esta inhibición está involucrada con la unión del MPP<sup>+</sup> a uno de los dos sitios de unión en el complejo I (Krueger y col., 1993; Gluck y col., 1994). Uno de estos sitios es accesible a compuestos hidrófilos y el MPP<sup>+</sup> se une a este sitio rápidamente. El otro sitio hidrófobo es menos accesible a los compuestos hidrófilos y el MPP<sup>+</sup> se une a este sitio de forma relativamente lenta, lo que sugiere que puede ser enterrado dentro de la bicapa lipídica. El anión lipófilo tetrafenilborato (TPB) potencia la inhibición de la respiración por MPP<sup>+</sup> y sus análogos por un apareamiento iónico fuerte con estos cationes, acelerando así su acumulación en la matriz mitocondrial

(Aiuichi y col., 1988; Ramsay y col., 1989a,b; Heikkila y col., 1990). TPB también estimula la inhibición de la respiración por  $MPP^+$  en las partículas de transferencia de electrones, facilitando su difusión en el sitio inhibidor hidrófobo sobre el Complejo I (Ramsay y col., 1989b; Krueger y col., 1993; Gluck y col., 1994).



**Fig. 7. Mecanismos hipotéticos de neurotoxicidad por MPTP.** El MPTP cruza la barrera hematoencefálica y se convierte en su metabolito  $MPP^+$  a través de la MAO-B. EL  $MPP^+$  es captado selectivamente por las neuronas DAérgicas a través de los transportadores de DA y se acumula en la mitocondria, donde inhibe el complejo I de la cadena del transporte de electrones mitocondrial. La inhibición mitocondrial conduce a la disminución de oxígeno y de la producción de ATP. El estrés oxidativo generado por el  $MPP^+$ , finalmente, conduce a la muerte celular. [https://journals.prous.com/journals/servlet/xmlsl/pk\\_journals.xml\\_summary\\_pr?p\\_JournalId=3&p\\_RefId=343&p\\_IsPs=Y](https://journals.prous.com/journals/servlet/xmlsl/pk_journals.xml_summary_pr?p_JournalId=3&p_RefId=343&p_IsPs=Y).

Sin embargo, varios estudios sugieren que la neurotoxicidad de  $MPP^+$  está mediada parcialmente, a través de una producción excesiva del NO (Schulz y col., 1995; Przedborski y col., 1996). Por lo tanto, en la actualidad, muchos de los detalles bioquímicos y patológicos subyacentes a los mecanismos de acción de la neurotoxicidad del MPTP aún no se han dilucidado.

#### **4. MODELO ANIMAL DE EP POR INFLAMACIÓN. INYECCIÓN DE LPS.**

La neuroinflamación es un proceso complejo que implica a células del sistema inmune y del SNC, que tienen el propósito de reparar el daño producido. La inflamación, por tanto, es parte de un proceso fisiológico de reparación; sin embargo, cuando este proceso no es controlado, el proceso inflamatorio se extiende, la inflamación pierde su función reparadora y puede ser la causa fatal del daño. La respuesta inflamatoria en el SNC se piensa que favorece más al daño que a la función reparadora y podría explicar la mayoría de las patologías del SNC. Por ello, en los últimos años, numerosas tentativas terapéuticas han ido encaminadas a paliarla. Sin embargo, de momento, no parece que ningún fármaco haya resultado útil para detener o controlar la neuroinflamación.

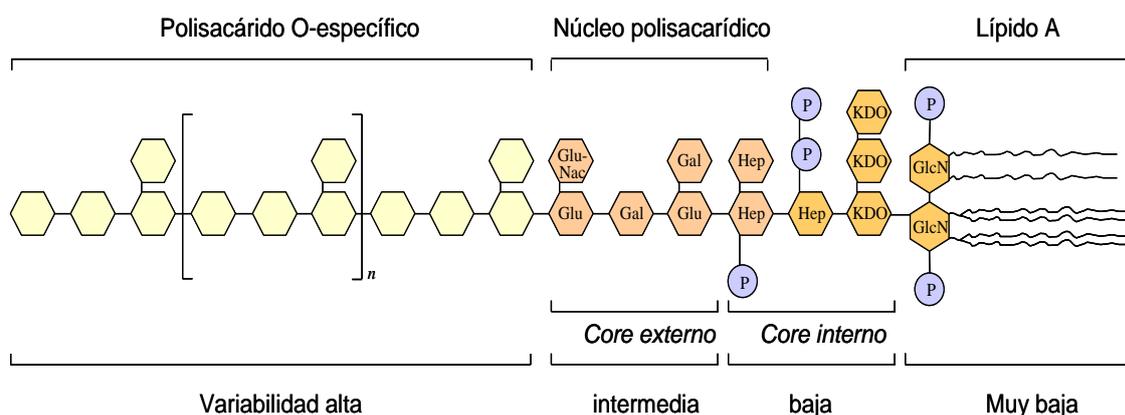
Como ya se ha comentado, existen varios modelos que permiten estudiar los mecanismos moleculares implicados en la neuroinflamación. De entre todos ellos el más utilizado es el basado en la inyección intranigral de LPS.

##### **4.1. EL LIPOPOLISACÁRIDO.**

El LPS representa el principal componente de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas y juega un papel clave en el desarrollo de infecciones y sepsis (Rietschel y Brade, 1992; Schletter y col, 1995). El LPS fue descubierto aproximadamente hace unos 100 años por Richard Pfeiffer, y al contrario que la exotoxina segregada por la bacteria del cólera, se trata de una toxina estable al calor involucrada en diferentes patologías (Ulmer y col, 2002).

Aunque existe una gran variación en la composición del LPS, todos ellos muestran una estructura común. Se trata de moléculas anfipáticas consistentes en una parte polisacárida e hidrófila que va unida covalentemente a un componente lipídico e

hidrófobo, denominado lípido A (**Fig. 8**). El heteropolisacárido comprende dos regiones: la cadena O-específica también llamada antígeno O, formada por unidades repetitivas de oligosacárido, y la región central o *core*. Éste a su vez se subdivide en *core* externo (formado por hexosas), mediante el cual se une al antígeno O, y el *core* interno (formado por heptosas). El lípido A se compone en general de un disacárido fosforilado, unido a dos D-glucosaminas en posición  $\beta$ 1,6 y que porta un máximo de seis o siete residuos acilo. Se une al *core* interno mediante un residuo llamado KDO (ácido 2-ceto-3-desoxioctanoico). Existen variaciones en la longitud, posición y número de ácidos grasos que componen el lípido A.



**Fig. 8. Estructura química y variabilidad del LPS.** <http://scielo.sld.cu/pdf/bta/v26n1/bta01109.pdf>.

#### 4.1.1. INTERACCIÓN ENTRE EL LPS Y PROTEÍNAS SOLUBLES DE MEMBRANA.

Un requisito previo para la activación de las células por el LPS es su interacción con moléculas específicas de unión al LPS en la superficie de sus células diana. Se han descrito varias estructuras de unión al LPS, pero sólo se ha demostrado relevancia fisiológica para algunas de ellas (**Fig. 9**). La proteína de la superficie celular más importante relacionada con la unión al LPS y a su activación celular es la glucoproteína

de 55 kDa CD14 (Tanaka y col, 2000). El CD14 existe como una proteína de membrana (CD14m) anclada a un glicosilfosfatidilinositol (GPI) en las células monocíticas, células epiteliales, leucocitos polimorfonucleares y algunos linfocitos B (Gu y col, 1998). La unión del LPS al CD14m en los monocitos es necesaria para la estimulación de estas células, lo cual lleva a una producción y liberación de mediadores inmunes.

La unión del LPS al receptor CD14 está fuertemente incrementada por una glucoproteína sérica de 60 kDa denominada proteína de unión al LPS (*LPS-binding protein* o LBP) (Staal y Sonsalla, 2000; Tanaka y col, 2000). Durante la respuesta de fase aguda, la concentración de LBP se incrementa desde 5-10 µg/ml hasta 200 µg/ml (Staal y Sonsalla, 2000).

El LBP reduce la concentración de LPS requerida para la activación de los monocitos formando complejos LBP-LPS, que son reconocidos por el CD14. Además del CD14m, existen distintos tipos de CD14 solubles (de 48, 53 y 55 kDa) presentes en concentraciones alrededor de 2-6 µg/ml en suero (Frey y col, 1992), y que son liberados por monocitos o bien secretados por formas libres de GPI (Alam y col, 1997; McNaught y Olanow, 2003). Se sabe que el LPS se une directamente a las formas solubles del CD14 (CD14s), un proceso altamente facilitado por el LBP, a pesar de que esta proteína no está presente en los complejos de LPS-CD14s (Andrew y col, 1993). Los complejos LPS-CD14s permiten la activación de algunas células sin CD14m, como células endoteliales, fibroblastos y células del músculo liso, que producirían citoquinas (Benveniste, 1992; Good y col, 1992; Wang, 2000). Así, se ha postulado la existencia de un receptor específico para los complejos de LPS-CD14s que se expresaría en estas células y que mediaría la activación por el LPS de las células sin CD14. En conclusión, el CD14 como receptor soluble de membrana, jugaría un papel extremadamente

importante en el reconocimiento molecular del LPS en varias células. Sin embargo, parece que para la activación celular se requieren moléculas de membrana adicionales.

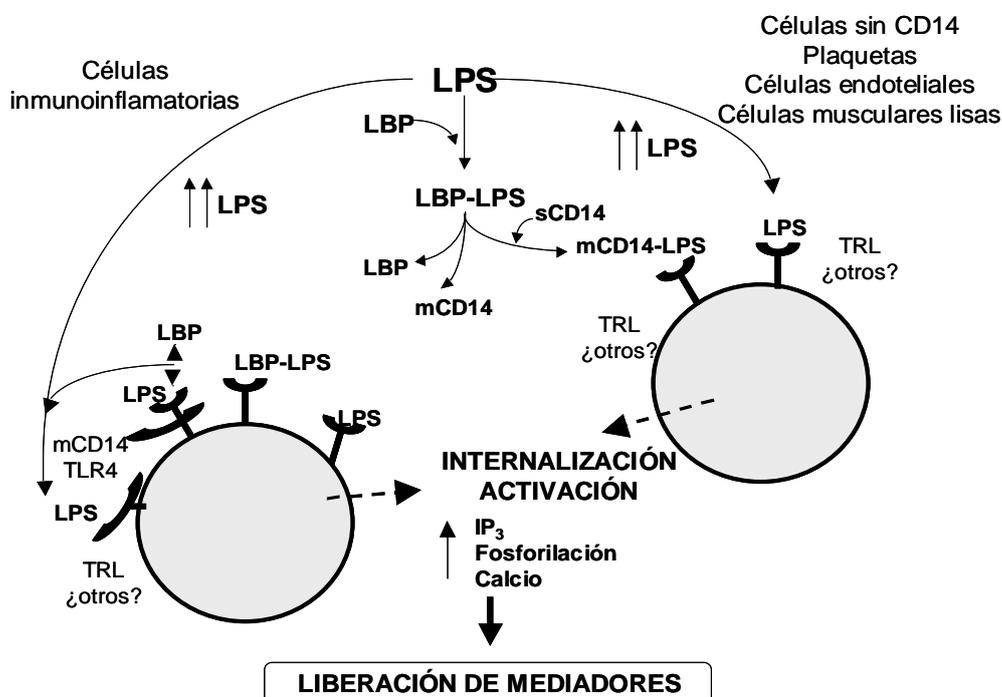


Fig. 9. Mecanismos de activación celular del LPS. (Arditi y col, 1995).

#### 4.1.2. TRANSDUCCIÓN DE SEÑAL INDUCIDA POR EL LPS.

Se han identificado en humanos y ratones una familia de proteínas denominadas receptores semejantes a Toll (Toll-like receptors o TLRs). Se trata de proteínas transmembrana con un dominio extracelular con repeticiones ricas en leucina (LRR) y un receptor citoplasmático Toll/IL-1 (TIR) con un dominio de gran semejanza estructural con el receptor de la IL-1 (O'Neill y Greene, 1998; Anderson, 2000). Existen evidencias que sugieren que estos TLRs son las moléculas más importantes de reconocimiento de patógenos y que se utilizan diferencialmente en el inicio de las cascadas de señalización en respuesta a infecciones con diferentes clases de patógenos.

Una vez que el LPS estimula las células diana ocurren una serie de acontecimientos intracelulares. El más importante y mejor caracterizado es la activación del factor nuclear  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B), que juega un papel central en la regulación de las respuestas inflamatorias e inmunes (Ghosh y col, 1998; May y Ghosh, 1998). El NF $\kappa$ B representa un grupo de proteínas relacionadas estructuralmente, incluidas la p65, p50, p52, RelB y c-Rel. En condiciones normales, el NF $\kappa$ B se encuentra secuestrado en el citosol como una forma inactivada homo o heterodimérica, con interacciones no covalentes con sus proteínas de inhibición, denominadas IKK $\beta$ s. Tras la estimulación con el agonista apropiado, el IKK $\beta$  es fosforilado, ubiquitinizado y degradado. Así, el NF $\kappa$ B es liberado y se transloca al núcleo iniciando fenómenos de expresión génica. Dentro de los genes diana del NF $\kappa$ B se incluyen aquellos que codifican para citoquinas, quimioquinas, moléculas de adhesión, proteínas de fase aguda, péptidos antimicrobianos, la iNOS y la ciclooxigenasa 2 (COX-2). En conjunto, estos mediadores proporcionan protección inmediata al huésped e inducen el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa (Ghosh y col 1998, May y Ghosh, 1998).

En los últimos años se ha producido una importante expansión de nuestro conocimiento sobre los mecanismos de señalización por los que el LPS induce la activación del NF $\kappa$ B. De hecho, se han descubierto varios de los componentes moleculares implicados en este proceso (**Fig. 10**). El TLR4 es un receptor primario transmembrana de señalización para el LPS. Una vez unido al receptor de superficie del LPS (CD14), éste debe transferirse al TLR4, dando como resultado la homodimerización del TLR4 y un cambio conformacional de su dominio citoplasmático. Posteriormente, se recluta sobre el receptor una proteína adaptadora llamada MyD88, lo cual va seguido de la interacción con la quinasa asociada al IL-1R (IRAK-1, -2 o -M). La IRAK se disocia del complejo del receptor y recluta al factor 6

asociado al receptor de TNF (TRAF6), que finalmente resulta en el ensamblaje y activación del complejo IKK $\alpha/\beta/\gamma$  y la posterior fosforilación y degradación del I $\kappa$ B y la translocación al núcleo del NF $\kappa$ B.

El mecanismo por el cual el TRAF6 activa a las IKKs no se conoce bien, aunque hay evidencias que muestran que el TRAF6 podría interactuar con moléculas adicionales que ayudarían a activar a proteínas quinasas en cascada, lo cual llevaría a la fosforilación y activación de las IKKs. Se han identificado tres proteínas TRAF6, denominadas intermediario evolutivo conservado de señales en la vía Toll (ECSIT), proteínas de unión a TAK-1, una quinasa activada por el factor de crecimiento transformante  $\beta$ -2 (TAB2) y proteína de unión al TRAF6 (T6BP) (Zhang y Ghosh, 2000). (**Fig. 10**).

Existen otras vías de transducción de señales del LPS. En diversos estudios *in vitro* con monocitos y fibroblastos se han implicado proteínas G y pequeñas proteínas G que pueden participar en la activación de tirosinaquinasas (TK) ((Tanke y col, 1991; Mayeux, 1997), la fosfolipasa C (PLC) y (A<sub>2</sub>) (Chang y col, 1990; Fleming y col., 1996), así como la calmodulina (Nakano y col, 1993; Mattson y Rydel, 1996). También se ha atribuido el papel de segundo mensajero a la esfingomielasa (SM), que hidrolizaría la esfingomielina en ceramida, la cual activaría diferentes proteínofosfatasa (PPT) y proteínquinasas (PK), como la PK activada por ceramida (Joseph y col, 1994), que podrían intervenir en la señal del LPS activando o inhibiendo diversas enzimas como la PK C, las fosfolipasas PLC y PLA<sub>2</sub>, y la COX-2 (Hayakawa y col, 1996; Liu y col, 1999).

Otra vía es la formada por las PK, en la cual están implicados varios grupos: las serina-treonina PK A y C (Shapira y col, 1990; Kozak y col, 1997) y un gran conjunto

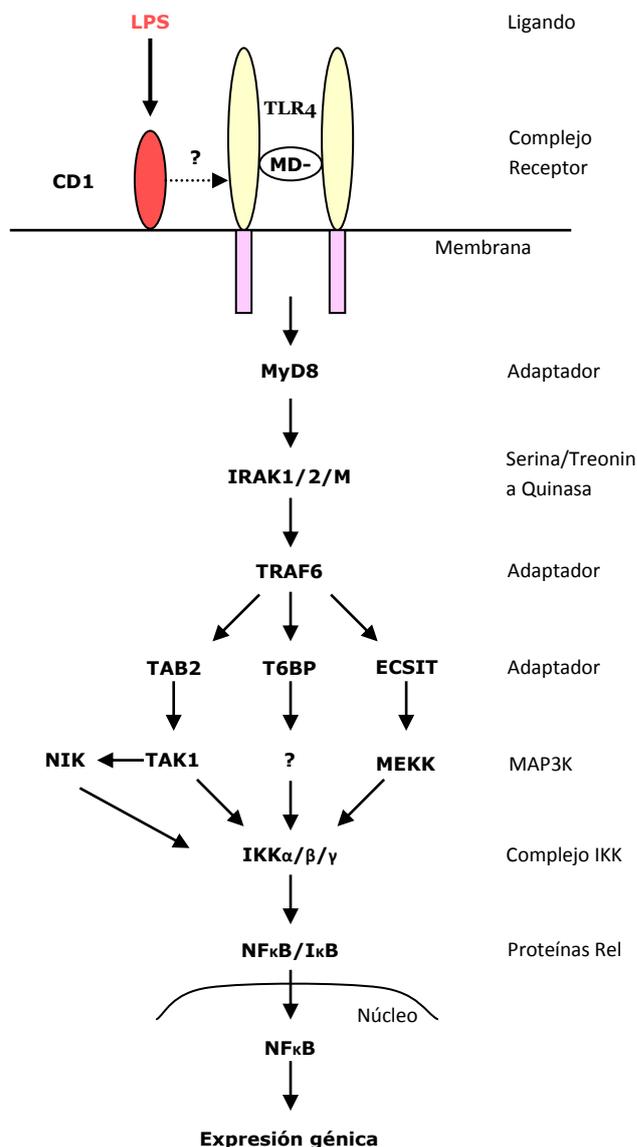
de TK (Ruetten y Thiemermann, 1997). El conjunto de las TK activadas por mitógenos y MAP quinasas (MAPK), también participan en gran medida en las señales intracelulares del LPS. Esta gran familia consta de PK que fosforilan restos de serina-treonina y tirosina-treonina. Según diferentes estudios *in vitro* realizados en macrófagos, otros leucocitos, células endoteliales, células musculares lisas y otros tipos celulares (Arditi y col, 1995; Downey y Han, 1998; Baydoun y col, 1999), existen al menos cuatro subgrupos de MAPK, de los cuales se ha descrito que tres están relacionados con las respuestas inducidas por el LPS. Una de ellas está formada por las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK). Las otras vías relacionadas con las MAPK incluyen el conjunto de proteínas que forman la subfamilia de PK del factor de transcripción c-jun, llamadas JNK.

Las quinasas p38 también juegan un papel crucial en la regulación de la respuesta con citoquinas tras la estimulación con el LPS. De hecho, se sabe que un inhibidor específico de estas quinasas, el SB203580, previene completamente la liberación de citoquinas tras la estimulación de los monocitos con el LPS (Lee y col, 1994).

#### **4.2. EL LPS COMO MODELO DE LA EP.**

Los procesos inflamatorios, incluida la activación microglial, parecen ser importantes en el desarrollo y progresión de varias enfermedades neuronales degenerativas, entre ellas la EP (McGeer y col, 1988b; Akiyama y McGeer, 1989). La cinética de la reacción inflamatoria que sigue a la administración intracerebral del LPS ya se ha descrito en el SNC de ratones (Anderson y col, 1992) y ratas (Bourdiol y col, 1991; Montero-Menei y col, 1994,1996; Szczepanik y col, 1996).

De igual manera, estudios previos de nuestro grupo de investigación trataron de determinar si la activación glial inducida por una única inyección de LPS en la SN podría tener algún efecto sobre la viabilidad de las neuronas DAérgicas *in vivo* y si este efecto era selectivo para este tipo de neuronas. El modelo que describieron permitiría determinar en qué medida está implicada la activación glial en la progresiva degeneración nigral característica de la EP y también en qué medida los factores derivados de la glía, como las citoquinas o la privación de factores neurotróficos, clásicamente asociados con una importante muerte neuronal *in vivo*, están implicados en la degeneración DAérgica.



**Fig. 10. Vías de señalización inducidas por el LPS que acaban en la activación del NFκB.** Tras la unión del LPS al CD14, éste puede ser transferido al complejo receptor TLR4-MD-2 en la membrana celular o bien activar una cascada de proteasas que generan un ligando para el TLR4. Consecuentemente, el TLR4 puede dimerizarse, lo cual provocaría un reclutamiento en cascada de moléculas y por último la activación del NFκB, así como la transcripción de varios genes implicados en la respuesta inmune e inflamatoria. Por otro lado, el TLR2 es el responsable de mediar la señal inducida por otros productos microbianos y, al igual que en la cascada del LPS, se usan idénticos intermediarios de señalización para activar al NFκB. Las vías de señalización independientes de MyD88 también existen en la activación del NFκB inducida por el LPS; sin embargo, las identidades moleculares de estos mediadores aún no han sido determinadas. Adaptado de Zhang y Ghosh, 2000).

Dichos estudios revelaron que la inyección de 2 µg de LPS en la SN de la rata producía una serie de eventos dañinos en esta estructura cerebral (Castaño y col, 1998). Cuatro días después de la inyección de LPS hubo una degeneración del sistema DAérgico puesta de manifiesto por el descenso significativo de los niveles de DA tanto en la SN como en el estriado. Mientras que los niveles de DA decrecieron, las relaciones ácido homovanílico (HVA)/DA y DOPAC/DA (indicadores del intercambio metabólico de la propia DA) se incrementaron en todos los tiempos en la SN y el estriado, lo que indicaría que el daño DAérgico inducido por la inyección de LPS incrementa la transmisión sináptica de DA. El descenso en los niveles de DA también está en consonancia con el descenso en la actividad de la tirosina hidroxilasa o TH (la enzima inicial y limitante de la biosíntesis de catecolaminas), sobre todo en el estriado. Este daño sobre las neuronas DAérgicas también se puso de manifiesto por la pérdida de neuronas TH positivas en la SN.

La neurodegeneración encontrada está de acuerdo con estudios previos con LPS. Andersson y colaboradores (1992) describieron la pérdida de células piramidales de la capa CA1 del hipocampo de ratones tras una inyección intrahipocámpal de 2 µg de LPS. Además, se ha descrito una leve pero significativa pérdida de receptores neuronales NMDA tras una única inyección de LPS en el estriado (Bourdiol y col, 1991).

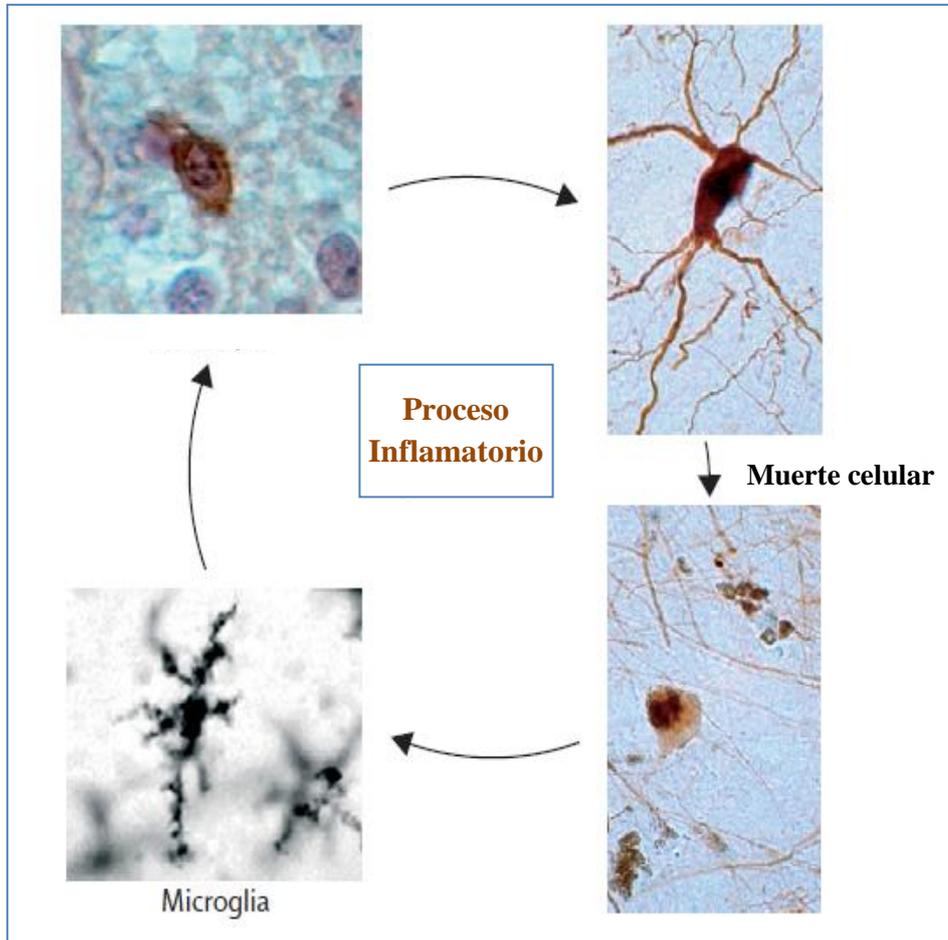
La eficacia del LPS como activador inmune en el SNC se mostró por el cambio en la morfología de la microglía y el incremento del número de células OX-42 positivas. Dos días tras la inyección de LPS, las células microgliales ya muestran una morfología activada en la SN dañada (**Fig. 11**). Este resultado está de acuerdo con estudios previos que muestran que el LPS es un potente estimulante de la microglía (Anderson y col, 1992; Lee y col, 1993; Montero-Menei y col, 1994, 1996).

Sin embargo, la reacción inflamatoria inducida por la inyección de LPS parece afectar de distinta manera a los diferentes tipos neuronales. Estudios *in vitro* han mostrado que las neuronas DAérgicas son dos veces más sensibles a los efectos tóxicos del LPS que las neuronas TH negativas (Bronstein y col, 1995). Nuestro grupo mostró en estudios previos que las neuronas DAérgicas son sensibles al LPS sólo cuando éste se ha inyectado en la SN. Los distintos parámetros bioquímicos e inmunohistoquímicos estudiados mostraron que la inyección de LPS en el haz prosencefálico medial (HPM) o en el estriado, no afectan al sistema DAérgico, excepto por un incremento en los niveles de DA y DOPAC en el estriado a los 15 días tras la inyección de LPS en esta estructura, lo que podría deberse a un incremento en la producción de factores de crecimiento en respuesta al LPS. Esta diferente reacción inflamatoria entre la SN y el estriado también fue patente en la característica desaparición de los astrocitos en el lugar de la inyección del LPS, de manera que cuando el LPS fue inyectado en el estriado, el área carente de astrocitos fue muy estrecha y localizada alrededor del tracto de inyección, y no se observaron fuertes agrupaciones de macrófagos.

La pérdida de astrocitos ya se había descrito en estudios anteriores cuando se hacían daños en el SNC, como con la inyección de excitotoxinas (Bjorklund y col, 1986; Ross y Ebner, 1990; Jorgensen y col, 1993), o con la inyección de 6-OHDA en el HPM (Stromberg y col, 1986). Sin embargo, algunos autores no han observado pérdida de astrocitos cuando se inyectaron neurotoxinas en el estriado (Bjorklund y col 1986, Isacson y col 1987).

Tras la apertura de la BHE, como en el caso de la muerte neuronal, el incremento masivo de componentes séricos, como el Glu, pueden inducir la hinchazón de los astrocitos (Kimelberg y Ransom, 1986). Sin embargo, también tenemos que

tener en cuenta que en estudios *in vitro*, el LPS altera la función astrocítica y su estructura a través de la liberación de citoquinas pro-inflamatorias (Hu y col 1994).



**Fig. 11: Posible papel de mecanismos celulares durante la degeneración DAérgica en la EP.**

Las neuronas DAérgicas inmersas en un proceso degenerativo, activan las células gliales, particularmente la microglia, la cual activa un proceso inflamatorio en la zona de daño neuronal. La inmunidad innata del SNC mediada por la microglia, podría contribuir a la recaptación de leucocitos periféricos (linfocitos T) que contribuirían al mantenimiento del proceso inflamatorio. Este mecanismo crea un ciclo continuo que puede amplificar o perpetuar la neurodegeneración en la EP.

Al contrario que su efecto sobre el sistema DAérgico, el LPS no afectó otros tipos neuronales estudiados. Estos estudios mostraron que el LPS no indujo daño sobre las neuronas GABAérgicas tras la inyección de LPS en la SN o en el estriado. Por su parte el sistema serotoninérgico mostró un daño transitorio (Herrera y col, 2000); los

niveles de serotonina descendieron desde el día 4 en adelante pero volvieron a sus valores normales al día 15 en el estriado y al 21 en la SN, mientras que los niveles de DA no se recuperaron durante todo el intervalo estudiado. El incremento en los niveles del ácido 5-hidroxiindolacético en el día 2 podría indicar un aumento de la neurotransmisión de serotonina. Las alteraciones en los niveles del ácido 5-hidroxiindolacético desaparecieron desde el día 15 en adelante, reforzando la idea de que el tratamiento con LPS fundamentalmente afecta al sistema DAérgico. Igualmente, la inyección de LPS en el rafe dorsal no produjo cambio alguno en la inmunotinción de las células serotoninérgicas.

Así, parece que el daño neuronal inducido por el LPS, al menos en las áreas estudiadas, es específico de las neuronas DAérgicas y se dispara en el cuerpo neuronal de la SN.

Además, los anteriores trabajos de nuestro grupo no sólo muestran que el daño inducido por el LPS es específico para las neuronas de DA sino también que este daño no se revierte durante el período de tiempo estudiado (1 año). Las medidas de la concentración de DA, la actividad de la TH y los análisis inmunohistoquímicos 1 año después de una única inyección de LPS en la SN, revelaron la pérdida de marcadores de DA en torno al 50-60%. Aunque hay algunas variaciones en los resultados con HPLC, el estudio de los distintos índices de recambio parecen indicar que no hay cambios significativos en el recambio de la DA tras la inyección de LPS, indicando un posible mecanismo compensatorio más que una recuperación celular como motivo de estos cambios. Por todo ello, se puede asumir que el daño inducido por el LPS en el sistema DAérgico es permanente.

En conclusión, estos estudios demostraron que una única inyección de LPS produce una fuerte respuesta inflamatoria en la SN, lo que lleva al daño de las neuronas de DA sin afectar a otros tipos neuronales. Esta neurodegeneración se dispara en el cuerpo neuronal, lo que está de acuerdo con Patt y colaboradores (1991), que sugieren que en la EP la lesión se inicia en la SN. El daño es permanente, al menos en el período de tiempo estudiado (1 año) y se acompaña por el daño en las terminales DAérgicas en el estriado.

Hoy día no está claro si la neuroinflamación es causa o consecuencia de la enfermedad, lo que si está claro es que ya se desarrolle en las fases tempranas o tardías de la enfermedad, la liberación de agentes quimiotácticos por parte de las neuronas DAérgicas muertas (Sriram y col, 2006) probablemente promuevan una mayor infiltración de macrófagos para deshacerse de los restos celulares. Esta actividad fagocítica de los macrófagos está relacionada con *la explosión respiratoria*, la cual cabría esperar que potenciase un estrés oxidativo en la población de neuronas DAérgicas supervivientes.

Todos estos resultados muestran las diferencias entre los efectos neurotóxicos sobre las neuronas DAérgicas inducidos por el LPS y la 6-OHDA o el MPP<sup>+</sup>; así, la 6-OHDA o el MPP<sup>+</sup> son inductores más potentes de neurodegeneración cuando se inyectan en estas estructuras, debido a la alta actividad del transportador de DA en esta áreas (Jones y col, 1995; Santiago y col, 1995), matando las neuronas directamente, a través de la producción de RLO o por la inhibición de la cadena respiratoria mitocondrial, respectivamente (Youdim y Riederer, 1993; Gerlach y Riederer, 1996), mientras que el LPS actúa indirectamente, a través de la activación microglial y la liberación de productos neurotóxicos (Banati y col, 1993; Giulian y col, 1993).

## **5. MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS EN LA NEURODEGENERACIÓN.**

Las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por la pérdida de poblaciones específicas de neuronas, muchas veces debido al acúmulo tanto intra como extraneuronal de material fibrilar que puede provocar inflamación. La formación de acúmulos intracelulares puede deberse a las interacciones anormales entre proteínas, ensamblaje erróneo de éstas, o una desregulación del sistema ubiquitina-proteosoma (SUP). Todo esto se conoce con el nombre de proteinopatías, y se piensa que juegan un papel principal en la disfunción y muerte neuronal que caracteriza el desarrollo de las enfermedades neurodegenerativas, tales como el Alzheimer, Parkinson, Huntington y esclerosis lateral amiotrófica.

Existen algunas teorías mencionadas anteriormente, que indican que las inclusiones que se encuentran en tejidos cerebrales con enfermedades neurodegenerativas son un mecanismo para compartimentalizar las proteínas acumuladas e impedir que obstruyan el funcionamiento correcto de la célula. Otros estudios apoyan la idea que confieren efectos citotóxicos que contribuyen al daño celular y a la degeneración mediante la activación de un proceso inflamatorio. Si los pacientes con EP en realidad poseen un mal funcionamiento del SUP, las proteínas que normalmente se renuevan a través de esta ruta, tenderán a agregarse y formar inclusiones. Esto en términos inflamatorios, puede dar a entender según estudios previos en cultivos celulares, que dicha acumulación de proteínas activa la respuesta inflamatoria mediante el aumento en la expresión de COX-2, la cual provoca un aumento del estrés oxidativo, producción de prostaglandinas, etc, que puede provocar un bucle de retroalimentación positiva inflamatorio, que afecte a la función del SUP (Rockwell y col, 2000; Li y col, 2003).

Existen numerosas teorías sobre el paso inicial que activa la población microglial, pero lo que si está claro es que existe un ciclo neuroinflamatorio autosostenido, que probablemente contribuya a la disfunción neuronal y eventualmente a la muerte de las poblaciones neuronales mas vulnerables. A cerca de esta idea, se han realizado estudios experimentales, clínicos y epidemiológicos que indican que la activación microglial puede ocurrir en paralelo con la disfunción neuronal que ocurre en ciertas enfermedades neurodegenerativas (McGeer y McGeer, 2004).

Después de una apropiada activación microglial, estas células son capaces tanto de una actividad antimicrobiana como de su ya conocida actividad citotóxica, todo esto a través de la producción y liberación de productos tóxicos derivados del oxígeno y nitrógeno, lo cuales son generados durante un proceso denominado *explosión oxidativa o respiratoria*. Durante esta explosión se activan numerosos sistemas enzimáticos entre los que se encuentran el de la NADPH ox, iNOS y MPO (mieloperoxidasa), los cuales liberan al medio cantidades tóxicas de superóxido ( $O_2^-$ ), radicales libres de NO o ácido hipocloroso (HClO). La expresión de estos sistemas biocatalíticos en la SN son sustancialmente más elevados en pacientes con EP (**Fig. 12**).

El nitrito ( $NO_2$ ) también aumenta su concentración en pacientes con parkinson; éste puede ser oxidado por la MPO y dar radicales libres ( $NO_2^-$ ) que producen la nitrosilación de ciertas proteínas. LA MPO, es una enzima que está implicada en la producción del HClO, un potente oxidante al convertir aminas en cloraminas, fenoles, etc, que puede dañar las macromoléculas directamente mediante la producción de  $OH^-$ . Las células astrogliales próximas a las neuronas DAérgicas pueden crear un ambiente oxidativo alrededor de éstas, que podría llevar probablemente al inicio del proceso inflamatorio que conducirá a la EP. El hecho de que se haya demostrado que la astroglia posea la enzima MPO sobreexpresada en pacientes con EP y ratones tratados

con MPTP, hace ver que estas células no sólo poseen un papel neuroprotector, sino que pueden contribuir a la creación de un ambiente proinflamatorio bajo ciertas circunstancias (Przedborski y col., 1996).

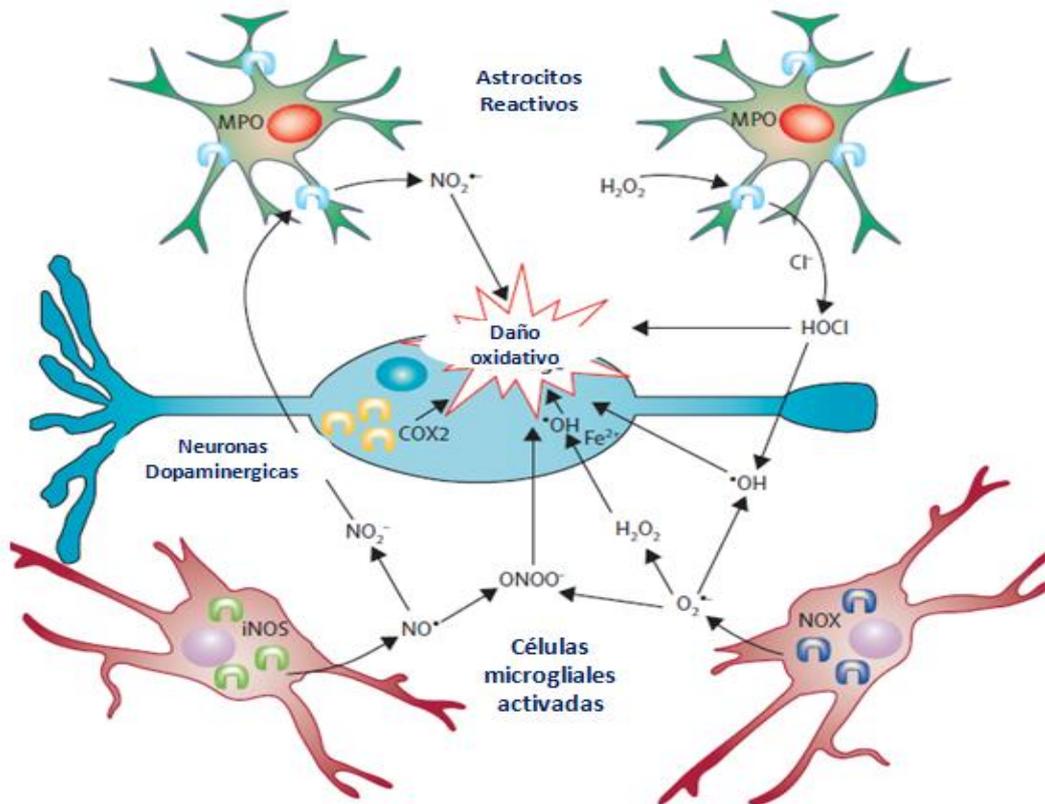
Dos de los caminos por los que la neuroinflamación produce estrés oxidativo en el SNC son, mediante la ruta del ácido araquidónico, a través de la cual se activa la producción de COXs y lipooxigenasas (LOX), y mediante la producción de altos niveles de EROs por medio de la glia activada (tanto microglía como astrogliá).

COX, es una enzima potencialmente involucrada en la neurodegeneración durante la EP. Una de sus funciones es la síntesis de prostaglandinas durante un proceso inflamatorio, y es el principal objetivo de los AINEs (ibuprofeno y aspirina entre otros). Existen estudios sobre el papel neuroprotector de la COX-2 en ratones y ratas expuestos a MPTP. En pacientes parkinsonianos se ha observado un incremento de la síntesis de COX-2, limitado a las neuronas DAérgicas, por lo que se podría pensar que la síntesis de COX-2 podría participar directamente en el proceso inflamatorio y por tanto en la degeneración DAérgica, pero en cambio, se cree que son los mecanismos oxidativos que producen RLOs durante la formación de prostaglandina H<sub>2</sub> o G<sub>2</sub>, los que principalmente contribuyen a la degeneración DAérgica en la SN. (**Fig. 12**)

Otra fuente de estrés oxidativo es la síntesis de eicosanoides (prostaglandinas) via lipooxigenasas. Las LOX son dioxigenasas de ácidos grasos esenciales, que dan como productos de su síntesis hidroxiperóxidos que pueden llegar a activar, en algunos casos, la muerte celular programada (Maccarrone y col., 2001).

Según diversos estudios (Richwine y col, 2008), la peroxidación lipídica es mayor en cerebros de ratones viejos comparados con adultos. Así, cuando el LPS se inyecta i.p., la peroxidación lipídica aumenta y la magnitud de la respuesta es

dependiente con la edad. Con todo esto, se puede sugerir que cerebros saludables de individuos viejos, sufren una exagerada reacción neuroinflamatoria cuando el sistema periférico inmune es activado.



**Fig. 12.** En esta figura se representa un posible escenario de muerte celular una vez desencadenada la **explosión respiratoria**. Son varios los acontecimientos que pueden dar lugar al daño celular. Uno de ellos es la unión del radicales libres como el NO y el  $\text{O}_2^-$  para dar peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), el cual puede causar un gran daño oxidativo en varias proteínas, tales como la TH o la  $\alpha$ -sin. Al mismo tiempo, el NO y  $\text{O}_2^-$  pueden seguir otras vías, como la reacción de Fenton producida en la SN. En pacientes parkinsonianos el Fe aumenta su concentración, por lo que se producen gran cantidad de radicales libres hidroxilos al interaccionar estos iones con el peróxido de hidrógeno. <http://imgarcade.com/1/neuronal-cell-death/>



Además de la evidencia de que la  $\alpha$ -sin puede modular la activación microglial *in vivo* e *in vitro* cuando se sobreexpresa (Su y col, 2007), existen evidencias de que la parkina y la DJ-1, pueden modular la respuesta inflamatoria celular. Existen estudios que sugieren que la parkina es un activador del NF $\kappa$ B y por tanto de la cascada de activación de componentes neuroprotectores a través del SUP (Henn y col, 2007). Si alguna neurona tiene una disfunción en la parkina, no se activará correctamente la cascada NF $\kappa$ B como consecuencia de la presencia de alguna citoquina inflamatoria, como por ejemplo el TNF, y por lo tanto no se activará con la fuerza necesaria el brazo opuesto al pro-apoptótico del TNF, por lo que dicha citoquina complicaría la supervivencia neuronal.

El TNF- $\alpha$  juega un papel importante en la EP tanto en las fases tempranas como en las fases tardías. Diversos estudios de ciertos de sus receptores (TNFr 1 y 2), muestran que éstos se expresan en células activas del sistema inmune como la microglía, y también en células DAérgicas e hipocampales (McGuire y col, 2001; Marchetti y Abbraccio, 2004; Bernardino y col, 2005). Los niveles de TNF en cerebros adultos humanos son generalmente muy bajos (Breder y col, 1993). En cambio, se han visto altos niveles de TNF y de TNFr1 tanto en el líquido cefalorraquídeo como en la SN de cerebros con EP post-mortem. (Boka y col, 1994; Mogi y col, 1994). Las neuronas DAérgicas son extremadamente sensibles al TNF (Aloe y Fiore, 1997), ya que puede activar la microglía (Lawson y col, 1990), por lo que potenciaría la respuesta inflamatoria, llevando a cabo la superproducción de EROs, NO y radicales superóxidos que potencian la formación de peroxinitritos (Beckman, 1993). La activación microglial dependiente de TNF en la SN crea un microambiente de estrés oxidativo a través de la activación de la NADPHox (Hunot, 1999) que fortalece el daño a las neuronas DAérgicas.

## **6. LA METFORMINA.**

La diabetes tipo 2 es la forma de diabetes más frecuente en personas mayores de 40 años. Se la conoce también como diabetes del adulto, aunque está aumentando mucho su incidencia en adolescentes e incluso preadolescentes con obesidad. En este tipo de diabetes la capacidad de producir insulina no desaparece pero el cuerpo presenta una resistencia a esta hormona. En fases tempranas de la enfermedad, la cantidad de insulina producida por el páncreas es normal o alta. Con el tiempo la producción de insulina por parte del páncreas puede disminuir.

Las personas con diabetes no mueren de su enfermedad, sino de las complicaciones que ésta conlleva. Después de muchos años, la diabetes puede llevar a problemas serios:

- Problemas oculares, como dificultad para ver (especialmente por la noche), sensibilidad a la luz e incluso ceguera
- Úlceras e infecciones en pies, piel, tracto genital femenino y en vías urinarias.
- La diabetes puede dificultar el control de la presión arterial y el colesterol. Esto puede llevar a un ataque cardíaco, accidente cerebrovascular y otros problemas.
- Los nervios pueden sufrir daño, causando dolor, picazón y pérdida de la sensibilidad.
- Debido al daño a los nervios, se pueden presentar problemas para digerir el alimento, sentir debilidad o tener problemas para ir al baño.
- Daño renal.
- Neurodegeneración. Recientes estudios han revelado que el sistema nervioso central está directamente implicado en la diabetes tipo 2 como parte de un mecanismo asociado a la inflamación hipotalámica que provoca la resistencia a la insulina. El deficiente control de la diabetes podría tener un impacto negativo

a largo plazo sobre el deterioro cerebral. Las investigaciones constatadas en este campo proporcionan una explicación sobre la prevalencia del deterioro cognitivo en pacientes con desordenes metabólicos, estableciendo un enlace directo entre la resistencia a la insulina y el daño cerebral. Igualmente estudios epidemiológicos revelan el mayor riesgo de neurodegeneración, como la que acontece en la EA y la EP, en personas que padecen diabetes. Así, se sabe que los pacientes con diabetes tienen más riesgo de padecer EA, incluso cuando toman antidiabéticos orales. La incidencia epidemiológica y patológica de ambas enfermedades aumenta con la edad, y la incidencia de diabetes aumenta en personas con la EA. Desde el punto de vista patológico, ambas enfermedades se asocian con una homeostasis alterada de glucosa y con la acumulación extracelular de proteínas amiloides, el polipéptido amiloide insular y de la proteína A $\beta$ . Por otro lado, la resistencia a insulina es una característica central en la diabetes y existen muchas evidencias de que esta resistencia a insulina es la que contribuye a la patología de la EA. En cuanto a la EP, recientes estudios epidemiológicos han demostrado una asociación entre la diabetes mellitus y el riesgo de padecer EP (Wahlqvist y col., 2012).

Al comienzo de la diabetes ésta se podrá controlar en muchas personas con cambios en el estilo de vida que incluyen una dieta normo o hipocalórica y ejercicio físico diario. Los controles de glucemia capilar son muy importantes aunque no se esté utilizando insulina como tratamiento. Si con estas medidas no se consigue tener un buen control metabólico se añadirán fármacos (antidiabéticos orales) o insulina. Aunque existen diferentes tipos de antidiabéticos orales, los más utilizados son la rosiglitazona, la pioglitazona, las sulfonilureas, la repaglinida, la acarbosa y la metformina.

La metformina, comercialmente denominada clorhidrato de metformina, es un miembro de la clase de las biguanidas de antihiper glucémicos orales (3-(diaminometiliden)-1,1-dimetilguanidina). De hecho, hoy en día, es el tratamiento más ampliamente prescrito para tratar la hiper glucemia en individuos con diabetes mellitus tipo II y es recomendado como terapia oral de primera línea. La metformina es tan efectiva reduciendo los niveles elevados de glucosa en sangre como otros muchos antidiabéticos pero, a diferencia de muchos de ellos, por si sola, no produce hipoglucemia.

Su fórmula empírica es  $C_4H_{11}N_5 \cdot HCl$ . Se trata de un polvo de color blanco a blanquecino, cristalino, que es fácilmente soluble en agua y prácticamente insoluble en acetona, éter y cloroformo, y cuya fórmula estructural se muestra en la **Fig. 13**.

La metformina fue aceptada clínicamente para el tratamiento de la hiper glucemia en Inglaterra en 1958, en Canadá en 1972, y en los EE.UU. en 1995, por su efecto antihiper glucemiante al reducir la producción de glucosa hepática y disminuir la resistencia a la insulina, así como los niveles de insulina plasmática en ayunas. La resistencia a la insulina ha sido el mecanismo central que subyace a diversas patologías (además de a la diabetes tipo II) y, por disminuir esta resistencia, la metformina imparte su papel beneficioso en un amplio espectro de enfermedades asociadas con la resistencia a la insulina (Viollet y col., 2009). Además, tiene potencial terapéutico en otras condiciones entre las que se incluyen la nefropatía diabética, las enfermedades cardiovasculares, la enfermedad de ovarios poliquísticos (Rotella y col., 2006) e incluso se ha investigado como antiviral y anticancerígeno (Rotella y col., 2006; Ben Sahra y col., 2010).

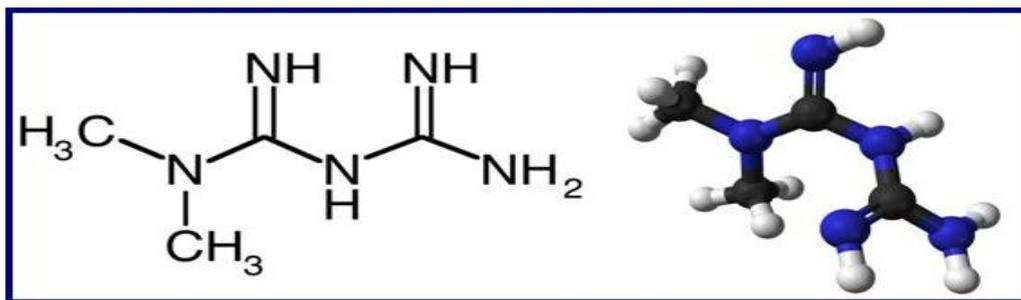


Fig. 13. Estructura de la Metformina.

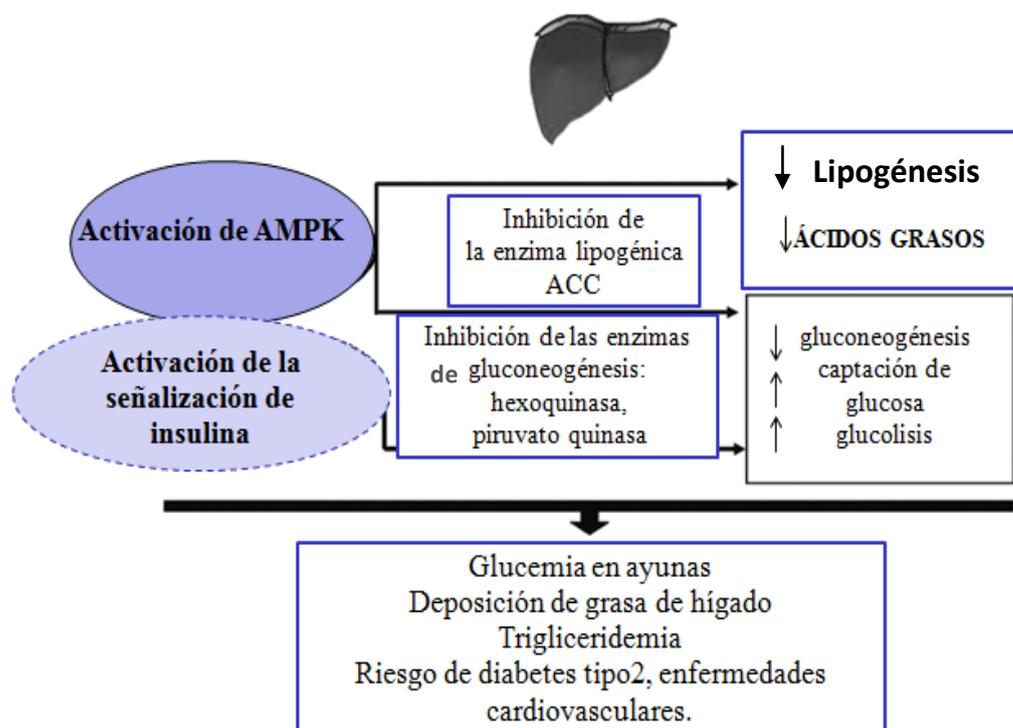
### 6.1. MECANISMO DE ACCIÓN DE LA METFORMINA.

La principal acción de metformina es disminuir las concentraciones de glucosa sin causar hipoglucemia. Esto lo consigue principalmente inhibiendo la gluconeogénesis (Natali y Ferrannini, 2006). Ejerce su acción metabólica directa y especialmente sobre el hígado (**Fig. 14**) al parecer por la predominante expresión de transportadores de cationes orgánicos tipo 1 (OCT 1) en los hepatocitos, que facilitan la entrada celular de metformina, ya que debido a su constante de disociación alta, en condiciones fisiológicas existe en una forma protonada de carga positiva (Shu y col., 2007).

El interés en el uso terapéutico de la metformina se ha visto incrementado actualmente por el reconocimiento de sus acciones pleiotrópicas en varios tejidos que se ven afectados por resistencia a la insulina y/o por hiperinsulinemia (Palomba y col., 2009). Esta mejora en la sensibilidad a la insulina se asocia a su efecto positivo sobre la expresión de los receptores de insulina (Gunton y col., 2003). Según Zhou y colaboradores (2001) las acciones pleiotrópicas de la metformina están íntimamente asociadas con la activación de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK), enzima importante en el balance de energía del cuerpo mediante el control de los hidratos de carbono y metabolismo de los lípidos a través de la señalización de insulina (Musi y

col., 2002; Gruzman y col., 2009). Este control protege las funciones celulares bajo condiciones de energía restrictivas.

La AMPK es una proteína heterotrimérica que consiste en una subunidad catalítica  $\alpha$  y dos subunidades reguladoras  $\beta$  y  $\gamma$ , donde cada subunidad tiene al menos dos isoformas. La AMPK se activa por un aumento en la razón AMP/ATP y/o ADP/ATP intracelular resultante del balance entre consumo y producción de ATP. Esta activación implica la unión del AMP a los sitios reguladores de la subunidad  $\gamma$ . Esto causa cambios conformacionales que activan alostéricamente a la enzima e inhiben la desfosforilación de Thr172 dentro de la subunidad  $\alpha$  (la activación de AMPK requiere la fosforilación de la Thr172 por quinasas como LKB1 y CaMKK $\beta$ ). La activación de AMPK por tanto inhibe las vías que consumen ATP y estimula vías alternativas para la regeneración de ATP (Carling, 2004); es decir, cambia las células de un estado anabólico a uno catabólico, cerrando las vías sintéticas que consumen ATP y restaurando el equilibrio energético. Como resultado la síntesis de glucosa, lípidos y proteínas y el crecimiento celular se inhiben mientras que la oxidación de los ácidos grasos y la captación de glucosa se estimulan (**Fig. 14**).



**Fig. 14. Acciones de la metformina en el hígado** (Adaptado de Diamanti-Kandarakis, y col, 2010).

Pero la activación de AMPK por metformina no parece que se produzca directamente, sino que es secundaria a su efecto en la mitocondria, blanco primario de la droga. Según se informó a principios del año 2000, la metformina induce inhibición específica del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial (**Fig. 15**). Esto se observó inicialmente en hígados perfundidos y hepatocitos aislados de roedores (El-Mir y col., 2000; Owen y col., 2000), pero más tarde también en otros tejidos, como el músculo esquelético (Brunmair y col., 2004), células endoteliales (Detaile y col., 2005), células beta pancreáticas (Hinke y col., 2007) y neuronas (El-Mir y col., 2008).

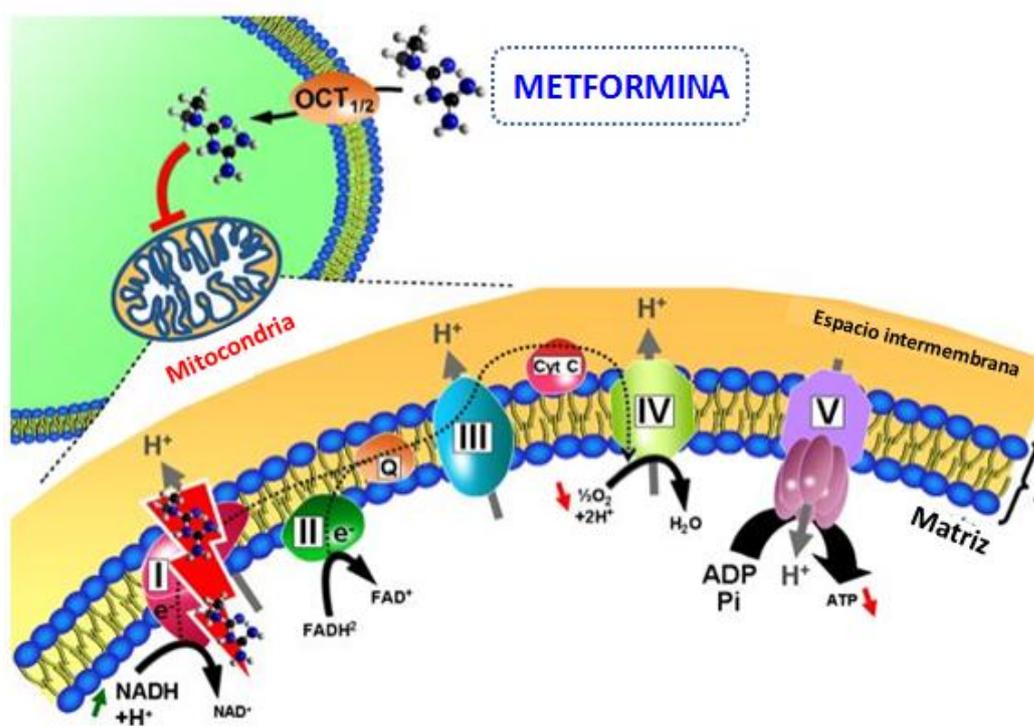


Fig. 15. El complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial es el principal objetivo de la metformina. (Adaptado de Viollet y col., 2012).

Aunque el mecanismo exacto por el cual la metformina inhibe el complejo I de la cadena respiratoria sigue siendo desconocido, se ha demostrado que este efecto no requiere AMPK. Por tanto, la activación de la AMPK por la metformina en el hígado, y probablemente en otros tejidos, es la consecuencia directa de una reducción transitoria en el estado de energía celular inducido por la inhibición específica del complejo I de la cadena respiratoria por la droga (Stephene y col., 2011), lo que da lugar a un bajo consumo de oxígeno por las células y a un aumento en la relación NADH/NAD. La  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos es llevada a cabo por la enzima L-3 hidroxil CoA deshidrogenasa, la cual utiliza NAD como cofactor. Al producirse un aumento en la relación de NADH/NAD, se bloquea la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos, aumentando la relación AMP/ATP y resultando en la activación de AMPK (Aljada y Mousa, 2012) (Fig. 16).

La demostración de que el complejo I de la cadena respiratoria y no la AMPK es el principal blanco de la metformina se reforzó al mostrar que el efecto metabólico del fármaco se preserva en el hígado de ratones deficientes en AMPK, por lo que otro/s mecanismo/s independiente/s de AMPK podría/n estar implicado/s.

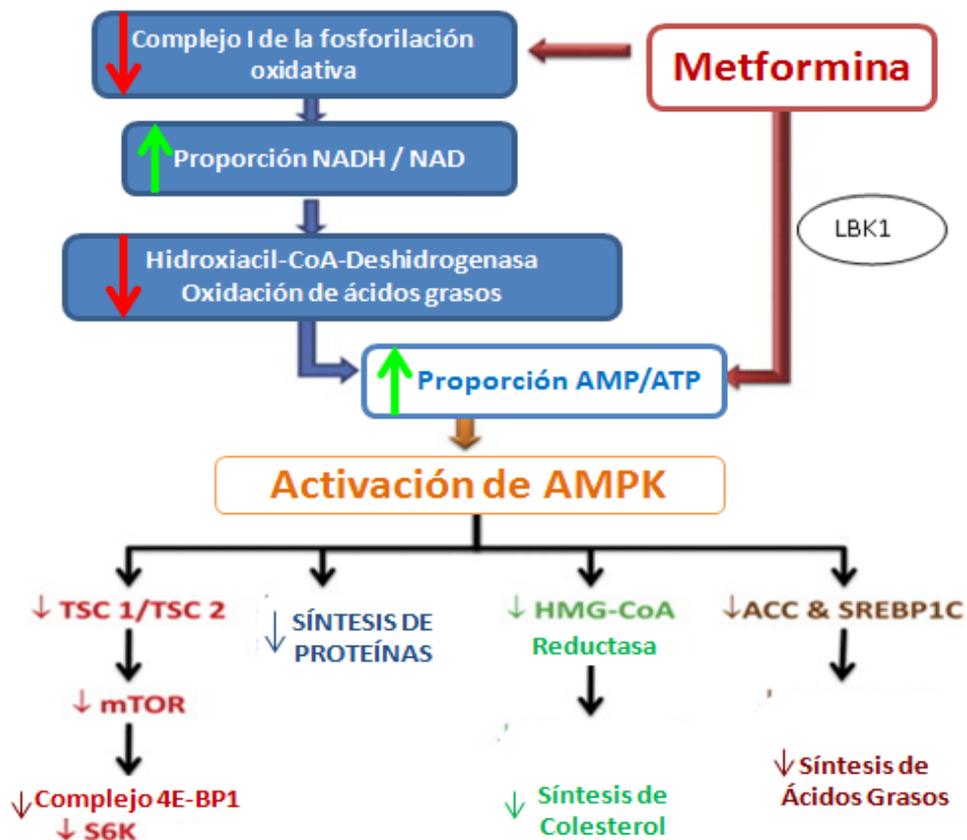


Fig. 16. Efecto de la inhibición del complejo I de la fosforilación oxidativa en la mitocondria por metformina. (Aljada y Mousa, 2012).

## 6.2. EFECTO ANTI-INFLAMATORIO DE LA METFORMINA.

Como ya se ha demostrado en diferentes estudios, la inflamación parece estar implicada en varios mecanismos patológicos, como por ejemplo, los que conducen a la muerte de neuronas DAérgicas en la EP. Varios resultados de estudios clínicos y experimentales sugieren que la metformina, a parte de su acción hipoglucemiante,

puede atenuar tanto la inflamación periférica como la central. El potencial anti-inflamatorio de metformina se ha estudiado en particular en modelos experimentales de inflamación periférica. Se ha demostrado que atenúa la respuesta pro-inflamatoria en las células endoteliales (Isoda y col., 2006), disminuye la proliferación de células de músculo liso de aorta humana (Li y col., 2005) y aminora la activación de macrófagos (Mamputu y col., 2003).

Isoda y colaboradores (2006) investigaron estos efectos anti-inflamatorios en células de la pared vascular humana, donde observaron que la metformina ejerce un efecto anti-inflamatorio al inhibir al NF- $\kappa$ B a través del bloqueo de la vía PI-3 quinasas. Por otro lado, en células endoteliales, la actividad de la AMPK se asocia con la fosforilación y la activación de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), que resulta en una acción anti-inflamatoria en la pared vascular (Zou y col., 2002).

También se han descrito efectos anti-inflamatorios de la metformina en monocitos humanos en los que se observa una reducción en la producción de TNF y TF (factor tisular) (Arai y col., 2010). Estudios recientes también han puesto de manifiesto que la metformina reduce de forma significativa las citoquinas inflamatorias como el TNF- $\alpha$ , la proteína 1 quimioatrayente de monocitos (MCP-1), la IL-1 $\beta$ , la MIP-1 $\alpha$ , la IL-6, la leptina, y la IL-18 en la uveítis inducida por endotoxina en ratas (Kalariya y col., 2012). Así mismo, se han descrito efectos beneficios terapéuticos de la metformina en la lesión hepática inducida por endotoxina, lo que sugiere su potencia farmacológica en los trastornos por inflamación.

Otros datos que apoyan el efecto anti-inflamatorio de la metformina fueron obtenidos por Koh y col. (2014) al encontrar que la metformina suprime la activación de NF- $\kappa$ B en las células epiteliales intestinales y amilora la colitis en ratones, lo que

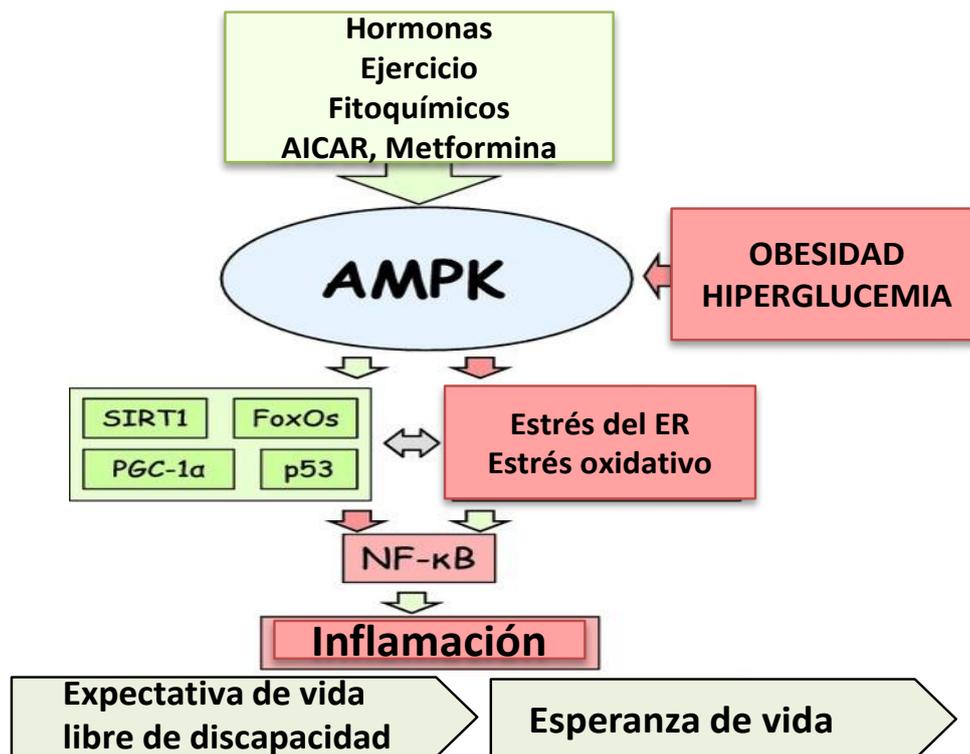
sugiere que la metformina podría utilizarse como un agente terapéutico potencial para el tratamiento de enfermedades inflamatorias del intestino (Koh y col., 2014).

Este efecto anti-inflamatorio de la metformina parece estar mediado por la AMPK. Al ser activada por metformina, la AMPK inhibe la señalización del NF- $\kappa$ B y por tanto, la inflamación, ya que el NF- $\kappa$ B es el inductor clave de las respuestas inflamatorias (Fig. 17). La AMPK tiene varias dianas de fosforilación, pero parece que suprime indirectamente la señalización de NF- $\kappa$ B a través de sus posteriores mediadores, por ejemplo, la SIRT1, la familia Forkhead O (FoxO) y el co-activador 1 $\alpha$  del receptor  $\gamma$  proliferador activado de peroxisomas (PGC-1  $\alpha$ ), los cuales posteriormente pueden reprimir la expresión de los factores inflamatorios (Salminen y col., 2011). Cabe decir que también es conocido que algunas de las respuestas biológicas a la metformina no se limitan a la activación de la AMPK sino que son mediadas por mecanismos independientes de la AMPK, incluyendo la inhibición de diferentes dianas intracelulares tales como p70S6K1 quinasa (Towler y Hardie, 2007), la MAPK p38 y la PKC (Saeedi y col., 2008).

Parece razonable considerar que la activación de la AMPK por la metformina puede afectar no sólo a tejidos periféricos sino también al cerebro, debido a que se ha demostrado que el fármaco cruza la BHE y se ha visto que se acumula en el cerebro de roedores (Wilcock y Bailey, 1994). En consecuencia, metformina es reconocida como un fármaco que actúa directamente sobre el sistema nervioso central y se ha probado en varios modelos experimentales de neurodegeneración y neuroinflamación. Así, por ejemplo, prolonga el tiempo de supervivencia en modelos de ratones transgénicos de la enfermedad de Huntington (Ma y col., 2007), atenúa la inducción experimental de encefalomiелitis autoinmune (Nath y col., 2009), disminuye la migración y la invasión de células de glioma U87 y LN229 (Beckner y col., 2005) y exhibe efectos

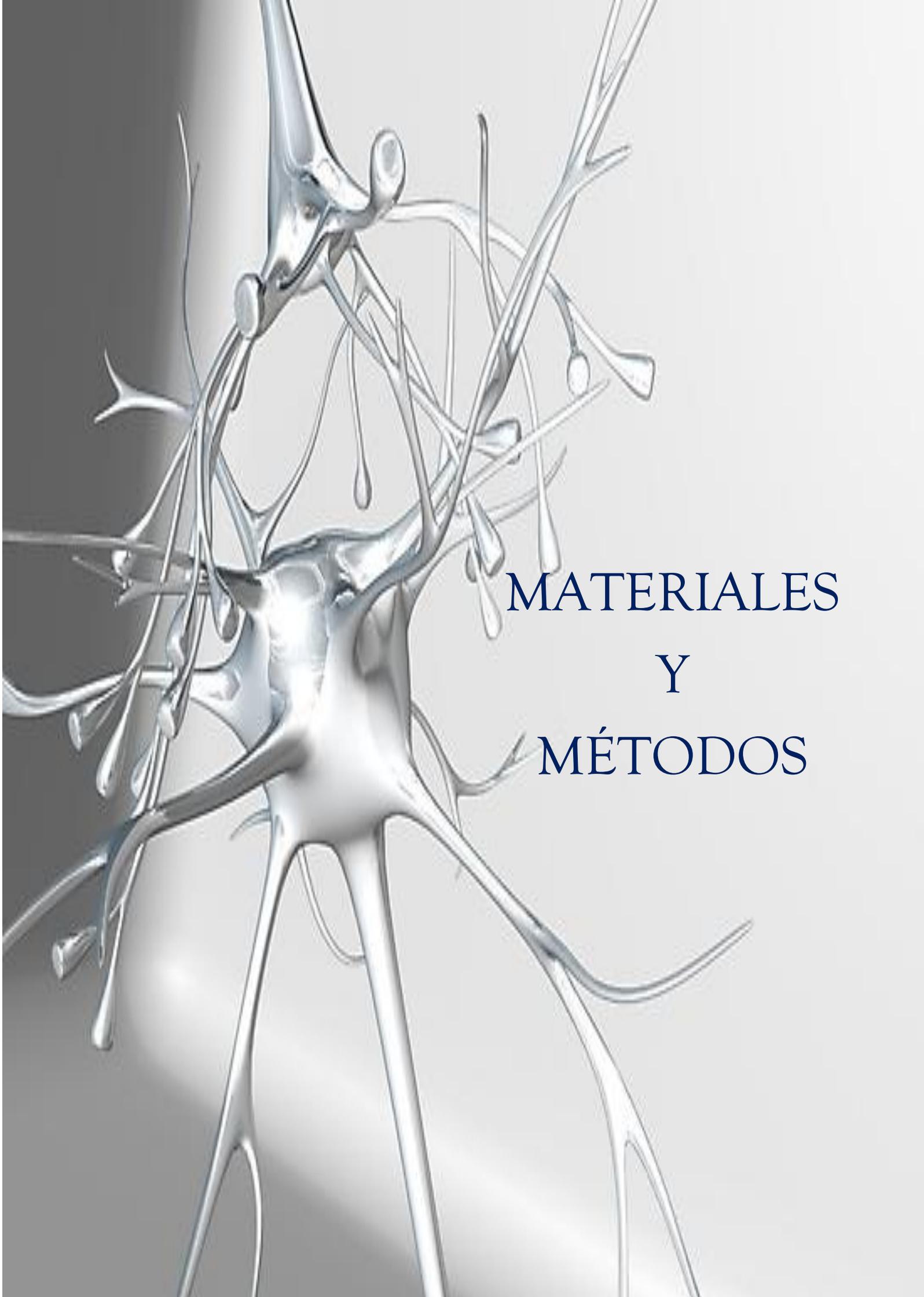
neuroprotectores contra la apoptosis inducida por etopósido en neuronas corticales primarias (El-Mir y col., 2008).

También existen evidencias de que la metformina puede modular la respuesta pro-inflamatoria inducida por LPS en microglia primaria en rata, tanto por mecanismos dependientes de la AMPK que regulan la liberación de TNF- $\alpha$ , como por mecanismos independientes de la AMPK que afectan a la liberación de IL-1, IL-6, IL-10 y TGF- $\beta$ , y que debido a su efecto inhibitor del complejo I de la cadena respiratoria en la mitocondria la metformina inhibe la producción de radicales libres tales como NO y ROS, aumentando la viabilidad celular (Labuzek y col., 2010).



**Fig. 17. Ilustración esquemática de las conexiones funcionales de la AMPK relacionadas con la inhibición de la señalización de NF-kappa B y la supresión de la inflamación.** Las flechas verdes indican las vías de activación y las flechas rojas son las conexiones inhibitorias. (Adaptado de Salminen y col, 2011).





MATERIALES  
Y  
MÉTODOS



## 1. ANIMALES.

Para este estudio se utilizaron ratas albinas machos de la raza Wistar (200-300 g) y ratones machos de la raza C57BL (20-25 g). Las ratas y los ratones se mantuvieron a una temperatura constante de  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  y a una humedad relativa del 60%, con un ciclo de luz-oscuridad de 12 h y acceso libre a comida y agua. Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con el «Guidelines of the European Union Council» (2010/63/EU), siguiendo las regulaciones españolas (BOE 34/11370-421, 2013) para el uso de animales de laboratorio y aprobadas por el comité científico de la Universidad de Sevilla.

## 2. CULTIVOS CELULARES.

Células DAérgicas mesencefálicas inmortalizadas de rata (N27) se utilizaron para este estudio. Éstas son células neuronales DAérgicas que poseen todas las propiedades fisiológicas y bioquímicas de las neuronas DAérgicas, y pueden ser utilizadas como modelo de la EP. Las células fueron cultivadas en medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS) inactivado por calor, penicilina (100 U / ml) y estreptomycin (100 U / ml), y se mantuvieron a  $37^\circ\text{C}$  en una atmósfera humidificada de  $\text{CO}_2$  al 5% en frascos de cultivo de  $75\text{ cm}^3$ . El medio se cambiaba cada 3 días y se dejaban crecer hasta un 80% de confluencia. Todos los experimentos se llevaron a cabo en células de pasaje 3-20. La manipulación de las células se realizó siempre en campana de flujo laminar. La separación de los cultivos se realizó cuando su crecimiento alcanzó un 80% de confluencia, mediante el siguiente procedimiento:

- Lavar las células con tampón fosfato (PBS1X).

- Añadir una cantidad suficiente de tripsina 0.25% para cubrir la superficie del cultivo.
- Incubar durante 5 min a 37 °C
- Añadir el medio de cultivo precalentado a 37 °C para detener la tripsinización.
- Recoger las células, centrifugarlas, resuspender el precipitado en un volumen deseado y resembrar.

Para determinar el número de células vivas se utilizó la *cámara de Neubauer* y el *azul de Tripán*. El *azul de Tripán* es un coloide que se introduce en el interior de las células que presentan rotura de membranas, siendo inviables las células de color azul y viables las células blancas. El procedimiento utilizado fue el siguiente:

- Homogenizar la suspensión de células y pasar 10 µL a un tubo eppendorf.
- Mezclar con un volumen igual de una solución de 0,4% de *azul de Tripán* y agitar muy bien la solución con el colorante vital.
- Rellenar los compartimientos de la *cámara de Neubauer* con 10 µL de la suspensión.
- Contar el número de células mediante un microscopio invertido (Leica DMIL).

Las fórmulas utilizadas para determinar el número de células/mL:

**Células/mL** = media del número de células contadas en las cuatro cuadrículas x  $10^4$  x

Factor de dilución (2).

**Total de células** = (Células/mL) x Volumen original de la suspensión celular

Para la conservación de las células, se siguió el siguiente protocolo:

- Recoger 10 mL de una suspensión celular y se centrifuga durante 5 min a 1000 rpm a temperatura ambiente.

- Resuspender el precipitado en 5-10 mL de *medio de congelación* consistente en 10% (p/v) dimetil sulfóxido (DMSO) como crioprotector y 90% de una solución de 10% FBS en RPMI.
- Hacer alícuotas de la suspensión celular en viales de congelación estériles.
- Como el DMSO es tóxico a temperatura ambiente, es conveniente proceder rápidamente al enfriamiento de los viales. La congelación, sin embargo, debe ser llevada a cabo lentamente. A tal efecto, se mantienen los viales a una temperatura de -20 °C durante 2 h y luego se transfieren a un congelador a -80 °C 2-3 días y, finalmente, se guardan en nitrógeno líquido.

La descongelación de los viales para recuperar las células conservadas debe ser lo más rápido posible, siguiendo un protocolo consistente en:

- Colocar los viales en un baño a 37 °C hasta descongelar la suspensión celular.
- Transferir la suspensión celular a tubos de centrifuga con 9 mL de medio de cultivo precalentado a 37 °C.
- Centrifugar las células a baja velocidad durante 5 min a 4 °C, resuspender el precipitado en medio de cultivo precalentado y proceder a la siembra.

### 3. OPERACIONES QUIRÚRGICAS.

Las operaciones intracerebrales se practicaron a las ratas mediante trepanación del cráneo previa anestesia con hidrato de cloral (400 mg/Kg de peso; i.p.), posicionando el animal en un estereotáxico (Kopf Instruments, Tujunga, CA, EEUU). Las coordenadas para inyectar en la SNpc fueron tomadas siguiendo el atlas de cerebro de Paxinos y Watson (1986). Todas las inyecciones se realizaron con una jeringa Hamilton posicionada 5,5 mm posterior,  $\pm 1,8$  mm lateral y 8,3 mm ventral con respecto al punto bregma. El flujo de inyección fue de 0,5  $\mu$ l/min y el volumen total inyectado de

2 µl (vehículo o LPS). Después de cada inyección se esperaron 10 minutos para evitar el reflujo a lo largo del tracto de inyección.

#### **4. TRATAMIENTOS.**

##### **4.1. RATAS.**

Para el modelo de EP por inyección de LPS los animales fueron distribuidos en 4 grupos (**Fig.18**), de acuerdo a dos variables distintas: según la solución ingerida (agua o metformina) y según el producto inyectado en la SN (vehículo o LPS). El grupo I recibió una única inyección en la SN izquierda de 2 µl de vehículo, compuesto por azul de monastral al 1%, utilizado como trazador inerte para localizar el sitio de la inyección, disuelto en solución salina (NaCl al 0,9%). El grupo II siguió exactamente el mismo protocolo que el grupo I, salvo la diferencia de que se administró por vía oral 150 mg/Kg de metformina disuelta en agua, 2 veces al día durante los 7 días del experimento. El grupo III recibió una única inyección en la SN izquierda de 2 µg de LPS disuelto en 2 µl de vehículo. El grupo IV siguió exactamente el mismo protocolo que el grupo III, salvo la diferencia de que se administró por vía oral 150 mg/Kg de metformina disuelta en agua, 2 veces al día durante los 7 días del experimento. Los animales usados para la inmunohistoquímica completaron un tratamiento de 7 días antes de ser sacrificados. Los animales utilizados para RT-PCR se sacrificaron por decapitación 6 horas después de la inyección de LPS o vehículo en la SN, por lo que solo recibieron una dosis de metformina/agua por vía oral.

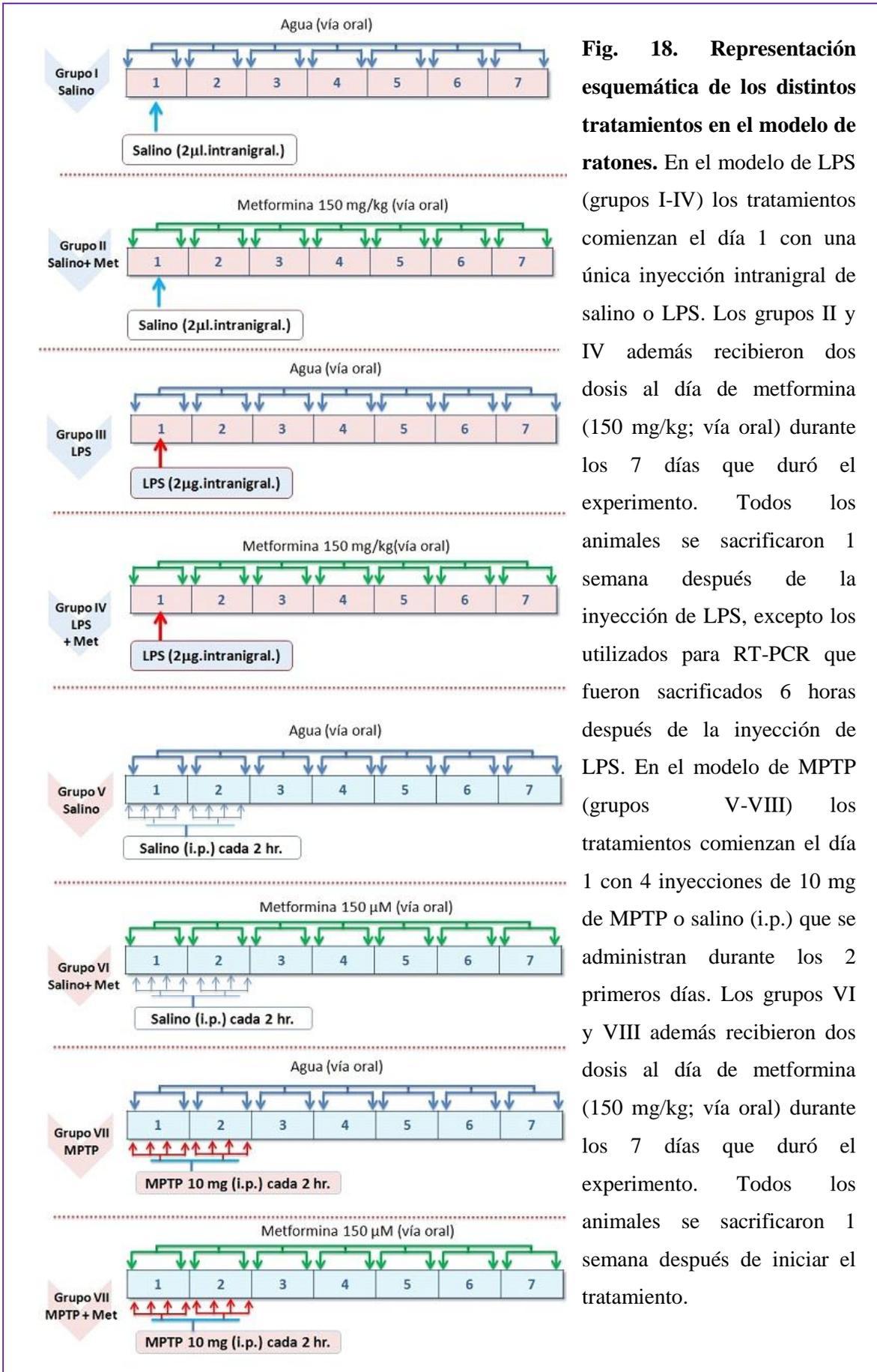
##### **4.2. RATONES.**

Para el modelo de EP por inyección de MPTP los animales fueron distribuidos en 4 grupos (**Fig. 18**), de acuerdo a dos variables distintas: según la solución ingerida

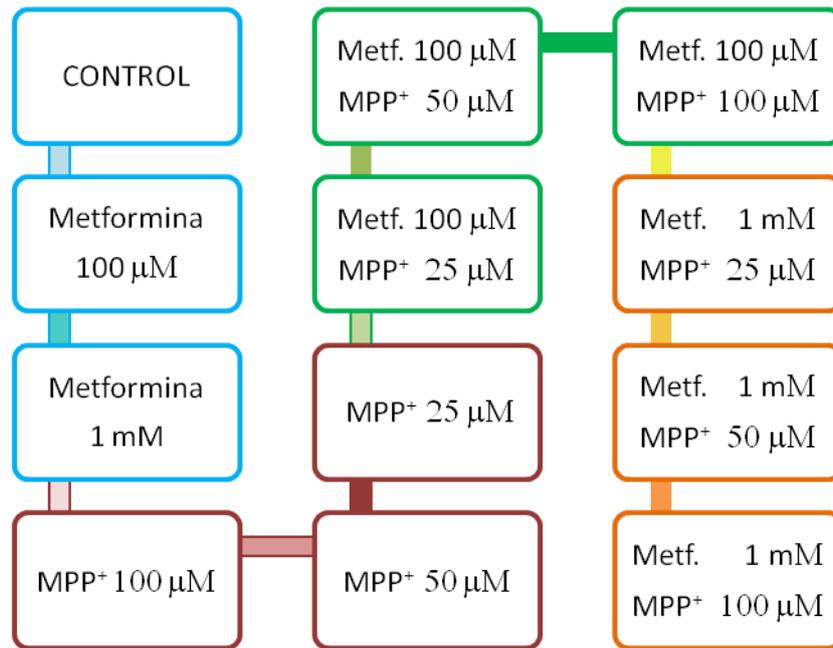
(agua o metformina) y según el producto inyectado i.p. (vehículo o MPTP). El grupo V fue tratado con agua por vía oral y dos inyecciones al día de vehículo (salino) por vía i.p. durante 7 días. El grupo VI siguió exactamente el mismo protocolo que el grupo V, salvo la diferencia de que se administró por vía oral 150 mg/Kg de metformina disuelta en agua, 2 veces al día durante los 7 días del experimento. El grupo VII fue tratado durante dos días con 80 mg de MPTP por vía i.p, 10mg/dosis, 4 dosis al día cada dos horas y agua por vía oral. El grupo VIII siguió exactamente el mismo protocolo que el grupo VII, salvo la diferencia de que se administró por vía oral 150 mg/Kg de metformina disuelta en agua, 2 veces al día durante los 7 días del experimento. Todos los animales se sacrificaron 7 días después del inicio del tratamiento.

#### **4.3. CÉLULAS N27.**

Las células fueron expuestas a metformina (1 mM y 100  $\mu$ M) y MPP<sup>+</sup> (25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M y 100  $\mu$ M), individualmente y combinados, durante 24h (**Fig.19**). Para estudiar los efectos sobre células completamente diferenciadas las células fueron pretratadas con 2mM de dibutilil adenosín monofosfato cíclico (AMPC) durante 3-5 días. Los efectos de los tratamientos se cuantificaron utilizando varios métodos analíticos: el ensayo de viabilidad celular basado en el uso del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), el ensayo de muerte celular mediante la combinación de anexina-V/yoduro de propidio, la medida de los niveles de ATP para evaluar la inhibición del complejo I mitocondrial y el ensayo de producción de EROs mediante el uso de una sonda (CellRox Deep Red Reagent).



**Fig. 18. Representación esquemática de los distintos tratamientos en el modelo de ratones.** En el modelo de LPS (grupos I-IV) los tratamientos comienzan el día 1 con una única inyección intranigral de salino o LPS. Los grupos II y IV además recibieron dos dosis al día de metformina (150 mg/kg; vía oral) durante los 7 días que duró el experimento. Todos los animales se sacrificaron 1 semana después de la inyección de LPS, excepto los utilizados para RT-PCR que fueron sacrificados 6 horas después de la inyección de LPS. En el modelo de MPTP (grupos V-VIII) los tratamientos comienzan el día 1 con 4 inyecciones de 10 mg de MPTP o salino (i.p.) que se administran durante los 2 primeros días. Los grupos VI y VIII además recibieron dos dosis al día de metformina (150 mg/kg; vía oral) durante los 7 días que duró el experimento. Todos los animales se sacrificaron 1 semana después de iniciar el tratamiento.



**Fig. 19. Representación esquemática de los distintos tratamientos aplicados a las células.**

## **5. PERFUSIÓN DE LOS ANIMALES.**

Para la técnica de inmunohistoquímica, los animales fueron perfundidos bajo anestesia profunda con hidrato de cloral (400 mg/Kg; i.p.) con una solución salina (NaCl al 0.9% en agua), seguido de 60 ml (ratones) -200 ml (ratas) de paraformaldehído al 4% en tampón fosfato, pH 7.4. Los cerebros se separaron y se crioprotegieron sumergiéndolos en sacarosa en PBS, pH 7.4, primero al 10% durante 24 horas y más tarde al 30% hasta que se hundieron completamente (2-5 días). A continuación se congelaron en isopentano a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## **6. INMUNOCITOQUÍMICA DE TIROSINA HIDROXILASA, OX-6 E IBA-1.**

Al menos 5 animales se utilizaron en cada grupo. Los cerebros criopreservados se cortaron seriadamente en un criostato a  $-20^{\circ}\text{C}$  y las secciones, de  $20\ \mu\text{m}$  de grosor, se

montaron en portaobjetos gelatinizados. Los anticuerpos primarios usados para el caso de las ratas fueron obtenidos de ratón, y reconocían respectivamente a la tirosina hidroxilasa (anti-TH) y al MHC II (OX-6, Serotec, RU, 1:200). OX-6 reconoce directamente al antígeno MHC II de la rata, siendo esta proteína expresada únicamente por la microglía reactiva y no por el resto de células. En el caso de los ratones, los anticuerpos primarios usados fueron obtenidos de conejo y reconocían respectivamente a la tirosina hidroxilasa (anti-TH) y a Iba-1, anticuerpo que marca específicamente las células microgliales (anti-Iba-1, Wako). Las incubaciones y lavados de todos los anticuerpos se realizaron en tampón salino Tris (TBS, pH 7,4). Salvo que se indique lo contrario, todo el trabajo se realizó a temperatura ambiente. Una vez lavadas, las secciones se trataron con peróxido de hidrógeno al 0,3% en metanol durante 15 minutos; tras otro lavado se incubaron en una cámara húmeda con una disolución que contenía TBS y suero de caballo (Vector, para los anticuerpos contra rata) o suero de cabra (Vector, para los anticuerpos contra ratón) al 1% durante 1 hora. A continuación, se añadió el suero para incubar de nuevo las secciones, esta vez con los respectivos anticuerpos primarios, en una disolución que contenía 1% de suero de caballo/cabra y 0,25% de Triton-X-100 durante 24 h a una temperatura de 4° C en una cámara húmeda. Posteriormente, los cortes se incubaron durante 2 horas con el anticuerpo secundario biotinilado anti IgG correspondiente a cada uno de los anticuerpos primarios, a una concentración 1:200, que se une a los anteriores anticuerpos primarios. Dicho anticuerpo secundario se diluyó en una disolución que contenía TBS y 0,25% de Tritón-X-100, y su adición fue precedida por tres lavados de 10 minutos cada uno en TBS. Las secciones fueron entonces incubadas con una solución de ExtrAvidin<sup>®</sup>-Peroxidasa (Kit ABC) diluida al 1% en TBS. La peroxidasa se visualizó revelando con una solución estándar de diaminobenzidina/peróxido de hidrógeno durante 5 minutos.

## **7. DESHIDRATACIÓN Y MONTAJE DE LAS SECCIONES.**

Para la deshidratación de las secciones se utilizó un procedimiento general mediante el cual se sumergieron en soluciones de concentraciones crecientes de etanol (50, 70, 80, 90 y 100% respectivamente) durante 5 minutos en cada uno de ellos, exceptuando el etanol al 100%, donde estuvieron expuestas 10 minutos; seguidamente se mantuvieron durante 15 minutos en histolemon. El medio de montaje utilizado una vez completado el proceso fue el DPX.

## **8. ANÁLISIS DE LOS DATOS INMUNOHISTOQUÍMICOS.**

Las células que mostraron inmunorreactividad al OX-6 o Iba-1 se contaron usando 5 secciones por animal, sistemáticamente distribuidas a través del eje antero-posterior de la SN. En cada sección se muestreó un área ocupada por las células OX-6/Iba-1 positivas, dividida en 5 campos elegidos aleatoriamente.

El conteo de dichas células se limitaba a una rejilla de dimensiones conocidas ( $40 \times 25 \mu\text{m} = 1000 \mu\text{m}^2$ ) superpuesta sobre la sección de tejido a contar, bajo el objetivo de 100x con aceite de inmersión. Los distintos tipos de células OX-6/Iba-1 positivas (dependiendo de su estado de activación poseen diversas formas) fueron contadas como un único tipo y expresadas en células/ $\text{mm}^2$ .

El número de neuronas en la SN fue estimado de acuerdo a una aproximación estereológica (Gundersen y col., 1988). El conteo de las neuronas TH positivas de cada sección se realizó a intervalos regulares con unas dimensiones predeterminadas ( $x = 150 \mu\text{m}$  e  $y = 200 \mu\text{m}$ ). El muestreo sistemático del área ocupada por la SNpc se inició a partir de un corte aleatorio. En el punto de recuento se superpuso una rejilla de área

conocida ( $40 \times 25 \mu\text{m} = 1000 \mu\text{m}^2$ ) que se usó con el objetivo de 100x con aceite de inmersión. Así pues la fracción del área de muestreo para cada una de las secciones era de  $1000 / (150 \times 200) = 0.033 \mu\text{m}^2$ . El eje Z de cada sección se normalizó, por tanto el grosor de la fracción muestreada fue de 1.

Así pues, en todos los animales, secciones de 20  $\mu\text{m}$  separadas entre sí 100  $\mu\text{m}$ , fueron analizadas; por tanto, el porcentaje de muestras analizadas fue de  $20/100 = 0.20$ . El número de neuronas de la SNpc se calculó multiplicando el número de neuronas contadas dentro de la región de conteo por la inversa de la fracción del área de muestreo y la inversa del total de las secciones contadas.

## **9. RT-PCR A TIEMPO REAL.**

La SN del hemisferio izquierdo de cada rata fue extraída 6 horas después de cada tratamiento y rápidamente congelada en nitrógeno líquido para ser posteriormente crioalmacenada a  $-80^\circ \text{C}$ . En el caso de los ratones, la SN izquierda fue extraída al finalizar el último día de tratamiento (7 días). El ARN total fue extraído de la SN con el kit RNeasy<sup>®</sup>. El ADNc fue sintetizado a partir de  $1 \mu\text{g}$  del ARN total usando el *reverse transcription kit*<sup>®</sup> (Qiagen) en un volumen de reacción de  $20 \mu\text{l}$  como se describía en el protocolo del fabricante. La PCR a tiempo real se llevó a cabo por medio del iQ<sup>™</sup>SYBR<sup>®</sup> Green Supermix (Bio-Rad), usando  $0,4 \mu\text{M}$  de cebadores y  $1 \mu\text{l}$  de ADNc. Los controles se llevaron a cabo sin la presencia del ADNc. La amplificación tuvo lugar en un termociclador Mastercycler<sup>®</sup> ep realplex (Eppendorf) a  $94^\circ\text{C}$  durante 3 minutos, seguidos de 35 ciclos de desnaturalización a  $94^\circ\text{C}$  durante 30 segundos, de alineamiento a  $55^\circ\text{C}$  o  $65^\circ\text{C}$  durante 45 segundos y de extensión a  $72^\circ\text{C}$  durante 45 segundos, seguidos de una elongación final a  $72^\circ\text{C}$  durante 7 minutos. Tras la amplificación, se

realizó el análisis de una curva de desnaturalización calentando las reacciones desde 65°C a 95°C a intervalos de 1°C mientras se monitoriza la fluorescencia. El análisis confirmó un producto de PCR simple en la temperatura de desnaturalización pronosticada. La  $\beta$ -actina sirvió como control interno (gen de referencia) y fue usada para normalizar las muestras.

Las secuencias de los cebadores para IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , iNOS y  $\beta$ -actina en cada caso (rata y ratón) se muestran en la tabla 1. Se determinó el ciclo al que cada muestra alcanza un umbral de fluorescencia (Ct) y se calculó el promedio de los valores triplicados para cada ADNc. Los análisis de PCR a tiempo real se hicieron usando un método comparativo de Ct.

ARNm diana	Sentido (S) y Antisentido (A) de los Cebadores	Temp
IL-1 $\beta$ de rata	S: 5'-CAGGATGAGGACATGAGCACC-3' A: 5'-CTCTGCAGACTCAAACCTCCAC-3'	55 °C
TNF- $\alpha$ de rata	S: 5'-TACTGAACTTCGGGGTGATTGGTCC-3' A: 5'-CAGCCTTGTCCCTTGAAGAGAACC-3'	55 °C
iNOS de rata	S: 5'-CCTCCTCCACCCTACCAAGT-3' A: 5'-CACCCAAAGTGCTTCAGTCA-3'	55 °C
$\beta$ -actina de rata	S: 5'-TGTGATGGTGGGAATGGGTCAG-3' A: 5'-TTTGATGTCACGCACGATTTC-3'	55 °C
IL-1 $\beta$ de ratón	S: 5'-TTGACGGACCCAAAAGATG-3' A: 5'-AGAAGGTGCTCATGTCCTCA-3'	60 °C
TNF- $\alpha$ de ratón	S: 5'-AGCCCACGTCGTAGCAAACCACCAA-3' A: 5'-AACACCCATTCCCTCACAGAGCAAT-3'	60 °C
iNOS de ratón	S: 5'-CTTTGCCACGGACGAGAC-3' A: 5'-TCATTGTA CTGAGGGCTGAC-3'	60 °C
$\beta$ -actina de ratón	S: 5'-TGTGATGGTGGGAATGGGTCAG-3' A: 5'-TTTGATGTCACGCACGATTTC-3'	60 °C

**Tabla 1. Secuencia de los cebadores para las distintas PCRs**

## **10. MEDIDA DE LA DA Y DOPAC.**

Los animales destinados a este estudio fueron decapitados entre las 12:00-13:00 h y los cerebros se sacaron rápidamente. A continuación el estriado fue diseccionado, congelado en nitrógeno líquido y almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis (el tiempo total para el aislamiento del área fue menor de 3 minutos). Se usaron 16 animales para estos experimentos.

El tejido cerebral fue pesado y homogenizado en 0,1 M de ácido perclórico (30  $\mu\text{l}$  de ácido perclórico por mg de tejido fresco) por desintegración en hielo usando un procesador ultrasónico Hielscher UP100H (Teltow, Alemania). Las muestras fueron centrifugadas a 15.000 g, a  $4^{\circ}\text{C}$ , durante 15 minutos y el sobrenadante se filtró a través de un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  (tubos de centrifuga con filtro Spin-X, Corning Incorporated, NY, USA). El material se inyectó mediante una válvula de inyección de alta presión (Rheodyne, CA, USA), con un 'loop' de muestra de 10  $\mu\text{l}$ .

El análisis de la DA del estriado y de su metabolito, DOPAC, fue realizado en isocrático por medio de HPLC equipado con una bomba vwr-Hitachi Elite Lachrom L-2130 (Tokyo, Japón), unida a un detector electroquímico con un electrodo de carbón vítreo fijado a un potencial de oxidación de 650 mV (DECADE II, ANTEC LEYDEN, Holanda). Se usó una columna Lichrocart (125 mm x 4 mm) de Merck con un relleno Lichrospher  $\text{C}_{18}$  5  $\mu\text{M}$ , de fase reversa.

La fase móvil consistió en una mezcla de 0,05 M de acetato de sodio, 0,4 mM de ácido 1-octanosulfónico, 0,3 mM de  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  y 70 ml de metanol, ajustado a pH 4,1 con ácido acético glacial. La mezcla de disolventes se filtró por centrifugación a 3.000 g, con un filtro de 0,45  $\mu\text{m}$ , y se desgasificó por vacío en un baño de ultrasonido, con el fin de eliminar las burbujas de aire que interfieren con la detección

electroquímica. Todos los reactivos fueron de grado HPLC. El flujo de la bomba de HPLC fue de 1,0 ml/min.

La concentración de DA del estriado fue calculada con la ayuda del software eDAQ PowerChrom 280.

## **11. ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR.**

### **11.1. ENSAYO DEL MTT.**

Para determinar el posible efecto citotóxico de las diferentes drogas aplicadas sobre las células N27, se utilizó la técnica del MTT. Este ensayo se basa en la reducción metabólica del MTT (amarillo) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazano), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. Este método ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular.  $10^4$  células/pocillo fueron cultivadas en una placa estéril de 96 pocillos.

Tras aplicarles los diferentes tratamientos y después de 24h de incubación, a cada pocillo se añadió 10ul de MTT (5mg/ml) y se incubó la placa 2-3h a 37°C. A continuación, el medio de cultivo fue reemplazado por 100 µl de DMSO para disolver el formazano insoluble en una solución de color púrpura. Tras 30 minutos de incubación a temperatura ambiente la absorbancia de esta solución coloreada se cuantificó a 550-600 nm en un lector de placas (Synergy HT, marca BioTek). La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazano producido.

La viabilidad celular se expresa como porcentaje mediante la siguiente ecuación:

% células viables =  $(A_{(550-600)\text{nm}} \text{ muestras tratadas} / A_{(550-600)\text{nm}} \text{ muestras no tratadas}) \times 100$ ; donde  $A_{(550-600)\text{nm}}$  es la absorbancia a 550-600 nm.

## **11.2. ENSAYO DE MUERTE CELULAR.**

Para el análisis del grado de apoptosis y necrosis empleamos el método de Anexina V y yoduro de propidio. La anexina V es un marcador de apoptosis, mientras que el yoduro de propidio se une al ADN señalando así el fraccionamiento y muerte celular. Para este estudio,  $4 \times 10^5$  células fueron tratadas con MPP<sup>+</sup> y/o metformina durante 24 horas. A las 24 horas de tratamiento, los sobrenadantes y las células tripsinizadas se recogieron en tubos de citometría con PBS frío. Las células se centrifugaron y resuspendieron en 100µL de binding buffer (Miltenyi Biotec). En este momento se añadieron 10µL de anexina-V-FITC. Trascorridos 15 minutos de incubación las células se lavaron con binding buffer y se añadieron 5µL de yoduro de propidio (Miltenyi Biotec) a cada tubo. A los 5 minutos, las suspensiones celulares se adquirieron en el citómetro de flujo Fortessa (Becton Dickinson), empleando el programa FACSDiva y el análisis de muerte celular se llevó a cabo con el programa Infinicyt 1.1 (Cytognos).

## **12. MEDIDA DE LOS NIVELES DE ATP PARA EVALUAR EL GRADO DE INHIBICIÓN DEL COMPLEJO I MITOCONDRIAL.**

La línea neuronal de rata N27 fue cultivada en medio DMEM F-12 (Sigma-Aldrich Co., USA) suplementado con FBS (Sigma-Aldrich Co., USA) al 10% (vol/vol) y diferenciada en dopaminérgica con 2mM final de dibutilil AMPc durante 3-5 días. Posteriormente, las células fueron lavadas con PBS y transferidas a placas opacas de 96 pocillos, con una densidad inicial de 50.000 células por pocillo, en medio DMEM F-12 sin suero y sin glucosa, suplementado con galactosa 10mM (Sigma) y tratadas durante

24 horas con concentraciones finales de MPP<sup>+</sup> 100  $\mu$ M y/o metformina 100  $\mu$ M o 1 mM.

Las líneas celulares propagadas en medios de cultivo con glucosa utilizan la vía glucolítica para generar ATP. Sin embargo, cuando usan galactosa como sustrato, la vía glucolítica no produce ningún ATP neto y las células tienen que realizar fosforilación oxidativa mitocondrial para obtener energía. La concentración de ATP se midió con el kit CellTiter-Glo siguiendo las instrucciones del fabricante. En estas condiciones concretas, el ATP generado refleja el grado de inhibición del complejo I mitocondrial por los diferentes compuestos.

### **13. MEDIDA DE LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO.**

La medida del estrés oxidativo celular se llevó a cabo mediante el uso de un reactivo permeable a las membranas (CellROX® Deep Red Reagent) en células vivas. Este reactivo es una sonda fluorogénica que exhibe señal fluorescente en presencia de EROs en el citoplasma celular. El ensayo se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, tras 24 h de incubación de las células con los diferentes tratamientos, se añadió al medio el reactivo a una concentración final de 5  $\mu$ M y las células se incubaron 30 minutos a 37°C. Posteriormente, retiramos el medio, lavamos las células tres veces con PBS y se toman imágenes utilizando un microscopio confocal (Zeiss LSM 7 DUO). Estas imágenes fueron procesadas utilizando el programa ImageJ.

#### **14. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

Los resultados se expresaron como media  $\pm$  desviación estándar (DE). Las medias se compararon mediante ANOVA de una vía y se usó el test LSD para comparaciones múltiples.

#### **15. REACTIVOS.**

Lipopolisacárido obtenido de *Escherichia coli* serotipo 026: BC, de Sigma Chemical Co, (USA). Monastral<sup>®</sup>Blue, de Sigma Chemical Co, (USA). MPTP, obtenido de Sigma-Aldrich Co., (USA). Metformina (Kern pharma). MPP<sup>+</sup> de Sigma-aldrich Co., (USA).

En las determinaciones inmunohistoquímicas de la población neuronal y microglial se utilizaron los siguientes productos: como anticuerpos primarios se usaron anti-TH (1:300) hecho en conejo (Sigma); OX-6 (1:200) hecho en ratón (Serotec, RU), y anti-Iba-1 (1:500) hecho en conejo (Wako).

El anticuerpo secundario utilizado fue, en todos los casos, un anti-IgG biotinilado (1:200) de Vector (RU). En los estudios con rata este anticuerpo secundario fue contra ratón obtenido en caballo, y en el caso de los ratones, fue contra conejo obtenido en cabra. Como sistema de revelado se utilizó el kit ABC (ExtraAvidin<sup>®</sup>-Peroxidase) de Vector (RU). El suero empleado (caballo/cabra) fue suministrado por Vector (RU). El agua oxigenada para la destrucción de la peroxidasa endógena y la utilizada para el revelado con diaminobenzidina se obtuvieron de Sigma Chemical Co., USA. Para el revelado de las técnicas inmunohistoquímicas se utilizó tetracloruro de 3,3'-diaminobencidina (DAB), de Sigma Chemical Co. El Tritón X-100 fue suministrado

también por Sigma Chemical Co, USA. Para la deshidratación y montaje de las secciones se utilizó Histolemon de Carlo Erba® y DPX de BDH.

La perfusión de los animales para las técnicas de inmunohistoquímica se realizó con paraformaldehído de Carlo Erba®.

En la técnica de la PCR a tiempo real, para la extracción del ARN total se utilizó el kit RNeasy® de Quiagen y para la síntesis del ADNc se utilizó el kit de transcripción inversa QuantiTest® de Quiagen. La PCR a tiempo real fue realizada con iQ™SYBR® Green Supermix de Biorad. La amplificación tuvo lugar en un termociclador LightCycler 480 de Roche.

Para el análisis de DA y DOPAC por HPLC se utilizaron patrones suministrados por Sigma Chemical Co, USA. También se utilizaron acetato sódico (Merck, Alemania), ácido etilendiaminotetracético (EDTA) de Sigma Chemical Co. (USA), ácido octanosulfónico (Acros organic, Bélgica) y metanol (Merck, Alemania). El agua utilizada fue desionizada (Milli-Q, Millipore).

Medio RPMI 1640 utilizado para el cultivo de las células N27 obtenido de Sigma-Aldrich Co. (USA). Mezcla de penicilina/estreptomicina y suero fetal bovino de Sigma-Aldrich Co. (USA) se utilizaron para complementar el medio de cultivo.

Las células N27 fueron diferenciadas con AMPc de Sigma-Aldrich Co. (USA).

El PBS utilizado en los cultivos celulares fue proporcionado por Sigma-Aldrich Co., (USA).

Tripsina-EDTA, de Sigma Aldrich Co., (USA). Azul de tripán obtenido de Sigma-Aldrich Co., (USA). MTT utilizado de Sigma-Aldrich Co., (USA). DMSO, de Sigma-Aldrich Co., (USA).

Anexina-V-FITC, el yoduro de propidio y el binding buffer se obtuvieron de Miltenyi Biotec.

La concentración de ATP se midió con el kit CellTiter-Glo (Promega).

La sonda para la medida de la producción de especies reactivas de oxígeno fue proporcionada por Invitrogen (CellROX® Deep Red Reagent, Invitrogen).



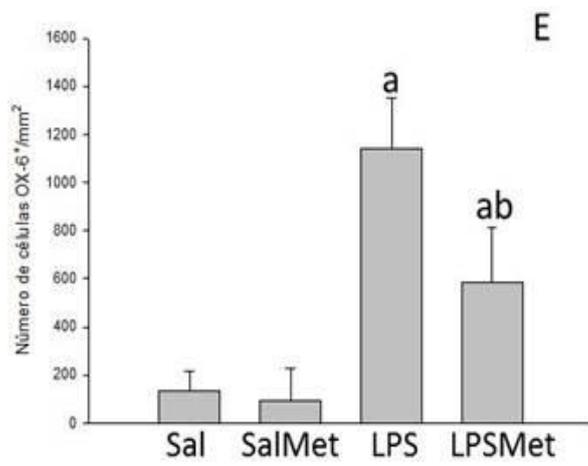
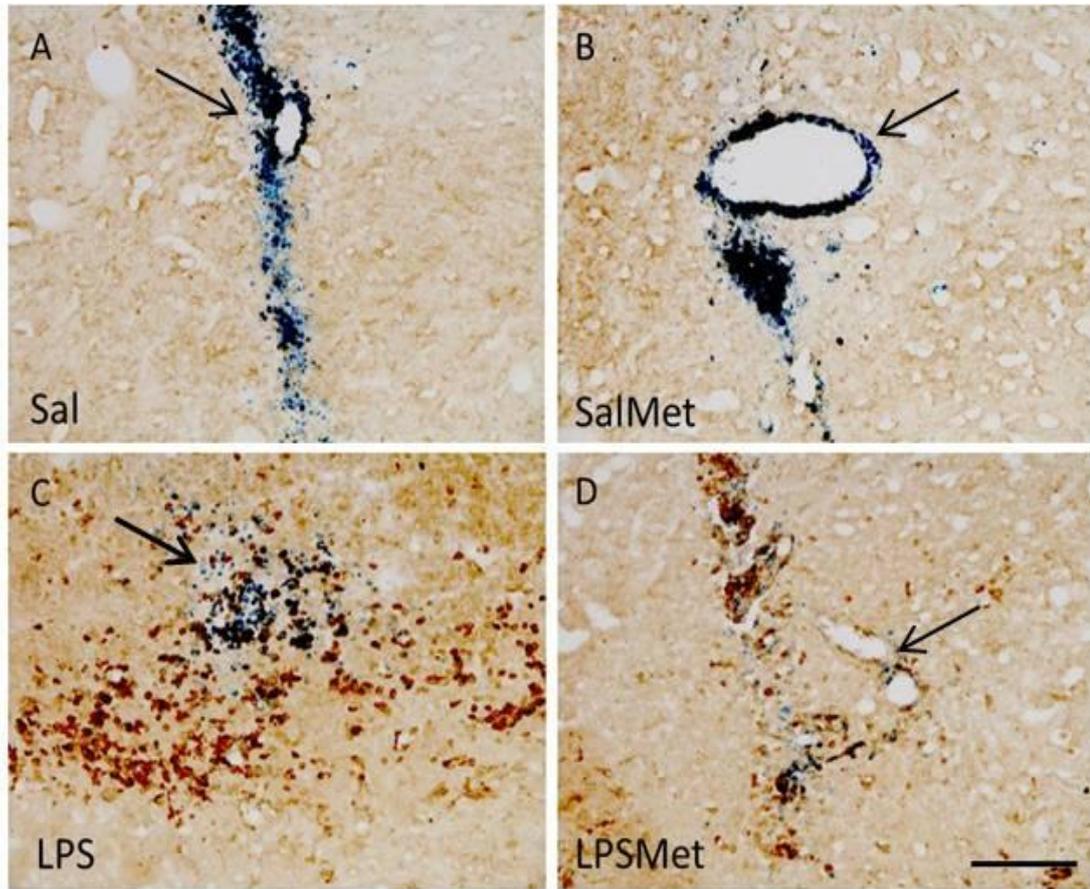
# RESULTADOS



## **1. EFECTO DE LA METFORMINA EN LA ACTIVACIÓN MICROGLIAL Y EN LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ E INOS.**

Hemos estudiado la microglía en los niveles morfológico y molecular para evaluar su activación en la SN inducida tras la inyección intranigral de LPS y tras la administración intraperitoneal de MPTP. Se realizaron técnicas de inmunohistoquímica contra marcadores morfológicos de microglía reactiva (OX-6 en ratas e Iba-1 en ratón), y medida de los niveles de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), para evaluar el efecto de la metformina sobre la neuroinflamación inducida en los dos modelos animales utilizados.

En el modelo de LPS realizado en ratas (**Fig. 20**) se puede observar como el grupo control y el tratado con metformina mostraron solamente una leve inmunoreactividad de OX-6 alrededor del tracto de inyección ( $132,6 \pm 84,3$  y  $94,4 \pm 131,1$  células/mm<sup>2</sup>; **Fig. 20A, B y E**), por lo que la metformina no produjo ningún efecto añadido a la propia inyección de salino. Por el contrario, el grupo tratado con LPS mostró una clara activación microglial casi 10 veces superior comparado con el grupo control ( $1141,9 \pm 207,8$  células/mm<sup>2</sup>,  $p < 0.01$ ; **Fig. 20C y E**). Como era de esperar por sus propiedades anti-inflamatorias, el tratamiento con metformina redujo la activación microglial inducida por el LPS hasta prácticamente la mitad ( $584,2 \pm 230,1$  células/mm<sup>2</sup>,  $p < 0.01$ ; **Fig. 20D y E**). Por lo tanto, la metformina disminuye significativamente el efecto inflamatorio causado por el LPS.

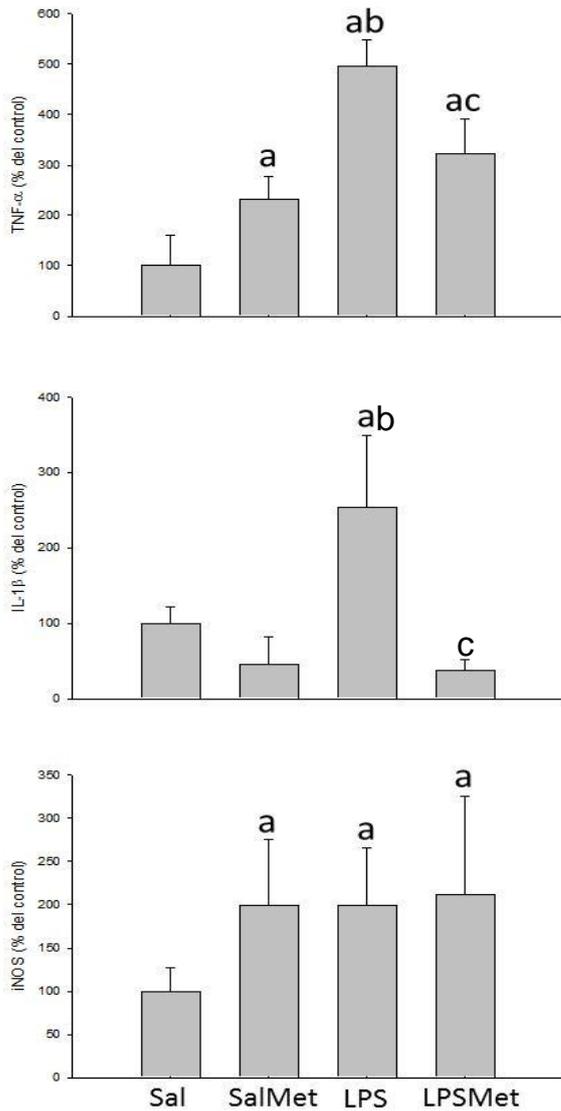


**Fig. 20. Cambios en la inmunorreactividad frente a OX-6 en la SN de las ratas tras los distintos tratamientos en el modelo de LPS.** **A)** Sección coronal que muestra las células OX-6 positivas en un animal inyectado con vehículo en la SN. **B)** Sección coronal que muestra la inmunorreactividad frente a OX-6 de un animal inyectado con vehículo en la SN y que ha recibido dos dosis diarias de metformina. La expresión de células OX-6 positivas se restringe al sitio de inyección. **C)** Sección coronal que muestra las células microgliales OX-6 positivas en un animal inyectado con 2µg de LPS en la SN. La flecha indica el sitio de inyección alrededor del cual se puede observar una fuerte reacción microglial. **D)** Sección coronal que muestra las células microgliales OX-6 positivas en un animal inyectado con 2µg de LPS en la SN y tratado con dos dosis diarias de metformina. Barra de escala: 250 µm. **E)** Cuantificación del número de células OX-6 positivas tras el tratamiento por LPS y/o metformina descrito antes. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  DE de al menos 4 experimentos independientes en número de células por mm<sup>2</sup>. La significación estadística se calculó a través de un ANOVA de una vía seguido del test LSD de comparaciones múltiples.  $P < 0.01$ . a  $\neq$  control; b  $\neq$  LPS. Abreviaturas: Sal: animales inyectados con vehículo en la SN; SalMet: animales inyectados con vehículo en la SN y tratados con metformina; LPS: animales inyectados con LPS en la SN; LPSMet: animales inyectados con LPS y tratados con metformina.

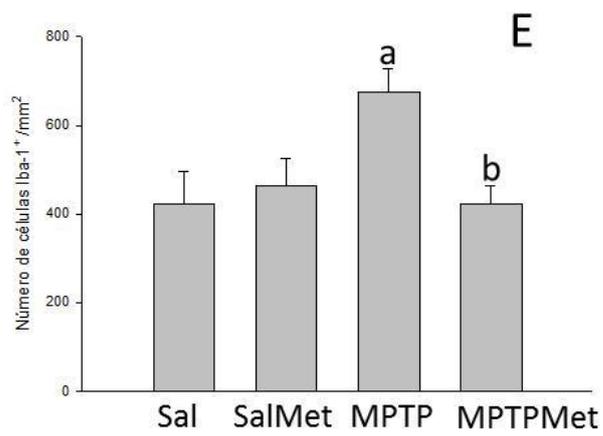
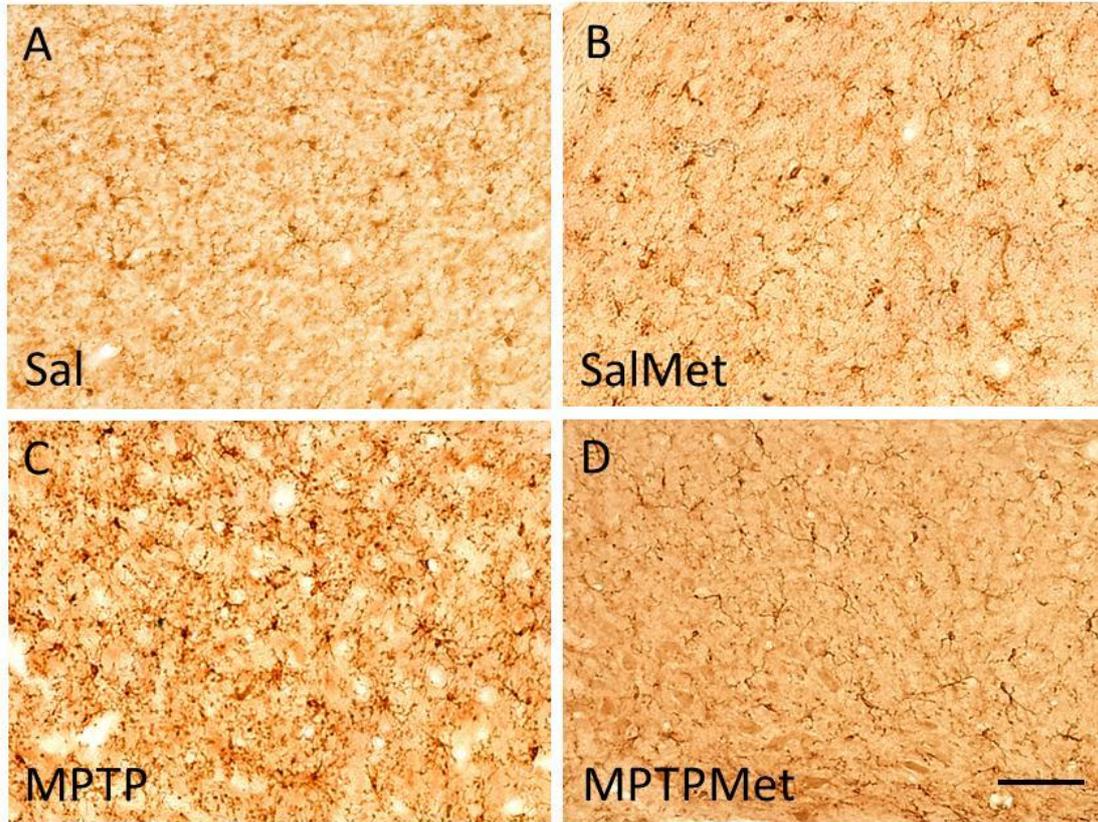
La microglía activada produce varias citoquinas y sustancias proinflamatorias con diferentes acciones dependiendo del inductor de su activación. El análisis por PCR a tiempo real mostró que los ARNm para las citoquinas proinflamatorias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  y la enzima iNOS fueron inducidos en la SN a 6 horas después de la inyección de LPS ( $496,3 \pm 53\%$ ;  $243,3 \pm 96\%$ ;  $199,5 \pm 66,5\%$  con respecto al grupo control, respectivamente;  $p < 0.01$  para TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  y  $p < 0.05$  para iNOS).

Como se observa en la (**Fig. 21**), el tratamiento con metformina redujo significativamente el aumento inducido por LPS en los niveles de los ARNm de los marcadores inflamatorios TNF- $\alpha$  y IL-1 $\beta$  pero no produjo ningún cambio en iNOS ( $322,9,4 \pm 67,6\%$ ;  $38,1 \pm 13,5\%$ ;  $211,6 \pm 115,2\%$  con respecto al grupo control, respectivamente;  $p < 0.01$ ).

En el modelo de MPTP realizado en ratones (**Fig. 22**) se puede observar como el tratamiento con metformina tampoco produjo cambios en el número de células marcadas con Iba-1 ( $464,8 \pm 60,5$  cél/mm<sup>2</sup>; **Fig. 22B y E**) con respecto al grupo control ( $421,2 \pm 73,5$  cél/mm<sup>2</sup>; **Fig. 22A y E**). Por el contrario, el tratamiento con MPTP aumentó el número de células microgliales hasta  $673,9 \pm 53,2$  cél/mm<sup>2</sup> (**Fig. 22C y E**;  $p < 0.01$ ). Al igual que ocurrió en el caso anterior, el tratamiento con metformina redujo el número de células microgliales hasta valores controles ( $421,2 \pm 41$  cél/mm<sup>2</sup>; **Fig. 22D y E**;  $p < 0.01$ ). Por lo tanto, se confirma de nuevo el efecto anti-inflamatorio de la metformina, en este caso producida la inflamación por MPTP.

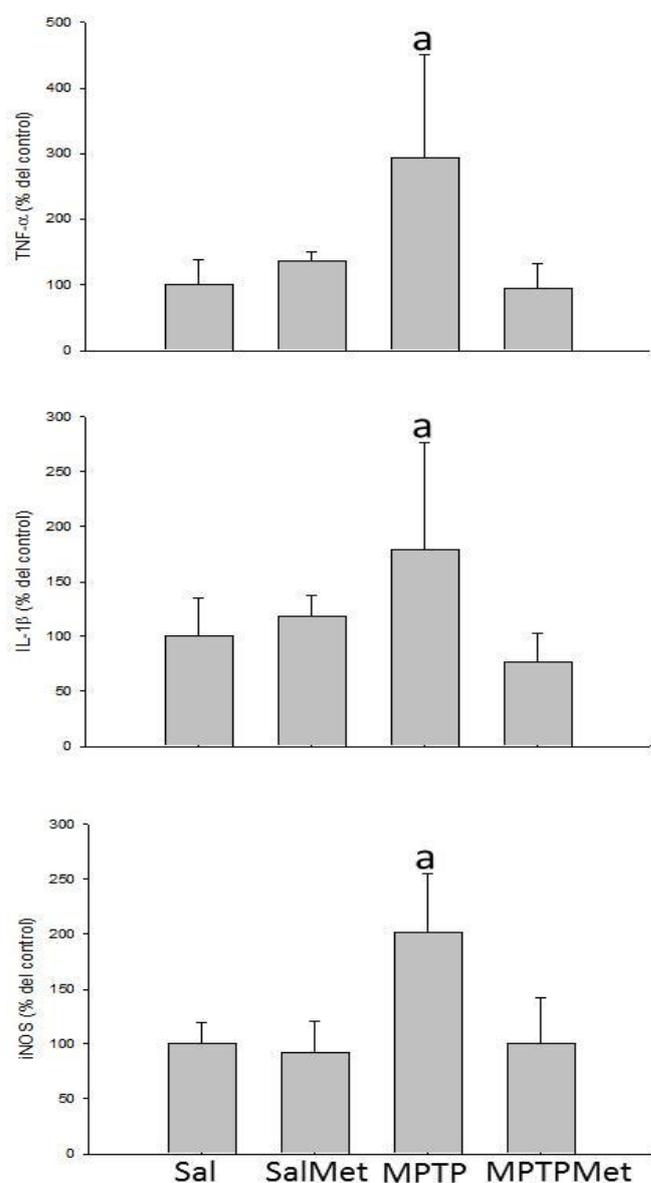


**Fig. 21. Efecto de los distintos tratamientos sobre los niveles de expresión de los ARNm de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , e iNOS en el modelo de LPS.** El ARN total se extrajo de las SN de los animales tratados con los distintos tratamientos 6 horas después de la inyección de LPS/vehículo en la SN. Los resultados se expresan como media  $\pm$  DE de al menos 4 experimentos independientes como porcentaje respecto a la  $\beta$ -actina. La significación estadística fue calculada a través de un ANOVA de una vía seguido del test LDS para comparaciones múltiples. Abreviaturas: Sal: animales inyectados con vehículo en la SN; SalMet: animales inyectados con vehículo en la SN y tratados con metformina; LPS: animales inyectados con LPS en la SN; LPSMet: animales inyectados con LPS y tratados con metformina.  $P < 0.01$  para TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ;  $P < 0.05$  para iNOS. a  $\neq$  Sal; b  $\neq$  SalMet c  $\neq$  LPS.



**Fig. 22. Cambios en la inmunorreactividad frente a Iba-1 en la SN de los ratones tras los distintos tratamientos en el modelo de MPTP.** **A)** Sección coronal que muestra las células Iba-1 positivas en una animal inyectado con vehículo i.p. **B)** Sección coronal que muestra la inmunorreactividad frente a Iba-1 de un animal inyectado con vehículo i.p. y que ha recibido dos dosis diarias de metformina. Las células microgliales presentan, al igual que en el control, una morfología ramificada propia de células microgliales no activadas. **C)** Sección coronal que muestra las células microgliales Iba-1 positivas en un animal inyectado con 10 mg i.p. de MPTP 4 veces al día durante dos días. Se puede observar una fuerte reacción microglial con células activadas de aspecto fagocítico. **D)** Sección coronal que muestra las células microgliales Iba-1 positivas en un animal inyectado con MPTP i.p. y tratado con dos dosis diarias de metformina. La reacción microglial es claramente inferior a la del animal inyectado sólo con MPTP. Barra de escala: 100  $\mu\text{m}$ . **E)** Cuantificación del número de células Iba-1 positivas tras el tratamiento por MPTP y/o metformina descrito antes. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  DE de al menos 4 experimentos independientes en número de células por  $\text{mm}^2$ . La significación estadística se calculó a través de un ANOVA de una vía seguido del test LSD de comparaciones múltiples.  $P < 0.01$ . a  $\neq$  control; b  $\neq$  MPTP. Abreviaturas: Sal: animales inyectados con vehículo i.p.; SalMet: animales inyectados con vehículo i.p. y tratados con metformina; MPTP: animales inyectados con MPTP i.p.; MPTPMet: animales inyectados con MPTP i.p. y tratados con metformina.

Del mismo modo, el análisis por PCR a tiempo real en este modelo (**Fig. 23**) mostró que los ARNm para las citoquinas pro-inflamatorias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  y la enzima iNOS fueron inducidos por el tratamiento con MPTP ( $293,2 \pm 158\%$ ,  $178 \pm 97,7\%$ , y  $202 \pm 52,9\%$  con respecto al grupo control, respectivamente;  $p < 0.05$ ). Nuevamente, el tratamiento con metformina redujo el aumento inducido por MPTP en los niveles de los ARNm de todos estos marcadores de inflamación hasta valores control ( $93,9 \pm 39,1\%$ ,  $76,7 \pm 26,8\%$  y  $101,1 \pm 41,5\%$ , respectivamente;  $p < 0.05$ ).



**Fig. 23. Efecto de los distintos tratamientos sobre los niveles de expresión de los ARNm de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , e iNOS en el modelo de MPTP.** El ARN total se extrajo de las SN de los animales tratados con los distintos tratamientos 7 días después de la primera inyección de MPTP. Los resultados se expresan como media  $\pm$  DE de al menos 4 experimentos independientes como porcentaje respecto a la  $\beta$ -actina. La significación estadística fue calculada a través de un ANOVA de una vía seguido del test LDS para comparaciones múltiples. Significación estadística: a $\neq$  del control (Sal).  $P < 0.05$ . Abreviaturas: Sal: animales inyectados con vehículo i.p; SalMet: animales inyectados con vehículo i.p. y tratados con metformina; MPTP: animales inyectados con MPTP i.p.; MPTPMet: animales inyectados con MPTP i.p. y tratados con metformina.

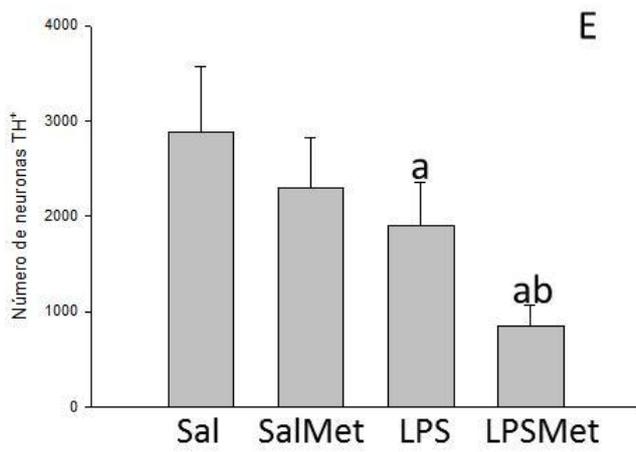
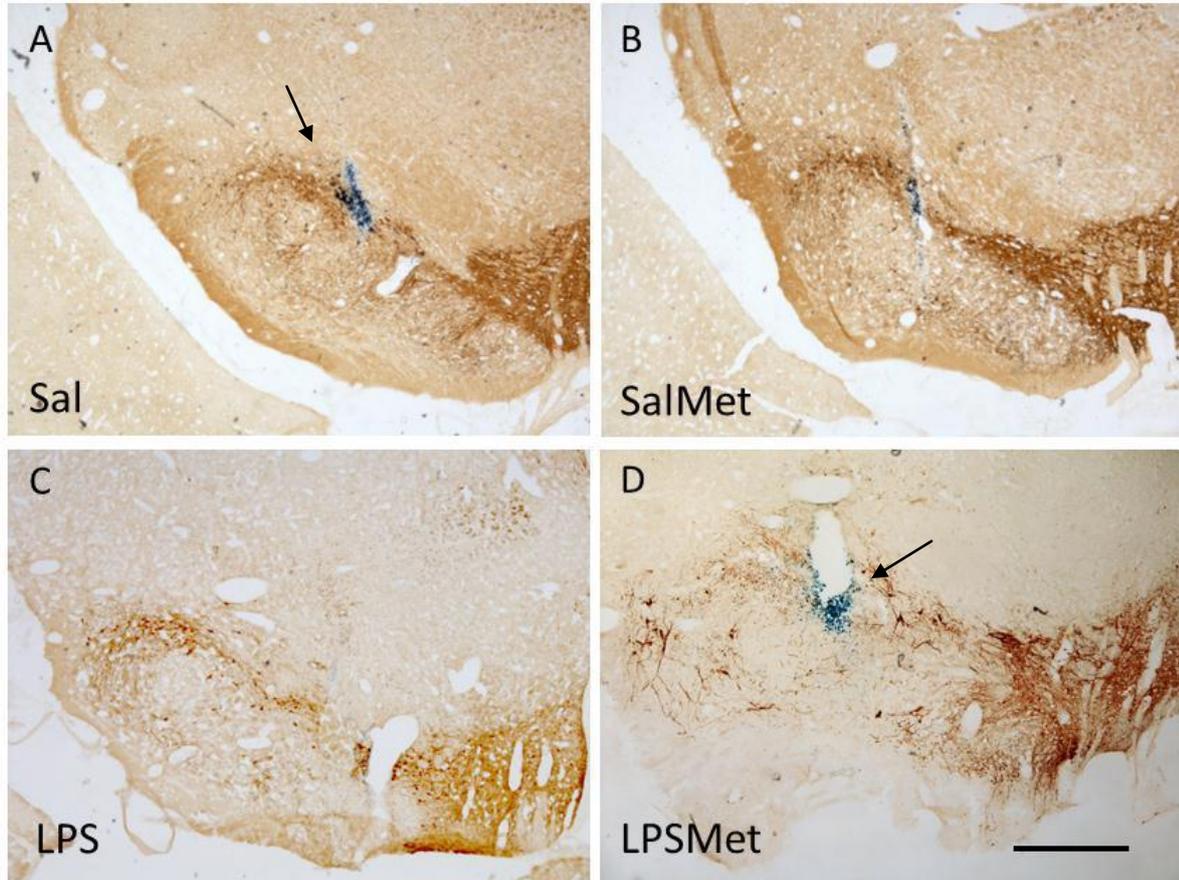
## **2. EFECTO DE LA METFORMINA EN EL SISTEMA DOPAMINÉRGICO.**

Una vez comprobada la protección anti-inflamatoria ejercida por la metformina en ambos modelos de EP, quisimos comprobar si esa reducción en la activación microglial tenía como consecuencia una reducción en la muerte de neuronas DAérgicas producida tanto por LPS como por MPTP (**Fig. 24**).

### **2.1. INMUNOREACTIVIDAD DE LAS CÉLULAS DOPAMINÉRGICAS EN SN. RECUENTO DE LAS CELULAS TH.**

Para la evaluación a nivel celular del efecto de los distintos tratamientos sobre las neuronas DAérgicas del sistema nigro-estriado se utilizaron técnicas de inmunohistoquímica frente a la enzima TH, enzima limitante en la síntesis de DA y, por tanto, un excelente marcador de neuronas DAérgicas.

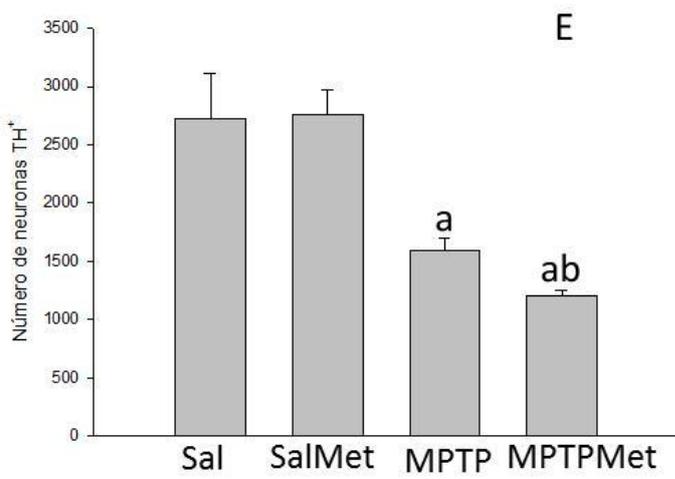
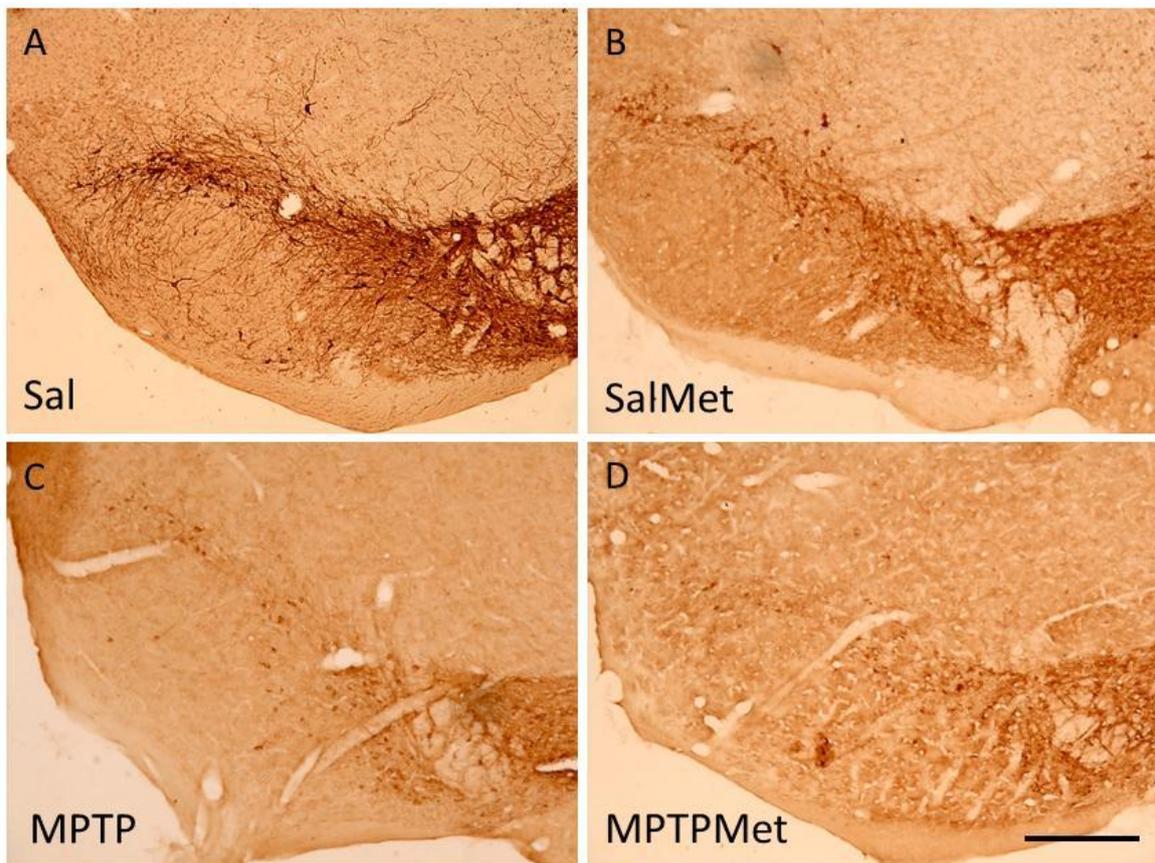
Para el modelo de ratas tratadas con LPS, las neuronas TH positivas en un SN intacta (no mostrada) muestran un patrón característico que no se diferencia mucho del observado en el grupo control (animales inyectados con salino, **Fig. 24A y E**). La administración oral de metformina a los animales inyectados con salino (**Fig. 24B y E**) no supuso pérdida de neuronas, de manera similar al grupo control. Sin embargo, la inyección intranigral de LPS produjo una disminución en el número de neuronas DAérgicas (66% del grupo control; **Fig. 24C y E**;  $p < 0.01$ ). Sorprendentemente, y al contrario a lo que esperábamos, encontramos una disminución en el número de neuronas DAérgicas aún mayor que en el caso anterior cuando los animales se trataron conjuntamente con LPS y metformina (29,6% con respecto al grupo control; **Fig. 24D y E**;  $p < 0.01$ ). Por lo tanto, la metformina empeora el daño producido por el LPS sobre la SN.



**Fig. 24. Cambios en la inmunorreactividad TH en la SN de las ratas tras los distintos tratamientos en el modelo de LPS.** **A)** Sección coronal que muestra la inmunorreactividad de TH en un animal inyectado con vehículo. La flecha señala el sitio de inyección de 2 µl de salino al 1% en monastral blue. **B)** Sección coronal que muestra las neuronas TH positivas en la SN de un animal inyectado con vehículo y tratado durante 7 días con 2 dosis diarias de metformina.. **C)** Sección coronal que muestra la inmunorreactividad TH en un animal inyectado con 2 µg de LPS en la SN. El trazador inerte es visible alrededor del área lesionada, donde la inmunorreactividad de TH se ve reducida en comparación con el animal inyectado con vehículo. **D)** Sección coronal que muestra neuronas TH positivas en un animal inyectado con LPS en la SN y tratado con dos dosis diarias de metformina. La flecha indica el sitio de inyección de 2 µg de LPS. Alrededor del tracto de inyección la pérdida de neuronas es sensiblemente superior a la del animal tratado sólo con LPS. Barra de escala: 1 mm. **E)** Cuantificación del número del número de neuronas TH positivas en la SN de las ratas después de los tratamientos indicados en la Fig.20. Los resultados se expresan como medias ± DE de al menos 4 experimentos individuales. La significación estadística se calculó a través de un ANOVA de una vía seguido del test LSD de comparaciones múltiples.  $P < 0.001$ .  $a \neq \text{Sal}$ ;  $b \neq \text{LPS}$ . Abreviaturas: Sal: animales inyectados con vehículo en la SN; SalMet: animales inyectados con vehículo en la SN y tratados con metformina; LPS: animales inyectados con LPS en la SN; LPSMet: animales inyectados con LPS y tratados con metformina.

En el caso del modelo con MPTP (**Fig. 25**), los resultados obtenidos fueron similares a los del modelo de LPS, de manera que la administración oral de metformina (**Fig. 25B y E**) no tuvo ningún efecto en la reducción del número de neuronas DAérgicas con respecto al grupo control (**Fig. 25A y E**), siendo el número de células TH positivas de  $2722 \pm 385$  y  $2761 \pm 210$ , respectivamente. Sin embargo la administración intraperitoneal de MPTP redujo el número de neuronas hasta prácticamente la mitad con respecto al grupo control ( $1588 \pm 111$  células TH positivas; **Fig. 25C y E**;  $p < 0.01$ ). Contrario a lo que se esperaba, el tratamiento combinado con MPTP y metformina siguió teniendo un efecto negativo sobre la integridad de las neuronas DAérgicas ( $1208 \pm 43$  células TH positivas; **Fig. 25D y E**;  $p < 0.01$ ). Por lo tanto, la metformina no protege del daño producido por el MPTP sobre las neuronas DAérgicas de la SN.

**Fig. 25. Cambios en la inmunorreactividad TH en la SN de los ratones tras los distintos tratamientos en el modelo de MPTP.** **A)** Sección coronal que muestra la inmunorreactividad de TH en un animal inyectado i.p. con vehículo. **B)** Sección coronal que muestra las neuronas TH positivas en la SN de un animal inyectado con vehículo i.p. y tratado durante 7 días con 2 dosis diarias de metformina. **C)** Sección coronal que muestra la inmunorreactividad TH en un animal inyectado con 10 mg de MPTP i.p. en dos dosis al día durante 4 días. **D)** Sección coronal que muestra neuronas TH positivas en una animal inyectado con MPTP i.p. durante 4 días y tratado con dos dosis diarias de metformina. Barra de escala:  $250 \mu\text{m}$  **E)** Cuantificación del número del número de neuronas TH positivas en la SN de las ratas después de los tratamientos indicados en la Fig.18. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  DE de al menos 4 experimentos individuales. La significación estadística se calculó a través de un ANOVA de una vía seguido del test LSD de comparaciones múltiples.  $P < 0.001$ .  $a \neq \text{Sal}$ ;  $b \neq \text{MPTP}$ . Abreviaturas: Sal: animales inyectados con vehículo i.p; SalMet: animales inyectados con vehículo i.p. y tratados con metformina; MPTP: animales inyectados con MPTP i.p. MPTPMet: animales inyectados con MPTP i.p. y tratados con metformina.

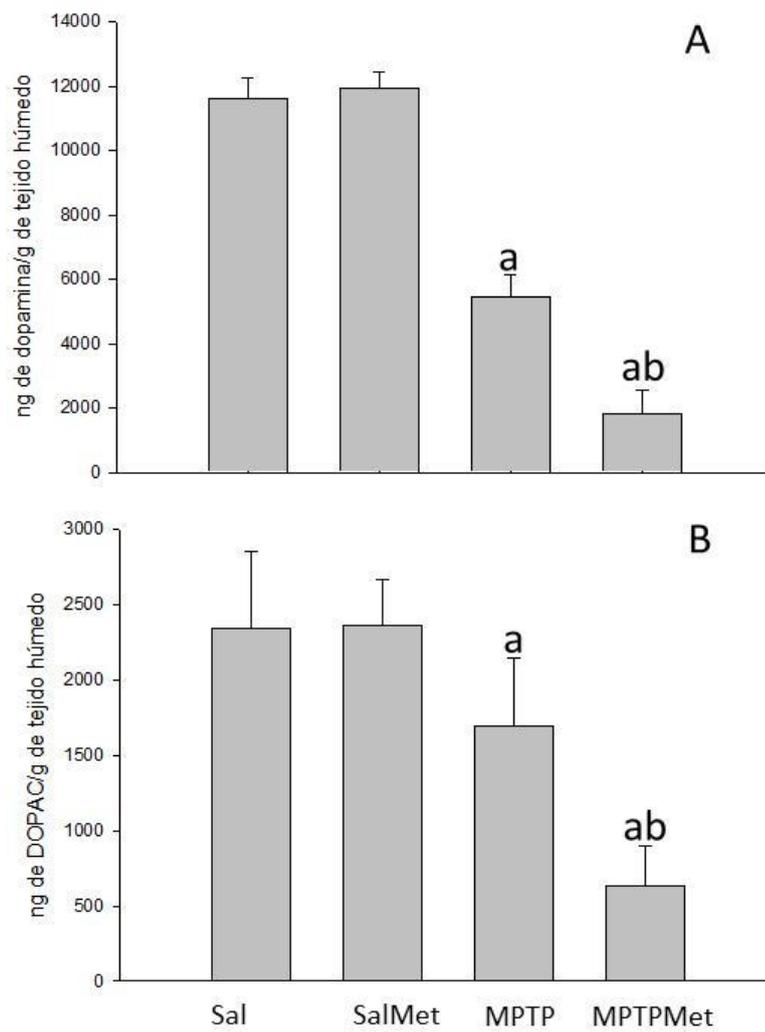


## 2.2. CUANTIFICACIÓN DE LA CANTIDAD DE DOPAMINA Y SU METABOLITO DOPAC.

La cantidad de DA y su metabolito DOPAC fueron medidos en el estriado de los animales sometidos al modelo de MPTP (**Fig. 26**). Se puede observar como la cantidad de DA en esta estructura disminuyó en un 47% de los valores control en los animales tratados con MPTP ( $p < 0.01$ ). Esta reducción fue mucho mayor cuando se combinó MPTP y metformina (15,6% respecto al grupo control;  $p < 0.01$ ; **Fig. 26A**).

En el caso del metabolito DOPAC, el contenido de este metabolito en esta estructura fue también reducido en los animales tratados con MPTP (72.3% respecto al grupo control;  $p < 0.01$ ; **Fig. 26B**). De la misma manera que ocurría con la DA, el efecto combinado de MPTP y metformina redujo notablemente la cantidad del metabolito en el estriado (26,9% respecto del control;  $p < 0.01$ ; **Fig. 26B**).

**Fig. 26. Cuantificación de la cantidad de DA y su metabolito DOPAC en el estriado de animales tras los distintos tratamientos a través de la técnica de HPLC. A)** Cuantificación de la cantidad de DA. El tratamiento con MPTP reduce significativamente la cantidad de DA en el estriado, mientras que el tratamiento con MPTP y metformina aumenta este efecto. **B)** Cuantificación de la cantidad de DOPAC. El tratamiento con MPTP reduce significativamente la cantidad de DOPAC en el estriado, mientras que el tratamiento con MPTP y metformina aumenta este efecto. Significación estadística: ANOVA de una vía seguido del test LSD de comparaciones múltiples.  $a \neq$  control;  $b \neq$  MPTP.  $P < 0.01$ . Abreviaturas: Sal: animales inyectados con vehículo i.p; SalMet: animales inyectados con vehículo i.p. y tratados con metformina; MPTP: animales inyectados con MPTP i.p.; MPTPMet: animales inyectados con MPTP i.p. y tratados con metformina.



### **3. EFECTO DE LA METFORMINA Y EL MPP<sup>+</sup> SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR DE NEURONAS DOPAMINÉRGICAS N27.**

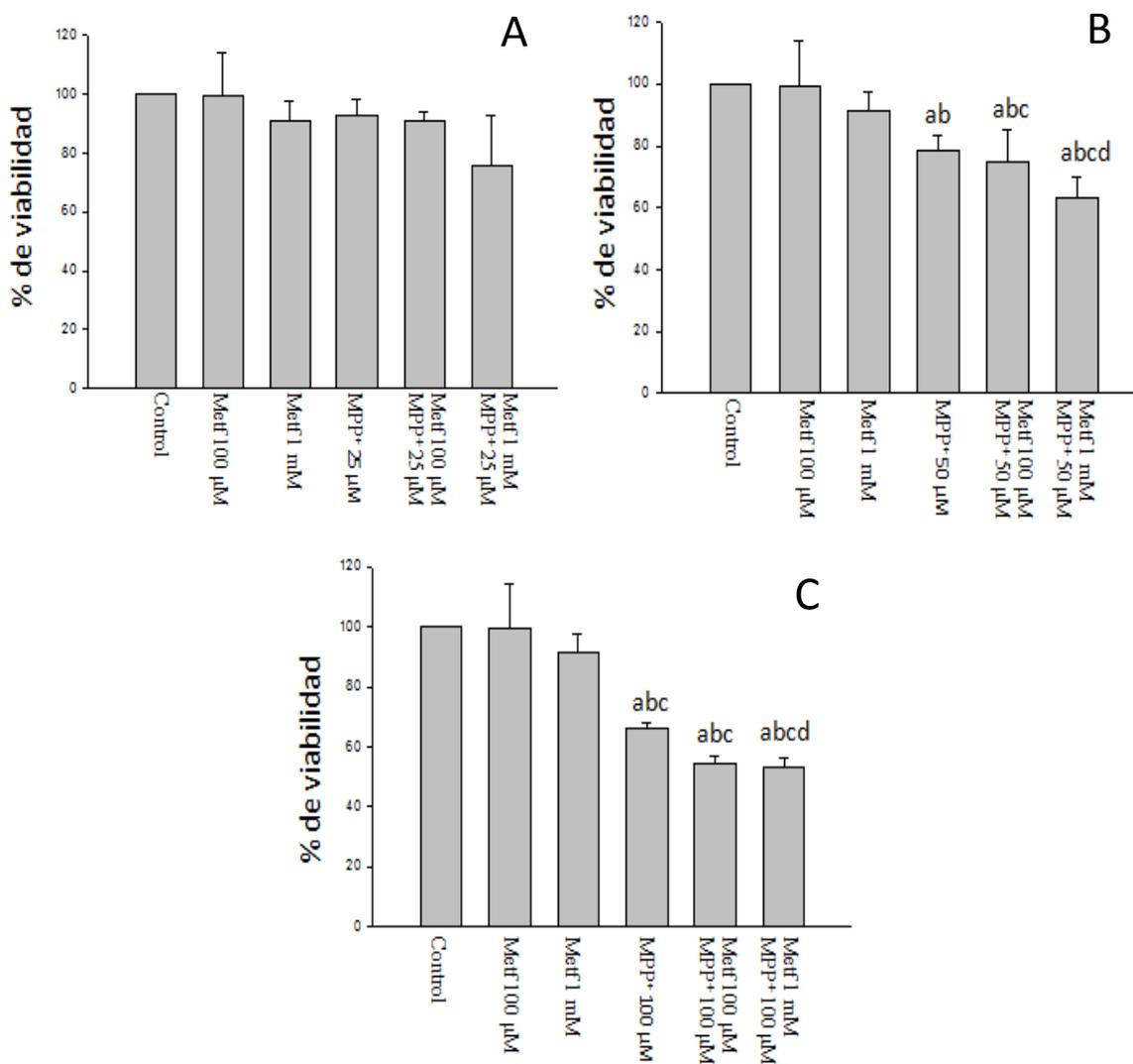
#### **3.1. ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR.**

En primer lugar se comprobó el efecto de cada tratamiento mostrado en la **Fig. 19** sobre la viabilidad de las células DAérgicas N27 diferenciadas por AMPc. Para esto se realizó el ensayo del MTT, 24 h después de cada tratamiento. Como puede observarse en la **Fig. 27**, ninguna de las dosis de metformina (100  $\mu$ M y 1 mM) produjeron variaciones significativas en el porcentaje de viabilidad celular, comparado con el 100% del grupo control ( $99,5 \pm 14,7\%$  y  $91,2 \pm 6,3\%$ , respectivamente). Cuando el MPP<sup>+</sup> lo utilizamos a la dosis más baja, 25  $\mu$ M, puede observarse en la **Fig. 27A** que no produjo ningún efecto significativo, con respecto al grupo control, sobre la viabilidad celular, ni sólo ni combinado con las dosis de 100  $\mu$ M y 1 mM de metformina ( $92,7 \pm 5,3\%$ ,  $91,1 \pm 2,73\%$  y  $76,0 \pm 16,65\%$ , respectivamente con respecto al grupo control).

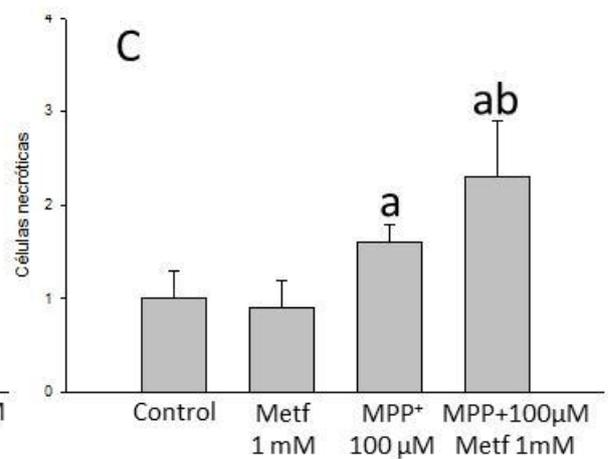
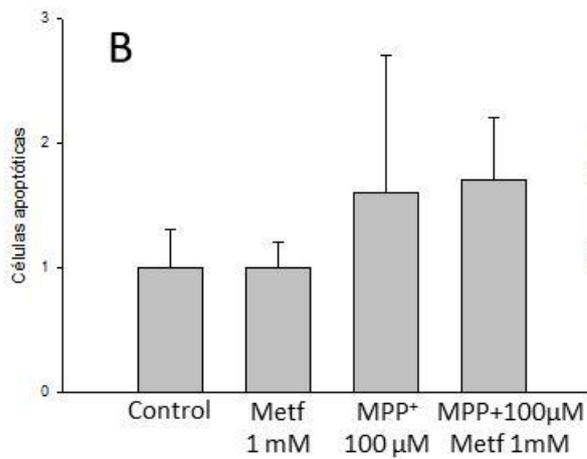
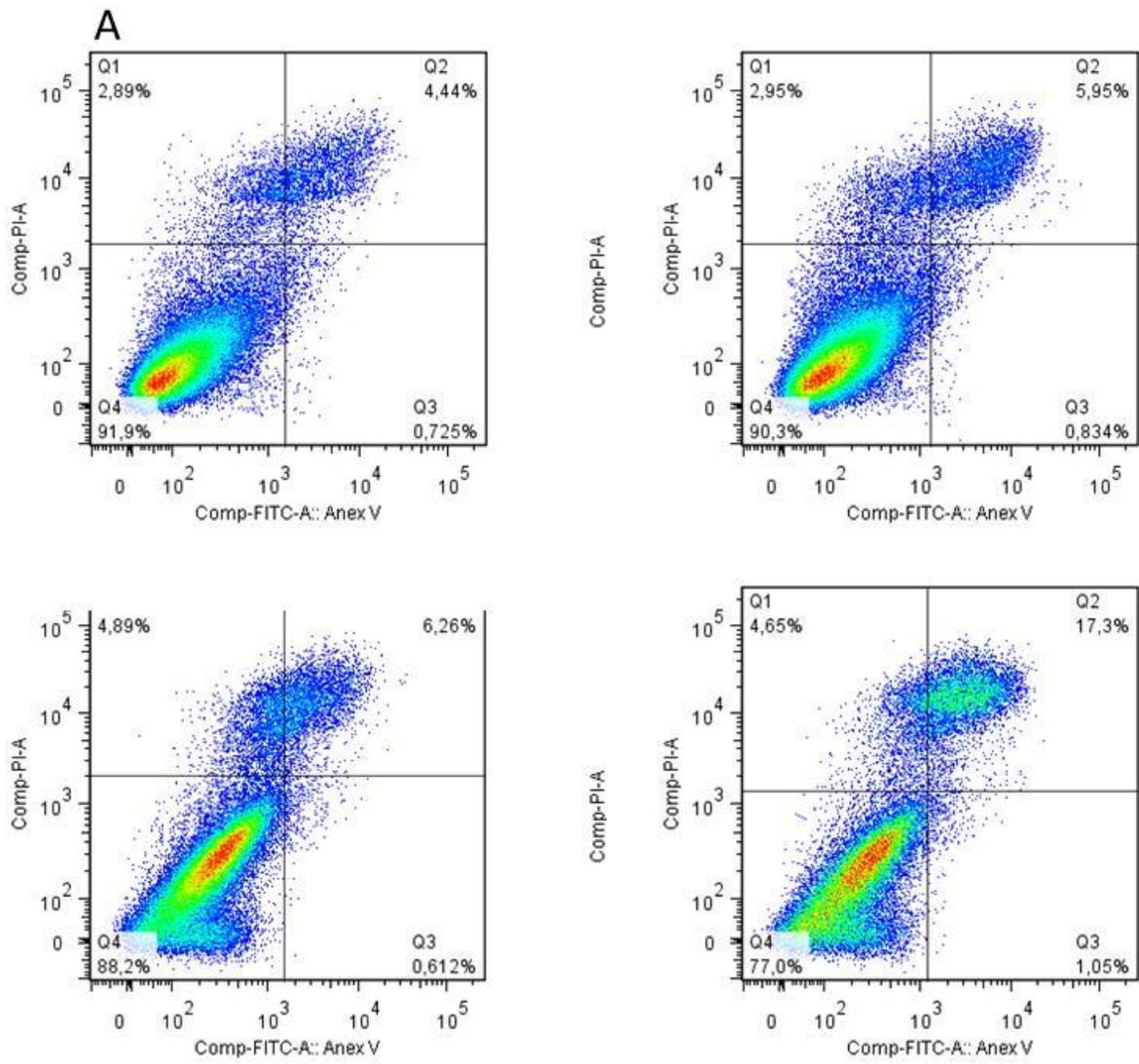
En la **Fig 27B**, se observa como la aplicación de la dosis de 50  $\mu$ M de MPP<sup>+</sup> produjo un descenso significativo de la viabilidad celular con respecto al grupo control ( $78,6 \pm 4,81\%$ ;  $p < 0.001$ ). La combinación con 100  $\mu$ M de metformina produjo una pérdida de viabilidad celular similar a la producida por sí solo ( $75,1 \pm 10,1\%$ , respecto del control;  $p < 0.001$ ). Cuando se combinó con 1 mM de metformina, la pérdida de viabilidad fue algo mayor que la producida por sí solo ( $63,5 \pm 6,4\%$ , respecto al grupo control;  $p < 0.001$ ).

La dosis más alta de MPP<sup>+</sup> (100  $\mu$ M) produjo el efecto mayor por sí solo sobre la viabilidad ( $66,2\% \pm 1,86$ , **Fig. 27C**;  $p < 0.001$ ). Cuando se combinaron las dosis más altas de metformina y MPP<sup>+</sup> (1 mM y 100  $\mu$ M, respectivamente), se observó el mayor

efecto sobre la viabilidad celular, llegando a encontrarse un  $54,5 \pm 2,4\%$  y un  $53,1 \pm 3,28\%$  de viabilidad respecto al grupo control en los grupos tratados con  $100 \mu\text{M}$  de  $\text{MPP}^+$  y  $100 \mu\text{M}/1 \text{ mM}$  de metformina respectivamente (**Fig. 27C**;  $p < 0.001$ ).



**Fig. 27. Efecto sobre la viabilidad celular de los diferentes tratamientos ensayados por el método del MTT.** El efecto de los diferentes tratamientos sobre la viabilidad celular se ensayó. a las diferentes dosis de las drogas (Metf 100  $\mu\text{M}$ , Metf 1 mM,  $\text{MPP}^+$  25  $\mu\text{M}$ ,  $\text{MPP}^+$  50  $\mu\text{M}$  y  $\text{MPP}^+$  100  $\mu\text{M}$ ) por sí solas y combinadas entre sí. (A) Efecto de la dosis de 25  $\mu\text{M}$  de  $\text{MPP}^+$  por sí sola y combinada con las diferentes dosis de metformina. (B) Efecto de la dosis de 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{MPP}^+$  por sí sola y combinada con las diferentes dosis de metformina. (C) Efecto de la dosis de 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{MPP}^+$  por sí sola y combinada con las diferentes dosis de metformina. Significación estadística: ANOVA de una vía seguido del test LSD de comparaciones múltiples. a  $\neq$  control; b  $\neq$  Metf 100  $\mu\text{M}$ ; c  $\neq$  Metf 1 mM; d  $\neq$   $\text{MPP}^+$  50  $\mu\text{M}$  (en B) ó  $\text{MPP}^+$  100  $\mu\text{M}$  (en C).  $p < 0.01$ .



**Fig. 28. Ensayo de muerte celular.** Para determinar qué tipo de muerte celular tiene lugar con las dosis más altas de los tratamientos ensayados se realizó el estudio por citometría de flujo. (A) Gráfico de puntos donde se muestran las tinciones con anexina V y yoduro de propidio correspondientes a cada tratamiento. Cada punto representa una única célula. (B) Cuantificación de células apoptóticas en las diferentes condiciones ensayadas. (C) Cuantificación de células necróticas en las diferentes condiciones ensayadas. Se encontraron diferencias significativas al tratar las células con MPP<sup>+</sup> y/o metformina. Significación estadística: ANOVA de una vía seguido del test LSD de comparaciones múltiples. a ≠ control; b ≠ MPP<sup>+</sup>100μM;  $P < 0.01$ .

### 3.2. ENSAYO DE MUERTE CELULAR.

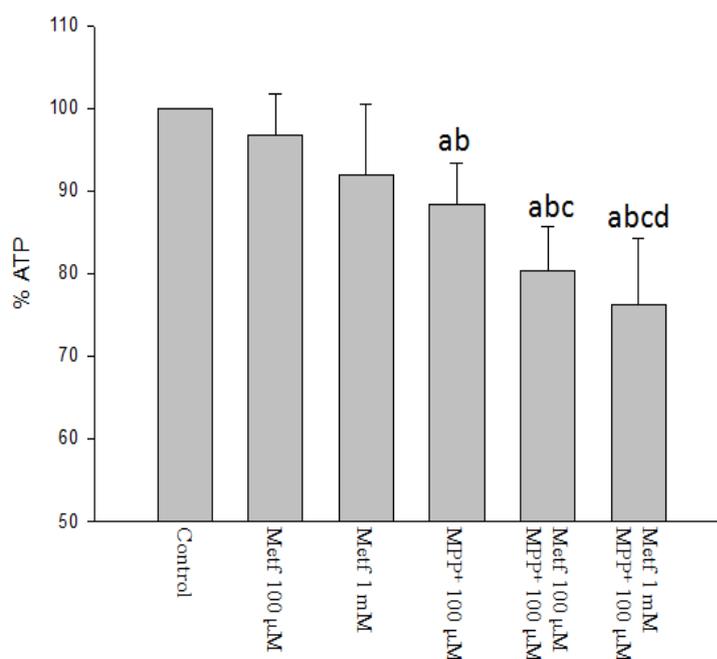
Con el objetivo de valorar si la muerte celular causada por las dosis altas de MPP<sup>+</sup> y metformina (100  $\mu$ M y 1 mM, respectivamente) que observamos por MTT se producía por apoptosis o necrosis, hicimos un estudio por citometría de flujo empleando anexina V y yoduro de propidio. Cuando una célula entra en apoptosis, la fosfatidilserina, que en condiciones normales se localiza en la cara interna de la membrana plasmática, se transloca a la membrana externa quedando así expuesta. La anexina V es un anticuerpo que se une a la fosfatidilserina. Al unirla a un fluorocromo e incubar con ella las células podremos detectar el grado de apoptosis en función del número de células positivas para anexina V. Por otro lado, el yoduro de propidio es un agente intercalante del ADN que sólo penetra en las células necróticas: Por tanto, incubando nuestras células con ambos reactivos podríamos encontrar los dos casos que nos interesan:

- Células positivas para anexina V y negativas para yoduro de propidio: células apoptóticas
- Células positivas para anexina V y yoduro de propidio: células necróticas.

Los resultados sólo mostraron diferencias significativas en el número de células necróticas, es decir, positivas para yoduro de propidio; mientras que el número de células apoptóticas no varió con el tratamiento (**Fig. 28B**). El número de células necróticas inducido por el MPP<sup>+</sup> fue 1.6 veces superior al encontrado en el grupo control, (**Fig. 28C**,  $p < 0.01$ ), y este número se incrementó hasta 2.3 veces el grupo control al co-tratar las células con metformina (**Fig. 28C**;  $p < 0.01$ ), lo cual sugiere que la necrosis fue el mecanismo de muerte celular implicado.

### 3.3. EFECTO DE LA METFORMINA Y EL MPP<sup>+</sup> SOBRE LOS NIVELES DE ATP EN LAS NEURONAS N27.

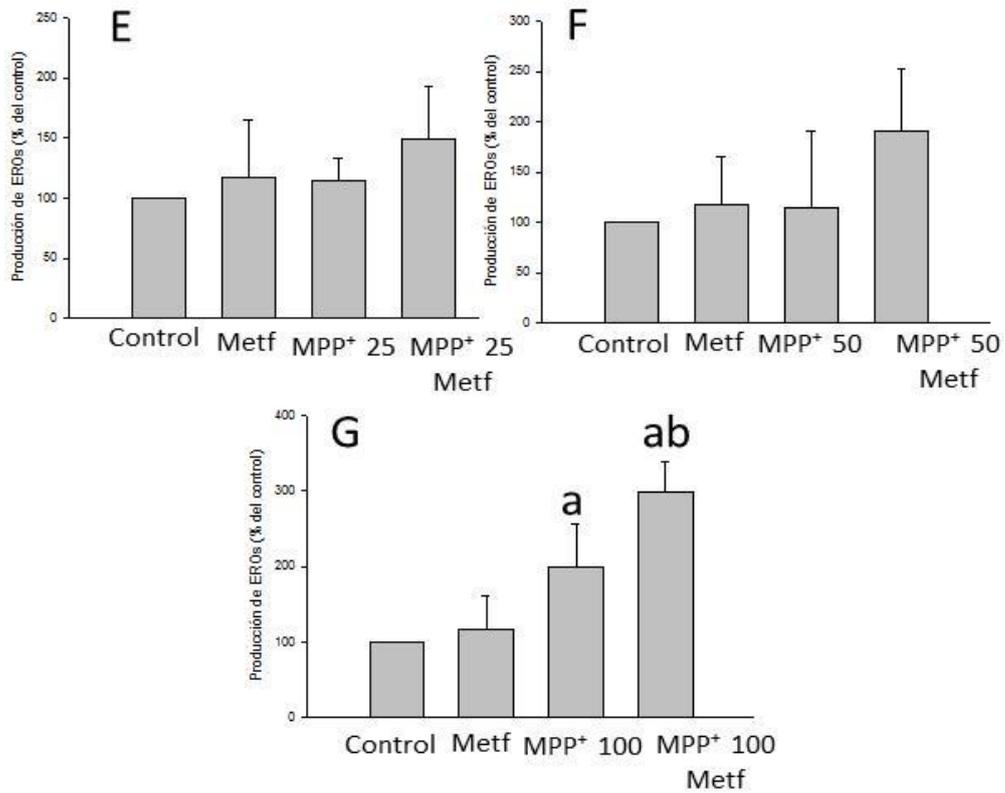
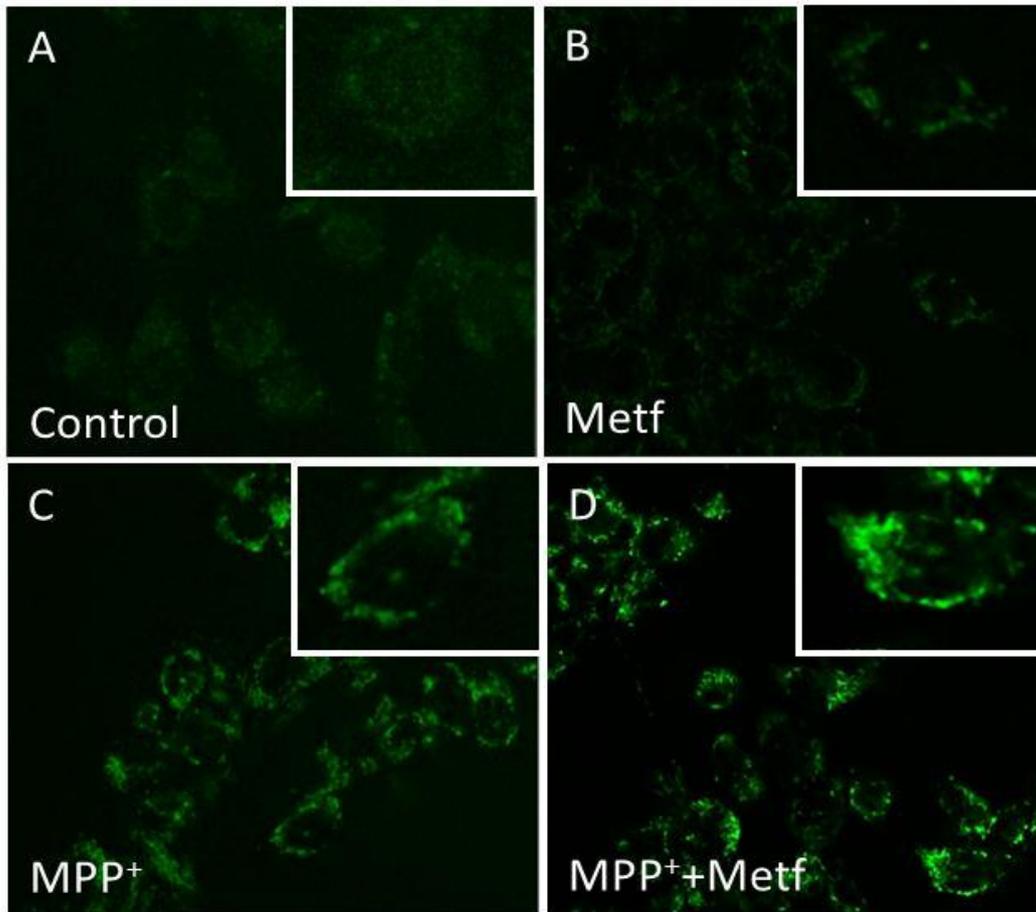
Los niveles de ATP se midieron en células N27 diferenciadas crecidas durante 1h en presencia de galactosa y de los diferentes tratamientos ensayados. Como puede observarse en la **Fig. 29**, el tratamiento con metformina en las dos dosis ensayadas (100  $\mu$ M y 1 mM) no produjeron diferencias significativas en los niveles de ATP respecto al control ( $96.7 \pm 5\%$  y  $92.0 \pm 8,5\%$ , respectivamente;  $p < 0.001$ ).



**Fig. 29. Grado de inhibición de la cadena respiratoria por metformina y MPP<sup>+</sup>.** Los niveles de ATP se midieron para evaluar la inhibición de la cadena respiratoria en células N27 diferenciadas crecidas en presencia de galactosa durante 1h y tratadas con 100  $\mu$ M y 1 mM de metformina, 100  $\mu$ M de MPP<sup>+</sup> y combinando ambos tratamientos. Se puede observar como la combinación de la dosis más alta de metformina (1 mM) combinada con 100  $\mu$ M de MPP<sup>+</sup> produce la mayor disminución en los niveles de ATP, a pesar de que la metformina por sí sola no tiene ningún efecto. Significación estadística: ANOVA de una vía seguido del test LSD de comparaciones múltiples. a  $\neq$  control; b  $\neq$  metformina 100  $\mu$ M; c  $\neq$  metformina 1 mM; d  $\neq$  MPP<sup>+</sup> 100  $\mu$ M.  $P < 0.01$ .

Sin embargo, el tratamiento con 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{MPP}^+$  si produjo un descenso significativo con respecto al grupo control ( $88.3 \pm 5,1\%$ ,  $p < 0.001$ ). Cuando se aplicó la combinación de tratamientos, 100  $\mu\text{M}$  de metformina junto con 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{MPP}^+$  y 1 mM de metformina junto con 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{MPP}^+$ , se observaron los niveles más bajos de ATP ( $80.3 \pm 5,4\%$  y  $76.2 \pm 8,1\%$  respectivamente respecto del control;  $p < 0.01$ ). Según esto, el efecto de la combinación es mayor que la de cada tratamiento por separado.

**Fig. 30. Determinación de la producción de EROs por los diferentes tratamientos ensayados mediante la sonda fluorogénica CellROX.** Para determinar el grado de estrés oxidativo producido por los diferentes tratamientos ensayados, se midió la producción de EROs 24h después de cada tratamiento: 1 mM de metformina, 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{MPP}^+$  y combinando cada dosis de  $\text{MPP}^+$  con 1 mM de metformina. A) Células sin tratar (grupo control). B) Células tratadas con metformina 1mM. C) Células tratadas con 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{MPP}^+$ . D) Células tratadas con 1mM de metformina y 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{MPP}^+$ . (E) Efecto de la dosis de 25  $\mu\text{M}$  de  $\text{MPP}^+$  por sí sola y combinada con 1 mM de metformina. (F) Efecto de la dosis de 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{MPP}^+$  por sí sola y combinada con 1 mM de metformina. (G) Efecto de la dosis de 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{MPP}^+$  por sí sola y combinada con 1 mM Metformina. Significación estadística: ANOVA de una vía seguido del test LSD de comparaciones múltiples.  $a \neq$  control;  $b \neq$  MPP 100  $\mu\text{M}$   $P < 0.01$ .



### **3.4. EFECTO DE LA METFORMINA Y EL MPP<sup>+</sup> SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN LAS NEURONAS N27.**

Para determinar el estado oxidativo de las neuronas DAérgicas inducido por los tratamientos aplicados, se determinó la producción de EROs intracelulares, mediante la sonda fluorogénica antes mencionada. Como puede observarse en la **Fig. 30 A y B**, la dosis de 1 mM de metformina no induce en la célula una situación de estrés oxidativo, ya que los niveles de EROs son similares a los del grupo control. Lo mismo sucedió con las dosis de MPP<sup>+</sup> 25  $\mu$ M y 50  $\mu$ M, a las que tampoco se vieron diferencias de producción de EROs ni por sí solas, ni combinadas con la metformina en comparación con el grupo control (**Fig. 30 E y F**). Por el contrario, la dosis de 100  $\mu$ M de MPP<sup>+</sup> si produjo un aumento del estado oxidativo de las neuronas con una producción de EROs dos veces mayor que el grupo control ( $200,4 \pm 55,1\%$ ; **Fig. 30 C y G**;  $p < 0,01$ ). Cuando se combinó con 1 mM de metformina, la producción de EROs fue significativamente mayor que la encontrada en el grupo tratado solo con MPP<sup>+</sup> ( $298,3 \pm 41,6\%$  **Fig. 30 D y G**,  $p < 0,01$ ).



# DISCUSIÓN



La EP es una de las enfermedades neurodegenerativas más comunes relacionadas con la edad, caracterizada por la muerte progresiva de las neuronas DAérgicas de la SN. Esta pérdida de DA y los circuitos neuronales compensatorios que se ponen en marcha producen un espectro de trastornos motores y no motores que tienen un dramático impacto en la calidad de vida de estos pacientes y sus familiares.

Existen evidencias preliminares que sugieren que la aparición de diabetes en la edad media puede desencadenar la aparición de determinadas enfermedades neurodegenerativas, incluida la EP y la EA (Sandyk, 1993). Evidencias recientes indican que la EP y la diabetes, ambas enfermedades crónicas relacionadas con la edad, comparten importantes desregulaciones en vías similares (Santiago y Potashkin, 2013). La exposición a factores ambientales y la susceptibilidad genética juegan un importante papel en la etiología y progresión de ambas enfermedades. Muy recientemente ha surgido una nueva e interesante hipótesis que sugiere que la disfunción mitocondrial, el estrés del retículo endoplásmico, la inflamación y las alteraciones en el metabolismo pueden conducir a la resistencia a la insulina y finalmente a la diabetes y/o la neurodegeneración (Santiago y Potashkin, 2013). Existen varias maneras en las que puede darse una patogénesis compartida por la diabetes, la demencia y la EP. Una de ellas es que debe haber un desorden en la bioenergética mitocondrial, manifestada en las células beta pancreáticas y el tejido adiposo (Zheng y col., 2010). Otro desorden citotóxico que puede ocurrir simultáneamente es el mal plegamiento de las proteínas (Twoler y Hardie, 2007; de la Monte y Wands, 2008; Morales y col., 2009), el cual se asocia con efectos derivados de la amilina en las células beta pancreáticas durante la diabetes, las tautopatías neurodegenerativas (hiperfosforilación de tau, bajos niveles de tau soluble, (Lei y col., 2010), la formación de la proteína precursora del amiloide (característica de la EA) y sinucleinopatías en desórdenes neurodegenerativos

caracterizados por agregados de alfa-sinucleína en neuronas y células de la glia en la EP (Gallego y col., 2003). El hecho de que la tolerancia anormal a la glucosa era un factor común entre los pacientes parkinsonianos y los diabéticos fue puesto de manifiesto por Sandyk (Sandyk, 1993). Así mismo, estudios animales han revelado que la hiperglicemia crónica disminuye la transmisión estriatal DAérgica (Becker y col., 2008). Cada uno de estos fenómenos puede ser más evidente con la resistencia a la insulina (Hu y col., 2007). Por último, las enfermedades macrovasculares que pueden aparecer en pacientes diabéticos pueden también incrementar tanto el riesgo de EP como la mortalidad derivada de esta enfermedad. Por el contrario, la EP idiopática no parece ser un factor de riesgo para la diabetes (Becker y col., 2008). Algunos estudios indican que la diabetes antecede a la EP y que el riesgo de EP aumenta en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (Hu y col., 2007; Xu y col., 2011; Schernhammer y col., 2011). Schernhammer y col., encontraron que no solo la diabetes, sino también el uso de antidiabéticos orales incrementa el riesgo de padecer EP.

Como ya se ha comentado, la metformina es el fármaco más utilizado como tratamiento para la diabetes mellitus a nivel mundial. Dada la alta prevalencia de enfermedades neurodegenerativas en pacientes diabéticos, decidimos estudiar el efecto de este fármaco sobre la supervivencia de las neuronas DAérgicas de la SN y la activación microglial (ambas características distintivas de la EP) en dos modelos diferentes de esta enfermedad. La metformina presenta dos mecanismos de acción con posibles efectos diferentes sobre las neuronas y la microglía. Por un lado activa a la AMPK, una enzima que, como ya se ha comentado, activa vías de señalización anti-inflamatorias y de supervivencia celular. Por este motivo decidimos estudiar el efecto de la metformina en el modelo de EP por inflamación inducido por la inyección intranigral de 2 µg de LPS. Por otro lado, la metformina parece inhibir de manera débil el complejo

I de la cadena de transporte de electrones en la mitocondria. Por este motivo decidimos estudiar el efecto de la metformina en el modelo de EP por fallo energético mitocondrial inducido por la neurotoxina MPTP.

## **1. EFFECTO DE LA METFORMINA EN EL MODELO DE LPS.**

En nuestro estudio se ha usado un modelo animal de EP ampliamente contrastado (Herrera y col., 2000), basado en una inyección intranigral de LPS, en el que la neurodegeneración DAérgica se inicia por medio de un proceso inflamatorio. El protocolo se basa en la perfusión de 2 µg de LPS directamente en la vía nigroestriada de la rata. Este tratamiento consigue inducir, entre otros procesos, una fuerte reacción tanto en la microglía como en los macrófagos de la SN, con un característico agrupamiento de éstos alrededor de los capilares sanguíneos.

### **1.1 EFECTO DE LA METFORMINA SOBRE LA ACTIVACIÓN MICROGLIAL.**

Recientes estudios clínicos y experimentales sugieren que la metformina, además de su acción hipoglucemiante, puede atenuar la inflamación central y periférica. El potencial anti-inflamatorio de la metformina se ha demostrado especialmente en modelos experimentales de inflamación periférica (Mamputu y col., 2003; Li y col., 2005; Isoda y col., 2006).

La metformina, así como otros fármacos como el AICAR (5-amino-4-imidazol carboxamida ribosa), es capaz de activar a la enzima AMPK. Ésta a su vez estimula la SIRT1, el PGC-1 $\alpha$ , el p53 y el FoxO, factores que pueden inhibir la vía de señalización del NF-kB a través de diferentes mecanismos. Puesto que la traslocación de este factor

de transcripción al núcleo es clave para desencadenar una respuesta inflamatoria, su inhibición por parte de la metformina se ha relacionado sistemáticamente con efectos anti-inflamatorios, tales como la reducción en la producción de IL-1 $\beta$ , de TNF- $\alpha$  o de la activación de las fosfoquinasas pro-inflamatorias p38 y ERK.

La activación de la AMPK afecta a las repuestas pro-inflamatorias de la microglía, las que actualmente se consideran como los principales componentes del sistema inmune cerebral (Giri y col., 2004). La microglía controla constantemente el contenido cerebral y evalúa la seguridad del ambiente neuronal, que a su vez regula a estas células (Hanish y Kettenmann, 2007). Sin embargo, la activación prolongada y sostenida de la microglía se relaciona con la patogénesis de un buen número de desórdenes neurológicos, incluyendo el daño cerebral por isquemia/reperfusión, la EA, la EP, la demencia asociada al VIH y la esclerosis múltiple (Benveniste, 1997).

Teniendo en cuenta las propiedades descritas para la metformina, debido al hecho de que puede atravesar la BHE (Wilcock y Bailey, 1994; Chen y col., 2009) y puesto que la AMPK se expresa en las células microgliales (Giri y col., 2004; Kuo y col., 2008), nuestra teoría es que la metformina puede modular la respuesta inflamatoria microglial inducida por la inyección de LPS o de MPTP. De hecho, estudios recientes han demostrado que la metformina es capaz de disminuir la respuesta inflamatoria en cultivos de microglía (Labuzek y col., 2010). Estos autores muestran cómo la metformina afecta a la liberación de citoquinas pro y anti-inflamatorias y reduce la producción de moléculas tóxicas promoviendo un cambio de la microglía hacia fenotipos de activación alternativos o anti-inflamatorios. La activación de la proteína AMPK constituye el mecanismo de acción mejor conocido de la metformina (Zhou y col., 2001). Parece razonable por tanto considerar la activación de la AMPK por la metformina como la responsable de los efectos anteriormente comentados.

Por ello nos propusimos estudiar inicialmente el efecto de la metformina sobre la activación microglial en los dos modelos de las enfermedades neurodegenerativas comentados anteriormente. El LPS es el modelo de EP por inflamación por excelencia por lo que se eligió como primera opción para estudiar el efecto de la metformina sobre la activación de las células microgliales.

Al estudiar los cambios en la microglía de los animales inyectados con LPS, se observó un fenómeno de activación, definido por una característica ramificación y posterior transformación fenotípica ameboide tras el estímulo inflamatorio. Concretamente, el número de células microgliales reactivas en la SN tras la inyección de LPS, fue diez veces mayor que en los animales a los que se les administró vehículo. Cuando el LPS fue inyectado en animales tratados con metformina se observó una clara reducción hasta prácticamente la mitad en el número de células OX-6 positivas alrededor del tracto de inyección. Estos resultados demuestran que la metformina, probablemente a través de su acción sobre la enzima AMPK, es capaz de inhibir la activación microglial en el mesencéfalo de la rata tras un estímulo inflamatorio, en este caso inducido por la inyección intranigral de LPS.

La glía está involucrada en la liberación de numerosas sustancias que generan o promueven el proceso inflamatorio. Por tanto, 6 horas tras la inyección de LPS y la posterior reacción glial, se midió la síntesis de distintos parámetros que podrían estar involucrados en el proceso inflamatorio inducido por LPS, lo que desembocaría finalmente en el daño neuronal. Los niveles de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e iNOS aumentaron entre 2 y 5 veces respecto a los animales control. Esto está de acuerdo con anteriores estudios en los que mediante técnicas de RT-PCR, se realizaron medidas de dichos parámetros en la SN a distintas horas tras la inyección del LPS. Estos estudios mostraron que a las 6 horas tras la inyección de LPS se producía un pico en los niveles de expresión de las

citoquinas, que empezaban a disminuir a partir de ese momento hasta alcanzar niveles normales entre las 24 y las 48 horas tras la inyección de LPS, dependiendo de la citoquina estudiada (Tomás-Camardiel y col., 2005).

En nuestras condiciones experimentales, el tratamiento con metformina redujo los niveles de expresión del TNF- $\alpha$ , siendo esta disminución aún mayor en el caso de la IL-1 $\beta$ . Sin embargo, los niveles de iNOS no se modificaron con el tratamiento con metformina.

Estos resultados corroboran los obtenidos a nivel celular a través de inmunohistoquímica y demuestran de nuevo un claro efecto anti-inflamatorio de este fármaco.

## **1.2 EFECTO DE LA METFORMINA SOBRE LA PÉRDIDA NEURONAL**

Los dos modelos de EP utilizados en este trabajo se caracterizan por una elevada pérdida de neuronas DAérgicas de la SNpc. En el caso del modelo basado en la inyección de LPS, esta pérdida neuronal se justifica por la fuerte reacción inflamatoria, mediada por la microglía, producida por este compuesto. Sin embargo, no siempre la activación microglial debe llevarnos a un estado no beneficioso para el organismo. Mediante la administración intranigral de la IL-4 (citoquina anti-inflamatoria) o ciertos glucocorticoides, los macrófagos secretan quimioquinas atrayentes para otros leucocitos, citoquinas anti-inflamatorias y algunos componentes de la matriz extracelular que favorecerían la proliferación celular, la angiogénesis y la reconstrucción de la matriz extracelular (McGeer y McGeer, 2007).

La inyección de 2  $\mu$ g de LPS en la SN de la rata produjo una pérdida significativa en el número de cuerpos celulares TH-positivos y alteró claramente el patrón de tinción

tanto para los cuerpos celulares como para las fibras. Estos son efectos idénticos a los descritos en estudios previos en nuestro laboratorio (Castaño y col., 1998; Herrera et al., 2000, 2005, 2008; de Pablos et al., 2005, 2006, 2014; Tomás-Camardiel et al., 2004; Hernández-Romero et al., 2008; Villarán et al., 2009).

El hecho de que el proceso inflamatorio que se da en la SN tras la inyección de LPS afecte exclusivamente a las neuronas DAérgicas, sugiere que la inflamación puede estar involucrada en ciertos procesos neurodegenerativos del sistema DAérgico de la vía nigroestriada, como por ejemplo la EP. Como ya se mencionó con anterioridad, está descrito el incremento de la síntesis de citoquinas inflamatorias por parte de la glía que se encuentra en la SN de pacientes con EP (Floor y Wetzel, 1998).

Las neuronas DAérgicas de la SN son más susceptibles que otras neuronas de distintas regiones cerebrales a la inflamación, probablemente debido a que en esta estructura la microglía es 4,5 veces más abundante que en cualquier otra área cerebral (Qin y col., 2007). Sin embargo, algunos autores han argumentado que la inflamación no es el factor más importante en la progresión de la EP. Así por ejemplo, Croisier y col (2005), correlacionaron la cantidad de  $\alpha$ -sin depositada en la SN con la activación microglial. No obstante, esta observación es difícil de argumentar ya que la actividad microglial es complicada de interpretar durante un periodo largo de activación, mientras que estos resultados son siempre evidencias a tiempos cortos.

Sin embargo, teniendo en cuenta la coexistencia de distintos tipos de neuronas en esta estructura, la mayor densidad de microglía en la SN no sería suficiente para explicar la especial vulnerabilidad de las neuronas DAérgicas. Esto obliga a pensar que estas neuronas deben tener unas características que justifiquen dicho comportamiento. Entre las posibles causas que pudieran justificar este hecho podríamos considerar la menor capacidad de protección frente al estrés oxidativo inducido por los radicales

libres de la SN (Jenner, 1998) y/o las altas concentraciones endógenas de DA en dicha estructura. Así, existen estudios previos en los que la propia DA juega un papel crucial en la degeneración de las neuronas DAérgicas de la SN (de Pablos y col., 2005). En dicho estudio los autores observaron que tras la inyección del LPS directamente en la SN del animal, se produce una pérdida de más del 40% de neuronas TH positivas en el hemisferio tratado con respecto al hemisferio control, inyectado con vehículo. Este efecto se pudo paliar mediante la administración de  $\alpha$ -metilparatirosina ( $\alpha$ -MPT), un inhibidor de la enzima TH, que por lo tanto disminuye la DA endógena. Sin embargo, al reponer los niveles de DA a través de la administración de su precursor, la L-DOPA, el daño sobre las neuronas Daérgicas volvía a producirse. Esto señalaría a la propia DA como uno de los factores causantes de la muerte neuronal durante el proceso inflamatorio provocado por el LPS (de Pablos y col., 2005).

Otra teoría interesante sobre la pérdida de neuronas DAérgicas relacionada con la activación microglial está relacionada con la expresión de ciertos receptores de la DA. La microglía expresa receptores de DA (D1 y D2) y noradrenérgicos, entre otros. La expresión de estos receptores *in vitro*, atenúa la liberación de TNF- $\alpha$  e IL-6 inducida por LPS. Esto podría sugerir que la pérdida de las neuronas DAérgicas se produce también por la propia pérdida del efecto anti-inflamatorio endógeno.

Ya que en el modelo de LPS la pérdida neuronal se produce fundamentalmente a través de la activación microglial, nuestra teoría era que el tratamiento con metformina, al disminuir todos los parámetros inflamatorios, debería disminuir también la muerte de neuronas Daérgicas. Sin embargo, y sorprendentemente, en nuestras condiciones experimentales, el tratamiento con metformina no protegió de los efectos dañinos originados por la inyección intranigral de LPS sino que, por el contrario, aumentó el número de neuronas TH positivas que degeneran tras la inyección de LPS en la SN.

## **2. EFECTO DE METFORMINA EN EL MODELO DE MPTP.**

Aunque, como ya se ha comentado, el mecanismo de acción más conocido de la metformina es la activación de la AMPK con las consiguientes respuestas anti-inflamatorias, recientemente se ha demostrado que la diana inicial de la metformina no es esta enzima, sino que este fármaco es capaz de inhibir de manera débil al complejo I de la cadena de transporte de electrones. La observación inicial se hizo en hígados perfundidos y hepatocitos aislados de roedores (Satoh y Kim, 1995; Sawada y col., 2007), aunque más tarde se extendió a otros tejidos, incluyendo el músculo esquelético (Shaftel y col., 2007), las células endoteliales (Si y col., 1996), las células beta pancreáticas (Sonoda y col., 2007) y las neuronas (Saeedi y col., 2008). Por tanto, una vez visto que el tratamiento con metformina atenúa la respuesta inflamatoria pero no protege a las neuronas DAérgicas, nos propusimos estudiar el efecto de este fármaco con otro modelo de EP, el basado en la inyección de MPTP, uno de los modelos de EP más ampliamente utilizado. Como ya se ha comentado, el MPTP es una protoxina de toxicocinética compleja que se transforma en su metabolito tóxico, el MPP<sup>+</sup> (Heikkila y col., 1984). Tras su administración sistémica el MPTP atraviesa la BHE en cuestión de segundos (Markey y col., 1984) debido a su alta lipofobicidad (Riachi y col., 1989) y una vez en el cerebro es transformado rápidamente en MPP<sup>+</sup> a través de las células gliales y serotoninérgicas (Chiba y col., 1984, 1985; Peterson y col., 1985). El MPP<sup>+</sup> es liberado al espacio extracelular y es captado por las neuronas Daérgicas a través del DAT, por el que tiene alta afinidad (Bezard y col., 1999; Javitch y col., 1985). Una vez dentro de las neuronas altera la respiración mitocondrial inhibiendo al complejo multienzimático de la NADH-ubiquinona oxidorreductasa (complejo I) de la cadena de transporte de electrones (Nicklas y col., 1985), produciendo la muerte neuronal.

## **2.1. EFECTO DE LA METFORMINA SOBRE LA ACTIVACIÓN MICROGLIAL.**

En nuestras condiciones experimentales la inyección de MPTP indujo la activación de la microglía, como se puso de manifiesto a través de inmunocitoquímica de Iba-1. Así, la mayor parte de las células microgliales en los animales tratados con MPTP muestran una morfología más redondeada típica de microglía activada y una mayor densidad (160% más respecto al grupo control) bajo estas condiciones. El tratamiento con metformina de nuevo disminuye la densidad microglial hasta niveles próximos a los controles en los animales inyectados con MPTP.

Por otro lado, los experimentos llevados a cabo a través de técnicas de RT-PCR mostraron un aumento significativo en los niveles de expresión del TNF- $\alpha$ , la IL-1 $\beta$  y la enzima iNOS en los animales tratados con MPTP, todos ellos mediadores de la inflamación liberados por la microglía reactiva en condiciones de inflamación. En nuestras condiciones experimentales, los niveles de expresión de dichas citoquinas, incluida la iNOS, se redujeron tras el tratamiento con metformina, lo que pone de manifiesto de nuevo el poder anti-inflamatorio de este fármaco. La diferencia en la protección ejercida por la metformina sobre la producción de iNOS en los dos modelos de EP usados puede deberse a que en el modelo inducido por el LPS la cuantificación de iNOS se realizó a 6 horas tras el tratamiento con LPS, de manera que los animales solo habían recibido una dosis de metformina, mientras que por el contrario en el modelo inducido por el MPTP la iNOS se midió al final del tratamiento por lo que los animales recibieron 2 dosis diarias de metformina durante los 7 días que duró el tratamiento.

## **2.2. EFECTO DE LA METFORMINA SOBRE LA PÉRDIDA NEURONAL.**

Para valorar el efecto de la metformina en animales tratados con MPTP se usaron en primer lugar técnicas de inmunocitoquímica frente a la enzima TH. En nuestras condiciones experimentales la inyección de MPTP indujo la muerte de las neuronas prácticamente hasta la mitad con respecto al control, tal como se puso de manifiesto a través de inmunocitoquímica de TH.

Para corroborar este efecto se decidió estudiar las cantidades de DA y su metabolito DOPAC en el estriado de los ratones. La medida de DA y DOPAC es un método ampliamente aceptado para estimar la pérdida neuronal en la SN, ya que éstas neuronas proyectan sus axones al estriado y allí liberan la DA. Por tanto, una pérdida de DA en el estriado se relaciona con una pérdida de cuerpos neuronales en la SN ipsilateral. Existen diversos métodos para determinar catecolaminas en el cerebro, pero de entre ellos el que se considera que tiene más sensibilidad es la cromatografía líquida de alta resolución o HPLC con detección electroquímica (Kissinger, 1996; Chaurasia, 1999; Raggi y col., 1999; Sabbioni y col., 2004). Esta técnica permite estimar con exactitud la liberación de neurotransmisores y sus metabolitos y estudiar los cambios inducidos en ellos por drogas que pueden perfundirse a través de la sonda de diálisis o ser administradas por vía sistémica (Bito y col., 1966). La técnica fue ideada por Bito y col. (1966) y, aunque inicialmente presentaba ciertas limitaciones, posteriormente fue perfeccionada por otros grupos de investigadores (Delgado y col., 1984; Ungerstedt y Hallström, 1987).

Nuestros resultados muestran como el tratamiento con MPTP a las dosis estudiadas induce la pérdida tanto de DA como de DOPAC en el estriado de los animales, lo que corrobora los datos obtenidos mediante inmunocitoquímica.

Sin embargo, y de nuevo en contra de lo que cabría esperar debido a su efecto anti-inflamatorio, el tratamiento con metformina en animales tratados con MPTP indujo una mayor muerte de neuronas DAérgicas en la SN, así como menores niveles de DA y DOPAC en el estriado, por lo que el tratamiento con metformina, lejos de proteger, aumenta el daño sobre estas neuronas.

El efecto dañino de la metformina se puede explicar a través de la inhibición que este fármaco ejerce sobre el complejo I mitocondrial. La actividad reducida en el complejo I altera la respiración mitocondrial y se asocia con un amplio espectro de enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la EP. De hecho, se ha encontrado una reducción de la actividad del complejo I en autopsias de tejidos de cerebro y de plaquetas de pacientes afectados con EP esporádicos. Además, se ha sugerido que los fenómenos de disfunción mitocondrial tienen lugar en estadios tempranos de la enfermedad. Aunque los mecanismos por los que las neuronas DAérgicas de la SNpc son especialmente sensibles a la inhibición de la respiración mitocondrial no están del todo esclarecidos, en un estudio reciente Gandhi y col. (2012) demostraron que la DA presente en estas neuronas es capaz de producir la apertura del poro de transición mitocondrial en el modelo de EP basado en la pérdida de función del gen PINK1, uno de los modelos clave para estudiar las patologías mitocondriales en la EP (Valente y col., 2004). Finalmente, Matsuda y col. (2009) han mostrado la enorme arborización de las neuronas DAérgicas de la SNc. El mantenimiento de esta arborización requiere grandes cantidades de ATP por lo que cualquier circunstancia que disminuya el suministro de energía en estas neuronas, como puede ser a través de la inhibición del complejo I, puede comprometer la viabilidad de las mismas.

Aunque el mecanismo exacto por el cual la metformina inhibe el complejo I de la cadena respiratoria sigue siendo desconocido, recientemente se ha demostrado que

este efecto no requiere de la AMPK (Wilkinson y Landreth, 2006, El-Mir y col., 2000) demostraron que la metformina inhibe específicamente al complejo I de la cadena respiratoria a través de un mecanismo indirecto que no funciona a través de las vías de señalización celulares tradicionales, pero que requiere que las células estén intactas para ser iniciado (Satoh y col., 1995). Esto llevó a los autores a proponer que los efectos de la metformina deben producirse a través de una vía de señalización compleja, en cuya primera etapa puede haber una interacción entre el fármaco y un receptor de membrana.

Sin embargo, nuevas investigaciones siguen siendo necesarias para aclarar el mecanismo por el cual la metformina modula el complejo I de la cadena respiratoria de una manera única. También vale la pena mencionar que la metformina probablemente también ejerce algunos efectos no mitocondriales ya que se ha demostrado que afecta el metabolismo de los eritrocitos, una célula carente de mitocondrias, mediante la modulación de la fluidez de membrana (Wu y col., 1999; Xie y col., 2002).

### **3. EFECTO DE LA METFORMINA SOBRE LA VIABILIDAD NEURONAL Y LA PRODUCCIÓN DE ATP.**

Para profundizar un poco más en los mecanismos por los que la metformina incrementa el daño sobre las neuronas DAérgicas, en este estudio hemos querido evaluar los efectos del tratamiento con metformina sobre un cultivo de neuronas DAérgicas N27 diferenciadas tratadas con MPP<sup>+</sup>. La viabilidad celular se midió a través del ensayo del MTT. El tratamiento con distintas dosis de metformina (100µM y 1 Mm) sola o en combinación con diferentes dosis de MPP<sup>+</sup> (desde 25 a 100 µM) produjo un claro efecto sobre la viabilidad neuronal. En el caso de la metformina hemos elegido la dosis de 100 µM por ser la concentración fisiológica alcanzada tras el tratamiento con

las dosis clínicamente utilizadas (El-Mir y col., 2008) y una dosis superior (1 mM) por ser la dosis más utilizada en la bibliografía (Williams y col., 2011). Respecto a las dosis de MPP<sup>+</sup> elegidas, nos basamos en el estudio realizado por Drechsel y colaboradores (2007) en el cual eligieron para su estudio concentraciones de 100  $\mu$ M y 1 mM para minimizar los efectos debidos a la pérdida de viabilidad celular. Para minimizar aún más estos efectos, nosotros tomamos como límite superior la concentración de 100  $\mu$ M y, como inferior, la de 25  $\mu$ M (máxima dosis a la cual hemos encontrado que los efectos tóxicos son despreciables)

Nuestros resultados muestran cómo la dosis de 25  $\mu$ M de MPP<sup>+</sup> no induce cambios significativos en la viabilidad celular de las neuronas DAérgicas N27. Tampoco encontramos diferencias significativas cuando esta dosis de MPP<sup>+</sup> se combinó con las distintas dosis de metformina. Estos resultados están de acuerdo con lo de otros autores que muestran como en el caso de las células N27 son necesarias dosis más altas de MPP<sup>+</sup> para producir el efecto neurotóxico deseado (Anantharam y col., 2007; Drechsel y col., 2007).

Sin embargo, el tratamiento con dosis de 50 y 100  $\mu$ M de MPP<sup>+</sup> indujo la muerte de neuronas de manera dependiente de la dosis. Estos resultados están de acuerdo con los de otros autores que muestran cómo estas dosis de MPP<sup>+</sup> son capaces de inhibir la respiración mitocondrial (Giordano y col., 2012). El tratamiento con las distintas dosis de metformina sola no indujo ningún cambio en la viabilidad celular. Sin embargo, en nuestras condiciones experimentales el tratamiento con la dosis baja de metformina no incrementa de manera significativa la muerte neuronal cuando se combina con las dos dosis ensayadas de MPP<sup>+</sup>. Sin embargo, la dosis alta de metformina produce una mayor pérdida de neuronas a las dos concentraciones de MPP<sup>+</sup> ensayadas (50 y 100  $\mu$ M). Estos resultados corroboran los encontrados *in vivo*, en los que el tratamiento con metformina

también aumenta el daño neuronal originado por el tratamiento con MPTP. Una vez realizados los estudios de viabilidad neuronal, decidimos estudiar el tipo de muerte inducida por el tratamiento de MPP<sup>+</sup> y metformina. Para ello elegimos las dosis más altas de ambas drogas (100  $\mu$ M de MPP<sup>+</sup> y 1 mM de metformina) por ser las que muestran un mayor porcentaje de muerte. Los resultados obtenidos por técnicas de citometría de flujo muestran como en nuestras condiciones experimentales la combinación de MPP<sup>+</sup> y metformina produce la muerte neuronal principalmente por necrosis. Como se ha comentado en el apartado de introducción, el régimen de administración del MPTP va a condicionar el grado y tipo de muerte neuronal, siendo en unos casos apoptótica y en otros no-apoptótica.

Por otro lado, nuestros resultados muestran una disminución en la producción de ATP en las neuronas tratadas con 100  $\mu$ M de MPP<sup>+</sup>. Este efecto se vio reforzado por el tratamiento con metformina, si bien solo la dosis más alta (1 mM) produjo resultados significativos. La disminución en la producción de ATP es característica de los procesos de inhibición de la cadena de transporte. En nuestras condiciones experimentales el tratamiento conjunto de MPP<sup>+</sup> y metformina debe producir una mayor inhibición de dicho complejo lo que lleva a una menor producción de ATP, una circunstancia a la que, como ya se ha comentado anteriormente, son especialmente sensibles las neuronas DAérgicas. Esto justificaría, al menos en parte, la mayor pérdida neuronal que se observa tras el tratamiento con MPP<sup>+</sup> y metformina juntos.

#### **4. EFECTO DE LA METFORMINA SOBRE LA PRODUCCIÓN DE EROs.**

El estrés oxidativo se ha relacionado con diversos desórdenes neurológicos, incluida la EP, la EA y la esclerosis lateral amiotrófica (Andersen, 2004). Está

ampliamente aceptado que el cerebro humano, que contiene altas concentraciones de lípidos poliinsaturados y catecolaminas, se caracteriza por un elevado metabolismo oxidativo, con niveles relativamente bajos de enzimas antioxidantes como la catalasa. Consecuentemente, el cerebro puede ser una diana importante para el ataque de los radicales libres lo que conlleva elevados niveles de peroxidación lipídica y/o de nitración de proteínas, así como la iniciación de la muerte celular programada (Bolaños y col., 1997; Yuan y Yankner, 2000).

Existen diversas fuentes de EROs en las neuronas: NADPHox, cadena de transporte mitocondrial, xantina oxidasa, etc, (Anantharam y col., 2007). La generación de EROs por la mitocondria es particularmente importante, debido al hecho de que tanto las mitocondrias dañadas como las activadas son fuentes bien conocidas de una buena cantidad de estrés oxidativo (Bolaños y col., 1997; Yuan y Yankner, 2000). En nuestras condiciones experimentales hemos observado un aumento significativo en la producción de EROs en las células N27 tratadas con 100  $\mu$ M de MPP<sup>+</sup>, lo que indicaría que la fuerte inhibición del complejo I induce la producción de EROs. Cuando se combinaron 100  $\mu$ M de MPP<sup>+</sup> y 1 mM de metformina se produjo un efecto sinérgico sobre la producción de EROs, demostrando que cuanto más inhibido está el complejo I mayor es el estrés oxidativo. Este aumento en la producción de radicales libres podría justificar, al menos en parte, la mayor muerte neuronal observada en nuestras condiciones experimentales.

## **5. RELACIÓN ENTRE METFORMINA Y ENFERMEDAD DE PARKINSON.**

Nuestros resultados muestran por tanto que la metformina es capaz de disminuir la respuesta inflamatoria en los dos modelos animales de EP usados en este estudio. Sin

embargo, a pesar de la disminución en los parámetros inflamatorios, el tratamiento con metformina no solo no consigue disminuir la muerte de neuronas DAérgicas de la SNpc, como cabía esperar, sino que por el contrario aumenta la muerte neuronal en esta estructura. Así, nuestros resultados sugieren que la metformina, a través de la inhibición del complejo I mitocondrial, aumenta la vulnerabilidad de estas neuronas que, como ya se ha comentado, son especialmente sensibles a la inhibición del complejo I de la cadena de transporte de electrones.

Sin embargo, estudios previos han mostrado el potencial beneficioso del consumo a largo plazo de metformina en el desarrollo de la EA, sugiriendo que la metformina puede tener efectos neuroprotectores y profilácticos en pacientes con predisposición a padecer esta enfermedad (Kickstein y col., 2010). Así, se ha demostrado cómo la metformina es capaz de proteger a las neuronas corticales, especialmente involucradas en la EA, de los efectos proapoptóticos inducidos por el etopósido, un modelo de muerte neuronal por apoptosis. Los autores justifican este efecto debido a que la débil inhibición del complejo I disminuye la producción de EROs en estas neuronas. La diferencia con nuestros resultados radica en el tipo de neuronas afectadas y en el grado de inhibición del complejo I, ya que, como ya se ha comentado, las neuronas DAérgicas son mucho más sensibles a la inhibición de este complejo que las corticales. Además, la potente inhibición que producimos al combinar metformina con  $MPP^+$  parece ser el causante de la mayor producción de EROs.

Por otro lado, también se ha demostrado que la metformina previene las alteraciones en el aprendizaje y la memoria que aparecen con el consumo prolongado de dietas ricas en grasa (Pintana y col., 2012). Así mismo, (Ullah y col 2012) han demostrado recientemente que la metformina protege de la degeneración por apoptosis en neuronas corticales inducida por etanol. La metformina también promueve la

neurogénesis, aumenta la formación de la memoria espacial (Wang y col., 2012) y atenúa el incremento en el hipocampo de tau total, tau fosforilada y la activación de JNK en un modelo de EA (Li y col., 2012). Por ello, cabe pensar que la metformina protege a las neuronas corticales e hipocampales, estructuras implicadas en la EA. De hecho, existen algunos estudios epidemiológicos que muestran cómo el tratamiento con metformina disminuye el riesgo de demencia (Hsu y col., 2011). Estos datos sugieren que el tratamiento con metformina en pacientes diabéticos puede disminuir el desarrollo de demencia y EA. Sin embargo, no todos los estudios epidemiológicos apuntan en esta dirección, sino que por el contrario existen estudios muy recientes que muestran como el tratamiento con metformina puede empeorar el rendimiento cognitivo y aumentar ligeramente el riesgo de padecer EA (Imfeld y col., 2012; Moore y col., 2013).

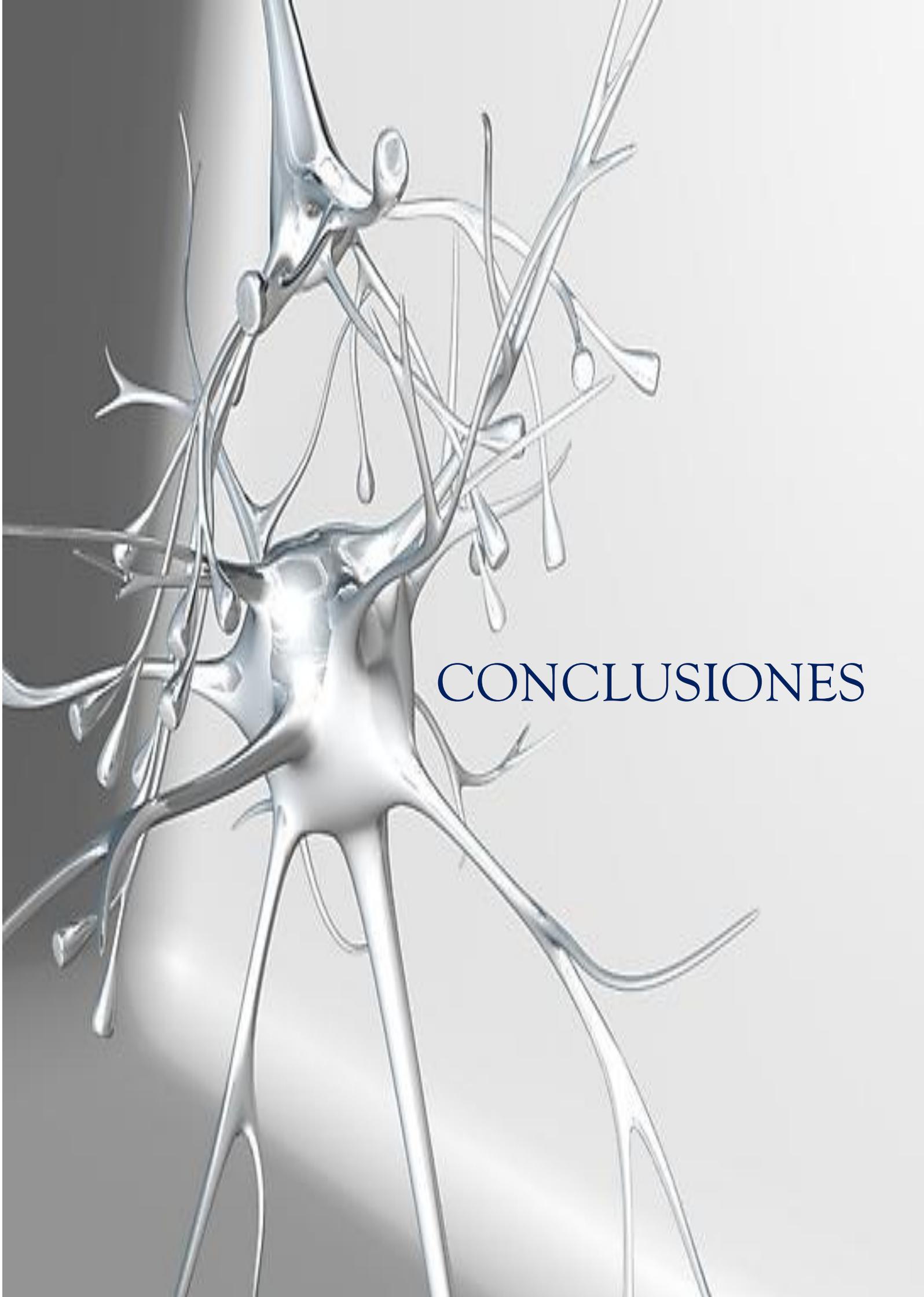
Sin embargo, no existen estudios previos que muestren el efecto de la metformina sobre las neuronas DAérgicas de la SNpc, implicadas en la EP. Nuestros resultados muestran que, lejos de proteger, la metformina aumenta la degeneración de estas neuronas. Dado que en pacientes parkinsonianos la actividad del complejo I está disminuida y que uno de los mecanismos de la metformina es precisamente la inhibición de este complejo multienzimático, nuestros resultados sugieren que el tratamiento con este fármaco en pacientes diabéticos puede ser un nuevo factor de riesgo que acelere la aparición y/o progresión de la enfermedad.

En los escasos estudios epidemiológicos que existen al respecto se ha demostrado que la aparición y el desarrollo de la EP en pacientes diabéticos depende en parte del tipo de tratamiento utilizado. Así, las sulfonilureas parecen incrementar el riesgo de padecer la enfermedad, mientras que si se combinan con metformina este efecto se reduce (Wahlqvist y col., 2012). Los autores justifican este fenómeno a través

de los distintos mecanismos de acción de ambos tipos de fármacos, de manera que cada uno compensa los efectos adversos del otro.

Así pues, teniendo en cuenta nuestros resultados, así como la mayor prevalencia de EP y EA en pacientes diabéticos y los diferentes efectos que los distintos tratamientos parecen ejercer en este sentido, resulta necesario profundizar en los efectos que la metformina tiene sobre los distintos tipos de neuronas y, por tanto, sobre la aparición y desarrollo de la EP y la EA, desórdenes neurodegenerativos muy comunes e incapacitantes y de cada vez mayor prevalencia en nuestra sociedad.



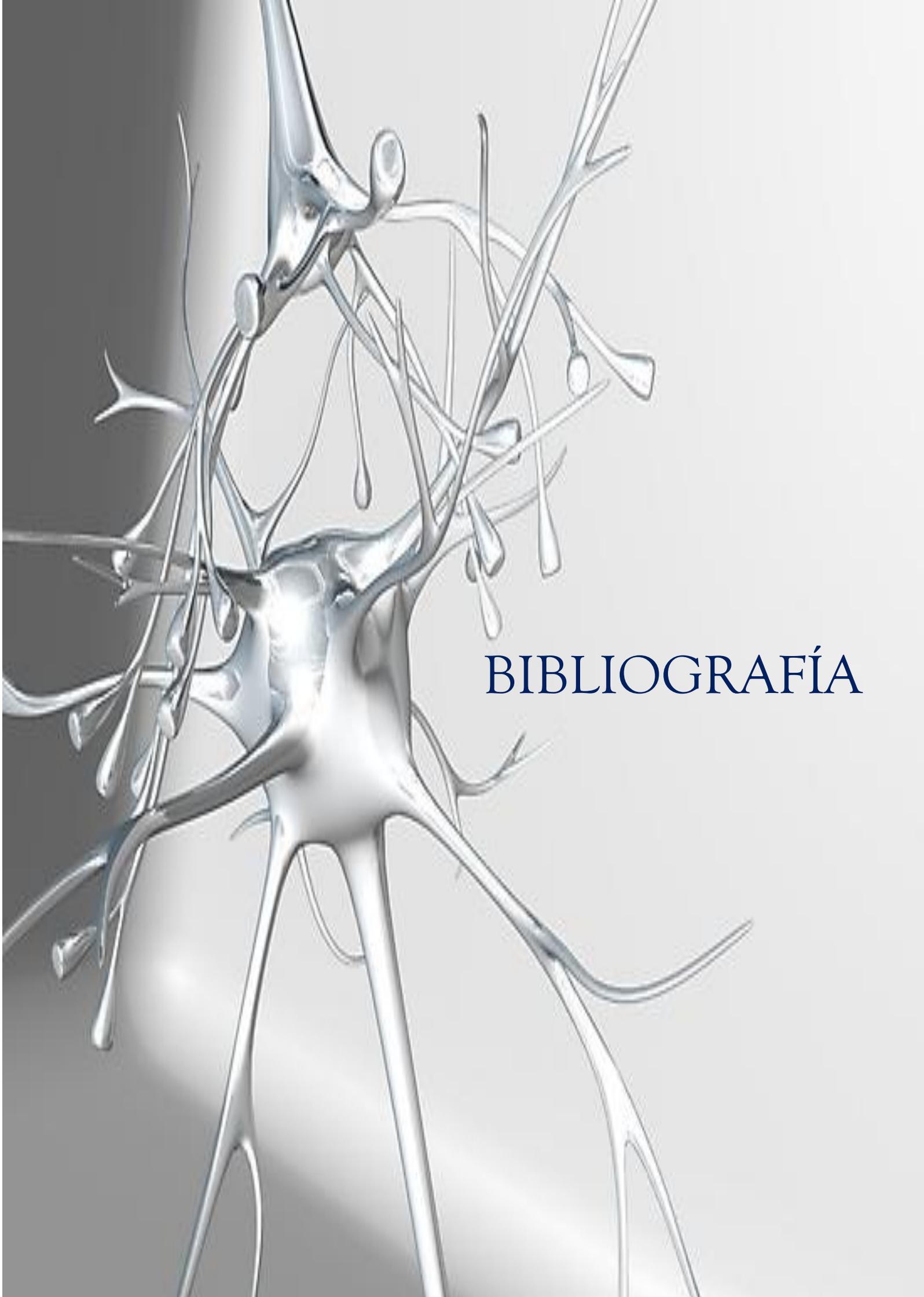


# CONCLUSIONES



- 1- El tratamiento con metformina es capaz de disminuir la inflamación central en los modelos de EP basados en la inyección intranigral de LPS (ratas), y en la inyección intraperitoneal de MPTP (ratones).
- 2- Aunque la metformina disminuye la inflamación central en esos dos modelos de EP, aumenta la muerte neuronal de las neuronas dopaminérgicas de la SN en ambos modelos.
- 3- En el estudio *in vitro*, al igual que se ha observado en el estudio *in vivo*, la metformina sola no afecta a las células dopaminérgicas N27 diferenciadas ni a la dosis terapéutica ensayada (100  $\mu$ M), ni a la dosis más alta de 1 mM.
- 4- A partir de la dosis de 50  $\mu$ M de MPP<sup>+</sup> se observa un efecto negativo sobre la viabilidad de las neuronas, el cual se acentúa a la dosis de 100  $\mu$ M, siendo el efecto mayor cuando estas dosis se combinan con las dosis de metformina ensayadas.
- 5- La muerte celular encontrada fue de tipo necrótico, como mostraron los estudios por citometría de flujo.
- 6- Los niveles de ATP disminuyen significativamente a la dosis de 100  $\mu$ M, siendo aún mayor el descenso cuando ésta se combina con ambas dosis de metformina.
- 7- La combinación de las diferentes dosis de metformina con la dosis más alta de MPP<sup>+</sup> (100  $\mu$ M) aumenta el estrés oxidativo en ese tipo de células, observado por un aumento en las EROs.
- 8- Nuestros resultados sugieren por tanto, que el tratamiento con metformina en pacientes diabéticos puede aumentar el riesgo de padecer EP. Teniendo en cuenta que las enfermedades neurodegenerativas son una de las complicaciones frecuentes en pacientes con diabetes mellitus y dados los pocos estudios epidemiológicos al respecto, parece necesario profundizar en las repercusiones

que el tratamiento con metformina u otros antidiabéticos orales pueda tener en el desarrollo de la EP y la EA.



# BIBLIOGRAFÍA



- Aiuchi T, Shirane Y, Kinemuchi H, Arai Y, Nakaya K. and Nakamura Y (1988) Enhancement by tetraphenylboron of inhibition of mitochondrial respiration induced by 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP<sup>+</sup>). *Neurochem. Int.* 12:525-531.
- Akiyama H, McGeer P (1989) Microglial response to 6-hydroxydopamine-induced substantia nigra lesions. *Brain Res.* 489:247-253.
- Alam ZI, Daniel SE, Lees AJ, Marsden DC, Jenner P, Halliwell B (1997) A generalised increase in protein carbonyls in the brain in Parkinson's but not incidental Lewy body disease. *J. Neurochem.* 69:1326-1239.
- Albin RL, Young AB, Penney JB (1989) The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci.* 12:366-375.
- Aljada A, Mousa SA. (2012) Metformin and neoplasia: implications and indications. *Pharmacol Ther.* 133:108–115.
- Aloe L, Fiore M (1997) TNF- $\alpha$  expressed in the brain of transgenic mice lowers central tyroxine hydroxylase immunoreactivity and alters grooming behavior. *Neurosci Lett.* 238:65-68.
- Anantharam V, Kaul S, Song C, Kanthasamy A, Kanthasamy AG (2007) Pharmacological inhibition of neuronal NADPH oxidase protects against 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>)-induced oxidative stress and apoptosis in mesencephalic dopaminergic neuronal cells. *Neurotoxicology.* 28:988-997.
- Andersen JK (2004) Iron dysregulation and Parkinson's disease. *J Alzheimers.* 6 Suppl 6:S47-52.
- Anderson KK, Vassort C, Brennan BA, Que L, Haavik J, Flatmark T, Gros F, Thibault J (1992) Purification and characterization of the blue-green rat pheochromocytoma (PC12) tyrosine hydroxylase with a dopamine-Fe (III) complex. *Biochem.* 284:687-695.
- Anderson KV (2000) Toll signaling pathways in the innate immune response. *Curr. Opin. Immunol.* 12:13-19.
- Andrew R, Watson DG, Best SA, Midgley JM, Wenlong H, Petty RK (1993) The determination of hydroxydopamines and other trace amines in the urine of parkinsonian patients and normal controls. *Neurochem. Res.* 18:1175-1177.
- Appell PP, Behan M (1990) Sources of subcortical GABAergic projections to the superior colliculus in the cat. *J Comp Neurol.* 302:143-58.
- Arai M, Uchiba M, Komura H, Mizuochi Y, Harada N, Okajima K (2010) Metformin, an antidiabetic agent, suppresses the production of tumor necrosis factor and tissue factor by inhibiting early growth response factor-1 expression in human monocyte in vitro. *JPET.* 334:206-13.
- Arai N, Misugi K, Goshima Y, Misu Y (1990) Evaluation of 1methyl-4phenyl- 1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-treated C57 black mouse model for parkinsonism. *Brain Res.* 515: 57–63.
- Araki T, Mikami T, Tanji H et al (2001) Biochemical and immunohistochemical changes in the brain of 1-methyl- 4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-treated mouse. *Eur J PharmSci.* 12: 231–238.
- Arditi M, Zhou J, Torres M, Durden DL, Stins M, Kim KS (1995) Lipopolysaccharide stimulates the tyrosine phosphorylation of mitogen-activated protein kinases p44, p42, and p41 in vascular endothelial cells in a soluble CD14-dependent manner. Role of protein tyrosine phosphorylation in lipopolysaccharide-induced stimulation of endothelial cells. *J. Immunol.* 155:3994-4003.
- Baimbridge KG, Celio MR, Rogers JH (1992) Calcium-binding proteins in the nervous system. *Trends Neurosci.* 15:303-308.

- Banati RB, Gehrman J, Schubert P, Kreutzberg GW (1993) Cytotoxicity of microglia. *Glia*. 7:111-118.
- Baydoun AR, Wileman SM, Wheeler-Jones CP, Marber MS, Mann GE, Pearson JD, Closs EI (1999) Transmembrane signalling mechanisms regulating expression of cationic amino acid transporters and inducible nitric oxide synthase in rat vascular smooth muscle cells. *Biochem. J.* 344:265-272.
- Beal MF (2003) Bioenergetic approaches for neuroprotection in Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 53 Suppl 3:S39-47.
- Becker C, Brobert GP, Johansson S, Jick SS, Meier CR (2008) Diabetes in patients with idiopathic Parkinson's disease. *Diabetes Care.* 31:1808–1812.
- Beckman JS, Carson M, Amith CD, Koppenol WH (1993) ALS, SOD and peroxynitrite. *Nature.* 364(6438):584.
- Beckner ME, Gobbel GT, Abounader R, Burovic F, Agostino NR, Laterra J, Pollack IF (2005) Glycolytic glioma cells with active glycogen synthase are sensitive to PTEN and inhibitors of PI3K and gluconeogenesis. *Lab Invest.* 85:1457–1470.
- Ben Sahra I, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF, Bost F (2010) Metformin in cancer therapy: a new perspective for an old antidiabetic drug? *Mol Cancer Ther.* 9:1092-1099.
- Benveniste EN (1992) Inflammatory cytokines within the central nervous system: sources, function, and mechanism of action. *Am. J. Physiol.* 263:1-16.
- Benveniste EN (1997) Role of macrophages/microglia in multiple sclerosis and experimental allergic encephalomyelitis. *J Mol Med.* 75:165–173.
- Bernardino L, Xapelli S, Silva AP, Jakobsen B, Poulsen FR, Oliveira CR, Vezzani A, Malva JO, Zimmer J (2005) Modulator effects of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha on AMPA-induced excitotoxicity in mouse organotypic hippocampal slice cultures. *J Neurosci.* 25:6734-6744.
- Bezard E, Gross CE, Fournier MC et al. (1999) Absence of MPTP-induced neuronal death in mice lacking the dopamine transporter. *Exp Neurol.* 155: 268– 73.
- Bito L, Davson H, Levin E, Murray M, Snider N (1966) The concentrations of free amino acids and other electrolytes in cerebrospinal fluid, in vivo dialysate of brain, and blood plasma of the dog. *J Neurochem.* 13:1057-1067.
- Bjorklund H, Olson L, Dahl D, Schwarcz R (1986) Short- and long-term consequences of intracranial injections of the excitotoxin, quinolinic acid, as evidenced by GFA immunohistochemistry of astrocytes. *Brain Res.* 371:267-277.
- Boka G, Anglade P, Wallach D, Javoy-Agid F, Agid Y, Hirsch EC (1994) Immunocytochemical analysis of tumor necrosis factor and its receptors in Parkinson's disease. *Neurosci Lett.* 172:151-154.
- Bolaños JP, Almeida A, Stewart V, Peuchen S, Land JM, Clark JB, Heales SJ (1997) Nitric oxide-mediated mitochondrial damage in the brain: mechanisms and implications for neurodegenerative diseases. *J Neurochem.* 68(6):2227-40.
- Bourdiol F, Toulmond S, Serrano A, Benavides J, Scatton B (1991) Increase in omega 3 (peripheral type benzodiazepine) binding sites in the rat cortex and striatum after local injection of interleukin-1, tumour necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide. *Brain Res.* 543, 194-200.
- Bové J, Perier C (2012) Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. *Neuroscience.* 211:51-76.
- Boyce S, Kelly E, Reavill C, Jenner P, Marsden CD (1984) Repeated administration of N-methyl-4-phenyl 1,2,5,6-tetrahydropyridine to rats is not toxic to striatal dopamine neurones. *Biochem Pharmacol.* 33:1747-52.

- Braak H, Braak E, Yilmazer D, de Vos RA, Jansen EN, Bohl J (1996) Pattern of brain destruction in Parkinson's and Alzheimer's diseases. *J. Neural Transm.* 103:455-490.
- Breder CD, Tsujimoto M, Terano Y, Scott DW, Saper CB (1993) Distribution and characterization of tumor necrosis factor-alpha-like immunoreactivity in the murine central nervous system. *J Comp Neurol.* 337:543-67.
- Bronstein DM, Perez-Otano I, Sun V, Mullis Sawin SB, Chan J, Wu GC, Hudson PM, Kong LY, Hong JS, McMillian MK (1995) Glia-dependent neurotoxicity and neuroprotection in mesencephalic cultures. *Brain Res.* 704:112-116.
- Brunmair B, Staniek K, Gras F, Scharf N, Althaym A, Clara R, Roden M, Gnaiger E, Nohl H, Waldhausl W, Furnsinn C (2004) Thiazolidinediones, like metformin, inhibit respiratory complex I: a common mechanism contributing to their antidiabetic actions? *Diabetes.* 53:1052-1059.
- Bunney BS, Aghajanian GK (1976) Dopaminergic influence in the basal ganglia: evidence for striatonigral feedback regulation. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis.* 55:249-267.
- Carling D (2004) The AMP-activated protein kinase cascade a unifying system for energy control. *Trends Biochem Sci.* 29:18-24.
- Carr PA, Yamamoto T, Karmy G, Baimbridge KG, Nagy JI (1989) Parvalbumin is highly colocalized with calbindin D28k and rarely with calcitonin gene-related peptide in dorsal root ganglia neurons of rat. *Brain Res.* 497:163-170.
- Carreño-Muller E, Herrera AJ, de Pablos RM, Tomas-Camardiel M, Venero JL, Cano J, Machado A (2003) Thrombin induces in vivo degeneration of nigral dopaminergic neurones along with the activation of microglia. *J. Neurochem.* 84:1201-1214.
- Castaño A, Herrera AJ, Cano J, Machado A (1998) Lipopolysaccharide intranigral injection induces inflammatory reaction and damage in nigrostriatal dopaminergic system. *J. Neurochem.* 70:1584-1592.
- Chan P, DeLanney LE, Irwin I, Langston WJ, Di Monte D (1991) Rapid ATP loss caused by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mouse brain. *J. Neurochem.* 57:348-351.
- Chang ZL, Novotney A, Suzuki T (1990) Phospholipase C and A<sub>2</sub> in tumoricidal activation of murine macrophage-like cell lines. *FASEB J.* 4:A1753.
- Chaudhuri KR, Healy DG, Schapira AH (2006) National Institute for Clinical Excellence Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. *Lancet Neurol.* 5:235-245.
- Chaurasia CS (1999) In vivo microdialysis sampling: theory and applications. *Biomed Chromatogr.* 13:317-32.
- Chen Y, Zhou K, Wang R, Liu Y, Kwak YD, Ma T, Thompson RC, Zhao Y, Smith L, Gasparini L, Luo Z, Xu H, Liao FF (2009) Antidiabetic drug metformin (GlucophageR) increases biogenesis of Alzheimer's amyloid peptides via up-regulating BACE1 transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:3907-3912.
- Chiba K, Kubota E, Miyakawa T, Kato Y, Ishizaki T (1988) Characterization of hepatic microsomal metabolism as an in vivo detoxication pathway of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 246:1108-1115.
- Chiba K, Trevor A, Castagnoli N Jr (1984) Metabolism of the neurotoxic tertiary amine, MPTP, by brain monoamine oxidase. *Biochem Biophys Res Commun.* 120: 574-578
- Chiba K, Trevor AJ y Castagnoli N Jr (1985) Active uptake of MPP<sup>+</sup>, a metabolite of MPTP, by brain synaptosomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 128:1228-1232.
- Chiueh CC, Markey SP, Burns RS, Johannessen JN, Pert A, Kopin IJ (1984) Neurochemical and behavioral effects of systemic and intranigral administration of

- N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in the rat. *Eur J Pharmacol.* 100:189-94.
- Chung ES, Joe EH, Ryu JK, Kim J, Lee YB, Cho KG, Oh YJ, Maeng SH, Baik HH, Kim SU, Jin BK (2001) GT1b ganglioside induces death of dopaminergic neurons in rat mesencephalic cultures. *Neuroreport.* 12:611-614.
- Cohen G, Heikkila RE (1974) The generation of hydrogen peroxide, superoxide radical, and hydroxyl radical by 6-hydroxydopamine, dialuric acid, and related cytotoxic agents. *J Biol. Chem.* 249:2447-2452.
- Crawley JN (1991) Cholecystokinin-dopamine interactions. *Trends Pharmacol Sci.* 12:232-236.
- Croisier E, Moran LB, Dexter DT, Pearce RK, Graeber MB (2005) Microglial inflammation in the parkinsonian substantia nigra: relationship to alpha-synuclein deposition. *J. Neuroinflammation.* 2:14.
- Dahlström A, Fuxe K (1964) Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia.* 15:398-399.
- Danner H, Pfister C (1982) 7 types of neurons in the substantia nigra of the rat. Golgi rapid-impregnation study. *J. Hirnforsch.* 23:553-556.
- Dauer W, Kholodilov N, Vila M, Trillat AC, Goodchild R, Larsen KE, Staal R, Tieu K, Schmitz Y, Yuan CA, Rocha M, Jackson-Lewis V, Hersch S, Sulzer D, Przedborski S, Burke R, Hen R (2002) Resistance of alpha -synuclein null mice to the parkinsonian neurotoxin MPTP. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 99:14524–14529.
- Davey GP, Tipton KF and Murphy MP (1992) Uptake and accumulation of 1-methyl-4-phenylpyridinium by rat liver mitochondria measured using an ion-selective electrode. *Biochem. J.* 288, 439-443.
- Dawson VL, Dawson TM, London ED, Brecht DS, Snyder SH (1991) Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88:6368-6371.
- De la Monte SM1, Wands JR (2008) Alzheimer's disease is type 3 diabetes-evidence reviewed. *J Diabetes Sci Technol.* 2:1101-13.
- De Pablos RM, Herrera AJ, Villarán RF, Cano J, Machado A (2005) Dopamine-dependent neurotoxicity of lipopolysaccharide in substantia nigra. *FASEB J.* 19:407-409.
- De Pablos R.M., Villarán R.F., Argüelles S., Herrera A.J., Venero J.L., Ayala A., Cano J., and Machado A (2006) Stress increases vulnerability to inflammation in the rat prefrontal cortex. *J. Neurosci.* 26, 5709-5719.
- De Pablos R.M., Herrera A.J., Espinosa-Oliva A.M., Sarmiento M., Muñoz M.F., Machado A., and Venero J.L (2014) Chronic stress enhances microglia activation and exacerbates death of nigral dopaminergic neurons under conditions of inflammation. *J Neuroinflammation.* 11:34.
- De Rijk MC, Rocca WA, Anderson DW, Melcon MO, Breteler MM, Maraganore DM (1997) A population perspective on diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Neurology.* 48:1277-81.
- Delgado JM, Lerma J, Martín del Río R, Solís JM (1984) Dialytrode technology and local profiles of amino acids in the awake cat brain. *J Neurochem.* 42:1218-28.
- Detaille D, Guigas B, Chauvin C, Batandier C, Fontaine E, Wiernsperger N, Leverve X (2005) Metformin prevents high-glucose-induced endothelial cell death through a mitochondrial permeability transition-dependent process. *Diabetes.* 54:2179–2187.
- Diamanti-Kandarakis E, Christakou CD, Kandaraki E, Economou FN (2010) Metformin: an old medication of new fashion: evolving new molecular mechanisms and clinical implications in polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol.* 162:193-212.

- Downey JS, Han J (1998) Cellular activation mechanisms in septic shock. *Front. Biosci.* 3:468-476.
- Drechsel DA, Liang L, Patel M (2007) 1-Methyl-4-phenylpyridinium-induced alterations of glutathione status in immortalized rat dopaminergic neurons. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 220: 341-348.
- El-Mir MY, Nogueira V, Fontaine E, Averet N, Rigoulet M, Leverve X (2000) Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I. *J Biol Chem.* 275:223–228.
- El-Mir MY, Detaille D, GRV, Delgado-Esteban M, Guigas B, Attia S, Fontaine E, Almeida A, Leverve X (2008) Neuroprotective role of antidiabetic drug metformin against apoptotic cell death in primary cortical neurons. *J Mol Neurosci.* 34:77–87.
- Faber-Zuschratter H, Wolf G (1994) Ultrastructural distribution of NADPH-diaphorase in cortical synapses. *Neuroreport.* 5:2029-2032.
- Fallon JH, Seroogy KB (1985) The distribution and some connections of cholecystokinin neurons in the rat brain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 448:121-132.
- Fallon JH, Wang C, Kim Y, Canepa N, Loughlin S, Seroogy K (1983) Dopamine- and cholecystokinin-containing neurons of the crossed mesostriatal projection. *Neurosci. i Lett.* 40:233-238.
- Fernagut PO, Chesselet MF (2004) Alpha-synuclein and transgenic mouse models. *Neurobiol Dis.* 17:123-30.
- Fink JS, Smith GP (1990) Mesolimbocortical dopamine terminal fields are necessary for normal locomotor and investigatory exploration in rats. *Brain Research.* 199:359-384.
- Fleming IN, Elliott CM, Exton JH (1996) Differential translocation of rho family GTPases by lysophosphatidic acid, endothelin-1, and platelet-derived growth factor. *J Biol Chem.* 271:33067-73.
- Floor E, Wetzel MG (1998) Increased protein oxidation in human substantia nigra pars compacta in comparison with basal ganglia and prefrontal cortex measured with an improved dinitrophenylhydrazine assay. *J Neurochem.* 70:268-75.
- Forno LS (1982) Pathology of Parkinson's disease. *Movement disorders.* 2:25-40.
- Frey EA, Miller DS, Jahr TG, Sundan A, Bazil V, Espevik T, Finlay BB, Wright SD (1992) Soluble CD14 participates in the response of cells to lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* 176, 1665-1671.
- Gallego M, Setién R, Izquierdo MJ, Casis O, Casis E (2003) Diabetes-induced biochemical changes in central and peripheral catecholaminergic systems. *Physiol Res.* 52:735–741.
- Gandhi S, Vaarmann A, Yao Z, Duchon MR, Wood NW, Abramov AY (2012) Dopamine induced neurodegeneration in a PINK1 model of Parkinson's disease. *PLoS One.* 7:e37564.
- Gao HM, Liu B, Zhang W, Hong JS (2003a) Synergistic dopaminergic neurotoxicity of MPTP and inflammogen lipopolysaccharide: relevance to the etiology of Parkinson's disease. *FASEB J.* 17:1957-1959.
- Gao HM, Liu B, Zhang W, and Hong J, S (2003b) Novel anti- inflammatory therapy for Parkinson's disease. *Trends Pharmacol. Sci.* 24: 395–401.
- Garthwaite J, Boulton CL (1995) Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annu Rev Physiol.* 57:683-706.
- Geloso MC, Vinesi P, Michetti F (1998) Neuronal subpopulations of developing rat hippocampus containing different calcium-binding proteins behave distinctively in trimethyltin-induced neurodegeneration. *Exp Neurol.* 154:645-653.

- Gerfen CR (1992) The nigrostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization. *Trends Neurosci.* 15:133-139.
- Gerfen CR, Baimbridge KG, Miller JJ (1985) The neostriatal mosaic: compartmental distribution of calcium-binding protein and parvalbumin in the basal ganglia of the rat and monkey. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82: 8780-8784.
- Gerlach M, Riederer P (1996) Animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with the phenomenology of the disease in man. *J. Neural Transm.* 103:987-1041.
- German DC, Manaye KF (1993) Midbrain dopaminergic neurons (nuclei A8, A9, and A10): three-dimensional reconstruction in the rat. *J Comp Neurol.* 331:297-309.
- Ghosh S, May MJ, Kopp EB (1998) NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 16:225-260.
- Giordano S, Lee J, Darley-Usmar VM, Zhang J (2012) Distinct effects of rotenone, 1-methyl-4-phenylpyridinium and 6-hydroxydopamine on cellular bioenergetics and cell death. *PLoS One.* 7:e44610.
- Giovanni A, Sonsalla PK, Heikkila E (1994) Studies on species sensitivity to the dopaminergic neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. Part 2: Central administration of 1-methyl-4-phenylpyridinium. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 270: 1008-1014.
- Giri S, Nath N, Smith B, Viollet B, Singh AK, Singh I (2004) 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1- $\beta$ -D-ribofuranoside inhibits proinflammatory response in glial cells: a possible role of AMP-activated protein kinase. *J Neurosci.* 24, 479-487.
- Gispert S, Del Turco D, Garrett L, Chen A, Bernard DJ, Hamm-Clement J, Korf HW, Deller T, Braak H, Auburger G, Nussbaum RL (2003) Transgenic mice expressing mutant A53T human alpha-synuclein show neuronal dysfunction in the absence of aggregate formation. *Mol Cell Neurosci.* 24:419-429.
- Giulian D, Vaca K, Corpuz M (1993) Brain glia release factors with opposing actions upon neuronal survival. *J. Neurosci.* 13:29-37.
- Gluck MR, Krueger MJ, Ramsay RR et al (1994) Characterization of the inhibitory mechanism of 1-methyl-4-phenylpyridinium and 4-phenylpyridine analogs in inner membrane preparations. *J BiolChem.* 269: 3167-3174.
- Goldberg MS, Lansbury PT Jr (2000) Is there a cause-and-effect relationship between alpha-synuclein fibrillization and Parkinson's disease? *Nat Cell Biol.* 2:115-119.
- González-Hernández T, Abdala P, Rodríguez M (1997) NOS expression in nigral cells after excitotoxic and non-excitotoxic lesion of the pedunculopontine tegmental nucleus. *Eur J Neurosci.* 9:2658-2667.
- Good PF, Olanow CW, Perl DP (1992) Neuromelanin-containing neurons of the substantia nigra accumulate iron and aluminum in Parkinson's disease: a LAMMA study. *Brain Res.* 593:343-346.
- Graham DG (1978) Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinones. *Mol. Pharmacol.* 14:633-643.
- Grofová I (1975) The identification of striatal and pallidal neurons projecting to substantia nigra. An experimental study by means of retrograde axonal transport of horseradish peroxidase. *Brain Res.* 27:286-291.
- Grofová I, Deniau JM, Kitai ST (1982) Morphology of the substantia nigra pars reticulata projection neurons intracellularly labeled with HRP. *J Comp Neurol.* 208:352-368.
- Gruzman A, Babai G, Sasson S (2009) Adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) as a new target for antidiabetic drugs: a review on metabolic, pharmacological and chemical considerations. *Rev Diabet Stud.* 6:13-36.

- Gu M, Cooper JM, Taanman JM, Schapira AH (1998) Mitochondrial DNA transmission of the mitochondrial defect in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 44:177-186.
- Gundersen HJ, Bagger P, Bendtsen TF et al. (1988) The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS.* 96, 857–981.
- Gunton JE, Delhanty PJ, Takahashi S, Baxter RC (2003) Metformin rapidly increases insulin receptor activation in human liver and signals preferentially through insulin-receptor substrate-2. *J Clin Endocrinol Metab.* 88:1323-32.
- Haber SN (1968) Neurotransmitters in the human and nonhuman primate basal ganglia. *Human Neurobiol.* 5:159-168.
- Hanisch UK, Kettenmann H (2007) Microglia: active sensor and versatile effectors cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci.* 10, 1387–1394.
- Hantraye P, Brouillet E, Ferrante R, Palfi S, Dolan R, Matthews RT, Beal MF (1996) Inhibition of neuronal nitric oxide synthase prevents MPTP-induced parkinsonism in baboons. *Nat Med.* 2:1017-1021.
- Hasegawa E, Takeshige K, Oishi T et al. (1990) 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>) induces NADH-dependent superoxide formation and enhances NADH-dependent lipid peroxidation in bovine heart submitochondrial particles. *Biochem. Biophys Res Commun.* 170: 1049–1055.
- Hattori T, Fibiger HC, McGeer PL (1975) Demonstration of a pallido-nigral projection innervating dopaminergic neurons. *J Comp Neurol.* 162:487-504.
- Hayakawa M, Jayadev S, Tsujimoto M, Hannun YA, Ito F (1996) Role of ceramide in stimulation of the transcription of cytosolic phospholipase A2 and cyclooxygenase 2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 220:681-686.
- Heikkila RE, Hess A, Duvoisin RC (1984) Dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine in mice. *Science.* 224:1451-3.
- Heikkila RE, Hwang J, Ofori S, Geller HM and Niklas WJ (1990) Potentiation by the tetraphenylboron anion of the effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and its pyridinium metabolite. *J. Neurochem.* 54, 743-750.
- Heizmann CW (1984) Parvalbumin, a relaxing factor in muscle and a neuronal marker in brain. *Prog Clin Biol Res.* 168:205-210.
- Heizmann CW, Braun K (1992) Changes in Ca(2+)-binding proteins in human neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci.* 15:259-264.
- Henn IH, Bouman L, Schlehe JS, Schlierf A, Schramm JE, Wegener E, Nakaso K, Culmsee C, Berninger B, Krappmann D, Tatzelt J, Winklhofer KF (2007) Parkin mediates neuroprotection through activation of IκB kinase/nuclear factor-κB signaling. *J Neurosci.* 27:1868-78.
- Hernández-Romero MC, Argüelles S, Villarán, RF, de Pablos RM, Delgado-Cortés MJ, Santiago, M. Herrera, AJ, Cano J, and Machado, A (2008) Simvastatin prevents the inflammatory process and the dopaminergic degeneration induced by the intranigral injection of lipopolysaccharide. *J. Neurochem.* 105, 445-459.
- Herrera AJ, Castano A, Venero JL, Cano J, Machado A (2000) The single intranigral injection of LPS as a new model for studying the selective effects of inflammatory reactions on dopaminergic system. *Neurobiol Dis.* 7:429-447.
- Herrera AJ, Tomás-Camardiel M, Venero JL, Cano J, and Machado A (2005) Inflammatory process as a determinant factor for the degeneration of substantia nigra dopaminergic neurons. *J. Neural. Transm.* 112, 111-119.
- Herrera AJ, de Pablos RM, Carreño-Müller E, Villarán RF, Venero JL, Tomás-Camardiel, M, Cano J, Machado A (2008) The intrastratial injection of thrombin in rat induced

- a retrograde apoptotic degeneration of nigral dopaminergic neurons through synaptic elimination. *J. Neurochem.* 105, 750-762.
- Hinke SA, Martens GA, Cai Y, Finsi J, Heimberg H, Pipeleers D, Van de Casteele M (2007) Methyl succinate antagonises biguanide-induced AMPK-activation and death of pancreatic beta-cells through restoration of mitochondrial electron transfer. *Br J Pharmacol.* 150:1031–1043.
- Hirsch EC, Hunot S, Damier P, Faucheux B (1998) Glial cells and inflammation in Parkinson's disease: a role in neurodegeneration? *Ann. Neurol.* 44:115-120.
- Hökfelt T, Johansson O, Goldstein M (1984) Chemical anatomy of the brain. *Science.* 225:1326-1334.
- Hoppel CL, Greenblatt D, Kwok HC, Arora PK, Singh MP and Sayre LM (1987) Inhibition of mitochondrial respiration by analogs of 4-phenylpyridine and 1-methyl-4-phenylpyridinium cation (MPP+), the neurotoxic metabolite of MPTP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 148, 684-693.
- Hu G, Jousilahti P, Bidel S, Antikainen R, Tuomilehto J (2007) Type 2 diabetes and the risk of Parkinson's disease. *Diabetes Care.* 30: 842–847.
- Hu S, Martella A, Anderson WR, Chao CC (1994) Role of cytokines in lipopolysaccharide-induced functional and structural abnormalities of astrocytes. *Glia.* 10:227-234.
- Hunot S, Brugg B, Ricard D, Michel PP, Muriel MP, Ruberg M, Faucheux BA, Agid Y, Hirsch EC (1997) Nuclear translocation of NF-kappaB is increased in dopaminergic neurons of patients with parkinson disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94:7531-7536.
- Hunot S, Dugas N, Faucheux B, Hartmann A, Tardieu M, Debre P, Agid Y, Dugas B, Hirsch EC (1999) FcepsilonRII/CD23 is expressed in Parkinson's disease and induces, in vitro, production of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha in glial cells. *J. Neurosci.* 19:3440-3447.
- Hunot S, Hirsch EC (2003) Neuroinflammatory processes in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 53:49-58.
- Hsu CC1, Wahlqvist ML, Lee MS, Tsai HN (2011) Incidence of dementia is increased in type 2 diabetes and reduced by the use of sulfonylureas and metformin. *J Alzheimers.* 24:485-93.
- Iacopino AM1, Rhoten WB, Christakos S (1990) Calcium binding protein (calbindin-D28k) gene expression in the developing and aging mouse cerebellum. *Brain Res Mol Brain Res.* 8:283-90.
- Iacopino A, Christakos S, German D, Sonsalla PK, Altar CA (1992) Calbindin-D28K-containing neurons in animal models of neurodegeneration: possible protection from excitotoxicity. *Brain Res Mol Brain Res.* 13:251-61.
- Imfeld P, Bodmer M, Jick SS, Meier CR (2012) Metformin, other antidiabetic drugs, and risk of Alzheimer's disease: a population-based case-control study. *J Am Geriatr Soc.* 60:916-21.
- Isacson O, Fischer W, Victorin K, Dawbarn D, Bjorklund A (1987) Astroglial response in the excitotoxically lesioned neostriatum and its projection areas in the rat. *Neuroscience.* 20:1043-1056.
- Isoda K, Young JL, Zirlik A, MacFarlane LA, Tsuboi N, Gerdes N, et al. (2006) Metformin inhibits proinflammatory responses and nuclear factor-κB in human vascular wall cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 26:611-617.
- Jackson-Lewis V, Jakowec M, Burke RE, Przedborski S (1995) Time course and morphology of dopaminergic neuronal death caused by the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Neurodegeneration.* 4:257–269.

- Jackson-Lewis V, Przedborski S (2007) Protocol for the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Nat Protoc.* 2:141–151.
- Javitch JA, D'Amato RJ, SM, Snyder SH (1985) Parkinsonism-inducing MPTP; uptake of the metabolite MMP<sup>+</sup> by dopamine neurons explains selective toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82:2173-2177.
- Jenner P (1998) Oxidative mechanisms in nigral cell death in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 13:24-34.
- Jones SR, Garris PA, Kilts CD, Wightman RM (1995) Comparison of dopamine uptake in the basolateral amygdaloid nucleus, caudate-putamen, and nucleus accumbens of the rat. *J. Neurochem.* 64:2581-2589.
- Jorgensen MB, Finsen BR, Jensen MB, Castellano B, Diemer NH, Zimmer J (1993) Microglial and astroglial reactions to ischemic and kainic acid-induced lesions of the adult rat hippocampus. *Exp. Neurol.* 120:70-88.
- Joseph CK, Wright SD, Bornmann WG, Randolph JT, Kumar ER, Bittman R, Liu J, Kolesnick RN (1994) Bacterial lipopolysaccharide has structural similarity to ceramide and stimulates ceramide-activated protein kinase in myeloid cells. *J. Biol. Chem.* 269:17606-17610.
- Kahle PJ, Neumann M, Ozmen L, Muller V, Jacobsen H, Schindzielorz A, Okochi M, Leimer U, van Der Putten H, Probst A, Kremmer E, Kretzschmar HA, Haass C (2000) Subcellular localization of wild-type and Parkinson's disease-associated mutant alpha -synuclein in human and transgenic mouse brain. *J Neurosci.* 20:6365-6373.
- Kalariya NM, Shoeb M, Ansari NH, Srivastava SK, Ramana KV (2012) Antidiabetic dr metformin suppresses endotoxin-induced uveitis in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 53:3431-3440.
- Kickstein E, Krauss S, Thornhill P, Rutschow D, Zeller R, Sharkey J, Williamson R, Fuchs M, Köhler A, Glossmann H, Schneider R, Sutherland C, Schweiger S (2010) Biguanide metformin acts on tau phosphorylation via mTOR/protein phosphatase 2A (PP2A) signaling. *Proc Natl Acad Sci USA.* 107: 21830-5.
- Kimelberg HK, Ransom BR (1986) Physiological and pathological aspects of astrocytes swelling. En: *Astrocytes, Cell Biology and Pathology of Astrocytes.* Ed. Fedoroff S. y Vernadakis A. Academic Press, Orlando. Vol.: 3, pp.129-166.
- Kissinger PT (1996) Electrochemical detection in bioanalysis. *J Pharm Biomed Anal.* 14:871-80.
- Koh SJ, Kim JM, Kim IK, Ko SH, Kim JS (2014) Anti-inflammatory mechanism of metformin and its effects in intestinal inflammation and colitis-associated colon cancer. *J Gastroenterol Hepatol.* 29:502-10.
- Kozak W, Klir JJ, Conn CA, Kluger MJ (1997) Attenuation of lipopolysaccharide fever in rats by protein kinase C inhibitors. *Am. J. Physiol.* 273:873-879.
- Krueger MJ, Sablin SO, Ramsay R and Singer TP (1993) Reactivation of NADH dehydrogenase (complex I) inhibited by 1-methyl-4-(4'-alkylphenyl) pyridinium analogues: a clue to the nature of the inhibition site. *J. Neurochem.* 61:1546-1548.
- Kuo CL, Ho FM, Chang MY, Prakash E, Lin WW (2008) Inhibition of lipopolysaccharide-induced inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 gene expression by 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside is independent of AMP-activated protein kinase. *J Cell Biochem.* 103:931-940.
- Labuzek K, Liber S, Gabryel B, Okopień B (2010) Metformin has adenosine-monophosphate activated protein kinase (AMPK)-independent effects on LPS-stimulated rat primary microglial cultures. *Pharmacol Rep.* 62:827-848.

- Langston JW, Irwin I, Langston EB, Forno LS (1984) 1-Methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP<sup>+</sup>): identification of a metabolite of MPTP, a toxin selective to the substantia nigra. *Neurosci. Lett.* 48: 87-92.
- Langston JW, Irwin I (1986) MPTP: current concepts and controversies. *Clin Neuropharmacol.* 9:485-507.
- Lawson LJ, Perry VH, Dri P, Gordon S (1990) Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience.* 39:151-170
- Le W, Rowe D, Xie W, Ortiz I, He Y, Appel SH (2001) Microglial activation and dopaminergic cell injury: an in vitro model relevant to Parkinson's disease. *J Neurosci.* 21:8447-8455.
- Lee SC, Liu W, Dickson DW, Brosnan CF, Berman JW (1993) Cytokine production by human fetal microglia and astrocytes. Differential induction by lipopolysaccharide and IL-1 beta. *J. Immunol.* 150:2659-2667.
- Lee JC, Laydon JT, McDonnell PC, Gallagher TF, Kumar S, Green D, McNulty D, Blumenthal MJ, Heys JR, Landvatter SW (1994) A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature.* 372:739-746.
- Lee JY, Cole TB, Palmiter RD, Suh SW, Koh JY (2002) Contribution by synaptic zinc to the gender-disparate plaque formation in human Swedish mutant APP transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:7705-7710.
- Lees AJ (1997) Trauma and Parkinson disease. *Rev. Neurol.* 153:541-546.
- Lees AJ, Hardy J, Revesz T (2009) Parkinson's disease. *Lancet.* 373:2055-2066.
- Lei SZ, Pan ZH, Aggarwal SK, Chen HS, Hartman J, Sucher NJ, Lipton SA (1992) Effect of nitric oxide production on the redox modulatory site of the NMDA receptor-channel complex. *Neuron.* 8:1087-1099.
- Lei P, Ayton S, Finkelstein DI, Adlard PA, Masters CL, Bush AI (2010) Tau protein: relevance to Parkinson's disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 42, pp. 1775–1778.
- Leisman G, Melillo R (2013) The basal ganglia: motor and cognitive relationships in a clinical neurobehavioral context. *Rev Neurosci.* 24:9-25.
- Li Z, Jansen M, Pierre SR, Figueiredo-Pereira ME (2003) Neurodegeneration: linking ubiquitin/proteasome pathway impairment with inflammation. *Int J Biochem Cell Biol.* 35:547-552.
- Li L, Mamputu JC, Wiernsperger N, Renier G (2005) Signaling pathways involved in human vascular smooth muscle cell proliferation and matrix metalloproteinase-2 expression induced by leptin: inhibitory effect of metformin. *Diabetes.* 54:2227–2234.
- Li J, Deng J, Sheng W, Zuo Z (2012) Metformin attenuates Alzheimer's disease-like neuropathology in obese, leptin-resistant mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 101: 564-574.
- Liang CL, Sinton CM, German DC (1996) Midbrain dopaminergic neurons in the mouse: co-localization with Calbindin-D28K and calretinin. *Neuroscience.* 75:523-533.
- Lindvall O, Björklund A (1978) Anatomy of the dopaminergic neuron systems in the rat brain. *Adv Biochem Psychopharmacol.* 19:1-23.
- Liu D, Smith CL, Barone FC, Ellison JA, Lysko PG, Li K, Simpson IA (1999) Astrocytic demise precedes delayed neuronal death in focal ischemic rat brain. *Mol. Brain Res.* 68:29–41.
- Ma TC, Buescher JL, Oatis B, Funk JA, Nash AJ, Carrier RL, Hoyt KR (2007) Metformin therapy in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Neurosci Lett.* 411: 98–103.

- Maccarrone M, Bari M, Battista N, Di Rienzo M, Falciglia K, Finazzi-Agrò A (2001) Oxidation products of polyamines induce mitochondrial uncoupling and cytochrome c release. *FEBS Lett.* 507:30-4.
- Mamputu JC, Wiernsperger NF, Renier G (2003) Antiatherogenic properties of metformin: the experimental evidence. *Diabetes Metab.* 29, 6S71–6S76.
- Marchetti B, Abbracchio MP (2004) To be or not to be (inflamed) — is that the question in anti-inflammatory drug therapy of neurodegenerative disorders?. *Trends Pharmacol. Sci.* 26:517–525.
- Markey SP, Johannessen JN, Chiueh CC, Burns RS, Herkenham MA (1984) Intraneuronal generation of a pyridinium metabolite may cause drug-induced parkinsonism. *Nature.* 311: 464-467.
- Masliah E, Rockenstein E, Veinbergs I, Mallory M, Hashimoto M, Takeda A, Sagara Y, Sisk A, Mucke L (2000) Dopaminergic loss and inclusion body formation in alpha-synuclein mice: implications for neurodegenerative disorders. *Science.* 287:1265-1269.
- Matsuda W, Furuta T, Nakamura KC, Hioki H, Fujiyama F, Arai R, Kaneko T (2009) Single nigrostriatal dopaminergic neurons form widely spread and highly dense axonal arborizations in the neostriatum. *J Neurosci.* 29:444-53.
- Matsuoka K, Taya C, Kubo S, Toyama-Sorimachi N, Kitamura F, Ra C, Yonekawa H, Karasuyama H (1999) Establishment of antigen-specific IgE transgenic mice to study pathological and immunobiological roles of IgE in vivo. *Int Immunol.* 11:987-994.
- Mattson MP, Rydel RE (1996) Alzheimer's disease. Amyloid ox-tox transducers. *Nature.* 382:674-675.
- May MJ, Ghosh S (1998) Signal transduction through NF-kappa B. *Immunol. Today.* 19:80-88.
- Mayeux PR (1997) Pathobiology of lipopolysaccharide. *J Toxicol Environ Health.* 51:415-35.
- McGeer EG, McGeer PL (1980) Aging and neurotransmitter systems. *Adv Biochem Psychopharmacol.* 23:305-14.
- McGeer PL, Itagaki S, Akiyama H, McGeer EG (1988a) Rate of cell death in parkinsonism indicates active neuropathological process. *Ann. Neurol.* 24:574-576.
- McGeer PL, Itagaki S, Boyes BE, McGeer EG (1988b) Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology.* 38:1285–1291.
- McGeer PL, McGeer EG (2004) Inflammation and neurodegeneration in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 10:3–7.
- McGeer EG, McGeer PL (2007) The role of anti-inflammatory agents in Parkinson's disease. *CNS Drugs.* 21:789-797.
- McGuire TR, Bociek GR, Pavletic SZ, Hock L, Lynch J, Schneider J, Hoie EB, Tarantolo S, Haire WD (2001) Organ dysfunction following stem cell transplantation: relationship to plasma cytokine concentrations. *Bone Marrow Transplant.* 28:889-893.
- McNaught KS, Olanow CW (2003) Proteolytic stress: a unifying concept for the etiopathogenesis of Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 3:73-84.
- McRitchie DA, Halliday GM (1995) Calbindin D28k-containing neurons are restricted to the medial substantia nigra in humans. *Neuroscience.* 65:87-91.
- McRitchie DA, Cartwright H, Pond S, van der Schyf CJ, Castagnoli N Jr., van der Nest D, Halliday GM (1996) The midbrain dopaminergic cell groups in the baboon *Papio ursinus*. *Brain. Res. Bull.* 47: 611-623.

- Minghetti L, Polazzi E, Nicolini A, Greco A, Levi G (1999) Possible role of microglial prostanoids and free radicals in neuroprotection and neurodegeneration. *Adv. Exp. Med. Biol.* 468:109-119.
- Mogi M, Harada M, Riederer P, Narabayashi H, Fujita K, Nagatsu T (1994) Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) increases both in the brain and in the cerebrospinal fluid from parkinsonian patients. *Neurosci Lett.* 165:208-210.
- Mogi M, Togari A, Ogawa M, Ikeguchi K, Shizuma N, Fan D, Nakano I, Nagatsu T (1998) Effects of repeated systemic administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) to mice on interleukin-1beta and nerve growth factor in the striatum. *Neurosci. Lett.* 250:25-28.
- Montero-Menei CN, Sindji L, Pouplard-Barthelaix A, Jehan F, Denechaud L, Darcy F (1994) Lipopolysaccharide intracerebral administration induces minimal inflammatory reaction in rat brain. *Brain Res.* 653:101-111.
- Montero-Menei CN, Sindji L, Garcion E, Mege M, Couez D, Gamelin E, Darcy F (1996) Early events of the inflammatory reaction induced in rat brain by lipopolysaccharide intracerebral injection: relative contribution of peripheral monocytes and activated microglia. *Brain Res.* 724:55-66.
- Moore EM, Mander AG, Ames D, Kotowicz MA, Carne RP, Brodaty H, Woodward M, Boundy K, Ellis KA, Bush AI, Faux NG, Martins R, Szoeki C, Rowe C, Watters DA; AIBL Investigators (2013) Increased risk of cognitive impairment in patients with diabetes is associated with metformin. *Diabetes Care.* 36:2981-7.
- Morales R, Green KM, Soto C (2009) Cross currents in protein misfolding disorders: interactions and therapy. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 8:363-71.
- Moriizumi T, Hattori T (1992) Ultrastructural morphology of projections from the medial geniculate nucleus and its adjacent region to the basal ganglia. *Brain Res Bull.* 29:193-198.
- Mugnaini E (1985) GABA neurons in the superficial layers of the rat dorsal cochlear nucleus: light and electron microscopic immunocytochemistry. *J Comp Neurol.* 235:61-81.
- Musi N, Hirshman MF, Nygren J, Svanfeldt M, Bavenholm P, Rooyackers O, et al. (2002) Metformin increases AMP-activated protein kinase activity in skeletal muscle of subjects with type 2 diabetes. *Diabetes.* 51: 2074-2081.
- Muthane U, Ramsay KA, Jiang H, Jackson-Lewis V, Donaldson D, Fernando S, Ferreira M, Przedborski S (1994) Differences in nigral neuron number and sensitivity to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in C57/bl and CD-1mice. *Exp Neurol.* 126:195-204.
- Nakano M, Saito S, Nakano Y, Yamasu H, Matsuura M, Shinomiya H (1993) Intracellular protein phosphorylation in murine peritoneal macrophages in response to bacterial lipopolysaccharide (LPS): effects of kinase-inhibitors and LPS-induced tolerance. *Immunobiology.* 187:272-282.
- Natali A, Ferrannini E (2006) Effects of metformin and thiazolidinediones on suppression of hepatic glucose production and stimulation of glucose uptake in type 2 diabetes: a systematic review. *Diabetologia.* 49:434-41.
- Nath N, Khan M, Paintlia MK, Hoda MN, Giri S (2009) Metformin attenuated the autoimmune disease of the central nervous system in animal models of multiple sclerosis. *J Immunol.* 182, 8005-8014.
- Nelson EL, Liang CL, Sinton CM, German DC (1996) Midbrain dopaminergic neurons in the mouse: computer-assisted mapping. *J Comp Neurol.* 369:361-371.

- Nicklas WJ, Vyas I, Heikkila RE (1985) Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenyl-pyridine, a metabolite of the neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *Life Sci.*; 36: 2503-2508.
- O'Neill LA, Greene C (1998) Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor family: ancient signaling machinery in mammals, insects, and plants. *J. Leukoc. Biol.* 63:650-657.
- Owen MR, Doran E and Halestrap AP (2000) Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem J.* 348:607–614.
- Palomba S, Falbo A, Zullo F, Orio F (2009) Evidence-based and potential benefits of metformin in the polycystic ovary syndrome: a comprehensive review. *Endocr Rev.* 30:1–50.
- Parent A, Mackey A, De Bellefeuille L (1983) The subcortical afferents to caudate nucleus and putamen in primate: a fluorescence retrograde double labeling study. *Neuroscience.* 10:1137-1150.
- Parent A, Hazrati LN (1995) Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain Res Brain Res Rev.* 20:91-127.
- Parker WD Jr, Boyson SJ, Parks JK (1989) Abnormalities of the electron transport chain in idiopathic Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 26:719–723.
- Patt S, Gertz HJ, Gerhard L and Cervos-Navarro J (1991) Pathological changes in dendrites of substantia nigra neurons in Parkinson's disease: a Golgi study. *Histol. Histopathol.* 6:373-380.
- Paxinos G and Watson C (1986) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* CA: Academic Press. San Diego.
- Perier C, Bove J, Wu DC, Dehay B, Choi DK, Jackson-Lewis V, Rathke-Hartlieb S, Bouillet P, Strasser A, Schulz JB, Przedborski S, Vila M (2007) Two molecular pathways initiate mitochondrially dependent dopaminergic neurodegeneration in experimental Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:8161–8166.
- Peterson LA, Caldera PS, Trevor AJ, Chiba K, Castagnoli N J (1985) Studies on the 1-methyl-4-phenyl-2,3-dihydropyridinium species 2,3-MPDP<sup>+</sup>, the monoamine oxidase catalyzed oxidation product of the nigrostriatal toxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *J. Med. Chem.* 28, 1432-1436.
- Pintana H, Apaijai N, Pratchayasakul W, Chattipakorn N, Chattipakorn SC (2012) Effects of metformin on learning and memory behaviors and brain mitochondrial functions in high fat diet induced insulin resistant rats. *Life Sci.* 91: 409-414.
- Prediger RD, Batista LC, Medeiros R, Pandolfo P, Florio JC, Takahashi RN (2006) The risk is in the air: Intranasal administration of MPTP to rats reproducing clinical features of Parkinson's disease. *Exp Neurol.* 202:391-403.
- Prediger RD, Rial D, Medeiros R, Figueiredo CP, Doty RL, Takahashi RN (2009) Risk is in the air: an intranasal MPTP (1-methyl-4-phenyl 1,2,3,6-tetrahydropyridine) rat model of Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci.* 1170:629-36.
- Przedborski S, Jackson-Lewis V, Yokoyama R, Shibata T, Dawson VL, Dawson TM (1996) Role of neuronal nitric oxide in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced dopaminergic neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:4565-4571.
- Przedborski S, Vila M (2003) The 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model: a tool to explore the pathogenesis of Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 991:189–198.

- Qin L1, Wu X, Block ML, Liu Y, Breese GR, Hong JS, Knapp DJ, Crews FT (2007) Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia*. 55:453-462.
- Raggi MA, Sabbioni C, Casamenti G, Gerra G, Calonghi N, Masotti L (1999) Determination of catecholamines in human plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr B Biomed Sci*. 730:201-11.
- Rajakumar N, Elisevich K, Flumerfelt BA (1994) Parvalbumin-containing GABAergic neurons in the basal ganglia output system of the rat. *J Comp Neurol*. 8:324-336.
- Ramón y Cajal S (1911) *Histologie du Système Nerveux de l'Homme et des Vertèbres*. Maloine; Paris. France.
- Ramsay RR, Youngster SK, Nicklas WJ, McKeown KA, Jin YZ, Heikkila RE and Singer TP (1989a) Structural dependence of the inhibition of mitochondrial respiration and of NADH oxidase by 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) analogs and their energized accumulation by mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:9168-9172.
- Ramsay RR, Mehlhorn RJ and Singer TP (1989b) Enhancement by tetraphenylboron of the interaction of the 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP+) with mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 159:983-990.
- Redgrave P, Marrow L, Dean P (1992) Topographical organization of the nigrothalamic projection in rat: evidence for segregated channels. *Neuroscience*. 50:571-595.
- Reiner A, Anderson KD (1990) The patterns of neurotransmitter and neuropeptide co-occurrence among striatal projection neurons: conclusions based on recent findings. *Brain Res Brain Res Rev*. 15:251-265.
- Riachi NJ, LaManna JC, Harik SI (1989) Entry of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine into the rat brain. *J Pharmacol. Exp. Ther.* 249:744-748.
- Richwine AF, Parkin AO, Buchanan JB, Chen J, Markham JA, Juraska JM, Johnson RW (2008) Architectural changes to CA1 pyramidal neurons in adult and aged mice after peripheral immune stimulation. *Psychoneuroendocrinology*. 33:1369-1377.
- Rietschel ET and Brade H (1992) Bacterial endotoxins. *Sci. Am*. 267:54-61.
- Rockwell P, Yuan H, Magnusson R, Figueiredo-Pereira ME (2000) Proteasome inhibition in neuronal cells induces a proinflammatory response manifested by upregulation of cyclooxygenase-2, its accumulation as ubiquitin conjugates, and production of the prostaglandin PGE(2). *Arch Biochem Biophys*. 374:325-333.
- Rodrigo J, Springall DR, Uttenthal O, Bentura ML, Abadia-Molina F, Riveros-Moreno V, Martínez-Murillo R, Polak JM, Moncada S (1994) Localization of nitric oxide synthase in the adult rat brain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 345:175-221.
- Rojo AI, Montero C, Salazar M, Close RM, Fernández-Ruiz J, Sánchez-González MA, de Sagarra MR, Jackson-Lewis V, Cavada C, Cuadrado A (2006) Persistent penetration of MPTP through the nasal route induces Parkinson's disease in mice. *Eur J Neurosci*. 24:1874-1884.
- Ros-Bernal F, Hunot S, Herrero MT, Parnadeau S, Corvol JC, Lu L, Alvarez-Fischer D, Carrillo-de Sauvage MA, Saurini F, Coussieu C, Kinugawa K, Prigent A, Höglinger G, Hamon M, Tronche F, Hirsch EC, Vyas S (2011) Microglial glucocorticoid receptors play a pivotal role in regulating dopaminergic neurodegeneration in parkinsonism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108:6632-6637.
- Ross DT, Ebner FF (1990) Thalamic retrograde degeneration following cortical injury: an excitotoxic process? *Neuroscience*. 35:525-550.

- Rossetti ZL, Sotgiu A, Sharp DE, Hadjiconstantinou M, Neff NH (1988) 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and free radicals in vitro. *Biochem Pharmacol.* 37:4573-4574.
- Rotella CM, Monami M, Mannucci E (2006) Metformin beyond diabetes: new life for an old drug. *Curr Diabetes Rev.* 2:307-315.
- Ruetten H, Thiemermann C (1997) Effects of tyrphostins and genistein on the circulatory failure and organ dysfunction caused by endotoxin in the rat: a possible role for protein tyrosine kinase. *Br. J. Pharmacol.* 122:59-70.
- Ryu JK, Shin WH, Kim J, Joe EH, Lee YB, Cho KG, Oh YJ, Kim SU, Jin BK (2002) Triasiloganglioside GT1b induces in vivo degeneration of nigral dopaminergic neurons: role of microglia. *Glia.* 38:15-23.
- Sabbioni C1, Bugamelli F, Varani G, Micolini L, Musenga A, Saracino MA, Fanali S, Raggi MA (2004) A rapid HPLC-DAD method for the analysis of fluoxetine and norfluoxetine in plasma from overdose patients. *J Pharm Biomed Anal.* 36:351-6.
- Saeedi R, Parsons HL, Wambolt RB, Paulson K, Sharma V, Dyck JR, Brownsey RW, Allard MF (2008) Metabolic actions of metformin in the heart can occur by AMPK-independent mechanisms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 294, 2497–2506.
- Salminen A, Hyttinen JM, Kaarniranta K (2011) AMP-activated protein kinase inhibits NF- $\kappa$ B signaling and inflammation: impact on healthspan and lifespan. *J Mol Med (Berl).* 89:667-76.
- Sandyk R (1993) The relationship between diabetes mellitus and Parkinson's disease. *Int J Neurosci.* 69:125-130.
- Santiago JA, Potashkin JA (2013) Shared dysregulated pathways lead to Parkinson's disease and diabetes. *Trends Mol Med.* 19:176-186.
- Santiago M, Granero L, Machado A, Cano J (1995) Complex I inhibitor effect on the nigral and striatal release of dopamine in the presence and absence of nomifensine. *Eur J Pharmacol.* 280:251-256.
- Satoh J1, Kim SU (1995) Ganglioside markers GD3, GD2, and A2B5 in fetal human neurons and glial cells in culture. *Dev Neurosci.* 17:137-148.
- Sawada H1, Hishida R, Hirata Y, Ono K, Suzuki H, Muramatsu S, Nakano I, Nagatsu T, Sawada M (2007) Activated microglia affect the nigro-striatal dopamine neurons differently in neonatal and aged mice treated with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *J Neurosci Res.* 85:1752-1761.
- Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Clark JB, Jenner P, Marsden CD (1990) Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem* 54:823–827.
- Schernhammer E, Hansen J, Rugbjerg K, Wermuth L, Ritz B (2011). Diabetes and the risk of developing Parkinson's disease in Denmark. *Diabetes Care.* 34:1102-1108.
- Schletter J, Heine H, Ulmer AJ, Rietschel ET (1995) Molecular mechanisms of endotoxin activity. *Arch. Microbiol.* 164:383-389.
- Schulz JB, Matthews RT, Muqit MM et al. (1995) Inhibition of neuronal nitric oxide synthase by 7-nitroindazole protects against MPTP-induced neurotoxicity in mice. *J Neurochem.* 64: 936–939.
- Schuman EM, Madison DV (1994) Locally distributed synaptic potentiation in the hippocampus. *Science.* 263:532-536.
- Seroogy KB, Dangaran K, Lim S, Haycock JK, Fallon JH (1989) Ventral mesencephalic neurons containing both cholecystokinin- and tyrosine hydroxylase-like immunoreactivities project to forebrain regions. *J. Comp. Neurol.* 279:397–414.
- Shaftel SS1, Kyrkanides S, Olschowka JA, Miller JN, Johnson RE, O'Banion MK (2007) Sustained hippocampal IL-1 beta overexpression mediates chronic

- neuroinflammation and ameliorates Alzheimer plaque pathology. *J Clin Invest.* 117:1595-1604.
- Shapira L, Takashiba S, Champagne C, Amar S, Van Dyke TE (1994) Involvement of protein kinase C and protein tyrosine kinase in lipopolysaccharide-induced TNF-alpha and IL-1 beta production by human monocytes. *J. Immunol.* 153:1818-1824.
- Shu Y, Sheardown SA, Brown C, Owen RP, Zhang S, Castro RA, Ianculescu AG, Yue L, Lo JC, Burchard EG, Brett CM, Giacomini KM (2007) Effect of genetic variation in the organic cation transporter 1 (OCT1) on metformin action. *J Clin Invest.* 117:1422-31.
- Si QS1, Nakamura Y, Schubert P, Rudolphi K, Kataoka K (1996) Adenosine and propentofylline inhibit the proliferation of cultured microglial cells. *Exp Neurol.* 137:345-349.
- Smeyne M, Jiao Y, Shepherd KR, Smeyne RJ (2005) Glia cell number modulates sensitivity to MPTP in mice. *Glia.* 52:144-152.
- Smith Y, Parent A, Seguela P, Descarries L (1987) Distribution of GABA-immunoreactive neurons in the basal ganglia of the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). *J Comp Neurol.* 259:50-64.
- Sonoda JI, Laganière J, Mehl IR, Barish GD, Chong LW, Li X, Scheffler IE, Mock DC, Bataille AR, Robert F, Lee CH, Giguère V, Evans RM (2007) Nuclear receptor ERR alpha and coactivator PGC-1 beta are effectors of IFN-gamma-induced host defense. *Genes Dev.* 21:1909-1920.
- Sriram K, Miller DB, O'Callaghan JP (2006) Minocycline attenuates microglial activation but fails to mitigate striatal dopaminergic neurotoxicity: role of tumor necrosis factor-alpha. *J Neurochem.* 96:706-718.
- Staal RG, Sonsalla PK (2000) Inhibition of brain vesicular monoamine transporter (VMAT2) enhances 1-methyl-4-phenylpyridinium neurotoxicity in vivo in rat striata. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 293:336-342.
- Stephane X, Foretz M, Taleux N, van der Zon GC, Sokal E, Hue L, Viollet B, Guigas B (2011) Metformin activates AMP-activated protein kinase in primary human hepatocytes by decreasing cellular energy status. *Diabetologia.* 54:3101-10.
- Stromberg I, Bjorklund H, Dahl D, Jonsson G, Sundstrom E, Olson L (1986) Astrocyte responses to dopaminergic denervations by 6-hydroxydopamine and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine as evidenced by glial fibrillary acidic protein immunohistochemistry. *Brain Res. Bull.* 17:225-236.
- Su X, Maguire-Zeiss KA, Giuliano R, Prifti L, Venkatesh K, Federoff HJ (2007) Synuclein activates microglia in a model of Parkinson's disease. *Neurobiol Aging.* 29:1690-1701.
- Szczepanik AM, Fishkin DK, Rush DK, Wilmot CA (1996) Effects of chronic intrahippocampal infusion of lipopolysaccharide in the rat. *Neuroscience.* 70:57-65.
- Tanaka M, Endo K, Suzuki T, Kakita A, Takahashi H, Sata T (2000) Parkinsonism in HIV encephalopathy. *Mov. Disord.* 15:1032-1033.
- Tanke T, van de Loo JW, Rhim H, Leventhal PS, Proctor RA, Bertics PJ (1991) Bacterial lipopolysaccharide-stimulated GTPase activity in RAW 264.7 macrophage membranes. *Biochem J.* 277: 379-85.
- Tansey MG, McCoy MK, Frank-Cannon TC (2007) Neuroinflammatory mechanisms in Parkinson's disease: potential environmental triggers, pathways, and targets for early therapeutic intervention. *Exp Neurol.* 208:1-25.
- Tatton NA, Kish SJ (1997) In situ detection of apoptotic nuclei in the substantia nigra compacta of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3-tetrahydropyridine-treated mice using

- terminal deoxynucleotidyl transferase labelling and acridine orange staining. *Neuroscience*. 77:1037–1048.
- Tolosa E, Gaig C, Santamaría J, Compta Y (2009) Diagnosis and the premotor phase of Parkinson disease. *Neurology*. 72: S12-20.
- Tomás-Camardiel M, Rite, I, Herrera AJ, de Pablos RM, Cano J, Machado A, and Venero JL (2004) Minocycline reduces the lipopolysaccharide-induced inflammatory reaction, peroxynitrite-mediated nitration of proteins, disruption of the blood-brain barrier, and damage in the nigral dopaminergic system. *Neurobiol. Dis.* 16:190-201.
- Tomás-Camardiel M, Venero JL, Herrera AJ, De Pablos RM, Pintor-Toro JA, Machado A, Cano J (2005) Blood-brain barrier disruption highly induces aquaporin-4 mRNA and protein in perivascular and parenchymal astrocytes: protective effect by estradiol treatment in ovariectomized animals. *J Neurosci Res.* 80:235-246.
- Towler MC, Hardie DG (2007) AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling. *Circ Res.* 100, 328–341.
- Tretiakoff C (1919) Contributions a l'etude de l'anatomie pathologique du locus niger de soemmering avec quelques deductions relatives a la pathogenie des troubles de tonus musculaire et de la maladie de Parkinson. (Thesis, Paris).
- Ullah I, Ullah N, Naseer MI, Lee HY, Kim MO (2012) Neuroprotection with metformin and thymoquinone against ethanol-induced apoptotic neurodegeneration in prenatal rat cortical neurons. *BMC Neurosci.* 13: 11.
- Ulmer AJ, Rietschel ET, Zähringer UY, Heine H (2002) Lipopolysaccharide: structure, Bioactivity, receptors, and signal transduction. *Trsnds. Glycos. Glycotech.* 14:53-68.
- Ungerstedt U, Hallström A (1987) In vivo microdialysis a new approach to the analysis of neurotransmitters in the brain. *Life Sci.* 41:861-864.
- Valente EM1, Abou-Sleiman PM, Caputo V, Muqit MM, Harvey K, Gispert S, Ali Z, Del Turco D, Bentivoglio AR, Healy DG, Albanese A, Nussbaum R, González-Maldonado R, Deller T, Salvi S, Cortelli P, Gilks WP, Latchman DS, Harvey RJ, Dallapiccola B, Auburger G, Wood NW (2004) Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science.* 304:1158-60.
- Vila M, Jackson-Lewis V, Vukosavic S, Djaldetti R, Liberatore G, Offen D, Korsmeyer SJ, Przedborski S (2001) Bax ablation prevents dopaminergic neurodegeneration in the 1-methyl- 4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:2837–2842.
- Villarán RF, de Pablos RM, Argüelles S, Espinosa-Oliva AM, Tomás-Camardiel M, Herrera AJ, Cano J, and Machado A (2009) The intranigral injection of tissue plasminogen activator induced blood-brain barrier disruption, inflammatory process and degeneration of the dopaminergic system of the rat. *Neurotoxicology.* 30:403-413.
- Viollet B, Guigas B, Leclerc J, Hebrard S, Lantier L, Mounier R, Andreelli F, Foretz M. (2009) AMP-activated protein kinase in the regulation of hepatic energy metabolism: from physiology to therapeutic perspectives. *Acta Physiol (Oxf).* 196:81–98.
- Viollet B, Guigas B, Sanz Garcia N, Leclerc J, Foretz M, Andreelli F (2012) Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clin Sci (Lond).* 122(6):253-70.
- Vyas I, Heikkila RE, Nicklas WJ (1986) Studies on the neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: inhibition of NAD-linked substrate oxidation by its metabolite, 1-methyl-4-phenylpyridinium. *J Neurochem.* 46: 1501– 1507.
- Wahlqvist ML, Lee MS, Hsu CC, Chuang SY, Lee JT, Tsai HN (2012) Metformin-inclusive sulfonylurea therapy reduces the risk of Parkinson's disease occurring with

- Type 2 diabetes in a Taiwanese population cohort. *Parkinsonism Relat Disord.* 18:753-8.
- Wang XF, Cynader MS (2000) Astrocytes provide cysteine to neurons by releasing glutathione. *J Neurochem.* 74: 1434-1442.
- Wang J, Gallagher D, DeVito LM, Cancino GI, Tsui D, He L, Keller GM, Frankland PW, Kaplan DR, Miller FD (2012) Metformin activates an atypical PKC-CBP pathway to promote neurogenesis and enhance spatial memory formation. *Cell Stem Cell.* 11: 23-35.
- Wilcock C, Bailey CJ (1994) Accumulation of metformin by tissues of the normal and diabetic mouse. *Xenobiotica.* 49-57.
- Wilkinson BL1, Landreth GE (2006) The microglial NADPH oxidase complex as a source of oxidative stress in Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation.* 3:30.
- Williams T, Courchet J, Viollet B, Brenman JE, Polleux F (2011) AMP-activated protein kinase (AMPK) activity is not required for neuronal development but regulates axogenesis during metabolic stress. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108:5849-5854.
- Wilson SA (1914) An experimental research into the anatomy and physiology of the corpus striatum. *Brain.* 36, 427-492.
- Wu T, Wang HL (1994) CCK-8 excites substantia nigra dopaminergic neurons by increasing a cationic conductance. *Neurosci Lett.* 170:229-232.
- Wu ZH, Nie HL, Lu B, Wang Q, Ke YB (1999) Activation of G protein on the membrane of TCS-sensitive cells. *Shi Yan Sheng Wu Xue Bao.* 32(2):151-6.
- Wu DC, Jackson-Lewis V, Vila M et al. (2002) Blockade of microglial activation is neuroprotective in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson disease. *J Neurosci.* 22: 1763-1771.
- Xie L1, Helmerhorst E, Taddei K, Plewright B, Van Bronswijk W, Martins R (2002) Alzheimer's beta-amyloid peptides compete for insulin binding to the insulin receptor. *J Neurosci.* 22:RC221.
- Xu Q, Park Y, Huang X, Hollenbeck A, Blair A, Schatzkin A, Chen H (2011) Diabetes and risk of Parkinson's disease. *Diabetes Care.* 34:910-915.
- Yelnik J, François C, Percheron G, Heyner S (1987) Golgi study of the primate substantia nigra. I. Quantitative morphology and typology of nigral neurons. *J Comp Neurol.* 265:455-472.
- You ZB, Herrera-Marschitz M, Pettersson E, Nylander I, Goiny M, Shou HZ, Kehr J, Godukhin O, Hökfelt T, Terenius L, Ungerstedt U (1996) Modulation of neurotransmitter release by cholecystinin in the neostriatum and substantia nigra of the rat: regional and receptor specificity. *Neuroscience.* 74:793-804.
- Youdim MB, Riederer P (1993) The role of iron in senescence of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *J. Neural Trans Suppl.* 40:57-67.
- Yuan J, Yankner BA (2000) Apoptosis in the nervous system. *Nature.* 407:802-809.
- Zhang G, Ghosh S (2000) Molecular mechanisms of NF-kappaB activation induced by bacterial lipopolysaccharide through Toll-like receptors. *J Endotoxin Res.* 6:453-7.
- Zheng B, Liao Z, Locascio JJ, Lesniak KA, Roderick SS, Watt ML, et al (2010) PGC-1alpha, a potential therapeutic target for early intervention in Parkinson's disease. *Sci Transl Med.* 2:52ra73.
- Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ, Moller DE (2001) Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest.* 108: 1167-1174.

Zou MH, Hou XY, Shi CM, Nagata D, Walsh K, Cohen RA (2002) Modulation by peroxynitrite of Akt- and AMPactivated kinase-dependent Ser1179 phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem.* 277:32552–32557.