

TESIS DE DOCTORADO

**DISCINESIAS INDUCIDAS POR L-DOPA EN MODELOS DE
ENFERMEDAD DE PARKINSON: IMPLICACIÓN DE LA VÍA
RHO QUINASA Y SUS INTERACCIONES CON EL RECEPTOR
DE (PRO)RENINA Y EL COLESTEROL**

Andrea López López

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL DE LA UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE
COMPOSTELA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN NEUROCIENCIA Y PSICOLOGÍA CLÍNICA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

AÑO 2021



D./Dña. **ANDREA LÓPEZ LÓPEZ**

Título da
tese: **Discinesias inducidas por L-DOPA en modelos de
enfermedad de Parkinson: implicación de la vía
Rho quinasa y sus interacciones con el receptor de
(pro)renina y el colesterol**

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento y declaro que:

- 1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.
- 2) De ser el caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.
- 3) Confirmo que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.

Y me comprometo a presentar el Compromiso Documental de Supervisión en el caso que el original no esté depositado en la Escuela.

En **SANTIAGO DE COMPOSTELA, 10 de marzo de 2021.**

Firma electrónica



D./Dña. **JOSE LUIS LABANDEIRA GARCÍA**

En condición
de: **Tutor/a y director/a**

Título de la
tesis: **Discinesias inducidas por L-DOPA en modelos de
enfermedad de Parkinson: implicación de la vía
Rho quinasa y sus interacciones con el receptor de
(pro)renina y el colesterol**

INFORMA:

Que la presente tesis, se corresponde con el trabajo realizado por D/Dña **ANDREA LÓPEZ LÓPEZ**, bajo mi dirección/tutorización, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director/tutor de esta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

En **SANTIAGO DE COMPOSTELA, 10 de marzo de 2021**

Firma electrónica



D./Dña. **ANA MARÍA MUÑOZ PATIÑO**

En condición
de: **Director/a**

Título de la
tesis: **Discinesias inducidas por L-DOPA en modelos de
enfermedad de Parkinson: implicación de la vía
Rho quinasa y sus interacciones con el receptor de
(pro)renina y el colesterol**

INFORMA:

Que la presente tesis, se corresponde con el trabajo realizado por D/Dña **ANDREA LÓPEZ LÓPEZ**, bajo mi dirección/tutorización, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director/tutor de esta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

En **SANTIAGO DE COMPOSTELA, 10 de marzo de 2021**

Firma electrónica



**DISCINESIAS INDUCIDAS POR L-DOPA EN MODELOS DE
ENFERMEDAD DE PARKINSON: IMPLICACIÓN DE LA VÍA
RHO QUINASA Y SUS INTERACCIONES CON EL
RECEPTOR DE (PRO)RENINA Y EL COLESTEROL**

Tesis doctoral presentada por

ANDREA LÓPEZ LÓPEZ

Directores

JOSÉ LUIS LABANDEIRA GARCÍA
CATEDRÁTICO DE ANATOMÍA HUMANA

ANA MARÍA MUÑOZ PATIÑO
PROFESORA TITULAR

Departamento de Ciencias Morfológicas
Facultade de Medicina
Universidade de Santiago de Compostela



AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a todas aquellas personas que directa o indirectamente han formado parte de esta tesis doctoral, en especial:

Al **Profesor José Luis Labandeira García**, gracias por permitirme formar parte de su grupo de investigación y darme la oportunidad de iniciarme en este apasionante trabajo. Así como, por preocuparse por todos nosotros, transmitiéndonos cada día su gran pasión por la ciencia y por el trabajo bien hecho.

A la **Profesora María Josefa Guerra Seijas**, gracias por su amabilidad y su cariño desde el primer momento que nos hemos conocido. Por haberme contagiado su gran pasión por la docencia.

A **Ana Muñoz**, porque sin duda sin ella esta tesis no sería posible. Gracias por tu ayuda profesional y personal desde el primer día que llegué al laboratorio. Gracias por confiar en mí y por ser mi guía y mi ejemplo durante estos años.

A **Begoña Villar**, porque ha sido fundamental en la realización de esta tesis. Gracias sencillamente por estar siempre y por haberme enseñado tanto. Es un privilegio trabajar contigo.

A **Rita Valenzuela**, porque también ha sido esencial en esta tesis. Gracias por todos los momentos juntas, porque trabajar contigo es simplemente bonito, contagias paz y tranquilidad.

A **Alicia**, gracias por tu ayuda, por ser una fuente de alegría en el laboratorio, que se echa mucho de menos. Gracias también por ser una trabajadora modelo y ejemplo para nosotras.

A **Aloia y Lucia**, gracias por las palabras de ánimo y fuerza en esta última etapa.

A **Ana Isabel Rodríguez**, gracias por realizar un gran trabajo de gestión que nos ayuda a todos. Y por transmitirme tu pasión por el trabajo.

A **Antonio Domínguez**, gracias por ser tan buen compañero y estar siempre dispuesto a ayudar, siendo una fuente interminable de sabiduría.

A **Carmen Díaz**, gracias por estar siempre dispuesta a una conversación constructiva, por tus consejos y porque además eres una maravillosa persona llena de valores.

A **Cristina Giano**, gracias por tu ayuda y por tu gran capacidad de resolución de problemas. Gracias por contagiarme con tu alegría y buen rollo cada rincón del laboratorio.

A **Clynton Correa**, aunque hemos compartido poco tiempo eres una persona que ha dejado una gran huella. Gracias por enseñarme la importancia de la rigurosidad en el trabajo y valor del compañerismo.

A **Iria Novoa**, gracias por enseñarme a trabajar bien, porque eres una persona rigurosa y muy profesional, he aprendido mucho de ti. Gracias también por tu gran amistad y por todo lo que me has cuidado.

A **Jannette Rodríguez**, gracias por ser ejemplo de profesionalidad y por toda tu ayuda sobre todo en esta última etapa de trámites burocráticos.

A **Juan Parga**, gracias por ser un gran compañero, por tu ayuda inestimable siempre en el momento que se te solicita. Gracias también por todo el trabajo de gestor que nos hace a todos la vida más fácil.

A **María García**, porque compartir esta etapa contigo ha sido sencillamente un regalo de la vida. Gracias por tu amistad, tu cariño y tu apoyo. Gracias por las confidencias y charlas constructivas e infinitas arreglando el mundo.

A **Mary Pedrosa**, gracias por ser una gran compañera y por todo el cariño que me has demostrado siempre, es para mí un placer charlar contigo.

A **Pablo Garrido**, gracias por ser un ejemplo de compañerismo, de buen trato y de saber estar. Gracias por tu buen humor y tu disponibilidad para ayudar siempre que se necesita.

A **Pilar Aldrey**, gracias por ser el motor del laboratorio. Gracias por tu ayuda profesional, pero sobre todo gracias por tu amistad, por tu apoyo y tu cariño. Gracias por todas las conversaciones contigo y por abrirme incluso las puertas de tu casa.

A **Bernardo**, gracias por toda tu ayuda con los animales, por ser tan buen compañero, ha sido un placer trabajar contigo. Te echaremos mucho de menos.

A mis padres, **José y Dolores**, porque sin ellos ni esto ni nada sería posible. Gracias por estar siempre ahí, por creer en mí, por apoyarme y por enseñarme a que si se quiere se puede. Sois mi fuente de energía, mi refugio, mi ejemplo y mi orgullo. Gracias simplemente por ser mi vida.

A mi hermana, **Sesé**, porque si alguien se siente orgullosa de un hermano, esa es ella. Gracias por confiar en mí, por darme aliento, por ser fuente de alegría, por enseñarme tanto y por ser mi mitad. Gracias también a **Rubén**, por ser sinónimo de familia y por hacernos la vida tan fácil y feliz.

A mis abuelas, **Titita y María**, gracias porque sin vosotras no estaría aquí y no sería la persona que soy. Además, sé que nadie estará más orgulloso de esto que vosotras.

A **Xosé Manuel**, gracias por ser, por existir y por estar. Eres mi persona en lo bueno y en lo malo. Eres amigo, compañero de vida y ejemplo de ser humano. GRACIAS por serlo todo en esta tesis y en mi vida, ahora y siempre.

A **Oscar Domínguez**, gracias por ser la definición de amistad incondicional. Gracias por compartirlo todo en este proyecto y en toda mi vida. Gracias por tu cariño, por creer en mí más que nadie y por supuesto, por ser mi médico de referencia.

A **Noe**, gracias porque lo hemos vivido todo durante estos años. Ella es casi Bióloga y yo casi Psicóloga. Sabes que esto no sería lo mismo sin ti, gracias por tu amistad y toda tu ayuda.

A **Álvaro, Ana, Ale, Miguel, Nuria y Patri**, mis Biólogos favoritos. Gracias por compartir esta etapa conmigo cada uno de ellos de una manera, pero todos sois imprescindibles y fundamentales.

A **Sandra, Alba y Laura**, gracias por ser amigas de toda la vida y para toda la vida. Gracias por escucharme y entenderlo todo siempre.

A **Marcos**, porque eres de esas personas que a pesar de estar muy lejos estas muy muy cerquita. Gracias por las risas, por las charlas y por preocuparte siempre por mí.

A **Carina**, gracias por ser el gran descubrimiento de esta etapa, en muy poquito tiempo has sido capaz de aportar un montón a este trabajo y sobre todo a mi vida.



Eu son libre, nada pode conter a marcha
dos meus pensamentos
e eles son a lei que rexe o meu destino

ROSALIA DE CASTRO

Todo hombre puede ser si se lo propone
escultor de su propio cerebro

SANTIAGO RAMÓN Y CAJAL



ANEXO I	I
RESUMEN	II
ARTÍCULOS DERIVADOS DE LA TESIS	VII
OTROS ARTÍCULOS REALIZADOS DURANTE EL PERÍODO DE TESIS	VIII
PATENTES DERIVADAS DE LA TESIS	IX
ABREVIATURAS	X
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 LA ENFERMEDAD DE PARKINSON	1
1.1.1 Características generales de la enfermedad de Parkinson	1
1.1.2 Tratamiento en la enfermedad de Parkinson	12
1.1.3 Sistema renina angiotensina (SRA), neuroinflamación y enfermedad de Parkinson	20
1.2 DISCINESIAS INDUCIDAS POR L-DOPA	24
1.2.1 Mecanismos implicados	28
1.2.1.1 Mecanismos neuronales: sistema dopaminérgico, serotoninérgico y glutamatérgico	28
1.2.1.2 Mecanismos no neuronales: neuroinflamación y angiogénesis	32
1.2.2 Tratamiento de las discinesias inducidas por L-DOPA	36
1.3 VÍA RHO QUINASA (ROCK)	38
1.3.1 Características y funciones generales de la vía ROCK	38
1.3.2 Papel de la vía ROCK en procesos neuroinflamatorios	41
1.3.3 Relación de la vía ROCK con SRA y la neuroinflamación	43
1.4 EL RECEPTOR PARA (PRO)RENINA (PRR) Y SU PAPEL EN NEUROINFLAMACIÓN	44
1.4.1 Características y funciones del PRR	45
1.4.2 Papel del PRR en procesos neuroinflamatorios y relación con la enfermedad de Parkinson	47
1.5 EL COLESTEROL EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL: IMPLICACIONES EN DISCINESIAS	48
1.5.1 Metabolismo del colesterol en el sistema nervioso central	49

1.5.2	Papel del colesterol en la enfermedad de Parkinson y en las discinesias inducidas por L-DOPA: interacción con el SRA y la vía ROCK	50
1.5.3	Interacción del colesterol, el SRA y la vía ROCK	51
2.	<i>JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</i>	53
3.	<i>MATERIAL Y MÉTODOS</i>	56
3.1	<i>DISEÑO EXPERIMENTAL</i>	56
3.2	<i>EXPERIMENTOS IN VIVO</i>	66
3.2.1	Modelo de lesión con 6-OHDA	66
3.2.2	Inyección intraventricular con angiotensina II (AII)	67
3.2.3	Pruebas de comportamiento animal	67
3.2.3.1	Test del cilindro	67
3.2.3.2	Test de comportamiento rotacional	68
3.2.3.3	Test del stepping	69
3.2.3.4	Test de discinesias	70
3.2.4	Aislamiento de microglía de cerebros de ratones adultos	72
3.2.5	Microdissección por captura láser	73
3.3	<i>EXPERIMENTOS IN VITRO</i>	74
3.3.1	Cultivos primarios de microglía	74
3.3.2	Líneas celulares	75
3.3.2.1	Líneas microgliales	76
3.3.2.2	Líneas neuronales	76
3.3.2.3	Líneas astrogiales	76
3.4	<i>TÉCNICAS POSTMORTEM</i>	77
3.4.1	Técnicas de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia	77
3.4.1.1	Inmunohistoquímica	77
3.4.1.2	Inmunofluorescencia	78
3.4.2	Western Blot	79
3.4.3	Extracción de ARN, RT-PCR y Q-PCR	82
3.4.4	Ensayos de actividad y ELISA:	84
3.4.4.1	Actividad ROCK	84
3.4.4.2	Actividad NADPH-Oxidasa	85
3.4.4.3	ELISA para TNF- α	85
3.4.4.4	Análisis de niveles de colesterol	86

3.4.4.5	Ensayo de viabilidad celular MTT	86
3.4.5	Análisis estadístico	87
4.	RESULTADOS	91
4.1	IMPLICACIÓN DE LA VÍA ROCK EN LAS DISCINESIAS INDUCIDAS POR L-DOPA	91
4.1.1	Cambios en los componentes de la vía ROCK en el modelo de 6-OHDA	91
4.1.2	Cambios en los componentes de la vía ROCK en discinesias inducidas por L-DOPA	96
4.1.3	Efecto de la inhibición de la vía ROCK sobre las discinesias	102
4.1.3.1	Efecto de la inhibición de la vía ROCK sobre el desarrollo de las discinesias	102
4.1.3.2	Efecto de la inhibición de la vía ROCK sobre las discinesias ya establecidas	105
4.1.3.3	Efecto de la inhibición de la vía ROCK sobre el efecto terapéutico de la L-DOPA	108
4.2	PAPEL DEL PRR COMO MECANISMO DE DISCINESIAS INDUCIDAS POR L-DOPA E INTERACCIÓN CON LA VÍA ROCK EN PROCESOS NEUROINFLAMATORIOS	113
4.2.1	Expresión de PRR en el modelo de 6-OHDA, modelo de discinesias y en ratones KO para el SRA	114
4.2.2	Efecto de la activación del PRR sobre el estrés oxidativo y la vía ROCK	117
4.2.3	Efecto del bloqueo de la vía ROCK sobre la inflamación inducida por PRR	120
4.2.4	Efecto de activación del PRR y de la vía ROCK sobre la autofagia	123
4.2.5	Efecto de activación del PRR microglial sobre la viabilidad de neuronas dopaminérgicas	126
4.3	PAPEL DEL COLESTEROL EN LAS DISCINESIAS INDUCIDAS POR L-DOPA, INTERACCIÓN CON SRA	127
4.3.1	Expresión de colesterol en el modelo de EP y discinesias	128
4.3.2	Efecto de la inhibición del colesterol en discinesias inducidas por L-DOPA	129
4.3.3	Efecto de AII sobre los niveles de colesterol	134
4.3.3.1	Expresión de colesterol tras inyección de AII intraventricular	134

4.3.3.2	Expresión de colesterol en ratones KO para SRA _____	135
4.3.4	Expresión de los niveles de colesterol y sus receptores en cultivos neuronales y astrogiales _____	136
5.	<i>DISCUSIÓN</i> _____	141
5.1	IMPLICACIÓN DE LA VÍA ROCK EN LAS DISCINESIAS INDUCIDAS POR L-DOPA _____	141
5.1.1	Expresión de la vía ROCK en la lesión dopaminérgica _____	141
5.1.2	Expresión de ROCK en el modelo de discinesias y efecto de la inhibición de la vía ROCK _____	143
5.1.3	Relación de la vía ROCK con la neuroinflamación y la angiogénesis: papel del VEGF, IL-1 β y TNF- α _____	145
5.2	INTERACCIÓN ENTRE PRR Y LA VÍA ROCK EN PROCESOS NEUROINFLAMATORIOS Y SU IMPLICACIÓN EN LAS DISCINESIAS _____	149
5.2.1	Expresión de PRR en el modelo de enfermedad de Parkinson y discinesias _____	149
5.2.2	Interacción de PRR y la vía ROCK: papel de la microglía _____	152
5.3	PAPEL DEL COLESTEROL EN LAS DISCINESIAS INDUCIDAS POR L-DOPA _____	158
5.3.1	Expresión del colesterol en el modelo de discinesias y efecto de la inhibición de la síntesis de colesterol _____	159
5.3.2	Interacciones entre el colesterol, el SRA y la vía ROCK _____	162
6.	<i>CONCLUSIONES</i> _____	165
7.	<i>BIBLIOGRAFÍA</i> _____	167
	<i>ANEXO II</i> _____	167
	DECLARACIÓN DE CONFLICTOS DE INTERES _____	213
	FINANCIACIÓN _____	215







ANEXO I

RESUMEN

La principal forma de tratamiento en la enfermedad de Parkinson (EP) se basa en la administración de la molécula precursora de la dopamina, L-DOPA, pero su uso clínico prolongado da lugar a complicaciones, entre las que destacan la aparición de movimientos involuntarios anormales, también conocidos como discinesias. Las causas que conducen al desarrollo de las discinesias no son del todo conocidas. Clásicamente se han considerado como causas principales la alteración de los sistemas glutamatérgico y serotoninérgico. Sin embargo, recientemente, se ha sugerido que los mecanismos neuroinflamatorios podrían estar también implicados. La vía Rho quinasa (ROCK) y el sistema renina angiotensina (SRA) tienen un papel fundamental en la degeneración dopaminérgica de la EP, como activadores de la neuroinflamación, y los compuestos que bloquean ambas vías resultan neuroprotectores. En esta tesis se ha investigado si la vía ROCK u otros componentes relacionados con la neuroinflamación, como el receptor para la (pro)renina (PRR) y el colesterol, están implicados en el desarrollo de las discinesias. Además, se ha estudiado si fármacos que bloquean esas vías reducen las discinesias. Para ello se han empleado modelos animales de EP y cultivos celulares neuronales o de células de la glía. En animales discinéticos se observó un aumento en la actividad de la vía ROCK y de la expresión de citoquinas inflamatorias, junto con un incremento en la expresión de PRR, así como en la síntesis de colesterol. La activación de PRR en células microgliales da lugar a un aumento de la neuroinflamación que se bloquea al inhibir la vía ROCK. La administración de fasudil, inhibidor de ROCK que se emplea habitualmente en clínica para el tratamiento de enfermedades vasculares, reduce las discinesias sin provocar afectación alguna sobre el efecto terapéutico inducido por L-DOPA. La administración de angiotensina dio lugar a un aumento de la síntesis del colesterol en neuronas dopaminérgicas, mientras que en astrocitos se reduce la síntesis e incrementa la expresión del receptor de entrada, sugiriendo que los astrocitos podrían estar desempeñando un mecanismo de protección neuronal frente al acúmulo de lípidos. El bloqueo de la síntesis de colesterol empleando simvastatina produjo una reducción en las discinesias y una disminución en la expresión de ROCK. Por lo

tanto, la manipulación de estas vías podría representar nuevas estrategias terapéuticas para prevenir y tratar las discinesias, además de frenar la progresión de la degeneración de las neuronas dopaminérgicas en la EP.



RESUMO

A principal forma de tratamento para a enfermidade de Parkinson (EP) basease na administración da molécula precursora da dopamina, L-DOPA, pero o seu uso clínico prolongado da lugar a complicacións, entre as que destacan a aparición de movementos involuntarios anormais, tamén coñecidos como discinesias. As causas que producen as discinesias non son do todo coñecidas. Clasicamente considerouse como causa principal a alteración dos sistemas glutamatérxico e serotoninérxico. No obstante, recentemente, suxeríuse que os mecanismos neuroinflamatorios poderían estar tamén implicados. A vía Rho quinasa (ROCK) e o sistema renina anxiotensina (SRA) teñen un papel fundamental na dexeneración dopaminérxica da EP, como activadores da neuroinflamación, e compostos que bloquean ambas vías son neuroprotectores. Nesta tese investigouse se a vía ROCK ou outros compoñentes relacionados coa neuroinflamación, como PRR e o colesterol, están implicados no desenvolvemento das discinesias. Para isto empregáronse modelos animais de EP e cultivos celulares neuronais ou de células da glía. En animais discinéticos observouse un aumento da actividade da vía ROCK e da expresión de citoquinas inflamatorias, xunto cun incremento da expresión do PRR e da síntese de colesterol. A activación de PRR en células microgliais, da lugar a un aumento da neuroinflamación que se bloquea ao inhibir a vía ROCK. A administración de fasudil, inhibidor de ROCK que se emprega habitualmente na clínica para o tratamento das enfermidades vasculares, reduce as discinesias sen producir afectación algunha no efecto terapéutico inducido pola L-DOPA. A administración de anxiotensina deu lugar a un aumento da síntese de colesterol nas neuronas, mentres que nos astrocitos redúcese a síntese de colesterol e incrementa a expresión do receptor de entrada, suxerindo que os astrocitos poderían estar desempeñando un mecanismo de protección neuronal fronte o acumulo de lípidos. O bloqueo da síntese de colesterol empregando simvastatina xerou unha redución nas discinesias e unha diminución na expresión de ROCK. Polo tanto, a manipulación desta vía podería representar unha nova estratexia terapéutica para previr e

tratar as discinesias, ademais de frear a progresión da dexeneración dopaminérxica na EP.



ABSTRACT

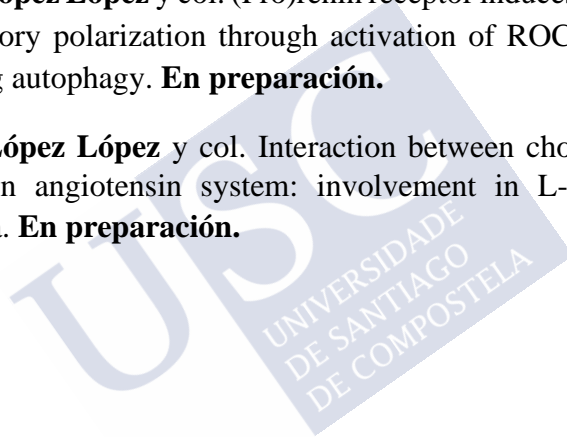
The gold standard therapy for Parkinson disease (PD) is based in L-DOPA administration, the dopamine precursor. However, long term use of this compound causes complications, such as abnormal involuntary movements called dyskinesias. The causes behind dyskinesia development have not been fully elucidated up to date. The alteration of glutamatergic and serotonergic systems has been classically considered the main cause. However, it has been recently suggested that neuroinflammation mechanisms may be also involved in the process. Rho kinase (ROCK) pathway and the renin angiotensin system have a key role in dopaminergic degeneration in PD activating neuroinflammation. Moreover, compounds that block these pathways have neuroprotective properties. In this thesis, it has been investigated whether ROCK pathway and other compounds related with neuroinflammation, such as PRR and cholesterol, are involved in L-DOPA induced-dyskinesias. Furthermore, it has been studied whether compounds that block these pathways are able to reduce dyskinesias. Animal models of PD and neuronal or glial cell cultures have been used for this purpose. Dyskinetic animals showed an increase in ROCK activity, cholesterol synthesis, and the expression of inflammatory cytokines and the PRR. Activation of PRR in microglial cells results in increased neuroinflammation that is blocked when the ROCK pathway is inhibited. Fasudil, a rock inhibitor used in clinic for the treatment of vascular diseases, reduces dyskinesias without interfering with the therapeutic effect of L-DOPA. Angiotensin administration increases cholesterol synthesis in neurons and reduces it in astrocytes, where there is an increase in the expression of the receptor that mediates cholesterol access into cells. This suggest that astrocytes may play a role in neuronal protection against lipid accumulation. Blocking cholesterol synthesis by simvastatin reduces dyskinesia and ROCK expression. Therefore, the manipulation of these pathways may be a novel target for preventing and treating dyskinesias, as well as slowing the progression of degeneration of dopaminergic neurons in PD.

ARTÍCULOS DERIVADOS DE LA TESIS

Andrea López López; Carmen Labandeira; José Luis Labandeira García; Ana Muñoz. Rho kinase inhibitor Fasudil reduces L-DOPA-induced dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. **British Journal of Pharmacology**: 177(24):5622-5641. doi: 10.1038/onc.2016.341. PHARMACOLOGY&PHARMACY Q1 (D1) Índice de impacto: 7.8

Andrea López López y col. (Pro)renin receptor induces microglial pro-inflammatory polarization through activation of ROCK pathway and decreasing autophagy. **En preparación.**

Andrea López López y col. Interaction between cholesterol and the brain renin angiotensin system: involvement in L-DOPA induced dyskinesia. **En preparación.**



OTROS ARTÍCULOS REALIZADOS DURANTE EL PERÍODO DE TESIS

Rita Valenzuela; Ana I Rodriguez-Perez; Maria A Costa-Besada; Rafael Rivas-Santisteban; Pablo Garrido-Gil; **Andrea Lopez-Lopez**; Gemma Navarro; Jose L Lanciego; Rafael Franco; Jose Luis Labandeira-Garcia. An ACE2/Mas-related receptor MrgE axis in dopaminergic neuron mitochondria. Implications for neurodegeneration and Covid-19. **En Revisión**

Ana Muñoz; **Andrea López López**; Carmen Labandeira; José Luis Labandeira García. Interactions between the serotonergic and other neurotransmitter systems in the basal ganglia: role in Parkinson's disease and adverse effects of L-DOPA. **Frontiers in Neuroanatomy** (2020) 4, pp. 14-26. Mini-review doi: 10.3389/fnana.2020.00026 ANATOMY&MORPHOLGY Q1 (D1) Índice de impacto: 2.92

Ana Muñoz; Clynton Correa; **Andrea López López**; Maria Alicia Costa Besada; Carmen Díaz Ruíz; José Luis Labandeira García. Physical Exercise Improves Aging-Related Changes in Angiotensin, IGF-1, SIRT 1, SIRT3 and VEGF in the Substantia Nigra. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci** (2018) 73 - 12, pp. 1594 – 1601 doi: 10.1093/gerona/gly072 GERONTOLOG Q1 Índice de impacto: 4.9

PATENTES DERIVADAS DE LA TESIS

- ✓ Solicitud de patente en España, con título "**COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA PARA SU USO EN EL TRATAMIENTO PROFILÁCTICO Y/O TERAPÉUTICO DE DISCINESIAS INDUCIDAS POR L-DOPA**", número de publicación ES2804076A1, y fecha de prioridad 31.07.2019. Informe favorable 03/06/2020. Participantes: José Luis Labandeira García, Ana María Muñoz Patiño y **Andrea López López**.

- ✓ Solicitud de patente internacional, con título "**COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA PARA SU USO EN EL TRATAMIENTO PROFILÁCTICO Y/O TERAPÉUTICO DE DISCINESIAS INDUCIDAS POR L-DOPA**", número de publicación WO2021/019116A1, fecha de presentación 24/07/2020. Participantes: José Luis Labandeira García, Ana María Muñoz Patiño y **Andrea López López**.



ABREVIATURAS

24-OHC: 24-hidroxicolesterol	PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonido de las siglas en inglés <i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i>
27-OHC: 27-hidroxicolesterol	ECA 2: enzima convertidora de angiotensina II
5-HT: serotonina	ECA: enzima convertidora de angiotensina
5-HT1A: receptor de serotonina tipo IA	ELISA: ensayo inmunoenzimático de las siglas en inglés <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
5-HT1B: receptor de serotonina tipo IB	EP: enfermedad de Parkinson
6-OHDA: 6-hidroxidopamina	ERK: quinasa regulada por señales extracelulares, del inglés <i>extracellular signal-regulated kinase</i>
A1,7: angiotensina 1,7	FPM: fascículo prosencefálico medial
ABC: avidina-biotina-peroxidasa	GB: ganglios basales
AADC: aminoácido aromático descarboxilasa	GDNF: factor neurotrófico derivado de la glía, del inglés <i>glial cell-derived neurotrophic factor</i>
ABCA1: transportador dependiente de ATP, del inglés <i>ATP-binding cassette transporter</i>	GDP: guanosin difosfato
ADN: ácido desoxirribonucleico	GPe: globo pálido externo
AI: angiotensina I	GPI: globo pálido interno
II: angiotensina II	GTP: guanosin trifosfato
A1,7: angiotensina 1,7	GTPCH: GTP ciclohidrolasa I
AIMs: movimientos involuntarios anormales de las siglas en inglés <i>abnormal involuntary movements</i>	HMGCR: 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A
AMPA: ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico	IL-1B: interleucina 1B
ARNm: ácido ribonucleico mensajero	IL-10: interleucina 10
AT1: receptor de angiotensina tipo I	IL-6: interleucina 6
AT2: receptor de angiotensina tipo II	INF-γ: interferón γ
BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro, del inglés <i>brain-derived neurotrophic factor</i>	iNOS: óxido nítrico sintasa inducible del inglés <i>inducible nitric oxide synthetase</i>
BH4: tetrahidobiopterina	IPS: células madre pluripotentes inducidas
BHE: barrera hematoencefálica	KO: silenciamiento, del inglés <i>knock out</i>
BSA: proteína seroalbúmina bovina del inglés <i>bovine serum albumin</i>	LC3B: proteína asociada a microtúbulos 1B
CMM: células madre mesenquimales	LDLR: receptor de lipoproteínas de baja densidad, del inglés <i>receptor low-density lipoprotein</i>
COMT: catecol-O-metil transferasa	L-DOPA: L-3,4-dihroxifenilalanina
COX-2: ciclooxigenasa 2	LPS: lipopolisacárido
D1: receptores de dopamina tipo I	MAO-B: monoamino oxidasa B
D2: receptores de dopamina tipo II	
D3: receptor de dopamina tipo III	
DA: dopamina	
DAB: 3,3'-diaminobezidina	
DAT: transportador de dopamina	
DNTPs: desoxinucleótidos trifosfato	

MAPK P38: proteína quinasa P38 activada por mitógeno
MC: medio condicionado
MCC: N-[(1,2,3,5,6,7-hexahidro-s-indacen-4-yl) amino]carbonyl]-4-(1-hydroxy-1-methylethyl)-2-furansulfonamide
mGlut: receptor metabotrópico de glutamato
MMLV: transcriptasa inversa, del inglés *Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase*
MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
MTT: Bromuro de 3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazolio
NADPH-oxidasa: nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato-oxidasa
NF-κB: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NMDA: N-metil-D-aspartato
NO: óxido nítrico del inglés *nitric oxide*
NOS: óxido nítrico sintetasa del inglés *nitric oxide synthetase*
NST: núcleo subtalámico

OH: grupo hidroxilo
PRR: receptor de (pro)renina
Q-PCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa, del inglés *quantitative polymerase chain reaction*
ROCK: rho quinasa
RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa, del inglés *reverse transcriptase polymerase chain reaction*
SEM: error estándar de la media, del inglés *standard Error of the Mean*
SNC: sistema nervioso central
SNC: sustancia negra pars compacta
SNr: sustancia negra pars reticulada
SRA: sistema renina angiotensina
SREBP: proteína de unión a elementos reguladores de esteroides del inglés *sterol regulatory element binding protein*
TH: tiroxina hidroxilasa
TNF-α: factor de necrosis tumoral
VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial
WB: *Western Blot*
WT: de las siglas en inglés *wild type*





1. INTRODUCCIÓN



1. INTRODUCCIÓN

1.1 LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

La enfermedad de Parkinson (EP) está considerada el segundo trastorno neurodegenerativo más común en la población, después de la enfermedad de Alzheimer y el primer trastorno neurodegenerativo motor (de Rijk y col., 1997). La EP fue descrita por primera vez por el médico británico James Parkinson que, en el año 1817, publica el tratado “*An essay on the shaking palsy*”.

1.1.1 Características generales de la enfermedad de Parkinson

La patofisiología de la EP se caracteriza principalmente por la pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra pars compacta (SNc), que produce una degeneración de las proyecciones de la vía nigro-estriatal, dando lugar a un déficit del neurotransmisor dopamina (DA) en el estriado. Cuando los niveles de DA en el estriado caen por debajo del 60-80% y se pierden alrededor del 50% de las conexiones nigro-estriatales se producen los síntomas motores de la enfermedad, derivados principalmente de la desregulación del circuito motor de los ganglios basales (GB) (Carlsson y col., 1959). Otra característica anatomo-patológica de la EP es la presencia de agregados proteicos a nivel de las neuronas dopaminérgicas que se denominan cuerpos de Lewy. En condiciones patológicas, la proteína α -sinucleína, que forma los cuerpos de Lewy, presenta errores en el plegamiento (Spillantini y col., 1997) causando degeneración neuronal, disfunción de los GB e inicio de la EP (Marsden, 1990).

Ganglios basales: componentes y circuitos

Los GB son estructuras anatómicas subcorticales que forman una red interconectada de núcleos neuronales. Los principales núcleos que participan en el circuito de los GB son los siguientes: el estriado, que se subdivide en dos núcleos denominados caudado y el putamen, y el globo pálido que se divide en el globo pálido interno (GPi), que en roedores se corresponde con el núcleo entopeduncular y globo pálido externo (GPe). Participan también en el circuito el núcleo subtalámico (NST), la sustancia negra pars reticulata (SNr), pars compacta (SNc), los núcleos del rafe y el núcleo pedúnculo-pontino. Estos núcleos establecen conexiones con áreas de la corteza y del tálamo relacionadas con funciones motoras, límbicas y de asociación (Alexandre y col., 1986). Por lo tanto, el papel de los GB es importante y principal a nivel del control motor y de la función cognitiva.

En el circuito de los GB, el núcleo estriado es la estructura aferente que recibe proyecciones de neuronas excitadoras glutamatérgicas que llegan desde distintas áreas de la corteza cerebral y proyecciones moduladoras que provienen de neuronas dopaminérgicas de la SNc, así como, de neuronas serotoninérgicas de los núcleos del rafe (Parent y Hazrati, 1995). El núcleo estriado está formado por neuronas de proyección GABAérgicas de tamaño medio (95% del total). Dentro de estas neuronas podemos diferenciar al menos dos clases con dos tipos de receptores de DA, receptores de DA tipo 1 (D1), que son excitadores y receptores de DA de tipo 2 (D2) o inhibidores. Los receptores D1 se localizan en las neuronas de proyección que expresan los neuropéptidos sustancia P y dinorfina, y cuando se activan dan lugar a la vía excitadora o vía directa. Por otro lado, los receptores D2 están presentes en las neuronas de proyección que presentan los neuropéptidos encefalina y sustancia P, y cuando estos se activan se desencadena la vía inhibitoria o indirecta. El 5% de las neuronas estriatales restantes son interneuronas colinérgicas y GABAérgicas que participan en el control de la actividad de las neuronas de proyección anteriormente descritas.

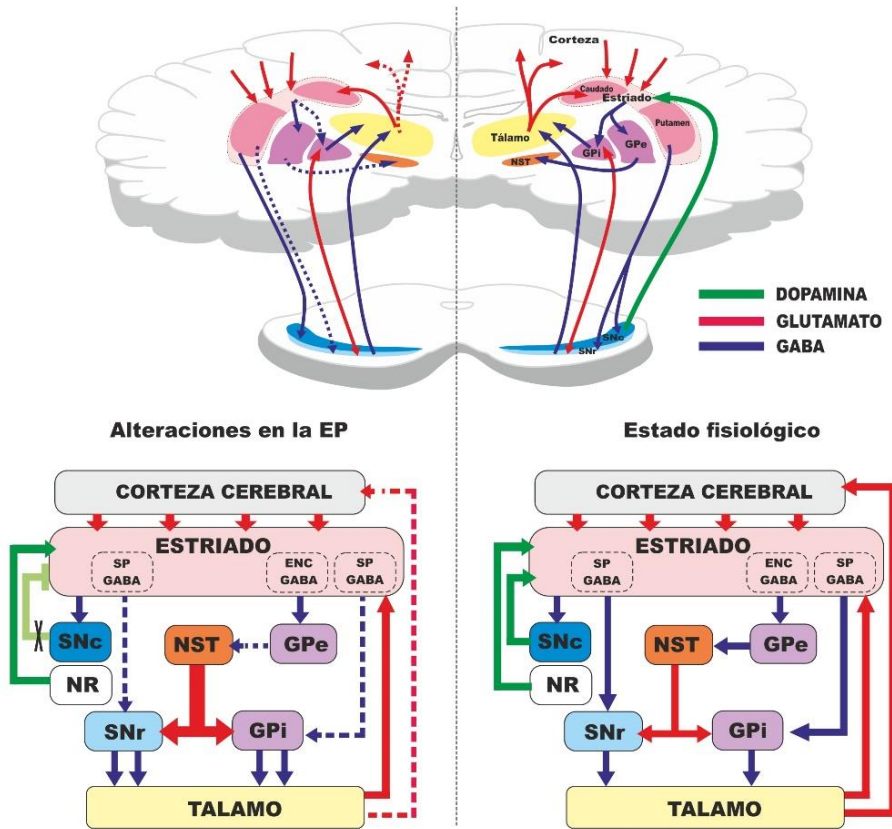
En la vía directa, se activan las neuronas estriatales que expresan receptores de tipo D1 que proyectan directamente sobre las estructuras eferentes de los GB, el GPi y la SNr, activando el tálamo motor y la corteza para facilitar la ejecución del inicio del movimiento (Galvan y

Wichmann, 2007). Sin embargo, la vía indirecta involucra a neuronas estriatales que expresan los receptores de DA D2 que proyectan al GPi y a la SNr de forma indirecta, ya que, usan dos núcleos de relevo el GPe y el NST. Cuando se activa esta vía se produce una inhibición del tálamo motor, que disminuye la actividad en las áreas motoras de la corteza cerebral, dando lugar a una inhibición del movimiento. Por consiguiente, el equilibrio entre estas dos vías es lo que hace posible el control del comportamiento motor, cualquier perturbación o desbalance en ellas induce trastornos del movimiento como es el caso de la EP (Galvan y Wichmann, 2007).

En la EP, la pérdida de DA, da lugar a una reducción de la actividad de los receptores D1, el origen de la vía directa y un aumento de la actividad de las neuronas estriatales que contienen receptores D2, el origen de la vía indirecta (Obeso y col., 2014), provocando una inhibición excesiva de las neuronas del tálamo motor y de la corteza que da lugar a la aparición de los síntomas motores que caracterizan la EP (Penney y Young, 1986; Obeso y col., 2000; ver esquema 1).



CIRCUITO DE LOS GANGLIOS BASALES



Esquema 1. Circuito de los ganglios basales en estado fisiológico (derecha) y representado las alteraciones que se producen en la EP (izquierda). En él se señalan las proyecciones glutamatérgicas excitadoras (rojo), las proyecciones GABAérgicas inhibitorias (azul) y las proyecciones dopaminérgicas y serotoninérgicas moduladoras del circuito (verde). Abreviaturas: EP, enfermedad de Parkinson; SP, sustancia P; ENC, encefalina; SNc, sustancia negra compacta; SNr, sustancia negra reticulada; NST, núcleo subtalámico; GPe, globo pálido externo; GPi, globo pálido interno; NR, núcleo del rafe. Esquema de elaboración propia.

Síntomas y etiología de la enfermedad de Parkinson

Los principales signos y síntomas en los que se basa la diagnosis clínica de la enfermedad son los síntomas motores, acinesia, bradicinesia, temblor, rigidez e inestabilidad postural. Aunque también se pueden observar otras manifestaciones motoras como son hiponimia (ausencia de expresividad facial), distonía y postura encorvada entre otros (Chou, 2013).

Además, en los últimos años se ha descrito que el cuadro clínico de un paciente parkinsoniano suele presentar también, síntomas no motores que durante mucho tiempo permanecieron subestimados, pero hoy en día se sabe que son de gran importancia clínica. Entre los síntomas no motores se incluyen: ansiedad, depresión, apatía, déficits cognitivos, trastornos visuales y olfativos, desordenes del sueño, pérdida de peso y trastornos digestivos (Chaudhuri y col., 2006; Chaudhuri y Schapira, 2009; Garrido-Gil y col., 2018).

La EP, atendiendo a su etiología se puede clasificar en EP idiopática o EP con base genética. La EP idiopática afecta al 90-95% de los individuos y presenta una etiología desconocida hasta el momento, la cual parece tener una implicación multifactorial. El restante 5-10% de individuos parkinsonianos padecen lo que conocemos como “Parkinson Familiar o Hereditario” que se atribuye a factores genéticos (Przedborski, 2017).

La EP con base genética tiene una penetrancia incompleta, lo cual indica que otros factores como los ambientales también juegan un papel importante en el desarrollo de la enfermedad (Goldman y col., 2019). Los genes principales que más se han estudiado y asociado con EP son SNCA (α -sinucleína), LRRK2, GBA1 y LRP10 en el caso de la enfermedad autosómica dominante y PINK1, Parkin y DJ-1 cuando la enfermedad es autosómica recesiva.

La EP esporádica o idiopática tiene una etiología multifactorial compleja, es decir, posiblemente sea el resultado de factores genéticos y ambientales combinados (Goldman, 2019). A lo largo de los años se han sugerido algunos factores que parecen suponer riesgo a padecer EP, relacionados con el aumento del estrés oxidativo en las neuronas dopaminérgicas, debido a reacciones inflamatorias. Por lo que, sin duda, el principal factor de riesgo en la EP es el envejecimiento, ya que,

se encuentran exacerbados todos los mecanismos anteriormente mencionados.

Entre los factores ambientales que entrañan riesgos a padecer EP destacan la exposición a pesticidas y a contaminantes ambientales como paraquat, rotenona, ditiocarbamatos u organoclorados (Goldman, 2014). Así como la exposición a metales tales como manganeso, hierro o plomo (Harischandra y col., 2019). También, lesiones cerebrales traumáticas se han relacionado con el desarrollo de EP (Kenborg y col., 2015).

Además, otros factores relacionados con el estilo de vida se han asociado con mayor o menor riesgo de padecer EP. Es el caso del consumo de tabaco (Soto-Otero y col., 2002), de cafeína (Ross y col., 2000) o de teína, así como hábitos de vida saludable tanto relacionados con la dieta como con la actividad física reducen el riesgo de padecer EP (Gao y col., 2007; Muñoz y col., 2016, 2018; Yang y col., 2015a). Por el contrario, mayor ingesta de leche y derivados lácteos en la dieta se ha vinculado con mayor riesgo de padecer esta enfermedad (Park y col., 2005).

En los últimos años, se han descrito varios mecanismos que parecen estar involucrados en los procesos neurodegenerativos que desencadenan la EP. Los que mejor explican hasta el momento la patogénesis de la enfermedad son la neuroinflamación, el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial, la autofagia y la disfunción ubiquitina/proteasoma.

- **Neuroinflamación**

En el sistema nervioso central (SNC) la función inmunológica la ejercen las células microgliales (Wang y col., 2015). Cuando se desencadenan mecanismos celulares que provocan degeneración neuronal o se inicia la agregación de proteínas mal plegadas como α -sinucleína, las células microgliales reciben fuertes estímulos que las activan y dan lugar a la respuesta neuroinflamatoria. Esta activación provoca migración de las células microgliales al lugar donde se está produciendo el daño celular, cambio de morfología ramificada a morfología globular, aumento del volumen celular y secreción de citoquinas proinflamatorias como COX-2 (ciclooxigenasa 2), TNF- α ,

(factor de necrosis tumoral), IL-1 β (interleucina 1 β), IL-6 (interleucina 6) y NO (óxido nítrico del inglés *nitric oxide*) (Qian y Flood., 2008; Roodveldt, 2013). La transformación de estado de reposo a estado activado es rápido y a menudo tiene lugar antes de que se vea cualquier otro signo de daño en los tejidos ni muerte celular. Por lo tanto, la presencia de microglía activada es un indicador de lesión neuronal en curso (Kreutzberg, 1996). Algunos estudios apoyan que la neuroinflamación es una consecuencia de la muerte de las neuronas dopaminérgicas, mientras que otros sugieren que la inflamación precede a la neurodegeneración (Hallyday y Stevens, 2011). Además, estudios en modelos experimentales y en cerebros humanos *postmortem* han demostrado que la activación microglial está asociada con patologías cerebrales como la EP (Kreutzberg, 1996). En pacientes con EP se ha descrito la presencia de microglía activada en estadios tempranos y en cerebros *postmortem*, demostrando un paralelismo en los cambios activación microglial y degeneración dopaminérgica (Ouchi y col., 2005). Se ha descrito además un aumento en los niveles de TNF- α , INF- γ (interferón- γ) y otras citoquinas (Barcia y col., 2005b; 2011). Por lo tanto, la activación microglial podría convertirse en un marcador predictivo de neurodegeneración (Gerhad y col., 2006).

- **Estrés oxidativo y disfunción mitocondrial**

La acumulación de sustancias neurotóxicas y la disfunción mitocondrial generan especies reactivas del oxígeno que provocan lo que se conoce como estrés oxidativo. Este estrés celular daña macromoléculas como el ADN, genera errores en la peroxidación proteica y lipídica, así como alteraciones en el citoesqueleto, lo cual contribuye a la desorganización celular (Bose y Beal, 2016) y a la degeneración de las neuronas dopaminérgicas en la EP.

Después de la mitocondria la activación del complejo NADPH-oxidasa es la fuente principal de producción de especies reactivas del oxígeno en las células. Se ha demostrado que la activación de este complejo media varios aspectos clave de producción de estrés oxidativo y sustancias inflamatorias en enfermedades relacionadas con el envejecimiento como es el caso de la EP entre otras (Labandeira-Garcia y col., 2013).

La desregulación del metabolismo del hierro en la SNc también juega un papel importante en la degeneración de las neuronas dopaminérgicas (Jiang y col., 2007). Estas son especialmente vulnerables por su alto contenido en neuromelanina, producto de la oxidación de la dopamina. Altos niveles de hierro libre en el citoplasma agravan el estrés oxidativo, aumentando la producción de grupos hidroxilo (OH) y radicales libres (Hare y Double, 2016; Dias y col., 2013). Además, puede producirse oxidación de la DA mediada por hierro, lo cual genera como producto 6-hidroxidopamina (6-OHDA), una neurotoxina dopaminérgica (Garrido-Gil y col., 2013a).

- **Sistema ubiquitina-proteasoma y autofagia**

Por último, el deterioro de los mecanismos de degradación celular parece formar parte de la patogénesis de la EP. Por un lado, en la EP se ha observado una disfunción del sistema ubiquitina proteasoma (Olanow y Mcnaught, 2011), la vía principal que media en la degradación de las proteínas intracelulares solubles en el citoplasma, el núcleo y el retículo endoplasmático (Wong y Cuervo, 2010). Por otro lado, la acumulación aberrante de proteínas anormales y de orgánulos dañados en la EP contribuye a la desregulación del mecanismo de autofagia. La autofagia es un proceso catabólico esencial que media en la degradación lisosomal de proteínas mal plegadas y orgánulos disfuncionales (Mizushima y col., 2011). Condiciones celulares adversas como aumento del estrés oxidativo, disminución de nutrientes o de energía promueven la autofagia, como mecanismo protector que permite mantener la homeostasis celular.

Modelos experimentales de EP

El estudio de la EP requiere el desarrollo de modelos experimentales animales y celulares, ya que, el material procedente de autopsias es escaso y no permite realizar un seguimiento del curso de la enfermedad. Los modelos animales más usados en experimentación son los inducidos mediante neurotoxinas ambientales o sintéticas. No obstante, existen los llamados modelos genéticos que utilizan la expresión in vivo de mutaciones relacionadas con la EP.

Los modelos neurotóxicos más eficaces se obtienen inyectando la toxina 6-OHDA o el compuesto 1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina (MPTP). Ambas sustancias producen estrés oxidativo que causa degeneración de las poblaciones neuronales dopaminérgicas. Sin embargo, la principal limitación que presentan estos modelos es el factor tiempo, que impide reproducir una degeneración progresiva similar a lo que ocurre en humanos. No obstante, esto no niega el indiscutible valor de estos modelos para el estudio de la EP (Blesa y col., 2012).

- **Modelo de 6-OHDA**

El modelo de 6-OHDA (Scwirting y Huston, 1996a; Scwirting y Huston, 1996b) es el más ampliamente utilizado para inducir EP en ratas. La 6-OHDA presenta una estructura química similar a la DA y a la norepinefrina, lo cual facilita su entrada a través del transportador de DA (DAT) en las neuronas dopaminérgicas (Sachs y Jonsson, 1975). La 6-OHDA se autooxida en el interior de las células (Heikkila y Cohen, 1972; Seitz y col., 2000; Soto-Otero y col., 2000), lo cual genera estrés oxidativo (Saner y Thoennen, 1971; Cohen y Heikkila, 1974), conduciendo a las neuronas dopaminérgicas a la inducción de apoptosis.

El Dr Ungerstedt en el año 1968 fue el primero en usar la 6-OHDA como neurotoxina para provocar una lesión en la vía dopaminérgica nigro-estriatal. La 6-OHDA no atraviesa la barrera hematoencefálica (BHE), por lo que necesita ser inyectada mediante cirugía estereotáxica en la SNc, en el fascículo prosencefálico medial (FPM) o en el estriado. La inyección de 6-OHDA en la SNc provoca la degeneración de aproximadamente el 60% de las neuronas que contienen tiroxina hidroxilasa (TH) en esta área del cerebro con la consecuente pérdida de las terminales TH-positivas en el estriado (Blandini y col., 2008). Inyectando esta sustancia en el estriado se produce una degeneración retrograda, primero en los terminales dopaminérgicos del cuerpo estriado y a continuación en los somas de las neuronas dopaminérgicas alojadas en el la SNc, aparentemente esta es una mejor aproximación a lo que ocurre en pacientes de EP (Lee y col., 1996; Sauer y Oertel, 1994). El modelo de 6-OHDA se usa de forma habitual como modelo

unilateral, ya que, la inyección bilateral en el estriado provoca adipsia severa y afagia (Ungerstedt, 1971).

Este modelo ha logrado con éxito replicar el déficit de DA, la pérdida de neuronas dopaminérgicas de la vía nigro-estriatal y los déficits neuroconductuales. Además, dado que se puede evaluar el alcance de la lesión usando test de comportamiento animal, se ha utilizado para probar la eficacia de terapias orientadas a mejorar las habilidades motoras en la EP. Sin embargo, este modelo no reproduce completamente las características clínicas de EP, ya que, no afecta a otras regiones del cerebro como las estructuras olfatorias, ni áreas del tronco cerebral, ni al locus coeruleus y tampoco induce agregaciones proteicas como los cuerpos de Lewys característicos de la EP (Blandini y col., 2008).

- **Modelo de MPTP**

El modelo animal que usa la neurotoxina MPTP es otro de los modelos más utilizados para inducir EP en monos y ratones (Langston y col., 1983). Esta toxina fue descubierta en el en año 1983 en California, donde un grupo de jóvenes drogadictos desarrolló un síndrome parkinsoniano, después de la inyección intravenosa de un opioide que resultó estar contaminado con una sustancia neurotóxica, el MPTP.

El MPTP es una sustancia altamente lipofílica que una vez inyectada a nivel sistémico rápidamente atraviesa la BHE. Una vez en el cerebro, entra en los astrocitos, se transforma en el metabolito activo MPP^+ , gracias a la acción de la enzima monoamino-oxidasa B (MAO-B). El MPP^+ es liberado al espacio extracelular (Cui y col., 2009), desde donde es captado al interior de las neuronas dopaminérgicas por DAT. Una vez dentro de las neuronas, MPP^+ es capaz de inhibir el complejo I de la cadena de transporte electrónico de la mitocondria, produciendo especies reactivas del oxígeno (Javitch y col., 1985; Langston y col., 1983). Además, MPP^+ puede ser almacenado en las vesículas sinápticas dentro de las neuronas, ya que, es recaptado del citoplasma celular por el transportador vesicular de monoaminas. En el interior de las vesículas puede dar lugar a metabolitos tóxicos como el DOPAL o la 6-OHDA causando mayor daño en las neuronas (Panneton y col., 2010).

Recientemente, se ha desarrollado un modelo crónico de ratón parkinsoniano, inyectando una dosis de 20mg/kg de MPTP subcutáneo 3 veces por semana durante 3 meses (Muñoz-Machado y col., 2016).

Otros modelos experimentales con los que se trabaja, pero con mucha menor frecuencia para el estudio de la EP, son los que usan como toxina los pesticidas ambientales paraquat y rotenona. Ambos son similares estructuralmente al MPTP y son interesantes porque son capaces de generar cuerpos de Lewy (Berry y col., 2010; Betarbert y col., 2000; Day y col., 1999).

- **Modelos genéticos**

Los modelos genéticos de EP se han estudiado atendiendo a que las características clínicas de la EP de origen genético y de la EP esporádica son comunes. Por lo que, podrían contribuir a la identificación de mecanismos moleculares que estén involucrados en la patogénesis de la enfermedad.

Los genes que se han manipulado para crear un modelo de EP autosómica dominante son SNCA y LRRK2. En el caso del gen que codifica la proteína α -sinucleína, SNCA, el fenotipo parkinsoniano lo han exhibido ratones, pero también otras especies como *Drosophila melanogaster* o *Caenorhabditis elegans*. Estos animales presentan disfunción motora que responde a terapia dopaminérgica e inclusiones filamentosas que provocan un leve inicio de la neurodegeneración; aunque no muestra una degeneración nigro-estriatal robusta (Giasson y col., 2002). Por otro lado, la manipulación del gen LRRK2 muestra evidencias mínimas de neurodegeneración (Kumar y Cookson, 2011; Lin y col., 2009). Asimismo, se ha trabajado en buscar modelos con los principales genes que causan EP autosómica recesiva. Sin embargo, sólo se ha demostrado que silenciando el gen PARKIN en ratones de edad adulta se provoca neurodegeneración en la SNc (Shin y col., 2011).

En los últimos años se han comenzado a usar modelos experimentales de EP basados en la inyección de vectores virales que permiten la sobreexpresión de genes en la sustancia negra. Los más utilizados han sido los modelos que sobreexpresan α -sinucleína mediante vectores virales adeno-asociados. Este modelo muestra una

degeneración neuronal más progresiva basada en la agregación de α -sinucleína (Dehay y Bezard, 2011; Meredith y col., 2008).

- **Modelos in vitro**

Los modelos *in vitro* de EP se llevan a cabo fundamentalmente en líneas celulares neuronales para reproducir en ellas los eventos celulares que causa la adicción de toxinas tales como la 6-OHDA, el MPTP o la rotenona. Por lo tanto, son útiles para estudiar episodios individuales que ocurren en el proceso neurodegenerativo, además de permitir la caracterización de los procesos moleculares y las rutas bioquímicas implicadas en la degeneración. Asimismo, estos modelos son importantes para la realización de estudios preliminares de análisis de compuestos con potencialidades terapéuticas. La principal ventaja de estos modelos con respecto a los modelos animales es que los tipos celulares que se usan pueden ser de origen humano. Sin embargo, son modelos muy simples incapaces de reproducir la funcionalidad de una red neuronal dopaminérgica.

1.1.2 Tratamiento en la enfermedad de Parkinson

El tratamiento para el abordaje de la EP es hasta la fecha exclusivamente sintomático, dirigido a paliar las manifestaciones clínicas y a mejorar la calidad de vida de los individuos que padecen la enfermedad. Actualmente, no existe ningún tratamiento que revierta o detenga el progreso neurodegenerativo.

El tratamiento farmacológico es la línea terapéutica principal, que se fundamenta en remplazo dopaminérgico con el objetivo de paliar el déficit del neurotransmisor DA que resulta del proceso neurodegenerativo.

Administración de L-DOPA

La L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) es el tratamiento estrella para la EP. La historia que llevó al desarrollo de este fármaco tiene como principales protagonistas los trabajos de dos investigadores Carlsson y Hornykiewicz. En primer lugar, Carlsson en los años cincuenta descubrió y describió la importancia de la DA en el cerebro postulando que esta ejercía un papel principal en la función motora

(Carlsson, 1957). A continuación, y tomando como referencia los trabajos de Carlsson e investigaciones que reportaban altas concentraciones de DA en el estriado (Bertler y Rosengren, 1959; Sano y col., 1959), Hornykiewicz comenzó a estudiar la DA en el cerebro de pacientes con EP. Sus hallazgos le llevaron a concluir que los déficits de DA en el estriado, cercanos al 90% en pacientes con EP, eran responsables de los síntomas motores de la enfermedad. Por consiguiente, vaticinó que el remplazo de DA podría mejorar las manifestaciones clínicas de los pacientes.

Debido a que la DA no es capaz de travesar la BHE, su precursor L-DOPA, aislado por primera vez en el año 1913 por Guggenheim de *Vicia faba*, fue el candidato elegido para comenzar los ensayos clínicos en humanos (Birkmayer y Hornykiewicz, 1998).

Actualmente, la L-DOPA se administra de forma combinada con un inhibidor de la enzima aminoácido aromático descarboxilasa (AADC) periférica, carbidopa o benserazida. Este inhibidor es necesario para garantizar la biodisponibilidad de L-DOPA en el cerebro, ya que, evita la descarboxilación periférica que conlleva un exceso de DA a nivel sistémico. Esto mejora la absorción intestinal de L-DOPA, evitando náuseas o vómitos, así como una reducción de los efectos secundarios (Hauser, 2009). Una vez en el cerebro, la L-DOPA es capaz de llegar a los terminales presinápticos de las neuronas dopaminérgicas que todavía no han degenerado en el estriado y en el citoplasma de las células, y gracias a la acción de la AADC se transforma en DA. La DA a través del transportador vesicular de monoaminas pasa al interior de las vesículas sinápticas, donde se almacena hasta su liberación en la sinapsis, evitando así su oxidación en el citoplasma. Durante la sinapsis, la DA es liberada a la hendidura sináptica produciendo la estimulación de los receptores de DA, lo cual conlleva una mejoría significativa de la sintomatología motora especialmente la acinesia y la rigidez (McDonald y col., 2018).

El tratamiento con L-DOPA se recomienda y está indicado en todas las etapas de la enfermedad y se administra comúnmente por vía oral y mediante el uso de bombas duodenales en pacientes en etapas muy avanzadas de la enfermedad. La ventaja de la vía de administración duodenal es que la liberación de L-DOPA se produce de manera más

paulatina, por lo que, la incidencia de las discinesias es mucho menor. La L-DOPA se absorbe desde el duodeno a la sangre, y desde la sangre atraviesa la BHE y llega al cerebro donde se transforma en DA, lo cual mejora la sintomatología motora de la enfermedad. Sin embargo, el 40% de los pacientes, al cabo de unos cinco años de tratamiento y el 90% después de 10 años de tratamiento crónico con L-DOPA sufren efectos secundarios que limitan enormemente el efecto terapéutico del fármaco y reducen drásticamente la calidad de vida de los pacientes. Entre estas destacan la aparición de movimientos involuntarios anormales denominadas discinesias inducidas por L-DOPA. Otras complicaciones incluyen fluctuaciones motoras y problemas psiquiátricos (Fox y Lang, 2008; Salat y Tolosa, 2013; Voon y Fox, 2007).

Otras terapias farmacológicas

Además de la L-DOPA, otras terapias farmacológicas como los agonistas dopaminérgicos, los inhibidores de las enzimas MAO-B o de la catecol-O-metil transferasa (COMT) se usan en el abordaje sintomático de la EP.

- **Agonistas dopaminérgicos**

Los análogos de la DA realizan su actividad farmacológica a nivel postsináptico sobre los receptores dopaminérgicos del estriado. Por lo tanto, actúan de manera independiente al conjunto de neuronas dopaminérgicas. Sin embargo, estos no son tan eficaces para revertir la sintomatología motora como lo es la L-DOPA, aunque están asociados con un menor riesgo de desarrollar discinesias. Por lo que, se usan como monoterapia en fases muy tempranas de la enfermedad o de forma más habitual como complemento a la terapia con L-DOPA para reducir la dosis de esta y disminuir así el riesgo de padecer discinesias. Actualmente, los más utilizados en clínica son apomorfina, ropinirol, pramipexol y rotigotina, ya que, son más específicos para los receptores D2 y D3, por lo que se reducen muchos los efectos secundarios adversos. Otros como bromocriptina, lisuride, pergolida y cabergolina poseen también propiedades dopaminérgicas con una afinidad alta por receptores D2 y mucho menor por D1 y D3. Sin embargo, estos

fármacos ejercen actividad inespecífica sobre otros sistemas como el serotoninérgico y el noradrenérgico, lo cual causa efectos secundarios indeseables como náuseas, hipotensión y alucinaciones (Antonini y col., 2009; Connolly y Lang, 2014; Millan, 2010).

- **Inhibidores de la monoamino oxidasa B**

Los inhibidores de la enzima MAO-B bloquean la enzima MAO-B, la cual metaboliza o degrada la DA. Esto consigue aumentar los niveles de DA y prologar la estimulación que ésta produce en el cerebro. En el tratamiento de la EP se utilizan dos tipos de inhibidores de la MAO-B, inhibidores irreversibles, como la selegilina y rasagilina, que además tienen efectos neuroprotectores, e inhibidores reversibles, como la safinamida que presenta efectos anti-discinéticos en modelos animales (Grégoire y col., 2013). Sin embargo, al igual que ocurre con los agonistas dopaminérgicos, estos fármacos no son capaces de producir efectos antiparkinsonianos tan robustos como es capaz de lograr L-DOPA.

- **Inhibidores de la COMT**

Los inhibidores de la enzima COMT se usan como tratamiento combinado con L-DOPA, ya que, inhibe la degradación de L-DOPA a nivel periférico. Esto aumenta la absorción, la vida media y la biodisponibilidad de L-DOPA a nivel central, lo cual mejora las fluctuaciones motoras (Müller, 2015). Los inhibidores de COMT son el tolcapone, que debe administrarse con precaución, ya que, se ha asociado con fallo hepático mortal y otros como entacapone u opicapone que se han aprobado recientemente en Europa (Balestrino y Schapira, 2020).

Tratamiento quirúrgico

Además de la terapia farmacológica otras estrategias terapéuticas como la estimulación cerebral profunda, los ultrasonidos, la terapia celular o la terapia génica resultan de interés para el tratamiento de la EP.

- **Estimulación cerebral profunda**

La estimulación cerebral profunda es un tratamiento neuroquirúrgico complicado y altamente invasivo que se utiliza cuando la EP se encuentra en etapas muy avanzadas, con complicaciones clínicas extremas que no responden a L-DOPA. La estimulación cerebral profunda se basa en aplicar electroestimulación de alta frecuencia directa sobre el NST o el GPi (Benazzouz y col., 1993; Limousin y col., 1995), ambos hiperactivados por el escaso número de neuronas dopaminérgicas en la SNc. La estimulación cerebral profunda supone mejoras significativas en la calidad de vida de los pacientes, ya que, alivia las complicaciones de la sintomatología motora, aunque, también puede inducir efectos adversos. Sin embargo, se trata de una terapia reversible, es decir, en caso de que no funcione adecuadamente los electrodos pueden retirársele al paciente (Carlson y col., 2014; Foley y col., 2017).

- **Radiocirugía gamma y ultrasonidos**

Otras alternativas terapéuticas menos invasivas se han planteado para pacientes en situaciones sintomatológicas de gravedad, la radiocirugía gamma y la técnica de ultrasonidos focalizados guiados por resonancia magnética. La radiocirugía gamma consiste en una subtalamotomía mediante altas dosis de radiación gamma (Higuchi y col., 2017; Rodríguez-Rojas y col., 2018). La técnica de ultrasonidos usa energía acústica de alta frecuencia para provocar una lesión termocoagulante milimétrica en el cerebro. Ambas técnicas no requieren de apertura craneal y tienen un porcentaje de éxito terapéutico elevado. Sin embargo, el inconveniente principal radica en que la intervención es irreversible (Higuchi y col., 2017).

- **Terapia celular**

La terapia de remplazo celular con el objetivo de restaurar las neuronas dopaminérgicas que han degenerado es una estrategia terapéutica prometedora (Stoker y col., 2017). Los primeros ensayos en este campo mostraron que las neuronas dopaminérgicas derivadas del desarrollo embrionario del mesencéfalo pueden sobrevivir al implante en cerebros adultos, y además las neuronas trasplantadas forman axones

que se extienden y restauran la innervación en el cerebro huésped (Björklund y col., 1976; Stenevi y col., 1976). A pesar de ello, las células dopaminérgicas trasplantadas han ofrecido un alivio sintomático a largo plazo en un número muy reducido de pacientes con EP (Kefalopoulou y col., 2014), sólo han producido beneficio clínico escaso en pacientes jóvenes o con baja severidad de la enfermedad y ninguno en individuos mayores (Freed y col., 2001; Olanow y col., 2003). Los resultados clínicos han sido muy variados, probablemente debido a las diferentes metodologías de los trasplantes y a la selección de los pacientes. Es necesario un número mínimo de neuronas supervivientes para obtener resultados favorables, esto supone la necesidad de implantar células procedentes de entre 3 y 5 embriones/fetos humanos de entre 6 y 9 semanas en cada hemisferio. Por lo que, para que el trasplante neuronal se convierta en una alternativa terapéutica factible en la EP, la supervivencia del injerto debe aumentar, así como el número de donantes de tejido embrionario humano, o en su lugar desarrollar fuentes alternativas de células (Hagell y Brundin 2001). Actualmente, el uso de tejido embrionario o fetal humano presenta problemas importantes, tales como ausencia de efectos terapéuticos consistentes en pacientes en estadios avanzados de enfermedad, probabilidad alta de rechazo inmunológico, dificultades ético-legales inherentes a su uso, riesgo de formación de tumores, fuente de suministro insuficiente (Barker y col., 2016) y aparición de efectos secundarios como discinesias inducidas por injerto (Brundin y col., 2001, 2010; Lindvall 2015, 2016; Lindvall y Björklund, 2011; Olanow y col., 2009).

Por consiguiente, el avance en las últimas décadas en la obtención de neuronas dopaminérgicas a partir de células madre pluripotentes neurales inducidas (IPS) o células madre mesenquimales (CMM) mejoró los resultados obtenidos y ayudó a resolver algunos problemas como la disponibilidad de material, el rechazo de las células trasplantadas y los problemas ético-legales (Björklund y Lindvall, 2017; Kikuchi y col., 2017). Actualmente, está en marcha el primer ensayo clínico con IPS que fueron diferenciadas a células progenitoras dopaminérgicas (Doi y col., 2014), iniciado por Takahashi en Japón en el año 2018. Asimismo, los resultados de la terapia con CMM en

modelos animales (Blandini y col., 2010; Capitelli y col., 2014; Dezawa y col., 2005; Jin y col., 2008; Pacary y col., 2006) puso de manifiesto que se puede retardar la progresión de la EP y promover la neuroregeneración, gracias fundamentalmente a la capacidad de producir factores tróficos y a las propiedades inmunomoduladoras de las CMM (Parga y col., 2018). En humanos se están llevando a cabo varios ensayos clínicos con CMM, pero todavía es pronto para evaluar los resultados y es necesario ajustar condiciones metodológicas (Venkataramana y col., 2012).

A pesar de todas las debilidades que la terapia celular presenta en estos momentos, el progreso continuo asociado al campo de las células madre predice avances terapéuticos esenciales en los próximos años.

- **Terapia génica**

La terapia génica es un campo de investigación continua que en el caso de las enfermedades neurodegenerativas está enfocado a detener la neurodegeneración. Algunas estrategias están dirigidas hacia la corrección de mutaciones cuando la EP es monogénica (Kabra y col., 2018; Singh y Sen, 2017), a inducir la sobreexpresión de factores neurotróficos en la SNc, a reparar genes para interrumpir la formación y a la acumulación de agregados proteicos (Hitti y col., 2019) o a la reprogramación celular *in-vivo* de la glía para su conversión en neuronas dopaminérgicas (Rivetti di Val Cervo y col., 2017). Todas estas aproximaciones están lejos de poder ser usadas hoy en día en la práctica clínica, pero gracias al avance exponencial en el estudio y refinamiento de las técnicas de ingeniería genética, la terapia génica supone una esperanza a la cura futura de la EP.

- **Inmunoterapia**

La inmunoterapia con anticuerpos dirigidos a la proteína α -sinucleína, factor clave en el inicio y la progresión de la neurodegeneración en la patogénesis de la EP, ha demostrado ser una estrategia efectiva para mejorar los déficits patológicos provocados por el exceso de α -sinucleína patógena en varios modelos animales y/o celulares (Bae y col., 2012; Masliah y col., 2005, 2011; Sánchez-Guajardo y col., 2013). Estos hallazgos dieron lugar a ensayos clínicos

de inmunización pasiva con anticuerpos monoclonales que actualmente se encuentran en fase II (Brys y col., 2019; Jankovic y col., 2018). Recientemente, también se han iniciado ensayos en fase I con el enfoque de inmunización activa, ya que, se ha desarrollado una vacuna que consiste en fragmentos cortos del péptido de α -sinucleína (Fields y col., 2019). Aunque los anticuerpos son una herramienta interesante, su elevado peso molecular socava la viabilidad de su potencial terapéutico, especialmente relevante en el caso de las enfermedades neurológicas por el obstáculo que supone la BHE. A pesar de que, la neuroinmunoterapia se presenta como una estrategia prometedora, fundamentalmente para inhibir la propagación de α -sinucleína, todavía para ello es necesario mejorar de forma sustancial la comprensión de los procesos patológicos que intervienen en las sinucleinopatías y estudiar como los anticuerpos son capaces de influir en ellas (Bergström y col., 2016). Además de clarificar los posibles riesgos asociados a la inmunización junto con averiguar cuál sería la forma idónea de administración (Fields y col., 2019).

- **Neuroprotección**

En los últimos años, también se ha puesto un gran interés en el estudio de estrategias neuroprotectoras que tienen como objetivo principal retrasar o incluso detener la neurodegeneración.

Una de las estrategias utilizadas se basa en compensar la falta de factores neurotróficos que se produce en la EP, a través del uso de sustancias como el GDNF (factor neurotrófico derivado de la glía, del inglés *glial cell-derived*) (Espinoza y col., 2020; Patel y col., 2019) o el BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro del inglés *brain-derived neurotrophic factor*) (Palasz y col., 2020). Asimismo, la actividad física tiene efectos neuroprotectores, ya que, por un lado, aumenta la disponibilidad de factores neurotróficos (Villar-Cheda y col., 2009) y, por otro lado, disminuye la inflamación (Muñoz y col., 2018).

Otra estrategia neuroprotectora en la que se ha trabajado mucho se basa en la disminución del estrés oxidativo (Singh y col., 2007) generado por la propia degeneración, así como atenuar la neuroinflamación que se haya producido. Por lo que es interesante el

uso de antioxidantes como las vitaminas A, C y E. Asimismo, la terapia con moléculas antiinflamatorias como el ibuprofeno y el naproxeno han mostrado tener efectos beneficiosos (Bonucelly y Del Dotto, 2006; Gao y col., 2011; Richardson y Hossain, 2013; Wilms y col., 2007). Además, resulta interesante destacar que en nuestro grupo de investigación se ha estudiado el papel del bloqueo del eje proinflamatorio/prooxidativo del sistema renina angiotensina (SRA). Se ha descubierto que inhibiendo el receptor de AII tipo 1 (AT1) o la enzima convertidora de angiotensina (ECA) con sartanes y captopril respectivamente, se reduce la inflamación inducida por la angiotensina II (AII) disminuyendo también el estrés oxidativo que esta genera a través de la activación de la enzima NADPH-oxidasa (Labandeira-Garcia y col., 2014, 2016).

1.1.3 Sistema renina angiotensina (SRA), neuroinflamación y enfermedad de Parkinson

El SRA filogenéticamente es uno de los sistemas hormonales más antiguo, clave para la supervivencia de los mamíferos y en particular en la evolución de la especie humana. Este sistema clásicamente se estudió como un sistema humoral circulante que tiene como función principal la regulación de la presión sanguínea, así como el mantenimiento de la homeostasis del sodio y del agua (Lev-Ran y Porta, 2005).

- **Componentes del sistema renina angiotensina**

El efector más importante en el SRA es el péptido AII, que se genera gracias a la acción secuencial de dos enzimas, la renina y la ECA sobre su precursor la glicoproteína, angiotensinógeno (Allen y col., 1998; Unger y col., 1996). El angiotensinógeno llega al plasma procedente principalmente de los hepatocitos mientras que la enzima renina se genera mayoritariamente en las células yuxtaglomerulares del riñón. Ambos, son liberados al torrente sanguíneo, donde la renina cataliza la reacción que elimina el residuo N-terminal del angiotensinógeno dando lugar al péptido angiotensina I (AI), poco activo en humanos (Peach y col., 1977). A continuación, la ECA que se encuentra de forma ubicua en las células endoteliales y en el plasma

escinde dos aminoácidos del extremo C-terminal de la AI y genera la AII (Corvol y col., 1995).

La AII realiza su actividad fundamentalmente sobre dos tipos de receptores (Husain y Graham, 2000). Estos receptores se dividen en dos clases, AT1 y el receptor de angiotensina tipo 2 (AT2) (Unger y col., 1996). La activación de los receptores AT1 causa vasoconstricción, aumentando la liberación de norepinefrina y aldosterona, dando lugar a elevación de la presión arterial, a través de la retención de sodio y la expansión del volumen intravascular (Labandeira-Garcia y col., 2011). Los receptores AT2 contrarrestan la constricción inducida por los receptores AT1 en el sistema vascular (Chabrashvili y col., 2003; Jones y col., 2008). AT2 se expresa en abundancia durante el desarrollo fetal pero su expresión generalmente cae después del nacimiento. Estos receptores se han asociado con modulación de la proliferación celular, diferenciación celular (Rodríguez-Pallares y col., 2004) y procesos de regeneración y apoptosis (Labandeira-Garcia y col., 2011).

La necesidad de aumentar el conocimiento del SRA ha llevado a identificar más componentes. Un enzima homólogo de ECA, el enzima ECA 2 (enzima convertidora de angiotensina 2) que hidroliza la AII generando angiotensina 1,7 (A1,7). La A1,7 actúa sobre el receptor Mas que posee acciones opuestas a la AII (Nakano y col., 1995), causando vasodilatación, natriuresis y bajada de la presión sanguínea (Ferrario y col., 1991). También, se ha identificado otro receptor denominado receptor de (Pro)renina (PRR) al que se unen como ligandos la renina y su precursor la prorenina. Esta unión provoca un aumento de la actividad enzimática incrementándose hasta cinco veces la generación de AII (Labandeira-Garcia y col., 2011).

- **El sistema renina angiotensina en el cerebro**

Además, del SRA circulante u humoral en las últimas décadas se ha demostrado que existe un segundo nivel representado por el SRA local o tisular, presente en varios tejidos incluyendo el tejido cerebral (Ganong, 1994; Re, 2004). El funcionamiento aberrante del SRA tisular está implicado en el aumento de los niveles de estrés oxidativo, y desempeña un papel clave en la respuesta inflamatoria, así como en la alteración del proceso normal de autofagia. Concretamente, niveles

elevados de AII vía receptor AT1, activan al complejo NADPH-oxidasa de las células (Garrido y Griendling, 2009; Touyz, 2004) que junto con la mitocondria es la fuente principal de producción de especies reactivas del oxígeno (Babior, 2004). Esto resulta en la liberación al medio de citoquinas o quimiocinas que activan la migración de las células inflamatorias, principalmente las células microgliales, al área dañada desencadenando la respuesta inflamatoria, lo que finalmente resulta en muerte celular (Labandeira-Garcia y col., 2016; Ruiz-Ortega y col., 2001; Suzuki y col., 2003). Este proceso se ve exacerbado en patologías relacionadas con el envejecimiento como hipertensión, diabetes o arterioesclerosis (Griendling y col., 2000; Münzel y Keaney, 2001). Por su parte, las funciones vía receptor AT2 contrarrestan el efecto deletéreo generado vía AT1, ya que, AT2 actúa inhibiendo la activación del complejo NADPH-oxidasa (Labandeira-Garcia y col., 2016). Es decir, por un lado, podemos hablar de la existencia de un brazo prooxidativo/proinflamatorio del SRA relacionado con el papel del receptor AT1, por otro lado, en contraposición, tenemos un brazo antioxidante/antinflamatorio inducido por la función que ejerce el receptor AT2.

Además, varios estudios han demostrado la existencia de un tercer nivel de SRA que se encuentra en el interior de varios tipos celulares y recibe el nombre de SRA intracrino o intracelular (Kumar y col., 2007; Labandeira-Garcia y col., 2020; Re y Cook, 2015). Concretamente, en trabajos recientes se han detectado los componentes del sistema en las mitocondrias (Costa-Besada y col., 2018; Valenzuela y col., 2016) y en el núcleo (Villar-Cheda y col., 2017).

En el cerebro, la presencia del SRA inicialmente se asoció con el control de la presión sanguínea o con el mantenimiento de la homeostasis del sodio y del agua en el área de los órganos circunventriculares (Phillips y Oliveira, 2008). Sin embargo, posteriormente los componentes del sistema fueron identificados en neuronas y células de la glía (von Bohlen y Albrecht, 2006), y la producción de angiotensinógeno fue detectada principalmente en los astrocitos (Milsted y col., 1990; Stornetta y col., 1988), aunque también una pequeña contribución se ha observado por parte de las neuronas (Kumar y col., 1988; Thomas y col., 1992). En las neuronas

dopaminérgicas y en las células de la glía se ha demostrado la presencia de los receptores AT1, AT2 (Garrido-Gil y col., 2013b; Joglar y col., 2009; Rodríguez-Pallares y col., 2004, 2008; Valenzuela y col., 2010) y PRR (Joglar y col., 2009; Garrido-Gil., 2013b) en roedores y primates incluyendo a los humanos. Además, se ha descrito la presencia de las subunidades del complejo NADPH-oxidasa en neuronas dopaminérgicas, astrocitos y microglía (Joglar y col., 2009; Rodríguez-Pallares y col., 2007, 2008).

- **El sistema renina angiotensina en la enfermedad de Parkinson**

Evidencias experimentales en nuestro laboratorio han puesto de manifiesto el papel del SRA en la degeneración dopaminérgica. Varios estudios sugieren que niveles elevados AII vía AT1 exacerban la degeneración dopaminérgica, lo que implica que el SRA juega un papel en la patogénesis y progresión de la EP (Labandeira-Garcia y col., 2016). Por un lado, la AII actúa en las neuronas dopaminérgicas vía AT1 elevando los niveles de especies reactivas del oxígeno (Rodríguez-Pallares y col., 2009, 2012), lo cual desencadena la respuesta inflamatoria por activación microglial. Por otro lado, usando modelos animales de EP se ha visto que la AII potencia el efecto neurodegenerativo que causan las neurotoxinas dopaminérgicas mientras que si se trata con inhibidores de ECA como el captopril (López-Real y col., 2005; Muñoz y col., 2006; Sonsalla y col., 2013), bloqueantes de AT1 como los sartanes (Joglar y col., 2009; Grammatopoulos y col., 2007; Rey y col., 2007; Rodríguez-Pallares y col., 2008) o inhibidores de la activación de la NADPH-oxidasa (Joglar y col., 2009; Rey y col., 2007; Rodríguez-Pallares y col., 2008) se reduce la pérdida de neuronas dopaminérgicas.

Otros hallazgos nos sugieren que la disminución de la actividad dopaminérgica que se produce durante la EP induce una regulación compensatoria del SRA, que acaba aumentando la vulnerabilidad de las neuronas dopaminérgicas (Dominguez-Meijide y col., 2014; Villar-Cheda y col., 2014). Inicialmente, cuando los niveles de DA en el estriado bajan, la AII vía AT1 aumenta la liberación de la DA. Sin embargo, cuando la degeneración dopaminérgica no permite que se restauren los niveles normales de DA, el SRA se hiperactiva lo cual

genera estrés oxidativo y agrava la respuesta inflamatoria resultando en progresión de la neurodegeneración (Labandeira-Garcia y col., 2013). La depleción dopaminérgica en el sistema nigroestriatal incrementa la expresión de los receptores AT1, AT2 y la activación de la NADPH-oxidasa y ambos decrecen cuando se restauran las funciones dopaminérgicas (Villar-Cheda y col., 2010). Además de la interacción del SRA y la DA, es interesante destacar también la interacción entre el SRA y los estrógenos, ya que, se ha demostrado que la inhibición del SRA media los efectos neuroprotectores de los estrógenos en modelos de EP (Labandeira-Garcia y col., 2016; Rodríguez-Pérez y col., 2010, 2012)

Por lo tanto, la manipulación del SRA cerebral podría constituir una estrategia neuroprotectora que retrase o debilite el proceso neurodegenerativo (Dominguez-Meijide y col., 2014; Rodriguez-Perez y col., 2018).

1.2 DISCINESIAS INDUCIDAS POR L-DOPA

El precursor de la DA, la levodopa, sigue siendo en la actualidad, el tratamiento con mayor efectividad para paliar la sintomatología motora que caracteriza la EP. Sin embargo, la respuesta a este tratamiento cambia durante el progreso de la enfermedad. Por lo tanto, a medida que la degeneración dopaminérgica incrementa se vuelve imprescindible aumentar la dosis diaria de L-DOPA, lo que conlleva un riesgo considerable de padecer complicaciones motoras denominadas discinesias inducidas por L-DOPA.

- **Definición y características**

Las discinesias se definen como movimientos involuntarios anormales (AIMs del inglés *abnormal involuntary movements*) que se desarrollan a medida que progresa la EP como resultado de las complicaciones que produce la terapia de remplazo dopaminérgico. La progresión de la degeneración de las neuronas dopaminérgicas es el principal factor de riesgo del desarrollo de discinesias (Bastide y col., 2015; Hong y col., 2014).

Además del grado de denervación dopaminérgica, otros factores de riesgo son la duración y severidad de la enfermedad, la edad de inicio de ésta, y la dosis de L-DOPA empleada (Lane, 2019). Estos

movimientos se producen debido a niveles fluctuantes de DA en el cerebro que inducen una estimulación pulsátil y no fisiológica de los receptores de DA, produciéndose principalmente una hiperactivación de los receptores D1, aunque también de los receptores D3 (Bezard y col., 2003). Esto da lugar a cambios en la plasticidad sináptica, en la expresión de proteínas y genes, ya que, se activan cascadas moleculares como la vía ERK (quinasa regulada por señales extracelulares, del inglés *extracellular signal-regulated kinase*) y Fos B. También se producen anomalías en diferentes sistemas de neurotransmisores que alteran el patrón de disparo de las neuronas y las señales entre la corteza y los GB (Batside y col., 2015; Carta y Bezard, 2011; Chase 1998; Cenci y col., 2011; Cenci, 2014).

- **Manifestaciones clínicas de las discinesias y clasificación**

Las presentaciones clínicas de las discinesias son variables. Por un lado, se han descrito diferencias en la manifestación de las complicaciones motoras, ya que, podemos hablar de corea, distonía o balismo. La corea se caracteriza por movimientos involuntarios irregulares, sin propósito, no rítmicos, abruptos y rápidos que parecen fluir de una parte del cuerpo a otra. Afectan principalmente al cuello y extremidades y se manifiestan primero en el lado del cuerpo que está más afectado por la EP. La distonía se identifica con contracciones sostenidas de los músculos agonistas y antagonistas. El balismo se asocia con movimientos coreicos de gran amplitud, unilaterales o bilaterales de las partes proximales de las extremidades.

Por otro lado, existen variaciones en función del patrón temporal en el cual aparecen las discinesias en relación con la ingesta del fármaco, discinesias “pico de dosis”, discinesia bifásica y distonía en periodos de reposo. La discinesia “pico de dosis” es la discinesia más común, coincide con los niveles plasmáticos más altos de DA, cuando se produce el mayor efecto antiparkinsoniano. Los movimientos más comunes en las discinesias “pico de dosis” son los coreicos y en los casos más graves se producen movimientos balísticos, aunque pueden presentarse como movimientos distónicos. En la discinesia bifásica, los movimientos involuntarios son distónicos principalmente y surgen justo antes del remplazo dopaminérgico y al final del efecto terapéutico,

es decir, cuando los niveles de L-DOPA en plasma están fluctuando (Fabbrini y col., 2007). En la distonía en periodos de reposo se producen movimientos distónicos generalmente dolorosos por la mañana o después de un periodo de reposo (Bastide y col., 2015).

Estas complicaciones pueden llegar a ser discapacitantes, ya que, reducen enormemente el efecto terapéutico de la L-DOPA limitando la actividad diaria de los pacientes. Además, el 80% de los pacientes tratados con L-DOPA desarrollan discinesias en un plazo de entre 7 y 10 años (Cenci y col., 2020). Razones por las que, los esfuerzos de la investigación en este campo se han centrado en desarrollar modelos animales que presenten estas complicaciones motoras y así poder comprender los mecanismos moleculares que subyacen a estas y evaluar nuevas estrategias terapéuticas de tratamiento.

- **Modelos animales de discinesias**

En los modelos animales las discinesias de “pico de dosis” y las respuestas motoras fluctuantes a la L-DOPA han sido caracterizadas tanto en roedores como en primates no humanos. Sin embargo, en los modelos animales las discinesias bifásicas o la distonía en periodo de reposo no han sido descritas, por lo que, los mecanismos que subyacen a este tipo de complicaciones son hasta la fecha completamente desconocidos (Cenci y Crossman, 2018).

Los primeros modelos empleados se realizaron en primates no humanos utilizando la neurotoxina MPTP, en donde se observó que entre 2 y 12 días tras el tratamiento con L-DOPA, estos animales desarrollan discinesias, caracterizadas por movimientos coreicos o distónicos (Jenner, 2003; Jonhston y Fox, 2015). Para proporcionar una cuantificación de la severidad de las discinesias en el modelo se estableció una escala con 4 grados de severidad (leve, modera, marcada y severa) (Fox y col., 2012).

A finales de los años 90, se empezaron a usar modelos de roedores. Concretamente, ratas con lesión unilateral con 6-OHDA exhibieron movimientos involuntarios anormales que afectan al lado contralateral a la lesión (Cenci y col., 1998; Lee y col., 2000). Estas discinesias presentan el mismo perfil de tiempo que las discinesias de “pico de dosis” y la severidad de las discinesias se va agravando a medida que

se administra la L-DOPA, llegando a ser máxima tras 2-3 semanas de tratamiento diario con L-DOPA (Cenci y Crossman, 2018). Los movimientos discinéticos en los roedores se distinguen claramente de los clásicos movimientos estereotipados. Se clasifican en 3 tipos topográficos principales, movimientos anormales del cuello y el tronco (axial), del miembro anterior (extremidad) o de los músculos de la lengua y la masticación (orolingual) (Cenci y col., 1998). La gravedad de la discinesia se estableció en base a la proporción de tiempo durante la observación en la cual la discinesia está presente (Cenci y col., 1998). También, se introdujo una escala para evaluar la amplitud de la discinesia, definida como el grado de desviación de una parte del cuerpo discinética de su posición natural de reposo (Breger y col., 2013; Winkler y col., 2002). Las discinesias en ratas tratadas con L-DOPA presentan muchas similitudes con las discinesias “pico de dosis” en humanos, son incapacitantes si son muy severas (Dekundy y col., 2007; Lundblad y col., 2003), responden de forma similar a los tratamientos antidiscinéticos que se usan en clínica y su incidencia y gravedad aumenta cuando se incrementa la dosis de L-DOPA (Lindgren y col., 2007). Además, existe una relación muy clara entre el grado de denervación dopaminérgica estriatal y la incidencia y la severidad de las discinesias (Nadjar y col., 2009; Paillé y col., 2007; Winkler y col., 2002).

También se pueden utilizar ratones con lesión unilateral de 6-OHDA para obtener modelos de discinesias (Francardo y col., 2011; Lundblad y col., 2004, 2005). Desde el punto de vista metodológico, resulta útil para estudiar las diferencias entre ratas y ratones en el modelo de lesión y en el tratamiento con L-DOPA. En ratón, la lesión en el FPM confiere una susceptibilidad muy pronunciada al desarrollo de discinesia incluso con dosis muy bajas de L-DOPA (1-2 mg/kg) (Fasano y col., 2010; Heiman y col., 2014). Sin embargo, en la lesión intraestriatal la variabilidad de la discinesia es más alta y la dosis de L-DOPA que se necesita para que estas se desarrollen es el cuádruple que en el caso de las ratas (Francardo y col., 2011). Otra diferencia importante entre los dos modelos de roedores es la evolución de la discinesia, ya que, en el ratón la severidad de la discinesia se alcanza tras 2 o 3 inyecciones diarias con L-DOPA.

Un interesante hallazgo reciente, consiste en la creación de modelos de discinesia en ratones transgénicos que permite activar específicamente distintos tipos celulares mediante quimiogénica u optogénica. Este desarrollo abre nuevas posibilidades para desgranar las causas de los movimientos involuntarios anormales. Por ejemplo, se ha demostrado que la estimulación de la vía directa estriatal con métodos quimiogénicos (Alcacer y col., 2017) u optogénicos (Hernandez y col., 2017; Perez y col., 2017) puede imitar las discinesias, aunque con diferentes resultados en función del método utilizado.

1.2.1 Mecanismos implicados

Los mecanismos implicados en el desarrollo de las discinesias son complejos y multifactoriales e implican la modulación de distintos sistemas neuronales, como los sistemas dopaminérgico, serotoninérgico y glutamatérgico, y no neuronales, por lo que estamos todavía lejos del conocimiento completo de los mismos.

1.2.1.1 Mecanismos neuronales: sistema dopaminérgico, serotoninérgico y glutamatérgico

- **Sistema dopaminérgico**

El principal sistema neuronal implicado en el desarrollo de las discinesias es el sistema dopaminérgico. Ya que, altas concentraciones de DA exógena provocan la hiperactivación de la vía directa, produciendo la hiperactivación crónica de las neuronas de proyección estriatales por hipersensibilización principalmente de los receptores D1 (Santini y col., 2008), aunque se han descrito también cambios en los receptores D3 (Bezard y col., 2003). Esta estimulación pulsátil de los receptores lleva a cambios en las vías de transducción de señales, como es el caso de aumento en la activación de las proteínas quinasas ERK1 y ERK2 (Santini y col., 2007; Westin y col., 2007) o del factor de transcripción Fos B, lo que provoca modificaciones en la plasticidad sináptica a largo plazo que conducen a las discinesias (Westin y col., 2007). La pérdida de DA provoca disminución del número de espinas dendríticas de las neuronas espinosas del estriado tanto en ratas (Zaja-

Milatovic y col., 2005) como en análisis de cerebros humanos *postmortem*. El tratamiento farmacológico con L-DOPA no es capaz de restaurar las características estructurales del circuito nigroestriatal y este podría ser también un posible mecanismo que intervenga en el desarrollo de las discinesias inducidas por L-DOPA (Jenner, 2008).

- **Sistema serotoninérgico**

La degeneración de la vía nigro-estriatal es necesaria para el desarrollo de las discinesias, de hecho, en estadios tempranos de la enfermedad y al inicio del tratamiento con L-DOPA, las discinesias no se producen porque hay terminales dopaminérgicos presinápticos conservados. Tras la administración exógena de L-DOPA, se produce estimulación fisiológica de los receptores de DA en las neuronas estriatales y los terminales dopaminérgicos preservados proporcionan un sistema de regulación, a través de DAT y de los autorreceptores D2, eliminando el exceso de DA de la hendidura sináptica (Ulusoy y col., 2010; Carta y Bezard, 2011). A medida que progresa la EP, cada vez son menos los terminales que pueden convertir L-DOPA en DA. Por lo tanto, otros grupos neuronales, como las neuronas serotoninérgicas captan la L-DOPA, la transforman en DA, ya que, poseen la maquinaria enzimática para su conversión (AADC) y almacenamiento vesicular, por lo tanto, son capaces de liberar DA al espacio sináptico. Esta contribución también se produce en etapas tempranas de la enfermedad, pero en este caso es beneficiosa, ya que, la presencia de terminales dopaminérgicos conservados permite amortiguar y recaptar el exceso de DA evitando la sobreestimulación de los receptores. Sin embargo, las neuronas serotoninérgicas carecen de los mecanismos de control que poseen las neuronas dopaminérgicas, los autorreceptores D2 para regular la liberación de DA y DAT para recaptar el exceso de DA. De esta manera, se produce un exceso de liberación de DA (Carta y col., 2007; Carta y Bezard, 2011; Muñoz y col., 2008) que da lugar a oscilaciones en los niveles del neurotransmisor que promueve la estimulación pulsátil de los receptores de DA postsinápticos estriatales y la aparición de discinesias (Carta y Bezard, 2011; Mosharov y col., 2015).

De acuerdo con esto, en experimentos realizados en nuestro laboratorio inicialmente se ha observado que lesiones específicas del sistema serotoninérgico bloquean los efectos de L-DOPA (López y col., 2001), y posteriormente se ha demostrado que la lesión de este sistema es capaz de causar una supresión casi completa de los movimientos involuntarios anormales en ratas hemiparquinsonianas discinéticas (Carta y col., 2007) y en primates no humanos (Beaudoin-Gobert y col., 2015). Un bloqueo similar de las discinesias fue obtenido después de administrar de forma combinada los agonistas de los dos tipos de autorreceptores serotoninérgicos, 5-HT1A y 5-HT1B (Carta y col., 2007). Estos compuestos, también fueron capaces de suprimir completamente las discinesias en el modelo de primates (Muñoz y col., 2008). Esto confirma la existencia de efectos sinérgicos en la activación de los dos tipos de autorreceptores serotoninérgicos. De esta manera, la activación de autorreceptores de serotonina (5-HT) por parte de los agonistas reduce la cantidad de DA liberada de las neuronas serotoninérgicas, lo que amortigua el exceso de DA en la sinapsis en los “picos de dosis” de L-DOPA. Además, la hiperinervación serotoninérgica producida por la sobreexpresión de BDNF, da lugar a un aumento de las discinesias en las ratas parkinsonianas (Tronci y col., 2017).

Los receptores 5-HT1A y 5-HT1B están presentes tanto en los somas y axones de las neuronas serotoninérgicas como en las neuronas corticales y estriales donde controlan la liberación de glutamato y GABA (Mignon y Wolf, 2005; Zhang y col., 2008a). El glutamato está altamente involucrado en las discinesias, por lo que, la activación de los receptores 5-HT1 en el córtex proporcionan efecto antidiscinético en el modelo de ratas. Los agonistas de los receptores 5-HT1A también suprimen los movimientos anormales inducidos por los agonistas directos de los receptores de DA (Dupre y col., 2013; Lindenbach y col., 2013; Meadows y col., 2017). Este efecto es independiente de las neuronas serotoninérgicas y tiene lugar a dosis de agonistas más altas de las que son efectivas con L-DOPA (Carta y col., 2007; Muñoz y col., 2009). Sin embargo, una nueva clase de agonistas de los receptores 5-HT1A altamente selectivo, está siendo desarrollado con el objetivo de

activar los receptores 5-HT_{1A} pre o post sinápticos y parece ser efectivo a dosis muy bajas (Meadows y col., 2017; Muñoz y col., 2020).

El tratamiento con L-DOPA a largo plazo reduce la liberación basal y el metabolismo en las neuronas serotoninérgicas, lo cual lleva a una reducción de los niveles de 5-HT en distintas áreas del cerebro (Navailles y col., 2011). Por lo que el deterioro de la función de las neuronas serotoninérgicas puede estar involucrado en la sintomatología no motora resultado de la farmacoterapia con L-DOPA, como es caso de la depresión o la ansiedad (Navailles y col., 2011; ver esquema 2).

- **Sistema glutamatérgico**

El sistema glutamatérgico juega un papel en las discinesias, ya que, la L-DOPA aumenta la actividad de la sinapsis corticoestriatales y incrementa la liberación de glutamato (Calon y col., 2003). Esto provoca cambios adaptativos en los receptores de glutamato ionotrópicos (NMDA, AMPA) y metabotrópicos (mGluR) (Ouattara y col., 2010). De hecho, el bloqueo de los receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) de glutamato a través de amantadina es el tratamiento habitual para combatir las discinesias. Después del tratamiento con L-DOPA, en modelos animales de EP y discinesias se ha visto una distribución anormal de los subtipos del receptor NMDA en las neuronas del estriado y en las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales (Gardoni y col., 2006; Hallett y col., 2005; Mellone y col., 2015; Picconi y col., 2004). Este desequilibrio en los subtipos de los receptores NMDA en el estriado es responsable de las alteraciones en las sinapsis glutamatérgicas que subyacen a las discinesias (Gardoni y col., 2006). Estos cambios se correlacionan con anomalías en el comportamiento motor y alteraciones de la plasticidad sináptica (Calabresi y col., 1992; Gardoni y col., 2006; Paille y col., 2010; Picconi y col., 2004). Modificaciones en la localización sináptica y la fosforilación de los receptores AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico) también se ha documentado en modelos de discinesia y en pacientes con EP (Ba y col., 2006; Errico y col., 2011; Santini y col., 2007, 2010), así como modificaciones en la composición y actividad de las subunidades (Hallett y col., 2005; Silverdale y col., 2010).

Estos cambios aberrantes en la plasticidad sináptica no se quedan solo en la estructura anatómica de los GB si no que se hacen extensibles a otras áreas conduciendo a una remodelación morfológica de la corteza prefrontal. En pacientes parkinsonianos con discinesia se ha reportado un aumento significativo del volumen de materia gris en la circunvolución frontal inferior bilateral en comparación con pacientes parkinsonianos que no desarrollan discinesia. De igual forma, varios estudios han mostrado una conectividad alterada entre las áreas corticales frontales y el putamen en pacientes con discinesia (Herz y col., 2014; ver esquema 2).

- **Otros sistemas y mecanismos**

Por otro lado, cabe destacar que el mecanismo por el cual se desarrollan las discinesias no se queda aquí y es más complejo todavía. Ya que, se ha demostrado que otros neurotransmisores juegan también un papel en su desarrollo, es el caso del GABA, de los receptores de adenosina-2, los opioides y los cannabinoides entre otros (Sharma y col., 2015). Igualmente, se han encontrado en modelos animales de discinesias que el tratamiento con nicotina (Quik y col., 2013), cafeína o antagonistas de los receptores noradrenérgicos reduce las discinesias (Buck y Ferger, 2010). Sin embargo, el papel preciso que juegan los sistemas colinérgico y noradrenérgico no se conoce aún de forma clara. Estudios recientes han sugerido también que la formación de heterómeros de distintos tipos de receptores está implicada en el desarrollo de las discinesias, como son los receptores dopaminérgicos D1-D3, (Fanni y col., 2019; Farré y col., 2018; Scheggi y col., 2020; Solís y Moratalla, 2018), de cannabinoides (Navarro y col., 2018) o de receptores de angiotensina (Rivas-Santisteban y col., 2020).

1.2.1.2 Mecanismos no neuronales: neuroinflamación y angiogénesis

En los últimos años se ha descrito que otros mecanismos como la neuroinflamación (Barnum y col., 2008; Del-Bel y col., 2016; Mulas y col., 2016; Teema y col., 2016) y la angiogénesis (Boi y col., 2019; Ohlin y col., 2011) juegan un papel en la fisiopatología de las discinesias.

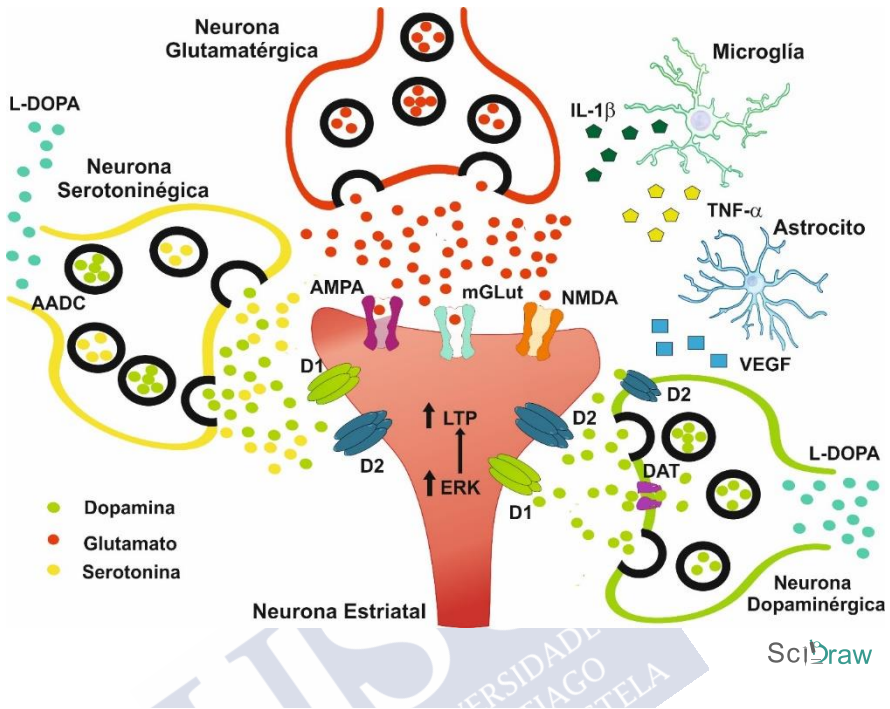
En modelos animales de discinesias se ha identificado un aumento de la producción de citoquinas proinflamatorias como IL-1 β (Barnum y col., 2008; Muñoz y col., 2014), TNF- α (Mulas y col., 2016) o NO (Bortolanza y col., 2015a). También se ha descrito un aumento en la expresión del enzima óxido nítrico sintetasa inmunorreactiva (iNOS), de microglía activada (CD-11B u OX-42) y de astrocitos (GFAP; *glial fibrillary acidic protein*) (Bortolanza y col., 2015a,b). Además, el estudio de Julien y col., 2006, realizado en cerebro *postmortem*, mostró que los pacientes que experimentaban complicaciones motoras inducidas por L-DOPA tenían niveles cerebrales elevados de ácido araquidónico, precursor principal de inflamación, frente a aquellos que no desarrollaron discinesias. Estas evidencias sugieren que la microglía y los astrocitos activados producen sustancias proinflamatorias que juegan un papel en el desarrollo de las discinesias, debido a una comunicación anormal entre las células de la glía y las neuronas que afecta a la actividad sináptica y a la neuroplasticidad (Bortolanza y col., 2015a; Carta y col., 2011, 2017; Martínez y col., 2015; Mulas y col., 2016). De acuerdo con esto, varios estudios demuestran que la administración exógena de sustancias antiinflamatorias como corticosterona (Barnum y col., 2008), ibuprofeno (Teema y col., 2016) o rosiglitazone (Martínez y col., 2015) atenúan las discinesias. Recientemente se ha descrito que la administración de talidomida reduce las discinesias a través de la disminución de marcadores neuroinflamatorios como TNF- α , IL-10 (interleucina-10) u OX-42 (Boi y col., 2019). Asimismo, se ha descrito que inyectando sustancias que producen estímulo inflamatorio como el lipopolisacárido (LPS), los movimientos involuntarios anormales se acentúan en ratas hemiparkinsonianas discinéticas. Este hallazgo reafirma la relación entre las discinesias y los procesos inflamatorios (Mulas y col., 2016). En la EP, la activación exacerbada de la microglía y la sobreproducción de citoquinas que se genera en respuesta a la L-DOPA pueden modular de manera anormal la función de los GB (Clark y col., 2015). Las citoquinas pueden contribuir a respuestas neuronales alteradas que se producen en discinesias a través de varios mecanismos, apuntando al tráfico y la función de los receptores en las neuronas de proyección estriatales, a la síntesis de DA en los terminales

dopaminérgicos conservados o al metabolismo en las neuronas serotoninérgicas (Calabresi y col., 2010; Picconi y col., 2003; Santini y col., 2007).

Además, hay numerosas evidencias que muestran una asociación entre las discinesias y la angiogénesis. La primera prueba de ello fue aportada por el grupo de la Dra Cenci, donde observaron un incremento en la proliferación de las células endoteliales junto con un aumento en permeabilidad de la BHE en ratas discinéticas, sugiriendo que esos cambios podrían afectar a la cinética de la L-DOPA y producir alteraciones motoras (Westin y col., 2006).

En los animales discinéticos se observó un aumento del flujo vascular cerebral acompañado de un incremento en el metabolismo de la glucosa al compararlos con animales no discinéticos (Ohlin y col., 2012). La angiogénesis inducida por la L-DOPA depende de la activación de los receptores D1 de DA, mientras que la estimulación de los receptores D2 tiene un efecto opuesto (Lindgren y col., 2009). En animales discinéticos y pacientes se ha descrito un aumento de la expresión de factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y moléculas que lo inhiben disminuyen las discinesias (Boi y col., 2019; Ohlin y col., 2011). Otros compuestos que modulan la angiogénesis y también la neuroinflamación como talidomida (Boi y col., 2019), ibuprofeno o peroxicam (Teema y col., 2016) reducen las discinesias en modelos animales.

En la EP el SRA (Rodríguez-Perez y col., 2018, 2020) y la vía ROCK (Rho quinasa; Borrajo y col., 2014b; Rodríguez-Pallares y col., 2016; Villar-Cheda y col., 2012) juegan un papel esencial en los procesos neuroinflamatorios, así como en la angiogénesis. Además, en trabajos realizados en nuestro grupo de investigación se ha demostrado que manipulando el SRA, mediante el bloqueo del receptor AT1 a través de su antagonista candesartan, en ratas discinéticas lesionadas con 6-OHDA, se reducen las discinesias, a través de la disminución de la expresión de IL-1 β y de VEGF (Muñoz y col., 2014; ver esquema 2).



Esquema 2. Principales mecanismos implicados en el desarrollo de las discinesias inducidas por L-DOPA. Las neuronas serotoninérgicas (amarillo), poseen la misma enzima, AADC, responsable de la conversión de la L-DOPA a dopamina, pero no los mecanismos para poder regular su liberación (DAT y autoreceptores D2). En ausencia de terminales dopaminérgicas (verde), la liberación no regulada de DA desde el sistema serotoninérgico provocaría la estimulación intermitente de los receptores dopaminérgicos de las neuronas estriatales (naranja), dando lugar a la aparición de movimientos involuntarios anormales. Además, existe una sobreactivación del sistema glutamatérgico (rojo) que conduce a cambios en la plasticidad sináptica. Recientemente, se ha propuesto que otros mecanismos no neuronales, como la neuroinflamación y la angiogénesis, se encuentran también involucrados, dónde intervendrían citoquinas y otros factores (TNF, IL-1B o VEGF) producidos por las células de la glía (azul). Abreviaturas: IL-1B, interleucina 1B; TNF- α , factor de necrosis tumoral; AADC, aminoácido-aromático decarboxilasa; AMPA, ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico; mGlu, receptor metabotrópico de glutamato; NMDA, N-metil-D-aspartato; VEGF, factor de crecimiento endotelial vascular; D1, receptor de dopamina tipo 1; D2, receptor de dopamina tipo 2; DAT, transportador de dopamina; LTP de las siglas en inglés *long-term potentiation*; ERK, de las siglas en inglés *extracellular signal-regulated kinase*. En este esquema de elaboración se emplearon recursos con licencia CC-BY-SA, (Scidraw 2021).

1.2.2 Tratamiento de las discinesias inducidas por L-DOPA

Actualmente, para el tratamiento de las discinesias la amantadina es el único compuesto considerado “clínicamente útil” (Ferreira y col., 2013; Luginger y col., 2000). Se trata de un antagonista de los receptores glutamatérgicos NMDA (Carta y col., 2018), con el cual se han realizado un gran número de ensayos clínicos durante los últimos años que han demostrado su eficacia clínica a largo plazo (Hauser y col., 2017; Oertel y col., 2017; Ory-Magne y col., 2014; Pahwa y col., 2015; Wolf y col., 2010). Sin embargo, se necesita una dosis muy alta para obtener un efecto antidiscinético (100-200mg diarios), lo que da lugar a numerosos efectos secundarios incluyendo visión borrosa, mareos, alucinaciones, confusión, edemas, problemas urinarios, estreñimiento o sequedad de la boca (Hubsher y col., 2012). Por ello, está contraindicado su uso en un importante número de pacientes.

El neuroepiléptico atípico, clozapina, es un agente antidopaminérgico, antiserotoninérgico, antimuscarínico, antiadrenérgico y antihistaminérgico, que ha resultado eficaz como antidiscinético en un único estudio clínico (Durif y col., 2004). No obstante, el posible riesgo de efectos adversos de este fármaco limita su uso (Leta y col., 2019).

Además de esto, también se han encontrado aproximaciones preclínicas interesantes en modelos animales de discinesia, trabajando con agonistas de los receptores de 5-HT, 5-HT1A y 5-HT1B (Bezard y col., 2013; Muñoz y col., 2009) o moduladores alostéricos negativos del receptor metabotrópico glutamatérgico mGluR5 (Bezard y col., 2014). En ensayos clínicos realizados hasta ahora han utilizado compuestos que actúan como agonistas de los receptores 5-HT1A, es decir, la bupiriona (Politis y col., 2014), sarizotan (Bara-Jimenez y col., 2005; Goetz y col., 2007; Olanow y col., 2004) y la tandospirona (Kannari y col., 2002). Actualmente, usando el fármaco bupiriona hay un ensayo clínico en fase III y un ensayo en fase II que combina bupiriona y amantadina (McFarthing y col., 2019). A pesar del efecto prometedor de los primeros ensayos con moduladores del sistema serotoninérgico, todavía no se ha aprobado ningún compuesto para su uso clínico, es necesario realizar ensayos más grandes controlados con

placebo (Goetz y col., 2007), ya que, en algunos casos, empeoró la condición clínica de los pacientes debido a una pérdida de efecto terapéutico de la L-DOPA. En base a los datos preclínicos parecía probable que los agonistas selectivos que actúan de forma sinérgica sobre los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{1B} (Carta y col., 2007; Muñoz y col., 2008), podrían tener un perfil farmacológico más favorable para la supresión de las discinesias. Aunque, se había visto que el uso de dosis altas compromete el efecto terapéutico de la L-DOPA (Bezard y col., 2013). Sin embargo, dos de los agonistas mixtos ya han sido probados en humanos, la eltoprazina y la anpirtolina. Un ensayo clínico con la eltoprazina (Svenningsson y col., 2015) fue realizando y se observó que no comprometía la acción antiparkinsoniana, pero la reducción de la discinesia, aunque significativa resultó ser modesta. Se han realizado estudios que han empleado inhibidores de la recaptación de la 5-HT como el citaloprán (Fidalgo y col., 2015) y la fluoxetina (Bishop y col., 2012) mostrando resultados positivos en modelos animales, y recientemente, se ha iniciado un ensayo clínico en pacientes (Takahashi y col., 2019), pero algunos de estos compuestos dan lugar también a un empeoramiento de los síntomas parkinsonianos. Por lo tanto, es necesaria más investigación en este campo y el desarrollo de más ensayos clínicos para que se puedan aportar datos más fiables sobre la eficacia terapéutica de estos fármacos. También se pueden emplear estrategias no farmacológicas como la terapia quirúrgica donde destaca la estimulación cerebral profunda (Dafsari y col., 2019; Liu y col., 2019) dirigida al NST, al GPi o la palidotomía unilateral. Sin embargo, estas intervenciones son altamente invasivas, por lo que, presentan un gran número de contraindicaciones, tales como la posibilidad de secuelas en el paciente que provoquen efectos secundarios severos, necesidad de personal altamente cualificado y además suponen un alto coste. Actualmente se han puesto en marcha otras estrategias terapéuticas, como el empleo de cannabinoides que modulan factores neuroinflamatorios (Ferreira-Junior y col., 2020). Ya que, la manipulación de vías como la neuroinflamación o la angiogénesis, que recientemente se han propuesto como nuevos factores involucrados en

la patofisiología de las discinesias, pueden representar también una nueva forma de terapia. De esta manera, se podrían emplear compuestos que inhiben el SRA o la vía ROCK, que además de bloquear la neuroinflamación y angiogénesis poseen efectos neuroprotectores frente a la degeneración de las neuronas dopaminérgicas.

1.3 VÍA RHO QUINASA (ROCK)

La vía ROCK está implicada en un gran número de procesos celulares. Sin embargo, destaca su importancia como mecanismo neuroinflamatorio en un número elevado de patologías sistémicas. Se encuentra implicada en enfermedades cardiovasculares, oncológicas, renales y en enfermedades del SNC como la enfermedad de Alzheimer, esclerosis o la EP. La manipulación de la vía ROCK, por lo tanto, puede representar una nueva estrategia terapéutica para estas enfermedades.

1.3.1 Características y funciones generales de la vía ROCK

La vía ROCK, tiene dos componentes principales que son las proteínas Rho A y ROCK.

La proteína Rho A es un miembro de la familia de las GTPasas moleculares. Rho A alterna ciclos de guanosin difosfato inactivo (GDP) y guanosin trifosfato activo (GTP), lo cual desencadena una serie de procesos moleculares en las células (Amano y col., 1996). Rho A ejerce su función actuando sobre su molécula efectora, la quinasa asociada a Rho, ROCK (Kato y col., 1998; Zhang y col., 2007).

La proteína ROCK es una serin-treonin quinasa, posee un dominio de unión a Rho, proteína con la que interactúa induciendo así cambios conformacionales que le permiten llevar a cabo su actividad catalítica (Ishizaki y col., 1996; Leung y col., 1996; Nakagawa y col., 1996). La proteína ROCK presenta dos isoformas en mamíferos, codificadas por dos genes diferentes, ROCK I y ROCK II (Nakagawa y col., 1996). ROCK I es la isoforma dominante en hígado, pulmones, testículos, sangre y sistema inmune. Mientras que ROCK II predomina su expresión en el cerebro, el corazón y las células de músculo liso (Hashimoto y col., 1999; Nakagawa y col., 1996; Shimokawa y col., 2016). Además, los niveles de expresión de ROCK II se han visto aumentados en el cerebro durante el envejecimiento, tanto en modelos

murinos (Komagome y col., 2000) como en humanos (Saal y col., 2017).

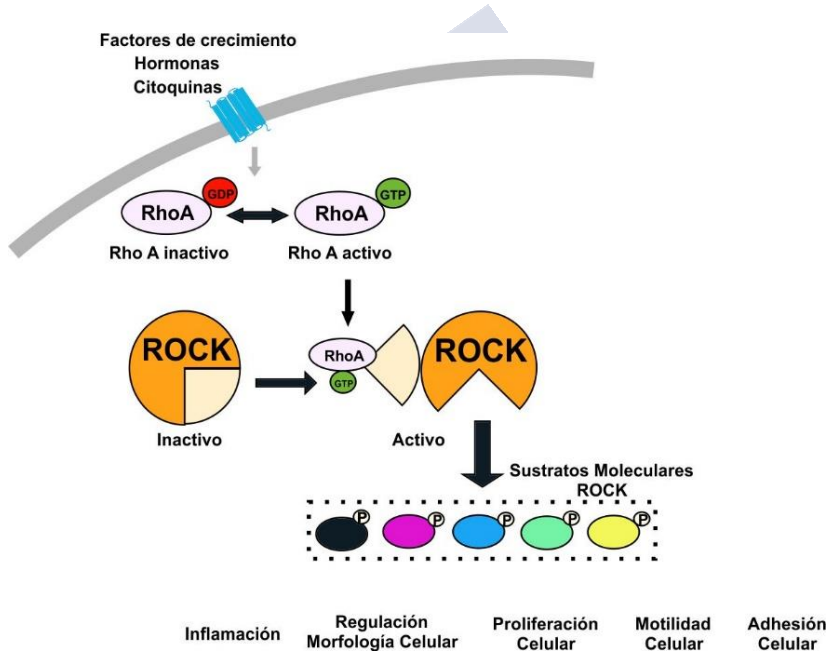
La activación de la proteína ROCK tiene una gran cantidad de blancos moleculares los cuales la involucran en abundantes procesos biológicos que median en la morfología, la migración y la supervivencia celular. Los efectores moleculares sobre los que principalmente actúa ROCK son las proteínas que regulan el citoesqueleto de actina y miosina (Maekawa y col., 1999), el cual está involucrado en la migración de la microglía y de otras células inflamatorias (Labandeira-García y col., 2015; Yan y col., 2012; ver esquema 3).

Además, destaca el importante papel que ejerce en procesos de degradación celular, tales como la apoptosis (Koch y col., 2014; Mills y col., 1998; Sebbagh y col., 2001, 2005) y la autofagia (Bauer y col., 2009; Koch y col., 2011; Mleczak y col., 2013). Concretamente, la vía ROCK está involucrada en los eventos morfológicos que ocurren durante el proceso de apoptosis, incluyendo la contracción celular, alteraciones en la dinámica de membrana y fragmentación de las células apoptóticas (Shi y Wei, 2007). Varios sustratos de ROCK están implicados en la muerte o la supervivencia celular (Labandeira-García y col., 2015). Se ha observado que la inhibición de ROCK induce efectos antiapoptóticos que resultan beneficiosos en la supervivencia neuronal en modelos de enfermedades tales como, Huntington (Bowerman y col., 2012), esclerosis lateral amiotrófica (Tönges y col., 2014) y la degeneración de la retina (Bermel y col., 2009; Koch y col., 2014a).

Asimismo, la activación de ROCK resulta en una disminución del crecimiento celular, concretamente, conduce al colapso del cono de crecimiento axonal (Arimura y col., 2000; Hall y col., 2001; Mimura y col., 2006) y a la retracción de las neuritas (Endo y col., 2007). La inhibición de ROCK también puede inducir efectos terapéuticos gracias a la función estabilizadora del axón, así como la promoción de las neuritas (Gallo, 2004; Katoh y col., 1998; Lingor y col., 2007).

La activación anormal de la vía ROCK se ha descrito en varios trastornos tales como enfermedades cardiovasculares, oncológicas, pulmonares o renales (Mueller y col., 2005; Olson 2008; Olson y col., 1995; Pan y col., 2013). En el SNC, se ha detectado una activación

aberrante de esta vía en modelos de lesión espinal, enfermedades inflamatorias desmielinizantes, accidente cerebrovascular, enfermedad de Alzheimer o EP entre otras (Chen y col., 2013b; Herskowitz y col., 2013; Labandeira-García y col., 2015; Mueller y col., 2005; Sheikh y col., 2009). En todas estas enfermedades del SNC, la neuroinflamación juega un papel relevante. Por lo que, la activación anormal de la vía ROCK se ha relacionado con su implicación en los eventos neuroinflamatorios de dichas patologías (Greenwood y col., 2003; Sheikh y col., 2009; Walters y col., 2002). El uso de inhibidores de ROCK podría representar una nueva estrategia terapéutica para el abordaje de estas enfermedades (Koch y col., 2018).



Esquema 3: La vía ROCK y sus principales funciones. La proteína ROCK se activa gracias a la unión de la proteína Rho A-GTPasa al dominio de unión Rho. Esta unión induce cambios conformacionales en ROCK que le permiten llevar a cabo su actividad catalítica sobre un gran número de blancos moleculares, lo cuales median en abundantes procesos celulares tales como: inflamación, regulación de la morfología, proliferación, motilidad y adhesión celular. Abreviatura: GDP, guanosa difosfato; GTP, guanosa trifosfato; ROCK, Rho quinasa; P grupos fosfato. Esquema de elaboración propia.

1.3.2 Papel de la vía ROCK en procesos neuroinflamatorios

Las alteraciones en la vía ROCK, principalmente en la expresión de la proteína ROCK II, están estrechamente relacionadas con procesos neuroinflamatorios. Por lo tanto, la actividad de esta vía de señalización está implicada en la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas como es el caso de la EP.

En secciones *postmortem* de cerebro humano de pacientes con EP se han detectado incrementos en los niveles de expresión de la proteína ROCK, tanto en astrocitos como en microglía (Saal y col., 2017). Asimismo, en modelos animales de EP realizados con la toxina MPTP tanto *in vivo* como *in vitro* se han visto aumentados los niveles de expresión de ROCK y la activación de la vía ROCK (Borrajo y col., 2014b; Tönges y col., 2012; Villar-Cheda y col., 2012). El bloqueo de la vía, con inhibidores como el fasudil o el Y-27632, en modelos de neurodegeneración como los de EP tiene efectos neuroprotectores (Barcia y col., 2012; Villar-Cheda y col., 2012; Tatenhorst y col., 2014). Además, se ha descrito que en el modelo de MPTP, el aumento de la expresión de ARNm para Rho A y ROCK se produce después de la primera inyección de MPTP, indicando que el aumento de actividad de ROCK está implicado en la degeneración de las neuronas dopaminérgicas y no es una consecuencia de la muerte neuronal (Wu y col., 2003). Asimismo, también se ha descubierto que la inhibición de la vía ROCK media efectos neuroprotectores producidos por los estrógenos (Rodríguez-Perez y col., 2013) y el ejercicio físico (Muñoz y col., 2016).

La capacidad de ROCK para actuar sobre un gran número de procesos celulares complica el trabajo para hallar el mecanismo por el cual su inhibición aumenta la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas en la EP. En base a lo descrito en la literatura parece que varios factores podrían estar influyendo. Inicialmente, la inhibición de ROCK supone un mecanismo de neuroprotección, ya que, permite que la estabilización de los axones (Borisoff y col., 2003) y que las neuritas de las neuronas dopaminérgicas aún presentes en la EP aumenten su longitud (Borrajo y col., 2014b; Tönges y col., 2012). Interesantemente, en modelos animales de EP que han recibido

trasplantes de células dopaminérgicas, el tratamiento con inhibidores de ROCK mejora la supervivencia de las células trasplantadas e incrementa significativamente la reinervación en el estriado hospedador (Rodríguez-Pallares y col., 2016). Se ha descrito también que inhibidores de ROCK como el fasudil disminuyen la agregación de la α -sinucleína en modelos de EP (Tatenhorst y col., 2016).

También, se ha demostrado que la inhibición de ROCK en la glía juega un papel crucial en la neuroprotección (Barcia y col., 2012; Borrajo y col., 2014b; Tönges y col., 2014; Villar-Cheda y col., 2012), principalmente en las células microgliales donde los niveles de expresión de la proteína ROCK son especialmente abundantes (Ding y col., 2010; Villar-Cheda y col., 2012; Zhang y col., 2008b). En modelos animales de EP, se ha visto que el uso de inhibidores de ROCK, tales como, fasudil o Y-27632, bloquean la activación microglial inducida con la toxina MPTP, lo cual reduce la pérdida de neuronas dopaminérgicas (Barcia y col., 2012; Borrajo y col., 2014b; Tönges y col., 2012; Villar-Cheda y col., 2012). Por consiguiente, se ha concluido que la inhibición de ROCK microglial disminuye la respuesta inflamatoria, lo que es esencial para aumentar la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas en la EP (Borrajo y col., 2014b). Por un lado, atenúa la migración y el cambio de morfología de la microglía disminuyendo los contactos neurona glía que llevan a procesos de autofagia, que acaban eliminando las neuronas dopaminérgicas (Barcia y col., 2012). Por otro lado, la inhibición de ROCK microglial también suprime la activación de la NADPH-oxidasa (Budzyn y col., 2006) y la liberación de citoquinas proinflamatorias por parte de la microglía (Borrajo y col., 2014a; Zhang y col., 2013). Esto resulta en una disminución del estrés oxidativo celular y de la neuroinflamación, ambos procesos contribuyen a la protección de las neuronas dopaminérgicas. Recientemente, se ha demostrado también que los inhibidores de ROCK pueden mediar su efecto neuroprotector a través de la mitofagia mediada por parkina (Moskal y col., 2020).

La manipulación de la vía ROCK supone un potencial objetivo terapéutico para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como la EP, ya que, presenta un potente efecto neuroprotector. En la actualidad, el único inhibidor de la proteína ROCK en uso clínico es el

fasudil, que se utiliza principalmente para el tratamiento de enfermedades vasculares, donde la bioseguridad y la efectividad terapéutica del compuesto ya ha sido demostrada (Koch y col., 2018; Labandeira-Garcia y col., 2015).

1.3.3 Relación de la vía ROCK con SRA y la neuroinflamación

La vía ROCK también participa en la regulación de la presión sanguínea dependiente de AII y se ha visto, en el tronco encefálico de ratas que, la respuesta al aumento de la presión sanguínea inducida por AII esta mediada por la activación de la vía ROCK, a través de los receptores AT1 (Sagawa y col., 2007).

Además, se sabe que el SRA cerebral juega un papel vital en la regulación de los procesos neuroinflamatorios, así como en la progresión de trastornos neurológicos a través de la activación de la vía ROCK (Rodríguez-Perez y col., 2015; Villar-Cheda y col., 2012). Concretamente, se ha demostrado que la activación de la vía ROCK microglial desempeña un papel sobre el efecto del eje AII/AT1/NADPH-oxidasa tanto en la polarización microglial como en la neurodegeneración. Esto fue observado en roedores (Barcia y col., 2012; Villar-Cheda y col., 2012) y confirmado usando cultivos primarios mesencefálicos carentes de células microgliales (Borrajo y col., 2014b; Villar-Cheda y col., 2012). Durante la activación microglial inducida por AII se observa una interrelación entre NADPH-oxidasa y ROCK: la activación de NADPH-oxidasa inducida por AII condujo a la producción de superóxido, translocación de NF- κ B y activación de ROCK. Además, la activación de Rho-quinasa vía NF- κ B provoca la sobreexpresión del receptor AT1 en las células microgliales lo que genera exacerbación del proceso neuroinflamatorio (Rodríguez-Perez y col., 2015).

La activación de ROCK está involucrada también en la regulación del complejo NADPH-oxidasa mediante la proteína quinasa P38 activada por mitógeno (MAPK P38). Por un lado, la generación de especies reactivas del oxígeno dependientes de NADPH-oxidasa induce la activación de ROCK por parte de la AII. Por otro lado, la activación

de ROCK retroalimenta el proceso neuroinflamatorio, ya que, fosforila la MAPK P38, la cual aumenta la activación del complejo NADPH-oxidasa (Rodríguez-Perez y col., 2015).

Otro enfoque es el que vincula a ROCK y al SRA con la angiogénesis, especialmente interesante la interacción con VEGF. En modelos de EP se ha visto que niveles de expresión elevados de VEGF provocan deterioro de la BHE y aumento de la permeabilidad de los vasos cerebrales, lo cual contribuye al deterioro de las neuronas dopaminérgicas (Barcia y col., 2005a; Muñoz y col., 2014). De acuerdo con esto, se ha demostrado que el VEGF induce angiogénesis a través de ROCK (Bryan y col., 2010) y el bloqueo de ROCK reduce la angiogénesis (Rodríguez-Pallares y col., 2016) mediada por VEGF (Sun y col., 2006). Por un lado, la AII a través de los receptores AT1 aumenta la expresión de VEGF (Fleegal-DeMotta y col., 2009), la cual se reduce tras el tratamiento con candesartan (Muñoz y col., 2006). Por lo tanto, la manipulación de la vía ROCK contribuye a la neuroprotección de las neuronas dopaminérgicas atenuando la angiogénesis (Labandeira-Garcia y col., 2015).

También, resulta interesante destacar que la inhibición de ROCK ha disminuido el efecto proinflamatorio-proxidativo que genera la lesión dopaminérgica por activación del eje AII/AT1. Además, el bloqueo de los receptores AT1 supuso un descenso de los niveles de expresión de ROCK en los modelos de EP (Rodríguez-Perez y col., 2013; Villar-Cheda y col., 2012). Por consiguiente, tanto la inhibición de AT1 como de ROCK mejoran la supervivencia neuronal, principalmente porque disminuye la neuroinflamación (Villar-Cheda y col., 2012).

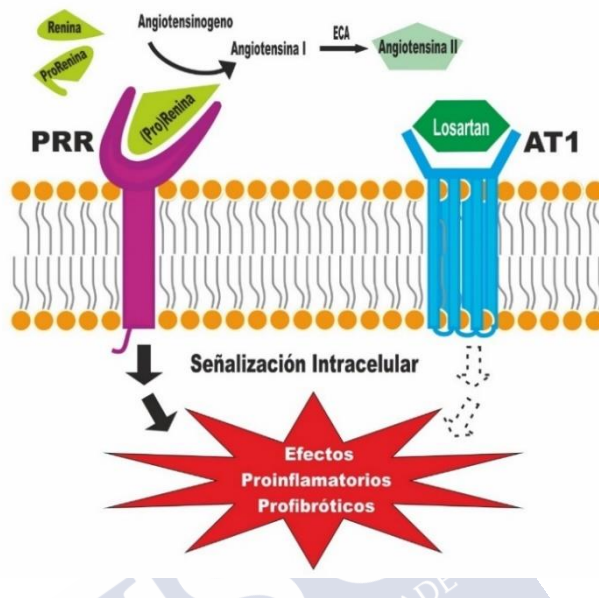
1.4 EL RECEPTOR PARA PRR Y SU PAPEL EN NEUROINFLAMACIÓN

En el SRA, tanto la activación de la vía AII/AT1, como la activación de PRR desencadenan procesos neuroinflamatorios (Matavelli y col., 2010; Shi y col., 2014; Zhu y col., 2015) lo que nos lleva a pensar que PRR pueda estar implicado en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como la EP (Garrido-Gil y col., 2013b; Valenzuela y col., 2010).

1.4.1 Características y funciones del PRR

PRR es una molécula multifuncional cuya estructura y función es altamente compleja. Este receptor presenta una amplia distribución en diferentes órganos y se han encontrado niveles elevados de PRR en varios tejidos entre los que se encuentran el corazón, el cerebro, la placenta y los adipocitos. A nivel estructural podemos distinguir tres regiones de esta molécula, un pequeño dominio citoplasmático, un dominio transmembrana y un dominio extracelular. Al dominio extracelular pueden unirse dos ligandos generados a partir del transcrito del gen de la renina, que son la (pro)renina y la renina madura.

A nivel funcional, PRR puede ejercer funciones dependientes e independientes de AII. En las funciones dependientes de AII, la renina y la (pro)renina unidas al receptor aumentan su actividad catalítica de 4 a 5 veces, produciendo niveles exacerbados de AII, lo que provoca la sobreactivación del SRA (Batenburg y Danser, 2012; Nguyen y col., 2002). En la actividad independiente de AII, la unión de los ligandos a PRR activa sus propias cascadas de señalización intracelular, activando las vías de MAPK (proteína quinasa activada por mitógeno del inglés, *Mitogen activated protein kinase*) p38 y ERK1/2 que producen un aumento en la expresión de genes prooxidativos, profibróticos y proinflamatorios (Krop y col., 2013; Nguyen y col., 2011; Sibn y col., 2010), efectos similares a los inducidos por la AII a través de AT1 (Labandeira-Garcia y col., 2017; ver esquema 4).



Esquema 4: La activación de PRR producida por la unión de los ligandos (pro)renina y renina genera efectos proinflamatorios en las células. Los efectos independientes de Angiotensina II, se pueden estudiar empleando el antagonista de los receptores AT1, losartán. Abreviaturas: ECA, enzima convertidora de angiotensina; AT1, receptor de angiotensina 1; PRR, receptor de (Pro)renina. Esquema de elaboración propia.

PRR contiene además una secuencia de corte específica de la proteína furina y la proteasa de sitio 1, las cuales fragmentan al receptor en dos partes con actividades funcionales distintas. La forma truncada de PRR contiene la región transmembrana y el dominio citoplasmático y actúa como proteína accesoria de la ATPasa vacuolar desempeñando funciones totalmente independientes del SRA. El otro fragmento que se genera es una forma soluble que contiene la porción extracelular del receptor (Nguyen y col., 2011). Esta forma soluble se ha detectado tanto en plasma como en orina y a pesar de que se desconoce su función, niveles elevados se correlacionan con procesos patológicos, ya que, se ha observado un incremento de PRR soluble en pacientes con hipertensión, daños renales y cardiacos (Lu y col., 2016). La complejidad funcional

del receptor se exagera todavía más al descubrirse la participación de PRR en la vía de señalización WNT independiente de la unión de ligando.

La enorme complejidad que subyace a este receptor hace que no sea de extrañar que los estudios que lo implican en procesos patológicos son a menudo contradictorios. Algunos autores han observado efectos beneficiosos en el bloqueo del receptor. Sin embargo, otros han descrito que esta inhibición provoca alteraciones importantes. Asimismo, en humanos la única mutación de PRR que ha sido descrita resulta en retraso mental y epilepsia en los individuos que la padecen. Además, la imposibilidad de crear animales deficientes para PRR deja patente la relevancia funcional del receptor. Sin embargo, los datos presentes en la literatura nos permiten concluir que los efectos nocivos del bloqueo del PRR son independientes del papel que este juega en el SRA. Ya que, se asocian con la participación de este receptor en la cascada de señalización medida por WNT, esencial en el desarrollo embrionario y básica también en la vida adulta o bien con la función que desempeña el receptor como proteína accesoria de la ATPasa vacuolar (Xu y col., 2016).

1.4.2 Papel del PRR en procesos neuroinflamatorios y relación con la enfermedad de Parkinson

En las patologías en las cuales el SRA juega un papel clave, tales como diabetes o hipertensión, los niveles de PRR están elevados causando efectos negativos (Nguyen y col., 2011). Se ha descrito que, la (pro)renina a través de PRR, juega un papel en el incremento de la producción de citoquinas proinflamatorias en tejidos como el ojo (Wilkinson-Berka y col., 2011), el riñón (Quadri y col., 2018; Matavelli y col., 2010; Satofuka col., 2012) o el tejido vascular (Satofuka y col., 2007, 2008).

Además, en la retina y en el hipotálamo, se ha descrito que la (pro)renina induce la activación microglial hacia el fenotipo M1, promoviendo de este modo mecanismos proinflamatorios (Peng y col., 2014) y proangiogénicos (Zhu y col., 2015). Esto confiere a la (pro)renina un papel en la estimulación de la neovascularización y la inflamación.

Los modelos animales transgénicos que sobreexpresan PRR, han permitido estudiar los efectos del receptor *in-vivo*, aunque los datos son contradictorios de nuevo. Algunos autores no observan cambios con el incremento de los niveles de PRR (Rosendabl y col., 2014), mientras que otros observan efectos nocivos, ya que, el incremento de AII, se traduce en un fenotipo cardiovascular patológico (Burkle y col., 2006), o la activación de la vía MAPK con el consiguiente aumento en los marcadores de fibrosis (Kaneshiro y col., 2007). En el caso concreto del cerebro, se ha detectado la presencia del receptor PRR en la sustancia negra, tanto en las neuronas dopaminérgicas, como en los astrocitos y en las células microgliales en roedores y primates, incluyendo a los humanos (Garrido-Gil y col., 2013b; Valenzuela y col., 2010). Además, la administración de péptidos bloqueantes de PRR disminuye la muerte neuronal generada por la neurotoxina 6-OHDA en cultivos neuronales. Mientras que la administración simultánea de renina con bloqueantes de los receptores AT1 y AT2 produjo un aumento en la muerte inducida por 6-OHDA. Lo que sugiere que la señalización intracelular de PRR independiente de los agentes activadores de AII puede contribuir a la exacerbación de la muerte celular. Por lo que, los agentes neuroprotectores en línea con el SRA para las neuronas dopaminérgicas en la EP deben abordar tanto a la AII como al PRR (Valenzuela y col., 2010).

1.5 EL COLESTEROL EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL: IMPLICACIONES EN DISCINESIAS

Niveles elevados de colesterol no solo son un importante factor de riesgo para las enfermedades cardiovasculares, sino que también parecen influir en las funciones cerebrales y en las enfermedades neurodegenerativas, incluida la EP (Huang y col., 2019). El cerebro contiene aproximadamente el 25% del contenido total de colesterol en un adulto, (Petek y col., 2018) lo cual le convierte en el órgano más rico en colesterol de todo el organismo. En el cerebro, el colesterol es muy importante no solo para la síntesis de mielina por parte de los oligodendrocitos, sino que también interviene en la sinaptogénesis y en la agregación de la proteína α -sinucleína (Doria y col., 2016; Mauch y col., 2001; Erickson y col., 2017). Además, datos clínicos han sugerido

que los lípidos y las lipoproteínas afectan a la señalización de neurotransmisores como la DA (Klemann y col., 2017).

1.5.1 Metabolismo del colesterol en el sistema nervioso central

El SNC es un sistema cerrado con respecto a la homeostasis del colesterol, ya que, las lipoproteínas que transportan el colesterol de la periferia no pueden cruzar la BHE y entrar en el cerebro, por eso, la biosíntesis del colesterol cerebral ocurre a nivel local y requiere de varios procesos enzimáticos que suponen consumo elevado de energía. La mayoría del colesterol presente en las neuronas en el cerebro adulto es transportada desde los astrocitos por la apolipoproteína E (Liu y col., 2013) e ingresa a través de los receptores LDLR (receptor de lipoproteínas de baja densidad) (Hayashi, 2011; Nieweg y col., 2009). Una vez entra en las neuronas, se almacena en el citoplasma o bien se metaboliza a 24-hidroxicolesterol (24-OHC). El 24-OHC es exportado al exterior a través de los transportadores ABC (Koldamova y col., 2003; Wellington y col., 2002), principalmente a través de ABCA1 (transportador dependiente de ATP) (Chen y col., 2013a). El 24-OHC atraviesa la BHE para dirigirse al hígado donde se metaboliza gracias a las sales biliares (Vega y col., 2003). La homeostasis del colesterol, en el cerebro adulto, se equilibra principalmente a través de los procesos de síntesis, controlados principalmente por la enzima con actividad reductasa 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMGCR) y degradación, facilitada por la acción de la enzima colesterol 24 hidroxilasa (Ali y col., 2013). Asimismo, el regulador de la homeóstasis, la proteína de unión a elementos reguladores de esteroides, (SREBP2) también juega un papel importante. Ya que, cuando los niveles de colesterol en las células son deficitarios este factor de transcripción se activa y se transloca al núcleo, induciendo síntesis de esteroides (Horton y col., 2002; Shao y Espeshade, 2012). El intercambio entre el colesterol periférico y central es limitado, en el cerebro puede ingresar el metabolito 27-OHC (27-hidroxicolesterol) y se excreta desde el cerebro a la circulación el metabolito 24-OHC (Björkhem, 2006). Sin embargo, niveles elevados de estrés oxidativo inducen la formación de lípidos en las neuronas que se transfieren a la glía, principalmente a los astrocitos donde se forman gotas lipídicas (Liu y

col., 2017b). El mantenimiento de la homeostasis del colesterol es crucial en la fisiología del SNC, ya que, juega un papel crítico en los procesos neurobiológicos tales como crecimiento axonal, sinaptogénesis y mantenimiento de las dendritas (Goritz y col., 2005; Heacock y col., 1984; Mauch y col., 2001; Pfrieger 2003). De hecho, la disrupción de la homeostasis del colesterol se ha asociado con trastornos neurológicos neurodegenerativos (Iannou y col., 2018).

1.5.2 Papel del colesterol en la enfermedad de Parkinson y en las discinesias inducidas por L-DOPA: interacción con el SRA y la vía ROCK

En el caso de las enfermedades neurodegenerativas se ha demostrado una asociación entre la patofisiología de la enfermedad y las modificaciones en el metabolismo del colesterol, sobre todo en la enfermedad de Alzheimer. En estas enfermedades se ha demostrado una relación estrecha entre el metabolismo del colesterol, la agregación de las proteínas implicadas en la enfermedad y los problemas cognitivos de los pacientes (Petek y col., 2018).

En modelos animales de EP se ha mostrado que inhibiendo la síntesis de colesterol mediante estatinas se producen efectos neuroprotectores (Kang y col., 2017; Kumar y col., 2012). No obstante, los estudios epidemiológicos de EP son, hasta el momento, controvertidos. Algunos estudios han asociado bajos niveles de colesterol en sangre con aumento del riesgo de padecer EP (Huang y col., 2007), por lo que el uso de estatinas, inhibidores de la síntesis de colesterol, podría resultar perjudicial (Huang y col., 2015; Jeong y col., 2019; Liu y col., 2017a). Además, en un estudio reciente se observó que niveles plasmáticos de 24-OH colesterol, están inversamente ligados a la EP, lo que podría servir como un nuevo biomarcador para la enfermedad (Huang y col., 2019). Por el contrario, en otros trabajos el resultado es opuesto y destacan el papel beneficioso de las estatinas, ya que, relacionan altos niveles de colesterol como factor de riesgo de padecer la enfermedad (Bai y col., 2016; Lee y col., 2013). Los motivos de las discrepancias en los estudios pueden estar causados por la dificultad de medir los niveles de colesterol cerebral en los humanos (Jin y col., 2019). Entre los mecanismos implicados, destaca que las

estatinas reducen la neuroinflamación y la activación microglial. Además, disminuyen el estrés oxidativo, aumentan la síntesis de factores tróficos, rebajan los niveles de coenzima Q10 y reducen la acumulación de α -sinucleína (Bar-On y col., 2008; Jeong y col., 2019). Actualmente, está en marcha un ensayo clínico en pacientes con EP en el cual se estudia el uso terapéutico de la simvastatina (Carroll y col., 2019). Por otro lado, recientemente se ha demostrado, usando modelos animales transgénicos, que genes relacionados con la patogénesis de la EP están implicados directamente en el metabolismo del colesterol cerebral (Jin y col., 2019). Es especialmente relevante el papel que juega la proteína α -sinucleína, ya que, es capaz de actuar como una apolipoproteína y promover la transferencia de colesterol (El-Agnaf y col., 2003). Incluso, algún estudio sugiere que α -sinucleína puede influir en el metabolismo del colesterol y por otro lado también se ha mostrado que el colesterol modifica la agregación de α -sinucleína (Schommer y col., 2018 a,b).

Además, varios estudios *in vitro* e *in vivo* han sugerido una interacción entre el metabolismo del colesterol y el SRA circulante (Mateos y col., 2011). Concretamente, el 27-OHC se ha visto que regula al alza el SRA cerebral a nivel de sustrato, de enzimas y de receptores (Borghi y col., 2017; Ismail y col., 2017; Mateos y col., 2011) y esto tienen implicaciones importantes en relación con las demencias (Petek y col., 2018).

Asimismo, también se ha descrito que las estatinas juegan un papel relevante en la reducción de las discinesias en modelos de rata (Schuster y col., 2008; Wang y col., 2015) y de mono (Tison y col., 2013). Sin embargo, en un ensayo clínico realizado en pacientes no se han obtenido resultados positivos (Tison y col., 2013). El efecto de las estatinas se ha atribuido a la modulación de ERK1/2, pero otros mecanismos podrían estar actuando, entre ellos la reducción de la neuroinflamación y la inhibición de la vía ROCK.

1.5.3 Interacción del colesterol, el SRA y la vía ROCK

Varios estudios *in vitro* e *in vivo* han sugerido una interacción entre el metabolismo del colesterol y el SRA cerebral (Mateos y col., 2011). Concretamente, el 27-OHC se ha visto que regula al alza el SRA

cerebral a nivel de sustrato, de enzimas y de receptores (Borghini y col., 2017; Ismail y col., 2017; Mateos y col., 2011) y esto tienen implicaciones importantes en relación con las demencias (Petek y col., 2018). Además, se ha demostrado que la angiotensina produce daño renal, ya que, induce la acumulación del colesterol en podocitos (Yang y col., 2017), pero se desconoce la interacción del colesterol y el SRA en la EP.

Los inhibidores de la síntesis del colesterol reducen la proteína ROCK en la médula espinal (Ohsawa y col., 2016) y en el carcinoma hepático inhibiendo el crecimiento tumoral (Relja y col., 2011). Además, las estatinas median el efecto de la angiotensina sobre las metaloproteasas en el remodelado vascular pulmonar y en la hipertensión pulmonar crónica a través de la inhibición de ROCK (Li y col., 2008; Wong y col., 2016). En modelos de enfermedades neurodegenerativas se observó que las estatinas y el fasudil inhiben la neurodegeneración a través de mecanismos similares, la vía Akt/NOS y la función mitocondrial (Ahmed y col., 2016). Todo esto nos indica que profundizar en el estudio del metabolismo del colesterol en el cerebro nos puede ayudar a mejorar la comprensión de la patogénesis de la EP.



2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS



2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La EP es una enfermedad neurodegenerativa de las más frecuentes en nuestra población, para la cual sólo se dispone hasta la fecha de tratamiento sintomático. La administración de la molécula precursora de la DA, L-DOPA, es la terapia estrella con la que se trata a los pacientes con EP. Este fármaco resulta efectivo y ha conseguido mejorar de forma sustancial la sintomatología motora característica de la enfermedad. Sin embargo, con el paso de los años el tratamiento crónico provoca, en la mayoría de los pacientes, complicaciones, entre las que destacan los movimientos involuntarios anormales también conocidos como discinesias. Las discinesias son incapacitantes e influyen negativamente en el efecto terapéutico de la L-DOPA y en la calidad de vida de los pacientes, representando uno de los principales problemas asociados a esta enfermedad.

Los mecanismos implicados en el desarrollo de las discinesias no son del todo conocidos. Actualmente, se sabe que la transmisión glutamatérgica anormal en la sinapsis corticoestriatales y la liberación no regulada de DA desde las neuronas serotoninérgicas desempeñan un papel importante, pero otros factores podrían estar también involucrados. El bloqueo del sistema glutamatérgico a través de la amantadina constituye la única forma de tratamiento que se utiliza en clínica para combatir las discinesias. Sin embargo, el uso continuado de este compuesto da lugar a complicaciones severas. Por lo tanto, es de vital importancia conocer todos los posibles mecanismos implicados en el desarrollo de las discinesias, para así poder investigar nuevas dianas terapéuticas.

En los últimos años se ha propuesto que otros factores como la neuroinflamación y la angiogénesis podrían estar relacionados con el desarrollo de las discinesias. En la EP, la neuroinflamación juega un

papel clave en la degeneración de las neuronas dopaminérgicas a través de la vía ROCK y el SRA. En estudios previos de nuestro grupo de investigación se ha demostrado que estas vías se encuentran activadas en modelos de EP y que su bloqueo tiene efectos neuroprotectores. El SRA es una fuente de neuroinflamación directa mediada por la estimulación de los receptores AT1 de la microglía, y previamente se ha observado que bloqueando estos receptores con candesartan se reduce el desarrollo de las discinesias a través de la disminución de la neuroinflamación y la angiogénesis. La estimulación de dicho receptor provoca la activación de la vía ROCK. Además de AT1, otros componentes del SRA como el PRR participan también en procesos neuroinflamatorios.

Por otra parte, se ha descrito la implicación del SRA en la síntesis de colesterol en un gran número de patologías, incluyendo enfermedades neurodegenerativas como es el caso de la enfermedad de Alzheimer. Se ha descrito además que la inhibición de la síntesis del colesterol a través de la administración de estatinas reduce la neuroinflamación e inhibe la vía ROCK en algunos tejidos, aunque se desconoce la interacción entre el colesterol, el SRA y la vía ROCK en el cerebro y en la EP.

Por lo tanto, en esta tesis nos planteamos estudiar si la vía ROCK, PRR y el colesterol juegan un papel en el desarrollo de las discinesias y si la manipulación de estas vías podría reducirlas. Se estudiarán también los posibles mecanismos relacionados con neuroinflamación y angiogénesis, así como las interacciones entre SRA, colesterol, PRR y la vía ROCK.

Objetivo general:

Estudiar los mecanismos implicados en el desarrollo de las discinesias, así como investigar nuevas estrategias terapéuticas, relacionadas con la vía ROCK, PRR y colesterol.

Objetivos concretos:

1. Estudiar el papel de la vía ROCK en las discinesias inducidas por L-DOPA.

- 1.1 Estudiar alteraciones de la vía ROCK en el modelo de 6-OHDA.
- 1.2 Estudiar las alteraciones de la vía ROCK en las discinesias inducidas por L-DOPA.
- 1.3 Estudiar si la manipulación de la vía ROCK reduce las discinesias e investigar los mecanismos implicados.

2. Estudiar el papel de PRR y su relación con la vía ROCK en los procesos neuroinflamatorios, así como su implicación en las discinesias inducidas por L-DOPA.
 - 2.1 Estudiar alteraciones del receptor en el modelo de 6-OHDA, el modelo de discinesias y en ratones KO para el SRA.
 - 2.2 Analizar los efectos de la activación de PRR sobre la vía ROCK y el estrés oxidativo en las células microgliales.
 - 2.3 Estudiar si la manipulación de la vía ROCK reduce la inflamación inducida por PRR e investigar los mecanismos implicados.

3. Estudiar el papel del colesterol en las discinesias inducidas por L-DOPA y su interacción con el SRA y la vía ROCK.
 - 3.1 Estudiar la expresión de los niveles de colesterol en modelos de EP y discinesias inducidas por L-DOPA.
 - 3.2 Analizar el efecto de la inhibición del colesterol en las discinesias inducidas por L-DOPA y estudiar el papel de la vía ROCK.
 - 3.3 Estudiar los efectos de la manipulación del SRA sobre los niveles de colesterol, empleando ratones KO para el SRA y ratas inyectadas con AII.
 - 3.4 Analizar la expresión de los niveles del colesterol y sus receptores en distintos tipos celulares en el cerebro, cultivos neuronales y astrogiales.





3. MATERIAL Y MÉTODOS





3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

En el desarrollo de esta tesis para la realización de los experimentos *in vivo* se utilizaron los siguientes animales de experimentación:

- Ratas hembra adultas, especie *Rattus norvegicus* cepa Sprague-Dawley para la realización de modelos de EP y de discinesias inducidas por L-DOPA. Al inicio de los experimentos, estos animales contaban 2 meses de edad y su peso aproximado se encontraba en torno a 200-230 gramos.
- Ratas macho adultas *Rattus norvegicus* de la cepa Sprague-Dawley para la realización de modelos de sobreexpresión del SRA. Estos animales sumaban 3 meses de edad y pesaban en torno a 300-350 gramos.
- Neonatos procedentes de la especie *Rattus norvegicus* cepa Sprague-Dawley, para la realización de cultivos primarios de microglía.
- Ratones macho adultos, especie *Mus musculus*, que disponían de 8 semanas de vida cuando se realizaron los experimentos y pesaban entre 20-25 gramos. La cepa que se usó fue la C57BL-6, concretamente:
 - La cepa de tipo salvaje u homocigótica (Charles River, Francia).
 - La cepa deficiente para AT1a, la principal isoforma del receptor AT1 en ratón y el homólogo murino más cercano al AT1 de humanos (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, EE. UU.; Sugaya y col., 1995).
 - La cepa deficiente para el receptor AT2 (Dr. Daniel Henrion).

Todos los animales que se utilizaron fueron alojados a una temperatura constante de 22°C, en parejas bajo un ciclo de 12 horas luz/oscuridad y con acceso *ad libitum* a comida y agua. Todos los

experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con la Directiva del consejo de las Comunidades Europeas 2010/63/UE, a la Directiva 86/609/CEE y el Real Decreto español 526/2014, y fueron aprobados por el comité correspondiente de la *Universidade de Santiago de Compostela*. Los procedimientos fueron desarrollados en el centro usuario autorizado Facultad de Medicina de la *Universidade de Santiago de Compostela*, bajo el registro REGA: ES150780263401 y enmarcados en el proyecto autorizado para experimentación animal con código 15005/15/002.

En los experimentos *in vitro* se usaron los siguientes modelos celulares:

- Línea celular microglial, BV2.
- Línea celular neuronal, N27.
- Línea celular astrogliial, C6.
- Cultivos primarios de microglía realizados a partir de neonatos de rata.

En la primera parte de esta tesis se estudió la implicación de la vía ROCK en el desarrollo de las discinesias (*objetivo 1*). Para ello, se utilizaron un total de 207 ratas hembra adultas que se dividieron en cuatro experimentos distintos (experimentos I-IV).

En el **experimento I** se estudió el efecto de la lesión dopaminérgica en los niveles de expresión de Rho A y ROCK (*objetivo 1.1*). Para ello, se realizó una lesión unilateral inyectando la neurotoxina 6-OHDA en el FPM derecho. Los animales fueron sacrificados después de una semana (n=12; grupo Ia), 4 semanas (n=12, grupo Ib) u 8 semanas (n=12; grupo Ic) después de la lesión, con el objetivo de evaluar la expresión de ROCK y Rho A en periodos agudos (1 semana postlesión), durante los cuales se están desarrollando procesos de muerte neuronal y neuroinflamación activa, y cuando la lesión es completa y está estabilizada (4 y 8 semanas postlesión), de manera que estos animales se pueden comparar con las ratas discinéticas que se han tratado durante 3 semanas con L-DOPA. En estos experimentos, las ratas que se usaron como control (n=12 por grupo) se les realizó una cirugía simulada con vehículo (solución salina estéril que contiene 0,2% de ácido ascórbico) cerca del FPM, por lo tanto, estos animales presentaron inervación dopaminérgica inalterada o normal (ver esquema 5).

En el **experimento II**, se usaron ratas lesionadas con 6-OHDA, las cuales presentaban una lesión unilateral máxima, para investigar los efectos de L-DOPA en el desarrollo de las discinesias, así como para evaluar los niveles de expresión de Rho A y ROCK en animales discinéticos (*objetivo 2.2*). Teniendo en cuenta el curso temporal de la lesión con 6-OHDA, la cual se estabiliza 3-4 semanas después de la inyección con la toxina (Labandeira-Garcia y col., 1996), se seleccionaron las ratas con lesión dopaminérgica máximas mediante pruebas de comportamiento realizadas durante la cuarta semana. Las ratas con lesiones máximas se asignaron a subgrupos balanceados antes del tratamiento con L-DOPA según la rotación con anfetamina para excluir posibles diferencias en el grado de lesión dopaminérgica entre los diferentes grupos experimentales. A continuación, los animales se trataron diariamente de manera crónica con L-DOPA (6 semanas después de la lesión de 6-OHDA), junto con un inhibidor de la AADC periférica (benserazida, 10 mg/kg) para inducir las discinesias hasta que se alcanzaron niveles constantes y estables de AIMs, (aproximadamente después de 3 semanas de tratamiento; es decir, en las semanas 6, 7 y 8 después de la inyección con 6-OHDA). El experimento se llevó a cabo con animales tratados con una dosis de L-DOPA de 6 mg/kg (n=16; grupo IIa), la cual se corresponde con la dosis terapéutica en humanos, o de 12 mg/kg (n=12; grupo IIb), para simular discinesias más intensas como ocurre en estadios finales de la enfermedad. El comportamiento discinético fue monitorizado periódicamente usando la escala de AIMs a través del test de discinesias. Finalmente, estos animales fueron sacrificados para estudios *postmortem* relacionados con la expresión y la actividad de la vía ROCK. Además, un grupo de ratas (grupo IIc) recibió una única inyección de L-DOPA (12 mg/kg) para analizar el efecto agudo de L-DOPA en las discinesias y en los niveles de expresión de ROCK. Estos animales fueron sacrificados 1h (n=7) o 4h (n=7) después de la inyección. Los controles correspondientes a estos grupos experimentales fueron ratas lesionadas con 6-OHDA e inyectadas vía subcutánea con solución salina (n=12 y n=7, respectivamente). Un número reducido de ratas tratadas con 6 mg/kg de L-DOPA no desarrollaron discinesias, y el tejido cerebral de estos animales (grupo

IId; n=7) junto con sus correspondientes controles (n=16) fueron procesados para evaluar posibles efectos de L-DOPA en la actividad ROCK independientes al desarrollo de las discinesias (ver esquema 5).

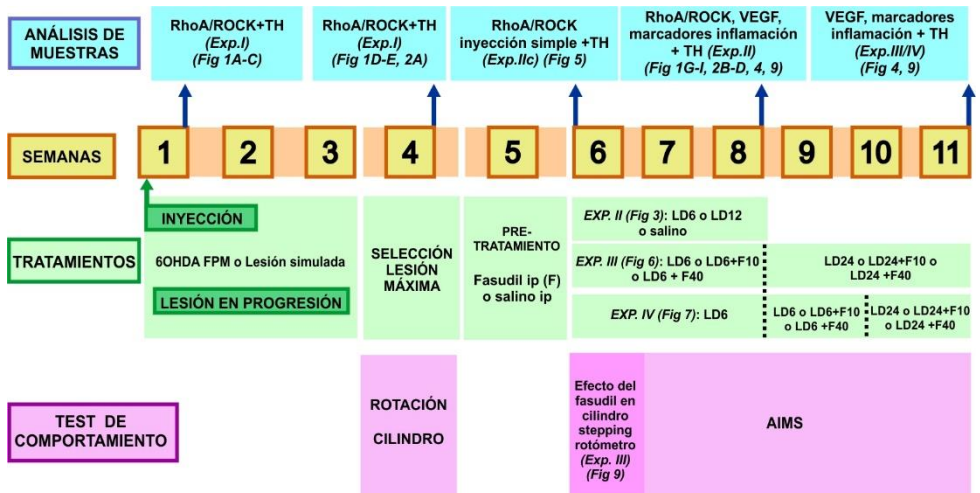
En los experimentos III y IV se investigó si la manipulación de la vía ROCK reduce las discinesias, así como los mecanismos implicados (*objetivo 1.3*).

En el **experimento III**, se estudiaron los efectos del inhibidor de ROCK, fasudil (HA1077), en el desarrollo de las discinesias inducidas por L-DOPA. Para ello, se balancearon los animales lesionados con 6-OHDA, en dos grupos en función de los valores adquiridos después de la prueba de comportamiento rotacional inducido por anfetamina. Estos animales fueron tratados con L-DOPA (6 mg/kg/día) junto con benserazida (10 mg/kg) durante 3 semanas (6-8 semanas después de la inyección con 6-OHDA). Inicialmente, uno de los grupos de ratas (n=10; grupo IIIa) fue tratado con el inhibidor de ROCK, fasudil (10 mg/kg/día), antes de la primera inyección con L-DOPA, durante un periodo de 5 días (es decir, durante la quinta semana después de la inyección de 6-OHDA). Posteriormente, una vez que se inició el tratamiento con L-DOPA, el fasudil fue administrado diariamente 30 minutos antes de la inyección de L-DOPA y benserazida, para investigar los efectos de L-DOPA cuando se ha llevado a cabo una inhibición previa de la proteína ROCK. El otro grupo experimental de animales fue tratado con solución salina (en lugar de fasudil) y L-DOPA (n=9; grupo IIIb). En este estudio el fasudil se administra a nivel periférico por vía intraperitoneal. Esto resulta posible, ya que, en la literatura se reporta que este fármaco es capaz de cruzar la BHE (Zhang y col., 2009) mostrando efectos en el SNC en números estudios (véase las revisiones Labandeira-Garcia y col., 2015; Koch y col., 2018). En un inicio, los experimentos se llevaron a cabo usando la dosis de fasudil más baja (10mg/kg/día), ya que, estudios previos habían mostrado efectos neuroprotectores (Rodríguez-Perez y col., 2015). Sin embargo, un grupo adicional de ratas fue usado para analizar el efecto de una dosis más alta de fasudil (40 mg/kg/día, ip, n=7; grupo IIIc) en el desarrollo de las discinesias. Los controles correspondientes a estos grupos experimentales fueron tratados con solución salina y L-DOPA (n=7, grupo IIIId). Durante el último periodo del tratamiento, la dosis de

L-DOPA fue incrementada a 24 mg/kg (es decir, en la novena semana después de la inyección con 6-OHDA) para investigar si el fasudil es efectivo para reducir las discinesias inducidas por L-DOPA cuando el grado de severidad de las mismas es muy elevado. Además, en todos estos grupos se evaluó si el tratamiento con fasudil (10 o 40 mg/kg/día) interfiere en el efecto terapéutico generado por la administración de L-DOPA. Para ello, se analizó la recuperación motora (durante la sexta semana después de la inyección con 6-OHDA) a través de diferentes pruebas de comportamiento, tales como, test del cilindro, test del *stepping* y test del rotómetro. Estas pruebas se realizaron al inicio del tratamiento con L-DOPA (después de la segunda, cuarta y sexta inyección de L-DOPA, respectivamente) para prevenir posibles interferencias de las discinesias (ver esquema 5).

El **experimento IV** fue diseñado para investigar si la inhibición de ROCK podría revertir las discinesias en los animales pretratados con L-DOPA, es decir, una vez las discinesias ya han sido establecidas y estas se manifiestan de forma constante. En este caso, las ratas fueron en primer lugar, inyectadas solamente con L-DOPA y benserazida (6 mg/kg/día y 10 mg/kg/día respectivamente sc; n=16) durante un periodo de 3 semanas. Una vez que las discinesias se habían establecido, las ratas fueron balanceadas de forma homogénea en base a las puntuaciones obtenidas gracias a la realización monitorizada del test de comportamiento discinético AIMS. A continuación (en la semana 9 y 10 después de la lesión con 6-OHDA), por un lado, un primer grupo experimental de ratas fue tratado con L-DOPA/benserazida (6 mg/kg/día; 10mg/kg/día respectivamente) y una dosis baja de fasudil 10 mg/kg/día (ip; n=8; grupo IVa) y se compararon con los animales control tratados con L-DOPA/benserazida y solución salina en lugar de fasudil (n=8; grupo IVb). Por otro lado, un segundo grupo de animales discinéticos fue tratado durante 3 semanas con L-DOPA/benserazida (6 mg/kg/día; 10mg/kg/día respectivamente) y con la dosis alta de fasudil 40mg/kg/día (ip; n=9; grupo IVc) o administrando solución salina y L-DOPA/benserazida en el caso de los animales control (n=9, grupo IVd). Después de este segundo período de tratamiento (en la undécima semana después de la lesión con 6-OHDA), la dosis de L-DOPA fue aumentada a 24mg/kg/día, para intensificar los

niveles de discinesia y así evaluar si fasudil es capaz de reducir los niveles de discinesia cuando estos son muy severos, similar a lo que ocurre en fases avanzadas de la EP (ver esquema 5).



Esquema 5: Diseño experimental (Semanas 1-11). Curso temporal de los experimentos (I-IV), análisis de muestras y pruebas de comportamiento. Abreviaturas: AIMS, movimientos involuntarios anormales; Exp., experimento; F, fasudil; LD, L-DOPA; FPM, fascículo prosencefálico medial. Esquema de elaboración propia.

En la segunda parte de esta tesis, se estudió el papel de PRR en la microglía como posible mecanismo de discinesias, debido a su implicación en procesos neuroinflamatorios, así como su relación con la vía ROCK (experimentos V-IX; objetivo 2).

En el **experimento V** se estudiaron las alteraciones de PRR en modelos animales de lesión dopaminérgica, modelo de discinesias y en ratones deficientes para los receptores del SRA (objetivo 2.1). En primer lugar, se analizaron los niveles de expresión del PRR en la lesión aguda, una semana después de la inyección con 6-OHDA (n=12; grupo Va) y tras 4 semanas en las lesiones crónicas (n=12, grupo Vb). En segundo lugar, se investigó la expresión de PRR en el modelo de discinesias, en un grupo de ratas (grupo Vc) que recibieron una única inyección de L-DOPA (12 mg/kg) junto con benserazida (10mg/kg).

Estos animales fueron sacrificados 1h (n=7) o 4h (n=7) después de la inyección. En otro grupo de animales (grupo Vd) se analizó la expresión de PRR en animales discinéticos después del tratamiento crónico con L-DOPA (6mg/kg de L-DOPA y 10mg/kg de benserazida) durante 3 semanas (n=16). Los controles correspondientes a estos grupos experimentales fueron ratas lesionadas con 6-OHDA e inyectadas con solución salina subcutánea (n=7 y n=12, respectivamente). En último lugar, en ratones deficientes para los receptores de AII se estudió la expresión de PRR en ratones deficientes en el receptor AT1(KOAT1, n=13; grupo Ve) y en ratones deficientes en el receptor AT2 (KOAT2 n=16; grupo Vf). En este caso los controles fueron ratones de la cepa salvaje (*wild type*; WT, n=24). Además, en los ratones deficientes en AT2, se analizó la expresión de PRR en células microgliales y en neuronas de la sustancia negra. Para ello, en primer lugar, usando el cerebro de un grupo de animales WT (n=4) y KOAT2 (n=4) se aisló la microglía adulta. A continuación, otro grupo de animales WT (n=6) y KOAT2 (n=6) fue utilizado para separar la población neuronal de secciones de sustancia negra a través de un microdisector de láser guiado.

En el **experimento VI** se analizaron los efectos de la activación de PRR sobre la vía ROCK, y el estrés oxidativo en células microgliales (*objetivo 2.2*). Para ello, se estudiaron los niveles expresión de la proteína ROCK y se realizó un análisis de las subunidades del complejo NADPH-oxidasa, así como de la actividad de dicho complejo. Todos los experimentos se realizaron en paralelo en la línea celular microglial BV2 y en cultivos primarios de microglía de rata. Los grupos experimentales con los que se trabajó fueron similares para los dos tipos de cultivos, grupos control (n= 21; grupo VIa y n=7; grupo VIc, respectivamente) y grupos tratados con una dosis de 5nM de la proteína (pro)renina recombinante (n= 21; grupo VIb y n=7; grupo VId, respectivamente).

Todos los grupos experimentales en los cuales se realiza un tratamiento con (pro)renina recombinante, se trataron 30 min antes con un antagonista del receptor AT1, losartan, (100nM), para valorar el efecto que la (pro)renina recombinante ejerce a través de PRR,

independiente del efecto que la AII pueda inducir sobre el receptor AT1.

En el **experimento VII** se estudiaron las consecuencias de la manipulación de la vía ROCK sobre el efecto derivado de la activación de PRR sobre la neuroinflamación en las células microgliales (*objetivo 2.3*). Al igual que en el experimento anterior, los experimentos se realizaron empleando el inhibidor fasudil, en la línea celular microglial BV2 y en cultivos primarios de microglía. Los grupos experimentales que se utilizaron fueron similares para ambos tipos celulares, grupos control (n=9-15 BV2 y n=8-10 microglía primaria), grupos tratados con una dosis de 5nM de la proteína (pro)renina recombinante y 100nM de losartan (n=8-13 BV2 y n=10-11 microglía primaria) y grupos tratados con una dosis de 5nM de la proteína (pro)renina recombinante junto con una dosis de 0,2µg/µl de fasudil y 100nM de losartan (n=8-13 BV2 y n=8-9 microglía primaria). En ellos se analizaron los niveles de inflamación utilizando los marcadores INOS, TNF- α , IL-1 β e IL-6.

En el **experimento VIII** se analizó el papel de PRR en el proceso de autofagia. Además, se investigó la implicación de la vía ROCK y del complejo del inflammasoma en el proceso de autofagia (*objetivo 2.3*). Los grupos experimentales que se utilizaron fueron similares para ambos tipos celulares, grupos control (n=7-12 BV2 y n=7-18 microglía primaria), grupos tratados con una dosis de 5nM de la proteína (pro)renina recombinante y 100nM de losartan (n= 7-20 BV2 y n=7-13) y grupos tratados con una dosis de 5nM de la proteína (pro)renina recombinante y 100nM de losartan combinado con una dosis 1M de rapamicina (n=6-7 BV2 y n=6-7 microglía primaria) o 0,2µg/µl de fasudil (n=7 BV2 y n=16 microglía primaria), o 10 µM de MCC (N-[[1,2,3,5,6,7,-hexahidri-s-indacen-4yl)amino]carbonyl]-4-(1-hydroxy-1-methylethyl)-2-furansulfonamide; n=6 microglía primaria).

En el **experimento IX** se analizó el efecto de las sustancias generadas por las células microgliales sobre la viabilidad de las neuronas en ausencia o en presencia de la neurotoxina 6-OHDA (*objetivo 2.3*). Para ello, en primer lugar, se cultivaron células de la línea neuronal N27 durante 24 horas. Posteriormente, se realizó un grupo control con medio específico de N27 y al resto de los grupos se les añadió medio de cultivo procedente de la microglía, con los factores

solubles que esta produce: un grupo sólo medio condicionado (MC) de microglía, otro grupo MC de microglía tratada con (pro)renina recombinante y 100nM de losartan y un último grupo con MC de microglía tratada con (pro)renina recombinante, fasudil y losartan. Una segunda parte del experimento se realizó con los mismos grupos en presencia de una dosis de 40 μ M de la neurotoxina 6-OHDA. Estos experimentos se realizaron empleando tanto medio de cultivo que provenía de la línea microglial BV2, como medio que procedía de los cultivos primarios de microglía de rata.

Finalmente, se estudió el papel del colesterol en las discinesias inducidas por L-DOPA y su interacción con el SRA (experimentos *X-XIII*; *objetivo 3*).

En el **experimento X** se analizaron los niveles de colesterol en modelos de EP y de discinesias inducidas por L-DOPA (*objetivo 3.1*). En primer lugar, se examinaron los niveles de colesterol en ratas lesionadas con 6-OHDA en el FPM (n=4) y en ratas lesionadas con 6-OHDA que fueron tratadas durante 3 semanas con L-DOPA (6mg/kg; sc) junto con benserazida (10 mg/kg), modelo de discinesias (n=6-8).

En el **experimento XI** se estudió el efecto de la inhibición del colesterol en las discinesias inducidas por L-DOPA (*objetivo 3.2*). Inicialmente, los animales fueron lesionados en el FPM con la neurotoxina 6-OHDA. Después de 3 semanas, se seleccionaron mediante test de comportamiento, las ratas que presentaban una denervación máxima. A continuación, un grupo de animales fue tratado con L-DOPA (6mg/kg sc; n=7) junto con benserazida (10 mg/kg), mientras que al otro grupo además de la L-DOPA/benserazida se le administró una dosis oral de 15mg/kg simvastatina (n=7). A continuación, estos animales fueron evaluados a través del test de discinesias, para evaluar los movimientos involuntarios anormales. Finalmente, estos animales fueron sacrificados, junto con un grupo de animales lesionados con 6-OHDA (n=5), para analizar los niveles de expresión en el estriado de la enzima de síntesis de colesterol, HMGCR, y de la proteína ROCK.

En el **experimento XII** se analizó el papel del SRA sobre los niveles de colesterol tras la inyección intraventricular de AII, así como en ratones deficientes para receptores del SRA (*objetivo 3.3*). En primer

lugar, se estudiaron los niveles de expresión del colesterol en ratas macho adultas inyectadas con una dosis de 5µg del péptido AII en el tercer ventrículo (n=5, grupo XIa). En este caso los animales que se usaron como control fueron ratas inyectadas con solución salina en el tercer ventrículo (n=5). Además, se analizaron los niveles de colesterol en ratones deficientes para el receptor AT1 (n= 5) y en ratones deficientes para el receptor AT2 (n=6) utilizando como control ratones de la cepa salvaje (n=5). Finalmente, los animales fueron sacrificados para analizar los niveles de colesterol.

En el **experimento XIII** se estudió la expresión de los niveles de colesterol y sus receptores en neuronas y astrocitos (*objetivo 3.4*). Para ello, se analizaron los niveles de expresión de la enzima de síntesis de colesterol, HMGCR, del receptor de salida LDLR y del receptor de entrada de colesterol en las células, ABCA1, en cultivos celulares de neuronas dopaminérgicas, así como de astrocitos, en presencia y ausencia de AII. Para ello se analizó en paralelo la expresión de dichos marcadores en la línea neuronal N27 y la línea astrogliosa C6. Los grupos experimentales que se utilizaron fueron grupo control (n=9-16 N27; n=11-15 C6) y un grupo tratado con AII (n=4-6 N27; n=11 C6) para el análisis de proteína. Para examinar la expresión de ácido ribonucleico mensajero (ARNm), además del grupo control (n=5 N27; n=5 C6) y el grupo tratado con AII (n=5 N27; n=5 C6) se añadió un grupo a mayores en el cual se inhibió la expresión del receptor AT1 con su inhibidor, el losartan 100nM (n=5 N27; n=6 C6).

Al final de los experimentos *in vivo*, todos los animales fueron sedados con dióxido de carbono y a continuación sacrificados por decapitación.

Los animales que fueron tratados con L-DOPA se sacrificaron 90 minutos después de la última inyección, a excepción de los animales que recibieron una única inyección de L-DOPA, que fueron sacrificados después de 1 o 4 horas. Los animales inyectados con AII en el tercer ventrículo fueron decapitados 16 horas después de la infusión de la molécula.

A continuación, las regiones cerebrales correspondientes a la sustancia negra y al estriado fueron rápidamente diseccionadas,

congelados en hielo seco y almacenados a -80°C hasta ser procesados para análisis mediante técnicas de *Western Blot* (WB), ensayos de actividad, *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA) y *Quantitative- Polymerase chain reaction* (Q-PCR). Los valores se obtuvieron del lado lesionado y se compararon con el área correspondiente de los animales pertenecientes al grupo control.

3.2 EXPERIMENTOS *IN VIVO*

En los experimentos *in vivo* se emplearon ratas Sprague-Dawley para realizar lesiones con 6-OHDA para establecer el modelo de EP, así como el modelo de discinesias. A continuación, en estos animales se realizaron pruebas de comportamiento motor tales como, test del cilindro, test de comportamiento rotacional, test del *stepping* y test de discinesias. Asimismo, se llevaron a cabo inyecciones con AII en el tercer ventrículo en ratas. Finalmente, se utilizaron también ratones deficientes en los receptores principales para el SRA (para reactivos y materiales ver tabla 8).

3.2.1 Modelo de lesión con 6-OHDA

El modelo de EP que se ha utilizado para la realización de esta tesis es el modelo neurotóxico que emplea la neurotoxina 6-OHDA para generar depleción de las neuronas dopaminérgicas de la vía nigro-estriatal.

En primer lugar, los animales fueron anestesiados con la combinación de ketamina (50mg/kg) / medetomidina (0,4mg/kg) y colocados en el aparato de estereotaxia (Kopf Instruments) para realizar la cirugía. Los animales se colocaron de manera que la posición del cráneo fuese plana situando la barra dental a -3,3mm. Se realizó una incisión en la línea media con un bisturí y se calcularon las coordenadas craneométricas en base al bregma correspondientes al FPM derecho: -3,7mm anteroposterior, -1,6mm medio lateral y -8,8 ventral a la superficie craneal (Paxinos y Watson, 1998). A continuación, se trepanó el cráneo para inyectar 12 μg de 6-OHDA (para proporcionar 8 μg de 6-OHDA de base libre) en 4 μl de solución salina estéril con 0,2% de ácido ascórbico para así evitar la oxidación de la molécula. La solución se inyectó usando una jeringa Hamilton de 5 μl acoplada a un

inyector monitorizado (Stoeling), a una velocidad de 0,5µl/min y la cánula se mantuvo *in situ* en torno a 2 minutos una vez se realizó la inyección. En los animales que se utilizaron como control se realizó una cirugía simulada sin inyectar la neurotoxina.

3.2.2 Inyección intraventricular con AII

Las ratas macho adultas fueron anestesiadas con una combinación farmacológica que incluía ketamina (50mg/kg) / medetomidina (0,4mg/kg) para poder realizar la cirugía estereotáxica, ya que, la AII, péptido efector del SRA, no es capaz de atravesar la BHE. Por lo tanto, esta sustancia se inyectó en el tercer ventrículo. Para ello, la barra dental del aparato de estereotaxia (Kopf Instruments) se situó en cero y en la línea media se emplearon las siguientes coordenadas desde bregma: -0,8mm anteroposterior y -6,5mm ventral a la superficie craneal. A continuación, se trepanó el cráneo para inyectar, a través de una jeringa Hamilton de 10µl acoplada a un inyector monitorizado (Stoeling), una concentración de 5µg de AII en un volumen de 3µl de solución salina estéril, a una velocidad de 0,5µl/min. Los controles correspondientes a este grupo de tratamiento fueron también inyectados con el mismo volumen de solución salina. Dieciséis horas después de ser inyectados los animales fueron decapitados y se diseccionó la sustancia negra y el estriado para su posterior procesamiento.

3.2.3 Pruebas de comportamiento animal

En esta tesis se realizaron pruebas de comportamiento animal, tales como test del cilindro, test de comportamiento rotacional, y el test del *stepping* para evaluar la eficacia de la lesión dopaminérgica, así como el efecto terapéutico de los tratamientos. Todos los test de comportamiento se realizaron durante el periodo de oscuridad, cuando el animal está en la fase activa del ciclo. Además, se realizó un test específico para evaluar los movimientos involuntarios anormales que se producen tras la inyección de L-DOPA.

3.2.3.1 Test del cilindro

El test del cilindro fue usado para evaluar la acinesia de las extremidades anteriores lo que nos permite valorar la eficacia de la lesión (Schallert y col., 1997; Schallert 1999). Las ratas se colocaron individualmente y se grabaron en video en el interior de un cilindro de

vidrio transparente (20cm de diámetro) con dos espejos, para permitir la visualización desde todas las direcciones y la correcta observación de los animales cuando estos se giran. A los animales se les permite moverse libremente por el cilindro explorando el ambiente, mientras que un observador ciego al tratamiento cuenta el número de contactos que las ratas realizan con sus extremidades anteriores (derecha e izquierda) sobre la pared del cilindro, hasta que el animal alcanza un total de 20 contactos. Los datos se expresaron como porcentaje de contactos con la extremidad impedida en relación con el total. Por lo tanto, un animal con inervación dopaminérgica intacta, es decir, un animal simétrico no lesionado realiza aproximadamente el 50% de los contactos con cada una de las extremidades. Sin embargo, los animales lesionados generalmente reducen el rendimiento de la extremidad impedida. La lesión fue considerada válida cuando el uso de la extremidad izquierda fue igual o inferior al 20% del recuento total de los contactos.

Además, la prueba del cilindro fue utilizada en esta tesis para evaluar la influencia del tratamiento con fasudil sobre el efecto terapéutico de la L-DOPA. En cada sesión en la que se realizó la prueba se obtuvo un valor de referencia evaluando al animal sin recibir ningún tratamiento (prueba basal), y a continuación la prueba se repitió a cada uno de los animales a los 90 minutos de la administración subcutánea de L-DOPA. Los animales que fueron cotratados con fasudil, este fármaco se les inyectó intraperitoneal 30 minutos antes que la L-DOPA.

3.2.3.2 Test de comportamiento rotacional

La prueba de comportamiento rotacional inducido por anfetamina se realizó también para evaluar el grado de denervación dopaminérgica. La capacidad giratoria de los animales fue registrada en un rotómetro automatizado con 8 canales independientes (Rota-count 8, Columbus Instruments, Columbus, EE.UU.). Los animales se colocaron individualmente en el interior de las cubetas y se mantuvieron durante 15-20 minutos para que se aclimataran al espacio. A continuación, se les inyectó intraperitonealmente una dosis de 2,5mg/kg de D-anfetamina disuelta en solución salina. Finalmente, los giros completos hacia la derecha y hacia la izquierda fueron registrados y almacenados en el equipo a intervalos de 5 minutos, durante un

periodo de 90 minutos. El análisis de los resultados se hizo calculando la rotación neta de cada animal, para ello se restó el número total de giros contralateral al lado denervado (hacia el lado izquierdo) menos el número total de giros ipsilateral a la lesión (hacia el lado derecho). El criterio de exclusión para discriminar que animales se usaban en el estudio fue que estos realizasen un promedio mínimo de 6 vueltas netas/por minuto en dirección ipsilateral a la lesión, equivalente a una depleción de fibras dopaminérgicas en el estriado igual o superior al 90% (Winkler y col., 2002).

Esta prueba se utilizó además para evaluar la rotación inducida por L-DOPA y el efecto del fasudil sobre la activación motora inducida por L-DOPA.

3.2.3.3 Test del *stepping*

La prueba de *stepping* permite monitorizar la acinesia de las extremidades anteriores en los modelos animales de EP. La prueba pretende proporcionar una medida más directa del déficit motor subyacente, análogo a la acinesia en las extremidades que resulta en problemas de la marcha durante la EP en humanos. Por lo tanto, esta prueba nos proporciona la posibilidad de evaluar el estado de las lesiones en la vía nigro-estriatal y además cuantificar los cambios que inducen los tratamientos en la acinesia generada por la enfermedad en las extremidades anteriores de los animales.

En esta tesis, el test de *stepping* se utilizó como indicador del efecto terapéutico de L-DOPA. Esta prueba se llevó a cabo realizando pequeñas modificaciones en el modelo que fue descrito por Olsson y sus colaboradores en el año 1995. Los animales con los que se realizó la prueba fueron entrenados durante tres días para que estos pudiesen habituarse a la manipulación y a la realización de la prueba. A continuación, fueron entrenados específicamente para la realización del ejercicio una vez al día, durante una semana. La prueba se efectuó sobre una superficie plana de 90cm de ancho. Inicialmente, se sostuvo con una mano al animal, para fijar las extremidades posteriores y elevarlas ligeramente para colocarlo por encima de la superficie de contacto. A su vez, con la otra mano se fijó la extremidad anterior que no estaba siendo monitorizada, mientras que la extremidad anterior libre podía tocar la superficie de contacto sin restricciones. Manteniendo a los

animales en la posición que se ha descrito se contaron los pasos que realizaron mientras se dirigían lentamente en una dirección y en la contraria. El proceso se repitió de la misma manera con las dos extremidades delanteras y en las dos direcciones. Los valores con los que se trabajó correspondían a la suma de los pasos que el animal realizó en las dos direcciones. Se analizó la suma de los pasos que dio cada animal con la extremidad derecha e izquierda en las dos direcciones. El rendimiento en la prueba de *stepping* se evaluó en los animales co-tratados con L-DOPA y fasudil y en los animales tratados solo con L-DOPA. La prueba siempre se llevó a cabo 90 minutos después de la administración de L-DOPA.

3.2.3.4 Test de discinesias

Los animales modelo de EP fueron tratados con L-DOPA para desarrollar el modelo de discinesias. La L-DOPA fue administrada de manera crónica, a través de una inyección subcutánea diaria durante 3 semanas. Las dosis que se utilizaron fueron 6, 12 o 24 mg/kg en función del experimento. La L-DOPA fue inyectada de forma combinada con el inhibidor de la AADC periférica, la benserazida (10mg/kg) disuelto en solución salina.

Para evaluar el grado de discinesia que desarrollaron los animales se empleó el test de discinesias o de movimientos involuntarios anormales (Cenci y col., 1998). Los animales fueron evaluados mediante esta prueba de forma periódica aproximadamente cada 2-3 días durante el período en el que estos fueron tratados con L-DOPA. Cada uno de los animales fue observado de manera individual durante un minuto cada 20 minutos, mientras perdura el efecto de L-DOPA, es decir, hasta que los movimientos discinéticos desaparecieron. La duración de la prueba (120-200 min) depende de la dosis de L-DOPA, a mayor dosis mayor es la duración de los movimientos discinéticos en el tiempo. Durante la realización de la prueba los animales se colocan individualmente en cajas transparentes que permitan evaluar correctamente los movimientos realizados por el animal.

Los movimientos que fueron reconocidos como discinéticos responden a los siguientes criterios: son inducidos por L-DOPA, afectan al lado contralateral a la lesión, son repetitivos, no tienen

propósito y no son atribuibles al comportamiento normal de los roedores (Cenci y col., 1998).

Los movimientos involuntarios anormales fueron clasificados en función de la distribución topográfica en cuatro componentes o subtipos: extremidad, orolingual, axial y rotacional.

- El componente extremidad se explica como una flexo-extensión y aducción, además de una prosupinación y apertura-cierre de la zarpa con propiedades coreicas o distónicas. El movimiento se desarrolla en la extremidad anterior contralateral a la lesión.
- El componente orolingual se manifiesta como un movimiento hipercinético realizado a nivel facial concretamente en la región mandibular y lingual en dirección contralateral a la lesión.
- El componente axial se expresa con desviaciones distónicas del cuello y el tronco contralaterales a lado lesionado.
- El componente rotacional está fundamentado en los giros completos que el animal realiza contralaterales a la lesión. Este componente no se ha considerado un movimiento estrictamente discinético, por lo que se ha utilizado simplemente para apoyar la valoración de la discinesia a nivel cualitativo, y no se incluye en el cómputo total del AIMs.

Los movimientos anteriormente descritos son evaluados de manera ciega al tratamiento y puntuados con valores de 0 a 4 atendiendo a la frecuencia con la que se están manifestando cada uno de los componentes durante el minuto de observación. El patrón de puntuación que se establece es el siguiente:

- Valor 0: ausencia de movimiento.
- Valor 1: el movimiento se produce durante menos del 50% del tiempo de observación.
- Valor 2: el movimiento está presente más del 50% del tiempo.
- Valor 3: el movimiento es continuo durante el tiempo que permanece el observador realizando la observación, pero se interrumpe si se aplica un estímulo sensorial.
- Valor 4: el movimiento se desarrolla en todo momento, incluso aunque se introduzca un estímulo sensorial.

Además, se han usado puntuaciones intermedias (1.5, 2.5 o 3.5) cuando el movimiento del animal se ajustaba a criterios intermedios a los anteriormente descritos. Finalmente, se recogieron las puntuaciones, se hizo un análisis del AIMS para cada animal y cada sesión, sumando los valores de los componentes extremidad, orolingual y axial. Para la realización de los análisis estadísticos tanto de los diferentes componentes discinéticos como del AIMS, se extrapola el valor al tiempo completo de la prueba, multiplicando el valor de cada observación por 20 minutos (1 minuto de muestro sobre 20 minutos totales).

3.2.4 Aislamiento de microglía de cerebros de ratones adultos

Los cerebros de ratones WT y KOAT2 adultos se extrajeron para el aislamiento de las células de la microglía adulta. En primer lugar, se realizó un lavado del cerebro con medio de cultivo sin suero (DMEM/F12 suplementado con 1% penicilina/estreptomicina y glucosa 100X). A continuación, se separaron los dos hemisferios y se homogenizaron con un bisturí en una placa petri sumergida en hielo. Cada uno de los hemisferios una vez triturados se transfieren a un homogeneizador Dounce que contiene la siguiente mezcla enzimática (5ml de DMEM/F12, 12,5mM de HEPES y 37,5mM de NaCl que contiene 1mg/ml de papaína, 6U/ml de dispasa y 20 U/ml de DNasa) para disociar el tejido con 12 pases usando un mortero embebido en hielo. A continuación, el tejido se incubó a 37°C durante 30 minutos en un tubo falcon de 50 ml para la digestión enzimática. La suspensión de células del hemisferio cerebral fue lavada con 10 ml de solución salina equilibrada Hanks' frío (HBSS 10X con calcio y magnesio), filtrada (filtro de 100µm) y centrifugada durante 5 minutos a 4°C y 300g. El pellet resultante fue resuspendido en 8ml de Percoll al 35% a temperatura ambiente y transferido a un tubo falcón limpio donde se le añadió 5ml de HBSS y se dejó reposar 5 minutos en hielo. Las muestras fueron centrifugadas durante 20 minutos a 4°C y 800g colocando la centrifuga sin desaceleración. El sobrenadante y la capa de mielina fueron eliminados y el pellet celular se lavó con HBSS frío y se filtró usando un filtro de 40 µm. Después de esto, la suspensión celular fue centrifugada 5 minutos a 4°C y 400g y resuspendida en 90µl de tampón de separación (solución de PBS con 0,5% de albúmina de suero bovino

y 2mM de EDTA) y transferido a un tubo Falcon de 15ml. Se añadieron 10µl de microesferas con anti CD11b a la mezcla de células y se incubaron durante 15 minutos a 4°C en agitación. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, la suspensión de microesferas fue lavada, resuspendida en 500 µl de tampón de separación y transferida a las columnas de MS siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, la microglía purificada procedente de dos cerebros de ratón se agrupa y se usa como una sola muestra, la cual fue resuspendida en tampón de lisis (RNesy Minikit, Qiagen) y almacenadas a -80°C hasta la posterior extracción de ARNm. La extracción de ARNm fue realizada utilizando el kit RNesy Microkit de Qiagen basado en una separación mediante columnas.

3.2.5 Microdissección por captura láser

La microdissección por captura láser de las neuronas de la sustancia negra de ratón fue realizada siguiendo el protocolo descrito previamente por Garrido-Gil y colaboradores en el año 2017, con ligeras modificaciones. Los cerebros frescos fueron extraídos con rapidez de los animales WT y KOAT2, congelados en nitrógeno líquido y almacenados a -80°C. A continuación, usando un criostato (Thermo Scientific), se realizaron secciones coronales de tejido cerebral con un grosor de 20µm, las cuales contenían la sustancia negra. Dichas secciones se montaron en un portaobjetos de vidrio y fueron teñidas con un protocolo acortado para rojo neutro al 1%, durante 2 minutos en hielo. Tras la completa deshidratación del tejido en concentraciones crecientes de etanol, se realizó la microdissección por captura láser usando el sistema PALM MicroBeam (Zeiss) controlado por el software PALM Robo. Las neuronas de la sustancia negra fueron visualizadas bajo microscopia de campo claro con un aumento de 40X con la ayuda de una cámara AxioCam Icc (Zeiss), para seleccionar los grupos de células (1000 neuronas por ratón) con la ayuda del software. Finalmente, los grupos celulares de interés se cortaron y catapultaron por pulsos de láser a tubos específicos (Zeiss). Las células se lisaron inmediatamente durante 30 minutos a temperatura ambiente en tampón de lisis (RNesy Microkit, Qiagen) y se almacenaron a -80°C hasta la posterior extracción de ARNm. La extracción de ARNm fue realizada

utilizando el kit RNesy Microkit de Qiagen basado en una separación mediante columnas.

3.3 EXPERIMENTOS *IN VITRO*

Los experimentos *in-vitro* se realizaron tanto con cultivos primarios de microglía de rata como con líneas celulares (neuronas, microglía y astrocitos; ver reactivos y materiales en tabla 8).

3.3.1 Cultivos primarios de microglía

Los cultivos primarios de microglía se realizaron a partir de cerebros de neonatos de un día (P1) de ratas Sprague-Dawley. Resulta necesario usar un mínimo de 20 neonatos para obtener una cantidad de microglía suficiente para realizar un experimento. Los cerebros se extrajeron en condiciones de esterilidad bajo la llama de un mechero bunsen e inmediatamente después se sumergen en una solución fría (4°C) que contiene glucosalino y penicilina/estreptomicina al 1%. Luego, con ayuda de un bisturí se eliminan los restos de médula espinal y el tronco del encéfalo a excepción del mesencéfalo. Los dos hemisferios cerebrales fueron separados para limpiar completamente las meninges junto con los vasos sanguíneos que se encuentran en los plexos coroideos. A continuación, en el interior de una campana de flujo laminar, la cual garantiza las condiciones de esterilidad, se llevó a cabo la disociación mecánica con un bisturí y la filtración de los fragmentos a través de un filtro de nylon con un tamaño de poro de 100µm. La suspensión celular que se obtiene se centrifugó a temperatura ambiente durante 10 minutos a 1800 rpm con el objetivo de eliminar el sobrenadante. El pellet celular se fue resuspendido en el volumen de medio completo requerido en cada experimento (10 ml de medio por cerebro aislado) y fue sembrado en frascos de 75cm² (2,5x10⁷ células/frasco). La siembra se realizó con medio de cultivo DMEM completado con 10% suero fetal bovino, 1% de penicilina/estreptomicina y 1% de anfotericina B. Las células en cultivo se mantuvieron en una incubadora a 37°C, 5% de CO₂ y humedad 95% hasta que llegaron a confluencia (aproximadamente 15 días). El primer cambio de medio fue realizado cuando las células estaban completamente adheridas a la superficie del frasco, aproximadamente

5 días después de la siembra. Después, el medio se repone cada 4 o 5 días.

Una vez que los frascos de cultivo están confluentes (en torno a 15 días después de la siembra) se realizó la extracción de microglía primaria. Para ello, los frascos fueron colocados sobre un agitador orbital dentro de un incubador con las condiciones de cultivo que comentamos anteriormente, para ser agitados durante 4 horas a 180 rpm. Inmediatamente después de la agitación, el medio de cultivo que contienen todos los frascos se recogió y centrifugó a temperatura ambiente, a una velocidad de 1800 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante fue eliminado y los pellets fueron resuspendidos en el volumen de medio completo requerido. Las células se contabilizaron usando una cámara de Neubauer en una suspensión con azul de tripano que nos permite analizar la viabilidad de las células obtenidas. Las células microgliales fueron sembradas en placas de 35mm tratadas con polilisina aproximadamente una cantidad de 2×10^6 células/placa en un volumen final de 2ml de medio de cultivo completo. Después de 1 hora con las células en condiciones de cultivo, se procedió a realizar una agitación suave de la placa con la mano del experimentador, se eliminó el medio de cultivo y se repuso con medio completo nuevo. Así se consiguen retirar aquellas células con menor capacidad de adherencia y que de otra manera continuarían en el cultivo como es el caso de los oligodendrocitos. Finalmente, las células microgliales se mantuvieron en condiciones de cultivo 24 horas antes de realizar el ensayo, para evitar que las células estén en estado activado a causa de la agitación. Hay que tener en cuenta que los ensayos con microglía primaria aislada no pueden prolongarse mucho en el tiempo, ya que, la capacidad de supervivencia de la microglía sin los astrocitos es limitada (máximo 48-72 horas). Es importante destacar que usando este proceso de extracción se consigue obtener un cultivo altamente enriquecido en microglía primaria, ya que, más del 95% de las células resultaron ser OX-42 positivas (Dominguez-Meijide y col., 2017).

3.3.2 Líneas celulares

Las líneas celulares usadas en este estudio se mantuvieron en condiciones de cultivo en una incubadora a una temperatura de 37°C, con un porcentaje de CO₂ del 5% y con un parámetro de humedad

relativa no inferior al 95%. La siembra de las células para el mantenimiento se realizó en frascos de 75cm² mientras que para realizar los tratamientos las células se sembraron en placas de 35mm de diámetro o en placas multipocillo de 24 pocillos.

Todas las líneas celulares que se usaron en esta tesis son adherentes por lo que para realizar los pases hay que usar tripsina para levantarlas. Para ello, en primer lugar, se retira el medio de cultivo en el que están creciendo, se lavan con buffer fosfato salino (PBS) y posteriormente se añaden 3 ml de tripsina y se dejan durante 5 minutos en el interior de la incubadora. Transcurrido ese tiempo las células se han despegado, la tripsina se neutraliza para detener la reacción con 3 ml de suero fetal bovino y las células se recogen a un tubo falcón de 15ml. Los tubos se centrifugan a 600g durante 5 minutos, para que las células precipiten. Finalmente, las células se resuspenden en medio completo correspondiente al tipo celular con el que se esté trabajando y éstas se siembran en el tipo de placa adecuado a la realización del experimento.

3.3.2.1 Líneas microgliales

La línea microglial que se usó en esta tesis es:

- BV2: línea tumoral microglial procedente del encéfalo de *Mus musculus* (ver Höing y col., 2011). Para su mantenimiento en cultivo se siembra en DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino, 1% de Penicilina/estreptomicina y 1% de Anfotericina B.

3.3.2.2 Líneas Neuronales

La línea neuronal con la que se trabajó en esta tesis doctoral es:

- N27: se trata de una línea celular dopaminérgica procedente de *Rattus norvegicus* (SCC048, Millipore, MA, USA). En condiciones de cultivo se mantienen en RPMI suplementado con 10% de FBS, 2mM de L-glutamina, 1% de Penicilina/estreptomicina y 1% de Anfotericina B.

3.3.2.3 Líneas Astrogliales

La línea astroglial con la cual se realizó este estudio es:

- C6: línea de rata (92090409, Sigma) se siembran en medio Ham's F12 suplementado con 10% FBS, 2mM de L-

glutamina, 1% de Penicilina/estreptomicina y 1% de Anfotericina B.

3.4 TÉCNICAS *POSTMORTEM*

A niveles *postmortem* con los animales procedentes de los ensayos *in vivo*, así como con los cultivos de los ensayos *in vitro* se realizaron análisis de biología molecular tales como inmunofluorescencia, WB, Q-PCR, kit ELISA y kit de actividad (ver reactivos en la tabla 8).

3.4.1 Técnicas de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia

En esta tesis se realizó la técnica de inmunohistoquímica en tejido de animales para confirmar la lesión dopaminérgica y en cultivos celulares inmunofluorescencia para demostrar la presencia de PRR en microglía.

3.4.1.1 Inmunohistoquímica

Esta técnica fue empleada principalmente para confirmar la lesión dopaminérgica en los animales inyectados con 6-OHDA.

Los animales que se usaron para inmunohistoquímica fueron primero anestesiados y perfundidos con 0,9% de salino e inmediatamente después con paraformaldehído frío al 4% en 0,2M de tampón fosfato (0,162M de Na_2HPO_4 y 0,036M NaH_2PO_4), a pH 7,4.

Finalizada la perfusión, los cerebros fueron extraídos, lavados y almacenados durante 48 horas en una solución crioprotectora (tampón fosfato con 20% de sacarosa) a 4°C. A continuación, el tejido fue cortado en secciones de 40 μm usando un microtomo de congelación. Las secciones de tejido fueron incubadas 1 hora en una solución con 10% de suero porcino normal, 0,25% de Triton X-100 en 20mM de PBS potásico que contenían 1% de BSA (seroalbúmina bovina del inglés *bovine serum albumin*) (KPBS-BSA). Después se incubaron durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo frente tirosina hidroxilasa, (anti-TH; 1:10000; ver tabla 1), enzima limitante en la síntesis de DA, empleado como marcador de neuronas dopaminérgicas. A continuación, las secciones se incubaron, primero durante 60 minutos con el correspondiente anticuerpo secundario biotilado (*caballo anti-ratón*, 1:200; ver tabla 2) y después durante 90 minutos con el complejo

avidina-biotina-peroxidasa (ABC, 1:100). Finalmente, las secciones se revelaron mediante el tratamiento con 0,04% de peróxido de hidrogeno y el 0,005 % de 3,3'-diaminobezidina (DAB), y se montaron en portaobjetos recubiertos de gelatina para su visualización. Las microfotografías fueron realizadas empleando el microscopio NIKON. En todos los experimentos, las secciones control, en las que se obvió el anticuerpo primario fueron inmuno-negativas para TH.

3.4.1.2 Inmunofluorescencia

Los cultivos celulares procedentes de la línea microglial BV2 y de cultivos primarios de rata fueron sembrados en placas de 35mm con un cubreobjetos de vidrio. Después de 24 horas, las células fueron lavadas con DPBS (0,7mM CaCl₂, 2,7mM KCl, 1,4mM KH₂PO₄, 0,5mM MgCl₂, 137mM NaCl, 6mM Na₂HPO₄) y fijadas con paraformaldehído al 4% durante 20 minutos, para luego iniciar el doble marcaje inmunofluorescente.

A continuación, las células se mantuvieron durante una hora en una solución con 5% de suero, 10% de Triton X-100 disuelto en DPBS con 1% de BSA. Luego, las células se incubaron a 4 grados durante toda la noche con el anticuerpo primario marcador de microglía OX-42 (ver tabla 1) y el anticuerpo para PRR (ver tabla 1) disueltos en DPBS conteniendo 1% de BSA y 2% de suero normal. Después, se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con los correspondientes anticuerpos secundarios fluorescentes (ver tabla 2). Los núcleos de las células se marcaron con Hoechst 33342 (10µg/ml) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, los cubreobjetos donde están las células marcadas se montan sobre portaobjetos con la solución de montaje Immumount. Las fotografías se realizaron usando el microscopio confocal Leica SP5X (Leica Biosystems, Wetzlar, Germany).

Tabla 1: Anticuerpos primarios inmunofluorescencia empleados para inmunohistoquímica

Antígeno	Especie	Tipo	Dilución	Casa Comercial/Referencia
TH	Ratón	Monoclonal	1:10000	Sigma
OX-42	Ratón	Monoclonal	1:50	AbD Serotec
PRR	Conejo	Policlonal	1:1000	Abcam (ab40790)
CD11B	Ratón	Monoclonal	1:10	MACS Miltenyi Biotec (130-093-634)

Tabla 2: Anticuerpos secundarios empleados para inmunohistoquímica e inmunofluorescencia

Antígeno	Especie	Dilución	Casa Comercial/Referencia
IgG Conejo	Mono	1:200	Invitrogen Alexa Fluor 488 (A-10042)
IgG Ratón	Mono	1:200	Invitrogen Alexa Fluor 568 (A-21202)
IgG Ratón	Caballo	1:200	Vector Laboratories (BA2001)

3.4.2 Western Blot

Los niveles de expresión de proteínas se determinaron a partir de las fracciones de tejido procedentes de la sustancia negra y el estriado de los animales de los diferentes grupos experimentales o de cultivos celulares usando la técnica de WB.

✓ Extracción de Proteínas

En primer lugar, por un lado, para extraer la fracción proteica de las muestras de tejido, este fue homogenizado mecánicamente con un politrón, en un tampón de lisis específico para ROCK (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM beta-glicerolfosfato, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM Na_3VO_4) o con tampón RIPA (50mM Tris-CL pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100; 1% SDS; 0,1% $\text{C}_{24}\text{H}_{39}\text{NaO}_4$) ambos suplementados con inhibidores de proteasas (1:200) y fluoruro de fenilmetilsulfonido (PMSF; 1:100). Por otro lado, los cultivos celulares fueron lavados con DPBS para eliminar los restos de medio y a continuación las células se lisaron gracias al raspado mecánico usando una solución que contiene tampón RIPA con inhibidores de proteasas (1:200) y PMSF (1:100). Los homogenados se centrifugaron durante 20 minutos a 14000g y a continuación se retiró el sobrenadante, fracción en la que se encuentran las proteínas. A continuación, se procedió a determinar la concentración

de proteína de cada una de las muestras, usando el método BCA (*Pierce BCA protein*). La absorbancia a 525 nm fue medida en el lector de placas TECAN infinite M20 y el método de análisis cuantitativo se realizó a partir de una recta patrón utilizando diluciones seriadas de la proteína BSA.

✓ Electroforesis

En segundo lugar, se realizó la desnaturalización y separación de las proteínas en función de su peso molecular a través de una electroforesis. Las muestras se diluyeron en buffer RIPA y tampón de carga para cargar la misma concentración de proteína en todos los pocillos del gel. El tampón de carga contiene β -mercaptoetanol y azul de bromo fenol, que aportan densidad a la muestra, rompen los puentes disulfuro y permiten la correcta visualización de la electroforesis. Las muestras preparadas se desnaturalizaron con un choque térmico, calentándolas durante 4 minutos a 95°C y a continuación, se procedió a la separación de las proteínas utilizando una electroforesis discontinua con geles SDS-PAGE 5%-10%. Estos geles contienen una zona concentradora del gel donde se apilan las proteínas con bajo grado de reticulación y pH 6.8 (5% de poliacrilamida) y una zona separadora o de resolución con mayor grado de reticulación y pH 8.8 (10%-14% de poliacrilamida en función del tamaño de la proteína). La electroforesis fue realizada en una fuente de voltaje (BioRad) bajo los siguientes parámetros: amperaje 0,04 amperios, voltaje 120 voltios y tiempo en torno a 90 minutos.

✓ Transferencia

En tercer lugar, se realizó la transferencia de las proteínas separadas desde el gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa o de PVDF. Para esto se coloca el gel en contacto con la membrana en interior de un *cassette* y ambos se sumergen en un tampón de transferencia rico en metanol. La transferencia se realiza usando la fuente bajo las siguientes condiciones: amperaje 0,30 amperios, voltaje 90 voltios durante 3 horas.

✓ Incubación y revelado de las membranas

Por último, las membranas se preincubaban con la solución de bloqueo (BSA 5%), durante una hora, para a continuación, incubar

durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario (ver tabla 3) diluido en BSA al 2,5% en PBS. Posteriormente, las membranas se incubaron con los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de HRP (ver tabla 4), diluidos en BSA al 2,5% en PBST durante 1 hora a temperatura ambiente. Las bandas inmunoreactivas se detectaron usando el kit de quimioluminiscencia (170-5044; Bio-Rad, Hercules, CA, USA) que se visualizó con un sistema de detección de quimioluminiscencia (Molecular Imager ChemiDoc XRS System). A continuación, las membranas fueron tratadas con una solución de lavado para realizar la incubación con el control de carga GADPH o tubulina (ver tabla 5). El nivel de expresión de las proteínas se cuantificó por densitometría de cada una de las bandas usando el software *Quantity One* y se expresó en relación con el valor de la banda que se usó como control de carga. Los datos se normalizaron a los valores del grupo control (100%). Las muestras fueron analizadas por triplicado, es decir, se utilizó la media obtenida tras el análisis de 3 membranas diferentes.

Tabla 3: Anticuerpos Primarios empleados en Western Blot

Antígeno	Especie	Tipo	Dilución	Casa Comercial/Referencia
ABCA1	Conejo	Policlonal	1:1000	Abcam (ab7360)
IL 1B	Hámster	Monoclonal	1:100	Santa Cruz Biotechnology (sc-12742)
LC3B	Conejo	Policlonal	1:1000	Cell Signaling (2775S)
LDLR	Conejo	Policlonal	1:1000	Abcam (ab30532)
HMGCR	Conejo	Monoclonal	1:1000	Abcam (ab174830)
PRR	Conejo	Policlonal	1:3000	Abcam (ab40790)
Rho A	Ratón	Monoclonal	1:200	Santa Cruz Biotechnology (sc-418)
ROCK II	Ratón	Monoclonal	1:200	Santa Cruz Biotechnology (sc-398519)
TH	Ratón	Monoclonal	1:5000	Sigma (T2928)
VEGF	Ratón	Monoclonal	1:200	Santa Cruz Biotechnology (sc-7269)

Tabla 4: Anticuerpos Secundarios empleados en Western Blot

Antígeno	Especie	Tipo	Dilución	Casa Comercial/Referencia
IgG Conejo	Ratón	Monoclonal	1:2500	Santa Cruz (sc-2357)
IgG Hámster	Ratón	Monoclonal	1:2500	Santa Cruz (sc-2789)
IgG Ratón	Conejo	Policlonal	1:5000	Dako (P0260)

Tabla 5: Anticuerpos Primarios empleados en Western Blot como control de carga

Antígeno	Especie	Tipo	Dilución	Casa Comercial
GAPDH	Ratón	Policlonal	1:25000	Sigma (G-9545)
Tubulina-HRP	Conejo	Monoclonal	1:5000	Abcam (ab185067)

3.4.3 Extracción de ARN, RT-PCR y Q-PCR

El ARNm total fue extraído de la sustancia negra y del estriado de las muestras procedentes de animales o de placas de cultivos celulares. El tejido fue homogenizando mecánicamente con la ayuda de un politrón en Trizol y los cultivos celulares una vez eliminado el medio de cultivo se lisaron directamente con Trizol. La extracción de ARNm se realizó siguiendo las instrucciones que marca el fabricante. Las concentraciones de ARNm se estimaron utilizando una placa NanoQuant y un lector de placas Infinite M200 (TECAN, Salzburgo, Austria). El ARNm total (2 µg) se retrotranscribió a ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) a través de *Reverse transcriptase-PCR* (RT-PCR), añadiendo a la reacción desoxinucleótidos trifosfato (dNTP), cebadores aleatorios y la enzima transcriptasa inversa MMLV (del inglés, *Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase*; 200 U).

La Q-PCR se utilizó para examinar los niveles de expresión de ARNm de los transcritos correspondientes (ver tabla 6-7) utilizando un termociclador (QuantStudio 3 Real-Time PCR Systems; ThermoFisher) para amplificar en paralelo los genes de interés y los genes que se usan como normalizadores. Las muestras de cada animal se analizaron por duplicado.

Para cada gen fue diseñada una pareja de oligonucleótidos (*forward* y *reverse*) utilizando el programa *Primer-BLAST NCBI* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>).

Los oligonucleótidos se diseñaron teniendo en cuenta que estuviesen ubicados entre exones para así evitar la amplificación de ADN genómico.

Los datos fueron evaluados usando el método delta-delta Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) donde Ct es el ciclo a partir del cual la fluorescencia supera un umbral. La expresión de cada gen se obtuvo normalizando su valor con respecto al gen que en cada caso se usó como control. Además, los datos se normalizaron a los del grupo control de cada uno de los ensayos.

Tabla 6: Oligonucleótidos de rata empleados para Q-PCR

Gen	Oligonucleótido <i>Forward</i> (F)	Oligonucleótido <i>Reverse</i> (R)
Abca1 (ABCA1)	5'-GGAGCTCTTTACAACAATAAAT-3'	5'-CAAAAAGGTTCCGTCCTACT-3'
Actb (ACT)	5'-TCGTGCGTGACATTAAGAG-3'	5'-TGCCACAGGATTCCATACC-3'
Atp6ap2 (PPR)	5'-TGGTGGGAATGCAGTGGTAGAG-3'	5'-GGGACTTTGGGTGTTCTCTTGT-3'
Cybb (gp91)	5'-TGTGTCGGAATCTCCTCTCCTC-3'	5'-GCCGTGTGAAGTGCTATCATCC-3'
Hmgcr (HMGCR)	5'-AACTCACAGGATGAAGTAAGG-3'	5'-AAAGCAGCACATGATCTCAA-3'
Il1b (IL-1B)	5'-GGCAACTGTCCCTGAACTCA-3'	5'-TGTCGAGATGCTGCTGTGAGA-3'
Il6 (IL-6)	5'-GGATACCACCCACAACAGACC-3'	5'-AGTGCATCATCGGTTACACACA-3'
Nos 2 (INOS)	5'-CAGGCTTGGGTCTTGTAGCC-3'	5'-GCCATGTCTGTGACTTTGTGCTT-3'
Ldlr (LDLR)	5'-GAACTCTGTTCCGAGAGAAA-3'	5'-CCACTGGGAAGATCTAGTGT-3'
Rhoa (Rho A)	5'-GGACGGGAAGCAGGTAGAGTT-3'	5'-AACTATCAGGGCTGTCGATGGAA-3'
Rock2 (ROCKII)	5'-GTTTCAGTTGGTTCGTACATAAGGCA-3'	5'-TGAACCACCCACGGACTGTT-3'
Tnf (TNF α)	5'-CACGTCGTAGCAAACCACCA-3'	5'-GGTTGTCTTTGAGATCCATGCCA-3'

Tabla 7: Oligonucleótidos de ratón empleados para Q-PCR

Gen	Oligonucleótido <i>Forward</i> (F)	Oligonucleótido <i>Reverse</i> (R)
Actb (ACT)	5'-TCGTGCGTGACATTAAGAG-3'	5'-TGCCACAGGATTCCATACC-3'
Atp6ap2 (PRR)	5'-GTTTGTGTCTCGTCATAAGC-3'	5'-ACTCTACCACTGCGTTCC-3'
Il1b (IL-1B)	5'-GCTATGGCAACTGTTCTGA-3'	5'-TGATGTGCTGCTGCGAGA-3'
Il6 (IL-6)	5'-GACTGATGCTGGTGACAAC-3'	5'-GAGTGGTATCCTCTGTGAA-3'
Nos 2 (INOS)	5'-TGGTGAAGGGACTGAGCTGTTA-3'	5'-CAGGGGCAAGCCATGTCTGAG-3'
Nox2 (gp91)	5'-GGAGTTCCAAGATGCCTGGA-3'	5'-CCACTAACATCACCACTCATAGC-3'
Rock2 (ROCK)	5'-CGAATAGAACTCCAGATGACC-3'	5'-GCACAGGCAATGACAACC-3'
Tnf (TNF α)	5'-TGTGCTCAGAGCTTCAACAA-3'	5'-CTTGATGGTGGTGCATGAGA-3'

3.4.4 Ensayos de actividad y ELISA:

Los ensayos de actividad que se utilizaron en esta tesis fueron actividad ROCK y actividad NADPH-oxidasa. Los ELISA realizados se usaron para detectar TNF- α y niveles de colesterol. Además, se llevó a cabo un ensayo para analizar la viabilidad neuronal, MTT (para reactivos y materiales ver tabla 8).

3.4.4.1 Actividad ROCK

El ensayo de actividad enzimática de la proteína ROCK fue realizado empleando el kit comercial ROCK Activity assay (CellBiolabs, Inc, San Diego, CA EE.UU). Esta prueba consiste en un inmunoensayo enzimático que permite detectar y cuantificar la fosforilación específica del sustrato MYPT1 por la proteína ROCK.

Las muestras de sustancia negra y estriado se homogenizaron mecánicamente con el politrón en el tampón de lisis específico para actividad ROCK. A continuación, se centrifugaron durante 20 minutos a 14000g y la fracción proteica fue extraída. La cantidad de proteína se cuantifica usando el método BCA (*Pierce BCA protein*, Thermo Scientific). A continuación, en la placa del ensayo se cargaron 5 μ g de

proteína de cada muestra por duplicado y se realizó el ensayo siguiendo los pasos marcados por el fabricante. La actividad quinasa se evaluó midiendo la absorbancia a 450 nm en el lector de placas Infinite M200 (TECAM).

3.4.4.2 Actividad NADPH-Oxidasa

La actividad NADPH-oxidasa mide la quimioluminiscencia emitida por lucigenina (Griendling y col., 2000; Hong y col., 2007) en presencia de la enzima NADPH-oxidasa. La lucigenina (Bis-N-metilacridinio) es un compuesto que al reducirse e interactuar con los aniones superóxido emite luz que es cuantificada para determinar la producción de superóxido.

Las células microgliales (líneas celulares y cultivos primarios) para el ensayo de NADPH-oxidasa se trataron en cultivo con las sustancias correspondiente para cada uno de los experimentos, durante 8 horas. Una vez transcurrido el tiempo de tratamiento, el medio de cultivo se retiró y las células se lavaron con PBS para a continuación ser lisadas mediante un raspado con una solución de Buffer Krebs-Hepes (118mM NaCl, 4,7mM KCl, 2,5mM CaCl₂, 1,18mM MgSO₄, 1,18 KH₂PO₄, 24,9mM NaHCO₃, 11mM glucosa, 0,03mM EDTA y 20mM HEPES) con inhibidores de proteasas (1:200) y PMSF (1:100). Para realizar el ensayo se cargaron 20 µg (determinados a través de BCA) de proteína extraída (por duplicado) con lucigenina (25µM) y la reacción se llevó a cabo durante 5 minutos en oscuridad. A continuación, en presencia de NADPH-oxidasa (100 µM) se midió en unidades relativas de luminiscencia con el lector de microplaca infinite M200 (TECAN).

3.4.4.3 ELISA para TNF- α

El tejido para determinar la expresión de TNF- α fue homogenizado mecánicamente con un politrón, en un tampón de lisis que contenía un cóctel de inhibidores de proteasas. Los homogenados fueron centrifugados a 12000 g durante 20 minutos a 4°C y la concentración de proteína fue determinada por ensayo de BCA. Los niveles de TNF- α fueron cuantificados usando un kit-ELISA específico para rata de acuerdo con las instrucciones del fabricante (rat TNF- α). Las muestras se cargaron por duplicado en la placa y la cantidad de

proteína por pocillo fue 35µg. Los niveles de TNF-α contenidos en la sustancia negra fueron obtenidos en picogramos por mililitro de proteína.

3.4.4.4 Análisis de niveles de colesterol

Las muestras de tejido fueron homogenizadas mecánicamente con la ayuda del politrón, en tampón RIPA con inhibidores de proteasas y PMSF. A continuación, las muestras se centrifugaron a 14000g durante 20 minutos y el pellet resultante se homogenizó en el tampón específico para la cuantificación de colesterol (kit amplex red). Las muestras se cargaron en una placa de fluorescencia por duplicado (10µg de proteína) y se siguieron las instrucciones del fabricante. La fluorescencia se midió a 530-560nm en el TECAM infinite. Los datos se calcularon en µg/ml de colesterol por µg de proteína de cada muestra en función de los valores obtenidos en una recta patrón con un control positivo incluido en el kit. Para representar los valores se normalizaron con respecto al control.

3.4.4.5 Ensayo de viabilidad celular MTT

El ensayo de 3-(4,5-Dimethylthianizol-2)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) fue usado para medir la viabilidad celular, ya que, permite detectar la actividad metabólica celular (Berridge y col., 2005). Este ensayo colorimétrico se utiliza para evaluar la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas en distintas condiciones de tratamiento.

Las neuronas se sembraron en placas multipocillo 24 horas antes de realizar el tratamiento. En este estudio se usaron neuronas control y neuronas tratadas con la neurotoxina dopaminérgica 6-OHDA (0.02% ascorbato salino) como modelo de EP. Además, las neuronas se mantuvieron en cuatro condiciones de tratamiento: DMEM completo (grupo control), MC de células microgliales (BV2 y microglía primaria), MC de células microgliales tratadas con (pro)renina recombinante (BV2 y microglía primaria) y MC de células microgliales tratadas con (pro)renina recombinante y fasudil. En todos los casos el receptor AT1 fue bloqueado tratando las células con losartán. Las células se mantuvieron en condiciones de cultivo tratadas durante 6 horas, a continuación, se añadió la solución de MTT (20 µL/pocillo, 5

mg/mL en PBS) y fue incubado a 37°C durante 4 horas. A continuación, se eliminó el sobrenadante cuidadosamente y se añadió isopropanol ácido (isopropanol con 10% Triton x100). MTT al metabolizarse en el interior de las células se vuelve insoluble, por lo tanto, cristaliza y precipita en el interior de las células. El contacto con el isopropanol ácido permite que se lisen las células y se disuelva el precipitado facilitando la lectura de absorbancia a 570 nm en el espectrofotómetro TECAM. Las absorbancias se expresaron como porcentajes respecto al control.

3.4.5 Análisis estadístico

Todos los datos fueron obtenidos de al menos tres experimentos independientes y se expresaron como la media \pm SEM (Error estándar de la media del inglés *standard Error of the Mean*). Los datos procedentes del análisis de WB o de PCR fueron normalizados a los valores del grupo control (100% o 1, respectivamente) y expresados como la media \pm SEM. Los demás datos se presentaron como puntuaciones (datos de comportamiento) o como valores absolutos (ELISA). Los análisis estadísticos fueron realizados solo en estudios donde el tamaño de muestra o número de animales era igual o superior a cinco. El número mínimo de animales por grupo fue estimado teniendo en cuenta el principio de las tres erres, remplazamiento, refinamiento y reducción (RRR), empleando la herramienta calculadora estadística en la página <https://www.imim.cat/ofertadeserveis/software-public/granmo/> del Instituto Hospital del Mar de investigaciones Médicas (IMIM) del Parque de Investigaciones Biomédicas de Barcelona (PRBB).

Las comparaciones entre 2 grupos se llevaron a cabo usando el test estadístico *t-Student (unpaired)*, mientras que para las comparaciones múltiples se utilizó el análisis ANOVA de una vía seguida del test posthoc Holm-Sidak. La prueba posthoc se realizó solo si F en el ANOVA obtuvo un valor $P < 0,05$ y no hubo variaciones de homogeneidad significativas. Los datos de los experimentos de discinesias fueron analizados por ANOVA de vías o factores (tiempo x tratamiento) de medidas repetidas seguido de la prueba posthoc Holm-Sidak.

En todas las pruebas se analizó la normalidad y la igualdad de varianzas. En aquellos casos en que los datos mostrados no eran homogéneos se utilizó una prueba no paramétrica, Mann-Whitney o Kruskal-Wallis, para confirmar las diferencias estadísticas. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $P < 0,05$. Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el programa SigmaPlot 11.0 de JandelScientific, Systat Software, Inc., CA, EE.UU.

Tabla 8: Reactivos y otros materiales empleados en la tesis

Material	Casa Comercial	Referencia
6-OHDA	Sigma	H4381
Ácido ascórbico	Sigma	A4544
Acrilamida	BioRad	1610158
Albumina de Suero Bovino	Sigma	A-2153
Amplex Red	Invitrogen	A12216
Anfotericina B	Sigma	A2942
Angiotensina II	Sigma	A9525
Antisedan	Ecuphar	C.N570153.0 AV
Avidina-biotina-peroxidasa	Vector	PK6100
Azul de Bromo Fenol	Sigma	B0126
Azul Tripano	Sigma	T-8154
BCA	Thermo Scientifc	23225
B-mercaptoetanol	Sigma	113148
Benserazide	Sigma	B7283
BSA de WB	Thermo Scientifc	23209
$C_{24}H_{39}NaO_4$	Sigma	D6750
$CaCl_2$	Sigma	C-3881
Columnas MS	MACS Milteyi Biotec	130-042-210
3,3'-diaminobezidina	Sigma	D-5637
Dispasa	Sigma	D-4693
DMEM	Corning	15013 CV
DMEM/F12	Sigma	D-8437
DNasa	Sigma	DN25
dNTP	Invitrogen	10297/018
EDTA	Sigma	ED2SS
EGTA	Sigma	E3889
Fasudil (HA1077)	LC Laboratories	F4660
Filtros 100 μ m	Falcon	352360
Filtros 40 μ m	Falcon	352340
Frascos 75cm ² ventilados	Falcon	353136
Gelatina	Fluca	48723
Glucosa	Sigma	G-6152

Glucosalino	Fresenius Kabi	49869
Ham's F12	Gibco	21765-029
HBSS	Gibco	14065049
HEPES	Sigma	H-3375
Hoechst 33342	Sigma	B-2261
Immumount	Thermo Scientifc	9990402
Inhibidores de Proteasas	Sigma	P8340
Isopropanol	Scharlau	AL03101000
KCl	Panreac	141494.1211
Ketamina	Ricter Pharma	CN:580393.7
KH ₂ PO ₄	Merck Millipore	1.04873.1000
Kit quimioluminiscencia	BioRad	170-5044
Kit TNF- α rata	Diaclone	865.000.096
L-DOPA	Sigma	D-1507
L-Glutamina	Sigma	G-7513
Losartán	Fluca	61188
Lucigenina	Sigma	M8070
MCC	InvivoGen	Inh-MCC-950
Medetomidina	Ecuphar	CN:570686.3
Membrana de Nitrocelulosa	BioRad	1620115
Membrana de PVDF	BioRad	1620177
Metanol	Scharlau	Meo3022500
MgCl ₂	Merck Millipore	1.05833.1000
MgSO ₄	Merck Millipore	3013373
MML-V	Thermo Scientifc	28025-013
MTT	Sigma	M-2128
Na ₂ HPO ₄	Scharlau	S003361000
Na ₃ VO ₄	Sigma	S6508
NaCl	Scharlau	S002271000
NADPH	Sigma	N-1630
NaH ₂ PO ₄	Panreac	141677.1211
NaHCO ₃	Sigma	S-5761
Papaína	Sigma	P-4762
Paraformaldehido	Merck Millipore	1.04005.1000
Penicilina/estreptomicina	Gibco	15140-122
Percoll	Sigma	P-1644
Peróxido de hidrogeno	Merck Millipore	107209
Placas de 35mm	Corning	430165
Placas Multipocillo (24)	Corning	3524
PMSF	Sigma	P-7626
Polilisina	Sigma	P-1274
Portaobjetos	Linea Lab	1053057
(Pro)renina recombinante	Abcam	Ab123479
Quimioluminiscencia	BioRad	170-5044
Rapamicina	Sigma	37094
RNesay Microkit	Qiagen	74004

RNesay Minikit	Qiagen	74104
ROCK Activity Assay	Cell Biolabs	STA-416
Rojo Neutro	Sigma	72210
RPMI	Sigma	1640
Sacarosa	Panreac	141621.1214
SDS	Sigma	L5750
Suero fetal Bovino	Gibco	10270-106
Tripsina	Sigma	T3924
Triton	Sigma	X-100
Trizma	Sigma	T-6066
Trizol	Sigma	T-9424







4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 IMPLICACIÓN DE LA VÍA ROCK EN LAS DISCINESIAS INDUCIDAS POR L-DOPA

En esta tesis se estudió, en primer lugar, si la vía ROCK, íntimamente relacionada con procesos neuroinflamatorios, está implicada en el desarrollo de las discinesias inducidas por L-DOPA, la principal complicación del tratamiento habitual para la EP.

4.1.1 Cambios en los componentes de la vía ROCK en el modelo de 6-OHDA

En primer lugar, se analizó la expresión de la vía Rho A- ROCK en el modelo de EP con 6-OHDA (*objetivo 1.1*), tanto en lesiones agudas (1 semana después de la lesión), cuando se están produciendo episodios de muerte neuronal junto con los correspondientes procesos de neuroinflamatorios asociados, como en lesiones crónicas: 4 semanas después de la lesión, período que coincide con el inicio del tratamiento con L-DOPA y 8 semanas después de la lesión, período que coincide con el final del tratamiento con L-DOPA en los experimentos que siguen a continuación. En animales con lesiones agudas observamos un incremento significativo en los niveles de expresión de ARNm y de proteína de Rho A y de ROCK tanto en la sustancia negra como en el estriado, en relación con las ratas control no denervadas (Figura 1A-C). En animales con lesiones crónicas, tanto a las 4 como a las 8 semanas después de la lesión, se observó una disminución significativa tanto en los niveles de expresión de Rho A y ROCK como en la actividad ROCK con respecto a los animales control. En cambio, la actividad ROCK en el estriado de los animales analizados 8 semanas después de la lesión, no se detectó ningún cambio con respecto a los controles (Figura 1D-I).

Por lo tanto, el incremento de los niveles de expresión proteicos y de ARNm para Rho A y ROCK tras la lesión con 6-OHDA sólo se observó en estadios tempranos y posteriormente dichos niveles disminuyeron en las lesiones crónicas.



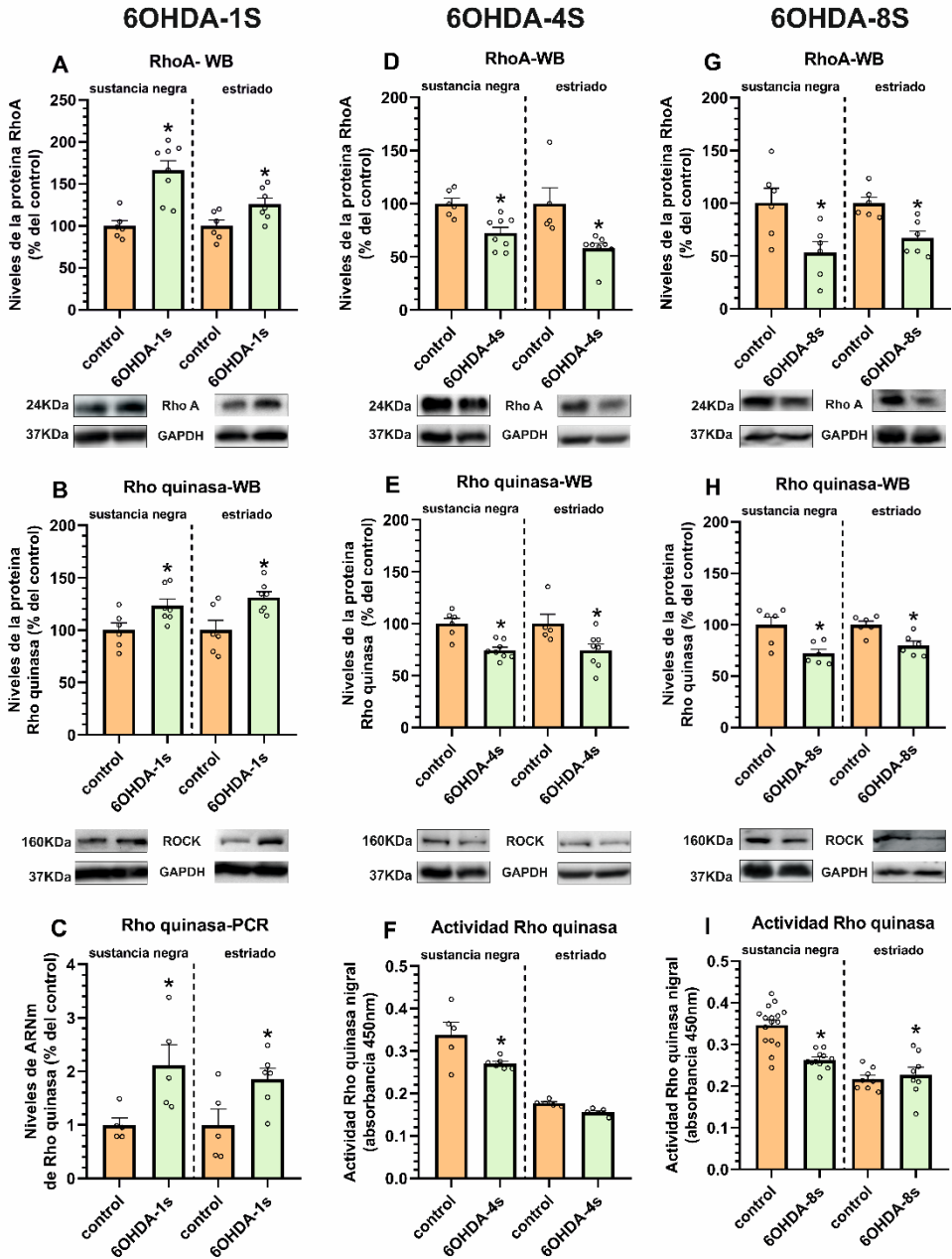


Figura 1. Efecto de las lesiones con 6-OHDA aguda 1 semana (1S) y crónicas 4 semanas y 8 semanas (4S y 8S) en la vía ROCK en el estriado y en la sustancia negra con respecto a los animales no denervados (controles sin 6-OHDA). La denervación en lesiones agudas indujo un importante aumento de la expresión de los niveles de Rho A y ROCK determinados por western blot (WB; A, B) y los niveles de ARNm analizados por RT-PCR (C). En las lesiones crónicas, los niveles de las proteínas Rho A y ROCK se redujeron (D, E, G, H). Los ensayos de actividad ROCK (F, I) confirmaron una disminución de la actividad ROCK en la sustancia negra y en el estriado de las lesiones de 4 semanas (no significativa en las lesiones de 8 semanas). La expresión de las proteínas se calculó en base al valor de la banda de GAPDH y la expresión de cada gen se determinó con respecto al transcrito del gen de β -actina que se usó como control de carga. Los resultados fueron normalizados a los valores de las ratas control no lesionadas. Los datos se representan como la media \pm SEM. * $p < 0.05$ (test t de Student).

En los animales con lesión dopaminérgica generada por la inyección de 6-OHDA, 4 semanas después de la lesión se realizó el test del cilindro y de comportamiento rotacional inducido por anfetamina, para seleccionar lesiones máximas. Todos los animales que fueron seleccionados mediante la prueba rotacional realizaron más de seis giros completos por minuto durante un periodo de 90 minutos, después de haber sido inyectados con 2,5mg/kg de anfetamina; concretamente exhibieron una media de 893 ± 106 giros durante 90 minutos. Además, todos ellos mostraron, mediante la prueba del cilindro, acinesia significativa en la extremidad anterior contralateral a la lesión (Figura 2A).

Finalmente, la pérdida de fibras y neuronas dopaminérgicas inmunopositivas para TH en el lado lesionado se confirmó analizando los niveles de expresión de TH por WB (Figura 2B) y estudiando secciones de tejido por inmunohistoquímica (Figura 2C-D).

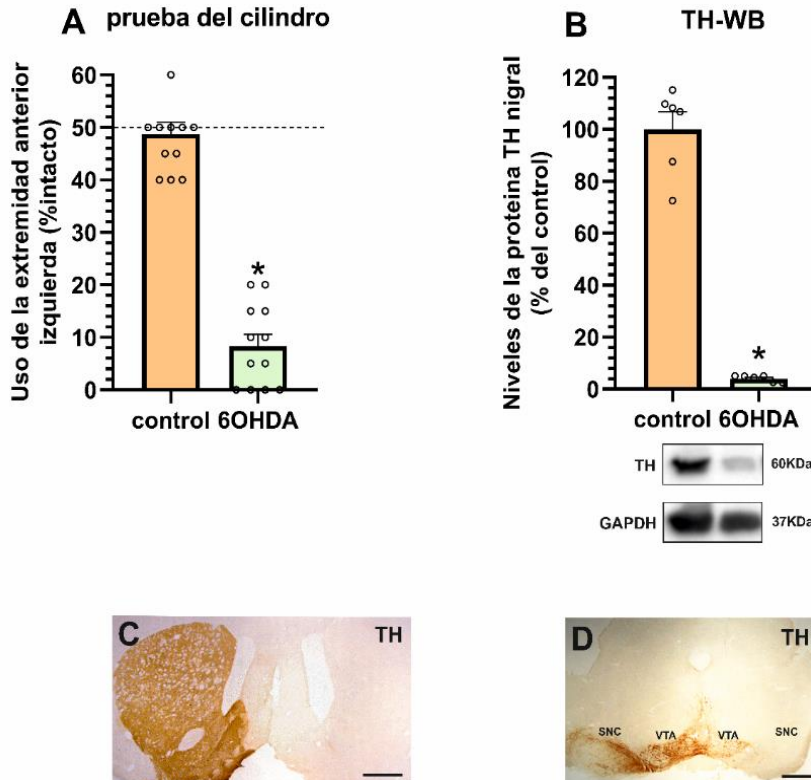


Figura 2. Las ratas con denervación dopaminérgica crónica mostraron una marcada reducción del uso de la extremidad izquierda delantera en relación con los controles no denervados, evaluados a través del test del cilindro (A) y del test de comportamiento rotacional inducido por anfetamina (893 ± 106 vueltas en 90 minutos). La lesión máxima (es decir, la falta de expresión de la tiroxina hidroxilasa; TH) se confirmó al final de los experimentos por análisis de Western Blot (WB; B) o inmunohistoquímica en estriado (C) y en la sustancia negra (D). Los resultados del WB se normalizaron a los valores de las ratas control no lesionadas. Los datos se representan como la media \pm SEM. * $p < 0.05$ (test t de Student). Abreviaturas SNC, sustancia negra compacta; VTA, área tegmental ventral. Barra de escala: 500 μ m.

4.1.2 Cambios en los componentes de la vía ROCK en discinesias inducidas por L-DOPA

Con el objetivo de estudiar si se producen cambios en la vía ROCK en las discinesias inducidas por L-DOPA (*objetivo 1.2*), un grupo de ratas con lesión máxima inducida por 6-OHDA fue inyectado diariamente con L-DOPA hasta que se alcanzaron niveles intensos y estables de AIMs, después del tratamiento crónico durante 3 semanas. Los animales lesionados se dividieron en 2 grupos. A uno de los grupos se le inyectó una dosis de L-DOPA 6mg/kg/día, mientras que en el otro la dosis elegida fue 12mg/kg/día. No obstante, ambas dosis se encuentran dentro del rango terapéutico que se usa en la clínica médica. Durante todo el período de tratamiento los animales fueron testados y monitorizados utilizando el test de AIMs para evaluar su grado de discinesia.

El incremento en la puntuación de AIMs integrado, calculado como la suma de los componentes extremidad, orolingual y axial, alcanzó valores aproximadamente un 25% más altos en los animales inyectados con la dosis de 12mg que en los inyectados con 6mg. El componente locomotor fue también alrededor de un 65% más alto en los animales inyectados con la dosis de 12mg de L-DOPA. Además, el tiempo que el comportamiento discinético perduró en los animales tratados con la dosis de 12mg fue de 3 horas mientras que en las ratas inyectadas con 6 mg/kg/día fue alrededor de 2 horas. Es decir, como cabía esperar, la dosis alta de L-DOPA resulta en un desarrollo de las discinesias más temprano y severo (Figura 3).

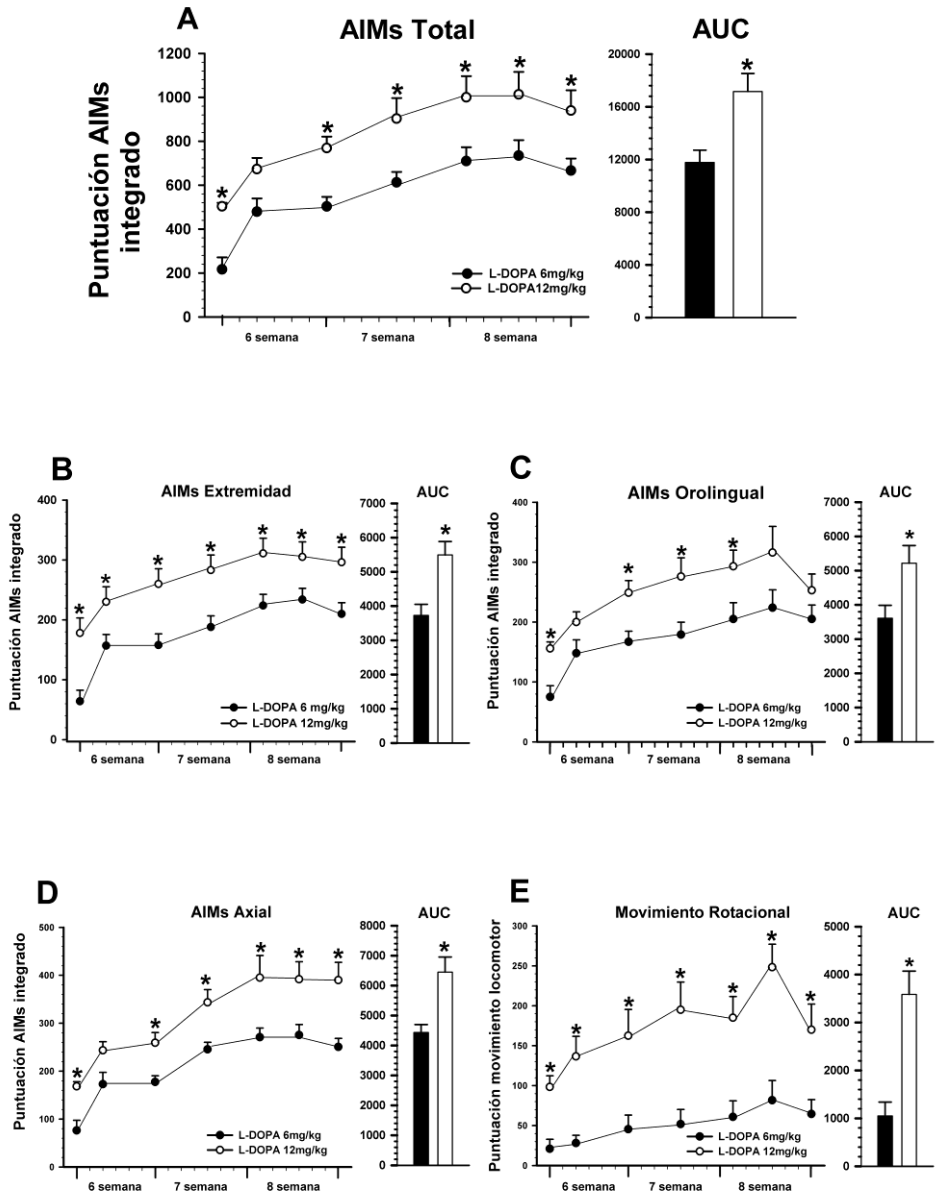


Figura 3. Desarrollo de las discinesias inducidas por el tratamiento crónico con L-DOPA (21 días; 6°, 7°, 8° semana) a dosis alta (12 mg/kg/día, círculos blancos; n=6) y a dosis bajas (6 mg/kg/día, círculos negros; n=11). La puntuación total del AIMS (A) se estimó como la suma del componente extremidad (B), orolingual (C) y axial (D). El movimiento rotacional se registró como componente locomotor (E). Los datos se representan como la media \pm SEM. * $p < 0.05$ (Prueba *t de Student* para cada punto en el tiempo), test *t de Student* (AUC), y ANOVA de dos vías con medidas repetidas y test post-hoc de Holm Sidak. Abreviaturas; AIM, movimientos involuntarios anormales; AUC, área bajo la curva.

A continuación, los animales fueron sacrificados, 90 minutos después de la última inyección de L-DOPA, para evaluar la expresión Rho A y ROCK en la sustancia negra y en el estriado. Los niveles de expresión de las proteínas Rho A y ROCK mostraron un aumento significativo en la sustancia negra de ratas discinéticas con respecto a ratas lesionadas con 6-OHDA inyectadas con vehículo. Sin embargo, en el estriado el aumento significativo de estas proteínas en los animales discinéticos se observó solamente con la dosis alta (12mg/kg/día; Figura 4A-D). En consonancia con los datos descritos anteriormente sobre la expresión de la proteína, la actividad ROCK aumentó significativamente en la sustancia negra de las ratas discinéticas en comparación con las ratas lesionadas tratadas con salino o con las ratas no denervadas sin L-DOPA. Curiosamente, en ratas lesionadas tratadas con L-DOPA que no desarrollaron discinesias, no se produjo aumento significativo de la actividad ROCK en comparación con los controles normales, ratas con inervación dopaminérgica (Figura 4E). Se observó un aumento significativo de la actividad ROCK en el estriado de las ratas discinéticas en relación con los controles de ratas normales no denervadas, incluso usando la dosis de 6mg/kg/día (Figura 4G). La pérdida de TH (Figura 4F) y el comportamiento rotacional (806 ± 80 vueltas en 90 min) en las ratas que no desarrollaron discinesias no fue diferente al que presentaron las ratas discinéticas, demostrando que los animales no discinéticos también exhibían lesiones máximas.

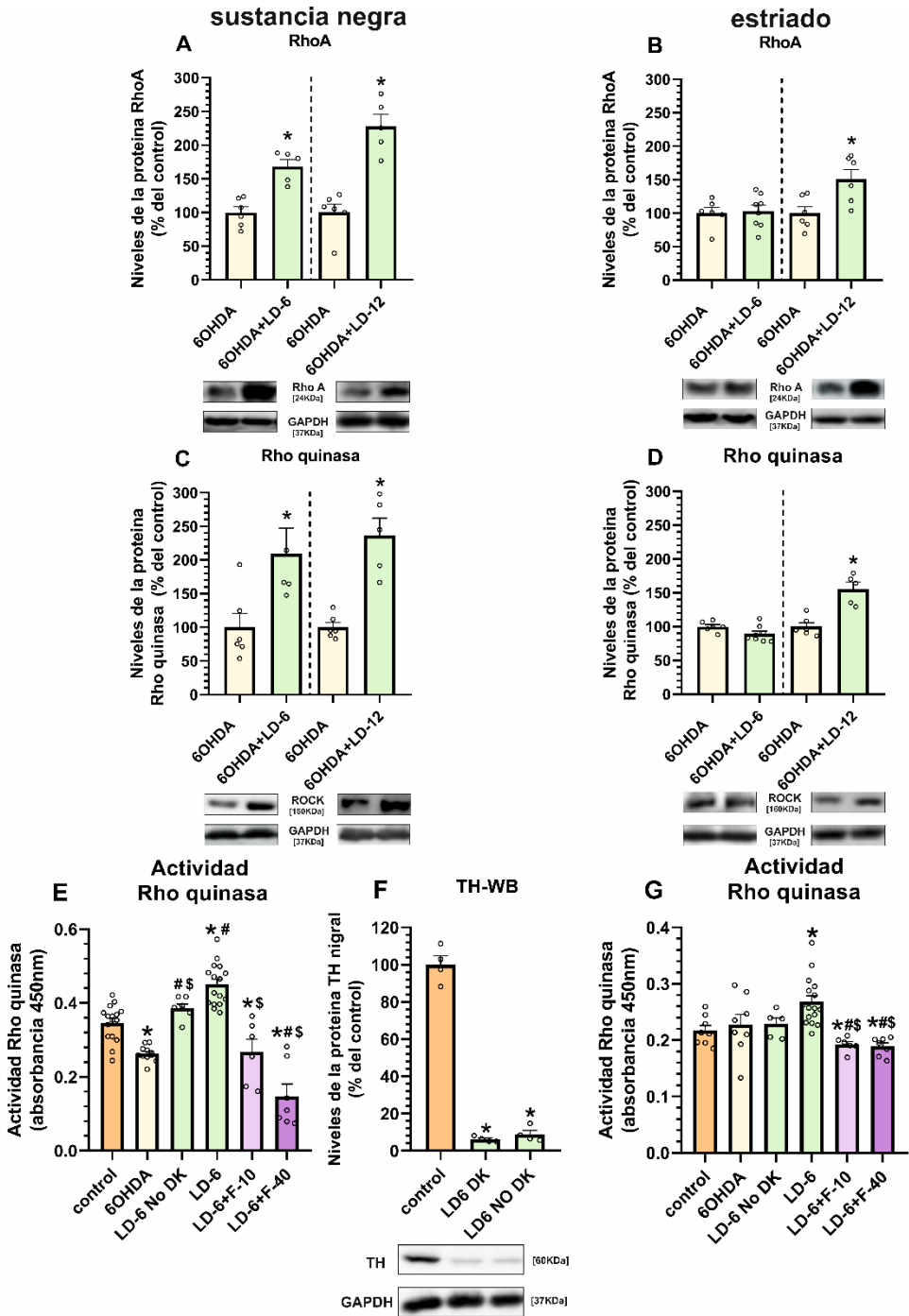
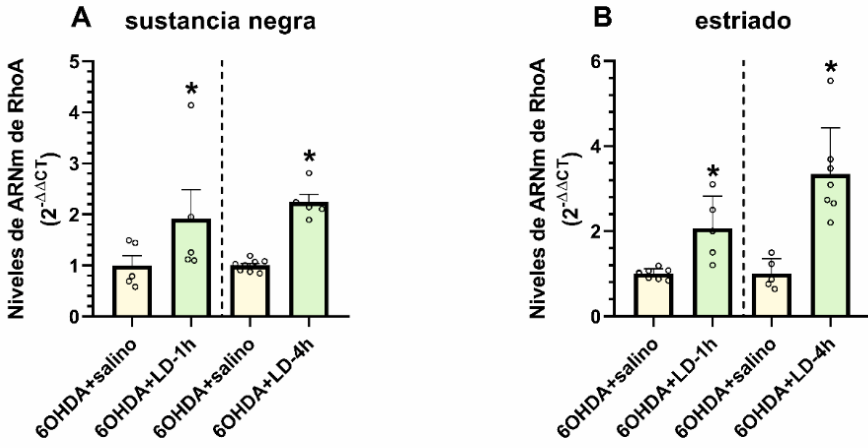


Figura 4. Niveles de las proteínas Rho A (A, B) y ROCK (C, D) en la sustancia de negra y en el estriado de ratas que presentan lesión crónica con 6-OHDA tratadas con salino y ratas discinéticas tratadas con L-DOPA (6mg/kg/día, LD-6; o 12 mg/kg/día, L-DOPA 12). Actividad de ROCK (E-G) en controles no tratados, en ratas lesionadas con 6-OHDA no tratadas y ratas con lesiones de 6-OHDA tratadas con L-DOPA (6mg/kg/día) que desarrollaron o no discinesias (DK). Las ratas discinéticas mostraron un aumento significativo de la actividad ROCK en relación con las ratas lesionadas inyectadas con solución salina y los controles no lesionados. Curiosamente, no hubo un aumento significativo entre los controles no lesionados y las ratas tratadas con L-DOPA que no desarrollaron discinesias. El tratamiento con fasudil (10 o 40 mg/kg/día; F-10, F-40) indujo una marcada disminución de la actividad ROCK tanto en la sustancia negra como en el estriado (E, G). El WB para la tirosina hidroxilasa (TH; F) y comportamiento rotacional mostraron los mismos niveles de denervación dopaminérgica en ratas discinéticas y no discinéticas. En A-D, el resultado se normaliza con respecto a los valores de los animales lesionados con 6-OHDA tratados con solución salina. Los datos se representan como la media \pm SEM. * $p < 0.05$ (*test t de Student*). En E-G, ANOVA de una vía y test post-hoc de Holm Sidak (* $p < 0.05$, diferencias significativas con respecto a los controles; # $p < 0.05$, diferencias significativas en relación con 6-OHDA; § $p < 0.05$, diferencias significativas con respecto a L-DOPA).

En paralelo, para evaluar si es necesario un tratamiento crónico con L-DOPA para inducir un aumento significativo en la expresión de Rho A y ROCK, a un grupo de ratas lesionadas con 6-OHDA se les administró una dosis única de L-DOPA, 12mg/kg. Estos animales fueron sacrificados, 1 y 4 horas después de la administración de L-DOPA. Estas ratas mostraron movimientos discinéticos, aunque menos intensos que los animales que recibieron tratamiento crónico con L-DOPA (Figura 5, primer punto en el tiempo) junto con un marcado incremento de la expresión del ARNm de Rho A y ROCK en la sustancia negra y en el estriado, tanto 1 hora como 4 horas después de la inyección de L-DOPA, en comparación con las ratas a las que se les inyectó el vehículo (Figura 5A-D). La evolución en el tiempo de una sola inyección de L-DOPA (12mg/kg) se muestra en la Figura 5 E-F.

RhoA



Rho quinasa

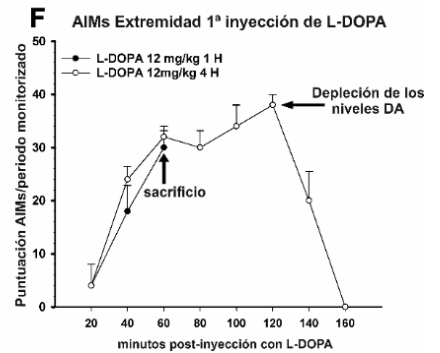
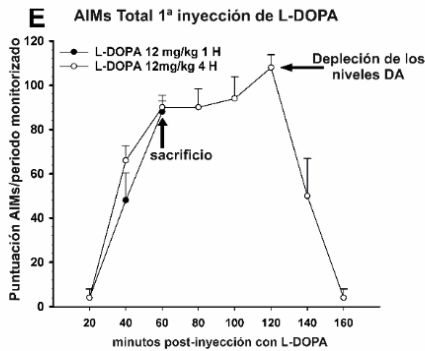
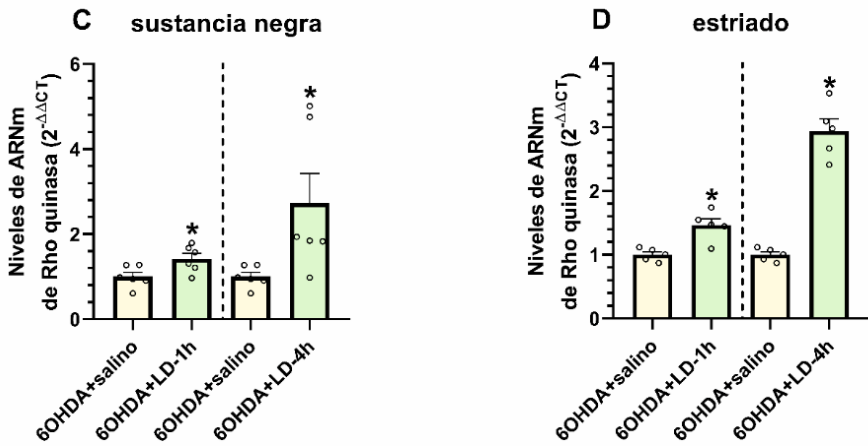


Figura 5. Efecto del tratamiento agudo con L-DOPA en los niveles de expresión de ARNm para Rho A y ROCK. Una única inyección con la dosis alta de L-DOPA (LD; 12 mg/kg) induce discinesias y un significativo incremento en los niveles de ARNm de Rho A (A, B) y ROCK (C, D) en la sustancia negra (A, C) y en el estriado (B, D). En A-D, los resultados se normalizan con respecto a los valores de ratas lesionadas con 6-OHDA y tratadas con salino. Evolución en el tiempo de AIMs total (E) y el componente extremidad (F) en ratas sometidas a una única inyección con L-DOPA sacrificadas tras 1h (n=5) y 4h (n=5) después de la inyección. Los datos se representan como la media \pm SEM. * $p < 0.05$ (*test t de Student*).

4.1.3 Efecto de la inhibición de la vía ROCK sobre las discinesias

Una vez confirmada la implicación de la vía ROCK en el desarrollo de las discinesias inducidas por L-DOPA, se estudió, por un lado, si la inhibición de esta vía podía prevenir o atenuar el desarrollo de las discinesias y, por otro lado, si esta inhibición es capaz de revertir las discinesias ya establecidas (*objetivo 1.3*). Para ello tratamos a los animales con fasudil, como molécula inhibidora de la vía ROCK. Se ha demostrado en estudios previos que este compuesto es capaz de atravesar la BHE y además muestra efectos neuroprotectores sobre la muerte de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra.

4.1.3.1 Efecto de la inhibición de la vía ROCK sobre el desarrollo de las discinesias

Las ratas lesionadas con 6-OHDA fueron co-tratadas con L-DOPA y fasudil (10 mg/kg/día o 40mg/kg/día) para evaluar el efecto de la inhibición de ROCK sobre el desarrollo de las discinesias, ya que, en experimentos anteriores hemos demostrado que los animales discinéticos presentan una marcada sobreactivación de ROCK. Durante las 3 semanas de tratamiento, los movimientos discinéticos se evaluaron de manera periódica a través del test de discinesias, en el grupo de animales cotratados con fasudil y L-DOPA y en el grupo de animales tratados solamente con L-DOPA. Los animales tratados con 10 mg/kg/día de fasudil mostraron una reducción significativa en el desarrollo de las discinesias, en comparación con los animales tratados solamente con L-DOPA, desde el quinto día hasta el final del tratamiento (Figura 6A). Estas diferencias fueron observadas realizando el test estadístico ANOVA de dos vías con medidas repetidas, y también

confirmadas a través del test no paramétrico U- de Mann-Whitney. Se representaron también los datos del área de debajo de la curva (AUC), analizados a través del test *t-Student*. Además, la inhibición que ejerce el fasudil sobre la proteína ROCK redujo significativamente las discinesias en cada uno de sus componentes (Figura 6 C-G): componente extremidad (disminución de alrededor del 20%), componente axial (aproximadamente 30%) y componente orolingual (en torno al 25%).

Por otro lado, los animales tratados con una dosis más alta de fasudil, 40mg/kg/día, mostraron una disminución más acentuada del patrón de movimientos anormales, concretamente en torno al 50% con respecto a los animales tratados solamente con L-DOPA (Figura 6 B). La disminución de las discinesias fue observada en todos los componentes analizados (Figura 6 D, F, H) desde el quinto día de tratamiento hasta el final del período de evaluación.

Finalmente, con el objetivo de confirmar si el fasudil (40mg/kg/día) es capaz también de reducir el comportamiento discinético cuando este es muy severo, similar a lo que ocurre en fases muy avanzadas de la enfermedad en humanos, se incrementó la dosis de L-DOPA a 24mg/kg/día durante la cuarta semana de tratamiento (novena semana postlesión) después de la lesión con 6-OHDA. También en este caso se observó una reducción significativa de las discinesias en los animales cotratados con fasudil, frente a aquellos que solamente fueron inyectados con L-DOPA (Figura 6B). La disminución de las discinesias inducida por 24 mg/kg/día de L-DOPA se observó también en todos los componentes analizados (Figura 6 D, F, H). De nuevo, las diferencias fueron también confirmadas a través del test no paramétrico Mann-Whitney.

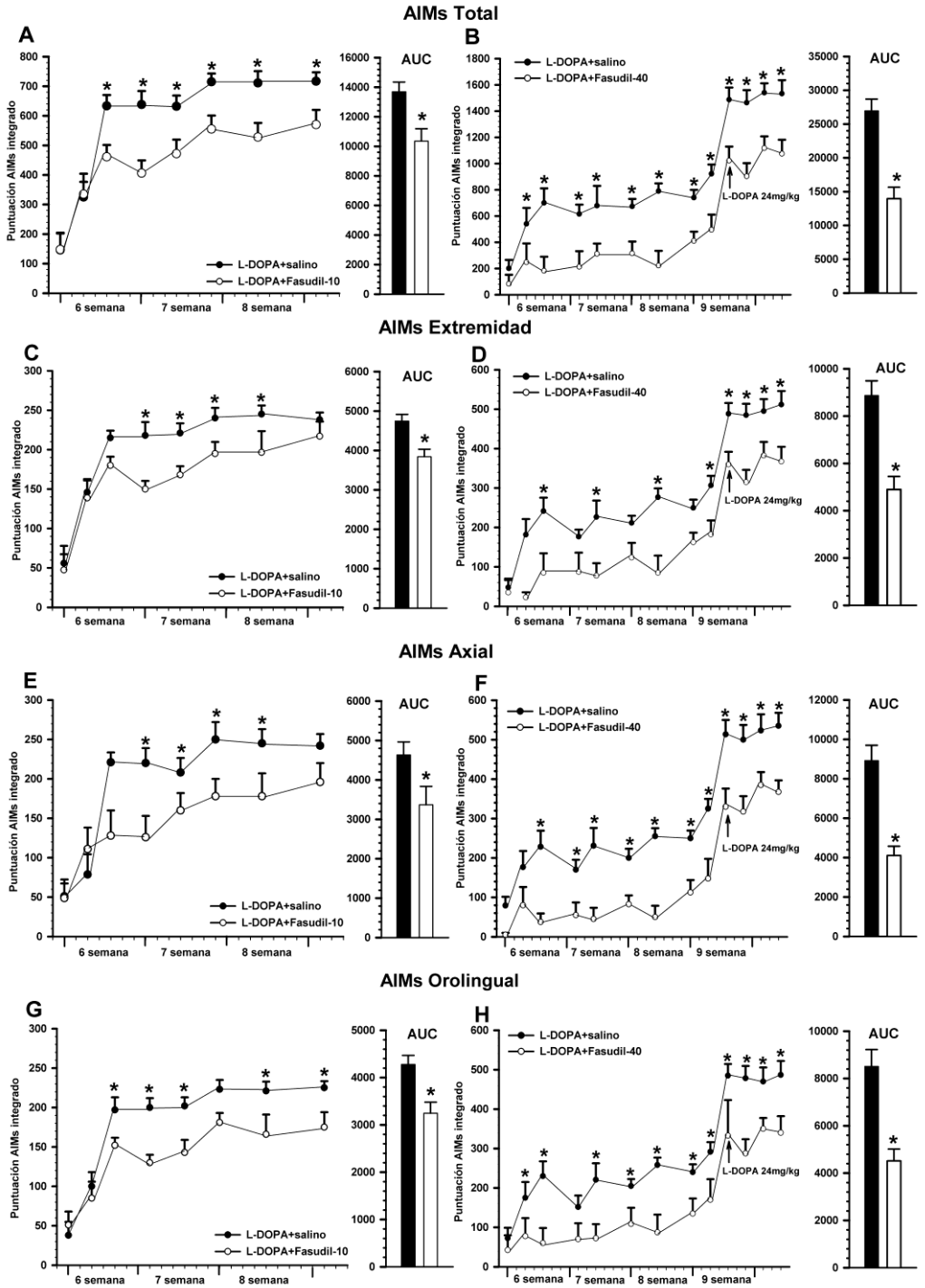


Figura 6. Efecto del fasudil en el desarrollo de las discinesias inducidas por L-DOPA. Las ratas tratadas durante 3 semanas con 10mg/kg fasudil y 6mg/kg L-DOPA (A, C, E, G) o 40mg/kg de fasudil y 6mg/kg L-DOPA (B, D, F, H; círculos blancos) presentan una reducción significativa de la severidad de las discinesias en relación con las ratas tratadas con 6mg/kg L-DOPA y solución salina (círculos negros), puntuaciones totales de AIMS (A, B) y en los diferentes componentes extremidad (C, D), axial (E, F) y orolingual (G, H). En la semana 9 (4ª semana de tratamiento, flecha), la dosis de L-DOPA se incrementó a 24 mg/kg para aumentar el grado de discinesia, que se redujo significativamente por fasudil a 40 mg/kg (B, D, F, H). Las áreas bajo la curva (AUC) también se muestran en A-H. Los datos se representan como la media \pm SEM. * $p < 0.05$. Test t de Student para AUC y ANOVA de dos vías con medidas repetidas y test post-hoc de Holm Sidak. Abreviaturas AIM, movimientos involuntarios anormales; AUC área bajo la curva.

4.1.3.2 Efecto de la inhibición de la vía ROCK sobre las discinesias ya establecidas

Con el objetivo de investigar si la inhibición de ROCK podría reducir también las discinesias una vez que están ya establecidas, un grupo adicional de ratas lesionadas con 6-OHDA fueron tratadas diariamente con L-DOPA durante 3 semanas hasta que las discinesias inducidas por L-DOPA se establecieron de forma intensa. A continuación, los animales se cotrataron con L-DOPA y fasudil 10 o 40 mg/kg/día. Empleando la dosis baja de fasudil (10 mg/kg/día), los animales no mostraron una reducción significativa de los patrones de AIMS, ni después de prolongar el tratamiento con fasudil durante una semana más ni tampoco aumentando la dosis de L-DOPA hasta 24mg/kg/día (Figura 7 A, B).

Paralelamente, un segundo grupo de animales discinéticos fue tratado con la dosis alta de fasudil (40mg/kg/día). Tras la administración de esta dosis, en los animales se produjo una reducción significativa de las discinesias, concretamente en torno al del 40% (Figura 7C, D), desde el tercer día del tratamiento con fasudil. Esta reducción fue también observada en los diferentes componentes analizados individualmente (Figura 7E-H). Curiosamente, es interesante destacar que incluso después de incrementar la dosis de L-DOPA a 24 mg/kg/día, para que la discinesia se tornase más severa, (en la décima semana después de la inyección de 6-OHDA) se produjo una reducción de la discinesia incluso mayor, y dicha reducción se mantuvo hasta el final del período de tratamiento; concretamente en la última

inyección de L-DOPA la reducción fue en torno al 45% (Figura 7 D). Las diferencias fueron también confirmadas a través de la prueba no paramétrico Mann-Whitney U-test.



Resultados

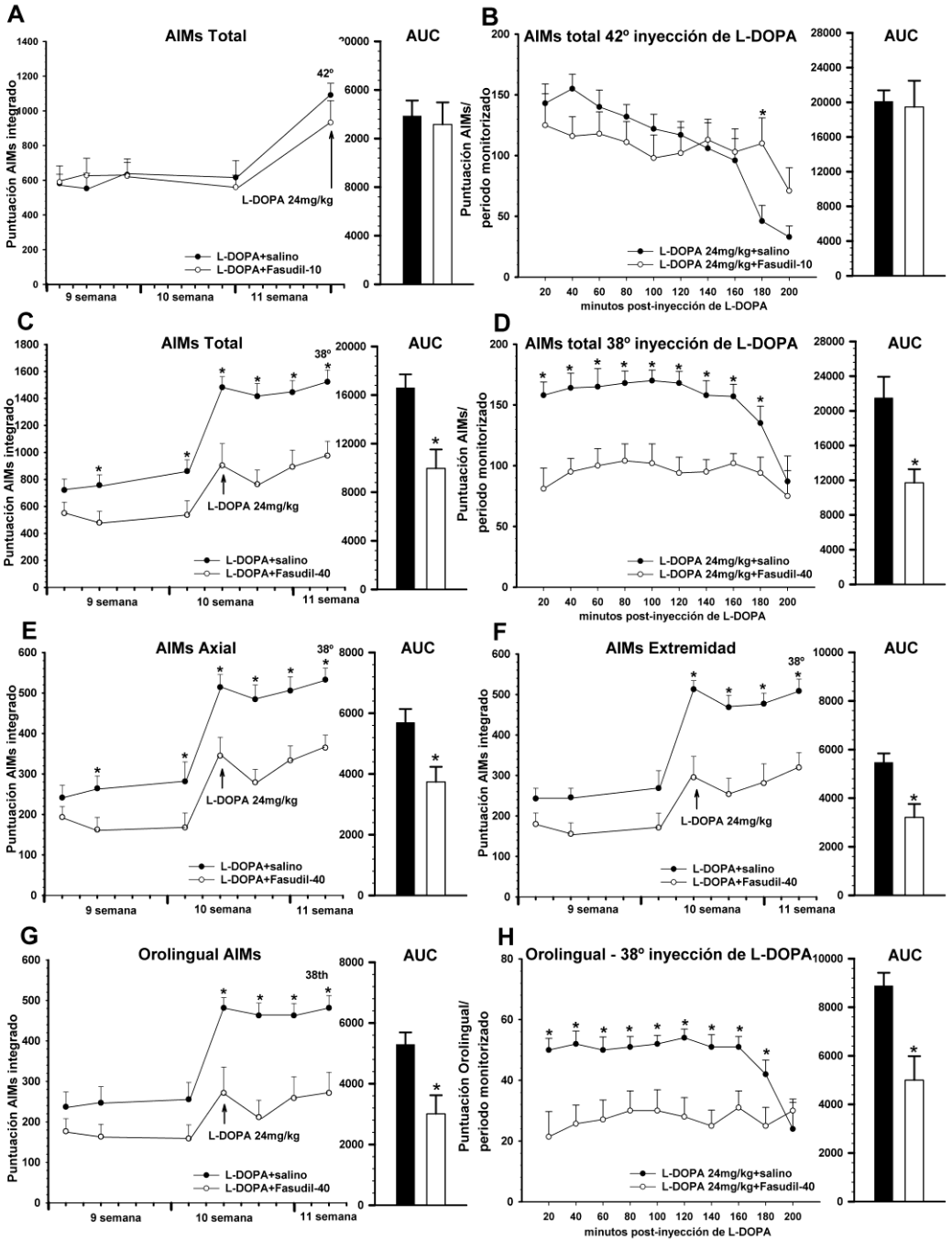


Figura 7. Efecto del fasudil en ratas con discinesia previamente establecida, en donde se muestra el AIMS integrado (A, C, E, F, G) y el curso temporal de una última inyección (B, D, H). Las ratas (n=34) fueron tratadas solamente con L-DOPA (6 mg/kg) durante 3 semanas; i.p hasta que las discinesias estuvieron completamente establecidas. A continuación, las ratas recibieron L-DOPA (6 mg/kg) y solución salina o L-DOPA y fasudil (10 o 40 mg/kg; círculos blancos). El tratamiento con 10 mg/kg de fasudil (n=9) no produjo ningún efecto significativo en el comportamiento discinético en relación con las ratas tratadas con L-DOPA y salino (n=9), incluso cuando el tratamiento se prolongó hasta la 42^a inyección o la dosis de L-DOPA se aumentó a 24 mg/kg (flecha; A). El curso de tiempo (200 minutos) de AIMS en la última inyección (42^a inyección; 24 mg/kg) se muestra en la figura B. Sin embargo, el tratamiento con 40 mg/kg/día de fasudil (n=8), indujo una reducción significativa en las discinesias, incluyendo la producida por la dosis alta (24mg/kg; flecha) de L-DOPA (C-H), en la puntuación del AIMS total (C, D) y en los diferentes componentes analizados: axial (E), extremidad (F) y orolingual (G, H). También se muestra el curso temporal del AIMS (D) y del componente orolingual (H) de la última inyección de L-DOPA de este experimento (38^a inyección; 24 mg/kg). Los datos se representan como la media \pm SEM. * $p < 0.05$. Test t de Student para AUC y ANOVA de dos vías con medidas repetidas y test post-hoc de Holm Sidak. Abreviaturas AIMS, movimientos involuntarios anormales; AUC área bajo la curva; LID, discinesias inducidas por L-DOPA.

4.1.3.3 Efecto de la inhibición de la vía ROCK sobre el efecto terapéutico de la L-DOPA

Mientras se llevó a cabo la evaluación de la inhibición de ROCK sobre el desarrollo y la severidad de las discinesias, también se comprobó que el tratamiento con fasudil no interfiriera en el efecto terapéutico que la L-DOPA proporciona sobre la sintomatología motora en los modelos animales de EP. Para ello se evaluó a los animales usando dos pruebas de comportamiento, el test del cilindro y el test del *stepping*. Ambas pruebas se realizaron 90 minutos después de la administración de L-DOPA, y en ellas se observó una marcada mejoría en el uso de la extremidad anterior izquierda, al comparar estos datos con las puntuaciones basales (la misma prueba realizada antes de que los animales recibieran el tratamiento con L-DOPA; prueba basal). También se comprobó que dicha mejoría no se produce en las ratas lesionadas con 6-OHDA e inyectadas con solución salina. Por lo tanto, se observó que entre los animales tratados solo con L-DOPA y los animales cotratados con L-DOPA y fasudil (10 o 40mg/kg/día) no se detectaron diferencias significativas en el patrón de recuperación motora, indicando que el efecto terapéutico de la L-DOPA se preservó

tanto en relación con la prueba basal como con ratas lesionadas con 6-OHDA e inyectadas con solución salina, demostrando que el fasudil no interfiere en el efecto terapéutico de la L-DOPA (Figura 8 A, B).

Además, se evaluó también el movimiento rotacional/locomotor contralateral mediante la prueba del rotómetro, para analizar si la disminución observada en las discinesias inducidas por L-DOPA era consecuencia de una reducción en la actividad motora generada por el fasudil. Tampoco en este caso se observaron diferencias entre los animales tratados solamente con L-DOPA y aquellos que fueron cotratados con fasudil y L-DOPA, demostrando que fasudil no altera la activación motora que ejerce la administración de L-DOPA en los animales (Figura 8 C).

Es importante destacar que los test del cilindro, *stepping* y rotómetro fueron realizados después de la segunda, cuarta y sexta inyección de L-DOPA respectivamente, para prevenir así una posible interferencia del comportamiento discinético, el cual empezó a ser significativo a partir de la quinta inyección de L-DOPA, como se demostró en los resultados obtenidos a través del test de discinesias (test de AIMS).

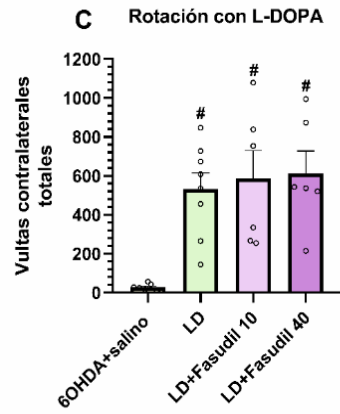
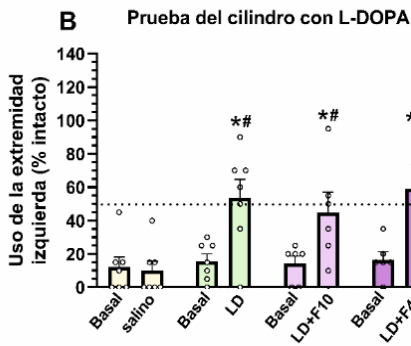
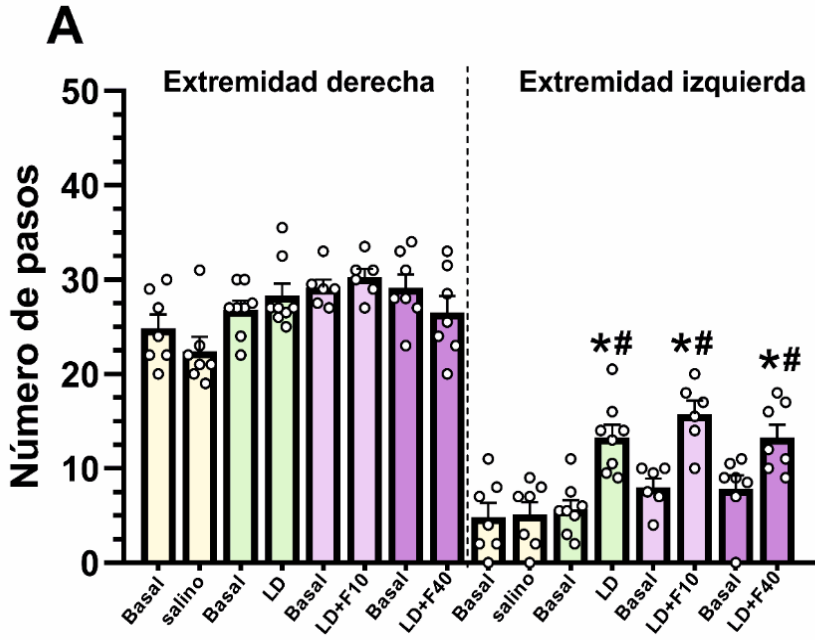


Figura 8. Efecto del fasudil (10mg/kg/día y 40 mg/kg/día; F10, F40) sobre el efecto terapéutico de la L-DOPA (LD; 6 mg/kg/día), que se evaluó mediante el test del *stepping* (A), el test del cilindro (B) y el comportamiento rotacional (C). Se analizó el comportamiento motor de las ratas lesionadas con 6-OHDA antes de la inyección de L-DOPA (basal), de las ratas inyectadas con salino en lugar de L-DOPA, de las ratas inyectadas sólo con L-DOPA o las inyectadas con L-DOPA y fasudil. La administración de fasudil no redujo la capacidad de L-DOPA de mejorar la acinesia de las extremidades delanteras (A, B), o para inducir rotación contralateral (C). Los datos se representan como la media \pm SEM. (* $p < 0.05$, diferencias significativas en relación con los niveles basales, sin L-DOPA, test *t-Student*; # $p < 0.05$, diferencias significativas en relación con las ratas con 6-OHDA inyectadas con solución salina).

4.1.4 Efecto de la inhibición de la vía ROCK sobre la inflamación y la angiogénesis

Finalmente, en el análisis *postmortem* de la sustancia negra y el estriado de estos grupos de animales se analizaron diferentes marcadores de angiogénesis y neuroinflamación, con el objetivo de comprobar si la reducción de las discinesias producida por el fasudil es inducida a través de estos mecanismos. En primer lugar, se confirma que efectivamente el tratamiento de ratas discinéticas con fasudil (10 o 40mg/kg/día) induce una disminución significativa en la actividad ROCK, tanto en la sustancia negra como en el estriado, observado tras el análisis de la actividad enzimática de ROCK (Figura 4E, G).

En segundo lugar, se comprobó también en estos experimentos, que en las ratas inyectadas con L-DOPA (discinéticas) se produjo un aumento significativo de marcadores relacionados con la angiogénesis como el VEGF (alrededor del 50%) con respecto a los controles (con inervación dopaminérgica) y en comparación con las ratas lesionadas con 6-OHDA y tratadas con vehículo. Además, se observó también un aumento significativo en la expresión de marcadores relacionados con inflamación tales como la IL-1 β y el TNF- α en relación con los controles con lesión simulada y con las ratas lesionadas con 6-OHDA y tratadas con vehículo (Figura 9). Es importante destacar que el tratamiento con fasudil disminuyó significativamente el efecto de L-DOPA sobre la angiogénesis, observándose una reducción en la expresión de los niveles de VEGF tanto con la dosis baja (10mg/kg/día; Figura 9A), como con la dosis alta (40mg/kg/día; Figura 9B) y una reducción de las citoquinas inflamatorias, TNF- α (Figura 9C) y IL-1 β

(Figura 9D) sugiriendo que el fasudil reduce las discinesias a través de la reducción de la angiogénesis y la neuroinflamación.

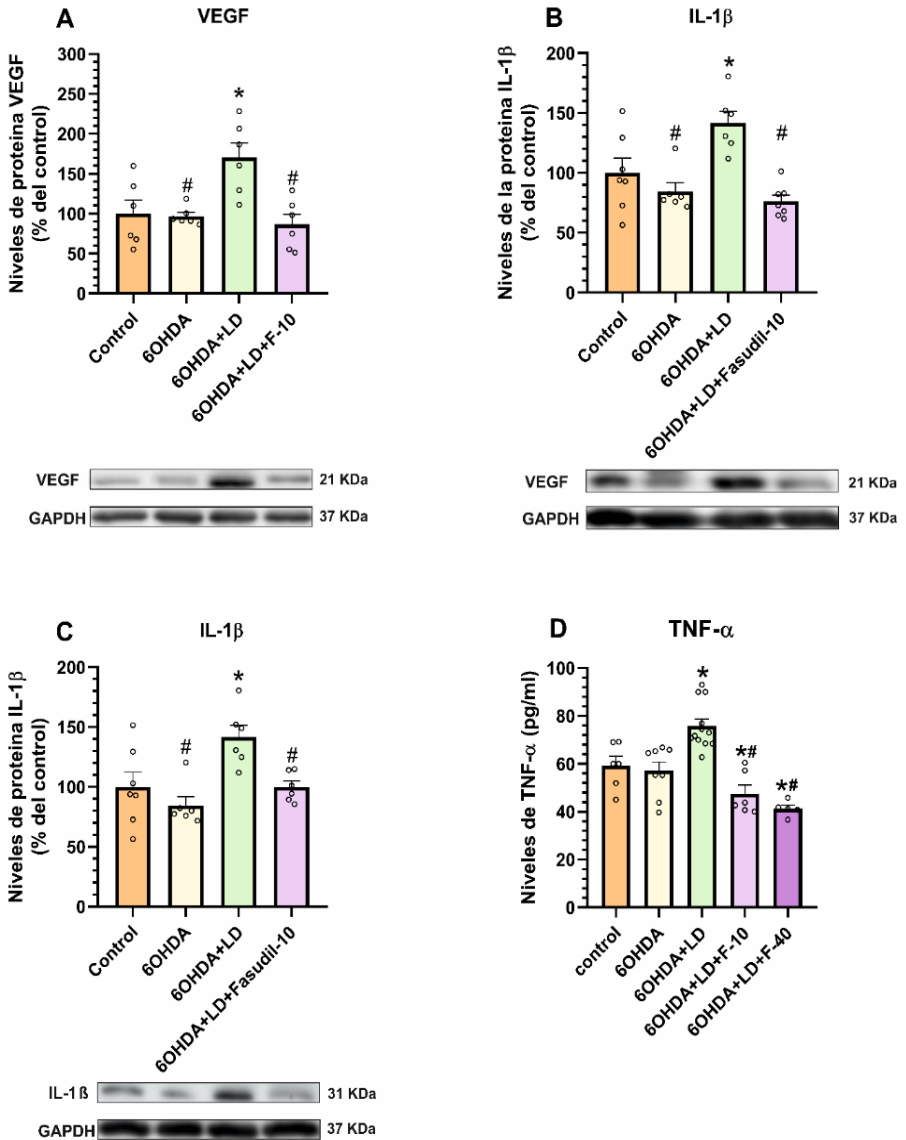


Figura 9. Efecto del fasudil (10 o 40 mg/kg/día; F-10, F-40) en marcadores relacionados con la angiogénesis y la neuroinflamación en la sustancia negra, comparando controles no lesionados con ratas lesionadas con 6-OHDA no tratadas. Los niveles de VEGF (A, B) y los marcadores proinflamatorios IL-1 β (C) y TNF- α (D) aumentaron en ratas tratadas con L-DOPA, y disminuyeron de manera significativa en ratas tratadas con L-DOPA (6 mg/kg/día) y fasudil, según lo determinado por los análisis de WB (A-C) y ELISA (D). Los resultados fueron normalizados con respecto a los valores de los controles no lesionados. Los datos se representan como la media \pm SEM. * $p < 0.05$ diferencias significativa en relación con los controles; # $p < 0.05$, diferencias significativas con respecto a los animales tratados con L-DOPA (ANOVA de una vía y test post-hoc de Holm-Sidak). Abreviaturas IL-1 β , interleucina-1 β ; TNF- α , factor de necrosis tumoral- α ; VEGF, factor de crecimiento endotelial vascular.

4.2 PAPEL DEL PRR COMO MECANISMO DE DISCINESIAS INDUCIDAS POR L-DOPA E INTERACCIÓN CON LA VÍA ROCK EN PROCESOS NEUROINFLAMATORIOS

En segundo lugar, se estudió si PRR podía estar implicado en las discinesias inducidas por L-DOPA, como activador de la neuroinflamación. De esta manera, se estudió la expresión de PRR en el modelo de discinesias y en ratones deficientes para los receptores de AII (KOAT1 y KOAT2). Además, se analizó si la activación de PRR de las células microgliales tenía alguna implicación en la neuroinflamación a través de la vía Rho A- ROCK. Para llevar a cabo el estudio junto con los modelos *in vivo* de animales con EP, se emplearon modelos *in vitro*, tales como la línea tumoral microglial BV2 y cultivos primarios de microglía de rata. Para activar el receptor en las células microgliales se utilizó su ligando específico la proteína (pro)renina recombinante. En todos los casos antes de tratar las células con la (pro)renina recombinante se inhibió el receptor AT1 del SRA con losartan, para poder afirmar que los efectos resultantes del tratamiento con (pro)renina recombinante estaban provocados por la activación de PRR y no eran resultado del papel que ejerce la AII sobre su principal efector el receptor AT1.

4.2.1 Expresión de PRR en el modelo de 6-OHDA, modelo de discinesias y en ratones KO para el SRA

Para estudiar la implicación de PRR en las discinesias inducidas por L-DOPA, y como varía la expresión del receptor en la sustancia negra en relación con los niveles de neuroinflamación (*objetivo 2.1*) se han utilizado varios modelos animales.

En primer lugar, se analizaron los niveles de expresión de PRR en modelos de EP y de discinesias, ya que, en estudios previos de nuestro grupo de investigación se ha descrito que estos modelos, principalmente en fases agudas o tempranas, muestran una marcada activación microglía y un incremento en los niveles de neuroinflamación. Además, se ha observado que este aumento de la neuroinflamación se bloquea con antagonistas de los receptores AT1. Asimismo, en esta tesis se demuestra el aumento de la vía neuroinflamatoria ROCK en las discinesias. Por lo tanto, nos planteamos si en los animales discinéticos aumentan otros componentes neuroinflamatorios relacionados con el SRA. En fases tempranas del modelo de 6-OHDA, (una semana después de la lesión), se observó un incremento en los niveles de expresión PRR con respecto a los animales control, tanto en el análisis de ARNm como de proteína en la sustancia negra (Figura 10 A, B). No obstante, en la lesión crónica (4 semanas después de la inyección de 6-OHDA) los niveles de expresión de PRR disminuyen en la sustancia negra de los animales lesionados, obteniéndose valores similares a los de los animales control no denervados (Figura 10 A, B). Estos resultados, demuestran que también en modelos de EP cuando los procesos inflamatorios se encuentran exacerbados, PRR muestra un incremento significativo.

A continuación, se analizaron los niveles de expresión del receptor en animales lesionados discinéticos. Los niveles de expresión de PRR aparecen incrementados de forma significativa en animales discinéticos, tras 4 horas de haber recibido una única inyección de L-DOPA a una dosis de 12mg/kg con respecto a animales control con lesión simulada y animales lesionados con 6-OHDA y tratados con vehículo (Figura 10 C). Además, también presentan niveles elevados de

PRR los animales lesionados con 6-OHDA discinéticos que han recibido tratamiento crónico con L-DOPA durante 3 semanas, con respecto a animales lesionados con 6-OHDA y tratados con vehículo (Figura 10 D).

En segundo lugar, se analizaron los niveles de PRR en animales deficientes para los receptores AT1 y AT2 del SRA, dada la relación de este sistema con los procesos neuroinflamatorios. En los ratones KOAT1, los cuales se caracterizar por presentar niveles de neuroinflamación disminuidos, se encontró una disminución significativa en la expresión de PRR tanto a nivel de ARNm (Figura 10 E) como de proteína (Figura 10 F), en la sustancia negra. Por el contrario, en los animales KOAT2, los cuales presentan niveles de inflamación incrementados, se observó un aumento significativo en los niveles de expresión de ARNm de PRR (Figura 10 E). Sin embargo, en los niveles de proteína no se observaron cambios en la expresión en la sustancia negra (Figura 10 F).

Finalmente, con el objetivo de comprobar si el incremento de la expresión de PRR en los animales KOAT2 está directamente relacionado con el aumento de la neuroinflamación que está presente en estos animales, se analizaron los niveles de expresión de PRR en células microgliales adultas aisladas y en neuronas de la sustancia negra extraídas por microdissección por captura láser de animales KOAT2 y WT. Se observó un incremento significativo en los niveles de expresión de PRR en la microglía procedente de animales KOAT2 con respecto a los animales control de la cepa salvaje. Sin embargo, en las neuronas de la sustancia negra no se observaron cambios en los niveles del receptor entre los ratones de la cepa salvaje y los ratones KOAT2 (Figura 10 G).

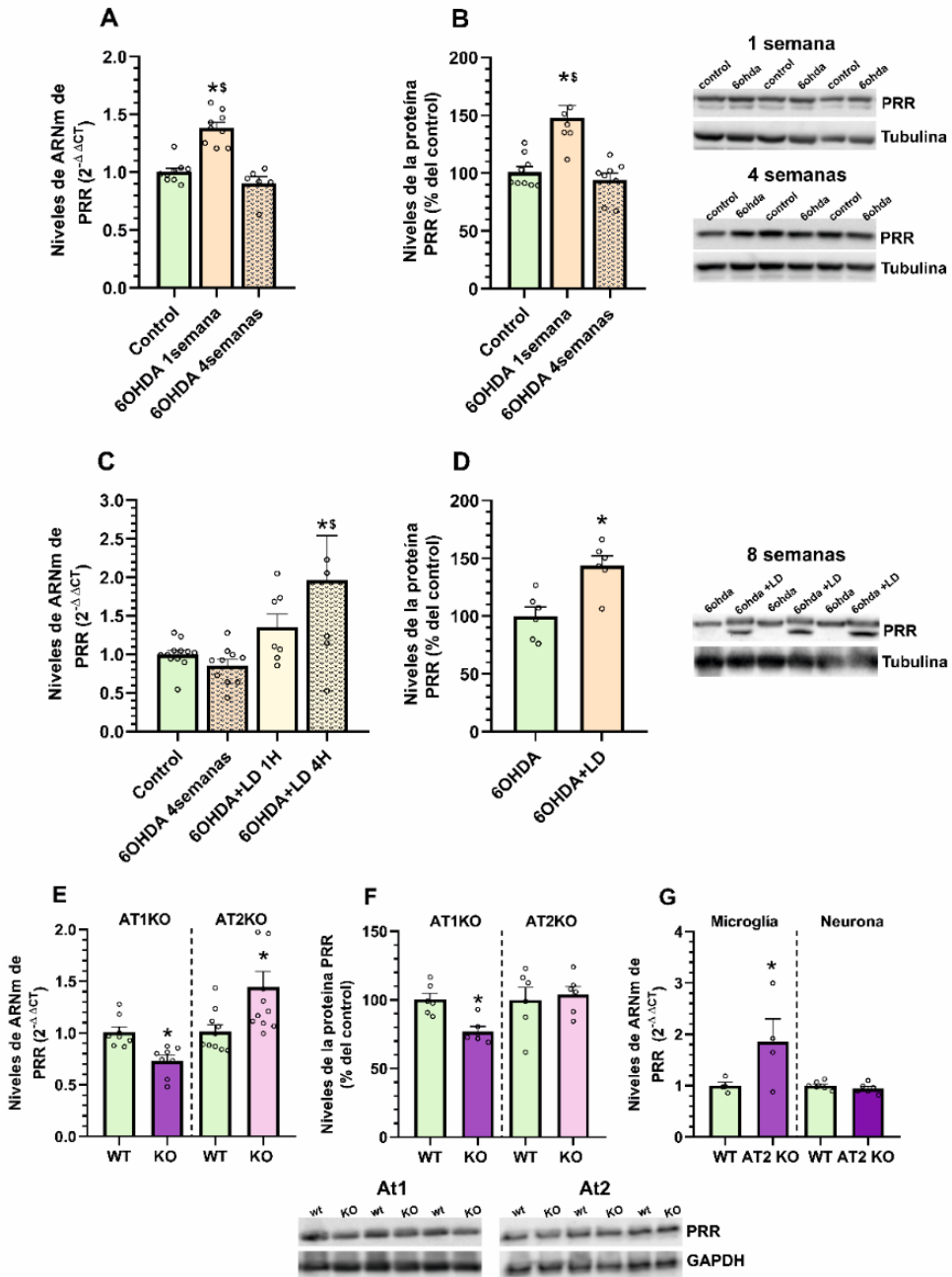


Figura 10. Niveles de expresión de ARNm y proteína PRR en la sustancia negra. Ratas con lesiones agudas con 6-OHDA (1 semana) y crónicas (4semanas) ARNm (A) y proteína (B), niveles de ARNm en ratas discinéticas con una única inyección de L-DOPA (12mg/kg) sacrificados tras 1 y 4 horas (C). Niveles de proteína en ratas discinéticas que han recibido una inyección crónica con L-DOPA (6mg/kg/día) durante 3 semanas (D). Ratones KOAT1 y KOAT2 ARNm (E) y proteína (F). ARNm en microglía adulta de ratones KOAT2 y en neuronas de la sustancia negra de ratón KOAT2 (G). La expresión de las proteínas se calculó en base al valor de la banda de GAPDH o tubulina y la expresión de cada gen se determinó con respecto al transcrito del gen de β -actina que se usó como control de carga. Los resultados fueron normalizados a los valores de las ratas control no lesionadas o de los ratones de la cepa salvaje (WT). Los datos se representan como la media \pm SEM. * $p < 0.05$ (Test *t* de Student o ANOVA de una vía, post-hoc de Holm Sidak).

4.2.2 Efecto de la activación del PRR sobre el estrés oxidativo y la vía ROCK

Una vez demostrada la activación de PRR en estados neuroinflamatorios analizamos en paralelo la línea celular microglial BV2 y los cultivos primarios de microglía de rata, para estudiar si la activación de PRR induce estrés oxidativo y activación de la vía ROCK (*objetivo 2.2*) en el principal tipo celular responsable de la neuroinflamación.

En primer lugar, se comprobó la presencia de PRR en las células microgliales, en la línea celular BV2 y en microglía primaria de rata, a través de inmunofluorescencia y microscopia confocal. En ambos tipos de cultivos observó la expresión de PRR en las células microgliales que eran inmunopositivas para el marcador de microglía OX-42.

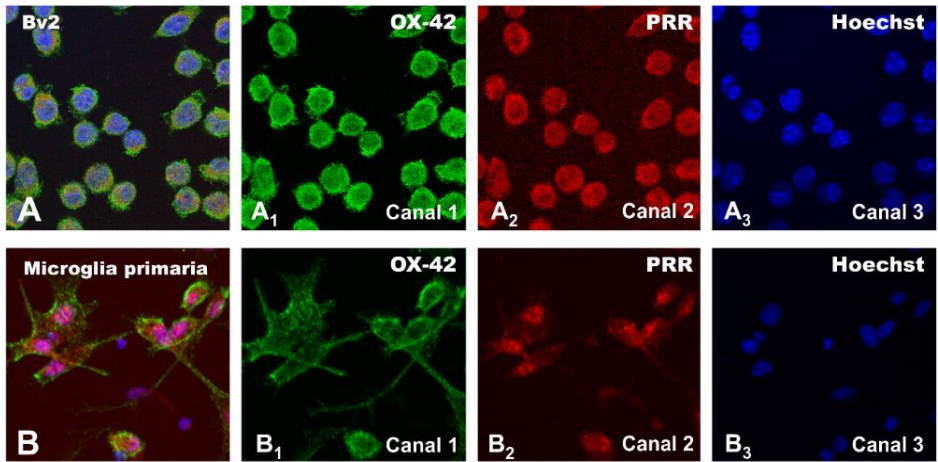


Figura 11. Presencia de PRR en la Microglía. Marcaje inmunofluorescente doble de la línea microglial BV2 (A) y de cultivo primario de microglía de rata (B). OX42 (verde A₁, B₁); PRR (rojo; A₂, B₂) HOECHST, marcaje de los núcleos (azul A₃, B₃).

El tratamiento de las células microgliales con el ligando específico del receptor, la proteína (pro)renina recombinante (5nM), mostró que la activación de PRR provoca un incremento significativo en la actividad enzimática NADPH-oxidasa con respecto a los cultivos control no tratados (Figura 12 A, B). Además, el aumento de la actividad fue acompañado de un significativo incremento de la expresión del ARNm para la subunidad gp91^{phox} (también denominada NOX2), uno de los componentes de membrana del complejo NADPH-oxidasa. (Figura 11 C).

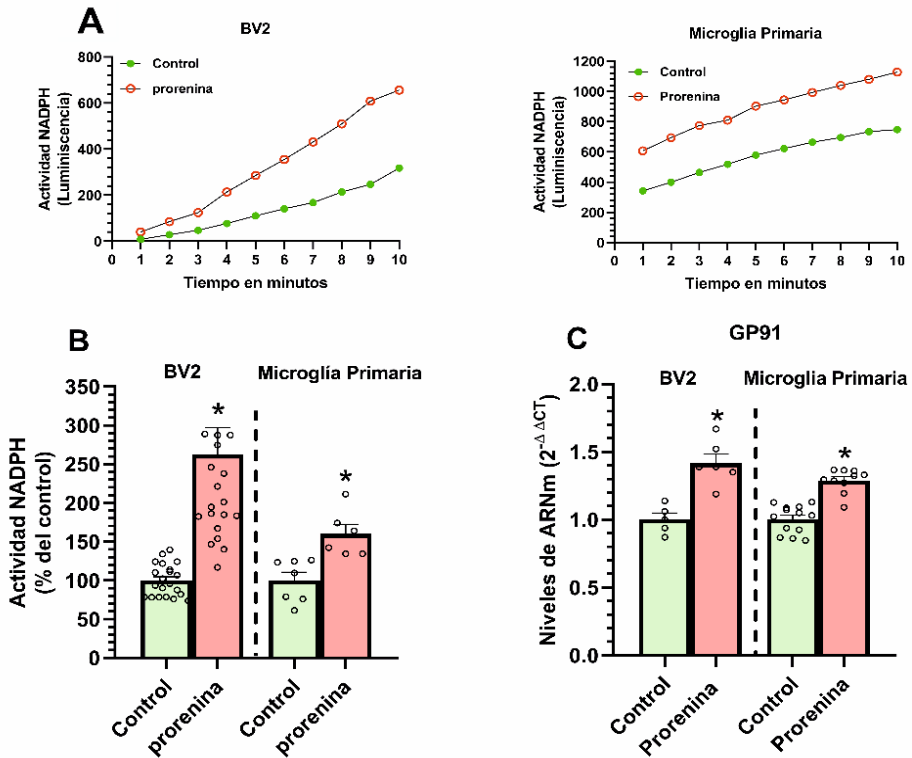


Figura 12. Actividad NADPH-oxidasa y niveles de expresión de la subunidad de membrana del complejo, gp91 en BV2 y microglía primaria de rata. Cinética de la luminiscencia en minutos realizada en células control y células tratadas con (pro)renina recombinante (5nM) y losartan (100nM) (A). Actividad NADPH-oxidasa acumulada a los 10 minutos en células control y tratadas con (pro)renina recombinante (5nM) y losartan (100nM) (B). Niveles de expresión de gp91 en células control y tratadas con (pro)renina recombinante (5nM) y losartan (100nM) (C). La expresión de cada gen se determinó con respecto al transcrito del gen de β -actina que se usó como control de carga. Los resultados fueron normalizados a los valores de las células control sin tratadas. Los datos se representan como la media \pm SEM. * $p < 0.05$ (Test *t* de Student).

Además, la activación de PRR con su ligando específico produjo un incremento en la expresión del ARNm (alrededor del 100% en BV2 y 40% en microglía primaria; Figura 13A) y de la proteína ROCK (alrededor del 150% en BV2 y 50% en microglía primaria; Figura 13 B-C) en las células microgliales, en comparación con las células control no tratadas, en los 2 modelos de cultivos celulares estudiados.

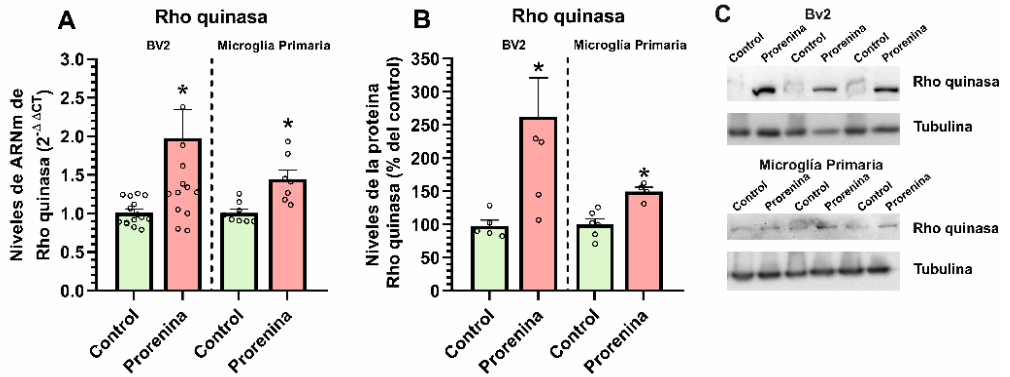


Figura 13. Análisis de los niveles de expresión del ARN y la proteína ROCK en BV2 y en microglía primaria para células control y tratadas con (pro)renina recombinante (5nM) y losartan (100nM). Niveles de ARNm (A). Niveles de la proteína ROCK (B,C). La expresión de las proteínas se calculó en base al valor de la banda de tubulina y la expresión de cada gen se determinó con respecto al transcrito del gen de β -actina que se usó como control de carga. Los resultados fueron normalizados a los valores de las células control sin tratar. Los datos se representan como la media \pm SEM. * $p < 0.05$ (test *t* de Student).

De esta manera, estos resultados demuestran que, la activación de PRR en las células microgliales genera un aumento del estrés oxidativo, así como activación de la vía ROCK.

4.2.3 Efecto del bloqueo de la vía ROCK sobre la inflamación inducida por PRR

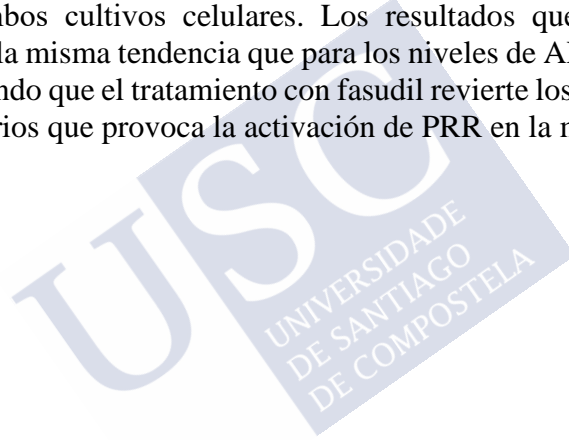
Después de demostrar que la activación de PRR aumenta la expresión de ROCK, nos planteamos si la inhibición de esa vía revierte la neuroinflamación inducida por PRR (*objetivo 2.3*).

En primer lugar, se analizaron en paralelo células procedentes de cultivo de la línea BV2 y de cultivos primarios de microglía de rata, tratadas con (pro)renina recombinante (5nM), así como células control sin tratar. Se observó un incremento significativo en los niveles de expresión de ARNm tanto de marcadores prooxidativos y/o proinflamatorios tales como citoquinas inflamatorias IL-6, IL-1 β y TNF- α , como del marcador de fenotipo M1, INOS (Figura 13), en las células microgliales pertenecientes a ambos tipos celulares, que habían

sido tratadas con (pro)renina recombinante (5nM) con respecto a las células control no tratadas. Por consiguiente, la activación de PRR induce polarización de la microglía hacia el fenotipo M1.

Para estudiar si la vía ROCK podría estar involucrada en los procesos inflamatorios desencadenados por PRR se empleó el inhibidor de ROCK fasudil (0,2 μ g/ μ l), administrándolo en ambos cultivos microgliales. Se observó que esta inhibición contrarresta los efectos de la activación de PRR con la (pro)renina recombinante (5nM), observándose una reducción significativa en los niveles de ARNm de todos los marcadores proinflamatorios estudiados (Figuras 14 A-B).

Además, se analizaron los niveles de expresión de la proteína IL-1 β en ambos cultivos celulares. Los resultados que se obtuvieron siguieron la misma tendencia que para los niveles de ARNm (Figura 14 C), indicando que el tratamiento con fasudil revierte los efectos nocivos inflamatorios que provoca la activación de PRR en la microglía.



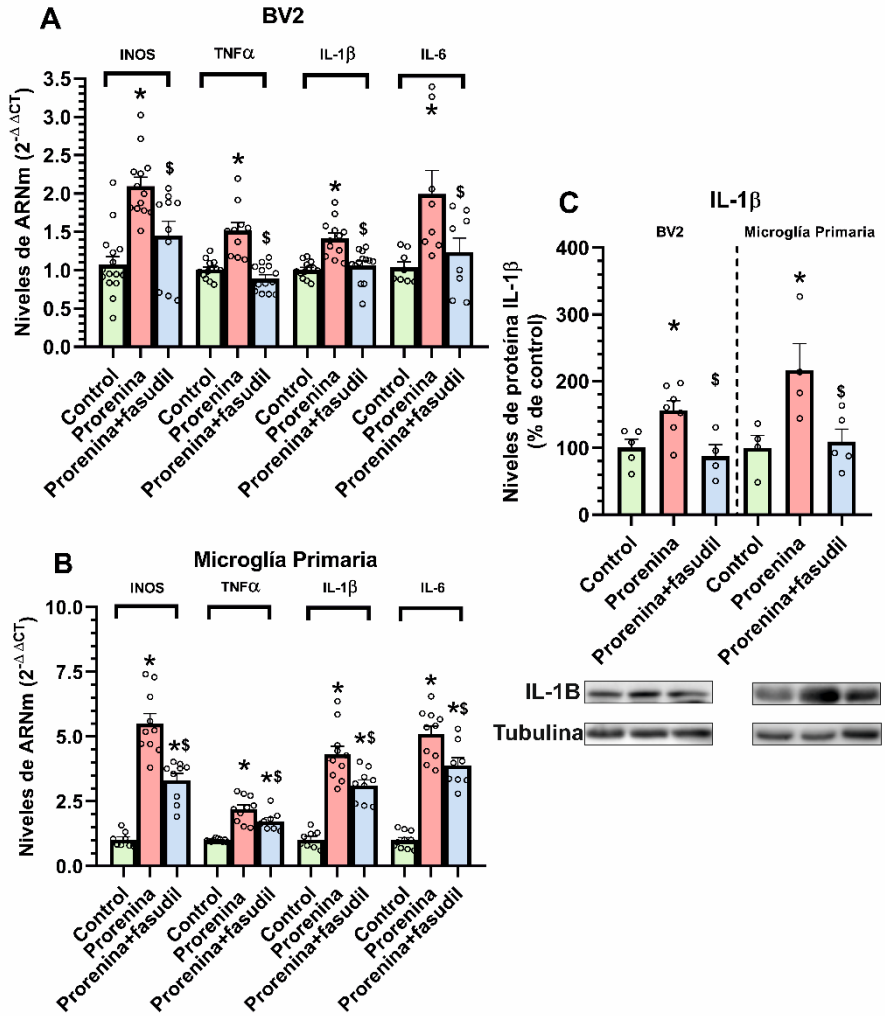


Figura 14. Análisis de los niveles de expresión de INOs, TNF- α , IL-1B e IL-6 en células control, tratadas con (pro)renina recombinante (5nM) y losartan (100nM) y tratadas con (pro)renina recombinante (5nM) y losartan (100nM) + y fasudil (0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Niveles de expresión de ARNm de INOs, TNF- α , IL-1B e IL-6 en BV2 (A) y en microglía primaria (B) en BV2 y microglía primaria de rata por western blot (C). La expresión de las proteínas se calculó en base al valor de la banda de tubulina y la expresión de cada gen se determinó con respecto al transcrito del gen de β -actina que se usó como control de carga. Los resultados fueron normalizados a los valores de las células control sin tratar. Los datos se representan como la media \pm SEM (* $p < 0.05$, diferencias significativas con respecto a las células control; $^{\S}p < 0.05$ diferencias significativas con respecto al grupo tratado con (pro)renina recombinante) (ANOVA de una vía post-hoc de Holm Sidak).

4.2.4 Efecto de activación del PRR y de la vía ROCK sobre la autofagia

Como posible mecanismo implicado en el aumento de la inflamación producida por la activación de PRR y de la vía ROCK en las células microgliales estudiamos el proceso de autofagia (*objetivo 2.3*).

En primer lugar, se analizó si la activación de PRR en las células microgliales desempeña algún papel en el proceso de autofagia. Para ello se estudió la expresión de la proteína asociada a microtúbulos 1B (LC3B). Durante el proceso de autofagia, la LC3B-I soluble se convierte en LC3B-II, la cual se asocia con los autofagosomas. La detección de la forma específica de los autofagosomas LC3B-II se utiliza ampliamente para monitorizar la autofagia. En nuestro caso se observó que el tratamiento con (Pro)renina recombinante provoca una disminución significativa en los niveles de expresión de la proteína LC3B en la línea microglial BV2 y en cultivos primarios de microglía de rata con respecto a células control no tratadas.

Además, cuando se combina el tratamiento de (pro)renina recombinante (5nM) con rapamicina (1M), un activador del proceso de autofagia, los niveles de LC3B se revierten a valores control en BV2 e incluso por encima de los valores control en cultivos primarios de microglía (Figura 15A).

Por otra parte, se observa que el tratamiento con rapamicina revierte el incremento en los niveles de IL-1B provocados por la

(pro)renina recombinante (Figura 15C) en ambos cultivos de microglía. Esto permite deducir que el incremento de la inflamación provocado por la activación de PRR está relacionado con la disminución del proceso de autofagia.

En segundo lugar, se analizó si la disminución de la autofagia provocada por PRR se produce a través de la vía ROCK. Para ello utilizamos el inhibidor de ROCK, fasudil ($0,2\mu\text{g}/\mu\text{l}$), y hemos observado que la disminución en los niveles de la proteína LC3B inducida por la (pro)renina recombinante se revierte a valores similares a los observado en los controles (Figura 15B).

Finalmente, una vía que ha sido relacionada tanto con los procesos inflamatorios como con el proceso de autofagia es la vía del inflamasoma. Para determinar si esta vía está relacionada directamente con los procesos inducidos por la activación de PRR, se bloqueó en microglía primaria el complejo del inflamasoma mediante el inhibidor específico MCC. Hemos observado que el aumento en los niveles de la proteína IL-1 β provocados por la activación de PRR disminuyen a valores control tras el tratamiento con MCC ($10\mu\text{M}$), indicando que el inflamasoma estaría implicado en los procesos inflamatorios inducidos por PRR. Para analizar si el inflamasoma está relacionado con la disminución del proceso de autofagia provocada por la activación PRR, se analizó cómo se comporta el marcador LC3B al tratar los cultivos primarios de microglía con MCC. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurría al bloquear la vía ROCK con fasudil, o al activar la autofagia con rapamicina, la combinación del tratamiento (pro)renina recombinante (5nM) y MCC no tiene efecto sobre la expresión de la proteína LC3B en cultivos primarios de microglía (Figura 15D).

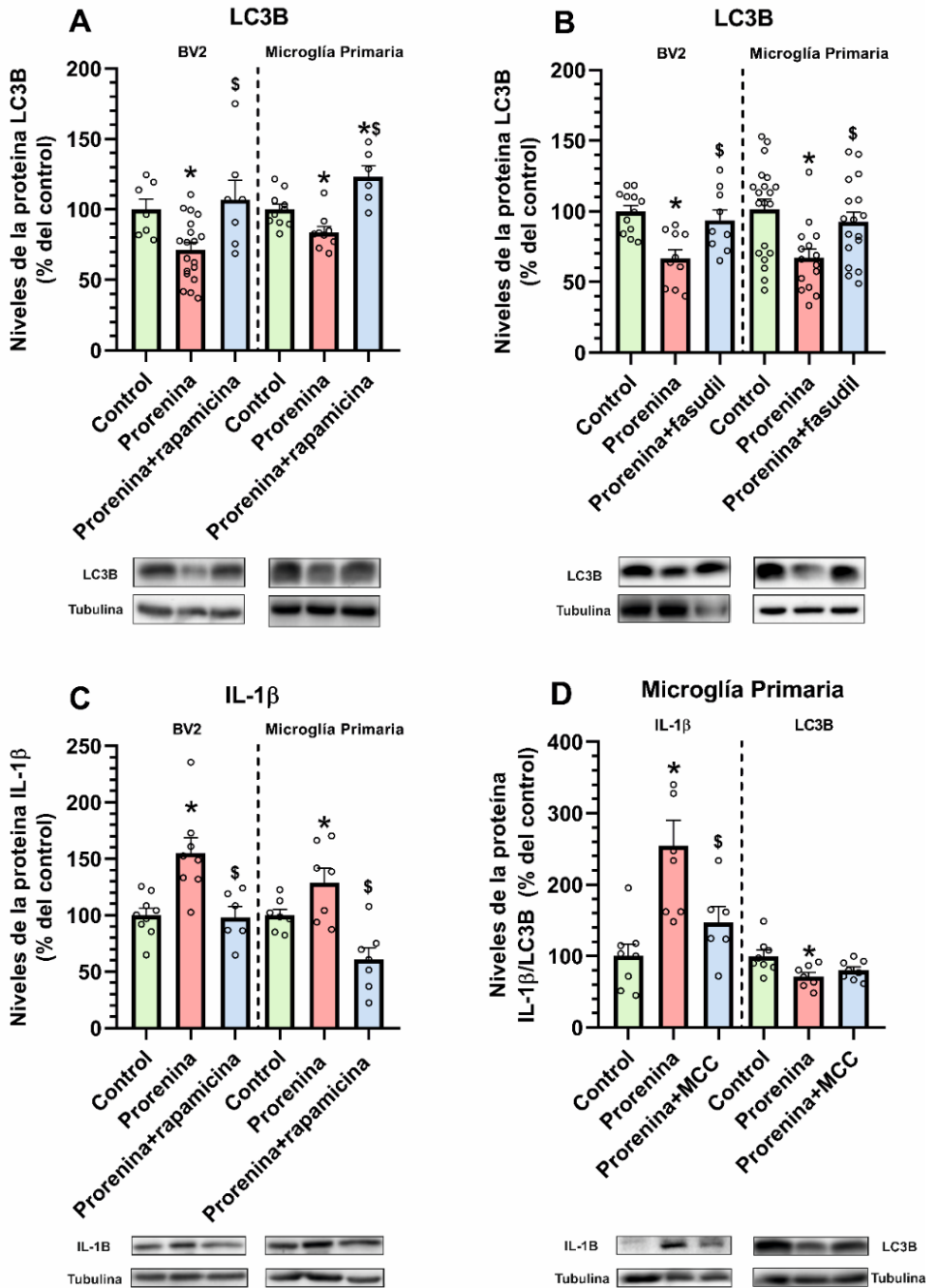


Figura 15. Análisis de los niveles de expresión de las proteínas LC3B y IL-1B en BV2 y microglía primaria por western blot. LC3B en células control, tratadas con (pro)renina recombinante (5nM) y losartan (100nM); con (pro)renina recombinante (5nM, losartan (100nM) y rapamincina (1M) (A). LC3B en células control, tratadas con (pro)renina recombinante (5nM) y losartan (100nM) y tratadas con (pro)renina recombinante (5nM), losartan (100nM) y fasudil (0,2 µg/µl) (B). IL-1B en células control, tratadas con (pro)renina recombinante (5nM) y losartan (100nM) y tratadas con (pro)renina recombinante (5nM), losartan (100nM) y rapamincina (1M) (C). IL-1B y LC3B en microglía primaria en células control, tratadas con (pro)renina recombinante (5nM) y losartan (100nM) y tratadas con (pro)renina recombinante (5nM), losartan (100nM) y MCC (10µM) (D). La expresión de las proteínas se calculó en base al valor de la banda de Tubulina. Los resultados fueron normalizados a los valores de las células control sin tratar. Los datos se representan como la media ± SEM (*p<0.05, diferencias significativas con respecto a las células control; †p<0.05 diferencias significativas con respecto al grupo tratado con (pro)renina recombinante) (ANOVA de una vía post-hoc de Holm Sidak).

4.2.5 Efecto de activación del PRR microglial sobre la viabilidad de neuronas dopaminérgicas

El MC obtenido a partir de los cultivos de microglía fue administrado sobre la línea neuronal N27, para analizar las consecuencias que la activación de PRR microglial tiene sobre la viabilidad neuronal (*objetivo 2.3*).

En las células N27 cuando se mantienen en cultivo con MC microglial se observó una leve disminución de la viabilidad neuronal, tanto exponiéndolas a MC procedente de la línea BV2 (Figura 16A) como de microglía primaria de rata (Figura 16B). Sin embargo, si la línea neuronal N27 se expone a MC de células microgliales previamente activadas con (pro)renina recombinante, se observó una disminución significativa de la viabilidad neuronal. Esto sugiere que la activación de PRR en la microglía produce sustancias nocivas para las neuronas dopaminérgicas. Además, empleando la neurotoxina dopaminérgica 6-OHDA en combinación con el MC de microglía, se obtiene un incremento en la muerte dopaminérgica, que resulta más evidente si empleamos MC procedentes de células microgliales que han sido activadas previamente con la (pro)renina recombinante (Figura 16A-B). Tanto en presencia como en ausencia de la neurotoxina, el uso

del MC de células microgliales tratadas con (pro)renina recombinante y fasudil revierte el incremento de la muerte neuronal (Figura 16A-B), probablemente debido a una menor producción de citoquinas proinflamatorias.

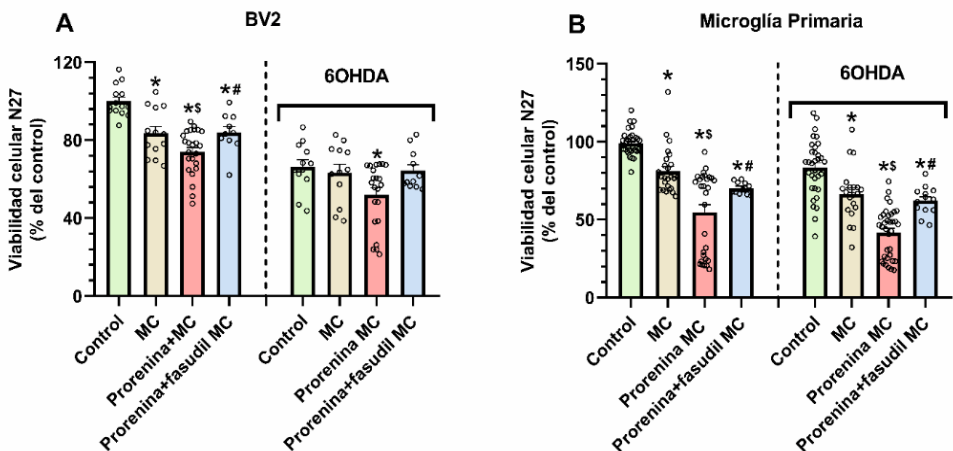


Figura 16. Análisis de la viabilidad neuronal de las células N27 en presencia y ausencia de la neurotoxina 6-OHDA tratadas con medio condicionado de BV2 (A) y de microglía (B). Los grupos que se estudiaron son control, medio condicionado de células microgliales, medio condicionado de células microgliales + (pro)renina recombinante (5nM) y medio condicionado de células microgliales + (pro)renina recombinante (5nM) + fasudil (0,2µg/µl). La expresión de cada gen se determinó con respecto al transcrito del gen de β-actina que se usó como control de carga. Los resultados fueron normalizados a los valores de las células control sin tratar. Los datos se representan como la media ± SEM (*p<0.05, diferencias significativas con respecto a las células control; ^{\$}p<0.05 diferencias significativas con respecto al grupo tratado con (pro)renina recombinante) (ANOVA de una vía post-hoc de Holm Sidak). Abreviatura: medio condicionado (MC).

4.3 PAPEL DEL COLESTEROL EN LAS DISCINESIAS INDUCIDAS POR L-DOPA, INTERACCIÓN CON SRA

En tercer lugar, se estudió el papel del colesterol en modelos de EP y discinesias, así como el efecto de la simvastatina, inhibidor de la principal enzima de síntesis de colesterol, la HMGCR, en el desarrollo de las discinesias inducidas por L-DOPA. Además, se analizó el papel que juega el SRA en la síntesis de colesterol en el cerebro utilizando modelos *in vivo*, ratas inyectadas con AII en el tercer ventrículo y

animales deficientes para los principales receptores del sistema, KOAT1 y KOAT2. También se emplearon modelos *in vitro*, ya que, se investigó el papel de la AII en las neuronas dopaminérgicas, utilizando la línea N27 y en las células astrogiales, empleando la línea C6.

4.3.1 Expresión de colesterol en el modelo de EP y discinesias

Para estudiar la expresión de colesterol en animales lesionados con 6-OHDA y animales lesionados discinéticos, los cuales habían recibido tratamiento crónico con L-DOPA (*objetivo 3.1*), se examinaron los niveles de expresión de la principal enzima encargada de la síntesis del colesterol, HMGCR y del factor de transcripción inductor de su síntesis, SREBP 2.

En los animales discinéticos tratados de manera crónica con L-DOPA (6mg/kg), se observó un aumento significativo en la síntesis de colesterol en el estriado. Esto fue detectado a través del análisis por PCR de los niveles de ARNm de la enzima HMGCR y de la proteína reguladora de la homeostasis del colesterol SREBP2. En los animales discinéticos se observó un incremento de hasta 5 veces en los niveles de ARNm para HMCGR (Figura 17A) y de 3 veces en los niveles de expresión de SREBP2 (Figura 17B), con respecto a los controles, animales modelo de EP (lesiones crónicas con 6-OHDA) inyectados durante 3 semanas con solución salina.

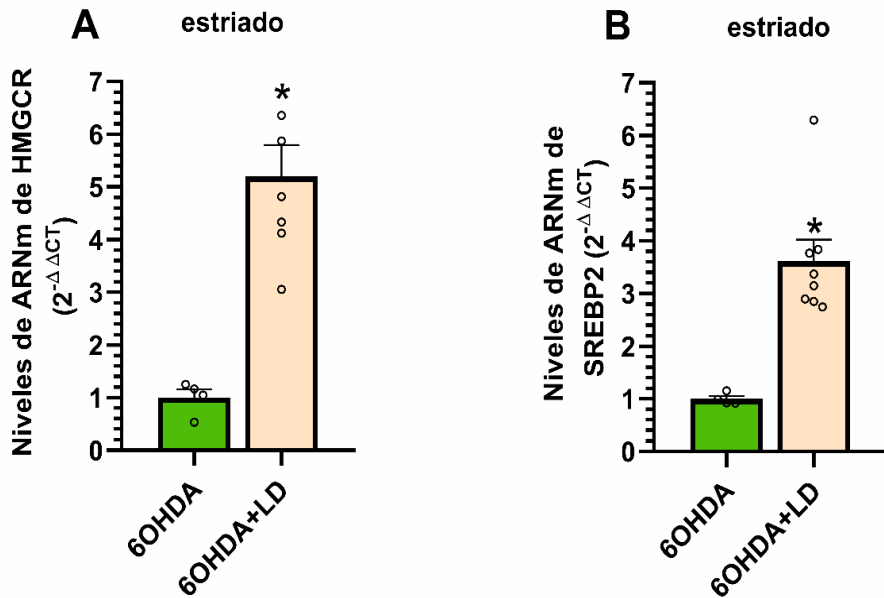


Figura 17. Análisis de los niveles de colesterol en el estriado de ratas lesionadas con 6-OHDA y en ratas lesionadas discinéticas tratadas durante 3 semanas con L-DOPA (6mg/kg/día). Niveles de expresión de ARNm para HMGCR (A) y SREBP2 (B). La expresión de cada gen se determinó con respecto al transcrito del gen de β -actina que se usó como control de carga. Los resultados se normalizaron a los animales control lesionados con 6-OHDA e inyectados con vehículo. Los datos se representan como la media \pm SEM (* $p < 0.05$, *t-Student*). Abreviatura: LD, L-DOPA.

4.3.2 Efecto de la inhibición del colesterol en discinesias inducidas por L-DOPA

Un grupo de animales fueron lesionados en el FPM con la neurotoxina 6-OHDA para estudiar el papel de la inhibición del colesterol en el desarrollo de las discinesias inducidas por L-DOPA (*objetivo 3.2*). Para ello, se les administró simvastatina (15mg/kg) oral disuelta en vehículo (nutella) durante el tratamiento crónico con L-DOPA (6mg/kg subcutáneo). El comportamiento discinético fue evaluado de manera periódica a través del test AIMS. Durante los primeros días de tratamiento (hasta la 7^a inyección de L-DOPA), los

movimientos discinéticos eran leves y no se observaron diferencias significativas en los animales tratados con simvastatina con respecto a los controles inyectados L-DOPA a los que se les trato también con vehículo oral. A partir de la primera semana de tratamiento (7^a inyección de L-DOPA), las estatinas indujeron una reducción significativa de las discinesias (alrededor de 25% en el AIMs total, Figura 18A), que se mantuvo a lo largo del tratamiento crónico (alrededor del 30% en la 14^a inyección de L-DOPA y 20% en la 21^a inyección de L-DOPA). En el análisis de cada uno de los componentes por separado observamos que las diferencias más marcadas se producen el componente extremidad y orolingual (alrededor del 30% en la 7^a, 14^a y 21^a inyección de L-DOPA; Figura 18C-D) mientras que en el componente axial las diferencias fueron más sutiles (alrededor del 20% en la 7^a, 14 y 21^a inyección de L-DOPA; Figura 18B). El movimiento rotacional en estos animales (rotación hacia el lado contralateral a la lesión) se vio incrementado en los animales tratados con simvastatina, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Figura 18E).

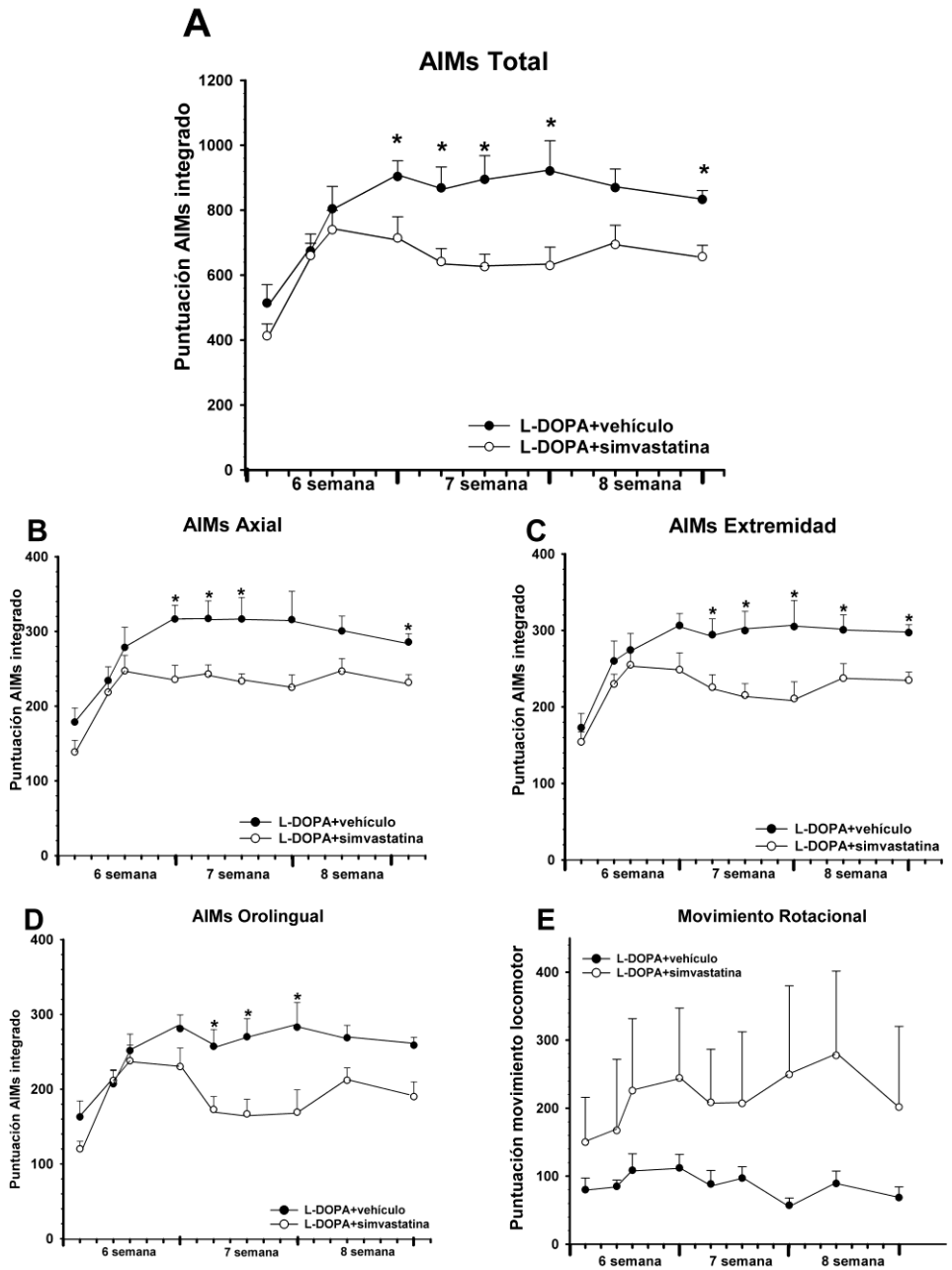


Figura 18. Desarrollo de las discinesias inducidas por el tratamiento crónico (21 días) con L-DOPA (6 mg/kg, círculos negros; n=7) y con L-DOPA (6 mg/kg) y simvastatina (15mg/kg, círculos blancos; n=7). La puntuación total del AIMS (A) se estimó como la suma del componente extremidad (B), orolingual (C) y axial (D). El movimiento rotacional se registró como componente locomotor (E). Los datos se representan como la media \pm SEM. * $p < 0.05$ (test t de Student para cada punto a lo largo del tiempo). Abreviaturas; AIMS, movimientos involuntarios anormales.

En el análisis *postmortem* de estos animales se estudiaron los niveles de expresión en el estriado de la enzima de síntesis del colesterol, HMGCR, así como de la proteína ROCK a través de WB. Observamos que los animales discinéticos presentan niveles elevados de expresión de HMGCR (alrededor del 90%; Figura 19A) y ROCK (alrededor del 70%; Figura 19B) obteniéndose diferencias significativas con respecto a los animales lesionados con 6-OHDA que fueron tratados con solución salina. Mientras que en los animales que habían sido tratados con simvastatina además de L-DOPA, en los cuales los movimientos discinéticos se redujeron significativamente, también los niveles de expresión de la enzima HMGCR (Figura 19A) y de la proteína ROCK (Figura 19B) disminuyeron de manera significativa, y se obtuvieron valores similares a los que presentan los animales lesionados sin L-DOPA.

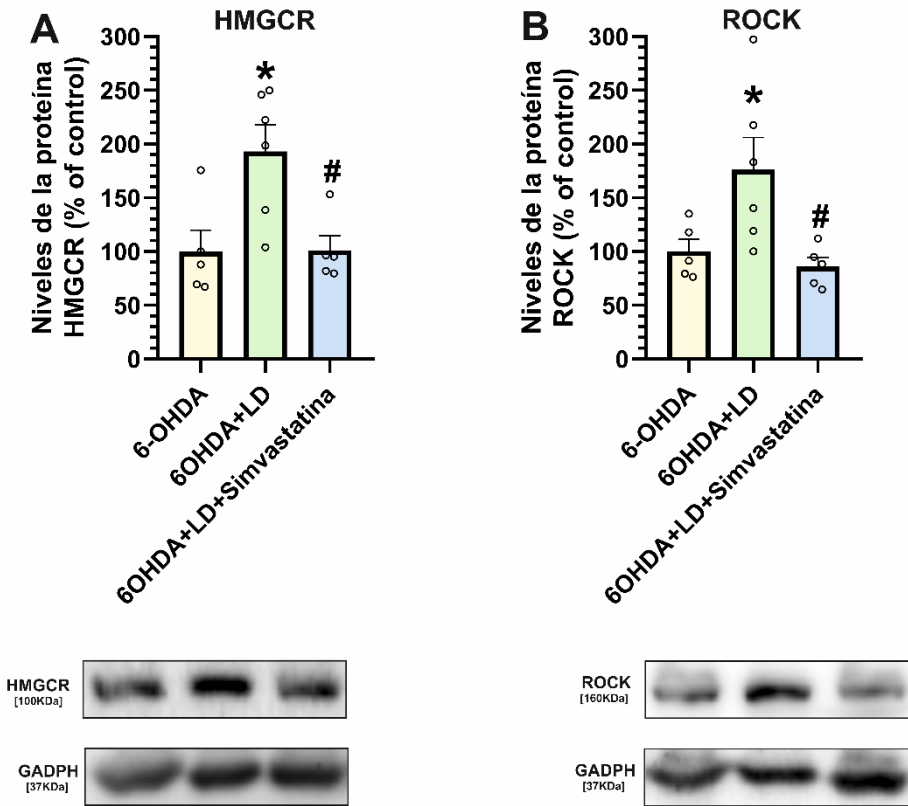


Figura 19. Análisis de los niveles de expresión de la enzima de síntesis de colesterol, HMGCR (A), y de la proteína ROCK (B) en el estriado de ratas lesionadas con 6-OHDA, en ratas lesionadas discinéticas tratadas durante 3 semanas con L-DOPA (6mg/kg/día) y en ratas lesionadas tratadas con simvastatina (15mg/kg/día) y L-DOPA (6mg/kg/día). La expresión de las proteínas se calculó en base al valor de la banda de GADPH. Los resultados fueron normalizados a los valores de las ratas control, ratas lesionadas con 6-OHDA tratadas con solución salina. Los datos se representan como la media \pm SEM (* $p < 0.05$, diferencias significativas con respecto a las ratas control; # $p < 0.05$ diferencias significativas con respecto al grupo tratado ratas discinéticas tratadas con L-DOPA (ANOVA de una vía post-hoc de Holm Sidak).

4.3.3 Efecto de AII sobre los niveles de colesterol

Para investigar la interacción del SRA sobre los niveles de colesterol y sus receptores (*objetivo 3.3*), se estudió, por un lado, como afecta a los niveles de colesterol en el cerebro la infusión intraventricular de AII (principal péptido efector del SRA) y por otro lado como se presentan los niveles de colesterol en animales KO para receptores del SRA (KOAT1 y KOAT2).

4.3.3.1 Expresión de colesterol tras inyección de AII intraventricular

En los animales tratados con AII intraventricular se observó un aumento significativo en los niveles de colesterol (analizados a través del kit amplex red) tanto en la sustancia negra y en el estriado, al compararlos con los controles que fueron inyectados con salino. En la sustancia negra el aumento observado fue alrededor del 75% (Figura 20A), mientras que en el estriado las diferencias fueron más pronunciadas, donde los valores de los niveles de colesterol en los animales tratados con AII se triplicaron (Figura 20B). Estos datos nos indican que la AII juega un papel en la síntesis de colesterol en el cerebro.

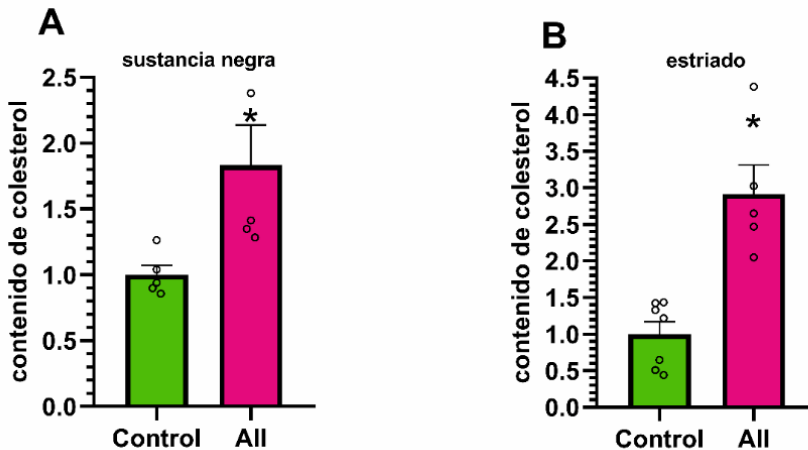


Figura 20. Análisis de los niveles de colesterol en la sustancia negra (A) y en el estriado (B) de ratas inyectadas con 5µg de AII en el tercer ventrículo. Los resultados fueron normalizados con respecto a los valores de las ratas control inyectadas con solución salina. Los datos se representan como la media \pm SEM (* $p < 0.05$, t-student). Abreviatura: AII, angiotensina II.

4.3.3.2 Expresión de colesterol en ratones KO para SRA

Para estudiar la interacción entre el colesterol y el SRA, los niveles de colesterol se analizaron también en la sustancia negra de animales transgénicos con deleciones para los receptores de AII, KOAT1 y KOAT2, a través del kit Amplex Red. Por un lado, se observó que en ratones KOAT1 los niveles de colesterol disminuyen con respecto a los controles de la cepa salvaje (Figura 21A), mientras que en los animales KOAT2 los niveles de colesterol en la sustancia negra se encuentran significativamente elevados (los valores se triplican; Figura 21B) con respecto a lo que ocurre en animales control procedentes de la cepa salvaje, sugiriendo que la AII juega un papel en la síntesis del colesterol a través de los receptores AT1.

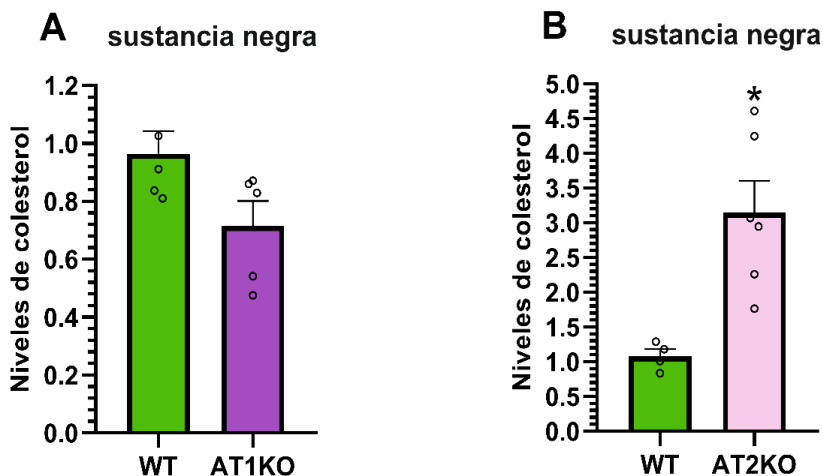


Figura 21. Análisis de los niveles de colesterol en la sustancia negra de ratones KOAT1 (A) y KOAT2 (B). Los resultados fueron normalizados con respecto a los valores de los ratones de la cepa salvaje. Los datos se representan como la media \pm SEM (* $p < 0.05$, t-sudent). Abreviatura: WT, cepa salvaje.

4.3.4 Expresión de los niveles de colesterol y sus receptores en cultivos neuronales y astrogliales

Para investigar la expresión de los niveles de colesterol en las células tras la administración de AII (*objetivo, 3.4*) los cultivos celulares de neuronas dopaminérgicas (N27) y astrocitos (C6) fueron utilizados para estudiar la forma en la que se comportan los distintos tipos celulares implicados en la síntesis y transporte de colesterol en el cerebro cuando se administra AII. Para ello se han analizado los niveles de expresión de la principal enzima de síntesis en el cerebro, la HMGCR. Se ha estudiado también la expresión de los receptores relacionados con el transporte de lípidos, para la entrada del colesterol en las células se estudió el receptor LDLR y para la salida el receptor conocido como ABCA1.

En las neuronas tratadas con AII se observó un aumento significativo en la expresión de ARNm para la enzima de síntesis HMGCR (alrededor del 40%; Figura 22A) y para el receptor de salida

ABCA1 (alrededor del 25%; Figura 22B). El tratamiento con el antagonista de los receptores AT1, losartán revirtió el aumento de la expresión de la enzima de síntesis, obteniéndose valores similares a los controles (cultivos no tratados), mientras que en el caso del receptor de salida la inhibición del receptor AT1 no produjo ningún efecto. En el caso del receptor de entrada de lípidos en la célula, LDLR, no se observaron diferencias significativas en los niveles de ARNm (Figura 22C).

Por otro lado, al analizar los niveles de expresión proteica de dichos marcadores, observamos la misma tendencia que en los resultados obtenidos tras el análisis del ARNm. De esta manera, la AII provoca un aumento en la expresión de las proteínas HMGCR y ABCA1 (Figuras 22D-E). Sin embargo, en el caso del LDLR a nivel de expresión proteica se observó una tendencia al aumento de los niveles de expresión de dicho receptor tras el tratamiento con AII, aunque no fue estadísticamente significativa (Figura 22F).



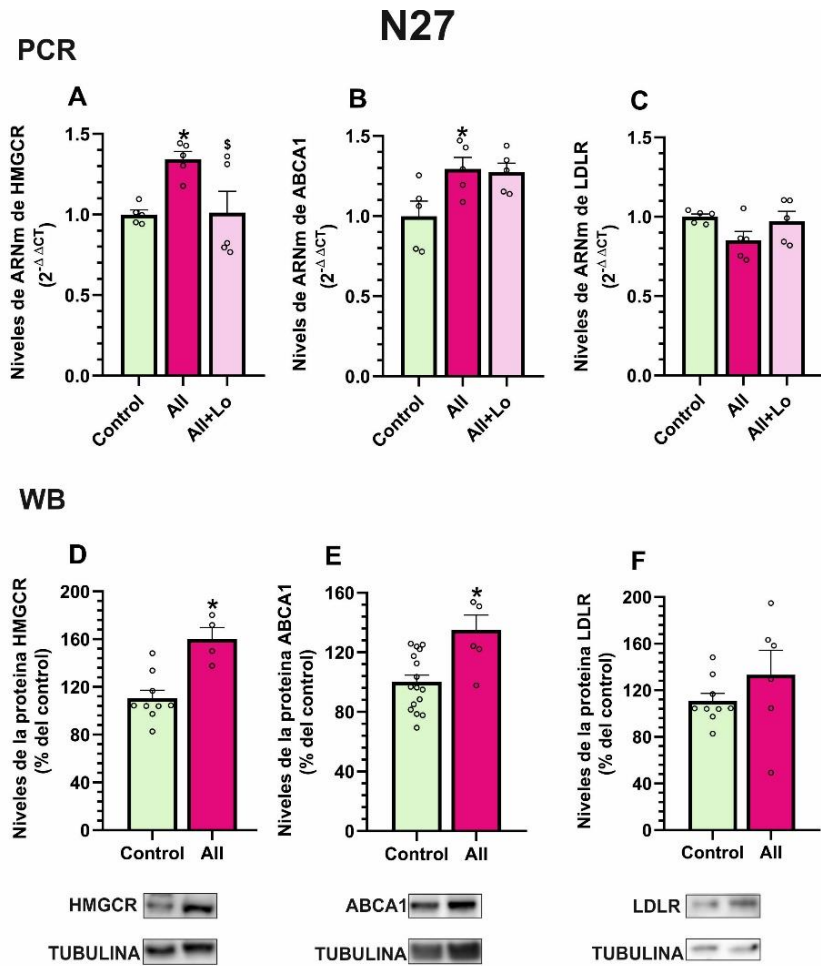


Figura 22. Análisis de los niveles de expresión de HMGCR (A, D), ABCA1 (B, E) y LDLR (C, F) en células de la línea N27. Niveles de expresión de ARNm por PCR de HMGCR (A), ABCA1 (B) y LDLR (C) en N27 control, tratadas con All (1 μ M) y tratadas con All (1 μ M) y losartán (100nM), a través de westerm blot (A-C) y PCR (D-F). La expresión de cada gen se determinó con respecto al transcrito del gen de β -actina que se usó como control de carga y la expresión de las proteínas se calculó en base al valor de la banda de tubulina. Los resultados fueron normalizados con respecto a los valores de las células control no tratadas. Los datos se representan como la media \pm SEM. * $p < 0.05$ (Test *t* de Student o ANOVA de una vía, post-hoc de Holm Sidak).

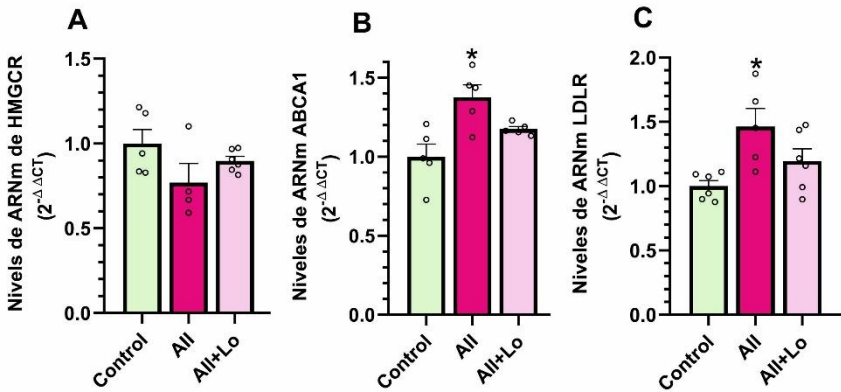
En paralelo se ha llevado a cabo el mismo análisis en cultivos de astrocitos, concretamente en la línea C6. En este caso, la concentración de AII con la que se trató fue 100ng/ml. Tras el análisis de ARNm se ha observado que la enzima HMGCR presenta una tendencia a disminuir los niveles de expresión cuando los astrocitos se tratan con AII (Figura 23A). Asimismo, se produce un aumento en los niveles de expresión de los receptores de salida ABCA1 y de entrada LDLR (alrededor del 40%; Figura 23B-C). En ambos casos el tratamiento con losartán tiende a revertir el efecto, aunque las diferencias no llegan a ser estadísticamente significativas.

Al analizar los niveles de expresión proteica tras el tratamiento con AII, se confirmaron los resultados observados tras el estudio del ARNm. De esta manera, se observó que la enzima de síntesis después de la infusión de AII en los astrocitos disminuye significativamente su expresión (Figura 23D) y se produce un aumento significativo en la expresión del receptor de entrada LDLR cuando las células están bajo los efectos de la AII (Figura 23F). Sin embargo, al contrario de lo que ocurría en el ARNm no se observan cambios en la expresión proteica del receptor ABCA1 en astrocitos tras el tratamiento con AII (Figura 23E).

Estos resultados sugieren que, la AII en el cerebro intensifica la síntesis de colesterol en las neuronas. El exceso de colesterol presente en las neuronas se libera hacia los astrocitos, donde posiblemente se almacene, para así evitar daño en las neuronas.

C6

PCR



WB

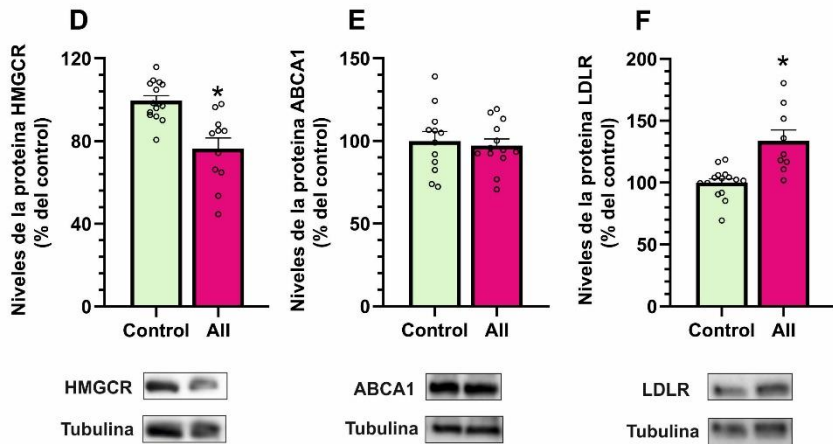


Figura 23. Análisis de los niveles de expresión de HMGCR (A,D), ABCA1 (B,E) y LDLR (C,F) en células de la línea astrogliar C6, tratadas con All (100nM) y tratadas con All (100nM) y losartán (100nM), y en controles a través de PCR (A-C) y westerm blot (D-F). La expresión de cada gen se determinó con respecto al transcrito del gen de β -actina que se usó como control de carga y la expresión de las proteínas se calculó en base al valor de la banda de Tubulina. Los resultados fueron normalizados a los valores de las células control no tratadas. Los datos se representan como la media \pm SEM. * $p < 0.05$ (Test *t* de Student o ANOVA de una vía, post-hoc de Holm Sidak).



5. DISCUSIÓN



5. DISCUSIÓN

Las causas a través de las cuales se producen las discinesias inducidas por L-DOPA, hoy en día, no están claramente establecidas. No obstante, se ha descrito que varios mecanismos neuronales y no neuronales están implicados en su desarrollo. En esta tesis hemos demostrado que factores como la neuroinflamación intervienen en el desarrollo de las discinesias, poniendo de manifiesto la implicación de nuevos mecanismos y nuevas estrategias terapéuticas relacionadas con la vía ROCK, PRR y el colesterol.

5.1 IMPLICACIÓN DE LA VÍA ROCK EN LAS DISCINESIAS INDUCIDAS POR L-DOPA

La vía ROCK es una de las principales vías implicadas en la respuesta inflamatoria en el cerebro. Además, se ha demostrado en trabajos anteriores de nuestro grupo de investigación que la manipulación de la enzima ROCK, mediante inhibidores específicos protege de la neurodegeneración a las neuronas dopaminérgicas en la EP. En esta tesis se ha observado una hiperactivación de esta vía en los animales que presentan discinesias inducidas por L-DOPA. Asimismo, hemos demostrado que el uso de fasudil, como fármaco inhibidor de la proteína ROCK, es capaz de prevenir el desarrollo de las discinesias, así como reducir su grado una vez se han establecido.

5.1.1 Expresión de la vía ROCK en la lesión dopaminérgica

En estudios previos se ha descrito que el fasudil y sus análogos inhiben la actividad ROCK y resultan eficaces en el tratamiento de varias enfermedades (Chen y col., 2013b; Defert y Boland, 2017). En esta tesis, las ratas con lesión aguda inducida por 6-OHDA (1 semana después de la lesión) mostraron un significativo incremento en la

expresión de la proteína Rho A y de la enzima ROCK en la sustancia negra y en el estriado, lo cual concuerda con el aumento de la actividad ROCK que media en procesos neuroinflamatorios durante la degeneración neuronal (Barcia, Ros y col., 2012; Borrajo, y col., 2014b; Villar-Cheda y col., 2012). Sin embargo, las ratas inyectadas con 6-OHDA que desarrollaron una lesión crónica máxima presentaron una reducción significativa en los niveles de expresión y en la actividad de la proteína ROCK en la sustancia negra y en el estriado. De acuerdo con estos resultados, varios estudios han demostrado que se produce una disminución a lo largo del tiempo en la expresión de marcadores neuroinflamatorios después de las lesiones neurotóxicas (Joglar y col., 2009; Walsh y col., 2011). Un descenso por debajo de los niveles del control puede estar relacionado con la importante pérdida de neuronas dopaminérgicas y/o cambios compensatorios relacionados con la denervación que dan lugar a niveles más bajos de Rho A y ROCK (Koch y col., 2018; Labandeira-Garcia y col., 2015). La neuroinflamación juega un papel principal en la progresión de la EP (Gerhard y col., 2006). Al contrario de lo que ocurre con los animales que presentan lesión crónica con 6-OHDA, en los cuales ya se ha completado el proceso neurodegenerativo, en secciones de cerebro de pacientes con EP analizadas *postmortem* se observó un incremento de la expresión de ROCK en astrocitos y microglía, lo cual sugiere la activación de procesos neuroinflamatorios (Koch y col., 2018). Por lo tanto, en el curso de la EP la reducción de la actividad ROCK a través de fasudil debería presentar efectos neuroprotectores y antidiscinéticos más efectivos que en modelos crónicos de ratas lesionadas con 6-OHDA.

En modelos animales y en pacientes con EP se ha descrito una reacción microglial intensa en el estriado y en la sustancia negra (Gerhard y col., 2006; Rodriguez-Pallares y col., 2007). En varios estudios se ha descrito un incremento en la expresión de Rho A y ROCK en modelos neurotóxicos de EP, MPTP y 6-OHDA, en los cuales se han demostrado también efectos neuroprotectores derivados de la inhibición de ROCK (Moskal y col., 2020; Muñoz y col., 2016; Tonges y col., 2012; Villar-Cheda y col., 2012; Zhao y col., 2015a). Previamente en nuestro laboratorio se demostró que la activación de

ROCK microglial media la respuesta inflamatoria en modelos de EP (Muñoz y col., 2016; Villar-Cheda y col., 2012). Además, cabe destacar que efectos antiinflamatorios proporcionados por la inhibición de ROCK con Y-27632 o fasudil han mostrado propiedades neuroprotectoras en las neuronas dopaminérgicas, a través de la estabilización de los axones así como por procesos de regeneración (Barcia y col., 2012; Borrajo y col., 2014b; Labandeira-Garcia y col., 2015; Tonges y col., 2012). Recientemente, la regulación al alza de la mitofagia mediada por parkina e inducida por inhibidores de ROCK se ha sugerido como un mecanismo neuroprotector adicional (Moskal y col., 2020).

5.1.2 Expresión de ROCK en el modelo de discinesias y efecto de la inhibición de la vía ROCK

Los resultados presentes en esta tesis demuestran, por primera vez, que la activación de ROCK en la sustancia negra y en el estriado está involucrada en los mecanismos de las discinesias, y que la inhibición de ROCK con fasudil reduce significativamente el desarrollo de estas. En trabajos anteriores, se ha descrito que inhibidores de ROCK como son el Y-27632 o el fasudil, muestran propiedades neuroprotectoras en las neuronas dopaminérgicas a través de varios mecanismos, en distintos modelos de EP (Barcia y col., 2012; Moskal y col., 2020; Tatenhorst y col., 2014; Villar -Cheda y col., 2012). Además, nosotros hemos observado que el fasudil fue capaz de reducir los movimientos discinéticos cuando estos ya se habían establecido de forma intensa y robusta en los animales. A dosis bajas de fasudil (10mg/kg), descritas como efectivas en la literatura en varios estudios de neuroprotección (Rodríguez-Perez y col., 2015; Song y col., 2013; Wu y col., 2012), los animales mostraron efectos significativos cuando se estudió el desarrollo de las discinesias, sin embargo, no hubo ningún efecto en ratas en las que las discinesias ya estaban establecidas. No obstante, dosis más altas de fasudil (40mg/kg), también utilizadas para inducir neuroprotección dopaminérgica en modelos animales (Barcia y col., 2012; Zhao y col., 2015b) dieron lugar a una reducción significativa de las discinesias ya establecidas. Esta dosis de fasudil también resultó eficaz cuando la severidad de la discinesia era muy alta provocada por

la dosis de 24mg/kg de L-DOPA, incluso en los animales que ya habían desarrollado discinesias antes del tratamiento con fasudil. La eficacia del fasudil para reducir las discinesias en ambas situaciones (es decir, la reducción del desarrollo de las discinesias tanto en ratas tratadas previamente con fasudil como la reducción en el grado de discinesia en ratas que ya las habían desarrollado antes del tratamiento con fasudil) sugiere que este compuesto puede utilizarse como fármaco neuroprotector en pacientes con EP sin discinesia con el objetivo de retrasar y reducir el desarrollo de las mismas y también puede ser efectivo para tratar pacientes con EP que ya han desarrollado discinesias. Además, investigamos la posibilidad de que esta reducción de las discinesias estuviese relacionada con una disminución de la actividad motora por parte del fasudil. Sin embargo, varias pruebas de comportamiento motor demostraron que el fasudil disminuyó las discinesias sin afectar a la respuesta terapéutica motora que ejerce el tratamiento con L-DOPA.

En las ratas discinéticas, la inyección crónica con L-DOPA provocó un aumento en los niveles de expresión de la vía ROCK y de los marcadores proinflamatorios, que fue revertido después del tratamiento con fasudil, a la vez que se produjo la reducción del comportamiento discinético. Además, en animales cuya denervación dopaminérgica era máxima, una única inyección de L-DOPA indujo comportamiento discinético y aumentó los niveles de expresión de Rho A y ROCK, aunque los niveles de discinesia aumentaron aún más después de varias inyecciones con L-DOPA. Curiosamente, se observó que un número de ratas denervadas y tratadas con L-DOPA que no desarrollaron comportamiento discinético tampoco mostraron aumento de la actividad ROCK como sí ocurrió en las ratas discinéticas. Esto sugiere que el aumento de la actividad ROCK está asociado al comportamiento discinético y no a la administración de la molécula L-DOPA. Estas ratas no discinéticas no fueron el resultado de una lesión dopaminérgica incompleta, ya que, fueron seleccionadas bajo los mismos criterios de lesión máxima que se usaron con los demás animales y, mostraron una pérdida de inmunoreactividad para TH similar al caso de los animales discinéticos. Estas ratas resistentes a la discinesia también se han descrito anteriormente en muchos otros

estudios en la literatura (Carta y col., 2006; Ohlin, y col., 2012). En cualquier caso, estos resultados muestran la asociación entre la ausencia de niveles elevados de actividad ROCK y la ausencia de discinesia.

5.1.3 Relación de la vía ROCK con la neuroinflamación y la angiogénesis: papel del VEGF, IL-1 β y TNF- α

El efecto de ROCK en el desarrollo de discinesias puede deberse al papel principal de ROCK en varios mecanismos que intervienen en el desarrollo de estas, en particular procesos relacionados con la neuroinflamación y la angiogénesis. Estudios previos han demostrado que la neuroinflamación está también involucrada en la patofisiología de las discinesias. En la sustancia negra y el estriado de animales discinéticos se observó un aumento en los niveles de expresión de IL-1 β (Barnum y col., 2008; Muñoz y col., 2014) y de otros marcadores de inflamación como GFAP, OX-42 e iNOS (Bortolanza y col., 2015; Mulas y col., 2016). También, las discinesias se vieron incrementadas cuando se usaron inductores de inflamación como el LPS (Mulas y col., 2016; Pisanu y col., 2018). Además, el uso de compuestos antiinflamatorios, como el ibuprofeno (Teema y col., 2016), o fármacos inmunomoduladores como la talidomida (Boi y col., 2019), retrasaron el desarrollo de las discinesias. Otras estrategias contra las discinesias, como son los inhibidores de NOS, también se ha demostrado que inhiben la neuroinflamación (Bortolanza y col., 2015a,b; Padovan-Neto y col., 2015). La activación de ROCK microglial está relacionada con varios componentes principales de la respuesta neuroinflamatoria como la migración de la microglía, la fagocitosis, la activación del complejo NADPH-oxidasa y la liberación de citoquinas proinflamatorias como TNF- α (Borrajo y col., 2014a; Labandeira-Garcia y col., 2015; Rodriguez-Perez y col., 2015). En esta tesis, se confirma que el fasudil disminuye los niveles de los marcadores inflamatorios que se encuentran aumentados en las ratas discinéticas. Además, ROCK regula la migración transendotelial y la filtración de células del sistema inmune periférico al SNC modulando la permeabilidad microvascular, la dinámica del citoesqueleto y la adhesión celular (Heasman y col., 2010; Honing y col., 2004). Varios mecanismos pueden vincular la neuroinflamación y el desarrollo de discinesias. Curiosamente, las

citoquinas relacionadas con los procesos neuroinflamatorios están involucradas en síntesis y metabolismo de neurotransmisores, en plasticidad cerebral y en modulación de la fuerza sináptica (Beattie y col., 2002). En animales tratados con L-DOPA, concentraciones elevadas de TNF- α juegan un papel en la plasticidad sináptica disfuncional a través de la modulación del tráfico de receptores AMPA. En ratones y pacientes con discinesias se han detectado alteraciones aberrantes en la transmisión glutamatérgica y en la plasticidad de las sinapsis corticoestriatales (Calabresi y col., 2007; Picconi y col., 2004). TNF- α desencadena la liberación de glutamato desde la microglía activada (Takeuchi y col., 2006) e incrementa la fosforilación de la subunidad GluR1 de los receptores AMPA postsinápticos (Centonze y col., 2009; Stellwagen y col., 2005). Curiosamente, trabajos previos de nuestro laboratorio mostraron que ROCK induce la producción de TNF- α microglial, y disminuye con inhibidores de ROCK (Borrajo y col., 2014a). El incremento en la fosforilación de GluR1 fue observado en diferentes modelos de discinesias, tanto agudos como crónicos en ratas y primates no-humanos (Santini y col., 2010). De acuerdo con esto, la amantadina como antagonista de los receptores NMDA, es actualmente el tratamiento que se emplea para tratar las discinesias, aunque el uso de este compuesto a largo plazo causa complicaciones (Espay y col., 2018). Cabe destacar que la amantadina también tiene propiedades antiinflamatorias e induce una disminución en los niveles de varios marcadores proinflamatorios en modelos de EP (Kim y col., 2012; Ossola y col., 2011).

Además de los efectos sobre el glutamato, la activación de ROCK y los compuestos relacionados con la inflamación modulan la función de otros neurotransmisores. Las citoquinas parecen afectar a la síntesis de DA a través de su acción sobre el cofactor de TH, BH4 (tetrahidobiopterina) y su enzima GTPCH (GTP ciclohidrolasa I) (Sakai y col., 1995). TNF- α puede también influir en la biodisponibilidad de 5-HT a través del incremento de la expresión y la actividad del transportador de 5-HT reduciendo así los niveles extracelulares del neurotransmisor (Wu y col., 2015). El sistema serotoninérgico juega un papel clave en discinesias, ya que, los terminales serotoninérgicos pueden convertir L-DOPA a DA en

ausencia de terminales dopaminérgicos en estadios avanzados de enfermedad (Carta y col., 2018; Lopez y col., 2001) y además la inhibición serotoninérgica suprime las discinesias en ratas parkinsonianas en monos tratados con MPTP y en pacientes con EP (Bezard y col., 2013; Carta y col., 2018; Fidalgo y col., 2015; Marin y col., 2009; Muñoz y col., 2008). También se han observado interacciones directas entre ROCK y 5-HT (Mair y col., 2008). Curiosamente, el fasudil suprime la proliferación celular inducida por 5-HT a través de la principal vía relacionada con el desarrollo de las discinesias, la vía ERK1/2 (Mair y col., 2008).

La desregulación de los procesos de angiogénesis inducida por L-DOPA también está implicada en discinesias. La alteración de las propiedades de la BHE se asocia con un aumento de la angiogénesis, que puede conducir a un suministro no controlado de L-DOPA, activación glial y neuroinflamación, lo cual contribuye al desarrollo de discinesias. Varios estudios mostraron, tanto en ratas (Lerner y col., 2017; Ohlin y col., 2011; Westin y col., 2006) como en humanos (Jourdain y col., 2017; Ohlin y col., 2011) alteraciones en el transporte de la BHE y regulación al alza de marcadores de angiogénesis después de la exposición crónica al tratamiento con L-DOPA. Los animales discinéticos y los pacientes con EP y discinesias presentan niveles elevados de VEGF. Cabe destacar también que se demostró que el uso de vandetanib, como bloqueante de VEGF, inhibe el desarrollo de las discinesias (Ohlin y col., 2011; Westin y col., 2006), y a su vez VEGF activa la vía MEK/ERK (Fournier y col., 2012). La angiogénesis inducida por L-DOPA requiere estimulación de los receptores D1 e induce la activación de ERK1/2 (Lindgren y col., 2009). La inhibición de la vía ROCK también puede reducir las discinesias a través de la inhibición de la angiogénesis. La señalización de la vía ROCK es esencial por múltiples aspectos como angiogénesis inducida por VEGF (Bryan y col., 2010; Sun y col., 2006), procesos de supervivencia celular endotelial, diferenciación, migración y permeabilidad de la BHE (Hoang y col., 2004). De acuerdo con esto, la inhibición de la vía ROCK bloquea la angiogénesis (Bryan y col., 2010; Rodriguez-Pallares y col., 2016), así como la hiperpermeabilidad endotelial microvascular inducida por VEGF (Sun y col., 2006), y el fasudil suprime la

angiogénesis inducida por el glioma a través de la modulación de las vías ROCK y ERK (Nakabayashi y col., 2011). En esta tesis hemos observado que el fasudil disminuye los niveles de VEGF junto con la actividad ROCK y las discinesias en las ratas modelo de EP tratadas con L-DOPA.

Varios fármacos implicados en paliar el desarrollo de las discinesias pueden estar convergiendo en la regulación de la actividad de la vía ROCK. En esta tesis y en otros estudios recientes de nuestro grupo de investigación, se ha demostrado un aumento en los niveles de VEGF en ratas discinéticas, y tanto el VEGF como las discinesias se redujeron después del tratamiento con fasudil (en el presente estudio) o con candesartan (antagonista de AT1; Muñoz y col., 2014). Sin embargo, el bloqueo de AT1 (Muñoz y col., 2014; Rodríguez-Pallares y col., 2012) puede reducir las discinesias también de forma indirecta a través de la inhibición de ROCK (Carbajo-Lozoya y col., 2012). En trabajos previos realizados en nuestro laboratorio se ha demostrado que existen importantes interacciones entre la AII cerebral y ROCK en el sistema dopaminérgico (Labandeira-García y col., 2015; Rodríguez-Pallares y col., 2012; Villar-Cheda y col., 2012). Las estatinas también podrían inducir la inhibición de ROCK (Wang y col., 2015). Finalmente, la amantadina, fármaco que actualmente se usa para tratar las discinesias, presenta efectos antiinflamatorios, por lo que la modulación de ROCK podría también estar involucrada (Kim y col., 2012; Ossola y col., 2011).

De esta manera, estos datos demuestran que la inhibición de ROCK con fasudil reduce el desarrollo de las discinesias e inhibe las discinesias ya establecidas sin interferir con el efecto terapéutico de la L-DOPA. Es interesante destacar que este compuesto también protege al sistema dopaminérgico y tiene efectos beneficiosos en modelos de enfermedad de Alzheimer (Gu y col., 2018), de enfermedad de Huntington (Li y col., 2013) y de esclerosis lateral amiotrófica (Günther y col., 2017). En clínica, el fasudil se emplea desde el año 1995, su seguridad y sus beneficios han sido ampliamente demostrados (Suzuki y col., 2007), y además se ha iniciado ya un ensayo clínico empleando este compuesto en enfermedades neurodegenerativas (Lingor y col., 2019). Por lo tanto, el fasudil sería un buen candidato para el

tratamiento de las discinesias y de manera simultánea generaría efectos neuroprotectores frente a la progresión de la EP.

5.2 INTERACCIÓN ENTRE PRR Y LA VÍA ROCK EN PROCESOS NEUROINFLAMATORIOS Y SU IMPLICACIÓN EN LAS DISCINESIAS

Diversos artículos demuestran la relación entre el SRA, la vía ROCK y los procesos neuroinflamatorios. De hecho, en animales discinéticos tanto el uso del antagonista de AT1 candesartan como el uso de fasudil reduce los niveles de discinesia al disminuir la neuroinflamación. El PRR es un componente del SRA que presenta efectos similares a los del receptor AT1, participando en procesos neuroinflamatorios. Por ello, como parte de esta tesis estudiamos la relación entre PRR, la vía ROCK y los procesos neuroinflamatorios.

5.2.1 Expresión de PRR en el modelo de enfermedad de Parkinson y discinesias

En este trabajo hemos analizado por primera vez cómo cambia la expresión de PRR en la EP y en las discinesias. En trabajos previos de nuestro grupo de investigación se ha descrito la presencia de este receptor en la sustancia negra, localizándolo en neuronas, microglía y en menor proporción en astrocitos (Garrido-Gil y col., 2013b; Valenzuela y col., 2010). Sin embargo, existen pocos datos que aclaren el papel que este receptor puede desempeñar en la EP.

Nuestros resultados muestran que la expresión de PRR en la sustancia negra se incrementa en modelos animales en los cuales la inflamación se encuentra exacerbada, como en el modelo agudo de EP y en animales discinéticos. Estos datos, coinciden con lo descrito en otros órganos y tejidos como el ojo (Wilkinson-Berka y col., 2011), el riñón (Matavelli y col., 2010; Quadri y col., 2018; Satofuka y col., 2012) o el tejido vascular (Satofuka y col., 2007, 2008) donde la activación de PRR se relaciona directamente con procesos prooxidativos, profibróticos y proinflamatorios.

En el presente trabajo encontramos una correlación entre el proceso neuroinflamatorio y los niveles de expresión de PRR. Así en modelos agudos de EP, caracterizados por una marcada activación microglial y una respuesta inflamatoria exacerbada (Barcia y col., 2012; Borrajo, y

col., 2014b; Rodríguez-Pallares y col., 2008; Villar-Cheda y col., 2012) se observó un incremento significativo en la expresión del PRR, mientras que una vez la lesión se cronifica y el proceso inflamatorio decae (Joglar y col., 2009; Walsh y col., 2011) los niveles de PRR revierten a valores similares a los presentes en animales control. Igualmente, en el modelo de discinesias hemos observado un incremento significativo en los niveles de expresión de PRR. Este aumento fue observado tanto tras el tratamiento agudo con L-DOPA (una sola inyección), como en animales que recibieron un tratamiento crónico (3 semanas). Como ya mencionamos anteriormente está ampliamente descrito en la bibliografía que estos animales presentan una mayor microgliosis (Mulas y col., 2016) así como altas concentraciones de citoquinas proinflamatorias, tales como IL-1 β (Barnum y col., 2008; Muñoz y col., 2014) iNOS o TNF- α (Bortolanza y col., 2015; Mulas y col., 2016)) entre otras. Además, en esta tesis hemos demostrado que en las discinesias se produce una activación de la vía inflamatoria ROCK y previamente en nuestro grupo se ha demostrado que el bloqueo del SRA reduce las discinesias, a través de una disminución de la neuroinflamación. Por lo tanto, estos resultados muestran que en los animales discinéticos se produce un aumento de marcadores de neuroinflamatorios relacionados con el SRA, como es el caso de PRR, reforzando la hipótesis de que la neuroinflamación representa un mecanismo implicado en la patofisiología de las discinesias. Además, se ha descrito que PRR activa factores angiogénicos como VEGF (Haque y col., 2017; Kanda y col., 2012; Satofuka y col., 2009) que se encuentran elevados en animales y pacientes discinéticos (Muñoz y col., 2014; Ohlin y col., 2011). La activación de PRR tras el tratamiento con L-DOPA podría activar la expresión de estas citoquinas, así como la de factores angiogénicos como VEGF favoreciendo el desarrollo de las discinesias. Es interesante destacar que PRR induce angiogénesis a través de la activación de ERK, uno de los principales marcadores moleculares de discinesias, y esta activación es independiente del SRA (Uraoka y col., 2009). El conocimiento de nuevas vías moleculares implicadas en los procesos inflamatorios que potencian el desarrollo de las discinesias abre vías a la investigación de nuevas dianas terapéuticas, ya que, se ha

demostrado que el uso de compuestos anti-inflamatorios reduce el desarrollo de las discinesias (Boi y col., 2019; Teema y col., 2016). Concretamente, en esta tesis hemos demostrado que el fasudil, inhibiendo la vía inflamatoria ROCK, disminuye el desarrollo de las discinesias y además puede reducirlas una vez que ya están establecidas.

PRR es uno de los receptores del SRA el cual tiene una importante implicación en procesos neuroinflamatorios (Labandeira-García y col., 2011, 2014, 2017), por ello hemos estudiado como varía la expresión de PRR en ratones deficientes para los dos receptores de angiotensina (AT1 y AT2). Los animales KOAT1 se caracterizan por presentar una mayor longevidad debido a una disminución del estrés oxidativo, así como por la sobreexpresión de genes que inducen supervivencia celular (Benigni y col., 2009). Además, estos animales tienen disminuida su respuesta neuroinflamatoria, y cuando se usan como modelo de EP presenta una menor activación microglial (Garrido-Gil y col., 2012). En estos animales la expresión de PRR disminuye con respecto a los controles pertenecientes a la cepa salvaje. En los animales KOAT2 ocurre el efecto contrario, ya que, presentaron una sobreexpresión de PRR. Estos animales muestran en condiciones basales, expresión elevada de citoquinas inflamatorias, tales como IL1- β y IL-6, así como mayores niveles de los indicadores de estrés oxidativo (Rodríguez-Pérez y col., 2020). También, tras el tratamiento con LPS los niveles prooxidativos o proinflamatorios se exacerbaban en estos animales comparándolos con sus homólogos de la cepa salvaje. Estos datos indican que el aumento de citoquinas proinflamatorias en estos animales podría estar mediado por PRR.

Resulta interesante destacar que cuando analizamos de forma separada la microglía adulta y las neuronas de los animales KOAT2 frente a animales de la cepa salvaje, observamos que la expresión de PRR está incrementada únicamente en la microglía, el principal tipo celular implicado en la respuesta inflamatoria en el SNC. Mientras que en neuronas no se aprecian cambios en los niveles de expresión del receptor entre los dos grupos de animales. Por otra parte, se ha descrito que la activación de PRR en la microglía tiene efectos proinflamatorios y proangiogénicos, ya que, induce la expresión de moléculas tales como

VEGF, IL-1 β , TNF- α , IL-6, ICAM (molécula de adhesión intracelular) y MCP1 (Monocito quimio-atrayente del inglés monocyte Chemoattractant Protein), así como, la caída en los niveles de IL-10 o arginasa-1 (Shi y col., 2014; Zhu y col., 2015). Tanto nuestros resultados como los datos publicados por otros autores (Peng y col., 2013; Shi y col., 2014; Zhu y col., 2015) ponen de manifiesto la implicación de PRR microglial en el desarrollo de los procesos neuroinflamatorios. Por ello decidimos profundizar en el análisis de los efectos de la activación de PRR microglial, así como estudiar que vías y mecanismos intracelulares están afectadas.

5.2.2 Interacción de PRR y la vía ROCK: papel de la microglía

La unión de PRR a su ligando implica una mayor actividad enzimática tanto de la renina como de su precursor la (pro)renina, lo cual se traduce en generación de AII, que a través de su receptor AT1 agrava la respuesta inflamatoria (Labandeira-García y col., 2011). Sin embargo, en nuestro estudio, hemos bloqueado el receptor AT1 para investigar la acción directa del receptor a nivel intracelular y estudiar sus efectos independientes de AII. Los mecanismos moleculares a través de los cuales el receptor ejerce sus efectos son muy diversos e implican algunas vías inflamatorias relacionadas con las MAPK y ERK (Ichihara y Yatabe, 2019). No obstante, esta es la primera vez que se estudia la relación de la activación de este receptor en el cerebro con la vía neuroinflamatoria ROCK.

En las células microgliales, hemos observado que la activación de PRR provoca aumento de los niveles de ARNm de la subunidad gp91 del complejo NADPH-oxidasa, así como una mayor actividad de este enzima. Estos datos concuerdan con los descritos en otros tipos celulares como neuronas y células epiteliales de retina, donde se ha descrito un incremento del estrés oxidativo mediado por PRR y NADPH-oxidasa (Haque y col., 2017; Peng y col., 2013, 2018). Nuestros datos sugieren que PRR podría actuar de manera similar al receptor AT1, el cual a través de su ligando específico la AII, produce un aumento del estrés oxidativo y de la neuroinflamación ya que, por una parte activa al complejo NADPH-oxidasa y por otra, produce una

mayor activación microglial en modelos de EP (Joglar y col., 2009; Labandeira-Garcia y col., 2017; Rodriguez-Pallares y col., 2008; Rodriguez-Perez y col., 2015).

Además del aumento del estrés oxidativo con la activación de PRR microglial observamos un incremento en la expresión de las citoquinas inflamatorias tales como IL6, TNF- α IL-1 β , lo cual concuerda con datos de otros estudios (Peng y col., 2014; Zhu y col., 2015) en los que se describe como PRR participa en la polarización de la microglía hacia el fenotipo M1. Nuestros resultados muestran por primera vez que la activación de PRR microglial produce un drástico aumento en la expresión de iNOS. La inducción de iNOS por parte de PRR ha sido también descrita en neuronas del núcleo paraventricular hipotalámico donde se relaciona con la regulación de la presión arterial (Huber y col., 2015).

Uno de nuestros resultados más destacables es que la activación de PRR conduce a un aumento de la expresión de ROCK en la microglía y que con el bloqueo de esta enzima, empleando fasudil, restaura los niveles de los marcadores inflamatorios a valores similares al control. Estos resultados sugieren que la respuesta pro-inflamatoria provocada por la activación de PRR se produce a través de la activación de la vía ROCK. El trabajo realizado por Zang y colaboradores en el año 2016 apoya nuestros resultados, ya que describen que la supresión de la expresión génica de ROCK en la microglía conlleva una disminución en la expresión de iNOS y de citoquinas inflamatorias lo que implica a su vez una menor activación microglial hacia el fenotipo M1. Resulta interesante destacar que en los animales discinéticos cuando se observa una activación de la vía ROCK, que a su vez provoca respuesta inflamatoria y estrés oxidativo, también se han detectado niveles de expresión de PRR elevados. La acción de PRR microglial conduce a un aumento de la neuroinflamación a través de la vía ROCK. Este aumento de la inflamación podría contribuir al desarrollo de las discinesias. El uso de fasudil podría estar minimizando este efecto.

Uno de los mecanismos intracelulares implicados en el proceso neurodegenerativo es la autofagia, clave para el mantenimiento de la homeostasis. En condiciones fisiológicas, los niveles basales de autofagia son requeridos para el mantenimiento y control de la calidad

de las proteínas, así como para eliminar proteínas, orgánulos y lípidos dañados, que de otro modo alteran y dañan la función celular normal (Klionsky y Emr, 2000). Sin embargo, si las ratios basales de autofagia decaen se produce la acumulación de proteínas y orgánulos dañados que contribuyen a la progresión de enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas (Gustafsson y Gottlieb, 2009; Hara y col., 2006). El papel de la autofagia en procesos neurodegenerativos ha sido estudiado principalmente en neuronas, pero hoy sabemos que la autofagia también es relevante en la microglía (Jülg y col., 2021). En la EP se ha descrito que las células microgliales son capaces de degradar acúmulos de α -sinucleína presentes en el medio extracelular y que el bloqueo del proceso de autofagia microglial conduce a la acumulación de la proteína mal plegada causando un incremento de la neurodegeneración (Choi y col., 2020). La autofagia también permite regular el proceso inflamatorio, así la inducción de la autofagia con activadores específicos como la rapamicina disminuye la expresión de citoquinas proinflamatorias en líneas microgliales activadas (Han y col., 2013; Liang y col., 2017). Nuestros resultados van en esta misma línea y muestran que la inflamación producida con la activación de PRR se debe a una disminución de la autofagia inducida a través de ROCK. Tanto el tratamiento con rapamicina como el uso de fasudil revierte la inhibición de la autofagia provocada por PRR y reduce la producción de la citoquina proinflamatoria IL-1 β .

Aunque este es el primer trabajo que evidencia, en la microglía, la implicación de la vía ROCK en el proceso de autofagia, existen otros trabajos que van en esta línea y reportan que, en la mayor parte de los tipos celulares y modelos estudiados, la activación de ROCK reduce la autofagia, y el uso de inhibidores como el fasudil, producen un aumento del flujo autofágico (Koch y col., 2018). En el SNC se ha demostrado que la inhibición de ROCK reduce los agregados proteicos mediante la activación de la autofagia y del sistema de degradación ubiquitina-proteasoma en enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Huntington (Bauer y col., 2009; Bauer y Nukina, 2009). De manera similar, en un modelo de EP, el inhibidor de ROCK fasudil aumentó la autofagia en las células SH-SY5Y favoreciendo la eliminación de α -sinucleína mutante A53T (Liu y col., 2016). El incremento de la

autofagia a través de la inhibición de la vía ROCK fue descrito en otros modelos neuronales en los que, o se utilizaron fármacos como fasudil, ripasudil o SR3677 (Iorio y col., 2010; Gentry y col., 2016; Kitaoka y col., 2017) o bien se realizó una supresión de la expresión génica de ROCK (Gentry y col., 2016; Koch y col., 2014). Sin embargo, en el estudio realizado por Ban y colaboradores en el año 2013 en neuronas corticales, describen que la inhibición de ROCK mediada por Y27632 presenta el efecto contrario y disminuye el proceso de autofagia, en este caso resulta beneficioso, ya que, se relaciona con un mayor crecimiento axonal. Además, algunos autores han descrito que la activación de ROCK puede resultar beneficiosa, ya que, evita la degeneración retrograda del axón en las neuronas dopaminérgicas mediante la inhibición del proceso de autofagia (Cheng y col., 2011; Tönges y col., 2012). Estos datos sugieren que los efectos que la actividad ROCK ejerce sobre el proceso de autofagia pueden variar en función de las condiciones celulares.

En cuanto a la relación entre PRR y autofagia hay numerosas publicaciones en las que se pone de manifiesto la importancia de PRR en este proceso. El uso de modelos de silenciamiento génico del receptor en cardiomiocitos y podocitos ha permitido conocer que PRR es esencial en la cascada de señalización de la autofagia (Kinouchi y col., 2010; Oshima y col., 2011; Riediger y col., 2011). La depleción génica del receptor en estos tipos celulares ha dado lugar a animales viables tan solo unos pocos días o semanas, debido a que la inactivación de PRR provoca la acumulación de gran cantidad de proteínas mal plegadas y restos de autofagosoma. Esto demuestra que la función de PRR es vital para el correcto funcionamiento del proceso de autofagia en las células (Binger y Muller, 2013). PRR es una proteína multifuncional que desempeña diversas funciones, la importancia de este receptor en el proceso de autofagia está relacionada con la forma truncada de PRR, que se genera a partir del mismo gen, también llamado ATP6AP2, pero que desempeña funciones muy diferentes. Esta forma truncada actúa como proteína accesoria de la ATPasa vacuolar, responsable de la acidificación de los compartimentos de la célula, por lo que resulta imprescindible para el proceso de autofagia (Ichihara y Yatabe, 2019). Sin embargo, nuestros resultados muestran

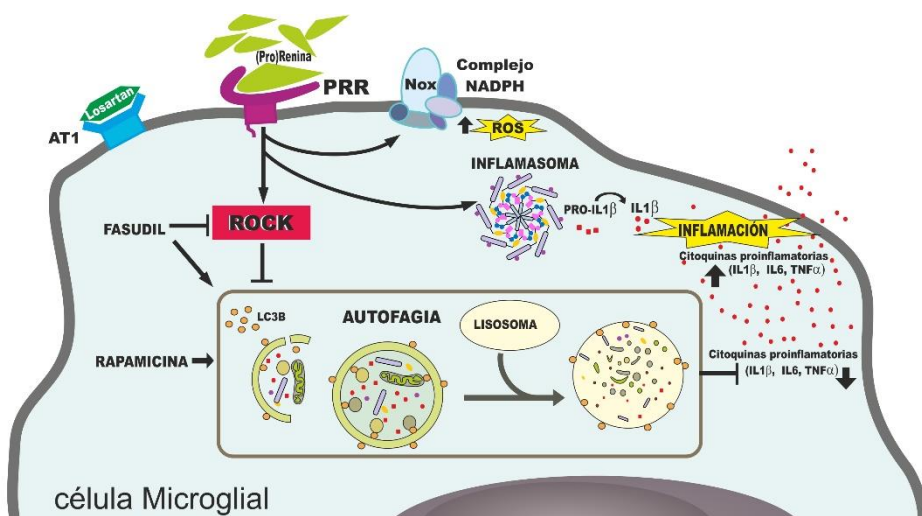
que la activación de PRR con el ligando específico produce una disminución de la autofagia, esto puede deberse a que los efectos descritos en los trabajos anteriormente citados van por vías independientes, ya que, la forma truncada de PRR carece de la zona de unión al ligando específico utilizado en este estudio, la (pro)renina.

Datos recientes sugieren que existe una relación importante entre la autofagia y el inflammasoma, un complejo multiproteico implicado, entre otras cosas, en la liberación de las citoquinas proinflamatorias IL-18 e IL-1 β (Wu y col., 2021) con lo que contribuye a la polarización de la microglía hacia su estado proinflamatorio (M1). A nivel de la microglía la activación del proceso de autofagia disminuye la inflamación, ya que, conlleva la degradación de componentes del inflammasoma así como la eliminación de los precursores de las citoquinas (Wu y col., 2021). Nuestros resultados muestran que la síntesis de IL1 β producida tras la activación de PRR está mediada por el complejo del inflammasoma, ya que, la inhibición de este mediante el uso de MCC disminuye los niveles de esta proteína. Sin embargo, nuestros datos indican que el MCC no afecta a los niveles de autofagia, lo que hace pensar que el complejo del inflammasoma podría actuar en la misma vía, pero en un tiempo posterior, o bien de forma independiente al proceso de autofagia.

Una vez demostrada la implicación de PRR y la vía ROCK en el proceso inflamatorio nos planteamos estudiar las repercusiones que esto tiene sobre las neuronas dopaminérgicas. Nuestros datos muestran que la activación microglial de PRR produce una disminución en la viabilidad dopaminérgica. Esto se debe posiblemente al aumento en el medio de cultivo de especies reactivas del oxígeno y citoquinas proinflamatorias producidas por la microglía en su estado M1, que afectan directamente a la supervivencia neuronal. Los pocos datos que relacionan a PRR con la EP van en este mismo sentido y el uso del péptido bloqueante de PRR en cultivos primarios mesencefálicos resulta beneficioso, mejorando la supervivencia dopaminérgica en modelos celulares de EP (Valenzuela y col., 2010). La importancia de la activación microglial en la supervivencia dopaminérgica ha sido puesto de manifiesto en varios estudios, así las sustancias que inducen la activación microglial hacia su fenotipo M1 producen además un

aumento en la degeneración de las neuronas dopaminérgicas (Chen y col., 2019; Ma y col., 2015; Miller y col., 2016). De modo similar la inhibición de la activación microglial mediante compuestos anti-inflamatorios reduce la liberación de citoquinas, lo que a su vez tiene efectos protectores en las células dopaminérgicas cultivadas con el MC que proviene de microglía (Seo y col., 2017; Tran y col., 2008). El uso de fasudil en microglía aumenta el proceso de autofagia y disminuye la producción de citoquinas provocada tras la activación de PRR y como consecuencia observamos una mejora en la viabilidad neuronal. Estos datos concuerdan con publicaciones previas en las que se demuestra la implicación de la vía ROCK en la degeneración dopaminérgica (Barcia y col., 2012; Borrajo y col., 2014b; Tonges y col., 2012, Villar-Cheda y col., 2012). Se ha visto además en modelos de EP que la activación de ROCK ocurre fundamentalmente en las células microgliales y que la mejora en la supervivencia neuronal inducida por la inhibición de ROCK está mediada por la microglía (Borrajo y col., 2014b; Villar-Cheda y col., 2012).

En resumen, la activación microglial inducida por PRR activa la vía ROCK, provocando un aumento de la inflamación a través de la disminución del proceso de autofagia. La inhibición de la vía ROCK con fasudil tiene efectos beneficiosos, ya que, se reduce la expresión de las moléculas inflamatorias recuperando los niveles basales del proceso de autofagia, lo cual mejora la viabilidad neuronal (ver esquema 6).



Esquema 6. Efectos de la activación de PRR en las células de la microglía. La unión de la (pro)renina a PRR provoca activación de la vía ROCK, del complejo NADPH-oxidasa y del complejo del inflamasoma, dando lugar a un aumento de la respuesta inflamatoria en las células generado por una disminución del proceso de autofagia. La inhibición de la vía ROCK con fasudil reduce los niveles de inflamación activando el proceso de autofagia. Abreviaturas: AT1, receptor de angiotensina tipo 1; PRR, receptor de (Pro)renina; ROS, de las siglas en inglés *reactive oxygen species*; ROCK, Rho quinasa; IL-1 β , interleucina 1 β , IL-6, interleucina 6; TNF- α , factor de necrosis tumoral; LC3B, proteína de unión a microtúbulos. El esquema del inflamasoma ha sido obtenido de Wikimedia Commons. Licencia CC-BY-SA autor: Ле Лой.

5.3 PAPEL DEL COLESTEROL EN LAS DISCINESIAS INDUCIDAS POR L-DOPA

En los últimos años se ha relacionado el SRA y la vía ROCK con el metabolismo del colesterol y se ha discutido su implicación en enfermedades neurodegenerativas. En esta tesis hemos visto que AII aumenta la síntesis de colesterol en el cerebro y en el modelo de EP y discinesias también se produce un aumento en los niveles de colesterol. Hemos observado también que el empleo de inhibidores de la síntesis de colesterol como las estatinas reduce las discinesias, sugiriendo que

estos compuestos podrían representar una nueva estrategia terapéutica para el tratamiento de las discinesias inducidas por L-DOPA en la EP.

5.3.1 Expresión del colesterol en el modelo de discinesias y efecto de la inhibición de la síntesis de colesterol

En este estudio hemos demostrado que en los animales discinéticos se produce un aumento sustancial en el estriado de los niveles de ARNm de la principal enzima de síntesis del colesterol, HMGCR. De la misma manera, se ha observado también gran incremento en los niveles de ARNm para SREBP2. SREBP2 es un factor de transcripción que regula la síntesis de colesterol, de manera que cuando los niveles de colesterol de la célula disminuyen, se desencadena la activación de una cascada de señalización, que permite que este factor de transcripción se transloque al núcleo y controle la activación transcripcional de varios genes involucrados en el metabolismo del colesterol y de los ácidos grasos (Brown y col., 2002; Eberle y col., 2004; Hua y col., 1993), como es el caso de la HMGCR (Horton y col., 2002). A su vez, la HMGCR es la enzima limitante de la vía síntesis de colesterol (Petrov y col., 2016).

Inhibiendo la síntesis del colesterol a través de la administración oral de simvastatina, hemos observado que se produce una reducción significativa en el desarrollo de las discinesias a partir de la tercera inyección con L-DOPA, hasta que finaliza el tratamiento tres semanas después. Esta reducción se produjo en todos los componentes discinéticos analizados, pero la diferencia se acentuó en el caso del componente orolingual. En el análisis del movimiento rotacional, por el contrario, se observó un aumento en los animales tratados con simvastatina, aunque no llegó a ser significativo, indicando que este compuesto no disminuye las discinesias a través de una reducción de la actividad motora.

En algunos estudios previos se observaron resultados similares empleando simvastatina u otro tipo de estatinas en diferentes modelos. Concretamente, se ha descrito que la lovastatina reduce las discinesias en el modelo de 6-OHDA en rata (Schuster y col., 2008). En este estudio, los componentes orolingual y axial se redujeron drásticamente mientras que el componente extremidad no lo hizo e incluso empeoró en los animales que además de con L-DOPA fueron tratados con

lovastatina. La simvastatina produce efectos similares en ratas (Wang y col., 2015) y en monos a dosis bajas, sin interferir con la eficacia terapéutica de la L-DOPA (3mg/kg; Tison y col., 2013). En cambio, en un ensayo en pacientes se han testado dosis de hasta 40 mg/kg sin obtener resultados significativos, sugiriendo que serían necesarias dosis más altas que quizás no sean compatibles con un tratamiento prolongado seguro (Tison y col., 2013). En este estudio hemos empleado una dosis de 15 mg/kg por vía oral, ya que, es la vía más útil para un tratamiento clínico. Dentro de las estatinas, la simvastatina es una de las que posee propiedades farmacocinéticas más interesantes, como la capacidad para atravesar la BHE (Najib y col., 2003; Patel y col., 2008). Es interesante destacar también que en modelos de EP las estatinas producen efectos neuroprotectores, atribuidos en gran medida a sus potentes propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y anti-apoptóticas (Ghosh y col., 2009; Koob y col., 2010; Mutez y col., 2009; Selley 2005; Wolozin y col., 2007; Yan y col., 2011, 2014; 2018; 2019). Curiosamente, se ha demostrado que el tratamiento con estatinas suprime la agregación de α -sinucleína en cultivos neuronales (Bar-On y col., 2008), así como en modelos animales de EP (Gosh y col., 2009; Koob y col., 2010). Por lo tanto, esto sugiere que la reducción de colesterol mediante estatinas en individuos con EP podría atenuar la acumulación de agregados de α -sinucleína en el cerebro (Roy y Pahan, 2011). En base a estas evidencias actualmente está en marcha un ensayo clínico que usa simvastatina como potencial agente neuroprotector para pacientes con EP (NCT02787590). No obstante, los estudios epidemiológicos de asociación entre estatinas y riesgo de padecer EP son poco consistentes. Algunos estudios demuestran que el uso de las estatinas reduce el riesgo de EP (Bai y col., 2016; Huang y col., 2007; Lee y col., 2013; Wahner y col., 2008), otros no muestran diferencias (Ritz y col., 2010; Rozani y col., 2017) o incluso otros informan de un aumento en el riesgo de padecer EP provocado por las estatinas (Huang y col., 2015; Liu y col., 2017a).

Varios mecanismos podrían estar implicados en la reducción de las discinesias por parte de las estatinas. Entre ellos, destaca que las estatinas inhiben la fosforilación de ERK1/2 (Schuster y col., 2008; Tison y col., 2013; Wang y col., 2015) y los movimientos discinéticos

están asociados con una activación de esta vía (Gerfen y col., 2002; Westin y col., 2007). Sin embargo, las estatinas podrían reducir también las discinesias a través de otros mecanismos, relacionados con la neuroinflamación, el SRA y la vía ROCK.

Experimentos realizados en ratones tratados con estatinas como la cerivastatina han demostrado que éstas reducen la neuroinflamación tras la administración de LPS, disminuyendo los niveles de TNF- α , IL-1 β y IL-16 (Ando y col., 2000; Chaudhry y col., 2008). En estudios previos se ha descrito que estos compuestos se encuentran elevados en modelos de discinesias (Barnum y col., 2008). Por lo tanto, esto indica que las estatinas podrían reducir las discinesias a través de una disminución de los procesos inflamatorios mediados a través de estas citoquinas.

En los resultados de esta tesis hemos demostrado que en las discinesias se produce una activación de una de las principales vías inflamatorias, la vía ROCK, y que la inhibición de esa vía a través de la administración de fasudil reduce las discinesias. También hemos observado que en los animales tratados con L-DOPA y simvastatina que presentan una reducción en los movimientos discinéticos, se produjo una disminución significativa en la expresión de ROCK, así como de la expresión de la enzima limitante para la síntesis del colesterol.

Varios autores han descrito que las estatinas inhiben la vía ROCK en diferentes tejidos como pulmón (Li y col., 2008; Wang y col., 2015), hígado (Relja y col., 2010) y también en el sistema nervioso central, en la médula espinal (Osawa y col., 2016). En esta tesis hemos demostrado por primera vez que las estatinas reducen ROCK también en el cerebro. En modelos de lesión del nervio ciático se ha descrito que la simvastatina reduce la expresión de ROCK II y la traslocación de Rho A, acompañado de una reducción de la respuesta glial (Osawa y col., 2016). De esta manera, las estatinas podrían también reducir las discinesias a través de la reducción de la vía ROCK, dando lugar a una disminución de la respuesta inflamatoria. Los efectos neuroprotectores atribuidos las estatinas podrían deberse también a la reducción de la activación de la vía ROCK.

En trabajos publicados por nuestro grupo de investigación se ha demostrado que el SRA activa ROCK (Borrajó y col., 2014b; Labandeira-García y col., 2014; Rodríguez-Pérez y col., 2013; Villar-Cheda y col., 2012;). Además, el SRA desempeña un papel clave en la neuroinflamación en los modelos de EP y manipulando este sistema se reducen las discinesias (Muñoz y col., 2014). Recientemente se ha descrito que la AII aumenta la síntesis del colesterol en algunos tipos celulares como los podocitos (Yang y col., 2017). Por lo tanto, el SRA podría estar implicado también en la reducción de las discinesias a través de las estatinas.

5.3.2 Interacciones entre el colesterol, el SRA y la vía ROCK

La relación del colesterol con el SRA fue investigada para estudiar los mecanismos implicados en el incremento de colesterol que se produce en los animales discinéticos. Resulta interesante destacar que la simvastatina reduce los efectos de la AII en enfermedades cardiovasculares, y este efecto protector se produce a través de la inhibición de ROCK (Li y col., 2008).

En esta tesis se describe por primera vez en el SNC, que la infusión de AII intraventricular en ratas aumenta la síntesis de colesterol en la sustancia negra y en el estriado. En algunos estudios recientes, se ha descrito que la angiotensina modifica la síntesis del colesterol. En podocitos se ha demostrado que la AII aumenta la síntesis de colesterol, produciendo un aumento en los niveles de expresión de HMGCR y SREBP2 (Yang y col., 2017). Además, la AII inhibe significativamente la salida de colesterol en macrófagos THP-1. Mientras que el tratamiento de AII con A1-7 es capaz de restaurar el flujo de colesterol en este tipo celular, aumentando la expresión de los receptores ABC (Yang y col., 2015b).

Se ha estudiado también la relación entre el SRA y la hipercolesterolemia en otras enfermedades neurodegenerativas frecuentes como la enfermedad de Alzheimer. Se ha descrito en estudios epidemiológicos que altos niveles de colesterol se asocian con riesgo a padecer enfermedad de Alzheimer (Kivipelto y col., 2002; Solomon y col., 2007). Por otra parte, se demostró un incremento en la acumulación de placas amiloides en modelos animales de enfermedad

de Alzheimer con una dieta rica en colesterol (Refolo y col., 2000). Asimismo, se ha observado en el hipocampo (Simons y col., 1998) y en cultivos celulares (Frears y col., 1999) que si disminuyen los niveles de colesterol la carga de dichas placas también se reduce. Por otro lado, en pacientes con hipertensión y Alzheimer se encontraron altos niveles de ECA en el análisis *postmortem* del hipocampo, córtex frontal o núcleo caudado, lo cual se relaciona también con mayor riesgo de sufrir la enfermedad (Miners y col., 2008). La hipótesis de la interacción entre el SRA y la hipercolesterolemia se basa en que altos niveles de colesterol en sangre llevan a la penetración en cerebro de cantidades elevadas del metabolito 27-OHC (Petek y col., 2018), el cual es capaz de causar a lo largo de la vida efectos deletéreos relacionados con la inflamación y la disfunción sináptica (Ali y col., 2013; Björkhem y col., 2009; Zhang y col., 2015). Además, el 27-OHC puede inducir la sobreexpresión del SRA cerebral a nivel de sustrato, de enzimas y de receptores (Ismail y col., 2017; Mateos y col., 2011). Lo cual se traduce en una exacerbación de la inflamación y del estrés oxidativo que afecta a la supervivencia neuronal (Labandeira-García y col., 2014).

Esto mismo podría estar ocurriendo en otras enfermedades neurodegenerativas como es el caso de la EP, ya que, se conoce ampliamente que la sobreactivación del SRA cerebral eleva la denervación dopaminérgica a través de la inducción exacerbada de la respuesta inflamatoria, así como la generación de especies reactivas del oxígeno (Labandeira-García y col., 2014). En concreto, en esta tesis, hemos demostrado que el principal efector del SRA, la AII induce la síntesis de colesterol en la sustancia negra y en el estriado, lo cual a su vez podría estar provocando una sobreactivación del sistema que generase mayores niveles de neuroinflamación en el cerebro. De la misma forma, se observaron mayores niveles de colesterol en la SN de ratones KOAT2, modelo en el que se caracterizan por su estado proinflamatorio. Mientras que en los animales KOAT1, en los que la inflamación se encuentra atenuada se observó que la expresión de colesterol disminuye. Asimismo, también se ha descrito que defectos en el metabolismo del colesterol conducen a enfermedades funcionales

y estructurales del SNC como la enfermedad de Huntington, la enfermedad de Alzheimer o la EP (Block y col., 2010; Di Paolo y Kim, 2011; Wang y col., 2011).

Tras el análisis del papel de AII en la síntesis del colesterol en los distintos tipos celulares, hemos visto que la AII exagera la síntesis de colesterol en las neuronas, mientras que en los astrocitos esta se ve disminuida. Del mismo modo, se observó que en las neuronas aumentan los niveles del receptor que media la liberación de colesterol, ABCA1, y por el contrario, en los astrocitos se incrementa la expresión de los receptores que facilitan su entrada, LDLR. En trabajos anteriores, se ha descrito que la acumulación de especies reactivas del oxígeno induce la formación de lípidos en las neuronas, los cuales son transferidos a la glía por lipoproteínas, donde se acumulan formando lo que se conoce como gotas lipídicas (Liu y col., 2017b). Los astrocitos degradan los ácidos grasos almacenados a través de β -oxidación mitocondrial en respuesta a la hiperactivación neuronal, para protegerlas de la toxicidad (Iannou y col., 2018).

Nuestros resultados sugieren que el estrés oxidativo y la generación de especies reactivas del oxígeno producida por la AII, provoca un cambio en la homeostasis del colesterol, aumentando su síntesis en las neuronas dopaminérgicas. Al mismo tiempo, se produce un aumento de expresión de los receptores que median la salida de colesterol, posiblemente para liberar el exceso de este. Los astrocitos, por su parte, aumentan la expresión de receptores que facilitan su entrada, posiblemente para captar el colesterol liberado por las neuronas y almacenarlo en forma de gotas lipídicas como mecanismo de protección neuronal.



6. CONCLUSIONES



6. CONCLUSIONES

1. En animales inyectados con 6-OHDA, modelo neurotóxico de EP, se produce una activación de la vía ROCK una semana después de la lesión, mientras que en lesiones crónicas la expresión de ROCK se restaura a niveles fisiológicos o incluso más bajos. Estos cambios están relacionados con el curso de la neuroinflamación tras la lesión dopaminérgica.
2. En animales discinéticos se produce un aumento de la actividad ROCK, así como de marcadores inflamatorios como TNF- α e IL-1 β , apoyando la hipótesis de que la neuroinflamación interviene en el desarrollo de las discinesias inducidas por L-DOPA.
3. El inhibidor de la vía ROCK, fasudil, reduce el desarrollo las discinesias y disminuye la intensidad de éstas en animales con discinesias ya establecidas, sin interferir en el efecto terapéutico de la L-DOPA.
4. El fasudil reduce las discinesias a través de la disminución de la inflamación y la angiogénesis. Como el fasudil posee además efectos neuroprotectores sobre las neuronas dopaminérgicas, estos datos sugieren que este compuesto podría ser un buen candidato para el tratamiento de las discinesias inducidas por L-DOPA y a la vez frenar la progresión de la EP.
5. Existe una correlación entre los estados inflamatorios y la expresión de PRR. Los niveles de expresión de PRR aumentan en estadios agudos de lesión en el modelo de 6-OHDA, en animales discinéticos y en la microglía de animales deficientes para el receptor AT2.

6. La activación de PRR en las células microgliales da lugar a un aumento del estrés oxidativo y del proceso inflamatorio mediado por de la activación de la vía ROCK y de la reducción de la autofagia.
7. La inhibición de la vía ROCK con fasudil resulta beneficiosa, ya que, mediante la activación de la autofagia revierte la inflamación inducida por PRR, lo que conlleva aumento de la viabilidad neuronal.
8. En los animales discinéticos se produce un aumento de la síntesis de colesterol. La simvastatina, inhibidora de la enzima de síntesis de colesterol, y compuesto empleado habitualmente en clínica, reduce el desarrollo de las discinesias inducidas por L-DOPA en modelos animales y disminuye la activación de la vía ROCK.
9. Existe una relación entre el SRA y el metabolismo del colesterol a nivel cerebral. La AII intraventricular aumenta de los niveles de colesterol en el estriado y la sustancia negra. Además, en la sustancia negra de animales deficientes para el receptor AT1 se observan menores niveles de colesterol, mientras que este aumenta en los animales deficientes para el receptor AT2.
10. El tratamiento de neuronas dopaminérgicas con AII produce un aumento en la síntesis y liberación de colesterol. Por el contrario, en astrocitos la AII genera incremento de su captación y disminución de su síntesis. Estos resultados sugieren que en condiciones de estrés oxidativo las neuronas dopaminérgicas producen mayor cantidad de colesterol, el cual es captado por los astrocitos, que podrían estar desempeñando un mecanismo de protección neuronal frente al acúmulo de lípidos.

6. CONCLUSIONS

1. Animals injected with 6-OHDA, as a neurotoxic model of PD, show an activation of the ROCK pathway one week after injury, whereas in chronic lesions ROCK this expression is restored to physiological levels or even lower. These changes are related to the time course of neuroinflammation after dopaminergic lesion.
2. In dyskinetic animals, there is an increase in ROCK activity, as well as in inflammatory markers such as TNF- α and IL-1 β , supporting the hypothesis that neuroinflammation is involved in the development of L-DOPA-induced dyskinesias.
3. The ROCK inhibitor, fasudil, reduces the development of dyskinesias and decreases their intensity in animals with established dyskinesias, without interfering with the therapeutic effect of L-DOPA.
4. Fasudil reduces dyskinesias by decreasing inflammation and angiogenesis. Fasudil also has neuroprotective effects on dopaminergic neurons, therefore these data suggest that this compound could be a good candidate for treating L-DOPA-induced dyskinesias and slowing the progression of PD.
5. There is a correlation between inflammatory states and PRR expression. PRR expression levels increase in acute stages of the 6-OHDA model, in dyskinetic animals and in the microglia of AT2 receptor deficient animals.
6. Activation of the PRR in microglial cells results in an increase of oxidative stress and inflammatory process mediated by activation of the ROCK pathway and reduced autophagy.

7. Inhibition of the ROCK pathway with fasudil reverses PRR-induced inflammation by activating autophagy, leading to an increased neuronal viability.
8. In dyskinetic animals, there is an increase in cholesterol synthesis. The HMGCR enzyme inhibitor simvastatin, a compound commonly used in clinical practice, reduces the development of L-DOPA-induced dyskinesias in animal models decreasing the activation of the ROCK pathway.
9. There is a link between RAS and cholesterol metabolism in the brain. Intraventricular angiotensin increases cholesterol levels in the striatum and the substantia nigra. Furthermore, lower cholesterol levels are observed in the substantia nigra of AT1 receptor-deficient animals, whereas cholesterol levels increase in AT2 receptor-deficient animals.
10. Dopaminergic neurons treated with All present an increase in cholesterol synthesis and liberation/release/exportation. Conversely, All-treated astrocytes present an increased uptake but a decreased synthesis of cholesterol. These results suggest that under oxidative stress, dopaminergic neurons produce a higher quantity of cholesterol which is taken up by astrocytes, which may be playing a role in neuronal protection against lipid accumulation.



7. BIBLIOGRAFÍA



7. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed, L. A., Darwish, H. A., Abdelsalam, R. M., y Amin, H. A. (2016). Role of Rho Kinase inhibition in the protective effect of fasudil and simvastatin against 3-nitropropionic Acid-Induced Striatal Neurodegeneration and Mitochondrial Dysfunction in Rats. *Molecular neurobiology*, 53(6), 3927–3938. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9303-2>
- Alcacer, C., Andreoli, L., Sebastianutto, I., Jakobsson, J., Fieblinger, T., y Cenci, M. A. (2017). Chemogenetic stimulation of striatal projection neurons modulates responses to Parkinson's disease therapy. *The Journal of Clinical Investigation*, 127(2), 720–734. <https://doi.org/10.1172/JCI90132>
- Alexander, G. (1986). Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. *Annual Review of Neuroscience*, 9(1), 357–381. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.9.1.357>
- Ali, Z., Heverin, M., Olin, M., Acimovic, J., Lövgren-Sandblom, A., Shafaati, M., Bävner, A., Meiner, V., Leitersdorf, E., y Björkhem, I. (2013). On the regulatory role of side-chain hydroxylated oxysterols in the brain. Lessons from CYP27A1 transgenic and Cyp27a1(-/-) mice. *Journal of Lipid Research*, 54(4), 1033–1043. <https://doi.org/10.1194/jlr.M034124>
- Allen, A. M., MacGregor, D. P., Chai, S. Y., Donnan, G. A., Kaczmarczyk, S., Richardson, K., Kalnins, R., Ireton, J., y Mendelsohn, F. A. (1992). Angiotensin II receptor binding associated with nigrostriatal dopaminergic neurons in human basal ganglia. *Annals of Neurology*, 32(3), 339–344. <https://doi.org/10.1002/ana.410320306>
- Amano, M., Ito, M., Kimura, K., Fukata, Y., Chihara, K., Nakano, T., Matsuura, Y., y Kaibuchi, K. (1996). Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *The Journal of Biological Chemistry*, 271(34), 20246–20249. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.34.20246>
- Ando, H., Takamura, T., Ota, T., Nagai, Y., y Kobayashi, K. (2000). Cerivastatin improves survival of mice with lipopolysaccharide-induced sepsis. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 294(3), 1043–1046.
- Antonini, A., Tolosa, E., Mizuno, Y., Yamamoto, M., y Poewe, W. H. (2009). A reassessment of risks and benefits of dopamine agonists in Parkinson's disease. *The Lancet. Neurology*, 8(10), 929–937. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70225-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70225-X)
- Arimura, N., Inagaki, N., Chihara, K., Ménager, C., Nakamura, N., Amano, M., Iwamatsu, A., Goshima, Y., y Kaibuchi, K. (2000). Phosphorylation of collapsin response mediator protein-2 by Rho-kinase. Evidence for two separate signaling pathways for growth cone collapse. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(31), 23973–23980. <https://doi.org/10.1074/jbc.M001032200>

- Ba, M., Kong, M., Yang, H., Ma, G., Lu, G., Chen, S., y Liu, Z. (2006). Changes in subcellular distribution and phosphorylation of GluR1 in lesioned striatum of 6-hydroxydopamine-lesioned and l-dopa-treated rats. *Neurochemical Research*, 31(11), 1337–1347. <https://doi.org/10.1007/s11064-006-9177-9>
- Babior, B. M. (2004). NADPH oxidase. *Current Opinion in Immunology*, 16(1), 42–47. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2003.12.001>
- Bae, E.-J., Lee, H.-J., Rockenstein, E., Ho, D.-H., Park, E.-B., Yang, N.-Y., Desplats, P., Masliah, E., y Lee, S.-J. (2012). Antibody-aided clearance of extracellular α -synuclein prevents cell-to-cell aggregate transmission. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 32(39), 13454–13469. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1292-12.2012>
- Bai, S., Song, Y., Huang, X., Peng, L., Jia, J., Liu, Y., y Lu, H. (2016). Statin use and the risk of Parkinson's disease: An Updated Meta-Analysis. *PloS One*, 11(3), e0152564. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152564>
- Balestrino, R., y Schapira, A. H. V. (2020). Parkinson disease. *European Journal of Neurology*, 27(1), 27–42. <https://doi.org/10.1111/ene.14108>
- Ban, B. K., Jun, M. H., Ryu, H. H., Jang, D. J., Ahmad, S. T., y Lee, J.-A. (2013). Autophagy negatively regulates early axon growth in cortical neurons. *Molecular and Cellular Biology*, 33(19), 3907–3919. <https://doi.org/10.1128/mcb.00627-13>
- Bara-Jimenez, W., Bibbiani, F., Morris, M. J., Dimitrova, T., Sherzai, A., Mouradian, M. M., y Chase, T. N. (2005). Effects of serotonin 5-HT1A agonist in advanced Parkinson's disease. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 20(8), 932–936. <https://doi.org/10.1002/mds.20370>
- Barcia, C., Bautista, V., Sánchez-Bahillo, A., Fernández-Villalba, E., Faucheux, B., Poza y Poza, M., Fernandez Barreiro, A., Hirsch, E. C., y Herrero, M.-T. (2005a). Changes in vascularization in substantia nigra pars compacta of monkeys rendered parkinsonian. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)*, 112(9), 1237–1248. <https://doi.org/10.1007/s00702-004-0256-2>
- Barcia, C., de Pablos, V., Bautista-Hernández, V., Sánchez-Bahillo, A., Bernal, I., Fernández-Villalba, E., Martín, J., Bañón, R., Fernández-Barreiro, A., y Herrero, M.-T. (2005b). Increased plasma levels of TNF-alpha but not of IL1-beta in MPTP-treated monkeys one year after the MPTP administration. *Parkinsonism y Related Disorders*, 11(7), 435–439. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2005.05.006>
- Barcia, C., Hunot, S., Guillemin, G. J., y Pitossi, F. (2011). Inflammation and Parkinson's disease. *Parkinson's Disease*, 2011, 729054. <https://doi.org/10.4061/2011/729054>
- Barcia, C., Ros, C. M., Annese, V., Sauvage, M. A. C. De, Ros-Bernal, F., Gómez, A., Yuste, J. E., Campuzano, C. M., De Pablos, V., Fernandez-Villalba, E., y Herrero, M. T. (2012). ROCK/Cdc42-mediated microglial motility and gliapse formation lead to phagocytosis of degenerating dopaminergic neurons in vivo. *Scientific Reports*, 2, 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep00809>
- Barker, R. A., Parmar, M., Kirkeby, A., Björklund, A., Thompson, L., y Brundin, P. (2016). Are stem cell-based therapies for Parkinson's disease ready for the clinic in 2016? *Journal of Parkinson's Disease*, 6(1), 57–63. <https://doi.org/10.3233/JPD-160798>
- Barnum, C. J., Eskow, K. L., Dupre, K., Blandino, P., Deak, T., y Bishop, C. (2008). Exogenous corticosterone reduces l-DOPA-induced dyskinesia in the hemi-parkinsonian rat: Role for

- interleukin-1 β . *Neuroscience*, 156(1), 30–41.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.07.016>
- Bar-On, P., Crews, L., Koob, A. O., Mizuno, H., Adame, A., Spencer, B., y Masliah, E. (2008). Statins reduce neuronal alpha-synuclein aggregation in in vitro models of Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, 105(5), 1656–1667. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05254.x>
- Bastide, M. F., Meissner, W. G., Picconi, B., Fasano, S., Fernagut, P. O., Feyder, M., Francardo, V., Alcacer, C., Ding, Y., Brambilla, R., Fisone, G., Jon Stoessl, A., Bourdenx, M., Engeln, M., Navailles, S., De Deurwaerdère, P., Ko, W. K. D., Simola, N., Morelli, M., ... Bézard, E. (2015). Pathophysiology of L-dopa-induced motor and non-motor complications in Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology*, 132, 96–168.
<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.07.002>
- Batenburg, W. W., y Danser, A. H. J. (2012). (Pro)renin and its receptors: pathophysiological implications. *Clinical Science (London, England: 1979)*, 123(3), 121–133.
<https://doi.org/10.1042/CS20120042>
- Bauer, P. O., y Nukina, N. (2009). Enhanced degradation of mutant huntingtin by rho kinase inhibition is mediated through activation of proteasome and macroautophagy. *Autophagy*, 5(5), 747–748. <https://doi.org/10.4161/auto.5.5.8704>
- Bauer, P. O., Wong, H. K., Oyama, F., Goswami, A., Okuno, M., Kino, Y., Miyazaki, H., y Nukina, N. (2009). Inhibition of Rho kinases enhances the degradation of mutant huntingtin. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(19), 13153–13164. <https://doi.org/10.1074/jbc.M809229200>
- Beattie, E. C., Stellwagen, D., Morishita, W., Bresnahan, J. C., Ha, B. K., Von Zastrow, M., Beattie, M. S., y Malenka, R. C. (2002). Control of synaptic strength by glial TNF α . *Science (New York, N. Y.)*, 295(5563), 2282–2285. <https://doi.org/10.1126/science.1067859>
- Beaudoin-Gobert, M., Epinat, J., Météreau, E., Duperrier, S., Neumane, S., Ballanger, B., Lavenne, F., Liger, F., Tourvielle, C., Bonnefoi, F., Costes, N., Bars, D. Le, Broussolle, E., Thobois, S., Tremblay, L., y Sgambato-Faure, V. (2015). Behavioural impact of a double dopaminergic and serotonergic lesion in the non-human primate. *Brain: A Journal of Neurology*, 138(Pt 9), 2632–2647. <https://doi.org/10.1093/brain/awv183>
- Benazzouz, A., Gross, C., Féger, J., Boraud, T., y Bioulac, B. (1993). Reversal of rigidity and improvement in motor performance by subthalamic high-frequency stimulation in MPTP-treated monkeys. *The European Journal of Neuroscience*, 5(4), 382–389.
<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1993.tb00505.x>
- Benigni, A., Corna, D., Zoja, C., Sonzogni, A., Latini, R., Salio, M., Conti, S., Rottoli, D., Longaretti, L., Cassis, P., Morigi, M., Coffman, T. M., y Remuzzi, G. (2009). Disruption of the Ang II type 1 receptor promotes longevity in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(3), 524–530.
<https://doi.org/10.1172/JCI36703>
- Bergström, A.-L., Kallunki, P., y Fog, K. (2016). Development of passive immunotherapies for synucleinopathies. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 31(2), 203–213. <https://doi.org/10.1002/mds.26481>
- Bermel, C., Tönges, L., Planchamp, V., Gillardon, F., Weishaupt, J. H., Dietz, G. P. H., Bähr, M., y Lingor, P. (2009). Combined inhibition of Cdk5 and ROCK additively increase cell survival, but not the regenerative response in regenerating retinal ganglion cells. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 42(4), 427–437. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2009.09.005>
- Berry, C., La Vecchia, C., y Nicotera, P. (2010). Paraquat and Parkinson's disease. *Cell Death and Differentiation*, 17(7), 1115–1125. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.217>

- Bertler, A., y Rosengren, E. (1959). Occurrence and distribution of dopamine in brain and other tissues. *Experientia*, 15(1), 10–11. <https://doi.org/10.1007/BF02157069>
- Betarbet, R., Sherer, T. B., MacKenzie, G., Garcia-Osuna, M., Panov, A. V., y Greenamyre, J. T. (2000). Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nature Neuroscience*, 3(12), 1301–1306. <https://doi.org/10.1038/81834>
- Bézard, E., Ferry, S., Mach, U., Stark, H., Leriche, L., Boraud, T., Gross, C., y Sokoloff, P. (2003). Attenuation of levodopa-induced dyskinesia by normalizing dopamine D3 receptor function. *Nature Medicine*, 9(6), 762–767. <https://doi.org/10.1038/nm875>
- Bézard, E., Muñoz, A., Tronci, E., Pioli, E. Y., Li, Q., Porras, G., Björklund, A., y Carta, M. (2013). Anti-dyskinetic effect of amipirtoline in animal models of L-DOPA-induced dyskinesia. *Neuroscience Research*, 77(4), 242–246. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2013.10.002>
- Bézard, E., Pioli, E. Y., Li, Q., Girard, F., Mutel, V., Keywood, C., Tison, F., Rascol, O., y Poli, S. M. (2014). The mGluR5 negative allosteric modulator dipraglurant reduces dyskinesia in the MPTP macaque model. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 29(8), 1074–1079. <https://doi.org/10.1002/mds.25920>
- Bézard, E., Tronci, E., Pioli, E. Y., Li, Q., Porras, G., Björklund, A., y Carta, M. (2013). Study of the antidyskinetic effect of eltopazine in animal models of levodopa-induced dyskinesia. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 28(8), 1088–1096. <https://doi.org/10.1002/mds.25366>
- Binger, K. J., y Muller, D. N. (2013). Autophagy and the (Pro)renin receptor. *Frontiers in Endocrinology*, 4(October), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00155>
- Birkmayer, W., y Hornykiewicz, O. (1998). The effect of 1-3,4-dihydroxyphenylalanine (=DOPA) on akinesia in parkinsonism. *Parkinsonism y Related Disorders*, 4(2), 59–60. [https://doi.org/10.1016/s1353-8020\(98\)00013-3](https://doi.org/10.1016/s1353-8020(98)00013-3)
- Bishop, C., George, J. A., Buchta, W., Goldenberg, A. A., Mohamed, M., Dickinson, S. O., Eissa, S., y Eskow Jaunarajs, K. L. (2012). Serotonin transporter inhibition attenuates L-DOPA-induced dyskinesia without compromising L-DOPA efficacy in hemi-parkinsonian rats. *The European Journal of Neuroscience*, 36(6), 2839–2848. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2012.08202.x>
- Björkhem, I. (2006). Crossing the barrier: oxysterols as cholesterol transporters and metabolic modulators in the brain. *Journal of Internal Medicine*, 260(6), 493–508. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2006.01725.x>
- Björkhem, I., Cedazo-Minguez, A., Leoni, V., y Meaney, S. (2009). Oxysterols and neurodegenerative diseases. *Molecular Aspects of Medicine*, 30(3), 171–179. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2009.02.001>
- Björklund, A., y Lindvall, O. (2017). Replacing dopamine neurons in Parkinson's disease: How did it happen? *Journal of Parkinson's Disease*, 7(s1), S21–S31. <https://doi.org/10.3233/JPD-179002>
- Björklund, A., Stenevi, U., y Svendgaard, N. (1976). Growth of transplanted monoaminergic neurones into the adult hippocampus along the perforant path. *Nature*, 262(5571), 787–790. <https://doi.org/10.1038/262787a0>
- Blandini, F., Armentero, M.-T., y Martignoni, E. (2008). The 6-hydroxydopamine model: news from the past. *Parkinsonism y Related Disorders*, 14 Suppl 2, S124-9. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2008.04.015>
- Blandini, F., Cova, L., Armentero, M.-T., Zennaro, E., Levandis, G., Bossolasco, P., Calzarossa, C., Mellone, M., Giuseppe, B., Deliliers, G. L., Polli, E., Nappi, G., y Silani, V. (2010).

- Transplantation of undifferentiated human mesenchymal stem cells protects against 6-hydroxydopamine neurotoxicity in the rat. *Cell Transplantation*, 19(2), 203–217. <https://doi.org/10.3727/096368909X479839>
- Blesa, J., Phani, S., Jackson-Lewis, V., y Przedborski, S. (2012). Classic and new animal models of Parkinson's disease. *Journal of Biomedicine y Biotechnology*, 2012, 845618. <https://doi.org/10.1155/2012/845618>
- Block, R. C., Dorsey, E. R., Beck, C. A., Brenna, J. T., y Shoulson, I. (2010). Altered cholesterol and fatty acid metabolism in Huntington disease. *Journal of Clinical Lipidology*, 4(1), 17–23. <https://doi.org/10.1016/j.jacl.2009.11.003>
- Boi, L., Pisanu, A., Greig, N. H., Scerba, M. T., Tweedie, D., Mulas, G., Fenu, S., Carboni, E., Spiga, S., y Carta, A. R. (2019). Immunomodulatory drugs alleviate l-dopa-induced dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 34(12), 1818–1830. <https://doi.org/10.1002/mds.27799>
- Bonuccelli, U., y Del Dotto, P. (2006). New pharmacologic horizons in the treatment of Parkinson disease. *Neurology*, 67(7 Suppl 2), S30-8. https://doi.org/10.1212/wnl.67.7_suppl_2.s30
- Borghgi, C., Urso, R., y Cicero, A. F. (2017). Renin-angiotensin system at the crossroad of hypertension and hypercholesterolemia. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases: NMCD*, 27(2), 115–120. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2016.07.013>
- Borisoff, J. F., Chan, C. C. M., Hiebert, G. W., Oschipok, L., Robertson, G. S., Zamboni, R., Steeves, J. D., y Tetzlaff, W. (2003). Suppression of Rho-kinase activity promotes axonal growth on inhibitory CNS substrates. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 22(3), 405–416. [https://doi.org/10.1016/s1044-7431\(02\)00032-5](https://doi.org/10.1016/s1044-7431(02)00032-5)
- Borrajo, A., Rodriguez-Perez, A. I., Diaz-Ruiz, C., Guerra, M. J., y Labandeira-Garcia, J. L. (2014a). Microglial TNF- α mediates enhancement of dopaminergic degeneration by brain angiotensin. *Glia*, 62(1), 145–157. <https://doi.org/10.1002/glia.22595>
- Borrajo, A., Rodriguez-Perez, A. I., Villar-Cheda, B., Guerra, M. J., y Labandeira-Garcia, J. L. (2014b). Inhibition of the microglial response is essential for the neuroprotective effects of Rho-kinase inhibitors on MPTP-induced dopaminergic cell death. *Neuropharmacology*, 85, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.05.021>
- Bortolanza, M., Cavalcanti-Kiwiatkoski, R., Padovan-Neto, F. E., da-Silva, C. A., Mitkovski, M., Raisman-Vozari, R., y Del-Bel, E. (2015a). Glial activation is associated with l-DOPA induced dyskinesia and blocked by a nitric oxide synthase inhibitor in a rat model of Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*, 73, 377–387. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.10.017>
- Bortolanza, M., Padovan-Neto, F. E., Cavalcanti-Kiwiatkoski, R., Dos Santos-Pereira, M., Mitkovski, M., Raisman-Vozari, R., y Del-Bel, E. (2015b). Are cyclooxygenase-2 and nitric oxide involved in the dyskinesia of Parkinson's disease induced by L-DOPA? *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 370(1672). <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0190>
- Bose, A., y Beal, M. F. (2016). Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, 139 Suppl, 216–231. <https://doi.org/10.1111/jnc.13731>
- Bowerman, M., Murray, L. M., Boyer, J. G., Anderson, C. L., y Kothary, R. (2012). Fasudil improves survival and promotes skeletal muscle development in a mouse model of spinal muscular atrophy. *BMC Medicine*, 10, 24. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-10-24>

- Breger, L. S., Dunnett, S. B., y Lane, E. L. (2013). Comparison of rating scales used to evaluate L-DOPA-induced dyskinesia in the 6-OHDA lesioned rat. *Neurobiology of Disease*, 50, 142–150. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2012.10.013>
- Brown, A. J., Sun, L., Feramisco, J. D., Brown, M. S., y Goldstein, J. L. (2002). Cholesterol addition to ER membranes alters conformation of SCAP, the SREBP escort protein that regulates cholesterol metabolism. *Molecular Cell*, 10(2), 237–245. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(02\)00591-9](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00591-9)
- Brundin, P., Barker, R. A., y Parmar, M. (2010). Neural grafting in Parkinson's disease problems and possibilities. *Progress in Brain Research*, 184, 265–294. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(10\)84014-2](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(10)84014-2)
- Brundin, P., Dunnett, S., Björklund, A., y Nikkhah, G. (2001). Transplanted dopaminergic neurons: more or less? In *Nature medicine* (Vol. 7, Issue 5, pp. 512–513). <https://doi.org/10.1038/87796>
- Bryan, B. A., Dennstedt, E., Mitchell, D. C., Walshe, T. E., Noma, K., Loureiro, R., Saint-Geniez, M., Campaigniac, J.-P., Liao, J. K., y D'Amore, P. A. (2010). RhoA/ROCK signaling is essential for multiple aspects of VEGF-mediated angiogenesis. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 24(9), 3186–3195. <https://doi.org/10.1096/fj.09-145102>
- Brys, M., Fanning, L., Hung, S., Ellenbogen, A., Penner, N., Yang, M., Welch, M., Koenig, E., David, E., Fox, T., Makh, S., Aldred, J., Goodman, I., Pepinsky, B., Liu, Y., Graham, D., Weihofen, A., y Cedarbaum, J. M. (2019). Randomized phase I clinical trial of anti- α -synuclein antibody BIIB054. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 34(8), 1154–1163. <https://doi.org/10.1002/mds.27738>
- Buck, K., y Ferger, B. (2010). The selective alpha1 adrenoceptor antagonist HEAT reduces L-DOPA-induced dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. *Synapse (New York, N.Y.)*, 64(2), 117–126. <https://doi.org/10.1002/syn.20709>
- Budzyn, K., Marley, P. D., y Sobey, C. G. (2006). Targeting Rho and Rho-kinase in the treatment of cardiovascular disease. *Trends in Pharmacological Sciences*, 27(2), 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2005.12.002>
- Burcklé, C. A., Jan Danser, A. H., Müller, D. N., Garrelds, I. M., Gasc, J.-M., Popova, E., Plehm, R., Peters, J., Bader, M., y Nguyen, G. (2006). Elevated blood pressure and heart rate in human renin receptor transgenic rats. *Hypertension (Dallas, Tex: 1979)*, 47(3), 552–556. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000199912.47657.04>
- Calabresi, P., Di Filippo, M., Ghiglieri, V., Tambasco, N., y Picconi, B. (2010). Levodopa-induced dyskinesias in patients with Parkinson's disease: filling the bench-to bedside gap. *The Lancet. Neurology*, 9(11), 1106–1117. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70218-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70218-0)
- Calabresi, P., Galletti, F., Saggese, E., Ghiglieri, V., y Picconi, B. (2007). Neuronal networks and synaptic plasticity in Parkinson's disease: beyond motor deficits. *Parkinsonism y Related Disorders*, 13 Suppl 3, S259-62. [https://doi.org/10.1016/S1353-8020\(08\)70013-0](https://doi.org/10.1016/S1353-8020(08)70013-0)
- Calabresi, P., Maj, R., Pisani, A., Mercuri, N. B., y Bernardi, G. (1992). Long-term synaptic depression in the striatum: physiological and pharmacological characterization. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 12(11), 4224–4233. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.12-11-04224.1992>
- Calon, F., Rajput, A. H., Hornykiewicz, O., Bédard, P. J., y Di Paolo, T. (2003). Levodopa-induced motor complications are associated with alterations of glutamate receptors in Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*, 14(3), 404–416. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2003.07.003>

- Capitelli, C. S., Lopes, C. S., Alves, A. C., Barbiero, J., Oliveira, L. F., da Silva, V. J. D., y Vital, M. A. B. F. (2014). Opposite effects of bone marrow-derived cells transplantation in MPTP-rat model of Parkinson's disease: a comparison study of mononuclear and mesenchymal stem cells. *International Journal of Medical Sciences*, 11(10), 1049–1064. <https://doi.org/10.7150/ijms.8182>
- Carbajo-Lozoya, J., Lutz, S., Feng, Y., Kroll, J., Hammes, H.-P., y Wieland, T. (2012). Angiotensin II modulates VEGF-driven angiogenesis by opposing effects of type 1 and type 2 receptor stimulation in the microvascular endothelium. *Cellular Signalling*, 24(6), 1261–1269. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.02.005>
- Carlson, J. D., Neumiller, J. J., Swain, L. D. W., Mark, J., McLeod, P., y Hirschauer, J. (2014). Postoperative delirium in Parkinson's disease patients following deep brain stimulation surgery. *Journal of Clinical Neuroscience: Official Journal of the Neurosurgical Society of Australasia*, 21(7), 1192–1195. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2013.12.007>
- Carlsson, A. (1959). The occurrence, distribution and physiological role of catecholamines in the nervous system. *Pharmacological Reviews*, 11(2, Part 2), 490–493.
- Carlsson, A., Lindqvist, M., y Magnusson, T. (1957). 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. *Nature*, 180(4596), 1200. <https://doi.org/10.1038/1801200a0>
- Carroll, C. B., Webb, D., Stevens, K. N., Vickery, J., Eyre, V., Ball, S., Wyse, R., Webber, M., Foggo, A., Zajicek, J., Whone, A., y Creanor, S. (2019). Simvastatin as a neuroprotective treatment for Parkinson's disease (PD STAT): protocol for a double-blind, randomised, placebo-controlled futility study. *BMJ Open*, 9(10), e029740. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2019-029740>
- Carta, A. R., Mulas, G., Bortolanza, M., Duarte, T., Pillai, E., Fisone, G., Vozari, R. R., y Del-Bel, E. (2017). L-DOPA-induced dyskinesia and neuroinflammation: do microglia and astrocytes play a role? *The European Journal of Neuroscience*, 45(1), 73–91. <https://doi.org/10.1111/ejn.13482>
- Carta, M., y Bezard, E. (2011). Contribution of pre-synaptic mechanisms to L-DOPA-induced dyskinesia. *Neuroscience*, 198, 245–251. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.07.070>
- Carta, M., y Björklund, A. (2018). The serotonergic system in L-DOPA-induced dyskinesia: pre-clinical evidence and clinical perspective. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)*, 125(8), 1195–1202. <https://doi.org/10.1007/s00702-018-1865-5>
- Carta, M., Carlsson, T., Kirik, D., y Björklund, A. (2007). Dopamine released from 5-HT terminals is the cause of L-DOPA-induced dyskinesia in parkinsonian rats. *Brain: A Journal of Neurology*, 130(Pt 7), 1819–1833. <https://doi.org/10.1093/brain/awm082>
- Carta, M., Lindgren, H. S., Lundblad, M., Stancampiano, R., Fadda, F., y Cenci, M. A. (2006). Role of striatal L-DOPA in the production of dyskinesia in 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Journal of Neurochemistry*, 96(6), 1718–1727. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03696.x>
- Carta, M., Srikumar, B. N., Gorlewicz, A., Rebola, N., y Mülle, C. (2018). Activity-dependent control of NMDA receptor subunit composition at hippocampal mossy fibre synapses. *The Journal of Physiology*, 596(4), 703–716. <https://doi.org/10.1113/JP275226>
- Cenci, M. A. (2014). Presynaptic Mechanisms of L-DOPA-induced dyskinesia: The findings, the debate, and the therapeutic implications. *Frontiers in Neurology*, 5, 242. <https://doi.org/10.3389/fneur.2014.00242>
- Cenci, M. A., y Crossman, A. R. (2018). Animal models of l-dopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 33(6), 889–899. <https://doi.org/10.1002/mds.27337>

- Cenci, M. A., Lee, C. S., y Björklund, A. (1998). L-DOPA-induced dyskinesia in the rat is associated with striatal overexpression of prodynorphin- and glutamic acid decarboxylase mRNA. *The European Journal of Neuroscience*, 10(8), 2694–2706.
- Cenci, M. A., Ohlin, K. E., y Odin, P. (2011). Current options and future possibilities for the treatment of dyskinesia and motor fluctuations in Parkinson's disease. *CNS y Neurological Disorders Drug Targets*, 10(6), 670–684. <https://doi.org/10.2174/187152711797247885>
- Cenci, M. A., Ohlin, K. E., y Odin, P. (2012). Current options and future possibilities for the treatment of dyskinesia and motor fluctuations in Parkinson's disease. *CNS y Neurological Disorders - Drug Targets*, 10(6), 670–684. <https://doi.org/10.2174/187152711797247885>
- Cenci, M. A., Riggare, S., Pahwa, R., Eidelberg, D., y Hauser, R. A. (2020). Dyskinesia matters. *Movement Disorders*, 35(3), 392–396. <https://doi.org/10.1002/mds.27959>
- Centonze, D., Muzio, L., Rossi, S., Cavasinni, F., De Chiara, V., Bergami, A., Musella, A., D'Amelio, M., Cavallucci, V., Martorana, A., Bergamaschi, A., Cencioni, M. T., Diamantini, A., Butti, E., Comi, G., Bernardi, G., Ceconi, F., Battistini, L., Furlan, R., y Martino, G. (2009). Inflammation triggers synaptic alteration and degeneration in experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 29(11), 3442–3452. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5804-08.2009>
- Chabrashvili, T., Kitiyakara, C., Blau, J., Karber, A., Aslam, S., Welch, W. J., y Wilcox, C. S. (2003). Effects of ANG II type 1 and 2 receptors on oxidative stress, renal NADPH oxidase, and SOD expression. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 285(1), R117–24. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00476.2002>
- Chase, T. N. (1998). Levodopa therapy: consequences of the nonphysiologic replacement of dopamine. *Neurology*, 50(5 Suppl 5), S17–25. https://doi.org/10.1212/wnl.50.5_suppl_5.s17
- Chaudhry, M. Z., Wang, J. H., Blankson, S., y Redmond, H. P. (2008). Statin (cerivastatin) protects mice against sepsis-related death via reduced proinflammatory cytokines and enhanced bacterial clearance. *Surgical Infections*, 9(2), 183–194. <https://doi.org/10.1089/sur.2006.077>
- Chaudhuri, K. R., y Schapira, A. H. V. (2009). Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment. *The Lancet. Neurology*, 8(5), 464–474. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70068-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70068-7)
- Chaudhuri, K. R., Healy, D. G., y Schapira, A. H. V. (2006). Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. *The Lancet. Neurology*, 5(3), 235–245. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(06\)70373-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(06)70373-8)
- Chen, J., Zhang, X., Kusumo, H., Costa, L. G., y Guizzetti, M. (2013a). Cholesterol efflux is differentially regulated in neurons and astrocytes: implications for brain cholesterol homeostasis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1831(2), 263–275. <https://doi.org/10.1016/j.bbailip.2012.09.007>
- Chen, M., Liu, A., Ouyang, Y., Huang, Y., Chao, X., y Pi, R. (2013b). Fasudil and its analogs: a new powerful weapon in the long war against central nervous system disorders? *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 22(4), 537–550. <https://doi.org/10.1517/13543784.2013.778242>
- Chen, Y., Wu, T., Li, H., Li, X., Li, Q., Zhu, X., Yu, M., Kuo, S. H., Huang, F., y Wu, Y. C. (2019). DL-3-n-butylphthalide exerts dopaminergic neuroprotection through inhibition of neuroinflammation. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 11(February), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00044>
- Cheng, H. C., Kim, S. R., Oo, T. F., Kareva, T., Yarygina, O., Rzhetskaya, M., Wang, C., During, M., Talloczy, Z., Tanaka, K., Komatsu, M., Kobayashi, K., Okano, H., Kholodilov, N., y Burke,

- R. E. (2011). Akt suppresses retrograde degeneration of dopaminergic axons by inhibition of macroautophagy. *Journal of Neuroscience*, 31(6), 2125–2135. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5519-10.2011>
- Choi, I., Zhang, Y., Seegobin, S. P., Pruvost, M., Wang, Q., Purtell, K., Zhang, B., y Yue, Z. (2020). Microglia clear neuron-released α -synuclein via selective autophagy and prevent neurodegeneration. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15119-w>
- Chou KL, 2013 (intro, pag 2)Clinical manifestations of Parkinson disease - UpToDate en google scholar
- Clark, A. K., Gruber-Schoffnegger, D., Drdla-Schutting, R., Gerhold, K. J., Malcangio, M., y Sandkühler, J. (2015). Selective activation of microglia facilitates synaptic strength. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 35(11), 4552–4570. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2061-14.2015>
- Cohen, G., y Heikkilä, R. E. (1974). The generation of hydrogen peroxide, superoxide radical, and hydroxyl radical by 6-hydroxydopamine, dialuric acid, and related cytotoxic agents. *The Journal of Biological Chemistry*, 249(8), 2447–2452. Falta el DOI
- Connolly, B. S., y Lang, A. E. (2014). Pharmacological treatment of Parkinson disease: a review. *JAMA*, 311(16), 1670–1683. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.3654>
- Corvol, P., Williams, T. A., y Soubrier, F. (1995). Peptidyl dipeptidase A: angiotensin I-converting enzyme. *Methods in Enzymology*, 248, 283–305. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(95\)48020-x](https://doi.org/10.1016/0076-6879(95)48020-x)
- Costa-Besada, M. A., Valenzuela, R., Garrido-Gil, P., Villar-Cheda, B., Parga, J. A., Lanciego, J. L., y Labandeira-Garcia, J. L. (2018). Paracrine and intracrine angiotensin 1-7/Mas receptor axis in the substantia nigra of rodents, monkeys, and humans. *Molecular Neurobiology*, 55(7), 5847–5867. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0805-y>
- Cui, M., Aras, R., Christian, W. V., Rappold, P. M., Hatwar, M., Panza, J., Jackson-Lewis, V., Javitch, J. A., Ballatori, N., Przedborski, S., y Tieu, K. (2009). The organic cation transporter-3 is a pivotal modulator of neurodegeneration in the nigrostriatal dopaminergic pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(19), 8043–8048. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900358106>
- Dafsari, H. S., Ray-Chaudhuri, K., Mahlstedt, P., Sachse, L., Steffen, J. K., Petry-Schmelzer, J. N., Dembek, T. A., Reker, P., Barbe, M. T., Visser-Vandewalle, V., Fink, G. R., y Timmermann, L. (2019). Beneficial effects of bilateral subthalamic stimulation on alexithymia in Parkinson's disease. *European Journal of Neurology*, 26(2), 222–e17. <https://doi.org/10.1111/ene.13773>
- Day, B. J., Patel, M., Calavetta, L., Chang, L. Y., y Stamler, J. S. (1999). A mechanism of paraquat toxicity involving nitric oxide synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(22), 12760–12765. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.22.12760>
- De Rijk, M. C., Rocca, W. A., Anderson, D. W., Melcon, M. O., Breteler, M. M., y Maraganore, D. M. (1997). A population perspective on diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Neurology*, 48(5), 1277–1281. <https://doi.org/10.1212/wnl.48.5.1277>
- Defert, O., y Boland, S. (2017). Rho kinase inhibitors: a patent review (2014 - 2016). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 27(4), 507–515. <https://doi.org/10.1080/13543776.2017.1272579>
- Dehay, B., y Bezard, E. (2011). New animal models of Parkinson's disease. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 26(7), 1198–1205. <https://doi.org/10.1002/mds.23546>

- Dekundy, A., Lundblad, M., Danysz, W., y Cenci, M. A. (2007). Modulation of L-DOPA-induced abnormal involuntary movements by clinically tested compounds: further validation of the rat dyskinesia model. *Behavioural Brain Research*, 179(1), 76–89. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.01.013>
- Del-Bel, E., Bortolanza, M., Dos-Santos-Pereira, M., Bariotto, K., y Raisman-Vozari, R. (2016). L-DOPA-induced dyskinesia in Parkinson's disease: Are neuroinflammation and astrocytes key elements? *Synapse (New York, N.Y.)*, 70(12), 479–500. <https://doi.org/10.1002/syn.21941>
- Dezawa, M., Ishikawa, H., Hoshino, M., Itokazu, Y., y Nabeshima, Y. (2005). Potential of bone marrow stromal cells in applications for neuro-degenerative, neuro-traumatic and muscle degenerative diseases. *Current Neuropharmacology*, 3(4), 257–266. <https://doi.org/10.2174/157015905774322507>
- Di Paolo, G., y Kim, T.-W. (2011). Linking lipids to Alzheimer's disease: cholesterol and beyond. *Nature Reviews Neuroscience*, 12(5), 284–296. <https://doi.org/10.1038/nrn3012>
- Dias, V., Junn, E., y Mouradian, M. M. (2013). The role of oxidative stress in Parkinson's disease. *Journal of Parkinson's Disease*, 3(4), 461–491. <https://doi.org/10.3233/JPD-130230>
- Ding, J., Li, Q.-Y., Wang, X., Sun, C.-H., Lu, C.-Z., y Xiao, B.-G. (2010). Fasudil protects hippocampal neurons against hypoxia-reoxygenation injury by suppressing microglial inflammatory responses in mice. *Journal of Neurochemistry*, 114(6), 1619–1629. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06876.x>
- Doi, D., Samata, B., Katsukawa, M., Kikuchi, T., Morizane, A., Ono, Y., Sekiguchi, K., Nakagawa, M., Parmar, M., y Takahashi, J. (2014). Isolation of human induced pluripotent stem cell-derived dopaminergic progenitors by cell sorting for successful transplantation. *Stem Cell Reports*, 2(3), 337–350. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.01.013>
- Dominguez-Mejide, A., Rodriguez-Perez, A. I., Diaz-Ruiz, C., Guerra, M. J., y Labandeira-Garcia, J. L. (2017). Dopamine modulates astroglial and microglial activity via glial renin-angiotensin system in cultures. *Brain, Behavior, and Immunity*, 62, 277–290. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.02.013>
- Dominguez-Mejide, A., Villar-Cheda, B., Garrido-Gil, P., Sierra-Paredes, G., Guerra, M. J., y Labandeira-Garcia, J. L. (2014). Effect of chronic treatment with angiotensin type 1 receptor antagonists on striatal dopamine levels in normal rats and in a rat model of Parkinson's disease treated with L-DOPA. *Neuropharmacology*, 76 Pt A, 156–168. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.07.016>
- Doria, M., Maugest, L., Moreau, T., Lizard, G., y Vejux, A. (2016). Contribution of cholesterol and oxysterols to the pathophysiology of Parkinson's disease. *Free Radical Biology y Medicine*, 101, 393–400. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.10.008>
- Dupre, K. B., Ostock, C. Y., George, J. A., Eskow Jaunarajs, K. L., Hueston, C. M., y Bishop, C. (2013). Effects of 5-HT1A receptor stimulation on D1 receptor agonist-induced striatonigral activity and dyskinesia in hemiparkinsonian rats. *ACS Chemical Neuroscience*, 4(5), 747–760. <https://doi.org/10.1021/cn300234z>
- Durif, F., Debilly, B., Galitzky, M., Morand, D., Viallet, F., Borg, M., Thobois, S., Broussolle, E., y Rascol, O. (2004). Clozapine improves dyskinesias in Parkinson disease: a double-blind, placebo-controlled study. *Neurology*, 62(3), 381–388. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000110317.52453.6c>

- Eberlé, D., Hegarty, B., Bossard, P., Ferré, P., y Foufelle, F. (2004). SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie*, 86(11), 839–848. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2004.09.018>
- El-Agnaf, O. M. A., Salem, S. A., Paleologou, K. E., Cooper, L. J., Fullwood, N. J., Gibson, M. J., Curran, M. D., Court, J. A., Mann, D. M. A., Ikeda, S., Cookson, M. R., Hardy, J., y Allsop, D. (2003). Alpha-synuclein implicated in Parkinson's disease is present in extracellular biological fluids, including human plasma. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 17(13), 1945–1947. <https://doi.org/10.1096/fj.03-0098fje>
- Endo, M., Ohashi, K., y Mizuno, K. (2007). LIM kinase and slingshot are critical for neurite extension. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(18), 13692–13702. <https://doi.org/10.1074/jbc.M610873200>
- Eriksson, I., Nath, S., Bornefall, P., Giraldo, A. M. V., y Öllinger, K. (2017). Impact of high cholesterol in a Parkinson's disease model: Prevention of lysosomal leakage versus stimulation of α -synuclein aggregation. *European Journal of Cell Biology*, 96(2), 99–109. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2017.01.002>
- Errico, F., Bonito-Oliva, A., Bagetta, V., Vitucci, D., Romano, R., Zianni, E., Napolitano, F., Marinucci, S., Di Luca, M., Calabresi, P., Fisone, G., Carta, M., Picconi, B., Gardoni, F., y Usiello, A. (2011). Higher free D-aspartate and N-methyl-D-aspartate levels prevent striatal depotentiation and anticipate L-DOPA-induced dyskinesia. *Experimental Neurology*, 232(2), 240–250. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.09.013>
- Espay, A. J., Morgante, F., Merola, A., Fasano, A., Marsili, L., Fox, S. H., Bezard, E., Picconi, B., Calabresi, P., y Lang, A. E. (2018). Levodopa-induced dyskinesia in Parkinson disease: Current and evolving concepts. *Annals of Neurology*, 84(6), 797–811. <https://doi.org/10.1002/ana.25364>
- Espinoza, S., Scarpato, M., Damiani, D., Managò, F., Mereu, M., Contestabile, A., Peruzzo, O., Carninci, P., Santoro, C., Papaleo, F., Mingozzi, F., Ronzitti, G., Zucchelli, S., y Gustincich, S. (2020). SINEUP Non-coding RNA Targeting GDNF rescues motor deficits and neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 28(2), 642–652. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2019.08.005>
- Fabbrini, G., Brotchie, J. M., Grandas, F., Nomoto, M., y Goetz, C. G. (2007). Levodopa-induced dyskinesias. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 22(10), 1379–1389; quiz 1523. <https://doi.org/10.1002/mds.21475>
- Fanni, S., Scheggi, S., Rossi, F., Tronci, E., Traccis, F., Stancampiano, R., De Montis, M. G., Devoto, P., Gambarana, C., Bortolato, M., Frau, R., y Carta, M. (2019). 5alpha-reductase inhibitors dampen L-DOPA-induced dyskinesia via normalization of dopamine D1-receptor signaling pathway and D1-D3 receptor interaction. *Neurobiology of Disease*, 121, 120–130. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2018.09.018>
- Farré, D., Muñoz, A., Moreno, E., Reyes-Resina, I., Canet-Pons, J., Dopeso-Reyes, I. G., Rico, A. J., Lluís, C., Mallol, J., Navarro, G., Canela, E. I., Cortés, A., Labandeira-García, J. L., Casadó, V., Lanciego, J. L., y Franco, R. (2015). Stronger dopamine D1 receptor-mediated neurotransmission in dyskinesia. *Molecular Neurobiology*, 52(3), 1408–1420. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-8936-x>

- Fasano, S., Bezard, E., D'Antoni, A., Francardo, V., Indrigo, M., Qin, L., Doveró, S., Cerovic, M., Cenci, M. A., y Brambilla, R. (2010). Inhibition of Ras-guanine nucleotide-releasing factor 1 (Ras-GRF1) signaling in the striatum reverts motor symptoms associated with L-dopa-induced dyskinesia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(50), 21824–21829. <https://doi.org/10.1073/pnas.1012071107>
- Ferrario, C. M., Brosnihan, K. B., Diz, D. I., Jaiswal, N., Khosla, M. C., Milsted, A., y Tallant, E. A. (1991). Angiotensin-(1-7): a new hormone of the angiotensin system. *Hypertension (Dallas, Tex: 1979)*, 18(5 Suppl), III126-33. https://doi.org/10.1161/01.hyp.18.5_suppl.iii126
- Ferreira, A. P. O., Rodrigues, F. S., Della-Pace, I. D., Mota, B. C., Oliveira, S. M., Velho Gewehr, C. de C., Bobinski, F., de Oliveira, C. V., Brum, J. S., Oliveira, M. S., Furian, A. F., de Barros, C. S. L., Ferreira, J., Santos, A. R. S. Dos, Figuera, M. R., y Royes, L. F. F. (2013). The effect of NADPH-oxidase inhibitor apocynin on cognitive impairment induced by moderate lateral fluid percussion injury: role of inflammatory and oxidative brain damage. *Neurochemistry International*, 63(6), 583–593. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2013.09.012>
- Fidalgo, C., Ko, W. K. D., Tronci, E., Li, Q., Stancampiano, R., Chuan, Q., Bezard, E., y Carta, M. (2015). Effect of serotonin transporter blockade on L-DOPA-induced dyskinesia in animal models of Parkinson's disease. *Neuroscience*, 298, 389–396. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.04.027>
- Fields, C. R., Bengoa-Vergniory, N., y Wade-Martins, R. (2019). Targeting alpha-synuclein as a therapy for Parkinson's disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 12, 299. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00299>
- Fleegal-DeMotta, M. A., Doghu, S., y Banks, W. A. (2009). Angiotensin II modulates BBB permeability via activation of the AT (1) receptor in brain endothelial cells. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 29(3), 640–647. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2008.158>
- Foley, J. A., Foltynie, T., Zrinzo, L., Hyam, J. A., Limousin, P., y Cipelotti, L. (2017). Apathy and reduced speed of processing underlie decline in verbal fluency following DBS. *Behavioural Neurology*, 2017, 7348101. <https://doi.org/10.1155/2017/7348101>
- Fournier, N. M., Lee, B., Banasr, M., Elsayed, M., y Duman, R. S. (2012). Vascular endothelial growth factor regulates adult hippocampal cell proliferation through MEK/ERK- and PI3K/Akt-dependent signaling. *Neuropharmacology*, 63(4), 642–652. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.04.033>
- Fox, S. H., y Lang, A. E. (2008). Levodopa-related motor complications--phenomenology. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 23 Suppl 3, S509-14. <https://doi.org/10.1002/mds.22021>
- Fox, S. H., Johnston, T. H., Li, Q., Brotchie, J., y Bezard, E. (2012). A critique of available scales and presentation of the non-human primate dyskinesia rating scale. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 27(11), 1373–1378. <https://doi.org/10.1002/mds.25133>
- Francardo, V., Recchia, A., Popovic, N., Andersson, D., Nissbrandt, H., y Cenci, M. A. (2011). Impact of the lesion procedure on the profiles of motor impairment and molecular responsiveness to L-DOPA in the 6-hydroxydopamine mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*, 42(3), 327–340. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.01.024>

- Frears, E. R., Stephens, D. J., Walters, C. E., Davies, H., y Austen, B. M. (1999). The role of cholesterol in the biosynthesis of beta amyloid. *Neuroreport*, 10(8), 1699–1705. <https://doi.org/10.1097/00001756-199906030-00014>
- Freed, C. R., Greene, P. E., Breeze, R. E., Tsai, W. Y., DuMouchel, W., Kao, R., Dillon, S., Winfield, H., Culver, S., Trojanowski, J. Q., Eidelberg, D., y Fahn, S. (2001). Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *The New England Journal of Medicine*, 344(10), 710–719. <https://doi.org/10.1056/NEJM200103083441002>
- Gallo, G. (2004). Myosin II activity is required for severing-induced axon retraction in vitro. *Experimental Neurology*, 189(1), 112–121. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2004.05.019>
- Galvan, A., y Wichmann, T. (2007). GABAergic circuits in the basal ganglia and movement disorders. *Progress in Brain Research*, 160, 287–312. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(06\)60017-4](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(06)60017-4)
- Ganong, W. F. (1994). Origin of the angiotensin II secreted by cells. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.), 205(3), 213–219. <https://doi.org/10.3181/00379727-205-43699a>
- Gao, J., Fan, H., y Mei, L. (2010). *Asian Journal of Pharmacodynamics and Pharmacokinetics* Pharmacological activities and pharmacokinetics of licofelone. 2010(4), 287–299.
- Gao, X., Chen, H., Fung, T. T., Logroscino, G., Schwarzschild, M. A., Hu, F. B., y Ascherio, A. (2007). Prospective study of dietary pattern and risk of Parkinson disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 86(5), 1486–1494. <https://doi.org/10.1093/ajcn/86.5.1486>
- Gao, X., Chen, H., Schwarzschild, M. A., y Ascherio, A. (2011). Use of ibuprofen and risk of Parkinson disease. *Neurology*, 76(10), 863–869. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31820f2d79>
- Gardoni, F., y Di Luca, M. (2006). New targets for pharmacological intervention in the glutamatergic synapse. *European Journal of Pharmacology*, 545(1), 2–10. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.06.022>
- Garrido, A. M., y Griendling, K. K. (2009). NADPH oxidases and angiotensin II receptor signaling. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 302(2), 148–158. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.11.003>
- Garrido-Gil, P., Fernandez-Rodríguez, P., Rodríguez-Pallares, J., y Labandeira-García, J. L. (2017). Laser capture microdissection protocol for gene expression analysis in the brain. *Histochemistry and Cell Biology*, 148(3), 299–311. <https://doi.org/10.1007/s00418-017-1585-1>
- Garrido-Gil, P., Joglar, B., Rodríguez-Perez, A. I., Guerra, M. J., y Labandeira-García, J. L. (2012). Involvement of PPAR- γ in the neuroprotective and anti-inflammatory effects of angiotensin type 1 receptor inhibition: effects of the receptor antagonist telmisartan and receptor deletion in a mouse MPTP model of Parkinson's disease. *Journal of Neuroinflammation*, 9, 38. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-38>
- Garrido-Gil, P., Rodríguez-Pallares, J., Dominguez-Meijide, A., Guerra, M. J., y Labandeira-García, J. L. (2013a). Brain angiotensin regulates iron homeostasis in dopaminergic neurons and microglial cells. *Experimental Neurology*, 250, 384–396. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2013.10.013>
- Garrido-Gil, P., Rodríguez-Perez, A. I., Dominguez-Meijide, A., Guerra, M. J., y Labandeira-García, J. L. (2018). Bidirectional neural interaction between central dopaminergic and gut lesions in

- Parkinson's disease models. *Molecular Neurobiology*, 55(9), 7297–7316. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-0937-8>
- Garrido-Gil, P., Rodríguez-Perez, A. I., Fernández-Rodríguez, P., Lanciego, J. L., y Labandeira-García, J. L. (2017). Expression of angiotensinogen and receptors for angiotensin and prorenin in the rat and monkey striatal neurons and glial cells. *Brain Structure y Function*, 222(6), 2559–2571. <https://doi.org/10.1007/s00429-016-1357-z>
- Garrido-Gil, P., Valenzuela, R., Villar-Cheda, B., Lanciego, J. L., y Labandeira-García, J. L. (2013b). Expression of angiotensinogen and receptors for angiotensin and prorenin in the monkey and human substantia nigra: an intracellular renin-angiotensin system in the nigra. *Brain Structure y Function*, 218(2), 373–388. <https://doi.org/10.1007/s00429-012-0402-9>
- Gentry, E. G., Henderson, B. W., Arrant, A. E., Gearing, M., Feng, Y., Riddle, N. C., y Herskowitz, J. H. (2016). Rho kinase inhibition as a therapeutic for progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration. *Journal of Neuroscience*, 36(4), 1316–1323. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2336-15.2016>
- Gerfen, C. R., Miyachi, S., Paletzki, R., y Brown, P. (2002). D1 dopamine receptor supersensitivity in the dopamine-depleted striatum results from a switch in the regulation of ERK1/2/MAP kinase. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(12), 5042–5054. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-12-05042.2002>
- Gerhard, A., Pavese, N., Hotton, G., Turkheimer, F., Es, M., Hammers, A., Eggert, K., Oertel, W., Banati, R. B., y Brooks, D. J. (2006). In vivo imaging of microglial activation with [11C](R)-PK11195 PET in idiopathic Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*, 21(2), 404–412. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2005.08.002>
- Ghosh, A., Roy, A., Matras, J., Brahmachari, S., Gendelman, H. E., y Pahan, K. (2009). Simvastatin inhibits the activation of p21ras and prevents the loss of dopaminergic neurons in a mouse model of Parkinson's disease. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 29(43), 13543–13556. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4144-09.2009>
- Giasson, B. I., Duda, J. E., Quinn, S. M., Zhang, B., Trojanowski, J. Q., y Lee, V. M.-Y. (2002). Neuronal alpha-synucleinopathy with severe movement disorder in mice expressing A53T human alpha-synuclein. *Neuron*, 34(4), 521–533. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(02\)00682-7](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(02)00682-7)
- Goetz, C. G., Damier, P., Hicking, C., Laska, E., Müller, T., Olanow, C. W., Rascol, O., y Russ, H. (2007). Sarizotan as a treatment for dyskinesias in Parkinson's disease: a double-blind placebo-controlled trial. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 22(2), 179–186. <https://doi.org/10.1002/mds.21226>
- Goldman, S. M. (2014). Environmental toxins and Parkinson's disease. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 54, 141–164. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-011613-135937>
- Goldman, S. M., Marek, K., Ottman, R., Meng, C., Comyns, K., Chan, P., Ma, J., Marras, C., Langston, J. W., Ross, G. W., y Tanner, C. M. (2019). Concordance for Parkinson's disease in twins: A 20-year update. *Annals of Neurology*, 85(4), 600–605. <https://doi.org/10.1002/ana.25441>
- Gorelenkova Miller, O., Behring, J. B., Siedlak, S. L., Jiang, S., Matsui, R., Bachschmid, M. M., Zhu, X., y Mיעאל, J. J. (2016). Upregulation of glutaredoxin-1 activates microglia and promotes neurodegeneration: implications for Parkinson's disease. *Antioxidants and Redox Signaling*, 25(18), 967–982. <https://doi.org/10.1089/ars.2015.6598>

- Goritz, C., Mauch, D. H., y Pfrieder, F. W. (2005). Multiple mechanisms mediate cholesterol-induced synaptogenesis in a CNS neuron. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 29(2), 190–201. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2005.02.006>
- Grammatopoulos, T. N., Jones, S. M., Ahmadi, F. A., Hoover, B. R., Snell, L. D., Skoch, J., Jhaveri, V. V., Poczbott, A. M., Weyhenmeyer, J. A., y Zawada, W. M. (2007). Angiotensin type 1 receptor antagonist losartan reduces MPTP-induced degeneration of dopaminergic neurons in substantia nigra. *Molecular Neurodegeneration*, 2, 1. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-2-1>
- Greenwood, J., Walters, C. E., Pryce, G., Kanuga, N., Beraud, E., Baker, D., y Adamson, P. (2003). Lovastatin inhibits brain endothelial cell Rho-mediated lymphocyte migration and attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 17(8), 905–907. <https://doi.org/10.1096/fj.02-1014fje>
- Grégoire, L., Jourdain, V. A., Townsend, M., Roach, A., y Di Paolo, T. (2013). Safinamide reduces dyskinesias and prolongs L-DOPA antiparkinsonian effect in parkinsonian monkeys. *Parkinsonism y Related Disorders*, 19(5), 508–514. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2013.01.009>
- Griendling, K. K., Sorescu, D., y Ushio-Fukai, M. (2000). NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circulation Research*, 86(5), 494–501. <https://doi.org/10.1161/01.res.86.5.494>
- Gu, Q.-F., Yu, J.-Z., Wu, H., Li, Y.-H., Liu, C.-Y., Feng, L., Zhang, G.-X., Xiao, B.-G., y Ma, C.-G. (2018). Therapeutic effect of Rho kinase inhibitor FSD-C10 in a mouse model of Alzheimer's disease. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 16(5), 3929–3938. <https://doi.org/10.3892/etm.2018.6701>
- Günther, R., Balck, A., Koch, J. C., Nientiedt, T., Sereda, M., Bähr, M., Lingor, P., y Tönges, L. (2017). Rho Kinase inhibition with fasudil in the SOD1(G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis-symptomatic treatment potential after disease onset. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 17. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00017>
- Gustafsson, A. y Gottlieb (2009). Autophagy in ischemic heart disease. *Circ Res.* <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.187427>.
- Hagell, P., y Brundin, P. (2001). Cell survival and clinical outcome following intrastriatal transplantation in Parkinson disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 60(8), 741–752. <https://doi.org/10.1093/jnen/60.8.741>
- Hall, C., Brown, M., Jacobs, T., Ferrari, G., Cann, N., Teo, M., Monfries, C., y Lim, L. (2001). Collapsin response mediator protein switches RhoA and Rac1 morphology in N1E-115 neuroblastoma cells and is regulated by Rho kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(46), 43482–43486. <https://doi.org/10.1074/jbc.C100455200>
- Hallett, P. J., Dunah, A. W., Ravenscroft, P., Zhou, S., Bezard, E., Crossman, A. R., Brotchie, J. M., y Standaert, D. G. (2005). Alterations of striatal NMDA receptor subunits associated with the development of dyskinesia in the MPTP-lesioned primate model of Parkinson's disease. *Neuropharmacology*, 48(4), 503–516. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2004.11.008>
- Halliday, G. M., y Stevens, C. H. (2011). Glia: initiators and progressors of pathology in Parkinson's disease. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 26(1), 6–17. <https://doi.org/10.1002/mds.23455>

- Han, H. E., Kim, T. K., Son, H. J., Park, W. J., y Han, P. L. (2013). Activation of autophagy pathway suppresses the expression of iNOS, IL6 and cell death of LPS-stimulated microglia cells. *Biomolecules and Therapeutics*, 21(1), 21–28. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2012.089>
- Haque, R., Iuvone, P. M., He, L., Hur, E. H., Chung Choi, K. S., Park, D., Farrell, A. N., Ngo, A., Gokhale, S., Aseem, M., y Kumar, B. (2017). Prorenin receptor (PRR)-mediated NADPH oxidase (Nox) signaling regulates VEGF synthesis under hyperglycemic condition in ARPE-19 cells. *Journal of Receptor and Signal Transduction Research*, 37(6), 560–568. <https://doi.org/10.1080/10799893.2017.1369120>
- Haque, R., Iuvone, P. M., He, L., Hur, E. H., Su, K., Choi, C., Park, D., Farrell, A. N., Ngo, A., Gokhale, S., y Aseem, M. y Kumar B. (2017). Prorenin receptor (PRR)-mediated NADPH oxidase (Nox) signaling regulates VEGF synthesis under hyperglycemic condition in ARPE-19 cells. *J Recept Signal Transduct Res*. 37(6), 560–568. <https://doi.org/10.1080/10799893.2017.1369120>
- Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Suzuki-Migishima, R., Yokoyama, M., Mishima, K., Saito, I., Okano, H., y Mizushima, N. (2006). Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature*, 441(7095), 885–889. <https://doi.org/10.1038/nature04724>
- Hare, D. J., y Double, K. L. (2016). Iron and dopamine: a toxic couple. *Brain: A Journal of Neurology*, 139(Pt 4), 1026–1035. <https://doi.org/10.1093/brain/aww022>
- Harischandra, D. S., Rokad, D., Neal, M. L., Ghaisas, S., Manne, S., Sarkar, S., Panicker, N., Zenitsky, G., Jin, H., Lewis, M., Huang, X., Anantharam, V., Kanthasamy, A., y Kanthasamy, A. G. (2019). Manganese promotes the aggregation and prion-like cell-to-cell exosomal transmission of α -synuclein. *Science Signaling*, 12(572). <https://doi.org/10.1126/scisignal.aau4543>
- Hashimoto, R., Nakamura, Y., Kosako, H., Amano, M., Kaibuchi, K., Inagaki, M., y Takeda, M. (1999). Distribution of Rho-kinase in the bovine brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 263(2), 575–579. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1409>
- Hauser, R. A. (2009). Levodopa: past, present, and future. *European Neurology*, 62(1), 1–8. <https://doi.org/10.1159/000215875>
- Hauser, R. A., Pahwa, R., Tanner, C. M., Oertel, W., Isaacson, S. H., Johnson, R., Felt, L., y Stempien, M. J. (2017). ADS-5102 (amantadine) extended-release capsules for levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease (EASE LID 2 Study): interim results of an open-label safety study. *Journal of Parkinson's Disease*, 7(3), 511–522. <https://doi.org/10.3233/JPD-171134>
- Hayashi, H. (2011). Lipid metabolism and glial lipoproteins in the central nervous system. *Biological y Pharmaceutical Bulletin*, 34(4), 453–461. <https://doi.org/10.1248/bpb.34.453>
- Heacock, A. M., Klinger, P. D., Seguin, E. B., y Agranoff, B. W. (1984). Cholesterol synthesis and nerve regeneration. *Journal of Neurochemistry*, 42(4), 987–993. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1984.tb12701.x>
- Heasman, S. J., y Ridley, A. J. (2010). Multiple roles for RhoA during T cell transendothelial migration. *Small GTPases*, 1(3), 174–179. <https://doi.org/10.4161/sgtp.1.3.14724>
- Heikkilä, R., y Cohen, G. (1972). Further studies on the generation of hydrogen peroxide by 6-hydroxydopamine. Potentiation by ascorbic acid. *Molecular Pharmacology*, 8(2), 241–248.
- Heiman, M., Heilbut, A., Francardo, V., Kulicke, R., Fenster, R. J., Kolaczky, E. D., Mesirov, J. P., Surmeier, D. J., Cenci, M. A., y Greengard, P. (2014). Molecular adaptations of striatal spiny projection neurons during levodopa-induced dyskinesia. *Proceedings of the National Academy*

- of Sciences of the United States of America, 111(12), 4578–4583. <https://doi.org/10.1073/pnas.1401819111>
- Hernández, L. F., Castela, I., Ruiz-DeDiego, I., Obeso, J. A., y Moratalla, R. (2017). Striatal activation by optogenetics induces dyskinesias in the 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson disease. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 32(4), 530–537. <https://doi.org/10.1002/mds.26947>
- Herskowitz, J. H., Feng, Y., Mattheyses, A. L., Hales, C. M., Higginbotham, L. A., Duong, D. M., Montine, T. J., Troncoso, J. C., Thambisetty, M., Seyfried, N. T., Levey, A. I., y Lah, J. J. (2013). Pharmacologic inhibition of ROCK2 suppresses amyloid- β production in an Alzheimer's disease mouse model. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 33(49), 19086–19098. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2508-13.2013>
- Herz, D. M., Haagensen, B. N., Christensen, M. S., Madsen, K. H., Rowe, J. B., Løkkegaard, A., y Siebner, H. R. (2014). The acute brain response to levodopa heralds dyskinesias in Parkinson disease. *Annals of Neurology*, 75(6), 829–836. <https://doi.org/10.1002/ana.24138>
- Higuchi, Y., Matsuda, S., y Serizawa, T. (2017). Gamma knife radiosurgery in movement disorders: Indications and limitations. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 32(1), 28–35. <https://doi.org/10.1002/mds.26625>
- Hitti, F. L., Yang, A. I., Gonzalez-Alegre, P., y Baltuch, G. H. (2019). Human gene therapy approaches for the treatment of Parkinson's disease: An overview of current and completed clinical trials. *Parkinsonism y Related Disorders*, 66, 16–24. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2019.07.018>
- Hoang, M. V., Whelan, M. C., y Senger, D. R. (2004). Rho activity critically and selectively regulates endothelial cell organization during angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(7), 1874–1879. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308525100>
- Höing, S., Rudhard, Y., Reinhardt, P., Glatza, M., Stehling, M., Wu, G., Peiker, C., Böcker, A., Parga, J. A., Bunk, E., Schwamborn, J. C., Slack, M., Sternecker, J., & Schöler, H. R. (2012). Discovery of inhibitors of microglial neurotoxicity acting through multiple mechanisms using a stem-cell-based phenotypic assay. *Cell Stem Cell*, 11(5), 620–632. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.07.005>
- Hong, J. Y., Oh, J. S., Lee, I., Sunwoo, M. K., Ham, J. H., Lee, J. E., Sohn, Y. H., Kim, J. S., y Lee, P. H. (2014). Presynaptic dopamine depletion predicts levodopa-induced dyskinesia in de novo Parkinson disease. *Neurology*, 82(18), 1597–1604. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000385>
- Hong, N. J., y Garvin, J. L. (2007). Flow increases superoxide production by NADPH oxidase via activation of Na-K-2Cl cotransport and mechanical stress in thick ascending limbs. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 292(3), F993-8. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00383.2006>
- Honing, H., van den Berg, T. K., van der Pol, S. M. A., Dijkstra, C. D., van der Kammen, R. A., Collard, J. G., y de Vries, H. E. (2004). RhoA activation promotes transendothelial migration of monocytes via ROCK. *Journal of Leukocyte Biology*, 75(3), 523–528. <https://doi.org/10.1189/jlb.0203054>

- Horton, J. D., Goldstein, J. L., y Brown, M. S. (2002). SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *The Journal of Clinical Investigation*, 109(9), 1125–1131. <https://doi.org/10.1172/JCI15593>
- Hua, X., Yokoyama, C., Wu, J., Briggs, M. R., Brown, M. S., Goldstein, J. L., y Wang, X. (1993). SREBP-2, a second basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that stimulates transcription by binding to a sterol regulatory element. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(24), 11603–11607. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.24.11603>
- Huang, X., Alonso, A., Guo, X., Umbach, D. M., Lichtenstein, M. L., Ballantyne, C. M., Mailman, R. B., Mosley, T. H., y Chen, H. (2015). Statins, plasma cholesterol, and risk of Parkinson's disease: a prospective study. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 30(4), 552–559. <https://doi.org/10.1002/mds.26152>
- Huang, X., Chen, H., Miller, W. C., Mailman, R. B., Woodard, J. L., Chen, P. C., Xiang, D., Murrow, R. W., Wang, Y.-Z., y Poole, C. (2007). Lower low-density lipoprotein cholesterol levels are associated with Parkinson's disease. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 22(3), 377–381. <https://doi.org/10.1002/mds.21290>
- Huang, X., Sterling, N. W., Du, G., Sun, D., Stetter, C., Kong, L., Zhu, Y., Neighbors, J., Lewis, M. M., Chen, H., Hohl, R. J., y Mailman, R. B. (2019). Brain cholesterol metabolism and Parkinson's disease. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 34(3), 386–395. <https://doi.org/10.1002/mds.27609>
- Huber, M. J., Basu, R., Cecchetti, C., Cuadra, A. E., Chen, Q. H., y Shan, Z. (2015). Activation of the (Pro)renin receptor in the paraventricular nucleus increases sympathetic outflow in anesthetized rats. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 309(5), H880–H887. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00095.2015>
- Hubsher, G., Haider, M., y Okun, M. S. (2012). Amantadine: the journey from fighting flu to treating Parkinson disease. *Neurology*, 78(14), 1096–1099. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31824e8f0d>
- Ichihara, A., y Yatabe, M. S. (2019). The (pro)renin receptor in health and disease. *Nature Reviews Nephrology*, 15(11), 693–712. <https://doi.org/10.1038/s41581-019-0160-5>
- Ioannou, M. S., Jackson, J., Sheu, S. H., Chang, C. L., Weigel, A. V., Liu, H., Pasolli, H. A., Xu, C. S., Pang, S., Hess, H. F., Lippincott-Schwartz, J., y Liu, Z. (2018). Neuron-astrocyte metabolic coupling during neuronal stimulation protects against fatty acid toxicity. *BioRxiv*, 1–45. <https://doi.org/10.1101/465237>
- Iorio, F., Bosotti, R., Scacheri, E., Belcastro, V., Mithbaokar, P., Ferriero, R., Murino, L., Tagliaferri, R., Brunetti-Pierri, N., Isacchi, A., y Di Bernardo, D. (2010). Discovery of drug mode of action and drug repositioning from transcriptional responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(33), 14621–14626. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000138107>
- Ishizaki, T., Maekawa, M., Fujisawa, K., Okawa, K., Iwamatsu, A., Fujita, A., Watanabe, N., Saito, Y., Kakizuka, A., Morii, N., y Narumiya, S. (1996). The small GTP-binding protein Rho binds to and activates a 160 kDa Ser/Thr protein kinase homologous to myotonic dystrophy kinase. *The EMBO Journal*, 15(8), 1885–1893.
- Ismail, M.-A.-M., Mateos, L., Maioli, S., Merino-Serrais, P., Ali, Z., Lodeiro, M., Westman, E., Leitersdorf, E., Gulyás, B., Olof-Wahlund, L., Winblad, B., Savitcheva, I., Björkhem, I., y Cedazo-Minguez, A. (2017). 27-Hydroxycholesterol impairs neuronal glucose uptake through

- an IRAP/GLUT4 system dysregulation. *The Journal of Experimental Medicine*, 214(3), 699–717. <https://doi.org/10.1084/jem.20160534>
- Jankovic, J. (2018). Immunologic treatment of Parkinson's disease. In *Immunotherapy* (Vol. 10, Issue 2, pp. 81–84). <https://doi.org/10.2217/imt-2017-0146>
- Javitch, J. A., D'Amato, R. J., Strittmatter, S. M., y Snyder, S. H. (1985). Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 -tetrahydropyridine: uptake of the metabolite N-methyl-4-phenylpyridine by dopamine neurons explains selective toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(7), 2173–2177. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.7.2173>
- Jenner, P. (2003). The MPTP-treated primate as a model of motor complications in PD: primate model of motor complications. *Neurology*, 61(6 Suppl 3), S4-11. https://doi.org/10.1212/wnl.61.6_suppl_3.s4
- Jenner, P. (2008). Molecular mechanisms of L-DOPA-induced dyskinesia. *Nature Reviews. Neuroscience*, 9(9), 665–677. <https://doi.org/10.1038/nrn2471>
- Jeong, S.-M., Jang, W., y Shin, D. W. (2019). Association of statin use with Parkinson's disease: Dose-response relationship. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 34(7), 1014–1021. <https://doi.org/10.1002/mds.27681>
- Jiang, H., Song, N., Wang, J., Ren, L.-Y., y Xie, J.-X. (2007). Peripheral iron dextran induced degeneration of dopaminergic neurons in rat substantia nigra. *Neurochemistry International*, 51(1), 32–36. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2007.03.006>
- Jin, G.-Z., Cho, S.-J., Choi, E.-G., Lee, Y.-S., Yu, X.-F., Choi, K.-S., Yee, S.-T., Jeon, J.-T., Kim, M.-O., y Kong, I.-K. (2008). Rat mesenchymal stem cells increase tyrosine hydroxylase expression and dopamine content in ventral mesencephalic cells in vitro. *Cell Biology International*, 32(11), 1433–1438. <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2008.08.014>
- Jin, U., Park, S. J., y Park, S. M. (2019). Cholesterol metabolism in the brain and its association with Parkinson's disease. *Experimental Neurobiology*, 28(5), 554–567. <https://doi.org/10.5607/en.2019.28.5.554>
- Joglar, B., Rodriguez-Pallares, J., Rodriguez-Perez, A. I., Rey, P., Guerra, M. J., y Labandeira-Garcia, J. L. (2009). The inflammatory response in the MPTP model of Parkinson's disease is mediated by brain angiotensin: relevance to progression of the disease. *Journal of Neurochemistry*, 109(2), 656–669. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.05999.x>
- Johnston, T. M., y Fox, S. H. (2015). Symptomatic Models of Parkinson's Disease and L-DOPA-Induced Dyskinesia in Non-human Primates. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*, 22, 221–235. https://doi.org/10.1007/7854_2014_352
- Jones, E. S., Vinh, A., McCarthy, C. A., Gaspari, T. A., y Widdop, R. E. (2008). AT2 receptors: functional relevance in cardiovascular disease. *Pharmacology y Therapeutics*, 120(3), 292–316. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2008.08.009>
- Jourdain, V. A., Schindlbeck, K. A., Tang, C. C., Niethammer, M., Choi, Y. Y., Markowitz, D., Nazem, A., Nardi, D., Carras, N., Feigin, A., Ma, Y., Peng, S., Dhawan, V., y Eidelberg, D. (2017). Increased putamen hypercapnic vasoreactivity in levodopa-induced dyskinesia. *JCI Insight*, 2(20). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.96411>
- Jülg, J., Strohm, L., y Behrends, C. (2020). Canonical and non-canonical autophagy pathways in microglia. *Molecular and Cellular Biology*, November. <https://doi.org/10.1128/mcb.00389-20>
- Junior, N. C. F., Dos-Santos-Pereira, M., Guimarães, F. S., y Del Bel, E. (2020). Cannabidiol and cannabinoid compounds as potential strategies for treating Parkinson's disease and L-DOPA-

- induced dyskinesia. *Neurotoxicity Research*, 37(1), 12–29. <https://doi.org/10.1007/s12640-019-00109-8>
- Kabra, A., Sharma, R., Kabra, R., y Baghel, U. S. (2018). Emerging and alternative therapies for Parkinson disease: an updated review. *Current Pharmaceutical Design*, 24(22), 2573–2582. <https://doi.org/10.2174/1381612824666180820150150>
- Kanda, A., Noda, K., Saito, W., y Ishida, S. (2012). (Pro)renin receptor is associated with angiogenic activity in proliferative diabetic retinopathy. *Diabetologia*, 55(11), 3104–3113. <https://doi.org/10.1007/s00125-012-2702-2>
- Kaneshiro, Y., Ichihara, A., Sakoda, M., Takemitsu, T., Nabi, A. H. M. N., Uddin, M. N., Nakagawa, T., Nishiyama, A., Suzuki, F., Inagami, T., y Itoh, H. (2007). Slowly progressive, angiotensin II-independent glomerulosclerosis in human (pro)renin receptor-transgenic rats. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 18(6), 1789–1795. <https://doi.org/10.1681/ASN.2006091062>
- Kang, S. Y., Lee, S.-B., Kim, H. J., Kim, H.-T., Yang, H. O., y Jang, W. (2017). Autophagic modulation by rosuvastatin prevents rotenone-induced neurotoxicity in an in vitro model of Parkinson's disease. *Neuroscience Letters*, 642, 20–26. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.01.063>
- Kannari, K., Kurahashi, K., Tomiyama, M., Maeda, T., Arai, A., Baba, M., Suda, T., y Matsunaga, M. (2002). [Tandospirone citrate, a selective 5-HT_{1A} agonist, alleviates L-DOPA-induced dyskinesia in patients with Parkinson's disease]. *No to shinkei = Brain and nerve*, 54(2), 133–137.
- Katoh, H., Aoki, J., Ichikawa, A., y Negishi, M. (1998). p160 RhoA-binding kinase ROK α induces neurite retraction. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(5), 2489–2492. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.5.2489>
- Kefalopoulou, Z., Politis, M., Piccini, P., Mencacci, N., Bhatia, K., Jahanshahi, M., Widner, H., Rehncrona, S., Brundin, P., Björklund, A., Lindvall, O., Limousin, P., Quinn, N., y Foltyniec, T. (2014). Long-term clinical outcome of fetal cell transplantation for Parkinson disease: two case reports. *JAMA Neurology*, 71(1), 83–87. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2013.4749>
- Kenborg, L., Rugbjerg, K., Lee, P.-C., Ravnskjaer, L., Christensen, J., Ritz, B., y Lassen, C. F. (2015). Head injury and risk for Parkinson disease: results from a Danish case-control study. *Neurology*, 84(11), 1098–1103. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000001362>
- Kikuchi, T., Morizane, A., Doi, D., Magotani, H., Onoe, H., Hayashi, T., Mizuma, H., Takara, S., Takahashi, R., Inoue, H., Morita, S., Yamamoto, M., Okita, K., Nakagawa, M., Parmar, M., y Takahashi, J. (2017). Human iPS cell-derived dopaminergic neurons function in a primate Parkinson's disease model. *Nature*, 548(7669), 592–596. <https://doi.org/10.1038/nature23664>
- Kim, J.-H., Lee, H.-W., Hwang, J., Kim, J., Lee, M.-J., Han, H.-S., Lee, W.-H., y Suk, K. (2012). Microglia-inhibiting activity of Parkinson's disease drug amantadine. *Neurobiology of Aging*, 33(9), 2145–2159. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2011.08.011>
- Kinouchi, K., Ichihara, A., Sano, M., Sun-Wada, G. H., Wada, Y., Kurauchi-Mito, A., Bokuda, K., Narita, T., Oshima, Y., Sakoda, M., Tamai, Y., Sato, H., Fukuda, K., y Itoh, H. (2010). The (Pro)renin receptor/ATP6AP2 is essential for vacuolar H⁺-ATPase assembly in murine cardiomyocytes. *Circulation Research*, 107(1), 30–34. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.224667>
- Kitaoka, Y., Sase, K., Tsukahara, C., Kojima, K., Shiono, A., Kogo, J., Tokuda, N., y Takagi, H. (2017). Axonal protection by ripasudil, a rho kinase inhibitor, via modulating autophagy in

- Tkinduced optic nerve degeneration. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 58(12), 5056–5064. <https://doi.org/10.1167/iovs.17-22000>
- Kivipelto, M., Helkala, E.-L., Laakso, M. P., Hänninen, T., Hallikainen, M., Alhainen, K., Iivonen, S., Mannermaa, A., Tuomilehto, J., Nissinen, A., y Soyninen, H. (2002). Apolipoprotein E epsilon4 allele, elevated midlife total cholesterol level, and high midlife systolic blood pressure are independent risk factors for late-life Alzheimer disease. *Annals of Internal Medicine*, 137(3), 149–155. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-137-3-200208060-00006>
- Klemann, C. J. H. M., Martens, G. J. M., Sharma, M., Martens, M. B., Isaacson, O., Gasser, T., Visser, J. E., y Poelmans, G. (2017). Integrated molecular landscape of Parkinson's disease. *NPJ Parkinson's Disease*, 3, 14. <https://doi.org/10.1038/s41531-017-0015-3>
- Klionsky, D. J., y Emr, S. D. (2000). Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science*, 290(5497), 1717–1721. <https://doi.org/10.1126/science.290.5497.1717>
- Koch, J. C., Barski, E., Lingor, P., Bähr, M., y Michel, U. (2011). Plasmids containing NRSE/RE1 sites enhance neurite outgrowth of retinal ganglion cells via sequestration of REST independent of NRSE dsRNA expression. *The FEBS Journal*, 278(18), 3472–3483. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08269.x>
- Koch, J. C., Tatenhorst, L., Roser, A. E., Saal, K. A., Tönges, L., y Lingor, P. (2018). ROCK inhibition in models of neurodegeneration and its potential for clinical translation. *Pharmacology and Therapeutics*, 189, 1–21. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.03.008>
- Koch, J. C., Tönges, L., Barski, E., Michel, U., Bähr, M., y Lingor, P. (2014). ROCK2 is a major regulator of axonal degeneration, neuronal death and axonal regeneration in the CNS. *Cell Death y Disease*, 5(5), e1225. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.191>
- Koch, J. C., Tönges, L., Barski, E., Michel, U., Bähr, M., y Lingor, P. (2014). ROCK2 is a major regulator of axonal degeneration, neuronal death and axonal regeneration in the CNS. *Cell Death and Disease*, 5(5), 1–12. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.191>
- Koch, J. C., Tönges, L., Michel, U., Bähr, M., y Lingor, P. (2014). Viral vector-mediated downregulation of RhoA increases survival and axonal regeneration of retinal ganglion cells. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8, 273. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00273>
- Koldamova, R. P., Lefterov, I. M., Ikonovic, M. D., Skoko, J., Lefterov, P. I., Isanski, B. A., DeKosky, S. T., y Lazo, J. S. (2003). 22R-hydroxycholesterol and 9-cis-retinoic acid induce ATP-binding cassette transporter A1 expression and cholesterol efflux in brain cells and decrease amyloid beta secretion. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(15), 13244–13256. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300044200>
- Komagome, R., Kimura, K., y Saito, M. (2000). Postnatal changes in Rho and Rho-related proteins in the mouse brain. *The Japanese Journal of Veterinary Research*, 47(3–4), 127–133. FALTA DOI
- Koob, A. O., Ubhi, K., Paulsson, J. F., Kelly, J., Rockenstein, E., Mante, M., Adame, A., y Masliah, E. (2010). Lovastatin ameliorates alpha-synuclein accumulation and oxidation in transgenic mouse models of alpha-synucleinopathies. *Experimental Neurology*, 221(2), 267–274. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.11.015>
- Kreutzberg, G. W. (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends in Neurosciences*, 19(8), 312–318. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(96\)10049-7](https://doi.org/10.1016/0166-2236(96)10049-7)
- Krop, M., Lu, X., Danser, A. H. J., y Meima, M. E. (2013). The (pro)renin receptor. A decade of research: what have we learned? *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology*, 465(1), 87–97. <https://doi.org/10.1007/s00424-012-1105-z>

- Kumar, A., y Cookson, M. R. (2011). Role of LRRK2 kinase dysfunction in Parkinson disease. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 13, e20. <https://doi.org/10.1017/S146239941100192X>
- Kumar, A., Rassoli, A., y Raizada, M. K. (1988). Angiotensinogen gene expression in neuronal and glial cells in primary cultures of rat brain. *Journal of Neuroscience Research*, 19(3), 287–290. <https://doi.org/10.1002/jnr.490190302>
- Kumar, A., Sharma, N., Gupta, A., Kalonia, H., y Mishra, J. (2012). Neuroprotective potential of atorvastatin and simvastatin (HMG-CoA reductase inhibitors) against 6-hydroxydopamine (6-OHDA) induced Parkinson-like symptoms. *Brain Research*, 1471, 13–22. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.06.050>
- Kumar, R., Singh, V. P., y Baker, K. M. (2007). The intracellular renin-angiotensin system: a new paradigm. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 18(5), 208–214. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2007.05.001>
- Labandeira-García, J. L., Garrido-Gil, P., Rodríguez-Pallares, J., Valenzuela, R., Borrajo, A., y Rodríguez-Perez, A. I. (2014). Brain renin-angiotensin system and dopaminergic cell vulnerability. *Frontiers in Neuroanatomy*, 8, 67. <https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00067>
- Labandeira-García, J. L., Rodríguez-Pallares, J., Domínguez-Meijide, A., Valenzuela, R., Villar-Cheda, B., y Rodríguez-Perez, A. I. (2013). Dopamine-angiotensin interactions in the basal ganglia and their relevance for Parkinson's disease. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 28(10), 1337–1342. <https://doi.org/10.1002/mds.25614>
- Labandeira-García, J. L., Rodríguez-Pallares, J., Villar-Cheda, B., Rodríguez-Perez, A. I., Garrido-Gil, P., y Guerra, M. J. (2011). Aging, Angiotensin system and dopaminergic degeneration in the substantia nigra. *Aging and Disease*, 2(3), 257–274.
- Labandeira-García, J. L., Rodríguez-Perez, A. I., Garrido-Gil, P., Rodríguez-Pallares, J., Lanciego, J. L., y Guerra, M. J. (2017). Brain renin-angiotensin system and microglial polarization: implications for aging and neurodegeneration. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 9, 129. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00129>
- Labandeira-García, J. L., Rodríguez-Perez, A. I., Valenzuela, R., Costa-Besada, M. A., y Guerra, M. J. (2016). Menopause and Parkinson's disease. Interaction between estrogens and brain renin-angiotensin system in dopaminergic degeneration. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 43, 44–59. <https://doi.org/10.1016/j.yfrme.2016.09.003>
- Labandeira-García, J. L., Rodríguez-Perez, A. I., Villar-Cheda, B., Borrajo, A., Domínguez-Meijide, A., y Guerra, M. J. (2015). Rho Kinase and dopaminergic degeneration: a promising therapeutic target for Parkinson's disease. *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry*, 21(6), 616–629. <https://doi.org/10.1177/1073858414554954>
- Labandeira-García, J. L., Rozas, G., Lopez-Martin, E., Liste, I., y Guerra, M. J. (1996). Time course of striatal changes induced by 6-hydroxydopamine lesion of the nigrostriatal pathway, as studied by combined evaluation of rotational behaviour and striatal Fos expression. *Experimental Brain Research*, 108(1), 69–84. <https://doi.org/10.1007/BF00242905>
- Labandeira-García, J. L., Valenzuela, R., Costa-Besada, M. A., Villar-Cheda, B., y Rodríguez-Perez, A. I. (2020). The intracellular renin-angiotensin system: Friend or foe. Some light from the dopaminergic neurons. *Progress in Neurobiology*, 101919. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2020.101919>
- Lane, E. L. (2019). L-DOPA for Parkinson's disease—a bittersweet pill. *The European Journal of Neuroscience*, 49(3), 384–398. <https://doi.org/10.1111/ejn.14119>

- Langston, J. W., Ballard, P., Tetrud, J. W., y Irwin, I. (1983). Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science (New York, N.Y.)*, 219(4587), 979–980. <https://doi.org/10.1126/science.6823561>
- Lee, C. S., Cenci, M. A., Schulzer, M., y Björklund, A. (2000). Embryonic ventral mesencephalic grafts improve levodopa-induced dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. *Brain: A Journal of Neurology*, 123 (Pt 7), 1365–1379. <https://doi.org/10.1093/brain/123.7.1365>
- Lee, C. S., Sauer, H., y Björklund, A. (1996). Dopaminergic neuronal degeneration and motor impairments following axon terminal lesion by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat. *Neuroscience*, 72(3), 641–653. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(95\)00571-4](https://doi.org/10.1016/0306-4522(95)00571-4)
- Lee, Y.-C., Lin, C.-H., Wu, R.-M., Lin, M.-S., Lin, J.-W., Chang, C.-H., y Lai, M.-S. (2013). Discontinuation of statin therapy associates with Parkinson disease: a population-based study. *Neurology*, 81(5), 410–416. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31829d873c>
- Lerner, R. P., Francardo, V., Fujita, K., Bimpisidis, Z., Jourdain, V. A., Tang, C. C., Dewey, S. L., Chaly, T., Cenci, M. A., y Eidelberg, D. (2017). Levodopa-induced abnormal involuntary movements correlate with altered permeability of the blood-brain-barrier in the basal ganglia. *Scientific Reports*, 7(1), 16005. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16228-1>
- Leta, V., Jenner, P., Chaudhuri, K. R., y Antonini, A. (2019). Can therapeutic strategies prevent and manage dyskinesia in Parkinson's disease? An update. *Expert Opinion on Drug Safety*, 18(12), 1203–1218. <https://doi.org/10.1080/14740338.2019.1681966>
- Leung, T., Chen, X. Q., Manser, E., y Lim, L. (1996). The p160 RhoA-binding kinase ROK alpha is a member of a kinase family and is involved in the reorganization of the cytoskeleton. *Molecular and Cellular Biology*, 16(10), 5313–5327. <https://doi.org/10.1128/mcb.16.10.5313>
- Lev-Ran, A., y Porta, M. (2005). Salt and hypertension: a phylogenetic perspective. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 21(2), 118–131. <https://doi.org/10.1002/dmrr.539>
- Li, M., Li, Z., y Sun, X. (2008). Statins suppress MMP2 secretion via inactivation of RhoA/ROCK pathway in pulmonary vascular smooth muscles cells. *European Journal of Pharmacology*, 591(1–3), 219–223. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.06.082>
- Li, M., Yasumura, D., Ma, A. A. K., Matthes, M. T., Yang, H., Nielson, G., Huang, Y., Szoka, F. C., Lavail, M. M., y Diamond, M. I. (2013). Intravitreal administration of HA-1077, a ROCK inhibitor, improves retinal function in a mouse model of huntington disease. *PloS One*, 8(2), e56026. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056026>
- Li, X.-L., Guan, R.-J., y Li, J.-J. (2012). Attenuation of monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats by rosuvastatin. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 60(2), 219–226. <https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e31825c6e63>
- Liang, Y., Zhou, T., Chen, Y., Lin, D., Jing, X., Peng, S., Zheng, D., Zeng, Z., Lei, M., Wu, X., Huang, K., Yang, L., Xiao, S., Liu, J., y Tao, E. (2017). Rifampicin inhibits rotenone-induced microglial inflammation via enhancement of autophagy. *NeuroToxicology*, 63, 137–145. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2017.09.015>
- Limousin, P., Pollak, P., Benazzouz, A., Hoffmann, D., Le Bas, J. F., Broussolle, E., Perret, J. E., y Benabid, A. L. (1995). Effect of parkinsonian signs and symptoms of bilateral subthalamic nucleus stimulation. *Lancet (London, England)*, 345(8942), 91–95. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(95\)90062-4](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(95)90062-4)
- Lin, X., Parisiadou, L., Gu, X.-L., Wang, L., Shim, H., Sun, L., Xie, C., Long, C.-X., Yang, W.-J., Ding, J., Chen, Z. Z., Gallant, P. E., Tao-Cheng, J.-H., Rudow, G., Troncoso, J. C., Liu, Z., Li, Z., y Cai, H. (2009). Leucine-rich repeat kinase 2 regulates the progression of neuropathology

- induced by Parkinson's disease related mutant alpha-synuclein. *Neuron*, 64(6), 807–827. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.11.006>
- Lindenbach, D., Dupre, K. B., Eskow Jaunarajs, K. L., Ostock, C. Y., Goldenberg, A. A., y Bishop, C. (2013). Effects of 5-HT1A receptor stimulation on striatal and cortical M1 pERK induction by L-DOPA and a D1 receptor agonist in a rat model of Parkinson's disease. *Brain Research*, 1537, 327–339. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.09.020>
- Lindgren, H. S., Ohlin, K. E., y Cenci, M. A. (2009). Differential involvement of D1 and D2 dopamine receptors in L-DOPA-induced angiogenic activity in a rat model of Parkinson's disease. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 34(12), 2477–2488. <https://doi.org/10.1038/npp.2009.74>
- Lindgren, H. S., Rylander, D., Ohlin, K. E., Lundblad, M., y Cenci, M. A. (2007). The “motor complication syndrome” in rats with 6-OHDA lesions treated chronically with L-DOPA: relation to dose and route of administration. *Behavioural Brain Research*, 177(1), 150–159. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.09.019>
- Lindvall, O. (2015). Treatment of Parkinson's disease using cell transplantation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 370(1680), 20140370. <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0370>
- Lindvall, O. (2016). Clinical translation of stem cell transplantation in Parkinson's disease. *Journal of Internal Medicine*, 279(1), 30–40. <https://doi.org/10.1111/joim.12415>
- Lindvall, O., y Björklund, A. (2011). Cell therapeutics in Parkinson's disease. *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 8(4), 539–548. <https://doi.org/10.1007/s13311-011-0069-6>
- Lingor, P., Teusch, N., Schwarz, K., Mueller, R., Mack, H., Bähr, M., y Mueller, B. K. (2007). Inhibition of Rho kinase (ROCK) increases neurite outgrowth on chondroitin sulphate proteoglycan in vitro and axonal regeneration in the adult optic nerve in vivo. *Journal of Neurochemistry*, 103(1), 181–189. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04756.x>
- Lingor, P., Weber, M., Camu, W., Friede, T., Hilgers, R., Leha, A., Neuwirth, C., Günther, R., Benatar, M., Kuzma-Kozakiewicz, M., Bidner, H., Blankenstein, C., Frontini, R., Ludolph, A., y Koch, J. C. (2019). ROCK-ALS: protocol for a randomized, placebo-controlled, double-blind phase IIa trial of safety, tolerability and efficacy of the Rho Kinase (ROCK) inhibitor fasudil in amyotrophic lateral sclerosis. In *Frontiers in neurology* (Vol. 10, p. 293). <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00293>
- Liu, C.-C., Liu, C.-C., Kanekiyo, T., Xu, H., y Bu, G. (2013). Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. In *Nature reviews. Neurology* (Vol. 9, Issue 2, pp. 106–118). <https://doi.org/10.1038/nrneuro.2012.263>
- Liu, F. T., Yang, Y. J., Wu, J. J., Li, S., Tang, Y. L., Zhao, J., Liu, Z. Y., Xiao, B. G., Zuo, J., Liu, W., y Wang, J. (2016). Fasudil, a Rho kinase inhibitor, promotes the autophagic degradation of A53T α -synuclein by activating the JNK 1/Bcl-2/beclin 1 pathway. *Brain Research*, 1632, 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.12.002>
- Liu, G., Sterling, N. W., Kong, L., Lewis, M. M., Mailman, R. B., Chen, H., Leslie, D., y Huang, X. (2017a). Statins may facilitate Parkinson's disease: Insight gained from a large, national claims database. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 32(6), 913–917. <https://doi.org/10.1002/mds.27006>
- Liu, L., MacKenzie, K. R., Putluri, N., Maletić-Savatić, M., y Bellen, H. J. (2017b). The glia-neuron lactate shuttle and elevated ROS promote lipid synthesis in neurons and lipid droplet

- accumulation in glia via APOE/D. *Cell Metabolism*, 26(5), 719-737.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.08.024>
- Liu, X. D., Bao, Y., y Liu, G. J. (2019). Comparison between levodopa-carbidopa intestinal gel infusion and subthalamic nucleus deep-brain stimulation for advanced Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. In *Frontiers in neurology* (Vol. 10, p. 934). <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00934>
- López, A., Muñoz, A., Guerra, M. J., y Labandeira-Garcia, J. L. (2001). Mechanisms of the effects of exogenous levodopa on the dopamine-denervated striatum. *Neuroscience*, 103(3), 639–651. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(00\)00588-1](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(00)00588-1)
- López-Real, A., Rey, P., Soto-Otero, R., Mendez-Alvarez, E., y Labandeira-Garcia, J. L. (2005). Angiotensin-converting enzyme inhibition reduces oxidative stress and protects dopaminergic neurons in a 6-hydroxydopamine rat model of Parkinsonism. *Journal of Neuroscience Research*, 81(6), 865–873. <https://doi.org/10.1002/jnr.20598>
- Lu, X., Wang, F., Xu, C., Soodvilai, S., Peng, K., Su, J., Zhao, L., Yang, K. T., Feng, Y., Zhou, S.-F., Gustafsson, J.-Å., y Yang, T. (2016). Soluble (pro)renin receptor via β -catenin enhances urine concentration capability as a target of liver X receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(13), E1898-906. <https://doi.org/10.1073/pnas.1602397113>
- Luginger, E., Wenning, G. K., Bösch, S., y Poewe, W. (2000). Beneficial effects of amantadine on L-dopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 15(5), 873–878. [https://doi.org/10.1002/1531-8257\(200009\)15:5<873aid-mds1017>3.0.co;2-i](https://doi.org/10.1002/1531-8257(200009)15:5<873aid-mds1017>3.0.co;2-i)
- Lundblad, M., Picconi, B., Lindgren, H., y Cenci, M. A. (2004). A model of L-DOPA-induced dyskinesia in 6-hydroxydopamine lesioned mice: relation to motor and cellular parameters of nigrostriatal function. *Neurobiology of Disease*, 16(1), 110–123. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2004.01.007>
- Lundblad, M., Usiello, A., Carta, M., Håkansson, K., Fisone, G., y Cenci, M. A. (2005). Pharmacological validation of a mouse model of l-DOPA-induced dyskinesia. *Experimental Neurology*, 194(1), 66–75. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2005.02.002>
- Lundblad, M., Vaudano, E., y Cenci, M. A. (2003). Cellular and behavioural effects of the adenosine A2a receptor antagonist KW-6002 in a rat model of l-DOPA-induced dyskinesia. *Journal of Neurochemistry*, 84(6), 1398–1410. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01632.x>
- Ma, K., Wu, H. Y., Zhang, B., He, X., y Li, B. X. (2015). Neurotoxicity effects of atrazine-induced SH-SY5Y human dopaminergic neuroblastoma cells via microglial activation. *Molecular BioSystems*, 11(11), 2915–2924. <https://doi.org/10.1039/c5mb00432b>
- Maekawa, M., Ishizaki, T., Boku, S., Watanabe, N., Fujita, A., Iwamatsu, A., Obinata, T., Ohashi, K., Mizuno, K., y Narumiya, S. (1999). Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science (New York, N.Y.)*, 285(5429), 895–898. <https://doi.org/10.1126/science.285.5429.895>
- Mair, K. M., MacLean, M. R., Morecroft, I., Dempsie, Y., y Palmer, T. M. (2008). Novel interactions between the 5-HT transporter, 5-HT1B receptors and Rho kinase in vivo and in pulmonary fibroblasts. *British Journal of Pharmacology*, 155(4), 606–616. <https://doi.org/10.1038/bjp.2008.310>
- Marin, C., Aguilar, E., Rodríguez-Oroz, M. C., Bartoszyk, G. D., y Obeso, J. A. (2009). Local administration of sarizotan into the subthalamic nucleus attenuates levodopa-induced

- dyskinesias in 6-OHDA-lesioned rats. *Psychopharmacology*, 204(2), 241–250. <https://doi.org/10.1007/s00213-008-1452-9>
- Marsden, C. D. (1990). Parkinson's disease. *Lancet* (London, England), 335(8695), 948–952. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(90\)91006-v](https://doi.org/10.1016/0140-6736(90)91006-v)
- Martinez, A. A., Morgese, M. G., Pisanu, A., Macheda, T., Paquette, M. A., Seillier, A., Cassano, T., Carta, A. R., y Giuffrida, A. (2015). Activation of PPAR gamma receptors reduces levodopa-induced dyskinesias in 6-OHDA-lesioned rats. *Neurobiology of Disease*, 74, 295–304. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.11.024>
- Masliah, E., Rockenstein, E., Adame, A., Alford, M., Crews, L., Hashimoto, M., Seubert, P., Lee, M., Goldstein, J., Chilcote, T., Games, D., y Schenk, D. (2005). Effects of alpha-synuclein immunization in a mouse model of Parkinson's disease. *Neuron*, 46(6), 857–868. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.05.010>
- Masliah, E., Rockenstein, E., Mante, M., Crews, L., Spencer, B., Adame, A., Patrick, C., Trejo, M., Ubhi, K., Rohn, T. T., Mueller-Steiner, S., Seubert, P., Barbour, R., McConlogue, L., Buttini, M., Games, D., y Schenk, D. (2011). Passive immunization reduces behavioral and neuropathological deficits in an alpha-synuclein transgenic model of Lewy body disease. *PLoS One*, 6(4), e19338. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019338>
- Matavelli, L. C., Huang, J., y Siragy, H. M. (2010). (Pro)renin receptor contributes to diabetic nephropathy by enhancing renal inflammation. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 37(3), 277–282. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2009.05292.x>
- Mateos, L., Ismail, M.-A.-M., Gil-Bea, F.-J., Leoni, V., Winblad, B., Björkhem, I., y Cedazo-Minguez, A. (2011). Upregulation of brain renin angiotensin system by 27-hydroxycholesterol in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 24(4), 669–679. <https://doi.org/10.3233/JAD-2011-101512>
- Mauch, D. H., Nägler, K., Schumacher, S., Göritz, C., Müller, E. C., Otto, A., y Pfrieder, F. W. (2001). CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science* (New York, N.Y.), 294(5545), 1354–1357. <https://doi.org/10.1126/science.294.5545.1354>
- Mcdonald, C., Gordon, G., Hand, A., Walker, R. W., y Fisher, J. M. (2018). 200 years of Parkinson's disease: What have we learnt from James Parkinson? *Age and Ageing*, 47(2), 209–214. <https://doi.org/10.1093/ageing/afx196>
- McFarthing, K., Prakash, N., y Simuni, T. (2019). Clinical trial highlights - dyskinesia. *Journal of Parkinson's Disease*, 9(3), 449–465. <https://doi.org/10.3233/JPD-199002>
- Meadows, S. M., Chambers, N. E., Conti, M. M., Bossert, S. C., Tasber, C., Sheena, E., Varney, M., Newman-Tancredi, A., y Bishop, C. (2017). Characterizing the differential roles of striatal 5-HT(1A) auto- and hetero-receptors in the reduction of l-DOPA-induced dyskinesia. *Experimental Neurology*, 292, 168–178. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.03.013>
- Mellone, M., Stanic, J., Hernandez, L. F., Iglesias, E., Zianni, E., Longhi, A., Prigent, A., Picconi, B., Calabresi, P., Hirsch, E. C., Obeso, J. A., Di Luca, M., y Gardoni, F. (2015). NMDA receptor GluN2A/GluN2B subunit ratio as synaptic trait of levodopa-induced dyskinesias: from experimental models to patients. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9, 245. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00245>
- Meredith, G. E., Sonsalla, P. K., y Chesselet, M.-F. (2008). Animal models of Parkinson's disease progression. *Acta Neuropathologica*, 115(4), 385–398. <https://doi.org/10.1007/s00401-008-0350-x>

- Mignon, L. J., y Wolf, W. A. (2005). 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin reduces striatal glutamate in an animal model of Parkinson's disease. *Neuroreport*, 16(7), 699–703. <https://doi.org/10.1097/00001756-200505120-00009>
- Millan, M. J. (2010). From the cell to the clinic: a comparative review of the partial D₂/D₃receptor agonist and α 2-adrenoceptor antagonist, piribedil, in the treatment of Parkinson's disease. *Pharmacology y Therapeutics*, 128(2), 229–273. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2010.06.002>
- Mills, J. C., Stone, N. L., Erhardt, J., y Pittman, R. N. (1998). Apoptotic membrane blebbing is regulated by myosin light chain phosphorylation. *The Journal of Cell Biology*, 140(3), 627–636. <https://doi.org/10.1083/jcb.140.3.627>
- Milsted, A., Barna, B. P., Ransohoff, R. M., Brosnihan, K. B., y Ferrario, C. M. (1990). Astrocyte cultures derived from human brain tissue express angiotensinogen mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(15), 5720–5723. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.15.5720>
- Mimura, F., Yamagishi, S., Arimura, N., Fujitani, M., Kubo, T., Kaibuchi, K., y Yamashita, T. (2006). Myelin-associated glycoprotein inhibits microtubule assembly by a Rho-kinase-dependent mechanism. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(23), 15970–15979. <https://doi.org/10.1074/jbc.M510934200>
- Miners, J. S., Ashby, E., Van Helmond, Z., Chalmers, K. A., Palmer, L. E., Love, S., y Kehoe, P. G. (2008). Angiotensin-converting enzyme (ACE) levels and activity in Alzheimer's disease, and relationship of perivascular ACE-1 to cerebral amyloid angiopathy. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 34(2), 181–193. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2007.00885.x>
- Mizushima, N. (2011). Autophagy in protein and organelle turnover. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 76, 397–402. <https://doi.org/10.1101/sqb.2011.76.011023>
- Mlecza, A., Millar, S., Tooze, S. A., Olson, M. F., y Chan, E. Y. W. (2013). Regulation of autophagosome formation by Rho kinase. *Cellular Signalling*, 25(1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.09.010>
- Mosharov, E. V., Borgkvist, A., y Sulzer, D. (2015). Presynaptic effects of levodopa and their possible role in dyskinesia. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 30(1), 45–53. <https://doi.org/10.1002/mds.26103>
- Moskal, N., Riccio, V., Bashkurov, M., Taddese, R., Datti, A., Lewis, P. N., y Angus McQuibban, G. (2020). ROCK inhibitors upregulate the neuroprotective Parkin-mediated mitophagy pathway. *Nature Communications*, 11(1), 88. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13781-3>
- Mueller, B. K., Mack, H., y Teusch, N. (2005). Rho kinase, a promising drug target for neurological disorders. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 4(5), 387–398. <https://doi.org/10.1038/nrd1719>
- Mulas, G., Espa, E., Fenu, S., Spiga, S., Cossu, G., Pillai, E., Carboni, E., Simbula, G., Jadžić, D., Angius, F., Spolitu, S., Batetta, B., Lecca, D., Giuffrida, A., y Carta, A. R. (2016). Differential induction of dyskinesia and neuroinflammation by pulsatile versus continuous L-DOPA delivery in the 6-OHDA model of Parkinson's disease. *Experimental Neurology*, 286, 83–92. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2016.09.013>
- Mulas, G., Espa, E., Fenu, S., Spiga, S., Cossu, G., Pillai, E., Carboni, E., Simbula, G., Jadžić, D., Angius, F., Spolitu, S., Batetta, B., Lecca, D., Giuffrida, A., y Carta, A. R. (2016). Differential induction of dyskinesia and neuroinflammation by pulsatile versus continuous L-DOPA delivery in the 6-OHDA model of Parkinson's disease. *Experimental Neurology*, 286, 83–92. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2016.09.013>

- Müller, T. (2015). Catechol-O-methyltransferase inhibitors in Parkinson's disease. *Drugs*, 75(2), 157–174. <https://doi.org/10.1007/s40265-014-0343-0>
- Muñoz, A., Carlsson, T., Tronci, E., Kirik, D., Björklund, A., y Carta, M. (2009). Serotonin neuron-dependent and -independent reduction of dyskinesia by 5-HT1A and 5-HT1B receptor agonists in the rat Parkinson model. *Experimental Neurology*, 219(1), 298–307. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.05.033>
- Muñoz, A., Corrêa, C. L., Lopez-Lopez, A., Costa-Besada, M. A., Diaz-Ruiz, C., y Labandeira-Garcia, J. L. (2018). Physical exercise improves aging-related changes in angiotensin, IGF-1, SIRT1, SIRT3, and VEGF in the substantia nigra. *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences*, 73(12), 1594–1601. <https://doi.org/10.1093/gerona/gly072>
- Muñoz, A., Corrêa, C. L., Villar-Cheda, B., Costa-Besada, M. A., y Labandeira-Garcia, J. L. (2016). Aging-related Increase in Rho Kinase Activity in the Nigral Region Is Counteracted by Physical Exercise. *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences*, 71(10), 1254–1257. <https://doi.org/10.1093/gerona/glv179>
- Muñoz, A., Garrido-Gil, P., Dominguez-Mejide, A., y Labandeira-Garcia, J. L. (2014). Angiotensin type 1 receptor blockage reduces l-dopa-induced dyskinesia in the 6-OHDA model of Parkinson's disease. Involvement of vascular endothelial growth factor and interleukin-1 β . *Experimental Neurology*, 261, 720–732. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.08.019>
- Muñoz, A., Li, Q., Gardoni, F., Marcello, E., Qin, C., Carlsson, T., Kirik, D., Di Luca, M., Björklund, A., Bezard, E., y Carta, M. (2008). Combined 5-HT1A and 5-HT1B receptor agonists for the treatment of L-DOPA-induced dyskinesia. *Brain: A Journal of Neurology*, 131(Pt 12), 3380–3394. <https://doi.org/10.1093/brain/awn235>
- Muñoz, A., Lopez-Lopez, A., Labandeira, C. M., y Labandeira-Garcia, J. L. (2020). Interactions between the serotonergic and other neurotransmitter systems in the basal ganglia: role in Parkinson's disease and adverse effects of L-DOPA. *Frontiers in Neuroanatomy*, 14, 26. <https://doi.org/10.3389/fnana.2020.00026>
- Muñoz, A., Rey, P., Guerra, M. J., Mendez-Alvarez, E., Soto-Otero, R., y Labandeira-Garcia, J. L. (2006). Reduction of dopaminergic degeneration and oxidative stress by inhibition of angiotensin converting enzyme in a MPTP model of parkinsonism. *Neuropharmacology*, 51(1), 112–120. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2006.03.004>
- Muñoz-Manchado, A. B., Villadiego, J., Romo-Madero, S., Suárez-Luna, N., Bermejo-Navas, A., Rodríguez-Gómez, J. A., Garrido-Gil, P., Labandeira-García, J. L., Echevarría, M., López-Barneo, J., y Toledo-Aral, J. J. (2016). Chronic and progressive Parkinson's disease MPTP model in adult and aged mice. *Journal of Neurochemistry*, 136(2), 373–387. <https://doi.org/10.1111/jnc.13409>
- Münzel, T., y Keaney, J. F. J. (2001). Are ACE inhibitors a “magic bullet” against oxidative stress? *Circulation*, 104(13), 1571–1574. <https://doi.org/10.1161/hc3801.095585>
- Mutez, E., Duhamel, A., Defebvre, L., Bordet, R., Destée, A., y Kreisler, A. (2009). Lipid-lowering drugs are associated with delayed onset and slower course of Parkinson's disease. *Pharmacological Research*, 60(1), 41–45. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2009.03.010>
- Nadjar, A., Gerfen, C. R., y Bezard, E. (2009). Priming for l-dopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease: a feature inherent to the treatment or the disease? *Progress in Neurobiology*, 87(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2008.09.013>

- Najib, N. M., Idkaidek, N., Adel, A., Admour, I., Astigarraga, R. E. B., Nucci, G. De, Alam, S. M., Dham, R., y Qumaruzaman. (2003). Pharmacokinetics and bioequivalence evaluation of two simvastatin 40 mg tablets (Simvast and Zocor) in healthy human volunteers. *Biopharmaceutics y Drug Disposition*, 24(5), 183–189. <https://doi.org/10.1002/bdd.347>
- Nakabayashi, H., y Shimizu, K. (2011). HA1077, a Rho kinase inhibitor, suppresses glioma-induced angiogenesis by targeting the Rho-ROCK and the mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase (MEK/ERK) signal pathways. *Cancer Science*, 102(2), 393–399. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2010.01794.x>
- Nakagawa, O., Fujisawa, K., Ishizaki, T., Saito, Y., Nakao, K., y Narumiya, S. (1996). ROCK-I and ROCK-II, two isoforms of Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase in mice. *FEBS Letters*, 392(2), 189–193. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00811-3](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00811-3)
- Nakano, M., Kanda, T., Matsuzaki, S., Hasegawa, S., Ma, H., Imai, S., Suzuki, T., y Kobayashi, I. (1995). Effect of losartan, an AT1 selective angiotensin II receptor antagonist, on isoproterenol-induced cardiac ornithine decarboxylase activity. *Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology*, 88(1), 21–30.
- Navailles, S., Carta, M., Guthrie, M., y De Deurwaerdère, P. (2011). L-DOPA and serotonergic neurons: functional implication and therapeutic perspectives in Parkinson's disease. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry*, 11(4), 305–320. <https://doi.org/10.2174/1871524911106040305>
- Navarro, G., Borroto-Escuela, D., Angelats, E., Etayo, Í., Reyes-Resina, I., Pulido-Salgado, M., Rodríguez-Pérez, A. I., Canela, E. I., Saura, J., Lanciego, J. L., Labandeira-García, J. L., Saura, C. A., Fuxe, K., y Franco, R. (2018). Receptor-heteromer mediated regulation of endocannabinoid signaling in activated microglia. Role of CB(1) and CB(2) receptors and relevance for Alzheimer's disease and levodopa-induced dyskinesia. *Brain, Behavior, and Immunity*, 67, 139–151. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.08.015>
- Nguyen, G. (2011). Renin, (pro)renin and receptor: an update. *Clinical Science (London, England: 1979)*, 120(5), 169–178. <https://doi.org/10.1042/CS20100432>
- Nguyen, G., Delarue, F., Burcklé, C., Bouzahir, L., Giller, T., y Sraer, J.-D. (2002). Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *The Journal of Clinical Investigation*, 109(11), 1417–1427. <https://doi.org/10.1172/JCI14276>
- Nieweg, K., Schaller, H., y Pfrieger, F. W. (2009). Marked differences in cholesterol synthesis between neurons and glial cells from postnatal rats. *Journal of Neurochemistry*, 109(1), 125–134. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.05917.x>
- Obeso, J. A., Rodríguez-Oroz, M. C., Rodríguez, M., Lanciego, J. L., Artieda, J., Gonzalo, N., y Olanow, C. W. (2000). Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease. *Trends in Neurosciences*, 23(10 Suppl), S8-19. [https://doi.org/10.1016/s1471-1931\(00\)00028-8](https://doi.org/10.1016/s1471-1931(00)00028-8)
- Obeso, J. A., Rodríguez-Oroz, M. C., Stamelou, M., Bhatia, K. P., y Burn, D. J. (2014). The expanding universe of disorders of the basal ganglia. *Lancet (London, England)*, 384(9942), 523–531. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)62418-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62418-6)
- Oertel, W., Eggert, K., Pahwa, R., Tanner, C. M., Hauser, R. A., Trenkwalder, C., Ehret, R., Azulay, J. P., Isaacson, S., Felt, L., y Stempien, M. J. (2017). Randomized, placebo-controlled trial of ADS-5102 (amantadine) extended-release capsules for levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease (EASE LID 3). *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 32(12), 1701–1709. <https://doi.org/10.1002/mds.27131>

- Ohlin, K. E., Francardo, V., Lindgren, H. S., Sullivan, S. E., O'Sullivan, S. S., Luksik, A. S., Vassoler, F. M., Lees, A. J., Konradi, C., y Cenci, M. A. (2011). Vascular endothelial growth factor is upregulated by l-dopa in the parkinsonian brain: Implications for the development of dyskinesia. *Brain*, 134(8), 2339–2357. <https://doi.org/10.1093/brain/awr165>
- Ohlin, K. E., Sebastianutto, I., Adkins, C. E., Lundblad, C., Lockman, P. R., y Cenci, M. A. (2012). Impact of L-DOPA treatment on regional cerebral blood flow and metabolism in the basal ganglia in a rat model of Parkinson's disease. *NeuroImage*, 61(1), 228–239. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2012.02.066>
- Ohsawa, M., Ishikura, K.-I., Mutoh, J., y Hisa, H. (2016). Involvement of inhibition of RhoA/Rho kinase signaling in simvastatin-induced amelioration of neuropathic pain. *Neuroscience*, 333, 204–213. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.07.029>
- Olanow, C. W., y McNaught, K. (2011). Parkinson's disease, proteins, and prions: milestones. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 26(6), 1056–1071. <https://doi.org/10.1002/mds.23767>
- Olanow, C. W., Damier, P., Goetz, C. G., Mueller, T., Nutt, J., Rascol, O., Serbanescu, A., Deckers, F., y Russ, H. (2004). Multicenter, open-label, trial of sarizotan in Parkinson disease patients with levodopa-induced dyskinesias (the SPLENDID Study). *Clinical Neuropharmacology*, 27(2), 58–62. <https://doi.org/10.1097/00002826-200403000-00003>
- Olanow, C. W., Goetz, C. G., Kordower, J. H., Stoessl, A. J., Sossi, V., Brin, M. F., Shannon, K. M., Nauert, G. M., Perl, D. P., Godbold, J., y Freeman, T. B. (2003). A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease. *Annals of Neurology*, 54(3), 403–414. <https://doi.org/10.1002/ana.10720>
- Olanow, C. W., Kordower, J. H., Lang, A. E., y Obeso, J. A. (2009). Dopaminergic transplantation for Parkinson's disease: current status and future prospects. *Annals of Neurology*, 66(5), 591–596. <https://doi.org/10.1002/ana.21778>
- Olson, M. F. (2008). Applications for ROCK kinase inhibition. *Current Opinion in Cell Biology*, 20(2), 242–248. <https://doi.org/10.1016/j.jceb.2008.01.002>
- Olson, M. F., Ashworth, A., y Hall, A. (1995). An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1. *Science (New York, N.Y.)*, 269(5228), 1270–1272. <https://doi.org/10.1126/science.7652575>
- Olsson, M., Nikkhah, G., Bentlage, C., y Björklund, A. (1995). Forelimb akinesia in the rat Parkinson model: differential effects of dopamine agonists and nigral transplants as assessed by a new stepping test. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 15(5 Pt 2), 3863–3875. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-05-03863.1995>
- Ory-Magne, F., Corvol, J.-C., Azulay, J.-P., Bonnet, A.-M., Brefel-Courbon, C., Damier, P., Dellapina, E., Destée, A., Durif, F., Galitzky, M., Lebouvier, T., Meissner, W., Thalamas, C., Tison, F., Salis, A., Sommet, A., Viallet, F., Vidailhet, M., y Rascol, O. (2014). Withdrawing amantadine in dyskinetic patients with Parkinson disease: the amandysk trial. *Neurology*, 82(4), 300–307. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000050>
- Oshima, Y., Kinouchi, K., Ichihara, A., Sakoda, M., Kurauchi-Mito, A., Bokuda, K., Narita, T., Kurosawa, H., Sun-Wada, G. H., Wada, Y., Yamada, T., Takemoto, M., Saleem, M. A., Quaggin, S. E., y Itoh, H. (2011). Prorenin receptor is essential for normal podocyte structure and function. *Journal of the American Society of Nephrology*, 22(12), 2203–2212. <https://doi.org/10.1681/ASN.2011020202>

- Ossola, B., Schendzielorz, N., Chen, S.-H., Bird, G. S., Tuominen, R. K., Männistö, P. T., y Hong, J.-S. (2011). Amantadine protects dopamine neurons by a dual action: reducing activation of microglia and inducing expression of GDNF in astroglia [corrected]. *Neuropharmacology*, 61(4), 574–582. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.04.030>
- Ouattara, B., Hoyer, D., Grégoire, L., Morissette, M., Gasparini, F., Gomez-Mancilla, B., y Di Paolo, T. (2010). Changes of AMPA receptors in MPTP monkeys with levodopa-induced dyskinesias. *Neuroscience*, 167(4), 1160–1167. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.03.022>
- Ouchi, Y., Yoshikawa, E., Sekine, Y., Futatsubashi, M., Kanno, T., Ogusu, T., y Torizuka, T. (2005). Microglial activation and dopamine terminal loss in early Parkinson's disease. *Annals of Neurology*, 57(2), 168–175. <https://doi.org/10.1002/ana.20338>
- Pacary, E., Legros, H., Valable, S., Duchatelle, P., Lecocq, M., Petit, E., Nicole, O., y Bernaudin, M. (2006). Synergistic effects of CoCl₂ and ROCK inhibition on mesenchymal stem cell differentiation into neuron-like cells. *Journal of Cell Science*, 119(Pt 13), 2667–2678. <https://doi.org/10.1242/jcs.03004>
- Padovan-Neto, F. E., Cavalcanti-Kiwiatkovski, R., Carolino, R. O. G., Anselmo-Franci, J., y Del Bel, E. (2015). Effects of prolonged neuronal nitric oxide synthase inhibition on the development and expression of L-DOPA-induced dyskinesia in 6-OHDA-lesioned rats. *Neuropharmacology*, 89, 87–99. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.08.019>
- Pahwa, R., Tanner, C. M., Hauser, R. A., Sethi, K., Isaacson, S., Truong, D., Struck, L., Ruby, A. E., McClure, N. L., Went, G. T., y Stempien, M. J. (2015). Amantadine extended release for levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease (EASED Study). *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 30(6), 788–795. <https://doi.org/10.1002/mds.26159>
- Paillé, V., Henry, V., Lescaudron, L., Brachet, P., y Damier, P. (2007). Rat model of Parkinson's disease with bilateral motor abnormalities, reversible with levodopa, and dyskinesias. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 22(4), 533–539. <https://doi.org/10.1002/mds.21308>
- Paillé, V., Picconi, B., Bagetta, V., Ghiglieri, V., Sgobio, C., Di Filippo, M., Viscomi, M. T., Giampà, C., Fusco, F. R., Gardoni, F., Bernardi, G., Greengard, P., Di Luca, M., y Calabresi, P. (2010). Distinct levels of dopamine denervation differentially alter striatal synaptic plasticity and NMDA receptor subunit composition. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 30(42), 14182–14193. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2149-10.2010>
- Palasz, E., Wysocka, A., Gasiorowska, A., Chalimoniuk, M., Niewiadomski, W., y Niewiadomska, G. (2020). BDNF as a promising therapeutic agent in Parkinson's disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3). <https://doi.org/10.3390/ijms21031170>
- Pan, P., Shen, M., Yu, H., Li, Y., Li, D., y Hou, T. (2013). Advances in the development of Rho-associated protein kinase (ROCK) inhibitors. *Drug Discovery Today*, 18(23–24), 1323–1333. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2013.09.010>
- Panneton, W. M., Kumar, V. B., Gan, Q., Burke, W. J., y Galvin, J. E. (2010). The neurotoxicity of DOPAL: behavioral and stereological evidence for its role in Parkinson disease pathogenesis. *PloS One*, 5(12), e15251. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015251>
- Parent, A., y Hazrati, L. N. (1995). Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain Research. Brain Research Reviews*, 20(1), 91–127. [https://doi.org/10.1016/0165-0173\(94\)00007-c](https://doi.org/10.1016/0165-0173(94)00007-c)

- Parga, J. A., García-Garrote, M., Martínez, S., Raya, Á., Labandeira-García, J. L., y Rodríguez-Pallares, J. (2018). Prostaglandin EP2 receptors mediate mesenchymal stromal cell-neuroprotective effects on dopaminergic neurons. *Molecular Neurobiology*, 55(6), 4763–4776. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0681-5>
- Park, M., Ross, G. W., Petrovitch, H., White, L. R., Masaki, K. H., Nelson, J. S., Tanner, C. M., Curb, J. D., Blanchette, P. L., y Abbott, R. D. (2005). Consumption of milk and calcium in midlife and the future risk of Parkinson disease. *Neurology*, 64(6), 1047–1051. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000154532.98495.BF>
- Patel, B. N., Sharma, N., Sanyal, M., y Shrivastav, P. S. (2008). Simultaneous determination of simvastatin and simvastatin acid in human plasma by LC-MS/MS without polarity switch: application to a bioequivalence study. *Journal of Separation Science*, 31(2), 301–313. <https://doi.org/10.1002/jssc.200700367>
- Patel, D., Jana, A., Roy, A., y Pahan, K. (2019). Cinnamon and its metabolite protect the nigrostriatum in a mouse model of Parkinson's disease via astrocytic GDNF. *Journal of Neuroimmune Pharmacology: The Official Journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*, 14(3), 503–518. <https://doi.org/10.1007/s11481-019-09855-0>
- Paxinos G, Watson C (1986). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, New York.
- Peach, M. J. (1977). Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action. *Physiological Reviews*, 57(2), 313–370. <https://doi.org/10.1152/physrev.1977.57.2.313>
- Peng, H., Jensen, D. D., Li, W., Sullivan, M. N., Buller, S. A., Worker, C. J., Cooper, S. G., Zheng, S., Earley, S., Sigmund, C. D., y Feng, Y. (2018). Overexpression of the neuronal human (pro)renin receptor mediates angiotensin II-independent blood pressure regulation in the central nervous system. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 314(3), H580–H592. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00310.2017>
- Peng, H., Jensen, D. D., Li, W., Sullivan, M. N., Buller, S. A., Worker, C. J., Cooper, S. G., Zheng, S., Earley, S., Sigmund, C. D., y Feng, Y. (2018). Overexpression of the neuronal human (Pro)renin receptor mediates angiotensin ii-independent blood pressure regulation in the central nervous system. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 314(3), H580–H592. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00310.2017>
- Peng, H., Li, W., Seth, D. M., Nair, A. R., Francis, J., y Feng, Y. (2013). (Pro)renin receptor mediates both angiotensin II-dependent and -independent oxidative stress in neuronal cells. *PLoS ONE*, 8(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058339>
- Penney, J. B. J., y Young, A. B. (1986). Striatal inhomogeneities and basal ganglia function. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 1(1), 3–15. <https://doi.org/10.1002/mds.870010102>
- Perez, X. A., Zhang, D., Bordia, T., y Quik, M. (2017). Striatal D1 medium spiny neuron activation induces dyskinesias in parkinsonian mice. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 32(4), 538–548. <https://doi.org/10.1002/mds.26955>
- Petek, B., Villa-Lopez, M., Loera-Valencia, R., Gerenu, G., Winblad, B., Kramberger, M. G., Ismail, M.-A.-M., Eriksdotter, M., y Garcia-Ptacek, S. (2018). Connecting the brain cholesterol and renin-angiotensin systems: potential role of statins and RAS-modifying medications in dementia. *Journal of Internal Medicine*, 284(6), 620–642. <https://doi.org/10.1111/joim.12838>
- Petrov, A. M., Kasimov, M. R., y Zefirov, A. L. (2016). Brain cholesterol metabolism and its defects: linkage to neurodegenerative diseases and synaptic dysfunction. *Acta Naturae*, 8(1), 58–73.

- Pfriege, F. W. (2003). Role of cholesterol in synapse formation and function. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1610(2), 271–280. [https://doi.org/10.1016/s0005-2736\(03\)00024-5](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(03)00024-5)
- Phillips, M. I., y de Oliveira, E. M. (2008). Brain renin angiotensin in disease. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, 86(6), 715–722. <https://doi.org/10.1007/s00109-008-0331-5>
- Picconi, B., Centonze, D., Håkansson, K., Bernardi, G., Greengard, P., Fisone, G., Cenci, M. A., y Calabresi, P. (2003). Loss of bidirectional striatal synaptic plasticity in L-DOPA-induced dyskinesia. *Nature Neuroscience*, 6(5), 501–506. <https://doi.org/10.1038/nn1040>
- Picconi, B., Centonze, D., Rossi, S., Bernardi, G., y Calabresi, P. (2004). Therapeutic doses of L-dopa reverse hypersensitivity of corticostriatal D2-dopamine receptors and glutamatergic overactivity in experimental parkinsonism. *Brain: A Journal of Neurology*, 127(Pt 7), 1661–1669. <https://doi.org/10.1093/brain/awh190>
- Pisanu, A., Boi, L., Mulas, G., Spiga, S., Fenu, S., y Carta, A. R. (2018). Neuroinflammation in L-DOPA-induced dyskinesia: beyond the immune function. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)*, 125(8), 1287–1297. <https://doi.org/10.1007/s00702-018-1874-4>
- Politis, M., Wu, K., Loane, C., Brooks, D. J., Kiferle, L., Turkheimer, F. E., Bain, P., Molloy, S., y Piccini, P. (2014). Serotonergic mechanisms responsible for levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease patients. *The Journal of Clinical Investigation*, 124(3), 1340–1349. <https://doi.org/10.1172/JCI71640>
- Przedborski, S. (2017). The two-century journey of Parkinson disease research. *Nature Reviews. Neuroscience*, 18(4), 251–259. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.25>
- Qian, L., y Flood, P. M. (2008). Microglial cells and Parkinson's disease. *Immunologic Research*, 41(3), 155–164. <https://doi.org/10.1007/s12026-008-8018-0>
- Quadri, S. S., Culver, S., y Siragy, H. M. (2018). Prorenin receptor mediates inflammation in renal ischemia. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 45(2), 133–139. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12868>
- Quik, M., Mallela, A., Ly, J., y Zhang, D. (2013). Nicotine reduces established levodopa-induced dyskinesias in a monkey model of Parkinson's disease. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 28(10), 1398–1406. <https://doi.org/10.1002/mds.25594>
- Re, R. N. (2004). Tissue renin angiotensin systems. *The Medical Clinics of North America*, 88(1), 19–38. [https://doi.org/10.1016/s0025-7125\(03\)00124-x](https://doi.org/10.1016/s0025-7125(03)00124-x)
- Re, R. N., y Cook, J. L. (2015). Studies of intracellular angiotensin II. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1234, 1–8. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1755-6_1
- Refolo, L. M., Malester, B., LaFrancois, J., Bryant-Thomas, T., Wang, R., Tint, G. S., Sambamurti, K., Duff, K., y Pappolla, M. A. (2000). Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model. *Neurobiology of Disease*, 7(4), 321–331. <https://doi.org/10.1006/nbdi.2000.0304>
- Relja, B., Lehnert, M., Seyboth, K., Bormann, F., Höhn, C., Czerny, C., Henrich, D., y Marzi, I. (2010). Simvastatin reduces mortality and hepatic injury after hemorrhage/resuscitation in rats. *Shock (Augusta, Ga.)*, 34(1), 46–54. <https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e3181cd8d05>
- Relja, B., Meder, F., Wang, M., Blaheta, R., Henrich, D., Marzi, I., y Lehnert, M. (2011). Simvastatin modulates the adhesion and growth of hepatocellular carcinoma cells via decrease of integrin expression and ROCK. *International Journal of Oncology*, 38(3), 879–885. <https://doi.org/10.3892/ijo.2010.892>
- Rey, P., Lopez-Real, A., Sanchez-Iglesias, S., Muñoz, A., Soto-Otero, R., y Labandeira-Garcia, J. L. (2007). Angiotensin type-1-receptor antagonists reduce 6-hydroxydopamine toxicity for

- dopaminergic neurons. *Neurobiology of Aging*, 28(4), 555–567. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2006.02.018>
- Richardson, J. R., y Hossain, M. M. (2013). Microglial ion channels as potential targets for neuroprotection in Parkinson's disease. *Neural Plasticity*, 2013, 587418. <https://doi.org/10.1155/2013/587418>
- Riediger, F., Quack, I., Qadri, F., Hartleben, B., Park, J. K., Potthoff, S. A., Sohn, D., Sihn, G., Rousselle, A., Fokuhl, V., Maschke, U., Purfürst, B., Schneider, W., Rump, L. C., Luft, F. C., Dechend, R., Bader, M., Huber, T. B., Nguyen, G., y Muller, D. N. (2011). Prorenin receptor is essential for podocyte autophagy and survival. *Journal of the American Society of Nephrology*, 22(12), 2193–2202. <https://doi.org/10.1681/ASN.2011020200>
- Ritz, B., Manthripragada, A. D., Qian, L., Schernhammer, E., Wermuth, L., Olsen, J., y Friis, S. (2010). Statin use and Parkinson's disease in Denmark. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 25(9), 1210–1216. <https://doi.org/10.1002/mds.23102>
- Rivas-Santisteban, R., Rodríguez-Pérez, A. I., Muñoz, A., Reyes-Resina, I., Labandeira-García, J. L., Navarro, G., y Franco, R. (2020). Angiotensin AT(1) and AT(2) receptor heteromer expression in the hemilesioned rat model of Parkinson's disease that increases with levodopa-induced dyskinesia. *Journal of Neuroinflammation*, 17(1), 243. <https://doi.org/10.1186/s12974-020-01908-z>
- Rivetti di Val Cervo, P., Romanov, R. A., Spigolon, G., Masini, D., Martín-Montañez, E., Toledo, E. M., La Manno, G., Feyder, M., Pifl, C., Ng, Y.-H., Sánchez, S. P., Linnarsson, S., Wernig, M., Harkany, T., Fisone, G., y Arenas, E. (2017). Induction of functional dopamine neurons from human astrocytes in vitro and mouse astrocytes in a Parkinson's disease model. *Nature Biotechnology*, 35(5), 444–452. <https://doi.org/10.1038/nbt.3835>
- Rodríguez-Pallares, J., Parga, J. A., Joglar, B., Guerra, M. J., y Labandeira-García, J. L. (2009). The mitochondrial ATP-sensitive potassium channel blocker 5-hydroxydecanoate inhibits toxicity of 6-hydroxydopamine on dopaminergic neurons. *Neurotoxicity Research*, 15(1), 82–95. <https://doi.org/10.1007/s12640-009-9010-8>
- Rodríguez-Pallares, J., Parga, J. A., Joglar, B., Guerra, M. J., y Labandeira-García, J. L. (2012). Mitochondrial ATP-sensitive potassium channels enhance angiotensin-induced oxidative damage and dopaminergic neuron degeneration. Relevance for aging-associated susceptibility to Parkinson's disease. *Age (Dordrecht, Netherlands)*, 34(4), 863–880. <https://doi.org/10.1007/s11357-011-9284-7>
- Rodríguez-Pallares, J., Parga, J. A., Muñoz, A., Rey, P., Guerra, M. J., y Labandeira-García, J. L. (2007). Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity: the role of NADPH oxidase and microglial activation in 6-hydroxydopamine-induced degeneration of dopaminergic neurons. *Journal of Neurochemistry*, 103(1), 145–156. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04699.x>
- Rodríguez-Pallares, J., Quiroz, C. R., Parga, J. A., Guerra, M. J., y Labandeira-García, J. L. (2004). Angiotensin II increases differentiation of dopaminergic neurons from mesencephalic precursors via angiotensin type 2 receptors. *The European Journal of Neuroscience*, 20(6), 1489–1498. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03621.x>
- Rodríguez-Pallares, J., Rey, P., Parga, J. A., Muñoz, A., Guerra, M. J., y Labandeira-García, J. L. (2008). Brain angiotensin enhances dopaminergic cell death via microglial activation and NADPH-derived ROS. *Neurobiology of Disease*, 31(1), 58–73. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2008.03.003>

- Rodriguez-Pallares, J., Rodriguez-Perez, A. I., Muñoz, A., Parga, J. A., Toledo-Aral, J. J., y Labandeira-Garcia, J. L. (2016). Effects of Rho Kinase Inhibitors on Grafts of Dopaminergic Cell Precursors in a Rat Model of Parkinson's Disease. *Stem Cells Translational Medicine*, 5(6), 804–815. <https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0182>
- Rodriguez-Perez, A. I., Borrajo, A., Rodriguez-Pallares, J., Guerra, M. J., y Labandeira-Garcia, J. L. (2015). Interaction between NADPH-oxidase and Rho-kinase in angiotensin II-induced microglial activation. *Glia*, 63(3), 466–482. <https://doi.org/10.1002/glia.22765>
- Rodriguez-Perez, A. I., Dominguez-Mejjide, A., Lanciego, J. L., Guerra, M. J., y Labandeira-Garcia, J. L. (2013). Inhibition of Rho kinase mediates the neuroprotective effects of estrogen in the MPTP model of Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*, 58, 209–219. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2013.06.004>
- Rodriguez-Perez, A. I., Garrido-Gil, P., Pedrosa, M. A., Garcia-Garrote, M., Valenzuela, R., Navarro, G., Franco, R., y Labandeira-Garcia, J. L. (2020). Angiotensin type 2 receptors: Role in aging and neuroinflammation in the substantia nigra. *Brain, Behavior, and Immunity*, 87, 256–271. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.12.011>
- Rodriguez-Perez, A. I., Sucunza, D., Pedrosa, M. A., Garrido-Gil, P., Kulisevsky, J., Lanciego, J. L., y Labandeira-Garcia, J. L. (2018). Angiotensin type 1 receptor antagonists protect against alpha-synuclein-induced neuroinflammation and dopaminergic neuron death. *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 15(4), 1063–1081. <https://doi.org/10.1007/s13311-018-0646-z>
- Rodriguez-Perez, A. I., Valenzuela, R., Villar-Cheda, B., Guerra, M. J., y Labandeira-Garcia, J. L. (2012). Dopaminergic neuroprotection of hormonal replacement therapy in young and aged menopausal rats: role of the brain angiotensin system. *Brain: A Journal of Neurology*, 135(Pt 1), 124–138. <https://doi.org/10.1093/brain/awr320>
- Rodriguez-Perez, A. I., Valenzuela, R., Villar-Cheda, B., Guerra, M. J., Lanciego, J. L., y Labandeira-Garcia, J. L. (2010). Estrogen and angiotensin interaction in the substantia nigra. Relevance to postmenopausal Parkinson's disease. *Experimental Neurology*, 224(2), 517–526. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2010.05.015>
- Rodriguez-Rojas, R., Carballo-Barreda, M., Alvarez, L., Guridi, J., Pavon, N., Garcia-Maeso, I., Mací As, R., Rodriguez-Oroz, M. C., y Obeso, J. A. (2018). Subthalamotomy for Parkinson's disease: clinical outcome and topography of lesions. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 89(6), 572–578. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2017-316241>
- Roodveldt, C., Labrador-Garrido, A., Gonzalez-Rey, E., Lachaud, C. C., Williams, T., Fernandez-Montesinos, R., Benitez-Rondan, A., Robledo, G., Hmadcha, A., Delgado, M., Dobson, C. M., y Pozo, D. (2013). Preconditioning of microglia by α -synuclein strongly affects the response induced by toll-like receptor (TLR) stimulation. *PloS One*, 8(11), e79160. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079160>
- Rosendahl, A., Niemann, G., Lange, S., Ahadzadeh, E., Krebs, C., Contrepas, A., van Goor, H., Wiech, T., Bader, M., Schwake, M., Peters, J., Stahl, R., Nguyen, G., y Wenzel, U. O. (2014). Increased expression of (pro)renin receptor does not cause hypertension or cardiac and renal fibrosis in mice. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 94(8), 863–872. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2014.83>
- Ross, G. W., Abbott, R. D., Petrovitch, H., Morens, D. M., Grandinetti, A., Tung, K. H., Tanner, C. M., Masaki, K. H., Blanchette, P. L., Curb, J. D., Popper, J. S., y White, L. R. (2000).

- Association of coffee and caffeine intake with the risk of Parkinson disease. *JAMA*, 283(20), 2674–2679. <https://doi.org/10.1001/jama.283.20.2674>
- Roy, A., y Pahan, K. (2011). Prospects of statins in Parkinson disease. *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry*, 17(3), 244–255. <https://doi.org/10.1177/1073858410385006>
- Rozani, V., Giladi, N., El-Ad, B., Gurevich, T., Tsamir, J., Hemo, B., y Peretz, C. (2017). Statin adherence and the risk of Parkinson's disease: A population-based cohort study. *PloS One*, 12(4), e0175054. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175054>
- Ruiz-Ortega, M., Lorenzo, O., Suzuki, Y., Rupérez, M., y Egido, J. (2001). Proinflammatory actions of angiotensins. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 10(3), 321–329. <https://doi.org/10.1097/00041552-200105000-00005>
- Saal, K.-A., Galter, D., Roeber, S., Bähr, M., Tönges, L., y Lingor, P. (2017). Altered expression of growth associated protein-43 and Rho Kinase in human patients with Parkinson's disease. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, 27(1), 13–25. <https://doi.org/10.1111/bpa.12346>
- Sachs, C., y Jonsson, G. (1975). Mechanisms of action of 6-hydroxydopamine. *Biochemical Pharmacology*, 24(1), 1–8. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(75\)90304-4](https://doi.org/10.1016/0006-2952(75)90304-4)
- Sagawa, H., Terasaki, H., Nakamura, M., Ichikawa, M., Yata, T., Tokita, Y., y Watanabe, M. (2007). A novel ROCK inhibitor, Y-39983, promotes regeneration of crushed axons of retinal ganglion cells into the optic nerve of adult cats. *Experimental Neurology*, 205(1), 230–240. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.02.002>
- Sakai, N., Kaufman, S., y Milstien, S. (1995). Parallel induction of nitric oxide and tetrahydrobiopterin synthesis by cytokines in rat glial cells. *Journal of Neurochemistry*, 65(2), 895–902. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1995.65020895.x>
- Salat, D., y Tolosa, E. (2013). Levodopa in the treatment of Parkinson's disease: current status and new developments. *Journal of Parkinson's Disease*, 3(3), 255–269. <https://doi.org/10.3233/JPD-130186>
- Sanchez-Guajardo, V., Annibali, A., Jensen, P. H., y Romero-Ramos, M. (2013). α -Synuclein vaccination prevents the accumulation of parkinson disease-like pathologic inclusions in striatum in association with regulatory T cell recruitment in a rat model. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 72(7), 624–645. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e31829768d2>
- Saner, A., y Thoenen, H. (1971). Model experiments on the molecular mechanism of action of 6-hydroxydopamine. *Molecular Pharmacology*, 7(2), 147–154.
- Sano, I., Gamo, T., Kakimoto, Y., Taniguchi, K., Takesada, M., y Nishinuma, K. (1959). Distribution of catechol compounds in human brain. *Biochimica et Biophysica Acta*, 32, 586–587. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(59\)90652-3](https://doi.org/10.1016/0006-3002(59)90652-3)
- Santini, E., Sgambato-Faure, V., Li, Q., Savasta, M., Dovero, S., Fisone, G., y Bezard, E. (2010). Distinct changes in cAMP and extracellular signal-regulated protein kinase signalling in L-DOPA-induced dyskinesia. *PloS One*, 5(8), e12322. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012322>
- Santini, E., Valjent, E., y Fisone, G. (2008). Parkinson's disease: levodopa-induced dyskinesia and signal transduction. *The FEBS Journal*, 275(7), 1392–1399. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06296.x>
- Santini, E., Valjent, E., Usiello, A., Carta, M., Borgkvist, A., Girault, J.-A., Hervé, D., Greengard, P., y Fisone, G. (2007). Critical involvement of cAMP/DARPP-32 and extracellular signal-

- regulated protein kinase signaling in L-DOPA-induced dyskinesia. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(26), 6995–7005. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0852-07.2007>
- Satofuka, S., Ichihara, A., Nagai, N., Koto, T., Shinoda, H., Noda, K., Ozawa, Y., Inoue, M., Tsubota, K., Itoh, H., Oike, Y., y Ishida, S. (2007). Role of nonproteolytically activated prorenin in pathologic, but not physiologic, retinal neovascularization. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 48(1), 422–429. <https://doi.org/10.1167/iovs.06-0534>
- Satofuka, S., Ichihara, A., Nagai, N., Noda, K., Ozawa, Y., Fukamizu, A., Tsubota, K., Itoh, H., Oike, Y., y Ishida, S. (2008). (Pro)renin receptor promotes choroidal neovascularization by activating its signal transduction and tissue renin-angiotensin system. *American Journal of Pathology*, 173(6), 1911–1918. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.080457>
- Satofuka, S., Ichihara, A., Nagai, N., Noda, K., Ozawa, Y., Fukamizu, A., Tsubota, K., Itoh, H., Oike, Y., y Ishida, S. (2009). (Pro)renin receptor-mediated signal transduction and tissue renin-angiotensin system contribute to diabetes-induced retinal inflammation. *Diabetes*, 58(7), 1625–1633. <https://doi.org/10.2337/db08-0254>
- Satofuka, S., Kanda, A., y Ishida, S. (2012). Receptor-associated prorenin system in the pathogenesis of retinal diseases. *Frontiers in Bioscience (Scholar Edition)*, 4, 1449–1460. <https://doi.org/10.2741/s345>
- Sauer, H., y Oertel, W. H. (1994). Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastratial terminal lesions with 6-hydroxydopamine: a combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. *Neuroscience*, 59(2), 401–415. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)90605-x](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)90605-x)
- Schallert, T., Kozlowski, D. A., Humm, J. L., y Cocke, R. R. (1997). Use-dependent structural events in recovery of function. *Advances in Neurology*, 73, 229–238. FALTA DOI
- Schallert, T., y Tillerson J.L (1999). *Intervention strategies for degeneration of dopamine neurons in parkinsonism: Optimising behavioural assessment of outcome*. Clifton, NJ: Humana Press.
- Scheggi, S., Rossi, F., Corsi, S., Fanni, S., Tronci, E., Ludovica, C., Vargiu, R., Gambarana, C., Muñoz, A., Stancampiano, R., Björklund, A., y Carta, M. (2020). BDNF overexpression increases striatal D3 receptor level at striatal neurons and exacerbates D1-receptor agonist-induced dyskinesia. *Journal of Parkinson's Disease*, 10(4), 1503–1514. <https://doi.org/10.3233/JPD-202061>
- Schommer, J., Marwarha, G., Nagamoto-Combs, K., y Ghribi, O. (2018a). Palmitic acid-enriched diet increases α -synuclein and tyrosine hydroxylase expression levels in the mouse brain. *Frontiers in Neuroscience*, 12, 552. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00552>
- Schommer, J., Marwarha, G., Schommer, T., Flick, T., Lund, J., y Ghribi, O. (2018b). 27-Hydroxycholesterol increases α -synuclein protein levels through proteasomal inhibition in human dopaminergic neurons. *BMC Neuroscience*, 19(1), 17. <https://doi.org/10.1186/s12868-018-0420-5>
- Schuster, S., Nadjar, A., Guo, J. T., Li, Q., Itrich, C., Hengerer, B., y Bezard, E. (2008). The 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitor lovastatin reduces severity of L-DOPA-induced abnormal involuntary movements in experimental Parkinson's disease. *Journal of Neuroscience*, 28(17), 4311–4316. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4720-07.2008>
- Schwartz, R. K., y Huston, J. P. (1996). The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research. Analysis of functional deficits, recovery and treatments. *Progress in Neurobiology*, 50(2–3), 275–331. [https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(96\)00040-8](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(96)00040-8)

- Schwartz, R. K., y Huston, J. P. (1996). Unilateral 6-hydroxydopamine lesions of meso-striatal dopamine neurons and their physiological sequelae. *Progress in Neurobiology*, 49(3), 215–266. [https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(96\)00015-9](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(96)00015-9)
- Scidraw (2021). <https://scidraw.io/>. doi.org/10.5281/zenodo.3926040, doi.org/10.5281/zenodo.3926033, doi.org/10.5281/zenodo.3925959, doi.org/10.5281/zenodo.3926048, doi.org/10.5281/zenodo.3926159, doi.org/10.5281/zenodo.3926103.
- Sebbagh, M., Hamelin, J., Bertoglio, J., Solary, E., y Bréard, J. (2005). Direct cleavage of ROCK II by granzyme B induces target cell membrane blebbing in a caspase-independent manner. *The Journal of Experimental Medicine*, 201(3), 465–471. <https://doi.org/10.1084/jem.20031877>
- Sebbagh, M., Renvoizé, C., Hamelin, J., Riché, N., Bertoglio, J., y Bréard, J. (2001). Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nature Cell Biology*, 3(4), 346–352. <https://doi.org/10.1038/35070019>
- Seitz, G., Stegmann, H. B., Jäger, H. H., Schlude, H. M., Wolburg, H., Roginsky, V. A., Niethammer, D., y Bruchelt, G. (2000). Neuroblastoma cells expressing the noradrenaline transporter are destroyed more selectively by 6-fluorodopamine than by 6-hydroxydopamine. *Journal of Neurochemistry*, 75(2), 511–520. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0750511.x>
- Selley, M. L. (2005). Simvastatin prevents 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced striatal dopamine depletion and protein tyrosine nitration in mice. *Brain Research*, 1037(1–2), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.02.083>
- Seo, M., Lee, J. H., Baek, M., Kim, M. A., Ahn, M. Y., Kim, S. H., Yun, E. Y., y Hwang, J. S. (2017). A novel role for earthworm peptide Lumbricusin as a regulator of neuroinflammation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 490(3), 1004–1010. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.06.154>
- Shao, W., y Espenshade, P. J. (2012). Expanding roles for SREBP in metabolism. *Cell Metabolism*, 16(4), 414–419. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.09.002>
- Sharma, S., Singh, S., Sharma, V., Singh, V. P., y Deshmukh, R. (2015). Neurobiology of 1-DOPA induced dyskinesia and the novel therapeutic strategies. *Biomedicine y Pharmacotherapy = Biomedicine y Pharmacotherapie*, 70, 283–293. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2015.01.029>
- Sheikh, A. M., Nagai, A., Ryu, J. K., McLarnon, J. G., Kim, S. U., y Masuda, J. (2009). Lysophosphatidylcholine induces glial cell activation: role of rho kinase. *Glia*, 57(8), 898–907. <https://doi.org/10.1002/glia.20815>
- Shi, J., y Wei, L. (2007). Rho kinase in the regulation of cell death and survival. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 55(2), 61–75. <https://doi.org/10.1007/s00005-007-0009-7>
- Shi, P., Grobe, J. L., Desland, F. A., Zhou, G., Shen, X. Z., Shan, Z., Liu, M., Raizada, M. K., y Summers, C. (2014). Direct pro-inflammatory effects of prorenin on microglia. *PLoS ONE*, 9(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092937>
- Shimokawa, H., Sunamura, S., y Satoh, K. (2016). RhoA/Rho-Kinase in the cardiovascular system. *Circulation Research*, 118(2), 352–366. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306532>
- Shin, J.-H., Ko, H. S., Kang, H., Lee, Y., Lee, Y.-I., Pletinkova, O., Troconso, J. C., Dawson, V. L., y Dawson, T. M. (2011). PARIS (ZNF746) repression of PGC-1 α contributes to neurodegeneration in Parkinson's disease. *Cell*, 144(5), 689–702. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.010>

- Sihn, G., Rousselle, A., Vilianovitch, L., Burckle, C., y Bader, M. (2010). Physiology of the (pro)renin receptor: Wnt of change? *Kidney International*, 78(3), 246–256. <https://doi.org/10.1038/ki.2010.151>
- Silverdale, M. A., Kobylecki, C., Hallett, P. J., Li, Q., Dunah, A. W., Ravenscroft, P., Bezard, E., y Brotchie, J. M. (2010). Synaptic recruitment of AMPA glutamate receptor subunits in levodopa-induced dyskinesia in the MPTP-lesioned nonhuman primate. *Synapse (New York, N.Y.)*, 64(2), 177–180. <https://doi.org/10.1002/syn.20739>
- Simons, M., Schwärzler, F., Lütjohann, D., von Bergmann, K., Beyreuther, K., Dichgans, J., Wormstall, H., Hartmann, T., y Schulz, J. B. (2002). Treatment with simvastatin in normocholesterolemic patients with Alzheimer's disease: A 26-week randomized, placebo-controlled, double-blind trial. *Annals of Neurology*, 52(3), 346–350. <https://doi.org/10.1002/ana.10292>
- Singh, A., y Sen, D. (2017). MicroRNAs in Parkinson's disease. *Experimental Brain Research*, 235(8), 2359–2374. <https://doi.org/10.1007/s00221-017-4989-1>
- Singh, N., Pillay, V., y Choonara, Y. E. (2007). Advances in the treatment of Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology*, 81(1), 29–44. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2006.11.009>
- Solís, O., y Moratalla, R. (2018). Dopamine receptors: homomeric and heteromeric complexes in L-DOPA-induced dyskinesia. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)*, 125(8), 1187–1194. <https://doi.org/10.1007/s00702-018-1852-x>
- Solomon, A., Kåreholt, I., Ngandu, T., Winblad, B., Nissinen, A., Tuomilehto, J., Soininen, H., y Kivipelto, M. (2007). Serum cholesterol changes after midlife and late-life cognition: twenty-one-year follow-up study. *Neurology*, 68(10), 751–756. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000256368.57375.b7>
- Song, Y., Chen, X., Wang, L.-Y., Gao, W., y Zhu, M.-J. (2013). Rho kinase inhibitor fasudil protects against β -amyloid-induced hippocampal neurodegeneration in rats. *CNS Neuroscience y Therapeutics*, 19(8), 603–610. <https://doi.org/10.1111/cns.12116>
- Sonsalla, P. K., Coleman, C., Wong, L.-Y., Harris, S. L., Richardson, J. R., Gadad, B. S., Li, W., y German, D. C. (2013). The angiotensin converting enzyme inhibitor captopril protects nigrostriatal dopamine neurons in animal models of parkinsonism. *Experimental Neurology*, 250, 376–383. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2013.10.014>
- Soto-Otero, R., Méndez-Alvarez, E., Hermida-Ameijeiras, A., López-Real, A. M., y Labandeira-García, J. L. (2002). Effects of (-)-nicotine and (-)-cotinine on 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress and neurotoxicity: relevance for Parkinson's disease. *Biochemical Pharmacology*, 64(1), 125–135. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(02\)01070-5](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(02)01070-5)
- Soto-Otero, R., Méndez-Alvarez, E., Hermida-Ameijeiras, A., Muñoz-Patiño, A. M., y Labandeira-García, J. L. (2000). Autoxidation and neurotoxicity of 6-hydroxydopamine in the presence of some antioxidants: potential implication in relation to the pathogenesis of Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, 74(4), 1605–1612. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0741605.x>
- Spillantini, M. G., Schmidt, M. L., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q., Jakes, R., y Goedert, M. (1997). Alpha-synuclein in Lewy bodies. In *Nature (Vol. 388, Issue 6645, pp. 839–840)*. <https://doi.org/10.1038/42166>
- Stellwagen, D., Beattie, E. C., Seo, J. Y., y Malenka, R. C. (2005). Differential regulation of AMPA receptor and GABA receptor trafficking by tumor necrosis factor alpha. *The Journal of*

- Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience, 25(12), 3219–3228. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4486-04.2005>
- Stenevi, U., Björklund, A., y Svendgaard, N. A. (1976). Transplantation of central and peripheral monoamine neurons to the adult rat brain: techniques and conditions for survival. *Brain Research*, 114(1), 1–20. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(76\)91003-9](https://doi.org/10.1016/0006-8993(76)91003-9)
- Stoker, T. B., Blair, N. F., y Barker, R. A. (2017). Neural grafting for Parkinson's disease: challenges and prospects. *Neural Regeneration Research*, 12(3), 389–392. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.202935>
- Stornetta, R. L., Hawelu-Johnson, C. L., Guyenet, P. G., y Lynch, K. R. (1988). Astrocytes synthesize angiotensinogen in brain. *Science (New York, N.Y.)*, 242(4884), 1444–1446. <https://doi.org/10.1126/science.3201232>
- Sun, H., Breslin, J. W., Zhu, J., Yuan, S. Y., y Wu, M. H. (2006). Rho and ROCK signaling in VEGF-induced microvascular endothelial hyperpermeability. *Microcirculation (New York, N.Y.: 1994)*, 13(3), 237–247. <https://doi.org/10.1080/10739680600556944>
- Suzuki, Y., Ruiz-Ortega, M., Lorenzo, O., Ruperez, M., Esteban, V., y Egido, J. (2003). Inflammation and angiotensin II. *The International Journal of Biochemistry y Cell Biology*, 35(6), 881–900. [https://doi.org/10.1016/s1357-2725\(02\)00271-6](https://doi.org/10.1016/s1357-2725(02)00271-6)
- Suzuki, Y., Shibuya, M., Satoh, S.-I., Sugimoto, Y., y Takakura, K. (2007). A postmarketing surveillance study of fasudil treatment after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Surgical Neurology*, 68(2), 122–126. <https://doi.org/10.1016/j.surneu.2006.10.037>
- Svenningsson, P., Rosenblad, C., Af Edholm Arvidsson, K., Victorin, K., Keywood, C., Shankar, B., Lowe, D. A., Björklund, A., y Widner, H. (2015). Eltopazine counteracts l-DOPA-induced dyskinesias in Parkinson's disease: a dose-finding study. *Brain: A Journal of Neurology*, 138(Pt 4), 963–973. <https://doi.org/10.1093/brain/awu409>
- Takahashi, M., Tabu, H., Ozaki, A., Hamano, T., y Takeshima, T. (2019). Antidepressants for depression, apathy, and gait instability in Parkinson's disease: a multicenter randomized study. *Internal Medicine (Tokyo, Japan)*, 58(3), 361–368. <https://doi.org/10.2169/internalmedicine.1359-18>
- Takeuchi, H., Jin, S., Wang, J., Zhang, G., Kawanokuchi, J., Kuno, R., Sonobe, Y., Mizuno, T., y Suzumura, A. (2006). Tumor necrosis factor- α induces neurotoxicity via glutamate release from hemichannels of activated microglia in an autocrine manner. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(30), 21362–21368. <https://doi.org/10.1074/jbc.M600504200>
- Tatenhorst, L., Eckermann, K., Dambeck, V., Fonseca-Ornelas, L., Walle, H., Lopes da Fonseca, T., Koch, J. C., Becker, S., Tönges, L., Bähr, M., Outeiro, T. F., Zweckstetter, M., y Lingor, P. (2016). Fasudil attenuates aggregation of α -synuclein in models of Parkinson's disease. *Acta Neuropathologica Communications*, 4, 39. <https://doi.org/10.1186/s40478-016-0310-y>
- Tatenhorst, L., Tönges, L., Saal, K.-A., Koch, J. C., Szegő, É. M., Bähr, M., y Lingor, P. (2014). Rho kinase inhibition by fasudil in the striatal 6-hydroxydopamine lesion mouse model of Parkinson disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 73(8), 770–779. <https://doi.org/10.1097/NEN.0000000000000095>
- Teema, A. M., Zaitone, S. A., y Moustafa, Y. M. (2016). Ibuprofen or piroxicam protects nigral neurons and delays the development of l-dopa induced dyskinesia in rats with experimental Parkinsonism: Influence on angiogenesis. *Neuropharmacology*, 107, 432–450. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.03.034>

- Thomas, W. G., Greenland, K. J., Shinkel, T. A., y Sernia, C. (1992). Angiotensinogen is secreted by pure rat neuronal cell cultures. *Brain Research*, 588(2), 191–200. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(92\)91575-y](https://doi.org/10.1016/0006-8993(92)91575-y)
- Tison, F., Nègre-Pagès, L., Meissner, W. G., Dupouy, S., Li, Q., Thiolat, M. L., Thiollier, T., Galitzky, M., Ory-Magne, F., Milhet, A., Marquine, L., Spampinato, U., Rascol, O., y Bezdard, E. (2013). Simvastatin decreases levodopa-induced dyskinesia in monkeys, But not in a randomized, Placebo-controlled, Multiple cross-over (“n-of-1”) exploratory trial of simvastatin against levodopa-induced dyskinesia in Parkinson’s disease patients. *Parkinsonism and Related Disorders*, 19(4), 416–421. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2012.12.003>
- Tönges, L., Frank, T., Tatenhorst, L., Saal, K. A., Koch, J. C., Szego, É. M., Bähr, M., Weishaupt, J. H., y Lingor, P. (2012). Inhibition of rho kinase enhances survival of dopaminergic neurons and attenuates axonal loss in a mouse model of Parkinson’s disease. *Brain*, 135(11), 3355–3370. <https://doi.org/10.1093/brain/aws254>
- Tönges, L., Günther, R., Suhr, M., Jansen, J., Balck, A., Saal, K.-A., Barski, E., Nientied, T., Götz, A. A., Koch, J.-C., Mueller, B. K., Weishaupt, J. H., Sereda, M. W., Hanisch, U.-K., Bähr, M., y Lingor, P. (2014). Rho kinase inhibition modulates microglia activation and improves survival in a model of amyotrophic lateral sclerosis. *Glia*, 62(2), 217–232. <https://doi.org/10.1002/glia.22601>
- Touyz, R. M. (2004). Reactive oxygen species and angiotensin II signaling in vascular cells -- implications in cardiovascular disease. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira de Pesquisas Medicas e Biologicas*, 37(8), 1263–1273. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2004000800018>
- Tran, T. A., McCoy, M. K., Sporn, M. B., y Tansey, M. G. (2008). The synthetic triterpenoid CDDO-methyl ester modulates microglial activities, inhibits TNF production, and provides dopaminergic neuroprotection. *Journal of Neuroinflammation*, 5, 1–14. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-5-14>
- Tronci, E., Napolitano, F., Muñoz, A., Fidalgo, C., Rossi, F., Björklund, A., Usiello, A., y Carta, M. (2017). BDNF over-expression induces striatal serotonin fiber sprouting and increases the susceptibility to L-DOPA-induced dyskinesia in 6-OHDA-lesioned rats. *Experimental Neurology*, 297, 73–81. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.07.017>
- Ulusoy, A., Sahin, G., y Kirik, D. (2010). Presynaptic dopaminergic compartment determines the susceptibility to L-DOPA-induced dyskinesia in rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(29), 13159–13164. <https://doi.org/10.1073/pnas.1003432107>
- Unger, T., Chung, O., Csikos, T., Culman, J., Gallinat, S., Gohlke, P., Höhle, S., Meffert, S., Stoll, M., Stroth, U., y Zhu, Y. Z. (1996). Angiotensin receptors. *Journal of Hypertension. Supplement: Official Journal of the International Society of Hypertension*, 14(5), S95-103.
- Ungerstedt, U. (1968). 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *European Journal of Pharmacology*, 5(1), 107–110. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(68\)90164-7](https://doi.org/10.1016/0014-2999(68)90164-7)
- Ungerstedt, U. (1971). Adipsia and aphagia after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. *Acta Physiologica Scandinavica. Supplementum*, 367, 95–122. <https://doi.org/10.1111/j.1365-201x.1971.tb11001.x>
- Uraoka, M., Ikeda, K., Nakagawa, Y., Koide, M., Akakabe, Y., Nakano-Kurimoto, R., Takahashi, T., Matoba, S., Yamada, H., Okigaki, M., y Matsubara, H. (2009). Prorenin induces ERK activation

- in endothelial cells to enhance neovascularization independently of the renin-angiotensin system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 390(4), 1202–1207. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.10.121>
- Valenzuela, R., Barroso-Chinea, P., Villar-Cheda, B., Joglar, B., Muñoz, A., Lanciego, J. L., y Labandeira-Garcia, J. L. (2010). Location of prorenin receptors in primate substantia nigra: effects on dopaminergic cell death. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 69(11), 1130–1142. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e3181fa0308>
- Valenzuela, R., Costa-Besada, M. A., Iglesias-Gonzalez, J., Perez-Costas, E., Villar-Cheda, B., Garrido-Gil, P., Melendez-Ferro, M., Soto-Otero, R., Lanciego, J. L., Henrion, D., Franco, R., y Labandeira-Garcia, J. L. (2016). Mitochondrial angiotensin receptors in dopaminergic neurons. Role in cell protection and aging-related vulnerability to neurodegeneration. *Cell Death y Disease*, 7(10), e2427. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.327>
- Vega, G. L., Weiner, M. F., Lipton, A. M., Von Bergmann, K., Lutjohann, D., Moore, C., y Svetlik, D. (2003). Reduction in levels of 24S-hydroxycholesterol by statin treatment in patients with Alzheimer disease. *Archives of Neurology*, 60(4), 510–515. <https://doi.org/10.1001/archneur.60.4.510>
- Venkataramana, N. K., Pal, R., Rao, S. A. V., Naik, A. L., Jan, M., Nair, R., Sanjeev, C. C., Kamble, R. B., Murthy, D. P., y Chaitanya, K. (2012). Bilateral transplantation of allogenic adult human bone marrow-derived mesenchymal stem cells into the subventricular zone of Parkinson's disease: a pilot clinical study. *Stem Cells International*, 2012, 931902. <https://doi.org/10.1155/2012/931902>
- Villar-Cheda, B., Costa-Besada, M. A., Valenzuela, R., Perez-Costas, E., Melendez-Ferro, M., y Labandeira-Garcia, J. L. (2017). The intracellular angiotensin system buffers deleterious effects of the extracellular paracrine system. *Cell Death y Disease*, 8(9), e3044. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.439>
- Villar-Cheda, B., Dominguez-Meijide, A., Joglar, B., Rodríguez-Perez, A. I., Guerra, M. J., y Labandeira-Garcia, J. L. (2012). Involvement of microglial RhoA/Rho-kinase pathway activation in the dopaminergic neuron death. Role of angiotensin via angiotensin type 1 receptors. *Neurobiology of Disease*, 47(2), 268–279. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2012.04.010>
- Villar-Cheda, B., Dominguez-Meijide, A., Valenzuela, R., Granado, N., Moratalla, R., y Labandeira-Garcia, J. L. (2014). Aging-related dysregulation of dopamine and angiotensin receptor interaction. *Neurobiology of Aging*, 35(7), 1726–1738. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.01.017>
- Villar-Cheda, B., Rodríguez-Pallares, J., Valenzuela, R., Muñoz, A., Guerra, M. J., Baltatu, O. C., y Labandeira-Garcia, J. L. (2010). Nigral and striatal regulation of angiotensin receptor expression by dopamine and angiotensin in rodents: implications for progression of Parkinson's disease. *The European Journal of Neuroscience*, 32(10), 1695–1706. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07448.x>
- Villar-Cheda, B., Sousa-Ribeiro, D., Rodríguez-Pallares, J., Rodríguez-Perez, A. I., Guerra, M. J., y Labandeira-Garcia, J. L. (2009). Aging and sedentarism decrease vascularization and VEGF levels in the rat substantia nigra. Implications for Parkinson's disease. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 29(2), 230–234. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2008.127>
- von Bohlen und Halbach, O., y Albrecht, D. (2006). The CNS renin-angiotensin system. *Cell and Tissue Research*, 326(2), 599–616. <https://doi.org/10.1007/s00441-006-0190-8>

- Voon, V., y Fox, S. H. (2007). Medication-related impulse control and repetitive behaviors in Parkinson disease. *Archives of Neurology*, 64(8), 1089–1096. <https://doi.org/10.1001/archneur.64.8.1089>
- Wahner, A. D., Bronstein, J. M., Bordelon, Y. M., y Ritz, B. (2008). Statins use and the risk of Parkinson disease. *Neurology*, 70(16 Pt 2), 1418–1422. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000286942.14552.51>
- Wakita, Y., Kakimoto, T., Katoh, H., y Negishi, M. (2011). The F-BAR protein Rapostlin regulates dendritic spine formation in hippocampal neurons. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(37), 32672–32683. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.236265>
- Walsh, S., Finn, D. P., y Dowd, E. (2011). Time-course of nigrostriatal neurodegeneration and neuroinflammation in the 6-hydroxydopamine-induced axonal and terminal lesion models of Parkinson's disease in the rat. *Neuroscience*, 175, 251–261. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.12.005>
- Walters, C. E., Pryce, G., Hankey, D. J. R., Sebt, S. M., Hamilton, A. D., Baker, D., Greenwood, J., y Adamson, P. (2002). Inhibition of Rho GTPases with protein prenyltransferase inhibitors prevents leukocyte recruitment to the central nervous system and attenuates clinical signs of disease in an animal model of multiple sclerosis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md: 1950)*, 168(8), 4087–4094. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.8.4087>
- Wang, Q., Liu, Y., y Zhou, J. (2015). Neuroinflammation in Parkinson's disease and its potential as therapeutic target. *Translational Neurodegeneration*, 4, 19. <https://doi.org/10.1186/s40035-015-0042-0>
- Wang, Q., Wang, P. H., McLachlan, C., y Wong, P. T.-H. (2005). Simvastatin reverses the downregulation of dopamine D1 and D2 receptor expression in the prefrontal cortex of 6-hydroxydopamine-induced Parkinsonian rats. *Brain Research*, 1045(1–2), 229–233. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.03.016>
- Wang, Q., Yan, J., Chen, X., Li, J., Yang, Y., Weng, J., Deng, C., y Yenari, M. A. (2011). Statins: multiple neuroprotective mechanisms in neurodegenerative diseases. *Experimental Neurology*, 230(1), 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2010.04.006>
- Wang, T., Cao, X., Zhang, T., Shi, Q., Chen, Z., y Tang, B. (2015). Effect of simvastatin on L-DOPA-induced abnormal involuntary movements of hemiparkinsonian rats. *Neurological Sciences: Official Journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*, 36(8), 1397–1402. <https://doi.org/10.1007/s10072-015-2127-z>
- Wellington, C. L., Walker, E. K. Y., Suarez, A., Kwok, A., Bissada, N., Singaraja, R., Yang, Y.-Z., Zhang, L.-H., James, E., Wilson, J. E., Francone, O., McManus, B. M., y Hayden, M. R. (2002). ABCA1 mRNA and protein distribution patterns predict multiple different roles and levels of regulation. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 82(3), 273–283. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3780421>
- Westin, J. E., Lindgren, H. S., Gardi, J., Nyengaard, J. R., Brundin, P., Mohapel, P., y Cenci, M. A. (2006). Endothelial proliferation and increased blood-brain barrier permeability in the basal ganglia in a rat model of 3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine-induced dyskinesia. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(37), 9448–9461. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0944-06.2006>
- Westin, J. E., Vercammen, L., Strome, E. M., Konradi, C., y Cenci, M. A. (2007). Spatiotemporal pattern of striatal ERK1/2 phosphorylation in a rat model of L-DOPA-induced dyskinesia and

- the role of dopamine D1 receptors. *Biological Psychiatry*, 62(7), 800–810. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2006.11.032>
- Wilkinson-Berka, J. L., Miller, A. G., y Binger, K. J. (2011). Prorenin and the (pro)renin receptor: recent advances and implications for retinal development and disease. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 20(1), 69–76. <https://doi.org/10.1097/MNH.0b013e328341328a>
- Wilkinson-Berka, J. L., Miller, A. G., y Binger, K. J. (2011). Prorenin and the (pro)renin receptor: Recent advances and implications for retinal development and disease. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 20(1), 69–76. <https://doi.org/10.1097/MNH.0b013e328341328a>
- Wilms, H., Zecca, L., Rosenstiel, P., Sievers, J., Deuschl, G., y Lucius, R. (2007). Inflammation in Parkinson's diseases and other neurodegenerative diseases: cause and therapeutic implications. *Current Pharmaceutical Design*, 13(18), 1925–1928. <https://doi.org/10.2174/138161207780858429>
- Winkler, C., Kirik, D., Björklund, A., y Cenci, M. A. (2002). L-DOPA-induced dyskinesia in the intrastriatal 6-hydroxydopamine model of parkinson's disease: relation to motor and cellular parameters of nigrostriatal function. *Neurobiology of Disease*, 10(2), 165–186. <https://doi.org/10.1006/nbdi.2002.0499>
- Wolf, E., Seppi, K., Katzenschlager, R., Hochschorner, G., Ransmayr, G., Schwingenschuh, P., Ott, E., Kloiber, I., Haubenberger, D., Auff, E., y Poewe, W. (2010). Long-term antidyskinetic efficacy of amantadine in Parkinson's disease. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 25(10), 1357–1363. <https://doi.org/10.1002/mds.23034>
- Wolozin, B., Wang, S. W., Li, N.-C., Lee, A., Lee, T. A., y Kazis, L. E. (2007). Simvastatin is associated with a reduced incidence of dementia and Parkinson's disease. *BMC Medicine*, 5, 20. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-5-20>
- Wong, E., y Cuervo, A. M. (2010). Autophagy gone awry in neurodegenerative diseases. *Nature Neuroscience*, 13(7), 805–811. <https://doi.org/10.1038/nn.2575>
- Wong, M. J., Kantores, C., Ivanovska, J., Jain, A., y Jankov, R. P. (2016). Simvastatin prevents and reverses chronic pulmonary hypertension in newborn rats via pleiotropic inhibition of RhoA signaling. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 311(5), L985–L999. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00345.2016>
- Wu, A. G., Zhou, X. G., Qiao, G., Yu, L., Tang, Y., Yan, L., Qiu, W. Q., Pan, R., Yu, C. L., Law, B. Y. K., Qin, D. L., y Wu, J. M. (2021). Targeting microglial autophagic degradation in NLRP3 inflammasome-mediated neurodegenerative diseases. *Ageing Research Reviews*, 65(August 2020). <https://doi.org/10.1016/j.arr.2020.101202>
- Wu, D.-C., Teismann, P., Tieu, K., Vila, M., Jackson-Lewis, V., Ischiropoulos, H., y Przedborski, S. (2003). NADPH oxidase mediates oxidative stress in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(10), 6145–6150. <https://doi.org/10.1073/pnas.0937239100>
- Wu, J., Li, J., Hu, H., Liu, P., Fang, Y., y Wu, D. (2012). Rho-kinase inhibitor, fasudil, prevents neuronal apoptosis via the Akt activation and PTEN inactivation in the ischemic penumbra of rat brain. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 32(7), 1187–1197. <https://doi.org/10.1007/s10571-012-9845-z>

- Wu, Y., Dissing-Olesen, L., MacVicar, B. A., y Stevens, B. (2015). Microglia: Dynamic Mediators of Synapse Development and Plasticity. *Trends in Immunology*, 36(10), 605–613. <https://doi.org/10.1016/j.it.2015.08.008>
- Xu, Q., Jensen, D. D., Peng, H., y Feng, Y. (2016). The critical role of the central nervous system (pro)renin receptor in regulating systemic blood pressure. *Pharmacology y Therapeutics*, 164, 126–134. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.04.006>
- Yan, J., Qiao, L., Tian, J., Liu, A., Wu, J., Huang, J., Shen, M., y Lai, X. (2019). Effect of statins on Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. *Medicine*, 98(12), e14852. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000014852>
- Yan, J., Qiao, L., Wu, J., Fan, H., Sun, J., y Zhang, Y. (2018). Simvastatin protects dopaminergic neurons against MPP⁺-induced oxidative stress and regulates the endogenous antioxidant system through ERK. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 51(4), 1957–1968. <https://doi.org/10.1159/000495720>
- Yan, J., Sun, J., Huang, L., Fu, Q., y Du, G. (2014). Simvastatin prevents neuroinflammation by inhibiting N-methyl-D-aspartic acid receptor 1 in 6-hydroxydopamine-treated PC12 cells. *Journal of Neuroscience Research*, 92(5), 634–640. <https://doi.org/10.1002/jnr.23329>
- Yan, J., Xu, Y., Zhu, C., Zhang, L., Wu, A., Yang, Y., Xiong, Z., Deng, C., Huang, X.-F., Yenari, M. A., Yang, Y.-G., Ying, W., y Wang, Q. (2011). Simvastatin prevents dopaminergic neurodegeneration in experimental parkinsonian models: the association with anti-inflammatory responses. *PLoS One*, 6(6), e20945. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020945>
- Yan, J., Zhou, X., Guo, J.-J., Mao, L., Wang, Y.-J., Sun, J., Sun, L.-X., Zhang, L.-Y., Zhou, X.-F., y Liao, H. (2012). Nogo-66 inhibits adhesion and migration of microglia via GTPase Rho pathway in vitro. *Journal of Neurochemistry*, 120(5), 721–731. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07619.x>
- Yang, F., Trolle Lagerros, Y., Bellocco, R., Adami, H.-O., Fang, F., Pedersen, N. L., y Wirdefeldt, K. (2015a). Physical activity and risk of Parkinson's disease in the Swedish National March Cohort. *Brain: A Journal of Neurology*, 138(Pt 2), 269–275. <https://doi.org/10.1093/brain/awu323>
- Yang, H.-Y., Bian, Y.-F., Xiao, C.-S., Liang, B., Zhang, N., Gao, F., y Yang, Z.-M. (2015b). Angiotensin-(1-7) stimulates cholesterol efflux from angiotensin II-treated cholesterol-loaded THP-1 macrophages through the suppression of p38 and c-Jun N-terminal kinase signaling. *Molecular Medicine Reports*, 12(1), 1387–1392. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3484>
- Yang, Y., Yang, Q., Yang, J., Ma, Y., y Ding, G. (2017). Angiotensin II induces cholesterol accumulation and injury in podocytes. *Scientific Reports*, 7(1), 10672. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09733-w>
- Zaja-Milatovic, S., Milatovic, D., Schantz, A. M., Zhang, J., Montine, K. S., Samii, A., Deutch, A. Y., y Montine, T. J. (2005). Dendritic degeneration in neostriatal medium spiny neurons in Parkinson disease. *Neurology*, 64(3), 545–547. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000150591.33787.A4>
- Zhang, D.-D., Yu, H.-L., Ma, W.-W., Liu, Q.-R., Han, J., Wang, H., y Xiao, R. (2015). 27-Hydroxycholesterol contributes to disruptive effects on learning and memory by modulating cholesterol metabolism in the rat brain. *Neuroscience*, 300, 163–173. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.05.022>

- Zhang, H., Li, Y., Yu, J., Guo, M., Meng, J., Liu, C., Xie, Y., Feng, L., Xiao, B., y Ma, C. (2013). Rho kinase inhibitor fasudil regulates microglia polarization and function. *Neuroimmunomodulation*, 20(6), 313–322. <https://doi.org/10.1159/000351221>
- Zhang, Q., Zhao, Y. F., Xi, J. Y., Yu, W. B., y Xiao, B. G. (2016). Rho kinase II interference by small hairpin RNA ameliorates 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced parkinsonism in mice. *Molecular Medicine Reports*, 14(6), 4947–4956. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5889>
- Zhang, X., Andren, P. E., Greengard, P., y Svenningsson, P. (2008a). Evidence for a role of the 5-HT1B receptor and its adaptor protein, p11, in L-DOPA treatment of an animal model of Parkinsonism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(6), 2163–2168. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711839105>
- Zhang, Y., Gu, X., y Yuan, X. (2007). Phenylalanine activates the mitochondria-mediated apoptosis through the RhoA/Rho-associated kinase pathway in cortical neurons. *The European Journal of Neuroscience*, 25(5), 1341–1348. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05404.x>
- Zhang, Z., Fauser, U., y Schluesener, H. J. (2008b). Dexamethasone suppresses infiltration of RhoA cells into early lesions of rat traumatic brain injury. *Acta Neuropathologica*, 115(3), 335–343. <https://doi.org/10.1007/s00401-007-0301-y>
- Zhao, Y., Zhang, Q., Xi, J., Li, Y., Ma, C., y Xiao, B. (2015a). Multitarget intervention of Fasudil in the neuroprotection of dopaminergic neurons in MPTP-mouse model of Parkinson's disease. *Journal of the Neurological Sciences*, 353(1–2), 28–37. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2015.03.022>
- Zhao, Y., Zhang, Q., Xi, J., Xiao, B., Li, Y., y Ma, C. (2015b). Neuroprotective effect of fasudil on inflammation through PI3K/Akt and Wnt/β-catenin dependent pathways in a mice model of Parkinson's disease. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8(3), 2354–2364.
- Zhu, T., Miller, A. G., Deliyanti, D., Berka, D. R., Agrotis, A., Campbell, D. J., y Wilkinson-Berka, J. L. (2015). Prorenin stimulates a pro-angiogenic and pro-inflammatory response in retinal endothelial cells and an M1 phenotype in retinal microglia. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 42(5), 537–548. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12376>







ANEXO II



DECLARACIÓN DE CONFLICTOS DE INTERES

No existen conflictos de interés.





FINANCIACIÓN

- ✓ Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (RTI2018-098830-B-I00).
- ✓ Spanish Ministry of Health (RD16/0011/0016 and CIBERNED).
- ✓ Galician Government (XUGA, ED431C 2018/10, ED431G/05).
- ✓ FEDER (Regional European Development Fund)

