



TESIS DE DOCTORADO

**MECANISMOS IMPLICADOS EN LA  
NEUROGÉNESIS Y LA SUPERVIVENCIA CELULAR  
DE PROGENITORES NEURALES EN LA ZONA  
VENTRICULAR-SUBVENTRICULAR ADULTA Y EN  
IMPLANTES DOPAMINÉRGICOS**

María García Garrote

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL DE LA UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE  
COMPOSTELA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN NEUROCIENCIA Y PSICOLOGÍA CLÍNICA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2021



D./Dña. **María García Garrote**

Título de la tesis: **Mecanismos implicados en la neurogénesis y la supervivencia celular de los progenitores neurales en la zona ventricular-subventricular adulta y en implantes dopaminérgicos**

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, 16 de septiembre de 2021.**

**Firma electrónica**

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR/TUTOR DE LA TESIS

**Mecanismos implicados en la neurogénesis y la supervivencia celular de progenitores neurales en la zona ventricular-subventricular adulta y en implantes dopaminérgicos**

D. José Luis Labandeira García  
D<sup>a</sup>. Jannette Rodríguez Pallares

INFORMAN:

Que la presente tesis, se corresponde con el trabajo realizado por D<sup>a</sup>. **María García Garrote** bajo nuestra dirección/tutorización, y autorizamos su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC y que, como directores de esta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

De acuerdo con lo indicado en el Reglamento de Estudios de Doctorado, declaramos también que la presente tesis doctoral es idónea para ser defendida en base a la modalidad de *Monográfica con reproducción parcial de publicaciones*, en los que la participación de la doctoranda fue decisiva para su elaboración y las publicaciones se ajustan al Plan de Investigación.

En Santiago de Compostela, 16 de septiembre de 2021.

Firma electrónica

## AGRADECIMIENTOS

Esta tesis doctoral no habría sido posible sin la inestimable colaboración, científica y no científica, de las personas mencionadas a continuación, y especialmente me siento agradecida:

Al profesor **José Luis Labandeira García**, cuya dedicación y tenacidad han inspirado esta tesis, por abrirme las puertas del grupo de investigación que dirige e iniciarme en el apasionante mundo de la ciencia.

A la profesora **María José Guerra Seijas**, por su amabilidad al acogerme en el grupo y por tener siempre una palabra de ánimo para todos.

A **Jannette Rodríguez Pallares**, quien no solo ha sido una excelente mentora para una doctoranda inexperta, sino también una compañera infatigable en el día a día. Sin sus consejos y su apoyo esta tesis no habría sido posible.

A **Juan Parga**, porque desde el primer día como estudiante de máster hasta el último como doctoranda no he recibido de él más que palabras de aliento e ideas útiles.

A **Pablo Garrido**, con quien he tenido la gran suerte de compartir nuevos proyectos, tan retadores como ilusionantes, y porque su buen carácter y paciencia son ya marca de la casa.

A **Carmen Díaz**, porque los temas científicos y no científicos sobre los que hemos debatido son ya innumerables y por aportar siempre una perspectiva diferente.

A **Alicia Costa**, cuya cercanía extrañé durante esta última etapa porque pude disfrutarla durante la primera, y por ser un ejemplo de excelencia científica y de fortaleza personal.

A **Antonio Domínguez**, genio y figura, por deslumbrarme con su sabiduría y por su fantástico sentido del humor.

A **Mary Pedrosa**, por su espontaneidad y compañerismo, ha sido una suerte poder compartir contigo esta experiencia trepidante que es la tesis.

A **Rita Valenzuela**, por tu alegría, porque siempre aportas serenidad allí donde se necesita y porque me has alegrado la hora de comer durante años con las aventuras y desventuras de tus peques.

A **Ana Isabel Rodríguez**, por estar siempre ahí, porque tu labor de gestión nos facilita inmensamente el trabajo a todos.

A **Begoña Villar**, compatriota norteña, por brindarme siempre consejos estupendos y por tu incansable y contagioso buen humor.

A **Ana Muñoz**, porque ha sido un placer compartir contigo las prácticas de Neuroanatomía y aprender de ti en ellas, por interesarte siempre por los demás.

A **Aloia Quijano**, porque, aunque parece que siempre estamos discutiendo, en realidad nos exasperamos con las mismas cosas y me traes mucha alegría.

A **Lucía Lage**, por tu frescura, por tu risa, porque siempre estás dispuesta a echar una mano donde haga falta.

A nuestro inmerecidísimo equipo técnico, porque son el motor del laboratorio y sin duda esta tesis no sería lo que es sin vosotras. Gracias a **Cristina Gianzo**, porque verdaderamente eres incombustible y me has enseñado a no desesperar. Gracias a **Pilar Aldrey**, por ser un torbellino, por ser inigualable y fantástica y por los cientos de horas que hemos compartido entre inmunes. Gracias a **Iria Novoa**, mi guía espiritual en cuanto a cultivos celulares se refiere, y porque si hay algo en mí de organizada y meticulosa, lo aprendí de ti.

A **Andrea López**, porque vivir esta aventura contigo ha sido más de lo que podría pedir, porque solo con mirarnos nos entendemos y porque, aunque de vez en cuando tomamos conciencia de nuestra locura y nos entra la risa, seguimos queriendo arreglar el mundo en nuestras conversaciones. Gracias por ser increíble.

A mis padres, **Benigno** y **Mercedes**, por hacer posible este y otros muchos sueños, gracias a un amor y apoyo incondicionales. Gracias por confiar en mí y por no dudar en que lo lograría, aun cuando yo estaba llena de dudas. No habría llegado hasta aquí sin vosotros.

A mi hermana, **Ana**, por ser inimitable, por ser mi mejor amiga, mi confidente y mi compañera de vida y de parranda. Por no juzgarme jamás, por apoyarme en las buenas y en las malas y, sobre todo, por hacerme risa desde 1993.

A mis tías, **Chelo** y **Lola**, dos mujeres impresionantes que tanto me han mimado de niña como me han servido de ejemplo como adulta. Vuestra confianza y cariño inamovibles me han traído hasta aquí.

A mis abuelos, **Juana, Manuel, Consuelo** y **Jesús**, cuya abnegación y sacrificio son los verdaderos artífices de este trabajo, porque de ellos aprendí a valorar lo alcanzado con el esfuerzo propio.

A mis amigas, **Lau, Laura** y **Ta**, que más que amigas son mis hermanas, gracias por vuestra amistad, inquebrantable a prueba de kilómetros, de nuevas responsabilidades y proyectos locos. Por otros veintisiete años más queriéndonos, riéndonos y apoyándonos.

A **Antonio Dopico**, porque somos tan parecidos como solo dos personas tan distintas pueden serlo y porque con tu ponerme de los nervios, con tu ironía y con tus calderos de peltre, de verdad que has hecho mi vida menos dura.

A **Manuel Rodríguez**, por ser uno entre un millón, porque su humor color licor café, su absoluta falta de coordinación motora, su prosa y su poesía han contribuido enormemente a la realización no científica de esta tesis.

A **Ignacio**, para quien tendría que escribir otras doscientas cincuenta y siete páginas de gratitud, porque ya van dos y una pandemia y un confinamiento y una estancia, y aquí seguimos. Gracias por acompañarme durante cada minuto de este camino, alegrándote conmigo en cada triunfo y animándome tras cada tropiezo. Sin ser tú mi oasis, nunca lo habría conseguido. Te quiero.

# ÍNDICE

RESUMEN.....	I
ARTÍCULOS DERIVADOS DE ESTA TESIS.....	III
OTROS ARTÍCULOS REALIZADOS DURANTE EL PERÍODO DE LA TESIS .....	V
ABREVIATURAS.....	VI
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. LA ENFERMEDAD DE PARKINSON.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.1. Epidemiología y sintomatología clínica .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.2. Neuropatología y fisiopatología.....</b>	<b>2</b>
<b>1.1.3. Etiología y mecanismos patogénicos .....</b>	<b>4</b>
1.1.3.1. Estrés oxidativo .....	5
1.1.3.2. Disfunción mitocondrial.....	5
1.1.3.3. Fallos en la proteostasis de la $\alpha$ -sinucleína .....	6
1.1.3.4. Neuroinflamación.....	7
1.1.3.5. Vulnerabilidad dopaminérgica .....	8
<b>1.1.4. Modelos animales de EP .....</b>	<b>8</b>
1.1.4.1. Modelos basados en la administración de neurotoxinas.....	9
1.1.4.2. Modelos genéticos.....	10
1.1.4.3. Otros modelos .....	12
<b>1.1.5. Tratamiento de la EP .....</b>	<b>13</b>
1.1.5.1. Tratamientos farmacológicos .....	13
1.1.5.2. Inmunoterapia.....	15
1.1.5.3. Aproximaciones quirúrgicas.....	15
<b>1.2. TERAPIA CELULAR Y EP.....</b>	<b>17</b>
<b>1.2.1. Trasplante de células humanas de origen embrionario/fetal</b>	<b>17</b>
<b>1.2.2. Trasplante de células dopaminérgicas derivadas de hESCs.</b>	<b>19</b>

1.2.3. Trasplante de células dopaminérgicas derivadas de hiPSCs	20
1.2.4. Trasplante de fuentes celulares alternativas.....	22
1.3. NEUROGÉNESIS ADULTA EN LA ZONA VENTRICULAR-SUBVENTRICULAR .....	25
1.3.1. Citoarquitectura del nicho neurogénico de la V-SVZ.....	25
1.3.1.1. Células B1 .....	25
1.3.1.2. Células B2 .....	27
1.3.1.3. Células C .....	27
1.3.1.4. Células A.....	27
1.3.2. Regulación del nicho neurogénico por factores intrínsecos y extrínsecos.....	30
1.3.2.1. Factores extrínsecos .....	30
1.3.2.2. Factores intrínsecos .....	35
1.3.3.1. Trasplante de NSCs.....	38
1.3.3.2. Secretoma de NSCs.....	39
1.3.3.3. Estimulación de las poblaciones residentes en la V-SVZ ...	40
1.4. SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA .....	43
1.4.1. SRA cerebral.....	44
1.4.2. SRA y EP.....	47
1.4.3. SRA y neurogénesis adulta .....	51
<b>2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS .....</b>	<b>53</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>56</b>
3.1. ANIMALES.....	56
3.2. ESTUDIO DE LOS MECANISMOS IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN DE LA NEUROGÉNESIS EN LA V-SVZ ADULTA EN CONDICIONES FISIOLÓGICAS Y EN MODELOS ANIMALES DE EP .....	57
3.2.1. Diseño experimental.....	57
3.2.2. Cultivo de neurosféricas derivadas de la V-SVZ de ratones adultos .....	63

<b>3.2.3. Expansión y cuantificación de neurosféricas .....</b>	<b>64</b>
<b>3.2.4. Extracción de ARN y PCR en tiempo real de neurosféricas ...</b>	<b>65</b>
<b>3.2.5. Cromatografía líquida de alta resolución .....</b>	<b>66</b>
3.2.5.1. Determinación de los niveles de ANG .....	66
3.2.5.2. Determinación de los niveles de catecolaminas .....	67
<b>3.2.6. WB .....</b>	<b>68</b>
<b>3.2.7. Diferenciación de neurosféricas .....</b>	<b>69</b>
<b>3.2.8. Inmunocitoquímica y cuantificación celular .....</b>	<b>70</b>
<b>3.2.9. Microdissección de captura guiada por láser .....</b>	<b>70</b>
<b>3.2.10. Extracción de ARN y qPCR de V-SVZ obtenida por MCL</b>	<b>71</b>
<b>3.2.11. Modelo animal de 6-OHDA .....</b>	<b>72</b>
<b>3.2.12. Trasplante de precursores mesencefálicos fetales .....</b>	<b>73</b>
<b>3.2.13. Pruebas de comportamiento.....</b>	<b>74</b>
3.2.13.1. Test del cilindro.....	74
3.2.13.2. Test de comportamiento rotacional .....	74
<b>3.2.14. Inmunohistoquímica colorimétrica e inmunofluorescencia</b>	<b>75</b>
<b>3.2.15. Cuantificación estereológica .....</b>	<b>77</b>
<b>3.3. ESTUDIO DE LOS MECANISMOS IMPLICADOS EN LA SUPERVIVENCIA DE PRECURSORES DOPAMINÉRGICOS EN MODELOS ANIMALES DE EP .....</b>	<b>78</b>
<b>3.3.1. Diseño experimental .....</b>	<b>78</b>
<b>3.3.2. Cultivo de la línea celular dopaminérgica Mes23.5.....</b>	<b>81</b>
<b>3.3.3. Cultivo de la línea celular dopaminérgica N27 .....</b>	<b>81</b>
<b>3.3.4. Cultivos de la línea catecolaminérgica humana SH-SY5Y ...</b>	<b>82</b>
<b>3.3.5. Ensayo de viabilidad celular.....</b>	<b>82</b>
<b>3.3.6. Detección de EOR en cultivos de líneas celulares dopaminérgicas.....</b>	<b>83</b>
<b>3.3.7. Plásmidos, establecimiento de líneas celulares estables y silenciamiento génico.....</b>	<b>83</b>

3.3.8. Extracción de ARN y qPCR de líneas dopaminérgicas .....	84
3.3.9. Aislamiento, cultivo y caracterización de MSCs .....	85
3.3.10. Obtención de MSC-CM .....	86
3.3.11. Tratamiento del MSC-CM .....	86
3.3.11.1. Inactivación de la fase proteica del MSC-CM .....	86
3.3.11.2. Eliminación de la fase lipídica del MSC-CM.....	87
3.3.12. Cotrasplantes de precursores dopaminérgicos y MSCs.....	88
3.3.13. Inmunohistoquímica colorimétrica e inmunofluorescencia de implantes celulares .....	89
3.3.14. Cuantificación estereológica de implantes celulares .....	89
3.3.15. Cultivos primarios de mesencéfalo .....	90
3.3.16. Cultivos de neuronas dopaminérgicas derivadas de hiPSCs.. .....	90
3.3.17. Inmunofluorescencia, citometría de flujo e inmunocitoquímica colorimétrica de cultivos celulares.....	92
3.3.18. Cuantificación de células en cultivo.....	94
3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS .....	94
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>96</b>
4.1. MECANISMOS IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN DE LA NEUROGÉNESIS ADULTA EN LA V-SVZ EN CONDICIONES FISIOLÓGICAS Y EN MODELOS ANIMALES DE EP .....	96
4.1.1. Estudio del papel del SRA en la regulación de la neurogénesis adulta en la V-SVZ cerebral.....	96
4.1.1.1. Los receptores AT2 median los efectos de AngII sobre la generación de neurosféricas .....	96
4.1.1.2. El agonista del receptor AT2 C21 estimula la actividad en las células del nicho de la V-SVZ.....	100
4.1.1.3. El efecto restrictivo del receptor AT1 sobre la neurogénesis adulta es contrarrestado por la estimulación de la actividad del receptor AT2.....	102

4.1.1.4. La regulación mutua entre los receptores AT1 y AT2 es la base de los efectos de AngII sobre las células formadoras de neuroferas..	104
4.1.1.5. Los efectos estimuladores de la activación del receptor AT2 sobre las NSCs obtenidas de individuos jóvenes y envejecidos implican al receptor Mas .....	107
4.1.1.6. Implicación del receptor AT1 en los efectos del SRA sobre la neurogénesis adulta en rata.....	109
<b>4.1.2. Estudio de la interacción entre el SRA y el sistema dopaminérgico en la regulación de la neurogénesis adulta en la V-SVZ cerebral.....</b>	<b>113</b>
4.1.2.1. La expresión de los receptores del SRA y de los receptores dopaminérgicos se regula recíprocamente en NSCs y NPCs derivadas de la V-SVZ.....	114
4.1.2.2. La activación de los receptores D3 incrementa la proliferación de NSCs y NPCs derivadas de la V-SVZ.....	119
4.1.2.3. La interacción entre la dopamina y el SRA regula la proliferación <i>in vitro</i> de NSCs y NPCs derivadas de la V-SVZ....	124
4.1.2.4. La interacción entre la dopamina y el SRA regula la proliferación y la generación de neuroblastos en un modelo en rata de EP .....	129
<b>4.2. MECANISMOS IMPLICADOS EN LA SUPERVIVENCIA DE PRECURSORES DOPAMINÉRGICOS EN MODELOS ANIMALES DE EP .....</b>	<b>140</b>
<b>4.2.1. Estudio del efecto la manipulación del SRA en la funcionalidad y supervivencia de implantes dopaminérgicos en modelos animales de EP.....</b>	<b>140</b>
<b>4.2.2. Estudio de los efectos de la AngII sobre la producción de EOR, la expresión de genes antioxidantes y la supervivencia dopaminérgica .....</b>	<b>143</b>
4.2.2.1. La AngII reduce la viabilidad dopaminérgica y aumenta la producción de EOR <i>in vitro</i> .....	144
4.2.2.2. El factor de transcripción <i>Klf9</i> favorece la supervivencia dopaminérgica <i>in vitro</i> en respuesta al estrés oxidativo inducido por AngII .....	146

<b>4.2.3. Estudio de las propiedades terapéuticas de las MSCs como estrategia para promover la supervivencia de precursores dopaminérgicos.....</b>	<b>150</b>
4.2.3.1. El cotrasplante de precursores dopaminérgicos con dosis elevadas de MSCs afecta negativamente a su supervivencia y a su capacidad de reinervación .....	153
4.2.3.2. El cotrasplante de precursores dopaminérgicos con dosis bajas de MSCs promueve su supervivencia y su capacidad de reinervación .....	156
<b>4.2.4. Estudio de los mecanismos implicados en la neuroprotección dopaminérgica mediada por MSCs .....</b>	<b>159</b>
4.2.4.1. El MSC-CM posee efectos neuroprotectores y de rescate sobre neuronas dopaminérgicas <i>in vitro</i> .....	159
4.2.4.2. Los factores lipídicos presentes en el MSC-CM favorecen la supervivencia de las células dopaminérgicas <i>in vitro</i> .....	164
4.2.4.3. Las vías de señalización MAPK/ERK y PI3K/Akt están implicadas en los efectos neuroprotectores mediados por el MSC-CM sobre las neuronas dopaminérgicas <i>in vitro</i> .....	167
4.2.4.4. La PGE2 media los efectos neuroprotectores del MSC-CM sobre las neuronas dopaminérgicas <i>in vitro</i> .....	169
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>173</b>
<b>5.1. MECANISMOS IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN DE LA NEUROGÉNESIS ADULTA EN LA V-SVZ EN CONDICIONES FISIOLÓGICAS Y EN MODELOS ANIMALES DE EP .....</b>	<b>173</b>
<b>5.1.1. La interacción entre los receptores AT1, AT2 y Mas regula la neurogénesis adulta en la V-SVZ cerebral.....</b>	<b>173</b>
<b>5.1.2. La dopamina regula la neurogénesis adulta en la V-SVZ a través de interacciones entre los receptores de dopamina D3 y los receptores AT2.....</b>	<b>180</b>
<b>5.2. MECANISMOS IMPLICADOS EN LA SUPERVIVENCIA DE PRECURSORES DOPAMINÉRGICOS EN MODELOS ANIMALES DE EP .....</b>	<b>188</b>

5.2.1. La manipulación del SRA favorece la funcionalidad y supervivencia de implantes dopaminérgicos en modelos animales de EP.....	188
5.2.2. La AngII induce estrés oxidativo y regula al alza la señalización neuroprotectora mediada por las vías NRF2 y KLF9 en neuronas dopaminérgicas.....	189
5.2.3. El efecto del cotrasplante de las MSCs sobre los precursores dopaminérgicos implantados en un modelo animal de EP es dependiente de la dosis.....	193
5.2.4. Los receptores EP2 median los efectos neuroprotectores de las MSCs sobre las neuronas dopaminérgicas.....	195
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>200</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>203</b>
<b>DECLARACIÓN DE CONFLICTOS DE INTERÉS .....</b>	<b>258</b>
<b>FINANCIACIÓN .....</b>	<b>259</b>



## RESUMEN

La enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda enfermedad neurodegenerativa en incidencia y se caracteriza por la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra. Hoy en día, el tratamiento clásico habitual consiste en la administración de L-DOPA, con una eficacia limitada. Por ello resulta de especial interés la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas.

En los últimos años, la movilización de los progenitores neurales endógenos residentes en los nichos neurogénicos del cerebro adulto para producir neuroblastos se perfila como una aproximación terapéutica de interés. Estudios previos muestran que el sistema renina-angiotensina (SRA) media procesos neuroinflamatorios y de vulnerabilidad dopaminérgica, y que existen interacciones contrarreguladoras entre la dopamina y el SRA en la sustancia negra y el estriado. Sin embargo, no se conoce su posible papel en la regulación de la neurogénesis adulta en la zona ventricular-subventricular (V-SVZ), cuya localización adyacente al estriado la hace especialmente interesante como diana terapéutica para el tratamiento de la EP. Nuestros resultados muestran que la angiotensina II (AngII) tiene un papel relevante en la regulación de la neurogénesis adulta e interacciones complejas entre sus receptores tipo 1 (AT1) y tipo 2 (AT2) desempeñan un papel fundamental, tanto en animales jóvenes como envejecidos. Además, nuestros resultados sugieren que los receptores de AngII están involucrados en la regulación de la neurogénesis mediada por dopamina, y que ambos sistemas interactúan en la V-SVZ para regular la proliferación y generación de neuroblastos, tanto en condiciones fisiológicas como en modelos animales de EP.

Por otra parte, el modelo clásico de terapia celular para el tratamiento de la EP se basa en el trasplante de precursores dopaminérgicos mesencefálicos de origen embrionario/fetal. Este modelo, que ya ha saltado a la clínica con resultados desiguales, posee importantes limitaciones técnicas relacionadas con la disponibilidad de tejido y con la escasa supervivencia de las neuronas dopaminérgicas implantadas, independientemente de cuál sea su origen. Por ello, en esta tesis nos propusimos investigar los mecanismos implicados en la supervivencia

de los precursores dopaminérgicos trasplantados en modelos animales de EP. Estudios previos de nuestro grupo muestran que el SRA juega un papel relevante en la maduración de precursores dopaminérgicos *in vitro*, aunque no se había estudiado su posible papel en la supervivencia de los implantes mesencefálicos. Nuestros resultados indican que la manipulación del SRA local, en concreto la inhibición de los receptores AT1, incrementa la supervivencia y capacidad de reinervación de los precursores dopaminérgicos implantados. Nuestros datos sugieren además que la producción exacerbada de especies oxigenadas reactivas inducida por AngII es responsable, al menos en parte, de sus efectos deletéreos sobre la supervivencia dopaminérgica, aunque también activa vías de señalización neuroprotectoras que implican al factor de transcripción *Nrf2*. Por otro lado, son bien conocidas las propiedades tróficas, inmunomoduladoras y antiapoptóticas de las células estromales mesenquimales (MSCs), por lo que podrían promover la supervivencia dopaminérgica. Nuestros resultados muestran que el cotrasplante de precursores dopaminérgicos con MSCs tiene efectos beneficiosos sobre la supervivencia y capacidad de reinervación de los precursores dopaminérgicos implantados en un modelo animal de EP. Estudios *in vitro* sugieren además que la fracción lipídica del secretoma de las MSCs, y particularmente la prostaglandina E2 a través de sus receptores EP2, es la responsable de los efectos neuroprotectores y de rescate de las MSCs sobre la población dopaminérgica.

En conjunto, nuestros resultados subrayan el papel del SRA como regulador clave en la proliferación, supervivencia y diferenciación de progenitores neurales endógenos y de precursores dopaminérgicos implantados en modelos animales de EP. Por tanto, los datos recogidos en la presente tesis apuntan a que la manipulación del SRA posee potencial para convertirse en una herramienta terapéutica relevante en el ámbito de la terapia celular para el tratamiento de la EP.

## ARTÍCULOS DERIVADOS DE ESTA TESIS

- García-Garrote M.**, Parga J.A., Labandeira P.J., Labandeira-García J.L., y Rodríguez-Pallares J. (2021). Dopamine regulates adult neurogenesis in the ventricular-subventricular zone via dopamine D3 angiotensin type 2 receptor interactions. *Stem Cells*, <https://doi.org/10.1002/stem.3457>. Índice de impacto: 6,277. Categoría: *Biotechnology & Applied Microbiology* (19/159) Q1
- Rodríguez-Pallares J., **García-Garrote M.**, Parga J.A., y Labandeira-García J.L. (2021). Dose-dependent effect of mesenchymal stromal cells co-grafted with dopaminergic neurons in a Parkinson's disease rat model. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, <https://doi.org/10.1111/jcmm.16900>. Índice de impacto: 5,310. Categoría: *Medicine, Research & Experimental* (44/140) Q2
- García-Garrote M.**, Pérez-Villalba A., Garrido-Gil P., Belenguer G., Parga J.A., Pérez-Sánchez F., Labandeira-García J.L., Fariñas I., y Rodríguez-Pallares J. (2019). Interaction between Angiotensin Type 1, Type 2, and Mas Receptors to Regulate Adult Neurogenesis in the Brain Ventricular–Subventricular Zone. *Cells*, 8, <https://doi.org/10.3390/cells8121551>. Índice de impacto: 5,656. Categoría: *Cell Biology* (40/193) Q1
- Parga J.A., Rodríguez-Pérez A.I., **García-Garrote M.**, Rodríguez-Pallares J., y Labandeira-García J.L. (2018). Data on the effect of Angiotensin II and 6-hydroxydopamine on reactive oxygen species production, antioxidant gene expression and viability of different neuronal cell lines. *Data in Brief*, 21, <https://doi.org/10.1016/j.dib.2018.10.069>. JCI: 0,17.
- Parga J.A., Rodríguez-Pérez A.I., **García-Garrote M.**, Rodríguez-Pallares J., y Labandeira-García J.L. (2018). Angiotensin II induces oxidative stress and upregulates neuroprotective signaling from the NRF2 and KLF9 pathway in dopaminergic cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 129, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.10.409>. Índice de

impacto: 6,020. Categoría: *Endocrinology & Metabolism* (17/142) Q1

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, <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0681-5>. Índice de impacto: 5,076. Categoría: *Neurosciences* (44/261) Q1

## OTROS ARTÍCULOS REALIZADOS DURANTE EL PERÍODO DE LA TESIS

- Garrido-Gil, P., **García-Garrote M.**, Pedrosa M.A., Rodríguez-Pérez A.I., y Labandeira-García J.L. (2021). Microglial angiotensin type 2 receptors mediate sex-specific expression of inflammatory cytokines independently of estrogen. *Brain Behavior and Immunity*, en primera revisión. Índice de impacto: 7,217. Categoría: *Neurosciences* (37/273) Q1
- López-López A., Villar-Cheda B., Quijano A., Garrido-Gil P., **García-Garrote M.**, Diaz-Ruiz C., Muñoz A., y Labandeira-García J.L. (2021). NADPH-oxidase, Rho-kinase and autophagy mediate the (pro)renin-induced pro-inflammatory microglial response and enhancement of dopaminergic neuron death. *Antioxidants*, <https://doi.org/10.3390/antiox10091340>. Índice de impacto: 5,014. Categoría: *Chemistry, Medicinal* (7/61) Q1
- Rodríguez-Pérez A.I., Garrido-Gil P., Pedrosa M.A., **García-Garrote M.**, Valenzuela R., Navarro G., Franco R., y Labandeira-García J.L. (2020). Angiotensin type 2 receptors: Role in aging and neuroinflammation in the substantia nigra. *Brain Behaviour and Immunity*, 87, <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.12.011>. Índice de impacto: 6,633. Categoría: *Neurosciences* (25/261) Q1 (D1)

## ABREVIATURAS

**6-OHDA:** 6-hidroxidopamina

**7-OH-DPAT:** 7-hidroxi-N,N-dipropil-2-aminotetralina

**AADC:** L-aminoácido aromático descarboxilasa

**ABC:** complejo avidina-biotina-peroxidasa

**ADN:** ácido desoxirribonucleico

**ADNc:** ADN complementario

**ANG:** angiotensinógeno

**AngI:** angiotensina I

**AngII:** angiotensina II

**ANOVA:** análisis de la varianza

**aNSCs:** NSCs activadas, del inglés *activated NSCs*

**ARNm:** ácido ribonucleico mensajero

**AT1:** receptor de angiotensina II tipo 1

**AT2:** receptor de angiotensina II tipo 2

**BDNF:** factor neurotrófico derivado del cerebro, del inglés *brain-derived neurotrophic factor*

**bFGF:** FGF humano básico, del inglés *human basic fibroblast growth factor*

**BHE:** barrera hematoencefálica

**BLBP:** proteína cerebral de unión a lípidos, del inglés *brain-specific lipid-binding protein*

**BMP:** proteína morfogenética del hueso, del inglés *bone morphogenetic protein*

**BO:** bulbo olfatorio

**BrdU:** bromodesoxiuridina

**BrdU-LRC:** células que retienen la marca BrdU, del inglés *BrdU-Label Retaining Cells*

**BSA:** albúmina de suero bovino, del inglés *bovine serum albumin*

**CDNF:** factor neurotrófico de dopamina cerebral, del inglés *cerebral dopamine neurotrophic factor*

**CMTMR:** colorante vital fluorescente Cell Tracker™ Orange

**COMT:** catecol-O-metil transferasa

**COX-2:** ciclooxigenasa-2

**Ct:** ciclo umbral, del inglés *cycle threshold*

**DAB:** 3,3'-diaminobencidina

**DCFDA:** diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína, del inglés *2',7'-dichlorofluorescein-diacetate*

**DCX:** doblecortina

**DIV:** días *in vitro*

**DMEM/F-12:** medio Eagle modificado de Dulbecco: mezcla de nutrientes F-12

**dNTPs:** nucleósidos trifosfato

**DOPAC:** ácido 3,4-dihidroxifenil acético, del inglés *3,4-dihydroxyphenylacetic acid*

**DPEC:** dietilpirocarbonato

**DTT:** ditiotreitól

**ECA:** enzima convertidora de angiotensina

**EDTA:** ácido etilendiaminetetraacético

**EEM:** error estándar de la media

**EGFR:** receptor de factor de crecimiento epidérmico, del inglés *epidermal growth factor receptor*

**EOR:** especies oxigenadas reactivas

**EP:** enfermedad de Parkinson

**EP1:** receptor de prostaglandina E2 tipo 1

**EP2:** receptor de prostaglandina E2 tipo 2

**FACS:** del inglés *Fluorescence-Activated Cell Sorting*

**FBSi:** suero fetal bovino inactivado por calor, del inglés *heat-inactivated fetal bovine serum*

**FGF:** factor de crecimiento de fibroblastos, del inglés *fibroblast growth factor*

**FMP:** fascículo medial del prosencéfalo

**GABA:** ácido  $\gamma$ -aminobutírico

**GAPDH:** gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

**GDNF:** factor neurotrófico derivado de células gliales, del inglés *glial derived-neurotrophic factor*

**GEO:** *Gene Expression Omnibus*

**GFAP:** proteína ácida fibrilar glial, del inglés *glial fibrillary acidic protein*

**GLAST:** transportador de glutamato aspartato, del inglés *glutamate/aspartate transporter*

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** peróxido de hidrógeno

**hESCs:** células madre embrionarias humanas, del inglés *human embryonic stem cells*

**hfVM:** tejido mesencefálico ventral de origen embrionario/fetal humano, del inglés *human fetal ventral mesencephalon*

**HIFU:** ultrasonido focalizado de alta intensidad, del inglés *high-intensity focused ultrasound*

**hiPSCs:** células madre pluripotentes inducidas humanas, del inglés *human induced pluripotent stem cells*

**HPLC:** cromatografía líquida de alta resolución, del inglés *high performance liquid chromatography*

**HRP:** peroxidasa de rábano, del inglés *horseradish peroxidase*

**IGF:** factor de crecimiento insulínico, del inglés *insulin growth factor*

**IL:** interleucina

**iNOS:** enzima óxido nítrico sintasa inducible

**i.p.:** intraperitoneal

**-ir:** inmunorreactivas

**KO-AT1:** delección específica del gen *Agtr1a*

**KO-AT2:** delección específica del gen *Agtr2*

**KSR:** del inglés, *knock-out serum replacement*

**LCR:** líquido cefalorraquídeo

**L-DOPA:** L-3,4-dihidroxifenilalanina

**LGF:** factor de crecimiento del hígado, del inglés *liver growth factor*

**LIF:** factor inhibidor de la leucemia, del inglés *leukemia inhibitory factor*

**MAO-B:** monoamino oxidasa B

**MasR:** receptor Mas

**MCL:** microdissección guiada por captura láser

**MEF-CM:** medio condicionado por fibroblastos embrionarios de ratón, del inglés *mouse embryonic fibroblast conditioned media*

**MEM:** medio mínimo esencial de Eagle

**M-MLV:** transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina de Moloney, del inglés *Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase*

**MPP<sup>+</sup>:** catión 1-metil-1,4-fenilpiridino

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

**MrgD:** receptor acoplado a proteína G asociado al receptor Mas

**MSC-CM:** medio condicionado derivado de MSCs, del inglés *conditioned medium derived from MSCs*

**MSCs:** células estromales mesenquimales, del inglés *mesenchymal stromal cells*

**MTT:** bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol  
**NDS:** suero normal de burro, del inglés *normal donkey serum*  
**Ngn:** neurogenina  
**NHS:** suero normal de caballo, del inglés *normal horse serum*  
**NOX:** NADPH oxidasa  
**NPCs:** células progenitoras neurales, del inglés *neural progenitor cells*  
**NSCs:** células madre neurales, del inglés *neural stem cells*  
**NST:** núcleo subtalámico de Luys  
**PBS:** tampón fosfato salino, del inglés *phosphate buffered saline*  
**PDGF:** factor de crecimiento derivado de plaquetas, del inglés *platelet-derived growth factor*  
**PEDF:** factor derivado del epitelio pigmentario, del inglés *pigment epithelium-derived factor*  
**PFA:** paraformaldehído  
**PGE2:** prostaglandina E2  
**PMSF:** fluoruro de fenilmetilsulfonilo  
**PSA-NCAM:** molécula de adhesión neural a células polisiliadas  
**qNSCs:** NSCs quiescentes, del inglés *quiescent NSCs*  
**qPCR:** PCR en tiempo real, del inglés *quantitative polymerase chain reaction*  
**RIPA:** tampón de ensayo de radioinmunoprecipitación, del inglés *radioimmunoprecipitation assay buffer*  
**RMS:** corriente migratoria rostral, del inglés *rostral migratory stream*  
**RT:** temperatura ambiente, del inglés *room temperature*

**SCF:** factor de crecimiento de células madre, del inglés *stem cell factor*  
**SDF-1:** factor derivado de células estromales 1, del inglés *stromal cell-derived factor-1*  
**SGZ:** zona subgranular, del inglés *subgranular zone*  
**SHH:** Sonic hedgehog  
**siARN:** ARN pequeño de interferencia, del inglés *small interfering RNA*  
**siKlf9:** siARN diseñado contra *Klf9*  
**siNrf2:** siARN diseñado contra *Nrf2*  
**siNT:** siARN control, del inglés *non-targeting siRNA*  
**SNC:** sistema nervioso central  
**SNpc:** sustancia negra *pars compacta*  
**SNpr:** sustancia negra *pars reticulata*  
**SRA:** sistema renina-angiotensina  
**TGF:** factor de crecimiento tumoral, del inglés *tumor growth factor*  
**TH:** tirosina hidroxilasa  
**TNF- $\alpha$ :** factor de necrosis tumoral alfa, del inglés *tumor necrosis factor alpha*  
**UV:** ultravioleta  
**VCAM-1:** molécula de adhesión a células vasculares 1, del inglés *vascular cell adhesion molecule-1*  
**VEGF:** factor de crecimiento endotelial vascular, del inglés *vascular endothelial growth factor*  
**V-SVZ:** zona ventricular-subventricular, del inglés *ventricular-subventricular zone*  
**WB:** Western blot  
**WT:** genotipo silvestre, del inglés *wild type*

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

### 1.1.1. Epidemiología y sintomatología clínica

A nivel mundial, se estima que la enfermedad de Parkinson (EP) suma de 5 a 35 nuevos casos por cada 100.000 habitantes anualmente, lo que la convierte en la segunda enfermedad neurodegenerativa más común tras la enfermedad de Alzheimer (Poewe y col., 2017; Twelves y col., 2003). La incidencia se incrementa de 5 a 10 veces a partir de la sexta década de vida, afectando al 1,5% de la población global mayor de 65 años y al 3% de la población mayor de 80 años (Pringsheim y col., 2014). Además, la EP es la enfermedad neurodegenerativa de crecimiento más rápido ya que, debido al envejecimiento de la población mundial, el número de personas afectadas se incrementa exponencialmente. Se espera que el número de pacientes de EP se duplique desde los 6,9 millones en 2015 hasta los 14,2 millones en 2040 (Dorsey y Bloem, 2018). La prevalencia de la EP es el doble en hombres que en mujeres y en estas la aparición de la patología es más tardía, debido posiblemente al efecto neuroprotector de los estrógenos (Rodríguez-Pérez y col., 2015b; Song y col., 2020).

La EP se caracteriza principalmente por la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra *pars compacta* (SNpc) del mesencéfalo ventral. La pérdida de proyecciones axonales al estriado provoca un drástico descenso en la dopamina disponible para las neuronas espinosas medianas de este núcleo y, como consecuencia, se produce la desregulación de la vía nigroestriada (Parmar y col., 2020). La degeneración dopaminérgica puede prolongarse durante varios años hasta que, al perderse el 50-70% de la población neuronal y el 80% de los terminales nerviosos, los síntomas cardinales de la EP se hacen evidentes (Engelender e Isacson, 2017; Fearnley y Lees, 1991). Entre las manifestaciones clínicas destacan las alteraciones

motoras como la aparición de rigidez muscular, la bradiquinesia, trastornos de la marcha e inestabilidad postural y temblor en reposo. Los síntomas no motores se asocian a disfunciones del sistema nervioso autónomo y cursan con hiposmia, trastornos de conducta del sueño REM, hipotensión ortostática, disfunción urogenital e intestinal e hiperhidrosis. Estas alteraciones presentan una aparición temprana que puede preceder, incluso en décadas, a la de los síntomas motores. La prevalencia de los síntomas no motores se incrementa con el progreso de la enfermedad y, en fases tardías, a ellos se suman ansiedad, demencia, depresión y dolor. Estas alteraciones no motoras suponen una importante causa de incapacidad y de reducción de la calidad de vida asociada a la EP (Mahlknecht y col., 2015; Schapira y col., 2017a).

### **1.1.2. Neuropatología y fisiopatología**

Aunque la EP se caracteriza por la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc, la degeneración neuronal puede extenderse a otras regiones cerebrales y afectar a poblaciones noradrenérgicas y colinérgicas presentes en el *locus coeruleus*, los núcleos basales de Meynert, el hipotálamo, el córtex cerebral y el núcleo motor dorsal del vago (Seidel y col., 2015).

La principal característica neuropatológica de la EP es la acumulación anormal de  $\alpha$ -sinucleína en inclusiones intracitoplásmicas e intraneuríticas que reciben el nombre de cuerpos de Lewy o de neuritas de Lewy, respectivamente (Alafuzoff y Parkkinen, 2014). Estos agregados se detectan en etapas presintomáticas de la EP en el núcleo motor dorsal del vago, el núcleo anterior del bulbo olfatorio (BO) y el plexo entérico. A medida que la patología progresa, las inclusiones aparecen en la sustancia negra y en el *locus coeruleus* y en estados muy avanzados de la enfermedad, en la amígdala, el prosencéfalo basal y en estructuras mediales del lóbulo temporal (Braak y col., 2003). Apoyando este modelo en etapas propuesto por Braak, surge la hipótesis de una propagación priónica de la  $\alpha$ -sinucleína, que postula que los agregados pueden ser liberados al espacio extracelular y ser captados por las neuronas vecinas (Hijaz y Volpicelli-Daley, 2020). Conjuntamente, ambas teorías respaldarían la idea de una agregación de  $\alpha$ -sinucleína inicial en los nervios entéricos y en el BO,

que causaría las alteraciones asociadas al inicio de la EP (hiposmia y disfunción intestinal) (ver Introducción, apartado [1.1.1](#)). A continuación, los depósitos se propagarían hasta alcanzar la sustancia negra y provocar la disfunción motora que se observa en etapas posteriores de la EP (George y col., 2013).

En la EP se producen una serie de alteraciones en las conexiones de los núcleos tálamo-córtico-basales, responsables de la coordinación del movimiento voluntario. El globo pálido interno y la sustancia negra *pars reticulata* (SNpr) son los principales núcleos de salida de los ganglios basales y envían proyecciones de ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) al tronco cerebral y al tálamo ventrolateral. A estos núcleos llegan proyecciones GABAérgicas procedentes del estriado. Clásicamente, se ha descrito la anatomía funcional de esta circuitería en base a la existencia de dos subpoblaciones de neuronas estriatales que proyectan a dianas diferentes y ejercen efectos opuestos sobre el movimiento (Albin y col., 1990). Aunque este modelo tiene limitaciones, y ha sido revisado por varios autores (Calabresi y col., 2014), da respuesta a la regulación del movimiento coordinado, en base al balance funcional de dos vías. La vía directa se inicia en las neuronas de proyección estriatales que expresan receptores de dopamina D1 y envían sus axones al globo pálido interno y a la SNpr. Por otra parte, la vía indirecta se origina en las neuronas de proyección estriatales que expresan receptores D2 y cuyas eferencias al globo pálido externo, tras un relevo glutamatérgico en el núcleo subtalámico de Luys (NST), alcanzan el globo pálido interno y la SNpr (Mitchell y col., 1989). Puesto que la inervación dopaminérgica procedente de la SNpc modula las proyecciones GABAérgicas que parten del estriado, la degeneración neuronal en la SNpc provoca el desequilibrio de ambas vías. Como consecuencia, se inhibe la vía directa, dependiente de la activación de D1, de manera que la inervación GABAérgica que recibe el tálamo motor se exagera, dando lugar a la hipocinesia típica de la EP. Por otra parte, la vía indirecta, dependiente de D2, se hiperactiva y como consecuencia se reduce la proyección GABAérgica que reciben tálamo y córtex, produciéndose hipertonía y rigidez muscular (Calabresi y col., 2014).

### 1.1.3. Etiología y mecanismos patogénicos

En la actualidad, se considera que la EP posee un origen multifactorial donde genética y ambiente se combinan para provocar la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc.

La EP familiar se caracteriza por una aparición temprana de los síntomas, generalmente antes de los 45 años. Recientemente, se han identificado más de 90 genes que contribuyen al riesgo de padecer EP (Bandres-Ciga y col., 2020; Nalls y col., 2019); de ellos, un porcentaje reducido causan EP familiar, con diversos grados de penetrancia. De hecho, la penetrancia de las mutaciones más comunes como *LRRK2* *G2019S* es incompleta, lo que sugiere la contribución adicional de otros factores genéticos y/o ambientales al desarrollo de la EP (Goldwurm y col., 2011). Aunque solo un 10-20% de los casos diagnosticados de EP se deben a alteraciones monogénicas heredables en genes como *SNCA*, *Parkin*, *DJ-1*, *PINK* o *LRRK2*, estresores ambientales y otros factores externos pueden activar o inhibir estos genes, vinculándolos así con la EP idiopática (Panicker y col., 2021).

La EP idiopática o esporádica constituye más del 85% de los casos diagnosticados y se caracteriza por una aparición tardía de los síntomas (> 55-60 años), con un pico de incidencia máxima entre los 75 y los 79 años. En este caso, la progresión de la enfermedad es más lenta y puede desarrollarse como consecuencia de la sinergia entre factores ambientales y cierta predisposición genética a padecer la EP (Kitada y col., 2012; Simon y col., 2020). La hipótesis de una causa ambiental para la EP recobró fuerza a comienzos de los 80, cuando un grupo de jóvenes toxicómanos de San Francisco desarrolló un agudo parkinsonismo tras inyectarse un análogo de meperidina, posteriormente identificado como 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) (Langston y col., 1983). Hoy en día, se acepta que diversos factores ambientales como infecciones virales, metales o pesticidas pueden contribuir a desencadenar la enfermedad (Chen y Ritz, 2018).

Esta heterogeneidad etiológica converge en mecanismos patogénicos comunes que incluyen estrés oxidativo, disfunción mitocondrial, fallos en la proteostasis de la  $\alpha$ -sinucleína y neuroinflamación, entre otros (Figura 1).

### 1.1.3.1. Estrés oxidativo

En condiciones fisiológicas, la respiración mitocondrial produce especies oxigenadas reactivas (EOR) que son neutralizadas por agentes antioxidantes para mantener la homeostasis redox celular. La alteración de este delicado equilibrio entre la producción y acumulación de EOR y su adecuada eliminación por parte de la célula se conoce como estrés oxidativo (Lushchak, 2014). Un ambiente altamente oxidante no solo daña a la mitocondria, sino que también favorece la agregación proteica y exige un funcionamiento intensificado de las principales vías de degradación intracelular, el sistema ubiquitina-proteasoma y la vía lisosomal (Souza y col., 2000) (Figura 1). El estrés oxidativo da lugar a daños en el ácido desoxirribonucleico (ADN), a fallos enzimáticos y finalmente al colapso de la membrana lipídica y a la apoptosis neuronal. Los pacientes de EP presentan niveles elevados de oxidación proteica y lipídica en la SNpc y una actividad reducida de los sistemas antioxidantes endógenos como las enzimas superóxido dismutasa y catalasa, o el glutatión, entre otros (Dexter y Jenner, 2013; Islam, 2017). De hecho, la pérdida de función de *DJ-1*, que actúa como un sensor de estrés oxidativo y que orquesta la acción de diversos mecanismos antioxidantes, entre ellos la síntesis de glutatión, se relaciona con una variante hereditaria de la EP de aparición temprana (Bonifati, 2003; Raninga y col., 2017). Aunque la mitocondria constituye la principal fuente de EOR, otros procesos celulares como el metabolismo de la dopamina contribuyen a incrementar el estrés oxidativo (Rodríguez-Pallares y col., 2007, 2008), que junto con la especial vulnerabilidad de las neuronas dopaminérgicas (ver Introducción, apartado [1.1.3.5](#)) favorece su pérdida progresiva (Brichta y Greengard, 2014).

### 1.1.3.2. Disfunción mitocondrial

La disfunción mitocondrial juega un papel clave en la patogénesis de la EP, ya sea esta idiopática o familiar (Zuo y Motherwell, 2013) (Figura 1). La exposición a neurotoxinas como el MPTP antes mencionado o a pesticidas, como la rotenona, inhibe el complejo I mitocondrial o NADH deshidrogenasa en las neuronas dopaminérgicas (Greenamyre y col., 2003). De hecho, se observa una

actividad disminuida de este complejo enzimático en la sustancia negra de pacientes de EP (Bose y Beal, 2016; Schapira, 2007), lo que supone la interrupción de la fosforilación oxidativa y como consecuencia, una menor producción de ATP. La mitocondria genera entonces radicales libres que inducen la peroxidación lipídica de la membrana celular. Esta cascada redundante en un ciclo de fallo bioenergético y muerte neuronal que se retroalimenta positivamente (Rodríguez-Pallares y col., 2009). *Parkin* y *PINK1*, genes clásicamente asociados al desarrollo de la EP, se coordinan como detectores de daño mitocondrial. La pérdida de función en ellos provoca el acúmulo de mitocondrias defectuosas como consecuencia de una mitofagia desregulada que se relaciona con variantes autosómicas recesivas de la enfermedad, de aparición temprana (Pickrell y Youle, 2015; Yang y col., 2020).

#### 1.1.3.3. Fallos en la proteostasis de la $\alpha$ -sinucleína

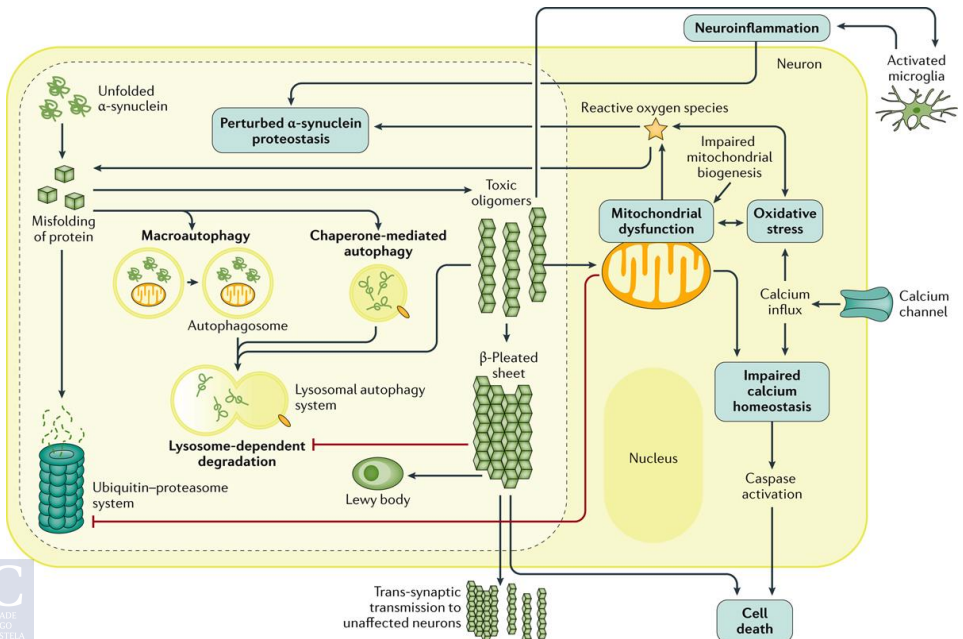
Hoy en día, la función fisiológica de la  $\alpha$ -sinucleína, aunque no se ha dilucidado por completo, se relaciona con el reciclaje de vesículas sinápticas, la función mitocondrial y la regulación del tráfico intracelular. Su implicación en la patogénesis de la EP, en cambio, está bien establecida ya que mutaciones puntuales en el gen *SNCA* como A30P y A53T dan lugar a variantes hereditarias de la EP (Sulzer y Edwards, 2019). La  $\alpha$ -sinucleína adquiere propiedades neurotóxicas durante un proceso patogénico en el que monómeros solubles de  $\alpha$ -sinucleína se fusionan para formar protofibrillas que, a su vez, se ensamblan entre sí para dar lugar a grandes fibrillas insolubles. La sobreproducción de proteína o las mutaciones que favorecen su plegamiento erróneo promueven su agregación (Panicker y col., 2021) (Figura 1).

En condiciones fisiológicas, la proteostasis de la  $\alpha$ -sinucleína se mantiene gracias al sistema ubiquitina-proteasoma que degrada las proteínas aberrantes, evitando su acumulación en el citoplasma. Mutaciones en el gen *UCHL-1*, también conocido como *PARK5* y cuyo producto génico posee actividad ubiquitin-ligasa, incrementan el riesgo de padecer EP. Los oligómeros de  $\alpha$ -sinucleína pueden inhibir el sistema ubiquitina-proteasoma, la macroautofagia y la función autofágica mediada por chaperonas. Esto genera un círculo vicioso en

el que la proteína mal plegada bloquea los sistemas degradativos que podrían eliminarla (Lee y Hsu, 2017; Panicker y col., 2021) (Figura 1).

#### 1.1.3.4. Neuroinflamación

En los últimos años, diversos estudios han demostrado la implicación de la inflamación en la degeneración dopaminérgica. Sin embargo, aún resulta controvertido determinar si la neuroinflamación y la activación microglial observadas en la SNpc y en el estriado de pacientes de EP son la causa o la consecuencia de la muerte neuronal (Kannarkat y col., 2013; Ransohoff, 2016). En este sentido, la neuroinflamación es un arma de doble filo, ya que la respuesta inflamatoria puede contribuir tanto a la reparación celular y al normal funcionamiento del cerebro como favorecer la neurodegeneración (Gelders y col., 2018) (Figura 1). Por un lado, la microglía es capaz de fagocitar y degradar agregados extracelulares de  $\alpha$ -sinucleína (George y Brundin, 2015). Por otro, la microglía activada libera EOR y citoquinas proinflamatorias como la interleucina (IL)-1 $\beta$ , señales que perpetúan el estado proinflamatorio induciendo la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y el reclutamiento de linfocitos hacia la sustancia negra (Collins y col., 2012).



**Figura 1. Mecanismos moleculares implicados en la degeneración dopaminérgica en la enfermedad de Parkinson (EP).** En la patogénesis de la EP contribuyen varios mecanismos entre los que destacan la generación exacerbada de ROS (del inglés, *reactive oxygen species*), una reducción en la actividad del sistema ubiquitina-proteasoma y la alteración de la dinámica mitocondrial. A su vez, la disfunción mitocondrial y la neuroinflamación, generada por la activación microglial, alteran la proteostasis de la  $\alpha$ -sinucleína, que forma agregados patogénicos o cuerpos de Lewy. Permiso concedido por *Copyright Clearance RightsLink®*, en nombre de *Springer Nature; Poewe y col., 2017*.

#### 1.1.3.5. Vulnerabilidad dopaminérgica

En la EP, la muerte neuronal transcurre con una especificidad tal que incluso núcleos dopaminérgicos adyacentes como el área tegmental ventral y la SNpc presentan diferentes susceptibilidades a la degeneración (Brichta y Greengard, 2014). Las neuronas dopaminérgicas de la SNpc poseen axones desmielinizados particularmente largos (hasta 4,5 metros) capaces de establecer hasta 2,4 millones de sinapsis. Esto las convierte en células excepcionalmente exigentes en cuanto a demanda metabólica, lo que las hace extraordinariamente sensibles a cualquier alteración que comprometa la función mitocondrial (Bolam y Pissadaki, 2012). La rápida autooxidación de la dopamina, que genera en condiciones fisiológicas peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y otras EOR, también contribuye a la vulnerabilidad dopaminérgica. Además, la acumulación excesiva de neuromelanina, que interacciona con el hierro y con otros metales prooxidantes, puede favorecer la agregación de  $\alpha$ -sinucleína y comprometer la función neuronal (Double, 2012; Halliday y col., 2005; Vila, 2019).

#### 1.1.4. Modelos animales de EP

En los últimos años, la identificación de los genes causantes de la EP familiar, así como la demostrada implicación de factores ambientales han permitido generar distintos modelos animales de EP. Estos modelos, además de proporcionar una valiosa herramienta para probar estrategias terapéuticas, replican parte de los mecanismos patogénicos de la enfermedad humana (Imbriani y col., 2018).

#### 1.1.4.1. Modelos basados en la administración de neurotoxinas

La administración, local o sistémica, de neurotoxinas que inducen la degeneración selectiva de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales es uno de los modelos más versátiles de EP, ya que reproduce la mayoría de las características patológicas y fenotípicas de la enfermedad. Sin embargo, las toxinas provocan habitualmente una pérdida masiva de neuronas dopaminérgicas (> 70-80%), lo que simula la fase tardía de la enfermedad, pero limita el estudio de su progresión (Kin y col., 2019).

##### *1.1.4.1.1. 6-hidroxidopamina*

La 6-hidroxidopamina (6-OHDA), debido a su elevada afinidad por transportadores catecolaminérgicos, induce la degeneración de neuronas dopaminérgicas, noradrenérgicas y en menor medida serotoninérgicas (Javoy y col., 1976). La incorporación de la neurotoxina al citoplasma celular provoca su autooxidación y la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, radicales superóxido, quinonas y radicales hidroxilo, causando disfunción mitocondrial, una sobreproducción de EOR y finalmente la degeneración neuronal (Kuruvilla y col., 2013).

Dado que no atraviesa la barrera hematoencefálica (BHE), la 6-OHDA debe administrarse intracerebralmente, habitualmente mediante inyección estereotáxica unilateral en el fascículo medial del prosencéfalo (FMP) (Penttinen y col., 2016). Previamente, y para aumentar la selectividad de la lesión, se administra desipramina, un inhibidor de la recaptación de noradrenalina y serotonina. Esta metodología, más empleada en rata, consigue un elevado porcentaje de degeneración dopaminérgica (en torno al 97% de la población tirosina hidroxilasa (TH) positiva de la SNpc) (Carman y col., 1991) y reproduce muchas de las alteraciones motoras y moleculares de la EP, lo que la hace especialmente útil en estudios de neurodegeneración. Sin embargo, este modelo presenta varias limitaciones. Por un lado, la degeneración nigroestriatal ocurre en el transcurso de unas pocas semanas para después mantenerse estática; mientras que, en la EP, la muerte neuronal es progresiva y no llega a estabilizarse. Por otra parte, la administración de 6-OHDA en el FMP restringe la degeneración neuronal a la SNpc, sin afectar a otras regiones cerebrales, lo que limita

la recapitulación de los aspectos no motores de la EP (Hamadjida y col., 2019; Salari y Bagheri, 2019).

Alternativamente, la inyección de 6-OHDA en el estriado permite obtener una depleción dopaminérgica parcial que reproduce las fases tempranas de la enfermedad, un modelo especialmente adecuado para el ensayo de estrategias neuroprotectoras (Lee y col., 1996). Puesto que tras la administración de 6-OHDA los animales no desarrollan bradiquinesia ni temblor, la evaluación del modelo se basa en una batería de tests que demuestra un comportamiento motor alterado tras la lesión de la vía nigroestriada (ver Material y métodos, apartado [3.2.13](#)).

#### *1.1.4.1.2. MPTP*

Debido a su naturaleza lipofílica, la MPTP atraviesa fácilmente la BHE por lo que puede administrarse por vía sistémica. En los astrocitos, la MPTP se transforma en su catión metabólicamente activo 1-metil-1,4-fenilpiridino ( $MPP^+$ ) en una reacción catalizada por la monoamino oxidasa B (MAO-B). A través de un transportador orgánico de cationes de tipo 3, el  $MPP^+$  se libera al medio extracelular desde los astrocitos y es captado por los transportadores presinápticos de dopamina de las neuronas dopaminérgicas (Cui y col., 2009). Ya en el citoplasma, el  $MPP^+$  que no es incorporado a vesículas transportadoras de monoaminas, inhibe la NADH deshidrogenasa mitocondrial, causando tanto la liberación de EOR como una disminución en la síntesis de ATP. La neurodegeneración ocurre progresivamente, dirigida por la comprometida función mitocondrial, y transcurre con la aparición de inclusiones proteicas, además de otras alteraciones cognitivas y motoras propias de la EP (Kowall y col., 2000; Meredith y Rademacher, 2011). Sin embargo, no todas las especies responden a la administración sistémica de MPTP – habitualmente se emplea en primates no humanos y en determinadas cepas de ratones –, y su uso reviste cierto riesgo para el investigador que lo maneja (Przedborski y col., 2001).

#### 1.1.4.2. Modelos genéticos

Los modelos animales transgénicos se basan en la

manipulación de genes clásicamente asociados al desarrollo de la EP para reproducir las características de la enfermedad, pero la mayoría de ellos no reporta evidencias de degeneración dopaminérgica en el sistema nigroestriatal (Kin y col., 2019).

#### *1.1.4.2.1. SNCA*

Se han observado duplicados o triplicados en el gen *SNCA* en casos familiares e idiopáticos de EP. Estas mutaciones reducen los niveles de dopamina en el estriado de modelos animales e inducen la aparición de inclusiones intracelulares de  $\alpha$ -sinucleína y alteraciones motoras, aunque no una degeneración neuronal masiva en la SNpc. La implementación de tecnologías sofisticadas de edición génica, como CRISPR/Cas9, ha permitido introducir mutaciones del gen *SNCA* en cerdo, un modelo más próximo a las particularidades genéticas, anatómicas, fisiológicas y neurológicas del ser humano (Zhou y col., 2015a).

#### *1.1.4.2.2. LRKK2*

La mutación patogénica del gen *LRKK2 G2019S* da lugar a una variante autosómica dominante de la EP cuyo fenotipo recuerda al de la EP idiopática. En modelos transgénicos, la incorporación de *G2019S* induce defectos en la plasticidad sináptica asociados a una conducta hipoactiva y al deterioro de la memoria; así como alteraciones en la arquitectura neuronal y en la transmisión dopaminérgica. Sin embargo, en estos modelos, no se ha observado una degeneración neuronal significativa en la SNpc (Beccano-Kelly y col., 2015; Chou y col., 2014; Wallings y col., 2019).

#### *1.1.4.2.3. PINK1*

Mientras que las mutaciones homocigotas en *PINK1* se relacionan con EP juvenil de aparición temprana, las mutaciones heterocigotas se asocian a EP de aparición tardía (Valente y col., 2004). Los animales transgénicos que incorporan estas últimas presentan una disminución en la liberación de dopamina en el estriado que, sin embargo, no provoca alteraciones motoras (Madeo y col., 2014).

#### 1.1.4.3. Otros modelos

Los modelos mixtos ('*double hit*'), de reciente generación, combinan un agente tóxico externo con un genotipo vulnerable para recrear más fielmente el origen multifactorial de la EP (Cannon y Greenamyre, 2013). De esta manera, se contrarrestan posibles mecanismos compensatorios que enmascaran la aparición del fenotipo motor en los modelos transgénicos. En un estudio reciente se observó que la exposición a rotenona induce déficits motores y degeneración neuronal en la SNpc de un modelo transgénico de *PINK1*, alteraciones que el modelo genético no replicaba por sí mismo (Martella y col., 2016). Otro ejemplo es la combinación de la administración estereotáxica de  $\alpha$ -sinucleína en la sustancia negra y de la exposición crónica a rotenona, que muestra resultados similares (Mulcahy y col., 2013). Otra estrategia, a caballo entre la manipulación genética y la administración de neurotoxinas, consiste en inducir la sobreexpresión de  $\alpha$ -sinucleína humana en animales de experimentación mediante la inyección de vectores virales adenoasociados que contienen la forma silvestre o alguna de las mutaciones más comunes de la proteína humana (Koprach y col., 2017; Rodríguez-Pérez y col., 2018; Van der Perren y col., 2016).

En los últimos años, la optogenética, mediante la estimulación independiente de las neuronas estriatales espinosas que expresan D1 y D2, ha permitido delimitar la contribución de la vía directa y de la vía indirecta a la alteración del circuito motor y replicar diversos estados de la enfermedad (Lee y col., 2018) e incluso ensayar estrategias terapéuticas basadas en esta técnica (Magno y col., 2019).

Por otra parte, los resultados discretos obtenidos en modelos genéticos clásicos de ratón han despertado el interés por modelos genéticos alternativos como la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, el nematodo *Caenorhabditis elegans* o el pez cebra *Danio rerio*. Estos ofrecen un manejo relativamente sencillo, la fácil manipulación de su genoma y el bajo coste, aunque su validez está limitada por la naturaleza de los síntomas motores que muestran estas especies (Duty y Jenner, 2011).

### 1.1.5. Tratamiento de la EP

En 1817, James Parkinson manifestaba su esperanza de que “*algún proceso correctivo pueda ser pronto descubierto, mediante el cual, al menos, el progreso de la enfermedad pueda ser detenido*” (Parkinson, 1817). Sin embargo, transcurridos más de dos siglos desde la publicación de *Un ensayo sobre la parálisis agitante*, el tratamiento de la EP continúa siendo meramente sintomático.

En los siguientes apartados, abordaremos las principales estrategias terapéuticas empleadas en esta patología.

#### 1.1.5.1. Tratamientos farmacológicos

##### 1.1.5.1.1. L-3,4-dihidroxifenilalanina

El descubrimiento de la L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), un precursor de la dopamina capaz de atravesar la BHE y de restaurar los niveles de dopamina en el estriado, supuso una revolución en el tratamiento de la EP. Más de 50 años después, la L-DOPA sigue siendo la terapia farmacológica habitual, a pesar de que solo alivia los síntomas motores durante unos pocos años (LeWitt y Fahn, 2016). Para frenar su metabolización periférica e incrementar su biodisponibilidad, la L-DOPA se coadministra con un inhibidor de la L-aminoácido aromático descarboxilasa (AADC), la carbidopa, que no atraviesa la BHE (Tarazi y col., 2014). Sin embargo, a medio plazo, la administración crónica y sistémica de L-DOPA-carbidopa presenta importantes inconvenientes. Por una parte, el incremento de la concentración intracerebral de dopamina no puede monitorizarse ni temporal ni espacialmente, lo que desencadena respuestas oscilatorias al fármaco y discinesias inducidas por L-DOPA (Picconi y col., 2018). Estos efectos secundarios se deben a la asimilación pulsátil del fármaco, resultado de su corta vida media y de una absorción gastrointestinal y transporte a través de la BHE variables (Poewe y Antonini, 2015). En esta línea, se ha demostrado que la liberación sostenida del fármaco, mediante la aplicación intestinal de geles de L-DOPA-carbidopa, mejora la evolución de las discinesias inducidas por L-DOPA en pacientes de EP (Fernández y col., 2018, [NCT00660673](#)).

#### *1.1.5.1.2. Inhibidores de la catecol-O-metil transferasa*

La coadministración de inhibidores de la AADC desplaza el metabolismo periférico de la L-DOPA hacia la ortometilación del fármaco, en una reacción catalizada por la catecol-O-metil transferasa (COMT). El uso de inhibidores de la COMT, como opicapona, entacapona o tolcapona, permite incrementar la biodisponibilidad y la vida media de la L-DOPA en un 30-50%, lo que alargaría el efecto terapéutico de cada dosis (Müller, 2015).

#### *1.1.5.1.3. Inhibidores de la MAO-B*

La biodisponibilidad de la dopamina se ve limitada por su recaptación presináptica a través de receptores específicos y por su oxidación al metabolito inactivo ácido 3,4-dihidroxifenil acético (DOPAC, del inglés *3,4 – dihydroxyphenylacetic acid*) en una reacción catalizada por la MAO-B glial. Inhibidores irreversibles de la MAO-B como la selegilina o la rasagilina reducen los efectos adversos de la L-DOPA en pacientes de EP con fluctuaciones motoras (de Bie y col., 2020). Recientemente, se ha comercializado el inhibidor reversible de la MAO-B safinamida (Schapira y col., 2017b, [NCT00627640](#)), aprobada en Europa como terapia complementaria a la L-DOPA, sola o en combinación con otros fármacos, para el tratamiento de pacientes en estadios medios o avanzados de la enfermedad que experimentan fluctuaciones del movimiento.

#### *1.1.5.1.4. Agonistas dopaminérgicos*

La estimulación de los receptores D2 con fines terapéuticos se remonta a los años 70. Desde entonces, agonistas dopaminérgicos como la bromocriptina se han utilizado como terapia complementaria para la EP, debido a su mayor vida media y al menor riesgo de inducir discinesias (Connolly y Lang, 2014). Uno de los agonistas más atractivos para tratar pacientes con EP avanzada es la apomorfina, que ejerce una acción combinada sobre D1 y D2, posee un efecto terapéutico global equiparable al de la L-DOPA y puede administrarse de forma no invasiva gracias al desarrollo de fórmulas novedosas (Olanow y col., 2020, [NCT02469090](#)). No obstante, aunque su administración puede mejorar tanto la sintomatología motora

(rigidez, temblor y bradiquinesia) como la no motora (fatiga, disfagia o dolor), los agonistas dopaminérgicos tienden a inducir somnolencia y desregulaciones en el control de impulsos ya que activan los sistemas cerebrales de recompensa (Voon y col., 2011).

#### 1.1.5.2. Inmunoterapia

La clara contribución de los agregados de  $\alpha$ -sinucleína a la patogénesis de la EP los ha señalado como posible diana terapéutica. La administración de péptidos cortos diseñados contra la  $\alpha$ -sinucleína oligomérica humana induce inmunización en modelos transgénicos de EP, en un proceso mediado por la activación microglial. La vacuna disminuye la acumulación de  $\alpha$ -sinucleína en axones y sinapsis y reduce la degeneración de fibras dopaminérgicas en el estriado, provocando una considerable mejora funcional (Mandler y col., 2014). Debido a los resultados positivos obtenidos en modelos preclínicos, este abordaje terapéutico se ha trasladado a la clínica. Los ensayos clínicos en fase I se han ampliado recientemente tras observar que las inmunizaciones generan anticuerpos contra  $\alpha$ -sinucleína en pacientes de EP (Volc y col., 2020, [NCT02618941](#)). Por otra parte, la inmunización pasiva mediante anticuerpos monoclonales humanizados dirigidos contra los agregados de  $\alpha$ -sinucleína podría inhibir la propagación priónica de la  $\alpha$ -sinucleína, favoreciendo la neuroprotección y ralentizando el avance de la enfermedad, según sugieren los resultados de un ensayo clínico en fase II (Jankovic y col., 2018, [NCT03100149](#)).

#### 1.1.5.3. Aproximaciones quirúrgicas

La lesión específica de núcleos que forman parte de la circuitería motora, como la talamotomía y la palidotomía, se practica desde los años 50 con el objetivo de disminuir la hiperactividad a la que se ven sometidos los ganglios basales en la EP. Aunque arrojaron algunos resultados prometedores, se trataba de intervenciones muy agresivas con un alto riesgo de morbilidad (Krayenbühl y col., 1961; Spindola y col., 2017).

#### *1.1.5.3.1. Estimulación cerebral profunda*

A principios de los años 90, la identificación del NST como potencial diana para la estimulación cerebral profunda produce un gran salto cualitativo en el tratamiento de la enfermedad (Limousin y col., 1995; Parkin y col., 2001). La aplicación de corrientes eléctricas de alta frecuencia (100-200 Hz) al NST permite su lesión reversible sin destruir tejido cerebral. Este procedimiento, además de paliar trastornos motores, permite reducir la dosis diaria de L-DOPA en casi un 60%, con la consecuente disminución de las discinesias y de las fluctuaciones hipocinéticas asociadas (Álvarez y col., 2009; Rodríguez-Rojas y col., 2018). Sin embargo, esta intervención no puede aplicarse a todos los pacientes de EP y presenta problemas inherentes a la implantación quirúrgica de los electrodos, como riesgo de hemorragias intracraneales o infecciones. En general, los candidatos ideales son pacientes de EP idiopática con una buena respuesta a la L-DOPA y complicaciones motoras debidas al tratamiento farmacológico crónico. En cambio, disfunciones cognitivas como la demencia, la psicosis aguda o la depresión constituyen criterios de exclusión. Recientemente, sin embargo, se ha aplicado exitosamente esta técnica a pacientes de EP familiar en fases avanzadas (Fernández-Pajarín y col., 2021). La estimulación cerebral profunda del globo pálido interno, aunque efectiva, no permite reducir la dosis de L-DOPA (Bronstein y col., 2011; Odekerken y col., 2016).

#### *1.1.5.3.2. Ablación térmica de ganglios basales guiada por ultrasonidos*

En los últimos años, se ha aprobado la aplicación de ultrasonidos focalizados de alta intensidad (HIFU, del inglés *high-intensity focused ultrasound*) guiada por resonancia magnética para el tratamiento del temblor esencial y, más recientemente, de la EP. Mediante esta metodología se consigue la ablación térmica del núcleo ventrolateral talámico, del NST o del globo pálido interno con precisión submilimétrica y sin necesidad de realizar una incisión en el cráneo del paciente. Aunque se han publicado resultados esperanzadores, su eficacia se restringe casi exclusivamente al alivio del temblor esencial y de la rigidez en estos pacientes, con ningún o muy leve efecto sobre

otras alteraciones motoras. Incluso se han registrado hemiparesias leves asociadas a la cirugía, probablemente debido a la ablación térmica accidental de la cápsula interna (Martínez-Fernández y col., 2018, [NCT02912871](#); Moosa y col., 2019).

## **1.2. TERAPIA CELULAR Y EP**

Los tratamientos anteriores, algunos bien establecidos y otros en fase de desarrollo, alivian notablemente los síntomas motores de la EP y mejoran la calidad de vida de los pacientes, pero no consiguen detener la pérdida de neuronas dopaminérgicas. Por ello, continúa la búsqueda de terapias capaces de modificar o incluso revertir la progresión de la enfermedad. Desde hace años, la EP ha sido pionera en el campo de la terapia celular ya que, a diferencia de otras enfermedades neurodegenerativas, el reemplazo de un tipo celular concreto en una única región anatómica definida podría ser suficiente para contrarrestar las principales alteraciones motoras causadas por la enfermedad.

### **1.2.1. Trasplante de células humanas de origen embrionario/fetal**

Hoy en día está bien establecido que los precursores mesencefálicos de origen fetal son capaces de sobrevivir e integrarse funcionalmente en el estriado hospedador en modelos animales de EP, donde adquieren un fenotipo dopaminérgico maduro capaz de compensar parte de los déficits motores. En los años 90, los resultados obtenidos en animales de experimentación (Björklund y col., 1982; Brundin y col., 1986), junto con la publicación de estudios preliminares que sugerían que el injerto de tejido mesencefálico ventral de origen embrionario/fetal humano (hfVM, del inglés *human fetal ventral mesencephalon*) era capaz de aliviar los síntomas motores en pacientes de EP (Lindvall y col., 1990; Piccini y col., 1999; Widner y col., 1992), alentaron el salto a la clínica, con el NIH promocionando dos estudios a doble ciego a gran escala. Sin embargo, los resultados fueron decepcionantes: no solo se observaron mejorías poco consistentes, con grandes diferencias entre los grupos de edad, sino que además se describieron discinesias inducidas por el trasplante (Freed y col., 2001

[NCT03347955](#); Herzog y col., 2008; Olanow y col., 2003). Desde entonces, se ha planteado que el diseño de estos ensayos no fue óptimo en aspectos clave como la preparación y almacenamiento del tejido donado, la elección y/o aplicación del protocolo de inmunosupresión o la selección de períodos de seguimiento suficientemente largos (Brundin y col., 2001; Petit y col., 2014). Tras estos resultados, los ensayos clínicos con humanos se abandonaron temporalmente. Hoy se cree que el desarrollo de discinesias puede evitarse minimizando el porcentaje de células serotoninérgicas en la suspensión implantada (Carta y col., 2010). Ensayos posteriores obtuvieron resultados irregulares, con pacientes que experimentaban una mejoría funcional estable y prolongada, que incluso permitía la interrupción del tratamiento farmacológico (Kefalopoulou y col., 2014; Li y col., 2016) y otros que desarrollaban discinesias sin experimentar ningún alivio de los síntomas (Hagell y col., 2002). Otro freno importante para este tipo de ensayos surge tras la publicación de un trabajo que describía la aparición de inclusiones tipo cuerpos de Lewy en las células trasplantadas (Kordower y col., 2008), lo que sugería una propagación priónica de la  $\alpha$ -sinucleopatía desde el hospedador hacia el implante. Cabe destacar, sin embargo, que la neuropatología solo parecía afectar a un porcentaje reducido de células dopaminérgicas, sin comportar la disminución del efecto terapéutico del trasplante (Cooper y col., 2009).

En el año 2010 se inicia un ensayo multicéntrico financiado por la Unión Europea, TRANSEURO, que utiliza hfVM como fuente de células dopaminérgicas para el trasplante. TRANSEURO pretende solventar las limitaciones o errores cometidos previamente que han entorpecido el desarrollo clínico competitivo de esta técnica para el tratamiento de la EP. Para ello se incluyeron candidatos óptimos para terapias de reemplazo neuronal reclutando una cohorte observacional de pacientes jóvenes de EP ( $\leq 65$  años  $n = 153$ ), con una aparición temprana de los síntomas en fases iniciales de la enfermedad y que no han experimentado discinesias. Once pacientes procedentes de esta cohorte se sometieron al injerto de hfVM (Barker y col., 2019, [NCT01898390](#)). Este ensayo supuso, por primera vez, la aplicación uniforme de directrices definidas y ampliamente validadas para la preparación y almacenamiento del tejido (Piroth y col., 2014; Rath y

col., 2013), de manera que se garantizó un número mínimo de 100.000 células dopaminérgicas viables por injerto antes de ser trasplantadas al putamen (Li y col., 2016) y se aplicó el mismo protocolo de inmunosupresión a todos los pacientes durante 12 meses (Barker y col., 2019; Liu y col., 2017). Se prevé que los resultados de este ensayo se den a conocer este mismo año. Sin embargo, el uso de tejido humano de origen fetal, vinculado a controversias ético-legales, y las dificultades logísticas relacionadas con la disponibilidad, calidad y homogeneidad del tejido, hacen necesaria la búsqueda de fuentes alternativas de células aptas para el reemplazo neuronal en la EP.

En este sentido, las estrategias basadas en el uso de células madre suponen una opción atractiva. El trasplante alogénico de hfVM requiere al menos 3-6 fetos para obtener una cantidad significativa de precursores dopaminérgicos viables mientras que la expansión de células madre *in vitro*, siguiendo protocolos estandarizados, garantiza una disponibilidad casi ilimitada de tejido para el trasplante y un elevado grado de pureza (Kirkeby y col., 2017; Parmar y col., 2020). De esta forma, los trasplantes pueden planificarse y es menos probable que la intervención se cancele debido a una pobre cantidad y/o calidad del tejido, aumentando notablemente el número de pacientes que podrían recibir el injerto (Barker y col., 2013, 2019). Actualmente, es posible generar neuronas con fenotipo dopaminérgico a partir de diferentes tipos de células madre, aunque destacamos, por las ventajas que ofrecen, dos fuentes de células madre pluripotentes humanas: las células madre embrionarias (hESCs, del inglés *human embryonic stem cells*) y las células madre pluripotentes inducidas (hiPSCs, del inglés *human induced pluripotent stem cells*).

### **1.2.2. Trasplante de células dopaminérgicas derivadas de hESCs**

Las hESCs aisladas de la masa celular interna del blastocisto poseen una elevada capacidad de autorrenovación y pueden diferenciarse a cualquiera de los tipos celulares de las tres capas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo) (Thomson y col., 1998). En los últimos años, los protocolos de diferenciación basados en la obtención de un precursor dopaminérgico intermedio *in vitro* han

permitido la implantación exitosa de neuronas derivadas de hESCs en modelos animales de EP, con excelentes resultados (Kirkeby y col., 2012; Kriks y col., 2011). De hecho, se ha demostrado que estos precursores maduran para dar lugar a neuronas dopaminérgicas capaces de liberar dopamina *in vivo*, sin detectarse la contaminación de otros tipos celulares. En ratas lesionadas con 6-OHDA, cantidades similares de neuronas dopaminérgicas derivadas de hESCs y de hfVM indujeron mejorías funcionales equiparables, lo que sugiere que ambas poblaciones celulares son terapéuticamente equivalentes (Grealish y col., 2014). Estos datos han favorecido que se estén dando los primeros pasos en ensayos clínicos con pacientes de EP (Kirkeby y col., 2017; Wang y col., 2018, [NCT03119636](#)). En los últimos meses, se ha aprobado un ensayo clínico de fase I para probar la seguridad y eficacia de MSK-DA01, un producto celular derivado de hESCs, en pacientes de EP (Piao y col., 2021, [NCT04802733](#)). Sin embargo, los resultados obtenidos en modelos animales deben tomarse con prudencia. Las características inherentes al modelo preclínico – menor dosis celular, tiempos de evaluación relativamente cortos, ausencia de protocolo de inmunosupresión en la mayoría de los modelos – y las propias de la fuente celular de partida – riesgo potencial de formación de tumores – condicionan sustancialmente su salto a la clínica (Ambasudhan y col., 2014; Petit y col., 2014).

### **1.2.3. Trasplante de células dopaminérgicas derivadas de hiPSCs**

En 2006, el desarrollo de la reprogramación celular por Shinya Yamanaka sacudió los cimientos de la terapia celular. Tan solo un año más tarde, era posible reprogramar células somáticas humanas adultas a un estado pluripotente gracias a 4 factores de transcripción, hoy mundialmente conocidos: *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* y *c-Myc* (Park y col., 2008; Takahashi y Yamanaka, 2006). A partir de entonces, se ha planteado su uso como posible fuente celular para diversas enfermedades. Como fuente de neuronas dopaminérgicas para el trasplante en pacientes de EP, las hiPSCs presentan varias ventajas. Por un lado, se evitan controversias ético-legales derivadas del uso de fuentes celulares de origen embrionario/fetal, ya que se trata de células somáticas adultas

que se pueden extraer del mismo paciente que recibirá el trasplante. Por otro lado, el aislamiento de hiPSCs mediante marcadores de superficie permite obtener una población pura, evitando la introducción de células con capacidad tumorigénica (Nolbrant y col., 2017).

Una de las principales limitaciones para el uso clínico de las hiPSCs es la necesidad de utilizar vectores lentivirales o retrovirales para la reprogramación que podrían causar la integración del genoma viral en el genoma hospedador, incrementando el riesgo de mutagénesis tras el trasplante (Okita y col., 2007). Por ello, han surgido nuevas metodologías de reprogramación celular que no dependen de vectores integrativos. El uso de vectores adenoasociados, episómicos y plasmídicos garantiza la expresión episomal de los factores de reprogramación, pero requiere varias rondas de transfección/transducción y la eficacia de la reprogramación es inferior a la obtenida con vectores integrativos (Haridhasapavalan y col., 2019). Por otra parte, la utilización de extractos proteicos derivados de ESCs como vectores de la reprogramación ha permitido obtener hiPSCs capaces de diferenciarse al fenotipo dopaminérgico (Kwon y col., 2014). Además, el uso de inhibidores de histona deacetilasas y de metiltransferasas de ADN se perfila como un novedoso método de reprogramación celular, solo o como potenciador en otras estrategias de obtención de hiPSCs (Hou y col., 2013; Ma y col., 2017b). En los últimos años, también destaca el uso de moléculas de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) sintético especialmente diseñadas para presentar una inmunogenicidad reducida y disminuir el número de transfecciones necesario para inducir pluripotencia (Warren y Lin, 2019).

En la actualidad existe un ensayo clínico en marcha en Japón, en fase I/II, centrado en la realización de trasplantes de hiPSCs alogénicas inmunocompatibles en pacientes de EP (Takahashi, 2020). En él se incluirán pacientes de entre 50 y 69 años con al menos 5 años de evolución de la enfermedad, y el primero de los 7 trasplantes previstos ya se ha realizado (Cyranoski, 2018). Recientemente, también se han conocido los resultados obtenidos tras el implante bilateral de hiPSCs autólogas en un paciente de EP, que muestran que diversos parámetros clínicos se han estabilizado o mejorado en los 18-24 meses siguientes al trasplante (Schweitzer y col., 2020). Sin embargo, esta terapia

continúa teniendo importantes limitaciones. Una de ellas es el incremento en la expresión del antígeno leucocitario humano que acompaña a la diferenciación, no solo de las hiPSCs, sino también de hESCs y hfVM. Esta dificultad podría solventarse con bancos de hiPSCs, que ya se han inaugurado en China, Japón, EEUU y Europa y en los que se almacenan células de súper donantes con grupo sanguíneo 0 y homocigotos para los loci del antígeno leucocitario humano. Dada la escasa frecuencia de estos súper donantes en la población, se exploran otras alternativas como la edición génica de las hiPSCs para conseguir que evadan el reconocimiento inmune del hospedador (Deuse y col., 2019; Wilmut y col., 2015).

La reprogramación directa se erige como una alternativa atractiva que evitaría el estado pluripotente, de manera que los implantes no contendrían células con capacidad proliferativa y se reduciría significativamente el riesgo de tumorigénesis. En un estudio pionero, Rivetti di Val Cervo y colaboradores han reprogramado *in vivo* astrocitos a neuronas dopaminérgicas mediante un cóctel de 3 factores de transcripción (*NeuroD1*, *Ascl1* y *Lmx1a*) y el microARN miR218, en un modelo animal de EP (Rivetti di Val Cervo y col., 2017). Aunque esta estrategia terapéutica eliminaría la necesidad de inmunosupresión, también implicaría la pérdida local de astrocitos, cuyo papel como soporte neurotrófico y metabólico de la función neuronal y sináptica es esencial para la homeostasis cerebral y para el mantenimiento de la BHE (Osborn y col., 2020). Sin embargo, el número de células obtenidas mediante esta técnica aún constituye una limitación importante, por lo que se requieren investigaciones más detalladas sobre su seguridad y eficacia antes de su aplicación clínica (He y col., 2019; López-León y col., 2017; Nolbrant y col., 2020).

#### **1.2.4. Trasplante de fuentes celulares alternativas**

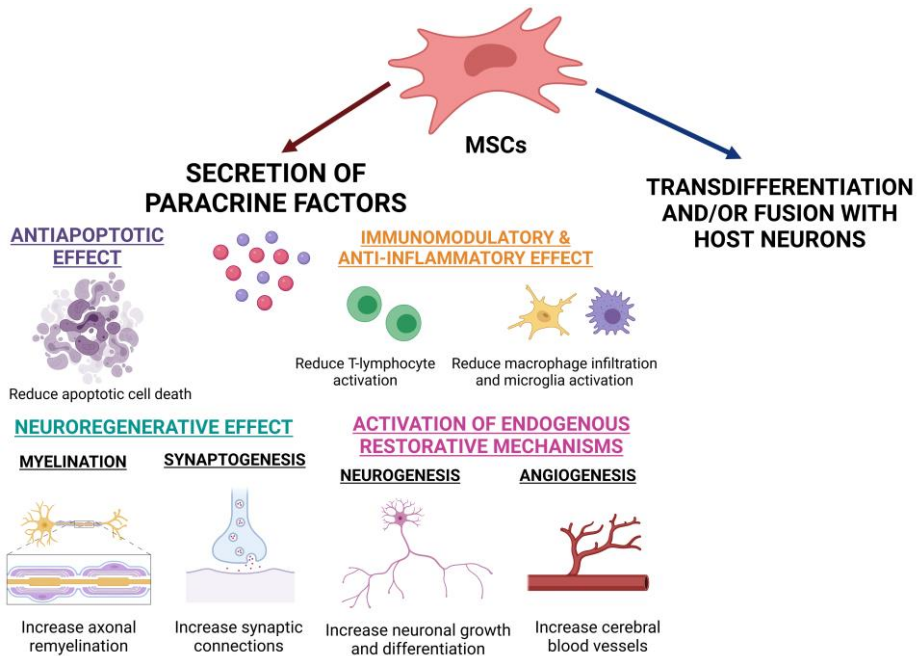
La búsqueda de fuentes celulares de reemplazo dopaminérgico que eviten la utilización de tejido fetal/embrionario se remonta a los años 80, cuando se ensayaron implantes de médula adrenal en pacientes de EP, con un éxito limitado (Backlund y col., 1985; Madrazo y col., 1987).

Las células del cuerpo carotídeo, procedentes de la cresta neural, secretan dopamina e inducen neuroprotección dependiente del factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF, del inglés *glial derived-neurotrophic factor*) en modelos animales de EP (Toledo-Aral y col., 2003). Estos resultados motivaron la realización de ensayos clínicos de fase II en los que la implantación autóloga de cuerpo carotídeo en el estriado de pacientes con EP avanzada mostró cierta eficacia (Mínguez-Castellanos y col., 2007).

Por otra parte, también se ha ensayado el trasplante de células estromales mesenquimales (MSCs, del inglés *mesenchymal stromal cells*), que pueden obtenerse con facilidad de una gran variedad de tejidos como la médula ósea, el tejido adiposo, la pulpa dental o la gelatina de Wharton del cordón umbilical. La relevancia terapéutica de las MSCs radica en sus propiedades inmunomoduladoras, antiapoptóticas y neurotróficas (Glavaski-Joksimovic y Bohn, 2013). Además, la transdiferenciación de MSCs al fenotipo dopaminérgico puede alcanzarse mediante protocolos basados en la inducción química, la transfección génica, el cocultivo con células gliales, neuronales o precursores neurales o mediante el uso de medio condicionado (Shen y col., 2016) (Figura 2). Estos precursores neuronales derivados de MSCs se han implantado con éxito en modelos animales de EP (Shetty y col., 2013), donde se diferencian y expresan marcadores de neuronas dopaminérgicas como TH durante al menos 4 meses, sin evidencias de tumorigénesis o de rechazo inmune (Venkatesh y Sen, 2017). Sin embargo, hoy en día se acepta que la neuroprotección, la neurogénesis y la revascularización que induce el implante de MSCs son las principales responsables de su potencial terapéutico (Chen y col., 2020) (Figura 2). Así lo avala la capacidad de las MSCs para migrar hacia áreas afectadas por la degeneración y la inflamación y secretar localmente factores neurotróficos y citoquinas que catalizan la regeneración del tejido (Lo Furno y col., 2018). Los resultados obtenidos en modelos preclínicos han impulsado ensayos clínicos en fase I/II, en los que se está investigando la seguridad y eficacia de la administración intranasal, intravenosa o combinada de MSCs autólogas ([NCT04146519](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT04146519)), o MSCs alogénicas derivadas de la médula ósea

([NCT02611167](#)) y de cordón umbilical ([NCT03550183](#)) en pacientes de EP (Chen y col., 2020).

En resumen, las terapias basadas en el reemplazo dopaminérgico, aunque prometedoras, presentan importantes limitaciones que hacen necesaria la búsqueda de estrategias terapéuticas alternativas para el tratamiento de la EP, como las basadas en la movilización de células madre endógenas.



**Figura 2. Posibles mecanismos implicados en los efectos terapéuticos de las MSCs (del inglés, *mesenchymal stromal cells*) en la enfermedad de Parkinson (EP).** Las MSCs pueden proteger y/o estimular la regeneración de la población dopaminérgica en el hospedador mediante la secreción de diferentes factores de crecimiento, citoquinas y proteínas de la matriz extracelular, capaces de reducir la muerte neuronal (efectos antiapoptóticos) y de crear un ambiente favorable para la regeneración neural. La acción paracrina de las MSCs también promueve procesos de reparación endógena, como la neurogénesis y la angiogénesis. Las propiedades inmunomoduladoras y antiinflamatorias de las MSCs también contribuyen a rescatar y proteger las neuronas dopaminérgicas. En comparación con sus efectos paracrinos, la capacidad de las MSCs para transdiferenciarse a neuronas y/o fusionarse con las neuronas del hospedador se relaciona en menor medida con sus efectos beneficiosos para la EP. Adaptado de *Castillo-Meléndez y col., 2013* y de *Glavaski-Joksimovic y col., 2013*.

### 1.3. NEUROGÉNESIS ADULTA EN LA ZONA VENTRICULAR-SUBVENTRICULAR

La mayoría de los órganos adultos retiene células madre somáticas capaces de regenerar el tejido en respuesta a estímulos fisiológicos o patológicos. Durante décadas, el dogma establecido por Santiago Ramón y Cajal señaló el cerebro como una excepción (Ramón y Cajal, 1913). Sin embargo, en 1963, el neurobiólogo estadounidense Joseph Altman demostró que el cerebro adulto de mamíferos no es un órgano quiescente, sino que incorpora nuevas neuronas al hipocampo, al córtex y al BO (Altman y Das, 1965). Hoy en día, se acepta la existencia de dos nichos neurogénicos bien establecidos en el cerebro mamífero posnatal: la zona subgranular (SGZ, del inglés *subgranular zone*) del giro dentado del hipocampo y la zona ventricular-subventricular (V-SVZ, del inglés *ventricular-subventricular zone*) de los ventrículos laterales (Ming y Song, 2011). En esta tesis, nos centraremos en el estudio de los factores implicados en el control de la neurogénesis en la V-SVZ, por lo que, en los siguientes apartados, ahondaremos en su conocimiento.

#### 1.3.1. Citoarquitectura del nicho neurogénico de la V-SVZ

La V-SVZ es el nicho neurogénico más amplio del cerebro mamífero adulto y posee un patrón estructural único con una heterogeneidad celular característica (Figura 3). Su localización adyacente al estriado la convierte en un objetivo terapéutico atractivo para terapias basadas en la movilización de progenitores endógenos, especialmente en la EP donde este núcleo se ve afectado (ver Introducción, apartado [1.1.2](#)). En este nicho se encuentran distintas poblaciones celulares con una citoarquitectura característica (Doetsch y col., 1997; García-Verdugo y col., 1998), que describimos a continuación.

##### 1.3.1.1. Células B1

Las células B1 expresan marcadores gliales como la proteína ácida fibrilar glial (GFAP, del inglés *glial fibrillary acidic protein*), el transportador de glutamato aspartato (GLAST, del inglés

*glutamate/aspartate transporter*) y la proteína cerebral de unión a lípidos (BLBP, del inglés *brain-specific lipid-binding protein*). Ellas representan las células madre neurales (NSCs, del inglés *neural stem cells*) de la zona (Doetsch y col., 1999) y, como tales, poseen capacidad para autorrenovarse y diferenciarse a todos los tipos celulares del linaje neural (neuronas, astrocitos y oligodendrocitos) (Chaker y col., 2016). Apicalmente, presentan un pequeño cilio primario, heredado de la glía radial embrionaria, en contacto con el líquido cefalorraquídeo (LCR); y basalmente, un proceso más largo en contacto con el sistema vascular. Las células endoteliales (células E) tapizan la pared ventricular y en su superficie apical presentan multitud de cilios en contacto con el LCR (Figura 3). El movimiento ciliar coordinado contribuye al mantenimiento del flujo de LCR, crucial para la exposición de las células B1 a señales tróficas y metabólicas y para la eliminación de toxinas y productos de desecho del cerebro (Ortiz-Álvarez y col., 2019). Por otra parte, el pequeño cilio primario de las células B1, junto con los procesos apicales de las células E que lo rodean, dan lugar a una estructura en forma de roseta que se repite formando un patrón denominado molinillo germinal (*'pinwheel'*) (Mirzadeh y col., 2008). En la V-SVZ adulta cohabitan dos poblaciones de células B1 que se distinguen por su estado de activación. Las NSCs entran en quiescencia (qNSCs, del inglés *quiescent NSCs*) durante la embriogénesis y permanecen en estado latente hasta que se activan (aNSCs, del inglés *activated NSCs*) en el adulto (Chaker y col., 2016). Mediante análisis transcriptómicos de célula única se han detectado, sin embargo, estados intermedios de activación de las NSCs *in vivo*, con un perfil molecular y una duración del ciclo celular característicos (Dulken y col., 2017). Las qNSCs presentan ADN muy empaquetado y un metabolismo dependiente de la glucólisis. En ellas, predomina la expresión de proteínas implicadas en señalización celular y en adhesiones célula-célula, lo que sugiere que el estado quiescente requiere una regulación molecular estricta (Knobloch y Jessberger, 2017). Las aNSCs, por su parte, expresan genes relacionados con el control del ciclo celular y con la reparación del ADN, producen ATP mediante fosforilación oxidativa y son positivas para el receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR, del inglés *epidermal growth factor receptor*) y para nestina

(Llorens-Bobadilla y col., 2015). Las qNSCs dependen mayoritariamente del compartimento lisosomal para mantener la proteostasis mientras que en las aNSCs predomina la actividad proteasomal (Leeman y col., 2018). Como células madre activas, las aNSCs se dividen lentamente para generar células progenitoras neurales (NPCs, del inglés *neural progenitor cells*) con capacidad transitoria de amplificación, también conocidas como células C (ver Introducción, apartado [1.3.1.3](#)).

#### 1.3.1.2. Células B2

Las células B2 son astrocitos propios de la V-SVZ con capacidad proliferativa que constituyen la frontera glial entre las cadenas migratorias de neuroblastos y el estriado adyacente (Doetsch y col., 1997). A diferencia de las células B1, a las que se hallan acopladas mediante uniones de tipo Gap, las células B2 establecen contacto con los vasos sanguíneos, pero no con el LCR (Lacar y col., 2011) (Figura 3). Esta población se vuelve más numerosa a lo largo de la vida, lo que sugiere que una proporción de células B1 da lugar a NSCs sin proceso apical ni propiedades neurogénicas (Silva-Vargas y col., 2018).

#### 1.3.1.3. Células C

Las células C o NPCs expresan los factores de transcripción *Ascl1* (también conocido como *Mash1*) y *Dlx2*, además de EGFR. Se disponen en grupos a lo largo de las cadenas migratorias de neuronas inmaduras o células A (ver Introducción, apartado [1.3.1.4](#)) (Figura 3) que se dirigen hacia el BO. Estas NPCs presentan una tasa de proliferación hasta 10 veces superior a la de las células B, y se dividen simétricamente 3-4 veces para dar lugar a las células A (Ponti y col., 2013).

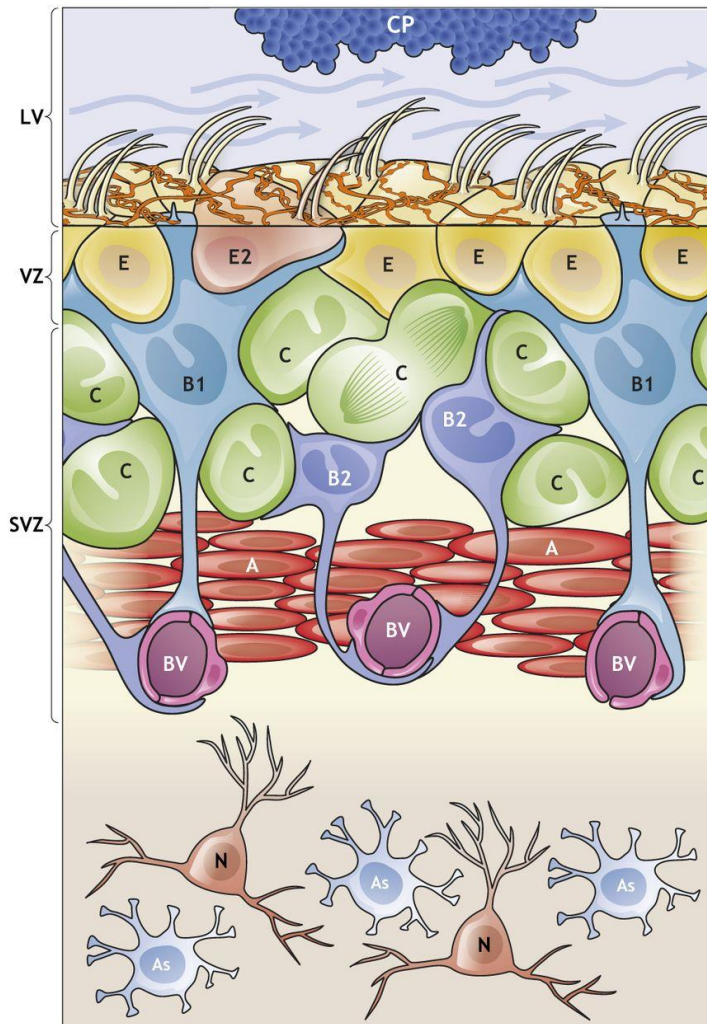
#### 1.3.1.4. Células A

Las células A son neuroblastos que se desplazan apoyados entre sí formando, como hemos mencionado en el apartado 0, cadenas migratorias hacia el BO que no necesitan guías axonales para llegar a su destino (Conover y Todd, 2017; Doetsch y Álvarez-Buylla, 1996) (Figura 3). En roedores, esta migración ocurre en dos fases: en primer

lugar, los neuroblastos se desplazan tangencialmente desde el prosencéfalo anterior, vía la corriente migratoria rostral (RMS, del inglés *rostral migratory stream*) y en la segunda fase migran radialmente, abandonando la RMS para integrarse sinápticamente en el BO. Los neuroblastos expresan marcadores neuronales tempranos como *Dlx2* o la molécula de adhesión neural a células polisiliadas (PSA-NCAM), y doblecortina (DCX), una proteína asociada a microtúbulos (Francis y col., 1999). La mayoría de estos neuroblastos se dividirá 1-2 veces durante su trayecto al BO (Ponti y col., 2013), donde madurará para dar lugar a interneuronas GABAérgicas de la capa granular, mientras que una pequeña proporción se diferenciará a neuronas periglomerulares que coexpresan GABA y TH. En el ratón adulto, entre 10.000 y 80.000 interneuronas jóvenes se añaden diariamente al BO, donde intervienen en tareas complejas como la memoria olfativa a largo plazo o en comportamientos innatos como la percepción de feromonas (Bacigaluppi y col., 2020; Lois y Álvarez-Buylla, 1994).

A largo plazo, la neurogénesis adulta depende del equilibrio entre quiescencia, autorrenovación y diferenciación de las NSCs. En gran medida, esto se consigue mediante un estricto control de los modos de división celular. Las divisiones simétricas de las NSCs pueden dar lugar a dos células madre (autorrenovación) o a dos células C (consumo de las células madre/diferenciación), garantizando no solo el mantenimiento del *pool* de células madre, sino también una regulación independiente de los procesos de autorrenovación y de diferenciación. Las divisiones asimétricas dan lugar a una célula B1 y a una célula C (Calzolari y col., 2015). En contra de lo comúnmente aceptado en el campo, Obernier y colaboradores han demostrado que, en condiciones fisiológicas, el 80% de las NSCs de la V-SVZ sufren divisiones simétricas que las consumen para generar dos células C, lo que induce un descenso en la población de NSCs a medida que el animal envejece. El 20% restante se divide simétricamente para generar dos células madre y autorrenovarse. De esta manera, la neurogénesis se mantiene durante toda la vida adulta, aunque se observa una reducción en la capacidad de proliferación y generación de progenitores con la edad (Obernier y col., 2018). Curiosamente, estudios recientes sugieren que

la población remanente de NSCs en animales envejecidos conserva su capacidad de proliferación y diferenciación bajo los estímulos adecuados (Kalamakis y col., 2019). Otra cuestión que cabe plantearse es si, en respuesta a alteraciones como el envejecimiento o la neurodegeneración, se produce un cambio en el patrón de división canónico y entran en juego modos de división alternativos de las poblaciones de qNSCs (Silva-Vargas y col., 2018).



**Figura 3. Citoarquitectura del nicho neurogénico de la zona ventricular-subventricular (V-SVZ, del inglés *ventricular-subventricular zone*).** Las células B1 (en azul claro) poseen características astrocíticas y son las células madre neurales (NSCs, del inglés *neural stem cells*) en la V-SVZ. Las NSCs dan lugar a células B2 (en azul oscuro), que comparten muchas de las características astrogliales de las células B1, como el contacto con los vasos sanguíneos (BV, del inglés *blood vessels*), aunque no establecen contacto con el ventrículo lateral (LV, del inglés *lateral ventricle*). Las células B1 también generan progenitores neurales con capacidad transitoria de amplificación (células C, en verde) que dan lugar a neuroblastos (células A, en rojo). Las células B1 están en contacto con el líquido cefalorraquídeo (LCR; flechas azules) mediante un pequeño contacto apical que alberga un cilio primario. El plexo coroideo (CP, del inglés *choroid plexus*; en azul) secreta factores al LCR que son esenciales para la regulación de las células B1. Los extremos apicales de las células B1 se encuentran rodeados por grandes superficies de células multiciliadas y biciliadas endimarias (células E/E2) de la zona ventricular (VZ, del inglés *ventricular zone*). Bajo la superficie apical, las células B1 contactan con las células C, las células A, los vasos sanguíneos y las células B2. Por debajo de la V-SVZ, en el estriado, se localizan neuronas maduras (N, en marrón) y astrocitos (As, en azul pálido). Permiso concedido por CCC MarketPlace, en nombre de *The Company of Biologists Ltd*; Obernier y Álvarez-Buylla, 2019.

### **1.3.2. Regulación del nicho neurogénico por factores intrínsecos y extrínsecos**

La neurogénesis adulta es un proceso multietapa que implica no solo la proliferación y diferenciación de las NSCs, sino también su migración e integración funcional en la circuitería neural. Para ello, las NSCs de la V-SVZ adulta integran múltiples señales extrínsecas e intrínsecas procedentes de un cerebro adulto plenamente formado y altamente interconectado.

#### **1.3.2.1. Factores extrínsecos**

##### *1.3.2.1.1. Señales procedentes de células vecinas*

Debido a la posición central que ocupan en la citoarquitectura de la V-SVZ, las células B1 contactan estrechamente con todas las poblaciones del nicho (Figura 3). Gracias a la comunicación célula-célula, las células B1 sincronizan su estado de activación con otras células B1, favoreciendo la activación de una NSC concreta tras la muerte o diferenciación de una NSC vecina. Apicalmente, como hemos mencionado previamente, las células B1 se

relacionan con las células E que liberan noggina, un antagonista de la proteína morfogenética del hueso-4 (BMP4, del inglés *bone morphogenetic protein-4*), que bloquea la diferenciación glial de las NSCs a favor de la neurogénesis (Lim y col., 2000; Mercier y Douet, 2014).

La microglía de la V-SVZ, más densa y proliferativa en el nicho que en otras regiones cerebrales, favorece el mantenimiento de las NSCs y facilita la migración de los neuroblastos (Mosher y col., 2012; Ribeiro Xavier y col., 2015). La activación microglial que acompaña a la neurodegeneración induce la liberación de citoquinas, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ , del inglés *tumor necrosis factor alpha*) o IL-6, que inhiben la neurogénesis en la V-SVZ. A su vez, la secreción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, del inglés *vascular endothelial growth factor*) y de vesículas extracelulares desde las NSCs modula la activación microglial (Morton y col., 2018; Mosher y col., 2012). Esta comunicación bidireccional contribuye a mantener la homeostasis del nicho neurogénico durante la edad adulta (Matarredona y col., 2018).

El sistema vascular proporciona sostén para la migración de los neuroblastos y regula la proliferación y activación de las NSCs liberando el factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF, del inglés *pigment epithelium-derived factor*) y VEGF para mantener su capacidad de autorrenovación, y betacelulina, que favorece la proliferación de las células B1 y C (Andreu-Agulló y col., 2009; Gómez-Gavira y col., 2012). Además, las células endoteliales secretan factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, del inglés *brain-derived neurotrophic factor*) y factor derivado de células estromales 1 (SDF-1, del inglés *stromal cell-derived factor-1*), que promueven la movilización de células C y A (Kokovay y col., 2010; Snappyan y col., 2009). El contacto célula-célula entre las células B1 y las células endoteliales frena el ciclo celular de las NSCs en fase G0-G1, mediante la activación de efrinas B2 (Ottone y col., 2014).

#### 1.3.2.1.2. Factores presentes en el LCR

Las células B1 contactan directamente con el LCR a través de un proceso apical recubierto de molécula de adhesión a células

vasculares 1 (VCAM-1, del inglés *vascular cell adhesion molecule-1*) que las ancla al centro del molinillo germinal (Figura 3). La señalización vía VCAM-1 regula la producción de EOR para mantener la quiescencia de las NSCs. Además, la expresión de VCAM-1 responde a señales presentes en el LCR, de manera que el cilio primario de las NSCs actúa como un sensor ambiental de los cambios en el microambiente del nicho (Kokovay y col., 2012). De este modo, factores tróficos presentes en el LCR como el factor inhibidor de la leucemia (LIF, del inglés *leukemia inhibitory factor*) favorecen la autorrenovación de las NSCs a expensas de la neurogénesis (Bauer y Patterson, 2006). Otras señales extrínsecas presentes en el LCR incluyen Sonic hedgehog (SHH), BMPs, el factor insulínico tipo 2 (IGF-2, del inglés *insulin growth factor-2*) o el ácido retinoico (Lehtinen y Walsh, 2011). En concreto, la proteína SHH actúa como mitógeno para diversos progenitores neurales (Ruiz i Altaba y col., 2003) y contribuye a la heterogeneidad regional de las células B1.

#### 1.3.2.1.3. Neurotransmisores

Numerosas evidencias avalan el papel de los neurotransmisores en la regulación de la neurogénesis, lo que sugiere que la V-SVZ se halla totalmente integrada en los circuitos neurales locales (Berg y col., 2013). Tanto los neurotransmisores GABA y glutamato, que se liberan localmente desde otras poblaciones del nicho, como los neuromoduladores dopamina y serotonina, cuyas aferencias a la V-SVZ proceden de localizaciones más distantes en el cerebro adulto, modulan el comportamiento de las NSCs.

*GABA*. El origen de las aferencias GABAérgicas que reciben las NSCs es intrínseco a la V-SVZ, ya que son las células A quienes liberan GABA induciendo la quiescencia de las NSCs y autorregulando la producción de neuroblastos paracrinamente (Fernando y col., 2011). El GABA no solo regula negativamente las primeras etapas de la neurogénesis, sino que también disminuye la capacidad migratoria de las células A (Bolteus y Bordey, 2004; Pathania y col., 2010). De esta forma, el GABA contribuye a mantener el equilibrio entre amplificación y movilización de NPCs en la V-SVZ.

*Glutamato.* Los efectos del GABA sobre las poblaciones de la V-SVZ son en parte contrarrestados por el glutamato sintetizado y liberado por las células tipo astrocito GLAST<sup>+</sup> del nicho (Platel y col., 2007) y por las neuronas del estriado adyacente. Los neuroblastos de la V-SVZ presentan un mosaico de receptores glutamatérgicos AMPA, NMDA y mGluR5. Recientemente, se ha descrito que la expresión de receptores NMDA se incrementa rostralmente en la V-SVZ y la RMS, lo que sugiere la implicación de estos receptores en la maduración de las nuevas neuronas (Platel y col., 2010). Sin embargo, la estimulación de receptores AMPA favorece la proliferación de las células A (Song y col., 2017).

*Serotonina.* En los núcleos dorsales del rafe se originan aferencias serotoninérgicas que alcanzan la V-SVZ como axones densamente empaquetados. La serotonina, considerada como un regulador positivo de la neurogénesis adulta, activa receptores específicos en las NSCs y en las células E de la V-SVZ, promoviendo su proliferación (Tong y col., 2014). Estas proyecciones serotoninérgicas, que también contactan con el giro dentado de la SGZ, pueden verse afectadas por la EP (ver Introducción, apartado [1.1.2](#)). Por tanto, es posible que su degeneración y el consiguiente deterioro de la neurogénesis hipocampal contribuyan a la aparición de los síntomas no motores de la EP, como ansiedad y depresión (Kohl y col., 2016).

*Dopamina.* Aunque diversos grupos han demostrado de forma fehaciente que la SNpc envía proyecciones a la V-SVZ de ratón (Baker y col., 2004), primates (Freundlieb y col., 2006) y seres humanos (Höglinger y col., 2004), persiste la controversia acerca del papel que la dopamina ejerce sobre el comportamiento de las poblaciones de la V-SVZ y de los mecanismos que median su efecto sobre la neurogénesis en este nicho. La profusa inervación dopaminérgica que recibe la V-SVZ activa los receptores dopaminérgicos de tipo D1 (receptores D1 y D5) y de tipo D2 (receptores D2, D3 y D4), presentes en distintas poblaciones de progenitores neurales. En la V-SVZ adulta, predomina la expresión de receptores D3 que se localizan principalmente en la membrana de las células C (Höglinger y col., 2004). En líneas generales, se ha demostrado que la dopamina es un regulador positivo de la neurogénesis y que la ablación de neuronas dopaminérgicas de la

SNpc reduce la neurogénesis en la V-SVZ y el BO (Baker y col., 2004; O’Keeffe y col., 2009a; Winner y col., 2009). Sin embargo, también se han obtenido resultados que contradicen esta hipótesis (Baker y col., 2005). En pacientes de EP, se observa una importante disminución de la proliferación celular en la V-SVZ y un número reducido de células C con respecto a individuos sanos de la misma edad (Höglinger y col., 2004; O’Keeffe y col., 2009b). La depleción dopaminérgica no solo altera la capacidad proliferativa de la V-SVZ, sino que también modifica la adquisición del fenotipo neural. De hecho, la administración intraestriatal de 6-OHDA en modelos animales de EP incrementa la neurogénesis dopaminérgica en la capa glomerular del BO, al aumentar la expresión de *Pax-6* en la V-SVZ dorsal (Winner y col., 2006).

Estos resultados contradictorios hacen necesarios nuevos estudios que aporten información sobre el papel de la dopamina en la neurogénesis adulta.

#### *1.3.2.1.4. Envejecimiento*

Durante el envejecimiento la V-SVZ experimenta cambios estructurales importantes que conllevan la pérdida de los molinillos germinales. La estenosis de los ventrículos laterales compromete la integridad del epitelio de células E y de la V-SVZ ventral subyacente, lo que restringe la mayoría de la neurogénesis a la V-SVZ dorsolateral (Luo y col., 2006). La disminución de la capacidad proliferativa y las alteraciones estructurales implican la pérdida del 75% de los neuroblastos que alcanzan el BO, posiblemente debido a una mayor proporción de qNSCs (Enwere y col., 2004; Kalamakis y col., 2019). Asociado al envejecimiento, las células del nicho adquieren un fenotipo senescente como consecuencia del estrés causado por daños en el ADN, la disfunción mitocondrial, la expresión disminuida de telomerasa y la presencia de proteínas mal plegadas (Herranz y Gil, 2018). Aunque el número de NSCs desciende notablemente con la edad en la V-SVZ, el porcentaje de células que se dividen activamente se incrementa con el envejecimiento, lo que sugiere que existen mecanismos compensatorios capaces de mantener la actividad del nicho, incluso a edades muy avanzadas (Shook y col., 2012). De hecho, diversos estudios sostienen que las qNSCs envejecidas retienen un

potencial proliferativo tal que pueden diferenciarse a neuronas funcionales, indistinguibles en sus propiedades electrofisiológicas de las derivadas de qNSCs jóvenes (Ahlenius y col., 2009; Kalamakis y col., 2019).

Con la edad, la disponibilidad de los factores tróficos que sustentan la proliferación y diferenciación de NSCs durante la juventud se reduce en el LCR y el torrente sanguíneo. La caída en los niveles de VEGF y de factor de crecimiento de fibroblastos de tipo 2 (FGF-2, del inglés *fibroblast growth factor-2*) se relaciona con una disminución de la neurogénesis en animales envejecidos. La composición del secretoma del plexo coroideo también sufre modificaciones: se incrementa la liberación de señales proinflamatorias, como el interferón de tipo I, y se reduce la secreción de BMP5 e IGF-1. Las remodelaciones en los vasos, que reducen el aporte sanguíneo a la V-SVZ, también contribuyen al deterioro de la neurogénesis con el envejecimiento (DeCarolis y col., 2015; Katsimpardi y col., 2014; Luo y col., 2006; Silva-Vargas y col., 2016). Por otro lado, la microglía residente de la V-SVZ se activa e incrementa la producción de las citoquinas proinflamatorias IL-6, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  (Solano Fonseca y col., 2016).

En los últimos años, se han ensayado diversas estrategias para revertir el envejecimiento de las NSCs, entre las que destacamos la restricción calórica (Apple y col., 2019) y otras manipulaciones sistémicas como la parabiosis heterocrónica, la atenuación del ambiente inflamatorio (Baruch y col., 2014; L'Episcopo y col., 2013) o el uso de senolíticos (Cutler y Kokovay, 2020). Dado que el envejecimiento es el principal factor de riesgo para el desarrollo de la EP, cobra especial relevancia el estudio de los mecanismos que podrían estar interviniendo en el descenso de la neurogénesis con la edad.

#### 1.3.2.2. Factores intrínsecos

Múltiples factores intrínsecos (disponibilidad de receptores, factores de transcripción, mecanismos epigenéticos) establecen el modo en que se integran los estímulos extrínsecos mencionados en el apartado anterior para inducir una respuesta celular determinada.

#### 1.3.2.2.1. Factores de transcripción

Los factores de transcripción regulan la autorrenovación de las NSCs, el fenotipo neural que adoptan y la generación de distintos subtipos de interneuronas en el BO. El factor de transcripción *Sox2* se expresa en la mayoría de las poblaciones celulares de la V-SVZ y de la SGZ y su delección conduce al agotamiento de las NSCs (Bond y col., 2015). *Sox2* interacciona con *TIX*, un receptor nuclear huérfano que se expresa abundantemente en retina y cerebro durante el desarrollo, para mantener la población de células B1 (Shimozaki y col., 2012). Por otra parte, la traslocación al núcleo del dominio intracelular de receptores NOTCH inhibe la diferenciación neuronal y mantiene la quiescencia de las NSCs, posiblemente a través de *Notch2* (Engler y col., 2018; Gaiano y Fishell, 2002).

La determinación del linaje celular en la V-SVZ adulta está ligada a una familia de factores de transcripción proneurales, entre los que se incluyen *Ascl1*, neurogenina-2 (*Ngn2*), *NeuroD1* y *NeuroD2*. Las células C y algunas células B1 expresan *Ascl1*, que se requiere tanto para la diferenciación de neuronas como de oligodendrocitos. Un subconjunto de estas células C coexpresa *Ngn2*, que regula negativamente la expresión de *Ascl1* e induce la proliferación de interneuronas calretinina positivas en el BO (Parras y col., 2004; Roybon y col., 2009). La expresión de *Pax-6* en una subpoblación de células C y A favorece la generación de interneuronas periglomerulares dopaminérgicas en el BO (Hack y col., 2005). Los factores de transcripción también contribuyen a mantener la heterogeneidad regional en la V-SVZ. La expresión de *Nr2f1* en la V-SVZ dorsal es inversamente proporcional a la expresión de factores restringidos ventralmente como *Nkx2-1* o *Nkx6-2* (Delgado y Lim, 2015).

#### 1.3.2.2.2. Mecanismos epigenéticos

La estructura de la cromatina se modifica para activar o inactivar genes relacionados con la adquisición de un linaje neural concreto. Entre estas modificaciones, destacan la remodelación no covalente mediante complejos BAF, la deacetilación de histonas y la metilación del ADN. En concreto, se ha demostrado que distintas clases de deacetilasas de histonas podrían estar implicadas en la amplificación

transitoria de NPCs (Foti y col., 2013; Jaworska y col., 2015) y en la regulación del ciclo celular de las células B1 y C (Sun y col., 2007). Por otra parte, la expresión predominante de la metiltransferasa DNMT3A en la V-SVZ facilita la transcripción de genes neurogénicos como *Dlx2* (Wu y col., 2010). Además, la presencia de ARNs no codificantes como ARNs largos no codificantes y microARNs en la V-SVZ se relaciona con la regulación postranscripcional de la adquisición de fenotipo neural (Jobe y col., 2012; Ramos y col., 2013, 2015).

La integración espacial y temporal de señales intrínsecas y extrínsecas para el correcto funcionamiento del nicho neurogénico sigue sin comprenderse en profundidad. Tras su nacimiento en la V-SVZ, las nuevas neuronas tardan entre 20 y 28 días en alcanzar el BO, donde se diferencian (Lemasson y col., 2005). Por tanto, cualquier alteración en la regulación a nivel de V-SVZ es de carácter anticipatorio y predispone el nicho a aumentar o disminuir la neurogénesis antes de que ocurran eventos que requieran un ajuste en la discriminación olfatoria del BO (Obernier y Álvarez-Buylla, 2019). En la EP, el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial y los fallos en la proteostasis conviven con la depleción dopaminérgica y el envejecimiento, el principal factor de riesgo asociado a la enfermedad, factores que, como hemos mencionado, regulan negativamente la neurogénesis.

### **1.3.3. Potencial terapéutico de las NSCs. Implicaciones para la EP**

El descubrimiento de nichos neurogénicos en el cerebro adulto de mamíferos abrió nuevos horizontes en el campo de la regeneración cerebral. En respuesta a un daño en el parénquima, las NSCs activan un doble mecanismo terapéutico: por un lado, limitan el alcance de las reacciones inflamatorias subsiguientes y por otro, promueven la reparación del tejido o, al menos, la compartimentalización del área afectada mediante la formación de una cicatriz glial (Martino y col., 2011). En el caso de la EP, la localización de la V-SVZ con respecto al estriado justifica la búsqueda de estrategias que promuevan la proliferación de las NSCs e idealmente, su diferenciación a un fenotipo dopaminérgico maduro capaz de restaurar los niveles de dopamina en el estriado adyacente. Estudios recientes han demostrado que la V-SVZ

de pacientes de EP no solo contiene NSCs capaces de proliferar y de diferenciarse a neuronas y glía *in vitro*, sino que el análisis de su transcriptoma y proteoma también revela la presencia de un subconjunto de qNSCs listas para ser activadas (Donega y col., 2019; van den Berge y col., 2011; Wang y col., 2012).

#### 1.3.3.1. Trasplante de NSCs

Tanto las NSCs como las NPCs derivadas de ellas pueden expandirse *in vitro* y diferenciarse a neuronas funcionales tras ser implantadas en modelos animales de EP, con un potencial tumorigénico despreciable (Cave y col., 2014; Westerlund y col., 2005). En un estudio llevado a cabo por Zuo y colaboradores, el trasplante intraestriatal de una línea de NSCs humanas indiferenciadas indujo una recuperación cognitiva y motora notable en ratones lesionados con 6-OHDA. Sin embargo, al igual que en un estudio similar realizado en primates no humanos lesionados con MPTP, las mejoras funcionales ocurren sin la proliferación detectable de las NSCs humanas implantadas (Bjugstad y col., 2008; Zuo y col., 2017). Estos datos sugieren que las NSCs humanas estimulan las poblaciones endógenas de NSCs para que secreten factores neurotróficos y citoquinas antiinflamatorias en la V-SVZ (Zuo y col., 2017). En esta línea, se ha postulado que la matriz extracelular de las células trasplantadas podría formar un andamiaje capaz de transferir las NSCs desde la V-SVZ hacia áreas cerebrales dañadas (Tajiri y col., 2013). La eficacia de las NSCs indiferenciadas es comparable a la obtenida por trasplantes de hfVM, lo que supone un gran impacto en la viabilidad de futuros ensayos clínicos que hasta ahora dependía de una cantidad suficiente de material de origen fetal y sujeta a consideraciones ético-legales (Napoli, 2017; Zuo y col., 2017). Actualmente, se está llevando a cabo un ensayo clínico en Australia para evaluar la seguridad de trasplantar una línea celular de NSCs derivadas de células madre humanas partenogénicas (Garitaonandia y col., 2018, [NCT02452723](#)). La capacidad de estas células para arraigar y sobrevivir en el estriado y estimular *in situ* la secreción de factores neurotróficos ha sido previamente demostrada en modelos animales de

EP desarrollados en roedores y primates no humanos (González y col., 2015, 2016).

Un obstáculo por superar en estas aproximaciones es la tendencia de las NSCs a adquirir un fenotipo glial; de manera que, al ser trasplantadas, difícilmente darán lugar a neuronas dopaminérgicas. Por otra parte, el envejecimiento acentúa la diferenciación preferentemente glial de los progenitores neurales de la V-SVZ. Por tanto, en pacientes de EP el trasplante autólogo de NSCs derivadas de la V-SVZ resultaría poco eficiente (Cave y col., 2014; Gritti y col., 2009). Por ello, la estimulación *in situ* de las poblaciones endógenas de V-SVZ se perfila como una alternativa más plausible para el tratamiento de la EP.

#### 1.3.3.2. Secretoma de NSCs

Los efectos beneficiosos del trasplante de NSCs incluyen la secreción *in situ* de moléculas bioactivas, en conjunto conocidas como secretoma (Marques y col., 2018). En un estudio reciente, se observó que la administración del secretoma de NPCs humanas en el estriado y la sustancia negra de ratas lesionadas con 6-OHDA induce una mejora funcional significativa y un incremento de la supervivencia de neuronas dopaminérgicas, gracias a la liberación de BDNF y PEDF (Mendes-Pinheiro y col., 2018). En el secretoma de las NSCs se han detectado ARN, lípidos, citoquinas y factores de crecimiento como VEGF, BDNF, GDNF, el factor de crecimiento de células madre (SCF, del inglés *stem cell factor*) y pleiotropina (Bacigaluppi y col., 2020). Parte de este secretoma se vehiculiza mediante vesículas extracelulares que pueden transferir moléculas bioactivas tales como microARNs, ARNm, proteínas y lípidos de unas células a otras, alcanzando grandes distancias a través de la sangre o el LCR (Holm y col., 2018). Gracias a su baja inmunogenicidad y un potencial tumorigénico nulo, las vesículas extracelulares derivadas de NSCs y NPCs están adquiriendo protagonismo como vehículos terapéuticos, con resultados prometedores en modelos animales de ictus isquémico y de lesión medular (Rong y col., 2019; Vogel y col., 2018; Webb y col., 2018).

### 1.3.3.3. Estimulación de las poblaciones residentes en la V-SVZ

#### 1.3.3.3.1 Estimulación de la proliferación de las NSCs

La estimulación de la proliferación de NSCs mediante la infusión de factores neurotróficos es una de las estrategias de terapia celular más ensayadas en modelos animales de EP. Varios autores han reportado un incremento de la proliferación de progenitores en la V-SVZ y una mayor migración de células C al estriado adyacente en modelos animales de EP tras la administración intraestriatal de factor de crecimiento tumoral alfa (TGF- $\alpha$ , del inglés *tumor growth factor alpha*) (Cooper e Isacson, 2004; de Chevigny y col., 2008). Sin embargo, tan solo uno de estos estudios muestra evidencias de diferenciación dopaminérgica y de recuperación funcional (Fallon y col., 2000). En la misma línea, la administración de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, del inglés *platelet-derived growth factor*) y de BDNF potencian la proliferación y la diferenciación neuronal en el estriado de modelos animales de EP, aunque sin detectar diferenciación dopaminérgica (Mohapel y col., 2005). La combinación de EGF y FGF-2 (Winner y col., 2008) o la administración del factor de crecimiento del hígado (LGF, del inglés *liver growth factor*) arrojan resultados similares: tanto la proliferación en la V-SVZ como el número de neuroblastos en el nicho y en el estriado aumentan significativamente, pero estos progenitores se diferencian principalmente a astrocitos (Gonzalo-Gobernado y col., 2009). La infusión intracerebroventricular de PDGF ya se ha sometido a ensayos clínicos con pacientes de EP, con el objetivo de estimular poblaciones de progenitores neurales (Paul y col., 2015, [NCT02408562](#)).

La activación de receptores de efrinas, además de incrementar la proliferación en la V-SVZ, moviliza estos progenitores no solo hacia su destino natural en el BO sino también hacia el estriado adyacente, donde se incrementa la expresión de TH. Estos cambios histológicos se acompañan de un aumento de la angiogénesis y de notables mejoras en la función motora (Jing y col., 2012).

La estimulación farmacológica de los receptores dopaminérgicos presentes en los progenitores neurales también es una estrategia

terapéutica prometedoras. La administración crónica de 7-hidroxi-N,N-dipropil-2-aminotetralina (7-OH-DPAT), un agonista selectivo de D3, en el III ventrículo de ratas lesionadas con 6-OHDA incrementa la proliferación de progenitores en la V-SVZ y en la sustancia negra e incluso se ha observado un incremento de la expresión de TH en las nuevas neuronas que se relaciona con una notable recuperación de la función motora (Van Kampen y Eckman, 2006). En estudios posteriores, se investigaron los efectos de combinar agonistas para receptores de tipo D1 y de tipo D2 y el uso de pramipexol en modelos animales de EP, con resultados satisfactorios (O'Keefe, y col., 2009a; Winner y col., 2009).

Por otra parte, otras estrategias se centran en reducir los efectos de factores que regulan negativamente la proliferación en la V-SVZ como la inflamación. La minociclina, un antibiótico que se emplea para inhibir la activación microglial, induce un incremento de la proliferación en las NSCs de la V-SVZ de animales lesionados con 6-OHDA y del porcentaje de neuroblastos que migran al estriado adyacente (Worlitzer y col., 2012). Igualmente, la administración de estatinas, que promueven la función vascular, incrementa el número de células proliferativas y de neuronas inmaduras en la V-SVZ (Chen y col., 2003). Las aproximaciones descritas favorecen la proliferación de las NSCs, pero todavía resulta controvertido afirmar que esto implique una mejora funcional perceptible en modelos animales de EP.

#### *1.3.3.3.2. Estimulación de la diferenciación y migración de NPCs y neuroblastos*

La migración de los neuroblastos de la V-SVZ se caracteriza por su escasa o nula dispersión, un movimiento estrictamente dirigido al BO y guiado quimiotácticamente por gradientes de factores de crecimiento y quimiocinas (Kaneko y col., 2017). Factores neurotróficos como GDNF y EGF incrementan la capacidad migratoria de los neuroblastos de la V-SVZ hacia el córtex y el estriado (Kolb y col., 2007). En la misma línea, BDNF y su receptor TrkB, que se expresan *in vivo* a lo largo de todo el trayecto migratorio desde la V-SVZ al BO, pueden manipularse para regular la capacidad migratoria en la RMS (Zhou y col., 2015b). La administración en la V-

SVZ del factor neurotrófico de dopamina cerebral (CDNF, del inglés *cerebral dopamine neurotrophic factor*) induce la atracción de NPCs desde este nicho hacia el estriado lesionado adyacente y una mejora funcional notable en modelos animales de EP basados en la inyección de 6-OHDA (Nasrolahi y col., 2019). La eficacia de este tipo de tratamientos se incrementa cuando los factores de crecimiento se administran en forma de hidrogeles biocompatibles, inyectados directamente en la región de interés (V-SVZ o estriado) (Nakaguchi y col., 2012). Sin embargo, las estrategias de movilización aún deben optimizarse para lograr un desplazamiento eficaz y suficiente de progenitores desde la V-SVZ hacia áreas afectadas tras un evento neurodegenerativo.

Un objetivo claro de diversos abordajes ha sido dirigir la diferenciación de los neuroblastos hacia un fenotipo concreto de interés. Varios estudios demuestran que el ácido retinoico, vehiculizado en nanopartículas, induce la expresión de los genes proneurogénicos *Ascl1* y *Ngn1* en la V-SVZ *in vivo* (Ferreira y col., 2016; Santos y col., 2012). Sin embargo, la diferenciación dopaminérgica eficiente a partir de los progenitores endógenos residentes en la V-SVZ todavía no se ha alcanzado en modelos animales. En cambio, se han establecido protocolos *in vitro* que favorecen la adquisición del fenotipo dopaminérgico gracias a la modificación genética de las NSCs. La sobreexpresión de *Oct4* consigue la reprogramación celular de los progenitores de la V-SVZ de manera que un 5% de las células en cultivo adquiere un fenotipo mesencefálico que, al ser injertado en ratas lesionadas con 6-OHDA, induce una mejora funcional significativa (Deleidi y col., 2011). En otro estudio, la sobreexpresión del factor de transcripción *Nurr1* mediante vectores retrovirales aumenta el porcentaje de células dopaminérgicas al 37% en cultivos derivados de la V-SVZ. El trasplante de estas células induce una recuperación funcional en modelos animales de EP (Shim y col., 2007). Aunque atractivas, estas estrategias basadas en vectores retrovirales pueden suponer riesgo de tumorigénesis (Yi y col., 2011).

En conjunto, estos estudios subrayan el potencial de las estrategias terapéuticas basadas en la movilización de NSCs y destacan la necesidad de identificar nuevos mecanismos regulatorios que modulen

su comportamiento y ralenticen su agotamiento con la edad. De esta forma, sería posible restaurar la neurogénesis adulta en condiciones patológicas asociadas al envejecimiento, como ocurre en la EP, y utilizarla como herramienta terapéutica para el tratamiento de la enfermedad.

#### **1.4. SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA**

El sistema renina-angiotensina (SRA) es uno de los sistemas endocrinos más conservados filogenéticamente y se conoce clásicamente por su papel en la regulación de la presión sanguínea y de la homeostasis electrolítica. La renina, una enzima producida en el riñón, hidroliza el angiotensinógeno (ANG), un precursor hepático que se secreta a la sangre, para generar el decapeptido inactivo angiotensina I (AngI). La enzima convertidora de angiotensina (ECA) escinde AngI y genera el octapéptido bioactivo angiotensina II (AngII), el principal efector del SRA, implicado en la fisiología de una gran variedad de tejidos. Los efectos de la AngII están mediados por dos tipos de receptores: los receptores de AngII tipo 1 (AT1) y tipo 2 (AT2). El receptor AT1 ejerce la mayoría de las acciones periféricas de la AngII, si bien su activación crónica puede desencadenar inflamación, vasoconstricción o fibrosis, mientras que AT2 generalmente contrarresta estos efectos (Abiodun y Ola, 2020; Bernstein y col., 2014; Unger y col., 1996).

Recientemente, se han descrito otros péptidos biológicamente activos en el SRA. El procesamiento alternativo de la AngII por aminopeptidasas puede dar lugar a AngIII y esta, a su vez, a AngIV. La AngIII se une a receptores AT1 con menor afinidad que la AngII e induce vasoconstricción y proliferación de las células del músculo liso a nivel sistémico. En cambio, la activación de AT2 por AngIII favorece la natriuresis para regular la presión sanguínea (Kemp y col., 2014; Li y col., 2017c). Por su parte, la AngIV se une a receptores específicos AT4 y excepcionalmente a AT1. ECA2 es una isoforma de ECA recientemente descubierta que puede actuar sobre AngI y AngII para dar lugar a Ang(1-9) y a Ang(1-7), respectivamente. La Ang(1-7) se une, en orden decreciente de afinidad, al receptor Mas (MasR), a AT2 y a los receptores acoplados a proteínas G asociados a MasR (MrgDs)

(Elased y col., 2008; Santos y col., 2003, 2018). A su vez, la descarboxilación de Ang(1-7) genera alamandina, el ligando de MrgD (Tetzner y col., 2016). La unión de Ang(1-9), Ang(1-7), alamandina y AngIV a sus respectivos receptores ha demostrado jugar un papel relevante en la protección frente a enfermedades cardiovasculares (Hussain y Awan, 2018). Además del SRA sistémico, se han descrito varios SRA locales en diversos tejidos, incluyendo corazón, riñón, pulmón, hígado, retina y cerebro. En esta tesis, prestaremos especial atención al SRA cerebral.

#### **1.4.1. SRA cerebral**

Tradicionalmente, los efectos del SRA en el cerebro se atribuían a los efectos que el SRA periférico ejercía sobre el sistema nervioso central (SNC) debido a la existencia de capilares fenestrados en los órganos circunventriculares que rodean el III y el IV ventrículo. El hecho de que la AngII no atravesase la BHE parecía respaldar esta hipótesis (Von Bohlen und Halbach, 2005; Phillips y de Oliveira, 2008). Sin embargo, el progresivo hallazgo de SRA paracrinos locales en otros tejidos, incluido el cerebro, y el descubrimiento de una síntesis local de ANG, a cargo mayoritariamente de los astrocitos, rebatieron este paradigma. La presencia de ANG y de la enzima que lo hidroliza en neuronas y en astrocitos confirma la existencia de un SRA cerebral, independiente del SRA humoral sistémico y con funciones que van más allá de controlar la presión sanguínea y el equilibrio electrolítico (Garrido-Gil y col., 2013, 2017b; Jackson y col., 2018; Lavoie y col., 2004; Stornetta y col., 1988) (Figura 4).

La renina se expresa en neuronas tanto a nivel intracelular como en su forma secretada, prorenina. La prorenina se une a sus receptores específicos para escindir el ANG y activar los receptores de AngII (Grobe y col., 2008; Wright y Harding, 2013). Mientras que ECA aparece en el endotelio del sistema vascular cerebral y en órganos circunventriculares (Bodiga y Bodiga, 2013), ECA2 se expresa prácticamente en todo el cerebro, predominantemente en neuronas, e interviene en la regulación central de la presión sanguínea (Doobay y col., 2007; Tota y col., 2012). Sin embargo, su producto Ang(1-7) presenta una expresión más restringida y aparece en el córtex

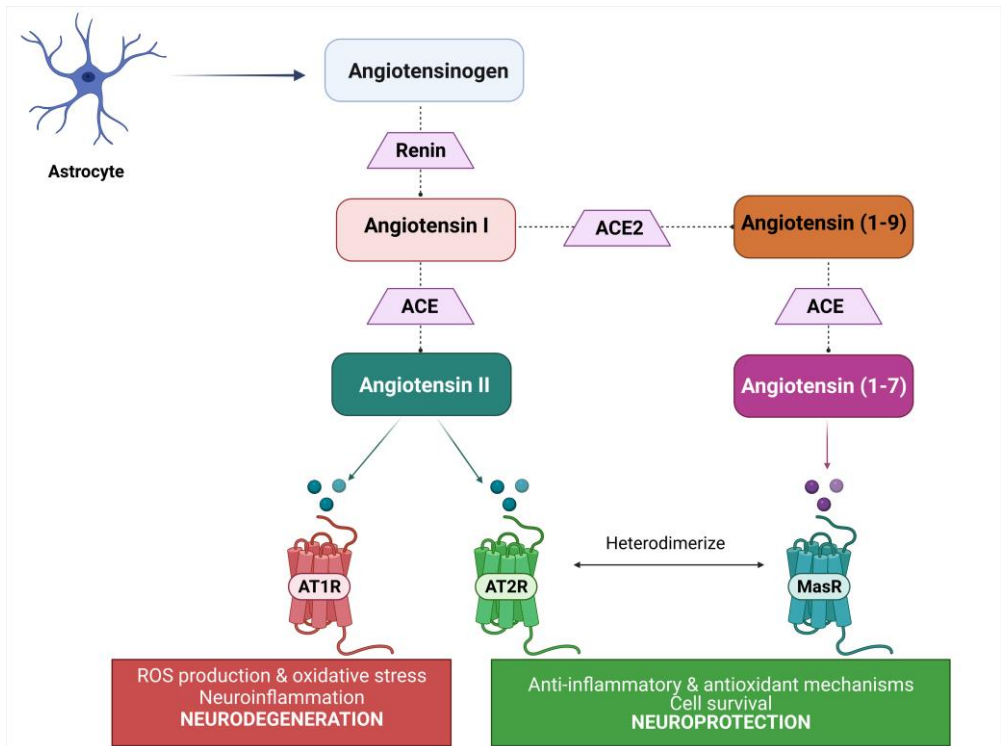
cerebeloso, el hipocampo, el hipotálamo y la sustancia negra (Gironacci y col., 2018). La expresión de AngII y de los receptores AT1, AT2 y MasR se ha demostrado ampliamente en neuronas, astrocitos y microglía de córtex, hipocampo y ganglios basales (Labandeira-García y col., 2017; Lenkei y col., 1996; Schelling y col., 1983), mientras que la expresión del receptor AT4 se restringe a neuronas de córtex, hipocampo y ganglios basales, donde interviene en procesos de remodelación sináptica (Wright y col., 2015).

Recientemente, la detección de los componentes del SRA a nivel intracelular en las mitocondrias y núcleos de neuronas, microglía y astrocitos, con capacidad para funcionar independientemente de los receptores de membrana, ha añadido un tercer nivel de complejidad al estudio del SRA en el SNC (Deliu y col., 2014; Labandeira-García y col., 2021). La presencia del SRA a diversos niveles en el cerebro de mamíferos subraya su importancia funcional, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas.

Numerosos estudios han demostrado que la desregulación del SRA contribuye a la patogénesis y progresión de las enfermedades neurodegenerativas, y se ha descrito su relación con la neuroinflamación, el estrés oxidativo y el envejecimiento (Labandeira-García y col., 2017). La hiperactivación del eje ECA/AngII/AT1 induce la activación de la isoforma de la NADPH oxidasa (NOX)-2 en la membrana celular, la principal fuente intracelular de EOR después de la mitocondria (Babior, 2004). Las EOR derivadas de NOX-2 inducen la apertura de canales de sodio en la mitocondria, lo que incrementa la producción mitocondrial de EOR en diversos tipos celulares, incluyendo las neuronas dopaminérgicas (Rodríguez-Pallares y col., 2009, 2012b). Generalmente, esta cascada de eventos pone en marcha mecanismos compensatorios ejercidos por los ejes AngII/AT2, ECA2/Ang(1-7)/MasR y alamandina/MrgD, clásicamente implicados en supervivencia celular y en la activación de mecanismos antioxidantes y antiinflamatorios (Abiodun y Ola, 2020; Labandeira-García y col., 2021) (Figura 4). A su vez, el SRA intracrino tiende a contrarrestar la activación del eje AngII/AT1/NOX-2 incrementando la expresión intracelular de AT2, para traslocarlo a la membrana mitocondrial y a la superficie celular, y de Ang(1-7). Sin embargo, esta

capacidad amortiguadora del SRA tisular y del SRA intracrina puede verse sobrepasada por condiciones patológicas o por el envejecimiento (Valenzuela y col., 2016; Villar-Cheda y col., 2017).

En resumen, la activación del eje ECA/AngII/AT1 desencadena una cascada de estrés oxidativo y promueve la neuroinflamación, mecanismos clave en la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Huntington y la EP. En consecuencia, la inhibición de elementos del SRA como ECA o AT1 se traduce en mejoras funcionales relevantes en la enfermedad de Alzheimer (Kehoe, 2018; Rygiel, 2016), la esclerosis múltiple (Stegbauer y col., 2009) y la EP (Rodríguez-Pérez y col., 2018), objeto de estudio de esta tesis y a la que dedicaremos el siguiente apartado.



**Figura 4. Sistema renina-angiotensina (SRA) cerebral.** Los astrocitos son la principal fuente de angiotensinógeno a nivel cerebral. La renina hidroliza este precursor y da lugar al decapeptido inactivo angiotensina I (AngI). La enzima convertidora de angiotensina (ACE, del inglés *angiotensin-converting enzyme*) escinde a la AngI y da lugar al octapéptido activo angiotensina II (AngII), el principal efector del SRA, que ejerce sus acciones a través de los receptores AT1 y AT2, con efectos opuestos. Alternativamente, la AngII puede dar lugar a Ang(1-7), en una reacción catalizada por ACE2, el sustrato del receptor Mas (MasR). La activación del eje proinflamatorio AngII/AT1 interviene en procesos relacionados con el estrés oxidativo, la neuroinflamación y la neurodegeneración. La activación del brazo protector, representado por los ejes AngII/AT2 y Ang(1-7)/MasR, contrarresta las acciones del brazo proinflamatorio, promoviendo la supervivencia celular y poniendo en marcha mecanismos antiinflamatorios y antioxidantes. *Figura de elaboración propia.*

#### 1.4.2. SRA y EP

Se ha descrito la interacción entre los receptores de AngII y los receptores dopaminérgicos en órganos periféricos, donde regula la excreción renal de sodio (Gildea y col., 2019), la función cardiovascular (Zeng y col., 2006) o la inflamación intestinal (Garrido-Gil y col., 2018). En nuestro laboratorio, se ha demostrado la expresión de AT1 y AT2 en neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra y en la microglía y astrocitos de roedores, primates y humanos (Garrido-Gil y col., 2013, 2017b), así como en cultivos primarios mesencefálicos (Joglar y col., 2009; Rodríguez-Pallares y col., 2004, 2008). Además, en nuestro grupo se describió por primera vez la presencia de receptores de prorenina en neuronas y microglía de la sustancia negra de roedores, primates y humanos (Garrido-Gil y col., 2013, 2017b; Valenzuela y col., 2010). La detección de los componentes del SRA en el sistema nigroestriatal ha sido el punto de partida para estudiar posibles interacciones funcionales entre el SRA y los receptores dopaminérgicos.

En numerosos estudios llevados a cabo por nuestro grupo, se ha demostrado que la AngII exagera la vulnerabilidad y degeneración dopaminérgica a través de diversos mecanismos (Labandeira-García y col., 2014). Por un lado, la depleción dopaminérgica induce un incremento en la expresión de AT1 y AT2 en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc en modelos animales de EP, un mecanismo compensatorio del SRA local (Villar-Cheda y col., 2010). La

hiperactivación del brazo proinflamatorio AngII/AT1 en las neuronas dopaminérgicas activa NOX-2, que genera niveles intracelulares bajos de EOR que interactúan con las producidas por la mitocondria y con otras fuentes de EOR (neurotoxinas dopaminérgicas o citoquinas liberadas por la microglía activada), incrementando la vulnerabilidad dopaminérgica (Rodríguez-Pallares y col., 2008, 2012b). En la microglía, la AngII actuando sobre el receptor AT1, también activa NOX, que ejerce un doble efecto. Por un lado, se liberan altas concentraciones de EOR al medio extracelular, lo que disminuye la viabilidad neuronal y, por otro, se generan niveles intracelulares bajos de EOR que activarán en la microglía vías de señalización mediadas por NF- $\kappa$ B y Rho/RhoA quinasas. Como consecuencia, se incrementa la expresión, síntesis y liberación de citoquinas como TNF- $\alpha$  y de moléculas de adhesión que contribuyen a la migración de células inflamatorias hacia áreas dañadas y al predominio del fenotipo microglial proinflamatorio (Borrajo y col., 2014a; Villar-Cheda y col., 2012a). En resumen, la hiperactivación del SRA exacerba la respuesta inflamatoria mediada por la microglía y favorece el estrés oxidativo, que actúan sinérgicamente para contribuir a la degeneración dopaminérgica en la SNpc y a la progresión de la EP (Labandeira-García y col., 2014).

Aunque el brazo protector AngII/AT2 suele contrarrestar los efectos deletéreos del eje proinflamatorio AngII/AT1, su capacidad de respuesta se ve menoscabada por condiciones que habitualmente acompañan a la EP, como el envejecimiento o la menopausia (Labandeira-García y col., 2016, 2017; Regenhardt y col., 2013). Recientemente, nuestro grupo ha demostrado que en animales envejecidos la exacerbación del SRA en la sustancia negra (una expresión incrementada de AT1 y una expresión reducida de AT2) se relaciona con un incremento en los niveles de inflamación, marcadores de estrés oxidativo y una mayor vulnerabilidad dopaminérgica a neurotoxinas (Villar-Cheda y col., 2012b). Por otra parte, la administración de estrógenos a ratas ovariectomizadas induce una sobreexpresión de AT2 y reduce la expresión de AT1 y NOX en la sustancia negra frenando el progreso de la neurodegeneración en modelos animales de EP (Rodríguez-Pérez y col., 2010, 2012, 2015b).

En astrocitos, la estimulación de receptores D2 inhibe la síntesis de ANG y regula la expresión de AT1 y AT2 en la microglía, reduciendo la actividad proinflamatoria del eje AT1/NOX/superóxido (Domínguez-Meijide y col., 2017).

A nivel intracelular, nuestro grupo ha descrito la presencia de los componentes del brazo protector del SRA, MasR y AT2, en mitocondrias y núcleos de neuronas y glía de la sustancia negra de roedores, primates y humanos, así como en hiPSCs derivadas de pacientes de EP. En la sustancia negra envejecida, disminuye la expresión de Ang(1-7) y MasR, que modulan los niveles mitocondriales y nucleares de superóxido, lo que podría estar contribuyendo al incremento de la vulnerabilidad dopaminérgica asociado a la edad (Costa-Besada y col., 2018).

La desregulación del SRA se perfila, por tanto, como un mecanismo clave que relaciona el envejecimiento, la neuroinflamación, el estrés oxidativo, la menopausia y la vulnerabilidad dopaminérgica con la patogénesis y progresión de la EP. Por ello, no es de extrañar que en los últimos años se hayan dedicado muchos esfuerzos a implementar estrategias terapéuticas basadas en la manipulación del SRA para el tratamiento de la EP.

El uso de inhibidores de ECA para el tratamiento de la EP se basa en la amplia distribución de la enzima en el sistema nigroestriatal, en el incremento de su actividad registrado en el LCR de pacientes de EP y en la capacidad de ECA para modular los niveles de dopamina estriatales (Mertens y col., 2010). Con Jenkins y colaboradores a la cabeza, se iniciaron una serie de estudios para determinar las propiedades neuroprotectoras de los inhibidores de ECA en los que se observó que la administración de perindopril restaura los niveles de dopamina a niveles control en un modelo animal de EP (Jenkins y col., 2002). En nuestro laboratorio, observamos que la administración subcutánea de captopril atenúa la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la SNpc y de sus terminales en el estriado en modelos animales de EP. Además, la inhibición de ECA reduce los niveles de peroxidación lipídica y de oxidación proteica en el mesencéfalo ventral y en el estriado de ratas lesionadas con 6-OHDA (López-Real y col., 2005; Muñoz y col., 2006; Sonsalla y col., 2013).

Por otra parte, en pacientes de EP, se registra un descenso en los niveles de AT1, lo que sugiere que este se expresa mayoritariamente en neuronas dopaminérgicas, y dado que estos receptores intervienen en la liberación de dopamina (Brown y col., 1996; Domínguez-Meijide y col., 2014; Ge y Barnes, 1996), el uso de inhibidores de AT1 se ha propuesto para el tratamiento de la EP. En nuestro grupo hemos demostrado que el tratamiento con el antagonista de AT1 ZD7155 reduce la peroxidación lipídica y la oxidación proteica en el estriado y en el mesencéfalo de un modelo animal de EP y tiene efectos neuroprotectores sobre las neuronas dopaminérgicas de la SNpc, reduciendo la actividad de NOX (Rey y col., 2007). En la misma línea, la inhibición de AT1 con el antagonista telmisartán protege a las neuronas dopaminérgicas del daño neurotóxico y de la respuesta microglial inducida por la administración de MPTP *in vivo* (Garrido-Gil y col., 2012). Además, hemos observado que el antagonista de AT1 candesartán es capaz de revertir la exacerbación del brazo proinflamatorio del SRA observada en modelos animales de EP en animales jóvenes (Joglar y col., 2009; Muñoz y col., 2014; Rodríguez-Pallares y col., 2008) y en animales envejecidos (Villar-Cheda y col., 2012b). El bloqueo de los receptores AT1 con candesartán también reduce las discinesias inducidas por L-DOPA en modelos animales de EP (Muñoz y col., 2014).

El efecto terapéutico de los inhibidores de AT1 está mediado, en parte, por la activación indirecta de los receptores AT2 que ejerce efectos neuroprotectores, constitutivamente enmascarados por AT1 (Grammatopoulos y col., 2005). La neuroprotección inducida por AT2 y una mayor capacidad para atravesar la BHE hace de los inhibidores de AT1 una opción terapéutica más potente que los inhibidores de ECA (Gohlke y col., 2002). En pacientes de EP, los niveles de AT2 aparecen disminuidos en el núcleo caudado, pero no presentan alteraciones en el putamen ni en la sustancia negra (Ge y Barnes, 1996), lo que sugiere que la mera inhibición de AT1 podría no ser suficiente para inducir una activación endógena terapéutica de AT2. Por ello, la estimulación directa de AT2 mediante la administración de agonistas específicos como CGP42112 o C21 podría constituir una alternativa.

### 1.4.3. SRA y neurogénesis adulta

La neurogénesis adulta en la V-SVZ se sustenta, entre otros muchos factores, gracias a unos niveles adecuados y estables de EOR, lo que requiere de una maquinaria antioxidante endógena muy eficaz. El estrés oxidativo moderado favorece la expresión de genes antioxidantes y apoptóticos, mientras que un estrés oxidativo intenso y sostenido reduce la capacidad de proliferación de las NSCs e induce su envejecimiento prematuro (Chohan, 2020).

El factor de transcripción *Nrf2* regula la homeostasis redox, favoreciendo la expresión de genes antioxidantes y detoxificantes (Vomund y col., 2017) y juega un papel crucial en la supervivencia, proliferación y diferenciación de las NSCs en la V-SVZ (Khacho y col., 2016). Resultados recientes muestran, en un modelo *in vitro* de EP, que los niveles elevados de estrés oxidativo inducen la sobreexpresión de *Nrf2* en NSCs derivadas de hiPSCs, promoviendo su diferenciación (Kahroba y col., 2021; Pistollato y col., 2017).

Además de regular el ambiente oxidativo cerebral, la AngII juega un papel relevante en el desarrollo del sistema nervioso. La expresión de los receptores AT1 es similar antes y después del nacimiento, o incluso más elevada en el cerebro adulto, mientras que la de AT2 predomina durante el desarrollo cerebral y cae en el período posnatal (Cook y col., 1991; Millan y col., 1991). A través de los receptores AT2, la AngII regula la proliferación y maduración celular, así como procesos de apoptosis y regeneración (Li y col., 2007). Además, hay datos que sugieren que la AngII vía AT2 favorece la diferenciación dopaminérgica de precursores mesencefálicos (Rodríguez-Pallares y col., 2004). Investigaciones recientes llevadas a cabo por nuestro grupo han revelado, sin embargo, la importancia funcional de AT2 en el cerebro adulto (Rodríguez-Pérez y col., 2020). El papel del SRA en el desarrollo sugiere que podría estar implicado en la regulación de la neurogénesis adulta, pero actualmente, las investigaciones en este campo son escasas y se centran en el giro dentado del hipocampo.

Por otra parte, la producción de superóxido inducida por el brazo proinflamatorio AngII/AT1/NOX-4 favorece la proliferación de las NSCs (Topchiy y col., 2013; Yoneyama y col., 2010), lo que concuerda con las conclusiones de Le Belle y colaboradores, que demostraron que

las NSCs deficientes para NOX-2 muestran una capacidad de autorrenovación disminuida a causa de niveles intracelulares reducidos de EOR (Le Belle y col., 2011). Además, otros estudios sostienen que la activación de AT2 estimula la proliferación de NSCs derivadas del hipocampo fetal en un mecanismo mediado por la vía de señalización ERK (Chao y col., 2013). La expresión de MasR, que no se detecta prenatalmente en el cerebro, predomina en el giro dentado del hipocampo adulto, concretamente en células en división y en neuroblastos (Freund y col., 2012, 2014), lo que apunta a su posible implicación en procesos de proliferación y maduración celular.

Un número reducido de investigaciones ha estudiado el papel del SRA en la regulación de la neurogénesis adulta en condiciones patológicas. Así, se ha visto que el bloqueo de AT1 promueve la neurogénesis hipocampal en modelos animales de hipertensión, incrementando la expresión de marcadores neurogénicos como *NeuroD1* o *Ngn* y disminuyendo la de marcadores gliogénicos como BMP2 (Bhat y col., 2018). En un estudio similar, en el que se empleó un modelo crónico de hipertensión severa, la administración intranasal de losartán indujo la expresión de marcadores neuronales tempranos en la V-SVZ y en el plexo coroideo (Drews y col., 2019). Otros estudios, en los que se emplearon modelos animales de isquemia sugieren, en cambio, que el SRA carece de un papel regulador en la neurogénesis hipocampal (Wakai y col., 2011) o que este ejerce efectos opuestos a los descritos (Mukuda y col., 2014).

En conjunto, la mayoría de estos trabajos no profundiza en el posible papel del SRA en la regulación de la neurogénesis adulta en el nicho neurogénico de mayor interés terapéutico para la EP, la V-SVZ, ni estudian la relevancia que podría tener el SRA en las alteraciones que sufre la neurogénesis en la V-SVZ durante el envejecimiento. Además, tampoco se ha investigado si el SRA interactúa con otros factores que controlan la funcionalidad de este nicho, como son los neurotransmisores y en particular la dopamina, clave en el desarrollo de la EP.

## 2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La EP es la segunda enfermedad neurodegenerativa en incidencia a nivel mundial y se caracteriza por la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc del mesencéfalo. Como consecuencia, caen los niveles de dopamina en el estriado y aparecen alteraciones motoras como rigidez muscular, bradiquinesia, trastornos de la marcha y temblor en reposo. Además, la enfermedad también cursa, entre otros, con síntomas no motores como alteraciones olfatorias, ansiedad, depresión y deterioro cognitivo leve, que puede progresar hacia demencia, funciones en las que están implicados los nichos neurogénicos del cerebro adulto.

Desde hace varios años, se acepta que el origen de la EP es multifactorial. Entre los posibles mecanismos implicados en la patogénesis y progresión de la enfermedad destacan la neuroinflamación, la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo que, conjuntamente, exacerbaban la vulnerabilidad de las neuronas dopaminérgicas y promueven su degeneración. Estudios previos en nuestro laboratorio muestran que el SRA está activado en modelos de EP, mediando procesos neuroinflamatorios y de vulnerabilidad dopaminérgica. Además, se ha demostrado que existen interacciones y mecanismos contrarreguladores entre el SRA y la dopamina en la sustancia negra y en el estriado. Por otra parte, y aunque existen datos contradictorios, diversas evidencias sugieren que cambios en los niveles de dopamina dan lugar a alteraciones en la neurogénesis adulta, particularmente en la V-SVZ. Estudios previos muestran que la AngII, a través de sus receptores AT1 y AT2, juega un papel relevante en el desarrollo y maduración del sistema nervioso, controlando procesos de proliferación y de determinación del linaje neurales. Con estos antecedentes, parece razonable pensar que el SRA pueda mediar los efectos de la dopamina sobre la neurogénesis en la V-SVZ. Sin embargo, no existen estudios al respecto. Teniendo en cuenta que

existen investigaciones que subrayan el potencial terapéutico de la movilización de progenitores neurales de la V-SVZ, adyacente al estriado, para la generación de neuroblastos en procesos neurodegenerativos, resulta necesario identificar los mecanismos que modulan su comportamiento en este nicho, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas.

Hoy en día, el tratamiento clásico habitual para la EP sigue siendo farmacológico y consiste en la administración de L-DOPA, que solo alivia los síntomas motores durante unos pocos años y se asocia con efectos secundarios graves a medio plazo, como las discinesias. De ahí la importancia de buscar nuevas alternativas terapéuticas. En este sentido, la terapia celular sustitutiva en la EP se plantea como una estrategia prometedora que podría modificar o incluso revertir la progresión de la enfermedad. El modelo clásico de terapia celular en la EP se ha basado en la obtención de suspensiones de neuroblastos fetales obtenidas del mesencéfalo ventral, que se inyectan en el estriado denervado en modelos animales de parkinsonismo. Aunque este modelo también se ha empleado en ensayos clínicos con resultados prometedores, posee importantes limitaciones relacionadas, principalmente, con la disponibilidad de tejido y con la escasa supervivencia y capacidad de reinervación de los precursores dopaminérgicos implantados, independientemente de cuál sea su origen. Por ello, cobra especial interés el desarrollo de estrategias neuroprotectoras que puedan aumentar la supervivencia y funcionalidad de las células implantadas, para lo que resulta imprescindible ahondar en los mecanismos implicados en la degeneración dopaminérgica que tiene lugar tras el implante. En este sentido, estudios previos de nuestro grupo han demostrado que los inhibidores del SRA, y en particular el bloqueo de los receptores AT1, tienen efectos neuroprotectores sobre la población dopaminérgica de la SNpc. Por otro lado, en el ámbito de la terapia celular, el uso de MSCs surge como una opción de futuro ya que poseen propiedades regenerativas basadas, entre otras, en su capacidad inmunomoduladora/antiinflamatoria, antiapoptótica y de producción de factores tróficos, que podrían mejorar la supervivencia de las células dopaminérgicas implantadas. De ahí el interés de estudiar la

manipulación del SRA y el cotrasplante de MSCs como posibles estrategias para aumentar la supervivencia de los precursores dopaminérgicos implantados en modelos animales de EP.

En base a estos antecedentes, en la presente tesis nos hemos propuesto los siguientes objetivos generales y específicos:

1. Estudiar los mecanismos implicados en la regulación de la neurogénesis en la V-SVZ adulta de roedores en condiciones fisiológicas y en modelos animales de EP.

1.1. Estudiar la presencia de los componentes fundamentales del SRA en la V-SVZ y el posible papel de sus receptores sobre la proliferación de NSCs/NPCs y la generación de neuroblastos en la V-SVZ adulta en condiciones fisiológicas en animales jóvenes y envejecidos.

1.2. Investigar la existencia de posibles interacciones entre el SRA y la dopamina y sus efectos funcionales sobre la neurogénesis de la V-SVZ adulta en condiciones fisiológicas.

1.3. Analizar el papel de la dopamina y sus posibles interacciones con el SRA en la proliferación de NSCs/NPCs y la generación de neuroblastos en la V-SVZ adulta en un modelo animal de EP.

2. Investigar los mecanismos implicados en la supervivencia de precursores dopaminérgicos en modelos animales de EP.

2.1. Evaluar el posible efecto de la manipulación del SRA sobre la supervivencia y funcionalidad de implantes de precursores dopaminérgicos en un modelo animal de EP.

2.2. Investigar los posibles mecanismos implicados en la neurodegeneración dopaminérgica mediada por AngII.

2.3. Estudiar el potencial de las MSCs para aumentar la supervivencia y funcionalidad de los precursores dopaminérgicos implantados en un modelo animal de EP.

2.4. Determinar los posibles mecanismos implicados en los efectos neuroprotectores de las MSCs sobre la viabilidad dopaminérgica.

## 3. MATERIAL Y MÉTODOS

### 3.1. ANIMALES

Para la realización de los estudios llevados a cabo en esta tesis se utilizaron ratas (*Rattus norvegicus*) jóvenes (3-4 meses de edad) y envejecidas (20-22 meses de edad) de la cepa Sprague-Dawley, así como ratones (*Mus musculus*) jóvenes (3-4 meses) y envejecidos (20-22 meses) de genotipo silvestre (WT, del inglés *wild type*) de la cepa C57Bl/6J. Además, se emplearon ratones deficientes (KO, del inglés *knock-out*) para el gen *Agtr1a* (KO-AT1) (Ito y col., 1995), la isoforma más abundante en el cerebro de ratón y con la distribución tisular más similar a la del gen humano *AGTR1* (Takayanagi y col., 1992), proporcionados por The Jackson Laboratories (B6.129P2-*Agtr1<sup>tm1Unc</sup>/J*, stock: 002682, Bar Harbor, ME, EEUU). También se emplearon ratones deficientes para AT2 (KO-AT2) (Ichiki y col., 1995), cedidos generosamente por el Dr. Daniel Henrion (Université d'Angers, Angers, Francia). Como controles, se utilizaron ratones WT con el mismo fondo genético (cepa C57Bl/6J) y de la misma edad. En todos los experimentos, se emplearon machos excepto en los estudios del papel del SRA o de las MSCs en la supervivencia de precursores dopaminérgicos (ver Justificación y objetivos, objetivos 2.1 y 2.3), en los que se utilizaron hembras de rata Sprague-Dawley adultas.

Los experimentos se realizaron de acuerdo con la normativa para la protección de los animales utilizados en experimentación, recogida en el Real Decreto RD53/2013 y en las directrices comunitarias europeas 2010/63/EU y 86/609/CEE, y siguiendo protocolos aprobados por los comités de bioética correspondientes de la Universidad de Santiago de Compostela y de la Xunta de Galicia (número de autorización del proyecto de experimentación animal: 15005/15/002 y 15012/2021/012). Los animales se mantuvieron a temperatura constante ( $21,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ) con ciclos de luz/oscuridad de 12 h y acceso

*ad libitum* a agua y comida en los centros usuarios autorizados para los experimentos (Facultad de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela, número de registro REGA: ES150780263401 y Centro de Biomedicina Experimental CEBEGA, número de registro REGA: ES150780292901). La distribución de los animales en grupos experimentales se realizó aleatoriamente, manteniendo una media homogénea de pesos entre grupos. Los animales dispusieron de un período mínimo de aclimatación de 7 días antes del comienzo de los experimentos.

### **3.2. ESTUDIO DE LOS MECANISMOS IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN DE LA NEUROGÉNESIS EN LA V-SVZ ADULTA EN CONDICIONES FISIOLÓGICAS Y EN MODELOS ANIMALES DE EP**

#### **3.2.1. Diseño experimental**

En una primera serie de experimentos, con el objetivo de determinar el posible papel del SRA sobre la proliferación de las NSCs/NPCs *in vitro* (ver Justificación y objetivos, objetivo 1.1), se trataron neuroferas obtenidas de la V-SVZ de ratones WT jóvenes (3-4 meses de edad) (ver Material y métodos, apartado [3.2.2](#)) con agonistas y/o antagonistas específicos del SRA. Como agonistas del SRA se emplearon los siguientes fármacos: AngII (100 nM; A9525, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EEUU) (Rodríguez-Pallares y col., 2008), CGP42112A (agonista del receptor AT<sub>2</sub>; 1 μM; C160, Sigma) (Díaz-Ruiz y col., 2018) y C21 (agonista de AT<sub>2</sub>; 1 μM; Vicore Pharma, Gotemburgo, Suecia) (Fouda y col., 2017). Como antagonistas del SRA se emplearon: candesartán (antagonista del receptor AT<sub>1</sub>; 1 μM; 4791, Tocris, Bristol, Reino Unido), ZD7155 (antagonista de AT<sub>1</sub>; 1 μM; 1211, Tocris) y PD123319 (antagonista de AT<sub>2</sub>; 1 μM; P186, Sigma) (Rodríguez-Pallares y col., 2004).

En una segunda serie de experimentos, con el objetivo de investigar la posible implicación de los receptores del SRA en la neurogénesis de la V-SVZ *in vivo* (ver Justificación y objetivos, objetivo 1.1), evaluamos la proliferación y generación de neuroblastos en ratones jóvenes (3-4 meses de edad) WT (n = 16), KO-AT<sub>1</sub> (n = 7) y KO-AT<sub>2</sub> (n = 17). Además, un grupo de ratones WT jóvenes (n = 7) recibió

inyecciones intraperitoneales (i.p.) diarias del agonista del receptor AT2 C21 (n = 7) (0,3 mg/kg/día) (Kaschina y col., 2008) durante 15 días. Como controles, se utilizaron animales de la misma edad que recibieron volúmenes equivalentes del vehículo (n = 8) (salino estéril al 0,9%; 616003.9, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Alemania). Por otra parte, se trataron ratones WT (n = 8) y ratones KO-AT2 jóvenes (n = 8) con el antagonista del receptor AT1 candesartán cilexetilo (1 mg/kg/día; Atacand, AstraZeneca, Madrid, España) administrado por vía oral en bolos mezclados con Nocilla (crema de avellanas; Idilia Foods, Valencia, España) (Rodríguez-Pérez y col., 2015b). Esta dosis de candesartán es capaz de bloquear efectivamente los receptores AT1 cerebrales sin disminuir la presión sanguínea (Unger, 2003). Un grupo de animales WT y KO-AT2 (n = 8 y n = 9, respectivamente) recibió bolos de Nocilla sin medicamento y fueron empleados como control, ya que los flavonoles presentes en el cacao pueden afectar a la neurogénesis tanto en roedores (Valente y col., 2009) como en seres humanos (Sokolov y col., 2013).

Para profundizar en la naturaleza de las interacciones entre los receptores del SRA en el control de la neurogénesis en la V-SVZ (ver Justificación y objetivos, objetivo 1.1), se realizó un tercer bloque de experimentos para estudiar la expresión de los receptores AT1 y AT2 en la V-SVZ de ratones jóvenes WT (n = 5), KO-AT1 (n = 5), KO-AT2 (n = 5) y de ratones jóvenes WT tratados con el antagonista de AT1 candesartán (n = 5) y en cultivos de neuroesferas control tratados con el antagonista de AT2 PD o con el antagonista de AT1 candesartán. En este tercer bloque de experimentos, también estudiamos el efecto de la delección específica de *Agtr1a* y de *Agtr2* sobre la generación de esferas *in vitro*.

En el siguiente bloque de experimentos, para determinar el papel del brazo protector del SRA sobre la neurogénesis en animales envejecidos (ver Justificación y objetivos, objetivo 1.1), se trataron neuroesferas obtenidas de animales jóvenes y envejecidos con agonistas y antagonistas de AT2 y MasR. Como agonista de AT2 se utilizó CGP42212A y como antagonista de AT2, PD123319 (ver arriba). Como agonista de MasR se utilizó Ang (1-7) (1  $\mu$ M; A9202, Sigma) y

como antagonista, A779 (1  $\mu$ M; H-2888, Bachem, Bubendorf, Suiza) (Costa-Besada y col., 2018).

En una quinta serie de experimentos, con el objetivo de investigar posibles diferencias entre especies en la regulación de la neurogénesis adulta mediada por el SRA (ver Justificación y objetivos, objetivo 1.1), estudiamos la presencia de los principales componentes del SRA y las interacciones entre ellos en la V-SVZ de ratas (n = 7) y ratones (n = 4) jóvenes (3-4 meses de edad) y de ratas envejecidas (n = 3) (20-22 meses de edad). Subconjuntos de ratas jóvenes (n = 10) y envejecidas (n = 10) se trataron con el antagonista del receptor AT1 candesartán, tal y como se ha descrito anteriormente, y se evaluó la proliferación y generación de neuroblastos *in vivo* en comparación con animales control de la misma edad (controles jóvenes n = 7; controles envejecidos n = 9).

En un sexto bloque de experimentos, con el objetivo de estudiar el papel de posibles interacciones entre el SRA y la dopamina en la proliferación de NSCs/NPCs derivadas de la V-SVZ adulta (ver Justificación y objetivos, objetivo 1.2), se trataron neuroferas obtenidas de ratones WT y de ratones KO-AT2 jóvenes (3-4 meses de edad) con agonistas y antagonistas de ambos sistemas. Como agonistas del SRA, se utilizaron los siguientes fármacos: AngII (100 nM), CGP42112A (1  $\mu$ M) y C21 (1  $\mu$ M). Como antagonistas del SRA se emplearon candesartán (1  $\mu$ M) y PD123319 (1  $\mu$ M). Como agonistas del sistema dopaminérgico, se emplearon los siguientes fármacos: dopamina (10  $\mu$ M; H8502, Sigma), SKF38393 (agonista de la familia de receptores de dopamina D1; 10  $\mu$ M; S101, Sigma), quinpirol (agonista de la familia de receptores de dopamina D2; 10  $\mu$ M; Q102, Sigma) y 7-OH-DPAT (agonista del receptor de dopamina D3; 100 nM; H8653, Sigma). Como antagonistas del sistema dopaminérgico, se emplearon: SCH23390 (antagonista de la familia de receptores D1; 10  $\mu$ M; D054, Sigma), raclopride (antagonista de la familia de receptores D2; 100 nM; 1810, Tocris) y SB277011A (antagonista del receptor de dopamina D3; 100 nM; 4207, Tocris).

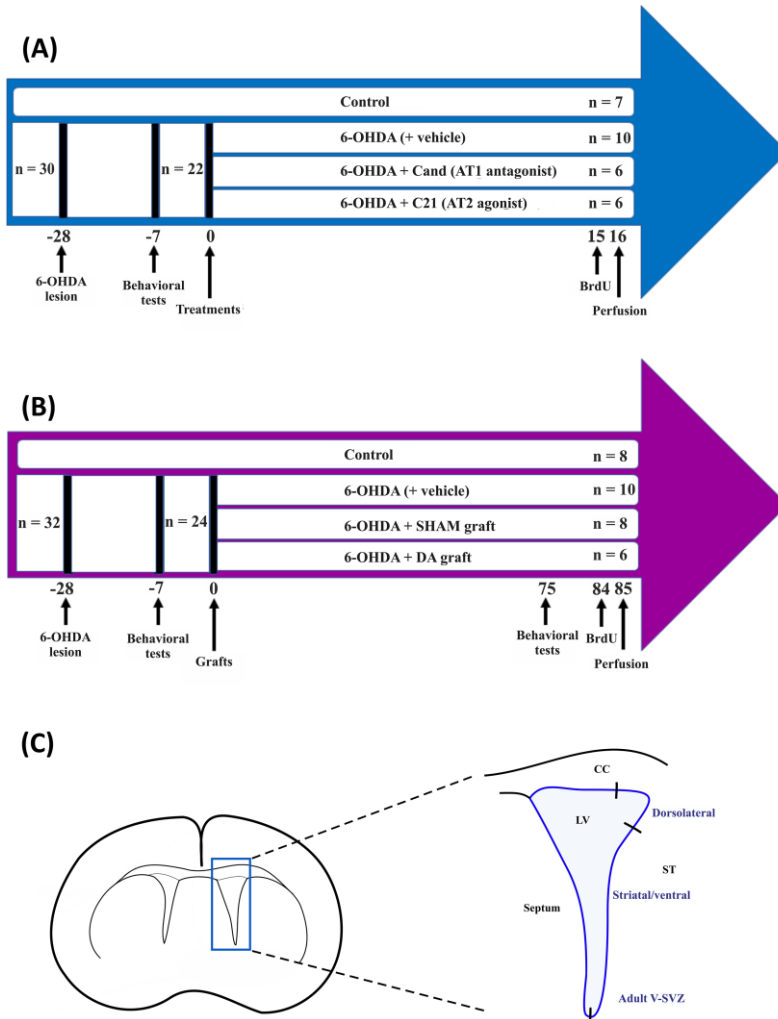
Para estudiar posibles interacciones entre el SRA y el sistema dopaminérgico en un modelo animal de EP (ver Justificación y objetivos, objetivo 1.3), un grupo de ratas jóvenes adultas se sometió a una depleción dopaminérgica unilateral inducida con 6-OHDA (n = 22)

(Figura 5). Un mes después de la administración de 6-OHDA (ver Material y métodos, apartado [3.2.11](#)), se seleccionaron las ratas con una lesión maximal (depleción dopaminérgica > 90%) mediante el test de comportamiento del cilindro y del rotómetro (ver Material y métodos, apartado [3.2.13](#)). Una semana después de la última prueba, los animales se distribuyeron aleatoriamente en 3 grupos experimentales. A los animales del primer grupo (n = 6) se les administró el antagonista de AT1 candesartán por vía oral, mientras que los animales del segundo grupo (n = 6) recibieron inyecciones i.p. diarias del agonista de AT2 C21, tal y como se ha descrito previamente. Un tercer grupo de animales, compuesto por ratas lesionadas con 6-OHDA (n = 10), recibió inyecciones del vehículo durante 15 días. Por último, se incluyó un grupo de ratas jóvenes sin lesionar (n = 7) que se utilizó como grupo control (Figura 5).

Para estudiar el efecto de los trasplantes dopaminérgicos sobre la neurogénesis adulta de la V-SVZ (ver Justificación y objetivos, objetivo 1.3), se empleó un nuevo grupo de ratas sometidas a depleción dopaminérgica maximal tras la administración de 6-OHDA (n = 24), que se distribuyeron aleatoriamente en 3 grupos experimentales (Figura 5). Un primer grupo de ratas lesionadas con 6-OHDA (n = 6) recibió implantes de suspensiones celulares mesencefálicas en el estriado denervado. Otro grupo de animales lesionados (n = 8) recibió un trasplante simulado (*sham*), es decir, inyecciones intraestriatales de vehículo sin células en las mismas coordenadas que los animales del grupo anterior. Un tercer grupo de animales se compuso de ratas lesionadas con 6-OHDA (n = 10). Todos los animales lesionados y trasplantados con células o vehículo se sometieron a los tests de comportamiento correspondientes (test del cilindro y del rotómetro) y se sacrificaron una semana después de la última prueba. Como grupo control, se utilizaron ratas jóvenes (n = 8) de la misma edad sin lesionar (Figura 5).

Para evaluar los efectos *in vivo* de los distintos tratamientos sobre la proliferación celular en la V-SVZ, todos los animales de los grupos experimentales anteriormente mencionados recibieron, el último día de tratamiento, cuatro pulsos de bromodesoxiuridina (BrdU; 50 mg/kg; B5002, Sigma) cada dos horas por vía i.p. Los animales se sacrificaron

24 h después de recibir el último pulso de BrdU (Figura 5). Este período de supervivencia de 24 h permite marcar las células y la progenie celular de las células que se encontraban en fase S del ciclo celular durante la administración de BrdU hasta el momento del sacrificio. Un subgrupo de los animales tratados durante 15 días con C21 o con el vehículo correspondiente se sacrificó un mes después de recibir 4 inyecciones diarias de BrdU, una cada dos horas. De esta forma, se permite que las células recién generadas se diferencien completamente y es posible determinar el fenotipo de las células que retienen la marca BrdU (BrdU-LRC, del inglés *BrdU-Label Retaining Cells*) en el BO (Delgado y col., 2014).



**Figura 5.** Diseño experimental y cronología de los experimentos *in vivo* para estudiar el papel de la dopamina y su interacción con el sistema renina-angiotensina (SRA) en la regulación de la neurogénesis adulta en la zona ventricular-subventricular (V-SVZ) de ratas adultas. Un primer conjunto de animales (A) se utilizó para estudiar el efecto de las interacciones entre dopamina y SRA sobre la neurogénesis adulta de la V-SVZ en ratas con denervación dopaminérgica tras la inyección de 6-hidroxidopamina (6-OHDA). Un segundo conjunto de animales (B) se utilizó para estudiar el efecto de implantes dopaminérgicos (DA) sobre la neurogénesis adulta en la V-SVZ. (C) Diagrama esquemático de las áreas dorsolateral y estriatal/ventral de la V-SVZ analizadas en este estudio. Cand = candesartán; BrdU = bromodesoxiuridina; CC = cuerpo calloso; LV = ventrículo lateral; ST = estriado; sham = trasplante simulado. Figura realizada con Inkscape (<https://inkscape.org/es/>).

### 3.2.2. Cultivo de neuroferas derivadas de la V-SVZ de ratones adultos

Se establecieron cultivos de neuroferas derivadas de la V-SVZ de animales adultos (ratones WT, KO-AT1 y KO-AT2, jóvenes y envejecidos) siguiendo protocolos descritos previamente con ligeras modificaciones (Belenguer y col., 2016; Ferrón y col., 2007). Tras extraer el cerebro, la disección se realizó bajo microscopio quirúrgico (Leica M220 F12, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) a 16x en un soporte con glucosalino (615-047, Fresenius Kabi) frío. La V-SVZ resultante de cada hemisferio se troceó para obtener 3-4 fragmentos que se incubaron en una solución enzimática de papaína (12 U/ml; LS003119, Worthington, Lakewood, NJ, EEUU), clorhidrato de L-cisteína (0,2 mg/ml; 168149, Sigma) y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA; 0,2 mg/ml; ED2SS, Sigma) en EBSS (E2888, Sigma) a 37 °C durante 15 min. La suspensión celular resultante se sembró en medio Eagle modificado de Dulbecco : mezcla de nutrientes F-12 (DMEM/F-12; 11320-074, ThermoFisher Scientific, Paisley, Escocia) suplementado con 10% de glucosa (60 mg/ml; G6152, Sigma), 10% de cóctel hormonal 10x [DMEM/F-12 suplementado con 0,5% de glucosa, 0,09% de bicarbonato de sodio (S5761, Sigma), HEPES 4 mM (H3375, Sigma), apotransferrina humana 0,8 mg/ml (T4382, Sigma), insulina de páncreas bovino 0,2 mg/ml (I6634, Sigma), putrescina 90 µg/ml (P5780, Sigma), progesterona 160 nM (P8783, Sigma) y selenito sódico 240 nM (S5261, Sigma)], 2% de albúmina de suero bovino (BSA, del inglés *Bovine Serum Albumin*; 50 mg/ml; A7906, Sigma), 1% de bicarbonato de sodio (100 mg/ml), 1% de heparina (400 µg/ml; H3149, Sigma), 1% de HEPES (500 mM), 1% de L-glutamina (200 mM; G7513, Sigma), 1% de fungizona (250 µg/ml; A2942, Sigma) y 0,5% de penicilina-estreptomicina (10.000 U/ml penicilina, 10.000 µg/ml estreptomicina; 15140-122, Gibco, Waltham, MA, EEUU). Al medio de cultivo se añadieron, además, EGF (20 ng/ml; 315-09, PeproTech, Londres, Reino Unido) y FGF humano básico (bFGF, del inglés *human basic fibroblast growth factor*; 10 ng/ml; 100-18B, PeproTech) como mitógenos. Los cultivos se mantuvieron en un incubador humidificado con control de CO<sub>2</sub> (Forma™ Steri-Cycle™ i160, 51030301, ThermoFisher Scientific) a 37 °C, con 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad

relativa. Transcurridos 7-10 días *in vitro* (DIV), se observó la formación de neurosféricas primarias que se contabilizaron y subcultivaron para expandir el cultivo.

### **3.2.3. Expansión y cuantificación de neurosféricas**

Las neurosféricas primarias obtenidas se disociaron mecánicamente mediante 80-85 pases con una micropipeta P100, hasta obtener una suspensión de célula única que se resembró en medio de crecimiento (ver Material y métodos, apartado [3.2.2](#)) suplementado con mitógenos para obtener neurosféricas secundarias.

Para estudiar el efecto de manipulaciones del SRA y del sistema dopaminérgico sobre la capacidad de autorrenovación de las NSCs y NPCs que forman las neurosféricas, los pocillos se trataron en el momento de la siembra con agonistas y antagonistas específicos (ver Material y métodos, apartado [3.2.1](#)). El cultivo se mantuvo hasta que las neurosféricas secundarias alcanzaron un tamaño adecuado (diámetro de 40-150  $\mu\text{m}$ ), aproximadamente 6 DIV después de su siembra, para su cuantificación y determinación de su diámetro como parámetro indicador de su proliferación (Ferrón y col., 2007). Diversos estudios sugieren que el BrdU puede tener efectos citotóxicos sobre las NPCs *in vitro* e influenciar negativamente su proliferación, ciclo celular, supervivencia y diferenciación (Gil-Perotín y col., 2013; Schneider y d'Adda di Fagagna, 2012), por lo que el diámetro de las neurosféricas se considera un buen indicador del índice de proliferación en cultivo (Ferrón y col., 2007; Gil-Perotín y col., 2013; Mori y col., 2006). Para estudiar el efecto de manipulaciones del SRA y del sistema dopaminérgico sobre la expresión de receptores de AngII y de dopamina, las neurosféricas secundarias ya formadas se mantuvieron en presencia de los distintos tratamientos (ver Material y métodos, apartado [3.2.1](#)) durante 6 h. En los experimentos en los que se realizaron cotratamientos de agonistas/antagonistas, los antagonistas se administraron 30 min antes de los tratamientos correspondientes.

Transcurridos 6 DIV en presencia de los distintos tratamientos, el número de neurosféricas secundarias se cuantificó manualmente a 10x con un microscopio invertido para campo claro (Nikon Eclipse Ts2, Nikon, Ámsterdam, Países Bajos). Los pocillos se fotografiaron para

posteriormente determinar el diámetro de las neurosféricas secundarias mediante el software de análisis de imagen ImageJ (Wayne Rasband, NIH). Las neurosféricas secundarias se sembraron para obtener, en pases sucesivos, neurosféricas terciarias y cuaternarias, cuyo número y diámetro se estimaron en los experimentos correspondientes tras 6 DIV.

#### 3.2.4. Extracción de ARN y PCR en tiempo real de neurosféricas

El ARN total de cada grupo experimental se aisló de neurosféricas secundarias sometidas al tratamiento correspondiente durante 6 h según se ha descrito previamente (Rodríguez-Pallares y col., 2007) utilizando el reactivo TRI (T9424, Sigma) según las instrucciones del fabricante. Se añadieron 500  $\mu$ l de reactivo por pocillo para favorecer la lisis celular y la inactivación de ARNasas intercelulares. La utilización secuencial de cloroformo (100  $\mu$ l/muestra; CL02031000, Scharlau, Sentmenat, España) e isopropanol (250  $\mu$ l/muestra; AL03101000, Scharlau) permitió separar la muestra en 3 fases (ARN, ADN y proteínas) y precipitar el ARN, respectivamente. La concentración y pureza del ARN aislado se determinó mediante un espectrofotómetro de microvolúmenes (NanoDrop™ One, ND-ONE-W, ThermoFisher Scientific). Las ratios A280/260 y A260/230, proporcionadas por el equipo, se utilizaron para estimar la presencia de fenoles y de sales en la muestra, respectivamente.

A continuación, se retrotranscribió una cantidad total de 1  $\mu$ g de ARN por muestra para obtener ADN complementario (ADNc), utilizando el kit High-capacity RNA-to-cDNA™ (4387406, Applied Biosystems, Waltham, MA, EEUU) según las instrucciones del fabricante. La expresión de ARNm de ANG, AT1, AT2, D1, D2 y D3 se determinó mediante PCR en tiempo real (qPCR, del inglés *quantitative polymerase chain reaction*) utilizando una plataforma QuantStudio3™ (A28131, Applied Biosystems), BlasTaq™ 2X qPCR MasterMix (G892, Applied Biological Materials, Richmond, Canadá) y los cebadores correspondientes (Sigma) (Tabla 1). El diseño de los cebadores para cada gen de interés se realizó empleando la herramienta NCBI Primer-Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). La eficiencia de amplificación de los cebadores, determinada mediante ensayos de validación en muestras del tejido correspondiente,

fue: 106% para AT1, 98% para AT2, 99% para D1, 94% para D2 y 95% para  $\beta$ -actina en ratón; y 114% para AT1 y 114% para AT2 en rata. Siempre que fue posible, se diseñaron cebadores que estuviesen entre exones en el ADN genómico correspondiente. El ARN total sin transcribir se utilizó como control negativo. La cuantificación de los niveles de expresión de ARNm se realizó según el método de comparativa del ciclo umbral (*Ct*, del inglés *Cycle threshold*) que utiliza la fórmula  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , donde  $\Delta C_t$  es la diferencia entre el valor *Ct* del gen de referencia ( $\beta$ -actina), que se expresa constitutivamente en las células de partida, y el valor *Ct* del gen de interés.

El ADNc amplificado se resolvió en un gel de agarosa al 2% que se tiñó con SYBR Safe (1:10000; S33102, ThermoFisher Scientific) para visualizar las bandas correspondientes de ANG, AT1a, AT2, D1, D2 y D3. El gel se fotografió con un transiluminador ultravioleta (UV) (Molecular Imager® ChemiDoc™ XRS System, 170-8070, Bio-Rad, Hercules, CA, EEUU) para visualizar el amplicón correspondiente.

	Gen	Cebador <i>Forward</i> (F)	Cebador <i>Reverse</i> (R)
Ratón	<i>Agt</i>	5' - CTGCTGGCTGAGGACAAG - 3'	5' - CGAGGAGGATGCTATTGAGAA - 3'
	<i>Agtr1a</i>	5' - CTCTGCTGCTCTCCCGACTTAA - 3'	5' - AGGGCCATTTTGCTTTTCTGGGT - 3'
	<i>Agtr2</i>	5' - CTGGCAAGCATCTTATGTAGTTC - 3'	5' - CAAGCATTACACCTAAGTATTCA - 3'
	<i>Drd1</i>	5' - CAGCGTGGACAGGTATTGG - 3'	5' - TGGAATGAAGGATATGAGAACAGA - 3'
	<i>Drd2</i>	5' - GCAGACCACCAACTA - 3'	5' - CCACCAACCTCCAGATAGAC - 3'
	<i>Drd3</i>	5' - GGAGCGAGCCCTACAGACCA - 3'	5' - CTCCACCTGTACCTCCAAGT - 3'
	<i>Actb</i>	5' - TCGTGCGTGACATTAAGAG - 3'	5' - TGCCACAGGATTCCATACC - 3'
Rata	<i>Agtr1a</i>	5' - GTTAAGGGCCATTTTGTCTTTCTGG - 3'	5' - TTGTCTGGATAAATCACACAACCC - 3'
	<i>Agtr2</i>	5' - AACATCTGCTGAAGACCAATAG - 3'	5' - AGAAGGTCAGAACATGGAAGG - 3'
	<i>Actb</i>	5' - TCGTGCGTGACATTAAGAG - 3'	5' - TGCCACAGGATTCCATACC - 3'

Tabla 1. Cebadores utilizados para qPCR

### 3.2.5. Cromatografía líquida de alta resolución

#### 3.2.5.1. Determinación de los niveles de ANG

Para determinar los niveles de ANG en el medio de cultivo de neuroesferas se empleó la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, del inglés *high performance liquid chromatography*) tal y como se ha descrito previamente (Domínguez-Mejide y col., 2017). El medio de cultivo se separó de las células

mediante centrifugación y se tomó una muestra de 1 ml que se calentó a 37 °C. Posteriormente, se inyectó un volumen de 20 µl por muestra en un sistema HPLC Shimadzu (Shimadzu, Kyoto, Japón). La fracción que contenía el ANG se separó mediante una columna de fase reversa (Perkin Elmer Aquapore ODS300, Perkin Elmer, Madrid, España) a 37 °C y a un flujo de 1,5 ml/min. La separación se produjo en dos etapas: una elución isocrática inicial (5% de acetonitrilo con un 0,1% de ácido fosfórico durante 5 min) seguida de un gradiente lineal de acetonitrilo desde 5% hasta 66,5% con un 0,1% de ácido fosfórico a lo largo de 30 min (Andrade y col., 2002). La fracción eluida con el ANG se visualizó a 240 nm con un detector UV-VIS (Shimadzu SPD-20-AV, Shimadzu), se recogió mediante un colector de fracciones (Shimadzu FRC-10A, Shimadzu) y se secó en un concentrador de vacío (Thermo Scientific™ Savant™ ISS110 SpeedVac™, ThermoFisher Scientific). El precipitado resultante se resuspendió en tampón de ensayo de radioinmunoprecipitación (RIPA, del inglés *radioimmunoprecipitation assay buffer*; Tris-Cl 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, 1% Triton X-100, 1% SDS, 0,1% desoxicolato de sodio) con inhibidores de proteasas (1:200; P8340, Sigma) y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF; 1:100; P7626, Sigma) para confirmar la presencia de ANG en la fracción separada mediante Western blot (WB) (ver Material y métodos, apartado [3.2.6](#)).

#### 3.2.5.2. Determinación de los niveles de catecolaminas

Para determinar los niveles de dopamina y DOPAC mediante HPLC, a cada muestra de medio de cultivo de neuroesferas (1 ml) se añadieron 0,25 ml de una solución de ácido perclórico 0,5 M que contenía metabisulfito de sodio (0,5 M), EDTA (0,5 M) y 5% de etanol para favorecer la precipitación de las proteínas. Posteriormente, la fracción proteica se eliminó mediante centrifugación y la muestra se hizo pasar a través de un filtro de 0,2 µm (83.1826.001, Sarstedt AG y Co. KG, Nümbrecht, Alemania). La fracción que contenía la dopamina y el DOPAC se separó mediante una columna de fase reversa (Symmetry C18 Column, Waters Corporation, Milford, MA; EEUU) a un flujo isocrático de 1 ml/min durante 20 min. La fase móvil consistía en una solución acuosa al 10% de metanol (pH 4,0) con KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (70

mM), ácido octanosulfónico (1 mM) y EDTA (1 mM). Los niveles de dopamina y DOPAC en la fracción eluida correspondiente se visualizaron con un detector electroquímico coulombimétrico (ESA Coulochem III, Eagle Superabrasives Inc., Hickory, NC, EEUU). Las diferencias de potencial del primer y del segundo electrodo de la celda analítica se establecieron a +50 mV y +350 mV, respectivamente, y la de la celda de protección a +100 mV.

### 3.2.6. WB

La presencia de ANG en la fracción de medio de cultivo de neurosféricas separada por HPLC y la de los receptores de AngII AT1 y AT2 en la V-SVZ de ratón microdisecionada se determinaron mediante WB. El contenido proteico de las muestras se determinó con el kit Pierce<sup>TM</sup> BCA Protein Assay (23225, ThermoFisher Scientific). Cantidades equivalentes de proteína (25 µg) se separaron mediante electroforesis en geles de bis-tris-poliacrilamida al 5-10% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (0,45 µm; 1620115, Bio-Rad). Como marcador de peso molecular, se utilizó el kit Precision Plus Protein<sup>TM</sup> Dual Color Standards (1610374, Bio-Rad). Las membranas se incubaron durante 16 h a 4 °C en presencia de los anticuerpos primarios correspondientes: cabra anti-ANG (1:200; SC-7419, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EEUU), cabra anti-AT1 (1:200; SC-31181, Santa Cruz, Biotechnology) o conejo anti-AT2 (1:200; SC-9040, Santa Cruz Biotechnology). Los anticuerpos se prepararon en leche en polvo desnatada al 5% en tampón fosfato salino (PBS, del inglés *phosphate buffered saline*) con 0,1% Tween-20. Tras realizar los lavados correspondientes, las membranas se incubaron durante 1 h en presencia de un anticuerpo secundario burro anti-cabra IgG conjugado con peroxidasa de rábano (HRP, del inglés *horseradish peroxidase*; 1:2500; SC-2020, Santa Cruz Biotechnology) y proteína A (1:5000; GENA9120, Sigma) a temperatura ambiente (RT del inglés, *room temperature*). Las bandas inmunorreactivas se detectaron con el kit Immobilon® Crescendo Western HRP (WBLUR0500, Millipore, Billerica, MA, EEUU) y se visualizaron con un sistema de detección de quimioluminiscencia (Molecular Imager® ChemiDoc<sup>TM</sup> XRS System, 170-8070, Bio-Rad). Como control positivo para la detección de AT1 y

AT2 en la V-SVZ se utilizaron homogenados de estriado. Las membranas se reincubaron con conejo anti-gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH; 1:50000; G9545, Sigma), que se utilizó como control de carga.

La especificidad de los anticuerpos anti-AT1 SC-31181 y anti-AT2 SC-9040 empleados tanto para ensayos de WB como de inmunohistoquímica (ver Material y métodos, apartado [3.2.14](#)) se ha demostrado previamente (Giles y col., 1999; Obermüller y col., 2004; Ruiz-Ortega y col., 2003) y en nuestro laboratorio (Rodríguez-Pérez y col., 2010; Valenzuela y col., 2016). Para ello, se realizó primero una validación mediante preadsorción con el antígeno peptídico correspondiente (Rodríguez-Pérez y col., 2010) y, más recientemente, se detectó la presencia de bandas inmunorreactivas en lisados de células HEK293 transfectadas con AT1 o AT2 marcados con el epítipo DDK (DYKDDDDK; TA50011, Origene, Rockville, MD, EEUU) o su ausencia cuando los lisados procedían de células transfectadas con los vectores vacíos (Valenzuela y col., 2016).

### **3.2.7. Diferenciación de neurosféricas**

Las NSCs/NPCs adultas retienen *in vitro* su capacidad para diferenciarse a neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. Para estudiar el efecto de la activación de los receptores de dopamina de tipo D2 sobre la diferenciación de las neurosféricas derivadas de la V-SVZ, se sembraron células derivadas de neurosféricas secundarias pretratadas con quinpirol sobre cubreobjetos recubiertos de sustrato adherente (Matrigel®; 1:100; 354230, Corning, Corning, NY, EEUU) en medio de crecimiento suplementado con bFGF (10 ng/ml). Transcurridos 2 DIV, el medio se reemplazó por medio de crecimiento fresco suplementado con 2% de suero fetal bovino inactivado por calor (FBSi, del inglés *heat-inactivated fetal bovine serum*; 35-079-CV, Corning). Al cabo de 7 DIV, los cultivos de neurosféricas diferenciadas se fijaron con paraformaldehído (PFA) previamente atemperado (2% en KPBS 0,1M, pH 7,4; 104005, Merck, Darmstadt, Alemania) durante 15 min a 37° C y se procesaron para inmunofluorescencia doble, tal y como se describe en el apartado [3.2.8](#).

### 3.2.8. Inmunocitoquímica y cuantificación celular

Para determinar el fenotipo adquirido por las neuroesferas sometidas a ensayos de diferenciación, los cultivos fijados se lavaron y se preincubaron en una solución de bloqueo con un 5% de suero normal de burro (NDS, del inglés *normal donkey serum*; ab7475, Abcam, Cambridge, Reino Unido), 0,3% de Triton X-100 (X-100, Sigma) y 1% de BSA (A2153, Sigma) en KPBS durante 1 h a RT. A continuación, los cultivos de neuroesferas diferenciadas se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes: conejo anti-GFAP (como marcador de astrocitos; 1:2000, Z0334, Dako-Agilent, Santa Clara, CA, EEUU) y ratón anti- $\beta$ -III-tubulina (como marcador neuronal; 1:500, ab78078, Abcam) 16 h a 4 °C. Posteriormente, los cultivos se lavaron y se incubaron en presencia de los anticuerpos secundarios fluorescentes correspondientes: burro anti-conejo 568 nm (1:200; A10042, Invitrogen, Waltham, MA, EEUU) y burro anti-ratón 488 nm (1:200; A21202, Invitrogen) durante 2 h 30 min a RT. Los núcleos celulares se marcaron con el fluoróforo de unión a ADN Hoechst-33342 (30  $\mu$ M en KPBS; B2261, Sigma) durante 20 min a RT. Por último, los cubreobjetos se montaron con el medio de montaje Immu-Mount™ (9990402, ThermoFisher Scientific). El número de células GFAP-inmunoactivas (-ir) y  $\beta$ -III-tubulina-ir se cuantificó en al menos 5 campos microscópicos aleatorios dentro del área de cada cubreobjetos (~113 mm<sup>2</sup>) empleando un microscopio invertido (Nikon Eclipse, Nikon) a 20x. Los resultados se obtuvieron de al menos tres experimentos independientes y se normalizaron respecto a los valores obtenidos en el grupo control de la misma tanda (100%). El porcentaje de células positivas se expresó como la media de células positivas para cada marcador con respecto al número total de núcleos en cada campo.

### 3.2.9. Microdissección de captura guiada por láser

Los cerebros de ratas y ratones sacrificados mediante decapitación se extrajeron rápidamente, se congelaron en nitrógeno líquido para minimizar la degradación del ARN y se almacenaron a -80 °C hasta su procesamiento. En el criostato, se realizaron cortes coronales de 20  $\mu$ m de grosor y las secciones que contenían la V-SVZ se montaron inmediatamente en portaobjetos de vidrio, previamente esterilizados

mediante la exposición secuencial a luz UV (10-15 min) y a altas temperaturas (2 h a 220 °C). Las muestras se deshidrataron completamente en la cámara del criostato y se mantuvieron durante una semana, como máximo, a -80 °C en contenedores estériles de plástico en contacto con gel de sílice para evitar la hidratación del tejido. Tras una fijación rápida con etanol al 70%, las secciones se hidrataron para someterse a una tinción rápida con rojo neutro (1% en solución acuosa de dietilpirocarbonato, DEPC; 72210, Sigma) durante 2 min. A continuación, el tejido se expuso a concentraciones crecientes de etanol y se sumergió en xilol (211769, PanReac AppliChem, Darmstadt, Alemania) durante 4 min para conseguir la deshidratación total de las muestras.

La microdissección de captura guiada por láser (MCL) se realizó con el sistema de microdissección PALM MicroBeam (Zeiss, Jena, Alemania) que consta de un microscopio invertido con una pletina motorizada y un láser UV, controlados por el software PALM Robo (Zeiss). La V-SVZ y las células estriatales utilizadas como control se visualizaron con microscopía de campo claro a 40x (EC Plan-NEOFLUAR; apertura numérica 1.3; Zeiss) con la ayuda de una cámara AxioCam Icc (Zeiss). Se seleccionaron áreas de 0,4 mm<sup>2</sup> o de 1 mm<sup>2</sup> según el tejido procediera de ratón o de rata, respectivamente, que se cortaron y catapultaron con pulsos de láser a la tapa adhesiva de un microtubo. Cada muestra se incubó con 350 µl de tampón de lisis RLT (Qiagen, Hilden, Alemania) con β-mercaptoetanol (1:100; M3148, Sigma) durante 30 min a RT en agitación. Finalmente, los microtubos se sometieron a una centrifugación rápida para recolectar la muestra en la base del tubo y se conservaron a -80 °C hasta finalizar la obtención de las muestras y llevar a cabo la extracción de ARN del conjunto de estas (Garrido-Gil y col., 2017a).

### **3.2.10. Extracción de ARN y qPCR de V-SVZ obtenida por MCL**

La extracción del ARN del tejido obtenido mediante MCL se realizó con el kit RNeasy® Micro Kit (74004, Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. A cada muestra se le añadió tampón de lisis y etanol para promover la unión selectiva del ARN a las membranas de

sílce presentes en las columnas de centrifugación. Los restos de ADN genómico se eliminaron mediante un tratamiento con DNasa (79254, Qiagen). Finalmente, el ARN aislado se eluyó en 14 µl de agua libre de ARNasas.

El ARN total obtenido de cada muestra se retrotranscribió a ADNc en una reacción catalizada por la transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina de Moloney (M-MLV, del inglés *Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase*; 1,67 U/µl; 28025-013, Invitrogen) en presencia de hexanucléotidos como cebadores aleatorios (5 µg/ml; 48190011, Invitrogen), de nucleósidos trifosfato (dNTPs; 0,3 mM; Applied Biological Materials), del estabilizador de la M-MLV ditiotreitol (DTT; 6,6 mM; Invitrogen) y de la enzima inhibidora de ribonucleasas RNase Out (1,33 U/µl; 10777019, Invitrogen). El ADNc se amplificó mediante qPCR y la expresión de ARNm se cuantificó tal y como se describe en el apartado [3.2.4](#), utilizando los cebadores correspondientes (Tabla 1).

### 3.2.11. Modelo animal de 6-OHDA

Para la obtención de un modelo animal de EP se emplearon ratas jóvenes a las que se les inyectó unilateralmente la neurotoxina dopaminérgica 6-OHDA en la vía nigroestriada. Treinta minutos antes de la cirugía, las ratas recibieron una inyección subcutánea de meloxicam (1 mg/kg; CP-Pharma, Burgdorf, Alemania) como analgésico y una inyección i.p. de desipramina (25 mg/kg; D3900, Sigma) para prevenir la recaptación de la neurotoxina por parte de las neuronas noradrenérgicas. Los animales se anestesiaron profundamente con una mezcla de ketamina (50 mg/kg; Ketamidol®, CN: 580393.7, Richter Pharma, Wels, Austria) y medetomidina (0,4 mg/kg; Domtor®, CN: 570686.3, Ecuphar, Barcelona, España) inyectada por vía i.p. A continuación, los animales se colocaron en un equipo de inyección estereotáxico (51600, Stoelting, Wood Dale, IL, EEUU).

Una vez expuesto el cráneo, se inyectaron 12 µg de hidrocloreto de 6-OHDA (3 µg/µl en salino estéril con 0,2% de ácido ascórbico; H4381, Sigma) en el FMP (Rodríguez-Pallares y col., 2012a, 2016) en las siguientes coordenadas: 3,7 mm posterior a Bregma, -1,6 mm lateral a Bregma y 8,8 mm ventral a la superficie del cráneo (Paxinos y

Watson, 1998), con la barra dental ajustada a -3,3 mm. La solución de 6-OHDA se inyectó utilizando una jeringa Hamilton de 10  $\mu$ l (701RN; 80330, Hamilton, Bonaduz, Suiza) a un flujo constante de 1  $\mu$ l/min. Tras finalizar la cirugía, los animales recibieron una inyección i.p. de hidroclicloruro de atipamezol (0,5 mg/kg; Antisedan®, CN: 570153.0, Ecuphar) para revertir los efectos de la anestesia y una inyección subcutánea de meloxicam (1 mg/kg) como analgésico 24 h después de la cirugía. Transcurridas 48-72 h, se valoró la necesidad de nuevas administraciones de meloxicam en función del dolor aparente observado en los animales.

### **3.2.12. Trasplante de precursores mesencefálicos fetales**

Para estudiar el efecto de la dopamina en la neurogénesis de la V-SVZ, ratas con lesiones maximales del sistema dopaminérgico (ver Material y métodos, apartado [3.2.11](#)) recibieron trasplantes intraestriatales de suspensiones de precursores mesencefálicos fetales. El tejido para los implantes se obtuvo a partir del mesencéfalo ventral de embriones de rata de 13 días de gestación (E13) tal y como se ha descrito previamente (Dunnet y Björklund, 1992; Rodríguez-Pallares y col., 2000). Los fragmentos del tejido obtenido se incubaron en una solución enzimática de tripsina (1 mg/ml; T-8523, Sigma) y DNasa (0,5 mg/ml; DN25, Sigma) en DMEM (15-013-CV, Corning) a 37 °C durante 20 min. Posteriormente, el tejido se disgregó mecánicamente y la suspensión celular resultante se centrifugó a 50 g durante 5 min a RT. Una vez descartado el sobrenadante, el pellet se resuspendió en DMEM con 0,05% DNasa. Antes de cada implante, la concentración y viabilidad celular de la suspensión se determinaron con un hemocitómetro utilizando el colorante vital azul de tripano (Trypan Blue 0,4%; 1:1; T8154, Sigma). Se preparó una suspensión celular con una concentración aproximada de  $1,65 \times 10^5$  células/ $\mu$ l, cuya viabilidad antes del trasplante fue de un 90-95%. Para realizar el implante, se cargó un volumen total de 3  $\mu$ l de la suspensión celular en una jeringa Hamilton y se inyectó en el estriado en las coordenadas 0,6 mm anterior a Bregma, -2,7 mm lateral a la línea media y 4,5 mm ventral desde duramadre, con la barra dental ajustada a 0,0 mm. Otro grupo de animales (trasplante simulado, *sham*) recibió inyecciones

intraestriales con vehículo (DMEM/DNasa) en las mismas coordenadas (Rodríguez-Pallares y col., 2012a, 2016).

### **3.2.13. Pruebas de comportamiento**

Para evaluar el grado de la lesión dopaminérgica y la supervivencia y funcionalidad de las células trasplantadas, se llevaron a cabo pruebas de comportamiento basadas en la detección de asimetrías motoras (Hamadjida y col., 2019). El grado de depleción dopaminérgica se determinó 1 mes poslesión y la supervivencia del implante 1, 2 y 3 meses postrasplante según el diseño experimental correspondiente y ambos parámetros se confirmaron posteriormente mediante inmunohistoquímica para TH (ver Material y métodos, apartado [3.2.14](#)). Las pruebas de comportamiento se llevaron a cabo durante las primeras horas del ciclo oscuro, cuando los animales están más activos (Lundblad y col., 2002).

#### **3.2.13.1. Test del cilindro**

El grado de asimetría en el uso de las extremidades anteriores se determinó mediante el test del cilindro desarrollado por Schallert y colaboradores (Schallert y col., 2000, 2006). Los animales se colocaron en el interior de un cilindro de vidrio transparente de 20 cm de diámetro y se observó su comportamiento exploratorio espontáneo. Un observador que no conocía el grupo experimental al que pertenecían los animales anotó el número de contactos de cada pata con la pared del cilindro hasta contabilizar un total de 20 contactos por animal. La asimetría en el uso de las extremidades anteriores se expresó como el porcentaje de contactos con la pata izquierda con respecto al número de contactos totales, de manera que un animal no lesionado obtendría una puntuación de aproximadamente el 50%.

#### **3.2.13.2. Test de comportamiento rotacional**

El comportamiento rotacional de los animales se evaluó con un rotómetro automatizado de 8 canales (Rota-Count System 8, 1368B-C, Columbus Instruments, Columbus, OH, EEUU) tras la inyección i.p. de D-anfetamina (5 mg/kg; A5880, Sigma), agonista indirecto de la dopamina. Los animales dispusieron de un período previo de

aclimatación al aparato de 15 min y su comportamiento rotacional se monitorizó en sesiones de 90 min. Se considera que un animal muestra una depleción dopaminérgica maximal ( $> 90\%$ ) cuando realiza  $\geq 7$  rotaciones ( $360^\circ$ ) netas por minuto ipsilaterales a la lesión (Hefti y col., 1980).

### **3.2.14. Inmunohistoquímica colorimétrica e inmunofluorescencia**

Los animales se anestesiaron profundamente con ketamina/medetomidina y se perfundieron transcárdicamente con PFA frío (4% en PBS 0,1M, pH 7,4) utilizando una bomba de perfusión (Masterflex® Console Drive con rotor HV-07015-52, Cole-Parmer Instrument Company, IL, EEUU). Los cerebros se extrajeron y se criopreservaron en una solución de sacarosa al 30% (141-621, PanReac AppliChem) a 4 °C. Posteriormente, se obtuvieron secciones coronales de 30  $\mu\text{m}$  en un criostato (Shandon Cryotome, ThermoFisher Scientific) y se almacenaron a -20 °C hasta su procesamiento.

Secciones seriadas que contenían la V-SVZ, el estriado o la sustancia negra se procesaron inmunohistoquímicamente para BrdU, DCX,  $\beta$ -III-tubulina y TH. Para la detección de BrdU, el tejido se sometió a una desnaturalización previa con HCl 2N durante 30 min a 37 °C seguida de lavados con tampón borato sódico 0,1 M (pH 8,9). La actividad endógena de la peroxidasa se bloqueó mediante la incubación con  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1.08597, Millipore) al 3% durante 5 min. Posteriormente, el tejido se preincubó con una solución de bloqueo que contenía un 5% de suero normal de caballo (NHS, del inglés *normal horse serum*; H0146, Sigma), 0,3% de Triton X-100 y 1% de BSA en KPBS durante 1 h a RT. A continuación, las secciones se incubaron durante 16 h a 4 °C con los anticuerpos primarios correspondientes: ratón anti-BrdU (marcador de células proliferativas; 1:500; B2531, Sigma), cabra anti-DCX (marcador de neuroblastos; 1:1000; SC-8066, Santa Cruz Biotechnology), ratón anti- $\beta$ -III-tubulina (marcador neuronal temprano; 1:1000) o ratón anti-TH (marcador de células dopaminérgicas; 1:10000; T2928, Sigma) en solución de bloqueo. A continuación, las secciones se incubaron en presencia del anticuerpo secundario biotinilado respectivo: caballo anti-ratón (1:200; BA-2001,

Vector Laboratories, Peterborough, Reino Unido) o caballo anti-cabra (1:200; BA-9500, Vector Laboratories) durante 1 h a RT. Por último, el tejido se incubó con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC; 1:150; PK-6100, Vector Laboratories) durante 1 h a RT. Para el revelado, se utilizó una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,04% y 3,3'-diaminobencidina (DAB; D5637, Sigma) al 0,05% en KPBS. Como resultado de la reacción, se obtuvo un precipitado marrón. Finalmente, las secciones se montaron en portaobjetos (76 x 26 mm, LineaLab) cubiertos con gelatina y se cubrieron con medio de montaje DPX (255254, PanReac AppliChem) y cubreobjetos (24 x 60 mm, Menzel-Gläser).

Secciones seleccionadas se procesaron para inmunofluorescencia doble con el objetivo de, por un lado, establecer la posible colocalización de los receptores de AngII AT1 y AT2 con distintas poblaciones celulares de la V-SVZ y, por otro, de identificar el fenotipo de las células proliferativas BrdU-ir de este nicho. Para ello, las secciones se incubaron con los correspondientes anticuerpos primarios: conejo anti-AT1 (1:100), cabra anti-AT2 (1:100), cabra anti-DCX (1:1000), ratón anti-GFAP (1:500; MAB360, Merck), conejo anti-GFAP (1:1000), ratón anti-BrdU (1:400), conejo anti-BrdU (1:500; ab152095, Abcam), ratón anti-Mash1 (marcador de NPCs; 1:150; 556604, Pharmigen, BD Biosciences) o conejo anti-Olig2 (marcador de oligodendrocitos; 1:1000; GTX132732, GeneTex, Hsinchu, Taiwan). La inmunofluorescencia doble para BrdU y Mash1 u Olig2 se llevó a cabo secuencialmente. En primer lugar, las secciones se incubaron en presencia del anticuerpo primario anti-BrdU correspondiente. Posteriormente, las secciones se preincubaron en tampón citrato sódico 0,01 M (pH 6,0) durante 30 min a 37 °C. A continuación, las secciones se incubaron con los anticuerpos primarios anti-Mash1 o anti-Olig2. Finalmente, las secciones se incubaron en presencia del cóctel correspondiente de anticuerpos secundarios fluorescentes: Alexa Fluor 568 burro anti-conejo (1:200), Alexa Fluor 488 burro anti-conejo (1:200; A21206, Invitrogen), Alexa Fluor 568 burro anti-cabra (1:200; A11057, Invitrogen), Alexa Fluor 488 burro anti-cabra (1:200; A11055, Invitrogen), Alexa Fluor 568 burro anti-ratón (1:200; A10037, Invitrogen) y Alexa Fluor 488 burro anti-ratón (1:200). Las

incubaciones con dichos anticuerpos se realizaron durante 2 h 30 min a RT. Para el marcaje de núcleos celulares, el tejido se incubó con Hoechst-33342 durante 20 min a RT. Finalmente, las secciones se montaron con el medio de montaje Immu-Mount™ y se visualizaron con un microscopio láser confocal Leica AOBS-SP5X (Leica Biosystems).

### 3.2.15. Cuantificación estereológica

El muestreo de células BrdU-ir, DCX-ir,  $\beta$ -III-tubulina-ir y TH-ir se realizó con la herramienta de cuantificación estereológica asistida por ordenador CASTGrid (CASTGrid System; CAST versión 2.1.5.9, Olympus, Ballerup, Dinamarca), compuesta por un microscopio invertido Olympus IX51, una pletina motorizada ProScan II X-Y (Prior Scientific, Rockland, MA, EEUU), un microcator que permite conocer el grosor de los disectores cuantificados (MT1201, Heidenhain, Alemania) y una videocámara en color (Victor Company of Japan, Yokohama, Japón) (Rodríguez-Pallares y col., 2012a).

Para realizar una cuantificación representativa de toda la V-SVZ, las células BrdU-ir, DCX-ir y  $\beta$ -III-tubulina-ir se contabilizaron en 5 secciones en el caso del cerebro de rata (2 rostrales, 2 centrales y 1 caudal) entre las coordenadas 1,70 mm y 0,20 mm respecto al punto craneométrico Bregma y 3 secciones (1 rostral, 1 central y 1 caudal) en el caso de cerebro de ratón, entre las coordenadas Bregma 1,54 y 0,14 mm (Paxinos y Watson, 1998). En ambos casos, la V-SVZ se delineó a un aumento de 10x y la cuantificación celular se realizó en áreas de conteo aleatorias de  $450 \mu\text{m}^2$  utilizando un objetivo 100x de inmersión (PlanApo; apertura numérica 1.4, Olympus).

Para la cuantificación de células TH-ir contenidas en los trasplantes y en la sustancia negra, la delineación del área de interés se realizó a 4x. En el caso de los implantes, la cuantificación de las neuronas TH-ir se llevó a cabo en todas las secciones que contenían el trasplante. En el caso de la sustancia negra, la cuantificación de neuronas TH-ir se llevó a cabo en 1 de cada 3 secciones por animal. En ambos casos, se utilizó un área de conteo de  $1800 \mu\text{m}^2$ . El número total de células BrdU-ir, DCX-ir,  $\beta$ -III-tubulina-ir y TH-ir se calculó mediante la fórmula del fraccionador óptico (West y col., 1991) y los volúmenes de la V-SVZ,

de la sustancia negra y del trasplante se estimaron mediante el método Cavalieri (Gundersen y col., 1988).

La estimación del número de células doblemente marcadas para BrdU y DCX, Mash1 u Olig2 se llevó a cabo en secciones representativas que cubrían toda la V-SVZ. Las células BrdU-ir se seleccionaron al azar en cada subregión de la V-SVZ (dorsolateral y estriatal/ventral) para determinar el porcentaje de células en proliferación que colocalizaban con cada marcador. Las cuantificaciones se realizaron bajo un microscopio invertido (Nikon Eclipse) a 40x. Los resultados se expresaron como porcentaje de células que mostraban colocalización de los dos marcadores a estudiar con respecto al número total de células doblemente marcadas en animales control (100%)

### **3.3. ESTUDIO DE LOS MECANISMOS IMPLICADOS EN LA SUPERVIVENCIA DE PRECURSORES DOPAMINÉRGICOS EN MODELOS ANIMALES DE EP**

#### **3.3.1. Diseño experimental**

En una primera serie de experimentos, para estudiar el posible efecto de la manipulación del SRA sobre la supervivencia y funcionalidad de implantes dopaminérgicos en un modelo animal de EP (ver Justificación y objetivos, objetivo 2.1), se emplearon ratas jóvenes adultas que fueron sometidas a depleción dopaminérgica maximal tras la administración de 6-OHDA (n = 14) (ver Material y métodos, apartado [3.2.11](#)). Los animales se distribuyeron aleatoriamente en dos grupos antes de recibir implantes de precursores dopaminérgicos fetales (ver Material y métodos, apartado [3.2.12](#)). El primer grupo (n = 7) recibió dosis diarias del antagonista de receptores AT1 candesartán, administrado por vía oral, tal y como se ha explicado previamente (ver Material y métodos, apartado [3.2.1](#)), desde 15 días antes de recibir el implante hasta el día anterior a su sacrificio. El segundo grupo recibió implantes de precursores mesencefálicos y dosis diarias del vehículo durante el mismo período que el grupo tratado con candesartán. Todos los animales se sometieron al test del rotómetro 1, 2 y 3 meses postrasplante.

En el siguiente bloque de experimentos, para estudiar los posibles mecanismos implicados en los efectos de la AngII sobre la supervivencia dopaminérgica (ver Justificación y objetivos, objetivo 2.2), tratamos cultivos de las líneas dopaminérgicas derivadas de roedores Mes23.5 y N27 y cultivos de la línea catecolaminérgica humana SH-SY5Y con AngII (100 nM) y evaluamos la viabilidad dopaminérgica, la generación de EOR y la expresión de *Klf9* en estos cultivos. Además, con el objetivo de determinar el papel de *Klf9* sobre la supervivencia dopaminérgica y su posible regulación por *Nrf2*, indujimos la sobreexpresión o el silenciamiento de *Klf9* o de *Nrf2* en cultivos dopaminérgicos sometidos a estrés oxidativo inducido por AngII.

Por otra parte, para estudiar el potencial de las MSCs para incrementar la supervivencia y funcionalidad de precursores dopaminérgicos implantados en modelos animales de EP (ver Justificación y objetivos, objetivo 2.3), en el siguiente bloque experimental realizamos cotrasplantes de precursores dopaminérgicos de origen mesencefálico y MSCs derivadas de la médula ósea del fémur de ratas adultas. Para ello, un grupo de ratas jóvenes adultas se sometió a depleción dopaminérgica unilateral inducida por 6-OHDA. Un mes después de la lesión, los animales que cumplían los criterios de comportamiento de denervación dopaminérgica maximal (> 90% de depleción dopaminérgica) se seleccionaron para la realización de trasplantes. En una primera serie de experimentos, un grupo de ratas (n = 5, grupo VM) recibió implantes intraestriatales de precursores dopaminérgicos (500.000 células) procedentes del mesencéfalo ventral de fetos de rata (E13) (ver Material y métodos, apartado [3.2.12](#)) y otro grupo de animales (n = 6) recibió cotrasplantes de 500.000 células de la misma suspensión de células derivadas del mesencéfalo ventral y dosis altas de MSCs (200.000 células; grupo VM + high MSCs) derivadas de médula ósea de rata. En una segunda serie de experimentos, ratas con denervación dopaminérgica maximal fueron trasplantadas con 500.000 precursores mesencefálicos (n = 5) o cotrasplantadas con 500.000 células de la misma suspensión celular obtenida del mesencéfalo y dosis bajas de MSCs (25.000 células; grupo VM + low MSCs, n = 5). Las MSCs se tiñeron antes del trasplante con

el colorante vital fluorescente Cell Tracker™ Orange (CMTMR; 15  $\mu$ M; C2927, Invitrogen) (ver Material y métodos, apartado [3.3.12](#)). Ocho semanas después del implante, todos los grupos experimentales se sometieron de nuevo a los tests de comportamiento correspondientes (test del cilindro y rotómetro) y se sacrificaron una semana después de la última prueba para los correspondientes análisis histológicos.

Con el objetivo de estudiar los posibles mecanismos implicados en el efecto de las MSCs sobre la supervivencia dopaminérgica (ver Justificación y objetivos, objetivo 2.4), en la siguiente serie de experimentos, tratamos cultivos de la línea dopaminérgica Mes23.5 y cultivos primarios de mesencéfalo, sometidos a daño neurotóxico inducido por 6-OHDA (10  $\mu$ M o 20  $\mu$ M, respectivamente), con medio condicionado derivado de MSCs (MSC-CM, del inglés *conditioned medium derived from mesenchymal stromal cells*) añadido antes, después o simultáneamente que la neurotoxina.

Para investigar la naturaleza molecular de los factores presentes en el MSC-CM (ver Justificación y objetivos, objetivo 2.4), este se sometió a distintos tratamientos para aislar la fracción responsable de los efectos observados, antes de ser añadido a cultivos de la línea dopaminérgica Mes23.5 o a cultivos primarios de mesencéfalo. La inactivación por calor y la incubación con proteinasa K se utilizaron como métodos para desnaturalizar la fracción proteica del MSC-CM (ver apartado [3.3.11.1](#)). Para secuestrar la fracción lipídica, el MSC-CM se incubó con carbón recubierto de dextrano o con sílice pirógena (ver apartado [3.3.11.2](#)).

En la siguiente serie de experimentos, con el objetivo de identificar las vías de señalización implicadas en los efectos del MSC-CM sobre la viabilidad dopaminérgica (ver Justificación y objetivos, objetivo 2.4), los cultivos de la línea Mes23.5 se trataron simultáneamente con MSC-CM y con U0126 (inhibidor de la vía MEK1/2; 10  $\mu$ M; 1144, Tocris), LY294002 (inhibidor de la vía PI3K; 10  $\mu$ M; 1130, Tocris) o H-89 (inhibidor de PKA; 10  $\mu$ M; 2910, Tocris). Para bloquear los receptores de prostaglandina E2 (PGE2) de tipo 2 (EP2), se trataron cultivos de la línea Mes23.5, cultivos primarios de mesencéfalo y cultivos de neuronas dopaminérgicas derivadas de hiPSCs con PF-04418948 (antagonista de receptores EP2; 1  $\mu$ M, PZ0213, Sigma).

### 3.3.2. Cultivo de la línea celular dopaminérgica Mes23.5

La línea celular inmortalizada Mes23.5 fue generosamente cedida por el doctor Weidong Le (Baylor College of Medicine, Houston, TX, EEUU) y es el resultado de fusionar células embrionarias (E16) mesencefálicas de rata y la línea celular N18TG2, derivada de neuroblastoma-glioma de ratón. Las células Mes23.5 son capaces de expresar TH y de sintetizar dopamina, pero no otras catecolaminas, lo que reproduce, en parte, las características de las neuronas dopaminérgicas presentes en la sustancia negra (Crawford y col., 1992). Las células se cultivaron en medio completo (DMEMF/12 suplementado con un 2% de componentes de Sato, 2% de FBSi, 1% de penicilina-estreptomocina) y se mantuvieron en un incubador humidificado de CO<sub>2</sub> (37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad relativa). El medio se renovó cada 3-4 DIV y las células se subcultivaron al alcanzar el 90% de confluencia. Antes de someterse a los tratamientos correspondientes, las células se sembraron a una densidad de  $2 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> en placas de 96 pocillos (353072, Falcon, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EEUU) previamente tratadas con poli-L-lisina (100 µg/ml; P1274, Sigma) y se dejaron proliferar hasta alcanzar el 80% de confluencia. Los cultivos de la línea dopaminérgica Mes23.5 permanecieron en presencia de los distintos tratamientos durante 24 h (ver Material y métodos, apartado [3.3.1](#)).

### 3.3.3. Cultivo de la línea celular dopaminérgica N27

Los cultivos de la línea celular dopaminérgica N27 (SCC048, Millipore), derivada de tejido mesencefálico de rata, se cultivaron tal y como se ha descrito previamente (Costa-Besada y col., 2018). Las células se mantuvieron en RPMI 1640 (R0883, Sigma) suplementado con 10% de FBSi, 2 mM de L-glutamina y 1% de penicilina-estreptomocina en un incubador humidificado de CO<sub>2</sub> (37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad relativa). Cuando alcanzaron el 90% de confluencia, las células se subcultivaron y se sembraron directamente a una densidad de  $2 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> en placas de 96 pocillos. Los cultivos proliferaron hasta alcanzar el 80% de confluencia antes de realizar los experimentos. Los cultivos de la línea dopaminérgica N27

permanecieron en presencia de los distintos tratamientos durante 24 h (ver Material y métodos, apartado [3.3.1](#)).

### **3.3.4. Cultivos de la línea catecolaminérgica humana SH-SY5Y**

La línea catecolaminérgica humana SH-SY5Y fue generosamente cedida por la doctora Sofía Sánchez Iglesias (Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, España) y se cultivó tal y como se ha descrito previamente (Araújo-Vilar y col., 2018). Las células se mantuvieron en una solución 1:1 de mezcla de nutrientes Ham F-12 (N4888, Sigma) y medio mínimo esencial de Eagle (MEM; M2279, Sigma) suplementada con 15% de FBSi, 1% de GlutaMax-ITM (35050-061, Gibco), 1% de penicilina-estreptomicina y 1% de solución 100x de aminoácidos no esenciales (M7145, Sigma). Los cultivos se mantuvieron en un incubador humidificado de CO<sub>2</sub> (37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad relativa) y el medio se reemplazó por medio fresco cada 3 DIV. Las células se subcultivaron al alcanzar el 90% de confluencia y se sembraron directamente a una densidad de  $2 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> en placas de 96 pocillos. Los cultivos alcanzaron el 80% de confluencia antes de realizar los experimentos y permanecieron en presencia de los tratamientos 24 h (ver Material y métodos, apartado [3.3.1](#)).

### **3.3.5. Ensayo de viabilidad celular**

Para evaluar el efecto de los diferentes tratamientos sobre la supervivencia de las líneas celulares dopaminérgicas Mes23.5, N27 y SH-SY5Y, se llevó a cabo un ensayo de viabilidad celular con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT). Las células se sembraron en placas de 96 pocillos y se trataron con 18 µl de MTT (1 mg/ml; M2128, Sigma) y se mantuvieron en estas condiciones a 37 °C durante 4 h. Las células vivas son capaces de escindir el anillo de tetrazol gracias a la acción de la reductasa mitocondrial, formando cristales insolubles de formazán, de color violeta (Mosmann, 1983). Posteriormente, se retiró el sobrenadante del cultivo y los cristales de formazán se disolvieron en una solución ácida de isopropanol (10% de Triton-X-100 y 40 mM de HCl en isopropanol) de manera que su concentración en cada pocillo se determinó por densidad óptica. La

absorbancia de cada pocillo se midió en un lector de placas (Infinite® 200 Pro Multimode Reader, Tecan, Männedorf, Suiza) a 570 nm. La viabilidad celular se expresó como porcentaje de la cantidad de formazán en relación con su control correspondiente (100%).

### **3.3.6. Detección de EOR en cultivos de líneas celulares dopaminérgicas**

Para medir la producción de EOR inducida por AngII en cultivos de las líneas neuronales Mes23.5, N27 y SH-SY5Y, se utilizó la sonda fluorescente sensible a EOR diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFDA, del inglés, 2',7'-*dichlorofluorescein-diacetate*). El DCFDA se metaboliza en las células y, en presencia de EOR, se oxida al producto intensamente fluorescente DCFDA. Los cultivos de las líneas Mes23.5, N27 y SH-SY5Y se disociaron, se lavaron con PBS y se incubaron en presencia de DCFDA (20  $\mu$ M; D6883, Sigma) durante 30 min a 37°C en oscuridad. La fluorescencia basal se midió a este tiempo ( $t = 0$  min) utilizando un lector de placas, con longitud de onda de excitación de 485 nm y longitud de onda de emisión de 520 nm. La fluorescencia se midió de nuevo a 15 min, 30 min, 45 min, 60 min, 75 min y 120 min tras la adición de AngII (100 nM). Como antioxidante y control para la baja producción de EOR, se utilizó N-acetil-L-cisteína (600  $\mu$ M; A7250, Sigma). Como indicador de una producción elevada de EOR, se utilizó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100  $\mu$ M; 1.07209, Millipore). La intensidad de la fluorescencia se expresó en unidades relativas, calculadas como la diferencia entre  $t = 0$  min, normalizada con respecto al control a  $t = 15$  min.

### **3.3.7. Plásmidos, establecimiento de líneas celulares estables y silenciamiento génico**

Los plásmidos pLV-SV40-puro (pLV-vacío) y pLV-SV40-KLF9-puro (pLV-KLF9) fueron generosamente donados por el doctor Mikhail A. Nikiforov (Roswell Park Cancer Institute, Buffalo, NY, EEUU). Estos vectores se utilizaron para transfectar líneas celulares tal y como se ha descrito previamente, con ligeras modificaciones (Wang y col., 2008). En primer lugar, transfectamos cultivos de la línea HEK 293T con los plásmidos de empaquetamiento viral correspondientes. Los

virus se recolectaron del sobrenadante y se utilizaron para transfectar líneas celulares neuronales en presencia de bromuro de hexadimetrina (8 µg/ml; H9268, Sigma), que incrementa la eficacia de la transducción neutralizando la repulsión de carga entre los viriones y el ácido siálico de la superficie celular. Las células se seleccionaron con puromicina (10 µg/ml; A11138-03, ThermoFisher Scientific) a partir de las 72 h desde la infección. Las líneas celulares estables se establecieron tras 2 semanas de selección y se cultivaron en presencia constante de puromicina (10 µg/ml) a partir de ese momento.

Las células de la línea dopaminérgica N27 se trataron con ARN pequeño de interferencia (siARN, del inglés *small interfering RNA*) diseñado contra *Nrf2* (si*Nrf2*; L-080047-02, Dharmacon), diseñado contra *Klf9* (si*Klf9*; L-091801-02, Dharmacon) o siARN control (siNT, del inglés *non-targeting siRNA*; D-001810-10, Dharmacon, Waltham, MA, EEUU) a una concentración final de 25 nM según las instrucciones del fabricante. La extracción de ARN se realizó 48 h después de la transfección y el ARN se analizó tal y como se describe a continuación.

### 3.3.8. Extracción de ARN y qPCR de líneas dopaminérgicas

El ARN total de las líneas celulares dopaminérgicas Mes23.5, N27 y SH-SY5Y se aisló de los cultivos según se ha descrito previamente (ver Material y métodos, apartado [3.2.4](#)). A continuación, se retrotranscribió una cantidad total de 2 µg de ARN por muestra para obtener ADNc según se describe en el apartado [3.2.10](#). La cuantificación de la expresión de ARNm de *Klf9*, *Nrf2* y *Ptger2* y el diseño de los cebadores correspondientes (Tabla 2) se realizaron tal y como se ha descrito en el apartado [3.2.4](#).

	Gen	Cebador Forward (F)	Cebador Reverse (R)
Rata	<i>Nrf2</i>	5' -CCAGCACATCCAGACAGACA- 3'	5' -ATATCCAGGGCAAGCGACTC- 3'
Ratón	<i>Ptger2</i>	5' -AGACGGACCACCTCATTCTCC- 3'	5' -CTCGGAGGTCCCACTTTTCC- 3'
Rata/ratón	<i>Klf9</i>	5' -AGTGCATACAGGTGAACGGC- 3'	5' -AACGGAAGTCTTTTCCCA- 3'
	<i>Actb</i>	5' - TCGTGCCTGACATTAAGAG - 3'	5' - TGCCACAGATTCCATACC - 3'
Humano	<i>KLF9</i>	5' -GGAAACACGCCTCCGAAAAG- 3'	5' -GCCGTTACCTGTATGCACT- 3'
	<i>ACTB</i>	5' -GGACTTCGAGCAAAGATGG- 3'	5' -AGCACTGTGTGGCGTACAG- 3'

Tabla 2. Cebadores utilizados para qPCR

### 3.3.9. Aislamiento, cultivo y caracterización de MSCs

Las MSCs se aislaron de la médula ósea del fémur de ratas adultas (8 semanas) siguiendo protocolos descritos previamente con ligeras modificaciones (Jones y col., 2010). La médula ósea se disgregó mecánicamente hasta obtener una suspensión celular que se sembró en frascos de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> (353082, Falcon) a una densidad de  $1 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> en DMEM suplementado con 15% de FBSi, 1% de penicilina-estreptomicina y 1% de fungizona. Los cultivos se mantuvieron en un incubador humidificado con control de CO<sub>2</sub>, a 37 °C, con 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad relativa. La población celular adherente al plástico proliferó durante 3-4 semanas y el medio de cultivo se reemplazó por medio fresco cada 3-4 DIV. Cada 5-7 DIV, al alcanzar el 90% de confluencia, las células se tripsinizaron con TrypLE (12563011, Gibco) durante 5 min a 37°C y se sembraron a una densidad de  $5 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup> en frascos de 75 cm<sup>2</sup> (353136, Falcon).

Con el objetivo de caracterizar el fenotipo de los cultivos obtenidos de médula ósea, algunos cultivos se procesaron para los marcadores clásicos de MSCs CD90 y CD44, tal y como se describe en el apartado [3.3.17](#). Como control positivo para CD90, se utilizaron cultivos de fibroblastos derivados del ventrículo cardíaco de ratas adultas (Hudon-David y col., 2007). El tejido se lavó con PBS, se diseccionó y se sometió a una digestión enzimática con colagenasa de tipo IV y tripsina durante 1 h. Las células se sembraron en DMEM suplementado con 10% de FBSi y 1% de penicilina-estreptomicina. Tras 7 DIV, las células se sembraron en cubreobjetos de vidrio, se fijaron con PFA al 4% y se procesaron para CD90. Como control positivo para CD44, utilizamos frotis sanguíneos de sangre periférica humana ya que está bien establecido que su expresión predomina en tipos celulares de origen hematopoyético, incluyendo eritrocitos, linfocitos T y B y granulocitos, entre otros (Naor y col., 1997). Los frotis se dejaron secar al aire sobre cubreobjetos de vidrio antes de fijarse con PFA al 4% y procesarse para CD44.

Con el objetivo de confirmar la multipotencialidad de las MSCs obtenidas, algunos cultivos se sometieron a ensayos de diferenciación *in vitro*. Las MSCs se sembraron a una densidad de  $1 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup> en placas de cultivo de 35 mm (353001, Falcon) en DMEM

suplementado con 10% de FBSi. Para los ensayos de diferenciación osteogénica, cultivos confluentes de MSCs (70-90%) se mantuvieron en medio completo suplementado con dexametasona (10 nM; D4902, Sigma), ácido ascórbico (0,2 mM; A4403, Sigma) y  $\beta$ -glicerolfosfato (10 mM; 50020, Sigma). Para confirmar el potencial adipogénico de las MSCs, el medio de cultivo se suplementó con hidrocortisona (0,5  $\mu$ M; H0135, Sigma), 3-isobutil-1-metilxantina (0,5 mM; I5879, Sigma) e indometacina (60  $\mu$ M; I7378, Sigma). El medio se renovó cada 2-3 DIV y las células se mantuvieron en condiciones de diferenciación 3 semanas. Finalmente, los cultivos se fijaron y se tiñeron con una solución de rojo de alizarina (pH 4,1, 40 mM; A5533, Sigma) durante 10 min para visualizar la mineralización de la matriz celular asociada a osteoblastos; o con aceite de rojo O (O1391, Sigma) para visualizar las vacuolas lipídicas (Caterston y col., 2002).

### **3.3.10. Obtención de MSC-CM**

El MSC-CM derivado de MSCs de médula ósea se obtuvo a partir de cultivos confluentes (90%) de MSCs (ver Material y métodos, apartado [3.3.9](#)). Tras 4 semanas en cultivo, las células se lavaron con PBS y el medio se sustituyó por medio completo (DMEMF/12 suplementado con 2% de FBSi, 2% de componentes de Sato, 1% de penicilina-estreptomicina) o por medio básico sin suero (DMEMF/12). Tras 24 h en contacto con las MSCs, el medio se recogió, se hizo pasar a través de un filtro de 0,22  $\mu$ m y se congeló a -80 °C hasta su utilización a concentración 100% (V/V). En algunos experimentos, el MSC-CM se sometió a diferentes tratamientos para profundizar en la naturaleza de los posibles factores neuroprotectores presentes en el medio (ver Material y métodos, apartado [3.3.1](#)). Para realizar diluciones del MSC-CM, se utilizó medio fresco completo hasta alcanzar la concentración correspondiente.

### **3.3.11. Tratamiento del MSC-CM**

#### **3.3.11.1. Inactivación de la fase proteica del MSC-CM**

La inactivación de la fase proteica secretada por las MSCs se llevó a cabo mediante dos metodologías. Por una parte, las proteínas

presentes en el MSC-CM se inactivaron mediante calor. El MSC-CM se calentó a 95 °C durante 30 min en un baño seco. Por otra parte, el MSC-CM se incubó en presencia de proteinasa K (25 µg/ml; P6556, Sigma) a 37 °C durante 2 h para digerir las proteínas de este. Posteriormente, la actividad enzimática de la proteinasa K se neutralizó calentando el MSC-CM a 95 °C durante 10 min.

#### 3.3.11.2. Eliminación de la fase lipídica del MSC-CM

Con el objetivo de investigar el posible papel de los lípidos presentes en el MSC-CM sobre la viabilidad dopaminérgica, se eliminó la fracción lipídica mediante dos estrategias. En una serie de experimentos, el MSC-CM se sometió a un tratamiento con carbón recubierto con dextrano (C2641, Sigma) antes de utilizarse sobre neuronas dopaminérgicas. Este método se basa en la alta afinidad del carbón por moléculas lipofílicas. La capa adicional de dextrano permite adsorber casi instantáneamente los lípidos libres en el medio, es decir, aquellos que no se encuentran formando complejos con un transportador o anticuerpo, minimizando la pérdida de la fracción proteica (Herbert y col., 1965). Las muestras de MSC-CM o de medio control se incubaron con el carbón recubierto de dextrano a 4 °C durante 12 h. Posteriormente, el carbón se eliminó mediante centrifugación y el sobrenadante se filtró antes de aplicarlo a los cultivos correspondientes.

En otra serie de experimentos, se utilizó sílice pirógena para precipitar las lipoproteínas presentes en el MSC-CM. La sílice pirógena es un material amorfo y particulado capaz de formar agregados reticulares que pueden dispersarse en un medio líquido. En una solución acuosa, como es el MSC-CM, el grado de agregación de estos complejos reticulares depende de la concentración de la sílice y del pH del sistema, entre otros factores. De esta manera, se puede modular el grado de dispersión de las partículas de sílice. Las moléculas de gran tamaño, como las lipoproteínas quedarán atrapadas en los agregados reticulares que, a su vez, pueden eliminarse fácilmente de la suspensión acuosa mediante centrifugación (Borensztajn y col., 1988). Por tanto, el medio se incubó con polvo de sílice (20 mg/ml; S5130, Sigma) a 4 °C durante 12 h en constante agitación para eliminar la fase lipídica del MSC-CM. La sílice se eliminó mediante centrifugación y el

sobrenadante se filtró antes de añadirse como tratamiento a los cultivos correspondientes.

### **3.3.12. Cotrasplantes de precursores dopaminérgicos y MSCs**

Las suspensiones de células derivadas del mesencéfalo ventral de rata se obtuvieron tal y como se ha descrito previamente (ver Material y métodos, apartado [3.2.12](#)). Los animales control (VM) recibieron implantes de suspensiones celulares que contenían 500.000 precursores dopaminérgicos (3  $\mu$ l) y medio de cultivo de MSCs (3  $\mu$ l). Las ratas que fueron cotrasplantadas recibieron 500.000 precursores mesencefálicos (3  $\mu$ l) de la misma suspensión que el grupo control correspondiente y 200.000 MSCs (grupo VM + high MSCs; 3  $\mu$ l) o 25.000 MSCs (grupo VM + low MSCs; 3  $\mu$ l). Una cantidad de 200.000 MSCs es el número habitual de MSCs que se trasplanta en el estriado, con efectos neuroprotectores o de rescate en el sistema dopaminérgico en degeneración (Hoban y col., 2015; Mendes-Pinheiro y col., 2019). Sin embargo, los implantes de 25.000-30.000 MSCs también ejercen efectos funcionales en otros estudios (Cova y col., 2010). Antes de ser trasplantadas en el estriado de ratas con depleción dopaminérgica (ver Material y métodos, apartado [3.2.11](#)), las MSCs se marcaron con CMTMR, que permite rastrear la localización de células vivas, según las instrucciones del fabricante. Para ello, las células se incubaron en presencia de CMTMR diluido en DMEM durante 30 min. Posteriormente, se retiró la solución de CMTMR y se reemplazó por medio fresco, dejando las células en condiciones de crecimiento celular durante 30 min. Finalmente, las células se lavaron con PBS y se tripsinizaron con TrypLE™. La actividad enzimática se neutralizó con DMEM fresco suplementado con 10% de FBSi y las células se resuspendieron en DMEM suplementado con 0,05% DNasa, antes de ser implantadas en el estriado.

Para realizar el implante, se cargó la suspensión celular correspondiente y se inyectó en las coordenadas craneométricas detalladas más arriba (ver Material y métodos, apartado [3.2.12](#)). Dado que la viabilidad de las suspensiones de precursores dopaminérgicos disminuye con el tiempo, los trasplantes se realizaron en dos sesiones (ver Material y métodos, apartado [3.3.1](#)), utilizando suspensiones

celulares frescas para los grupos VM + high MSCs y VM + low MSCs, que se compararon con los controles correspondientes de ratas trasplantadas con la misma suspensión. Además, en cada sesión de trasplante se alternaron los implantes control con los cotrasplantes para minimizar el efecto del tiempo sobre la viabilidad dopaminérgica.

Ocho semanas después de haber recibido los trasplantes, los animales se sometieron a los correspondientes tests de comportamiento (ver Material y métodos, apartado [3.2.13](#)) y a análisis histológicos (ver Material y métodos, apartados [3.2.14](#) y [3.3.13](#)). Las ratas de cada serie, es decir, animales con cotrasplantes y sus respectivos controles, se procesaron siempre en la misma tanda.

### **3.3.13. Inmunohistoquímica colorimétrica e inmunofluorescencia de implantes celulares**

Los animales que recibieron implantes de precursores dopaminérgicos o cotrasplantes de precursores dopaminérgicos y MSCs se anestesiaron profundamente y se perfundieron tal y como se ha descrito anteriormente. Secciones seriadas que contenían el estriado y la sustancia negra se procesaron para la detección colorimétrica de TH tal y como se ha descrito en el apartado [3.2.14](#). Además, secciones seleccionadas de los animales que recibieron cotrasplantes se procesaron realizando inmunofluorescencia para TH (1:5000) siguiendo los protocolos establecidos (ver Material y métodos, apartado [3.2.14](#)) para poder observar conjuntamente en el trasplante la localización de las células dopaminérgicas positivas para TH y las MSCs teñidas con CMTMR en el trasplante.

### **3.3.14. Cuantificación estereológica de implantes celulares**

El muestreo y cuantificación de células TH-ir contenidas en los implantes y en la sustancia negra se realizó con la herramienta CASTGrid tal y como describimos en el apartado [3.2.15](#). Además, el área de reinervación de los trasplantes se estimó (en mm<sup>2</sup>) midiendo el área TH-ir que rodea al implante en al menos 3 estriados por rata en los que el implante fuese visible. La densidad de fibras TH-ir en el área de reinervación se estimó como la densidad óptica de la TH estriatal con la ayuda del software de análisis de imagen NIH-Image 1.55 (Wayne

Rasband, NIH). La densidad óptica para cada sección se corrigió restando el fondo, determinado por la densidad óptica observada en el cuerpo calloso.

### **3.3.15. Cultivos primarios de mesencéfalo**

Con el objetivo de determinar si el MSC-CM ejerce su efecto sobre las neuronas dopaminérgicas también en presencia de otras poblaciones celulares, incluidas poblaciones de células gliales, se establecieron cultivos primarios de mesencéfalo en los que diversos tipos celulares están presentes. La disección del mesencéfalo ventral de embriones (E14) de rata y la estimación de la viabilidad celular se realizaron tal y como se describe en el apartado [3.2.12](#). La suspensión celular resultante se sembró en placas de cultivo de 35 mm previamente tratadas con poli-L-lisina a una densidad de  $1,5 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup>. Los cultivos se mantuvieron en DMEM/HAMS F/12 (1:1) suplementado con 10% de FBSi, 1% de penicilina-estreptomicina a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Tras 2 DIV, el medio se reemplazó por medio fresco y los cultivos se mantuvieron en estas condiciones 7 DIV (Rodríguez-Pallares y col., 2001), antes de realizar los experimentos correspondientes (ver Material y métodos, apartado [3.3.1](#)).

### **3.3.16. Cultivos de neuronas dopaminérgicas derivadas de hiPSCs**

Los experimentos con células derivadas de pacientes humanos fueron aprobados por la Comisión de Garantías para la Donación y Utilización de Células y Tejidos Humanos del Instituto de Salud Carlos III, por la comisión correspondiente de la Universidad de Santiago de Compostela y por el gobierno local. Las líneas celulares de hiPSCs SP11#1 y SP17#2 se obtuvieron del Banco Nacional de Líneas Celulares. Estas líneas se reprogramaron a un estado pluripotente y se caracterizaron en base a la morfología de las colonias, la dinámica de crecimiento de las mismas, su estabilidad cariotípica, la expresión de factores de transcripción asociados a la pluripotencia (*OCT4*, *SOX2*, *NANOG*, *CRIPTO*) y su capacidad para generar teratomas compuestos por derivados de las tres capas germinales (Sánchez-Danés y col.,

2012). El número de autorización del proyecto para el uso de células pluripotenciales humanas bajo el que se realizó la tesis es 270 213 2.

Las hiPSCs indiferenciadas se expandieron en presencia de medio condicionado por fibroblastos embrionarios de ratón (MEF-CM, del inglés *mouse embryonic fibroblast conditioned media*) suplementado con bFGF (4 ng/ml) (Xu y col., 2001). Las colonias de hiPSCs indiferenciadas se disociaron enzimáticamente con Accutasa® (SCR005, Millipore) y la suspensión de célula única resultante se sembró en placas recubiertas de Matrigel® a una densidad de  $3,6 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>. Los cultivos se mantuvieron 48 h en estas condiciones para permitir la adherencia de las células al sustrato. A continuación, el medio se reemplazó por medio de diferenciación [DMEM suplementado con un 15% de KSR (del inglés, *Knockout Serum Replacement*; 10828028, ThermoFisher Scientific), 1% de solución 100x de aminoácidos no esenciales, 1% de penicilina-estreptomicina y 1% de solución de mercaptoetanol 100x] suplementado con SB431542 (10 µM; 1614, Tocris) y con LDN193189 (100 nM; SML00559, Sigma) para inducir la diferenciación neural (D0 de diferenciación). A partir del D1, el medio se suplementó con FGF-8 (50 ng/ml; 100-25A, PeproTech), SHH (100 ng/ml; 130-095-727, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) y purmorfamina (2 µM; 4551, Tocris) y, a partir del D3, también con CHIR99021 (3 µM; SLM1046, Sigma). La maduración empezó el D11, y se indujo sustituyendo el medio por Neurobasal™ Plus Medium (A35829-01, Gibco) suplementado con 2% de B27 (17504044, Gibco), 0,2% de GlutaMax-ITM, 0,2% de penicilina-estreptomicina, ácido ascórbico (0,2 mM; Sigma) dibutilil AMPc (0,1 mM; D0627, Sigma), el inhibidor de Notch DAPT (10 nM; 2634, Tocris) y con los factores neurotróficos BDNF (10 ng/ml; 450-02, PeproTech), GDNF (10 ng/ml; 450-10, PeproTech) y TGF-β (1 ng/ml; 100-36E, PeproTech). El D13, las células se pasaron a placas de 12 pocillos (353043, Falcon) recubiertas con poli-L-ornitina (1,5 mg/ml; P3655, Sigma), fibronectina (0,5 mg/ml; 33010-018, Invitrogen) y laminina (23017-015, Invitrogen), donde los cultivos completaron su maduración antes de ser utilizados para los experimentos correspondientes. Transcurridos 30 DIV desde el inicio de la diferenciación, el medio de cultivo se reemplazó por medio mínimo o

por MSC-CM y los cultivos se trataron con el antagonista de EP2 PF-04418948 o con el vehículo correspondiente durante 24 h antes de analizar su efecto (ver Material y métodos, apartado [3.3.1](#)). La extracción del ARN total de los cultivos de hiPSCs, la qPCR y la visualización de las bandas de ADNc amplificado correspondientes a *PTGER2* se realizó tal y como se describe anteriormente (ver Material y métodos, apartado [3.3.8](#)), utilizando los cebadores correspondientes (Tabla 3).

	Gen	Cebador <i>Forward</i> (F)	Cebador <i>Reverse</i> (R)
Humano	<i>PTGER2</i>	5' -AGACGGACCACCTCATTCTCC- 3'	5' -ACAACAGAGGACTGAACGCA- 3'
	<i>ACTB</i>	5' -GGACTTCGAGCAAGAGATGG- 3'	5' -AGCACTGTGTTGGCGTACAG- 3'

Tabla 3. Cebadores utilizados para qPCR

### 3.3.17. Inmunofluorescencia, citometría de flujo e inmunocitoquímica colorimétrica de cultivos celulares

Los cultivos de MSCs, cultivos de la línea dopaminérgica Mes23.5 y cultivos de neuronas dopaminérgicas derivadas de hiPSCs se fijaron con PFA al 4% durante 15 min antes de procesarse para los marcadores correspondientes.

Con el objetivo de caracterizar el fenotipo de los cultivos obtenidos de médula ósea, algunos cultivos se procesaron para inmunofluorescencia. Para ello, los cultivos fijados se preincubaron en una solución de bloqueo (5% de NDS, 0,3% de Triton X-100 y 1% de BSA) y posteriormente, se incubaron en presencia de los anticuerpos primarios ratón anti-CD44 (1:100; MCA643R, Bio-Rad) y ratón anti-CD90 (1:1000; AB225, Abcam) durante 16 h a 4 °C. A continuación, las células se incubaron en presencia del anticuerpo fluorescente secundario Alexa Fluor burro anti-ratón 488 (1:200) durante 2 h 30 min a RT y los núcleos se marcaron con Hoechst-33342. Finalmente, los cultivos se montaron con el medio de montaje Immu-Mount™.

Además, la identidad de las células en cultivo se analizó mediante citometría de flujo. Para ello, se tripsinizaron cultivos confluentes de MSCs con TrypLE y la digestión enzimática se neutralizó con DMEM suplementado con 10% de FBSi. Posteriormente, las células se centrifugaron y el pellet se resuspendió a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml en una solución de bloqueo con BSA al 1% y 1% de azida

sódica (S2002, Sigma) en PBS. Las células se fijaron con un volumen equivalente de PFA al 4% para bloquear la internalización de receptores. Los cultivos se lavaron con la solución de bloqueo y se incubaron durante 1 h a RT en presencia de los anticuerpos anti-CD90, anti-CD44 y anti-TH, este último utilizado como control isotópico, o en ausencia de anticuerpos. Posteriormente, las células se incubaron con el anticuerpo fluorescente secundario Alexa Fluor burro anti-ratón 488 en solución de bloqueo durante 30 min. Por último, las células se resuspendieron en PBS y se analizaron 15.000 eventos/muestra utilizando un citómetro BD Accuri C6 (BD Biosciences).

Para determinar el efecto del MSC-CM sobre la proliferación de la línea celular dopaminérgica Mes23.5, las células se dejaron crecer sobre cubreobjetos y se fijaron con PFA al 4%. Posteriormente, se procesaron para inmunofluorescencia tal y como se ha descrito previamente, para el marcador de proliferación Ki67. Los cultivos se incubaron en presencia del anticuerpo primario conejo anti-Ki67 (1:1000; ab15580, Abcam) y se revelaron en presencia del anticuerpo secundario fluorescente Alexa Fluor burro anti-conejo 568 nm. Los núcleos se tiñeron con Hoechst-33342 y los cubreobjetos se montaron utilizando el medio de montaje Immu-Mount<sup>TM</sup>.

En otra serie de experimentos, cultivos primarios de mesencéfalo y cultivos de neuronas dopaminérgicas derivadas de hiPSCs se procesaron para TH. Para ello, la actividad endógena de la peroxidasa se bloqueó con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y posteriormente, los cultivos se preincubaron en una solución de bloqueo (5% de NHS o de suero normal de cerdo, 0,3% de Triton X-100 y 1% de BSA en KPBS) durante 1 h a RT. A continuación, los cultivos celulares de rata y de humano se incubaron en presencia de los anticuerpos ratón anti-TH (1:30000) o conejo anti-TH (1:500; AB152, Sigma), respectivamente, durante 16 h a 4 °C. Posteriormente, los cultivos se incubaron durante 1 h con los anticuerpos secundarios biotinilados respectivos: caballo anti-ratón (1:200, Vector Laboratories) o cerdo anti-conejo (1:200; E0353, Dako-Agilent). Por último, las células se incubaron en presencia de ABC y la inmunocitoquímica colorimétrica se reveló utilizando DAB como cromóforo, tal y como se describe en el apartado [3.2.14](#).

### 3.3.18. Cuantificación de células en cultivo

En cultivos de la línea dopaminérgica Mes23.5, las células Ki67-ir se cuantificaron en cinco campos microscópicos aleatorios dentro del diámetro de la placa de cultivo. Cada campo se definió como una cuadrícula de 0,5 x 0,5 cm (es decir, 1,25 cm<sup>2</sup>). El número de células Ki67-ir se expresó como porcentaje sobre el número de células totales, estimado mediante la tinción de los núcleos con Hoechst. Esta metodología se siguió también para la cuantificación de células CD44-ir y CD90-ir en cultivos de MSCs. En todos los experimentos, los cultivos control, que no se incubaron en presencia de los anticuerpos primarios para CD44 y CD90, resultaron inmunonegativos para estos marcadores.

En cultivos primarios de mesencéfalo y en cultivos de neuronas dopaminérgicas derivadas de hiPSCs, las células TH-ir se cuantificaron a un aumento de 100x en un microscopio invertido de contraste de fases (Eclipse, Nikon). La cuantificación se realizó en cinco campos microscópicos aleatorios de 1,25 cm<sup>2</sup> por un investigador que desconocía los tratamientos aplicados. Los datos se obtuvieron tras la cuantificación de al menos 3 experimentos independientes, procedentes de cultivos distintos, con un tamaño mínimo de muestra de 4 placas por experimento. Los resultados se normalizaron a los datos obtenidos en el grupo control de la misma tanda. En condiciones control, el número estimado de células TH-ir por pocillo en los cultivos primarios de mesencéfalo de rata fue de  $1179 \pm 70$ , y en cultivos de neuronas dopaminérgicas derivadas de hiPSCs de  $601 \pm 79$ .

### 3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

En el caso de comparaciones entre dos grupos experimentales, los datos se analizaron estadísticamente mediante el test *t* de Student o mediante el test de suma de rangos de Mann-Whitney. En el caso de comparaciones entre varios grupos experimentales, las diferencias estadísticamente significativas se determinaron mediante un análisis de la varianza (ANOVA) de una o de dos vías, seguido del test *post hoc* correspondiente (ver [Resultados](#)). La normalidad de las poblaciones y la homogeneidad de las varianzas se testaron antes de cada ANOVA y

las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a  $p < 0,05$ . Para el análisis estadístico, los datos de los experimentos *in vitro* se obtuvieron de al menos tres experimentos independientes. Los datos obtenidos se normalizaron respecto a los valores obtenidos en el grupo control correspondiente de la misma tanda (100%). Los datos se expresaron como la media de los valores  $\pm$  error estándar de la media (EEM). Los análisis estadísticos y la elaboración de histogramas se realizaron con los programas SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc., San José, CA, EEUU) y GraphPad Prism 8 (Graph-Pad Inc., San Diego, CA, EEUU).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. MECANISMOS IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN DE LA NEUROGÉNESIS ADULTA EN LA V-SVZ EN CONDICIONES FISIOLÓGICAS Y EN MODELOS ANIMALES DE EP

#### 4.1.1. Estudio del papel del SRA en la regulación de la neurogénesis adulta en la V-SVZ cerebral

Hoy en día, no se conoce el posible papel del SRA como regulador de la neurogénesis adulta en la V-SVZ. Por ello, en esta tesis, estudiamos en primer lugar la posible implicación de los principales receptores del SRA en la regulación de la neurogénesis adulta en este nicho neurogénico, particularmente en la proliferación y generación de neuroblastos de roedores jóvenes y envejecidos.

4.1.1.1. Los receptores AT2 median los efectos de AngII sobre la generación de neurosféricas

Para estudiar el posible papel del SRA local en la regulación de la neurogénesis adulta en la V-SVZ en condiciones fisiológicas, se aislaron células de la V-SVZ de ratones adultos jóvenes (3-4 meses de edad) y se sembraron como una suspensión de células en medio de crecimiento en presencia de mitógenos (ver Material y métodos, apartado [3.2.2](#)). Esta metodología permite la generación de neurosféricas o agregados clonales flotantes que pueden expandirse *in vitro* (Figura **6A**). Las neurosféricas se forman a partir de NSCs y NPCs y constituyen un sistema ideal para evaluar el efecto de distintos factores sobre la proliferación y autorrenovación de los progenitores neurales (Belenguer y col., 2016)

En primer lugar, nos propusimos demostrar la presencia de los principales componentes del SRA en cultivos de neurosféricas derivados de la V-SVZ de ratones adultos jóvenes. Nuestros resultados muestran la expresión endógena, detectada mediante qPCR, de ANG y de los

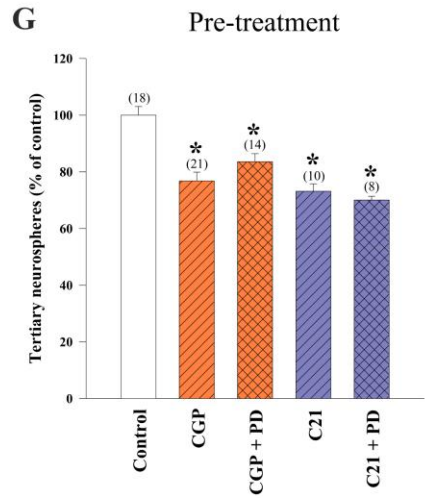
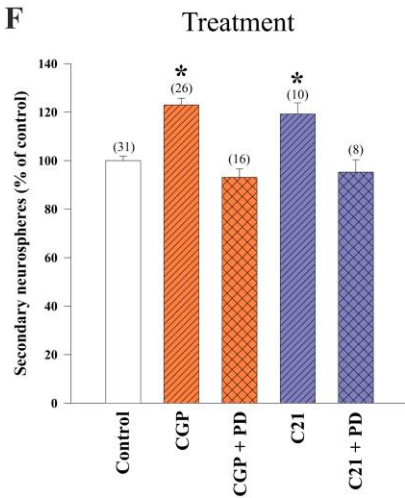
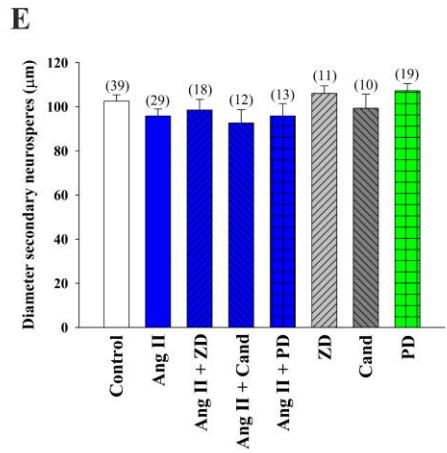
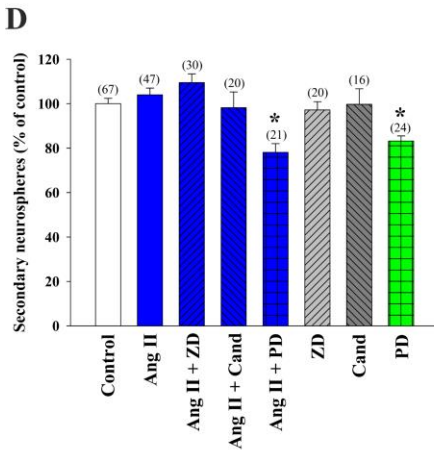
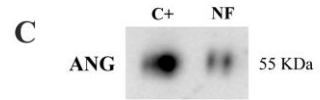
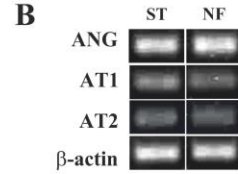
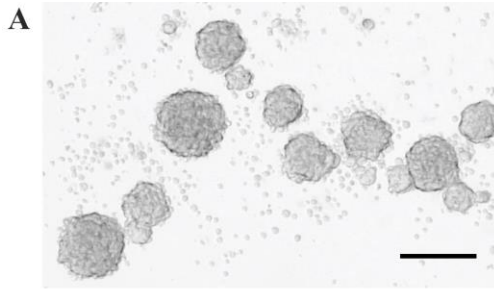
receptores AT1 y AT2 en lisados celulares derivados de neurosfers (Figura 6B). Además, demostramos la presencia de ANG en el medio de cultivo de las neurosfers, combinando una extracción basada en HPLC con la detección de la proteína en la fracción separada mediante WB (Domínguez-Meijide y col., 2017) (Figura 6C).

Una vez demostrada la presencia de componentes del SRA en neurosfers derivadas de la V-SVZ de ratones adultos, nos propusimos investigar si el SRA regula la generación de neurosfers secundarias *in vitro*. Para ello, cultivamos células individuales de la V-SVZ, obtenidas a partir de la disgregación de neurosfers primarias, en presencia de AngII y/o antagonistas de los receptores AT1 y AT2. En concreto, utilizamos el antagonista peptídico ZD7155 (ZD en lo sucesivo) y el antagonista no peptídico candesartán para bloquear los receptores AT1; y el péptido PD123319 (PD en lo sucesivo) para bloquear los receptores AT2. La inhibición de AT1 no induce cambios significativos en el número de neurosfers secundarias generadas, pero sí observamos una reducción del número de neurosfers en los cultivos tratados con el antagonista de AT2 PD, independientemente de la adición o no de AngII al cultivo. Estos datos indican que el receptor AT2 media los efectos activadores de la AngII sobre la formación de neurosfers (Figura 6D). Por otra parte, no se observan diferencias significativas en el diámetro de las esferas entre tratamientos, lo que sugiere que el receptor AT2 juega un papel en la iniciación de las neurosfers, pero no en su crecimiento (Figura 6E).

Para estudiar el papel de los receptores AT2 en la generación de esferas, sembramos células individuales en presencia de dos agonistas específicos de estos receptores. El tratamiento con el agonista CGP42112A (CGP en lo sucesivo) induce un incremento significativo en el número de esferas generadas, que se revierte con el tratamiento con el antagonista de AT2 PD. Cuando los cultivos se trataron con el agonista no peptídico de AT2 C21, se obtienen resultados similares a los descritos con CGP (Figura 6F).

Para determinar si los efectos observados sobre la generación de esferas mediados por el receptor AT2 modifican la capacidad de autorrenovación de NSCs/NPCs, evaluamos la generación de neurosfers terciarias. Para ello, resembramos células obtenidas de

neurosferas secundarias, que habían crecido en presencia de agonistas y antagonistas de AT2 (*treatment*), en medio de crecimiento sin ningún tratamiento específico (*pre-treatment*). Nuestros resultados muestran una reducción en el número de neurosféricas terciarias generadas a partir de células que se habían expandido en presencia de los agonistas de AT2 CGP y C21 (Figura 6G). Estos datos sugieren que la estimulación del receptor AT2 activa las células formadoras de neurosféricas, que generan un mayor número de neurosféricas secundarias. Sin embargo, la activación de AT2 también reduce su capacidad de autorrenovación, de manera que las neurosféricas secundarias obtenidas son menos clonogénicas; es decir, se reduce su capacidad de generar nuevas esferas (neurosferas terciarias).



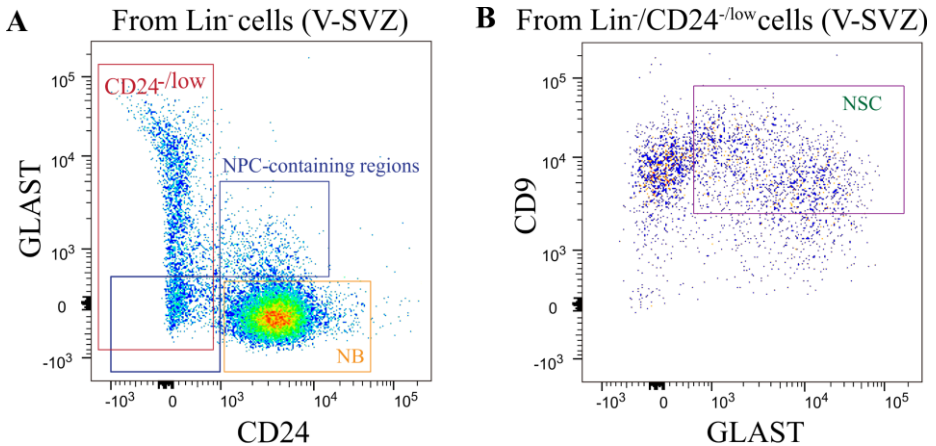
**Figura 6. Generación de neurosféricas de la zona ventricular-subventricular (V-SVZ) de ratones jóvenes.** (A) Microfotografías de cultivos de neurosféricas flotantes obtenidas de ratones *wild type* (WT). (B) Bandas representativas de angiotensinógeno (ANG), receptores AT1 y AT2, y  $\beta$ -actina obtenidas mediante qPCR en neurosféricas (NF). Se utilizaron homogenados de estriado (ST) como control positivo. (C) En el medio de cultivo de las neurosféricas se detectó ANG mediante HPLC y se visualizó mediante WB. Como control positivo (C+), se utilizó ANG (250  $\mu$ g/ml). Histogramas en los que se muestra el número (D) y diámetro (E) de neurosféricas secundarias obtenidas tras el tratamiento con AngII y/o antagonistas de AT1 (ZD7155 o candesartán), o de AT2 PD123319. Histograma que muestran el número de neurosféricas secundarias obtenidas tras el tratamiento con agonistas de AT2 (CGP42112A o C21) y/o con el antagonista de AT2 PD123319 (F; 'treatment'). Histograma en el que se muestra el número de neurosféricas terciarias obtenidas a partir de neurosféricas secundarias pretratadas con agonistas de AT2 y resembradas en ausencia de tratamiento (G; 'pre-treatment'). Los datos se obtuvieron de al menos tres experimentos independientes. Los datos se representan como valor de la media  $\pm$  EEM. \* $p < 0,05$  con respecto al grupo control (sin tratar) (ANOVA de una vía y test *post hoc* Bonferroni). bp =pares de bases. Escala = 150  $\mu$ m.

4.1.1.2. El agonista del receptor AT2 C21 estimula la actividad en las células del nicho de la V-SVZ

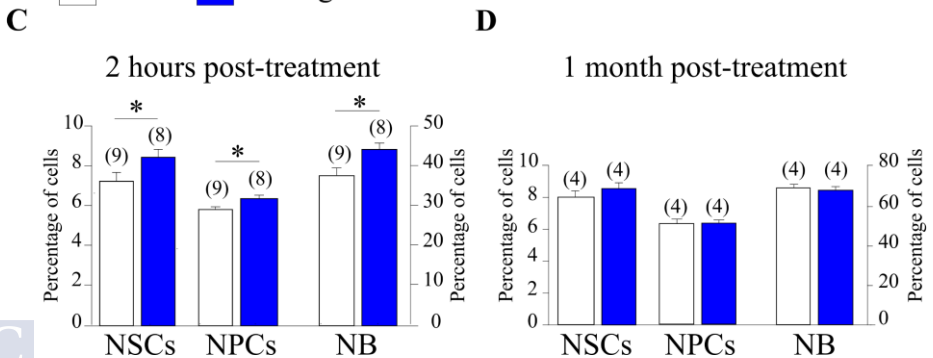
Nuestros datos indican que la activación de los receptores AT2 favorece la proliferación de las células formadoras de esferas procedentes de la V-SVZ adulta (ver Resultados, apartado [4.1.1.1](#)). Por ello, decidimos analizar los efectos de la activación farmacológica de los receptores AT2 sobre la proliferación y generación de neuroblastos *in vivo*. Para ello, analizamos la composición celular de la V-SVZ de ratones WT tratados con el agonista de AT2 C21, utilizando una combinación de varios marcadores y de tecnología FACS (del inglés *Fluorescence-Activated Cell Sorting*) (Chaker y col., 2016; Codega y col., 2014; Llorens-Bobadilla y col., 2015; Mich y col., 2014). Tras descartar las células no neurogénicas ( $Lin^+$ ), que comprenden células  $CD45^+$  (microglía y leucocitos),  $O4^+$  (oligodendrocitos),  $CD31^+$  (células endoteliales) y  $Ter119^+$  (eritrocitos) sin relevancia para el linaje neurogénico, la población  $Lin^-$  se subdividió según los niveles de expresión de GLAST (células astrogliales), CD24 (neuroblastos), CD9 (expresado preferentemente en NSCs) y EGFR, que marca las células activadas dentro de cada linaje. Gracias a este conjunto de marcadores, clasificamos las células en neuroblastos (células  $GLAST^-CD24^{high}$ ) proliferantes  $EGFR^+$  o neuroblastos posmitóticos  $EGFR^-$ ; en progenitores neurales (células  $GLAST^-CD24^{low}$  y  $GLAST^+CD24^{high}$ )

proliferantes EGFR<sup>+</sup>; y en NSCs (células CD9<sup>high</sup> GLAST<sup>+</sup> CD24<sup>low/neg</sup>) (Pérez-Villalba y col., 2018) (Figura 7A, B).

En los animales tratados con C21 durante 15 días, observamos un incremento significativo de la población total de NSCs y de NPCs. En línea con estos datos, observamos una mayor proporción de neuroblastos alcanzando el BO (Figura 7C). El efecto del C21 es transitorio, ya que no se observan signos de activación un mes después del tratamiento (Figura 7D). En conjunto, estos resultados indican que la activación farmacológica del receptor AT2 incrementa la actividad en la V-SVZ y que este efecto se mantiene durante un tratamiento crónico (15 días), pero no a largo plazo si el tratamiento se interrumpe.



□ Saline    ■ AT2 agonist C21



**Figura 7. (A) Análisis mediante FACS de las poblaciones de células madre neurales (NSCs), células progenitoras neurales (NPCs) y neuroblastos (NB) en la zona ventricular-subventricular (V-SVZ) en la población Lin<sup>-</sup> clasificada por los niveles de CD24 y GLAST. (B) Análisis mediante FACS de las NSCs en la población Lin<sup>-</sup>/CD24<sup>-</sup> clasificadas según los niveles de GLAST y CD9. (C) Niveles de NSCs, NPCs y NB detectados mediante análisis con FACS 2 h después de la última dosis del tratamiento con C21 durante 15 días. (D) Niveles de NSCs, NPCs y NB 1 mes después del tratamiento con C21. Los datos se expresan como valor de la media  $\pm$  EEM. \* $p < 0,05$  (test *t* de Student).**

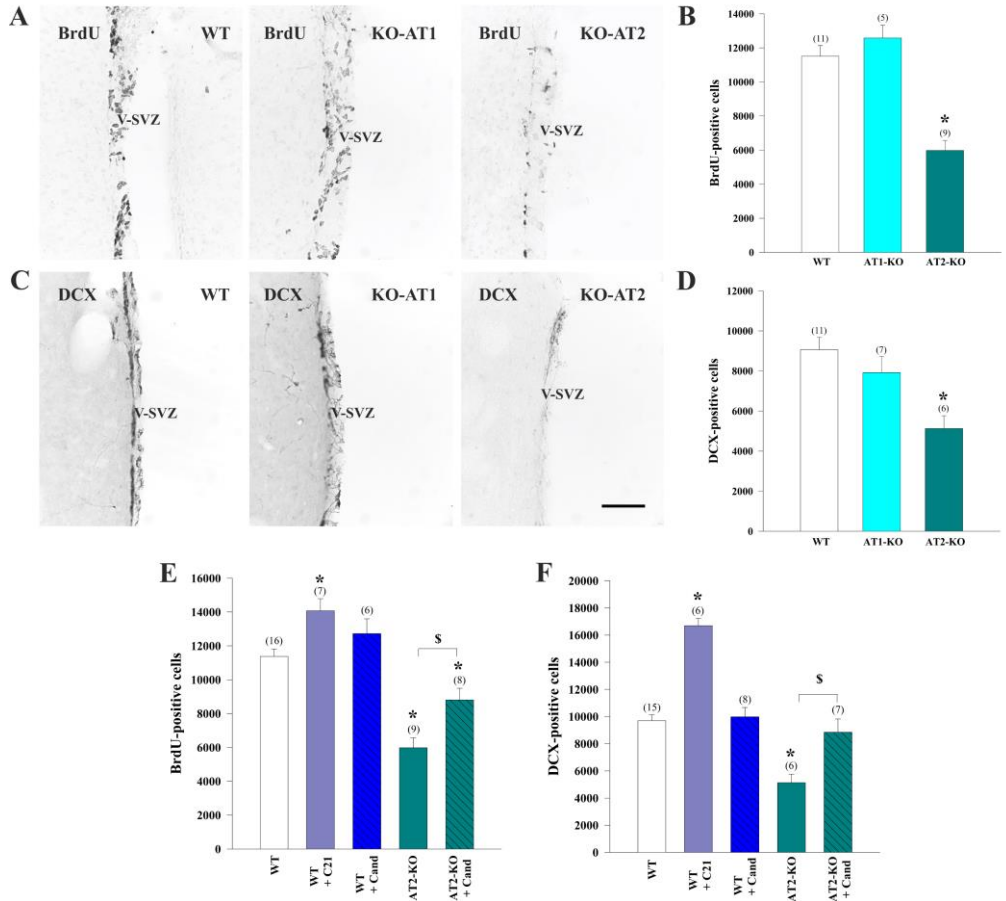
4.1.1.3. El efecto restrictivo del receptor AT1 sobre la neurogénesis adulta es contrarrestado por la estimulación de la actividad del receptor AT2

Para estudiar posibles interacciones entre los receptores AT1 y AT2 y sus posibles efectos sobre la regulación de la neurogénesis en la V-SVZ adulta, analizamos la proliferación y generación de neuroblastos *in vivo* en ratones con deleciones específicas en los genes que codifican para los receptores AT1 y AT2.

En consonancia con nuestros resultados *in vitro*, no observamos cambios significativos en el número de células BrdU-ir ni de células DCX-ir en ratones KO-AT1 con respecto a los ratones WT. Sin embargo, ambas poblaciones disminuyen drásticamente en ratones KO-AT2 con respecto a los ratones WT control (Figura 8A-D). Por tanto, los receptores AT2 juegan un papel esencial *in vivo*, que los señala como reguladores positivos de las NSCs.

Por otro lado, estudiamos los efectos de la manipulación de los receptores de AngII sobre la proliferación y generación de neuroblastos en ratones jóvenes. Nuestros resultados muestran que la activación específica de los receptores AT2 con C21 incrementa significativamente el número de células BrdU-ir y DCX-ir en la V-SVZ de ratones WT control. En línea con nuestros resultados previos (ver Figura 6D), no se observan cambios significativos ni en la proliferación ni en la generación de neuroblastos *in vivo* en animales WT tratados con candesartán. Sin embargo, la reducción de células BrdU-ir y de células DCX-ir observada en animales KO-AT2 se restaura parcialmente tras la inhibición del receptor AT1 con candesartán (Figura 8E, F). Estos resultados sugieren que los receptores AT1 inhiben la proliferación en la V-SVZ y que este efecto está bloqueado constitutivamente por el

receptor AT2; es decir, en condiciones basales, los efectos inhibitorios de AT1 se ven contrarrestados por la actividad de AT2.



**Figura 8.** Células bromodesoxiuridina (BrdU)-inmunorreactivas (-ir) (A, B) o doblecortina (DCX)-ir (C, D) en la zona ventricular-subventricular (V-SVZ) de ratones *wild type* (WT), ratones deficientes para el receptor AT1 (KO-AT1) y ratones KO-AT2. Número de células BrdU-ir (E) y de células DCX-ir (F) en la V-SVZ de ratones WT, ratones WT tratados con el antagonista de AT1 candesartán (Cand), ratones WT tratados con el agonista de AT2 C21 y ratones KO-AT2 control o tratados con candesartán durante 15 días. Los datos se expresan como valor de la media  $\pm$  EEM. \* $p < 0,05$  comparado con controles WT; en las figuras (E) y (F),  $^{\$}p < 0,05$  comparado con el grupo KO-AT2 (test *t* de Student o ANOVA de una vía y test *post hoc* Bonferroni). Escala = 200  $\mu$ m.

4.1.1.4. La regulación mutua entre los receptores AT1 y AT2 es la base de los efectos de AngII sobre las células formadoras de neuroesferas

Nuestros resultados sugieren que existen interacciones entre los receptores AT1 y AT2 en la V-SVZ (ver Figura 8E, F). Además, estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado una regulación recíproca entre ambos receptores en diversos tipos celulares y tejidos (Rodríguez-Pérez y col., 2013; Villar-Cheda y col., 2010, 2012b). Por ello, nos propusimos estudiar la expresión de AT1 y AT2 en células de la V-SVZ, aisladas mediante MCL, de ratones WT, ratones KO-AT1 y ratones KO-AT2.

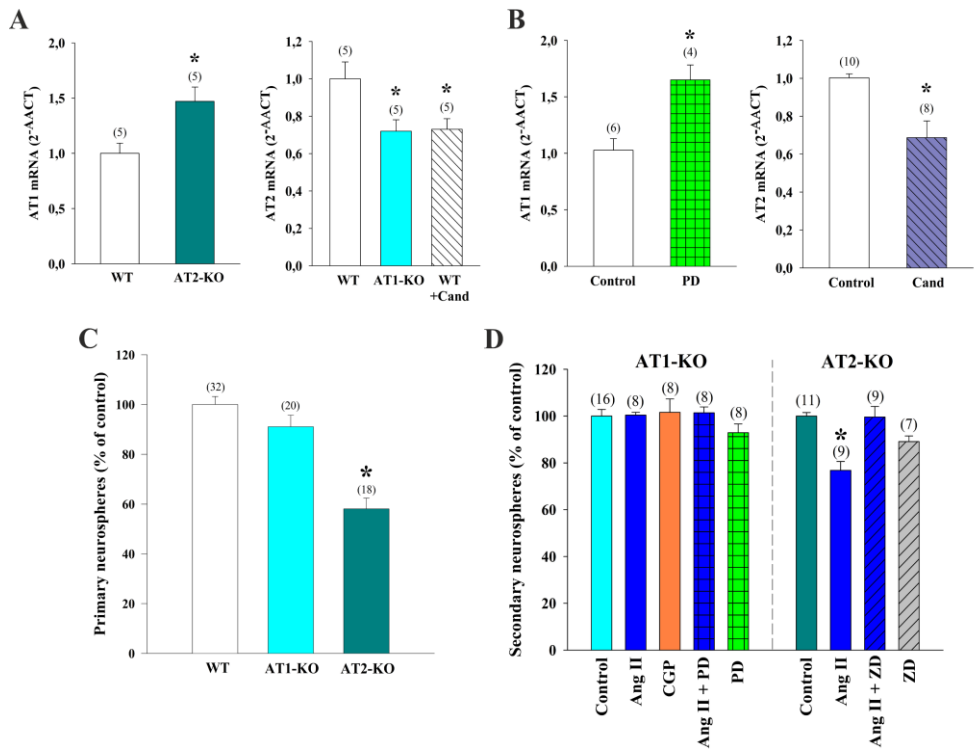
En las células aisladas de la V-SVZ de ratones KO-AT2 observamos un incremento significativo en los niveles de expresión de *Agtr1a*, lo que sugiere que los receptores AT2 regulan a la baja la expresión de AT1 en este nicho. En cambio, en células aisladas de la V-SVZ de ratones KO-AT1 y de ratones WT tratados con candesartán disminuye la expresión de *Agtr2*, lo que indica que la actividad del receptor AT1 regula positivamente la expresión de AT2 en la V-SVZ (Figura 9A). En concordancia con estos resultados, el tratamiento de neuroesferas derivadas de ratones WT con el antagonista de AT2 PD incrementa la expresión de *Agtr1a*, mientras que el tratamiento con el antagonista de AT1 candesartán reduce la expresión de *Agtr2* en estos cultivos (Figura 9B).

Como siguiente paso, nos planteamos estudiar cómo afectan las manipulaciones genéticas del SRA a la formación de neuroesferas *in vitro*. Para ello, aislamos células de la V-SVZ de ratones WT, ratones KO-AT1 y ratones KO-AT2 que sembramos en cantidades equivalentes en medio de crecimiento, para evaluar la generación de neuroesferas primarias. Las células obtenidas de la V-SVZ de ratones KO-AT1 y de ratones WT producen un número similar de neuroesferas primarias, mientras que las células sembradas a partir de la V-SVZ de ratones KO-AT2 dan lugar a un número significativamente menor de clones. Estos resultados subrayan el papel del receptor AT2 como principal efector de las acciones estimuladoras de la AngII sobre la generación de esferas derivadas de la V-SVZ (Figura 9C). Sin embargo, no detectamos diferencias asociadas al genotipo en el tamaño de los clones (diámetro

en  $\mu\text{m} \pm \text{EEM}$  en neurosfers primarias:  $106,8 \pm 2,8$  en WT;  $106,0 \pm 3,3$  en KO-AT1 y  $108,8 \pm 2,9$  en KO-AT2).

Para analizar los efectos de la AngII a través de cada uno de estos receptores, reproducimos *in vitro* las condiciones farmacológicas de los experimentos desarrollados *in vivo* (ver Figura 8). Para ello, sembramos células derivadas de la V-SVZ de ratones KO-AT1 y de ratones KO-AT2 en presencia de AngII y/o moduladores de sus receptores y cuantificamos las neurosfers secundarias generadas tras 6 DIV (ver Material y métodos, apartado 3.2.3). Tal y como cabe esperar según el perfil farmacológico descrito anteriormente, los cultivos derivados de ratones KO-AT1 no responden al tratamiento con AngII exógena. Sin embargo, la inhibición de los receptores AT2 con PD no reduce la formación de neurosfers (Figura 9D), como ocurre en los cultivos derivados de animales WT (ver Figura 6D). Estos datos sugieren que el receptor AT1 inhibe de manera basal la proliferación, efecto que es contrarrestado por el receptor AT2, gracias a su efecto represor sobre la expresión de AT1 (Figura 9A, B).

En conjunto, nuestros resultados muestran que la AngII, ya sea endógena o administrada exógenamente, regula la formación de neurosfers mediante un complejo equilibrio entre las actividades de sus receptores AT1 y AT2. La activación de AT2 estimula la proliferación, mientras que la estimulación de AT1 media la inhibición basal ejercida por la AngII sobre la proliferación que, a su vez, es contrarrestada por la acción represora de AT2 sobre la expresión de *Agtr1a*. La actividad de AT1, por otra parte, incrementa la expresión de *Agtr2*, generando una retroalimentación negativa que establece un nivel basal de regulación de la neurogénesis dependiente de AngII (ver Discusión, figura 34A).



**Figura 9.** Expresión de los receptores AT1 y AT2 en la zona ventricular-subventricular (V-SVZ) y en neurosféricas derivadas de la V-SVZ de ratón. (A) La expresión del receptor AT1 aumenta en la V-SVZ microdisseccionada de ratones deficientes para el receptor AT2 (KO-AT2) y la expresión de AT2 disminuye en la V-SVZ microdisseccionada de animales KO-AT1 y de ratones *wild type* (WT) tratados con el antagonista de AT1 candesartán. (B) La expresión de AT1 se incrementa en neurosféricas tratadas con el antagonista de AT2 PD123319 con respecto a los controles, mientras que la expresión de AT2 se reduce en neurosféricas tratadas con el antagonista de AT1 candesartán. El número de neurosféricas primarias obtenidas de ratones WT, KO-AT1 y KO-AT2 se muestra en (C). (D) Histograma en el que se muestra el número de neurosféricas derivadas de ratones KO-AT1 y KO-AT2 tras los correspondientes tratamientos. Los datos se obtuvieron de al menos tres experimentos independientes y se expresan como valor de la media  $\pm$  EEM. \* $p < 0,05$  con respecto al control (test *t* de Student o ANOVA de una vía y test *post hoc* Bonferroni). AngII = angiotensina II; CGP42112A = agonista de receptor AT2; ZD7155 = antagonista de receptor AT1.

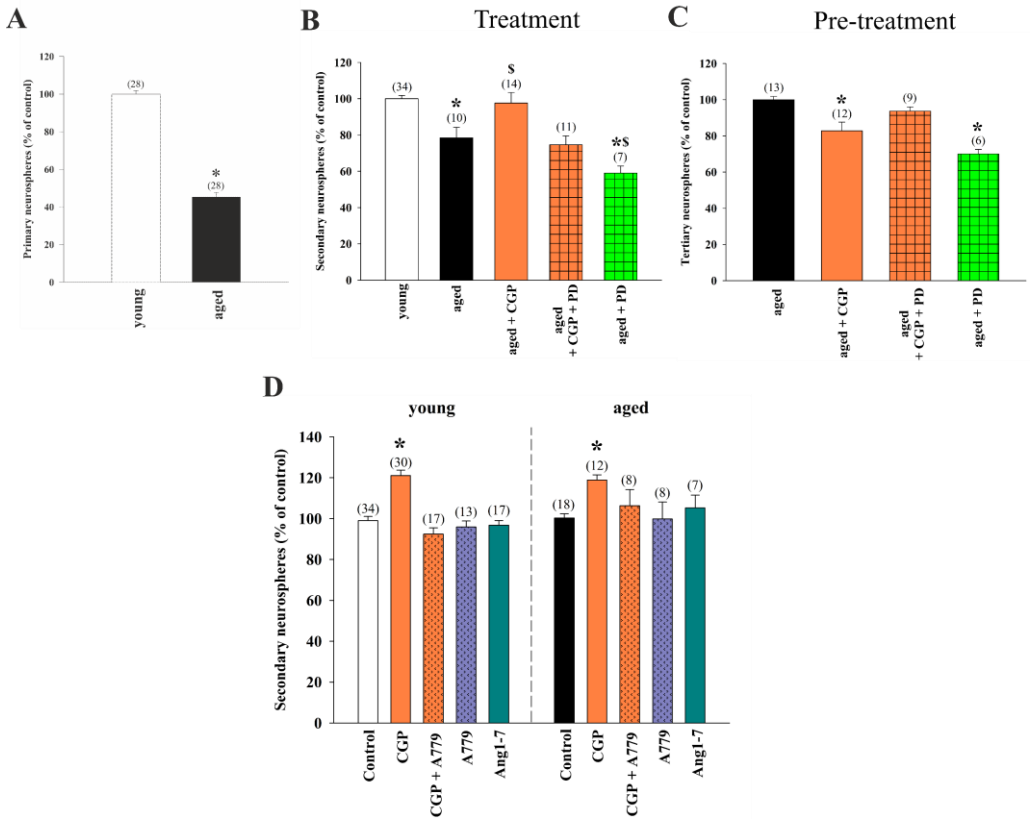
4.1.1.5. Los efectos estimuladores de la activación del receptor AT2 sobre las NSCs obtenidas de individuos jóvenes y envejecidos implican al receptor Mas

Tal y como hemos mencionado, nuestros resultados muestran que la activación del receptor AT2 estimula la proliferación *in vivo* e *in vitro* de NSCs y NPCs en ratones jóvenes (ver Figura **6F**, **7** y **8E**, **F**). A la vista de estos resultados, nos propusimos evaluar el posible efecto de la activación de los receptores AT2 sobre las NSCs y NPCs procedentes de animales envejecidos (20-22 meses).

En concordancia con estudios previos (Galvan y Jin, 2007), la V-SVZ aislada de ratones envejecidos genera menos neuroferas primarias que los cultivos establecidos a partir de células derivadas de la V-SVZ de ratones jóvenes control (Figura **10A**). Sin embargo, no se detectan diferencias significativas en el diámetro de las neuroferas obtenidas (en  $\mu\text{m} \pm \text{EEM}$ :  $103,4 \pm 3,2$  en cultivos derivados de ratones jóvenes y  $100,4 \pm 4,3$  en cultivos derivados de ratones envejecidos). En animales envejecidos, la activación de los receptores AT2 con CGP induce un incremento significativo en el número de neuroferas secundarias obtenidas, llegando incluso a igualar el número de neuroferas generadas a partir de la V-SVZ de controles jóvenes. Este incremento se revierte inhibiendo los receptores AT2 con su antagonista específico PD (Figura **10B**). Para estudiar el efecto de la activación de AT2 sobre la capacidad de autorrenovación de las NSCs y NPCs derivadas de animales envejecidos, las neuroferas secundarias que se expandieron en presencia de CGP (*'treatment'*) se disgregaron y la suspensión celular resultante se resembró en ausencia de tratamiento (*'pre-treatment'*) para permitir la formación de esferas terciarias. Tal y como ocurre en cultivos derivados de animales jóvenes (ver Figura **6G**), el incremento en la proliferación mediado por AT2 reduce el número de neuroferas terciarias obtenidas a partir de las neuroferas secundarias tratadas con CGP (Figura **10C**).

Recientemente, se han descubierto nuevos componentes del brazo protector del SRA, como el eje Ang(1-7)/MasR (Jackson y col., 2018), que cooperan con el eje AngII/AT2 en sus acciones neuroprotectoras (Costa-Besada y col., 2018). Por ello, nos propusimos investigar el posible papel del eje Ang(1-7)/MasR en la regulación de la

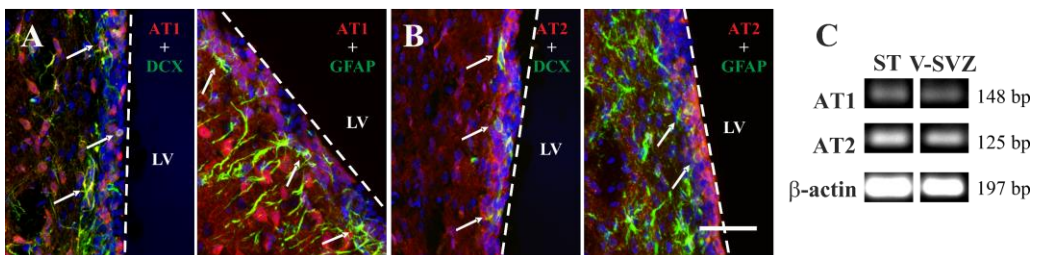
neurogénesis de la V-SVZ. Por sí sola, la activación o inhibición de MasR no afecta significativamente al número de neurosféricas secundarias generadas, independientemente de la edad del animal del que se obtiene el cultivo. Curiosamente, la inhibición de MasR con su antagonista específico A779 revierte el incremento en el número de neurosféricas inducido por CGP tanto en animales jóvenes como en animales envejecidos (Figura 10D), lo que sugiere la existencia de interacciones entre los receptores AT2 y Mas.



**Figura 10.** (A) Generación de neuroesferas de la zona ventricular-subventricular (V-SVZ) de ratones envejecidos (20-22 meses de edad) comparada con ratones jóvenes (3-4 meses de edad). Número de esferas obtenidas tras el tratamiento con el agonista de AT2 CGP42112A y/o con su antagonista PD123319 (B; ‘treatment’), o en cultivos derivados de neuroesferas pretratadas con agonistas de AT2 y resembradas en ausencia de tratamiento (C; neuroesferas derivadas de cultivos pretratados con agonistas de AT2; ‘pre-treatment’). (D) Número de neuroesferas secundarias obtenidas tras el tratamiento con CGP y/o con el antagonista del receptor Mas (MasR) A779, o con el agonista de MasR Ang(1-7). Los datos se obtuvieron de al menos tres experimentos independientes. Los datos se expresan como valores de la media  $\pm$  EEM. \* $p < 0,05$  comparado con el grupo control; en la figura (B),  $^{\S}p < 0,05$  comparado con el grupo de animales envejecidos (ANOVA de una vía y test *post hoc* Bonferroni).

#### 4.1.1.6. Implicación del receptor AT1 en los efectos del SRA sobre la neurogénesis adulta en rata

Para estudiar el posible papel del SRA en la regulación de la neurogénesis adulta en rata, en primer lugar, analizamos la expresión de los receptores de AngII en la V-SVZ de ratas jóvenes (3-4 meses de edad). La detección de los receptores AT1 y AT2 con anticuerpos específicos revela que la mayoría de los neuroblastos DCX-ir expresan los receptores AT1 y AT2 y que algunas células GFAP-ir, posiblemente correspondientes a NSCs y/o astrocitos no neurogénicos de la V-SVZ, también expresan ambos receptores (Figura 11A, B). La presencia de los receptores AT1 y AT2 en la V-SVZ de rata se confirmó mediante qPCR (Figura 11C).



**Figura 11.** Marcaje inmunofluorescente para los receptores AT1 (A, rojo) y AT2 (B, rojo) en células DCX-inmuno-reactivas (-ir; marcador de neuroblastos, verde) y en células GFAP-ir (marcador de astrocitos neurogénicos y no neurogénicos; verde) en la zona ventricular-subventricular (V-SVZ) de rata. Los núcleos aparecen teñidos con Hoechst-33342 (azul). (C) Bandas representativas de los receptores AT1 y AT2 y de  $\beta$ -actina obtenidas mediante qPCR en la V-SVZ microdisseccionada de rata. Como control positivo se utilizaron células microdisseccionadas del estriado (ST). LV = ventrículo lateral; DCX = doblecortina; GFAP = proteína ácida fibrilar glial; bp = pares de bases. Escala = 100  $\mu$ m.

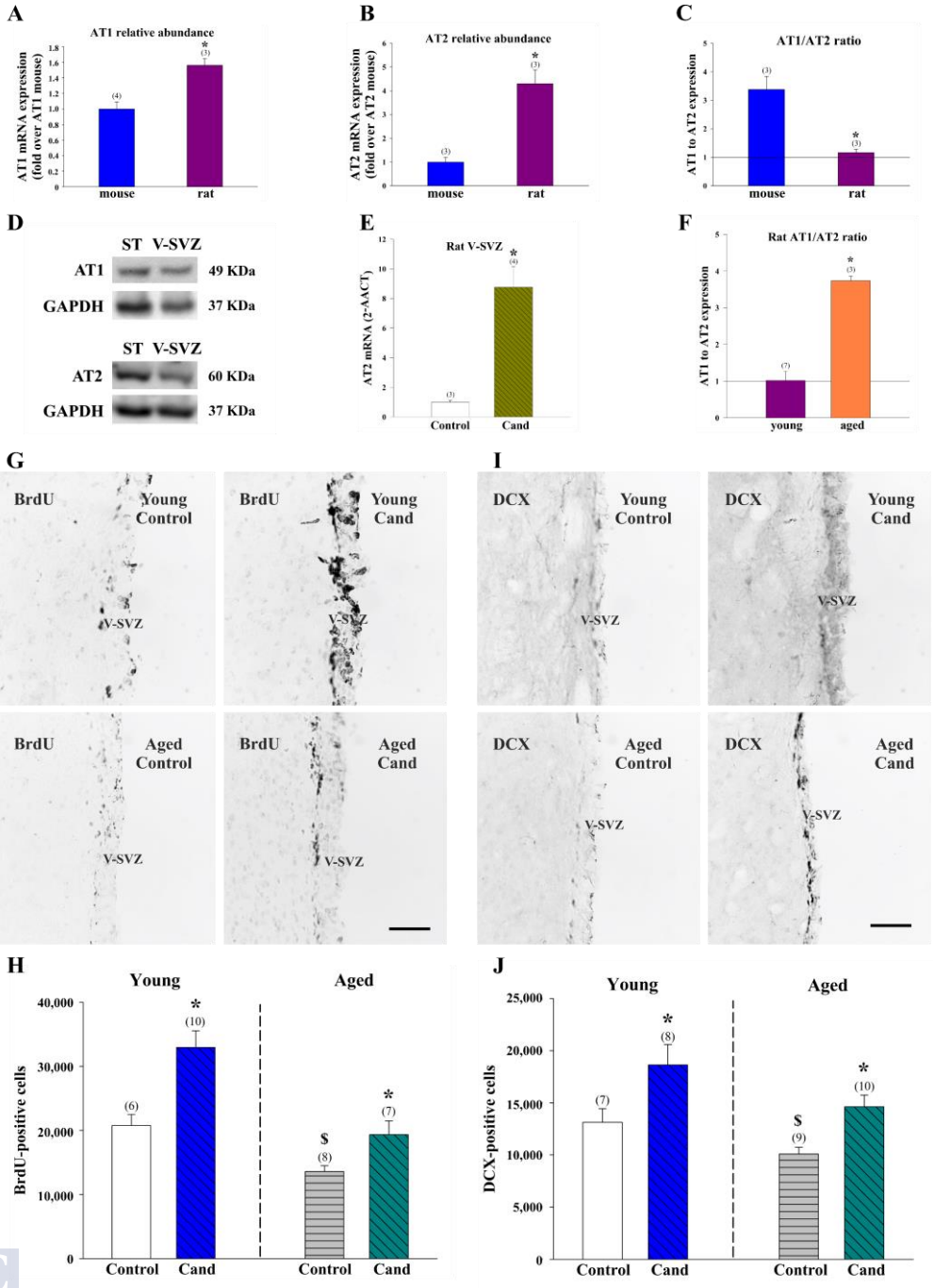
Con el objetivo de detectar posibles diferencias en la regulación de la neurogénesis adulta mediada por el SRA entre rata y ratón, estudiamos la expresión génica de los receptores AT1 y AT2 en las células de la V-SVZ, aisladas mediante MCL, de ambas especies. En ratas jóvenes adultas, los niveles de expresión de AT1 y AT2 son más elevados que los detectados en ratones (Figura 12A, B). Sin embargo, la ratio AT1/AT2 es de en torno a uno en ratas jóvenes, mientras que en el tejido de ratón los niveles de ARNm de *Agtr1a* son tres veces superiores a los de *Agtr2* (Figura 12C). El análisis de la V-SVZ de ratón mediante WB revela la presencia de los receptores AT1 y AT2 en extractos proteicos (Figura 12D).

Por otra parte, observamos que, al contrario de lo que ocurre en la V-SVZ de ratón (ver Figura 9A, B), las ratas tratadas con el inhibidor del receptor AT1 candesartán muestran un notable incremento en la expresión de *Agtr2* en la V-SVZ (Figura 12E), lo que concuerda con nuestras observaciones previas en el estriado de ratas tratadas con candesartán (Rodríguez-Pérez y col., 2013). Además, observamos que en la V-SVZ de ratas envejecidas (20-22 meses de edad) la ratio AT1/AT2 se incrementa con respecto a los controles jóvenes (Figura 12F), en consonancia con estudios previos en nuestro laboratorio realizados en el estriado y en la sustancia negra de ratas y ratones envejecidos (Rodríguez-Pérez y col., 2012; Villar-Cheda y col., 2012b, 2014). Nuestros datos indican que las manipulaciones del SRA empleando, por ejemplo, candesartán podrían ejercer efectos diferentes sobre la neurogénesis adulta en especies distintas, en este caso, rata y ratón.

Con el objetivo de confirmar esta hipótesis y para estudiar el posible papel de la AngII endógena en la neurogénesis adulta en la V-SVZ de rata, tratamos ratas jóvenes y envejecidas con el antagonista de AT1 candesartán durante 15 días (Rodríguez-Pérez y col., 2015b). El último día de tratamiento los animales recibieron 4 pulsos de BrdU tal y como se ha descrito previamente (ver Material y métodos, apartado 3.2.1). En los dos grupos de edad (joven y envejecido), el tratamiento con candesartán incrementa significativamente el número de células BrdU-ir en la V-SVZ con respecto a animales control de la misma edad (Figura 12G, H). Tal y como se ha observado previamente (Conover y

Todd, 2017), el número total de células BrdU-ir disminuye en animales control envejecidos con respecto a animales jóvenes (Figura **12H**). Cuando evaluamos el número de neuroblastos DCX-ir observamos resultados similares tanto en animales jóvenes como en animales envejecidos (Figura **12J, I**). Nuestros resultados sugieren que los receptores AT1 restringen la proliferación y disminuyen la expresión de AT2 en la V-SVZ de rata.

En conjunto, nuestros resultados demuestran los efectos de la AngII sobre la proliferación y generación de neuroblastos en la V-SVZ en condiciones fisiológicas tanto en ratas como en ratones, aunque las acciones del SRA pueden ser mecánicamente diferentes dependiendo de la especie.



**Figura 12. Expresión de los receptores AT1 y AT2 en la zona ventricular-subventricular (V-SVZ) adulta de rata y ratón.** Los niveles de ARNm de AT1 (A) y de AT2 (B) son más elevados en ratas que en ratones. Sin embargo, la ratio de los receptores AT1/AT2 en la V-SVZ microdiseccionada es superior en ratones que en ratas (C). (D) Bandas representativas de los receptores AT1 y AT2 en la V-SVZ de ratón detectadas por Western blot. El estriado (ST) se utilizó como control positivo. (E) La expresión de receptores AT2 se incrementa en ratas tratadas con el antagonista de AT1 candesartán (Cand) con respecto a las ratas control. (F) La ratio AT1/AT2 se incrementa en los animales envejecidos con respecto a los animales jóvenes. Microfotografías representativas de secciones coronales obtenidas de cerebros de ratas jóvenes y envejecidas en las que se muestra la V-SVZ marcada inmunohistoquímicamente para bromodesoxiuridina (BrdU) (G) y para doblecortina (DCX) (I). El número estimado de células Bru-inmunorreactivas (-ir) y de células DCX-ir en la V-SVZ de los grupos experimentales se muestra en (H, J). Los datos se expresan como valor de la media  $\pm$  EEM. \* $p < 0,05$  comparado con el grupo control de la misma edad (test *t* de Student); en las figuras (H) y (J),  $^{\S}p < 0,05$  comparado con el grupo joven control (test *t* de Student). Escala = 100  $\mu$ m.

#### **4.1.2. Estudio de la interacción entre el SRA y el sistema dopaminérgico en la regulación de la neurogénesis adulta en la V-SVZ cerebral**

Estudios recientes han descrito interacciones contrarreguladoras entre los receptores de AngII y los receptores de dopamina en tejidos periféricos (Gildea y col., 2019) y en el sistema nigroestriatal (Domínguez-Meijide y col., 2017; Labandeira-García y col., 2013). Sin embargo, no se han realizado estudios sobre posibles interacciones entre ambos sistemas en la V-SVZ, que recibe inervación dopaminérgica, ni sobre el posible papel del SRA como mediador de los efectos de la dopamina sobre la neurogénesis en este nicho. En el apartado anterior hemos mostrado el papel del SRA en la regulación de la neurogénesis adulta en la V-SVZ en condiciones fisiológicas. Sin embargo, no se conoce su posible papel en las alteraciones de la neurogénesis de la V-SVZ que se observan en modelos animales de EP. De ahí que nos hayamos propuesto abordar estas cuestiones en este apartado de la presente tesis.

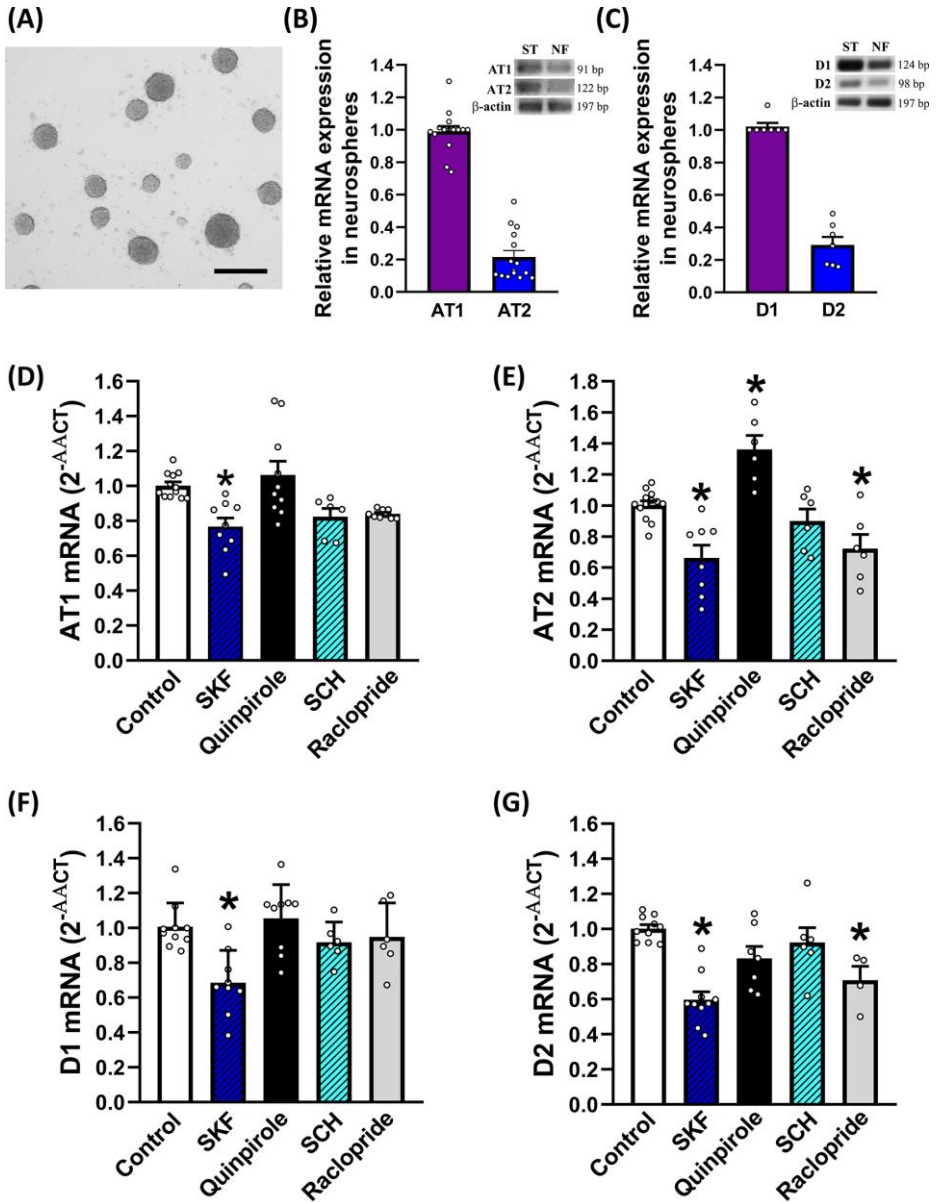
4.1.2.1. La expresión de los receptores del SRA y de los receptores dopaminérgicos se regula recíprocamente en NSCs y NPCs derivadas de la V-SVZ

Como una primera aproximación al estudio de posibles interacciones entre el SRA y el sistema dopaminérgico en la V-SVZ adulta, y puesto que nuestros resultados muestran la presencia de los receptores de AngII AT1 y AT2 en cultivos de neuroesferas derivados de la V-SVZ de ratones adultos jóvenes (3-4 meses de edad) (ver Figura **6B**), nos propusimos confirmar la presencia de receptores de dopamina en estos cultivos. Nuestros resultados muestran la presencia de los receptores dopaminérgicos de tipo D1 y de tipo D2 en cultivos de neuroesferas (Figura **13C**), detectada mediante qPCR (ver Material y métodos, apartado [3.2.4](#)). Además, nuestros resultados muestran que la expresión de ARNm de *Agtr1a* y de *Drd1* es significativamente superior a la de los receptores *Agtr2* y *Drd2*, respectivamente (Figura **13A-C**). En concreto, la ratio D1/D2 es de aproximadamente 5:1 (Figura **13C**) y la ratio AT1/AT2 es de aproximadamente 3:1 (Figura **13B**), lo que concuerda con nuestras observaciones previas en células de la V-SVZ, obtenidas mediante MCL, de ratones jóvenes (ver Figura **13C**).

Una vez confirmada la presencia de los receptores del SRA y de los receptores dopaminérgicos en cultivos derivados de la V-SVZ adulta de ratones, nos propusimos investigar posibles interacciones entre ellos. Para ello, en primer lugar, analizamos los niveles de expresión de *Agtr1a*, *Agtr2*, *Drd1* y *Drd2* tras la manipulación farmacológica de los receptores de dopamina de la familia D1 (tipo D1, que incluye los receptores D1 y D5) y de la familia D2 (tipo D2, que incluye los receptores D2, D3 y D4) (ver Material y métodos, apartado [3.2.1](#)). Nuestros resultados muestran que los niveles de expresión de los receptores AT1 y AT2 disminuyen en respuesta a la estimulación de receptores dopaminérgicos de tipo D1 con su agonista específico SKF38393 (SKF en lo sucesivo). En cambio, el tratamiento de cultivos derivados de la V-SVZ con el agonista específico de receptores de tipo D2 quinpirol induce un incremento significativo en los niveles de expresión del receptor AT2, sin modificar la expresión del receptor AT1 (Figura **13D, E**). Además, el bloqueo farmacológico de los receptores

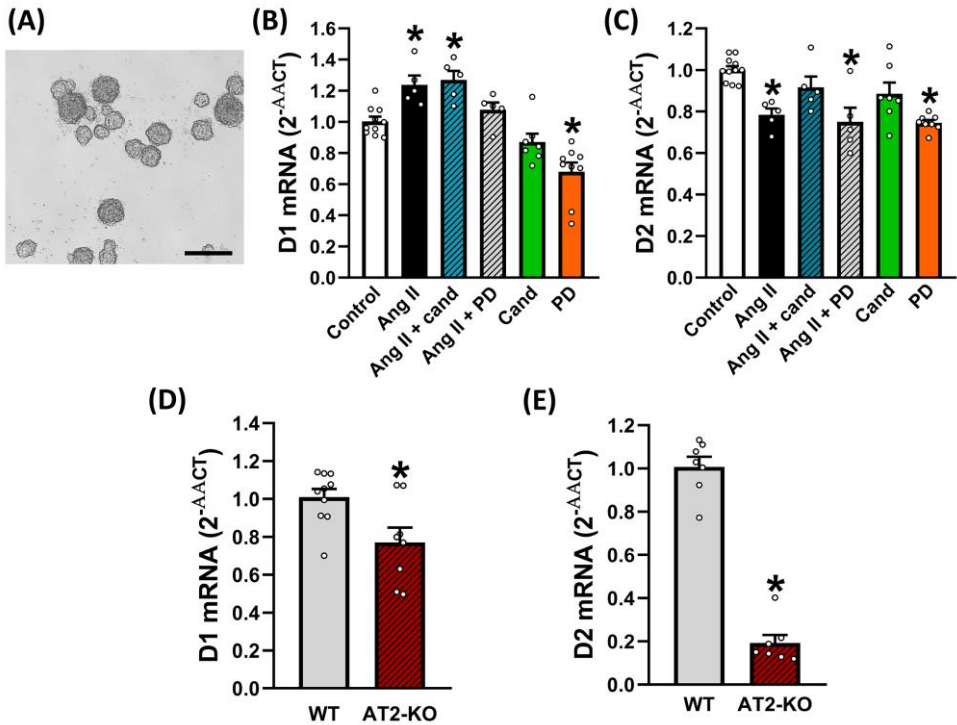
de tipo D2 con su antagonista específico raclopride reduce los niveles de expresión del receptor AT2. Sin embargo, la inhibición de los receptores de tipo D1 con su antagonista específico SCH23390 (SCH en lo sucesivo) no altera de manera significativa los niveles de expresión de los receptores AT1 y AT2 (Figura **13D, E**).

El análisis de la expresión de los receptores dopaminérgicos de tipo D1 y de tipo D2 tras su manipulación farmacológica revela que el tratamiento con el agonista específico de receptores D1 SKF reduce los niveles de expresión de D1 y de D2. Sin embargo, el agonista específico de receptores tipo D2 quinpirol no induce cambios significativos en los niveles de expresión de los receptores dopaminérgicos. El bloqueo de receptores de tipo D2 con raclopride, en cambio, inhibe la expresión de *Drd2* (Figura **13F, G**), mientras que el bloqueo de los receptores D1 con el antagonista SCH no cambia significativamente los niveles de expresión de *Drd1* ni de *Drd2* (Figura **13F, G**).



**Figura 13.** Expresión de receptores de angiotensina II (AngII) y de receptores dopaminérgicos en cultivos de neurosféricas derivados de la zona ventricular-subventricular (V-SVZ) adulta de ratones jóvenes (A-C) y efectos de agonistas y antagonistas dopaminérgicos sobre la expresión de los receptores AT1, AT2, D1 y D2. (A) Microfotografías de cultivos de neurosféricas flotantes obtenidas de la V-SVZ de ratones adultos jóvenes (3-4 meses de edad). (B, C) Bandas representativas y expresión relativa de ARNm de AT1, AT2, D1, D2 y  $\beta$ -actina obtenidas mediante qPCR en neurosféricas (NF). Se utilizaron homogenados de estriado (ST) como control positivo. Los niveles de expresión de los receptores AT1 y D1 son significativamente superiores a los de los receptores AT2 y D2, respectivamente. Las eficiencias de amplificación de los distintos cebadores utilizados fueron 95% para  $\beta$ -actina, 99% para D1, 94% para D2, 106% para AT1 y 98% para AT2. (D-G) El tratamiento con el agonista de D1 SKF38393 reduce tanto la expresión de los receptores de AngII AT1 y AT2 como la de los receptores dopaminérgicos D1 y D2. El tratamiento con el agonista de D2 quinpirol incrementa la expresión de los receptores AT2 mientras que el tratamiento con su antagonista raclopride reduce los niveles de expresión del receptor de AngII AT2 y del receptor dopaminérgico D2. Los datos se expresan como valores de la media  $\pm$  EEM. \* $p < 0,05$  comparado con el grupo control (ANOVA de una vía y test *post hoc* Bonferroni). bp = pares de bases. SCH23390 = antagonista de receptores dopaminérgicos de tipo D1. Escala = 200  $\mu$ m.

Para confirmar la regulación mutua de los receptores del SRA y de los receptores dopaminérgicos, analizamos los niveles de expresión de *Drd1* y *Drd2* tras la manipulación farmacológica de los receptores de AngII AT1 y AT2 en neurosféricas (ver Material y métodos, apartado [3.2.1](#)) (Figura **14A**). Nuestros resultados muestran que el tratamiento con AngII induce un incremento en la expresión de los receptores dopaminérgicos de tipo D1 en los cultivos de neurosféricas, y que este incremento se revierte con el antagonista de AT2 PD (Figura **14B**). Además, el tratamiento con AngII también induce un descenso en los niveles de expresión de los receptores de tipo D2, que se revierte con el antagonista del receptor AT1 candesartán (Figura **14C**). Por otra parte, el tratamiento con el antagonista de AT2 PD reduce la expresión de los receptores dopaminérgicos D1 y D2 (Figura **14B, C**). En cultivos de neurosféricas derivados de la V-SVZ adulta de ratones KO-AT2, nuestros datos muestran una disminución significativa en los niveles de expresión del receptor D1, y de forma más acusada, en la expresión de D2 (Figura **14D, E**).

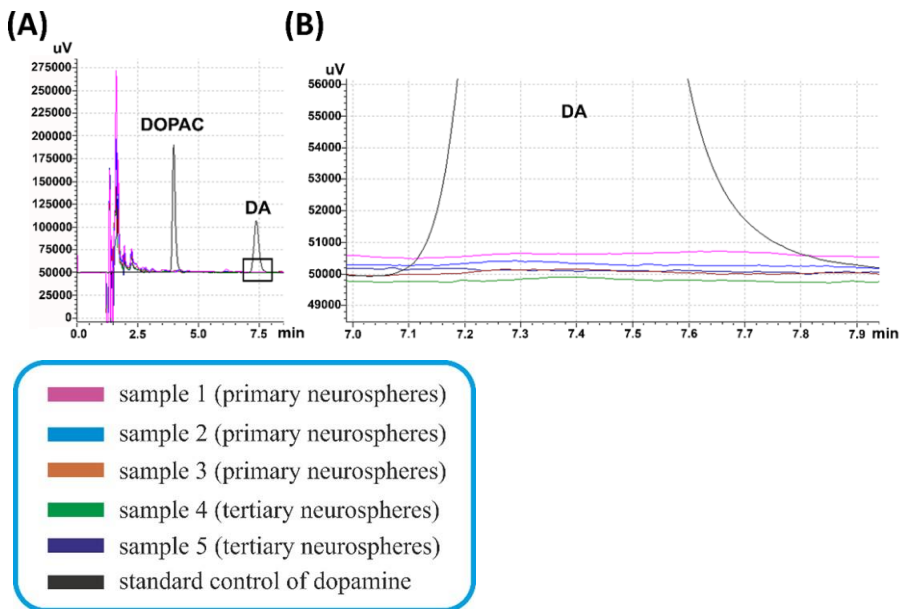


**Figura 14.** Efecto de los receptores de angiotensina II (AngII) sobre la expresión de receptores dopaminérgicos en cultivos de neuroesferas derivados de la zona ventricular-subventricular (V-SVZ). (A) Microfotografías de cultivos de neuroesferas flotantes obtenidas de la V-SVZ de ratones adultos. (B) La expresión del receptor D1 se incrementa en cultivos tratados con AngII. Este incremento se revierte cuando los cultivos de neuroesferas se tratan con el antagonista del receptor AT2 PD123319. (C) La expresión del receptor D2 se reduce en cultivos tratados con AngII, efecto que se revierte tras el tratamiento con el antagonista del receptor AT1 candesartán. Los niveles de expresión de D1 (D) y de D2 (E) disminuyen en neuroesferas obtenidas de la V-SVZ de ratones deficientes para el receptor AT2 (KO-AT2) con respecto a ratones *wild type* (WT). Los datos se obtuvieron de al menos tres experimentos independientes. Los datos se expresan como valores de la media  $\pm$  EEM. \* $p < 0,05$  comparado con el grupo control (test *t* de Student o ANOVA de una vía y test *post hoc* Bonferroni). Escala = 300  $\mu$ m.

4.1.2.2. La activación de los receptores D3 incrementa la proliferación de NSCs y NPCs derivadas de la V-SVZ

Diversos estudios han sugerido que la dopamina modula la neurogénesis en la V-SVZ, pero muchas de estas investigaciones han arrojado resultados contradictorios. Con el objetivo de esclarecer el papel de los receptores dopaminérgicos en la regulación de la neurogénesis en la V-SVZ adulta de ratón, tratamos cultivos de neuroesferas derivados de este nicho con dopamina y/o con diferentes agonistas/antagonistas de sus receptores.

Para ello, antes estudiamos la presencia de dopamina en medio de cultivo obtenido de cultivos de neuroesferas mediante HPLC (ver Material y métodos, apartado [3.2.5.2](#)). Nuestros datos muestran que el medio de cultivo derivado de neuroesferas primarias y terciarias no contiene dopamina (Figura 15).



**Figura 15. Análisis mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) del medio de cultivo derivado de neuroesferas primarias y terciarias. (A)** Cromatograma en el que se muestra la ausencia de dopamina (DA) y de su metabolito ácido 3,4 - dihidroxifenil acético (DOPAC, del inglés *3,4 - dihydroxyphenylacetic acid*) en muestras de neuroesferas. Los patrones de DA y DOPAC se utilizaron como controles positivos (picos en negro en el cromatograma). **(B)** Aumento del área encuadrada, que representa el tiempo de retención de DA.

A continuación, tratamos los cultivos de células derivadas de la V-SVZ con dopamina y/o distintos agonistas/antagonistas de sus receptores. El tratamiento con dopamina induce un incremento significativo en el número de esferas secundarias generadas. La inhibición del receptor de tipo D1 con SCH no induce cambios significativos en el aumento de esferas inducido por dopamina (Figura **16A**). Sin embargo, el pretratamiento con el antagonista del receptor de tipo D2 raclopride revierte el incremento en el número de neuroesferas secundarias inducido por dopamina (Figura **16B**), lo que indica que los receptores de tipo D2 median la formación de neuroesferas. Además, observamos una reducción en el número de neuroesferas secundarias en los cultivos que se trataron solo con el antagonista de D2 raclopride (Figura **16B**).

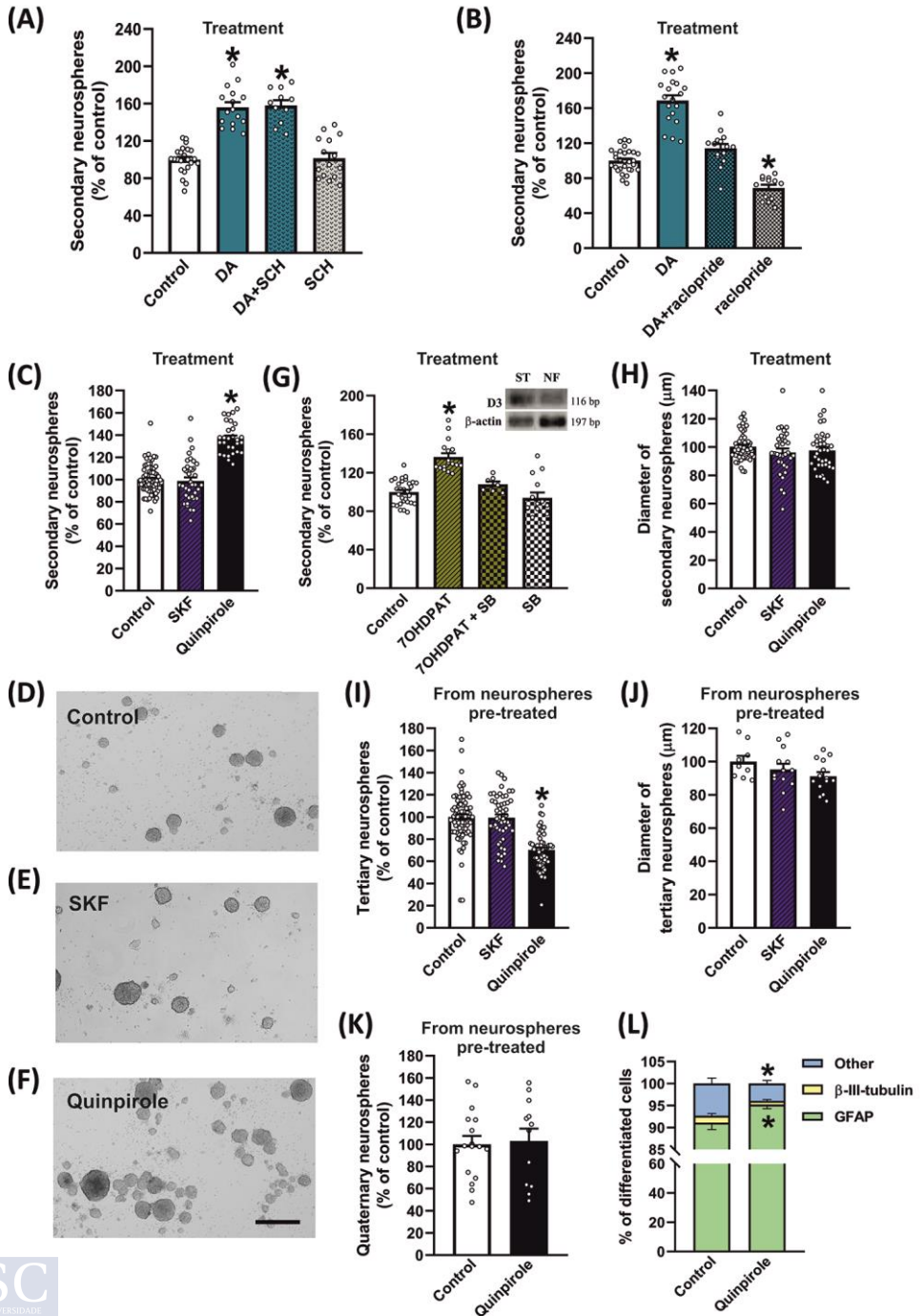
Con el objetivo de confirmar que la estimulación directa de los receptores dopaminérgicos de tipo D2 favorece la generación de esferas, sembramos células derivadas de la V-SVZ de ratón en presencia de agonistas específicos de los receptores de dopamina de tipo D1 y de tipo D2. El tratamiento con el agonista de receptores de tipo D2 quinpirol incrementa el número de neuroesferas derivadas de la V-SVZ. Sin embargo, la activación de los receptores de dopamina D1 con su agonista específico SKF no induce ningún cambio en el número de neuroesferas secundarias generadas con respecto a los cultivos control sin tratar (Figura **16C-F**).

En estudios previos, se ha demostrado que la estimulación preferencial de los receptores D3, pertenecientes a la subfamilia de receptores de dopamina de tipo D2, regula positivamente la proliferación en distintas áreas cerebrales, incluyendo la V-SVZ (Coronas y col., 2004). Por ello, nos propusimos investigar el efecto de la activación de los receptores D3 sobre la generación de neuroesferas derivadas de la V-SVZ. Nuestros resultados indican que los receptores D3 se expresan en nuestros cultivos de neuroesferas (Figura **16G**) y su activación con el agonista específico 7-OH-DPAT induce un incremento significativo en el número de esferas, que se revierte tras el tratamiento con el antagonista específico de D3 SB277011A (Figura **16G**).

Para estudiar si el aumento en el número de neuroferas observado tras la activación de los receptores dopaminérgicos se debe a un incremento en la capacidad de proliferación de los clones obtenidos, medimos el diámetro de las neuroferas secundarias generadas (ver Material y métodos, apartado [3.2.3](#)). Nuestros datos muestran que ni el tratamiento con SKF ni el tratamiento con quinpirol inducen cambios significativos en el diámetro de las esferas (Figura **16H**), lo que sugiere que la activación de los receptores de tipo D2 está involucrada en la activación de las células iniciadoras de esferas, pero no en su crecimiento.

Con el fin de conocer qué tipo de división celular es promovida por la activación de los receptores dopaminérgicos, resembramos células obtenidas de neuroferas secundarias, que habían crecido en presencia de SKF o de quinpirol, en medio de crecimiento sin ningún tratamiento específico (es decir, neuroferas derivadas de los cultivos pretratados con agonistas dopaminérgicos). Nuestros resultados muestran que el pretratamiento con SKF no induce cambios significativos en el número de esferas generadas. Sin embargo, el pretratamiento con quinpirol disminuye significativamente el número de neuroferas obtenidas (neuroferas terciarias) (Figura **16I**), lo que indica que la activación previa de los receptores de tipo D2 reduce la capacidad de las NSCs/NPCs para producir colonias sucesivas. Sin embargo, el diámetro de las neuroferas terciarias obtenidas no difiere significativamente entre ambos grupos (es decir, neuroferas obtenidas de neuroferas control y neuroferas obtenidas de neuroferas pretratadas con SKF o quinpirol) (Figura **16J**). Curiosamente, no observamos diferencias significativas en el número de neuroferas cuaternarias derivadas de los cultivos pretratados con quinpirol con respecto al grupo control (Figura **16K**). Con el objetivo de profundizar en los efectos de la activación de D2 sobre las NSCs/NPCs, realizamos ensayos de diferenciación. Para ello, resembramos células derivadas de neuroferas secundarias mantenidas en condiciones control y de neuroferas secundarias pretratadas con quinpirol en un sustrato adherente en presencia de medio de crecimiento suplementado con bFGF y posteriormente con FBSi (ver Material y métodos, apartado [3.2.7](#)). Nuestros resultados muestran que los cultivos derivados de neuroferas pretratadas con

quinpirol generan la misma proporción de células  $\beta$ -III-tubulina-ir que las neurosféricas derivadas de cultivos control. Sin embargo, observamos un incremento en el número de células GFAP-ir y un descenso en el número de células negativas para GFAP y para  $\beta$ -III-tubulina-ir (es decir, otras células) en los cultivos derivados de neurosféricas pretratadas con quinpirol (Figura **16L**).



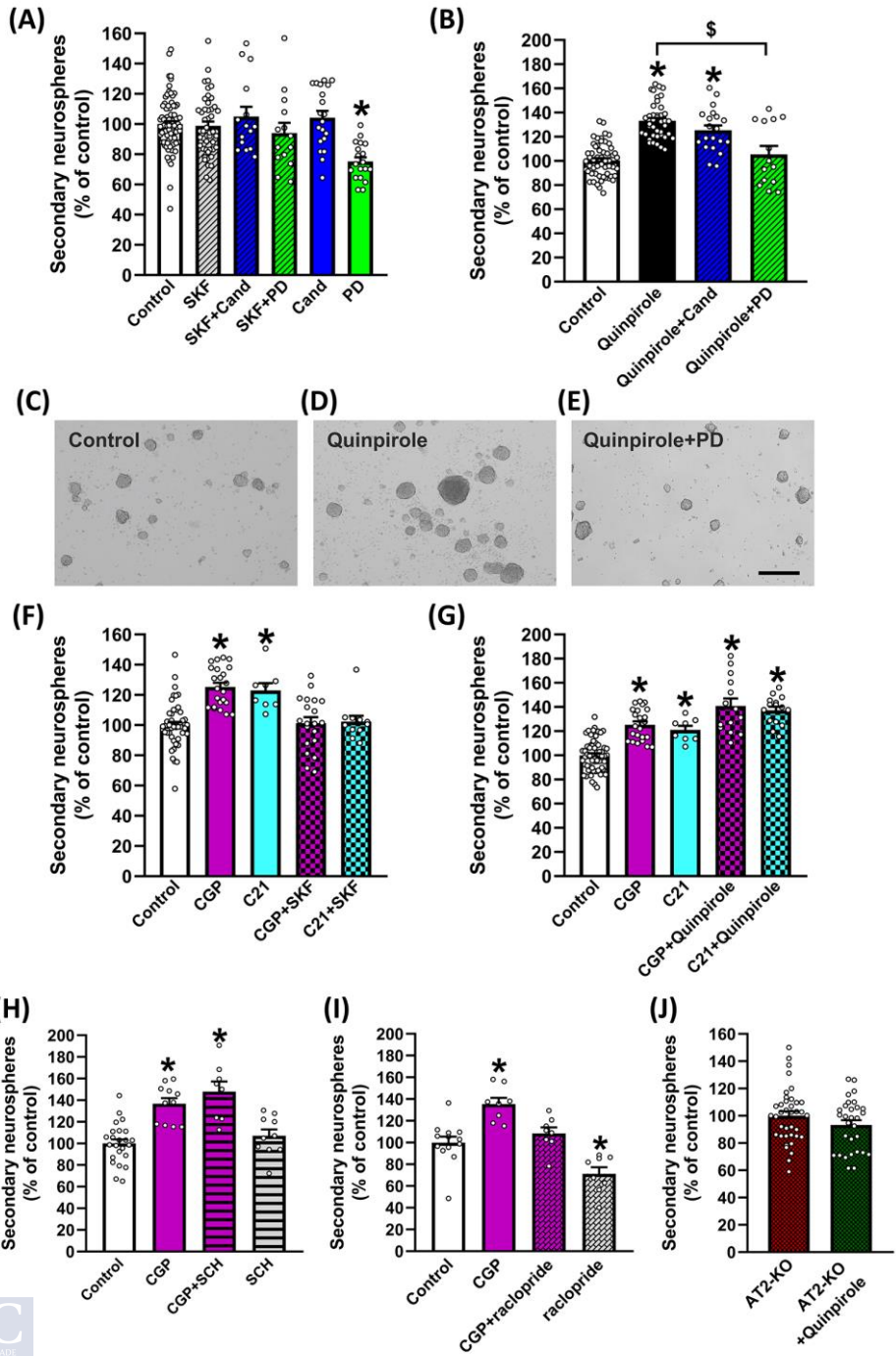
**Figura 16. Generación de neurosféricas de la zona ventricular-subventricular (V-SVZ) de ratones jóvenes tras el tratamiento con dopamina (DA) o diferentes agonistas y antagonistas de receptores dopaminérgicos.** Número (A-G, I, K) y el diámetro (H, J) de neurosféricas secundarias obtenidas tras el tratamiento con dopamina (A, B), con el agonista de receptores de tipo D1 SKF38393 y con el agonista de receptores de tipo D2 quinpirol (C, H), o con el agonista selectivo del receptor D3 7-hidroxi-N,N-dipropil-2-aminotetralina (7-OHDPAT) (G). (G) Bandas representativas de ARNm de D3 obtenidas mediante qPCR en neurosféricas (NF). Se utilizaron homogenizados de estriado (ST) como control positivo. Número de neurosféricas terciarias (I) o cuaternarias (K) obtenidas a partir de neurosféricas secundarias pretratadas con SKF38393 o con quinpirol y resembradas en ausencia de tratamiento. (L) Porcentaje de astrocitos (células GFAP-inmuno-reactivas(-ir)) y neuronas (células B-III-tubulina-ir) diferenciados a partir de neurosféricas pretratadas con quinpirol con respecto al número total de células (número de núcleos teñidos con Hoechst-33342). Los datos se obtuvieron de al menos tres experimentos independientes. Los datos se representan como valor de la media  $\pm$  EEM. \* $p < 0,05$  con respecto al grupo control (sin tratar) (ANOVA de una vía y test *post hoc* Bonferroni). SCH23390 = antagonista de receptores dopaminérgicos de tipo D1; raclopride = antagonista de receptores dopaminérgicos de tipo D2; SB277011A = antagonista de receptores D3; GFAP = proteína ácida fibrilar glial; bp= pares de bases. Escala = 300  $\mu$ m.

4.1.2.3. La interacción entre la dopamina y el SRA regula la proliferación *in vitro* de NSCs y NPCs derivadas de la V-SVZ

Nuestros resultados muestran no solo la presencia de los principales componentes del SRA (ver Figura 12D y 13B) y del sistema dopaminérgico (ver Figura 13C y 16G) en células derivadas de la V-SVZ adulta de ratón, sino también la existencia de una regulación mutua entre ambos tipos de receptores (ver Figura 13D, E y 14B-E).

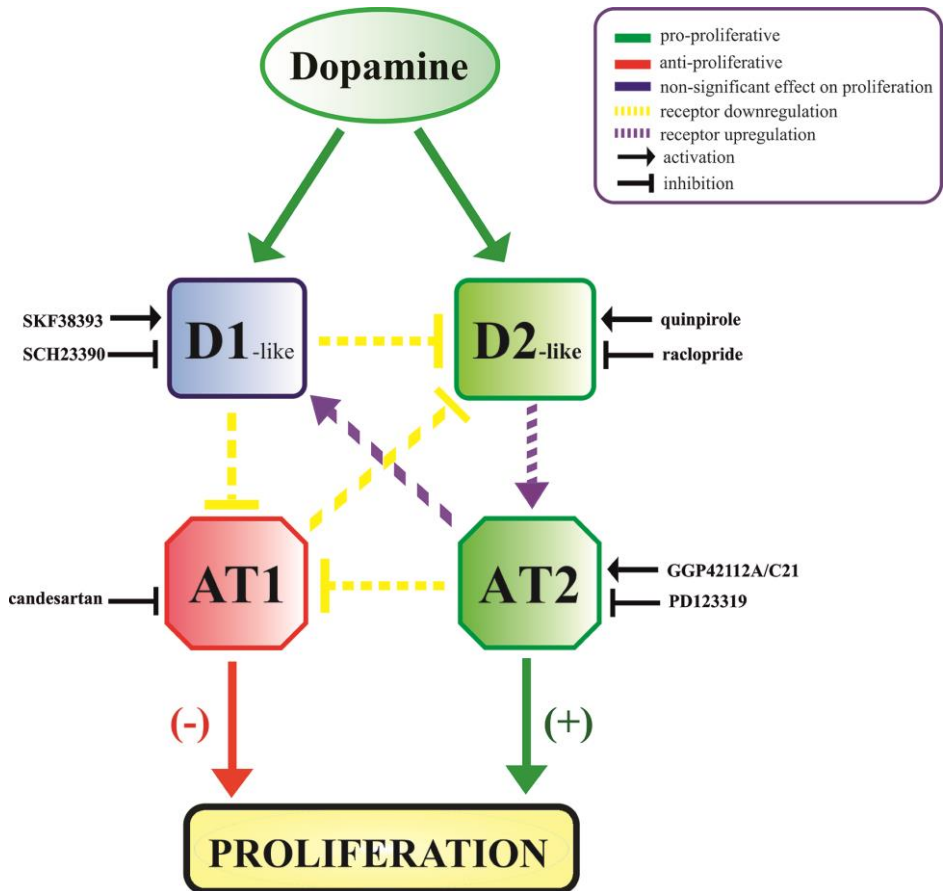
Con el objetivo de estudiar si estas interacciones ejercen algún efecto sobre la generación de esferas, tratamos cultivos de neurosféricas con agonistas y antagonistas de los receptores dopaminérgicos de tipo D1 y de tipo D2, en combinación con agonistas y antagonistas de los receptores AT1 y AT2. Tal y como cabía esperar, los cultivos tratados con el agonista del receptor D1 SKF no experimentan cambios significativos en el número de neurosféricas generadas con respecto al grupo control. Además, ni el pretratamiento con el antagonista de AT1 candesartán ni con el antagonista de AT2 PD modifican este efecto (Figura 17A). Curiosamente, el tratamiento con el antagonista del receptor AT2 PD inhibe el incremento en el número de neurosféricas

inducido por la activación de los receptores D2 con quinpirol. Sin embargo, no observamos cambios significativos en el número de neurosféricas secundarias obtenidas tras el tratamiento con el antagonista del receptor AT1 candesartán (Figura 17B-E). Tal y como hemos descrito previamente (ver Figura 6F), la estimulación de los receptores AT2 con CGP o con C21 induce un incremento en el número de neurosféricas. Sin embargo, el tratamiento con el agonista de receptores D1 SKF bloquea este efecto, es decir, revierte el aumento en el número de neurosféricas inducido por CGP o por C21 (Figura 17F). Tras la estimulación simultánea de los receptores AT2 y de los receptores dopaminérgicos de tipo D2, observamos un incremento significativo en el número de neurosféricas con respecto al grupo control (Figura 17G). El bloqueo de los receptores dopaminérgicos D1 con su antagonista específico SCH no tiene efectos sobre el aumento en el número de neurosféricas inducido por CGP (Figura 17H), mientras que el pretratamiento con el antagonista de receptores de tipo D2 raclopride previene el aumento en la generación de neurosféricas mediado por AT2 (Figura 17I). En línea con estos datos, que indican que los receptores AT2 median los efectos inducidos por los receptores D2, el tratamiento de neurosféricas derivadas de la V-SVZ de ratones KO-AT2 con quinpirol no induce cambios significativos en el número de neurosféricas secundarias con respecto a cultivos sin tratar derivados de ratones KO-AT2 (Figura 17J).



**Figura 17. Generación de neurosféricas de la zona ventricular-subventricular (V-SVZ) de ratones jóvenes tras el tratamiento con diferentes agonistas y antagonistas dopaminérgicos en combinación con agonistas y antagonistas de los receptores AT1 o de los receptores AT2.** (A) Histogramas que muestran el número de neurosféricas secundarias obtenidas tras el tratamiento con el agonista de receptores dopaminérgicos de tipo D1 SKF38393 y con el antagonista del receptor AT1 candesartán o con el antagonista de AT2 PD123319. (B) Número de neurosféricas en cultivos tratados con el agonista de los receptores D2 quinpirol y con antagonistas de los receptores AT1 y AT2. (C-E) Microfotografías representativas de cultivos de neurosféricas tratadas con quinpirol y PD123319. Número de neurosféricas obtenidas tras el tratamiento con los agonistas del receptor AT2 CGP42112A o C21 y el agonista de receptores D1 SKF38393 (F), el agonista de receptores D2 quinpirol (G), el antagonista de receptores D1 SCH23390 (H), o el antagonista de receptores D2 raclopride (I). (J) Las neurosféricas obtenidas de la V-SVZ de ratones deficientes para el receptor AT2 (KO-AT2) no responden al tratamiento con el agonista de receptores dopaminérgicos D2 quinpirol. Los datos se obtuvieron de al menos tres experimentos independientes. Los datos se representan como valor de la media  $\pm$  EEM. \* $p < 0,05$  con respecto al grupo control (sin tratar); en la figura (B),  $^{\$}p < 0,05$  con respecto a cultivos tratados únicamente con quinpirol (test *t* de Student o ANOVA de una vía y test *post hoc* Bonferroni). Escala = 300  $\mu$ m.

En conjunto, nuestros resultados sugieren que la dopamina estimula la proliferación de NSCs y NPCs derivadas de la V-SVZ de ratones adultos a través de interacciones con los receptores del SRA. La dopamina, a través de los receptores dopaminérgicos de tipo D2, incrementa los niveles de expresión de los receptores AT2 que, a su vez, median la proliferación celular inducida por D2. La activación de los receptores dopaminérgicos de tipo D1 reduce la expresión de los receptores AT1. Un efecto inhibitorio directo sobre la acción antiproliferativa de los receptores AT1 provocaría un aumento de la proliferación celular; sin embargo, la activación de D1 también inhibe el efecto proliferativo de D2, lo que conduce a cambios no significativos en la proliferación celular (Figura 18).



**Figura 18.** Esquema representativo del papel de la dopamina sobre la proliferación de las células de la zona ventricular-subventricular (V-SVZ). La dopamina, a través de la familia de receptores D2, regula al alza la expresión del receptor de angiotensina (AngII) AT2, que media la proliferación inducida por D2. A través de sus receptores de tipo D1, la dopamina reduce la expresión de los receptores de AngII AT1, que inhiben la proliferación celular. El bloqueo del efecto antiproliferativo del receptor AT1 podría inducir un incremento de la proliferación; sin embargo, la activación de los receptores de tipo D1 también inhibe la expresión de D2 y sus efectos proliferativos de manera que, en conjunto, no se observan cambios significativos en la proliferación celular. SKF38393 = agonista de receptores dopaminérgicos de tipo D1; SCH23390 = antagonista de receptores dopaminérgicos de tipo D1; quinpirol = agonista de receptores dopaminérgicos de tipo D2; raclopride = antagonista de receptores dopaminérgicos de tipo D2; candesartán = antagonista de receptores AT1; CGP42112A = agonista de receptores AT2; PD123319 = antagonista de receptores AT2.

#### 4.1.2.4. La interacción entre la dopamina y el SRA regula la proliferación y la generación de neuroblastos en un modelo en rata de EP

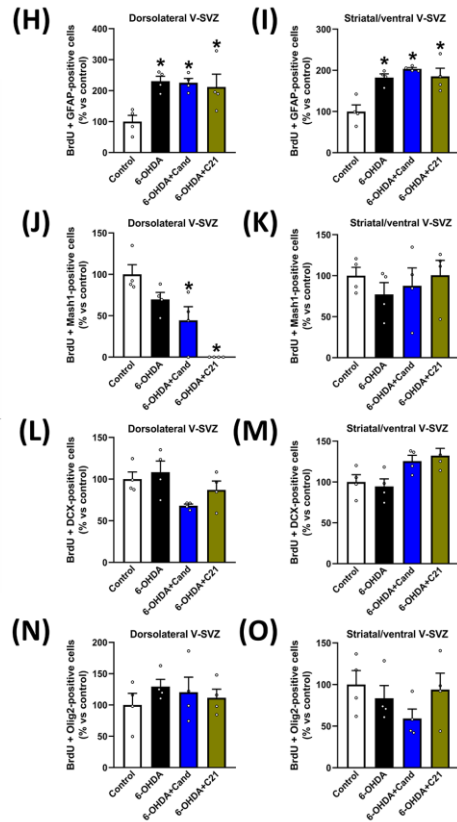
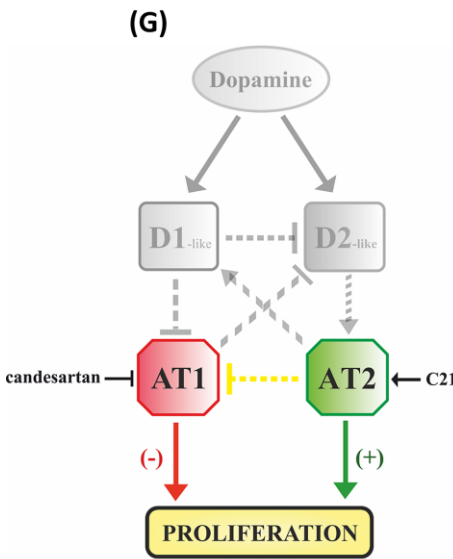
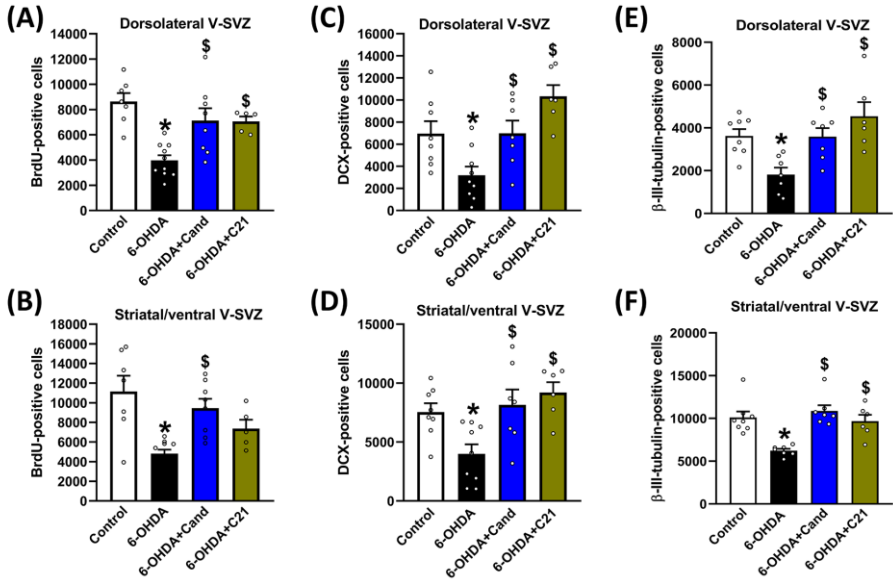
Con el objetivo de estudiar el posible efecto de las interacciones entre la dopamina y el SRA sobre la neurogénesis *in vivo*, nos propusimos conocer el efecto de manipular el SRA sobre la proliferación y generación de neuroblastos en un modelo animal de EP. Para ello, utilizamos ratas sometidas a una denervación maximal unilateral del sistema dopaminérgico tras la inyección de 6-OHDA (ver Material y métodos, apartado [3.2.11](#)).

Antes de realizar los tratamientos correspondientes, los animales con lesión maximal (depleción dopaminérgica > 90%) se seleccionaron mediante tests de comportamiento rotacional inducido por drogas y midiendo el uso espontáneo de las extremidades anteriores mediante el test del cilindro (ver Material y métodos, apartado [3.2.13](#)). Las ratas seleccionadas muestran un intenso comportamiento rotacional ipsilateral a la lesión (es decir, hacia el lado denervado) tras la administración i.p. de anfetamina ( $1199 \pm 221$  rotaciones). En el test del cilindro, el uso espontáneo de las extremidades anteriores es de un  $48,3 \pm 1,7\%$  en ratas control no lesionadas. Tras la lesión inducida por 6-OHDA, el uso de la pata izquierda se reduce hasta el  $16,1 \pm 4,2\%$  en el grupo lesionado. La pérdida de neuronas y terminales dopaminérgicos se confirmó *post mortem* mediante la visualización de secciones de mesencéfalo y de estriado inmunoprocadas para TH (ver Material y métodos, apartado [3.2.14](#)). Las ratas lesionadas con 6-OHDA exhiben una ausencia casi completa de neuronas TH-positivas en la sustancia negra ( $9969,3 \pm 725,7$  y  $196,8 \pm 83,9$  neuronas dopaminérgicas en animales control y en animales lesionados, respectivamente) y de terminales dopaminérgicos en el estriado (Rodríguez Pallares y col., 2012).

Las ratas denervadas se utilizaron para estudiar potenciales interacciones entre dopamina y receptores de AngII *in vivo*. Para ello, los animales lesionados se trataron con el antagonista del receptor AT1 candesartán o con el agonista del receptor AT2 C21 durante 15 días (ver Material y métodos, apartado [3.2.1](#)). El último día de tratamiento, los animales recibieron 4 pulsos de BrdU y se sacrificaron 24 h después de

la última inyección de BrdU para detectar las células en proliferación. Para estudiar posibles efectos específicos en diferentes dominios de la V-SVZ, cuantificamos de forma independiente el número de células BrdU-ir y de células DCX-ir en las regiones dorsolateral y estriatal/ventral de la V-SVZ (Figura 5). Nuestros resultados revelan un notable descenso en el número de células BrdU-ir en las ratas con denervación dopaminérgica tras la administración de 6-OHDA con respecto al grupo control (es decir, ratas no lesionadas tratadas con el vehículo), tanto en el área dorsolateral como en el área estriatal/ventral de la V-SVZ (Figura 19A, B y 20A-D). El tratamiento con el antagonista del receptor AT1 candesartán revierte el número de células BrdU-ir a niveles control en ambas áreas. Por su parte, el tratamiento con el agonista del receptor AT2 C21 induce un incremento significativo en el número de células BrdU-ir en el área dorsolateral con respecto a los animales lesionados. En la V-SVZ estriatal/ventral, el tratamiento con C21 induce un aumento en el número de células BrdU-ir positivas que, sin embargo, no es estadísticamente significativo con respecto a los animales lesionados con 6-OHDA (Figura 19A, B y 20A-D). A continuación, evaluamos la generación de neuroblastos en la V-SVZ de ratas lesionadas con 6-OHDA tratadas con candesartán o con C21. Al igual que cuando examinamos la proliferación celular, observamos una reducción en el número de células DCX-ir tras la administración de 6-OHDA que se revierte tras el tratamiento con el antagonista de AT1 candesartán o con el agonista de AT2 C21, tanto en la región dorsolateral como en la estriatal/ventral de la V-SVZ (Figura 19C, D y 20E-H). Estos resultados se confirmaron cuando evaluamos el número de células  $\beta$ -III-tubulina-ir (Figura 19E, F). Nuestros datos sugieren, por tanto, que el bloqueo de los receptores AT1 o la activación de los receptores AT2 podría compensar la reducción en la proliferación y en la generación de neuroblastos inducida en la V-SVZ por la depleción dopaminérgica (Figura 19G). Con el objetivo de identificar el fenotipo de las células proliferativas BrdU-ir, realizamos estudios de inmunofluorescencia doble para BrdU y para marcadores de distintas poblaciones celulares de la V-SVZ (ver Material y métodos, apartado [3.2.14](#)). Nuestros resultados muestran un incremento significativo en el número de células doblemente marcadas para BrdU y GFAP (marcador

de astrocitos y de NSCs) tras la administración de 6-OHDA tanto en la región dorsolateral como en la región ventral/estriatal de la V-SVZ. Este incremento no se revierte ni con el tratamiento con candesartán ni con C21 (Figura **19H, I**). Sin embargo, el número de NPCs (es decir, células Mash1-ir), se reduce significativamente en las ratas lesionadas con 6-OHDA tras el tratamiento con candesartán o con C21 en la región dorsolateral de la V-SVZ (Figura **19J, K**). Por el contrario, no observamos cambios significativos en el número de células doblemente marcadas para BrdU y DCX (neuroblastos en proliferación) ni en el número de células doblemente marcadas para BrdU y Olig2 (oligodendrocitos en proliferación) (Figura **19L-O**).



**Figura 19. Efectos de la manipulación de los receptores de angiotensina II (AngII) AT1 y AT2 sobre la proliferación (A, B, H-O) y la generación de neuroblastos (C-F) en la zona ventricular-subventricular (V-SVZ) de ratas con depleción dopaminérgica.** Número de células bromodesoxiuridina (BrdU) inmunorreactivas (-ir) en la V-SVZ dorsolateral (A) y estriatal/ventral (B) en ratas sometidas a depleción dopaminérgica (inyectadas con 6-hidroxidopamina, 6-OHDA) tras el tratamiento oral con el antagonista de AT1 candesartán (Cand) o con el agonista de AT2 C21, administrado por vía intraperitoneal (i.p.), durante 15 días. Histogramas en los que se muestran el número de células doblecortina (DCX)-ir y  $\beta$ -III-tubulina-ir (C-F) en la V-SVZ dorsolateral (C, E) y estriatal/ventral (D, F) de ratas lesionadas con 6-OHDA tras el tratamiento con candesartán o con C21. (G) Modelo del papel de la dopamina y de los receptores de AngII sobre la proliferación en la V-SVZ tras la depleción dopaminérgica. Histogramas que muestran el número de células doblemente BrdU-ir y GFAP-ir (H, I; marcador de NSCs y de astrocitos no neurogénicos), Mash1-ir (J, K; marcador de NPCs), DCX-ir (L, M; marcador de neuroblastos) u Olig2-ir (N, O; marcador de oligodendrocitos) en la V-SVZ dorsolateral y en la V-SVZ estriatal/ventral. Los datos se representan como valor de la media  $\pm$  EEM. \* $p < 0,05$  con respecto al grupo control y  $^{\S}p < 0,05$  con respecto al grupo lesionado con 6-OHDA (ANOVA de una vía y test *post hoc* Bonferroni). GFAP = proteína ácida fibrilar glial; NSCs = células madre neurales; NPCs = células progenitoras neurales.

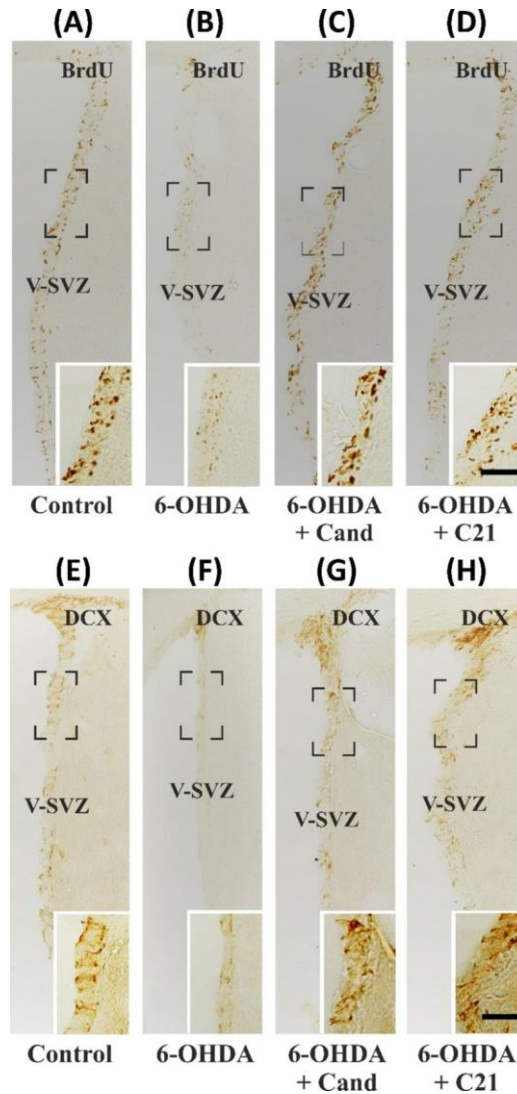
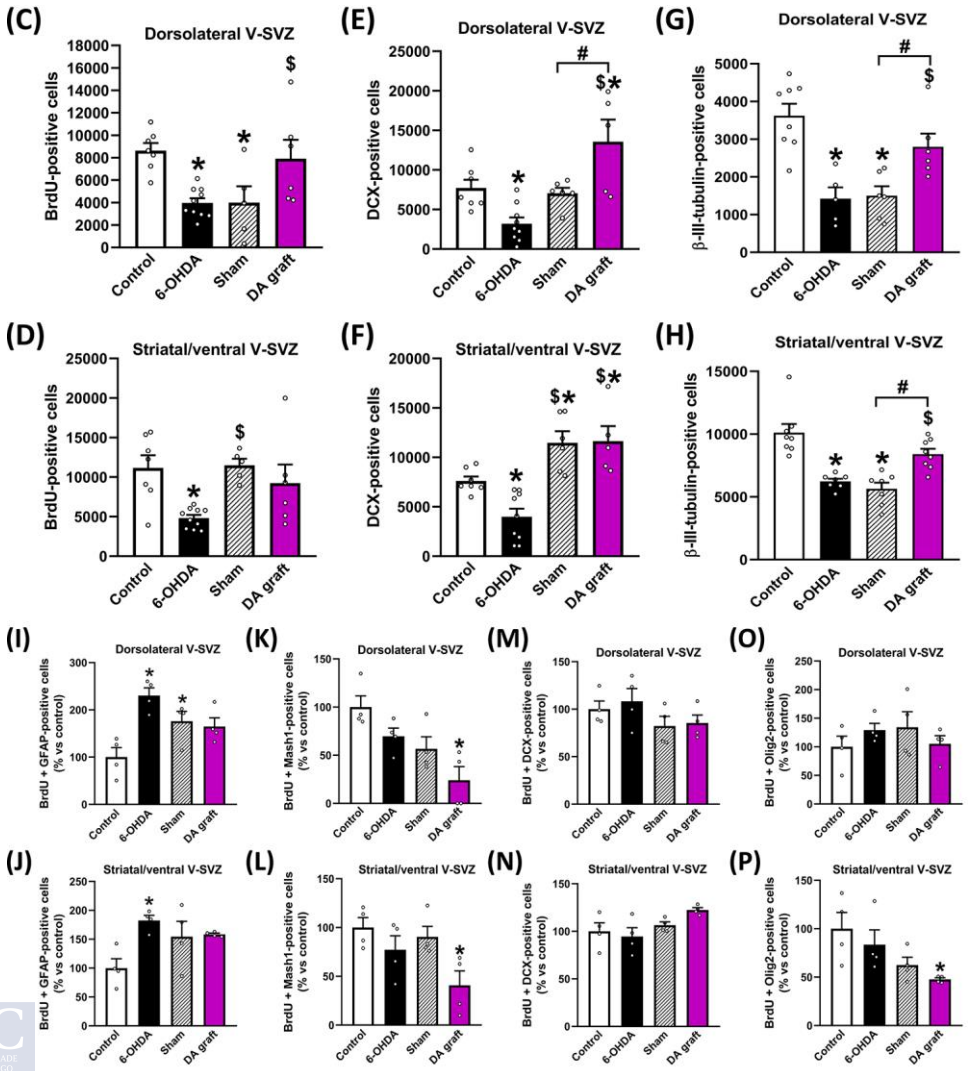
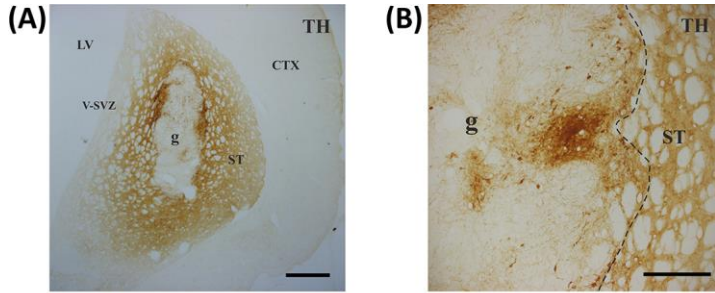


Figura 20. Efectos de la manipulación de los receptores de angiotensina II (AngII) AT1 y AT2 sobre la proliferación (A-D) y sobre la generación de neuroblastos (E-H) en la zona ventricular-subventricular (V-SVZ) de ratas con depleción dopaminérgica. Microfotografías de la V-SVZ en las que se muestra inmunorreactividad (-ir) frente a bromodesoxiuridina (BrdU; A-D) y a doblecortina (DCX; E-H) en ratas sometidas a denervación dopaminérgica unilateral tras la inyección con 6-hidroxidopamina (6-OHDA) y tratadas con el antagonista de AT1 candesartán (Cand) o con el agonista de AT2 C21. Se muestran imágenes a mayor aumento de las áreas encuadradas. Escala = 100  $\mu$ m.

Con el objetivo de estudiar el efecto del reemplazo de células dopaminérgicas sobre la neurogénesis adulta en la V-SVZ de animales con denervación dopaminérgica, trasplantamos suspensiones celulares de precursores derivados del mesencéfalo ventral de fetos de rata en el estriado denervado de ratas adultas lesionadas con 6-OHDA (ver Material y métodos, apartado [3.2.12](#)). Tanto los animales del grupo control como aquellas ratas que recibieron implantes de células dopaminérgicas o de vehículo (trasplante simulado, *sham*) se sometieron a pruebas de comportamiento para evaluar la eficacia del trasplante (ver Material y métodos, apartado [3.2.13](#)). Tras el implante, las rotaciones netas inducidas por anfetamina disminuyen considerablemente ( $-86 \pm 96$  rotaciones) en los animales lesionados con 6-OHDA que recibieron implantes de precursores dopaminérgicos con respecto a los valores registrados tras la lesión ( $1199 \pm 221$  rotaciones). De la misma forma, el uso de la extremidad anterior izquierda mejora significativamente en las ratas que recibieron las suspensiones celulares mesencefálicas ( $45,4 \pm 4,9$  %) con respecto a su uso antes del implante ( $16,1 \pm 4,2$  %); mientras que en los animales sometidos a un trasplante simulado los valores obtenidos son similares a los obtenidos tras la lesión ( $23,5 \pm 3,7$  % y  $16,0 \pm 5,2$  % de uso de la pata izquierda, respectivamente). Estos datos indican que las neuronas dopaminérgicas implantadas sobreviven en el estriado ( $8749,2 \pm 425,8$  células TH-ir en análisis *post mortem*) (Figura **21A, B**). Estos animales recibieron 4 pulsos de BrdU 3 meses después de recibir el implante y se sacrificaron 24 h después de la última inyección de BrdU para detectar las células en proliferación (Figura **5**). Nuestros resultados muestran una marcada disminución del número de células BrdU-ir en las ratas tratadas con 6-OHDA con respecto al grupo control (ratas sin lesionar) tanto en la V-SVZ dorsolateral como en la V-SVZ estriatal/ventral (Figura **21C, D** y **22A-D**). Sin embargo, observamos un incremento significativo en el número de células BrdU-ir en la V-SVZ dorsolateral de las ratas que recibieron trasplantes intraestriatales de precursores dopaminérgicos con respecto a los animales lesionados con 6-OHDA (Figura **21C, D** y **22A-D**). Curiosamente, en las ratas que recibieron un trasplante simulado, también se restablece el número de células BrdU-ir en la V-SVZ estriatal/ventral (Figura **21D**). De forma similar, en las ratas que

recibieron implantes dopaminérgicos observamos un considerable aumento del número de células DCX-ir con respecto a animales con depleción dopaminérgica (es decir, el grupo lesionado con 6-OHDA) tanto en la región dorsolateral como en la estriatal/ventral de la V-SVZ (Figura **21E-F** y **22E-H**), mientras que en los animales que recibieron un trasplante simulado, el número de células DCX-ir solo se incrementa significativamente en la V-SVZ estriatal/ventral (Figura **21F**). Además, cuando analizamos el número de células  $\beta$ -III-tubulina-ir, observamos que el incremento significativo de neuroblastos en ambos dominios de la V-SVZ solo se produce en los animales que recibieron implantes dopaminérgicos (Figura **21G, H**). El análisis de la identidad de las células en proliferación revela que la población de células doblemente marcadas para BrdU y GFAP se incrementa, de forma no significativa, en los animales que recibieron los implantes dopaminérgicos (Figura **21I, J**). Sin embargo, el número de NPCs (es decir, el número de células doblemente marcadas para BrdU y Mash1) se reduce significativamente en animales que reciben el trasplante de precursores mesencefálicos (Figura **21K, L**). Además, no observamos diferencias significativas en la población doblemente marcada para BrdU y DCX (neuroblastos en proliferación) entre los grupos experimentales (Figura **21M, N**). Por último, nuestros resultados indican una reducción significativa del número de células doblemente marcadas para BrdU y Olig2 (oligodendrocitos en proliferación) en los animales que recibieron implantes dopaminérgicos con respecto a los animales control en la región estriatal/ventral de la V-SVZ (Figura **21O, P**).



**Figura 21. Efectos de implantes dopaminérgicos (DA) (A, B) sobre la proliferación (C-D, I-P) y la generación de neuroblastos (E-H) en la zona ventricular-subventricular (V-SVZ) de ratas con depleción dopaminérgica. (A, B) Microfotografías de los implantes (g, del inglés *graft*) intraestriales de precursores mesencefálicos ventrales en las que se muestra inmunorreactividad (-ir) frente a tirosina hidroxilasa (TH; marcador dopaminérgico) en ratas sometidas a depleción dopaminérgica unilateral tras la inyección de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) y al injerto de suspensiones celulares de origen mesencefálico. Numerosas células TH-ir se localizan en la periferia del implante, y fibras TH-ir inervan el área estriatal que rodea el implante (B). Cuantificación de células bromodesoxiuridina (BrdU)-ir en la V-SVZ dorsolateral (C) y en la V-SVZ estriatal/ventral (D) de ratas con depleción dopaminérgica y de ratas que recibieron implantes DA. Células doblecortina (DCX)-ir y  $\beta$ -III-tubulina-ir (E-H) cuantificadas en la zona dorsolateral (E-G) y estriatal/ventral (F-H) de la V-SVZ en ratas lesionadas con 6-OHDA y animales que recibieron trasplantes DA. Número de células doblemente marcadas para BrdU y GFAP (I, J; marcador de NSCs y de astrocitos no neurogénicos), Mash1 (K, L; marcador de NPCs), DCX (M, N; marcador de neuroblastos) u Olig2 (O, P; marcador de oligodendrocitos) en la V-SVZ dorsolateral y en la V-SVZ estriatal/ventral. Los datos se representan como valor de la media  $\pm$  EEM. \* $p < 0,05$  con respecto al grupo control; en las figuras (C-H),  $^{\S}p < 0,05$  con respecto al grupo lesionado con 6-OHDA; en las figuras (E), (G) y (H),  $^{\#}p < 0,05$  con respecto al grupo con el trasplante simulado (*sham*; es decir, animales lesionados con 6-OHDA y sin implante dopaminérgico) (ANOVA de una vía y test *post hoc* Bonferroni). CTX = córtex; LV = ventrículo lateral; ST = estriado; GFAP = proteína ácida fibrilar glial; NSCs = células madre neurales; NPCs = células progenitoras neurales. Escala = 750  $\mu$ m (A) y 200  $\mu$ m (B).**

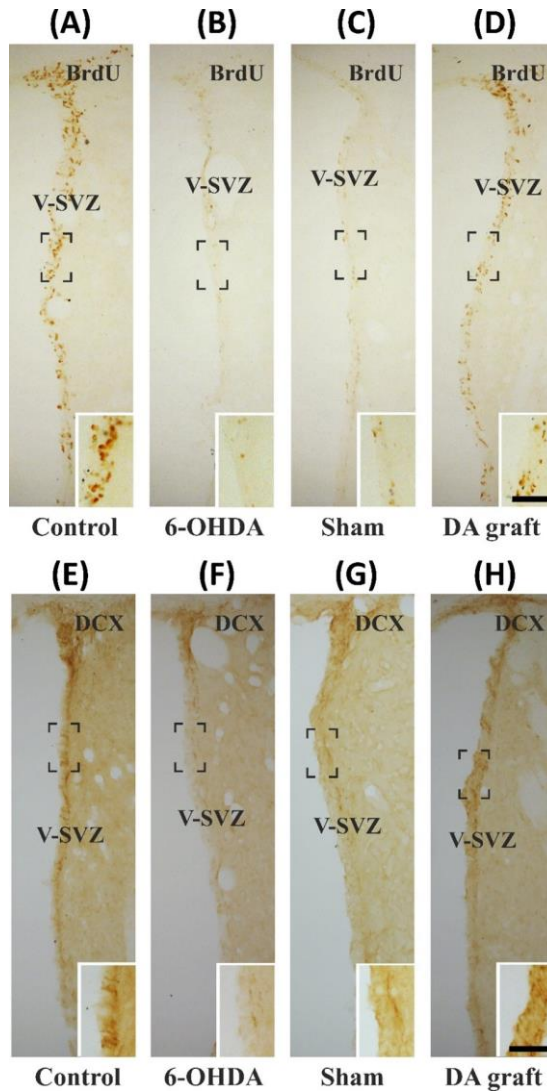


Figura 22. Efectos de implantes dopaminérgicos (DA) (D, H) sobre la proliferación (A-D) y la generación de neuroblastos (E-H) en la zona ventricular-subventricular (V-SVZ) de ratas con depleción dopaminérgica. Microfotografías de la V-SVZ en las que se muestra inmunorreactividad (-ir) frente a bromodesoxiuridina (BrdU; A-D) y a doblecortina (DCX; E-H) en ratas sometidas a denervación dopaminérgica unilateral tras la inyección con 6-hidroxidopamina (6-OHDA) y a un implante de precursores mesencefálicos (D, H) o a un trasplante simulado (*sham*) (C, G). Se muestran imágenes a mayor aumento de las áreas encuadradas. Escala = 100  $\mu$ m.

## **4.2. MECANISMOS IMPLICADOS EN LA SUPERVIVENCIA DE PRECURSORES DOPAMINÉRGICOS EN MODELOS ANIMALES DE EP**

Diversos ensayos clínicos basados en el trasplante de neuronas dopaminérgicas fetales han mostrado resultados prometedores en pacientes de EP. Sin embargo, existen una serie de limitaciones importantes asociadas a esta estrategia terapéutica, que incluyen la baja supervivencia de las células dopaminérgicas trasplantadas, independientemente de su fuente de obtención. De ahí la relevancia de buscar estrategias que mejoren la supervivencia y la reinervación del tejido hospedador por parte de las células implantadas.

### **4.2.1. Estudio del efecto la manipulación del SRA en la funcionalidad y supervivencia de implantes dopaminérgicos en modelos animales de EP**

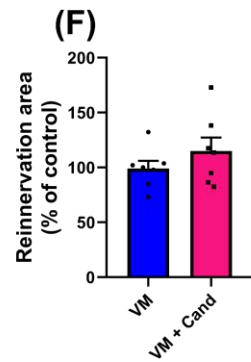
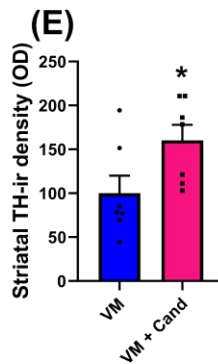
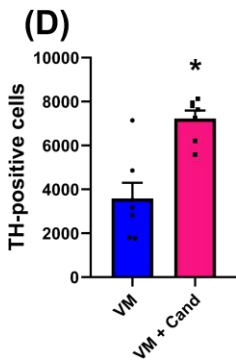
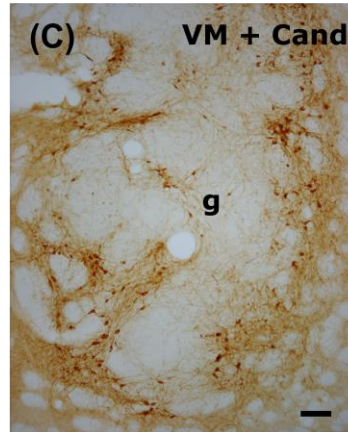
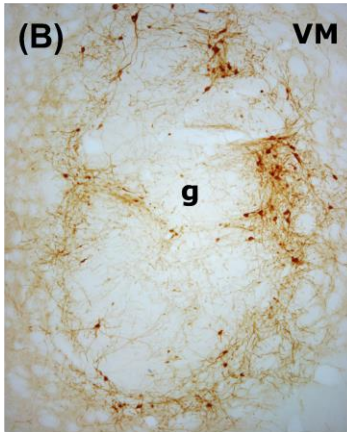
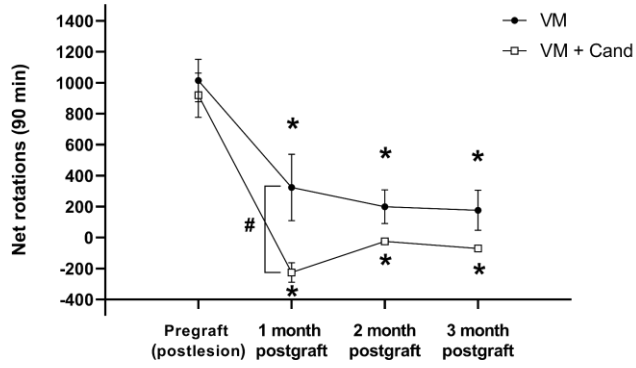
Los resultados descritos anteriormente muestran que la manipulación de los receptores de AngII, en concreto el antagonismo de los receptores AT1 con candesartán o la activación de los receptores AT2 con C21, promueve la proliferación *in vitro* de NSCs/NPCs derivadas de la V-SVZ, así como la proliferación y generación de neuroblastos en la V-SVZ adulta en condiciones fisiológicas y en un modelo animal de EP (ver apartados [4.1.1](#) y [4.1.2](#)). Además, numerosos estudios han puesto de manifiesto el papel del SRA en procesos neurodegenerativos y neuroinflamatorios implicados en la vulnerabilidad dopaminérgica. Por otra parte, la terapia celular basada en la realización de trasplantes de precursores dopaminérgicos es una estrategia terapéutica prometedora para el tratamiento de la EP. Sin embargo, tal y como hemos mencionado, está limitada por la escasa supervivencia de las células dopaminérgicas implantadas. Por ello, nos propusimos investigar si el bloqueo de los receptores de AT1 con candesartán podría favorecer la supervivencia de precursores dopaminérgicos implantados en un modelo animal de EP.

Antes de recibir los trasplantes, los animales con lesión maximal (depleción dopaminérgica > 90%) se seleccionaron mediante el test de comportamiento rotacional inducido por drogas (ver Material y métodos, apartado [3.2.13](#)). Las ratas seleccionadas muestran un intenso

comportamiento rotacional ipsilateral a la lesión tras la administración de anfetamina tanto en el grupo de animales que posteriormente recibirían un implante de precursores mesencefálicos (VM) ( $1014,6 \pm 136,8$  rotaciones) como en el grupo de animales que recibió el tratamiento con el antagonista de receptores AT1 candesartán (VM + Cand) ( $919,4 \pm 143,7$  rotaciones) (ver Material y métodos, apartado [3.3.1](#)). El comportamiento rotacional inducido por anfetamina se revierte tras la realización de los trasplantes en los dos grupos de animales 1 mes postrasplante ( $323,6 \pm 214,1$  y  $-226,4 \pm 63,5$  rotaciones en el grupo VM y en el grupo VM + Cand, respectivamente), aunque la recuperación es significativamente mayor en los animales que se trataron con candesartán. Este efecto se mantiene cuando evaluamos el comportamiento rotacional 2 meses después del implante ( $198,7 \pm 109,1$  y  $-24,6 \pm 19,3$  rotaciones en el grupo VM y en el grupo VM + Cand, respectivamente) y 3 meses después del mismo ( $175,1 \pm 130,2$  y  $-71,3 \pm 18,5$  rotaciones en el grupo VM y en el grupo VM + Cand, respectivamente) (Figura **23A**).

Tal y como hemos observado previamente (ver Figura **21A, B**), los trasplantes intraestriatales de precursores mesencefálicos contienen numerosas neuronas TH-ir. En los dos grupos de animales trasplantados, la mayoría de las neuronas TH-ir se agrupa formando parches localizados en la periferia del implante mientras que el área central del trasplante es TH-negativa (Figura **23B, C**). Sin embargo, el número total de neuronas TH-ir es significativamente mayor en los animales trasplantados que se trataron con candesartán con respecto a los animales trasplantados control (Figura **23D**). No observamos diferencias significativas en el volumen medio del implante entre ambos grupos (en  $\text{mm}^3 \pm \text{EEM}$ :  $0,733 \pm 0,138$  en el grupo VM y  $0,955 \pm 0,051$  en el grupo VM + Cand). La densidad de las fibras TH-ir en el área de reinervación es significativamente mayor en las ratas trasplantadas que recibieron el tratamiento con candesartán con respecto al grupo control (Figura **23E**), mientras que el área de reinervación es similar en ambos grupos (Figura **23F**). Nuestros resultados sugieren que el bloqueo de los receptores AT1 favorece la supervivencia de implantes de precursores dopaminérgicos en modelos animales de EP.

(A)



**Figura 23. Análisis comportamental (A) e histológico (B-F) de los efectos de la manipulación de los receptores de angiotensina II (AngII) AT1 sobre la supervivencia y la capacidad de reinervación de precursores dopaminérgicos mesencefálicos (VM, del inglés *ventral mesencephalic*) implantados en ratas con depleción dopaminérgica.** Rotaciones netas inducidas por anfetamina (A) 1, 2 y 3 meses postrasplante. Microfotografías de los implantes (g, del inglés *graft*) intraestriatales en las que se muestra inmunorreactividad (-ir) frente a tirosina hidroxilasa (TH; marcador dopaminérgico) en ratas sometidas a depleción dopaminérgica y que recibieron un trasplante de precursores dopaminérgicos (B) o que recibieron un trasplante de precursores dopaminérgicos y se trataron con el antagonista de AT1 candesartán (C). (D) Histogramas que muestran el número de neuronas TH-ir en ambos grupos. (E) La densidad de fibras TH-ir en el área de reinervación se estimó midiendo la densidad óptica (OD) y se expresa como un porcentaje del valor obtenido en el grupo control (grupo con trasplante VM). (F) Área de reinervación (área del estriado hospedador reinervada por las fibras TH-ir derivadas del implante) en ambos grupos. Los datos se representan como valor de la media  $\pm$  EEM. En la figura (A), \* $p < 0,05$  con respecto al grupo lesionado con 6-OHDA (poslesión y pretrasplante) y # $p < 0,05$  entre los grupos trasplantados (es decir, entre VM y VM + Cand); en las figuras (D) y (E), \* $p < 0,05$  con respecto al grupo VM (test *t* de Student). Escala = 75  $\mu$ m.

#### **4.2.2. Estudio de los efectos de la AngII sobre la producción de EOR, la expresión de genes antioxidantes y la supervivencia dopaminérgica**

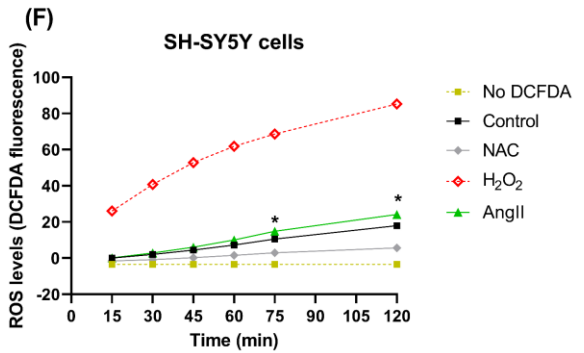
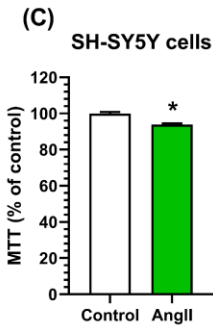
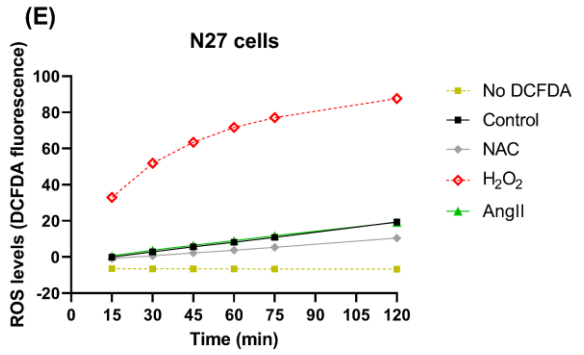
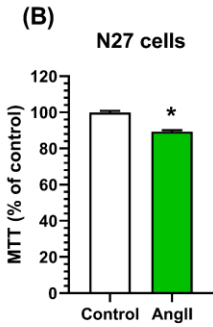
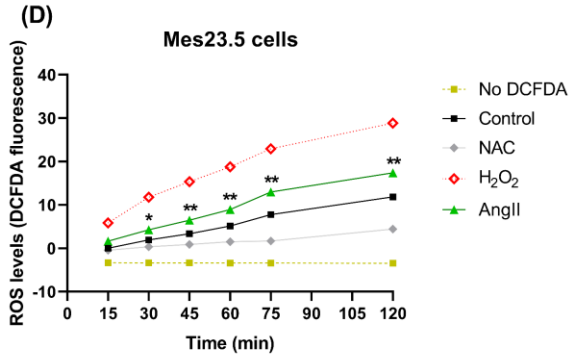
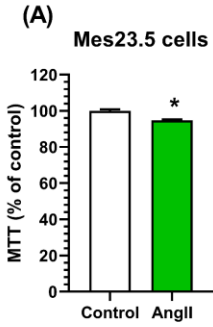
Los resultados descritos anteriormente en esta tesis indican que la AngII, a través de sus receptores AT1 y AT2, modula la supervivencia tanto de progenitores presentes en la V-SVZ adulta como de precursores dopaminérgicos implantados en el estriado de modelos animales de EP. Estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado que la AngII, a través de sus receptores AT1, contribuye a la degeneración dopaminérgica exacerbando la activación microglial y el estrés oxidativo en modelos animales de EP (Joglar y col., 2009; Labandeira-García y col., 2014; Rey y col., 2007; Rodríguez-Pallares y col., 2008). Además, otras investigaciones han sugerido que el factor de transcripción *Nrf2* está implicado en la activación microglial (Rojo y col., 2010) y en la señalización mediada por AngII (Abdo y col., 2014; Ron y col., 1990), ya que regula la expresión de AT1 y NOX (Li y col., 2017b). Sin embargo, el papel de la AngII en la regulación de la vía NRF2 en el cerebro y su posible implicación en la muerte dopaminérgica no se ha abordado hasta ahora. Por ello, nos propusimos

investigar el efecto de la AngII sobre la vía NRF2 y su papel en la supervivencia dopaminérgica en dos líneas celulares dopaminérgicas de roedores (Mes23.5 y N27) y en la línea neuronal catecolaminérgica humana SH-SY5Y.

4.2.2.1. La AngII reduce la viabilidad dopaminérgica y aumenta la producción de EOR *in vitro*

Nuestros resultados muestran que el tratamiento de la línea celular dopaminérgica Mes23.5 con AngII induce una reducción discreta, pero significativa, de la viabilidad celular en esta línea neuronal pura de en torno al 5% ( $94,7 \pm 0,7$  % con respecto al control) (Figura **24A**). El tratamiento de la línea celular mesencefálica de rata N27 o de la línea celular derivada de neuroblastoma humano SH-SY5Y con AngII induce efectos similares sobre la supervivencia celular, con una reducción en la señal MTT de en torno al 10% en la línea celular N27 (Figura **24B**) y una reducción de alrededor del 6% en la línea SH-SY5Y (Figura **24C**).

Para determinar los posibles mecanismos implicados en la degeneración neuronal inducida por AngII, nos propusimos estudiar la generación de EOR en cultivos de las líneas neuronales Mes23.5, N27 y SH-SY5Y. Nuestros datos muestran un incremento significativo en la generación de EOR en cultivos de la línea dopaminérgica Mes23.5 tratados con AngII con respecto a cultivos control (Figura **24D**). Sin embargo, el tratamiento con AngII no induce cambios significativos en los niveles de producción de EOR en la línea dopaminérgica N27, con respecto a cultivos control (Figura **24E**). El tratamiento con AngII exacerba la generación de EOR en la línea catecolaminérgica humana SH-SY5Y, llegando a ser significativamente mayor que en cultivos control a partir de 75 min (Figura **24F**). Nuestros datos indican que la AngII incrementa la generación de EOR en las neuronas dopaminérgicas y que este incremento es responsable, al menos en parte, del descenso en la viabilidad celular inducido por AngII.



**Figura 24.** La angiotensina II (AngII) disminuye la viabilidad celular e incrementa la producción de especies oxigenadas reactivas (EOR) en líneas celulares neuronales. Las líneas neuronales Mes23.5, N27 y SH-SY5Y se trataron con AngII 100 nM durante 24 h para estimar sus efectos sobre la supervivencia celular. El tratamiento con AngII disminuye la viabilidad de la línea dopaminérgica Mes23.5 (A), de la línea dopaminérgica N27 (B) y de la línea catecolaminérgica humana SH-SY5Y (C). La AngII incrementa la generación de EOR en las líneas neuronales con el tiempo (D-F). En la línea celular dopaminérgica Mes23.5, la fluorescencia DCFDA (del inglés, *2',7'-dichlorofluorescein-diacetate*) se incrementa con el tiempo cuando los cultivos se tratan con AngII (D). En la línea celular dopaminérgica N27, no se observan cambios significativos en la fluorescencia DCFDA tras el tratamiento con AngII (E). Las células SH-SY5Y son sensibles a la producción de EOR inducida por AngII, incrementándose los niveles de fluorescencia DCFDA con el tiempo (F). Como control positivo de la generación de EOR se utilizó peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y como control negativo, se utilizó N-acetil-L-cisteína (NAC). En las figuras (A), (B) y (C), los datos se representan como valor de la absorbancia media con respecto al control  $\pm$  EEM. En las figuras (D), (E) y (F), los datos se representan como el incremento en la fluorescencia DCFDA con respecto al control. En las figuras (A), (B) y (C), \* $p < 0,01$  con respecto al grupo control. En las figuras (D), (E) y (F), \* $p < 0,05$  AngII vs control y \*\* $p < 0,001$  AngII vs control (test *t* de Student o test de suma de rangos de Mann-Whitney). MTT = 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol.

4.2.2.2. El factor de transcripción *Klf9* favorece la supervivencia dopaminérgica *in vitro* en respuesta al estrés oxidativo inducido por AngII

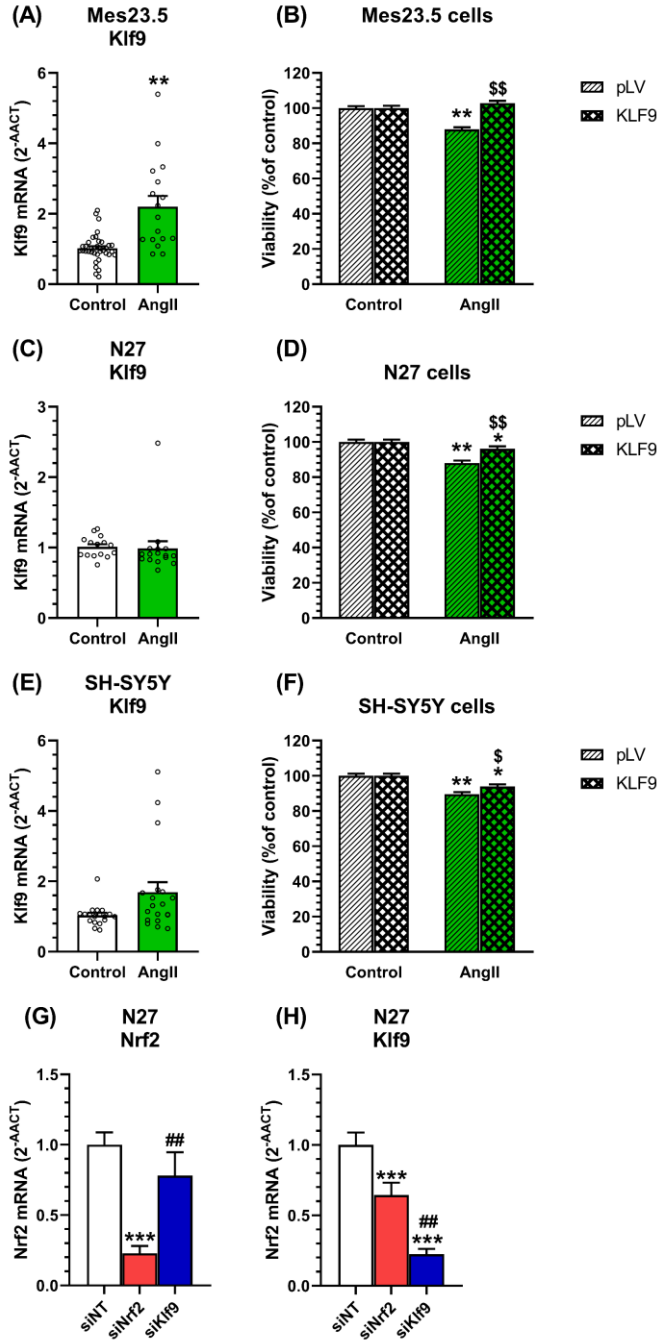
Estudios previos han sugerido que la expresión del factor de transcripción *Klf9* podría estar regulada por *Nrf2* y afectar a la supervivencia celular (Zucker y col., 2014), aunque las investigaciones arrojan resultados contradictorios. Por ello, nos propusimos estudiar la expresión de *Klf9*, en respuesta a la AngII, en cultivos de líneas neuronales dopaminérgicas. Además, para determinar los posibles efectos de *Klf9* sobre la viabilidad dopaminérgica, analizamos la supervivencia celular en cultivos de las líneas dopaminérgicas Mes23.5, N27 y SH-SY5Y infectados con un vector que contenía el factor de transcripción *Klf9* humano (vector pLV-KLF9) o con un vector vacío (vector pLV).

Nuestros resultados indican que el tratamiento con AngII induce un incremento en los niveles de expresión de *Klf9* ( $2,2 \pm 0,3$  incrementos con respecto al control) en cultivos de la línea dopaminérgica Mes23.5 (Figura 25A). Tal y como cabe esperar, el tratamiento con AngII reduce

la viabilidad de los cultivos de la línea dopaminérgica Mes23.5 infectados con el vector pLV. Sin embargo, la viabilidad de las células que se infectaron con el vector pLV-KLF9 y que se trataron con AngII no cambia significativamente con respecto a los cultivos control infectados con el vector pLV-KLF9 (Figura **25B**). Por otra parte, el tratamiento de la línea dopaminérgica N27 con AngII no induce cambios significativos en los niveles de expresión de *Klf9* (Figura **20C**). Curiosamente, la transfección de células de la línea dopaminérgica N27 con el vector pLV-KLF9 incrementa significativamente la viabilidad de los cultivos tratados con AngII con respecto a cultivos que se infectaron con el vector vacío y que recibieron el mismo tratamiento (Figura **25D**). Tal y como ocurre con la línea Mes23.5, el tratamiento de la línea catecolaminérgica humana SH-SY5Y con AngII incrementa los niveles de expresión de *Klf9* con respecto a los cultivos sin tratar ( $1,7 \pm 0,3$  incrementos con respecto al control) (Figura **25E**). Además, los cultivos de la línea SH-SY5Y transfectados con el vector pLV-KLF9 muestran un incremento de la viabilidad en respuesta a la AngII (Figura **25F**). Por tanto, nuestros datos indican que *Klf9* es un factor de transcripción que promueve la supervivencia en células dopaminérgicas.

El factor de transcripción *Nrf2* se incluye entre los genes cuya expresión está regulada por el factor de transcripción *Klf9*, de manera que *Nrf2* no solo modularía los niveles de expresión de *Klf9*, sino que, a su vez, *Klf9* también podría estar regulando la expresión de *Nrf2*. Este bucle de retroalimentación podría explicar el efecto protector observado tras inducir la sobreexpresión de *Klf9* en células de las líneas dopaminérgicas Mes23.5, N27 y SH-SY5Y (Figura **25B, D, F**). Con el objetivo de confirmar esta hipótesis, silenciamos la expresión de *Nrf2* y *Klf9* con siARN y evaluamos qué efectos inducían sobre su expresión. Nuestros datos muestran que tras la transfección con si*Nrf2*, los niveles de expresión génica de *Nrf2* se reducen hasta un 23% con respecto a cultivos transfectados con siARN control (Figura **25G**). Además, el silenciamiento de *Nrf2* induce una reducción significativa en los niveles de expresión de *Klf9* ( $64,4 \pm 8,7$  % con respecto al control) (Figura **25H**). Mientras que el si*Klf9* reduce los niveles de expresión de *Klf9* hasta el  $22,4 \pm 3,8$  % del control en cultivos de la línea dopaminérgica N27 (Figura **25H**), no observamos diferencias en los niveles de

expresión de *Nrf2* cuando se silencia la expresión de *Klf9* (Figura **25G**). Nuestros resultados sugieren que mientras que *Nrf2* regula los niveles de expresión de *Klf9*, *Klf9* no controla los niveles transcripcionales de *Nrf2*.



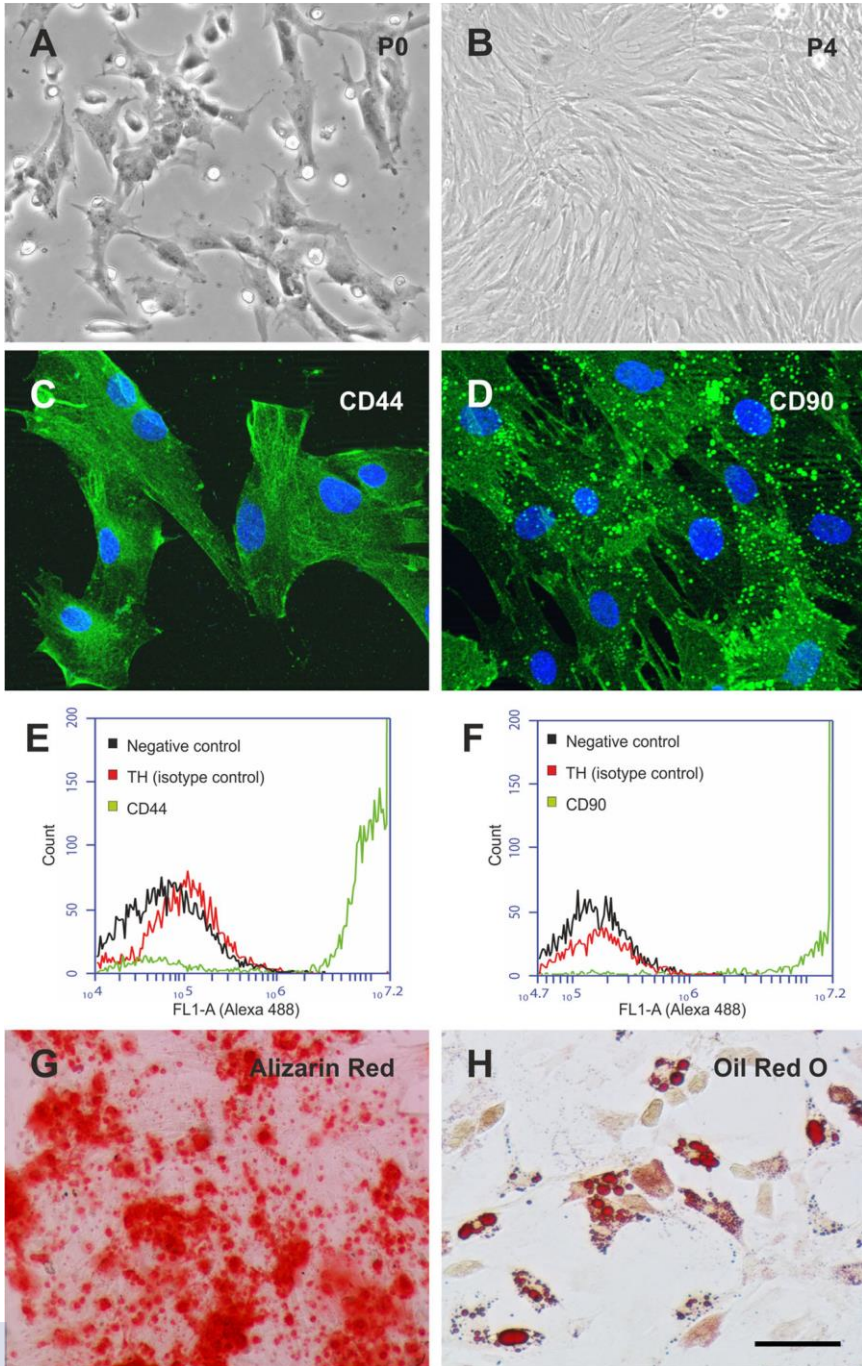
**Figura 25.** La expresión de *Klf9* revierte el descenso en la viabilidad dopaminérgica inducido por angiotensina II (AngII) (A-F) y es regulada por *Nrf2* (G-H). La AngII induce un incremento en los niveles de expresión del factor de transcripción *Klf9* tras 24h de tratamiento en la línea dopaminérgica Mes23.5 (A) y en la línea catecolaminérgica humana SH-SY5Y (E). La viabilidad de las líneas dopaminérgicas Mes23.5 (B), N27 (D) y SH-SY5Y (F) tratadas con AngII se incrementa gracias a la sobreexpresión de *Klf9* (pLV-KLF9) con respecto a células tratadas con AngII e infectadas con un vector vacío (pLV). Los niveles de expresión de ARNm de *Nrf2* y *Klf9* se cuantificaron en células N27 transfectadas con siARN diseñado contra *Nrf2* (si*Nrf2*) o con siARN diseñado contra *Klf9* (si*Klf9*) en condiciones control. Los niveles de *Nrf2* se reducen en células transfectadas con si*Nrf2* (G) en comparación con aquellas transfectadas con siARN control (siNT, del inglés *non-targeting*). Los niveles de expresión de ARNm de *Klf9* se reducen cuando las células se transfectan con si*Klf9*, pero también con si*Nrf2* (H). En las figuras (A), (C), (E), (G) y (H), los datos se representan como el incremento en los niveles de expresión de ARNm con respecto al control  $\pm$  EEM. En las figuras (B), (D) y (F), los datos se representan como valor de la absorbancia media con respecto al control  $\pm$  EEM. En las figuras (A), (B), (D) y (F), \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,001$  con respecto al grupo control y  $^{\$}p < 0,05$  y  $^{SS}p < 0,001$  con respecto a las células transfectadas con pLV (test de suma de rangos Mann-Whitney o ANOVA de dos vías y test *post hoc* Holm Sidak). En las figuras (G) y (H), \*\*\* $p < 0,001$  con respecto al grupo control, y  $^{##}p < 0,01$  con respecto al grupo si*Nrf2* (ANOVA de una vía y test *post hoc* Holm Sidak). *Klf9* = factor tipo Kruppel 9; pLV = pLV-SV40 puro; KLF9 = pLV-SV40-KLF9 puro.

#### 4.2.3. Estudio de las propiedades terapéuticas de las MSCs como estrategia para promover la supervivencia de precursores dopaminérgicos

Tal y como mencionamos, la terapia celular basada en el reemplazo dopaminérgico está en buena parte limitada por la escasa supervivencia de los precursores dopaminérgicos implantados. Por otra parte, las MSCs poseen propiedades antiapoptóticas, neurotróficas e inmunomoduladoras que podrían mejorar la supervivencia y la capacidad de reinervación de los precursores dopaminérgicos implantados. Por ello, nos hemos propuesto estudiar los efectos del cotrasplante de precursores dopaminérgicos combinados con MSCs derivadas de médula ósea, así como los posibles mecanismos implicados en los efectos observados.

En primer lugar, llevamos a cabo estudios de caracterización y de determinación de la pureza de la población MSC, obtenida de cultivos de la médula ósea de fémur de ratas Sprague-Dawley adultas (3-4 meses

de edad), que utilizaríamos posteriormente en nuestros estudios. Las MSCs se caracterizan por su adherencia al plástico y se propagan como unidades formadoras de colonias de fibroblastos. La morfología de las células en cultivo cambia gradualmente de una morfología alargada y fusiforme hacia una apariencia poligonal plana tras los primeros pases (Figura **26A, B**). La identidad celular de las MSCs se analizó en cultivos fijados o mediante citometría de flujo. El marcaje inmunofluorescente revela que la mayoría de las células en cultivo son positivas para marcadores clásicos de MSCs como CD44 y CD90 ( $97,2 \pm 1,6\%$  y  $96,6 \pm 0,1 \%$ , respectivamente) (Figura **26C, D**) y negativas para los marcadores hematopoyéticos CD34 y CD45 (datos no mostrados). Estos resultados se confirmaron mediante citometría de flujo (Figura **26E, F**). Además, se llevaron a cabo estudios para evaluar su multipotencia (ver Material y métodos, apartado [3.3.9](#)) y observamos que, bajo los estímulos adecuados, las MSCs poseen capacidad para diferenciarse a los linajes osteogénico y adipogénico, determinados por la presencia de deposiciones de calcio teñidas con rojo de alizarina o por la presencia de vacuolas lipídicas teñidas con aceite rojo O, respectivamente (Figura **26G, H**).



**Figura 26. Células estromales mesenquimales (MSCs, del inglés *mesenchymal stromal cells*) aisladas de la médula ósea de rata.** Microfotografías representativas de la adherencia al plástico de las MSCs durante los primeros días de cultivo (P0; **A**) y su proliferación tras varios pases (P4; **B**). La caracterización de las MSCs se realizó mediante inmunofluorescencia para los marcadores de superficie celular CD44 (**C**, verde) y CD90 (**D**, verde). Los núcleos se contrastaron con Hoechst-33342 (azul). (**E**, **F**) Histogramas en los que se muestran las superposiciones de las células marcadas con anticuerpos contra CD44 (**E**, línea verde) y contra CD90 (**F**, línea verde), y los controles correspondientes (líneas roja y negra). La multipotencia de las MSCs se demostró en condiciones de diferenciación específicas tras la tinción con rojo de alizarina (**G**, depósitos de calcio en osteoblastos, en rojo) o con aceite de rojo O (**H**, vacuolas lipídicas en adipocitos, en rojo). Escala = 50  $\mu\text{m}$  (**A**, **G**, **H**), 100  $\mu\text{m}$  (**B**) y 20  $\mu\text{m}$  (**C**, **D**).

4.2.3.1. El cotrasplante de precursores dopaminérgicos con dosis elevadas de MSCs afecta negativamente a su supervivencia y a su capacidad de reinervación

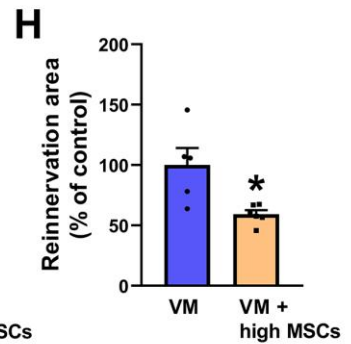
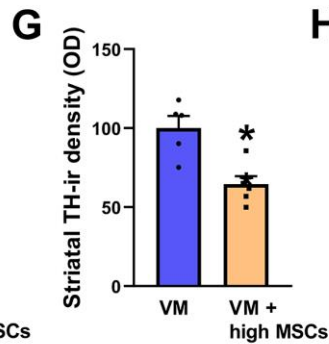
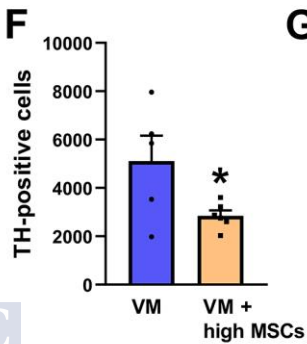
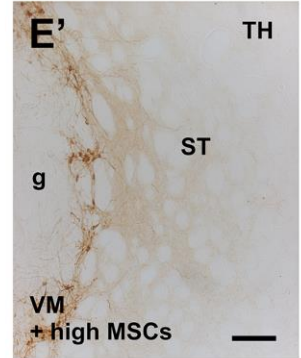
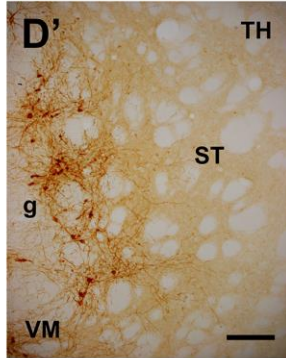
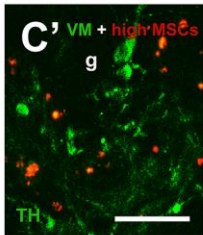
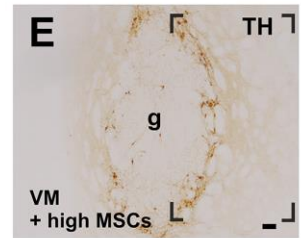
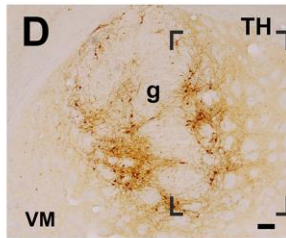
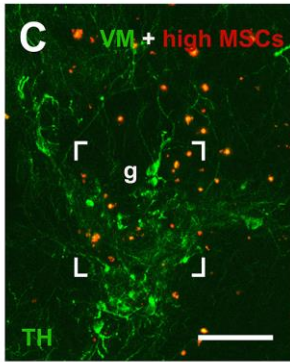
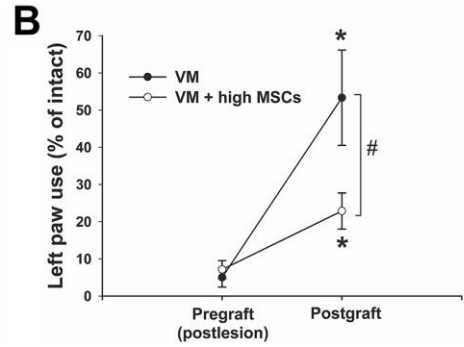
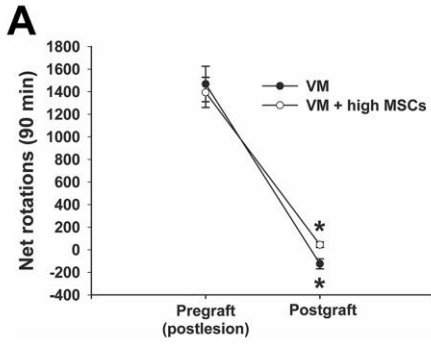
Con el objetivo de estudiar la capacidad de las MSCs para favorecer la supervivencia de precursores dopaminérgicos, trasplantamos ratas con denervación dopaminérgica con precursores mesencefálicos fetales (VM) solos (500.000 células), o en combinación con una dosis alta (VM + high MSCs; 200.000 células) o baja (VM + low MSCs; 25.000 células) de MSCs.

Antes de recibir los trasplantes, los animales con lesión maximal (depleción dopaminérgica > 90%) se seleccionaron mediante el test de comportamiento rotacional inducido por drogas (ver Material y métodos, apartado [3.2.13](#)). Las ratas seleccionadas muestran un intenso comportamiento rotacional ipsilateral a la lesión tras la administración de anfetamina tanto en el grupo de animales que posteriormente recibirían un implante de precursores mesencefálicos ( $1468,2 \pm 156,0$  rotaciones) como en aquellos que recibirían una combinación de precursores dopaminérgicos y de dosis altas de MSCs ( $1393,7 \pm 133,8$  rotaciones). Además, tras la lesión inducida por 6-OHDA, el uso de la pata izquierda se reduce hasta el  $5,0 \pm 2,6$  % en el grupo que recibiría el trasplante de precursores dopaminérgicos y hasta el  $7,1 \pm 2,4$  % en los animales que luego serían trasplantados con precursores dopaminérgicos y dosis altas de MSCs (Figura **27A**, **B**).

Ocho semanas después de haber recibido el trasplante, los dos grupos de animales trasplantados (es decir, ratas VM y ratas VM+ high

MSCs) muestran una reducción notable de las rotaciones inducidas por anfetamina ( $-124,8 \pm 44,4$  rotaciones en animales VM y  $44,5 \pm 23,7$  en animales VM + high MSCs) (Figura 27A). De la misma forma, el uso de la extremidad anterior izquierda mejora significativamente en ambos grupos, aunque esta recuperación es más discreta en los animales que recibieron un trasplante de precursores dopaminérgicos y altas dosis de MSCs ( $53,3 \pm 12,8\%$  en el grupo trasplantado con VM y  $22,9 \pm 4,9\%$  en el grupo trasplantado con VM + high MSCs) (Figura 27B).

Además, tal y como se ha observado en estudios previos (Tiklová y col., 2020), los trasplantes intraestriatales de precursores mesencefálicos de origen fetal contienen numerosas neuronas TH-ir, que no se distribuyen de forma uniforme dentro del implante (ver Figura 21A, B). La mayoría de las neuronas TH-ir se agrupan formando parches localizados en la periferia del trasplante mientras que el área central de los implantes suele ser TH negativa (Figura 27C-E, 27C'-E'). Las células que exhiben fluorescencia roja revelan la presencia de MSCs en los injertos (Figura 27C, C'). Curiosamente, el número total de neuronas TH-ir es significativamente menor en aquellos animales que recibieron un trasplante combinado de precursores dopaminérgicos y altas dosis de MSCs con respecto a los animales que recibieron únicamente suspensiones de precursores mesencefálicos (Figura 27F). Sin embargo, no observamos diferencias significativas en el volumen medio del implante entre ambos grupos (en  $\text{mm}^3 \pm \text{EEM}$ :  $0,351 \pm 0,023$  en el grupo VM + high MSCs y  $0,454 \pm 0,065$  en el grupo VM). Tanto la densidad de las fibras TH-ir en el área de reinervación (Figura 27G) como el área de reinervación (Figura 27H) se reducen significativamente en el grupo de animales que recibió un implante combinado de precursores mesencefálicos y dosis altas de MSCs con respecto a los animales que recibieron un trasplante solo de precursores dopaminérgicos. Teniendo en cuenta que ambos grupos muestran trasplantes de volumen equivalente, la reducción del número de neuronas y fibras TH-ir en el grupo VM + high MSCs indica un incremento sustancial de la pérdida selectiva de neuronas dopaminérgicas.



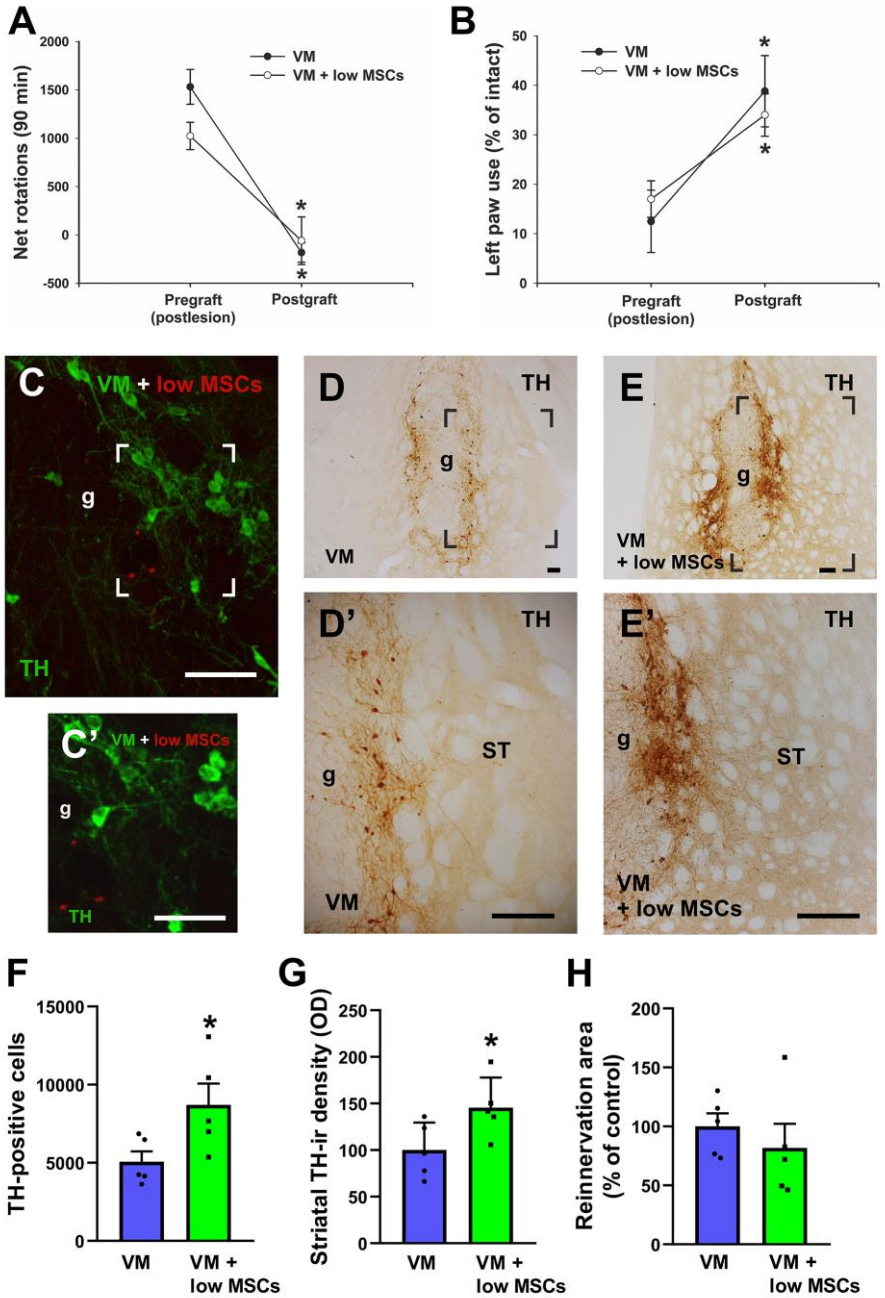
**Figura 27.** Análisis comportamental (A, B) e histológico (C-H) de los efectos del cotrasplante de suspensiones celulares derivadas del mesencéfalo ventral (VM, del inglés *ventral mesencephalic*) con dosis elevadas de células estromales mesenquimales (MSCs, del inglés *mesenchymal stromal cells*). El número de rotaciones netas inducidas por anfetamina (A) es similar en los dos grupos de animales trasplantados. En el test del cilindro (B), la recuperación del uso de la pata izquierda es más notable en el grupo VM que en el grupo VM + high MSCs. Microfotografías de los implantes (g, del inglés *graft*) intraestriatales representativas de inmunorreactividad (-ir) frente a tirosina hidroxilasa (TH; marcador dopaminérgico) en ratas sometidas a depleción dopaminérgica y que recibieron un cotrasplante de precursores dopaminérgicos y MSCs (C-C', E-E') o únicamente de precursores dopaminérgicos (D-D'), y mostrando fluorescencia verde de células dopaminérgicas TH-ir y fluorescencia roja de las MSCs implantadas (C-C'). Las áreas encuadradas en (C-E) se amplían en (C'-E'). (F) Histogramas en los que se muestra el número de neuronas TH-ir (dopaminérgicas) en ambos grupos. (G) La densidad de fibras TH-ir en el área de reinervación se estimó midiendo la densidad óptica (OD) y se expresa como un porcentaje del valor obtenido en el grupo control (grupo con trasplante VM). (H) Área de reinervación (área del estriado hospedador reinervada por las fibras TH-ir derivadas del implante) en ambos grupos. Los datos se representan como valor de la media  $\pm$  EEM. En las figuras (A) y (B), \* $p < 0,05$  con respecto al grupo lesionado con 6-OHDA (poslesión y pretrasplante) y # $p < 0,05$  entre los grupos trasplantados (es decir, entre VM y VM + high MSCs); en las figuras (F) y (G), \* $p < 0,05$  con respecto al grupo VM (test *t* de Student). ST = estriado. Escala = 100  $\mu$ m y 50  $\mu$ m para (C').

4.2.3.2. El cotrasplante de precursores dopaminérgicos con dosis bajas de MSCs promueve su supervivencia y su capacidad de reinervación

Tal y como se ha descrito en el apartado anterior, la lesión de la vía nigroestriatal con 6-OHDA genera un intenso comportamiento rotacional ipsilateral al lado denervado, inducido por la administración de anfetamina. De nuevo, observamos una marcada asimetría rotacional tanto en el grupo de animales que recibieron un trasplante con precursores dopaminérgicos ( $1530,8 \pm 179,9$  rotaciones) como en el que recibió un trasplante con precursores dopaminérgicos y dosis bajas de MSCs ( $1023,4 \pm 141,5$  rotaciones). El comportamiento rotacional inducido por anfetamina se revierte por completo tras la realización de los trasplantes en los dos grupos de animales trasplantados ( $-182,5 \pm 100,7$  y  $-60,4 \pm 246,0$  rotaciones en el grupo VM y en el grupo VM + low MSCs, respectivamente) (Figura 28A). Además, tras la lesión inducida por 6-OHDA, el uso de la pata izquierda se reduce hasta el

12,5 ± 6,3 % en el grupo que recibió un trasplante con precursores dopaminérgicos y hasta el 17,0 ± 3,7 % en los animales que recibieron un cotrasplante (Figura **28B**). Tras recibir los implantes, el uso de la extremidad anterior izquierda mejora significativamente en ambos grupos, sin detectarse diferencias entre ellos (38,8 ± 7,2% del uso de la pata izquierda en el grupo trasplantado con precursores dopaminérgicos y 34,0 ± 4,3% en el grupo trasplantado con precursores dopaminérgicos y dosis bajas de MSCs) (Figura **28B**).

Los análisis histológicos revelan que el número total de neuronas TH-ir es significativamente mayor en los animales que recibieron un trasplante de precursores dopaminérgicos combinados con dosis bajas de MSCs con respecto a los animales trasplantados únicamente con neuroblastos dopaminérgicos (Figura **28C-F, 28C'-E'**). Las células que exhiben fluorescencia roja revelan la presencia de MSCs en los injertos (Figura **28C, C'**). Aunque no observamos diferencias significativas en el volumen medio de los implantes entre ambos grupos (en mm<sup>3</sup> ± EEM: 0,510 ± 0,089 en el grupo VM + low MSCs y 0,455 ± 0,064 en el grupo VM), la densidad de las fibras TH-ir en el área de reinervación es significativamente mayor en las ratas que recibieron cotrasplantes con respecto a las ratas que recibieron un trasplante solo de precursores mesencefálicos (Figura **28G**). Sin embargo, el área de reinervación es similar en ambos grupos (Figura **28H**). Teniendo en cuenta que ambos grupos muestran trasplantes de volumen equivalente, el aumento en el número de neuronas y fibras TH-ir en el grupo VM + low MSCs indica una reducción importante de la muerte neuronal dopaminérgica. La ausencia de diferencias significativas en el comportamiento motor entre ambos grupos sugiere que los cambios histológicos observados no son suficientes para inducir diferencias funcionales o, más probablemente, que la sensibilidad de estos tests de comportamiento es insuficiente para detectar diferencias en la recuperación funcional de estos animales.



**Figura 28.** Análisis comportamental (A, B) e histológico (C-H) de los efectos del cotrasplante de suspensiones celulares derivadas del mesencéfalo ventral (VM, del inglés *ventral mesencephalic*) con dosis bajas de células estromales mesenquimales (MSCs, del inglés *mesenchymal stromal cells*). El número de rotaciones netas inducidas por anfetamina (A) y la recuperación del uso de la pata izquierda (B) es similar entre los dos grupos de animales trasplantados. Microfotografías de los implantes (g, del inglés *graft*) intraestriatales representativas de la inmunorreactividad (-ir) frente a tirosina hidroxilasa (TH; marcador dopaminérgico) en ratas sometidas a depleción dopaminérgica y al cotrasplante de precursores dopaminérgicos y MSCs (C-C', E-E') o únicamente al trasplante de precursores dopaminérgicos (D-D'), y mostrando fluorescencia verde de células dopaminérgicas TH-ir y fluorescencia roja de las MSCs implantadas (C-C'). Las áreas encuadradas en (C-E) se amplían en (C'-E'). (F) Histogramas en los que se muestra el número de neuronas TH-ir (dopaminérgicas) en ambos grupos. (G) La densidad de fibras TH-ir en el área de reinervación se estimó midiendo la densidad óptica (OD) y se expresa como un porcentaje del valor obtenido en el grupo control (grupo con trasplante VM). (H) Área de reinervación (área del estriado hospedador reinervada por las fibras TH-ir derivadas del implante) en ambos grupos. Los datos se representan como valor de la media  $\pm$  EEM. En las figuras (A) y (B), \* $p < 0,05$  con respecto al grupo lesionado con 6-OHDA (poslesión y pretrasplante) y # $p < 0,05$  entre los grupos trasplantados (es decir, entre VM y VM + low MSCs); en las figuras (F) y (G), \* $p < 0,05$  con respecto al grupo VM (test *t* de Student). ST = estriado. Escala = 100  $\mu$ m y 50  $\mu$ m para (C').

#### 4.2.4. Estudio de los mecanismos implicados en la neuroprotección dopaminérgica mediada por MSCs

Tras determinar que las MSCs poseen propiedades neuroprotectoras sobre la población dopaminérgica implantada *in vivo* en modelos animales de EP (ver Figura 27 y 28), llevamos a cabo estudios *in vitro* para identificar los posibles mecanismos implicados. Para ello, estudiamos el efecto del MSC-CM sobre la viabilidad de neuronas dopaminérgicas de distinto origen en cultivo.

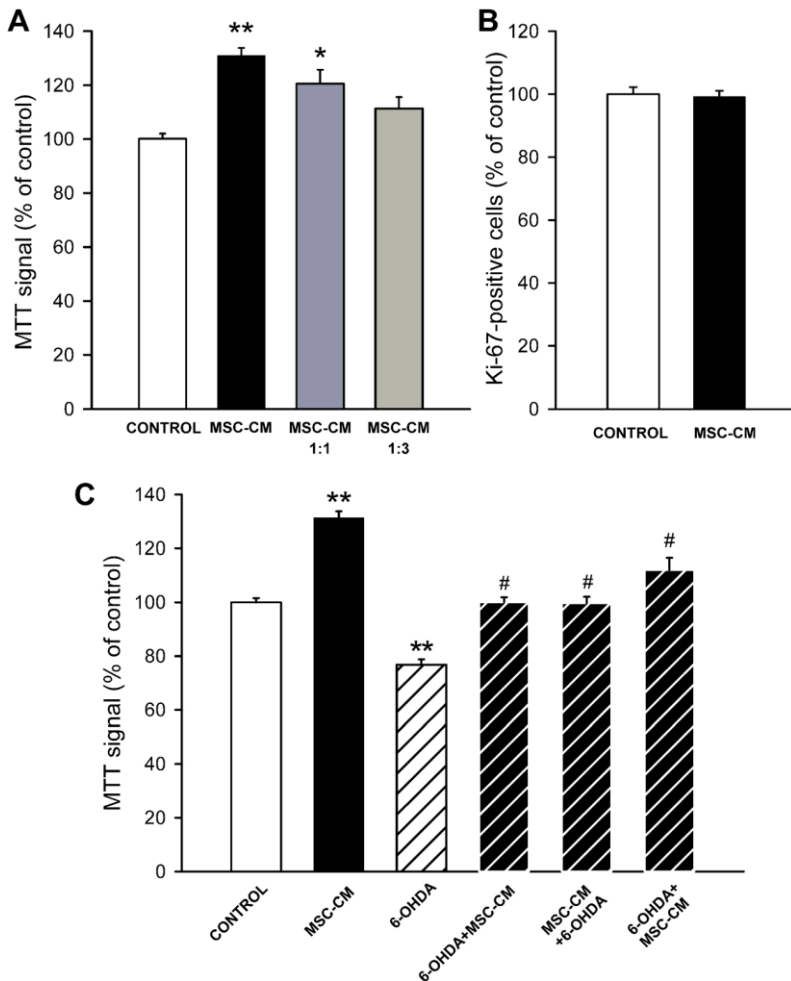
4.2.4.1. El MSC-CM posee efectos neuroprotectores y de rescate sobre neuronas dopaminérgicas *in vitro*

En primer lugar, tratamos cultivos de la línea dopaminérgica Mes23.5 (ver Material y métodos, apartado 3.3.2) con MSC-CM. En nuestras condiciones experimentales, el MSC-CM sin diluir induce un incremento significativo en el número de células Mes23.5 viables, tal y como demuestra el aumento en la formación de cristales de formazán a partir de MTT (ver Material y métodos, apartado 3.3.5) con respecto a

cultivos control sin tratar (Figura 29A). Además, estudiamos el efecto de tratar estos cultivos con diferentes diluciones del MSC-CM. Nuestros resultados muestran que los efectos neuroprotectores del MSC-CM disminuyen cuando este se diluye a la mitad (1:1) y desaparecen en diluciones sucesivas (1:3) (Figura 29A). A la luz de estos resultados, utilizamos MSC-CM sin diluir para todos los experimentos subsiguientes, ya que posee un efecto neuroprotector óptimo. Para descartar que el incremento en el número de células observado en los cultivos tratados con MSC-CM se deba a la proliferación de la línea Mes23.5, analizamos el número de células Ki-67-ir en estos cultivos. La expresión de Ki67 sirve como marcador de células en proliferación en todas las fases del ciclo celular, mientras que en las células que se encuentran en fase G0, la expresión de Ki67 es negativa. La ausencia de diferencias significativas en el porcentaje de células Ki67-ir entre los cultivos tratados con MSC-CM y los cultivos control sugiere que la proliferación celular no es responsable del incremento en el número de células Mes23.5 observado tras el tratamiento con MSC-CM (Figura 29B). Para evaluar las propiedades neuroprotectoras del MSC-CM sobre las neuronas dopaminérgicas, tratamos cultivos de la línea Mes23.5 con la neurotoxina 6-OHDA. Tal y como cabía esperar, en los cultivos que se trataron con 6-OHDA observamos un marcado descenso de la viabilidad celular con respecto al grupo control. Sin embargo, en los cultivos que se trataron simultáneamente con 6-OHDA y MSC-CM observamos un incremento significativo de la viabilidad con respecto a los cultivos que se trataron solo con 6-OHDA, llegando incluso a niveles de viabilidad similares a los cultivos control (Figura 29C). Con el objetivo de dilucidar el papel del MSC-CM sobre la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas, tratamos un grupo de cultivos con MSC-CM 24 h antes del tratamiento con 6-OHDA. Por otra parte, llevamos a cabo experimentos para conocer el posible efecto de rescate del MSC-CM sobre la población dopaminérgica. Para ello, la línea Mes23.5 se trató en primer lugar con 6-OHDA y 24 h después con MSC-CM. En ambos tipos de experimentos, el número de células TH-ir viables tras el tratamiento con 6-OHDA es significativamente mayor en los cultivos tratados con MSC-CM (tanto antes como después de sufrir el daño neurotóxico) con respecto a cultivos tratados únicamente con 6-OHDA

(Figura 29C). Estos datos sugieren que el MSC-CM posee tanto propiedades neuroprotectoras, tal y como se deduce de los experimentos en los que se añade antes que la 6-OHDA, como de rescate, tal y como se observa en aquellos cultivos en los que se añade después del tratamiento con 6-OHDA, sobre la población dopaminérgica en cultivo.

**Dopaminergic cell line MES 23.5**

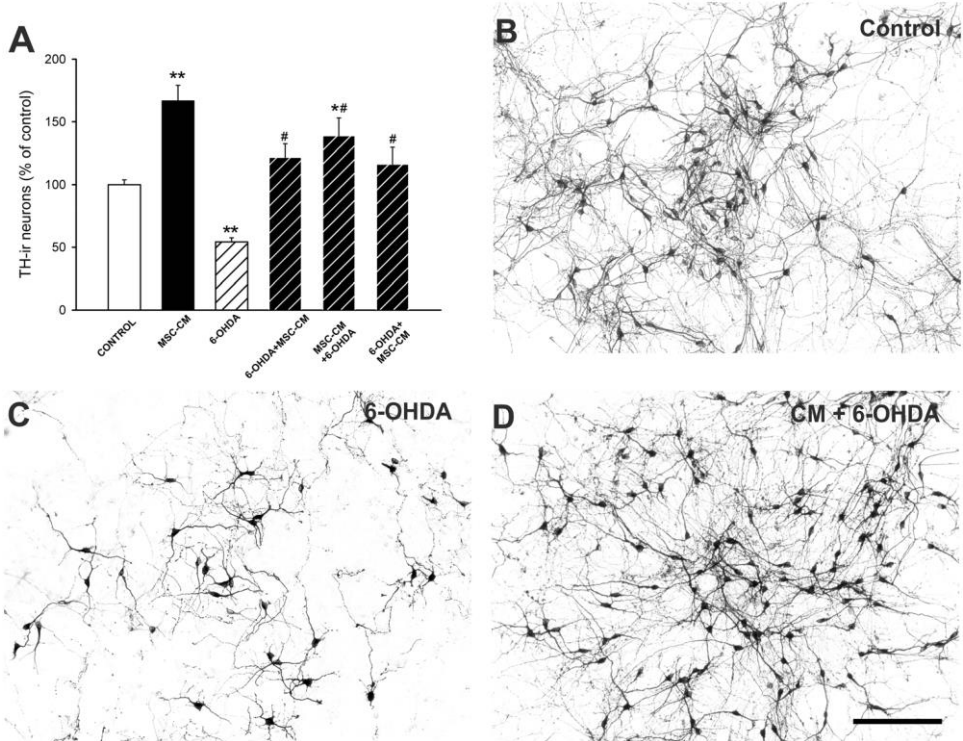


**Figura 29.** El medio condicionado derivado de células estromales mesenquimales (MSC-CM) incrementa la viabilidad de la línea celular dopaminérgica Mes23.5. (A) Las células Mes23.5 se cultivaron en presencia de diferentes diluciones del MSC-CM durante 24 h. El MSC-CM sin diluir induce el efecto máximo sobre la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas con respecto al grupo control. (B) El tratamiento de la línea dopaminérgica Mes23.5 con MSC-CM no incrementa su proliferación, como demuestra la proporción de células Ki-67 inmunorreactivas (-ir) en cultivo. (C) El tratamiento con la neurotoxina dopaminérgica 6-hidroxidopamina (6-OHDA) induce un descenso significativo de la viabilidad celular, que se revierte a niveles control con el tratamiento simultáneo (6-OHDA + MSC-CM), previo (MSC-CM + 6-OHDA) o posterior (6-OHDA + MSC-CM) con MSC-CM. Los datos se representan como valor de la media  $\pm$  EEM. \* $p < 0,01$  y \*\* $p < 0,001$  con respecto al grupo control y # $p < 0,001$  con respecto a cultivos tratados con 6-OHDA (ANOVA de una vía y test *post hoc* Student-Newman-Keuls).

Como siguiente paso, nos propusimos evaluar el efecto del MSC-CM sobre cultivos primarios de mesencéfalo, que contienen tanto neuronas como células gliales. Los cultivos de precursores mesencefálicos ventrales se trataron con 6-OHDA y/o con MSC-CM a partir del 5-6 DIV (ver Material y métodos, apartado [3.3.1](#)) y se mantuvieron en presencia de los tratamientos correspondientes 24 h. Nuestros resultados muestran un incremento en el número de neuronas dopaminérgicas (número de células TH-ir) en los cultivos que se trataron con MSC-CM (Figura **30A-D**). Los cultivos de precursores mesencefálicos contienen neuronas posmitóticas a partir del 7° DIV, de manera que el incremento en el número de neuronas TH-ir observado en los cultivos tratados con MSC-CM no puede deberse a efectos sobre la proliferación celular, sino que lo atribuimos a acciones neuroprotectoras del MSC-CM sobre las neuronas dopaminérgicas. La exposición de cultivos primarios control a la neurotoxina 6-OHDA durante 24 h reduce el número de neuronas TH-ir en un 50% aproximadamente (Figura **30A, C**). En concordancia con los resultados obtenidos en la línea dopaminérgica Mes23.5 (ver Figura **29C**), el tratamiento simultáneo con 6-OHDA y MSC-CM reduce el descenso en el número de células TH-ir inducido por la neurotoxina (Figura **30A-D**). La actividad neuroprotectora del MSC-CM observada en la línea dopaminérgica Mes23.5 (ver Figura **29C**) se confirma igualmente en cultivos primarios de mesencéfalo, ya que el tratamiento con MSC-CM

inhibe el descenso en la viabilidad de las células dopaminérgicas inducido por 6-OHDA cuando el MSC-CM se añade antes que la neurotoxina. Además, cuando el MSC-CM se añade con posterioridad al tratamiento con 6-OHDA también es capaz de revertir la muerte neuronal inducida por la neurotoxina (Figura 30A).

### Primary mesencephalic cultures



**Figura 30.** El medio condicionado derivado de células estromales mesenquimales (MSC-CM) incrementa la viabilidad de células dopaminérgicas primarias. (A) Los cultivos primarios de mesencéfalo tratados con MSC-CM muestran un incremento en el número de neuronas dopaminérgicas viables (número de neuronas tirosina hidroxilasa (TH)-inmuno-reactivas (-ir)). (B-D) En los cultivos que se trataron simultáneamente con MSC-CM y 6-hidroxidopamina (6-OHDA), se incrementa el número de células TH-ir con respecto a cultivos tratados únicamente con 6-OHDA. En cultivos tratados con MSC-CM, tanto antes como después de la administración de 6-OHDA, se observan resultados similares. Microfotografías representativas de cultivos primarios teñidos para TH. Los datos se representan como valor de la media  $\pm$  EEM. \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,001$  con respecto al grupo control y # $p < 0,001$  con respecto a cultivos tratados con 6-OHDA (ANOVA de una vía y test *post hoc* Student-Newman-Keuls). Escala = 100  $\mu$ m.

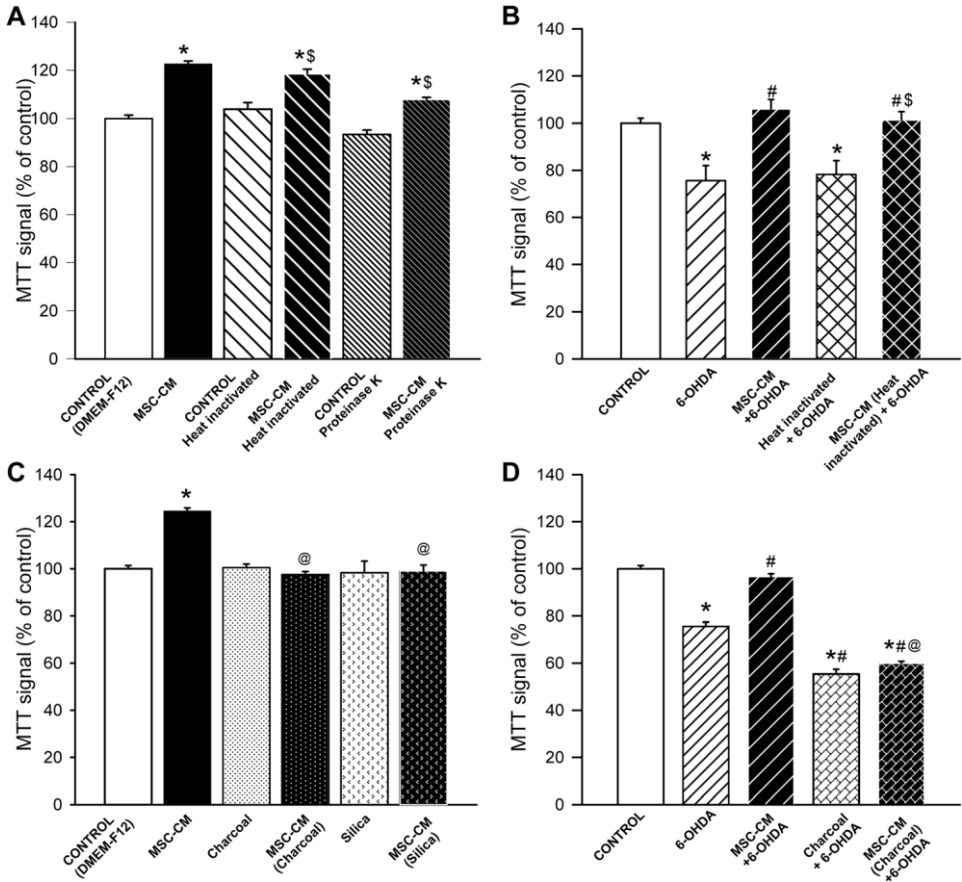
4.2.4.2. Los factores lipídicos presentes en el MSC-CM favorecen la supervivencia de las células dopaminérgicas *in vitro*

A continuación, nos propusimos investigar la naturaleza molecular de los factores presentes en el MSC-CM con el objetivo de averiguar qué fracción es responsable de sus acciones sobre la supervivencia dopaminérgica. El FBS, utilizado para mantener tanto los cultivos de la línea dopaminérgica Mes23.5 como los cultivos primarios de mesencéfalo, contiene componentes indefinidos cuya composición bioquímica puede variar significativamente entre lotes y proporciona factores con efectos sobre cultivos neuronales y de MSCs. Por ello, y para conocer la naturaleza de los factores presentes en el MSC-CM responsables de los efectos neuroprotectores observados, en los experimentos subsiguientes utilizamos DMEM/F-12 (es decir, medio mínimo sin FBS; ver Material y métodos, apartado [3.3.1](#)). Nuestros resultados muestran que el MSC-CM derivado de cultivos mantenidos en DMEM/F-12 también induce un incremento en la viabilidad de los cultivos dopaminérgicos de Mes23.5 con respecto a los cultivos control sin tratar (Figura **31A**).

En estudios previos se ha demostrado que los factores peptídicos favorecen la supervivencia celular. En un intento de aislar los factores responsables de las acciones neuroprotectoras del MSC-CM, un subconjunto de cultivos se trató con MSC-CM previamente calentado a 95 °C durante 30 min. La mayoría de los factores peptídicos se desnaturalizan tras este tratamiento y pierden sus propiedades tróficas. Sin embargo, el tratamiento con calor no elimina el efecto protector del MSC-CM sobre la supervivencia de la línea dopaminérgica Mes23.5, ya que el MSC-CM inactivado por calor tiene un efecto igualmente positivo sobre la viabilidad dopaminérgica (Figura **31A**). El tratamiento de cultivos de la línea Mes23.5, que se mantuvieron en DMEMF/12, con 6-OHDA reduce de manera significativa su viabilidad (Figura **31B**), de manera similar a lo que ocurre cuando se cultivan en presencia de medio completo (ver Figura **29C**). Curiosamente, la inactivación de la fracción peptídica del MSC-CM con calor no elimina sus propiedades neuroprotectoras sobre cultivos dopaminérgicos de Mes23.5 tratados con 6-OHDA (Figura **31B**). Además, el tratamiento del MSC-CM con proteinasa K, que empleamos como método alternativo para la

inactivación de la fracción peptídica presente en el MSC-CM, tampoco revierte su efecto protector sobre las neuronas dopaminérgicas Mes23.5 respecto a cultivos control (Figura **31A**). Estos datos indican que las moléculas que contribuyen a la acción neuroprotectora del MSC-CM podrían ser de naturaleza no peptídica.

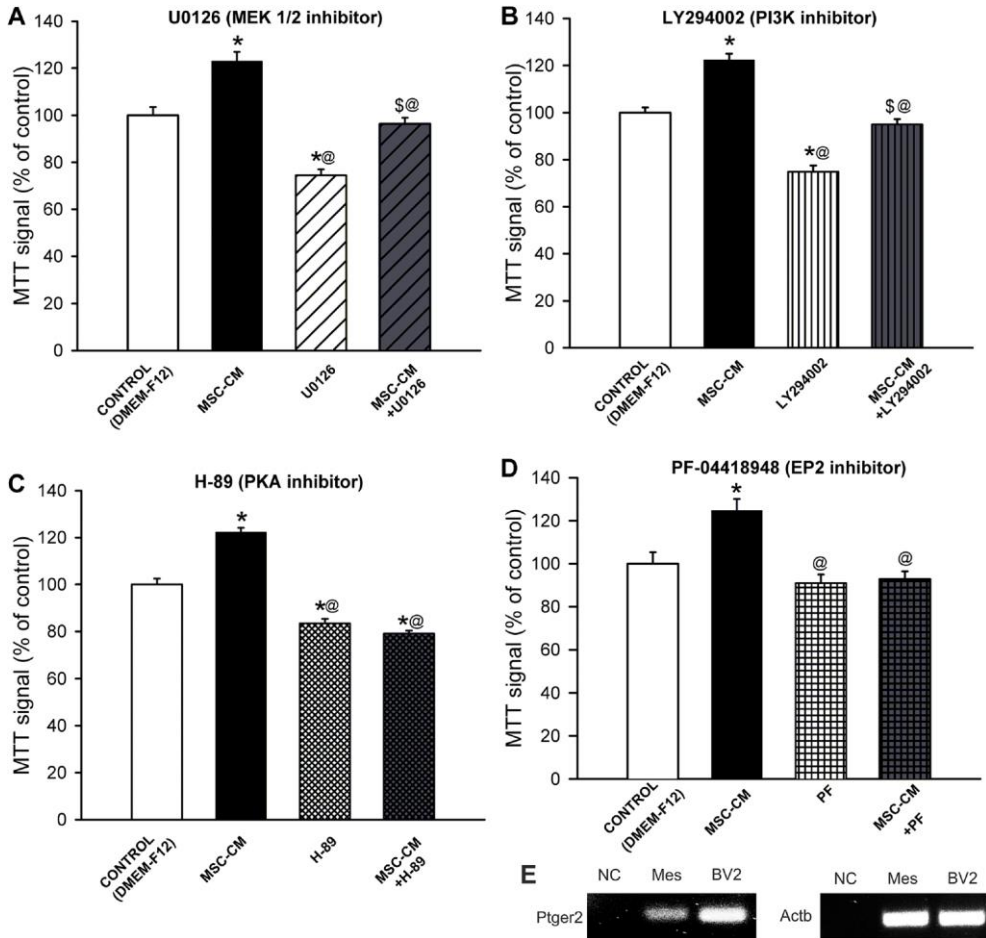
Con el objetivo de obtener más información acerca de la naturaleza de los factores neuroprotectores presentes en el MSC-CM, eliminamos su fracción lipídica mediante dos estrategias. En una primera serie de experimentos, tratamos cultivos de la línea dopaminérgica Mes23.5 con MSC-CM previamente tratado con carbón recubierto de dextrano (ver Material y métodos, apartado [3.3.11.2](#)). En los cultivos tratados con el MSC-CM sometido a este tratamiento, observamos un descenso significativo de la viabilidad dopaminérgica con respecto a los cultivos tratados con MSC-CM sin modificar (Figura **31C**). Para confirmar la disminución de la capacidad neuroprotectora del MSC-CM tras su deslipidación, utilizamos un segundo método de secuestro de lípidos. Para ello, tratamos el MSC-CM con sílice pirógena para precipitar las lipoproteínas presentes en el MSC-CM (ver Material y métodos, apartado [3.3.11.2](#)). Nuestros resultados muestran que el tratamiento con sílice revierte el incremento de la viabilidad celular inducido por el MSC-CM en cultivos de la línea dopaminérgica Mes23.5 (Figura **26C**). Además, en los cultivos dopaminérgicos tratados con 6-OHDA y con MSC-CM pretratado con carbón, el número de células viables disminuye significativamente con respecto a aquellos tratados con 6-OHDA y MSC-CM sin tratar (Figura **31D**). Nuestros resultados sugieren que los factores lipídicos presentes en el MSC-CM podrían ser los responsables de sus efectos beneficiosos sobre la supervivencia dopaminérgica *in vitro*.



**Figura 31.** Las sustancias lipofílicas median los efectos neuroprotectores del medio condicionado derivado de las células estromales mesenquimales (MSC-CM) sobre las neuronas dopaminérgicas. La inactivación de la fase proteica del MSC-CM con calor o mediante la digestión enzimática con proteinasa K no afecta a la actividad neuroprotectora del MSC-CM en condiciones basales (A) ni en presencia de daño neurotóxico inducido por 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (B). La eliminación de la fase lipídica mediante carbón o mediante sílice reduce significativamente (es decir, hasta niveles control) la viabilidad de los cultivos tratados con MSC-CM tanto en condiciones basales (C) como en cultivos tratados con 6-OHDA (D). Los datos se representan como valor de la media  $\pm$  EEM. \* $p < 0,005$  con respecto al grupo control, # $p < 0,001$  con respecto a cultivos tratados con 6-OHDA,  $^{\S}p < 0,001$  con respecto al grupo control tratado y @ $p < 0,001$  con respecto al grupo MSC-CM (ANOVA de una vía y test *post hoc* Student-Newman-Keuls).

4.2.4.3. Las vías de señalización MAPK/ERK y PI3K/Akt están implicadas en los efectos neuroprotectores mediados por el MSC-CM sobre las neuronas dopaminérgicas *in vitro*

Las vías de señalización celular MAPK/ERK y PI3K/Akt desencadenan procesos de muerte y supervivencia celular y se activan en respuesta a una gran variedad de factores de crecimiento, incluyendo aquellos liberados por las MSCs. Con el objetivo de determinar el posible papel de estas vías en los efectos neuroprotectores del MSC-CM, los cultivos de la línea dopaminérgica Mes23.5 se trataron simultáneamente con MSC-CM y con U0126 (inhibidor de la vía MEK1/2), LY294002 (inhibidor de la vía PI3K), H-89 (inhibidor de la vía PKA) o PF-04418948 (antagonista de receptores EP2) (ver Material y métodos, apartado [3.3.1](#)). Nuestros resultados muestran que el tratamiento con los inhibidores U0126 o LY294002 reduce la supervivencia de las células dopaminérgicas de la línea Mes23.5 tanto en condiciones basales (es decir, en presencia de DMEM/F-12) como en presencia de MSC-CM (Figura **32A, B**). Los cultivos que se trataron simultáneamente con MSC-CM y U0126 o LY294002 mantienen parte del incremento en la viabilidad celular inducido por el tratamiento con MSC-CM (Figura **32A, B**). Estos datos sugieren que, aunque estas vías de señalización están activas en las neuronas dopaminérgicas de la línea Mes23.5, los factores tróficos no ejercen un papel fundamental en los efectos observados, al menos en las presentes condiciones experimentales.



**Figura 32.** La inhibición de los receptores de prostaglandina E2 (EP2) o de la vía PKA bloquea los efectos neuroprotectores inducidos por el medio condicionado derivado de células estromales mesenquimales (MSC-CM) sobre la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas de la línea Mes23.5. (A, B) La inhibición de las vías de señalización activadas por factores de crecimiento MEK1/2 y PI3K con sus inhibidores específicos U0126 (A, 10  $\mu$ M) y LY294002 (B, 10  $\mu$ M), respectivamente, no bloquea el incremento de la supervivencia dopaminérgica inducido por MSC-CM. (C, D) El aumento de la viabilidad de las neuronas dopaminérgicas Mes23.5 tratadas con MSC-CM se revierte en cultivos tratados con el inhibidor de PKA H-89 (C, 10  $\mu$ M) y en cultivos tratados con el antagonista de receptores EP2 PF-04418948 (D, 1  $\mu$ M). (E) Bandas representativas de ARNm de *Ptger2* obtenidas mediante qPCR en células de la línea Mes23.5 (Mes). Como control positivo, se utilizaron homogenizados de la línea microglial BV2 (BV2). Los datos se representan como valor de la media  $\pm$  EEM. \* $p < 0,001$  con respecto al grupo control,  $^{\$}p < 0,001$  con respecto al grupo control tratado con inhibidores,  $^{\textcircled{a}}p < 0,001$  con respecto al grupo MSC-CM (ANOVA de una vía y test *post hoc* Student-Newman-Keuls). NC = control negativo; Mes = línea Mes23.5; Actb =  $\beta$ -actina.

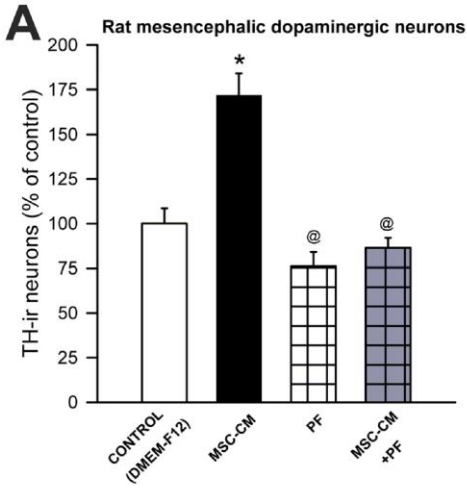
#### 4.2.4.4. La PGE2 media los efectos neuroprotectores del MSC-CM sobre las neuronas dopaminérgicas *in vitro*

La PGE2 es una molécula lipofílica cuya presencia se ha descrito en el secretoma de las MSCs. Por tanto, nos propusimos averiguar la posible implicación de esta molécula en los efectos neuroprotectores del MSC-CM. Por otra parte, la cascada de señalización AMPc-PKA es una vía de señalización comúnmente utilizada por los receptores de prostaglandinas para modular la neuroprotección. De hecho, el tratamiento de cultivos de la línea Mes23.5 con el inhibidor específico de la vía PKA H-89 reduce significativamente la viabilidad celular en las neuronas dopaminérgicas, lo que sugiere que la vía de señalización AMPc-PKA está activa en esta línea celular. Además, en los cultivos que se trataron simultáneamente con MSC-CM y H-89 observamos una disminución significativa de la viabilidad celular hasta niveles comparables a los de cultivos tratados con el inhibidor en presencia de DMEM/F-12 (Figura **32C**).

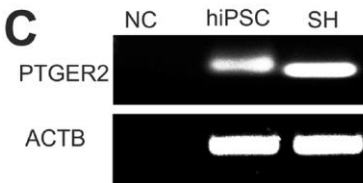
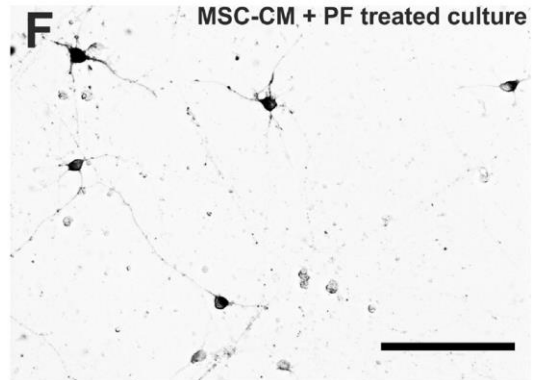
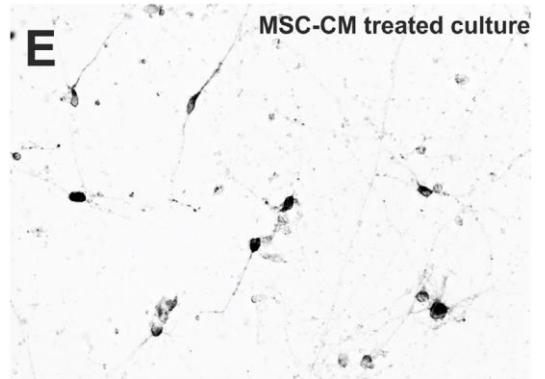
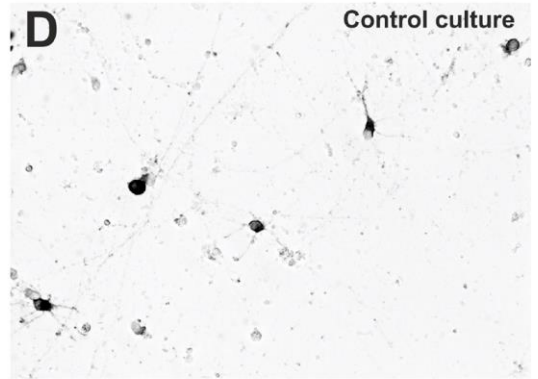
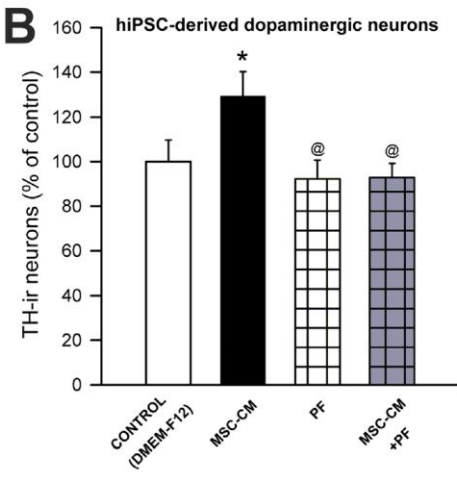
El receptor EP2 es uno de los receptores de PGE2 que señala a través de la cascada de señalización PKA y, en estudios previos, se ha sugerido que puede tener actividad neuroprotectora. Por ello, analizamos la expresión de receptores EP2 en células de la línea dopaminérgica Mes23.5 mediante qPCR. Nuestros resultados confirman la presencia de ARNm de *Ptger2* (Figura **32E**) en la línea dopaminérgica Mes23.5, por lo que nos propusimos estudiar si este receptor podría estar implicado en los efectos observados. Nuestros resultados muestran que el tratamiento con el antagonista específico de receptores EP2 PF-04418948 reduce la viabilidad de las neuronas dopaminérgicas en los cultivos de la línea Mes23.5 tratados con MSC-CM (Figura **32D**).

Con el objetivo de corroborar estas observaciones, nos propusimos investigar el efecto del antagonista de receptores EP2 sobre cultivos primarios de mesencéfalo, que contienen neuronas posmitóticas y células gliales. Nuestros resultados muestran que, en cultivos primarios, el tratamiento con PF-04418948 reduce el incremento de la viabilidad dopaminérgica inducido por el MSC-CM hasta niveles similares a los cultivos control sin tratar (Figura **33A**). Además, decidimos investigar

el efecto de este inhibidor sobre la viabilidad de neuronas dopaminérgicas maduras de origen humano. En primer lugar, analizamos la presencia del receptor EP2 en cultivos de hiPSCs diferenciadas hacia el fenotipo dopaminérgico. Nuestros datos confirman la presencia de ARNm de *PTGER2* en cultivos de hiPSCs, detectada mediante qPCR (Figura **33C**). El tratamiento de estas neuronas dopaminérgicas derivadas de hiPSCs durante 24 h desde el DIV 30 (ver Material y métodos, apartado [3.3.16](#)) con MSC-CM obtenido de cultivos de rata induce un incremento significativo en el número de neuronas TH-ir con respecto a cultivos sin tratar (Figura **33B, D, E**). Tal y como ocurre en otro tipo de cultivos de neuronas dopaminérgicas (ver Figura **32D**), el tratamiento simultáneo con MSC-CM y con el inhibidor de receptores EP2 PF-04418948 reduce el número de neuronas TH-ir derivadas de hiPSCs a niveles control (Figura **33B, F**). Nuestros resultados sugieren, por tanto, que la PGE2 media, al menos parcialmente, el efecto neuroprotector del MSC-CM sobre neuronas dopaminérgicas en cultivo, a través de la activación de sus receptores EP2.



hiPSC-derived dopaminergic neurons



**Figura 33. La señalización del receptor de prostaglandina E2 (EP2) media los efectos del medio condicionado derivado de células estromales mesenquimales (MSC-CM) sobre la supervivencia de neuronas dopaminérgicas de distinto origen.** (A) El tratamiento con el antagonista del receptor EP2 PF-04418948 (1  $\mu$ M) bloquea el incremento en la supervivencia dopaminérgica inducido por el tratamiento con MSC-CM en cultivos primarios de rata. (B) El antagonista del receptor EP2 PF-04418948 también bloquea el incremento en la supervivencia inducido por MSC-CM en neuronas dopaminérgicas (tirosina hidroxilasa (TH) inmunorreactivas (-ir)) derivadas de células madre pluripotentes inducidas humanas (hiPSCs, del inglés *human induced pluripotent stem cells*), tal y como se muestra en microfotografías representativas (D-F) de neuronas dopaminérgicas en cultivo. (C) Bandas representativas de ARNm de *PTGER2* obtenidas mediante qPCR en neuronas dopaminérgicas derivadas de hiPSCs (hiPSC). Como control positivo se utilizaron homogenados de la línea neuronal humana SH-SY5Y (SH). Los datos se representan como valor de la media  $\pm$  EEM. En la figura (A), \* $p < 0,001$  con respecto al grupo control y <sup>@</sup> $p < 0,001$  con respecto al grupo MSC-CM. En la figura (B), \* $p < 0,01$  con respecto al grupo control y <sup>@</sup> $p < 0,01$  con respecto al grupo MSC-CM (ANOVA de una vía y test *post hoc* Student-Newman-Keuls). NC = control negativo; Actb = B-actina. Escala = 50  $\mu$ m.

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1. MECANISMOS IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN DE LA NEUROGÉNESIS ADULTA EN LA V-SVZ EN CONDICIONES FISIOLÓGICAS Y EN MODELOS ANIMALES DE EP

#### 5.1.1. La interacción entre los receptores AT1, AT2 y Mas regula la neurogénesis adulta en la V-SVZ cerebral

En la presente tesis, hemos demostrado la presencia de los receptores de AngII AT1 y AT2 tanto en la V-SVZ adulta de rata como de ratón, así como en neuroesferas derivadas de las NSCs y NPCs de la V-SVZ de ratón. Además, nuestros resultados muestran que tanto los receptores AT1 como los receptores AT2 están implicados en la regulación de la proliferación de las células de la V-SVZ (Figura 34A) y que la expresión de los receptores AT1 y AT2, expresada como ratio AT1/AT2, puede verse modificada por el envejecimiento, por fármacos como antagonistas del receptor AT1 (candesartán) o por diferencias interespecíficas (Figura 34B). Nuestros resultados concuerdan con estudios previos en los que se ha demostrado inmunorreactividad frente a los receptores AT1 y AT2 en agregados de precursores celulares obtenidos del cerebro en desarrollo (Rodríguez-Pallares y col., 2004) y con estudios en los que se describe un incremento temporal de la expresión de AT1 y AT2 en cultivos de NSCs derivados del hipocampo embrionario y adulto de rata (Chao y col., 2013; Kim y col., 2017). Utilizando microscopía confocal, observamos que los receptores AT1 y AT2 se expresan mayoritariamente en los neuroblastos de la V-SVZ. Por su parte, algunas células GFAP-positivas, localizadas principalmente en la zona que limita con el estriado, muestran la coexpresión de ambos receptores. Basándonos en su localización, es posible que estas células sean astrocitos no neurogénicos, también denominados astrocitos propios del nicho o células B2 (Platel y Bordey, 2016). Además, la presencia de los receptores AT1 y AT2 en nuestro

sistema de cultivo celular sugiere que ambos receptores se localizan en las NSCs o células B1, también positivas para GFAP, así como en los progenitores con capacidad de amplificación transitoria (células C o NPCs) derivados de ellas que también intervienen en la formación de neuroesferas (Gil-Perotín y col., 2013). Nuestros resultados también demuestran que las NSCs y NPCs que forman las neuroesferas liberan al medio ANG, el precursor de AngII, ya que los efectos descritos también ocurren sin la administración exógena de AngII. Estos datos concuerdan con el hecho de que los astrocitos, cuyas características comparten las NSCs y NPCs, son la principal fuente cerebral de ANG (Doetsch y col., 1999; González-Pérez y Quiñones-Hinojosa, 2012).

Nuestros resultados también demuestran que los receptores AT1 y AT2 juegan un papel fundamental en la proliferación y/o en la generación de neuroblastos en la V-SVZ. La mayoría de las acciones conocidas de la AngII en el cerebro adulto están mediadas por los receptores AT1 (Nuyt y col., 2001). En diversos estudios, se ha demostrado que la AngII local, a través de sus receptores AT1, favorece el daño inducido por estrés oxidativo y la neuroinflamación, lo que contribuye a la progresión de la neurodegeneración (Labandeira-García y col., 2014, 2017). Sin embargo, los efectos de AT1 sobre la proliferación y sobre la neurogénesis resultan controvertidos. La AngII, a través de los receptores AT1, es un activador fundamental del complejo NOX, una de las principales fuentes de EOR (Ma y col., 2017a), cuya producción exacerbada juega un reconocido papel en procesos patogénicos y de muerte celular. Sin embargo, estudios previos han demostrado que las EOR generadas por la activación de NOX contribuyen a la autorrenovación (Topchiy y col., 2013) y a la determinación del linaje de las NSCs (Parga y col., 2010), y que los receptores AT1 desempeñan un papel relevante en la proliferación de células progenitoras (Rodgers y col., 2000). Otras investigaciones apuntan a que el bloqueo de los receptores AT1 con distintos antagonistas como candesartán, valsartán o losartán favorece la proliferación y la neurogénesis en el giro dentado del hipocampo (Bhat y col., 2018; Drews y col., 2019; Ping y col., 2014), mientras que otros estudios señalan que el tratamiento con antagonistas de AT1 o con inhibidores de ECA disminuye la neurogénesis (Jenrow y col., 2010;

Klempin y col., 2018; Koyama y col., 2018; Mukuda y col., 2014), o incluso que el bloqueo de los receptores AT1 no afecta a la neurogénesis hipocampal (Conner y col., 2011; Wakai y col., 2011). También existen datos contradictorios acerca de los efectos que los receptores AT1 ejercen sobre los receptores AT2. La activación de los receptores AT2 con su agonista específico CGP induce un incremento en el número de células BrdU-positivas en modelos animales de lesión traumática (Umschweif y col., 2014a, b) y en la proliferación de NSCs derivadas del hipocampo *in vitro* (Chao y col., 2013). Sin embargo, también se han descrito efectos antiproliferativos de los receptores AT2 (Meffert y col., 1996; Suzuki y col., 2002; Wolf y col., 2002).

Nuestros resultados sugieren que la mayoría de los datos contradictorios mencionados anteriormente pueden explicarse gracias a las interacciones complejas existentes entre los receptores AT1 y AT2 o como resultado de posibles diferencias en la ratio AT1/AT2 entre diferentes regiones cerebrales y distintas especies animales. En animales KO-AT2, que muestran una expresión incrementada de AT1 en la V-SVZ, observamos un notable descenso en la proliferación y en la generación de neuroblastos, que se revierte mediante el tratamiento con el antagonista de receptores AT1 candesartán, lo que sugiere que un descenso en la actividad de AT2 y un incremento en la actividad de AT1 inhiben la proliferación y la generación de neuroblastos. Esta hipótesis se confirmó cuando, al tratar ratones WT con el agonista de AT2 C21, observamos un incremento significativo de la proliferación y la generación de neuroblastos. Cabe destacar que en ratones KO-AT1 y en ratones WT tratados con el antagonista de AT1 candesartán que, además, regula a la baja la expresión de receptores AT2, no se aprecian diferencias significativas ni en la proliferación ni en la generación de neuroblastos con respecto a animales WT control. Una inhibición basal de la proliferación mediada por los receptores AT1, sin ningún efecto directo sobre los receptores AT2 (es decir, más allá de la inhibición de la actividad de AT1), debería inducir un incremento significativo de la proliferación en ratones KO-AT1 con respecto a ratones WT. Sin embargo, el que se obtengan niveles similares de proliferación en ambos grupos podría explicarse por un efecto directo adicional de los receptores AT2 sobre la proliferación, inhibida por la disminución de la

expresión de los receptores AT2 observada en ratones KO-AT1 y en animales WT tratados con candesartán, tanto *in vivo* como en neuroesferas. En resumen, tanto la regulación a la baja de los receptores AT1 como la regulación al alza de los receptores AT2 contribuyen al incremento de la proliferación y de la generación de neuroblastos en la V-SVZ.

Los resultados obtenidos en cultivos de neuroesferas son consistentes con las observaciones en ratones. La activación de los receptores AT2 conduce a un incremento en la generación de neuroesferas y su inhibición reduce la generación de esferas. El bloqueo de los receptores AT1 no induce cambios significativos en estos cultivos, ya que reduce los niveles de expresión de AT2 tal y como se observa en neuroesferas obtenidas de la V-SVZ de animales KO-AT1 y en neuroesferas obtenidas de la V-SVZ de animales WT y tratadas con los antagonistas de AT1 ZD y candesartán. Además, observamos que la generación de neuroesferas se reduce cuando son estimuladas previamente con agonistas de los receptores AT2, lo que sugiere una posible pérdida de capacidad de autorrenovación.

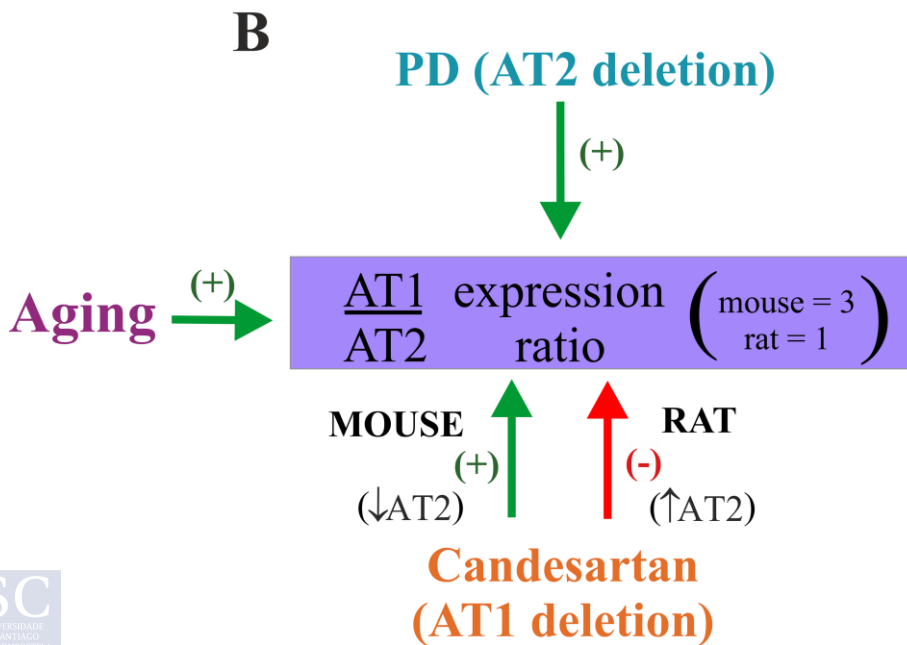
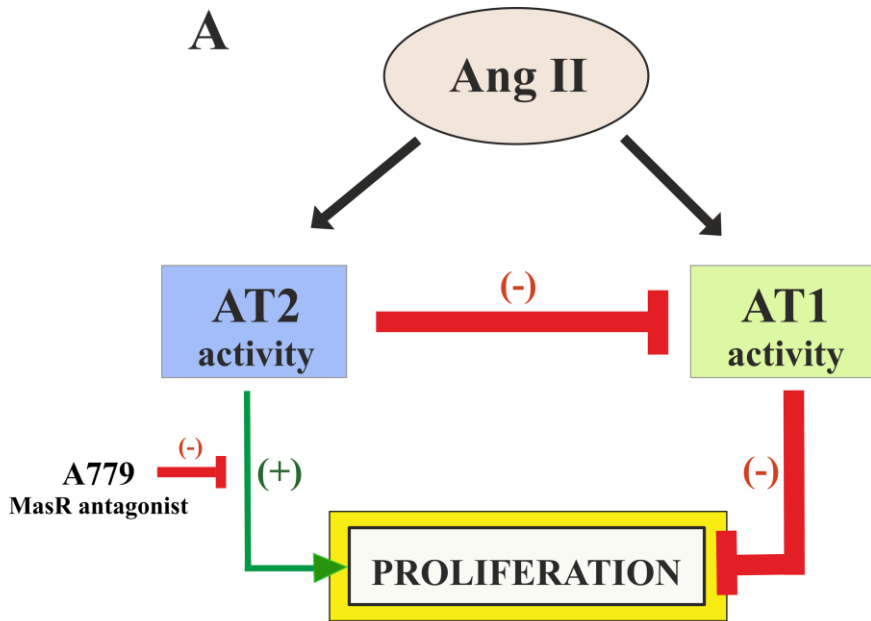
En la V-SVZ de rata y en neuroesferas de ratón derivadas de animales envejecidos observamos un descenso significativo de la proliferación y de la neurogénesis, que se revierte tras el tratamiento con agonistas de AT2 o con antagonistas de AT1, y que es exacerbado tras el tratamiento con antagonistas de AT2. Estos resultados concuerdan con los mecanismos anteriormente mencionados, ya que observamos un incremento en la ratio de expresión AT1/AT2 en la V-SVZ de animales envejecidos en comparación con controles jóvenes, tal y como se ha descrito previamente en distintos tipos de células (Cassis y col., 2010) y, particularmente, en el estriado y en la sustancia negra (Rodríguez-Pérez y col., 2012; Villar-Cheda y col., 2012b, 2014). Nuestros resultados coinciden con estudios previos en los que se demuestra que la neurogénesis continúa a lo largo de la vida, aunque su tasa disminuye con la edad en roedores y en primates no humanos (Galvan y Jin, 2007) y con investigaciones en las que se observa una reducción progresiva de la producción de progenitores a lo largo de la vida adulta de ratones y un mantenimiento de los *pools* de NSCs (Conover y Shook, 2011; Daynac y col., 2016; Soriano-Cantón y col.,

2015). Además, nuestros resultados revelan que la reducción en la proliferación y en la generación de neuroblastos y de neurosféricas observada en la V-SVZ de animales envejecidos puede contrarrestarse manipulando el SRA local, lo que sugiere que las NSCs envejecidas retienen capacidad de proliferación y diferenciación tras la estimulación adecuada, lo que se corresponde con investigaciones recientes (Kalamakis y col., 2019).

En cultivos de neurosféricas también investigamos el posible papel del eje Ang(1-7)/MasR. Para ello, administramos Ang(1-7) a cultivos de neurosféricas obtenidos de la V-SVZ de ratones jóvenes y envejecidos, en los que no detectamos cambios significativos. Sin embargo, el tratamiento de los cultivos con el antagonista de MasR A779 bloquea el incremento del número de esferas inducido por la activación de los receptores AT2. Esto sugiere la existencia de una dependencia funcional entre los receptores AT2 y Mas para la generación de esferas mediada por AT2. De hecho, numerosas evidencias demuestran que ambos receptores colocalizan, forman heterodímeros e interactúan funcionalmente en distintas células y condiciones experimentales (Ali y col., 2016; Klempin y col., 2018; Leonhardt y col., 2017; Patel y col., 2017). En nuestro laboratorio, hemos demostrado recientemente que los ratones KO-AT2 jóvenes muestran una expresión disminuida de MasR en la sustancia negra y en el estriado, lo que podría contribuir a la reducción en la proliferación y en la neurogénesis observada en la V-SVZ de ratones KO-AT2 (Rodríguez-Pérez y col., 2020). Aunque los receptores del SRA se han asociado con distintas respuestas celulares y fisiológicas, su papel en la regulación de la neurogénesis adulta es complejo, tal y como revelan las intrincadas interacciones entre los receptores AT1, AT2 y Mas, posiblemente existentes tanto en situaciones fisiológicas como patológicas.

En resumen, nuestros datos revelan que el SRA juega un papel determinante en la regulación de la neurogénesis adulta tanto en cerebros jóvenes como envejecidos. La AngII, a través de sus receptores AT1, establece una inhibición basal de la proliferación de la V-SVZ que es antagonizada por los receptores AT2. Además, la actividad de los receptores AT2 podría estar ejerciendo un efecto estimulante directo adicional sobre la proliferación. La expresión y la

ratio AT1/AT2 se ven afectadas por el envejecimiento, que induce un descenso de la neurogénesis. Sin embargo, la expresión de los receptores AT1 y AT2 y la neurogénesis podrían modularse con terapias basadas en el uso de agonistas y antagonistas de estos receptores. Además, el SRA podría estar interactuando con otros moduladores de la neurogénesis. Está bien establecido que la dopamina modula la neurogénesis en la V-SVZ (O’Keeffe y col., 2009a, b), y se han descrito interacciones contrarreguladoras entre los receptores de AngII y los receptores de dopamina en el estriado (Domínguez-Meijide y col., 2017; Villar-Cheda y col., 2012b) y en otros tejidos (Khan y col., 2008; Zeng y col., 2006). Por tanto, parece plausible que la dopamina regule la proliferación y la neurogénesis modulando la actividad del SRA. Nuestros resultados también destacan los potenciales efectos beneficiosos de los moduladores del SRA sobre la neurogénesis. Sin embargo, la expresión y la ratio de los receptores AT1 y AT2 y su respuesta a fármacos puede variar entre especies. Por ello, es necesario estudiar en mayor profundidad los efectos de la manipulación del SRA cerebral en humanos y en condiciones patológicas asociadas al deterioro de la neurogénesis, con el objetivo de proporcionar una base sólida para el uso terapéutico de la manipulación del SRA en tales enfermedades.



**Figura 34. (A) Modelo del papel de los receptores de angiotensina II (AngII) AT1 y AT2 sobre la proliferación de las células de la zona ventricular-subventricular (V-SVZ).** La AngII, a través de sus receptores AT1, establece una inhibición basal de la proliferación que es antagonizada por los receptores AT2, estableciéndose un nivel basal de regulación de la neurogénesis dependiente de AngII. Además, la actividad de los receptores AT2 podría estar ejerciendo un efecto estimulador directo sobre la proliferación, que es modulado por los receptores Mas (MasR). **(B)** El envejecimiento, el candesartán (o la delección de AT1) y el PD123319 (o la delección de AT2) regulan la ratio de expresión AT1/AT2. El envejecimiento y el PD1233219 (o la delección de AT2) incrementan la ratio AT1/AT2 y el candesartán (o la delección de AT1) incrementa la ratio en ratones (es decir, disminuye la expresión de AT2) y la reduce en ratas (es decir, aumenta la expresión de AT2). Candesartán = antagonista de receptor AT1; PD123319 = antagonista de receptor AT2.

### **5.1.2. La dopamina regula la neurogénesis adulta en la V-SVZ a través de interacciones entre los receptores de dopamina D3 y los receptores AT2**

Diversos estudios han demostrado la presencia de receptores de dopamina en NPCs y neuroblastos de la V-SVZ y que las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra envían sus axones a la V-SVZ (Baker y col., 2004; Freundlieb y col., 2006; Höglinger y col., 2004), lo que sugiere que la dopamina ejerce acciones sobre las células de la V-SVZ (Höglinger y col., 2004; Kippin y col., 2005). Nuestros resultados confirman un incremento notable de la generación de neurosféricas derivadas de la V-SVZ tras el tratamiento con dopamina (O'Keeffe y col., 2009b). En línea con estudios previos (Höglinger y col., 2004; Kippin y col., 2005), el tratamiento con el agonista de receptores dopaminérgicos de tipo D1 SKF no tiene ningún efecto sobre la generación de neurosféricas, mientras que la estimulación de receptores de tipo D2 con quinpirol incrementa la generación de neurosféricas, lo que indica que la dopamina actúa a través de los receptores de la familia D2. Sin embargo, otros trabajos reportan que el tratamiento con dopamina o con agonistas de los receptores D2/D3 no induce cambios significativos en la proliferación celular de las NPCs (Milosevic y col., 2007) o incluso que inhibe la proliferación de neurosféricas derivadas de la V-SVZ (Kippin y col., 2005). Estos resultados contradictorios

podrían explicarse por el uso de diferentes dosis de dopamina y de agonistas dopaminérgicos de la familia D2 (Kippin y col., 2005).

El efecto de la estimulación de los receptores D2 con quinpirol se replicó mediante el tratamiento con el agonista selectivo de receptores D3 7-OH-DPAT (Coronas y col., 2004; Kim y col., 2010; Lao y col., 2013). El receptor de dopamina D3 se expresa de forma robusta en las NSCs y NPCs de la V-SVZ de roedores, pero no en neuroblastos adultos. Por tanto, la señalización dopaminérgica a través de los receptores D3 impulsa la proliferación en la V-SVZ de roedores, especialmente de los progenitores con capacidad transitoria de amplificación (Kim y col., 2010). La estimulación de los receptores D3 disminuye la actividad adenilato ciclasa y los niveles de AMPc y regula la transducción de la señal mediada por Akt, MAPK y PKA. De hecho, estudios previos han demostrado que el tratamiento con agonistas del receptor D3 incrementa la fosforilación de Akt y de ERK1/2 en cultivos de neuroesferas derivados de la V-SVZ y acelera el ciclo celular gracias a la regulación al alza de la ciclina D1, que constituye el punto de control de la fase G1 a la fase S y promueve la proliferación celular (Lao y col., 2013; Ohtani y col., 2003). Sin embargo, el uso de distintos protocolos y el empleo de diferentes agonistas y antagonistas dopaminérgicos, con un amplio rango de propiedades y afinidades farmacológicas y con respuestas que pueden diferir entre especies, también han propiciado controversia en los resultados obtenidos (Baker y col., 2005; Young y col., 2011). Nuestros resultados muestran también una reducción en el número de esferas terciarias en los cultivos derivados de neuroesferas previamente tratadas con el agonista de receptores D2 quinpirol. Estos datos sugieren que la activación de los receptores D2 promueve la división de las células formadoras de esferas, lo que da lugar a un aumento en el número de neuroesferas. Sin embargo, estas neuroesferas sufren divisiones asimétricas, reduciendo su capacidad clonogénica (es decir, pierden capacidad de autorrenovación y se reduce su capacidad para generar nuevas esferas), lo que resulta en una reducción del número de neuroesferas terciarias. Sin embargo, este efecto se revierte en neuroesferas cuaternarias, lo que sugiere que esta pérdida de clonogenicidad podría ser temporal. Además, también observamos en ensayos de diferenciación que el tratamiento con

quinpirol promueve la diferenciación hacia el linaje astrocítico. Estos resultados concuerdan con estudios previos en los que el tratamiento de neurosféricas con pramipexol, un agonista de receptores dopaminérgicos de la familia D2 con mayor afinidad por los receptores D3 que por los receptores D2, acelera la maduración astrocítica e induce efectos neurogénicos (Merlo y col., 2011; O’Keeffe y col., 2009b).

Distintas investigaciones han descrito la existencia de interacciones contrarreguladoras entre los receptores de AngII y la dopamina en órganos periféricos (Garrido-Gil y col., 2018; Gildea, 2009) y en el cerebro (Domínguez-Meijide y col., 2017; Labandeira-García y col., 2013; Villar-Cheda y col., 2010). En la presente tesis, proporcionamos evidencias de la interacción entre los receptores dopaminérgicos y el SRA y de que esta actúa como un regulador de la neurogénesis en la V-SVZ adulta. De hecho, nuestros resultados muestran que la activación de receptores dopaminérgicos de tipo D1 en cultivos de neurosféricas regula a la baja la expresión de AT1, mientras que la activación de receptores de tipo D2 incrementa la expresión de receptores AT2. En línea con lo anterior, la activación de los receptores AT2 incrementa los niveles de expresión de los receptores D1 y la activación de receptores AT1 disminuye los niveles de expresión de receptores D2, y estos efectos se revierten bloqueando los receptores de AngII AT2 con PD y los receptores de AT1 con candesartán, respectivamente. Sin embargo, el tratamiento con candesartán no incrementa, por sí solo, los niveles de receptores D2, posiblemente a consecuencia del efecto represor que ejerce sobre la expresión de los receptores AT2 (Figura 34B). Además, observamos que el bloqueo de los receptores AT2 con PD inhibe la expresión de los receptores D1, posiblemente como parte de un mecanismo compensatorio que responde a la caída de los niveles de expresión de D2. Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos en ratones KO-AT2, que muestran un descenso drástico en los niveles de expresión de D2 y, en menor medida, de D1. Por tanto, nuestros datos sustentan la existencia de interacciones mutuas entre los receptores de dopamina y de AngII en la V-SVZ de ratones.

Por otra parte, y tal como se ha mencionado en el apartado anterior, nuestros resultados demuestran que la AngII, a través de sus receptores

AT2, incrementa la proliferación en la V-SVZ y que su efecto depende parcialmente del antagonismo que los receptores AT2 ejercen sobre la expresión de AT1, quien restringe constitutivamente la proliferación en la V-SVZ (Figura 34A). En la presente tesis, hemos mostrado que la activación de los receptores de tipo D2 incrementa la proliferación. Sin embargo, el aumento en la generación de neurosféricas inducido por D2 puede bloquearse mediante el tratamiento con el antagonista del receptor AT2 PD, lo que sugiere que la generación de neurosféricas promovida por D2 está mediada por los receptores AT2. La dependencia funcional entre los receptores D2 y AT2 se confirma cuando al tratar neurosféricas derivadas de ratones KO-AT2 con quinpirol, la activación de D2 es incapaz de aumentar el número de neurosféricas en cultivo. Estos datos indican de nuevo que la generación de neurosféricas promovida por la activación de D2 requiere de receptores de AngII AT2 funcionales. Puesto que el antagonista de AT2 PD disminuye el número de neurosféricas generadas *in vitro*, parece razonable esperar una reducción en el número de neurosféricas tras el cotratamiento de los cultivos derivados de la V-SVZ con PD y SKF. Sin embargo, la activación de los receptores D1 con SKF bloquea la reducción en el número de neurosféricas inducida por el antagonista de AT2 PD. El incremento en los niveles de expresión de los receptores AT1 observado tras el tratamiento con PD (Figura 34B) se contrarresta con el tratamiento con SKF, que reduce los niveles de expresión de AT1. Curiosamente, el tratamiento con raclopride induce una reducción en el número de neurosféricas, incluso en ausencia de dopamina, ya que el medio de cultivo no contiene dopamina. Estos cultivos muestran, además, una reducción en los niveles de expresión de AT2, lo que podría contribuir al descenso en la generación de neurosféricas observado. Estudios previos también han demostrado que los receptores D2 están activos de forma constitutiva (Kozell y Neve, 1997; Zhang y col., 2014), lo que podría verse afectado por el tratamiento con raclopride que, a su vez, modificaría los niveles de expresión de AT2 o los procesos de dimerización entre D2 y AT2, aunque también podrían estar implicados otros mecanismos. En riñón, diversas investigaciones han demostrado que las interacciones entre los receptores de AngII y los receptores dopaminérgicos pueden estar mediadas por una

transregulación directa entre D1 y AT2, en la que la activación de GαS mediada por D1 estimula la adenilato ciclasa (Felder y Jose, 2006; Jose y col., 2010) y promueve el reclutamiento de receptores AT2 hacia la membrana plasmática apical (Gildea y col., 2019). Además, también se ha mostrado que los receptores D1 y AT2 pueden formar heterodímeros y cooperar funcionalmente en células del túbulo proximal renal (Gildea y col., 2012). En línea con estos hallazgos, hemos demostrado recientemente en nuestro laboratorio la dimerización de D2 y AT1 en el estriado (Martínez-Pinilla y col., 2015). En cualquier caso, se requieren estudios que, en el futuro, contribuyan a aclarar las interacciones moleculares entre dopamina y SRA en la V-SVZ.

En línea con nuestros resultados *in vivo*, diferentes estudios concluyen que la dopamina regula positivamente la proliferación celular y que esta se reduce en la V-SVZ de modelos animales de EP (Baker y col., 2005; Freundlieb y col., 2006; Höglinger y col., 2004; O'Keefe y col., 2009a, b; Winner y col., 2006). La estimulación de la neurogénesis de la V-SVZ inducida por dopamina está mediada, en parte, por mecanismos dependientes de EGF (O'Keefe y col., 2009b). Sin embargo, otros estudios sugieren que la depleción dopaminérgica incrementa la proliferación celular en la V-SVZ (Aponso y col., 2008; Liu y col., 2006; Peng y col., 2008; Peng y Andersen, 2011), o no tiene efectos sobre ella (Marxreiter y col., 2009; van den Berge y col., 2011). En los estudios que describen una disminución de la proliferación celular en la V-SVZ tras la depleción dopaminérgica, esta cursa bien con una reducción drástica de los neuroblastos (L'Episcopo y col., 2012) o con la recuperación de neuroblastos en este nicho, como un proceso de autorreparación (He y Nakayama, 2015). Aunque son pocos los estudios que han abordado el análisis *post mortem* de la neurogénesis adulta en la V-SVZ de pacientes de EP, los resultados obtenidos muestran una reducción significativa en el número de células proliferativas (Höglinger y col., 2004) y de células EGFR-positivas (O'Keefe y col., 2009b) en la V-SVZ de cerebros con EP con respecto a individuos sanos. Sin embargo, estos resultados han sido cuestionados por van den Berge y colaboradores (van den Berge y col., 2011), quienes han observado que la proliferación en la V-SVZ no cambia en pacientes con EP en comparación con individuos sanos de la misma

edad. Estos resultados aparentemente contradictorios podrían explicarse por las diferentes metodologías utilizadas, por la variabilidad en el tiempo transcurrido desde la muerte del paciente y, más probablemente, por diferentes niveles de dopamina, que pueden afectar a la neurogénesis (Lamm y col., 2014; Marxreiter y col., 2013). Además, tras la depleción dopaminérgica observamos un incremento en el número de células GFAP-positivas de nueva generación, lo que sugiere un efecto sobre las NSCs como posible mecanismo compensatorio. Tras el tratamiento con candesartán o con C21, también observamos una reducción en la proliferación de los progenitores (es decir, células Mash1-positivas), acompañada de un incremento en el número de neuroblastos, lo que sugiere la diferenciación de las NPCs.

Estudios previos sugieren que el descenso de la proliferación que sigue a la depleción dopaminérgica *in vivo* puede revertirse mediante la estimulación dopaminérgica (O'Keeffe y col., 2009a; Winner y col., 2009), particularmente a través de los receptores D3 (Van Kampen y Eckman, 2006). Está bien establecido que los implantes de tejido mesencefálico ventral proporcionan una fuente local de estimulación dopaminérgica continuada y, por tanto, ejercen un efecto normalizador sobre los ganglios basales desregulados por la EP (Gilmour y col., 2011). De hecho, nuestros resultados muestran que las ratas que recibieron un trasplante con precursores dopaminérgicos experimentan una mejora significativa de la función motora. Un estudio reciente ha demostrado que el trasplante intraestriatal de NSCs humanas en ratones parkinsonianos restaura el proteoma de la V-SVZ (Zuo y col., 2017). En la presente tesis, hemos observado que el trasplante intraestriatal de precursores dopaminérgicos incrementa el número de células proliferativas en la región dorsolateral y la generación de neuroblastos en ambos dominios de la V-SVZ. Los implantes dopaminérgicos funcionales inducen una reducción en la proliferación de las NPCs (células Mash1-positivas) asociada a un incremento en el número de neuroblastos, sin afectar a su proliferación, lo que sugiere que la dopamina y otras moléculas producidas por los implantes favorecerían la diferenciación de las NPCs, además de la probable migración de parte de los neuroblastos hacia el BO durante el período de supervivencia postrasplante. Las NSCs ubicadas en regiones geográficamente

distintas del nicho generan diferentes tipos de neuronas en el BO (O’Keefe y col., 2009a). Las NSCs dorsales dan lugar tanto a neuronas granulares externas como a neuronas periglomerulares, mientras que las neuronas granulares internas derivan de las NSCs de la zona ventral (es decir, estriatal/ventral) (Chaker y col., 2016). La mayoría de las neuronas de la capa granular y glomerular maduran para dar lugar a interneuronas GABAérgicas o dopaminérgicas. Sin embargo, un pequeño porcentaje de interneuronas terminan en la capa plexiforme externa, donde se diferencian a neuronas glutamatérgicas yuxtglomerulares (Merkle y col., 2014). Esta heterogeneidad regional es en parte intrínseca a las células (Lim y Álvarez-Buylla, 2014) y culmina en una respuesta/expansión selectiva de subconjuntos regionales de NSCs y NPCs. De hecho, las NSCs de la V-SVZ dorsal, pero no las de la V-SVZ ventral, generan, entre otras, células TH-positivas. Además, las regiones dorsolateral y estriatal/ventral de la V-SVZ reciben innervación dopaminérgica de distinto origen (Baker y col., 2004; Freundlieb y col., 2006; Höglinger y col., 2004). Por tanto, este nicho es susceptible de verse afectado de forma diferente por cambios regionales específicos en la señalización dopaminérgica (Höglinger y col., 2014). Curiosamente, los animales que recibieron un trasplante simulado muestran un incremento en el número de células proliferativas y neuroblastos en la V-SVZ estriatal/ventral. Las NSCs y NPCs de la V-SVZ son altamente sensibles a los estímulos ambientales y podrían responder a la liberación no específica de factores tróficos, inducida por la cirugía del implante simulado (Hattiangady y col., 2007). Sin embargo, cuando empleamos  $\beta$ -III-tubulina como marcador neurogénico, el incremento de neuroblastos observado en la región estriatal/ventral de la V-SVZ de animales que recibieron el trasplante simulado no se replica. Esto podría deberse a que ambos marcadores no son completamente equivalentes (Cheng y col., 2009; Gatt y col., 2019; Wang y col., 2011).

En modelos de roedores de EP la pérdida neuronal dopaminérgica se asocia con un incremento en los niveles de expresión de los receptores de AngII AT1 y de NOX (Labandeira-García y col., 2014; Mertens y col., 2010; Villar-Cheda y col., 2010, 2012a), que es una fuente primaria de EOR. La generación exacerbada de EOR juega un

papel crítico en la muerte celular y la patogénesis de la enfermedad. Sin embargo, también se ha demostrado que las EOR derivadas de NOX contribuyen a la autorrenovación (Topchiy y col., 2013) y a la determinación del linaje de las NSCs (Parga y col., 2010). Hoy en día, el papel de los receptores AT1 y AT2 en la proliferación celular de progenitores está en debate. Algunos estudios describen un efecto proproliferativo de los receptores AT1 (Klempin y col., 2018; Koyama y col., 2018; Mukuda y col., 2014) o de los receptores AT2 (Umschweif y col., 2014a, b), mientras que otros estudios demuestran efectos antiproliferativos de ambos receptores (Bhat y col., 2018; Drews y col., 2019; Meffert y col., 1996). En la presente tesis, hemos demostrado que los receptores AT1 y AT2 juegan un papel fundamental en la proliferación y en la generación de neuroblastos en la V-SVZ adulta y envejecida (Figura 34). Además, nuestros resultados muestran que la activación de los receptores AT2 con C21 o la inhibición de los receptores AT1 con candesartán restaura la proliferación y la generación de neuroblastos a niveles control, independientemente de la región de la V-SVZ estudiada. Estos datos apoyan la idea de que la interacción entre dopamina y SRA tiene un papel en el control de la neurogénesis adulta en la V-SVZ y sugieren que la mayoría de los resultados contradictorios mencionados anteriormente pueden explicarse por interacciones complejas entre estos sistemas y posibles diferencias entre las ratios D1/D2 y AT1/AT2.

En conjunto, nuestros resultados ponen de manifiesto el papel fundamental de los receptores dopaminérgicos de tipo D2, particularmente del subtipo D3, en la neurogénesis adulta en la V-SVZ y que estos efectos están mediados por receptores AT2. El sistema dopaminérgico y el SRA se regulan mutuamente y su interacción recíproca modula la neurogénesis adulta en la V-SVZ. La disminución de la neurogénesis observada tras la denervación dopaminérgica se contrarresta mediante manipulaciones del SRA local, lo que sugiere que la dopamina regula la proliferación y la generación de neuroblastos a través de los receptores del SRA. Esto indica que los moduladores de SRA podrían tener efectos potencialmente beneficiosos sobre la neurogénesis tras la depleción dopaminérgica y, posiblemente, en EP.

## **5.2. MECANISMOS IMPLICADOS EN LA SUPERVIVENCIA DE PRECURSORES DOPAMINÉRGICOS EN MODELOS ANIMALES DE EP**

### **5.2.1. La manipulación del SRA favorece la funcionalidad y supervivencia de implantes dopaminérgicos en modelos animales de EP**

Aunque la terapia celular como estrategia terapéutica alternativa para la EP ha mostrado resultados prometedores, la escasez de tejido embrionario/fetal y/o las dificultades para generar células dopaminérgicas a partir de fuentes celulares alternativas, como las derivadas de hESCs o hiPSCs, limitan su salto a la clínica. Otro problema importante asociado al trasplante de células dopaminérgicas, independientemente de su origen, lo representa su escasa tasa de supervivencia y su reducida capacidad de integración una vez implantadas en el cerebro del hospedador (Björklund y Lindvall, 2017; Jang y col., 2020). Por ello, numerosos estudios se han centrado en identificar y abordar los factores responsables de la elevada muerte dopaminérgica que se produce tanto durante el trasplante como los primeros días después del mismo, cuando se produce la mayor parte de muerte celular (Emgård y col., 2003; Sortwell y col., 2000). Entre los factores responsables de la degeneración dopaminérgica destacan los procesos neuroinflamatorios asociados al implante (Piquet y col., 2012; Winkler y col., 2005). Estudios previos de nuestro grupo han puesto de manifiesto el papel del SRA cerebral en el proceso de vulnerabilidad y neurodegeneración dopaminérgica (Borrajo y col., 2014a; Labandeira-García y col., 2014; Rodríguez-Pallares y col., 2008, 2012b; Villar-Cheda y col., 2010, 2012a, b), lo que nos ha llevado a proponer la manipulación del SRA como posible estrategia neuroprotectora.

Nuestros resultados muestran que el tratamiento del hospedador con el antagonista de receptores AT1 candesartán favorece la recuperación motora, así como la supervivencia y la capacidad de reinervación de los precursores mesencefálicos implantados en modelos animales de EP. Numerosas evidencias muestran que la AngII, a través de los receptores AT1, desencadena respuestas inflamatorias y estrés oxidativo y que, mediante la activación de NOX, induce la liberación de altas cantidades de EOR por parte de células inflamatorias

(Borrajó y col., 2014b; Villar-Cheda y col., 2012a). Estudios previos muestran que el tratamiento con candesartán bloquea la activación del eje proinflamatorio AngII/AT1/NOX-2 microglial (Joglar y col., 2009; Rodríguez-Pallares y col., 2008), reduciendo la respuesta inflamatoria. Esta reducción en la respuesta inflamatoria podría explicar, al menos en parte, la mayor supervivencia dopaminérgica observada en los animales tratados con candesartán 3 meses después del trasplante. Por otro lado, estudios previos muestran que el tratamiento con candesartán incrementa los niveles de expresión de AT2 en el cerebro de ratas (García-Garrote y col., 2019; Rivas-Santisteban y col., 2020). Además, la AngII, a través de los receptores AT2, especialmente abundantes durante el desarrollo, favorece la diferenciación dopaminérgica de precursores mesencefálicos y el crecimiento neurítico (Rodríguez-Pallares y col., 2004), lo que podría explicar el incremento tanto en el número de células TH-ir como en la densidad de reinervación estriatal observado en los animales tratados con candesartán.

Por tanto, nuestros resultados sugieren que manipulaciones del SRA podrían ejercer efectos beneficiosos sobre la supervivencia y funcionalidad de las células dopaminérgicas en modelos animales de EP. Sin embargo, son necesarios nuevos estudios para profundizar en el conocimiento del posible papel del SRA en ensayos de terapia celular, así como estudios enfocados en otros factores que podrían limitar la eficacia de los trasplantes, como la escasa vascularización o la falta de factores tróficos, entre otros, en los que este y otros sistemas podrían tener un papel relevante.

### **5.2.2. La AngII induce estrés oxidativo y regula al alza la señalización neuroprotectora mediada por las vías NRF2 y KLF9 en neuronas dopaminérgicas**

Como hemos mencionado, el SRA modula la supervivencia de precursores dopaminérgicos implantados en el estriado y su principal efector, la AngII, tiene un papel relevante en procesos vinculados con el estrés oxidativo y la supervivencia dopaminérgica (Costa-Besada y col., 2018; Villar-Cheda y col., 2017). Por ello, hemos profundizado en el papel de la AngII como inductor de estrés oxidativo y la implicación de *Nrf2* como potencial candidato a participar en las adaptaciones

horméticas desencadenadas por ella en procesos antioxidantes en neuronas dopaminérgicas. Nuestros resultados indican que la AngII activa vías de señalización que inducen la neuroprotección y favorecen la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas. En concreto, la AngII regula, entre otros, la expresión de factores de transcripción como *Klf9*, que reduce el estrés oxidativo *in vitro*.

En estudios previos, hemos demostrado que la AngII exacerba el efecto de distintas neurotoxinas y favorece la degeneración de las neuronas dopaminérgicas en cultivos primarios de mesencéfalo e *in vivo* (Rey y col., 2007; Rodríguez-Pallares y col., 2008). En estos cultivos, es decir, cultivos mixtos que contienen neuronas y células de la glía, los niveles elevados de EOR que derivan del eje AT1/NOX-2 microglial juegan un papel relevante en la muerte neuronal (Joglar y col., 2009; Rodríguez-Pallares y col., 2008; Rodríguez-Pérez y col., 2015a). Las neuronas dopaminérgicas son especialmente vulnerables al estrés oxidativo y la AngII induce estrés o daño en las neuronas, desencadenando un evento apoptótico inicial que, a su vez, incrementa la activación microglial (Labandeira-García y col., 2013, 2014). Nuestros resultados muestran que la AngII puede también inducir muerte celular en diversas líneas celulares neuronales (es decir, en ausencia de células de la glía). De hecho, se ha demostrado que la AngII puede inducir apoptosis en la línea neuronal CATH.a (Zhao y col., 2015), y que las células dopaminérgicas transfectadas con AT1 presentan una mayor muerte celular en condiciones control (Valenzuela y col., 2016). La mayor vulnerabilidad de la línea dopaminérgica Mes23.5 observada en este trabajo y en estudios previos podría vincularse también a una reducción en la actividad del complejo I, una característica que estas células comparten con algunos pacientes de EP (Swerdlow, 2012). En comparación con la línea Mes23.5, la línea dopaminérgica N27 es menos vulnerable al estrés oxidativo inducido por AngII. Nuestros resultados sugieren que una reducción en la ratio AT1/AT2 con respecto a la línea Mes23.5 (datos no mostrados) podría explicar los efectos observados. La estimulación de AT2, por su parte, es capaz de inhibir la activación de la NADPH y reducir el estrés oxidativo (Labandeira-García y col., 2017).

Nuestros datos indican que la AngII incrementa los niveles de EOR y que la producción de superóxido es responsable, al menos en parte, de este efecto, ya que la sonda de EOR DHE, sensible a la generación de superóxido, proporciona resultados similares. La activación del eje AT1/NOX, mediada por AngII, puede ser responsable del incremento en la generación de EOR y en la muerte celular observada en nuestros cultivos. Estudios previos en nuestro laboratorio han mostrado la expresión de los receptores AT1 en las neuronas y las células gliales del estriado y la sustancia negra de ratones, ratas, monos y seres humanos (Garrido-Gil y col., 2013, 2017b; Joglar y col., 2009; Valenzuela y col., 2010) y en cultivos primarios (Rodríguez-Pallares y col., 2008), donde la AngII actúa como el principal activador de NOX. Las NOX constituyen la principal fuente de EOR y se han propuesto como reguladores clave en la EP (Bedard y Krause, 2007), ya que la expresión de NOX se incrementa en pacientes de EP con respecto a individuos sanos (Belarbi y col., 2017). La isoforma NOX-2 predomina en el cerebro y se localiza en la membrana plasmática de neuronas, astrocitos y microglía (Rodríguez-Pallares y col., 2007, 2008), mientras que las isoformas NOX-1 y NOX-4 se localizan en el citoplasma de neuronas. En nuestro grupo de investigación, hemos demostrado que los núcleos aislados de la sustancia negra de rata están enriquecidos en AT1 y NOX-4 (Villar-Cheda y col., 2017), mientras que los receptores AT1 acoplados a NOX-4 son menos prevalentes en las mitocondrias (Valenzuela y col., 2016), lo que apoya la idea de una regulación compleja de las vías de señalización entre distintos compartimentos celulares (Bernard y col., 2017; Kozieł y col., 2013). Estudios previos han confirmado la presencia de los componentes de NOX en células N27 (Anantharam y col., 2007), SH-SY5Y (Nikolova y col., 2005) y Mes23.5 (Díaz-Ruiz y col., 2015), lo que apunta a la implicación del eje AT1/NOX en la generación de EOR en nuestros estudios.

El estrés oxidativo activa *Nrf2*, un factor de transcripción que regula al alza diversos genes antioxidantes para mantener la homeostasis redox celular. De esta forma, la generación de EOR inducida por la activación del eje AT1/NOX induce la activación de *Nrf2*. Además, la activación del receptor AT1 puede favorecer la activación de la vía *Nrf2* mediante mecanismos alternativos. La AngII,

a través de los receptores AT1, puede activar las quinasas ERK1/2 (Huang y col., 1996) y PKC (Huang y col., 2000), lo que conduce a la fosforilación de *Nrf2* y promueve la disociación de su inhibidor KEAP1 y la localización nuclear de *Nrf2* (Xu y col., 2006). Además, los componentes de NOX pueden interactuar directamente con *Nrf2*/KEAP1 (Ha Kim y col., 2017) e inducir la expresión de los genes antioxidantes regulados por este factor de transcripción.

Estudios previos han sugerido que *Klf9* es inducido por *Nrf2* y favorece la muerte celular inducida por estrés oxidativo en diversos tipos de células en cultivo (Gu y col., 2015; Mannava y col., 2012; Zucker y col., 2014). Sin embargo, otros estudios sugieren un efecto beneficioso de la activación de *Klf9* sobre la diferenciación y maduración de células neuronales (Denver y col., 1999). Además, *Klf9* es necesario para el desarrollo y supervivencia de las neuronas de Purkinje (Lebrun y col., 2013), y artículos recientes incluyen la expresión de *Klf9* como parte de los sistemas de defensa antioxidante inducidos por *Nrf2* en el hígado (Yang y col., 2016, 2017) y por hipoxia y la hormona tiroidea en el cerebro (Li y col., 2017a). Nuestros resultados demuestran que *Klf9* se regula al alza tras el tratamiento con AngII en la línea Mes23.5 y en otras condiciones de estrés oxidativo (datos no mostrados) en las líneas celulares estudiadas. El incremento en la expresión de *Klf9* se correlaciona con los niveles de estrés oxidativo y con los niveles de expresión de otros genes regulados por *Nrf2* (datos no mostrados). Además, en este trabajo analizamos la posible regulación de la expresión de *Nrf2* por *Klf9*. Nuestros datos revelan que la regulación al alza o a la baja de *Klf9* no afecta a la transcripción de *Nrf2*. Estos resultados concuerdan con los datos de microarrays depositados en el *Gene Expression Omnibus* (GEO), en los que no se observan cambios en la expresión de *Nrf2* en experimentos que reducen la expresión de *Klf9* en células humanas ([GSE54699](#)) o de ratón ([GSE6443](#)), ni en experimentos que inducen la sobreexpresión de *Klf9* en células de rata ([GSE92507](#)). Nuestros resultados sugieren que el estrés oxidativo excesivo o sostenido induce la expresión de *Klf9* a través de la vía *Nrf2*, aunque *Klf9* no induce ni reduce la expresión de *Nrf2*. Se ha propuesto que los efectos deletéreos de *Klf9* podrían estar mediados por una reducción en los mecanismos antioxidantes celulares

(Gu y col., 2015; Zucker y col., 2014). En este trabajo, la expresión de *Klf9* reduce el estrés oxidativo inducido por la AngII y, como consecuencia, se incrementa la supervivencia dopaminérgica en líneas celulares tratadas con AngII.

En resumen, nuestros resultados ponen de manifiesto la relevancia de la AngII como fuente de EOR en poblaciones neuronales puras, con efectos tanto sobre la supervivencia celular como sobre la expresión de los factores de transcripción *Nrf2* y *Klf9*. Nuestros resultados concuerdan con estudios que demuestran que la respuesta celular a agentes neurotóxicos mediada por *Nrf2* actúa como mecanismo protector. En este trabajo vinculamos, por primera vez, la exposición a AngII y la expresión de *Nrf2* en el contexto del sistema nervioso. Además, nuestros datos demuestran que el factor de transcripción *Klf9*, cuya expresión es regulada por *Nrf2*, ejerce acciones neuroprotectoras sobre las neuronas dopaminérgicas, reduciendo la producción de EOR en estas células. Nuestros resultados sugieren que descifrar los componentes clave de los mecanismos moleculares desencadenados por la exposición a AngII podría mejorar sustancialmente la comprensión de los mecanismos compensatorios inducidos por estímulos de estrés oxidativo.

### **5.2.3. El efecto del cotrasplante de las MSCs sobre los precursores dopaminérgicos implantados en un modelo animal de EP es dependiente de la dosis**

La ausencia de fuentes alternativas a los neuroblastos dopaminérgicos derivados de la sustancia negra fetal y el elevado porcentaje de degeneración dopaminérgica observada durante el trasplante y en el período inmediatamente posterior son dos de las principales limitaciones a las que la terapia celular se ha enfrentado como estrategia terapéutica para el tratamiento de la EP. Recientemente, avances en el estudio de fuentes alternativas de neuronas dopaminérgicas, como las obtenidas a partir de la diferenciación de hiPSCs o hESC, han propiciado la realización de varios ensayos clínicos prometedores (Piao y col., 2021; Takahashi, 2020). Además de las limitaciones específicas relacionadas con el trasplante de neuronas dopaminérgicas derivadas de hiPSCs y de hESC

(Adler y col., 2019; Takahashi, 2020), la escasa supervivencia y la reducida capacidad de integración en el cerebro hospedador siguen siendo los obstáculos más preocupantes para el salto a la clínica de estas estrategias, independientemente de la fuente de obtención de neuroblastos aptos para el implante (Björklund y Lindvall, 2017; Jang y col., 2020).

Los principales factores responsables de la elevada muerte dopaminérgica durante el proceso de trasplante y en el período inmediatamente posterior a la cirugía no se han dilucidado por completo. Sin embargo, el trauma asociado al trasplante (Brundin y col., 2000), la ausencia de factores de crecimiento (Gantner y col., 2020), una vascularización insuficiente (Büchle y col., 2014) y la neuroinflamación (Piquet y col., 2012; Winkler y col., 2005), entre otros factores, podrían ser responsables de la degeneración observada. Las MSCs han demostrado ser efectivas mitigando varios de estos procesos (Fričová y col., 2020) y, por tanto, cabría esperar un efecto neuroprotector sobre las neuronas dopaminérgicas implantadas. El número de MSCs implantadas puede reducirse con el tiempo (Moloney y col., 2010; Offen y col., 2007) y, de hecho, parte de las células marcadas con CMTMR puede corresponder a MSCs degeneradas que han sido fagocitadas por la glía. Sin embargo, está bien establecido que la mayor parte de la pérdida dopaminérgica ocurre en los primeros días tras el trasplante (Enggård y col., 2003; Sortwell y col., 2000), cuando la mayoría de las MSCs trasplantadas aún están presentes. En la presente tesis, hemos demostrado la capacidad de las MSCs cotrasplantadas para inducir efectos beneficiosos sobre la supervivencia y la capacidad de reinervación de los precursores dopaminérgicos implantados. Curiosamente, el incremento en el número de MSCs coimplantadas induce efectos perjudiciales. Los mecanismos responsables de estos efectos deletéreos todavía no están claros. Una concentración elevada de MSCs podría inducir la senescencia de las MSCs, la transferencia de mitocondrias defectuosas o la desregulación de la producción de citoquinas proinflamatorias (Ding y col., 2018; Mahrouf-Yorgov y col., 2017; Zhang y col., 2016). En cualquier caso, nuestros resultados revelan la necesidad de realizar estudios adicionales para determinar con exactitud la proporción de MSCs/neuronas

dopaminérgicas a implantar con la que obtener un efecto neuroprotector óptimo. Otra cuestión que cabría plantearse es la posibilidad de identificar los productos derivados de las MSCs responsables de los efectos positivos observados, lo que permitiría utilizarlos en sustitución de las MSCs. En resumen, nuestros resultados sugieren que la dosis de MSCs debe ajustarse convenientemente al número de células dopaminérgicas implantadas para maximizar su efecto neuroprotector (Figura 35).

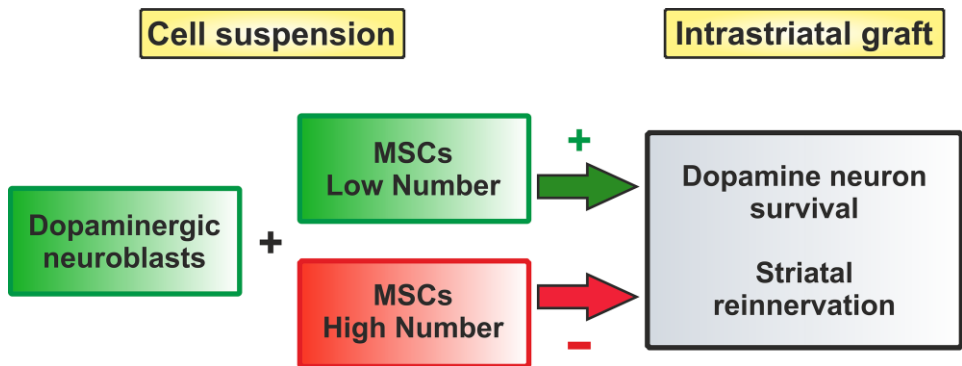


Figura 35. Efecto dependiente de la dosis del cotrasplante de MSCs (del inglés, *mesenchymal stromal cells*) sobre la supervivencia y capacidad de reinervación de las neuronas dopaminérgicas implantadas en un modelo animal de enfermedad de Parkinson. El cotrasplante de neuroblastos dopaminérgicos y MSCs induce un incremento de la supervivencia de las neuronas implantadas y en la densidad de fibras dopaminérgicas en el estriado hospedador cuando las MSCs se coimplantan a baja densidad, mientras que las MSCs poseen efectos deletéreos cuando se coimplantan a una densidad elevada.

#### 5.2.4. Los receptores EP2 median los efectos neuroprotectores de las MSCs sobre las neuronas dopaminérgicas

En la presente tesis, nuestros resultados muestran que las MSCs poseen actividad trófica sobre las células dopaminérgicas de la línea neuronal Mes23.5, sobre las neuronas dopaminérgicas de cultivos primarios derivados del mesencéfalo ventral fetal de rata y sobre neuronas dopaminérgicas derivadas de hiPSCs. La inhibición de la vía de señalización iniciada por la PGE2 revierte los efectos del MSC-CM sobre las neuronas dopaminérgicas. Nuestros resultados concuerdan

con estudios previos en los que se describe un papel neuroprotector de los receptores EP2 y revelan un nuevo mecanismo directo de protección que las MSCs ejercen sobre la población neuronal.

En condiciones basales, el MSC-CM induce un incremento de la viabilidad en neuronas dopaminérgicas de la línea Mes23.5, sin afectar a la proliferación celular, obteniéndose un efecto positivo máximo con MSC-CM sin diluir. Estos datos concuerdan con estudios previos en los que el MSC-CM sin diluir posee un efecto neuroprotector óptimo en modelos de EP (Shintani y col., 2007; Whone y col., 2012). El efecto trófico del MSC-CM también se ha testado sobre células tratadas con la neurotoxina dopaminérgica 6-OHDA. Resultados previos en nuestro laboratorio indican que el incremento del estrés oxidativo, generado a partir de diversas fuentes, está implicado en la degeneración dopaminérgica inducida por 6-OHDA (Rodríguez-Pallares y col., 2007). El tratamiento con MSC-CM favorece la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas tratadas con 6-OHDA, tanto en cultivos primarios mixtos (neurona-glía), como en poblaciones puras de neuronas dopaminérgicas de la línea Mes23.5. Además, también se incrementa el número de células viables cuando el MSC-CM se añade 24 h antes o después del tratamiento con la neurotoxina.

Algunos de los mecanismos implicados en el efecto de las MSCs sobre las neuronas dopaminérgicas se han asociado a una posible regulación de la respuesta inflamatoria mediada por la microglía (Cho y col., 2014; Kim y Hematti, 2009; Kim y col., 2009; Yan y col., 2013). Esta interacción podría explicar el efecto positivo del MSC-CM sobre los cultivos primarios de mesencéfalo fetal, ya que, tal y como hemos demostrado previamente en nuestro laboratorio, estos contienen un 10-15% de células microgliales (Borrajo y col., 2014b). Sin embargo, necesariamente han de estar involucrados mecanismos adicionales que expliquen los efectos positivos del MSC-CM sobre poblaciones neuronales puras, en neuronas dopaminérgicas derivadas de hiPSCs y en neuronas de la línea dopaminérgica Mes23.5.

Las MSCs secretan una amplia variedad de factores, entre los que se incluyen factores de crecimiento neurotróficos, quimiocinas y citoquinas (Drago y col., 2013; Glavaski-Joksimovic y Bohn, 2013; Konala y col., 2016). Los factores tróficos proporcionan

neuroprotección principalmente a través de la activación de dos vías de señalización, la vía PI3K/Akt y la vía MAPK (Isele y col., 2007; Kemp y col., 2010; Yang y col., 2013). Sin embargo, en nuestros resultados, el incremento en la viabilidad de los cultivos dopaminérgicos tratados con MSC-CM se mantiene con respecto a sus controles correspondientes, incluso en presencia de inhibidores de las vías de señalización PI3K/Akt y MAPK. Además, el incremento en la viabilidad inducido por el tratamiento con MSC-CM tampoco se ve afectado por la desnaturalización, mediada por calor o por digestión enzimática, de la fracción proteica del MSC-CM. La transducción de la señal autocrina en neuronas podría explicar la ausencia de actividad trófica en las proteínas secretadas por las MSCs. Estudios previos han demostrado que las NSCs, los neuroblastomas y las neuronas dopaminérgicas liberan factores tróficos que ejercen efectos sobre sí mismas (Aoyama y col., 2001; Brodeur y col., 2009; Nakagawara y col., 1994; Numan y col., 2005; Sarchielli y col., 2014; Seroogy y col., 1994). En nuestros resultados, la presencia de señalización autocrina se evidencia por la reducción en la viabilidad dopaminérgica observada tras la inhibición de las vías de señalización PI3K y MEK1/2 en cultivos de la línea Mes23.5 que crecen en presencia de DMEMF/12 sin suplementos. De esta manera, los factores tróficos secretados por las neuronas dopaminérgicas, que poseen acción autocrina sobre la línea Mes23.5, podrían estar enmascarando el efecto de factores tróficos secretados por las MSCs.

Por el contrario, hemos demostrado que el efecto protector del MSC-CM sobre la línea celular dopaminérgica Mes23.5 se bloquea con el inhibidor de PKA H-89 o mediante la eliminación de lípidos. Diversos derivados lipídicos, como algunos ácidos grasos saturados, esfingolípidos y muchos ácidos grasos poliinsaturados poseen propiedades neuroprotectoras (Bazan, 2005; Denis y col., 2015; Fidaleo y col., 2014; Serhan y col., 2015), y varios estudios sugieren que juegan un papel en la neuroprotección dopaminérgica en modelos de EP (Esposito y col., 2012; Garrido-Gil y col., 2012; Muñoz-Sáez y col., 2015; Pyszko y Strosznajder, 2014; Rodríguez-Pérez y col., 2012). Distintas prostaglandinas se cuentan entre los lípidos que las MSCs sintetizan y liberan al medio extracelular como moléculas de

señalización (Abumaree y col., 2012; Drago y col., 2013; Gao y col., 2016; Madrigal y col., 2014; Rossi y col., 2012). Las prostaglandinas actúan como mediadores lipídicos en la comunicación celular y pueden inducir tanto efectos neurotóxicos como neuroprotectores en el SNC. La PGE2 es una de las prostaglandinas más abundantes en el cerebro, donde se sintetiza a partir de ácido araquidónico en un proceso catalizado por la ciclooxigenasa 2 (COX-2). Aunque en los pacientes de EP se ha observado un incremento en los niveles de COX-2 y PGE2 (Teismann y Schulz, 2004), podrían estar ejerciendo acciones contrapuestas: diversos estudios muestran que la PGE2 tiene efectos positivos sobre la inflamación (Jiang y Dingleline, 2013; Ma y col., 2014) y los efectos citotóxicos de COX-2 parecen estar mediados por las EOR generadas dentro de las propias neuronas (Nogawa y col., 1997), a través de un mecanismo independiente de prostaglandinas (Bilak y col., 2004). La señalización de prostaglandinas se regula no solo por la síntesis, sino también por las vías de señalización aguas abajo activadas en las células diana. Los receptores EP2 estimulan la síntesis de AMPc a través de adenilato ciclasa, induciendo la activación de PKA. Nuestro trabajo muestra que los receptores EP2 se expresan en líneas celulares dopaminérgicas y en cultivos derivados de hiPSCs, y estudios previos han confirmado su presencia en neuronas dopaminérgicas de cultivos primarios de rata y en la SNpc humana (Carrasco y col., 2008). En nuestros resultados, el efecto neuroprotector del MSC-CM puede bloquearse mediante el tratamiento con H-89, un inhibidor de PKA, o mediante PF-04418948, un antagonista de los receptores EP2, lo que indica que la PGE2 liberada al medio por las MSCs estaría activando los receptores EP2 presentes en las neuronas dopaminérgicas. Los efectos tróficos de las MSCs se bloquean con antagonistas de los receptores EP2 tanto en la línea celular dopaminérgica Mes23.5 como en las neuronas posmitóticas de los cultivos primarios de mesencéfalo y en las derivadas de hiPSCs. En este sentido, estudios previos han demostrado que los receptores EP2 protegen a las neuronas frente a distintos daños, incluyendo modelos de enfermedades neurodegenerativas (Bilak y col., 2004; Echeverría y col., 2005; Li y col., 2015; McCullough y col., 2004). Concretamente, la activación de receptores EP2 tiene efectos neuroprotectores frente al

estrés oxidativo inducido por 6-OHDA en neuronas dopaminérgicas (Carrasco y col., 2008). Curiosamente, la activación de receptores de PGE2 de tipo 1 (EP1) posee un efecto neurotóxico (Carrasco y col., 2007; Li y col., 2013; Mohan y col., 2015; Zhen y col., 2012). En neuronas dopaminérgicas de la SNpc se ha confirmado la presencia tanto de receptores EP1 como EP2 (Carrasco y col., 2008). Sin embargo, dado que el receptor EP1 presenta una afinidad baja solo se activa a concentraciones elevadas de PGE2 (Dey y col., 2006). Esto concuerda con nuestros resultados previos, en los que observamos que números elevados de MSCs cotrasplantadas con neuroblastos dopaminérgicos en la misma suspensión celular inducen un efecto perjudicial sobre la supervivencia dopaminérgica (Figura 35).

En resumen, nuestros resultados muestran que las MSCs poseen propiedades tanto neuroprotectoras como de rescate sobre las neuronas dopaminérgicas sometidas a daño neurotóxico inducido por 6-OHDA. Nuestros datos sugieren que la señalización inducida por la PGE2 es una vía relevante en la actividad neuroprotectora de las MSCs sobre neuronas dopaminérgicas de diverso origen. Por primera vez, hemos demostrado una relación directa entre los efectos neuroprotectores de las MSCs y las prostaglandinas. Estas propiedades neuroprotectoras tienen el potencial de convertirse en una estrategia útil para mejorar la supervivencia de las células dopaminérgicas en la EP o para fomentar la supervivencia de los precursores dopaminérgicos que se implantan en terapia celular para el tratamiento de la EP, independientemente de la fuente de obtención de dichos precursores. Estudios futuros esclarecerán cómo puede integrarse esta señalización con otras moléculas secretadas por las MSCs y en el nicho local, para optimizar el potencial terapéutico de las MSCs dentro del ámbito de la terapia celular en la EP.

## 6. CONCLUSIONES

1. Existen receptores de angiotensina II tipo 1 (AT1) y tipo 2 (AT2) funcionales en la zona ventricular-subventricular adulta cerebral de roedores. La angiotensina II, a través de sus receptores AT2, activa las células madre y las células progenitoras neurales de la zona ventricular-subventricular y promueve la formación de neurosféricas *in vitro*, así como la proliferación y generación de neuroblastos *in vivo*.
2. La regulación de la neurogénesis mediada por angiotensina II en la zona ventricular-subventricular adulta se debe a interacciones complejas entre los receptores AT1 y AT2. La actividad de los receptores AT1 restringe constitutivamente la proliferación, efecto que es contrarrestado en condiciones basales por la activación de los receptores AT2.
3. Existe interacción entre los ejes del brazo protector del sistema renina-angiotensina (angiotensina II/AT2 y Ang(1-7)/receptor Mas) en la zona ventricular-subventricular adulta. El receptor Mas modula la neurogénesis mediada por la activación del receptor AT2 tanto en animales jóvenes como en animales envejecidos, estableciéndose una dependencia funcional entre ambos receptores.
4. La expresión de los receptores AT1 y AT2 en la zona ventricular-subventricular puede verse modificada por factores como el envejecimiento o el tratamiento con antagonistas de los receptores AT1 como el candesartán, ejerciendo algunos efectos diferentes en la neurogénesis adulta en distintas especies.

5. En condiciones fisiológicas, la interacción mutua entre los receptores dopaminérgicos y los receptores de angiotensina II regula la proliferación en la zona ventricular-subventricular adulta. La dopamina, a través de receptores tipo D2, y en particular el receptor D3, regula al alza la expresión de los receptores AT2 y promueve la proliferación celular, mientras que a través de los receptores tipo D1 reduce los niveles de expresión de los receptores AT1 y regula a la baja la proliferación.
6. La interacción entre receptores de angiotensina II y receptores dopaminérgicos regula la proliferación y generación de neuroblastos en la zona ventricular-subventricular adulta en un modelo animal de enfermedad de Parkinson. La manipulación del sistema renina-angiotensina local, mediante el bloqueo de los receptores AT1 o la activación de los receptores AT2, revierte la disminución en la neurogénesis inducida por la depleción dopaminérgica en este nicho.
7. El reemplazo de células dopaminérgicas mediante trasplantes intraestriatales de precursores dopaminérgicos en un modelo animal de enfermedad de Parkinson revierte el descenso en la proliferación y generación de neuroblastos inducido por la depleción dopaminérgica en la zona ventricular-subventricular adulta.
8. La manipulación del sistema renina-angiotensina local, a través de la inhibición de los receptores AT1 con candesartán, incrementa la supervivencia y capacidad de reinervación de los precursores dopaminérgicos implantados en un modelo animal de enfermedad de Parkinson.
9. La producción exacerbada de especies oxigenadas reactivas inducida por angiotensina II es responsable de los efectos deletéreos de este péptido sobre la supervivencia dopaminérgica. Sin embargo, la angiotensina II también pone

en marcha vías de señalización neuroprotectoras que implican al factor de transcripción *Nrf2* que regula, entre otros mecanismos antioxidantes, la expresión de *Klf9*, que disminuye el estrés oxidativo *in vitro*.

10. El cotrasplante de precursores dopaminérgicos con células estromales mesenquimales ejerce efectos positivos sobre la supervivencia y capacidad de reinervación de las neuronas dopaminérgicas implantadas en un modelo animal de enfermedad de Parkinson. Sin embargo, la proporción células estromales mesenquimales/precursores dopaminérgicos de la suspensión debe ajustarse cuidadosamente ya que dosis elevadas de células estromales mesenquimales poseen efectos deletéreos sobre la viabilidad dopaminérgica, mientras que dosis bajas de células estromales mesenquimales poseen efectos beneficiosos sobre la supervivencia y capacidad de reinervación del trasplante.
11. La fracción lipídica del medio condicionado derivado de las células estromales mesenquimales es la principal responsable de los efectos neuroprotectores y de rescate que el secretoma de las células estromales mesenquimales ejerce sobre la viabilidad de las células dopaminérgicas en cultivo. En particular, la prostaglandina E2, a través de sus receptores EP2, activa vías de señalización con efectos neuroprotectores, que promueven la supervivencia de células dopaminérgicas de distinto origen.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Abdo, S., Shi, Y., Otoukesh, A., Ghosh, A., Lo, C. S., Chenier, I., Filep, J. G., Ingelfinger, J. R., Zhang, S. L., y Chan, J. S. D. (2014). Catalase overexpression prevents nuclear factor erythroid 2-related factor 2 stimulation of renal angiotensinogen gene expression, hypertension, and kidney injury in diabetic mice. *Diabetes*, 63(10), 3483–3496. <https://doi.org/10.2337/db13-1830>
- Abiodun, O. A., y Ola, M. S. (2020). Role of brain renin angiotensin system in neurodegeneration: An update. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(3), 905–912. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.01.026>
- Abumaree, M., Al Jumah, M., Pace, R. A., y Kalionis, B. (2012). Immunosuppressive Properties of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cell Reviews and Reports*, 8(2), 375–392. <https://doi.org/10.1007/s12015-011-9312-0>
- Adler, A. F., Cardoso, T., Nolbrant, S., Mattsson, B., Hoban, D. B., Jarl, U., Wahlestedt, J. N., Grealish, S., Björklund, A., y Parmar, M. (2019). hESC-Derived Dopaminergic Transplants Integrate into Basal Ganglia Circuitry in a Preclinical Model of Parkinson's Disease. *Cell Reports*, 28(13), 3462–3473. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.08.058>
- Ahlenius, H., Visan, V., Kokaia, M., Lindvall, O., y Kokaia, Z. (2009). Neural stem and progenitor cells retain their potential for proliferation and differentiation into functional neurons despite lower number in aged brain. *Journal of Neuroscience*, 29(14), 4408–4419. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6003-08.2009>
- Alafuzoff, I., y Parkkinen, L. (2014). Staged pathology in Parkinson's disease. *Parkinsonism and Related Disorders*, 20, S57–S61. [https://doi.org/10.1016/S1353-8020\(13\)70016-6](https://doi.org/10.1016/S1353-8020(13)70016-6)
- Albin, R. L., Reiner, A., Anderson, K. D., Penney, J. B., y Young, A. B. (1990). Striatal and nigral neuron subpopulations in rigid Huntington's disease: Implications for the functional anatomy of chorea and rigidity-akinesia. *Annals of Neurology*, 27(4), 357–365. <https://doi.org/10.1002/ana.410270403>
- Ali, Q., Dhande, I., Samuel, P., y Hussain, T. (2016). Angiotensin type 2 receptor null mice express reduced levels of renal angiotensin II type 2 receptor/angiotensin (1-7)/Mas receptor and exhibit greater high-fat diet-induced kidney injury. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*, 17(3), 147032031666187. <https://doi.org/10.1177/1470320316661871>
- Altman, J., y Das, G. D. (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *Journal of Comparative Neurology*, 124(3), 319–335. <https://doi.org/10.1002/cne.901240303>

- Ambasudhan, R., Dolatabadi, N., Nutter, A., Masliah, E., MCKercher, S. R., y Lipton, S. A. (2014). Potential for cell therapy in Parkinson's disease using genetically programmed human embryonic stem cell-derived neural progenitor cells. *Journal of Comparative Neurology*, 522(12), 2845–2856. <https://doi.org/10.1002/cne.23617>
- Anantharam, V., Kaul, S., Song, C., Kanthasamy, A., y Kanthasamy, A. G. (2007). Pharmacological inhibition of neuronal NADPH oxidase protects against 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+)-induced oxidative stress and apoptosis in mesencephalic dopaminergic neuronal cells. *Neurotoxicology*, 28, 988–997. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2007.08.008>
- Andreu-Agulló, C., Morante-Redolat, J. M., Delgado, A. C., y Fariñas, I. (2009). Vascular niche factor PEDF modulates Notch-dependent stemness in the adult subependymal zone. *Nature Neuroscience*, 12(12), 1514–1523. <https://doi.org/10.1038/nn.2437>
- Aoyama, M., Asai, K., Shishikura, T., Kawamoto, T., Miyachi, T., Yokoi, T., Togari, H., Wada, Y., Kato, T., y Nakagawara, A. (2001). Human neuroblastomas with unfavorable biologies express high levels of brain-derived neurotrophic factor mRNA and a variety of its variants. *Cancer Letters*, 164(1), 51–60. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(00\)00715-1](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(00)00715-1)
- Aponso, P. M., Faull, R. L. M., y Connor, B. (2008). Increased progenitor cell proliferation and astrogenesis in the partial progressive 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Neuroscience*, 151(4), 1142–1153. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.11.036>
- Apple, D. M., Mahesula, S., Solano-Fonseca, R., Zhu, C., y Kokovay, E. (2019). Calorie restriction protects neural stem cells from age-related deficits in the subventricular zone. *Aging*, 11(1), 115–126. <https://doi.org/10.18632/aging.101731>
- Araújo-Vilar, D., Domingo-Jiménez, R., Ruibal, Á., Aguiar, P., Ibáñez-Micó, S., Garrido-Pumar, M., Martínez-Olmos, M. Á., López-Soler, C., Guillín-Amarelle, C., González-Rodríguez, M., Rodríguez-Núñez, A., Álvarez-Escudero, J., Liñares-Paz, M., González-Méndez, B., Rodríguez-García, S., y Sánchez-Iglesias, S. (2018). Association of metreleptin treatment and dietary intervention with neurological outcomes in Celia's encephalopathy. *European Journal of Human Genetics*, 26(3), 396–406. <https://doi.org/10.1038/s41431-017-0052-8>
- Babior, B. M. (2004). NADPH oxidase. *Current Opinion in Immunology*, 16(1), 42–47. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2003.12.001>
- Bacigaluppi, M., Sferruzza, G., Butti, E., Ottoboni, L., y Martino, G. (2020). Endogenous neural precursor cells in health and disease. *Brain Research*, 1730, 146619. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.146619>
- Backlund, E. O., Granberg, P. O., Hamberger, B., Knutsson, E., Mårtensson, A., Sedvall, G., Seiger, A., y Olson, L. (1985). Transplantation of adrenal medullary tissue to striatum in parkinsonism. First clinical trials. *Journal of Neurosurgery*, 62(2), 169–173. <https://doi.org/10.3171/jns.1985.62.2.0169>

- Baker, S. A., Baker, K. A., y Hagg, T. (2004). Dopaminergic nigrostriatal projections regulate neural precursor proliferation in the adult mouse subventricular zone. *European Journal of Neuroscience*, 20(2), 575–579. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03486.x>
- Baker, S. A., Baker, K. A., y Hagg, T. (2005). D3 dopamine receptors do not regulate neurogenesis in the subventricular zone of adult mice. *Neurobiology of Disease*, 18(3), 523–527. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2005.01.004>
- Bandres-Ciga, S., Diez-Fairen, M., Kim, J. J., y Singleton, A. B. (2020). Genetics of Parkinson's disease: An introspection of its journey towards precision medicine. *Neurobiology of Disease*, 137, 104782. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.104782>
- Barker, R. A., Barrett, J., Mason, S. L., y Björklund, A. (2013). Fetal dopaminergic transplantation trials and the future of neural grafting in Parkinson's disease. *The Lancet Neurology*, 12(1), 84–91. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(12\)70295-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(12)70295-8)
- Barker, R. A., Farrell, K., Guzman, N. V., He, X., Lazic, S. E., Moore, S., Morris, R., Tyers, P., Wijeyekoon, R., Daft, D., Hewitt, S., Dayal, V., Foltynie, T., Kefalopoulou, Z., Mahlkecht, P., Lao-Kaim, N. P., Piccini, P., Bjartmarz, H., Björklund, A., ... Winkler, C. (2019). Designing stem-cell-based dopamine cell replacement trials for Parkinson's disease. *Nature Medicine*, 25(7), 1045–1053. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0507-2>
- Baruch, K., Deczkowska, A., David, E., Castellano, J. M., Miller, O., Kertser, A., Berkutzki, T., Barnett-Itzhaki, Z., Bezalet, D., Wyss-Coray, T., Amit, I., y Schwartz, M. (2014). Aging-induced type I interferon response at the choroid plexus negatively affects brain function. *Science*, 346(6205), 89–93. <https://doi.org/10.1126/science.1252945>
- Bauer, S., y Patterson, P. H. (2006). Leukemia inhibitory factor promotes neural stem cell self-renewal in the adult brain. *Journal of Neuroscience*, 26(46), 12089–12099. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3047-06.2006>
- Bazan, N. G. (2005). Lipid signaling in neural plasticity, brain repair, and neuroprotection. *Molecular Neurobiology*, 32(1), 89–103. <https://doi.org/10.1385/mn:32:1:089>
- Beccano-Kelly, D. A., Volta, M., Lise, L. N., Paschall, S. A., Tatarnikov, I., Co, K., Chou, P., Cao, L. P., Bergeron, S., Mitchell, E., Han, H., Melrose, H. L., Tapia, L., Raymond, L. A., Matthew, M. J., y Milnerwood, A. J. (2015). LRRK2 overexpression alters glutamatergic presynaptic plasticity, striatal dopamine tone, postsynaptic signal transduction, motor activity and memory. *Human Molecular Genetics*, 24(5), 1336–1349. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu543>
- Bedard, K., y Krause, K. H. (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: Physiology and pathophysiology. *Physiological Reviews*, 87(1), 245–313. <https://doi.org/10.1152/physrev.00044.2005>
- Belarbi, K., Cuvelier, E., Destée, A., Gressier, B., y Chartier-Harlin, M. C. (2017). NADPH oxidases in Parkinson's disease: A systematic review. *Molecular Neurodegeneration*, 12(1), 84. <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0225-5>

- Belenguer, G., Domingo-Muelas, A., Ferrón, S. R., Morante-Redolat, J. M., y Fariñas, I. (2016). Isolation, culture and analysis of adult subependymal neural stem cells. *Differentiation*, 91(4–5), 28–41. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2016.01.005>
- Berg, D. A., Belnoue, L., Song, H., y Simon, A. (2013). Neurotransmitter-mediated control of neurogenesis in the adult vertebrate brain. *Development*, 140(12), 2548–2561. <https://doi.org/10.1242/dev.088005>
- Bernard, K., Logsdon, N. J., Miguel, V., Benavides, G. A., Zhang, J., Carter, A. B., Darley-Usmar, V. M., y Thannickal, V. J. (2017). NADPH Oxidase 4 (Nox4) suppresses mitochondrial biogenesis and bioenergetics in lung fibroblasts via a nuclear factor erythroid-derived 2-like 2 (Nrf2)-dependent pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 292(7), 3029–3038. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.752261>
- Bernstein, K. E., Giani, J. F., Shen, X. Z., y Gonzalez-Villalobos, R. A. (2014). Renal angiotensin-converting enzyme and blood pressure control. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 23(2), 106–112. <https://doi.org/10.1097/01.mnh.0000441047.13912.56>
- Bhat, S. A., Goel, R., Shukla, S., Shukla, R., y Hanif, K. (2018). Angiotensin Receptor Blockade by Inhibiting Glial Activation Promotes Hippocampal Neurogenesis Via Activation of Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling in Hypertension. *Molecular Neurobiology*, 55(6), 5282–5298. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0754-5>
- Bilak, M., Wu, L., Wang, Q., Haughey, N., Conant, K., St. Hillaire, C., y Andreasson, K. (2004). PGE2 receptors rescue motor neurons in a model of amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology*, 56(2), 240–248. <https://doi.org/10.1002/ana.20179>
- Björklund, A., y Lindvall, O. (2017). Replacing Dopamine Neurons in Parkinson's Disease: How did it happen? *Journal of Parkinson's Disease*, 7(s1), S23–S33. <https://doi.org/10.3233/JPD-179002>
- Björklund, A., Stenevi, U., Dunnett, S. B., y Gage, F. H. (1982). Cross-species neural grafting in a rat model of Parkinson's disease. *Nature*, 298(5875), 652–654. <https://doi.org/10.1038/298652a0>
- Bjugstad, K. B., Teng, Y. D., Redmond, D. E., Elsworth, J. D., Roth, R. H., Cornelius, S. K., Snyder, E. Y., y Sladek, J. R. (2008). Human neural stem cells migrate along the nigrostriatal pathway in a primate model of Parkinson's disease. *Experimental Neurology*, 211(2), 362–369. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2008.01.025>
- Bodiga, V. L., y Bodiga, S. (2013). Renin Angiotensin System in Cognitive Function and Dementia. *Asian Journal of Neuroscience*, 2013, 1–18. <https://doi.org/10.1155/2013/102602>
- Bolam, J. P., y Pissadaki, E. K. (2012). Living on the edge with too many mouths to feed: Why dopamine neurons die. *Movement Disorders*, 27(12), 1478–1483. <https://doi.org/10.1002/mds.25135>
- Bolteus, A. J., y Bordey, A. (2004). GABA release and uptake regulate neuronal precursor migration in the postnatal subventricular zone. *Journal of*

- Neuroscience*, 24(35), 7623–7631. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1999-04.2004>
- Bond, A. M., Ming, G. L., y Song, H. (2015). Adult Mammalian Neural Stem Cells and Neurogenesis: Five Decades Later. *Cell Stem Cell*, 17(4), 385–395. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.09.003>
- Bonifati, V., Rizzu, P., Van Baren, M. J., Schaap, O., Breedveld, G. J., Krieger, E., Dekker, M. C. J., Squitieri, F., Ibanez, P., Joosse, M., Van Dongen, J. W., Vanacore, N., Van Swieten, J. C., Brice, A., Meco, G., Van Duijn, C. M., Oostra, B. A., y Heutink, P. (2003). Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science*, 299(5604), 256–259. <https://doi.org/10.1126/science.1077209>
- Borensztajn, J., Reddy, M. N., y Gladstone, A. R. (1988). A simple method for the separation of triacylglycerols from fatty acids released in lipase assays. *Journal of Lipid Research*, 29(11), 1549–1552. [https://doi.org/10.1016/s0022-2275\(20\)38432-7](https://doi.org/10.1016/s0022-2275(20)38432-7)
- Borrajo, A., Rodriguez-Perez, A. I., Diaz-Ruiz, C., Guerra, M. J., y Labandeira-Garcia, J. L. (2014a). Microglial TNF- $\alpha$  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>
- Bose, A., y Beal, M. F. (2016). Mitochondrial dysfunction in Parkinson’s disease. *Journal of Neurochemistry*, 139, 216–231. <https://doi.org/10.1111/jnc.13731>
- Braak, H., Del Tredici, K., Rüb, U., De Vos, R. A. I., Jansen Steur, E. N. H., y Braak, E. (2003). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson’s disease. *Neurobiology of Aging*, 24(2), 197–211. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(02\)00065-9](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(02)00065-9)
- Brichta, L., y Greengard, P. (2014). Molecular determinants of selective dopaminergic vulnerability in Parkinson’s disease: An update. *Frontiers in Neuroanatomy*, 8(DEC). <https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00152>
- Brodeur, G. M., Minturn, J. E., Ho, R., Simpson, A. M., Iyer, R., Varela, C. R., Light, J. E., Kolla, V., y Evans, A. E. (2009). Trk receptor expression and inhibition in neuroblastomas. *Clinical Cancer Research*, 15(10), 3244–3250. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-1815>
- Bronstein, J. M., Tagliati, M., Alterman, R. L., Lozano, A. M., Volkmann, J., Stefani, A., Horak, F. B., Okun, M. S., Foote, K. D., Krack, P., Pahwa, R., Henderson, J. M., Hariz, M. I., Bakay, R. A., Rezai, A., Marks, W. J., Moro, E., Vitek, J. L., Weaver, F. M., ... DeLong, M. R. (2011). Deep brain stimulation for Parkinson disease: an expert consensus and review of key issues. *Archives of Neurology*, 68(2), 165–171. <https://doi.org/10.1001/archneurol.2010.260>
- Brown, D. C., Steward, L. J., Ge, J., y Barnes, N. M. (1996). Ability of angiotensin II

- to modulate striatal dopamine release via the AT1 receptor in vitro and in vivo. *British Journal of Pharmacology*, 118(2), 414–420. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1996.tb15418.x>
- Brundin, P., Dunnett, S., Björklund, A., y Nikkhah, G. (2001). Transplanted dopaminergic neurons: More or less? (multiple letters). *Nature Medicine*, 7(5), 512–513. <https://doi.org/10.1038/87796>
- Brundin, P., Nilsson, O. G., Strecker, R. E., Lindvall, O., Åstedt, B., y Björklund, A. (1986). Behavioural effects of human fetal dopamine neurons grafted in a rat model of Parkinson's disease. *Experimental Brain Research*, 65(1), 235–240. <https://doi.org/10.1007/BF00243848>
- Brundin, Patrik, Karlsson, J., Emgård, M., Kaminski Schierle, G. S., Hansson, O., Petersén, Å., y Castilho, R. F. (2000). Improving the survival of grafted dopaminergic neurons: A review over current approaches. *Cell Transplantation*, 9(2), 179–195. <https://doi.org/10.1177/096368970000900205>
- Büchele, F., Döbrössy, M., Hackl, C., Jiang, W., Papazoglou, A., y Nikkhah, G. (2014). Two-step grafting significantly enhances the survival of foetal dopaminergic transplants and induces graft-derived vascularisation in a 6-OHDA model of Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*, 68, 112–125. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.04.009>
- Calabresi, P., Picconi, B., Tozzi, A., Ghiglieri, V., y Di Filippo, M. (2014). Direct and indirect pathways of basal ganglia: A critical reappraisal. *Nature Neuroscience*, 17(8), 1022–1030. <https://doi.org/10.1038/nn.3743>
- Calzolari, F., Michel, J., Baumgart, E. V., Theis, F., Götz, M., y Ninkovic, J. (2015). Fast clonal expansion and limited neural stem cell self-renewal in the adult subependymal zone. *Nature Neuroscience*, 18(4), 490–492. <https://doi.org/10.1038/nn.3963>
- Cannon, J. R., y Greenamyre, J. T. (2013). Gene-environment interactions in Parkinson's disease: Specific evidence in humans and mammalian models. *Neurobiology of Disease*, 57, 38–46. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2012.06.025>
- Carman, L. S., Gage, F. H., y Shults, C. W. (1991). Partial lesion of the substantia nigra: relation between extent of lesion and rotational behavior. *Brain Research*, 553(2), 275–283. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)90835-J](https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)90835-J)
- Carrasco, E., Casper, D., y Werner, P. (2007). PGE2 receptor EP1 renders dopaminergic neurons selectively vulnerable to low-level oxidative stress and direct PGE2 neurotoxicity. *Journal of Neuroscience Research*, 85(14), 3109–3117. <https://doi.org/10.1002/jnr.21425>
- Carrasco, E., Werner, P., y Casper, D. (2008). Prostaglandin receptor EP2 protects dopaminergic neurons against 6-OHDA-mediated low oxidative stress. *Neuroscience Letters*, 441(1), 44–49. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.05.111>
- Carta, M., Carlsson, T., Muñoz, A., Kirik, D., y Björklund, A. (2010). Role of serotonin neurons in the induction of levodopa- and graft-induced dyskinesias in Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 25(SUPPL. 1), S174–S179. <https://doi.org/10.1002/mds.22792>

- Cassis, P., Conti, S., Remuzzi, G., y Benigni, A. (2010). Angiotensin receptors as determinants of life span. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 459(2), 325–332. <https://doi.org/10.1007/s00424-009-0725-4>
- Caterson, E. J., Nesti, L. J., Danielson, K. G., y Tuan, R. S. (2002). Human marrow-derived mesenchymal progenitor cells: Isolation, culture expansion, and analysis of differentiation. *Molecular Biotechnology*, 20(3), 245–256. <https://doi.org/10.1385/MB:20:3:245>
- Cave, J. W., Wang, M., y Baker, H. (2014). Adult subventricular zone neural stem cells as a potential source of dopaminergic replacement neurons. *Frontiers in Neuroscience*, 8(8 FEB). <https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00016>
- Chaker, Z., Codega, P., y Doetsch, F. (2016). A mosaic world: puzzles revealed by adult neural stem cell heterogeneity. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 5(6), 640–658. <https://doi.org/10.1002/wdev.248>
- Chao, J., Yang, L., Buch, S., y Gao, L. (2013). Angiotensin II Increased Neuronal Stem Cell Proliferation: Role of AT2R. *PLoS ONE*, 8(5), e63488. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063488>
- Chen, H., y Ritz, B. (2018). The search for environmental causes of Parkinson's disease: Moving forward. *Journal of Parkinson's Disease*, 8(s1), S9–S17. <https://doi.org/10.3233/JPD-181493>
- Chen, J., Zhang, Z. G., Li, Y., Wang, Y., Wang, L., Jiang, H., Zhang, C., Lu, M., Katakowski, M., Feldkamp, C. S., y Chopp, M. (2003). Statins induce angiogenesis, neurogenesis, and synaptogenesis after stroke. *Annals of Neurology*, 53(6), 743–751. <https://doi.org/10.1002/ana.10555>
- Chen, Y., Shen, J., Ke, K., y Gu, X. (2020). Clinical potential and current progress of mesenchymal stem cells for Parkinson's disease: a systematic review. *Neurological Sciences*, 41(5), 1051–1061. <https://doi.org/10.1007/s10072-020-04240-9>
- Cheng, L. C., Pastrana, E., Tavazoie, M., y Doetsch, F. (2009). MiR-124 regulates adult neurogenesis in the subventricular zone stem cell niche. *Nature Neuroscience*, 12(4), 399–408. <https://doi.org/10.1038/nn.2294>
- Cho, D. I., Kim, M. R., Jeong, H. Y., Jeong, H. C., Jeong, M. H., Yoon, S. H., Kim, Y. S., y Ahn, Y. (2014). Mesenchymal stem cells reciprocally regulate the M1/M2 balance in mouse bone marrow-derived macrophages. *Experimental and Molecular Medicine*, 46(1), e70. <https://doi.org/10.1038/emm.2013.135>
- Chohan, M. O. (2020). Deconstructing Neurogenesis, Transplantation and Genome-Editing as Neural Repair Strategies in Brain Disease. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00116>
- Chou, J. S., Chen, C. Y., Chen, Y. L., Weng, Y. H., Yeh, T. H., Lu, C. S., Chang, Y. M., y Wang, H. L. (2014). (G2019S) LRRK2 causes early-phase dysfunction of SNpc dopaminergic neurons and impairment of corticostriatal long-term depression in the PD transgenic mouse. *Neurobiology of Disease*, 68, 190–199. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.04.021>
- Codega, P., Silva-Vargas, V., Paul, A., Maldonado-Soto, A. R., DeLeo, A. M., Pastrana, E., y Doetsch, F. (2014). Prospective Identification and Purification

- of Quiescent Adult Neural Stem Cells from Their In Vivo Niche. *Neuron*, 82(3), 545–559. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.02.039>
- Collins, L. M., Toulouse, A., Connor, T. J., y Nolan, Y. M. (2012). Contributions of central and systemic inflammation to the pathophysiology of Parkinson's disease. *Neuropharmacology*, 62(7), 2154–2168. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.01.028>
- Conner, K. R., Forbes, M. E., Lee, W. H., Lee, Y. W., y Riddle, D. R. (2011). AT1 receptor antagonism does not influence early radiation-induced changes in microglial activation or neurogenesis in the normal rat brain. *Radiation Research*, 176(1), 71–83. <https://doi.org/10.1667/RR2560.1>
- Connolly, B. S., y Lang, A. E. (2014). Pharmacological treatment of Parkinson disease: A review. *Journal of the American Medical Association*, 311(16), 1670–1683. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.3654>
- Conover, J. C., y Shook, B. A. (2011). Aging of the subventricular zone neural stem cell niche. *Aging and Disease*, 2(1), 49–63. <https://doi.org/22396866>
- Conover, J. C., y Todd, K. L. (2017). Development and aging of a brain neural stem cell niche. *Experimental Gerontology*, 94, 9–13. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2016.11.007>
- Cook, V. I., Grove, K. L., McMenamin, K. M., Carter, M. R., Harding, J. W., y Speth, R. C. (1991). The AT2 angiotensin receptor subtype predominates in the 18 day gestation fetal rat brain. *Brain Research*, 560(1–2), 334–336. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)91254-X](https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)91254-X)
- Cooper, O., Astradsson, A., Hallett, P., Robertson, H., Mendez, I., y Isacson, O. (2009). Lack of functional relevance of isolated cell damage in transplants of Parkinson's disease patients. *Journal of Neurology*, 256(SUPPL. 3), 310–316. <https://doi.org/10.1007/s00415-009-5242-z>
- Cooper, O., y Isacson, O. (2004). Intrastratial transforming growth factor  $\alpha$  delivery to a model of Parkinson's disease induces proliferation and migration of endogenous adult neural progenitor cells without differentiation into dopaminergic neurons. *Journal of Neuroscience*, 24(41), 8924–8931. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2344-04.2004>
- Coronas, V., Bantubungi, K., Fombonne, J., Krantic, S., Schiffmann, S. N., y Roger, M. (2004). Dopamine D3 receptor stimulation promotes the proliferation of cells derived from the post-natal subventricular zone. *Journal of Neurochemistry*, 91(6), 1292–1301. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02823.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>
- Cova, L., Armentero, M. T., Zennaro, E., Calzarossa, C., Bossolasco, P., Busca, G., Lambertenghi Delilieri, G., Polli, E., Nappi, G., Silani, V., y Blandini, F. (2010). Multiple neurogenic and neurorescue effects of human mesenchymal

- stem cell after transplantation in an experimental model of Parkinson's disease. *Brain Research*, 1311, 12–27. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.11.041>
- Crawford, G. D., Le, W. D., Smith, R. G., Xie, W. J., Stefani, E., y Appel, S. H. (1992). A novel N18TG2 x mesencephalon cell hybrid expresses properties that suggest a dopaminergic cell line of substantia nigra origin. *Journal of Neuroscience*, 12(9), 3392–3398. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.12-09-03392.1992>
- 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>
- Cutler, R. R., y Kokovay, E. (2020). Rejuvenating subventricular zone neurogenesis in the aging brain. *Current Opinion in Pharmacology*, 50, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2019.10.005>
- Cyranoski, D. (2018). 'Reprogrammed' stem cells implanted into patient with Parkinson's disease. *Nature*, 557, 619–620. <https://doi.org/10.1038/d41586-018-07407-9>
- Daynac, M., Morizur, L., Chicheportiche, A., Mouthon, M. A., y Boussin, F. D. (2016). Age-related neurogenesis decline in the subventricular zone is associated with specific cell cycle regulation changes in activated neural stem cells. *Scientific Reports*, 6(1), 21505. <https://doi.org/10.1038/srep21505>
- de Bie, R. M. A., Clarke, C. E., Espay, A. J., Fox, S. H., y Lang, A. E. (2020). Initiation of pharmacological therapy in Parkinson's disease: when, why, and how. *The Lancet Neurology*, 19(5), 452–461. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(20\)30036-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(20)30036-3)
- de Chevigny, A., Cooper, O., Vinuela, A., Reske-Nielsen, C., Lagace, D. C., Eisch, A. J., y Isacson, O. (2008). Fate Mapping and Lineage Analyses Demonstrate the Production of a Large Number of Striatal Neuroblasts After Transforming Growth Factor  $\alpha$  and Noggin Striatal Infusions into the Dopamine-Depleted Striatum. *Stem Cells*, 26(9), 2349–2360. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2008-0080>
- DeCarolis, N. A., Kirby, E. D., Wyss-Coray, T., y Palmer, T. D. (2015). The role of the microenvironmental niche in declining stem-cell functions associated with biological aging. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5(12), a025874. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025874>
- Deleidi, M., Cooper, O., Hargus, G., Levy, A., y Isacson, O. (2011). Oct4-induced reprogramming is required for adult brain neural stem cell differentiation into midbrain dopaminergic neurons. *PLoS ONE*, 6(5), e19926. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019926>
- Delgado, A. C., Ferrón, S. R., Vicente, D., Porlan, E., Perez-Villalba, A., Trujillo, C. M., D'Ocón, P., y Fariñas, I. (2014). Endothelial NT-3 Delivered by Vasculature and CSF Promotes Quiescence of Subependymal Neural Stem

- Cells through Nitric Oxide Induction. *Neuron*, 83(3), 572–585. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.06.015>
- Delgado, R. N., y Lim, D. A. (2015). Embryonic Nkx2.1-expressing neural precursor cells contribute to the regional heterogeneity of adult V-SVZ neural stem cells. *Developmental Biology*, 407(2), 265–274. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2015.09.008>
- Deliu, E., Cristina Brailoiu, G., Eguchi, S., Hoffman, N. E., Rabinowitz, J. E., Tilley, D. G., Madesh, M., Koch, W. J., y Brailoiu, E. (2014). Direct evidence of intracrine angiotensin II signaling in neurons. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 306(8), C736–C744. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00131.2013>
- Denis, I., Potier, B., Heberden, C., y Vancassel, S. (2015). Omega-3 polyunsaturated fatty acids and brain aging. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 18(2), 139–146. <https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000141>
- Denver, R. J., Ouellet, L., Furling, D., Kobayashil, A., Fujii-Kuriyama, Y., y Puymirat, J. (1999). Basic transcription element-binding protein (BTEB) is a thyroid hormone- regulated gene in the developing central nervous system: Evidence for a role in neurite outgrowth. *Journal of Biological Chemistry*, 274(33), 23128–23134. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.33.23128>
- Deuse, T., Hu, X., Gravina, A., Wang, D., Tediashvili, G., De, C., Thayer, W. O., Wahl, A., Garcia, J. V., Reichenspurner, H., Davis, M. M., Lanier, L. L., y Schrepfer, S. (2019). Hypoimmunogenic derivatives of induced pluripotent stem cells evade immune rejection in fully immunocompetent allogeneic recipients. *Nature Biotechnology*, 37(3), 252–258. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0016-3>
- Dexter, D. T., y Jenner, P. (2013). Parkinson disease: From pathology to molecular disease mechanisms. *Free Radical Biology and Medicine*, 62, 132–144. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.01.018>
- Dey, I., Lejeune, M., y Chadee, K. (2006). Prostaglandin E 2 receptor distribution and function in the gastrointestinal tract. *British Journal of Pharmacology*, 149(6), 611–623. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706923>
- Diaz-Ruiz, C., Rodriguez-Perez, A. I., Beiroa, D., Rodriguez-Pallares, J., y Labandeira-Garcia, J. L. (2015). Reciprocal regulation between sirtuin-1 and angiotensin-II in the substantia nigra: Implications for aging and neurodegeneration. *Oncotarget*, 6(29), 26675–26689. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5596>
- Diaz-Ruiz, C., Villar-Cheda, B., Dominguez-Meijide, A., Garrido-Gil, P., Guerra, M. J., y Labandeira-Garcia, J. L. (2020). Aging-Related Overactivity of the Angiotensin/AT1 Axis Decreases Sirtuin 3 Levels in the Substantia Nigra, Which Induces Vulnerability to Oxidative Stress and Neurodegeneration. *Journals of Gerontology: Biological Sciences and Medical Sciences*, 75(3), 416–424. <https://doi.org/10.1093/gerona/gly259>
- Ding, Y., Liang, X., Zhang, Y., Yi, L., Shum, H. C., Chen, Q., Chan, B. P., Fan, H., Liu, Z., Tergaonkar, V., Qi, Z., Tse, H. F., y Lian, Q. (2018). Rap1 deficiency-

- provoked paracrine dysfunction impairs immunosuppressive potency of mesenchymal stem cells in allograft rejection of heart transplantation. *Cell Death and Disease*, 9(3), 386. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0414-3>
- Doetsch, F., y Alvarez-Buylla, A. (1996). Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(25), 14895–14900. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.25.14895>
- Doetsch, F., Caille, I., Lim, D. A., Garcia-Verdugo, J. M., y Alvarez-Buylla, A. (1999). Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell*, 97(6), 703–716. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80783-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80783-7)
- Doetsch, F., García-Verdugo, J. M., y Alvarez-Buylla, A. (1997). Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *Journal of Neuroscience*, 17(13), 5046–5061. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.17-13-05046.1997>
- Dominguez-Meijide, 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-Meijide, 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(PART A), 156–168. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.07.016>
- Donega, V., Burm, S. M., van Strien, M. E., van Bodegraven, E. J., Paliukhovich, I., Geut, H., van de Berg, W. D. J., Li, K. W., Smit, A. B., Basak, O., y Hol, E. M. (2019). Transcriptome and proteome profiling of neural stem cells from the human subventricular zone in Parkinson's disease. *Acta Neuropathologica Communications*, 7(1), 84. <https://doi.org/10.1186/s40478-019-0736-0>
- Doobay, M. F., Talman, L. S., Obr, T. D., Tian, X., Davisson, R. L., y Lazartigues, E. (2007). Differential expression of neuronal ACE2 in transgenic mice with overexpression of the brain renin-angiotensin system. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 292(1), R373–R381. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00292.2006>
- Dorsey, E. R., y Bloem, B. R. (2018). The Parkinson pandemic - A call to action. *JAMA Neurology*, 75(1), 9–10. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2017.3299>
- Double, K. L. (2012). Neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Parkinsonism and Related Disorders*, 18(SUPPL. 1), S52–S54. [https://doi.org/10.1016/s1353-8020\(11\)70018-9](https://doi.org/10.1016/s1353-8020(11)70018-9)
- Drago, D., Cossetti, C., Iraci, N., Gaude, E., Musco, G., Bachi, A., y Pluchino, S. (2013). The stem cell secretome and its role in brain repair. *Biochimie*, 95(12), 2271–2285. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.06.020>
- Drews, H. J., Yenkovyan, K., Lourhmati, A., Buadze, M., Kabisch, D., Verleysdonk,

- S., Petschak, S., Beer-Hammer, S., Davtyan, T., Frey, W. H., Gleiter, C. H., Schwab, M., y Danielyan, L. (2019). Intranasal Losartan Decreases Perivascular Beta Amyloid, Inflammation, and the Decline of Neurogenesis in Hypertensive Rats. *Neurotherapeutics*, 16(3), 725–740. <https://doi.org/10.1007/s13311-019-00723-6>
- Dulken, B. W., Leeman, D. S., Boutet, S. C., Hebestreit, K., y Brunet, A. (2017). Single-Cell Transcriptomic Analysis Defines Heterogeneity and Transcriptional Dynamics in the Adult Neural Stem Cell Lineage. *Cell Reports*, 18(3), 777–790. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.060>
- Dunnett, S., y Björklund, A. (1992). Staging and dissection of rat embryos. *Neural Transplantation*, 15–16.
- Duty, S., y Jenner, P. (2011). Animal models of Parkinson’s disease: A source of novel treatments and clues to the cause of the disease. *British Journal of Pharmacology*, 164(4), 1357–1391. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01426.x>
- Echeverría, V., Clerman, A., y Doré, S. (2005). Stimulation of PGE2 receptors EP2 and EP4 protects cultured neurons against oxidative stress and cell death following  $\beta$ -amyloid exposure. *European Journal of Neuroscience*, 22(9), 2199–2206. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04427.x>
- Elased, K. M., Cunha, T. S., Marcondes, F. K., y Morris, M. (2008). Brain angiotensin-converting enzymes: Role of angiotensin-converting enzyme 2 in processing angiotensin II in mice. *Experimental Physiology*, 93(5), 665–675. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2007.040311>
- Emgård, M., Hallin, U., Karlsson, J., Bahr, B. A., Brundin, P., y Blomgren, K. (2003). Both apoptosis and necrosis occur early after intracerebral grafting of ventral mesencephalic tissue: A role for protease activation. *Journal of Neurochemistry*, 86(5), 1223–1232. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01931.x>
- Engelender, S., y Isacson, O. (2017). The Threshold Theory for Parkinson’s Disease. *Trends in Neurosciences*, 40(1), 4–14. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2016.10.008>
- Engler, A., Rolando, C., Giachino, C., Saotome, I., Erni, A., Brien, C., Zhang, R., Zimmer-Strobl, U., Radtke, F., Artavanis-Tsakonas, S., Louvi, A., y Taylor, V. (2018). Notch2 Signaling Maintains NSC Quiescence in the Murine Ventricular-Subventricular Zone. *Cell Reports*, 22(4), 992–1002. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.12.094>
- Enwere, E., Shingo, T., Gregg, C., Fujikawa, H., Ohta, S., y Weiss, S. (2004). Aging results in reduced epidermal growth factor receptor signaling, diminished olfactory neurogenesis, and deficits in fine olfactory discrimination. *Journal of Neuroscience*, 24(38), 8354–8365. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2751-04.2004>
- Esposito, E., Impellizzeri, D., Mazzon, E., Paterniti, I., y Cuzzocrea, S. (2012). Neuroprotective activities of palmitoylethanolamide in an animal model of Parkinson’s disease. *PLoS ONE*, 7(8), e41880.

- <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041880>
- Fallon, J., Reid, S., Kinyamu, R., Opole, I., Opole, R., Baratta, J., Korc, M., Endo, T. L., Duong, A., Nguyen, G., Karkehabadhi, M., Twardzik, D., y Loughlin, S. (2000). In vivo induction of massive proliferation, directed migration, and differentiation of neural cells in the adult mammalian brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(26), 14686–14691. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.26.14686>
- Fearnley, J. M., y Lees, A. J. (1991). Ageing and Parkinson's disease: Substantia nigra regional selectivity. *Brain*, 114(5), 2283–2301. <https://doi.org/10.1093/brain/114.5.2283>
- Felder, R. A., y Jose, P. A. (2006). Mechanisms of disease: The role of GRK4 in the etiology of essential hypertension and salt sensitivity. *Nature Clinical Practice Nephrology*, 2(11), 637–650. <https://doi.org/10.1038/ncpneph0301>
- Fernández-Pajarín, G., Sesar, Jiménez-Martín, I., Ares, B., y Castro, A. (2021). Progression and treatment of a series of patients with advanced LRRK2-associated Parkinson's disease. *Neurología*. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2020.06.020>
- Fernandez, H. H., Boyd, J. T., Fung, V. S. C., Lew, M. F., Rodriguez, R. L., Slevin, J. T., Standaert, D. G., Zadikoff, C., Vanagunas, A. D., Chatamra, K., Eaton, S., Facheris, M. F., Hall, C., Robieson, W. Z., Benesh, J., y Espay, A. J. (2018). Long-term safety and efficacy of levodopa-carbidopa intestinal gel in advanced Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 33(6), 928–936. <https://doi.org/10.1002/mds.27338>
- Fernando, R. N., Eleuteri, B., Abdelhady, S., Nussenzweig, A., Andäng, M., y Ernfors, P. (2011). Cell cycle restriction by histone H2AX limits proliferation of adult neural stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(14), 5837–5842. <https://doi.org/10.1073/pnas.1014993108>
- Ferreira, R., Fonseca, M. C., Santos, T., Sargento-Freitas, J., Tjeng, R., Paiva, F., Castelo-Branco, M., Ferreira, L. S., y Bernardino, L. (2016). Retinoic acid-loaded polymeric nanoparticles enhance vascular regulation of neural stem cell survival and differentiation after ischaemia. *Nanoscale*, 8(15), 8126–8137. <https://doi.org/10.1039/c5nr09077f>
- Ferrón, S. R., Andreu-Agulló, C., Mira, H., Sánchez, P., Ángeles Marqués-Torrejón, M., y Fariñas, I. (2007). A combined ex/in vivo assay to detect effects of exogenously added factors in neural stem cells. *Nature Protocols*, 2(4), 849–859. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.104>
- Fidaleo, M., Fanelli, F., Ceru, M., y Moreno, S. (2014). Neuroprotective Properties of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha (PPAR $\alpha$ ) and its Lipid Ligands. *Current Medicinal Chemistry*, 21(24), 2803–2821. <https://doi.org/10.2174/0929867321666140303143455>
- Foti, S. B., Chou, A., Moll, A. D., y Roskams, A. J. (2013). HDAC inhibitors dysregulate neural stem cell activity in the postnatal mouse brain. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 31(6), 434–447.

- <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2013.03.008>
- Fouda, A. Y., Pillai, B., Dhandapani, K. M., Ergul, A., y Fagan, S. C. (2017). Role of interleukin-10 in the neuroprotective effect of the Angiotensin Type 2 Receptor agonist, compound 21, after ischemia/reperfusion injury. *European Journal of Pharmacology*, 799, 128–134. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.02.016>
- Francis, F., Koulakoff, A., Boucher, D., Chafey, P., Schaar, B., Vinet, M. C., Friocourt, G., McDonnell, N., Reiner, O., Kahn, A., McConnell, S. K., Berwald-Netter, Y., Denoulet, P., y Chelly, J. (1999). Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons. *Neuron*, 23(2), 247–256. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80777-1](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80777-1)
- 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. *New England Journal of Medicine*, 344(10), 710–719. <https://doi.org/10.1056/nejm200103083441002>
- Freund, M., Walther, T., y Von Bohlen und Halbach, O. (2014). Effects of the angiotensin-(1-7) receptor Mas on cell proliferation and on the population of doublecortin positive cells within the dentate gyrus and the piriform cortex. *European Neuropsychopharmacology*, 24(2), 302–308. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2013.06.004>
- Freund, M., Walther, T., y Von Bohlen Und Halbach, O. (2012). Immunohistochemical localization of the angiotensin-(1-7) receptor Mas in the murine forebrain. *Cell and Tissue Research*, 348(1), 29–35. <https://doi.org/10.1007/s00441-012-1354-3>
- Freundlieb, N., François, C., Tandé, D., Oertel, W. H., Hirsch, E. C., y Höglinger, G. U. (2006). Dopaminergic substantia nigra neurons project topographically organized to the subventricular zone and stimulate precursor cell proliferation in aged primates. *Journal of Neuroscience*, 26(8), 2321–2325. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4859-05.2006>
- Fričová, D., Korchak, J. A., y Zubair, A. C. (2020). Challenges and translational considerations of mesenchymal stem/stromal cell therapy for Parkinson's disease. *NPJ Regenerative Medicine*, 5(1), 20. <https://doi.org/10.1038/s41536-020-00106-y>
- Gaiano, N., y Fishell, G. (2002). The role of Notch in promoting glial and neural stem cell fates. *Annual Review of Neuroscience*, 25(1), 471–490. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.25.030702.130823>
- Galvan, V., y Jin, K. (2007). Neurogenesis in the aging brain. *Clinical Interventions in Aging*, 2(4), 605–610. <https://doi.org/10.2147/cia.s1614>
- Gantner, C. W., de Luzy, I. R., Kauhausen, J. A., Moriarty, N., Niclis, J. C., Bye, C. R., Penna, V., Hunt, C. P. J., Ermine, C. M., Pouton, C. W., Kirik, D., Thompson, L. H., y Parish, C. L. (2020). Viral Delivery of GDNF Promotes Functional Integration of Human Stem Cell Grafts in Parkinson's Disease. *Cell Stem Cell*, 26(4), 511–526. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.01.010>

- Gao, F., Chiu, S. M., Motan, D. A. L., Zhang, Z., Chen, L., Ji, H. L., Tse, H. F., Fu, Q. L., y Lian, Q. (2016). Mesenchymal stem cells and immunomodulation: Current status and future prospects. *Cell Death and Disease*, 7(1), e2062. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.327>
- García-Garrote, M., Pérez-Villalba, A., Garrido-Gil, P., Belenguer, G., Parga, J. A., Pérez-Sánchez, F., Labandeira-García, J. L., Fariñas, I., y Rodríguez-Pallares, J. (2019). Interaction between Angiotensin Type 1, Type 2, and Mas Receptors to Regulate Adult Neurogenesis in the Brain Ventricular-Subventricular Zone. *Cells*, 8(12). <https://doi.org/10.3390/cells8121551>
- García-Verdugo, J. M., Doetsch, F., Wichterle, H., Lim, D. A., y Alvarez-Buylla, A. (1998). Architecture and cell types of the adult subventricular zone: In search of the stem cells. *Journal of Neurobiology*, 36(2), 234–248. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4695\(199808\)36:2<234::AID-NEU10>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4695(199808)36:2<234::AID-NEU10>3.0.CO;2-E)
- Garitaonandia, I., Gonzalez, R., Sherman, G., Semechkin, A., Evans, A., y Kern, R. (2018). Novel approach to stem cell therapy in Parkinson's disease. *Stem Cells and Development*, 27(14), 951–957. <https://doi.org/10.1089/scd.2018.0001>
- Garrido-Gil, P., Fernández-Rodríguez, P., Rodríguez-Pallares, J., y Labandeira-García, J. L. (2017a). 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-Pérez, A. I., Guerra, M. J., y Labandeira-García, J. L. (2012). Involvement of PPAR- $\gamma$  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(1), 523. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-38>
- Garrido-Gil, P., Rodríguez-Pérez, A. I., Domínguez-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-Pérez, A. I., Fernández-Rodríguez, P., Lanciego, J. L., y Labandeira-García, J. L. (2017b). Expression of angiotensinogen and receptors for angiotensin and prorenin in the rat and monkey striatal neurons and glial cells. *Brain Structure and 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. (2013). 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 and Function*, 218(2), 373–388. <https://doi.org/10.1007/s00429-012-0402-9>
- Gatt, A., Lee, H., Williams, G., Thuret, S., y Ballard, C. (2019). Expression of neurogenic markers in Alzheimer's disease: a systematic review and

- metatranscriptional analysis. *Neurobiology of Aging*, 76, 166–180. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2018.12.016>
- Ge, J., y Barnes, N. M. (1996). Alterations in angiotensin AT1 and AT2 receptor subtype levels in brain regions from patients with neurodegenerative disorders. *European Journal of Pharmacology*, 297(3), 299–306. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(95\)00762-8](https://doi.org/10.1016/0014-2999(95)00762-8)
- Gelders, G., Baekelandt, V., y Van der Perren, A. (2018). Linking neuroinflammation and neurodegeneration in Parkinson's disease. *Journal of Immunology Research*, 2018, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2018/4784268>
- George, S., y Brundin, P. (2015). Immunotherapy in Parkinson's disease: Micromanaging alpha-synuclein aggregation. *Journal of Parkinson's Disease*, 5(3), 413–424. <https://doi.org/10.3233/JPD-150630>
- George, S., Rey, N. L., Reichenbach, N., Steiner, J. A., y Brundin, P. (2013).  $\alpha$ -Synuclein: The long distance runner. *Brain Pathology*, 23(3), 350–357. <https://doi.org/10.1111/bpa.12046>
- Gil-Perotín, S., Duran-Moreno, M., Cebrián-Silla, A., Ramírez, M., García-Belda, P., y García-Verdugo, J. M. (2013). Adult neural stem cells from the subventricular zone: A review of the neurosphere assay. *Anatomical Record*, 296(9), 1435–1452. <https://doi.org/10.1002/ar.22746>
- Gildea, J. J. (2009). Dopamine and angiotensin as renal counterregulatory systems controlling sodium balance. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 18(1), 28–32. <https://doi.org/10.1097/MNH.0b013e32831a9e0b>
- Gildea, J. J., Wang, X., Shah, N., Tran, H., Spinosa, M., Van Sciver, R., Sasaki, M., Yatabe, J., Carey, R. M., Jose, P. A., y Felder, R. A. (2012). Dopamine and angiotensin type 2 receptors cooperatively inhibit sodium transport in human renal proximal tubule cells. *Hypertension*, 60(2), 396–403. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.112.194175>
- Gildea, J. J., Xu, P., Kemp, B. A., Carey, R. M., Jose, P. A., y Felder, R. A. (2019). The Dopamine D1 Receptor and Angiotensin II Type-2 Receptor are Required for Inhibition of Sodium Transport Through a Protein Phosphatase 2A Pathway. *Hypertension*, 73(6), 1258–1265. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.12705>
- Giles, M. E., Fernley, R. T., Nakamura, Y., Moeller, I., Aldred, G. P., Ferraro, T., Penschow, J. D., McKinley, M. J., y Oldfield, B. J. (1999). Characterization of a specific antibody to the rat angiotensin II AT1 receptor. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 47(4), 507–515. <https://doi.org/10.1177/002215549904700409>
- Gilmour, T. P., Piallat, B., Lieu, C. A., Venkiteswaran, K., Ramachandra, R., Rao, A. N., Petticoffer, A. C., Berk, M. A., y Subramanian, T. (2011). The effect of striatal dopaminergic grafts on the neuronal activity in the substantia nigra pars reticulata and subthalamic nucleus in hemiparkinsonian rats. *Brain*, 134(11), 3276–3289. <https://doi.org/10.1093/brain/awr226>
- Gironacci, M. M., Vicario, A., Cerezo, G., y Silva, M. G. (2018). The depressor axis of the renin-angiotensin system and brain disorders: A translational approach.

- Clinical Science*, 132(10), 1021–1038. <https://doi.org/10.1042/CS20180189>
- Glavaski-Joksimovic, A., y Bohn, M. C. (2013). Mesenchymal stem cells and neuroregeneration in Parkinson's disease. *Experimental Neurology*, 247, 25–38. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2013.03.016>
- Gohlke, P., Von Kügelgen, S., Jürgensen, T., Kox, T., Rascher, W., Culman, J., y Unger, T. (2002). Effects of orally applied candesartan cilexetil on central responses to angiotensin II in conscious rats. *Journal of Hypertension*, 20(5), 909–918. <https://doi.org/10.1097/00004872-200205000-00026>
- Goldwurm, S., Tunesi, S., Tesei, S., Zini, M., Sironi, F., Primignani, P., Magnani, C., y Pezzoli, G. (2011). Kin-cohort analysis of LRRK2-G2019S penetrance in Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 26(11), 2144–2145. <https://doi.org/10.1002/mds.23807>
- Gómez-Gaviro, M. V., Scott, C. E., Sesay, A. K., Matheu, A., Booth, S., Galichet, C., y Lovell-Badge, R. (2012). Betacellulin promotes cell proliferation in the neural stem cell niche and stimulates neurogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(4), 1317–1322. <https://doi.org/10.1073/pnas.1016199109>
- Gonzalez-Perez, O., y Quiñones-Hinojosa, A. (2012). Astrocytes as Neural Stem Cells in the Adult Brain. *Journal of Stem Cells*, 7(3), 181–188. <https://doi.org/jsc.2012.7.3.181>
- Gonzalez, R., Garitaonandia, I., Crain, A., Poustovoitov, M., Abramihina, T., Noskov, A., Jiang, C., Morey, R., Laurent, L. C., Elsworth, J. D., Snyder, E. Y., Eugene Redmond, D., y Semechkin, R. (2015). Proof of concept studies exploring the safety and functional activity of human parthenogenetic-derived neural stem cells for the treatment of Parkinson's disease. *Cell Transplantation*, 24(4), 681–690. <https://doi.org/10.3727/096368915X687769>
- Gonzalez, R., Garitaonandia, I., Poustovoitov, M., Abramihina, T., McEntire, C., Culp, B., Attwood, J., Noskov, A., Christiansen-Weber, T., Khater, M., Mora-Castilla, S., To, C., Crain, A., Sherman, G., Semechkin, A., Laurent, L. C., Elsworth, J. D., Sladek, J., Snyder, E. Y., ... Kern, R. A. (2016). Neural stem cells derived from human parthenogenetic stem cells engraft and promote recovery in a nonhuman primate model of Parkinson's disease. *Cell Transplantation*, 25(11), 1945–1966. <https://doi.org/10.3727/096368916X691682>
- Gonzalo-Gobernado, R., Reimers, D., Herranz, A. S., Díaz-Gil, J. J., Osuna, C., Asensio, M. J., Baena, S., Rodríguez-Serrano, M., y Bazán, E. (2009). Mobilization of neural stem cells and generation of new neurons in 6-OHDA-lesioned rats by intracerebroventricular infusion of liver growth factor. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 57(5), 491–502. <https://doi.org/10.1369/jhc.2009.952275>
- Grammatopoulos, T. N., Ahmadi, F., Jones, S. M., Fariss, M. W., Weyhenmeyer, J. A., y Zawada, W. M. (2005). Angiotensin II protects cultured midbrain dopaminergic neurons against rotenone-induced cell death. *Brain Research*, 1045(1–2), 64–71. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.03.038>

- Grealish, S., Diguët, E., Kirkeby, A., Mattsson, B., Heuer, A., Bramouille, Y., Van Camp, N., Perrier, A. L., Hantraye, P., Björklund, A., y Parmar, M. (2014). Human ESC-derived dopamine neurons show similar preclinical efficacy and potency to fetal neurons when grafted in a rat model of Parkinson's disease. *Cell Stem Cell*, 15(5), 653–665. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.09.017>
- Greenamyre, J. T., Betarbet, R., y Sherer, T. B. (2003). The rotenone model of Parkinson's disease: Genes, environment and mitochondria. *Parkinsonism and Related Disorders*, 9(SUPPL. 2), 59–64. [https://doi.org/10.1016/S1353-8020\(03\)00023-3](https://doi.org/10.1016/S1353-8020(03)00023-3)
- Gritti, A., Molin, M. D., Foroni, C., y Bonfanti, L. (2009). Effects of developmental age, brain region, and time in culture on long-term proliferation and multipotency of neural stem cell populations. *Journal of Comparative Neurology*, 517(3), 333–349. <https://doi.org/10.1002/cne.22153>
- Grobe, J. L., Xu, D., y Sigmund, C. D. (2008). An intracellular renin-angiotensin system in neurons: Fact, hypothesis, or fantasy. *Physiology*, 23(4), 187–193. <https://doi.org/10.1152/physiol.00002.2008>
- Gu, Y., Wu, Y. B., Wang, L. H., y Yin, J. N. (2015). Involvement of Kruppel-like factor 9 in bleomycin-induced pulmonary toxicity. *Molecular Medicine Reports*, 12(4), 5262–5266. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.4015>
- Gundersen, H. J. G., Bendtsen, T. F., Korbo, L., Marcussen, N., Moller, A., Nielsen, K., Nyengaard, J. R., Pakkenberg, B., Sorensen, F. B., Vesterby, A., y West, M. J. (1988). Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS*, 96(5), 379–394. <https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1988.tb05320.x>
- Ha Kim, K., Sadikot, R. T., Yeon Lee, J., Jeong, H. S., Oh, Y. K., Blackwell, T. S., y Joo, M. (2017). Suppressed ubiquitination of Nrf2 by p47phox contributes to Nrf2 activation. *Free Radical Biology and Medicine*, 113, 48–58. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.09.011>
- Hack, M. A., Saghatelian, A., De Chevigny, A., Pfeifer, A., Ashery-Padan, R., Lledo, P. M., y Götz, M. (2005). Neuronal fate determinants of adult olfactory bulb neurogenesis. *Nature Neuroscience*, 8(7), 865–872. <https://doi.org/10.1038/nn1479>
- Hagell, P., Piccini, P., Björklund, A., Brundin, P., Rehncrona, S., Widner, H., Crabb, L., Pavese, N., Oertel, W. H., Quinn, N., Brooks, D. J., y Lindvall, O. (2002). Dyskinesias following neural transplantation in Parkinson's disease. *Nature Neuroscience*, 5(7), 627–628. <https://doi.org/10.1038/nn863>
- Halliday, G. M., Ophof, A., Broe, M., Jensen, P. H., Kettle, E., Fedorow, H., Cartwright, M. I., Griffiths, F. M., Shepherd, C. E., y Double, K. L. (2005).  $\alpha$ -Synuclein redistributes to neuromelanin lipid in the substantia nigra early in Parkinson's disease. *Brain*, 128(11), 2654–2664. <https://doi.org/10.1093/brain/awh584>
- Hamadjida, A., Frouni, I., Kwan, C., y Huot, P. (2019). Classic animal models of Parkinson's disease: A historical perspective. *Behavioural Pharmacology*, 30(4), 291–310. <https://doi.org/10.1097/FBP.0000000000000441>

- Haridhasapavalan, K. K., Borgohain, M. P., Dey, C., Saha, B., Narayan, G., Kumar, S., y Thummer, R. P. (2019). An insight into non-integrative gene delivery approaches to generate transgene-free induced pluripotent stem cells. *Gene*, 686, 146–159. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.11.069>
- Hattiangady, B., Shuai, B., Cai, J., Coksaygan, T., Rao, M. S., y Shetty, A. K. (2007). Increased Dentate Neurogenesis After Grafting of Glial Restricted Progenitors or Neural Stem Cells in the Aging Hippocampus. *STEM CELLS*, 25(8), 2104–2117. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0726>
- He, M., Zhang, H., Li, Y., Tian, C., Tang, B., Huang, Y., y Zheng, J. (2019). Direct and selective lineage conversion of human fibroblasts to dopaminergic precursors. *Neuroscience Letters*, 699, 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.01.033>
- He, X. J., y Nakayama, H. (2015). Transiently impaired neurogenesis in MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Neurotoxicology*, 50, 46–55. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2015.07.007>
- Hefti, F., Melamed, E., Sahakian, B. J., y Wurtman, R. J. (1980). Circling behavior in rats with partial, unilateral nigro-striatal lesions: Effect of amphetamine, apomorphine, and DOPA. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 12(2), 185–188. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(80\)90353-6](https://doi.org/10.1016/0091-3057(80)90353-6)
- Herbert, V., Lau, K. S., Gottlieb, C. W., y Bleicher, S. J. (1965). Coated charcoal immunoassay of insulin. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 25(10), 1375–1384. <https://doi.org/10.1210/jcem-25-10-1375>
- Herranz, N., y Gil, J. (2018). Mechanisms and functions of cellular senescence. *Journal of Clinical Investigation*, 128(4), 1238–1246. <https://doi.org/10.1172/JCI95148>
- Herzog, J., Pogarell, O., Pinsker, M. O., Kupsch, A., Oertel, W. H., Lindvall, O., Deuschl, G., y Volkmann, J. (2008). Deep brain stimulation in Parkinson's disease following fetal nigral transplantation. *Movement Disorders*, 23(9), 1293–1296. <https://doi.org/10.1002/mds.21768>
- Hijaz, B. A., y Volpicelli-Daley, L. A. (2020). Initiation and propagation of  $\alpha$ -synuclein aggregation in the nervous system. *Molecular Neurodegeneration*, 15(1), 19. <https://doi.org/10.1186/s13024-020-00368-6>
- Hoban, D. B., Howard, L., y Dowd, E. (2015). GDNF-secreting mesenchymal stem cells provide localized neuroprotection in an inflammation-driven rat model of Parkinson's disease. *Neuroscience*, 303, 402–411. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.07.014>
- Höglinger, G. U., Arias-Carrión, O., Ipach, B., y Oertel, W. H. (2014). Origin of the dopaminergic innervation of adult neurogenic areas. *Journal of Comparative Neurology*, 522(10), 2336–2348. <https://doi.org/10.1002/cne.23537>
- Höglinger, G. U., Rizk, P., Muriel, M. P., Duyckaerts, C., Oertel, W. H., Caille, I., y Hirsch, E. C. (2004). Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease. *Nature Neuroscience*, 7(7), 726–735. <https://doi.org/10.1038/nn1265>
- Holm, M. M., Kaiser, J., y Schwab, M. E. (2018). Extracellular Vesicles: Multimodal

- Envoys in Neural Maintenance and Repair. *Trends in Neurosciences*, 41(6), 360–372. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2018.03.006>
- Hou, P., Li, Y., Zhang, X., Liu, C., Guan, J., Li, H., Zhao, T., Ye, J., Yang, W., Liu, K., Ge, J., Xu, J., Zhang, Q., Zhao, Y., y Deng, H. (2013). Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. *Science*, 341(6146), 651–654. <https://doi.org/10.1126/science.1239278>
- Huang, H. C., Nguyen, T., y Pickett, C. B. (2000). Regulation of the antioxidant response element by protein kinase C-mediated phosphorylation of NF-E2-related factor 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(23), 12475–12480. <https://doi.org/10.1073/pnas.220418997>
- Huang, X. C., Richards, E. M., y Summers, C. (1996). Mitogen-activated protein kinases in rat brain neuronal cultures are activated by angiotensin II type 1 receptors and inhibited by angiotensin II type 2 receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 271(26), 15635–15641. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.26.15635>
- Hudon-David, F., Bouzeghrane, F., Couture, P., y Thibault, G. (2007). Thy-1 expression by cardiac fibroblasts: Lack of association with myofibroblast contractile markers. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 42(5), 991–1000. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2007.02.009>
- Hussain, M., y Awan, F. R. (2018). Hypertension regulating angiotensin peptides in the pathobiology of cardiovascular disease. *Clinical and Experimental Hypertension*, 40(4), 344–352. <https://doi.org/10.1080/10641963.2017.1377218>
- Ichiki, T., Labosky, P. A., Shiota, C., Okuyama, S., Imagawa, Y., Fogo, A., Niimura, F., Ichikawa, I., Hogan, B. L. M., y Inagami, T. (1995). Effects on blood pressure and exploratory behaviour of mice lacking angiotensin II type-2 receptor. *Nature*, 377(6551), 748–750. <https://doi.org/10.1038/377748a0>
- Imbriani, P., Sciamanna, G., Santoro, M., Schirinzi, T., y Pisani, A. (2018). Promising rodent models in Parkinson’s disease. *Parkinsonism and Related Disorders*, 46, S10–S14. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2017.07.027>
- Isele, N. B., Lee, H. S., Landshamer, S., Straube, A., Padovan, C. S., Plesnila, N., y Culmsee, C. (2007). Bone marrow stromal cells mediate protection through stimulation of PI3-K/Akt and MAPK signaling in neurons. *Neurochemistry International*, 50(1), 243–250. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2006.08.007>
- Islam, M. T. (2017). Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders. *Neurological Research*, 39(1), 73–82. <https://doi.org/10.1080/01616412.2016.1251711>
- Ito, M., Oliverio, M. I., Mannon, P. J., Best, C. F., Maeda, N., Smithies, O., y Coffman, T. M. (1995). Regulation of blood pressure by the type 1A angiotensin II receptor gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(8), 3521–3525. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.8.3521>
- Jackson, L., Eldahshan, W., Fagan, S. C., y Ergul, A. (2018). Within the brain: The renin angiotensin system. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3), 876. <https://doi.org/10.3390/ijms19030876>

- Jang, S. E., Qiu, L., Chan, L. L., Tan, E. K., y Zeng, L. (2020). Current Status of Stem Cell-Derived Therapies for Parkinson's Disease: From Cell Assessment and Imaging Modalities to Clinical Trials. *Frontiers in Neuroscience*, 14. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.558532>
- Jankovic, J., Goodman, I., Safirstein, B., Marmon, T. K., Schenk, D. B., Koller, M., Zago, W., Ness, D. K., Griffith, S. G., Grundman, M., Soto, J., Ostrowitzki, S., Boess, F. G., Martin-Facklam, M., Quinn, J. F., Isaacson, S. H., Omidvar, O., Ellenbogen, A., y Kinney, G. G. (2018). Safety and Tolerability of Multiple Ascending Doses of PRX002/RG7935, an Anti- $\alpha$ -Synuclein Monoclonal Antibody, in Patients with Parkinson Disease: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Neurology*, 75(10), 1206–1214. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2018.1487>
- Javoy, F., Sotelo, C., Herbet, A., y Agid, Y. (1976). Specificity of dopaminergic neuronal degeneration induced by intracerebral injection of 6-hydroxydopamine in the nigrostriatal dopamine system. *Brain Research*, 102(2), 201–215. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(76\)90877-5](https://doi.org/10.1016/0006-8993(76)90877-5)
- Jaworska, J., Ziemka-Nalecz, M., y Zalewska, T. (2015). Histone deacetylases 1 and 2 are required for brain development. *International Journal of Developmental Biology*, 59(4–6), 171–177. <https://doi.org/10.1387/ijdb.150071tz>
- Jenkins, T. A., Wong, J. Y. F., Howells, D. W., Mendelsohn, F. A. O., y Chai, S. Y. (1999). Effect of chronic angiotensin-converting enzyme inhibition on striatal dopamine content in the MPTP-treated mouse. *Journal of Neurochemistry*, 73(1), 214–219. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1999.0730214.x>
- Jenrow, K. A., Brown, S. L., Liu, J., Kolozsvary, A., Lapanowski, K., y Kim, J. H. (2010). Ramipril mitigates radiation-induced impairment of neurogenesis in the rat dentate gyrus. *Radiation Oncology*, 5(1), 6. <https://doi.org/10.1186/1748-717X-5-6>
- Jiang, J., y Dingledine, R. (2013). Prostaglandin receptor EP2 in the crosshairs of anti-inflammation, anti-cancer, and neuroprotection. *Trends in Pharmacological Sciences*, 34(7), 413–423. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2013.05.003>
- Jing, X., Miwa, H., Sawada, T., Nakanishi, I., Kondo, T., Miyajima, M., y Sakaguchi, K. (2012). Ephrin-A1-mediated dopaminergic neurogenesis and angiogenesis in a rat model of Parkinson's disease. *PLoS ONE*, 7(2), e32019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032019>
- Jobe, E. M., McQuate, A. L., y Zhao, X. (2012). Crosstalk among epigenetic pathways regulates neurogenesis. *Frontiers in Neuroscience*, 6(MAY). <https://doi.org/10.3389/fnins.2012.00059>
- Joglar, B., Rodriguez-Pallares, J., Rodriguez-Perez, A. I., Rey, P., Guerra, M. J., y Labandeira-García, 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>
- Jones, J., Jaramillo-Merchán, J., Bueno, C., Pastor, D., Viso-León, M. C., y Martínez, S. (2010). Mesenchymal stem cells rescue Purkinje cells and improve motor

- functions in a mouse model of cerebellar ataxia. *Neurobiology of Disease*, 40(2), 415–423. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2010.07.001>
- Jose, P. A., Soares-da-Silva, P., Eisner, G. M., y Felder, R. A. (2010). Dopamine and G protein-coupled receptor kinase 4 in the kidney: Role in blood pressure regulation. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1802(12), 1259–1267. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.02.004>
- Kahroba, H., Ramezani, B., Maadi, H., Sadeghi, M. R., Jaberie, H., y Ramezani, F. (2021). The role of Nrf2 in neural stem/progenitors cells: From maintaining stemness and self-renewal to promoting differentiation capability and facilitating therapeutic application in neurodegenerative disease. *Ageing Research Reviews*, 65, 101211. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2020.101211>
- Kalamakis, G., Brüne, D., Ravichandran, S., Bolz, J., Fan, W., Ziebell, F., Stiehl, T., Catalá-Martinez, F., Kupke, J., Zhao, S., Llorens-Bobadilla, E., Bauer, K., Limpert, S., Berger, B., Christen, U., Schmezer, P., Mallm, J. P., Berninger, B., Anders, S., ... Martin-Villalba, A. (2019). Quiescence Modulates Stem Cell Maintenance and Regenerative Capacity in the Aging Brain. *Cell*, 176(6), 1407–1419.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.040>
- Kaneko, N., Sawada, M., y Sawamoto, K. (2017). Mechanisms of neuronal migration in the adult brain. *Journal of Neurochemistry*, 141(6), 835–847. <https://doi.org/10.1111/jnc.14002>
- Kannarkat, G. T., Boss, J. M., y Tansey, M. G. (2013). The role of innate and adaptive immunity in Parkinson's disease. *Journal of Parkinson's Disease*, 3(4), 493–514. <https://doi.org/10.3233/JPD-130250>
- Kaschina, E., Grzesiak, A., Li, J., Foryst-Ludwig, A., Timm, M., Rompe, F., Sommerfeld, M., Kemnitz, U. R., Curato, C., Namsolleck, P., Tschöpe, C., Hallberg, A., Alterman, M., Hucko, T., Paetsch, I., Dietrich, T., Schnackenburg, B., Graf, K., Dahlöf, B., ... Steckelings, U. M. (2008). Angiotensin II type 2 receptor stimulation: A novel option of therapeutic interference with the renin-angiotensin system in myocardial infarction? *Circulation*, 118(24), 2523–2532. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.784868>
- Katsimpardi, L., Litterman, N. K., Schein, P. A., Miller, C. M., Loffredo, F. S., Wojtkiewicz, G. R., Chen, J. W., Lee, R. T., Wagers, A. J., y Rubin, L. L. (2014). Vascular and neurogenic rejuvenation of the aging mouse brain by young systemic factors. *Science*, 344(6184), 630–634. <https://doi.org/10.1126/science.1251141>
- 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 Foltynie, T. (2014). Long-term clinical outcome of fetal cell transplantation for Parkinson's disease: Two case reports. *JAMA Neurology*, 71(1), 83–87. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2013.4749>
- Kehoe, P. G. (2018). The coming of age of the angiotensin hypothesis in Alzheimer's disease: Progress toward disease prevention and treatment? *Journal of Alzheimer's Disease*, 62(3), 1443–1466. <https://doi.org/10.3233/JAD-171119>
- Kemp, J. R., Unal, H., Desnoyer, R., Yue, H., Bhatnagar, A., y Karnik, S. S. (2014).

- Angiotensin II-regulated microRNA 483-3p directly targets multiple components of the renin-angiotensin system. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 75, 25–39. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.06.008>
- Kemp, K., Hares, K., Mallam, E., Heesom, K. J., Scolding, N., y Wilkins, A. (2010). Mesenchymal stem cell-secreted superoxide dismutase promotes cerebellar neuronal survival. *Journal of Neurochemistry*, 114(6), 1569–1580. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06553.x>
- Khacho, M., Clark, A., Svoboda, D. S., Azzi, J., MacLaurin, J. G., Meghaizel, C., Sesaki, H., Lagace, D. C., Germain, M., Harper, M. E., Park, D. S., y Slack, R. S. (2016). Mitochondrial Dynamics Impacts Stem Cell Identity and Fate Decisions by Regulating a Nuclear Transcriptional Program. *Cell Stem Cell*, 19(2), 232–247. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.04.015>
- Khan, F., Špicarová, Z., Zelenin, S., Holtbäck, U., Scott, L., y Aperia, A. (2008). Negative reciprocity between angiotensin II type 1 and dopamine D1 receptors in rat renal proximal tubule cells. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 295(4), F1110–F1116. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.90336.2008>
- Kim, J., y Hematti, P. (2009). Mesenchymal stem cell-educated macrophages: A novel type of alternatively activated macrophages. *Experimental Hematology*, 37(12), 1445–1453. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2009.09.004>
- Kim, M. S., Lee, G. H., Kim, Y. M., Lee, B. W., Nam, H. Y., Sim, U. C., Choo, S. J., Yu, S. W., Kim, J. J., Kwon, Y. K., y Kim, S. W. (2017). Angiotensin II causes apoptosis of adult hippocampal neural stem cells and memory impairment through the action on AMPK-PGC1 $\alpha$  signaling in heart failure. *Stem Cells Translational Medicine*, 6(6), 1491–1503. <https://doi.org/10.1002/sctm.16-0382>
- Kim, Y. J., Park, H. J., Lee, G., Bang, O. Y., Ahn, Y. H., Joe, E., Kim, H. O., y Lee, P. H. (2009). Neuroprotective effects of human mesenchymal stem cells on dopaminergic neurons through anti-inflammatory action. *GLIA*, 57(1), 13–23. <https://doi.org/10.1002/glia.20731>
- Kim, Y., Wang, W. Z., Comte, I., Pastrana, E., Tran, P. B., Brown, J., Miller, R. J., Doetsch, F., Molnár, Z., y Szele, F. G. (2010). Dopamine stimulation of postnatal murine subventricular zone neurogenesis via the D3 receptor. *Journal of Neurochemistry*, 114(3), 750–760. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06799.x>
- Kin, K., Yasuhara, T., Kameda, M., y Date, I. (2019). Animal models for Parkinson's disease research: Trends in the 2000s. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(21), 5402. <https://doi.org/10.3390/ijms20215402>
- Kippin, T. E., Kapur, S., y Van Der Kooy, D. (2005). Dopamine specifically inhibits forebrain neural stem cell proliferation, suggesting a novel effect of antipsychotic drugs. *Journal of Neuroscience*, 25(24), 5815–5823. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1120-05.2005>
- Kirkeby, A., Grealish, S., Wolf, D. A., Nelander, J., Wood, J., Lundblad, M., Lindvall, O., y Parmar, M. (2012). Generation of Regionally Specified Neural Progenitors

- and Functional Neurons from Human Embryonic Stem Cells under Defined Conditions. *Cell Reports*, 1(6), 703–714. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.04.009>
- Kirkeby, A., Parmar, M., y Barker, R. A. (2017). Strategies for bringing stem cell-derived dopamine neurons to the clinic: A European approach (STEM-PD). *Progress in Brain Research*, 230, 165–190. <https://doi.org/10.1016/bs.pbr.2016.11.011>
- Kitada, T., Tomlinson, J. J., Ao, H. S., Grimes, D. A., y Schlossmacher, M. G. (2012). Considerations regarding the etiology and future treatment of autosomal recessive versus idiopathic Parkinson disease. *Current Treatment Options in Neurology*, 14(3), 230–240. <https://doi.org/10.1007/s11940-012-0175-8>
- Klempin, F., Mosienko, V., Matthes, S., Vilella, D. C., Todiras, M., Penninger, J. M., Bader, M., Santos, R. A. S., y Alenina, N. (2018). Depletion of angiotensin-converting enzyme 2 reduces brain serotonin and impairs the running-induced neurogenic response. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(19), 3625–3634. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2815-y>
- Knobloch, M., y Jessberger, S. (2017). Metabolism and neurogenesis. *Current Opinion in Neurobiology*, 42, 45–52. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2016.11.006>
- Kohl, Z., Ben Abdallah, N., Vogelgsang, J., Tischer, L., Deusser, J., Amato, D., Anderson, S., Müller, C. P., Riess, O., Masliah, E., Nuber, S., y Winkler, J. (2016). Severely impaired hippocampal neurogenesis associates with an early serotonergic deficit in a BAC  $\alpha$ -synuclein transgenic rat model of Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*, 85, 206–217. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.10.021>
- Kokovay, E., Goderie, S., Wang, Y., Lotz, S., Lin, G., Sun, Y., Roysam, B., Shen, Q., y Temple, S. (2010). Adult SVZ lineage cells home to and leave the vascular niche via differential responses to SDF1/CXCR4 signaling. *Cell Stem Cell*, 7(2), 163–173. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.05.019>
- Kokovay, E., Wang, Y., Kusek, G., Wurster, R., Lederman, P., Lowry, N., Shen, Q., y Temple, S. (2012). VCAM1 is essential to maintain the structure of the SVZ niche and acts as an environmental sensor to regulate SVZ lineage progression. *Cell Stem Cell*, 11(2), 220–230. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.06.016>
- Kolb, B., Morshead, C., Gonzalez, C., Kim, M., Gregg, C., Shingo, T., y Weiss, S. (2007). Growth factor-stimulated generation of new cortical tissue and functional recovery after stroke damage to the motor cortex of rats. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 27(5), 983–997. <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600402>
- Konala, V. B. R., Mamidi, M. K., Bhonde, R., Das, A. K., Pochampally, R., y Pal, R. (2016). The current landscape of the mesenchymal stromal cell secretome: A new paradigm for cell-free regeneration. *Cytotherapy*, 18(1), 13–24. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2015.10.008>
- Koprach, J. B., Kalia, L. V., y Brotchie, J. M. (2017). Animal models of  $\alpha$ -synucleinopathy for Parkinson disease drug development. *Nature Reviews*

- Neuroscience*, 18(9), 515–529. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.75>
- Kordower, J. H., Chu, Y., Hauser, R. A., Freeman, T. B., y Olanow, C. W. (2008). Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease. *Nature Medicine*, 14(5), 504–506. <https://doi.org/10.1038/nm1747>
- Kowall, N. W., Hantraye, P., Brouillet, E., Beal, M. F., McKee, A. C., y Ferrante, R. J. (2000). MPTP induces alpha-synuclein aggregation in the substantia nigra of baboons. *NeuroReport*, 11(1), 211–213. <https://doi.org/10.1097/00001756-200001170-00041>
- Koyama, Y., Mukuda, T., Hamasaki, S., Nakane, H., y Kaidoh, T. (2018). Short-term Heat Exposure Promotes Hippocampal Neurogenesis via Activation of Angiotensin II Type 1 Receptor in Adult Rats. *Neuroscience*, 385, 121–132. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.05.045>
- Kozell, L. B., y Neve, K. A. (1997). Constitutive activity of a chimeric D2/D1 dopamine receptor. *Molecular Pharmacology*, 52(6), 1137–1149. <https://doi.org/10.1124/mol.52.6.1137>
- Koziele, R., Pircher, H., Kratochwil, M., Lener, B., Hermann, M., Dencher, N. A., y Jansen-Dürr, P. (2013). Mitochondrial respiratory chain complex I is inactivated by NADPH oxidase Nox4. *Biochemical Journal*, 452(2), 231–239. <https://doi.org/10.1042/BJ20121778>
- Krayenbühl, H., Wyss, O. A., y Yasargil, M. G. (1961). Bilateral thalamotomy and pallidotomy as treatment for bilateral Parkinsonism. *Journal of Neurosurgery*, 18(4), 429–444. <https://doi.org/10.3171/jns.1961.18.4.0429>
- Kriks, S., Shim, J. W., Piao, J., Ganat, Y. M., Wakeman, D. R., Xie, Z., Carrillo-Reid, L., Auyeung, G., Antonacci, C., Buch, A., Yang, L., Beal, M. F., Surmeier, D. J., Kordower, J. H., Tabar, V., y Studer, L. (2011). Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease. *Nature*, 480(7378), 547–551. <https://doi.org/10.1038/nature10648>
- Kuruvilla, K. P., Nandhu, M. S., Paul, J., y Paulose, C. S. (2013). Oxidative stress mediated neuronal damage in the corpus striatum of 6-hydroxydopamine lesioned Parkinson's rats: Neuroprotection by Serotonin, GABA and Bone Marrow Cells Supplementation. *Journal of the Neurological Sciences*, 331(1–2), 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2013.04.020>
- Kwon, Y. W., Chung, Y. J., Kim, J., Lee, H. J., Park, J., Roh, T. Y., Cho, H. J., Yoon, C. H., Koo, B. K., y Kim, H. S. (2014). Comparative study of efficacy of dopaminergic neuron differentiation between embryonic stem cell and protein-based induced pluripotent stem cell. *PLoS ONE*, 9(1), e85736. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085736>
- L'Episcopo, F., Tirolo, C., Testa, N., Caniglia, S., Morale, M. C., Deleidi, M., Serapide, M. F., Pluchino, S., y Marchetti, B. (2012). Plasticity of subventricular zone neuroprogenitors in MPTP mouse model of Parkinson's disease involves cross talk between inflammatory and Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathways: Functional consequences for neuroprotection and repair. *Journal of Neuroscience*, 32(6), 2062–2085. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5259->

11.2012

- L'Episcopo, F., Tirolò, C., Testa, N., Caniglia, S., Morale, M. C., Impagnatiello, F., Pluchino, S., y Marchetti, B. (2013). Aging-induced Nrf2-ARE pathway disruption in the subventricular zone drives neurogenic impairment in parkinsonian mice via PI3K-Wnt/ $\beta$ -catenin dysregulation. *Journal of Neuroscience*, 33(4), 1462–1485. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3206-12.2013>
- 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(JULY). <https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00067>
- Labandeira-García, J. L., Rodríguez-Pallares, J., Dominguez-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*, 28(10), 1337–1342. <https://doi.org/10.1002/mds.25614>
- 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(MAY). <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.yfrne.2016.09.003>
- Labandeira-García, J. L., Valenzuela, R., Costa-Besada, M. A., Villar-Cheda, B., y Rodríguez-Perez, A. I. (2021). The intracellular renin-angiotensin system: Friend or foe. Some light from the dopaminergic neurons. *Progress in Neurobiology*, 199, 101919. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2020.101919>
- Lacar, B., Young, S. Z., Platel, J. C., y Bordey, A. (2011). Gap junction-mediated calcium waves define communication networks among murine postnatal neural progenitor cells. *European Journal of Neuroscience*, 34(12), 1895–1905. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07901.x>
- Lamm, O., Ganz, J., Melamed, E., y Offen, D. (2014). Harnessing neurogenesis for the possible treatment of Parkinson's disease. *Journal of Comparative Neurology*, 522(12), 2817–2830. <https://doi.org/10.1002/cne.23607>
- 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*, 219(4587), 979–980. <https://doi.org/10.1126/science.6823561>
- Lao, C. L., Lu, C. S., y Chen, J. C. (2013). Dopamine D3 receptor activation promotes neural stem/progenitor cell proliferation through AKT and ERK1/2 pathways and expands type-B and -C cells in adult subventricular zone. *GLIA*, 61(4), 475–489. <https://doi.org/10.1002/glia.22449>
- Lavoie, J. L., Cassell, M. D., Gross, K. W., y Sigmund, C. D. (2004). Localization of

- renin expressing cells in the brain, by use of a REN-eGFP transgenic model. *Physiological Genomics*, 16(2), 240–246. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00131.2003>
- Le Belle, J. E., Orozco, N. M., Paucar, A. A., Saxe, J. P., Mottahedeh, J., Pyle, A. D., Wu, H., y Kornblum, H. I. (2011). Proliferative neural stem cells have high endogenous ROS levels that regulate self-renewal and neurogenesis in a PI3K/Akt-dependant manner. *Cell Stem Cell*, 8(1), 59–71. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.11.028>
- Lebrun, C., Avci, H. X., Wehrlé, R., Doulazmi, M., Jaudon, F., Morel, M. P., Rivals, I., Ema, M., Schmidt, S., Sotelo, C., Vodjdani, G., y Dusart, I. (2013). Klf9 is necessary and sufficient for Purkinje cell survival in organotypic culture. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 54, 9–21. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2012.11.010>
- 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, E. J., Yoon, H. H., Park, E. S., Min, J., y Jeon, S. R. (2018). A Novel Animal Model of Parkinson's Disease Using Optogenetics: Representation of Various Disease Stages by Modulating the Illumination Parameter. *Stereotactic and Functional Neurosurgery*, 96(1), 22–32. <https://doi.org/10.1159/000486644>
- Lee, Y.-T. C., y Hsu, S.-T. D. (2016). Familial Mutations and Post-translational Modifications of UCH-L1 in Parkinson's Disease and Neurodegenerative Disorders. *Current Protein & Peptide Science*, 18(7), 733–745. <https://doi.org/10.2174/1389203717666160217143721>
- Leeman, D. S., Hebestreit, K., Ruetz, T., Webb, A. E., McKay, A., Pollina, E. A., Dulken, B. W., Zhao, X., Yeo, R. W., Ho, T. T., Mahmoudi, S., Devarajan, K., Passequé, E., Rando, T. A., Frydman, J., y Brunet, A. (2018). Lysosome activation clears aggregates and enhances quiescent neural stem cell activation during aging. *Science*, 359(6381), 1277–1283. <https://doi.org/10.1126/science.aag3048>
- Lehtinen, M. K., y Walsh, C. A. (2011). Neurogenesis at the brain-cerebrospinal fluid interface. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 27(1), 653–679. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154026>
- Lemasson, M., Saghatelian, A., Olivo-Marin, J. C., y Lledo, P. M. (2005). Neonatal and adult neurogenesis provide two distinct populations of newborn neurons to the mouse olfactory bulb. *Journal of Neuroscience*, 25(29), 6816–6825. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1114-05.2005>
- Lenkei, Z., Palkovits, M., Corvol, P., y Llorens-Cortes, C. (1996). Distribution of angiotensin II type-2 receptor (AT2) mRNA expression in the adult rat brain. *Journal of Comparative Neurology*, 373(3), 322–339. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19960923\)373:3<322::AID-CNE2>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19960923)373:3<322::AID-CNE2>3.0.CO;2-4)
- Leonhardt, J., Vilella, D. C., Teichmann, A., Münter, L. M., Mayer, M. C., Mardahl,

- M., Kirsch, S., Namsolleck, P., Lucht, K., Benz, V., Alenina, N., Daniell, N., Horiuchi, M., Iwai, M., Multhaup, G., Schüle, R., Bader, M., Santos, R. A., Unger, T., y Steckelings, U. M. (2017). Evidence for Heterodimerization and Functional Interaction of the Angiotensin Type 2 Receptor and the Receptor MAS. *Hypertension*, 69(6), 1128–1135. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.08814>
- Li, J., Donangelo, I., Abe, K., Scremin, O., Ke, S., Li, F., Milanese, A., Liu, Y. Y., y Brent, G. A. (2017a). Thyroid hormone treatment activates protective pathways in both in vivo and in vitro models of neuronal injury. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 452, 120–130. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.05.023>
- Li, J. M., Mogi, M., Tsukuda, K., Tomochika, H., Iwanami, J., Min, L. J., Nahmias, C., Iwai, M., y Horiuchi, M. (2007). Angiotensin II-induced neural differentiation via angiotensin II type 2 (AT2) receptor-MMS2 cascade involving interaction between AT 2 receptor-interacting protein and Src homology 2 domain-containing protein-tyrosine phosphatase 1. *Molecular Endocrinology*, 21(2), 499–511. <https://doi.org/10.1210/me.2006-0005>
- Li, M., Liu, X., He, Y., Zheng, Q., Wang, M., Wu, Y., Zhang, Y., y Wang, C. (2017b). Celastrol attenuates angiotensin II mediated human umbilical vein endothelial cells damage through activation of Nrf2/ERK1/2/Nox2 signal pathway. *European Journal of Pharmacology*, 797, 124–133. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.01.027>
- Li, Q., Sun, W., Wang, X., Zhang, K., Xi, W., y Gao, P. (2015). Skin-Derived Mesenchymal Stem Cells Alleviate Atherosclerosis via Modulating Macrophage Function. *STEM CELLS Translational Medicine*, 4(11), 1294–1301. <https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0020>
- Li, W., Englund, E., Widner, H., Mattsson, B., Van Westen, D., Lätt, J., Rehncróna, S., Brundin, P., Björklund, A., Lindvall, O., y Li, J. Y. (2016). Extensive graft-derived dopaminergic innervation is maintained 24 years after transplantation in the degenerating parkinsonian brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(23), 6544–6549. <https://doi.org/10.1073/pnas.1605245113>
- Li, X. C., Zhang, J., y Zhuo, J. L. (2017c). The vasoprotective axes of the renin-angiotensin system: Physiological relevance and therapeutic implications in cardiovascular, hypertensive and kidney diseases. *Pharmacological Research*, 125, 21–38. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.06.005>
- Li, X., Rose, S. E., Montine, K. S., Keene, C. D., y Montine, T. J. (2013). Antagonism of neuronal prostaglandin E2 receptor subtype 1 mitigates amyloid  $\beta$  neurotoxicity in vitro. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 8(1), 87–93. <https://doi.org/10.1007/s11481-012-9380-1>
- Lim, D. A., y Alvarez-Buylla, A. (2014). Adult neural stem cells stake their ground. *Trends in Neurosciences*, 37(10), 563–571. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2014.08.006>
- Lim, D. A., Tramontin, A. D., Trevejo, J. M., Herrera, D. G., García-Verdugo, J. M., y Alvarez-Buylla, A. (2000). Noggin antagonizes BMP signaling to create a

- niche for adult neurogenesis. *Neuron*, 28(3), 713–726. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)00148-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)00148-3)
- Limousin, P., Pollak, P., Benazzouz, A., Hoffmann, D., Broussolle, E., Perret, J. E., y Benabid, A. -L. (1995). Bilateral subthalamic nucleus stimulation for severe Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 10(5), 672–674. <https://doi.org/10.1002/mds.870100523>
- Lindvall, O., Brundin, P., Widner, H., Rehnström, S., Gustavii, B., Frackowiak, R., Leenders, K. L., Sawle, G., Rothwell, J. C., Marsden, C. D., y Björklund, A. (1990). Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in Parkinson's disease. *Science*, 247(4942), 574–577. <https://doi.org/10.1126/science.2105529>
- Liu, B. F., Gao, E. J., Zeng, X. Z., Ji, M., Cai, Q., Lu, Q., Yang, H., y Xu, Q. Y. (2006). Proliferation of neural precursors in the subventricular zone after chemical lesions of the nigrostriatal pathway in rat brain. *Brain Research*, 1106(1), 30–39. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.05.111>
- Liu, X., Li, W., Fu, X., y Xu, Y. (2017). The immunogenicity and immune tolerance of pluripotent stem cell derivatives. *Frontiers in Immunology*, 8(JUN). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00645>
- Llorens-Bobadilla, E., Zhao, S., Baser, A., Saiz-Castro, G., Zwadlo, K., y Martín-Villalba, A. (2015). Single-Cell Transcriptomics Reveals a Population of Dormant Neural Stem Cells that Become Activated upon Brain Injury. *Cell Stem Cell*, 17(3), 329–340. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.07.002>
- Lo Furno, D., Mannino, G., y Giuffrida, R. (2018). Functional role of mesenchymal stem cells in the treatment of chronic neurodegenerative diseases. *Journal of Cellular Physiology*, 233(5), 3982–3999. <https://doi.org/10.1002/jcp.26192>
- Lois, C., y Alvarez-Buylla, A. (1994). Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science*, 264(5162), 1145–1148. <https://doi.org/10.1126/science.8178174>
- López-León, M., Outeiro, T. F., y Goya, R. G. (2017). Cell reprogramming: Therapeutic potential and the promise of rejuvenation for the aging brain. *Ageing Research Reviews*, 40, 168–181. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2017.09.002>
- Lopez-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>
- Lundblad, M., Andersson, M., Winkler, C., Kirik, D., Wierup, N., y Cenci Nilsson, M. A. (2002). Pharmacological validation of behavioural measures of akinesia and dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. *European Journal of Neuroscience*, 15(1), 120–132. <https://doi.org/10.1046/j.0953-816x.2001.01843.x>
- Luo, J., Daniels, S. B., Lenington, J. B., Notti, R. Q., y Conover, J. C. (2006). The aging neurogenic subventricular zone. *Aging Cell*, 5(2), 139–152.

- <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2006.00197.x>
- Lushchak, V. I. (2014). Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-Biological Interactions*, 224, 164–175. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.10.016>
- Ma, M. W., Wang, J., Zhang, Q., Wang, R., Dhandapani, K. M., Vadlamudi, R. K., y Brann, D. W. (2017a). NADPH oxidase in brain injury and neurodegenerative disorders. *Molecular Neurodegeneration*, 12(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0150-7>
- Ma, S., Xie, N., Li, W., Yuan, B., Shi, Y., y Wang, Y. (2014). Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell Death and Differentiation*, 21(2), 216–225. <https://doi.org/10.1038/cdd.2013.158>
- Ma, X., Kong, L., y Zhu, S. (2017b). Reprogramming cell fates by small molecules. *Protein and Cell*, 8(5), 328–348. <https://doi.org/10.1007/s13238-016-0362-6>
- Madeo, G., Schirinzi, T., Martella, G., Latagliata, E. C., Puglisi, F., Shen, J., Valente, E. M., Federici, M., Mercuri, N. B., Puglisi-Allegra, S., Bonsi, P., y Pisani, A. (2014). PINK1 heterozygous mutations induce subtle alterations in dopamine-dependent synaptic plasticity. *Movement Disorders*, 29(1), 41–53. <https://doi.org/10.1002/mds.25724>
- Madrazo, I., Drucker-Colín, R., Díaz, V., Martínez-Mata, J., Torres, C., y Becerril, J. J. (1987). Open Microsurgical Autograft of Adrenal Medulla to the Right Caudate Nucleus in Two Patients with Intractable Parkinson's Disease. *New England Journal of Medicine*, 316(14), 831–834. <https://doi.org/10.1056/nejm198704023161402>
- Madrigal, M., Rao, K. S., y Riordan, N. H. (2014). A review of therapeutic effects of mesenchymal stem cell secretions and induction of secretory modification by different culture methods. *Journal of Translational Medicine*, 12(1), 260. <https://doi.org/10.1186/s12967-014-0260-8>
- Magno, L. A. V., Tenza-Ferrer, H., Collodetti, M., Aguiar, M. F. G., Rodrigues, A. P. C., Da Silva, R. S., Do Prado Silva, J., Nicolau, N. F., Rosa, D. V. F., Birbrair, A., Miranda, D. M., y Romano-Silva, M. A. (2019). Optogenetic stimulation of the M2 cortex reverts motor dysfunction in a mouse model of Parkinson's disease. *Journal of Neuroscience*, 39(17), 3234–3248. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2277-18.2019>
- Mahlknecht, P., Seppi, K., y Poewe, W. (2015). The concept of prodromal Parkinson's disease. *Journal of Parkinson's Disease*, 5(4), 681–697. <https://doi.org/10.3233/JPD-150685>
- Mahrouf-Yorgov, M., Augeul, L., Da Silva, C. C., Jourdan, M., Rigolet, M., Manin, S., Ferrera, R., Ovize, M., Henry, A., Guguin, A., Meningaud, J. P., Dubois-Randé, J. L., Motterlini, R., Foresti, R., y Rodriguez, A. M. (2017). Mesenchymal stem cells sense mitochondria released from damaged cells as danger signals to activate their rescue properties. *Cell Death and Differentiation*, 24(7), 1224–1238. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.51>
- Mandler, M., Valera, E., Rockenstein, E., Weninger, H., Patrick, C., Adame, A., Santic, R., Meindl, S., Vigil, B., Smrzka, O., Schneeberger, A., Mattner, F., y

- Masliah, E. (2014). Next-generation active immunization approach for synucleinopathies: Implications for Parkinson's disease clinical trials. *Acta Neuropathologica*, 127(6), 861–879. <https://doi.org/10.1007/s00401-014-1256-4>
- Mannava, S., Zhuang, D. Z., Nair, J. R., Bansal, R., Wawrzyniak, J. A., Zucker, S. N., Fink, E. E., Moparthy, K. C., Hu, Q., Liu, S., Boise, L. H., Lee, K. P., y Nikiforov, M. A. (2012). KLF9 is a novel transcriptional regulator of bortezomib- and LBH589-induced apoptosis in multiple myeloma cells. *Blood*, 119(6), 1450–1458. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-04-346676>
- Marques, C. R., Marote, A., Mendes-Pinheiro, B., Teixeira, F. G., y Salgado, A. J. (2018). Cell secretome based approaches in Parkinson's disease regenerative medicine. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 18(12), 1235–1245. <https://doi.org/10.1080/14712598.2018.1546840>
- Martella, G., Madeo, G., Maltese, M., Vanni, V., Puglisi, F., Ferraro, E., Schirinzi, T., Valente, E. M., Bonanni, L., Shen, J., Mandolesi, G., Mercuri, N. B., Bonsi, P., y Pisani, A. (2016). Exposure to low-dose rotenone precipitates synaptic plasticity alterations in PINK1 heterozygous knockout mice. *Neurobiology of Disease*, 91, 21–36. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.12.020>
- Martínez-Fernández, R., Rodríguez-Rojas, R., del Álamo, M., Hernández-Fernández, F., Pineda-Pardo, J. A., Dileone, M., Alonso-Frech, F., Foffani, G., Obeso, I., Gasca-Salas, C., de Luis-Pastor, E., Vela, L., y Obeso, J. A. (2018). Focused ultrasound subthalamotomy in patients with asymmetric Parkinson's disease: a pilot study. *The Lancet Neurology*, 17(1), 54–63. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30403-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30403-9)
- Martínez-Pinilla, E., Rodríguez-Pérez, A. I., Navarro, G., Aguinaga, D., Moreno, E., Lanciego, J. L., Labandeira-García, J. L., y Franco, R. (2015). Dopamine D2 and angiotensin II type 1 receptors form functional heteromers in rat striatum. *Biochemical Pharmacology*, 96(2), 131–142. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.05.006>
- Martino, G., Pluchino, S., Bonfanti, L., y Schwartz, M. (2011). Brain regeneration in physiology and pathology: The immune signature driving therapeutic plasticity of neural stem cells. *Physiological Reviews*, 91(4), 1281–1304. <https://doi.org/10.1152/physrev.00032.2010>
- Marxreiter, F., Nuber, S., Kandasamy, M., Klucken, J., Aigner, R., Burgmayer, R., Couillard-Despres, S., Riess, O., Winkler, J., y Winner, B. (2009). Changes in adult olfactory bulb neurogenesis in mice expressing the A30P mutant form of alpha-synuclein. *European Journal of Neuroscience*, 29(5), 879–890. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.06641.x>
- Marxreiter, F., Regensburger, M., y Winkler, J. (2013). Adult neurogenesis in Parkinson's disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70(3), 459–473. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1062-x>
- Matarredona, E. R., Talaverón, R., y Pastor, A. M. (2018). Interactions between neural progenitor cells and microglia in the subventricular zone: Physiological implications in the neurogenic niche and after implantation in the injured brain.

- Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12.  
<https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00268>
- McCullough, L., Wu, L., Haughey, N., Liang, X., Hand, T., Wang, Q., Breyer, R. M., y Andreasson, K. (2004). Neuroprotective Function of the PGE2 EP2 Receptor in Cerebral Ischemia. *Journal of Neuroscience*, 24(1), 257–268. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4485-03.2004>
- Meffert, S., Stoll, M., Steckelings, U. M., Bottari, S. P., y Unger, T. (1996). The angiotensin II AT2 receptor inhibits proliferation and promotes differentiation in PC12W cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 122(1), 59–67. [https://doi.org/10.1016/0303-7207\(96\)03873-7](https://doi.org/10.1016/0303-7207(96)03873-7)
- Mendes-Pinheiro, B., Anjo, S. I., Manadas, B., Da Silva, J. D., Marote, A., Behie, L. A., Teixeira, F. G., y Salgado, A. J. (2019). Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells' Secretome Exerts Neuroprotective Effects in a Parkinson's Disease Rat Model. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00294>
- Mendes-Pinheiro, B., Teixeira, F. G., Anjo, S. I., Manadas, B., Behie, L. A., y Salgado, A. J. (2018). Secretome of Undifferentiated Neural Progenitor Cells Induces Histological and Motor Improvements in a Rat Model of Parkinson's Disease. *Stem Cells Translational Medicine*, 7(11), 829–838. <https://doi.org/10.1002/sctm.18-0009>
- Mercier, F., y Douet, V. (2014). Bone morphogenetic protein-4 inhibits adult neurogenesis and is regulated by fractone-associated heparan sulfates in the subventricular zone. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 57–58, 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2014.03.005>
- Meredith, G. E., y Rademacher, D. J. (2011). MPTP mouse models of Parkinson's disease: An update. *Journal of Parkinson's Disease*, 1(1), 19–33. <https://doi.org/10.3233/JPD-2011-11023>
- Merkle, F. T., Fuentealba, L. C., Sanders, T. A., Magno, L., Kessar, N., y Alvarez-Buylla, A. (2014). Adult neural stem cells in distinct microdomains generate previously unknown interneuron types. *Nature Neuroscience*, 17(2), 207–214. <https://doi.org/10.1038/nn.3610>
- Merlo, S., Canonico, P. L., y Sortino, M. A. (2011). Distinct effects of pramipexole on the proliferation of adult mouse sub-ventricular zone-derived cells and the appearance of a neuronal phenotype. *Neuropharmacology*, 60(6), 892–900. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.01.026>
- Mertens, B., Vanderheyden, P., Michotte, Y., y Sarre, S. (2010). The role of the central renin-angiotensin system in Parkinson's disease. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*, 11(1), 49–56. <https://doi.org/10.1177/1470320309347789>
- Mich, J. K., Signer, R. A., Nakada, D., Pineda, A., Burgess, R. J., Vue, T. Y., Johnson, J. E., y Morrison, S. J. (2014). Prospective identification of functionally distinct stem cells and neurosphere-initiating cells in adult mouse forebrain. *ELife*, 2014(3). <https://doi.org/10.7554/eLife.02669>
- Millan, M. A., Jacobowitz, D. M., Aguilera, G., y Catt, K. J. (1991). Differential

- distribution of AT1 and AT2 angiotensin II receptor subtypes in the rat brain during development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(24), 11440–11444. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.24.11440>
- Milosevic, J., Schwarz, S. C., Maisel, M., Poppe-Wagner, M., Dieterlen, M. T., Storch, A., y Schwarz, J. (2007). Dopamine D2/D3 receptor stimulation fails to promote dopaminergic neurogenesis of murine and human midbrain-derived neural precursor cells in vitro. *Stem Cells and Development*, 16(4), 625–635. <https://doi.org/10.1089/scd.2006.0113>
- Ming, G. li, y Song, H. (2011). Adult Neurogenesis in the Mammalian Brain: Significant Answers and Significant Questions. *Neuron*, 70(4), 687–702. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.05.001>
- Mínguez-Castellanos, A., Escamilla-Sevilla, F., Hotton, G. R., Toledo-Aral, J. J., Ortega-Moreno, Á., Méndez-Ferrer, S., Martín-Linares, J. M., Katati, M. J., Mir, P., Villadiego, J., Meersmans, M., Pérez-García, M., Brooks, D. J., Arjona, V., y López-Barneo, J. (2007). Carotid body autotransplantation in Parkinson disease: A clinical and positron emission tomography study. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 78(8), 825–831. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2006.106021>
- Mirzadeh, Z., Merkle, F. T., Soriano-Navarro, M., Garcia-Verdugo, J. M., y Alvarez-Buylla, A. (2008). Neural Stem Cells Confer Unique Pinwheel Architecture to the Ventricular Surface in Neurogenic Regions of the Adult Brain. *Cell Stem Cell*, 3(3), 265–278. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.07.004>
- Mitchell, I. J., Clarke, C. E., Boyce, S., Robertson, R. G., Peggs, D., Sambrook, M. A., y Crossman, A. R. (1989). Neural mechanisms underlying parkinsonian symptoms based upon regional uptake of 2-deoxyglucose in monkeys exposed to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Neuroscience*, 32(1), 213–226. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(89\)90120-6](https://doi.org/10.1016/0306-4522(89)90120-6)
- Mohan, S., Narumiya, S., y Doré, S. (2015). Neuroprotective role of prostaglandin PGE2 EP2 receptor in hemin-mediated toxicity. *Neurotoxicology*, 46, 53–59. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2014.10.012>
- Mohapel, P., Frielingsdorf, H., Häggblad, J., Zachrisson, O., y Brundin, P. (2005). Platelet-Derived Growth Factor (PDGF-BB) and Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) induce striatal neurogenesis in adult rats with 6-hydroxydopamine lesions. *Neuroscience*, 132(3), 767–776. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.11.056>
- Moloney, T. C., Dockery, P., Windebank, A. J., Barry, F. P., Howard, L., y Dowd, E. (2010). Survival and immunogenicity of mesenchymal stem cells from the green fluorescent protein transgenic rat in the adult rat brain. *Neurorehabilitation and Neural Repair*, 24(7), 645–656. <https://doi.org/10.1177/1545968309357745>
- Moosa, S., Martínez-Fernández, R., Elias, W. J., del Alamo, M., Eisenberg, H. M., y Fishman, P. S. (2019). The role of high-intensity focused ultrasound as a symptomatic treatment for Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 34(9), 1243–1251. <https://doi.org/10.1002/mds.27779>

- Mori, H., Ninomiya, K., Kino-Oka, M., Shofuda, T., Islam, M. O., Yamasaki, M., Okano, H., Taya, M., y Kanemura, Y. (2006). Effect of neurosphere size on the growth rate of human neural stem/progenitor cells. *Journal of Neuroscience Research*, 84(8), 1682–1691. <https://doi.org/10.1002/jnr.21082>
- Morton, M. C., Neckles, V. N., Seluzicki, C. M., Holmberg, J. C., y Feliciano, D. M. (2018). Neonatal Subventricular Zone Neural Stem Cells Release Extracellular Vesicles that Act as a Microglial Morphogen. *Cell Reports*, 23(1), 78–89. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.037>
- Mosher, K. I., Andres, R. H., Fukuhara, T., Bieri, G., Hasegawa-Moriyama, M., He, Y., Guzman, R., y Wyss-Coray, T. (2012). Neural progenitor cells regulate microglia functions and activity. *Nature Neuroscience*, 15(11), 1485–1487. <https://doi.org/10.1038/nn.3233>
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Mukuda, T., Koyama, Y., Hamasaki, S., Kaidoh, T., y Furukawa, Y. (2014). Systemic angiotensin II and exercise-induced neurogenesis in adult rat hippocampus. *Brain Research*, 1588, 92–103. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.09.019>
- Mulcahy, P., O’Doherty, A., Paucard, A., O’Brien, T., Kirik, D., y Dowd, E. (2013). The behavioural and neuropathological impact of intranigral AAV- $\alpha$ -synuclein is exacerbated by systemic infusion of the Parkinson’s disease-associated pesticide, rotenone, in rats. *Behavioural Brain Research*, 243(1), 6–15. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.12.051>
- 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-Sáez, E., de Munck García, E., Arahuetes Portero, R. M., Vicente, F., Ortiz-López, F. J., Cantizani, J., y Miguel, B. G. (2015). Neuroprotective role of sphingosine-1-phosphate in L-BMAA treated neuroblastoma cells (SH-SY5Y). *Neuroscience Letters*, 593, 83–89. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.03.010>
- 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 $\beta$ . *Experimental Neurology*, 261, 720–732. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.08.019>
- Muñoz, A., Rey, P., Guerra, M. J., Mendez-Alvarez, E., Soto-Otero, R., y Labandeira-García, 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>
- Nakagawara, A., Azar, C. G., Scavarda, N. J., y Brodeur, G. M. (1994). Expression and function of TRK-B and BDNF in human neuroblastomas. *Molecular and Cellular Biology*, 14(1), 759–767. <https://doi.org/10.1128/mcb.14.1.759-767.1994>
- Nakaguchi, K., Jinnou, H., Kaneko, N., Sawada, M., Hikita, T., Saitoh, S., Tabata, Y.,

- y Sawamoto, K. (2012). Growth factors released from gelatin hydrogel microspheres increase new neurons in the adult mouse brain. *Stem Cells International*, 2012, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2012/915160>
- Nalls, M. A., Blauwendraat, C., Vallerga, C. L., Heilbron, K., Bandres-Ciga, S., Chang, D., Tan, M., Kia, D. A., Noyce, A. J., Xue, A., Bras, J., Young, E., von Coelln, R., Simón-Sánchez, J., Schulte, C., Sharma, M., Krohn, L., Pihlstrøm, L., Siitonen, A., ... Zhang, F. (2019). Identification of novel risk loci, causal insights, and heritable risk for Parkinson's disease: a meta-analysis of genome-wide association studies. *The Lancet Neurology*, 18(12), 1091–1102. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(19\)30320-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(19)30320-5)
- Naor, D., Sionov, R. V., y Ish-Shalom, D. (1997). CD44: Structure, function, and association with the malignant process. *Advances in Cancer Research*, 71, 241–319. [https://doi.org/10.1016/s0065-230x\(08\)60101-3](https://doi.org/10.1016/s0065-230x(08)60101-3)
- Napoli, E. (2017). Endogenous repair mechanisms enhanced in Parkinson's disease following stem cell therapy. *Brain Circulation*, 3(3), 163. [https://doi.org/10.4103/bc.bc\\_22\\_17](https://doi.org/10.4103/bc.bc_22_17)
- Nasrolahi, A., Mahmoudi, J., Karimipour, M., Akbarzadeh, A., Sadigh-Eteghad, S., Salehi, R., Farajdokht, F., y Farhoudi, M. (2019). Effect of cerebral dopamine neurotrophic factor on endogenous neural progenitor cell migration in a rat model of Parkinson's disease. *EXCLI Journal*, 18, 139–153. <https://doi.org/10.17179/excli2018-1959>
- Nikolova, S., Lee, Y. S., Lee, Y. S., y Kim, J. A. (2005). Rac1-NADPH oxidase-regulated generation of reactive oxygen species mediates glutamate-induced apoptosis in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Free Radical Research*, 39(12), 1295–1304. <https://doi.org/10.1080/10715760500176866>
- Nogawa, S., Zhang, F., Elizabeth Ross, M., y Iadecola, C. (1997). Cyclo-oxygenase-2 gene expression in neurons contributes to ischemic brain damage. *Journal of Neuroscience*, 17(8), 2746–2755. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.17-08-02746.1997>
- Nolbrant, S., Giacomoni, J., Hoban, D. B., Bruzelius, A., Birtele, M., Chandler-Militello, D., Pereira, M., Ottosson, D. R., Goldman, S. A., y Parmar, M. (2020). Direct Reprogramming of Human Fetal- and Stem Cell-Derived Glial Progenitor Cells into Midbrain Dopaminergic Neurons. *Stem Cell Reports*, 15(4), 869–882. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2020.08.013>
- Nolbrant, S., Heuer, A., Parmar, M., y Kirkeby, A. (2017). Generation of high-purity human ventral midbrain dopaminergic progenitors for in vitro maturation and intracerebral transplantation. *Nature Protocols*, 12(9), 1962–1979. <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.078>
- Numan, S., Gall, C. M., y Seroogy, K. B. (2005). Developmental expression of neurotrophins and their receptors in postnatal rat ventral midbrain. *Journal of Molecular Neuroscience*, 27(2), 245–260. <https://doi.org/10.1385/JMN:27:2:245>
- Nuyt, A. M., Lenkei, Z., Corvol, P., Palkovits, M., y Llorens-Cortés, C. (2001). Ontogeny of angiotensin II type 1 receptor mRNAs in fetal and neonatal rat

- brain. *Journal of Comparative Neurology*, 440(2), 192–203. <https://doi.org/10.1002/cne.1379>
- O’Keeffe, Gráinne C., Barker, R. A., y Caldwell, M. A. (2009a). Dopaminergic modulation of neurogenesis in the subventricular zone of the adult brain. *Cell Cycle*, 8(18), 2888–2894. <https://doi.org/10.4161/cc.8.18.9512>
- O’Keeffe, Gráinne C., Tyers, P., Aarsland, D., Dalley, J. W., Barker, R. A., y Caldwell, M. A. (2009b). Dopamine-induced proliferation of adult neural precursor cells in the mammalian subventricular zone is mediated through EGF. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(21), 8754–8759. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803955106>
- Obermüller, N., Gentili, M., Gauer, S., Gretz, N., Weigel, M., Geiger, H., y Gassler, N. (2004). Immunohistochemical and mRNA Localization of the Angiotensin II Receptor Subtype 2 (AT2) in Follicular Granulosa Cells of the Rat Ovary. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 52(4), 545–548. <https://doi.org/10.1177/002215540405200413>
- Obernier, K., y Alvarez-Buylla, A. (2019). Neural stem cells: Origin, heterogeneity and regulation in the adult mammalian brain. *Development*, 146(4), dev156059. <https://doi.org/10.1242/dev.156059>
- Obernier, K., Cebrian-Silla, A., Thomson, M., Parraguez, J. I., Anderson, R., Guinto, C., Rodas Rodriguez, J., Garcia-Verdugo, J. M., y Alvarez-Buylla, A. (2018). Adult Neurogenesis Is Sustained by Symmetric Self-Renewal and Differentiation. *Cell Stem Cell*, 22(2), 221–234.e8. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.01.003>
- Odekerken, V. J. J., Boel, J. A., Schmand, B. A., De Haan, R. J., Figuee, M., Van Den Munckhof, P., Schuurman, P. R., y De Bie, R. M. A. (2016). GPI vs STN deep brain stimulation for Parkinson disease. *Neurology*, 86(8), 755–761. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000002401>
- Offen, D., Barhum, Y., Levy, Y. S., Burshtein, A., Panet, H., Cherlow, T., y Melamed, E. (2007). Intrastratial transplantation of mouse bone marrow-derived stem cells improves motor behavior in a mouse model of Parkinson’s disease. *Journal of Neural Transmission, Supplementa*, 72, 133–143. [https://doi.org/10.1007/978-3-211-73574-9\\_16](https://doi.org/10.1007/978-3-211-73574-9_16)
- Ohtani, N., Goto, T., Waeber, C., y Bhide, P. G. (2003). Dopamine modulates cell cycle in the lateral ganglionic eminence. *Journal of Neuroscience*, 23(7), 2840–2850. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-07-02840.2003>
- Okita, K., Ichisaka, T., y Yamanaka, S. (2007). Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*, 448(7151), 313–317. <https://doi.org/10.1038/nature05934>
- Olanow, C. W., Factor, S. A., Espay, A. J., Hauser, R. A., Shill, H. A., Isaacson, S., Pahwa, R., Leinonen, M., Bhargava, P., Sciarappa, K., Navia, B., Blum, D., y Xx, X. (2020). Apomorphine sublingual film for off episodes in Parkinson’s disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 study. *The Lancet Neurology*, 19(2), 135–144. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(19\)30396-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(19)30396-5)

- 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>
- Ortiz-Álvarez, G., Daclin, M., Shihavuddin, A., Lansade, P., Fortoul, A., Faucourt, M., Clavreul, S., Lalioti, M. E., Taraviras, S., Hippenmeyer, S., Livet, J., Meunier, A., Genovesio, A., y Spassky, N. (2019). Adult Neural Stem Cells and Multiciliated Ependymal Cells Share a Common Lineage Regulated by the Geminin Family Members. *Neuron*, *102*(1), 159–172. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.01.051>
- Osborn, T. M., Hallett, P. J., Schumacher, J. M., y Isacson, O. (2020). Advantages and Recent Developments of Autologous Cell Therapy for Parkinson's Disease Patients. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *14*. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00058>
- Ottone, C., Krusche, B., Whitby, A., Clements, M., Quadrato, G., Pitulescu, M. E., Adams, R. H., y Parrinello, S. (2014). Direct cell-cell contact with the vascular niche maintains quiescent neural stem cells. *Nature Cell Biology*, *16*(11), 1045–1056. <https://doi.org/10.1038/ncb3045>
- Panicker, N., Ge, P., Dawson, V. L., y Dawson, T. M. (2021). The cell biology of Parkinson's disease. *The Journal of Cell Biology*, *220*(4). <https://doi.org/10.1083/jcb.202012095>
- Parga, J. A., Rodríguez-Pallares, J., Joglar, B., Diaz-Ruiz, C., Guerra, M. J., y Labandeira-Garcia, J. L. (2010). Effect of inhibitors of NADPH oxidase complex and mitochondrial ATP-sensitive potassium channels on generation of dopaminergic neurons from neurospheres of mesencephalic precursors. *Developmental Dynamics*, *239*(12), 3247–3259. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22474>
- Park, I. H., Zhao, R., West, J. A., Yabuuchi, A., Huo, H., Ince, T. A., Lerou, P. H., Lensch, M. W., y Daley, G. Q. (2008). Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature*, *451*(7175), 141–146. <https://doi.org/10.1038/nature06534>
- Parkin, S., Nandi, D., Giladi, N., Joint, C., Gregory, R., Bain, P., Scott, R., y Aziz, T. Z. (2002). Lesioning the subthalamic nucleus in the treatment of Parkinson's disease. *Stereotactic and Functional Neurosurgery*, *77*(1–4), 68–72. <https://doi.org/10.1159/000064599>
- Parkinson, J. (1817). *An Essay on the Shaking Palsy* (Sherwood, Neely, y Jones (eds.); Vol. 14, Issue 2). <http://psychiatryonline.org/doi/abs/10.1176/jnp.14.2.223>
- Parmar, M., Grealish, S., y Henchcliffe, C. (2020). The future of stem cell therapies for Parkinson disease. *Nature Reviews Neuroscience*, *21*(2), 103–115. <https://doi.org/10.1038/s41583-019-0257-7>
- Parras, C. M., Galli, R., Britz, O., Soares, S., Galichet, C., Battiste, J., Johnson, J. E., Nakafaku, M., Vescovi, A., y Guillemot, F. (2004). Mash1 specifies neurons and oligodendrocytes in the postnatal brain. *EMBO Journal*, *23*(22), 4495–

4505. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600447>
- Patel, S. N., Ali, Q., Samuel, P., Steckelings, U. M., y Hussain, T. (2017). Angiotensin II type 2 receptor and receptor mas are colocalized and functionally interdependent in obese Zucker rat kidney. *Hypertension*, 70(4), 831–838. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.09679>
- Pathania, M., Yan, L. D., y Bordey, A. (2010). A symphony of signals conducts early and late stages of adult neurogenesis. *Neuropharmacology*, 58(6), 865–876. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2010.01.010>
- Paul, G., Zachrisson, O., Varrone, A., Almqvist, P., Jerling, M., Lind, G., Rehncrona, S., Linderoth, B., Bjartmarz, H., Shafer, L. L., Coffey, R., Svensson, M., Mercer, K. J., Forsberg, A., Halldin, C., Svenningsson, P., Widner, H., Frisé, J., Pålhagen, S., y Haegerstrand, A. (2015). Safety and tolerability of intracerebroventricular PDGF-BB in Parkinson's disease patients. *Journal of Clinical Investigation*, 125(3), 1339–1346. <https://doi.org/10.1172/JCI79635>
- Paxinos, G., y Watson, C. (1998). *The Rat Brain in Stereotaxic coordinates* (2nd ed). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(87\)90017-8](https://doi.org/10.1016/0166-2236(87)90017-8)
- Peng, J., Xie, L., Jin, K., Greenberg, D. A., y Andersen, J. K. (2008). Fibroblast growth factor 2 enhances striatal and nigral neurogenesis in the acute 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease. *Neuroscience*, 153(3), 664–670. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.02.063>
- Peng, Jun, y Andersen, J. K. (2011). Mutant  $\alpha$ -synuclein and aging reduce neurogenesis in the acute 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease. *Aging Cell*, 10(2), 255–262. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2010.00656.x>
- Penttinen, A. M., Suleymanova, I., Albert, K., Anttila, J., Voutilainen, M. H., y Airavaara, M. (2016). Characterization of a new low-dose 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease in rat. *Journal of Neuroscience Research*, 94(4), 318–328. <https://doi.org/10.1002/jnr.23708>
- Perez-Villalba, A., Sirerol-Piquer, M. S., Belenguer, G., Soriano-Cantón, R., Muñoz-Manchado, A. B., Villadiego, J., Alarcón-Arís, D., Soria, F. N., Dehay, B., Bezard, E., Vila, M., Bortolozzi, A., Toledo-Aral, J. J., Pérez-Sánchez, F., y Fariñas, I. (2018). Synaptic regulator  $\alpha$ -synuclein in dopaminergic fibers is essentially required for the maintenance of subependymal neural stem cells. *Journal of Neuroscience*, 38(4), 814–825. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2276-17.2017>
- Petit, G. H., Olsson, T. T., y Brundin, P. (2014). The future of cell therapies and brain repair: Parkinson's disease leads the way. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 40(1), 60–70. <https://doi.org/10.1111/nan.12110>
- Phillips, M. I., y De Oliveira, E. M. (2008). Brain renin angiotensin in disease. *Journal of Molecular Medicine*, 86(6), 715–722. <https://doi.org/10.1007/s00109-008-0331-5>
- Piao, J., Zabierowski, S., Dubose, B. N., Hill, E. J., Navare, M., Claros, N., Rosen, S., Ramnarine, K., Horn, C., Fredrickson, C., Wong, K., Safford, B., Kriks, S., El

- Maarouf, A., Rutishauser, U., Henchcliffe, C., Wang, Y., Riviere, I., Mann, S., ... Tabar, V. (2021). Preclinical Efficacy and Safety of a Human Embryonic Stem Cell-Derived Midbrain Dopamine Progenitor Product, MSK-DA01. *Cell Stem Cell*, 28(2), 217-229.e7. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2021.01.004>
- Piccini, P., Brooks, D. J., Björklund, A., Gunn, R. N., Grasby, P. M., Rimoldi, O., Brundin, P., Hagell, P., Rehncrona, S., Widner, H., y Lindvall, O. (1999). Dopamine release from nigral transplants visualized in vivo in a Parkinson's patient. *Nature Neuroscience*, 2(12), 1137-1140. <https://doi.org/10.1038/16060>
- Picconi, B., Hernández, L. F., Obeso, J. A., y Calabresi, P. (2018). Motor complications in Parkinson's disease: Striatal molecular and electrophysiological mechanisms of dyskinesias. *Movement Disorders*, 33(6), 867-876. <https://doi.org/10.1002/mds.27261>
- Pickrell, A. M., y Youle, R. J. (2015). The roles of PINK1, Parkin, and mitochondrial fidelity in Parkinson's disease. *Neuron*, 85(2), 257-273. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.12.007>
- Ping, G., Qian, W., Song, G., y Zhaochun, S. (2014). Valsartan reverses depressive/anxiety-like behavior and induces hippocampal neurogenesis and expression of BDNF protein in unpredictable chronic mild stress mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 124, 5-12. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2014.05.006>
- Piquet, A. L., Venkiteswaran, K., Marupudi, N. I., Berk, M., y Subramanian, T. (2012). The immunological challenges of cell transplantation for the treatment of Parkinson's disease. *Brain Research Bulletin*, 88(4), 320-331. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2012.03.001>
- Piroth, T., Pauly, M. C., Schneider, C., Wittmer, A., Möllers, S., Döbrössy, M., Winkler, C., y Nikkhah, G. (2014). Transplantation of human fetal tissue for neurodegenerative diseases: Validation of a new protocol for microbiological analysis and bacterial decontamination. *Cell Transplantation*, 23(8), 995-1007. <https://doi.org/10.3727/096368913X666449>
- Pistollato, F., Canovas-Jorda, D., Zagoura, D., y Bal-Price, A. (2017). Nrf2 pathway activation upon rotenone treatment in human iPSC-derived neural stem cells undergoing differentiation towards neurons and astrocytes. *Neurochemistry International*, 108, 457-471. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2017.06.006>
- Platel, J. C., y Bordey, A. (2016). The multifaceted subventricular zone astrocyte: From a metabolic and pro-neurogenic role to acting as a neural stem cell. *Neuroscience*, 323, 20-28. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.10.053>
- Platel, J. C., Lacar, B., y Bordey, A. (2007). GABA and glutamate signaling: Homeostatic control of adult forebrain neurogenesis. *Journal of Molecular Histology*, 38(6), 601-610. <https://doi.org/10.1007/s10735-007-9153-y>
- Platel, J. C., Stamboulian, S., Nguyen, I., y Bordey, A. (2010). Neurotransmitter signaling in postnatal neurogenesis: The first leg. *Brain Research Reviews*, 63(1-2), 60-71. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2010.02.004>
- Poewe, W., y Antonini, A. (2015). Novel formulations and modes of delivery of levodopa. *Movement Disorders*, 30(1), 114-120.

- <https://doi.org/10.1002/mds.26078>
- Poewe, W., Seppi, K., Tanner, C. M., Halliday, G. M., Brundin, P., Volkman, J., Schrag, A. E., y Lang, A. E. (2017). Parkinson disease. *Nature Reviews Disease Primers*, 3(1), 1–21. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.13>
- Ponti, G. P., Obernier, K., y Alvarez-Buylla, A. (2013). Lineage progression from stem cells to new neurons in the adult brain ventricular-subventricular zone. *Cell Cycle*, 12(11), 1649–1650. <https://doi.org/10.4161/cc.24984>
- Pringsheim, T., Jette, N., Frolkis, A., y Steeves, T. D. L. (2014). The prevalence of Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. *Movement Disorders*, 29(13), 1583–1590. <https://doi.org/10.1002/mds.25945>
- Przedborski, S., Jackson-Lewis, V., Naini, A. B., Jakowec, M., Petzinger, G., Miller, R., y Akram, M. (2001). The parkinsonian toxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): A technical review of its utility and safety. *Journal of Neurochemistry*, 76(5), 1265–1274. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00183.x>
- Pyszko, J. A., y Strosznajder, J. B. (2014). The key role of sphingosine kinases in the molecular mechanism of neuronal cell survival and death in an experimental model of Parkinson's disease. *Folia Neuropathologica*, 52(3), 260–269. <https://doi.org/10.5114/fn.2014.45567>
- Ramón y Cajal, S. (1913). *Estudios sobre la degeneración y regeneración del sistema nervioso* (J. DeFelipe y E. G. Jones (eds.)). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780195065169.001.0001>
- Ramos, A. D., Andersen, R. E., Liu, S. J., Nowakowski, T. J., Hong, S. J., Gertz, C. C., Salinas, R. D., Zarabi, H., Kriegstein, A. R., y Lim, D. A. (2015). The long noncoding RNA Pnky regulates neuronal differentiation of embryonic and postnatal neural stem cells. *Cell Stem Cell*, 16(4), 439–447. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.02.007>
- Ramos, A. D., Diaz, A., Nellore, A., Delgado, R. N., Park, K. Y., Gonzales-Roybal, G., Oldham, M. C., Song, J. S., y Lim, D. A. (2013). Integration of genome-wide approaches identifies lncRNAs of adult neural stem cells and their progeny in vivo. *Cell Stem Cell*, 12(5), 616–628. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.03.003>
- Raniga, P. V., Di Trapani, G., y Tonissen, K. F. (2017). The multifaceted roles of DJ-1 as an antioxidant. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 1037, pp. 67–87). [https://doi.org/10.1007/978-981-10-6583-5\\_6](https://doi.org/10.1007/978-981-10-6583-5_6)
- Ransohoff, R. M. (2016). How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. *Science*, 353(6301), 777–783. <https://doi.org/10.1126/science.aag2590>
- Rath, A., Klein, A., Papazoglou, A., Pruszk, J., Garcia, J., Krause, M., Maciaczyk, J., Dunnett, S. B., y Nikkhah, G. (2013). Survival and functional restoration of human fetal ventral mesencephalon following transplantation in a rat model of Parkinson's disease. *Cell Transplantation*, 22(7), 1281–1293. <https://doi.org/10.3727/096368912X654984>
- Regenhardt, R. W., Desland, F., Mecca, A. P., Pioquinto, D. J., Afzal, A., Mocco, J., y Summers, C. (2013). Anti-inflammatory effects of angiotensin-(1-7) in

- ischemic stroke. *Neuropharmacology*, 71, 154–163. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.03.025>
- 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>
- Ribeiro Xavier, A. L., Kress, B. T., Goldman, S. A., De Lacerda Menezes, J. R., y Nedergaard, M. (2015). A distinct population of microglia supports adult neurogenesis in the subventricular zone. *Journal of Neuroscience*, 35(34), 11848–11861. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1217-15.2015>
- Rivas-Santisteban, R., Rodriguez-Perez, A. I., Muñoz, A., Reyes-Resina, I., Labandeira-García, J. L., Navarro, G., y Franco, R. (2020). Angiotensin AT1 and AT2 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>
- Rodgers, K. E., Xiong, S., Steer, R., y DiZerega, G. S. (2000). Effect of Angiotensin II on Hematopoietic Progenitor Cell Proliferation. *Stem Cells*, 18(4), 287–294. <https://doi.org/10.1634/stemcells.18-4-287>
- Rodriguez-Pallares, J., Caruncho, H. J., Muñoz, A., Guerra, M. J., y Labandeira-Garcia, J. L. (2000). GABA(A) receptor subunit expression in intrastriatal ventral mesencephalic transplants. *Experimental Brain Research*, 135(3), 331–340. <https://doi.org/10.1007/s002210000537>
- Rodriguez-Pallares, J., Joglar, B., Muñoz-Manchado, A. B., Villadiego, J., Toledo-Aral, J. J., y Labandeira-Garcia, J. L. (2012a). Cograftering of carotid body cells improves the long-term survival, fiber outgrowth and functional effects of grafted dopaminergic neurons. *Regenerative Medicine*, 7(3), 309–322. <https://doi.org/10.2217/rme.12.22>
- Rodriguez-Pallares, J., Parga, J. A., Joglar, B., Guerra, M. J., y Labandeira-Garcia, 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>
- Rodriguez-Pallares, J., Parga, J. A., Joglar, B., Guerra, M. J., y Labandeira-Garcia, J. L. (2012b). Mitochondrial ATP-sensitive potassium channels enhance angiotensin-induced oxidative damage and dopaminergic neuron degeneration. Relevance for aging-associated susceptibility to Parkinson's disease. *Age*, 34(4), 863–880. <https://doi.org/10.1007/s11357-011-9284-7>

- Rodriguez-Pallares, J., Parga, J. A., Muñoz, A., Rey, P., Guerra, M. J., y Labandeira-Garcia, 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>
- Rodriguez-Pallares, J., Quiroz, C. R., Parga, J. A., Guerra, M. J., y Labandeira-Garcia, J. L. (2004). Angiotensin II increases differentiation of dopaminergic neurons from mesencephalic precursors via angiotensin type 2 receptors. *European Journal of Neuroscience*, *20*(6), 1489–1498. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03621.x>
- Rodriguez-Pallares, J., Rey, P., Parga, J. A., Muñoz, A., Guerra, M. J., y Labandeira-Garcia, 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>
- Rodríguez-Pallares, J., Rey, P., Soto-Otero, R., y Labandeira-Garcia, J. L. (2001). N-acetylcysteine enhances production of dopaminergic neurons from mesencephalic-derived precursor cells. *NeuroReport*, *12*(18), 3935–3938. <https://doi.org/10.1097/00001756-200112210-00016>
- 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. (2015a). 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., Borrajo, A., Valenzuela, R., Lanciego, J. L., y Labandeira-Garcia, J. L. (2015b). Critical period for dopaminergic neuroprotection by hormonal replacement in menopausal rats. *Neurobiology of Aging*, *36*(2), 1194–1208. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.10.028>
- Rodriguez-Perez, A. I., Dominguez-Mejjide, A., Lanciego, J. L., Guerra, M. J., y Labandeira-Garcia, J. L. (2013). Dopaminergic degeneration is enhanced by chronic brain hypoperfusion and inhibited by angiotensin receptor blockage. *Age*, *35*(5), 1675–1690. <https://doi.org/10.1007/s11357-012-9470-2>
- 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*, *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*, *135*(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>
- Rojo, A. I., Innamorato, N. G., Martín-Moreno, A. M., De Ceballos, M. L., Yamamoto, M., y Cuadrado, A. (2010). Nrf2 regulates microglial dynamics and neuroinflammation in experimental Parkinson's disease. *GLIA*, *58*(5), 588–598. <https://doi.org/10.1002/glia.20947>
- Ron, D., Brasier, A. R., y Habener, J. F. (1990). Transcriptional regulation of hepatic angiotensinogen gene expression by the acute-phase response. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *74*(3), C97–C104. [https://doi.org/10.1016/0303-7207\(90\)90221-S](https://doi.org/10.1016/0303-7207(90)90221-S)
- Rong, Y., Liu, W., Wang, J., Fan, J., Luo, Y., Li, L., Kong, F., Chen, J., Tang, P., y Cai, W. (2019). Neural stem cell-derived small extracellular vesicles attenuate apoptosis and neuroinflammation after traumatic spinal cord injury by activating autophagy. *Cell Death and Disease*, *10*(5), 340. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1571-8>
- Rossi, D., Pianta, S., Magatti, M., Sedlmayr, P., y Parolini, O. (2012). Characterization of the Conditioned Medium from Amniotic Membrane Cells: Prostaglandins as Key Effectors of Its Immunomodulatory Activity. *PLoS ONE*, *7*(10), e46956. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046956>
- Roybon, L., Deierborg, T., Brundin, P., y Li, J. Y. (2009). Involvement of Ngn2, Tbr and NeuroD proteins during postnatal olfactory bulb neurogenesis. *European Journal of Neuroscience*, *29*(2), 232–243. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06595.x>
- Ruiz-Ortega, M., Esteban, V., Suzuki, Y., Ruperez, M., Mezzano, S., Ardiles, L., Justo, P., Ortiz, A., y Egido, J. (2003). Renal expression of angiotensin type 2 (AT2) receptors during kidney damage. *Kidney International, Supplement*, *64*(86), S21–S26. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.64.s86.5.x>
- Ruiz i Altaba, A., Nguyê n, V., y Palma, V. (2003). The emergent design of the neural tube: Prepattern, SHH morphogen and GLI code. *Current Opinion in Genetics and Development*, *13*(5), 513–521. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2003.08.005>
- Rygiel, K. (2016). Can angiotensin-converting enzyme inhibitors impact cognitive decline in early stages of Alzheimer's disease? An overview of research evidence in the elderly patient population. *Journal of Postgraduate Medicine*, *62*(4), 242–248. <https://doi.org/10.4103/0022-3859.188553>
- Salari, S., y Bagheri, M. (2019). In vivo, in vitro and pharmacologic models of Parkinson's disease. *Physiological Research*, *68*(1), 17–24.

- <https://doi.org/10.33549/physiolres.933895>
- Sánchez-Danés, A., Richaud-Patin, Y., Carballo-Carbajal, I., Jiménez-Delgado, S., Caig, C., Mora, S., Di Guglielmo, C., Ezquerra, M., Patel, B., Giralt, A., Canals, J. M., Memo, M., Alberch, J., López-Barneo, J., Vila, M., Cuervo, A. M., Tolosa, E., Consiglio, A., y Raya, A. (2012). Disease-specific phenotypes in dopamine neurons from human iPS-based models of genetic and sporadic Parkinson's disease. *EMBO Molecular Medicine*, 4(5), 380–395. <https://doi.org/10.1002/emmm.201200215>
- Santos, Robson A.S., Simoes e Silva, A. C., Maric, C., Silva, D. M. R., Machado, R. P., De Buhr, I., Heringer-Walther, S., Pinheiro, S. V. B., Lopes, M. T., Bader, M., Mendes, E. P., Lemos, V. S., Campagnole-Santos, M. J., Schultheiss, H. P., Speth, R., y Walther, T. (2003). Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(14), 8258–8263. <https://doi.org/10.1073/pnas.1432869100>
- Santos, Robson Augusto Souza, Sampaio, W. O., Alzamora, A. C., Motta-Santos, D., Alenina, N., Bader, M., y Campagnole-Santo, M. J. (2018). The ACE2/Angiotensin-(1-7)/Mas axis of the renin-angiotensin system: Focus on Angiotensin-(1-7). *Physiological Reviews*, 98(1), 505–553. <https://doi.org/10.1152/physrev.00023.2016>
- Santos, T., Ferreira, R., Maia, J., Agasse, F., Xapelli, S., Cortes, L., Bragancia, J., Malva, J. O., Ferreira, L., y Bernardino, L. (2012). Polymeric nanoparticles to control the differentiation of neural stem cells in the subventricular zone of the brain. *ACS Nano*, 6(12), 10463–10474. <https://doi.org/10.1021/nn304541h>
- Sarchielli, E., Marini, M., Ambrosini, S., Peri, A., Mazzanti, B., Pinzani, P., Barletta, E., Ballerini, L., Paternostro, F., Paganini, M., Porfirio, B., Morelli, A., Gallina, P., y Vannelli, G. B. (2014). Multifaceted roles of BDNF and FGF2 in human striatal primordium development: An in vitro study. *Experimental Neurology*, 257, 130–147. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.04.021>
- Schallert, T. (2006). Behavioral Tests for Preclinical Intervention Assessment. *NeuroRx*, 3(4), 497–504. <https://doi.org/10.1016/j.nurx.2006.08.001>
- Schallert, T., Fleming, S. M., Leasure, J. L., Tillerson, J. L., y Bland, S. T. (2000). CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury. *Neuropharmacology*, 39(5), 777–787. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(00\)00005-8](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(00)00005-8)
- Schapira, A. H. V. (2007). Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Cell Death and Differentiation*, 14(7), 1261–1266. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402160>
- Schapira, A. H. V., Chaudhuri, K. R., y Jenner, P. (2017a). Non-motor features of Parkinson disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 18(7), 435–450. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.62>
- Schapira, A. H. V., Fox, S. H., Hauser, R. A., Jankovic, J., Jost, W. H., Kenney, C., Kulisevsky, J., Pahwa, R., Poewe, W., y Anand, R. (2017b). Assessment of

- safety and efficacy of safinamide as a levodopa adjunct in patients with Parkinson disease and motor fluctuations a randomized clinical trial. *JAMA Neurology*, 74(2), 216–224. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2016.4467>
- Schelling, P., Clauser, E., y Felix, D. (1983). Regulation of angiotensinogen in the central nervous system. *Clinical and Experimental Hypertension*, A5(7–8), 1047–1061. <https://doi.org/10.3109/10641968309048841>
- Schneider, L., y D’Adda Di Fagagna, F. (2012). Neural stem cells exposed to BrdU lose their global DNA methylation and undergo astrocytic differentiation. *Nucleic Acids Research*, 40(12), 5332–5342. <https://doi.org/10.1093/nar/gks207>
- Schweitzer, J. S., Song, B., Herrington, T. M., Park, T.-Y., Lee, N., Ko, S., Jeon, J., Cha, Y., Kim, K., Li, Q., Henchcliffe, C., Kaplitt, M., Neff, C., Rapalino, O., Seo, H., Lee, I.-H., Kim, J., Kim, T., Petsko, G. A., ... Kim, K.-S. (2020). Personalized iPSC-Derived Dopamine Progenitor Cells for Parkinson’s Disease. *New England Journal of Medicine*, 382(20), 1926–1932. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1915872>
- Seidel, K., Mahlke, J., Siswanto, S., Krüger, R., Heinsen, H., Auburger, G., Bouzrou, M., Grinberg, L. T., Wicht, H., Korf, H. W., Den Dunnen, W., y Rüb, U. (2015). The brainstem pathologies of Parkinson’s disease and dementia with Lewy bodies. *Brain Pathology*, 25(2), 121–135. <https://doi.org/10.1111/bpa.12168>
- Serhan, C. N., Dalli, J., Colas, R. A., Winkler, J. W., y Chiang, N. (2015). Protectins and maresins: New pro-resolving families of mediators in acute inflammation and resolution bioactive metabolome. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1851(4), 397–413. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2014.08.006>
- Seroogy, K. B., Lundgren, K. H., Tran, T. M. D., Guthrie, K. M., Isackson, P. J., y Gall, C. M. (1994). Dopaminergic neurons in rat ventral midbrain express brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs. *Journal of Comparative Neurology*, 342(3), 321–334. <https://doi.org/10.1002/cne.903420302>
- Shen, Y., Huang, J., Liu, L., Xu, X., Han, C., Zhang, G., Jiang, H., Li, J., Lin, Z., Xiong, N., y Wang, T. (2016). A compendium of preparation and application of stem cells in Parkinson’s disease: Current status and future prospects. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 8(MAY). <https://doi.org/10.3389/fnagi.2016.00117>
- Shetty, P., Thakur, A. M., y Viswanathan, C. (2013). Dopaminergic cells, derived from a high efficiency differentiation protocol from umbilical cord derived mesenchymal stem cells, alleviate symptoms in a Parkinson’s disease rodent model. *Cell Biology International*, 37(2), 167–180. <https://doi.org/10.1002/cbin.10029>
- Shim, J.-W., Park, C.-H., Bae, Y.-C., Bae, J.-Y., Chung, S., Chang, M.-Y., Koh, H.-C., Lee, H.-S., Hwang, S.-J., Lee, K.-H., Lee, Y.-S., Choi, C.-Y., y Lee, S.-H. (2007). Generation of Functional Dopamine Neurons from Neural Precursor Cells Isolated from the Subventricular Zone and White Matter of the Adult Rat Brain Using Nurr1 Overexpression. *Stem Cells*, 25(5), 1252–1262.

- <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0274>
- Shimozaki, K., Zhang, C. L., Suh, H., Denli, A. M., Evans, R. M., y Gage, F. H. (2012). SRY-box-containing gene 2 regulation of nuclear receptor tailless (Tlx) transcription in adult neural stem cells. *Journal of Biological Chemistry*, 287(8), 5969–5978. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.290403>
- Shintani, A., Nakao, N., Kakishita, K., y Itakura, T. (2007). Protection of dopamine neurons by bone marrow stromal cells. *Brain Research*, 1186(1), 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.09.086>
- Shook, B. A., Manz, D. H., Peters, J. J., Kang, S., y Conover, J. C. (2012). Spatiotemporal changes to the subventricular zone stem cell pool through aging. *Journal of Neuroscience*, 32(20), 6947–6956. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5987-11.2012>
- Silva-Vargas, V., Delgado, A. C., y Doetsch, F. (2018). Symmetric Stem Cell Division at the Heart of Adult Neurogenesis. *Neuron*, 98(2), 246–248. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.04.005>
- Silva-Vargas, V., Maldonado-Soto, A. R., Mizrak, D., Codega, P., y Doetsch, F. (2016). Age-Dependent Niche Signals from the Choroid Plexus Regulate Adult Neural Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 19(5), 643–652. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.06.013>
- Simon, D. K., Tanner, C. M., y Brundin, P. (2020). Parkinson Disease Epidemiology, Pathology, Genetics, and Pathophysiology. *Clinics in Geriatric Medicine*, 36(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.cger.2019.08.002>
- Snapyan, M., Lemasson, M., Brill, M. S., Blais, M., Massouh, M., Ninkovic, J., Gravel, C., Berthod, F., Götz, M., Barker, P. A., Parent, A., y Saghatelian, A. (2009). Vasculature guides migrating neuronal precursors in the adult mammalian forebrain via brain-derived neurotrophic factor signaling. *Journal of Neuroscience*, 29(13), 4172–4188. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4956-08.2009>
- Sokolov, A. N., Pavlova, M. A., Klosterhalfen, S., y Enck, P. (2013). Chocolate and the brain: Neurobiological impact of cocoa flavanols on cognition and behavior. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 37(10), 2445–2453. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2013.06.013>
- Solano Fonseca, R., Mahesula, S., Apple, D. M., Raghunathan, R., Dugan, A., Cardona, A., O'Connor, J., y Kokovay, E. (2016). Neurogenic niche microglia undergo positional remodeling and progressive activation contributing to age-associated reductions in neurogenesis. *Stem Cells and Development*, 25(7), 542–555. <https://doi.org/10.1089/scd.2015.0319>
- Song, M., Yu, S. P., Mohamad, O., Cao, W., Wei, Z. Z., Gu, X., Jiang, M. Q., y Wei, L. (2017). Optogenetic stimulation of glutamatergic neuronal activity in the striatum enhances neurogenesis in the subventricular zone of normal and stroke mice. *Neurobiology of Disease*, 98, 9–24. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2016.11.005>
- Song, Y., Li, S., Li, X., Chen, X., Wei, Z., Liu, Q., y Cheng, Y. (2020). The Effect of Estrogen Replacement Therapy on Alzheimer's Disease and Parkinson's

- Disease in Postmenopausal Women: A Meta-Analysis. *Frontiers in Neuroscience*, 14. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00157>
- 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>
- Soriano-Cantón, R., Perez-Villalba, A., Morante-Redolat, J. M., Marqués-Torrejón, M. Á., Pallás, M., Pérez-Sánchez, F., y Fariñas, I. (2015). Regulation of the p19Arf/p53 pathway by histone acetylation underlies neural stem cell behavior in senescence-prone SAMP8 mice. *Aging Cell*, 14(3), 453–462. <https://doi.org/10.1111/accel.12328>
- Sortwell, C. E., Pitzer, M. R., y Collier, T. J. (2000). Time course of apoptotic cell death within mesencephalic cell suspension grafts: Implications for improving grafted dopamine neuron survival. *Experimental Neurology*, 165(2), 268–277. <https://doi.org/10.1006/exnr.2000.7476>
- Souza, J. M., Giasson, B. I., Chen, Q., Lee, V. M.-Y., y Ischiropoulos, H. (2000). Dityrosine cross-linking promotes formation of stable  $\alpha$ -synuclein polymers: Implication of nitrate and oxidative stress in the pathogenesis of neurodegenerative synucleinopathies. *Journal of Biological Chemistry*, 275(24), 18344–18349. <https://doi.org/10.1074/jbc.M000206200>
- Spindola, B., Leite, M. A., Orsini, M., Fonoff, E., Landeiro, J. A., y Pessoa, B. L. (2017). Ablative surgery for Parkinson's disease: Is there still a role for pallidotomy in the deep brain stimulation era? *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 158, 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2017.04.018>
- Stegbauer, J., Lee, D. H., Seubert, S., Ellrichmann, G., Manzel, A., Kvakán, H., Müller, D. N., Gaupp, S., Rump, L. C., Gold, R., y Linker, R. A. (2009). Role of the renin-angiotensin system in autoimmune inflammation of the central nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(35), 14942–14947. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903602106>
- Stornetta, R. L., Hawelu-Johnson, C. L., Guyenet, P. G., y Lynch, K. R. (1988). Astrocytes synthesize angiotensinogen in brain. *Science*, 242(4884), 1444–1446. <https://doi.org/10.1126/science.3201232>
- Sulzer, D., y Edwards, R. H. (2019). The physiological role of  $\alpha$ -synuclein and its relationship to Parkinson's Disease. *Journal of Neurochemistry*, 150(5), 475–486. <https://doi.org/10.1111/jnc.14810>
- Sun, G. Q., Yu, R. T., Evans, R. M., y Shi, Y. (2007). Orphan nuclear receptor TLX recruits histone deacetylases to repress transcription and regulate neural stem cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(39), 15282–15287. <https://doi.org/10.1073/pnas.0704089104>
- Suzuki, J., Iwai, M., Nakagami, H., Wu, L., Chen, R., Sugaya, T., Hamada, M., Hiwada, K., y Horiuchi, M. (2002). Role of angiotensin II-regulated apoptosis

- through distinct AT1 and AT2 receptors in neointimal formation. *Circulation*, 106(7), 847–853. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000024103.04821.86>
- Swerdlow, R. H. (2012). Does mitochondrial DNA play a role in Parkinson's disease? A review of cybrid and other supportive evidence. *Antioxidants and Redox Signaling*, 16(9), 950–964. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.3948>
- Tajiri, N., Kaneko, Y., Shinozuka, K., Ishikawa, H., Yankee, E., McGrogan, M., Case, C., y Borlongan, C. V. (2013). Stem Cell Recruitment of Newly Formed Host Cells via a Successful Seduction? Filling the Gap between Neurogenic Niche and Injured Brain Site. *PLoS ONE*, 8(9), e74857. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074857>
- Takahashi, J. (2020). iPS cell-based therapy for Parkinson's disease: A Kyoto trial. *Regenerative Therapy*, 13, 18–22. <https://doi.org/10.1016/j.reth.2020.06.002>
- Takahashi, K., y Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, 126(4), 663–676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
- Takayanagi, R., Ohnaka, K., Sakai, Y., Nakao, R., Yanase, T., Haji, M., Inagami, T., Furuta, H., Gou, D. F., Nakamuta, M., y Nawata, H. (1992). Molecular cloning, sequence analysis and expression of a cDNA encoding human type-1 angiotensin II receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 183(2), 910–916. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(92\)90570-B](https://doi.org/10.1016/0006-291X(92)90570-B)
- Tarazi, F. I., Sahli, Z. T., Wolny, M., y Mousa, S. A. (2014). Emerging therapies for Parkinson's disease: From bench to bedside. *Pharmacology and Therapeutics*, 144(2), 123–133. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.05.010>
- Teismann, P., y Schulz, J. B. (2004). Cellular pathology of Parkinson's disease: Astrocytes, microglia and inflammation. *Cell and Tissue Research*, 318(1), 149–161. <https://doi.org/10.1007/s00441-004-0944-0>
- Tetzner, A., Gebolys, K., Meinert, C., Klein, S., Uhlich, A., Trebicka, J., Villacañas, Ó., y Walther, T. (2016). G-Protein-Coupled Receptor MrgD Is a Receptor for Angiotensin-(1-7) Involving Adenylyl Cyclase, cAMP, and Phosphokinase A. *Hypertension*, 68(1), 185–194. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.07572>
- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergel, J. J., Marshall, V. S., y Jones, J. M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282(5391), 1145–1147. <https://doi.org/10.1126/science.282.5391.1145>
- Tiklová, K., Nolbrant, S., Fiorenzano, A., Björklund, Å. K., Sharma, Y., Heuer, A., Gillberg, L., Hoban, D. B., Cardoso, T., Adler, A. F., Birtele, M., Lundén-Miguel, H., Volakakis, N., Kirkeby, A., Perlmann, T., y Parmar, M. (2020). Single cell transcriptomics identifies stem cell-derived graft composition in a model of Parkinson's disease. *Nature Communications*, 11(1), 2434. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16225-5>
- Toledo-Aral, J. J., Méndez-Ferrer, S., Pardal, R., Echevarría, M., y López-Barneo, J. (2003). Trophic restoration of the nigrostriatal dopaminergic pathway in long-

- term carotid body-grafted parkinsonian rats. *Journal of Neuroscience*, 23(1), 141–148. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-01-00141.2003>
- Tong, C. K., Cebrián-Silla, A., Paredes, M. F., Huang, E. J., García-Verdugo, J. M., y Alvarez-Buylla, A. (2014). Axons take a dive. *Neurogenesis*, 1(1), e29341. <https://doi.org/10.4161/neur.29341>
- Topchiy, E., Panzhinskiy, E., Griffin, W. S. T., Barger, S. W., Das, M., y Zawada, W. M. (2013). Nox4-Generated Superoxide drives Angiotensin II-induced neural stem cell proliferation. *Developmental Neuroscience*, 35(4), 293–305. <https://doi.org/10.1159/000350502>
- Tota, S., Nath, C., Najmi, A. K., Shukla, R., y Hanif, K. (2012). Inhibition of central angiotensin converting enzyme ameliorates scopolamine induced memory impairment in mice: Role of cholinergic neurotransmission, cerebral blood flow and brain energy metabolism. *Behavioural Brain Research*, 232(1), 66–76. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.03.015>
- Twelves, D., Perkins, K. S. M., y Counsell, C. (2003). Systematic review of incidence studies of Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 18(1), 19–31. <https://doi.org/10.1002/mds.10305>
- Umschweif, G., Liraz-Zaltsman, S., Shabashov, D., Alexandrovich, A., Trembovler, V., Horowitz, M., y Shohami, E. (2014a). Angiotensin Receptor Type 2 Activation Induces Neuroprotection and Neurogenesis After Traumatic Brain Injury. *Neurotherapeutics*, 11(3), 665–678. <https://doi.org/10.1007/s13311-014-0286-x>
- Umschweif, G., Shabashov, D., Alexandrovich, A. G., Trembovler, V., Horowitz, M., y Shohami, E. (2014b). Neuroprotection after traumatic brain injury in heat-acclimated mice involves induced neurogenesis and activation of angiotensin receptor type 2 signaling. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 34(8), 1381–1390. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2014.93>
- Valente, E. M., Abou-Sleiman, P. M., Caputo, V., Muqit, M. M. K., Harvey, K., Gispert, S., Ali, Z., Del Turco, D., Bentivoglio, A. R., Healy, D. G., Albanese, A., Nussbaum, R., González-Maldonado, R., Deller, T., Salvi, S., Cortelli, P., Gilks, W. P., Latchman, D. S., Harvey, R. J., ... Wood, N. W. (2004). Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science*, 304(5674), 1158–1160. <https://doi.org/10.1126/science.1096284>
- Valente, T., Hidalgo, J., Bolea, I., Ramirez, B., Anglés, N., Reguant, J., Morelló, J. R., Gutiérrez, C., Boada, M., y Unzeta, M. (2009). A diet enriched in polyphenols and polyunsaturated fatty acids, LMN diet, induces neurogenesis in the subventricular zone and hippocampus of adult mouse brain. *Journal of Alzheimer's Disease*, 18(4), 849–865. <https://doi.org/10.3233/JAD-2009-1188>
- Valenzuela, R., Barroso-Chinea, P., Villar-Cheda, B., Jøglar, 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 and Disease*, 7(10), e2427–e2427. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.327>
- Van Den Berge, S. A., Van Strien, M. E., Korecka, J. A., Dijkstra, A. A., Sluijs, J. A., Kooijman, L., Eggers, R., De Filippis, L., Vescovi, A. L., Verhaagen, J., Van De Berg, W. D. J., y Hol, E. M. (2011). The proliferative capacity of the subventricular zone is maintained in the parkinsonian brain. *Brain*, 134(11), 3249–3263. <https://doi.org/10.1093/brain/awr256>
- Van der Perren, A., Casteels, C., Van Laere, K., Gijsbers, R., Van den Haute, C., y Baekelandt, V. (2016). Development of an alpha-synuclein based rat model for Parkinson's disease via stereotactic injection of a recombinant adeno-associated viral vector. *Journal of Visualized Experiments*, 2016(108). <https://doi.org/10.3791/53670>
- Van Kampen, J. M., y Eckman, C. B. (2006). Dopamine D3 receptor agonist delivery to a model of Parkinson's disease restores the nigrostriatal pathway and improves locomotor behavior. *The Journal of Neuroscience*, 26(27), 7272–7280. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0837-06.2006>
- Venkatesh, K., y Sen, D. (2016). Mesenchymal Stem Cells as a Source of Dopaminergic Neurons: A Potential Cell Based Therapy for Parkinson's Disease. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 12(4), 326–347. <https://doi.org/10.2174/1574888x12666161114122059>
- Vila, M. (2019). Neuromelanin, aging, and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 34(10), 1440–1451. <https://doi.org/10.1002/mds.27776>
- 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 and Disease*, 8(9), e3044. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.439>
- Villar-Cheda, B., Dominguez-Meijide, A., Joglar, B., Rodriguez-Perez, A. I., Guerra, M. J., y Labandeira-Garcia, J. L. (2012a). 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. *European Journal of Neuroscience*, 32(10), 1695–1706. <https://doi.org/10.1111/j.1460->

9568.2010.07448.x

- Villar-Cheda, B., Valenzuela, R., Rodriguez-Perez, A. I., Guerra, M. J., y Labandeira-Garcia, J. L. (2012b). Aging-related changes in the nigral angiotensin system enhances proinflammatory and pro-oxidative markers and 6-OHDA-induced dopaminergic degeneration. *Neurobiology of Aging*, 33(1), 204.e1-204.e11. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2010.08.006>
- Vogel, A., Upadhyya, R., y Shetty, A. K. (2018). Neural stem cell derived extracellular vesicles: Attributes and prospects for treating neurodegenerative disorders. *EBioMedicine*, 38, 273–282. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.11.026>
- Volc, D., Poewe, W., Kutzelnigg, A., Lühns, P., Thun-Hohenstein, C., Schneeberger, A., Galabova, G., Majbour, N., Vaikath, N., El-Agnaf, O., Winter, D., Mihailovska, E., Mairhofer, A., Schwenke, C., Staffler, G., y Medori, R. (2020). Safety and immunogenicity of the  $\alpha$ -synuclein active immunotherapeutic PD01A in patients with Parkinson's disease: a randomised, single-blinded, phase 1 trial. *The Lancet Neurology*, 19(7), 591–600. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(20\)30136-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(20)30136-8)
- Vomund, S., Schäfer, A., Parnham, M. J., Brüne, B., y Von Knethen, A. (2017). Nrf2, the master regulator of anti-oxidative responses. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(12), 2772. <https://doi.org/10.3390/ijms18122772>
- Von Bohlen und Halbach, O. (2005). The Renin-Angiotensin System in the Mammalian Central Nervous System. *Current Protein & Peptide Science*, 6(4), 355–371. <https://doi.org/10.2174/1389203054546361>
- Voon, V., Gao, J., Brezing, C., Symmonds, M., Ekanayake, V., Fernandez, H., Dolan, R. J., y Hallett, M. (2011). Dopamine agonists and risk: Impulse control disorders in Parkinson's; Disease. *Brain*, 134(5), 1438–1446. <https://doi.org/10.1093/brain/awr080>
- Wakai, T., Yoshioka, H., Yagi, T., Kato, T., y Kinouchi, H. (2011). Effects of valsartan on neuroprotection and neurogenesis after ischemia. *NeuroReport*, 22(8), 385–390. <https://doi.org/10.1097/WNR.0b013e328346be84>
- Wallings, R., Connor-Robson, N., y Wade-Martins, R. (2019). LRRK2 interacts with the vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPase pump  $\alpha 1$  subunit to regulate lysosomal function. *Human Molecular Genetics*, 28(16), 2696–2710. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddz088>
- Wang, C., Liu, F., Liu, Y. Y., Zhao, C. H., You, Y., Wang, L., Zhang, J., Wei, B., Ma, T., Zhang, Q., Zhang, Y., Chen, R., Song, H., y Yang, Z. (2011). Identification and characterization of neuroblasts in the subventricular zone and rostral migratory stream of the adult human brain. *Cell Research*, 21(11), 1534–1550. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.83>
- Wang, S., Okun, M. S., Suslov, O., Zheng, T., McFarland, N. R., Vedam-Mai, V., Foote, K. D., Roper, S. N., Yachnis, A. T., Siebzehnrubl, F. A., y Steindler, D. A. (2012). Neurogenic potential of progenitor cells isolated from postmortem human Parkinsonian brains. *Brain Research*, 1464, 61–72. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.04.039>
- Wang, X. J., Sun, Z., Villeneuve, N. F., Zhang, S., Zhao, F., Li, Y., Chen, W., Yi, X.,

- Zheng, W., Wondrak, G. T., Wong, P. K., y Zhang, D. D. (2008). Nrf2 enhances resistance of cancer cells to chemotherapeutic drugs, the dark side of Nrf2. *Carcinogenesis*, 29(6), 1235–1243. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgn095>
- Wang, Y. K., Zhu, W. W., Wu, M. H., Wu, Y. H., Liu, Z. X., Liang, L. M., Sheng, C., Hao, J., Wang, L., Li, W., Zhou, Q., y Hu, B. Y. (2018). Human Clinical-Grade Parthenogenetic ESC-Derived Dopaminergic Neurons Recover Locomotive Defects of Nonhuman Primate Models of Parkinson's Disease. *Stem Cell Reports*, 11(1), 171–182. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.05.010>
- Warren, L., y Lin, C. (2019). mRNA-Based Genetic Reprogramming. *Molecular Therapy*, 27(4), 729–734. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.12.009>
- Webb, R. L., Kaiser, E. E., Jurgielewicz, B. J., Spellicy, S., Scoville, S. L., Thompson, T. A., Swetenburg, R. L., Hess, D. C., West, F. D., y Stice, S. L. (2018). Human neural stem cell extracellular vesicles improve recovery in a porcine model of ischemic stroke. *Stroke*, 49(5), 1248–1256. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.117.020353>
- West, M. J., Slomianka, L., y Gundersen, H. J. G. (1991). Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *The Anatomical Record*, 231(4), 482–497. <https://doi.org/10.1002/ar.1092310411>
- Westerlund, U., Svensson, M., Moe, M. C., Varghese, M., Gustavsson, B., Wallstedt, L., Berg-Johnsen, J., y Langmoen, I. A. (2005). Endoscopically harvested stem cells: a putative method in future autotransplantation. *Neurosurgery*, 57(4), 779–784; discussion 779–84. <https://doi.org/10.1093/neurosurgery/57.4.779>
- Whone, A. L., Kemp, K., Sun, M., Wilkins, A., y Scolding, N. J. (2012). Human bone marrow mesenchymal stem cells protect catecholaminergic and serotonergic neuronal perikarya and transporter function from oxidative stress by the secretion of glial-derived neurotrophic factor. *Brain Research*, 1431, 86–96. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.10.038>
- Widner, H., Tetrud, J., Rehncrona, S., Snow, B., Brundin, P., Gustavii, B., Björklund, A., Lindvall, O., y Langston, J. W. (1992). Bilateral Fetal Mesencephalic Grafting in Two Patients with Parkinsonism Induced by 1-Methyl-4-Phenyl-L,2,3,6-Tetrahydropyridine (MPTP). *New England Journal of Medicine*, 327(22), 1556–1563. <https://doi.org/10.1056/nejm199211263272203>
- Wilmot, I., Leslie, S., Martin, N. G., Peschanski, M., Rao, M., Trounson, A., Turner, D., Turner, M. L., Yamanaka, S., y Taylor, C. J. (2015). Development of a global network of induced pluripotent stem cell haplobanks. *Regenerative Medicine*, 10(3), 235–238. <https://doi.org/10.2217/rme.15.1>
- Winkler, C., Kirik, D., y Björklund, A. (2005). Cell transplantation in Parkinson's disease: How can we make it work? *Trends in Neurosciences*, 28(2), 86–92. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.12.006>
- Winner, B., Couillard-Despres, S., Geyer, M., Aigner, R., Bogdahn, U., Aigner, L., Kuhn, H. G., y Winkler, J. (2008). Dopaminergic lesion enhances growth factor-induced striatal neuroblast migration. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 67(2), 105–116.

- <https://doi.org/10.1097/nen.0b013e3181630cff>
- Winner, B., Desplats, P., Hagl, C., Klucken, J., Aigner, R., Ploetz, S., Laemke, J., Karl, A., Aigner, L., Masliah, E., Buerger, E., y Winkler, J. (2009). Dopamine receptor activation promotes adult neurogenesis in an acute Parkinson model. *Experimental Neurology*, 219(2), 543–552. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.07.013>
- Winner, B., Geyer, M., Couillard-Despres, S., Aigner, R., Bogdahn, U., Aigner, L., Kuhn, G., y Winkler, J. (2006). Striatal deafferentation increases dopaminergic neurogenesis in the adult olfactory bulb. *Experimental Neurology*, 197(1), 113–121. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2005.08.028>
- Witt, P. A. L., y Fahn, S. (2016). Levodopa therapy for Parkinson disease: A look backward and forward. *Neurology*, 86(14), S3–S12. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000002509>
- Wolf, G., Harendza, S., Schroeder, R., Wenzel, U., Zahner, G., Butzmann, U., Freeman, R. S., y Stahl, R. A. K. (2002). Angiotensin II's antiproliferative effects mediated through AT2-receptors depend on down-regulation of SM-20. *Laboratory Investigation*, 82(10), 1305–1317. <https://doi.org/10.1097/01.LAB.0000029207.92039.2F>
- Worlitzer, M. M., Bunk, E. C., Hemmer, K., y Schwamborn, J. C. (2012). Anti-inflammatory treatment induced regenerative oligodendrogenesis in parkinsonian mice. *Stem Cell Research and Therapy*, 3(4), 33. <https://doi.org/10.1186/scrt124>
- Wright, J. W., y Harding, J. W. (2013). The brain renin-angiotensin system: A diversity of functions and implications for CNS diseases. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 465(1), 133–151. <https://doi.org/10.1007/s00424-012-1102-2>
- Wright, J. W., Kawas, L. H., y Harding, J. W. (2015). The development of small molecule angiotensin IV analogs to treat Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Progress in Neurobiology*, 125, 26–46. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2014.11.004>
- Wu, H., Coskun, V., Tao, J., Xie, W., Ge, W., Yoshikawa, K., Li, E., Zhang, Y., y Sun, Y. E. (2010). Dnmt3a-dependent nonpromoter DNA methylation facilitates transcription of neurogenic genes. *Science*, 329(5990), 444–447. <https://doi.org/10.1126/science.1190485>
- Xu, Changjiang, Yuan, X., Pan, Z., Shen, G., Kim, J. H., Yu, S., Khor, T. O., Li, W., Ma, J., y Kong, A. N. T. (2006). Mechanism of action of isothiocyanates: The induction of ARE-regulated genes is associated with activation of ERK and JNK and the phosphorylation and nuclear translocation of Nrf2. *Molecular Cancer Therapeutics*, 5(8), 1918–1926. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-05-0497>
- Xu, Chunhui, Inokuma, M. S., Denham, J., Golds, K., Kundu, P., Gold, J. D., y Carpenter, M. K. (2001). Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology*, 19(10), 971–974. <https://doi.org/10.1038/nbt1001-971>

- Yan, K., Zhang, R., Sun, C., Chen, L., Li, P., Liu, Y., Peng, L., Sun, H., Qin, K., Chen, F., Huang, W., Chen, Y., Lv, B., Du, M., Zou, Y., Cai, Y., Qin, L., Tang, Y., y Jiang, X. (2013). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells maintain the resting phenotype of microglia and inhibit microglial activation. *PLoS ONE*, 8(12), e84116. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084116>
- Yang, D., Lv, Z., Zhang, H., Liu, B., Jiang, H., Tan, X., Lu, J., Baiyun, R., y Zhang, Z. (2017). Activation of the Nrf2 Signaling Pathway Involving KLF9 Plays a Critical Role in Allicin Resisting Against Arsenic Trioxide-Induced Hepatotoxicity in Rats. *Biological Trace Element Research*, 176(1), 192–200. <https://doi.org/10.1007/s12011-016-0821-1>
- Yang, D., Tan, X., Lv, Z., Liu, B., Baiyun, R., Lu, J., y Zhang, Z. (2016). Regulation of Sirt1/Nrf2/TNF- $\alpha$  signaling pathway by luteolin is critical to attenuate acute mercuric chloride exposure induced hepatotoxicity. *Scientific Reports*, 6(1), 37157. <https://doi.org/10.1038/srep37157>
- Yang, W. H., Yang, C., Xue, Y. Q., Lu, T., Reiser, J., Zhao, L. R., y Duan, W. M. (2013). Regulated Expression of Lentivirus-Mediated GDNF in Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells and Its Neuroprotection on Dopaminergic Cells In Vitro. *PLoS ONE*, 8(5), e64389. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064389>
- Yang, X., Pan, W., Xu, G., y Chen, L. (2020). Mitophagy: A crucial modulator in the pathogenesis of chronic diseases. *Clinica Chimica Acta*, 502, 245–254. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.11.008>
- Yi, Y., Jong Noh, M., y Hee Lee, K. (2011). Current Advances in Retroviral Gene Therapy. *Current Gene Therapy*, 11(3), 218–228. <https://doi.org/10.2174/156652311795684740>
- Yoneyama, M., Kawada, K., Gotoh, Y., Shiba, T., y Ogita, K. (2010). Endogenous reactive oxygen species are essential for proliferation of neural stem/progenitor cells. *Neurochemistry International*, 56(6–7), 740–746. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2009.11.018>
- Young, S. Z., Taylor, M. M., y Bordey, A. (2011). Neurotransmitters couple brain activity to subventricular zone neurogenesis. *European Journal of Neuroscience*, 33(6), 1123–1132. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07611.x>
- Zeng, C., Felder, R., y Jose, P. (2008). A New Approach for Treatment of Hypertension: Modifying D1 Dopamine Receptor Function. *Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry*, 4(4), 369–377. <https://doi.org/10.2174/187152506778520727>
- Zhang, B., Albaker, A., Plouffe, B., Lefebvre, C., y Tiberi, M. (2014). Constitutive activities and inverse agonism in dopamine receptors. In *Advances in Pharmacology* (Vol. 70, pp. 175–214). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417197-8.00007-9>
- Zhang, Y., Yu, Z., Jiang, D., Liang, X., Liao, S., Zhang, Z., Yue, W., Li, X., Chiu, S. M., Chai, Y. H., Liang, Y., Chow, Y., Han, S., Xu, A., Tse, H. F., y Lian, Q. (2016). iPSC-MSCs with High Intrinsic MIRO1 and Sensitivity to TNF- $\alpha$  Yield

- Efficacious Mitochondrial Transfer to Rescue Anthracycline-Induced Cardiomyopathy. *Stem Cell Reports*, 7(4), 749–763. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.08.009>
- Zhao, H. R., Jiang, T., Tian, Y. Y., Gao, Q., Li, Z., Pan, Y., Wu, L., Lu, J., y Zhang, Y. D. (2015). Angiotensin II Triggers Apoptosis Via Enhancement of NADPH Oxidase-Dependent Oxidative Stress in a Dopaminergic Neuronal Cell Line. *Neurochemical Research*, 40(4), 854–863. <https://doi.org/10.1007/s11064-015-1536-y>
- Zhen, G., Kim, Y. T., Li, R. chi, Yocum, J., Kapoor, N., Langer, J., Dobrowolski, P., Maruyama, T., Narumiya, S., y Doré, S. (2012). PGE 2 EP1 receptor exacerbated neurotoxicity in a mouse model of cerebral ischemia and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 33(9), 2215–2219. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2011.09.017>
- Zhou, X., Xin, J., Fan, N., Zou, Q., Huang, J., Ouyang, Z., Zhao, Y., Zhao, B., Yi, X., Guo, L., Esteban, M. A., Zeng, Y., Yang, H., y Lai, L. (2015a). Generation of CRISPR/Cas9-mediated gene-targeted pigs via somatic cell nuclear transfer. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(6), 1175–1184. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1744-7>
- Zhou, Y., Oudin, M. J., Gajendra, S., Sonogo, M., Falenta, K., Williams, G., Lalli, G., y Doherty, P. (2015b). Regional effects of endocannabinoid, BDNF and FGF receptor signalling on neuroblast motility and guidance along the rostral migratory stream. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 64, 32–43. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2014.12.001>
- Zucker, S. N., Fink, E. E., Bagati, A., Mannava, S., Bianchi-Smiraglia, A., Bogner, P. N., Wawrzyniak, J. A., Foley, C., Leonova, K. I., Grimm, M. J., Moparthy, K., Ionov, Y., Wang, J., Liu, S., Sexton, S., Kandel, E. S., Bakin, A. V., Zhang, Y., Kaminski, N., ... Nikiforov, M. A. (2014). Nrf2 amplifies oxidative stress via induction of Klf9. *Molecular Cell*, 53(6), 916–928. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.01.033>
- Zuo, F., Xiong, F., Wang, X., Li, X., Wang, R., Ge, W., y Bao, X. (2017). Intrastriatal Transplantation of Human Neural Stem Cells Restores the Impaired Subventricular Zone in Parkinsonian Mice. *Stem Cells*, 35(6), 1519–1531. <https://doi.org/10.1002/stem.2616>
- Zuo, L., y Motherwell, M. S. (2013). The impact of reactive oxygen species and genetic mitochondrial mutations in Parkinson's disease. *Gene*, 532(1), 18–23. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.07.085>

## **DECLARACIÓN DE CONFLICTOS DE INTERÉS**

La doctoranda, María García Garrote, declara no tener ningún conflicto de interés en relación con la presente tesis doctoral.

## FINANCIACIÓN

- Ministerio de Economía y Competitividad (RTI2018-098830-B-I00, BFU2015-70523 y Ayudas para contratos predoctorales para la formación de doctores, con referencia BES-2016-076457)
- Ministerio de Sanidad (PI20/00385, RD16/0011/0016 y CIBERNED)
- Xunta de Galicia (XUGA, ED431C2018/10, GRC2014/002 y ED431G/05)
- Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER)