

Identificación y análisis de nuevas dianas terapéuticas en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

Víctor Lombardo Cristina^{1,2,a}, Jose Ángel Morales García²

1. Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biología de Sistemas, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España. 2. Instituto de Investigaciones Biomédicas A. Sols (CSIC-UAM), 28029 Madrid, España.

a. victor.lombardo@edu.uah.es

Palabras clave: Alzheimer; dianas terapéuticas; estrés oxidativo; neurodegeneración; neurogénesis; neuroinflamación; Parkinson

Resumen

Las enfermedades neurodegenerativas son una de las principales causas que afectan a la sociedad a nivel global. Están inducidas por distintos factores, pero se asocian principalmente al envejecimiento, como consecuencia del aumento en la esperanza de vida. Son difíciles de pronosticar y tratar siendo diagnosticadas en etapas avanzadas y los tratamientos disponibles palián los síntomas, pero no frenan su avance. Se caracterizan por una pérdida progresiva de neuronas en diferentes zonas del sistema nervioso, desarrollando aquellos pacientes que las padecen distintos síntomas neuropsicológicos, fundamentalmente a nivel cognitivo, emocional y conductual. Algunas de las más importantes son la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington y esclerosis amiotrófica lateral. En la búsqueda de nuevos fármacos que modifiquen el transcurso de la enfermedad es fundamental conocer en detalle los aspectos moleculares subyacentes a estas patologías, así como la alteración de las distintas rutas de señalización implicadas. Para ello, es necesario desarrollar modelos in vitro e in vivo que repliquen lo más fielmente posible los procesos celulares que acontecen en estas enfermedades. Este suele ser uno de los problemas principales a los que se enfrenta la investigación, ya que muchas de las características de estas enfermedades son de difícil reproducción en modelos celulares y animales. El presente trabajo pretende realizar una revisión bibliográfica del estado actual en investigación biomédica en el campo de las enfermedades neurodegenerativas, principalmente de la enfermedad de Alzheimer y de Parkinson con el fin de identificar nuevas dianas terapéuticas implicadas en inflamación y neurocitotoxicidad. En estos últimos años está cobrando importancia la investigación en el campo de la neurogénesis, con el fin de estimular la formación de nuevas neuronas. Por ello, este trabajo pretende identificar nuevas dianas terapéuticas con efecto neuroprotector y antiinflamatorios, que a su vez puedan tener actividad neurogénica.

Cita: Lombardo Cristina, Víctor; Morales García, Jose Ángel (2020) Identificación y análisis de nuevas dianas terapéuticas en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. *dianas* 9 (2): e202009fa10. ISSN 1886-8746 (electronic) [journal.dianas.e202009fa10](http://www3.uah.es/dianas?e202009fa10) <http://www3.uah.es/dianas?e202009fa10>. URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>

Copyright: © Lombardo-Cristina V, Morales-García J. Algunos derechos reservados. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObrasDerivada 4.0 Internacional. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Introducción

Enfermedades neurodegenerativas

Las enfermedades neurodegenerativas tienen una gran prevalencia a nivel global con una etiología muy heterogénea, lo que dificulta la existencia de tratamientos efectivos para combatir las, y de técnicas específicas para su detección en etapas tempranas [1]. Existen diferentes factores de riesgo que pueden incentivar y promover su desarrollo, como por ejemplo la edad, siendo el envejecimiento de la población uno de los principales problemas [2]. Entre las enfermedades neurodegenerativas de mayor incidencia destacan el Alzheimer, Parkinson, Huntington, y esclerosis amiotrófica lateral. El presente trabajo se centra en las dos con mayor prevalencia, la enfermedad de Alzheimer y Parkinson.

Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la enfermedad más común dentro de las enfermedades neurodegenerativas, siendo diagnosticada en el 80% de los pacientes con demencia. Afecta más a mujeres que a hombres y su incidencia es mayor a partir de los 65 años. Se caracteriza por su carácter multifactorial, con factores que intervienen en su desarrollo como los genéticos, el estrés y la edad [3, 4].

En relación a los marcadores neuropatológicos propios de la enfermedad, los más importantes son: 1) acumulación de ovillos neurofibrilares (NFTs) inducido por la hiperfosforilación de la proteína tau; 2) formación de placas seniles por la agregación del péptido β -amiloide ($A\beta$) y 3) alteración de la actividad colinérgica por la muerte de neuronas del hipocampo y la corteza cerebral [1, 4-6]. Como consecuencia se

producen una serie de síntomas asociados como son el deterioro de la memoria y funciones cognitivas (lenguaje y capacidad de razonamiento) y alteraciones neuropsiquiátricas (delirios y apatía) que se van acentuando según avanza la enfermedad [7]. Los enfermos de Alzheimer pasan por distintas fases en las que se van acentuando los síntomas. Primero hay una fase asintomática, seguida por una etapa temprana caracterizada por problemas en el lenguaje, dificultad en la realización de tareas, pérdida leve de memoria o cierta agresividad. La fase de enfermedad moderada es la etapa media siendo la más prolongada en el tiempo y en la que los pacientes padecen cambios de humor, confusión, repetición de actos y pérdida de memoria. Finalmente, en la etapa avanzada se acentúa la pérdida de memoria y funciones cognitivas, necesitando asistencia externa [8].

Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común a nivel mundial, [7, 9]. Actualmente se desconoce la causa que lo origina, aunque las evidencias científicas apuntan a una combinación de factores genéticos y ambientales que podrían causar un daño oxidativo. Sin duda, el principal factor de riesgo es la edad, con una incidencia mayor en personas entre 60-65 años. En general afecta un 1-2% de la población, más a hombres que a mujeres [7, 9, 10]. Además, en los últimos años cada vez son más los estudios que sugieren una posible relación entre el desarrollo del Parkinson y el intestino [11, 12].

Una de las principales características fisiopatológicas de esta enfermedad es la pérdida de neuronas dopaminérgicas (DAs) en la sustancia negra *pars compacta* (SNpc) de la región mesencefálica, lo que provoca un déficit dopaminérgico en la vía nigroestriatal [9, 13, 14]. Los síntomas se detectan en etapas avanzadas cuando se han perdido aproximadamente un 70% de las terminaciones DAs en el cuerpo estriado y más de la mitad de las neuronas en SNpc [10, 14]. Las primeras evidencias de esta patología son los síntomas motores clínicos como temblores, rigidez, bradiquinesia e inestabilidad postural, entre otras [15-17]. Los pacientes también pueden desarrollar síntomas no motores relacionados con alteraciones neuropsiquiátricas como depresión, ansiedad, demencia, confusión, alteraciones en el sueño, alteraciones cognitivas o pérdida olfativa [16, 18]. Con respecto al desarrollo de EP, se establecieron seis etapas según la sintomatología y el avance de la enfermedad. Etapa 1 de Braak, con daño en el bulbo y el núcleo anterior olfatorio. Etapa 2 de Braak, con afectación del tronco encefálico inferior. En ambas etapas aparecen alteraciones del olfato, del sueño y del sistema nervioso autónomo como disfunción cardíaca [19], sudoración anormal y/o alteración gastrointestinal [20]. En las etapas 3 y 4 de Braak, se repiten los síntomas motores mencionados anteriormente con mayor afectación del SN y otros núcleos del cuerpo estriado. Por último, las etapas 5 y 6 de Braak están relacionadas con la presencia de cuerpos de Lewy en estructuras límbicas y neocorteza madura [18]. Al no existir un tratamiento que revierta o detenga el progreso de la enfermedad, es necesario desarrollar nuevos fármacos que eviten la degeneración de las neuronas DAs.

Factores inductores de la neurodegeneración: neuroinflamación, neurotoxicidad y estrés oxidativo.

La caracterización de los fenómenos celulares y moleculares asociados al inicio y progreso de estas enfermedades es primordial para el desarrollo de nuevos tratamientos y terapias efectivas. Muchas de esas características son comunes a las distintas enfermedades, por lo que podrían estar involucradas y alteradas las mismas rutas de señalización. Por ejemplo, en todas ellas se activan procesos de neuroinflamación, neurotoxicidad, y estrés oxidativo que van a inducir la muerte de las neuronas. Estas alteraciones están relacionadas con la agregación y mal plegamiento de proteínas, disfunción mitocondrial, estrés oxidativo y del retículo endoplásmico (RE), alteración en la homeostasis del calcio intracelular, mecanismos de autofagia, procesos neuroinflamatorios y deterioro de la neurogénesis (**Figura 1**) [2, 17].

En **EA** se produce la formación de placas seniles, generadas por la agregación del péptido A β procedente de la proteólisis del péptido precursor amiloide (APP) llevado a cabo por la enzima β -secretasa [4]. Esta acumulación intracelular afecta al correcto funcionamiento de la mitocondria, provocando alteraciones en el complejo IV de la cadena transportadora de electrones, lo que conlleva a una disminución de la producción de ATP, que genera un estrés oxidativo como consecuencia de la acumulación de ROS [6]. También puede afectar a componentes de la membrana celular, en especial a receptores dependientes de proteína G (GPCR) [21], canales y receptores de calcio (NMDAR, VDCC) que provocan cambios en los niveles de calcio intracelulares y, por consiguiente, el funcionamiento del retículo endoplásmico (RE) [2, 22]. El calcio funciona como un segundo mensajero activando y desactivando rutas de señalización, por ejemplo, induce la activación de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) generando sustancias reactivas de nitrógeno (RNS) que provoca la oxidación de proteínas, disfunción mitocondrial, daño en el DNA, inflamación y neurotoxicidad por la generación de nitritos [2]. Además, los depósitos extracelulares de A β provocan la activación de la microglía, promoviendo el desarrollo de la respuesta inmune en el cerebro, que sintetizan citoquinas proinflamatorias, como interleuquina 1 (IL-1) [2] y afectan al proceso de neurogénesis [23]. También está implicado en la activación de la quinasa glicógeno sintasa 3 β (GSK-

3 β) que es la principal enzima que interviene en la fosforilación de tau, que al estar hiperfosforilada fomenta su agregación dando lugar a los NFTs, lo cual afecta al transporte axonal anterógrado de vesículas a través de los microtúbulos [3]. A su vez, también está implicado en la disfunción mitocondrial afectando a la cadena transportadora de electrones [6]. Estas agregaciones de proteínas también van a comprometer al mecanismo de autofagia, más concretamente a la mitofagia, afectando a componentes esenciales como son PINK1 y parkina [4].

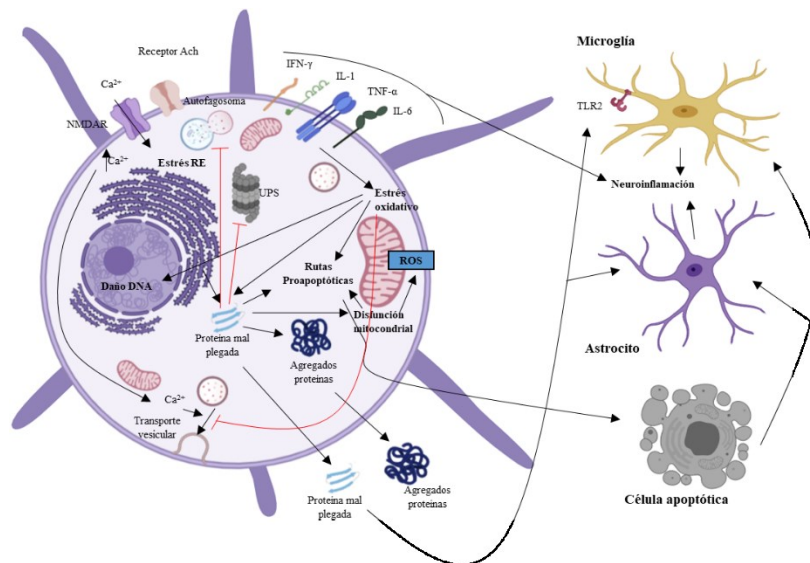


Figura 1.- Esquema de las principales alteraciones a nivel celular observadas en enfermedad de Alzheimer y de Parkinson. Las características fisiopatológicas están relacionadas con el mal plegamiento y la agregación de proteínas que provoca disfunción mitocondrial, lo que conduce a un estrés oxidativo por la acumulación de sustancias reactivas de oxígeno (ROS); alteración del sistema ubiquitina/proteasoma (UPS); alteración en el sistema de síntesis y liberación de neurotransmisores, daño en el ADN; respuesta neuroinflamatoria activándose microglía y astrocitos; alteración en la homeostasis del calcio intracelular por estrés del retículo endoplásmico (RE) y modificación del sistema de autofagia. Todos estos procesos favorecen la inflamación y desencadenan la muerte neuronal.

La **EP** se caracteriza por la presencia de plegamientos anómalos de la proteína α -syn que forman cuerpos de Lewy, como consecuencia de mutaciones en su gen (SNCA) [24]. La α -syn monomérica interviene en el funcionamiento normal de la mitocondria y lisosomas, transmisión sináptica y neurotransmisión. Su alteración va a provocar un funcionamiento anómalo de orgánulos. En primer lugar, SNCA en conformación desplegada se ha localizado en el RE bloqueando una chaperona denominada BiP que participa en la traslocación de polipéptidos recién sintetizados en el propio RE, facilita el plegamiento de las proteínas y la degradación de proteínas mal plegadas, regula la homeostasis del calcio y actúa como sensor de estrés del RE [25]. Este bloqueo provoca una alteración en los procesos postraduccionales de las proteínas [24]. También está involucrado en la alteración del sistema ubiquitina/proteosoma (UPS) por la presencia de agregados pequeños de α -syn (protofibrillas) alterando el comportamiento del proteosoma, asociado con una depleción del ATP como consecuencia de un funcionamiento anormal de la mitocondria [24]. En relación con el funcionamiento de la mitocondria, se ha visto que SNCA inhibe el complejo I de la cadena transportadora de electrones, esto conlleva a una disminución de la producción de ATP y genera un estrés oxidativo por la generación de ROS [2, 24]. Otro de los procesos más estudiados es la alteración del metabolismo de tirosina, que se transforma en dopamina por la enzima tirosina hidroxilasa (TH). En EP, disminuye la liberación de dopamina, ya que SNCA bloquea la TH. Además, la muerte neuronal genera la activación de células gliales que secretan citoquinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-6 y factor de necrosis tumoral α (TNF α) [24-27]. Existen otras proteínas que intervienen en la muerte de las neuronas: parkina, PINK y DJ-1 [1]. Parkina tiene una actividad protectora asociada a la membrana externa de la mitocondria evitando la salida del citocromo C, activación de caspasas y, por consiguiente, muerte neuronal. En cambio, una mutación en el gen provoca alteraciones en las mitocondrias, con un incremento del estrés oxidativo; en el mecanismo de UPS, que modifica la acción de la enzima ubiquitina ligasa afectando lo que a su vez afecta a la degradación autofágica de los agregados de α -syn, cuya alteración parece estar correlacionado con la mutación de otro gen, que codifica para la quinasa 2 rica en repeticiones de leucina (LRRK2) y PINK1 [1, 24]. Además, la exocitosis de las vesículas que contienen dopamina se ve comprometida, reduciéndose su contenido en la hendidura sináptica [24]. Por último, DJ-1 previene la muerte neuronal como consecuencia de un estrés oxidativo, pero una depleción de dicha proteína provoca alteraciones en la morfología de la mitocondria, incrementando ROS [24, 28], puesto que se establece una intercomunicación entre estas proteínas, podrían ser posibles dianas terapéuticas con efecto neuroprotector.

El envejecimiento conlleva un aumento de moléculas proinflamatorias, disfunción mitocondrial y estrés oxidativo, provocando la disminución de la neurogénesis adulta [2, 10]. La neurogénesis es un mecanismo implicado en plasticidad cerebral, responsable de la formación de neuronas en dos regiones específicas del sistema nervioso. Su relevancia funcional en el adulto no está del todo clara, aunque podría ser muy importante en procesos cognitivos, de aprendizaje y memoria [29, 30]. Todos los procesos fisiopatológicos anteriores van a estar relacionados de manera directa o indirecta con su alteración [2, 10, 15, 31].

Dianas terapéuticas y tratamientos neuroprotectores.

La mayoría de las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por la acumulación o agregación de proteínas alteradas a nivel intracelular que conlleva la alteración de funciones celulares esenciales como proliferación, crecimiento, metabolismo y supervivencia. Las principales investigaciones se centran en disminuir la síntesis de esas proteínas modificando la transcripción de sus genes o mediante la utilización de RNA de interferencia (iRNA); eliminación de agregados incentivando los mecanismos de degradación por autofagia o a través de la inmunoterapia, y bloquear su transmisión celular [2, 24].

Algunos tratamientos para EA se basan en el uso de donepezil, que actúan como inhibidor de la acetilcolinesterasa; y memantina, antagonista de los NMDAR. También tiene relevancia la inmunoterapia basada en la utilización de anticuerpos monoclonales contra los agregados moleculares induciendo la fagocitosis [2, 32]. Los principales tratamientos para EP están basados en restitución dopaminérgica, enfocada a compensar la pérdida de dopamina en la hendidura sináptica. Para ello, se administra L-dopa en combinación con inhibidores de descarboxilasa, como carbidopa, para evitar la degradación periférica de levodopa. L-dopa es un precursor de dopamina que se administra de forma oral. Al producir efectos secundarios como somnolencia, disquinesia o cambios en el estado de ánimo [33, 34], puede administrarse junto con agonistas de dopamina, antagonistas NMDAR, inhibidores de monoamino oxidasa-B (MAO-B) o inhibidores de catecol-O-metiltransferasa (COMT-I) [24, 33].

Las enfermedades de Alzheimer y de Parkinson suelen ir acompañadas de un incremento del estrés oxidativo por un funcionamiento anómalo de las mitocondrias que conlleva a la acumulación de ROS. Una de las posibles estrategias terapéuticas podría basarse en la utilización de agentes antioxidantes. Por ejemplo, la mitoquinona (MitoQ) que tiene actividad antioxidante frente a los compuestos peróxido, peroxinitrito y superóxido. Su acción provoca una disminución de la toxicidad y reducción de los marcadores apoptóticos [1, 2, 35]. Otra aproximación experimental sería la inducción de mitofagia y terapia génica basada en la inducción de la biogénesis mitocondrial. En este apartado juegan un papel esencial PINK1, parkina y DJ-1 [2, 36]. Existe un factor transcripcional frente a compuestos xenobióticos y ROS inducido por elementos antioxidantes y electrófilos, denominado factor nuclear E2 (Nrf2), que participa en la regulación de la biogénesis de las mitocondrias [35]. Junto con otro componente celular importante con actividad antioxidante y antiinflamatoria denominado Hmox1 que es inducido como consecuencia de la hipoxia, citoquinas y estrés oxidativo [10]. Ambos componentes pueden ser claves para la regulación de la producción excesiva de ROS.

La activación de las células gliales produce neuroinflamación del tejido nervioso debido a la producción de factores tóxicos y proinflamatorios. Las fosfodiesterasas (PDEs), como PDE7, juegan un papel fundamental en los procesos proinflamatorios. Se ha estudiado que su silenciamiento tiene acción neuroprotectora y antiinflamatoria, puesto que aumenta la concentración de adenosina 3', 5'-monofosfato cíclico (cAMP) el cual activa factores de transcripción, como la proteína de unión al elemento de respuesta de AMPc (CREB) involucrado en supervivencia neuronal y crecimiento axonal [2, 26, 27, 37]. Otro de los mecanismos que protege frente a la inflamación está relacionado con la proteína de unión a CCAAT / Enhancer β (C/EBP β), factor de transcripción que regula la expresión de genes involucrados en la expresión de moléculas inflamatorias, como IL-1 β , TNF α y ciclooxigenasa-2 (COX-2). Su silenciamiento presenta una acción neuroprotectora de las neuronas, y atenuación de la activación glial [2, 38].

En los últimos años, cada vez tiene más relevancia la terapia génica. En el caso del Alzheimer estaría relacionado con aquellos genes que sintetizan la APP y tau, y con proteínas que intervienen en la biogénesis de las mitocondrias como mitofusina 1 (Mfn1), Mfn2 y OPA1 [2, 6, 36]. En Parkinson, los principales genes involucrados son SNCA, parkina, PINK1 y DJ-1, cuya mutación provocan las fisiopatologías mencionadas en el apartado anterior. A través de la regulación de estos genes, se podría controlar los procesos alterados, pudiendo recuperar la función de las neuronas DA dañadas [36].

Neurogénesis, posible terapia para la sustitución de neuronas.

En las enfermedades neurodegenerativas se produce muerte neuronal en varias zonas cerebrales [9, 13, 14]. En los últimos años cada vez son más los estudios que buscan tratamientos destinados a estimular los nichos neurogénicos para así activar a las células madre neurales y que produzcan nuevas neuronas que puedan sustituir a las neuronas que mueren como consecuencia de la enfermedad [2, 15, 29]. La

neurogénesis adulta es la generación de neuronas a partir de precursores neuronales (NPCs). Este proceso está restringido a dos zonas específicas del cerebro: la zona subventricular (SVZ) del ventrículo lateral (**Figura 2.A**) y la zona subgranular (SGZ) del giro dentado (DG) del hipocampo (**Figura 2.B**). La neurogénesis está regulada por una serie de factores que se encargan del mantenimiento y estimulación de la proliferación de células madre neurales (NSCs), de la determinación de su destino celular y de promover su diferenciación, maduración y supervivencia, garantizando su integración en los circuitos cerebrales correspondientes [15, 29]. La neurogénesis puede activarse en determinados procesos patológicos como lesiones cerebrales, para reparar los tejidos dañados, ya que a través de señales celulares se produce la migración de los precursores neuronales hacia las regiones donde se detecta un daño [39, 40]. Este hecho es de gran interés en enfermedades neurodegenerativas, puesto que se han detectado progenitores neuronales quiescentes en la región periventricular del acueducto tegmental, próximo del SNpc que podrían tener potencial para generar neuronas dopaminérgicas [10]. En este sentido son muy importantes las vías de señalización celular. Por ejemplo, el nicho neurogénico de la SVZ expresa receptores DA, por lo que las propias neuronas dopaminérgicas podrían estar participando en la modulación de la neurogénesis. Por su parte, las NSCs de la SGZ también reciben inervación dopaminérgica que podría estar implicada en el control de la proliferación y diferenciación de estas células madre neurales del hipocampo [10]. De hecho, la destrucción de neuronas dopaminérgicas mediante agentes citotóxicos como 6-hidroxidopamina (6-OHDA) afecta a la neurogénesis en la SGZ, permitiendo un cierto control dopaminérgico en la actividad del nicho [41].

Otras vías de regulación incluyen la activación de la ruta de señalización Wnt/ β -catenina, que participa en la reparación y regeneración de tejidos [9, 10]. Wnt interviene en el desarrollo embrionario de las neuronas DA, mantenimiento de las células embrionarias, morfogénesis dendrítica y homeostasis tisular en adultos [10]. En su regulación participa la quinasa glicógeno sintasa-3 β (GSK-3 β), muy importante en la plasticidad neuronal, neurogénesis, apoptosis y supervivencia neuronal [10, 16], regulada a su vez por la ruta de la enzima quinasa fosfatidilinosítido 3 y la proteína quinasa B (PI3K/Akt) [42]. GSK-3 β juega un papel en el mantenimiento y autorrenovación de los progenitores neuronales en SVZ e hipocampo. Otro de los componentes que interviene en la regulación de la ruta Wnt/ β -catenina es la proteína Notch que interviene en el mantenimiento del estado quiescente de NSCs y regula el equilibrio entre la expansión celular de los progenitores y la diferenciación de neuronal/glial [16]. De este modo, se establece una comunicación cruzada entre Wnt/ β -catenina, PI3K/Akt, GSK-3 β y Notch manteniéndose la regulación de los progenitores neuronales, y, por lo tanto, la neurogénesis [10, 16, 42]. β -catenina tiene la capacidad de translocarse al núcleo y activar factores de transcripción como el receptor nuclear 1 (Nurr1) que interviene en la regulación de la proliferación y diferenciación de NSCs, promoviendo la activación de genes de los progenitores dopaminérgicos del mesencéfalo. Se ha visto que la inducción de este factor tiene efectos neuroprotectores y antiinflamatorios [2, 10]; por lo que, su activación podría ser clave para paliar la degradación de neuronas DA teniendo un efecto triple: neuroprotector, antiinflamatorio y neurogénico.

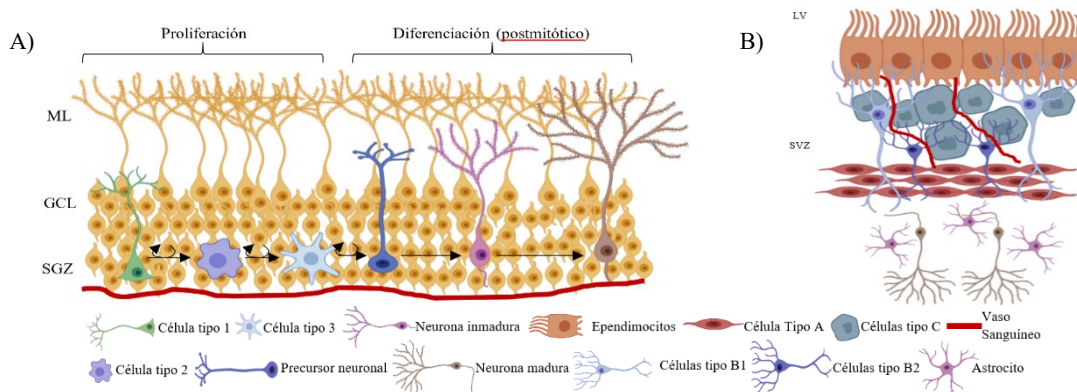


Figura 2.- Nichos neurogénicos en el adulto. A) Región subgranular (SGZ) del hipocampo. Las células tipo 1 son células madre neurales que se dividen asimétricamente dando lugar a células tipo 2, que al dividirse originan neuroblastos o células tipo 3, que migran hacia la capa granular (GCL) donde acaban madurando e integrándose en los circuitos correspondientes. ML-capa molecular. **B)** Región subventricular (SVZ) del ventrículo lateral (LV). Las células tipo B1 son células madre que dan lugar a las células tipo B2 que generan células amplificadoras transitorias (tipo C) que migran hacia el bulbo olfatorio para dar lugar a neuroblastos (células tipo A).

Objetivos

En EA y EP se activan los mecanismos inductores de inflamación y neurotoxicidad que provocan una muerte progresiva de las neuronas. Además, como consecuencia del envejecimiento, aparece una disminución de la capacidad neurogénica.

El principal objetivo de este trabajo es la identificación de nuevas dianas celulares que permitan el desarrollo de nuevos tratamientos frente a la enfermedad de Parkinson. Esos tratamientos van dirigidos a actuar sobre dos puntos fundamentales que contribuyen al desarrollo de la enfermedad: la inflamación y la muerte neuronal. Puesto que EP y EA comparten rasgos comunes, como la extensa neuroinflamación del tejido, aquellas dianas celulares implicadas en dicho proceso podrían ser utilizadas en el tratamiento de ambas patologías. Trabajos previos del laboratorio han demostrado que algunas de las dianas terapéuticas estudiadas también estimulan la neurogénesis, por lo que dicho aspecto también se incluirá entre los objetivos del trabajo. Para abordar el objetivo principal, se han planteado los siguientes objetivos específicos: Estudiar en un modelo *in vitro* de neurodegeneración dopaminérgica el posible efecto neuroprotector de un conjunto de fármacos que actúan sobre una determinada diana celular; analizar la acción antiinflamatoria de dichos compuestos en un modelo *in vitro* de neuroinflamación; estudiar la capacidad neurogénica *in vitro* de aquellos compuestos que hayan resultado tener mayor eficacia neuroprotectora y antiinflamatoria; y evaluar en un modelo animal de enfermedad de Parkinson aquellos compuestos que hayan tenido buenos resultados *in vitro*, con la posible acción neuroprotectora, antiinflamatoria y neurogénica.

Desarrollo teórico

Utilización de moléculas con posible actividad neuroprotectora, antiinflamatoria y neurogénica en modelos *in vitro*.

En las enfermedades neurodegenerativas se altera el funcionamiento de las mitocondrias provocando un estrés oxidativo por acumulación de ROS y la inactivación e inhibición de componentes antioxidantes. Una posible propuesta terapéutica sería el estudio de mecanismos regulatorios de ROS a través de fármacos antioxidantes que disminuyan el estrés oxidativo en modelos de Alzheimer y Parkinson. A través de los estudios realizados en este laboratorio en el descubrimiento de genes implicados en la EA y EP, otra de las ideas planteadas fue la utilización de una terapia combinada, con inhibidores de GSK-3 β que activaría la ruta Wnt/ β -catenina implicada en neurogénesis. En este trabajo, las dianas identificadas que se van a abordar están relacionadas con mecanismos neuroinflamatorios que producen citotoxicidad y por tanto contribuyen a la muerte de neuronas. Aunque no esté directamente relacionado, y dada la experiencia previa del laboratorio, aquellos compuestos que arrojen mejores resultados en los ensayos de neuroprotección y antiinflamación, serán evaluados para determinar una posible acción neurogénica.

El campo de la neurogénesis en enfermedades neurodegenerativas es uno de los más recientes y novedosos, puesto que al ser un proceso menos descrito en patologías del sistema nervioso se requiere más información pudiendo ser utilizado como terapia en la sustitución de las neuronas dañadas en el transcurso de la enfermedad. Por eso, a partir de toda la información analizada y una vez comprobado que tratamientos de los estudiados en el punto anterior tienen efecto neuroprotector y antiinflamatorio, se han propuesto investigar si algunos de esos compuestos pueden intervenir en: modulación de la actividad de los nichos neurogénicos en enfermedades neurodegenerativas; estimulación de poblaciones de células gliales parcialmente indiferenciadas, para promover su diferenciación hacia un fenotipo neuronal.

Modelos experimentales para la investigación de enfermedades neurodegenerativas.

Uno de los principales problemas que presenta el estudio de las enfermedades neurodegenerativas es su caracterización, siendo difícil poder desarrollarlas en modelos celulares y animales, ya que no reproducen al 100% lo que ocurre en humanos a nivel molecular, celular o sintomatológico. A esto hay que sumarle la falta de herramientas y técnicas para su seguimiento. Por eso es importante seleccionar de manera correcta el modelo preclínico que se quiere utilizar para poder desarrollar una terapia efectiva que pueda ser trasladada al ser humano [43]. Los modelos *in vitro* utilizados se han elegido basándonos en su capacidad de mimetizar de manera rápida y fiable algunos de los aspectos propios de EA y EP. Además, se trata de modelos celulares de fácil manejo, económicos y que no están sujetos a consideraciones éticas.

En primer lugar, los ensayos se llevarán a cabo en líneas celulares establecidas. La línea celular derivada de glioblastoma SH-SY5Y (**figura 3.A**) se usa frecuentemente en estudios de neurodegeneración puesto que mimetizan algunas de las características de la EA y EP. Para ello se tratan con un agente neurotóxico, 6-OHDA, que es análogo a la dopamina e inhibe el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, lo que conlleva a generar un estrés oxidativo que provoca la muerte de las neuronas [38]. A continuación, los ensayos a realizar serían de viabilidad celular que determinarán el porcentaje de muerte celular mediante un ensayo colorimétrico (MTT) basado en la actividad metabólica de las células por medio de la enzima reductasa mitocondrial. El estudio se completará con un análisis inmunocitoquímico de la fragmentación del DNA mediante el ensayo TUNEL y detección de proteínas apoptóticas por Western blot.

Para el estudio de los mecanismos inflamatorios se utilizarían dos líneas celulares. La línea celular IMG (**Figura 3.B**) son células inmortalizadas de microglía murina adulta procedentes del aislamiento de cultivos microgliales primarios infectadas con el retrovirus v-raf/v-myc. Estas células se caracterizan por

expresar marcadores específicos de la microglía como CD11b, F4/80 [44]. La línea celular IMA 2.1 (**figura 3.C**) son células inmortalizadas de astrocitos obtenidos de la corteza cerebral de ratón adulto transfectadas con el plásmido psV3neo, que expresan CD44 [45]. La estimulación de procesos neuroinflamatorios se llevaría a cabo mediante lipopolisacárido bacteriano (LPS), que inducen la activación glial y la síntesis de citoquinas proinflamatorias [46]. Se analizará el estado de inflamación mediante la medición de nitritos en el sobrenadante a través del ensayo de Griess [38, 47]; mientras que la producción de citoquinas proinflamatorias se determinará por inmunofluorescencia y Western blot.

Para corroborar los resultados de neuroinflamación obtenidos a partir de las líneas celulares establecidas se usarían cultivos celulares primarios gliales procedentes de la corteza cerebral de ratón o rata, de donde se aislarían células microgliales (**Figura 3.D**) y astrogliales (**Figura 3.E**).

Para el estudio de neurogénesis, se aislarán células madre neurales procedentes de los dos principales nichos neurogénicos: la región SVZ y SGZ (**Figura 2**). El objetivo es analizar si los compuestos seleccionados en la fase anterior (neuroprotectores y antiinflamatorios) pueden modular la actividad de las células madre neurales, promoviendo su proliferación, migración y diferenciación a neuronas. En ese caso se estudiará si fomentan la producción de neuronas colinérgicas (EA) o dopaminérgicas (EP). Se realizará un análisis inmunohistoquímico y por Western blot para identificar marcadores de multipotencialidad como nestina o Sox-2; de proliferación, con marcadores como bromodeoxiuridina (BrdU) y de ciclo celular, como Ki67 o PCNA; de migración, con marcadores específicos como doblecortina (DCX); y de diferenciación como β -III-tubulina (TuJ-1, neuronas inmaduras) o la proteína asociada a microtúbulos tipo 2 (MAP-2, neuronas maduras). El fenotipo neuronal se analizará mediante marcadores como tirosina hidroxilasa (TH, neuronas dopaminérgicas) o colina-acetil-transferasa (ChAT, neuronas colinérgicas) [15].

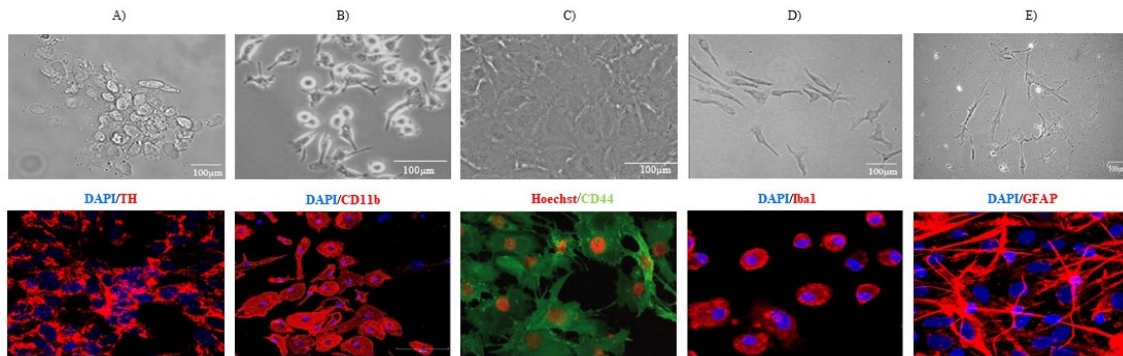


Figura 3.- Modelos *in vitro* de enfermedades neurodegenerativas. El panel superior muestra imágenes de campo claro. El panel inferior muestra cultivos celulares marcados con anticuerpos fluorescentes específicos de cada tipo celular y DAPI (azul) o Hoechst (rojo) como marcador nuclear. A) Línea dopaminérgica humana SH-SY5Y. El marcador dopaminérgico tirosina hidroxilasa (TH) se muestra en rojo. B) Línea celular microglial IMG. En rojo se muestra el marcador CD11b. C) Línea celular astrogliosa IMA 2.1. En verde se muestra el marcador CD44. D) Cultivos primarios microgliales. En rojo se muestra la expresión de Iba-1. E) Cultivos primarios astrogliales. La expresión de GFAP se muestra en rojo. Barra de escala: 100µm. Imágenes obtenidas de McCarthy et al. 2016; Schildknecht et al 2012; Sun et al. 2017; y Morales-García et al. 2019.

Investigación traslacional en modelos *in vivo*.

Una vez comprobada nuestra hipótesis en cultivos celulares, se procederá con el estudio *in vivo*. Los modelos animales utilizados en el estudio de enfermedades neurodegenerativas no reproducen al 100% lo que ocurre en humanos. Por eso, es muy importante seleccionar de la mejor manera posible los modelos a utilizar en el desarrollo de nuevas terapias efectivas para uso humano. El posible efecto neuroprotector, antiinflamatorio y neurogénico *in vivo* se podrían abordar en varios modelos animales: modelo agudo, en el que se induce daño dopaminérgico a la vez que se administra el tratamiento; modelo agudo, en el que se induce daño y al cabo de 72 horas se aplica el tratamiento durante una semana; y modelo crónico, en el que tras el daño dopaminérgico, dejando un margen de 2 semanas, se empezaría con el tratamiento. El primer modelo permitiría evaluar de manera rápida la efectividad del tratamiento, aunque tiene el inconveniente de que no se asemeja al desarrollo de la enfermedad en humanos. Los otros dos modelos mimetizan mejor lo que ocurren en humanos, ya que permiten empezar el tratamiento una vez se ha desarrollado la enfermedad con un porcentaje relevante de muerte neuronal, equivalente a una fase avanzada en humanos, en la que ya se ha diagnosticado la enfermedad. También permitiría realizar un estudio del posible efecto neurogénico del tratamiento, puesto que la migración de neuroblastos hacia su destino final y consiguiente maduración neuronal dura aproximadamente 2 semanas [48].

Para inducir degeneración dopaminérgica en modelos animales se inyectan dos tipos de toxinas: 1-metil-4-fenil-1, 2, 3, 6-tetrahidropiridina (MPTP) y 6-OHDA. MPTP es captado por las células gliales que lo

transforman en 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP⁺), siendo transportado a las neuronas DAs. Como consecuencia se bloquea el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial provocando una disminución de la producción de ATP, genera estrés oxidativo, neuroinflamación y muerte neuronal. A partir de estos modelos se pueden desarrollar estudios relacionados con la neurodegeneración dopaminérgica, disfunción mitocondrial, estrés oxidativo y neuroinflamación. El compuesto 6-OHDA produce una degeneración dopaminérgica inducida por estrés oxidativo, pero no atraviesa la barrera hematoencefálica, por lo que tiene que ser inyectado intracerebralmente en la SNpc provocando la muerte neuronal y la transmisión del daño hacia la región estriatal por transporte axonal anterógrado induciendo un déficit dopaminérgico a las 48-72h; o en el cuerpo estriado, la degeneración se produce en un sentido retrógrado hacia la SNpc, viéndose los efectos entre 1 y 3 semanas después [43]. Para inducir neuroinflamación se realiza una inyección de LPS en la SNpc, activando las células gliales que producen citoquinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-12 y TNF α [31, 46].

Tras la inducción de daño y posterior tratamiento, los animales serían sometidos a pruebas de comportamiento que nos permitan evaluar los daños motores producidos como consecuencia de la enfermedad. A continuación, para los estudios del tejido cerebral, los cerebros serán extraídos, crioprottegidos y congelados hasta su uso. Se realizará un análisis estereológico sobre secciones teñidas con anticuerpos fluorescentes, para evaluar la viabilidad celular dopaminérgica, utilizando anticuerpos frente a TH; los procesos neuroinflamatorios usando marcadores específicos para microglía, como Iba-1 y astroglía, como GFAP; y para factores neuroinflamatorios. Esas mismas secciones se podrá usar para el estudio de la neurogénesis, estudiando los mismos marcadores como los usados en el estudio *in vitro*.

Conclusiones

El ámbito de estudio de las enfermedades neurodegenerativas es muy amplio y complicado. La investigación de este tipo de enfermedades requiere modelos específicos que mimeticen los principales aspectos patológicos que las caracterizan. Esta revisión ha permitido identificar algunas de las dianas celulares con efecto terapéutico que están actualmente bajo investigación. También ha permitido resumir algunos de los modelos preclínicos utilizados en investigación de enfermedades neurodegenerativas, lo que ha supuesto una valiosísima herramienta a la hora de decidir cuáles serán los más adecuados para iniciar una futura investigación en el campo, en función de los parámetros que se quieran analizar.

Las enfermedades neurodegenerativas comparten alteraciones a nivel mitocondrial generando un estrés oxidativo como consecuencia de la producción excesiva de ROS, síntesis de citoquinas proinflamatorias que inducen la activación de las células gliales provocando neuroinflamación. Además, todos estos procesos alteran el mecanismo de neurogénesis, propio del envejecimiento, contribuyendo al desarrollo de la enfermedad. Los tratamientos existentes están destinados al tratamiento de los síntomas, no existiendo ninguna terapia que detenga la enfermedad. Las investigaciones actuales tienen como objetivo la identificación de nuevas dianas celulares que confieran protección a las neuronas, reduciendo además la inflamación. Datos previos del laboratorio apuntan además a un efecto neurogénico de algunas de esas dianas, que permitirían diseñar fármacos con un triple efecto: neuroprotector, antiinflamatorio y neurogénico. Teniendo en cuenta que la muerte neuronal, la inflamación y la alteración de la neurogénesis son aspectos comunes a distintas enfermedades neurodegenerativas, algunos de estos posibles tratamientos podrían servir para el tratamiento de varias patologías.

Referencias

1. Wu, Y., M. Chen, and J. Jiang. 2019. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases and drug targets via apoptotic signaling. *Mitochondrion*. 49: 35-45.
2. Van Bulck, M., A. Sierra-Magro, J. Alarcon-Gil, A. Perez-Castillo, and J.A. Morales-Garcia. 2019. Novel Approaches for the Treatment of Alzheimer's and Parkinson's Disease. *International Journal Molecular Sciences*. 20(3): 1-36.
3. Liyanage, S.I. and D.F. Weaver. 2019. Misfolded proteins as a therapeutic target in Alzheimer's disease. *Advances Protein Chemistry and Structural Biology*. 118: 371-411.
4. Kumar, A., A. Singh, and Ekavali. 2015. A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. *Pharmacological Reports*. 67(2): 195-203.
5. Han, M.H., E.H. Lee, and S.H. Koh. 2016. Current Opinion on the Role of Neurogenesis in the Therapeutic Strategies for Alzheimer Disease, Parkinson Disease, and Ischemic Stroke; Considering Neuronal Voiding Function. *International Neurology Journal*. 20(4): 276-87.
6. Cenini, G., A. Lloret, and R. Cascella. 2019. Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: From a Mitochondrial Point of View. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2019: 1-19.

7. Morales-Garcia, J.A., I.G. Salado, M. Sanz-San Cristobal, C. Gil, A. Perez-Castillo, A. Martinez, and D.I. Perez. 2017. Biological and Pharmacological Characterization of Benzothiazole-Based CK-1delta Inhibitors in Models of Parkinson's Disease. *ACS Omega*. 2(8): 5215-20.
8. Alzheimer y demencia. 2020 (22 may). In Alzheimer's Association. <https://www.alz.org/alzheimer-demencia>.
9. Mishra, A., S. Singh, and S. Shukla. 2018. Physiological and Functional Basis of Dopamine Receptors and Their Role in Neurogenesis: Possible Implication for Parkinson's disease. *Journal Experimental Neuroscience*. 12: 1-8.
10. Marchetti, B., C. Tirollo, F. L'Episcopo, S. Caniglia, N. Testa, J.A. Smith, S. Pluchino, and M.F. Serapide. 2020. Parkinson's disease, aging and adult neurogenesis: Wnt/ β -catenin signalling as the key to unlock the mystery of endogenous brain repair. *Aging Cell*. 19(3): 1-41.
11. Erny, D. and M. Prinz. 2017. Microbiology: Gut microbes augment neurodegeneration. *Nature*. 544(7650): 304-05.
12. Klingelhoefer, L. and H. Reichmann. 2015. Pathogenesis of Parkinson disease: the gut-brain axis and environmental factors. *Nature Reviews Neurology*. 11(11): 625-36.
13. Bonato, J.M., T.B. Bassani, H. Milani, M. Vital, and R.M.W. de Oliveira. 2018. Pioglitazone reduces mortality, prevents depressive-like behavior, and impacts hippocampal neurogenesis in the 6-OHDA model of Parkinson's disease in rats. *Experimental Neurology*. 300: 188-200.
14. Farzanehfar, P. 2016. Towards a Better Treatment Option for Parkinson's Disease: A Review of Adult Neurogenesis. *Neurochemical Research*. 41(12): 3161-70.
15. Lim, J., Y. Bang, and H.J. Choi. 2018. Abnormal hippocampal neurogenesis in Parkinson's disease: relevance to a new therapeutic target for depression with Parkinson's disease. *Archives Pharmacol Research*. 41(10): 943-54.
16. Singh, S., A. Mishra, S. Bharti, V. Tiwari, J. Singh, Parul, and S. Shukla. 2018. Glycogen Synthase Kinase-3 β Regulates Equilibrium Between Neurogenesis and Gliogenesis in Rat Model of Parkinson's Disease: a Crosstalk with Wnt and Notch Signaling. *Molecular Neurobiology*. 55(8): 6500-17.
17. Fujita, K.A., M. Ostaszewski, Y. Matsuoka, S. Ghosh, E. Glaab, C. Trefois, I. Crespo, T.M. Perumal, W. Jurkowski, P.M. Antony, N. Diederich, M. Buttini, A. Kodama, V.P. Satagopam, S. Eifes, A. Del Sol, R. Schneider, H. Kitano, and R. Balling. 2014. Integrating pathways of Parkinson's disease in a molecular interaction map. *Molecular Neurobiology*. 49(1): 88-102.
18. Braak, H., K. Del Tredici, U. Rüb, R.A. de Vos, E.N. Jansen Steur, and E. Braak. 2003. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology Aging*. 24(2): 197-211.
19. Palma, J.A., E. Urrestarazu, M. Alegre, M.A. Pastor, M. Valencia, J. Artieda, and J. Iriarte. 2013. Cardiac autonomic impairment during sleep is linked with disease severity in Parkinson's disease. *Clinical Neurophysiology*. 124(6): 1163-8.
20. van Hooren, M.R., L.W. Baijens, S. Voskuilen, M. Oosterloo, and B. Kremer. 2014. Treatment effects for dysphagia in Parkinson's disease: a systematic review. *Parkinsonism and Related Disorders*. 20(8): 800-7.
21. Zhao, J., Y. Deng, Z. Jiang, and H. Qing. 2016. G Protein-Coupled Receptors (GPCRs) in Alzheimer's Disease: A Focus on BACE1 Related GPCRs. *Frontiers Aging Neuroscience*. 8: 1-18.
22. Pannaccione, A., I. Piccialli, A. Secondo, R. Ciccone, P. Molinaro, F. Boscia, and L. Annunziato. 2020. The Na(+)/Ca(2+)exchanger in Alzheimer's disease. *Cell Calcium*. 87: 1-10.
23. Naumann, N., A. Alpar, U. Ueberham, T. Arendt, and U. Gartner. 2010. Transgenic expression of human wild-type amyloid precursor protein decreases neurogenesis in the adult hippocampus. *Hippocampus*. 20(8): 971-9.
24. Riederer, P., D. Berg, N. Casadei, F. Cheng, J. Classen, C. Dresel, W. Jost, R. Kruger, T. Muller, H. Reichmann, O. Riess, A. Storch, S. Strobel, T. van Eimeren, H.U. Volker, J. Winkler, K.F. Winklhofer, U. Wullner, F. Zunke, and C.M. Monoranu. 2019. alpha-Synuclein in Parkinson's disease: causal or bystander? *Journal Neural Transmission*. 126(7): 815-40.
25. Wang, M., S. Wey, Y. Zhang, R. Ye, and A.S. Lee. 2009. Role of the unfolded protein response regulator GRP78/BiP in development, cancer, and neurological disorders. *Antioxidants & Redox Signaling*. 11(9): 2307-16.

26. Morales-Garcia, J.A., M. Redondo, S. Alonso-Gil, C. Gil, C. Perez, A. Martinez, A. Santos, and A. Perez-Castillo. 2011. Phosphodiesterase 7 inhibition preserves dopaminergic neurons in cellular and rodent models of Parkinson disease. *PLoS One*. 6(2): 1-13.
27. Morales-Garcia, J.A., S. Alonso-Gil, Á. Santos, and A. Perez-Castillo. 2020. Phosphodiesterase 7 Regulation in Cellular and Rodent Models of Parkinson's Disease. *Molecular Neurobiology*. 57(2): 806-22.
28. Trempe, J.F. and E.A. Fon. 2013. Structure and Function of Parkin, PINK1, and DJ-1, the Three Musketeers of Neuroprotection. *Frontiers Neurology*. 4: 1-11.
29. Silva-Vargas, V., E.E. Crouch, and F. Doetsch. 2013. Adult neural stem cells and their niche: a dynamic duo during homeostasis, regeneration, and aging. *Current Opinion Neurobiology*. 23(6): 935-42.
30. Neves, G., S.F. Cooke, and T.V. Bliss. 2008. Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nature Reviews Neuroscience*. 9(1): 65-75.
31. Wang, Q., Y. Liu, and J. Zhou. 2015. Neuroinflammation in Parkinson's disease and its potential as therapeutic target. *Translational Neurodegeneration*. 4: 1-9.
32. Munoz-Manchado, A.B., J. Villadiego, N. Suarez-Luna, A. Bermejo-Navas, P. Garrido-Gil, J.L. Labandeira-Garcia, M. Echevarria, J. Lopez-Barneo, and J.J. Toledo-Aral. 2013. Neuroprotective and reparative effects of carotid body grafts in a chronic MPTP model of Parkinson's disease. *Neurobiology Aging*. 34(3): 902-15.
33. Oertel, W. and J.B. Schulz. 2016. Current and experimental treatments of Parkinson disease: A guide for neuroscientists. *Journal Neurochemistry*. 139 Suppl 1: 325-37.
34. Salat, D. and E. Tolosa. 2013. Levodopa in the treatment of Parkinson's disease: current status and new developments. *Journal Parkinson's Disease*. 3(3): 255-69.
35. Kim, G.H., J.E. Kim, S.J. Rhie, and S. Yoon. 2015. The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Experimental Neurobiology*. 24(4): 325-40.
36. Cai, Q. and Y.Y. Jeong. 2020. Mitophagy in Alzheimer's Disease and Other Age-Related Neurodegenerative Diseases. *Cells*. 9(1): 1-28.
37. Morales-Garcia, J.A., D. Aguilar-Morante, E. Hernandez-Encinas, S. Alonso-Gil, C. Gil, A. Martinez, A. Santos, and A. Perez-Castillo. 2015. Silencing phosphodiesterase 7B gene by lentiviral-shRNA interference attenuates neurodegeneration and motor deficits in hemiparkinsonian mice. *Neurobiology Aging*. 36(2): 1160-73.
38. Morales-Garcia, J.A., E. Gine, E. Hernandez-Encinas, D. Aguilar-Morante, A. Sierra-Magro, M. Sanz-SanCristobal, S. Alonso-Gil, R. Sanchez-Lanzas, J.G. Castano, A. Santos, and A. Perez-Castillo. 2017. CCAAT/Enhancer binding protein beta silencing mitigates glial activation and neurodegeneration in a rat model of Parkinson's disease. *Scientific Reports*. 7(1): 1-14.
39. Kokaia, Z. and O. Lindvall. 2003. Neurogenesis after ischaemic brain insults. *Current Opinion Neurobiology*. 13(1): 127-32.
40. Moraga, A., J.M. Pradillo, M.I. Cuartero, M. Hernández-Jiménez, M. Oses, M.A. Moro, and I. Lizasoain. 2014. Toll-like receptor 4 modulates cell migration and cortical neurogenesis after focal cerebral ischemia. *The FASEB Journal*. 28(11): 4710-8.
41. Suzuki, K., K. Okada, T. Wakuda, C. Shinmura, Y. Kameno, K. Iwata, T. Takahashi, S. Suda, H. Matsuzaki, Y. Iwata, K. Hashimoto, and N. Mori. 2010. Destruction of dopaminergic neurons in the midbrain by 6-hydroxydopamine decreases hippocampal cell proliferation in rats: reversal by fluoxetine. *PLoS One*. 5(2): 1-7.
42. Nasrolahi, A., J. Mahmoudi, A. Akbarzadeh, M. Karimipour, S. Sadigh-Eteghad, R. Salehi, and M. Farhoudi. 2018. Neurotrophic factors hold promise for the future of Parkinson's disease treatment: is there a light at the end of the tunnel? *Reviews Neurosciences*. 29(5): 475-89.
43. Konnova, E.A. and M. Swanberg. 2018. Animal Models of Parkinson's Disease. In: T.B. Stoker and J.C. Greenland. *Parkinson's Disease: Pathogenesis and Clinical Aspects*. Brisbane, Australia: Codon Publications. p: 83-106.
44. McCarthy, R.C., D.Y. Lu, A. Alkhateeb, A.M. Gardeck, C.H. Lee, and M. Wessling-Resnick. 2016. Characterization of a novel adult murine immortalized microglial cell line and its activation by amyloid-beta. *Journal Neuroinflammation*. 13(3): 1-15.

45. Schildknecht, S., S. Kirner, A. Henn, K. Gasparic, R. Pape, L. Efremova, O. Maier, R. Fischer, and M. Leist. 2012. Characterization of mouse cell line IMA 2.1 as a potential model system to study astrocyte functions. *Altex*. 29(3): 261-74.
46. Qin, L., X. Wu, M.L. Block, Y. Liu, G.R. Breese, J.S. Hong, D.J. Knapp, and F.T. Crews. 2007. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia*. 55(5): 453-62.
47. Giustarini, D., R. Rossi, A. Milzani, and I. Dalle-Donne. 2008. Nitrite and nitrate measurement by Griess reagent in human plasma: evaluation of interferences and standardization. *Methods Enzymology*. 440: 361-80.
48. Obernier, K. and A. Alvarez-Buylla. 2019. Neural stem cells: origin, heterogeneity and regulation in the adult mammalian brain. *Development*. 146(4): 1-15.
49. Sun, X., X. Hu, D. Wang, Y. Yuan, S. Qin, Z. Tan, Y. Gu, X. Huang, C. He, and Z. Su. 2017. Establishment and characterization of primary astrocyte culture from adult mouse brain. *Brain Research Bulletin*. 132: 10-19.