



UNIVERSIDAD DE MURCIA

**DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA HUMANA
Y PSICOBIOLOGÍA**

FACULTAD DE MEDICINA

**PAPEL DE LOS GLUCOCORTICOIDES Y
DEL RECEPTOR DE GLUCOCORTICOIDES
EN LOS PROCESOS DE
NEURODEGENERACIÓN E INFLAMACIÓN
EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL**

TESIS DOCTORAL

Realizada por:

MARÍA ÁNGELES CARRILLO CONESA

Dirigida por:

Dra. MARÍA TRINIDAD HERRERO EZQUERRO

Dra. SHEELA VYAS

**PROGRAMA DE DOCTORADO
BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA**

a Thomas

a mis padres y hermanos

Como preámbulo quisiera mostrar mi agradecimiento a todas las personas que han contribuido a que este manuscrito vea la luz.

A mis compañeros de laboratorio en Murcia. A Paco por tu eterna disponibilidad y apoyo, porque para mí has sido como el santo Job, armado de paciencia y de gratitud. A Jose Enrique, por poner humor a nuestras largas tardes “nicecianas” y por el positivismo que irradias día a día. A Carmen, por la oportunidad de seguir compartiendo tu amistad también en el ámbito de trabajo, por estar disponible para ayudarme con mis numerosos “pequeños favores” y por poder contar contigo en malos y buenos momentos. A Aurora por transmitirme tu coraje y valentía ante la vida, por tener siempre el consejo adecuado en el momento adecuado, por tu buen humor. A Victor, por todas nuestras conversaciones, siempre tan interesantes, por tu tolerancia y por todo tu afecto. A los que han pasado por nuestro laboratorio dejando huella. A Cristina, porque has constituido para mí un ejemplo de entusiasmo, superación y profesionalidad. A Marcela, por tu sencillez y al mismo tiempo tu gran valía como científica y como persona, espero que tu vida esté llena de éxitos en lo profesional y en lo personal. A Valentina, por confirmarme que los milagros existen, por tu celo ante todo lo que haces, por tener siempre palabras de ánimo para mí. A Lisette, por tu constancia y tu generosidad, ha sido un honor ayudarte a encontrar al “tío Barri”. También a nuestras vecinas de Medicina Preventiva y a Zenewton por su grata compañía durante nuestras comidas y cafés.

A mi grupo del College de France – Jussieu. A Marie, Sebastien y Aude, por su amistad, por haberme hecho sentir como en casa a pesar de ser extranjera, por apoyarme tanto en lo científico como en lo personal. A Jacques, por tus bromas y por ayuda. A Sakina, por tus consejos. A Alain, por asesorarme con las qPCR y otras técnicas. A François, por el excelente trato que he recibido por tu parte y por tu ayuda con trámites y más trámites. A todos los técnicos, estudiantes y postdocs que han formado o forman parte del grupo, así como a los miembros de grupos vecinos y del animalario: a Kalina, Emanuelle, Olivier, Marion, Clarisse, Lydie, Claire, Vincent, Isabelle, Pim, Thomas, Yunlin... porque habeis contribuido a que este tiempo en París haya constituido una de las experiencias más enriquecedoras de mi vida. Mi infinito agradecimiento a Etienne Hirsch por permitirme colaborar y trabajar en su equipo, así como a Patrick Michel y Serge por instruirme en las técnicas de cultivo celular.

A los profesores e investigadores que han contribuido a que llegue hasta aquí. A Pareja, por despertar en mí la pasión por la Biología. A Juan Antonio Madrid, por sus inolvidables clases de Neurofisiología, por transmitir su entusiasmo docente y saber guiarnos profesionalmente. A Cecilio

Vidal, por su disponibilidad y su aprecio, por darme la oportunidad, junto con Mari Sen, de realizar la Venia Docendi en su departamento. A Jorge de Costa, por su ayuda crucial para la instauración de la tesis en cotutela en la Universidad de Murcia. A Egle y Rita por haber aceptado evaluar la sección en inglés de la tesis y por sus correcciones. A Charo Luquin y Jose María García-Verdugo por su labor de rapporteurs. A todos los miembros del tribunal, por haber aceptado formar parte del mismo; mi especial agradecimiento a François Couraud por haber aceptado la proposición de venir a Murcia.

Un agradecimiento muy especial a mis codirectores de tesis. A Carlos Barcia, por ser “jefe” y sobretodo compañero, porque has sabido ver lo positivo de cada uno de mis esfuerzos y resultados, por tu gran disponibilidad y paciencia para conmigo, por recordarme el valor de la ciencia, por tus excelentes enseñanzas y ejemplo, porque esta tesis existe gracias a ti. A Sheela Vyas, por darme la oportunidad de afrontar un proyecto tan ambicioso, por abrirme las puertas a nuevas técnicas y nuevos retos, por todas tus enseñanzas prácticas; espero no haberte defraudado como primera estudiante de tesis. A María Trinidad Herrero, porque te debo este trabajo; por haber confiado siempre en mí, por haberme introducido en el mundo de la Neurociencia y por tu discernimiento en la construcción de mi perfil profesional; por ser un ejemplo de valentía y entusiasmo día a día.

A la Fundación Séneca, en primer lugar por concederme la beca que me ha sustentado durante 4 años no sólo en Murcia, sino también en París. Por darme la oportunidad de realizar estancias de investigación en el extranjero y financiarme algún que otro congreso. Por la suerte de encontrar personas amables y muy competentes en su trabajo.

A mis amigos, porque sois un tesoro para mí. Especialmente en este contexto de tesis, gracias a Victoria y a Laura por saber escuchar y sostenerme siempre. A Raquel, por ser un pilar para mí en París y por tu ayuda con las técnicas de laboratorio.

A mi familia en la fe, por recordarme día a día qué es lo importante en la vida y por contar con vuestro apoyo en todas las adversidades. A mi familia española y a mi familia francesa. A mis hermanos, por estar siempre disponibles a hora y deshora. A mis padres, por creer en mí y apoyarme en todas mis decisiones, por vuestra inagotable ayuda y sacrificio por nosotros, por regalarme la herencia de la fe. A Thomas, por ser mi mayor bien en este mundo; por sustentarme día a día, en especial en los momentos difíciles; por tu paciencia, dulzura y cariño; porque esta tesis también lleva tu nombre.

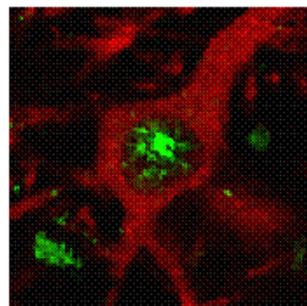
Université Pierre et Marie Curie- Paris VI



**Universidad de Murcia,
Dpto. de Anatomía Humana y Psicobiología**



**PAPEL DE LOS GLUCOCORTICOIDES
Y DEL RECEPTOR DE GLUCOCORTICOIDES
EN LOS PROCESOS DE
NEURODEGENERACIÓN E INFLAMACIÓN
EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL**



TESIS EN COTUTELA
para la obtención de grado de
Doctor de la Universidad de Murcia
y el grado de

Docteur de l'Université de Paris Pierre et Marie Curie, Paris VI

presentada por

María Ángeles Carrillo Conesa

Directores de tesis:

Dra. María Trinidad Herrero Ezquerro

Catedrática de Anatomía Humana (UMU)

Dra. Sheela Vyas

CR1 INSERM (UPMC)

ÍNDICE

Abreviaturas	6
Resumen / Résumé / Summary	9
I. <u>Revisión Bibliográfica</u>	17
1.1 El eje hipotálamo-hipófisis-adrenal y los glucocorticoides	20
1.1.1 Breves reseñas históricas y conceptos	20
1.1.2 Descripción y fisiología del eje HPA	22
1.1.3 CRF y sus receptores	24
1.1.4 Las hormonas glucocorticoideas	25
1.1.4.1 Descripción y síntesis	25
1.1.4.2 La disponibilidad de los GCs	26
1.1.4.3 Efectos fisiológicos de los GCs	29
1.1.5 Factores que determinan la respuesta a estrés	30
1.2 El receptor de glucocorticoides	31
1.2.1 Estructura molecular y expresión	31
1.2.2 Isoformas	35
1.2.3 Activación y regulación	36
1.2.3.1 GR en ausencia de ligando	36
1.2.3.2 La translocación al núcleo, reciclaje y exportación	38
1.2.3.3 Modificaciones post-traduccionales y degradación de GR	40
1.2.4 Expresión y mecanismos de acción de GR	41
1.2.4.1 Efectos transcripcionales de GR dependientes de su unión al ADN	42
1.2.4.2 Efectos transcripcionales de GR independientes de su unión al ADN	43
1.2.4.3 La remodelación de la cromatina por GR	44
1.2.4.4 Los efectos no genómicos de GR y GCs	44

1.2.5 Los modelos murinos genéticamente modificados para GR.....	45
1.3 La respuesta inflamatoria en el sistema nervioso central. Papel de los GCs.....	48
1.3.1 Integración Neuro-endocrino-inmunológica.....	48
1.3.2 Efectos antiinflamatorios de los GCs.....	53
1.3.2.1 Efectos a nivel molecular	53
1.3.2.2 Efectos a nivel celular.....	57
1.3.3 Modelos de inflamación en el SNC: administración de LPS. La vía de TLR4 ..	60
1.3.4 La microglía como mediador de la respuesta inflamatoria en el SNC. Efectos de los GCs: control de la reacción inflamatoria en el SNC	64
1.3.5 La infiltración celular en los procesos inflamatorios. Papel de MCP-1/CCL2...	68
1.4 Inflamación y enfermedad de Párkinson	72
1.4.1 La enfermedad de Párkinson.....	72
1.4.2 Modelos de parkinsonismo experimental por intoxicación con MPTP.....	78
1.4.2.1 Modos de acción y mecanismos de muerte	79
1.4.3 Inflamación y parkinsonismo.....	83
1.4.4 Glucocorticoides y parkinsonismo.....	90
II. <u>Objetivos</u>	95
III. <u>Apartados de estudio</u>	99
<u>Capítulo 1. “Papel de los glucocorticoides y el receptor de glucocorticoides en la supervivencia neuronal en modelos de parkinsonismo experimental”</u>	101
1. Materiales y métodos	103
2. Resultados	118
3. Discusión.....	143
<u>Capítulo 2. “Estudio de las acciones del receptor de glucocorticoides en los procesos de inflamación agudos en el sistema nervioso central”</u>	154

1. Materiales y métodos	156
2. Resultados	169
3. Discusión	182
Capítulo 3. “Estudio de la implicación de MCP-1/CCL2 en la infiltración y extravasación linfocitaria en un modelo de inflamación aguda en el sistema nervioso central”	198
1. Materiales y métodos	200
2. Resultados	203
3. Discusión	204
IV. <u>Conclusiones</u>	215
V. <u>Sección en Inglés / English Section</u>	221
VI. <u>Bibliografía</u>	331
VII. <u>Anexos</u>	351

11- β -HSD: 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase / 11- β -Hidroxiesteroide Deshidrogenasa

A

ACTH: Adrenocorticotropic Hormone / Corticotropina

API: Activator Protein 1 / Proteína de Activación 1

AR: Androgen Receptor / Receptor de Andrógenos

ARNm: Ácido Ribonucleico mensajero

ATP: Adenosine Triphosphate / Adenosina Trifosfato

ATV: Área Tegmental Ventral

AVP: Arginin Vasopressin / Arginina Vasopresina

B

β -CD: β -cyclodextrin / β -ciclodextrina

BAC: Bacterial Artificial Chromosome / Cromosoma Artificial Bacteriano

Bax: Bcl-2-associated X protein

BBB: Blood-Brain Barrier / Barrera Hematoencefálica

Bcl-2: B-cell lymphoma 2

BNST: Bed Nucleus of the Stria Terminalis / Núcleos del Lecho de la Estría Terminal

C

CBG: Corticosteroid Binding Globulin / Globulina Transportadora de Corticosteroides

CDK: Cyclin Dependent Kinase / Kinasa Dependiente de Ciclina

cdNA: complementary DNA

CCL2: Chemokine (C-C motif) ligand 2

CNS: Central Nervous System

CORT: Corticosterone / Corticosterona

COX: Cyclooxygenase / Ciclooxygenasa

Cre: Cyclisation recombination

CRF: Corticotropin Releasing Factor / Factor Liberador de Corticotropina

CXCR: Chemokine Receptor / Receptor de Quimiocinas

D

DAMPs: Damage-Associated Molecular Patterns

DA: Dopamine or Dopaminergic / Dopamina o Dopaminérgica

DAB: Diaminobenzidine / Diaminobenzidina

DANT: Dantrolene / Dantroleno

DAT: Dopamine Transporter / Transportador de Dopamina

DBD: DNA Binding Domain / Dominio de Unión al ADN

DBS: Deep Brain Stimulation / Estimulación Cerebral Profunda

DEX: Dexamethasone / Dexametasona

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium / Medio Esencial Dulbecco Modificado

DMSO: Dimethyl Sulfoxide / Dimetil Sulfóxido

E

ECSIT: Evolutionarily Conserved Signaling Intermediate in Toll pathways

EGF: Epidermal Growth Factor / Factor de Crecimiento Epidérmico

EP: Enfermedad de Parkinson

ER: Estrogen Receptor / Receptor de Estrógenos

ERK: Extracellular Regulated Kinases / Kinasas de Regulación Extracelular

F

FCS: Fetal Calf Serum / Suero Fetal Bovino

G

GCs: Glucocorticoids / Glucocorticoides

GDNF: Glial Cell-Derived Neurotrophic Factor

GFAP: Glial Fibrillary Acidic Protein / Proteína Glial Fibrilar Ácida

GH: Growth Hormone / Hormona de crecimiento

GM-CSF: Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor

GR: Glucocorticoid Receptor / Receptor de Glucocorticoides

GRE: Glucocorticoid Response Elements / Elementos de Respuesta a Glucocorticoides

H

HAT: Histone Acetyl Transferase

HDAC: Histone Deacetylase

hGR: human Glucocorticoid Receptor / Receptor de Glucocorticoides humano

HIV: Human Immunodeficiency Virus / Virus de la Inmunodeficiencia Humana

HLA-DR: Human Leukocyte Antigen / Antígeno Humano de Leucocitos grupo DR

HPA: Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis / Eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal

HSP: Heat Shock Proteins / Proteínas de Choque Térmico

HRE: Hormone Responsive Elements / Elementos de Respuesta a Hormonas

I

iCre: Codon-improved Cre recombinase

Iba-1: Ionized calcium Binding Adaptor molecule 1

IFN: Interferon

IKK: IκB Kinase

IL: Interleukin / Interleucina

iNOS: Inducible Nitric Oxide Synthase / Óxido Nítrico Sintasa Inducible

ip: Intraperitoneal

IP3: Inositol Trisphosphate / Inositol Trifosfato

IP3K: Inositol 1,4,5-Trisphosphate 3-Kinase / Inositol 1,4,5-Trifosfato 3-Kinasa

IRAK: Interleukin Receptor Associated Kinase / Kinasa Asociada al Receptor de Interleucinas

IRF: Interferon Regulatory Factor / Factor Regulador del Interferón

J

JNK: c-Jun N-terminal Kinase

L

LBD : Ligand Binding Domain / Dominio de Unión al Ligando

LBP : LPS-Binding Protein / proteína de unión del LPS

LBs: Lewy bodies / Cuerpos de Lewy

lc: locus coeruleus

L-DOPA: L-3,4-dihydroxyphenylalanine / L-3,4-dihidroxifenilalanina

LFB: Luxol Fast Blue

LPS: Lipopolysaccharides / Lipopolisacárido

M

MAO-B: Monoamine Oxidase B / Monoamino Oxidasa B

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase

MAPKK: Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase

MAPKKK: Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase

mGR: mouse's Glucocorticoid Receptor / Receptor de Glucocorticoides de ratón

MHC: Major Histocompatibility Complex / Complejo Mayor de Histocompatibilidad

MCP-1: Monocyte Chemoattractant Protein-1 / Proteína Quimiotáctica de Monocitos 1

MPDP+: 1-Methyl-4-Phenyl-2,3-Dihydropyridinium / 1-Metil-4-Fenil-2,3-Dihidropiridinico

MPP+: 1-Methyl-4-Phenylpyridinium / 1-Metil-4-Fenilpiridinio

MPTP: 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine / 1-Metil-4-Fenil-Tetrahidropiridina

MR: Mineralocorticoid Receptor / Receptor de Mineralocorticoides

MyD88: Myeloid Differentiation primary response gene

N

NAIDs: Non-steroidal Anti-Inflammatory Drugs / Drogas Antiinflamatorias No Esteroides

NES: Nuclear Export Sequence / Secuencia de Exportación Nuclear

NF-κB: Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NLS: Nuclear Localisation Signal / Señal de Localización Nuclear

NO: Nitric Oxide / Óxido Nítrico

NTD: N-Terminal Domain / Dominio N-Terminal

P

PAMPS: Pathogen-Associated Molecular Patterns

PBS: Phosphate Buffered Saline / Tampón Fosfato-Salino

PBST: Phosphate Buffered Saline Tween-20

PCR: Polymerase Chain Reaction / Reacción en Cadena de la Polimerasa

PD: Parkinson's Disease

PFA: Paraformaldehyde / Paraformaldehído

PGA: Periaqueductal Grey Area / Región Gris Periaqueductal

PINK: Phosphatase and Tescin Homolog Induced Putative Kinase

PKA: Protein Kinase A / Protein Kinasa A

PKC: Protein Kinase C / Protein Kinasa C

POMC: Proopiomelanocortin / Proopiomelanocortina

PR: Progesterone Receptor / Receptor de Progesterona

PVN: Paraventricular Nucleus / Núcleo Paraventricular

R

RANTES: Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted

RE: Retículo Endoplasmático

RIP: Receptor Interacting Protein

ROS: Reactive Oxygen Species / Especies Reactivas de Oxígeno

RyR: Ryanodine Receptors / Receptores de Rianodina

S

SNC: Sistema Nervioso Central

SN: Substantia Nigra / Sustancia Negra

SNpc: Substantia Nigra pars compacta / Sustancia Negra pars compacta

STAT5: Signal Transducer and Activator of Transcription 5

SUMO: Small Ubiquitin-like Modifier

T

TAK1: TGF-beta Activated Kinase 1

TGF: Transforming Growth Factor

TH: Tyrosine Hydroxylase / Tirosina Hidroxilasa

TIRAP/Mal: TIR domain-containing Adaptor Protein/MyD88-adaptor-like

TLR: Toll Like Receptors

TNF: Tumor Necrosis Factor / Factor de Necrosis Tumoral

TPR: Tetratricopeptide Repeat Proteins

TRAF6: TNF Receptor Associated Factor 6 / Factor Asociado con el Receptor de TNF6

V

VMAT2: Vesicular Monoamine Transporter / Transportador Vesicular de Aminas

VTA: Ventral Tegmental Area

Resumen / Résumé / Summary

**Según el Convenio Específico para la Obtención de tesis en cotutela entre
la Universidad de Murcia y la Universidad Pierre et Marie Curie (Paris VI)**

**Selon la convention pour l'obtention de la thèse en cotutelle entre
l'Université de Murcia et l'Université Pierre et Marie Curie (Paris VI)**

Papel de los glucocorticoides y del receptor de glucocorticoides en los procesos de neurodegeneración e inflamación en el sistema nervioso central

La activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal es uno de los mecanismos que se inducen tanto en respuesta a estrés como para regular y reprimir la reacción inflamatoria. Esta activación conduce a un aumento sistémico de los niveles de glucocorticoides (GCs) sintetizados por las glándulas suprarrenales. Los GCs ejercen sus acciones a través de la activación del receptor de glucocorticoides (GR), el cuál se expresa de forma ubicua en el organismo. Entre otras funciones, el GR activado regula la respuesta de las células inmunes a nivel transcripcional. La implicación del sistema GCs/GR en el sistema nervioso central (SNC) y su papel preciso en la supervivencia neuronal no han sido aún clarificados. Sin embargo, está establecido que los GCs pueden ejercer tanto efectos positivos como deletéreos sobre la supervivencia neuronal. Además, la regulación de las respuestas inflamatorias en el SNC varía según los niveles de GCs circulantes, el tipo de daño producido, el tipo celular implicado y el área cerebral afectada.

El objetivo principal de esta tesis es el estudio del papel de los GCs y del GR en las reacciones inflamatorias y en los procesos de neurodegeneración dopaminérgica en el SNC. Para abordar esta problemática, se ha utilizado una metodología experimental de amplio espectro que incluye el uso de modelos de parkinsonismo inducido por intoxicación con MPTP tanto in vivo como in vitro, así como modelos de inflamación aguda en el cerebro mediante inyecciones estereotáxicas de LPS. Además, se ha hecho uso de líneas de ratones transgénicas generadas mediante mutagénesis condicional gracias al sistema Cre/LoxP: ratones GR^{DATCre} y GR^{LysMCre}, que presentan GR específicamente inactivado en neuronas dopaminérgicas y microglía respectivamente.

De forma destacada, los resultados demuestran que el tratamiento con GCs previene la neurodegeneración dopaminérgica en modelos de parkinsonismo experimental *in vivo* e *in vitro*, y la activación de GR en el núcleo de las neuronas dopaminérgicas confiere protección mediante mecanismos directos sobre este tipo celular. Por otra parte, la presencia y función del GR microglial resulta esencial para evitar la exacerbación de la respuesta inflamatoria aguda inducida por una inyección intraparenquimal de LPS, previniendo así procesos de desmielinización y de degeneración neuronal. Estos trabajos presentan nuevas y potenciales dianas terapéuticas para el futuro tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y otros procesos patológicos del sistema nervioso central.

Le rôle des glucocorticoïdes et du récepteur des glucocorticoïdes dans les processus de neurodégénérescence et d'inflammation dans le système nerveux central

L'un des mécanismes stimulés pour restreindre et stopper une réaction inflammatoire est l'activation de l'axe HPA. Cette activation conduit à une augmentation systémique du taux de glucocorticoïdes (GCs) qui sont synthétisés par les glandes surrénales. Comme pour les réactions inflammatoires, les GCs augmentent lors d'une réponse au stress et dans les deux cas ils exercent leurs actions via le récepteur des glucocorticoïdes (GR) qui est exprimé de façon ubiquitaire. Une fois activé, le GR régule au niveau transcriptionnel les réponses des cellules immunitaires. L'implication du couple GC/GR dans le SNC et son rôle précis dans la survie neuronale n'ont jusqu'à présent pas été clarifiés. En effet, les régulations des réponses inflammatoires dans le SNC varient selon les taux de GCs circulant, le type de dommage, le type cellulaire ainsi que l'aire cérébrale touchée.

Le but principal de mon travail de thèse a été d'étudier le rôle des GCs et de GR dans la survie neuronale au cours des réactions inflammatoires ainsi que dans la dégénérescence des neurones dopaminergiques dans la maladie de Parkinson.

Pour réaliser cette étude, plusieurs stratégies expérimentales ont été utilisées. Nous avons notamment produit des modèles expérimentaux (in vitro et in vivo) de la maladie de Parkinson en traitant des animaux au MPTP, ainsi que des modèles d'inflammation aiguë provoquée par des injections stéréotaxiques de LPS. Nous avons également utilisé plusieurs lignées de souris transgéniques générées par mutagenèse conditionnelle grâce au système Cre/loxP: GR^{DATCre} et GR^{LysMCre} dans lesquelles le gène codant pour le GR est spécifiquement invalidé, respectivement dans les neurones dopaminergiques et la microglie.

Nos résultats montrent principalement que le traitement avec les GCs prévient la dégénérescence des neurones dopaminergiques dans les modèles de Parkinsonisme. En effet, il a été observé que l'activation du GR dans le noyau des neurones dopaminergiques leur confère une protection via des mécanismes directs. Par ailleurs, la présence du GR paraît essentielle pour éviter l'augmentation de la réponse inflammatoire aigüe induite par une injection intra-parenchymale de LPS, en prévenant les processus de démyélinisation et de dégénérescence neuronale. Ces travaux présentent de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles pour le traitement des maladies neurodégénératives et d'autres processus pathologiques du SNC.

Role of Glucocorticoids and Glucocorticoids Receptor in the inflammatory and neurodegenerative processes in the Central Nervous System

Hypothalamic–pituitary–adrenal axis is activated in response to stress and inflammatory processes. This activation lead to the increase of glucocorticoids (GCs) levels, which are released by suprarenal glands. GCs dependent processes are stimulated by the activation of the glucocorticoids receptor (GR), which is expressed ubiquitously and when activated it exerts a wide range of functions in the organism. However, the function of GCs-GR signaling in the central nervous system (CNS), and specifically in neuronal survival is scarcely known. It is thought that GCs could exert a positive or negative effect in neuronal survival, depending on circulating GCs levels, the nature of the insult, the cell type implicated as well as the area of the brain affected.

The objective of this thesis is to elucidate the role of GCs and GR in inflammatory responses and dopaminergic neurodegenerative processes in the CNS. To deal with these matters, we have utilized a wide range of experimental approaches, including the use of experimental models of Parkinsonism by MPTP intoxication, both in vivo and in vitro, as well as acute inflammation models induced by the stereotaxic injections of LPS. Furthermore, we have used mice with inactivated GR specifically in microglia ($GR^{LysMCre}$) and dopaminergic neurons (GR^{DATCre}) by conditional mutagenesis induced by the Cre-loxP system.

Importantly, we have demonstrated that GCs treatment prevents dopaminergic neurodegeneration in experimental Parkinsonism, both in vivo and in vitro, by direct activation of the GR, rearranged into the nucleus of dopaminergic neurons. This suggests that the activity of the GR in dopaminergic neurons may exerts neuroprotection by direct mechanisms. On the other hand, the expression and activity of microglial GR seems to be crucial to avoid the exacerbated inflammatory response induced by the intraparenchymal injection of LPS, leading to prevent the neuronal degeneration and demyelination process. These finding suggest new potential targets to develop specific treatments for inflammatory-associated and neurodegenerative disorders.

I. Revisión Bibliográfica

El objetivo principal de esta tesis es el estudio del papel de los glucocorticoides (GCs) y del receptor de glucocorticoides (GR) en los procesos de neurodegeneración dopaminérgica y en las reacciones inflamatorias en el sistema nervioso central (SNC). En el presente trabajo se ha usado el modelo de parkinsonismo inducido por intoxicación con MPTP tanto in vivo como in vitro, así como modelos de inflamación aguda en el cerebro mediante inyecciones estereotáxicas de LPS. Además, se han utilizado líneas de ratones genéticamente modificados para el gen de GR: ratones GR^{DATCre}, desprovistos de GR en las neuronas dopaminérgicas y ratones GR^{LysMCre}, desprovistos de GR en las células microgliales.

La revisión bibliográfica que prosigue introduce los elementos necesarios para comprender la problemática e hipótesis de los trabajos experimentales. Así, la primera sección trata sobre el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HPA), actor esencial en la reacción del organismo frente a los cambios en el medio que le rodea y el mantenimiento de la homeostasis. La activación de este eje conduce a la liberación de los GCs, principales “hormonas de estrés”. En la segunda sección presentamos el receptor de GCs, su estructura y mecanismos de acción. En la tercera sección, se aborda la temática de la inflamación en el SNC y cómo los GCs pueden influir en el transcurso de los procesos inflamatorios. Por último, la importancia de las reacciones inflamatorias en los procesos neurodegenerativos, más concretamente en la enfermedad de Parkinson (EP), y el posible papel de los GCs y de GR en ésta es el tema tratado en la sección final.

1.1 EL EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-ADRENAL Y LOS GLUCOCORTICOIDES

1.1.1 Breves reseñas históricas y conceptos

“Todo mecanismo vital, cualquiera sea su variedad, sólo tiene un objetivo, la preservación de la constancia de las condiciones vitales del medio interno”. El fisiólogo francés Claude Bernard (1813-1878) enunció esta afirmación en 1857, introduciendo el concepto de la constancia del medio interno. Esta estabilidad del medio interno no se debe a un equilibrio estático sino dinámico, que reposa sobre los sistema de regulación, permitiendo hacer frente a excesos o insuficiencias (Bernard y Delhoume, 1947). Estas ideas llevaron a Walter Bradford Cannon (1871-1945), fisiólogo americano, a forjar el término de homeostasis a partir del griego (homoio=semejante; stasis=permanecer), con el fin de designar las reacciones fisiológicas que mantienen el equilibrio dinámico del cuerpo a pesar de las modificaciones del entorno. Cannon sugirió que la activación de los sistemas homeostáticos (especialmente el que él denominó “sistema simpático-adrenal”) preserva el medio interno, al producir ajustes compensatorios y de forma anticipada que aumentan la probabilidad de supervivencia (Cannon, 1939). Así, la transgresión del estado de homeostasis provoca un “estrés”, que conduce a corto plazo a reacciones de lucha o de fuga como consecuencia del hiperfuncionamiento del sistema simpático-adrenal. El estrés se trata por tanto de una reacción adaptativa del organismo que, sin embargo, a largo plazo puede conducir a que éste se debilite.

Los trabajos de Cannon inspiraron las investigaciones posteriores de Hans Selye (1907-1982) que introdujo el concepto de estrés como síndrome o conjunto de reacciones fisiológicas, no específicas del organismo, a diferentes agentes nocivos del ambiente de naturaleza física o química (Selye, 1936). Es Selye el que por primera vez describe el eje HPA y su importancia para el desencadenamiento y transcurso de lo que denomina “reacción de

estrés”. Para explicarla, Selye elaboró un modelo fisiológico que denominó “síndrome general de adaptación” que se trata de una configuración específica del proceso y estados fisiológicos que surgen como respuesta a las diferentes clases de estímulos externos o “estresores”. El modelo se basa en la sucesión de tres fases: de alarma, de resistencia y de agotamiento (Selye, 1974). En la fase de alarma un estímulo o estresor perturba la homeostasis y el organismo responde poniendo en juego áreas del cortex, del sistema límbico, del hipotálamo y del sistema nervioso autónomo. Si el estímulo persiste, el organismo entra en una fase de resistencia en la que intenta atenuar y controlar los cambios provocados por la reacción de alarma y así llegar a una cierta estabilidad; el cuerpo puede fijar un nuevo estado de equilibrio (o estado alostático) diferente al estado inicial, en el que puede cohabitar con el estímulo estresante. Este nuevo estado de equilibrio se caracteriza por una actividad sostenida del eje HPA (de Kloet et al., 2005; McEwen y Stellar, 1993). La última fase, la fase de agotamiento, aparece después de la acción prolongada de los estresores. Las consecuencias para el organismo después del exceso de energía (siempre en aumento) empleada para mantener el estado de equilibrio son deterioro mental, alteraciones físicas y eventualmente la muerte. Este modelo fue ajustado y completado años más tarde por estudiosos posteriores, pero sin modificar el esquema básico (Chrousos y Gold, 1992; Monat y Lazarus, 1991).

Cuando pensamos en el término estresor es frecuente imaginar que se trata de un agente externo, como por ejemplo situaciones de tensión o presión en el ambiente profesional o familiar, la impotencia de enfrentarse a una enfermedad grave, etc. Sin embargo, hay que considerar que el término es más extenso e incluye agentes tanto externos como internos al organismo, de distintos tipos (psicológico, físico, fisiológico, etc.), y a distintas escalas (tanto a nivel de organismo como a nivel celular). Por ejemplo, también serían estresores comunes los daños oxidativos, la excitotoxicidad, la disfunción mitocondrial o los cambios

inmunológicos (Nguyen et al., 2002; Sorrells et al., 2009). Será necesario tener en cuenta esta aclaración para la correcta comprensión de siguientes apartados.

1.1.2 Descripción y fisiología del eje HPA

La respuesta del organismo a un estresor implica a diferentes estructuras y circuitos cerebrales. Los principales centros de control del sistema de estrés y las principales moléculas implicadas se encuentran en el hipotálamo y en el tronco del encéfalo. Destacan las neuronas del núcleo paraventricular (PVN) del hipotálamo (adyacente al tercer ventrículo) que secretan la hormona o factor liberador de corticotropina (CRF) o la vasopresina (AVP), y las neuronas noradrenérgicas del locus coeruleus (lc). El eje HPA junto con el sistema simpático-adrenal representan las vías efectoras mediante las cuales el cerebro influye en el resto de órganos periféricos durante la exposición a un estímulo de estrés (Tsigos y Chrousos, 2002).

La estimulación de las neuronas del PVN del hipotálamo provoca la secreción de CRF y de AVP a los vasos del sistema porta-hipofisario. Ambos neuropéptidos actúan de forma sinérgica para estimular la liberación de corticotropina (ACTH) en el lóbulo anterior de la hipófisis o glándula pituitaria (Fig. 1). La ACTH, pequeña hormona peptídica que deriva del proceso proteolítico del precursor proopiomelanocortina (POMC), es secretada a la circulación sistémica y va a estimular la secreción de GCs en la zona cortical de las glándulas suprarrenales (Herman y Cullinan, 1997). Los GCs contribuyen al mantenimiento del equilibrio del sistema gracias a los bucles de retroinhibición o retroactivación que reducen la síntesis y liberación de CRF en el hipotálamo, así como la síntesis de POMC y por tanto secreción de ACTH en la hipófisis (De Kloet y Reul, 1987) (Fig.1). Además, los GCs también modulan la actividad de las neuronas del PVN indirectamente, mediante vías descendentes provenientes del cortex prefrontal, el hipocampo, la amígdala, los núcleos del lecho de la estría terminal (BNST) o vías originadas en el tronco del encéfalo (Denver, 2009; Herman

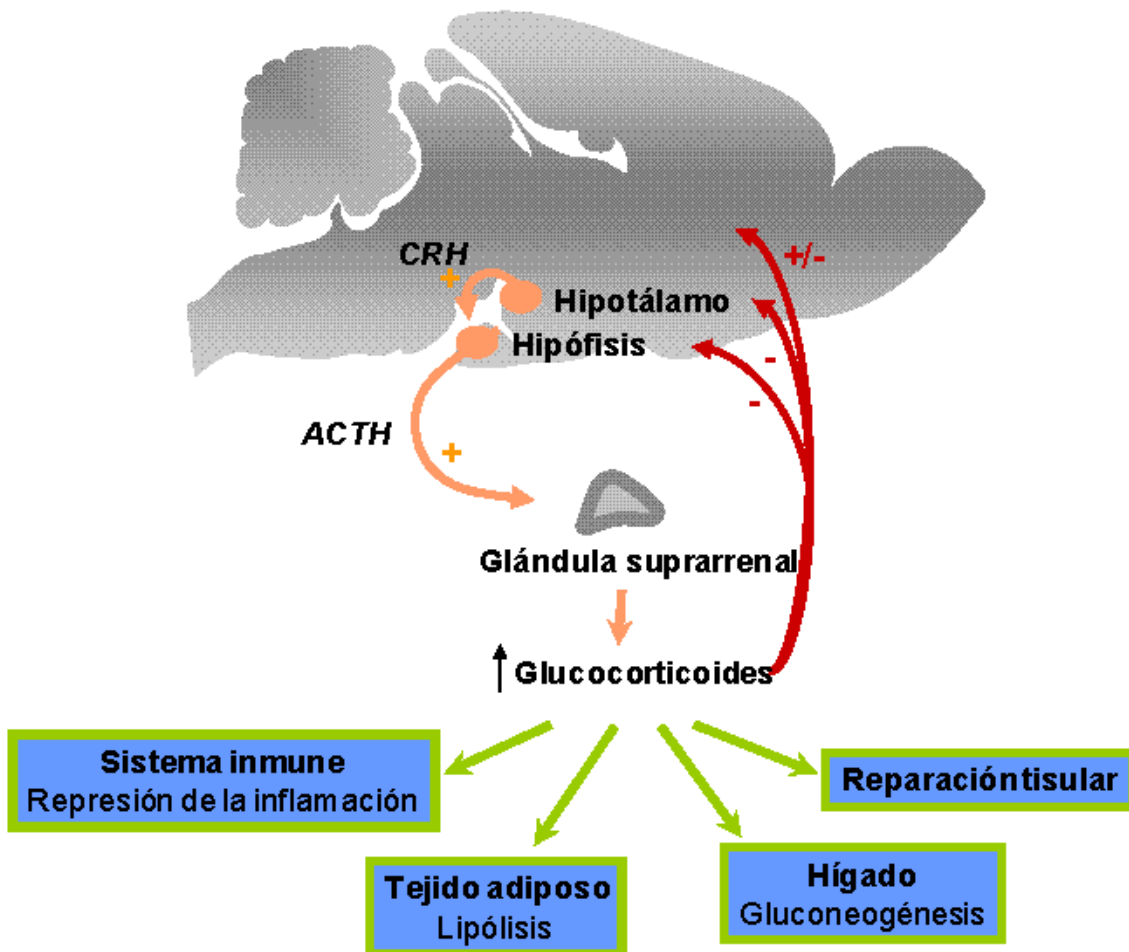


Figura 1. El eje HPA. La activación del eje HPA conduce a la producción de GCs y a su liberación por las glándulas suprarrenales al torrente sanguíneo. Los GCs ejercen un retrocontrol del eje a distintos niveles y están implicados en diversas funciones del organismo.

et al., 2005). La forma de regulación difiere según la estructura diana; así, la regulación a nivel de PVN por los GCs es inhibidora de la síntesis de CRF, mientras que es activadora en el núcleo central de la amígdala y en el BNST (Yao et al., 2008).

En el conjunto del eje HPA podríamos destacar el papel de CRF y de los GCs como elementos claves para su funcionamiento y su regulación.

1.1.3 CRF y sus receptores

La subdivisión parvocelular del PVN es la principal productora de CRF en el hipotálamo de los mamíferos; sin embargo, CRF también se expresa en otras regiones cerebrales, concretamente en el sistema límbico (hipocampo, amígdala, núcleo accumbens y BNST), tálamo, cortex cerebral, cerebelo y otras partes del romboencéfalo. Las acciones de CRF y otros péptidos de la misma familia (urocortinas) están mediadas por receptores pertenecientes a la familia de los receptores acoplados a proteína G, siendo los principales el CRFR1 y CRFR2. Ambos receptores se hallan en el SNC, aunque CRFR1 está más difundido. Concretamente CRFR1 se encuentra en el cortex, cerebelo, bulbo olfatorio, septum medial, hipocampo, amígdala e hipófisis, mientras que CRFR2 se encuentra limitado a las zonas del septum lateral, el hipotálamo y los plexos coroideos; sin embargo, CRFR2 se expresa en muchos tejidos periféricos como el sistema circulatorio, sistema gastrointestinal, pulmón y músculo esquelético (Potter et al., 1994). Durante la reacción de estrés, CRF activa el eje HPA a través de su unión a CRFR1 (por el que tiene mayor afinidad) en la hipófisis anterior, induciendo la liberación de ACTH. La unión de CRF a CRFR1 desencadena una señal de transducción que implica a protein kinasas A (PKA) y C (PKC) (Bale y Vale, 2004; Denver, 2009).

1.1.4 Las hormonas glucocorticoideas

1.1.4.1 Descripción y síntesis

Los GCs fueron descubiertos por su papel en el metabolismo de la glucosa y de este hecho proviene su nombre: gluco- por glucosa y -cortico porque son sintetizados en el cortex de las glándulas suprarrenales. Fue Hans Selye en 1936 quien describió por primera vez la fisiología de los GCs (Selye, 1936). Un año más tarde, en 1937 y 1938, fueron aislados respectivamente el cortisol y la hidrocortisona por el Dr. Kendall (Kronenberg, 2009). En 1948, Hench y Kendall utilizaron por primera vez la cortisona en el tratamiento de la artritis, basándose en la mejoría de la inflamación articular en pacientes con episodios de ictericia y pacientes embarazadas, al presumir que podía deberse a un aumento del nivel circulante de un metabolito esteroideo con propiedades antiinflamatorias (Hench et al., 1949; Hench et al., 1950; Neeck, 2002). Estos trabajos les condujeron a la obtención del premio Nobel en 1950.

Las hormonas esteroideas o corticosteroides son sintetizadas a partir de colesterol en el cortex o corteza de las glándulas suprarrenales y en las gónadas. El cortex de la glándula suprarrenal está constituido por tres zonas: la zona glomerular superficial que sintetiza los mineralocorticoides (la aldosterona es el principal), la zona fascicular intermedia donde se sintetizan los GCs y, por último, la zona reticular, más interna, donde se sintetizan gonadocorticoides u hormonas sexuales (andrógenos y estrógenos). Dentro de los GCs el principal representante en humanos es el cortisol, mientras que en roedores es la corticosterona (CORT). Los GCs se sintetizan a partir del colesterol en un proceso denominado esteroidogénesis que requiere la participación de enzimas oxidativas localizadas en las mitocondrias y en el retículo endoplasmático (Fig. 2). La primera etapa de la esteroidogénesis constituye la etapa limitante: el colesterol es transportado desde la membrana externa a la membrana interna mitocondrial y es convertido en pregnenolona por ruptura de su

cadena lateral (entre los átomos C-22 y C-20). El complejo enzimático que permite catalizar esta reacción, la desmolasa (o CYP11A1 o P450_{scc}), está presente en todas las células productoras de hormonas esteroideas y su expresión está regulada por la ACTH (Miller, 2008).

A lo largo de los años la industria farmacéutica ha sintetizados análogos del cortisol con características propias de solubilidad, vida media y grado de actividad glucocorticoide. Algunos ejemplos son la dexametasona (DEX), betametasona, triamcinolona, prednisona y prednisolona (De Bosscher y Haegeman, 2009).

1.1.4.2 La disponibilidad de los GCs

Globulina transportadora de corticosteroides (CBG). Los corticosteroides tienen naturaleza lipófila por lo que pueden atravesar las membranas mediante difusión pasiva. Sin embargo, esta propiedad les hace requerir una estrategia para su transporte en el flujo sanguíneo, que consiste en la formación de un complejo mediante la unión a proteínas plasmáticas denominadas CBGs. Así, el 95% de los GCs se encuentran unidos a la CBG (Brien, 1981; Lightman y Conway-Campbell, 2010). En la actualidad existen dos teorías que explicarían el transporte de las hormonas esteroideas. Según la primera, éstas serían liberadas por la CBG al nivel de los capilares sanguíneos, lo que les permitiría ser internalizadas por las células de los diferentes órganos diana y actuar al fijarse a sus receptores intracitoplasmáticos (Breuner y Orchinik, 2002). Según esta hipótesis, la cantidad de GCs libres, por tanto biológicamente activos, estaría en función de la cantidad y la capacidad de unión de la CBG. Diferentes condiciones (ciertos estímulos estresantes o procesos de inflamación) han sido identificados como causas por las que disminuiría la cantidad de CBG disponible o por las que se vería afectada la separación del complejo CBG-GCs, permitiendo así aumentar de una

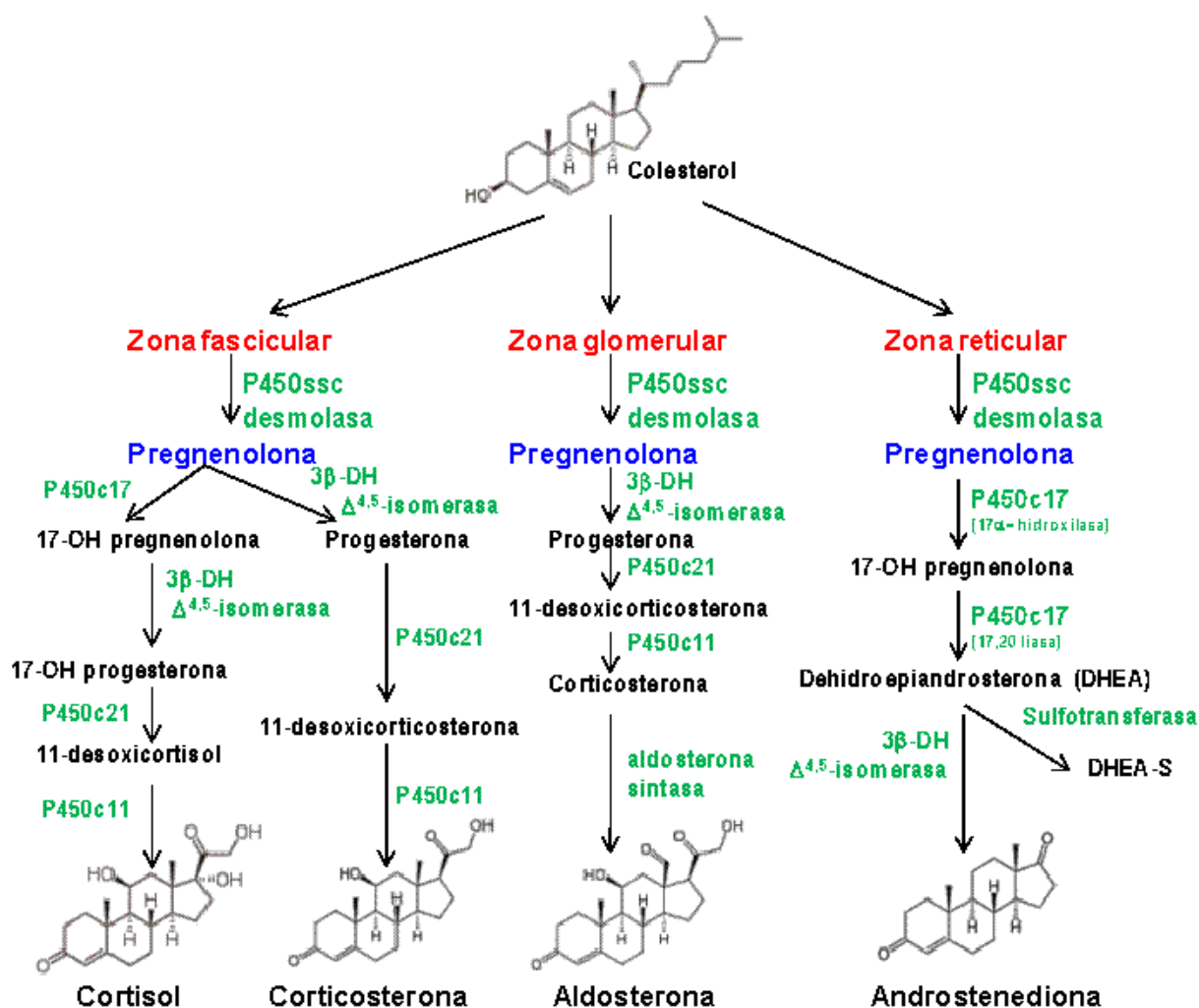


Figura 2. Esteroidogénesis en las glándulas suprarrenales. El primer paso en la biosíntesis de hormonas esteroides es la conversión de colesterol a pregnenolona por la desmolasa (P450ssc). Seguidamente, cada una de las regiones del córtex se encarga de la síntesis de hormonas esteroides específicas. La zona fascicular intermedia sintetiza los GCs, la zona glomerular superficial sintetiza los mineralocorticoides y la zona reticular sintetiza los gonadocorticoides.

forma general o local la cantidad de GCs libres (Breuner y Orchinik, 2002; Fleshner et al., 1995). La segunda teoría sugiere que el complejo CBG-corticosteroide se internalizaría en la célula diana por endocitosis, gracias a la unión a un receptor proteico de membrana: la megalina (Adams, 2005). En el interior de la vesícula de endocitosis se separaría la CBG de la hormona permitiendo su difusión en la célula receptora. Este mecanismo permitiría aumentar localmente la concentración de GCs de una forma más fina y controlada que por una simple liberación en la circulación sanguínea.

Las enzimas 11- β -hidroxiesteroide-deshidrogenasa de tipo 1 y 2 (11- β -HSD1 y 2).

La acción de los GCs sobre sus receptores depende no solamente de su concentración plasmática, sino también de las modificaciones que sufren en las células. Así, los niveles intracelulares de GCs están regulados en el interior de los tejidos diana por enzimas locales. La 11- β -HSD2 es una reductasa que inactiva los GCs al catalizar la conversión de cortisol en cortisona (o de CORT a dehidrocortisona en roedores). La 11- β -HSD1 es una enzima bidireccional que cataliza la regeneración de CORT activa a partir de derivados inactivos y posee una actividad inversa de tipo deshidrogenasa. Parece que ratones desprovistos de esta enzima muestran un retraso en la respuesta anti-inflamatoria dependiente de GCs, por lo que la 11- β -HSD1 podría tener un papel importante en los primeros estadios de este tipo de respuesta (Chapman et al., 2006). La 11- β -HSD1 se expresa también en el cerebro (cerebelo, hipocampo y cortex prefrontal) y parece estar implicada en los mecanismos de memoria, específicamente en la pérdida de ésta durante el envejecimiento (Holmes et al., 2010; Seckl y Walker, 2004).

La barrera hematoencefálica. Por su naturaleza lipofílica los GCs atraviesan fácilmente la barrera hematoencefálica. Aunque la presencia de CBP está más restringida en el cerebro, existe una P-glicoproteína denominada MDR-1 (Multi-Drug Resistance gene-1)

que se encuentra en la membrana plasmática de los astrocitos (concretamente en los podocitos) y de las células endoteliales que conforman la barrera hematoencefálica, que se encarga, entre otras cosas, de transportar hormonas esteroideas. Esta P-glicoproteína es muy importante para la protección del cerebro contra la entrada de moléculas tóxicas y extrañas y parece tener un importante papel en la regulación del acceso de GCs al cerebro (Uhr et al., 2002). Así, las MDR-1 permiten el acceso controlado de CORT y cortisol, limitando la entrada de esteroides sintéticos como la DEX, confiriendo así al cerebro resistencia a la entrada de cantidades moderadas de DEX (De Kloet et al., 1998).

1.1.4.3 Efectos fisiológicos de los GCs

Los GCs llevan a cabo acciones modulatorias de amplio rango muy importantes para el mantenimiento de la homeostasis en el organismo, actuando sobre múltiples dianas para activar o inhibir varias actividades celulares dirigidas a regular alteraciones metabólicas, endocrinas, nerviosas, cardiovasculares e inmunológicas. De este modo, los GCs ejercen un amplio rango de efectos fisiológicos:

- Efectos en el desarrollo. Algunos de los efectos más importantes de los GCs en el desarrollo fetal son, su contribución al desarrollo de los pulmones y producción de surfactante pulmonar. Además, son esenciales para el correcto desarrollo del cerebro (Bolt et al., 2001; Matthews, 2000).
- Efectos metabólicos. Intervienen en el catabolismo de proteínas, ya que aceleran la conversión de proteínas a aminoácidos, sobretudo en células musculares, incrementan el transporte de aminoácidos hacia las células hepáticas y elevan la cantidad de enzimas necesarias para la conversión de estos en glucosa como la tirosin aminotransferasa; en este sentido, favorecen la reparación tisular y la gluconeogénesis en el hígado, contribuyendo así a la resistencia al estrés. Además,

inhiben la recaptación de glucosa en el tejido muscular y adiposo, y promueven la lipólisis por movilización de lípidos de las células adiposas al hígado y también por aceleración de la degradación de triglicéridos. También ejercen efectos sobre el metabolismo del calcio, concretamente perjudican su absorción gastrointestinal y facilitan su excreción renal; inhiben la formación ósea, alterando la homeostasis del hueso, al inhibir, entre otras cosas, la proliferación y activación de los osteoblastos, mientras que aumentan la actividad de los osteoclastos. Finalmente, ejercen un efecto en el equilibrio electrolítico del organismo, al favorecer la retención de agua y sodio, y la eliminación de potasio, lo cual conduce a la hipervolemia (Koeppen, 2009).

- Efectos antiinflamatorios y sobre el sistema inmune. Estos efectos serán descritos más detalladamente en próximas secciones, al ser objeto de principal interés en esta tesis.

1.1.5 Factores que determinan la respuesta a estrés

Como vimos anteriormente, un estresor o estímulo estresante va a desencadenar una respuesta de estrés en el organismo, caracterizada, entre otras cosas, por una activación del eje HPA. La duración e intensidad del estímulo estresante va a condicionar si la respuesta a estrés tendrá o no efectos deletéreos para el organismo. Así, mientras que los estresores crónicos afectan negativamente a la función inmune, algunos trabajos sugieren que estresores breves (con duraciones menores de dos horas), pueden mejorar algunos aspectos de la función inmune, como puede ser el tráfico de células desde los órganos linfoides hacia el torrente sanguíneo y la piel (Glaser y Kiecolt-Glaser, 2005).

Además, existen otros factores como el sexo, el momento del desarrollo, o factores genéticos que pueden influir en la susceptibilidad al estrés crónico. En esta línea, hay trabajos

que muestran que ratones hembra difieren en su susceptibilidad al estrés con respecto a ratones macho. Otros estudios muestran que estresores psicológicos o inmunológicos durante las fases tempranas del desarrollo y periodo perinatal pueden tener importantes consecuencias a largo plazo y parecen contribuir a la variabilidad individual en la relación estrés-respuesta inmune (Avitsur et al., 2006; Drake et al., 2005; Kavelaars y Heijnen, 2006).

1.2. EL RECEPTOR DE GLUCOCORTICOIDES

1.2.1 Estructura molecular y expresión

Los receptores de los GCs pertenecen a la familia de los receptores esteroideos, la cual incluye en total a 6 miembros: los receptores de glucocorticoides (GR), mineralocorticoides (MR), progesterona (PR), andrógenos (AR) y estrógenos ($ER\alpha$, $ER\beta$). Estos receptores, a su vez, pertenecen a la familia de receptores nucleares que incluye, entre otros, a los receptores de hormonas tiroideas, vitamina D, ácido retinoico y hormonas sexuales (Pelaia et al., 2003). Los receptores nucleares actúan como factores de transcripción y traductores de señales que se activan por unión a hormonas de naturaleza lipofílica (Carson-Jurica et al., 1990). Tienen en común un dominio de unión al ADN denominada HRE (Hormone Responsive Element), por el cuál se unen a dominios nucleotídicos específicos situados en las regiones promotoras de sus genes diana y actúan activando o reprimiendo su transcripción. Además, son capaces de interactuar con otros factores de transcripción y modular su actividad (Chandler et al., 1983; Nordeen et al., 1990).

Las similitudes tanto estructurales como mecánísticas de los receptores esteroideos se justifican gracias a la hipótesis de que provienen de un receptor ancestral común. En efecto, estudios filogenéticos muestran que probablemente los receptores esteroideos provienen de un gen ancestral homólogo en un 71% al $ER\alpha$ humano que, por mutaciones diversas, dio lugar a

6 genes diferentes que codifican los receptores tal y como los conocemos actualmente (Thomton, 2001).

Los GCs se unen a dos receptores distintos de esta familia. Por una parte, al receptor tipo I (el MR) y por otra, al receptor tipo II (el GR). La afinidad de los GCs por MR es considerablemente mayor que por GR [para la CORT $K_d(\text{GR})= 5\text{nM}$ y $K_d(\text{MR})=0.5\text{nM}$] (de Kloet et al., 1990)]; este hecho explicaría, en parte, las acciones de los GCs dependiendo de su concentración. En esta línea y centrándonos en el SNC, al hacer una revisión conjunta de los distintos estudios sobre los efectos de los GCs en el hipotálamo, de Kloet emitió la hipótesis de que los MRs estarían implicados principalmente en los efectos tónicos de los GCs, mientras que los GRs estarían implicados en el desarrollo de la reacción de estrés, así como la recuperación hacia los estados basales del eje HPA tras su activación (De Kloet et al., 1998). El presente trabajo de tesis se centra en el estudio de GR en los procesos inflamatorios y neurodegenerativos en el SNC por lo que a continuación nos centraremos en su descripción.

El GR, al igual que los demás miembros de la familia de receptores nucleares, está compuesto por tres dominios funcionales principales (Kumar y Thompson, 1999) (Fig. 3A):

- dominio N-terminal (o NTD; N-terminal domain). Variable en función de las especies (Stolte et al., 2006), este dominio contiene una región de activación transcripcional (AF1; Activating Function 1) que permite la interacción de GR con proteínas co-reguladoras, así como con otros factores de transcripción (Kumar y Thompson, 2005). Además, presenta un dominio PEST (Pro-Glu-Ser-Thr) importante para los procesos de ubiquitinización y degradación (Wallace y Cidlowski, 2001), y sitios específicos de fosforilación, implicados en la regulación de la función del receptor (Beck et al., 2009).

- dominio de unión al ADN (o DBD; ADN binding domain). Es una región conservada entre los receptores nucleares (Stolte et al., 2006). Está constituido por dos “motivos en dedo de zinc” que interactúan con el ADN. Además, contiene regiones esenciales para la localización y exportación nuclear del receptor (NL1 y NES), su dimerización y la fijación de co-reguladores (Hard et al., 1990) (Fig. 3A). La fijación de GR a secuencias palindrómicas de ADN específicas denominadas GRE (Glucocorticoid Response Elements) en los genes diana, induce cambios conformacionales al receptor; el bucle de aminoácidos situado en el DBD se reorienta creando una superficie para el contacto con otro monómero de GR, seguidamente se induce un cambio de conformación que estabiliza las hélices α del DBD (Stockner et al., 2003). Recientes estudios muestran que el reconocimiento de los GRE es muy específico, de forma que pequeñas diferencias en estas secuencias, producen variaciones en los cambios de conformación y, consecuentemente, en la actividad reguladora de GR (Meijsing et al., 2009).
- dominio de unión al ligando (LBD; ligand binding domain). Está situado en la región C-terminal y compuesto por doce hélices α replegadas formando un bolsillo hidrofóbico donde se une la hormona glucocorticoidea (Kumar y Thompson, 1999). Además, este dominio contiene una segunda señal de translocación nuclear (NL2) y de activación transcripcional (AF2), así como regiones para la unión de proteínas chaperonas y de co-reguladores (Fig. 3A); entre ellas, un dominio de transactivación TA2 que contiene un dominio de fijación para la chaperona HSP90 y una secuencia diana para la matriz extracelular (Kumar y Thompson, 2005; Tang et al., 1998).

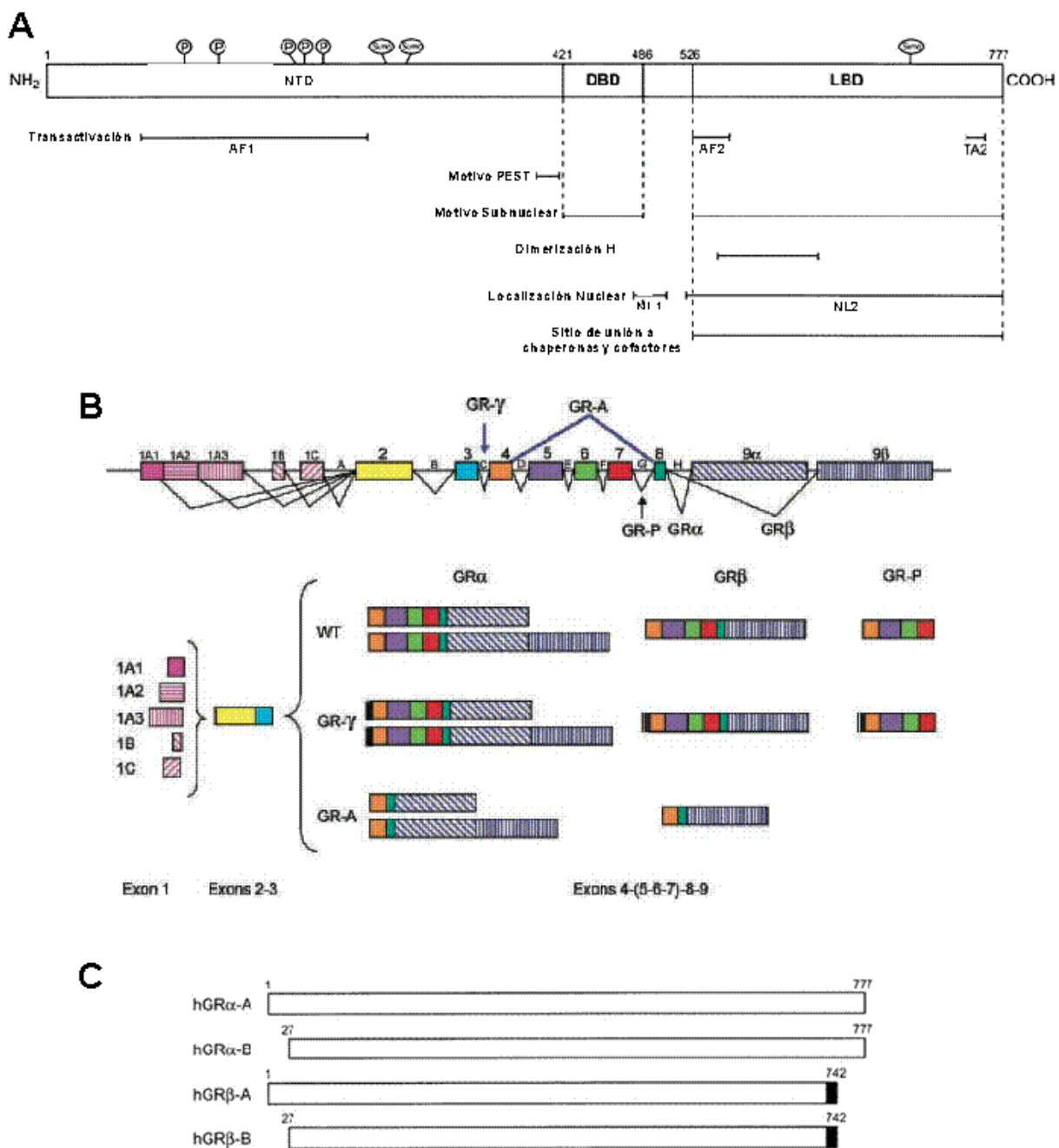


Figura 3. El GR: estructura e isoformas. (A) El GR humano consta de tres dominios: el dominio N terminal (NTD) que contiene sitios de fosforilación, una secuencia de transactivación AF1 y una secuencia PEST necesaria para los procesos de degradación; el dominio de unión al ADN (DBD) en el que se distingue un dominio de dimerización y una secuencia de localización nuclear NL1, y el dominio de unión al ligando (LDB) con dos secuencias de transactivación (AF2 y TA2) y un segundo NL (NL2). (B) Esquema de las posibilidades de splicing alternativo y las distintas isoformas de GR resultantes. (C) Algunas variantes de transcritos de GR. Nótese la diferencia de longitud de las proteínas resultantes. (Modificado de Lu y Cidlowski, 2004 y Sanchez-Vega et al., 2006).

1.2.2 Isoformas

Con esta estructura común, el GR es una proteína formada por 777 aminoácidos en el ser humano, 795 en la rata y 783 en el ratón (Beck et al., 2009). El gen de GR humano (hGR) se localiza en el cromosoma 5q11-q13, consta de 9 exones y fue clonado por primera vez por Hollenberg (Hollenberg et al., 1985). Aunque sólo se conoce un gen para hGR (así como para el resto de especies), se han identificado múltiples isoformas (Fig. 3B y 3C), debido a la presencia de al menos tres promotores distintos, al splicing alternativo (que originaría las isoformas: GR α , GR β , GR γ , GR-A, GR-P) y a sitios diferentes para el comienzo de la traducción (GR α -A, GR α -B, GR α -C1, GR α -C2, GR α -C3, GR α -D1, GR α -D2, o GR α -D3). Aunque los dominios N- y C-terminal pueden variar según la isoforma, el dominio DBD permanece constante (Beck et al., 2009; Lu y Cidlowski, 2004; Yudt y Cidlowski, 2002). El GR humano “clásico” de 777 aminoácidos es la isoforma hGR α , que es la predominante, funcional y normalmente estudiada, presentando un amplio patrón de expresión. La segunda isoforma mejor caracterizada en humanos es hGR β que resulta de un splicing alternativo del exón 9 y está compuesto por 742 aminoácidos. A diferencia de la primera, la presencia de hGR β es mucho menor, tanto en cantidad como en distribución. Además, es transcripcionalmente inactiva e incapaz de unirse a agonistas o antagonistas. Igualmente, parece ejercer un efecto negativo sobre la actividad de GR α al formar heterodímeros hGR $\alpha\beta$ a los que no pueden unirse las proteínas coactivadoras de forma normal (De Kloet et al., 1998; Yudt et al., 2003). La presencia de esta isoforma en determinadas células se relaciona, junto con otras causas, con el desarrollo de resistencias a GCs (Yudt et al., 2003). En esta línea, hay trabajos que muestran asociaciones entre algunas condiciones inflamatorias y altos niveles de expresión de hGR β en determinadas células. Se ha visto que determinadas citocinas proinflamatorias como IL-8, TNF α e IL-1 aumentan su expresión (Strickly et al., 2001;

Webster et al., 2001). Nuestro trabajo se centra en el estudio de la isoforma hGR α , por lo que la denominación GR a lo largo del manuscrito se referirá a ésta.

El por qué de la existencia de esta variedad de isoformas aún no se ha clarificado. Se han identificado variaciones en su ubicación y su función. Así, por ejemplo, las isoformas GR-P y GR γ se expresan solamente en células cancerígenas y otras isoformas parecen presentar funciones específicas de refuerzo o inhibición de la acción de GR α (Yudt y Cidlowski, 2002), aunque la función de algunas de ellas sigue siendo desconocida. La presencia de las distintas isoformas parece influenciar la respuesta a los GCs para cada tipo de célula. De hecho, la complejidad biológica de los GCs estaría ligada en mayor medida a la variedad de receptores, dejando en un segundo plano a los propios ligandos (Sanchez-Vega et al., 2006; Yudt y Cidlowski, 2002).

1.2.3 Activación y regulación

Los GCs son capaces de atravesar la membrana plasmática debido a su pequeño tamaño y a su naturaleza hidrofóbica. Al llegar al citoplasma, se unen al GR citosólico induciendo un cambio o activación conformacional que le permite liberarse de la mayoría de proteínas del complejo chaperona que lo estabiliza en el citoplasma y desenmascarar las señales de localización nuclear (NLS) (Fig. 4). Estos cambios, permiten su translocación al núcleo donde ejercerá efectos positivos o negativos en la transcripción de sus genes diana (Beck et al., 2009). A continuación expondremos cada una de las etapas de este proceso y trataremos algunos mecanismos que regulan la actividad de GR.

1.2.3.1 GR en ausencia de ligando

GR en su forma inactiva (sin ligando unido), se localiza principalmente en el citoplasma celular. Allí, se encuentra unido a un complejo proteico que deja accesible el

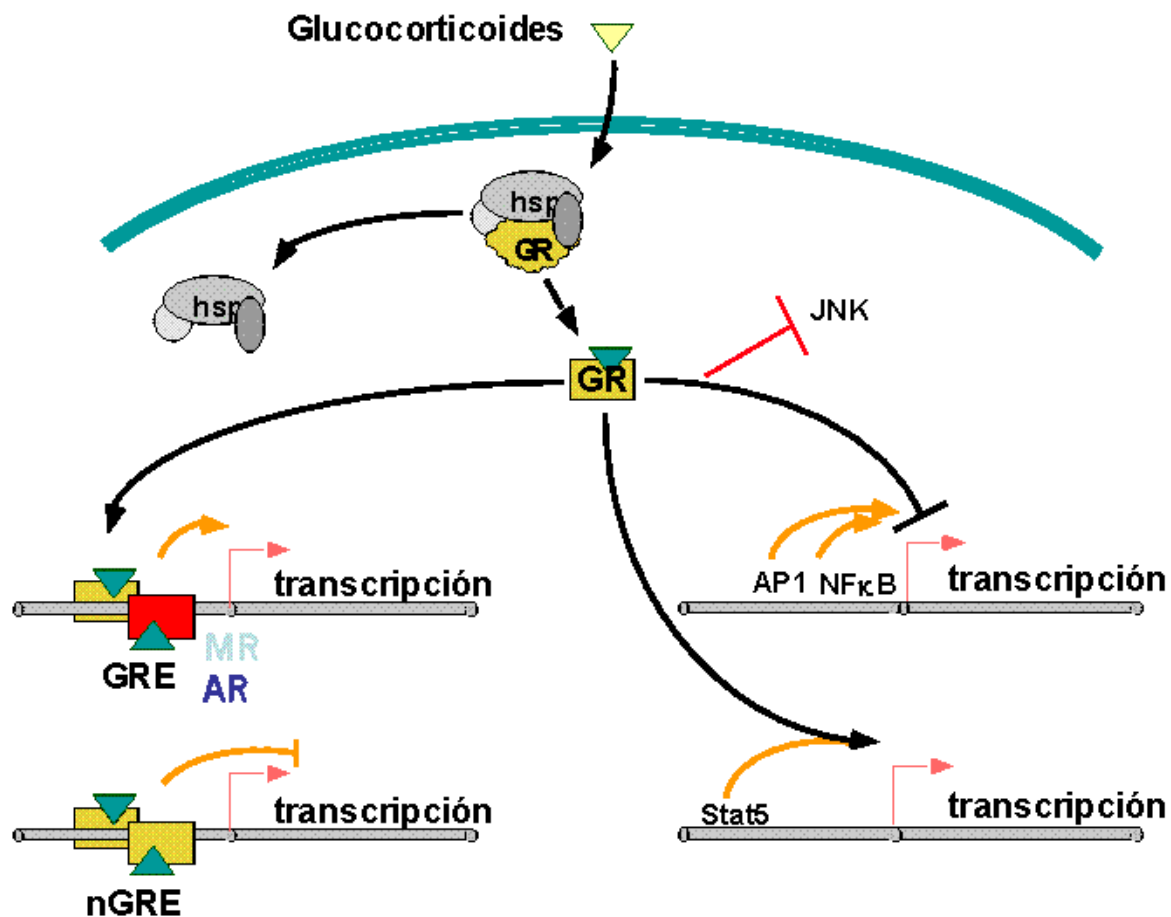


Figura 4. Mecanismos de acción de GR. La forma inactiva de GR se encuentra principalmente en el citoplasma unida a un grupo de proteínas chaperonas (como HSP90 y HSP70). La unión de GCs a GR promueve su translocación al núcleo donde actúa modificando la transcripción génica mediante distintos mecanismos: unión directa en forma de dímeros a los sitios GRE del ADN, perturbación o reforzamiento de la acción de diferentes factores de transcripción mediante interacción proteína-proteína. Estos mecanismos pueden conllevar la transactivación o transrepresión de los genes diana. En concreto, los mecanismos de transrepresión son esenciales para el control que GR ejerce sobre los procesos de inflamación.

dominio de unión al ligando e inaccesibles las NLS, NL1 y NL2. Este complejo está compuesto por proteínas chaperonas de choque térmico (HSP90 y HSP70), la proteína de unión a HSP90 p23, la proteína p60, las immunofilinas (también denominadas TPR: tetra-trico-peptide repeat proteins) FKBP52, FKBP51 (FK506-binding protein), la ciclofilina 40 (Cyp40) y la fosfatasa PP5 que participa en el ensamblaje y la estabilización del complejo (Beck et al., 2009).

Por orden de actuación, una primera chaperona HSP40 presentaría el GR nativo a HSP70 que se uniría a él de manera estable por hidrólisis de ATP (Laufen et al., 1999). HSP70 va a iniciar la apertura del bucle hidrofóbico del dominio LBD permitiendo así la unión de HSP90 al receptor. Ésta última chaperona tiene un papel importante en los efectos alostéricos de los ligandos y coreguladores de GR, y puede estabilizar la conformación de GR para favorecer el acceso de LBD al ligando (Ricketson et al., 2007). La proteína p60 conduce a la formación de un complejo inestable GR – HSP90 – p60 – HSP70. A continuación, la proteína p23 estabiliza el complejo; su presencia es indispensable para que el receptor tenga una actividad máxima de unión al ligando. Además, HSP90 interacciona con las secuencias TPR de p60 y de las immunofilinas; éstas modifican la afinidad de unión del GR al ligando gracias al dominio PPIase (PeptidilPropyl Isomerase); también pueden modificar su actividad transcripcional y sus efectos en la modulación comportamental y fisiológica (Davies et al., 2005; Riggs et al., 2003). Todas estas interacciones y ensamblaje requieren hidrólisis de ATP y están sometidas a regulaciones finas por parte de otras proteínas como Hip y Bag-1 (Grad y Picard, 2007).

1.2.3.2 La translocación al núcleo, reciclaje y exportación

Las immunofilinas FKBP52 y PP5 están implicadas en la translocación de GR al núcleo, gracias a la actividad de su dominio PPIase que les permite interactuar con la

dineína y realizar así el movimiento retrógrado del complejo GR-chaperonas-inmunofilinas a lo largo de los microtúbulos del citoesqueleto. Por otro lado, la inmunofilina FKBP51 inhibiría la translocación al núcleo, ya que posee baja afinidad por la dineína; por eso, el complejo interaccionaría con FKBP51 antes de su unión al ligando y pasaría a interaccionar con FKBP52 tras la unión a éste (Wochnik et al., 2005). Cuando el complejo llega al nivel de la envoltura nuclear, las proteínas pequeñas pueden atravesar la membrana o los poros nucleares por difusión pasiva. En cambio, las proteínas mayores de 40kDA necesitan de una maquinaria de importación-exportación para atravesar el poro nuclear. Concretamente, una secuencia de localización nuclear va a ser reconocida por la importina- α que ligada a la importina- β favorecen el paso a través del poro (Terry et al., 2007). El clásico modelo de translocación de GR propone la unión de éste a la importina- α y su disociación de HSP90 (Savory et al., 1999). Sin embargo, recientes estudios muestran una segunda posibilidad en la que GR pasaría unido a HSP90, el cual interaccionaría con otras proteínas del poro como Nup62 (Echeverria et al., 2009).

Está bien establecido que la translocación de GR al núcleo depende de la concentración extracelular de GCs (Kitchener et al., 2004). Sin embargo, no es el único factor: varios estudios realizados en el SNC, defienden la existencia de otros factores que contribuirían a la regulación de los niveles de translocación nuclear de GR como serían la regulación de su degradación por proteosomas, la influencia de ciertos neurotransmisores, los niveles de co-expresión de MR, así como la acción de la 11- β -HSD1 (Noguchi et al., 2010). Actualmente se ha identificado una región del GR denominada señal de retención nuclear (NRS) que favorece su permanencia en el núcleo (Carrigan et al., 2007).

Una vez en el núcleo, el GR va a asociarse a las secuencias nucleotídicas diana (GRE) o a otros factores de transcripción para modular la expresión génica. Parece que las

chaperonas pueden participar en este proceso. De hecho, HSP90 puede quedar unido a GR, estabilizando su unión al ADN y aumentando su actividad transcripcional (Grad y Picard, 2007). Tras ser separado de la cromatina o de sus co-reguladores, el GR puede ser reciclado al reconstruirse el complejo GR-HSP90-HSP70. Este complejo puede ser exportado al citoplasma o directamente reactivarse en el núcleo mediante una nueva unión a la hormona, para nuevamente actuar sobre la expresión de sus genes diana (Grad y Picard, 2007; Pratt et al., 2004). La exportación de GR al citoplasma se realiza gracias a la unión de las exportinas a la secuencia NES de exportación que posee GR (Black et al., 2001).

1.2.3.3 Modificaciones post-traduccionales y degradación de GR

La actividad de GR puede afectarse por varios tipos de modificaciones post-traduccionales como la fosforilación, SUMOilación, ubiquitinización acetilación, además de nitrosilación y regulación redox (Beck et al., 2009).

La fosforilación es la modificación post-traducciona l más estudiada y mejor establecida para GR. En roedores se han identificado ocho sitios de fosforilación situados en el NTD (Bodwell et al., 1995); mientras que en humanos se han identificado cinco, y recientemente otros seis in vitro que faltan por confirmar in vivo (Gallihier-Beckley et al., 2008; Ismaili y Garabedian, 2004), todos ellos se encuentran en la región AF1 del NTD. Enzimas de las vías de las MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) y CDK (Cyclin Dependent Kinase) están implicadas en los procesos de fosforilación de GR, mientras que fosfatasas como PP1, PP2A y sobretodo PP5 son responsables de los fenómenos de defosforilación. El estado de fosforilación de GR va a influir en su capacidad de unión al ADN, en su localización a nivel celular y en su vida media; además, puede alterar sus interacciones con proteínas co-reguladoras y chaperonas, así como afectar su actividad transcripcional (ampliamente revisado en Beck et al., 2009).

La SUMOilación es una modificación por la cual se unen pequeñas proteínas SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier) a otra proteína para modificar su función (Geiss-Friedlander y Melchior, 2007). Tres sitios de SUMOilación han sido identificados en hGR. Esta modificación puede afectar a la estabilidad de GR, su localización subcelular y su actividad transcripcional. Algunos estudios las identifican como elementos de control inhibitorio de la actividad de GR (Davies et al., 2008; Holmstrom et al., 2008).

Varios sitios sensibles a la ubiquitinización han sido identificados en el mGR (K426) y en el hGR (K419). Parece que la fosforegulación de la actividad de GR resulta clave para su proceso de degradación proteosomal mediada por ubiquitinización (Beck et al., 2009). El GR posee un dominio PEST que sirve de sitio de reconocimiento para las ubiquitin ligasas E2/E3 (Wallace y Cidlowski, 2001). La co-chaperona CHIP actúa como una ubiquitin ligasa E3, disociando p23 del complejo GR-HSP90 e induciendo la ubiquitinización de GR y su degradación por el proteosoma (Grad y Picard, 2007).

Por último, el proceso de acetilación de GR tiene influencia en sus acciones sobre la inflamación, ya que es un prerrequisito para la asociación de GR con el factor de transcripción NF- κ B (homo o heterodímero; siendo una de las formas más habituales la conjunción p65-p50), y además promueve la represión mediada por GCs del gen GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor).

1.2.4 Expresión y mecanismos de acción de GR

El GR se expresa en la mayoría de los distintos tipos celulares. Su nivel de expresión varía según el tejido, siendo elevado en ciertos órganos como el hígado, los riñones, los bronquios, el bazo y en ciertas estructuras del cerebro como en el sistema límbico, concretamente en el hipocampo (de Kloet et al., 1990; Pujols et al., 2002)

La función principal de GR es regular la expresión de una gran cantidad de genes diana mediante diversos mecanismos (Fig. 4). Por una parte puede producir la transactivación (incremento en la tasa de expresión) o transrepresión (disminución de la tasa de expresión) de determinados genes al unirse en forma de dímeros a secuencias GRE, o mediante la unión y modulación de la actividad de factores de transcripción activadores o inhibidores. Además, GR está implicado también en mecanismos rápidos no transcripcionales.

1.2.4.1 Efectos transcripcionales de GR dependientes de su unión al ADN

GR unido a su ligando puede estimular la expresión de ciertos genes por unión en forma de homodímeros a las ya mencionadas secuencias GRE. Los sitios GRE son secuencias palindrómicas imperfectas constituidas por 15 nucleótidos, que por su estructura permiten la fijación de dos moléculas de GR (Stockner et al., 2003). Esta unión va a permitir a la maquinaria transcripcional acceder al ADN. La especificidad de acción de GR en el tiempo y en los diferentes tipos celulares está determinada por su afinidad hacia las secuencias GRE, el conjunto de factores de transcripción presente en la región promotora, así como la incorporación diferencial de co-reguladores. Es importante tener en cuenta que los GRE pueden variar en función de la secuencia promotora, en el número de copias y en su localización relativa dentro del promotor; por esto se dice que las GRE actuarían como “ligandos alostéricos específicos de secuencia” para GR, regulando la especificidad y magnitud de su respuesta (Meijsing et al., 2009). Sin embargo, aunque la probabilidad de encontrar sitios GRE en el genoma es muy elevada, pocos de ellos son realmente funcionales (Beck et al., 2009).

GR también puede reprimir directamente la transcripción de genes que posean una secuencia palindrómica negativa (o nGRE). Una vez activado, GR puede unirse a estas secuencias adquiriendo una conformación que resulta inhábil para el reclutamiento de la

maquinaria de transcripción y para la fijación a otros factores de transcripción. Este es el caso del gen POMC, que codifica el precursor de la ACTH (Dostert y Heinzl, 2004).

1.2.4.2 Efectos transcripcionales de GR independientes de su unión al ADN

Una gran parte de los mecanismos de acción de GR no son dependientes de su unión a los sitios GRE, sino de su interacción con otros factores de transcripción. De hecho, varios estudios muestran que muchos genes bien conocidos como inducibles por GCs no contienen secuencias GRE consenso. Algunos de ellos poseen promotores que contienen “composite elements”; GR se une a estas secuencias, y el complejo GR-factor de transcripción se une al ADN. Así, GR puede aumentar la transcripción de forma cooperativa (Diamond et al., 1990; So et al., 2007). También GR puede unirse a factores de transcripción ya fijados al ADN y modificar su acción (Beck et al., 2009)

Al igual que para los efectos dependientes de la unión al ADN, los efectos independientes pueden conducir a la activación o inhibición de la transcripción de genes dependiendo de la función del factor de transcripción al que se haya unido GR. Por ejemplo, GR puede formar un complejo con STAT5 (Signal Transducer and Activator of Transcription 5) y actuar como co-activador a nivel de hepatocitos, estimulando la expresión de la hormona de crecimiento (GH) (Stocklin et al., 1996). De hecho, la invalidación de GR en los hepatocitos conduce a una disminución del tamaño de estos ratones (Tronche et al., 2004). Por otra parte, la mayoría de las acciones antiinflamatorias e inmunosupresoras de GR (que trataremos con más detalle en secciones posteriores) están mediadas por la represión por parte de GR de ciertos factores de transcripción como AP1 (Activator Protein 1) y NF- κ B (Reichardt et al., 2001) (Fig. 4). Otros factores de transcripción a los que GR puede unirse para reprimirlos son Oct-1, CREB, Smad3, Smad6, Ets2, T-box (en células T) y GATA3 (Beck et al., 2009).

1.2.4.3 La remodelación de la cromatina por GR

La remodelación de la cromatina es una etapa crucial en la transcripción ya que controla la accesibilidad del ADN a los factores de transcripción, los co-reguladores y a la maquinaria de transcripción. La compactación del ADN desfavorece la unión de factores de transcripción. El GR participa en la modificación de la estructura de la cromatina al asociarse a ciertos complejos de remodelación de la cromatina o interaccionar en los procesos de acetilación (Beck et al., 2009). Por ejemplo, un estudio muestra que GR puede inhibir la actividad de los cofactores CBP/p300 implicados en el aumento de la actividad de las enzimas HAT (Histone Acetyl Transferase), lo que conduce a la inhibición de las acetilaciones de la cromatina inducidas por TNF α e IL-1 β (Ito et al., 2000). Además, altas concentraciones de GCs pueden inducir la expresión de enzimas que desacetilan las histonas (HDAC, Histone Deacetylase) que conducirían a la represión de genes inflamatorios (Ito et al., 2000).

1.2.4.4 Los efectos no genómicos de GR y GCs

Los “clásicos” mecanismos de acción de los GCs tienen lugar después de horas o incluso días tras su exposición. Sin embargo, los GCs ejercen efectos mucho más rápidos que afectan respuestas celulares en unos pocos minutos. Estos efectos rápidos, muchas veces buscados y utilizados en el ámbito clínico, no están regulados a nivel transcripcional sino que implican otro tipo de mecanismos de GR (Buttgereit y Scheffold, 2002).

Así, por ejemplo, se ha descrito que GR puede translocarse a la mitocondria de linfocitos y otros tipos celulares, donde puede contribuir al inicio de la cascada apoptótica. Este hecho se correlaciona con la inducción de la apoptosis (o muerte celular programada) que ejercen los GCs en algunos tipos celulares (Du et al., 2009; Sionov et al., 2006). También GR puede inducir sus efectos directamente en el citoplasma, mediante unión a otras proteínas;

por ejemplo, tratamientos con DEX inducen la fosforilación de ZAP-70 en linfocitos a través de su unión al complejo GR-HSP90 en el citoplasma (Boelens et al., 2009). Por otra parte, se ha descrito en linfocitos de roedores y humanos, así como en el cerebro de anfibios un GR de membrana que se encuentra acoplado a proteína G, y parece que los GCs pueden ejercer efectos neurofisiológicos y comportamentales a través de este receptor (Evans et al., 1998; Gametchu, 1987). Igualmente, los GCs por sí mismos pueden ejercer efectos directos en la membrana celular.

Además, GR puede modular la estabilidad del ARNm, lo que constituye una modificación post-transcripcional de la expresión génica. Por ejemplo, estudios muestran que los GCs inhiben la síntesis de MCP-1/CCL2 (monocyte chemoattractant protein-1/Chemokine (C-C motif) ligand 2), quimiocina encargada de atraer los monocitos y macrófagos a regiones dañadas a través de este mecanismo. GR se uniría a una proteína con actividad ribonucleasa facilitando la degradación del ARNm de CCL2 (Dhawan et al., 2007). También se han descrito interacciones de GR con el ARNm de la ciclooxigenasa COX-2 que conllevan su degradación (Nishimori et al., 2004).

1.2.5 Los modelos murinos genéticamente modificados para GR

Como hemos visto hasta ahora, los GCs presentan una gran diversidad y complejidad de acciones; por esta razón, se hace necesario el uso de herramientas metodológicas que permitan una mejor comprensión de sus mecanismos de acción. El uso de modelos murinos transgénicos constituye una herramienta muy valiosa para el estudio de las acciones de los GCs y de GR in vivo.

Los primeros modelos de invalidación del gen de GR fueron generados por recombinación homóloga y permitieron la **invalidación constitutiva** de la proteína, gracias a

la inserción de un casete de neomicina en el segundo exón (que contiene el sitio de iniciación de la traducción), dando lugar a los ratones GR^{hypo/hypo} (“hypo” de hipomorfo), o la delección del tercer exón (que codifica el dominio DBD) dando lugar a los ratones GR^{null/null}. Los primeros expresan una proteína GR truncada que posee una actividad limitada, pero que es suficiente para la viabilidad del animal (Cole et al., 1995). En los ratones GR^{null/null} no se expresa la proteína GR en absoluto; en consecuencia, los neonatos mueren por falta de maduración de los pulmones (Tronche et al., 1998). Otro modelo transgénico se generó al introducir una mutación puntual en la parte del gen que codifica el segundo motivo en dedo de zinc del dominio DBD, impidiendo la dimerización de GR (ratones GR^{dim/dim}) (Reichardt et al., 1998) (Fig. 5A).

Dado que GR se expresa de forma ubicua, su invalidación en el organismo completo conduce a la muerte precoz del animal, impidiendo el estudio de su función en los estadios adultos. Por ello, se han utilizado técnicas de **mutagénesis condicional** a fin de conseguir una invalidación del gen GR solamente en un tejido o tipo celular concreto. Algunas de las técnicas empleadas son:

- **el uso de ARN antisentido.** La expresión del ARN antisentido de GR reduce la expresión de éste entre un 40 y un 60% dependiendo del tejido o tipo celular de interés (Barden et al., 1997). Este es el modelo utilizado por Morale y colaboradores en sus trabajos sobre GR y modelos de parkinsonismo por intoxicación con MPTP, donde muestran que ratones Tg (que expresan el ARN antisentido contra GR desde el desarrollo embrionario) son más vulnerables a la muerte neuronal dopaminérgica inducida por intoxicación con MPTP (Marchetti et al., 2005; Morale et al., 2004). El inconveniente de este método es que no permite una invalidación total del gen, dependiendo su nivel de extinción del tipo tisular o celular, lo cual no permite realizar estudios rigurosos sobre los efectos de GR. Además, concretamente el

modelo utilizado en los trabajos citados no permitía una invalidación específica de GR para un tipo de célula concreto.

- **el sistema Cre/LoxP.** Este sistema se basa en el uso de la actividad recombinasa de Cre (Cyclisation recombination), una proteína integrasa presente en ciertos virus capaz de escindir o transponer fragmentos de ADN. La recombinasa Cre utilizada normalmente está codificada por el bacteriofago P1 y reconoce secuencias de ADN de 34 pares de bases (pb) denominadas sitios loxP (Locus of X-over of P1). Cada sitio loxP consta de dos secuencias de 13 pb a las que se fijan sendos monómeros de Cre, separadas por 8 pb entre sí. La recombinación tiene lugar cuando los sitios loxP se encuentran enfrentados y en sentido opuesto, permitiendo la unión y ensamblaje de los cuatro monómeros de Cre. La recombinasa Cre va a catalizar entonces el corte y ligación del ADN, resultando en la escisión del fragmento situado entre dos sitios loxP con la misma orientación (Tronche et al., 2002).

En el caso de GR, dos sitios loxP flanqueando el exón 3 fueron introducidos por recombinación homóloga generando el alelo GR^{loxP} . La modificación introducida no interfiere con la actividad normal del gen GR y los ratones $GR^{loxP/loxP}$ tienen un fenotipo similar al de los ratones silvestres (Tronche et al., 1998). Así, en las células que expresen la recombinasa Cre, el exón 3 de GR será escindido, transformando los alelos de GR^{loxP} en alelos GR^{null} . Diferentes líneas de ratones Cre han sido generadas ubicando la recombinasa Cre bajo el control de un promotor específico de un tejido o tipo celular. Al cruzar estos ratones con los $GR^{loxP/loxP}$ se obtienen líneas en las que el gen para GR está invalidado específicamente en un tejido o tipo celular, por ejemplo en los hepatocitos $GR^{AlfpCre}$ (Balsalobre et al., 2000), en las células precursoras del páncreas GR^{PdxCre} (Gesina et al., 2004), o en las células del sistema nervioso central GR^{NesCre} (Tronche et al., 1998).

Para la realización del trabajo experimental de esta tesis se han utilizado dos de estas líneas de ratones: GR^{DATCre}, que presentan GR invalidado específicamente en las neuronas dopaminérgicas (DA); y GR^{LysMCre} que presentan GR invalidado específicamente en monocitos, macrófagos (diferenciados a partir de los monocitos) y neutrófilos (Fig. 5B). La línea de ratones GR^{DATCre} fue generada al cruzar ratones GR^{loxP/loxP} con ratones DAT-iCre que expresan la recombinasa mejorada iCre (codon-improved Cre recombinase) bajo el control de los elementos reguladores del gen que codifica el transportador de dopamina (DAT); para ello, iCre fue insertada en el gen DAT de ratón, mediante un BAC (Bacterial Artificial Chromosome) utilizado para introducir la modificación genética en el animal (Ambroggi et al., 2009; Turiault et al., 2007). La línea de ratones GR^{LysMCre} fue generada al cruzar ratones GR^{loxP/loxP} con ratones transgénicos LysMCre, que expresan Cre bajo el control del promotor de la lisozima M de ratón (Clausen et al., 1999). La lisozima M es una proteína que se expresa específicamente en las células mieloides (Cross et al., 1988). Los animales GR^{LysMCre} se caracterizan por la ausencia de GR principalmente en monocitos, macrófagos y neutrófilos, mientras que las células dendríticas y los mastocitos están menos afectados por la recombinación inducida por Cre (Tuckermann et al., 2007). En el SNC las células gliales de tipo microglía presentan un origen y naturaleza común a los macrófagos; por tanto, los ratones GR^{LysMCre} presentan GR invalidado también en este tipo celular, constituyendo una herramienta de gran valor para el estudio de las funciones de GR en la microglía (Fig. 5B).

1.3. LA RESPUESTA INFLAMATORIA EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL. PAPEL DE LOS GCs.

1.3.1 Integración Neuro-endocrino-inmunológica

Existe una gran cantidad de trabajos que estudian y ponen en evidencia las interacciones entre los sistemas inmunológico, endocrino y SNC. Hace ya algún tiempo,

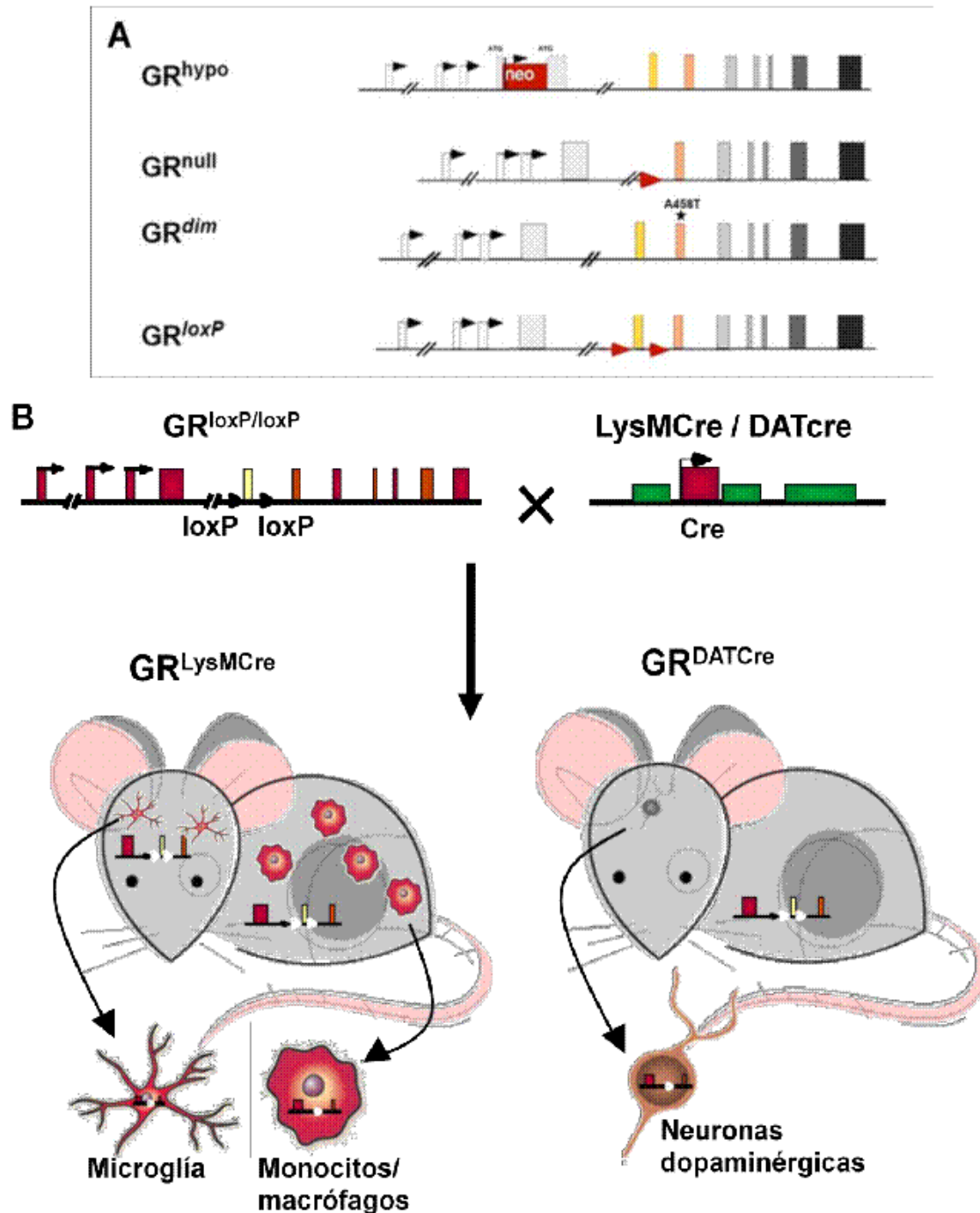


Figura 5. Diferentes alelos de GR y modelos murinos modificados genéticamente por mutagénesis condicional. (A) Diferentes alelos de GR creados por inserción del casete de neomicina (GR^{hypo}), delección del exón 3 (GR^{null}), introducción de una mutación puntual en el exón 4 (GR^{dim}) o por la introducción mediante recombinación homóloga de sitios loxP flanqueando el exón 3 (GR^{loxP}). (B) El cruce de ratones $GR^{loxP/loxP}$ con ratones LysMCre o DATCre genera respectivamente ratones $GR^{LysMCre}$ (con GR invalidado en monocitos/macrófagos y por tanto microglía) o ratones GR^{DATCre} (con GR invalidado en neuronas DA). Ambos tipos son ejemplos de modificación genética por mutagénesis condicional, mediante el uso del sistema Cre/LoxP.

se pensaba que el sistema inmune era autónomo y que se regulaba internamente mediante citocinas producidas por las propias células inmunes. Sin embargo, en la actualidad, existen más evidencias que demuestran que estos tres sistemas pueden comunicarse directamente, resultando esta comunicación esencial para el mantenimiento de la homeostasis del individuo. Incluso hay autores que los consideran como un único sistema. Según Blalock “el sistema nervioso y el sistema inmune hablan un lenguaje bioquímico común y se comunican mediante un circuito bidireccional que involucra ligandos compartidos como neurotransmisores, hormonas y citocinas” (Blalock, 2005). De hecho, el concepto de comunicación bidireccional entre el sistema inmune y el endocrino se estableció firmemente con los trabajos de este autor y sus colaboradores a principio de los años ochenta (Blalock, 1984). Los primeros estudios mostraban puntos comunes en las vías de acción de inmunoreguladores (como el interferón) y hormonas (como noradrenalina) (Blalock, 1985; Weigent y Blalock, 1987). A mediados de los años ochenta se llega a la idea de que las citocinas con función inmunoreguladora también son un nexo de unión entre el sistema inmune y el neuroendocrino (Besedovsky et al., 1986; Woloski et al., 1985).

El sistema inmune innato constituye la primera barrera de defensa contra los patógenos, al reconocer moléculas específicas de éstos: los PAMPs (pathogen-associated molecular patterns). Igualmente, los componentes tanto celulares como moleculares de este sistema pueden activarse como consecuencia de daños en el SNC, así como por enfermedades neurodegenerativas (Nguyen et al., 2002; Stemberg, 2006). En el contexto de la presente tesis, este hecho resulta de gran importancia, ya que constituye una vía de respuesta común ante los dos modelos de inflamación (tratamiento con la endotoxina LPS) y neurodegeneración (parkinsonismo inducido por MPTP) utilizados. El sistema inmune innato libera productos inflamatorios y citocinas que activan rápidamente respuestas del SNC; éstas a su vez amplifican la respuesta inmune e inducen respuestas neuroendocrinas sistémicas y locales

para conseguir restaurar la homeostasis. Si las respuestas del SNC son inapropiadas o prolongadas, se pueden desencadenar procesos de inflamación incontrolada, con exceso en la respuesta inflamatoria, que pueden conducir a daños tisulares y/o exacerbación de la muerte neuronal en los procesos neurodegenerativos (Marques-Deak et al., 2005) (Fig. 6).

En cuanto al sistema nervioso, el sistema nervioso periférico constituiría la primera línea de defensa en los sitios puntuales de la inflamación, al liberar neuropéptidos que normalmente aumentan la respuesta inmune. Generalmente, el sistema nervioso simpático (principalmente adrenérgico) y el parasimpático (exclusivamente colinérgico) inhiben la inflamación a nivel local, mediante la inervación de los órganos inmunes. A su vez, el control neuroendocrino de la inflamación se produce a nivel sistémico principalmente por acciones antiinflamatorias de los GCs liberados por la activación del eje HPA, pero también a través de las hormonas sexuales liberadas por los testículos y ovarios (por activación del eje hipotálamo-pituitaria-gonadal) y a través de las hormonas tiroideas, liberadas por las glándulas tiroideas (por activación del eje hipotálamo-pituitaria-tiroideas) (Stemberg, 2006). En cuanto a las células del sistema inmune, existen numerosos trabajos que muestran la expresión de receptores y moléculas que les permiten responder a los factores neurales (receptores de neurotransmisores, neuropéptidos y neurohormonas), y algunas células, como los linfocitos, capaces de producir hormonas como insulina, factor de crecimiento y un compuesto similar a la prolactina, entre otras (Montgomery et al., 1990; Stemberg, 2006; Turnbull y Rivier, 1999). En esta comunicación del sistema inmune con el sistema endocrino y el SNC también intervienen las citocinas que median diferentes señales en el cerebro y que influyen en la actividad secretora del eje HPA. Las demostraciones directas de que estas moléculas están involucradas en las respuestas fisiológicas o fisiopatológicas del eje HPA se focalizan en las citocinas IL-1, IL-6 y TNF α (Turnbull y Rivier, 1999; Webster et al., 2002).

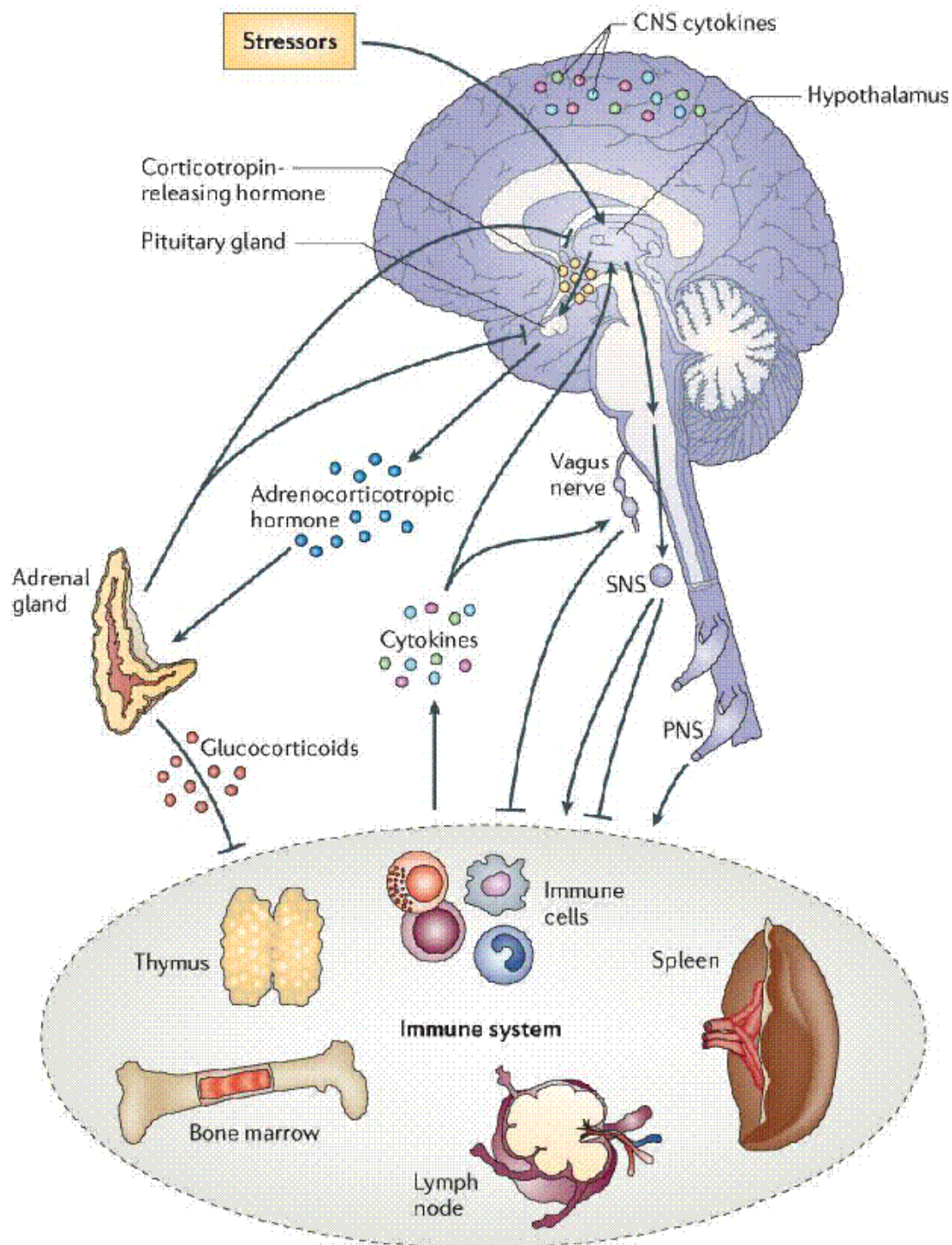


Figura 6. Esquema de conexiones entre Sistema Nervioso, Sistema Endocrino y Sistema Inmune.

La activación del eje HPA por diferentes estresores (infección, lesión endógena, etc) produce liberación de GCs, cuya acción es esencial para la regulación de la respuesta inflamatoria. Tanto el sistema nervioso como el endocrino regulan la respuesta inflamatoria mediante distintos mecanismos. El sistema nervioso lo hace a través de la activación de los sistemas parasimpático y simpático (neurotransmisores como la acetilcolina o noradrenalina inhiben la respuesta inmune). El sistema endocrino actúa principalmente a través de los GCs, de tal forma, que disfunciones en el eje HPA presentes en enfermedades autoinmunes, así como niveles crónicos y altos de GCs incrementan la susceptibilidad a padecer infecciones. (Extraído de Sternberg et al., 2006).

Como veremos en apartados posteriores, la función de los GCs en este conjunto de interacciones entre los tres sistemas ante una reacción inflamatoria es prevenir la llegada de las células inmunes desde los órganos inmunes hasta los lugares de inflamación, reducir la activación de las células involucradas en la respuesta inmune innata y disminuir la producción de citocinas, contribuyendo, en definitiva, a la inhibición de la respuesta inflamatoria.

1.3.2 Efectos antiinflamatorios de los GCs

1.3.2.1 Efectos a nivel molecular

Los GCs pueden ejercer sus efectos antiinflamatorios tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional, mayormente mediante transrepresión, pero también mediante activación transcripcional o transactivación (Clark, 2007). GR puede modular gran cantidad de proteínas y vías de señalización involucradas en los procesos inflamatorios, por lo que a continuación nos centraremos en las más importantes y en aquellas que pueden tener más relevancia en el contexto de este trabajo de tesis.

A nivel molecular, los procesos inflamatorios pueden desencadenarse por señales proinflamatorias como factores virales o bactericidas [como el lipopolisacárido (LPS)], o citocinas como IL-1 β o TNF α producidas por las propias células en respuesta a daños celulares o cambios en el medio que les rodea. Las distintas señales proinflamatorias van a culminar en la activación de rutas comunes que desencadenarán las respuestas inflamatorias. Una de estas vías comunes concierne a la activación de factores de transcripción, como AP-1 y NF- κ B e IRF3 que promueven la transcripción de citocinas proinflamatorias, quimiocinas y moléculas de adhesión (Beck et al., 2009) (Fig. 7).

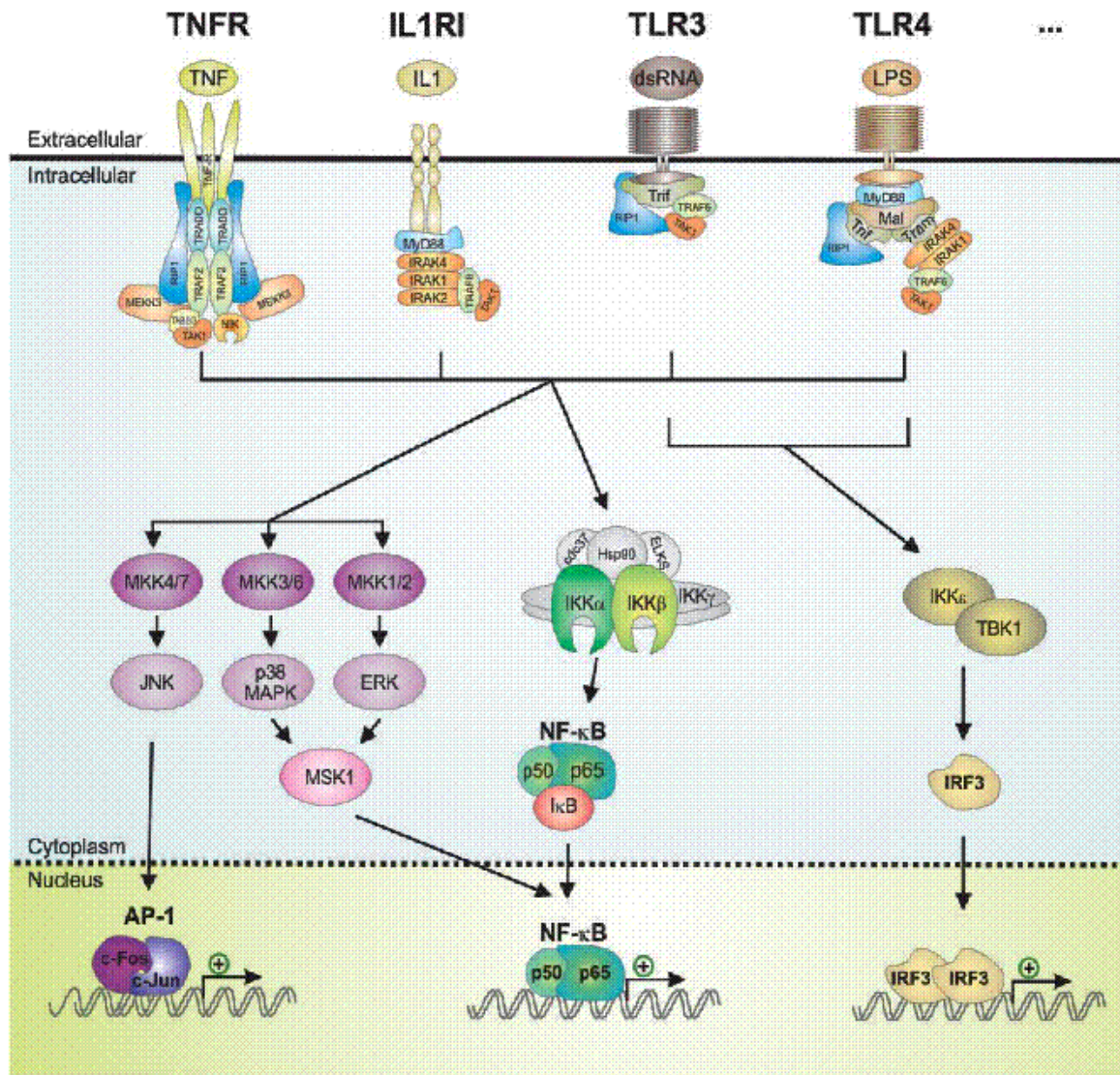


Figura 7. Respuesta inflamatoria a nivel molecular. Factores virales o bactericidas como el LPS, citocinas como TNF e IL-1 β , así como ARNs de doble hélice, pueden iniciar distintas rutas de inflamación por unión y activación de sus receptores específicos. Algunas de las rutas que se activan en la inflamación son la ruta de la MAPK kinasas y las rutas dependientes e independientes de la proteína MyD88 iniciadas por activación de TLR4. Todas ellas culminan con la activación y regulación de factores de transcripción como NF- κ B, AP-1 e IRF3 que modulan la expresión de genes diana implicados en la inflamación. (Extraído de Beck et al., 2009).

Los GCs, por activación de GR, son capaces de inhibir la acción de estos factores de transcripción. En concreto, la represión de NF- κ B por GR puede producirse de forma indirecta, por inducción de la expresión de I κ B α (proteína que se une a las subunidades p65 y p50 de NF- κ B, reteniéndolo en el citoplasma en forma inactiva) o de forma directa por inhibición de p65 (Auphan et al., 1995; De Bosscher et al., 1997). La acción de NF- κ B comprende, entre otras cosas, el control de la quimiotaxis y la activación de los leucocitos, el control del metabolismo celular, el procesamiento de antígenos y la regulación negativa de la vía de señalización de TNF; todo ello por la activación de la transcripción de citocinas como IL-6, la quimiocina IL-8, moléculas de adhesión como E-selectina, quimiocinas como RANTES (Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted) y enzimas como iNOS y COX-2. Por lo tanto, las consecuencias de la represión de NF- κ B por GR serán la inhibición de estos procesos. Igualmente, la represión de AP-1 implica la afectación de sus funciones en la regulación de la proliferación celular, diferenciación celular y apoptosis (Beck et al., 2009).

Entre las vías de señalización celular importantes para el control de la expresión de genes proinflamatorios encontramos las cascadas de MAPKs, que constan de un módulo de kinasas formado por al menos tres elementos diferentes: MAPKKK, MAPKK y MAPK (estas últimas comprenden a ERK, JNK o SAPK y p38 MAPK) (Jeffrey et al., 2007). Estas vías de señalización de kinasas son reguladas bien positiva bien negativamente por GR a distintos niveles (Beck et al., 2009).

Como mencionamos anteriormente, la actividad de GR puede ser modificada al ser fosforilado por MAPKs, pero al mismo tiempo GR puede inactivarlas directa o indirectamente. Así, numerosos estudios muestran que los GCs a través de GR inhiben la fosforilación (y por tanto activación) de JNK, ERK y p38 MAPK, de una forma dependiente

del tipo celular (Beck et al., 2009), contribuyendo al bloqueo de la actividad proinflamatoria. Por ejemplo, GR puede interactuar directamente con JNK modificando su actividad; al mismo tiempo, esta interacción puede disminuir indirectamente la actividad de AP1 (Caelles et al., 1997). Los GCs inhiben la asociación de Raf-1 (una MAPKKK) con Ras (una GTPasa activadora de vías MAPKs), lo que conduce a una menor activación de ERK (Cissel y Beaven, 2000). En cuanto a p38 MAPK, en muchas líneas celulares se ha visto afectada su activación por inhibición de su fosforilación mediada por GR (Bhattacharandya et al., 2007); sin embargo, tratamientos prolongados con GCs pueden producir aumento de su fosforilación (Miller et al., 2005).

La desfosforilación de JNK, ERK y p38 MAPK inducida por GCs, puede ocurrir también de forma indirecta por la activación de la fosfatasa DUSP1 (o MKP1, MAPK fosfatasa 1) (Abraham et al., 2006; Kassel et al., 2001). Esta fosfatasa se expresa en respuesta a GCs en un amplio rango de tipos celulares: mastocitos, monocitos, macrófagos, microglía, linfocitos T, fibroblastos de distintos tejidos, células endoteliales, osteoblastos, adipocitos y otros (Clark, 2007).

Los GCs también puede inhibir la inflamación al estimular la síntesis de anexina-1 (también denominada lipocortina1), miembro de una familia de proteínas que se unen a la membrana fosfolipídica y son dependientes de calcio (Gerke et al., 2005). Esta proteína inhibe la liberación de prostaglandinas proinflamatorias y afecta la extravasación de leucocitos en las zonas de inflamación (Lim y Pervaiz, 2007). Aunque diferentes estudios mostraron que la utilización de anticuerpos neutralizantes de la anexina-1 inhibía los efectos antiinflamatorios de los GCs (Duncan et al., 1993), trabajos más recientes han mostrado que los efectos de GCs sobre la anexina-1 dependen del tipo celular y se le puede considerar como mediador de ciertas acciones antiinflamatorias de los GCs; al mismo tiempo, parecen contribuir al

desarrollo de ciertos efectos secundarios como la supresión del eje HPA y la consecuente insuficiencia adrenal (Buckingham et al., 2006).

GILZ (glucocorticoid inducible leucine zipper) es otra proteína cuya transcripción es activada por GR en distintos tipos celulares implicados en la respuesta inmune y en el cerebro. GILZ puede interaccionar directamente con NF- κ B y AP1 afectando su función transcripcional; también pueden unirse a Raf-1 impidiendo su fosforilación y inhibiendo, por tanto, a la vía MAPKs que culmina en la activación de ERKs (Beck et al., 2009; Clark, 2007).

Además, los GCs median la activación de otras proteínas implicadas en la lucha contra la inflamación, como son: SLPI (de secretory leukocyte protease inhibitor), la citocina antiinflamatoria IL-10, el receptor tipo II de IL-1 (decoy receptor), Dexas1 (dexamethasone-induced Ras1), SLAP (de Src-like adaptor protein), p11 (calpactin binding protein), receptores β 2-adrenérgicos, SOCS1 (de E3-ubiquitin ligase suppressor of cytokine signaling) y tristetraprolin (TTP) (Beck et al., 2009). Al mismo tiempo, median la inhibición de la expresión de citocinas (IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-11, IL-12, IL-13, TNF α , GM-CSF), quimiocinas (IL-8, RANTES, MIP-1 α , MCP-1/CCL-2, MCP-3, MCP-4, eotaxina), enzimas (fosfolipasa A₂ citoplasmática (PLA₂), iNOS, COX-2), receptores y proteínas (endotelina-1, receptores NK₁ y NK₂) y moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM, E-selectina), todas ellas involucradas en los procesos inflamatorios (Barnes, 1998, 2006). Normalmente esta inhibición es indirecta mediada por factores de transcripción u otras vías implicadas en los procesos de inflamación vistos anteriormente (Fig. 8A).

1.3.2.2 Efectos a nivel celular

Parte de las acciones antiinflamatorias de los GCs provienen de su habilidad para inducir apoptosis en ciertas células inflamatorias como mastocitos, eosinófilos, macrófagos,

células dendríticas y linfocitos T (Smoak y Cidlowski, 2008; Sternberg, 2006), o disminuir la apoptosis de otros tipos celulares como los neutrófilos (Barnes, 1998) y otras células residentes de origen epitelial (Smoak y Cidlowski, 2008). Estos efectos específicos según el tipo celular parecen ser consecuencia de una regulación génica diferencial (incluyendo los mecanismos de transactivación y transrepresión comentados anteriormente), aunque los mecanismos diferenciadores no se conocen aún con total exactitud. Además de las interacciones con los factores de transcripción NF- κ B y AP1, los GCs deben inducir la apoptosis por la regulación que ejercen sobre la transcripción de varios miembros de la familia Bcl-2, que pueden ser pro o anti-apoptóticos (Du et al., 2009). Del mismo modo, el descubrimiento de distintas isoformas de GR α , que pueden regular genes concretos y se distribuyen específicamente en diferentes tejidos, ayuda a explicar los efectos diferenciales de los GCs según el tipo celular (Beck et al., 2009) (Fig. 8B).

Los GCs además de inducir apoptosis también promueven la fagocitosis de los desechos apoptóticos (que podrían inducir una reacción inflamatoria), mediante el aumento de la capacidad fagocítica de los macrófagos (Giles et al., 2001). Además, los GCs inhiben el tráfico y movimiento de las células inmunes al reducir la expresión de moléculas de adhesión (ver arriba) y quimioatrayentes. En esta línea, los GCs afectan la producción y secreción de las quimiocinas MCP-1/CCL2 y IL-8 por parte de los eosinófilos, y disminuyen la expresión de IL-5 por parte de los mastocitos; todo ello dificulta la actividad de los eosinófilos. También regulan negativamente la expresión de MCP-2 y MCP-3 por los linfocitos T, afectando la quimiotaxis de monocitos, células dendríticas y natural killer (Pype et al., 1999; Smoak y Cidlowski, 2008).

A

Tabla 1. Efectos de los GCs en la transcripción génica

Incremento de la transcripción (transactivación)

Anexina I (licocortina-1, inhibidor fosfolipasa A₂)
 Receptor β₂-adrenérgico
 CCL10 (inhibidor fosfolipasa A₂)
 Antagonista receptor IL-1
 Receptor IL-1 tipo II ("decoy receptor")
 IκB-α
 GILZ
 MCP-1
 IL-10 (indirectamente)

Descenso de la transcripción (transrepresión)

Citocinas:
 de IL-1 a IL-6, IL-9, de IL-11 a IL-13, IL-16, IL-18, TNFα, GM-CSF, SCF
 Quimiocinas:
 IL-8, RANTES, MIP-1α, MCP-1, MCP-3, MCP-4, eotaxina
 Moléculas de adhesión:
 ICAM-1, VCAM-1, E-selectina
 Enzimas inflamatorias:
 iNOS, COX-2 inducible, cPLA₂
 Receptores de Inflamación:
 Receptores NK1 y NK2, receptores de Bradiquinina β₂
 Péptidos
 Endotelina-1

Abreviaturas: CCL10: chemokine ligand 10; IL: interleukin; IκB-α: inhibitor of nuclear factor-κB; GILZ: glucocorticoid-induced leucine zipper protein; MKP: mitogen-activated protein kinase phosphatase; TNF: tumor necrosis factor; GM-CSF: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; SCF: stem cell factor; RANTES: regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted; MIP: macrophage inflammatory protein; MCP: monocyte chemoattractant protein; ICAM: intercellular adhesion molecule; VCAM: vascular cell adhesion molecule; iNOS: inducible nitric oxide synthase; cPLA₂: cytoplasmic phospholipase A₂.

B

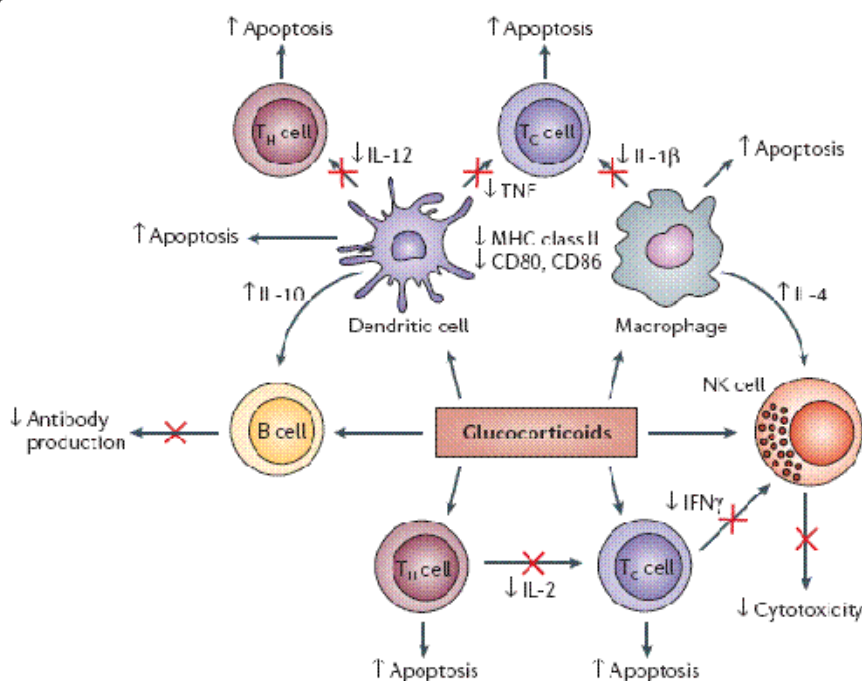


Figura 8. Efectos de los GCs sobre la transcripción génica de moléculas y función de células implicadas en procesos inflamatorios. Los GCs inhiben la producción de ciertas citocinas, quimiocinas y moléculas de adhesión, lo que provoca efectos en los procesos de fagocitosis, quimiotaxis y diferenciación celular. Además promueven la apoptosis de linfocitos T, macrófagos y células dendríticas. (A) Tabla resumen de los genes sobre los que GCs modifica su transcripción por transactivación o transrepresión (modificado de Barnes et al., 2006). (B) Esquema de los efectos de los GCs sobre las células inmunes (extraído de Sternberg et al., 2006).

La respuesta inmune adaptativa (dependiente de linfocitos T y B) va a ser modulada por los GCs, ya que afectan a la diferenciación de los linfocitos T helper a T_H1 (implicados en la respuesta inmune celular), principalmente al inhibir la producción de IL-12 por las células dendríticas y macrófagos; en cambio, promueven la diferenciación a T_H2 (encargados de la producción de citocinas y regulación de la respuesta humoral) al promover la diferenciación de las células B en células secretoras de anticuerpos (Agarwal y Marshall, 2001; Franchimont, 2004). Las personas que padecen niveles de estrés crónico (y por lo tanto producen elevados y mantenidos niveles de GCs) pueden tener problemas en la respuesta inmune celular, lo que podría explicar su mayor susceptibilidad a padecer resfriados comunes e infecciones por herpes virus simplex (Sainz et al., 2001).

1.3.3 Modelos de inflamación en el SNC: administración de LPS. La vía de TLR4

El uso de lipopolisacárido (LPS) constituye una herramienta clave para establecer modelos de inflamación en el SNC. El LPS es el constituyente principal de la capa externa de la membrana externa de las bacterias Gram negativas y se puede obtener mediante su lisis. La administración de esta endotoxina purificada simula la respuesta inflamatoria ante una infección por bacterias Gram-negativas, sin necesidad de infectar al huésped activamente; por esta razón su uso en investigación está muy extendido (Dauphinee y Karsan, 2006; Turnbull y Rivier, 1999). De hecho, constituye el ejemplo mejor caracterizado de respuesta inflamatoria mediada por macrófagos y células dendríticas, así como por la microglía específicamente en el SNC (Nadeau y Rivest, 2002).

El LPS va a ser reconocido por los receptores Toll Like Receptors 4 (TLR4), conduciendo a la activación de su vía molecular y el subsecuente desencadenamiento de una respuesta inflamatoria (Fig. 9). Este proceso requiere de otras moléculas: el LPS se va a unir inicialmente a una proteína de unión LBP (LPS-binding protein) que se encuentra en el suero,

y el complejo LPS-LBP será reconocido por CD14, una molécula de glicosilfosfatidilinositol anclada a la membrana de monocitos/macrófagos y neutrófilos preferentemente. Cuando CD-14 está unido a LPS-LBP se induce su interacción con TLR4 (Jiang et al., 2000). Para que la respuesta a LPS sea eficiente, TLR4 requiere una proteína accesoria, MD-2, que se une a su dominio extracelular (Shimazu et al., 1999). Además de LPS, TLR4 puede reconocer otro tipo de moléculas del propio huésped, como ciertas HSP (Ohashi et al., 2000). Por otra parte, aunque TLR4 es la principal vía de reconocimiento de LPS, algunos estudios muestran que podría ser reconocido por otro tipo de moléculas, como HSP70, HSP90, el receptor de quimiocinas 4 (CXCR4) y el factor de crecimiento/diferenciación 5 (GDF5) (Triantafilou et al., 2001).

Los TLR están formados por un dominio extracelular rico en repeticiones de leucina y un dominio citoplasmático similar a la porción citoplasmática del receptor de IL-1 (IL-1R) que se denomina Toll/IL-1R receptor o dominio TIR. Debido al descubrimiento de esta similitud, se pensó que la vía mediada por los TLR debía estar involucrada en la regulación de las respuestas inmunes, ya que debían ser rutas similares a las desencadenadas por IL-1 (Nguyen et al., 2002; Takeda et al., 2003).

Las vías de señalización intracelular dependientes de TLR4 se pueden clasificar en 2 tipos:

- Vía dependiente de MyD88 (myeloid differentiation primary response gene). El dominio TIR de TLR4 interacciona con el dominio TIR de MyD88. Esta proteína adaptadora contiene un dominio de muerte celular que se asocia con la serin-kinasa IRAK, que a su vez activa otra proteína adaptadora: TRAF6 (receptor de factor de necrosis tumoral asociado al factor 6). La proteína TAK1 es consecutivamente activada por su asociación con TRAF6. Una vez que TAK1 está activada, media la

fosforilación y activación del complejo IKK (kinasa I κ B), que contiene dos subunidades catalíticas (IKK α e IKK β) y una reguladora (IKK γ). NF- κ B se encuentra normalmente secuestrado por unión a I κ B en el citoplasma. IKK activa, va a fosforilar a I κ B permitiendo la liberación y translocación al núcleo de NF- κ B (Nguyen et al., 2002; Takeda et al., 2003) (Fig. 9).

Otra molécula denominada ECSIT (evolutionarily conserved signaling intermediate in Toll pathways) es capaz de interaccionar con TRAF6 activada y MEKK1, una MAPKKK que media la activación de NF- κ B y AP-1, vía inducción de JNK y ERK (Kopp et al., 1999). Otra rama de esta vía se activa cuando la serin/treonin-kinasa RIP2 se asocia con TRAF6 para inducir la activación de NF- κ B, vía inducción de la IP3K (de inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase) y Akt (McCarthy et al., 1998) (Fig. 9).

- Vía independiente de MyD88. La proteína TIRAP/Mal (de TIR domain-containing adaptor protein/MyD88-adaptor-like), se asocia con TLR4 por interacción de sendos dominios TIR. Esta vía culmina con la activación de IRF3. Los factores IRF inducen de la expresión de IL-12 e iNOS (Takeda et al., 2003) (Fig. 9).

Algunos estudios muestran que la subunidad p65, que forma parte de la mayoría de los tipos de NF- κ B, funciona como coactivador de IRF3 en la vía de TLR4 (Wietek et al., 2003) y viceversa (Ogawa et al., 2005). El GR activado por GCs inhibe la expresión de los genes inducidos por TLR4 al unirse competitivamente a p65, constituyendo un mecanismo de transrepresión (Ogawa et al., 2005).

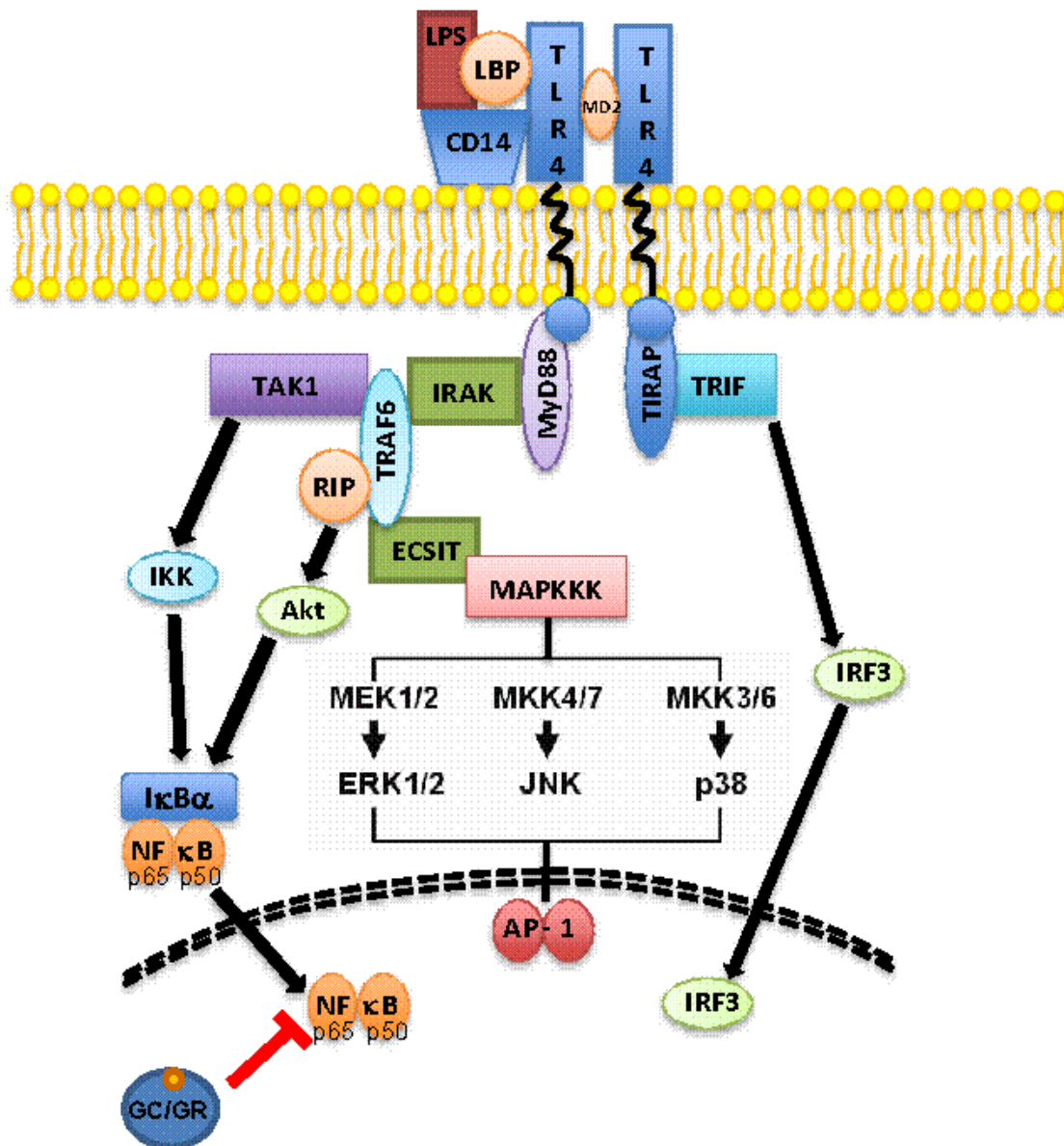


Figura 9. Vía de señalización de TLR4. El LPS interactúa con TLR4 y con CD14 tras interactuar con su proteína de unión (LBP), e inicia cascadas de señalización intracelular que pueden ser dependientes o independientes de la molécula adaptadora MyD88. Las diferentes vías culminan con la activación de los factores de transcripción NF- κ B, IRF-3 y AP-1, induciendo una respuesta inflamatoria. (Modificado de Dauphinee y Karsan, 2006).

Los TLR están involucrados en la transición desde la respuesta inmune innata a la adaptativa, ya que contribuyen a la maduración de las células dendríticas al ponerlas en contacto con componentes de organismos patógenos, e inducir la expresión de moléculas como CD80/CD86 y citocinas proinflamatorias como IL-12. Las células dendríticas maduras presentarán los antígenos mediante moléculas MHC de clase II a las células T en los órganos linfoides. Además, las vías de señalización de TLR son críticas en la determinación del balance T_H1/T_H2 (Akira et al., 2001).

TLR4 se expresa en células del sistema inmune innato, principalmente en monocitos/macrófagos, mastocitos y células dendríticas mieloides (sobre todo en las inmaduras y en menor medida en las maduras) (Visintin et al., 2001). Además, TLR4 se expresa en otros tipos celulares que contribuyen a la respuesta inflamatoria, como las células epiteliales del riñón, pulmón, córnea, dermis e intestino. En estas últimas TLR4 se encuentra expresado en bajas cantidades para evitar el desencadenamiento de fuertes respuestas inflamatorias (Takeda et al., 2003). En cuanto a la regulación de la expresión de TLR4 está influenciada por factores como las invasiones de microbios, la presencia de componentes de estos, así como citocinas. Algunas de las citocinas que modulan la expresión de TLR4 son MIF (macrophage migration inhibitory factor) e $IFN\gamma$, que aumentan su expresión en monocitos/macrófagos (Bosisio et al., 2002; Roger et al., 2001). Además, T1/ST2, un miembro de la familia de IL-1R, presente en mastocitos, células T_H2 y fibroblastos, contribuye a la expresión de TLR4 en estas células (Sweet et al., 2001).

1.3.4 La microglía como mediador de la respuesta inflamatoria en el SNC. Efectos de los GCs: control de la reacción inflamatoria en el SNC

El principal tipo celular implicado en el desencadenamiento de la respuesta inmune innata en el SNC es la microglía. Estas células, descritas por Río-Hortega en 1919 (Rezaie y

Male, 2002), provienen de la misma línea germinal que los monocitos/macrófagos (origen mieloide), y en general cumplen la función de “macrófagos del SNC”. Concretamente, pueden dividirse en diferentes subtipos dependiendo de su morfología y localización (Lassmann et al., 1993; Rinner et al., 1995). Así, la microglía del parénquima se diferencia a partir de monocitos que migran al SNC durante el desarrollo embrionario, manteniéndose en cantidad más o menos estable en los individuos adultos. Sin embargo, en las zonas afectadas por un daño se observa un aumento del número de microglía activada (Lehnardt et al., 2003). Ésta proviene bien de microglía del parénquima que migra hacia las zonas dañadas, bien de monocitos perivasculares que se diferencian a este primer tipo de microglía. Por otra parte, estos monocitos o microglía perivascular, constituiría el segundo tipo de microglía que deriva de los monocitos circulantes y que está en proceso de renovación continuo (Hickey et al., 1992). Este último tipo de microglía también se denomina macrófagos leptomeningeaes (Lehnardt et al., 2003), ya que son muy abundantes en las leptomeninges, plexos coroideos y órganos circunventriculares del cerebro, que constituyen las zonas más vascularizadas del cerebro.

La microglía contribuye a la respuesta inmune en parte por su propiedad de expresión de CD14 y TLR4 (que está reducida en el resto de células gliales y en las neuronas) (Lehnardt et al., 2003). De hecho, el LPS resulta neurotóxico solamente en presencia de microglia, lo que por otra parte indica que la microglía puede contribuir a iniciar daños neuronales (Block et al., 2007). Las células microgliales de las regiones cerebrales más vascularizadas están estratégicamente posicionadas para responder a los estímulos que activan la vía de TLR4, lo que conlleva la producción de las citocinas TNF α , IL-1, IL-6 (entre otras) por activación de NF- κ B. A su vez, TNF α es capaz de activar la transcripción génica dependiente de NF- κ B tanto autocrina como paracrinamente sobre otras células microgliales adyacentes, favoreciendo así la expansión de la respuesta inflamatoria por el parénquima cerebral

(Nguyen et al., 2002). Esta respuesta inflamatoria puede desencadenarse por la administración de LPS, pero también por otros ligandos tanto exógenos como endógenos que constituyan una amenaza o daño al SNC (Lehnardt et al., 2003). Por ejemplo, algunos trabajos muestran que la administración de IL-1 tiene un efecto similar al producido por la administración de bajas concentraciones de LPS, en cuanto a la producción de ciclooxigenasas COX (especialmente COX-2) y la subsecuente producción y liberación de prostaglandinas por parte de la microglía perivascular activada (Schiltz y Sawchenko, 2002). Las prostaglandinas actúan sobre las neuronas catecolaminérgicas del tronco del encéfalo que proyectan a las neuronas productoras de CRF en el hipotálamo, induciendo la activación del eje HPA y la consecuente regulación de la respuesta inmune por los GCs (Schiltz y Sawchenko, 2007). El uso de antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs) inhibe las COX evitando la producción de prostaglandinas y la activación de HPA (Serrats et al., 2010).

En este punto es importante destacar la importancia de los GCs, ya que debido a sus propiedades antiinflamatorias, descritas anteriormente, juegan un papel muy importante en el SNC al controlar la traducción de señales proinflamatorias y la transcripción de genes en las células de naturaleza mieloide, y por tanto, también en la microglía. Interesantes estudios del grupo de Rivest y colaboradores muestran que un pretratamiento sistémico con LPS atenúa la respuesta inmune innata cerebral causada por una inyección intraestriatal de LPS, debido al incremento de los niveles plasmáticos de GCs (Nadeau y Rivest, 2002). Además, sus resultados reafirman que la reacción inflamatoria causada por la administración de LPS sistémico (que en sí mismo resulta un estímulo estresante que activaría el eje HPA) está controlada por la acción de los GCs endógenos, impidiendo un efecto neurotóxico; sin embargo, al prevenir la acción de los GCs mediante un pretratamiento con el antagonista de GR RU486 o mifepristona se produce un efecto tóxico generalizado, debido a la presencia de niveles inapropiados de citocinas (especialmente $\text{TNF}\alpha$ y $\text{IL-1}\beta$) y de caspasas, así como

sobreproducción de moléculas como el óxido nítrico (NO) (Nadeau y Rivest, 2003). Estudios que utilizan una inyección de LPS en la Sustancia Negra (SN) para inducir la muerte de neuronas DA, muestran que la producción de citocinas inducida por LPS causa una inducción de la producción de la enzima NO sintasa inducida (iNOS) en la microglía que conduce al daño neuronal; éste puede prevenirse mediante el tratamiento con inhibidores de iNOS y DEX (Arimoto y Bing, 2003; Castano et al., 2002). Igualmente, Nurr-1 (un receptor nuclear huérfano) protege contra la muerte neuronal DA inducida por LPS mediante la inhibición de la producción de iNOS por la microglía (Saijo et al., 2009).

Aunque la activación de la microglía contribuye a la eliminación de los patógenos o la atenuación del daño que desencadena la respuesta inflamatoria, una activación sostenida puede conllevar efectos negativos que pueden estar asociados con procesos de neurotoxicidad y neurodegeneración (Gonzalez-Scarano y Baltuch, 1999; Zipp y Aktas, 2006). El balance entre los efectos positivos y negativos de la microglía activada podría estar determinado por la cantidad de células microgliales que haya en la zona afectada (Kim et al., 2000), la región cerebral de la que se trate, la susceptibilidad de las diferentes poblaciones neuronales (Nadeau y Rivest, 2002) y las señales extracelulares que actúen sobre este tipo celular (Lehnardt et al., 2003). La microglía activa produce gran cantidad de productos implicados en la degeneración neuronal como distintas citocinas, quimiocinas, ácido araquidónico y NO; entre ellos, podemos destacar el papel de $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$ como potentes inductores apoptóticos por excelencia. La activación tanto de la microglía como de los astrocitos, indicativa de inflamación, se produce en el SNC de pacientes con enfermedad de Alzheimer, EP, enfermedad de Huntington, esclerosis múltiple y esclerosis lateral amiotrófica; cuyo suero y líquido cefalorraquídeo presenta niveles elevados de moléculas inflamatorias como IL-6 , $\text{IL-1}\beta$ y $\text{TNF}\alpha$ (Mogi et al., 1994b; Mount et al., 2007; Nguyen et al., 2002; Reale et al., 2009).

En los procesos neuroinflamatorios crónicos destaca la presencia prolongada de activación microglial (Barcia et al., 2004; McGeer et al., 1998), que contribuye gradualmente al incremento de la susceptibilidad de las neuronas a la muerte. Así, en el caso de enfermedades neurodegenerativas de naturaleza no necesariamente inflamatoria, los procesos inflamatorios pueden tener un efecto negativo en la evolución de la enfermedad (Zipp y Aktas, 2006). En esta línea, ya que gran cantidad de las enfermedades neurodegenerativas cursan con procesos inflamatorios crónicos, el uso de drogas antiinflamatorias, como los GCs, los NSAIDs y anticuerpos neutralizantes representarían una posible vía terapéutica que se está desarrollando en el campo de la investigación básica y clínica (Allan y Rothwell, 2001). En apartados posteriores trataremos esta cuestión en el contexto de la EP.

1.3.5 La infiltración celular en los procesos inflamatorios. Papel de MCP-1/CCL2

En el marco de los modelos de enfermedades neurodegenerativas y la inflamación aguda causada por inyecciones intracerebrales de LPS, además de la activación microglial, uno de los principales fenómenos de la respuesta inflamatoria que se produce es la infiltración de leucocitos (entre ellos los linfocitos). Durante este proceso, las células del endotelio sintetizan moléculas de adhesión, como las selectinas que se unen a oligosacáridos presentes en la membrana de los leucocitos. Tras este primer contacto, los leucocitos atraviesan el epitelio mediante un mecanismo de rodamiento; en este proceso también intervienen las integrinas (como LFA-1, VLA-4, ICAM-1) expresadas por leucocitos y que permiten su unión tanto a células (por ejemplo epiteliales), como a componentes de la matriz extracelular gracias a su interacción de alta afinidad con sus ligandos pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas. Las integrinas son inducidas por quimiocinas secretadas por las células endoteliales que se unen a receptores en los leucocitos. Son ellas las que promueven una adhesión firme de los leucocitos al epitelio y la formación pseudopodos que les permiten

atravesar el epitelio vascular (diapédesis). Una vez en el intersticio del tejido, los leucocitos migran hacia la zona dañada o infectada en principio gracias a los gradientes quimiotáticos (del Pozo et al., 1995; Engelhardt, 2008b; Springer, 1994).

En el SNC existe una restricción de tráfico de leucocitos periféricos, constituyendo uno de los mecanismos que confieren al SNC su característica de órgano privilegiado desde el punto de vista inmunológico (Galea et al., 2007). El proceso de migración e infiltración al parénquima cerebral se inicia tras la activación microglial y astrogial, y subsecuente liberación de citocinas y quimiocinas que difunden hasta el torrente sanguíneo. En general, el proceso es similar al de extravasación leucocitaria en otros órganos, presentando las fases de quimioatracción, adhesión, rodamiento y diapédesis (Rezai-Zadeh et al., 2009). Sin embargo, en el SNC existe una regulación fina a nivel de la barrera hematoencefálica (BBB) (Engelhardt, 2008a), lo cual implica que se produzcan dos eventos específicos para que los leucocitos infiltrados alcancen el parénquima cerebral: una transmigración a través de la pared vascular hacia el espacio perivascular y seguidamente una progresión a través de la red limitante que representan los podocitos de los astrocitos (Owens et al., 2008).

El fenómeno de infiltración linfocitaria se detecta en muchas de las enfermedades neurodegenerativas que afectan al SNC, como en la esclerosis múltiple, tumores cerebrales, patologías producidas por infecciones de bacterias o virus (disfunción neurocognitiva asociada al virus de la inmunodeficiencia humana (HIV); encefalitis causada por el virus del Nilo occidental), esclerosis lateral amiotrófica y EP (Brochard et al., 2009; Rezai-Zadeh et al., 2009). El efecto de la infiltración puede ser beneficioso o deletéreo dependiendo, entre otras cosas, del estadio patológico en el que se encuentre el tejido dañado (Rezai-Zadeh et al., 2009). Por tanto, el control de la extravasación de leucocitos puede tener importantes implicaciones terapéuticas.

Como hemos visto anteriormente, los GCs a través de GR regulan la expresión de MCP-1/CCL2 mediante la modulación de la estabilidad de su ARNm. CCL2, junto a RANTES, es una de las quimiocinas más importantes y más estudiadas, y parece que puede ejercer importantes efectos en la infiltración de linfocitos en el cerebro. CCL2 pertenece a la gran familia de quimiocinas (de CHEMOtactic cytoKINES) formada por péptidos estructuralmente similares a las citocinas, cuya función principal es la regulación del tráfico celular por quimiotaxis. Las quimiocinas se clasifican en cuatro subfamilias (CXC, CC, CX₃C y C) según el número y la localización de los residuos de cisteína en la porción N-terminal. Según su función, pueden dividirse en dos subfamilias: quimiocinas inflamatorias (controlan el movimiento de leucocitos en procesos inflamatorios y de daño tisular) y quimiocinas homeostáticas (implicadas en funciones normales para el correcto funcionamiento del organismo, como el movimiento de leucocitos durante la hematopoyesis). Todas ellas son secretadas en respuesta a distintos tipos de señales, como citocinas proinflamatorias, estrés oxidativo o factores de crecimiento, y actúan mediante la unión y activación de receptores acoplados a proteínas G (Rollins, 1997).

CCL2 pertenece a la subfamilia de las quimiocinas CC. Su producción en la periferia corre a cargo de células del endotelio, músculo liso, fibroblastos, células epiteliales, células mesangiales y sobretodo monocitos/macrófagos (Deshmane et al., 2009). En el SNC existe cierta controversia sobre el tipo celular que la produce, pudiendo encontrar trabajos que identifican como productoras a neuronas dañadas (Yang et al., 2010; Zhang y De Koninck, 2006), microglía (Meda et al., 1996; Quan et al., 2011), pero sobretodo a astrocitos (Barna et al., 1994; Glabinski et al., 1996; Van Der Voorn et al., 1999). CCL2 actúa a través de su receptor CCR2, para el cual se han identificado 2 isoformas debido a un procesamiento con splicing alternativo: CCR2A es la principal isoforma expresada en células mononucleares y

células del músculo liso, mientras que CCR2B se expresa predominantemente en monocitos y células natural killer activadas (Bartoli et al., 2001).

La función de CCL2 es dual: tanto proinflamatoria como antiinflamatoria. Sus acciones proinflamatorias dependen de las células T y las células presentadoras de antígenos (principalmente macrófagos y células dendríticas); mientras que las acciones antiinflamatorias dependen de las células T reguladoras. La principal función que se le atribuye a CCL2 es el reclutamiento de monocitos en los procesos inflamatorios (Ajuebor et al., 1998; Palframan et al., 2001; Sozzani et al., 1993); aunque también parece estar involucrada en la atracción de células T de memoria y natural killer (Carr et al., 1994; Maghazachi et al., 1994). Además, la expresión de CCL2 está asociada con la polarización de células T_H0 a T_H2 y la secreción de IL-4 por parte de las mismas (Karpus et al., 1997).

Por último, CCL2 parece estar involucrado en la patogénesis de numerosas enfermedades como la tuberculosis, endometriosis, nefropatía, asma alérgico, artritis reumatoide, resistencia a la insulina, isquemia producida por muerte neuronal esclerosis múltiple y neovascularización de tumores (Deshmane et al., 2009). Además, formas mutadas de CCL2 están asociadas a una progresión más rápida del SIDA y aumento del riesgo de padecer demencia asociada a HIV (Gonzalez et al., 2002). En este sentido, la atenuación de la expresión y acción de CCL2, entre otras formas mediante el uso de anticuerpos neutralizantes específicos, constituye una terapia potencial para el tratamiento de algunas enfermedades como la esclerosis múltiple (Sorensen et al., 2004), artritis reumatoide, aterosclerosis, resistencia a la insulina (Sartipy y Loskutoff, 2003), neuropatías periféricas como la enfermedad de Charcot-Marie-Thoot (Groh et al., 2010; Kohl et al., 2009) y otros procesos patológicos como el dolor neuropático causado por daño en los nervios periféricos (Zhang et al., 2007).

1.4 INFLAMACIÓN Y ENFERMEDAD DE PARKINSON

1.4.1 La enfermedad de Parkinson (EP)

En 1917, James Parkinson describió la “parálisis agitante”, trastorno neurodegenerativo del movimiento que más tarde adquiriría la apelación de enfermedad de Parkinson (EP). Este trastorno que afecta aproximadamente a un 1% de la población mayor de 65 años (Lang y Lozano, 1998) se caracteriza por la presencia de al menos dos de los cuatro signos clínicos básicos: bradicinesia (lentitud en los movimientos) y acinesia (retraso en el inicio de los movimientos voluntarios), temblor en reposo (que suele ser intermitente, progresivo, asimétrico y desaparece durante el sueño), rigidez (caracterizada por una resistencia aumentada y sostenida durante el desplazamiento pasivo de una articulación) y trastornos posturales (flexión de los miembros y el tronco que produce una disminución en el control del equilibrio) (Linazasoro et al., 2009; Micheli, 2006). No menos importantes que los síntomas motores, son los síntomas no-motores que pueden ser perceptibles antes que los motores, constituyendo una potencial herramienta de diagnóstico precoz. Se clasifican en tres grupos: autonómicos, psiquiátricos/cognitivos y sensoriales. Algunos de los más frecuentes son la ansiedad, sudoración, bradifrenia, fatiga, acatisia, irritabilidad, alucinaciones, disfunción olfatoria, síntomas gastrointestinales y urinarios, cambios en la presión arterial, depresión y desviaciones sexuales (Bayulkem y Lopez, 2010; Witjas et al., 2002).

El evento principal que subyace a la aparición de los signos clínicos en la EP es la pérdida de subpoblaciones específicas de neuronas DA en distintas regiones del mesencefalo. Fue en 1960 cuando Ehringer y Hornykiewicz encontraron una disminución de los niveles de dopamina en las células pigmentadas con neuromelanina que forman la Sustancia Negra pars compacta (SNpc) y proyectan al estriado (Ehringer y Hornykiewicz, 1960). Esta pérdida neuronal conlleva una deficiencia en los niveles de dopamina que llegan al estriado y la

consecuente afectación de los circuitos de los ganglios basales. El grado de afectación de cada área mesencefálica depende de la vulnerabilidad de las subpoblaciones neuronales, siendo la más afectada la SNpc (entre el 70 y el 90%), seguida del Área Tegmental Ventral (ATV, un 50%), la región periretrorubral (A8, entre el 30 y 50%) y la región periacueductal (PGA, un 3%) (Hirsch et al., 1988). Además, dentro de la SNpc de primates humanos y no humanos se pueden distinguir tres subregiones que también presentan distinta susceptibilidad a la neurodegeneración en la EP: el área ventrolateral (correspondiente al área $\alpha+\beta$, a nivel de la salida del tercer par craneal), el área dorsal (γ) y el área lateral (lat); entre ellas, el área ventrolateral es la que presenta mayor grado de pérdida DA y activación glial (Damier et al., 1999b; Herrero et al., 1993b; Olszewski y Baxter, 1954). También existe una pérdida significativa de neuronas noradrenérgicas en el locus coeruleus (lc) (German et al., 1992b). De hecho, el daño en la SNpc siempre está acompañado de la afectación de otras regiones, incluyendo el núcleo motor dorsal de los nervios glossofaríngeo y vago, porciones adyacentes de la zona reticular intermedia, algunos núcleos de la formación reticular y del sistema del rafe, el núcleo magnocelular de la zona basal del cerebro anterior, distintos subnúcleos del tálamo y la amígdala e incluso neuronas fuera del SNC como las del bulbo olfatorio y el sistema mesentérico. De esta forma, según Braak y colaboradores la neurodegeneración se va expandiendo a distintas regiones cerebrales según avanzan los distintos estadios de la enfermedad (Braak et al., 2003).

En la actualidad, la etiología de la EP no ha sido determinada de forma definitiva. El 90% de los casos de parkinsonismo se corresponden con las formas denominadas esporádicas, en las que no solamente es importante la predisposición genética, sino también la contribución de factores ambientales como puede ser la exposición a ciertas toxinas, tóxicos (como los pesticidas rotenona y paraquat) y otros desconocidos. Sólo el 10% de los casos de EP corresponden a las formas familiares, para las cuales la enfermedad es transmitida

genéticamente. Aunque durante mucho tiempo la EP era considerada como un prototipo de enfermedad no-genética, en la última década han sido identificados al menos 16 loci y 9 genes asociados a las formas mendelianas de EP (Lesage y Brice, 2009). El hallazgo de estas mutaciones ha resultado de gran importancia, ya que resulta clave para la mejor comprensión de la patogénesis de la enfermedad a nivel molecular, tanto para las formas familiares como para las esporádicas por extrapolación.

Entre los loci identificados encontramos mutaciones para los siguientes genes:

- Mutaciones en el gen de α -sinucleína (Polymeropoulos et al., 1997; Singleton et al., 2003; Zarranz et al., 2004). La α -sinucleína es una proteína abundante en el cerebro de mamíferos y se encuentran en gran cantidad en las terminaciones de los nervios presinápticos, donde se asocia con membranas y estructuras vesiculares. Parece tener una función importante en la regulación del tamaño y reciclaje de estas vesículas, con particular relevancia en el almacenamiento de la dopamina (Abeliovich et al., 2000; Outeiro y Lindquist, 2003). Los oligómeros de esta proteína son los precursores de unos agregados, que precipitan formando estructuras filamentosas que constituyen el principal componente de los cuerpos de Lewy (LBs) y neuritas distróficas (neuritas de Lewy), que son inclusiones intracitoplasmáticas presentes en las neuronas que sobreviven en los enfermos de EP (Forno, 1996). Por tanto, α -sinucleína contribuye a la patogénesis de la EP, aunque los mecanismos por los que ejerce sus efectos neurotóxicos no están totalmente clarificados.
- Mutaciones en el gen de Parkina (Kitada et al., 1998; Mata et al., 2004). La parkina es una proteína que puede funcionar como una E3 protein-ubiquitin ligasa, por tanto implicada en los procesos de ubiquitinación proteica. Algunas de las mutaciones en esta proteína provocan que sus sustratos no sean degradados y por tanto se acumulan

- (Moore et al., 2005). Algunos trabajos describen para la parkina un papel regulador de la función mitocondrial en condiciones no patológicas (Palacino et al., 2004).
- Mutaciones en el gen de PINK1 (de phosphatase y tesin homolog induced putative kinase 1) (Valente et al., 2004). Esta proteína parece tener función de protein-kinasa mitocondrial; por lo que sus mutaciones están relacionadas con disfuncionalidad mitocondrial, una de las causas propuestas más aceptadas en la patogénesis de las formas esporádicas de la EP.
 - Mutaciones en la proteína DJ-1 (Bonifati et al., 2003). DJ-1 funciona como una proteína anti-oxidante o un sensor de estrés oxidativo. Parece que forma parte del sistema ubiquitin-proteosoma y confiere protección al funcionar como una chaperona o proteasa que contribuye a la degradación de agregados proteicos.
 - Mutaciones en UCH-L1 (de ubiquitin carboxyl-terminal esterasa L1) (Leroy et al., 1998). Esta proteína tiene funciones ubiquitin-ligasa e hidroxilasa. Las formas mutadas contribuyen a un sistema ubiquitin-proteosoma deficitario.
 - Mutaciones en LRRK2 (de leucine-rich repeat kinase 2) (Paisan-Ruiz et al., 2004). Esta proteína también llamada dardarina presenta entre otros un dominio similar a Ras/GTPasa y un dominio kinasa (similar a las MAPKKK). Se desconoce su función fisiológica exacta, aunque parece estar involucrada en la liberación de neurotransmisores, extensión de las neuritas y dinámica de vesículas sinápticas en los botones presinápticos (Piccoli et al., 2011). Además, la función patológica de las formas mutadas podría involucrar a vías comunes con otras proteínas asociadas con EP, como son la α -sinucleína o la proteína tau (Cookson, 2010). Además, recientemente se ha relacionado con procesos inflamatorios, ya que parece modular la respuesta de citocinas como IFN γ , lo cual podría estar unido a las alteraciones inflamatorias propias de la enfermedad (Gardet et al., 2010).

- Variaciones genéticas en la región HLA del HLA-DR (antígeno humano de leucocitos grupo DR) (Hamza et al., 2010). Recientes estudios de asociación del genoma completo (GWAS, genome-wide association study) han asociado variaciones en el gen de este receptor de membrana perteneciente a los MHC (complejo mayor de histocompatibilidad) de clase II a las formas esporádicas de la EP, lo cual apoya nuevamente el papel del sistema inmune en la patogénesis de esta enfermedad.

Además del estudio de estas mutaciones, numerosas evidencias experimentales describen la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo y el mal funcionamiento del sistema ubiquitin-proteosoma como las principales vías moleculares responsables de la patogénesis de la EP tanto en sus formas familiares como esporádicas (Dauer y Przedborski, 2003; Moore et al., 2005) (Fig. 10).

En cuanto al tratamiento de la EP, en la actualidad existen terapias predominantemente paliativas, pero no curativas. Aunque la L-DOPA sigue siendo el tratamiento por excelencia para la EP, los investigadores luchan por encontrar tratamientos alternativos o complementarios. Algunas técnicas como la estimulación cerebral profunda (DBS), la terapia génica y la terapia de replazamiento celular constituyen formas de tratamiento en uso o en continuo desarrollo (Smith, 2010). Otra vía de tratamiento cada vez más estudiada es el uso de agentes antiinflamatorios, puesto que cada día hay más evidencias de que los procesos neuroinflamatorios contribuyen de forma importante a la pérdida neuronal DA. Este es uno de los principales objetivos de estudio de esta tesis, por lo tanto desarrollaremos este punto de forma más amplia en secciones posteriores.

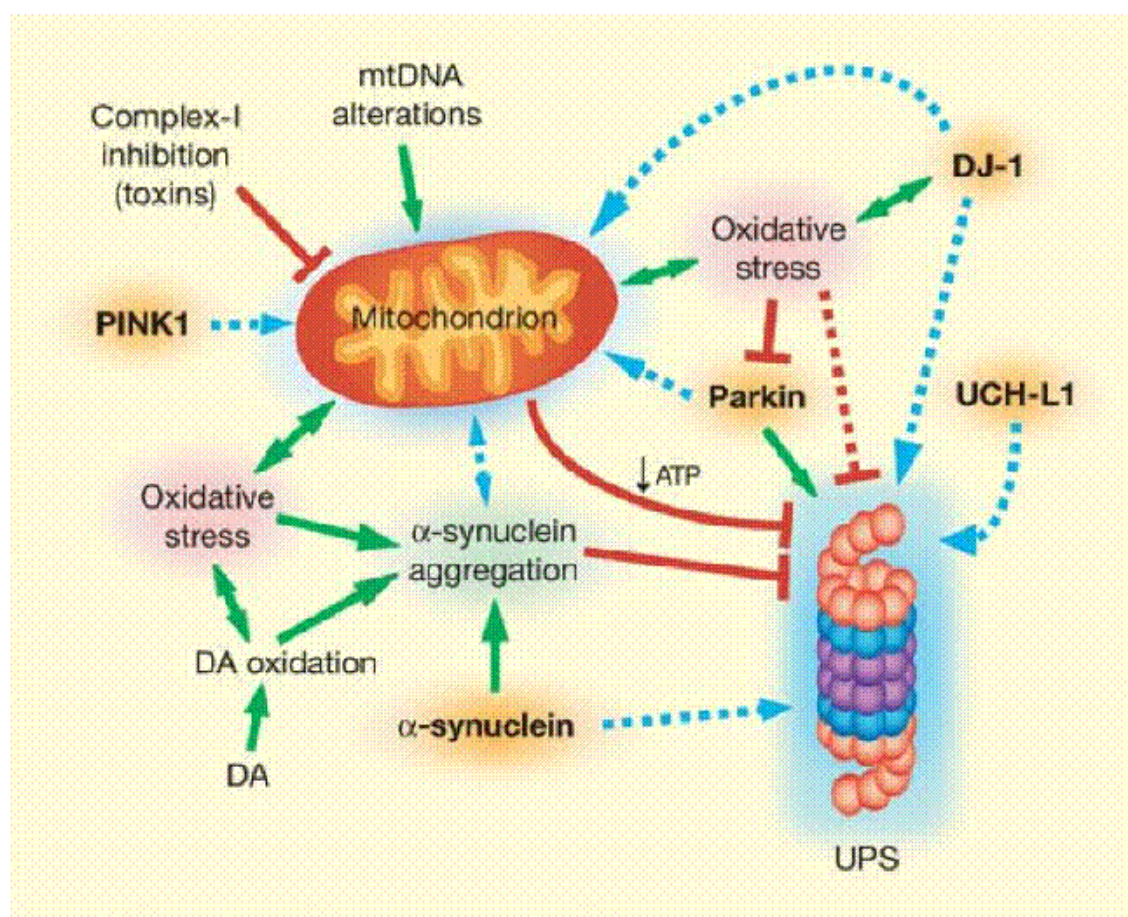


Figura 10. Patogénesis de la EP. Mutaciones en los genes que codifican para α -sinucleína, parkina, UCH-L1, PINK1, DJ-1 y LRRK2 se asocian a formas familiares de la EP. El estudio de las vías patogénicas en los casos familiares nos da pistas para comprender la patogénesis de las formas esporádicas. Estas vías patogénicas confluyen en déficits mitocondriales y fallos en los procesos de ubiquitinización. PINK1 está implicado en la función mitocondrial, UCH-L1 y parkina en la ubiquitinización y DJ1 en el estrés oxidativo. La fibrilización y agregación de α -sinucleína se favorece por mutaciones, estrés oxidativo y oxidación de DA citosólica, y afecta al sistema ubiquitina-proteosoma y posiblemente a la función mitocondrial. Algunas toxinas y pesticidas inhiben el complejo-I mitocondrial, aumentando su disfunción, al igual que ciertas mutaciones en el ADN mitocondrial que pueden producirse. Los daños en la función mitocondrial conducen a un déficit en la producción de ATP, estrés oxidativo y agregación de α -sinucleína, que inactiva al sistema ubiquitina-proteosoma.

Las líneas rojas indican efectos inhibitorios, las flechas verdes definen relaciones y las azules indican posibles relaciones. (Extraído de Moore et al., 2005).

1.4.2 Modelos de parkinsonismo experimental por intoxicación con MPTP

El uso de modelos de parkinsonismo experimental constituye una herramienta indispensable para el estudio de la etiopatogénesis y fisiopatología de la EP, así como para el desarrollo de nuevos tratamientos. En la actualidad, los investigadores utilizan diversos modelos experimentales tanto genéticos (uso de ratones modificados genéticamente para el gen de la α -sinucleína, parkina o la LRRK2), como por tratamiento con neurotoxinas (como la 6-hidroxidopamina, rotenona, paraquat, tricloroetileno y el 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina o MPTP) (Smith, 2010). En este trabajo de tesis se ha sido utilizada la intoxicación con MPTP como modelo de parkinsonismo. El efecto de este compuesto como neurotóxico fue descubierto de forma azarosa en 1982, cuando jóvenes drogadictos desarrollaron un síndrome parkinsoniano tras el consumo intravenoso de análogos de meperidino contaminados con MPTP (Langston et al., 1983).

Además de en humanos, la neurotoxicidad del MPTP ha sido demostrada en diversas especies animales incluyendo macacos, ratones negros (C57) y gatos. En humanos y primates no humanos, el MPTP puede producir un parkinsonismo severo e irreversible (dependiendo de las dosis y tiempo de administración), que simula la mayoría de las características de la EP (Przedborski et al., 2004). Así, monos parkinsonizados con MPTP desarrollan temblor de acción, bradicinesia, rigidez en las extremidades, trastornos posturales y congelamiento en movimientos (freezing) (Herrero et al., 1993^a; Herrero et al., 1993^b). Los animales responden al tratamiento con L-DOPA y desarrollan discinesias (Herrero et al., 1996; Jenner, 2008). El MPTP produce la muerte de neuronas DA, dañando por tanto las vías DA con un patrón similar al de la EP (mayor pérdida neuronal en la SNpc que en la ATV, y preferencialmente en la regiones ventral y lateral) (Herrero et al., 1993^b; Sirinathsinghji et al., 1992). El inconveniente del modelo en monos es que a pesar de que se observan ciertas inclusiones

intraneuronales, no se han descrito LBs de forma convincente (Forno et al., 1993), incluso diez años después de la noxa (Halliday et al., 2009).

1.4.2.1 Modos de acción y mecanismos de muerte

El MPTP es capaz de atravesar la BBB debido a su naturaleza lipofílica. Una vez en el cerebro, es metabolizado hasta 1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridinina (MPDP+) por la enzima monoamina oxidasa B (MAO-B), presente en células gliales y neuronas serotoninérgicas (Fig. 11). Posteriormente es oxidado hasta MPP+, que constituye el compuesto tóxico activo, y liberado al espacio extracelular. El MPP+ tiene alta afinidad por el DAT presente en la membrana de las neuronas DA, así como por los transportadores de norepinefrina y serotonina; por tanto, aunque produce alteraciones en las neuronas monoaminérgicas la degeneración es mayor en las neuronas DA (Dauer y Przedborski, 2003). En el citoplasma de la neurona DA el MPP+ puede seguir 3 rutas: i) unirse al transportador vesicular de aminas (VMAT2) que le transloca a vesículas sinaptosomales, evitando efectos tóxicos; ii) permanecer en el citosol, donde interacciona con enzimas cargadas negativamente; iii) concentrarse dentro de la mitocondria. El MPP+ concentrado en la mitocondria produce los efectos tóxicos al bloquear el complejo I de la cadena de transporte mitocondrial, interrumpiendo así la transferencia de electrones desde este complejo hasta la ubiquinona. Esta perturbación afecta la producción de ATP (Przedborski y Vila, 2003). Además, recientemente se ha comprobado que puede dañar los microtúbulos, lo que contribuye al daño neuronal. Incluso se piensa que esta alteración precede a la mitocondrial (Cartelli et al., 2010; Choi et al., 2011)

Sin embargo, la afectación de la producción de ATP por sí sola no es suficiente para explicar la inducción de la muerte neuronal DA. Tanto en estudios post-mortem de cerebros parkinsonianos, como en modelos animales de intoxicación por MPTP se ha observado una

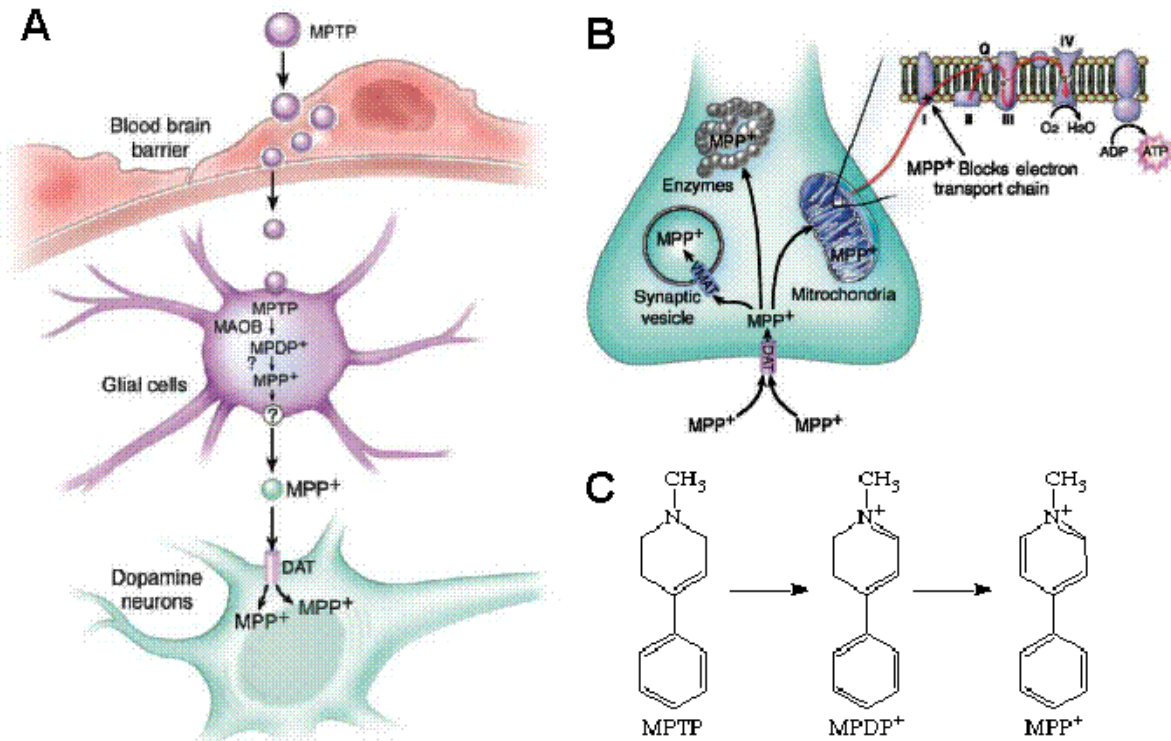


Figura 11. Metabolismo y vías moleculares del MPTP. (A) El MPTP es capaz de atravesar la BBB y ser captado por las células gliales que expresan MAO-B. En estas células va a ser metabolizado a MPDP⁺ y MPP⁺. El MPP⁺ es el metabolito tóxico activo, que va a ser liberado al medio y recaptado específicamente por el transportador DAT presente en la neuronas DA. (B) Dentro de la neuronas DA el MPP⁺ puede seguir diferentes vías moleculares: ser secuestrado en vesículas sinápticas; interaccionar con enzimas citosólicas o concentrarse dentro de la mitocondria, donde bloquea el complejo I de la cadena de transporte electrónico, interrumpiendo la producción de ATP y generando ROS. (C) Formulas químicas del MPTP y sus metabolitos. (Extraído de Dauer y Przedborski, 2003).

importante implicación del estrés oxidativo, causado por la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS), unido a un déficit en los procesos antioxidantes. Así, se ha descrito una disminución en las concentraciones de glutatión peroxidada y catalasa que podrían ser cruciales en este proceso de muerte celular (Cleeter et al., 1992; Fahn y Cohen, 1992). Además, en estudios post-mortem de pacientes de EP se han descrito daños en lípidos, proteínas y ADN nuclear y mitocondrial causados por estrés oxidativo (Moore et al., 2005). Algunas de las fuentes de producción de este estrés oxidativo son las disfunciones mitocondriales (comentadas arriba), el incremento en el metabolismo de la dopamina (auto-oxidación de dopamina) y el aumento de especies reactivas de hierro (Jenner, 2003). Las disfunciones mitocondriales promueven el incremento del estrés por especies de nitrógeno. De hecho, el NO puede reaccionar con el superóxido (un ROS) produciendo peroxinitrito y radicales hidroxilo que contribuyen a inducir muerte neuronal (Ischiropoulos y Beckman, 2003). Así mismo, el estrés oxidativo puede incluso producir daños directos en el sistema ubiquitin-proteosoma y viceversa (Jenner, 2003), lo cual podría explicar otra posible vía de muerte neuronal inducida por el estrés oxidativo.

En principio, estos procesos conducen a la activación de vías apoptóticas que contribuyen a la muerte de las neuronas DA. Se piensa que diferentes estímulos de muerte celular van a converger en la inducción de la apoptosis comenzando en la mitocondria. Normalmente, la inducción de muerte celular comporta la activación de la cascada de caspasas, donde la caspasa 3 tiene un papel fundamental en la decisión final apoptótica. Sin embargo, en ratones parkinsonianos intoxicados de forma prolongada y con dosis moderadas de MPTP, se ha detectado la activación específica de la caspasa 8 (Hartmann y Hirsch, 2001; Hartmann et al., 2001), junto con un aumento de la expresión de la proteína pro-apoptótica Bax y un descenso de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 (Vila et al., 2001). Bax a su vez se

transloca a la mitocondria e induce la liberación de citocromo c y la activación de las caspasas 9 y 3 (Viswanath et al., 2001).

Otras posibles vías de inducción de muerte neuronal DA son la excitotoxicidad y los déficit en la excitabilidad. Las neuronas DA mesencefálicas se distinguen de otras poblaciones neuronales por ser activas de forma autónoma, ya que generan potenciales de acción de tipo marcapasos (2-4 Hz) en ausencia de señal sináptica (Chan et al., 2009; Michel et al., 2007). La electrofisiología especial de las neuronas DA es crucial tanto para el control de la liberación de dopamina, como para su supervivencia. La disminución de la actividad neuronal puede deberse a los ROS que hiperpolarizan las neuronas DA al activar los canales de K⁺ sensibles a ATP (Liss y Roeper, 2001). En condiciones normales, la parkina y la UCHL-1 aumentan la excitabilidad de las neuronas DA mediante la activación de los receptores ionotrópicos purinérgicos P2X; cuando estas proteínas están dañadas o no son funcionales, contribuyen a la hiperpolarización de la neurona (Sato et al., 2006). También la falta de señales excitatorias conduce a la hiperpolarización de las neuronas DA. Esta disminución de la actividad electrofisiológica puede conducir a la activación de rutas apoptóticas y además facilitar la formación de agregados de α -sinucleína (Michel et al., 2007). Uno de los iones implicados de forma específica en la propiedad de actividad autónoma de las neuronas DA es el Ca²⁺. Los niveles intracitoplasmáticos de Ca²⁺ constituyen un punto clave para la supervivencia celular; de hecho, altos niveles de Ca²⁺ citoplasmático o perturbaciones en su compartimentalización pueden producir citotoxicidad y conducir a la muerte por apoptosis o necrosis (Orrenius et al., 2003). Por tanto, los niveles de Ca²⁺ se encuentran bajo un fuerte control homeostático, con un límite cercano a 100nM en el citosol (10.000 veces menor que la concentración del espacio extracelular). En esta línea, la estimulación excesiva por acción del glutamato o agonistas NMDA provoca una entrada masiva de Ca²⁺ que conduce a la apoptosis (Stella et al., 1994). Para mantener la actividad autónoma, las neuronas DA requieren una

estrategia metabólica que les resulta cara energéticamente, y que involucra al retículo endoplasmático (RE) y a la mitocondria en el mantenimiento de la homeostasis del Ca^{2+} ; todo esto significa un estrés exacerbado que puede conllevar un envejecimiento precoz de estas neuronas con respecto a otros tipos celulares (Chan et al., 2009). Esta hipótesis de envejecimiento celular mediado por Ca^{2+} es coherente con algunos trabajos que muestran que las neuronas DA que expresan calbindina, una proteína secuestradora de Ca^{2+} , son menos vulnerables a la muerte (German et al., 1992a; Yamada et al., 1990).

1.4.3 Inflamación y parkinsonismo

Cada vez existen más evidencias de que los procesos de neuroinflamación contribuyen de forma importante a la muerte de las neuronas DA en la EP. Los mecanismos de neuroinflamación están caracterizados por la activación microglial y astrogial, y la esencial infiltración de linfocitos. Aunque en principio su finalidad es la de controlar los daños causados en las zonas afectadas, al tratarse de un proceso crónico, pueden contribuir a la progresión de la muerte neuronal DA por la producción de moléculas inflamatorias deletéreas (Hirsch y Hunot, 2009).

En 1988, McGeer y colaboradores describieron un aumento de activación microglial en la SNpc de enfermos de EP mediante inmunohistoquímica para el HLA-DR (McGeer et al., 1988); posteriormente se observó también microgliosis en los primeros estudios post-mortem realizados en humanos intoxicados con MPTP (Czlonkowska et al., 2000; Langston et al., 1999) y en monos varios años después de la exposición a MPTP (Barcia et al., 2004; McGeer et al., 2003). En cerebros humanos de pacientes con EP, se ha detectado también astrogliosis mediante el marcaje con la proteína ácida gliofibrilar GFAP o la glutación peroxidada (Forno et al., 1992); esta astrogliosis también se observa en humanos intoxicados con MPTP y modelos experimentales de EP (Barcia et al., 2004; Langston et al., 1999).

Aunque la función de los astrocitos en la patogénesis de la EP no está clarificada, parece que pueden tener un papel neuroprotector por destoxificación de los ROS por secretar factores neurotróficos como el GDNF (glial-cell-line-derived neurotrophic factor). De hecho, la densidad de astrocitos es baja en la SNpc comparada con otras zonas menos afectadas en la EP como la región A8 y la ATV (Damier et al., 1993). Así, las neuronas más vulnerables en la EP parecen tener menos astrogliá en la vecindad que probablemente les destoxifique de los ROS mediante la actividad glutation peroxidada, constituyendo un posible factor de susceptibilidad (Hirsch y Hunot, 2009). En cuanto a la infiltración linfocitaria, recientes estudios han detectado la presencia de linfocitos T CD8+ y CD4+ en el cerebro de pacientes parkinsonianos. Estas células están en contacto con los vasos sanguíneos y se han encontrado cercanas a las neuronas DA, lo que sugiere que provienen del torrente sanguíneo y que interaccionan con las neuronas DA (Brochard et al., 2009). No se conoce con exactitud la función de estas células en la EP, pero parece que la infiltración de linfocitos T CD4+ contribuye a la muerte neuronal dopaminérgica.

La glía activada (especialmente la microglía) es responsable de la liberación de citocinas proinflamatorias y factores neurotóxicos. Algunos estudios muestran un incremento de la concentración de algunas citocinas como pueden ser el TNF α , β 2-microglobulina, factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento TGF α , TGF β 1 e IL-1 β , 2 y 6 en el estriado de enfermos de EP; así como el aumento de IFN γ , TNF α , IL-1 β y TNF γ en la SNpc (Barcia et al., 2001; Mogi et al., 1994a; Mogi et al., 1994b; Mount et al., 2007). Estas citocinas pueden ejercer sus efectos por unión directa o indirecta a sus receptores (muchos presentes en las neuronas DA), como TNF α , IL-1 β y TNF γ , que inducen la expresión de iNOS o COX-2, contribuyendo a la producción de especies tóxicas reactivas. De hecho, se ha demostrado que cuando iNOS se inactiva genética o farmacológicamente se reduce la neurotoxicidad del MPTP (Dehmer et al., 2000; Liberatore et al., 1999), indicando un papel

importante del NO producido por la microglia en la toxicidad inducida por MPTP. Igualmente, la inactivación de los genes que codifican para la COX-2, NADPH-oxidasa (que cataliza la generación de anión superóxido) y de los receptores de $\text{TNF}\alpha$, protegen a las neuronas DA de la muerte inducida por MPTP (Gao et al., 2003). Además, también se ha detectado un aumento en la expresión de IL-2, 6, $\text{TGF}\alpha$ y RANTES en el suero de pacientes con EP; así como $\text{TNF}\alpha$ e IL- 1β y 6 en el líquido cefalorraquídeo (Barcia et al., 2009; Hirsch y Hunot, 2009), lo que indica que las citocinas circulantes pueden contribuir a la inflamación local.

La activación microglial va a contribuir a la exacerbación del estrés oxidativo en el ambiente que rodea a las neuronas DA. Hirsch y Hunot presentan un hipotético escenario que puede conducir a la pérdida de estas neuronas: la microglía activa también va a producir especies reactivas de oxígeno y nitrógeno como anión superóxido y NO. Estos radicales se combinan formando peroxinitrito, una especie altamente reactiva de nitrógeno que puede oxidar proteínas como tirosina hidroxilasa (TH) y α -sinucleína, afectando su actividad enzimática y potenciando su agregación respectivamente (Hirsch y Hunot, 2009). A partir del anión superóxido se forma también peróxido de hidrogeno que puede reaccionar con iones hierro incrementando la cantidad de especies tóxicas. Los nitritos no reactivos pueden ser oxidados por la enzima mieloperoxidasa (presente en astrocitos) originando nitritos reactivos; además, esta enzima produce HOCl que es fuertemente oxidante y puede dañar ciertas macromoléculas directamente (Hirsch y Hunot, 2009).

Las citocinas también contribuyen de forma importante a este proceso inflamatorio asociado a estrés oxidativo. Las más estudiadas en el marco de los procesos inflamatorios de la EP han sido $\text{TNF}\alpha$, IL- 1β y $\text{TNF}\gamma$. Tanto $\text{TNF}\alpha$ como $\text{TNF}\gamma$ son inductores de iNOS y NADPH oxidasa en células microgliales, y el NO producido induce la expresión de $\text{TNF}\alpha$ por

los astrocitos. Además, $\text{TNF}\alpha$ es capaz de activar directamente sus receptores expresados en la membrana de las neuronas DA, induciendo vías proapoptóticas. Entre otras moléculas, $\text{TNF}\alpha$ induce la expresión de COX-2 específicamente en las neuronas DA, mediante la activación de la ruta de la MAPkinasa JNK, facilitando así su propia degeneración (Hunot et al., 2004; Teismann et al., 2003a). Otra molécula de la familia de $\text{TNF}\alpha$ que contribuye de forma importante al proceso inflamatorio es el Fas-ligando que se expresa principalmente en la membrana de los linfocitos T. Esta molécula puede inducir apoptosis por unión a su receptor Fas presente en ciertos tipos celulares como neuronas DA. La expresión de Fas está aumentada en enfermos de EP y en ratones intoxicados con MPTP (Hayley et al., 2004). Además de la ruta de JNK, tanto Fas-ligando como $\text{TNF}\alpha$ son capaces de activar las rutas de $\text{NF-}\kappa\text{B}$ y p38 (Hirsch y Hunot, 2009). Fas-ligando también puede unirse a su receptor en los astrocitos induciendo la expresión de citocinas y quimiocinas como IL-6, 8 y CCL2/MCP1 (Choi y Benveniste, 2004) (Fig. 12). Por otra parte $\text{IFN}\gamma$ también está involucrado en la EP al inducir la fosforilación de STAT-1 (un factor de transcripción), lo que contribuye a la activación glial sostenida y por tanto a la muerte de las neuronas DA (Barcia et al., 2011; Hashioka et al., 2009).

Ante este escenario, surge la idea de que los agentes antiinflamatorios podrían contribuir a paliar la pérdida neuronal DA en la EP, controlando e inhibiendo estos procesos inflamatorios. Se buscaría que los agentes candidatos fueran capaces de actuar en alguno de los puntos clave de este proceso inflamatorio, como podría ser la inhibición de la activación microglial inducida por agentes proinflamatorios, como por ejemplo COX-2, iNOS o NADPH (Gao et al., 2003). A partir de estudios epidemiológicos que mostraron que las personas que toman regularmente antiinflamatorios no-esteroides (NSAIDs) presentan menor riesgo de padecer EP (Chen et al., 2003), los investigadores tratan de determinar sus efectos en la EP.

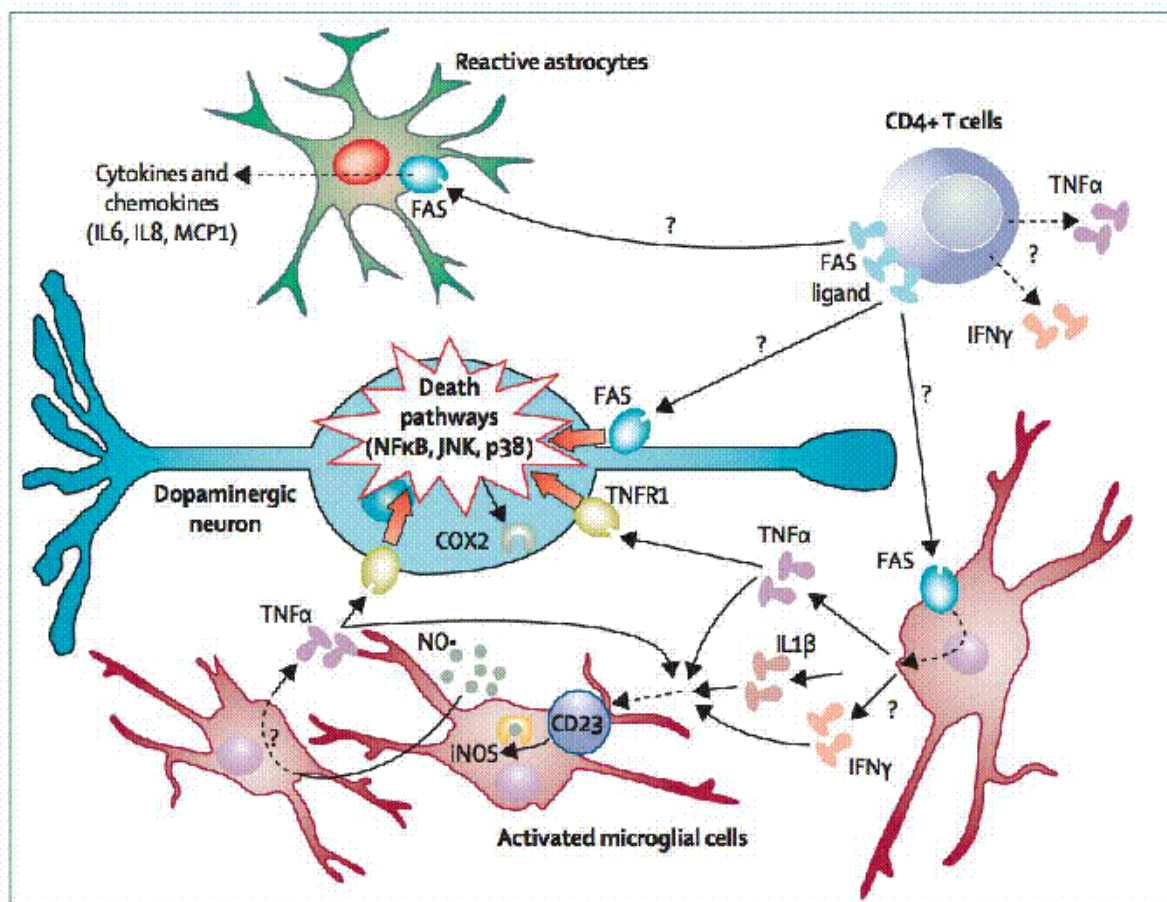


Figura 12. Efectos negativos de los procesos neuroinflamatorios en la EP: posibles mecanismos. La activación microglial contribuye a la muerte de las neuronas DA al liberar compuestos inflamatorios como citocinas (ej. TNF α , IL-1 β y TNF γ). TNF α puede ejercer daños directos por activación de su receptor TNF tipo I expresado en la membrana de las células DA, que conduce a la expresión de COX-2. Estas citocinas también inducen la expresión de iNOS en la microglia, por activación del receptor de baja afinidad para la inmunoglobulina E (CD23); esto conlleva la producción de NO, que a su vez potencia la liberación de más citocinas en células adyacentes, amplificando la reacción inflamatoria. Esta reacción iniciada por la microglia contribuye a la infiltración de linfocitos T CD4+, que también expresan citocinas como ligando-Fas. Éste puede ejercer efectos deletéreos directamente (por activación de Fas en neuronas DA) o indirectamente (por activación de Fas en glia). (Extraído de Hirsch y Hunot, 2009).

De hecho, se han realizado numerosos estudios para probar el efecto de los NSAIDs en modelos de EP y muchos de ellos parecen tener efectos neuroprotectores, por lo que podrían ser potenciales terapias para esta enfermedad (Bornebroek et al., 2007; Chen et al., 2005; Schiess, 2003; Wahner et al., 2007). Algunas de estas drogas, como la aspirina o el ibuprofeno, protegen contra la inducción de la muerte neuronal DA (Aubin et al., 1998; Casper et al., 2000). Los NSAIDs contribuyen a la inactivación de los ROS y las especies reactivas de nitrógeno (Choi y Benveniste, 2004; Sairam et al., 2003). Muchos de ellos son inhibidores de las COX-1 y/o COX-2 (Barcia et al., 2009). Así por ejemplo, la aspirina inhibe ambas, mientras que el ibuprofeno o el meloxicam inhiben sólo a COX-2 (Teismann y Ferger, 2001). En el caso del parkinsonismo experimental, se ha establecido que la COX-2 y no la COX-1 está involucrada específicamente en la degeneración DA (Teismann et al., 2003b). Además, parece que los inhibidores de la COX-2 afectan específicamente la activación microglial pero no la astrogial (Sanchez-Pernaute et al., 2004), lo que le otorga a la microglia un papel fundamental en la neurodegeneración inducida por inflamación. Sin embargo, a pesar de la gran cantidad de estudios realizados sobre los efectos de los inhibidores de COX-2 en la EP, aún existe controversia sobre su eficacia y sus efectos secundarios en la clínica.

Otros agentes antiinflamatorios cuya acción protectora en EP se está estudiando son: el agonista de PPAR γ pioglitazona; la naloxona (antagonista de receptores opioides); silymarin (un flavonoide polifenólico); la minociclina (derivado de la tetraciclina); el péptido vasoactivo intestinal; quinuclidine o PHA-709829 (que, como la nicotina, son agonistas de los receptores nicotínicos $\alpha 7$), y el receptor ionotrópico de purinas P2X $_7$ (que media la movilización intracelular de Ca $^{2+}$) entre otros (Gao et al., 2003; Hirsch y Hunot, 2009; Zipp y Aktas, 2006) (Fig. 13).

Approach	Substance or class	Disease, and stage of immunotherapy success
Broad immunosuppression	Bone marrow transplantation	MS, clinical trials ALD, established therapy
	<u>Corticosteroids</u>	MS, established therapy Bacterial meningitis, established therapy
NSAID	Combined COX1/COX2 inhibitors	AD, epidemiological studies and transgenic mouse models <u>PD, epidemiological studies and MPTP mouse model</u>
	COX2 inhibitors ('COXIBs')	AD, transgenic mouse model <u>PD, MPTP mouse model</u>
Selective immunomodulators	Glatiramer acetate	MS, established therapy and EAE mouse model AD, transgenic mouse model <u>PD, MPTP mouse model</u>
	Flavanoids	MS, EAE mouse model AD, transgenic mouse model <u>PD, MPTP mouse model</u>
	IVIg	MS, phase II trial (relapsing-remitting MS) and EAE mouse model AD, pilot trial
	Statins	MS, pilot trial and EAE mouse model AD, epidemiological studies <u>PD, MPTP mouse model</u>
	PPAR γ agonists	AD, pilot trial MS, EAE mouse model AD, transgenic mouse model <u>PD, MPTP mouse model</u>
	Vaccination	AD, pilot trials and transgenic mouse models <u>PD, transgenic mouse model</u>
	Migration blockers	Stroke, mouse model MS, pilot trials and EAE mouse model Stroke, mouse model
	Minocyclina	Meningitis, rabbit model MS, pilot trials and EAE mouse model HD, transgenic mouse model Stroke, mouse model

Figura 13. Inmunoterapias exitosas en el tratamiento de la inflamación en enfermedades neurodegenerativas. Cuadro resumen de las terapias antiinflamatorias utilizadas en el tratamiento de algunas enfermedades neurodegenerativas, entre ellas la EP. (Extraído de Zipp y Aktas, 2006).

En general, parece que el uso de agentes antiinflamatorios puede tener un efecto beneficioso como tratamiento preventivo. La administración de estos fármacos en combinación con otras terapias bien establecidas (como la L-DOPA) o tratamientos emergentes (como el remplazamiento celular o el uso de factores de crecimiento), contribuirá a una mayor efectividad de los tratamientos individualizados para cada paciente de EP.

1.4.4 Glucocorticoides y parkinsonismo

Los GCs tienen efectos variables en el cerebro dependiendo de factores como el balance de GR/MR, el tiempo exposición y dosis utilizada, la región cerebral sobre la que actúan y el contexto de las células diana (determinado por agentes como neurotransmisores, citocinas u otras hormonas) (De Kloet et al., 1998; Sorrells et al., 2009). De esta forma, altos niveles crónicos de GCs promueven efectos deletéreos en el hipocampo, disminuyendo la neurogénesis y afectando la plasticidad sináptica y la cognición (McEwen y Magarinos, 2001). Por el contrario, los GCs a niveles basales o elevados de forma puntual mejoran la plasticidad sináptica y los procesos cognitivos dependientes del hipocampo (McEwen et al., 1993; McEwen y Magarinos, 2001). Recientemente se ha descrito que los GCs, a través de la activación de GR y de una forma dosis-dependiente, contribuyen a la supervivencia neuronal en el hipocampo y en la zona subventricular del estriado mediante la activación de los receptores tirosina-kinasa Trk (Jeanneteau et al., 2008).

En pacientes de EP se han descrito alteraciones en la función del eje HPA conducentes al aumento en los niveles de cortisol (Hartmann et al., 1997; Ros-Bernal et al., 2011; Stypula et al., 1996; Volpi et al., 1991), aunque el tratamiento con L-DOPA puede modificar estos niveles. El hecho de que ocurra este aumento de cortisol parece sugerir que la degeneración DA tiene efecto sobre la actividad de los GCs y su metabolismo. En animales parkinsonizados con MPTP se ha detectado un aumento en los niveles de ACTH y cortisol o

corticosterona sistémicos, así como alteraciones en sus ritmos circadianos (Barcia et al., 2003; Hinenno et al., 1992; Mizobuchi et al., 1993; Ros-Bernal et al., 2011), lo que podría constituir una señal del organismo para promover la protección de las neuronas DA.

En secciones anteriores hemos tratado la importancia de los GCs en el control de la reacción inflamatoria en el cerebro. Diversos estudios han demostrado que la administración de GCs tiene un efecto protector sobre la neurotoxicidad producida por MPTP, debido a la inhibición que ejercen sobre los procesos inflamatorios mediados por las células gliales en las áreas DA afectadas; efecto que confirma su función como moduladores de la respuesta inflamatoria en las células gliales (Kurkowska-Jastrzebska et al., 2004; Marchetti et al., 2005; Morale et al., 2004).

Sin embargo, los mecanismos por los que los GCs ejercen sus efectos protectores no se conocen con exactitud. Quizás el estudio de otras hormonas esteroideas puede ayudarnos a entender el papel antiinflamatorio y protector de los GCs sobre las neuronas DA. En esta línea, se sabe que hormonas esteroideas, como el 17- β -estradiol o la progesterona protegen contra la degeneración DA inducida (Callier et al., 2001; Dluzen, 1996; Morale et al., 2006; Morissette et al., 2007), lo que podría explicar la mayor prevalencia de la EP en hombres que en mujeres (Wooten et al., 2004). La acción de los estrógenos parece reducir los procesos inflamatorios que tienen lugar en el parenquima cerebral, disminuyendo la activación de las células gliales que rodean las neuronas DA (Tripanichkul et al., 2006). Este proceso puede estar mediado por una expresión diferencial de los receptores de estrógenos en las células gliales y en las neuronas (Bains et al., 2007). De hecho, la ausencia de receptor de estrógenos confiere gran susceptibilidad a la neurodegeneración DA inducida por MPTP (Morissette et al., 2007) y efectos similares se han visto en ratones con ausencia del GR (Morale et al., 2004). En este trabajo, Morale y colaboradores utilizan ratones transgénicos que expresan un

ARN antisentido contra GR desde el desarrollo embrionario, produciendo entre un 40-60% de reducción en los niveles de expresión de GR. Estos ratones son más vulnerables a la muerte neuronal dopaminérgica inducida por intoxicación con MPTP. Los autores atribuyen este efecto a una superproducción de iNOS (y por tanto de NO) por parte de la microglia (Marchetti et al., 2005; Morale et al., 2004). En esta misma línea, la pérdida de neuronas DA inducida por una inyección de LPS en la SNpc es fuertemente inhibida por tratamientos con DEX, al inhibir la sobreexpresión de iNOS por parte de la microglía (Arimoto y Bing, 2003; Castano et al., 2002), ya que los GCs contribuyen a la inhibición de la activación microglial (Sugama et al., 2009). Por otra parte, en recientes estudios de nuestro laboratorio, utilizando ratones GR^{LysMCre}, hemos demostrado que la ausencia de GR específicamente en la microglía aumenta la pérdida de neuronas DA por la acción de MPTP (Ros-Bernal et al., 2011; Anexo 1); además, los efectos neuroprotectores de la DEX quedan abolidos en estos ratones, demostrando un importante papel de los GCs sobre la neurodegeneración DA a través del GR microglial, mediante la inhibición de NF-κB (Ghosh et al., 2007).

Todos estos trabajos se centran en los efectos antiinflamatorios de los GCs a través del GR microglial. Sin embargo, las acciones de los GCs son dependientes del tipo celular en el que actúen (Herr et al., 2007; Sorrells et al., 2009); y aunque se conoce que GR se expresa relativamente en altos niveles en las neuronas DA (Turiault et al., 2007), aún no se han determinado los efectos directos de los GRs sobre estas células (Fig. 14).

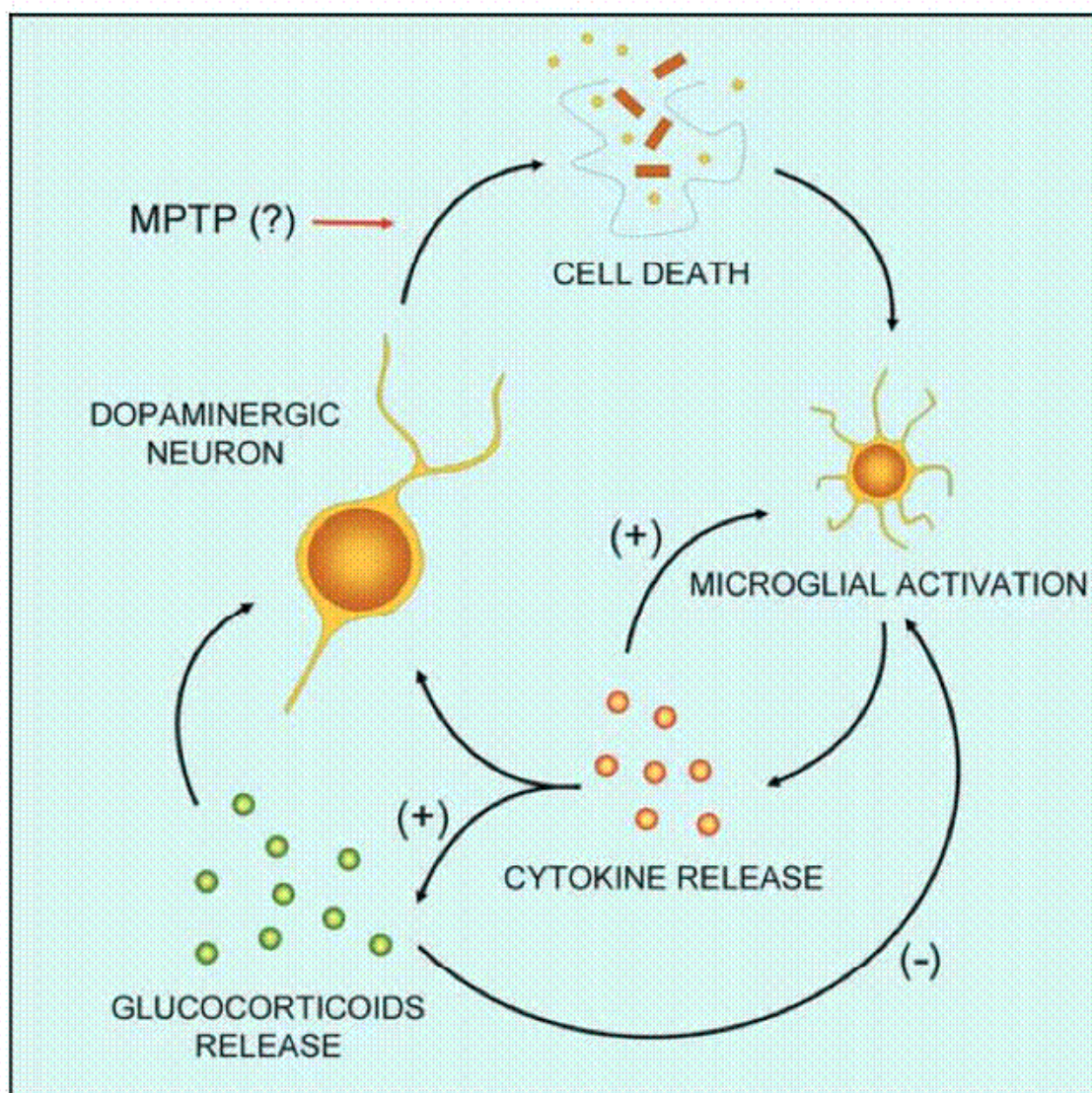


Figura 14. Función de las citocinas y los GCs en la degeneración DA. La degeneración de las neuronas DA causada por MPTP u otro agente o daño, dispara una reacción inflamatoria local caracterizada, entre otras cosas, por una activación microglial. La microglía activa es capaz de liberar citocinas proinflamatorias, que a su vez inducen la liberación de GCs por activación del eje HPA. Los GCs contribuyen a la protección de las neuronas DA indirectamente al inhibir la activación microglial; sin embargo, este efecto protector puede ser también directo por activación de GR en las propias neuronas DA. (Extraído de Barcia et al., 2009)

II. Objetivos

El principal objetivo de esta tesis concierne al estudio de los mecanismos mediante los cuales los glucocorticoides (GCs) y su receptor (GR) regulan la supervivencia neuronal en la EP y los procesos inflamatorios en el cerebro. Además, hemos querido profundizar en el estudio de los procesos de infiltración linfocitaria que ocurren en asociación a la inflamación en el SNC, a través de la identificación de las funciones de la citocina MCP-1/CCL2, cuya expresión puede ser modulada por GR.

Para llevar a cabo nuestro propósito hemos desarrollado modelos de inflamación aguda y de parkinsonismo experimental en ratones que presentan el gen de GR inactivado específicamente en distintos tipos celulares de interés.

Los objetivos específicos de este trabajo han sido:

1. Determinar los patrones de expresión de GR en las neuronas DA en modelos de parkinsonismo *in vivo* e *in vitro*; concretamente, en la SNpc de animales parkinsonizados con MPTP y en cultivos mesencefálicos de rata tratados con MPP⁺.
2. Estudiar los potenciales efectos neuroprotectores de los GCs en el parkinsonismo, así como identificar los tipos celulares implicados en estos efectos, mediante el uso de cultivos mesencefálicos tratados con MPP⁺ y ratones transgénicos que presentan GR inactivado específicamente en las neuronas DA (GR^{DATCre}).
3. Estudiar los mecanismos a través de los cuales GR ejerce sus efectos neuroprotectores en el parkinsonismo.
4. Caracterizar la respuesta inflamatoria, así como el daño tisular inducido por una inyección intraparenquimal de LPS en una línea transgénica de ratones que presenta GR inactivado específicamente en la microglía (GR^{Ly^sMCre}).

5. Estudiar el papel de GR en diferentes funciones microgliales como la motilidad, proliferación y diferenciación celular a estados activos.
6. Estudiar la implicación de la citocina MCP-1/CCL2 en los procesos de infiltración y extravasación linfocitaria en el parénquima cerebral tras inducción de procesos de inflamación aguda.
7. Identificar el tipo celular encargado de la expresión de MCP-1/CCL-2 en el cerebro.

III. Apartados de estudio

Capítulo 1

“Papel de los glucocorticoides y el receptor de glucocorticoides

en la supervivencia neuronal en modelos de parkinsonismo experimental”

Se ha descrito que los GCs a través de la activación y acción de GR pueden producir efectos tanto positivos como negativos sobre la supervivencia neuronal (Sorrells et al., 2009). Esta dicotomía en sus efectos puede depender de factores como el estatus del eje HPA, los niveles de GCs circulantes que puede afectar a la activación y funciones de GR, la naturaleza del daño, las vías de señalización intracelular que se activan o el tipo celular involucrado en la respuesta.

Aunque existen trabajos que demuestran el papel de los GCs sobre la neurodegeneración DA en modelos de parkinsonismo experimental, casi la totalidad se centra en el estudio de las funciones de GR sobre los procesos de inflamación crónica asociados a esta enfermedad. En trabajos anteriores de nuestro grupo, demostramos que la expresión y función de GR está modulada en el parkinsonismo experimental y que el GR microglial está implicado de forma crucial en la regulación de los procesos inflamatorios que afectan a la supervivencia de las neuronas DA (Ros-Bernal et al., 2011; Anexo 1).

Este primer capítulo se centra en la determinación de los efectos de los GCs en el parkinsonismo a través del GR específicamente en las neuronas DA. Para la realización de este estudio hemos utilizado distintos modelos de parkinsonismo in vivo e in vitro. Los resultados nos han permitido comprobar que no sólo el GR microglial es importante para el efecto neuroprotector de los GCs en el parkinsonismo, sino que el papel del GR de las neuronas DA resulta esencial.

1. Materiales y métodos

1.1 Procedimientos experimentales para los estudios realizados con animales

1.1.1 Monos parkinsonianos

Para la realización de esta parte del estudio se utilizó tejido cerebral procedente de ocho macacos jóvenes-adultos, de la especie *Macaca fascicularis*, de ambos sexos, que fueron estudiados anteriormente y durante años en la Unidad de Primatología de la Universidad de Murcia. Todos los experimentos se llevaron a cabo teniendo en cuenta las normas europeas para la protección de animales de experimentación de la declaración de Helsinki, la *Guidelines of the European Convention for the protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other scientific purposes* (Council of Europe of 2006), la Guía de la Sociedad Internacional de Primatología y la Guía de Cuidados y Usos de Animales de Experimentación (NIH Guide, revised 1996).

1.1.1.1 Tratamiento con MPTP

Se establecieron dos grupos compuestos por cuatro monos control y cuatro parkinsonianos. El grupo parkinsoniano, recibió una inyección semanal de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) vía vena safena, a bajas dosis (0.3 mg/Kg) durante un periodo de 3 meses (Barcia et al., 2003; Herrero et al., 1993b). Ningún animal recibió tratamiento con L-DOPA ni con otros agonistas dopaminérgicos. Los animales intoxicados con MPTP desarrollaron un parkinsonismo estable, caracterizado por la aparición de síntomas como bradicinesia, acinesia, rigidez muscular y temblor de acción, que fueron evaluados semanalmente mediante una escala de incapacidad motora descrita en trabajos previos (Herrero et al., 1993b).

1.1.1.2 Procesamiento del tejido y marcajes específicos

Los macacos fueron sacrificados mediante una inyección letal de pentobarbital, tras ser anestesiados con ketamina. El sacrificio se llevó a cabo dos años después de la última dosis de MPTP. Los cerebros fueron extraídos cuidadosamente y fijados durante tres días en paraformaldehído (PFA) al 4% diluido en tampón fosfato 0.1 M. Posteriormente, el mesencéfalo fue seccionado en cortes coronales de 40 μm de grosor utilizando el microtomo de congelación (Microm, HM400); los cortes fueron conservados en tampón fosfato-salino (PBS) con acida sódica 0.1 % hasta su utilización.

Para los análisis inmunocitoquímicos e inmunohistoquímicos (detallados en secciones posteriores), se utilizaron series de secciones espaciadas regularmente a intervalos de 1440 μm , que fueron marcadas para: 1) tirosina hidroxilasa (TH), mediante el anticuerpo primario de cabra policlonal anti-TH (1:500; Chemicon, Temecula, CA, USA), para estudiar las neuronas dopaminérgicas (neuronas DA); 2) GR, mediante un anticuerpo monoclonal (1:100; 3D5 ab9568, Abcam, Cambridge, UK), para determinar el patrón de expresión de GR en las neuronas DA y en las células gliales, 3) anticuerpo primario de conejo policlonal anti-ionized calcium binding adapter-1 (Iba-1; 1:750; Wako, Neuss, Germany) para el marcaje de microglía, 4) anticuerpo primario de conejo policlonal anti-proteína ácida fibrilar glial (GFAP; 1:500; Chemicon) para el marcaje de astrocitos.

1.1.2 Ratones parkinsonianos

Para este estudio se utilizaron ratones C57BL/6J macho de 12 semanas de edad (Charles River, France) y ratones GR^{DATCre}, con sus controles GR^{loxP/loxP}, de entre 12 y 14 semanas de edad; estos últimos fueron generados en el laboratorio de F. Tronche (Turiault et al., 2007). Los ratones fueron mantenidos en pequeños grupos o de forma individual en el animalario, bajo un fotoperiodo controlado y estable (ciclos de 12 horas luz-oscuridad), y a

temperatura constante de 22°C; sin tener restringido el acceso a comida y agua. Todos los experimentos se llevaron a cabo teniendo en cuenta las normas europeas para la protección de animales de experimentación de la declaración de Helsinki y la Guidelines of the European Convention for the protection of Vertebrate Animals used for Experimental y other scientific purposes (Council of Europe of 2006).

1.1.2.1 Tratamiento con MPTP

Los ratones que conformaron los grupos parkinsonianos recibieron un tratamiento subcrónico de MPTP consistente en una inyección de 30mg/kg por día durante cinco días, según describieron (Jackson-Lewis y Przedborski, 2007), y fueron sacrificados siete días después de la última inyección de MPTP. Los grupos de ratones C57BL/6J estaban compuestos por 6 individuos y los de ratones GR^{DATCre} por 5 individuos.

1.1.2.2 Tratamiento con Corticosterona (CORT)

Los ratones fueron tratados con CORT a una concentración de 35 $\mu\text{m}/\text{ml}$, disuelta en agua de bebida gracias a su mezcla con β -ciclodextrina (β -CD, oligosacárido inocuo) al 0.45% (Sigma-Aldrich) y sonicación en baño (David et al., 2009). Los ratones que no fueron tratados con CORT, recibieron el agua de bebida conteniendo 0.45% de β -CD como vehículo. Los ratones tenían acceso ad libitum al agua conteniendo CORT y/o β -CD, que se introdujo en biberones opacos para evitar la oxidación de la CORT. La cantidad de agua consumida por cada ratón fue controlada mediante la medida del peso de los biberones cada dos días. El cálculo de consumo de CORT aproximado para la dosis de 35 $\mu\text{m}/\text{ml}$ fue de 5 mg/kg/day de acuerdo con publicaciones previas (David et al., 2009). Los tratamientos con CORT comenzaron el primer día de inyección con MPTP o salino y se prolongaron hasta el sacrificio, siete días después de la última inyección con MPTP.

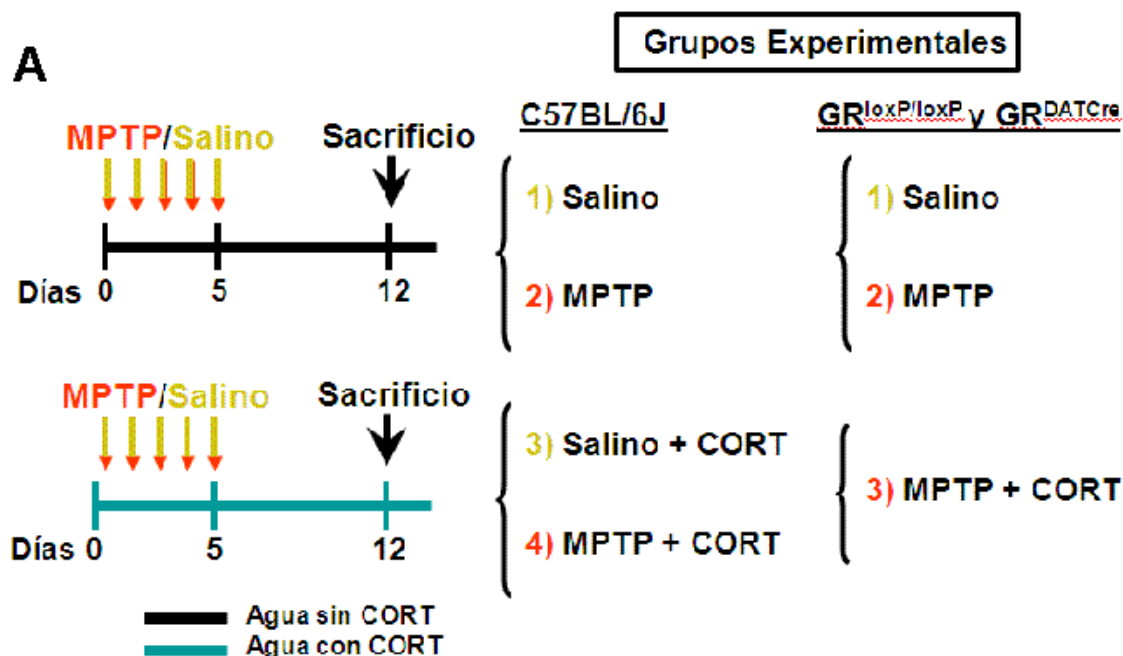
En base a los tratamientos recibidos, se establecieron cuatro grupos de ratones C57BL/6J: 1) Inyectados con salino/no tratados con CORT, 2) Salino/ tratado con CORT, 3) MPTP/no tratado con CORT, 4) MPTP/ tratado con CORT (Fig. 15A). Mientras que para los ratones GR^{DATCre} se establecieron seis grupos: 1) GR^{loxP/loxP}/salino/no tratado con CORT; 2) GR^{loxP/loxP}/MPTP/no tratado con CORT; 3) GR^{loxP/loxP}/MPTP/tratado con CORT; 4) GR^{DATCre}/salino/no tratado con CORT; 5) GR^{DATCre}/MPTP/no tratado con CORT y 6) GR^{DATCre}/MPTP/tratado con CORT (Fig. 15A).

1.1.2.3 Determinación de los niveles de CORT plasmáticos

Se determinaron los niveles de CORT plasmáticos para los ratones GR^{DATCre} y GR^{loxP/loxP}, después de uno y siete días de la intoxicación con MPTP. La sangre se extrajo de la vena de la cola, mediante escisión y con la ayuda de tubos microvette (Microvette®) conteniendo EDTA. La recogida de sangre se hizo durante 120 segundos para evitar posibles interferencias en los resultados debidos al estrés provocado en el animal durante el protocolo de extracción. A partir de la sangre se obtuvo el plasma por centrifugación (una primera vez a 1600g, 4°C durante 10 minutos, y una segunda vez a 2600g, 4°C durante 15 minutos) y se conservó a -80°C hasta su análisis. Los niveles de CORT fueron determinados mediante radioinmunoensayo (RIA) (kit Immunochen™ Corticosterone- MP Biomedicals, Orangeburg, NY, USA).

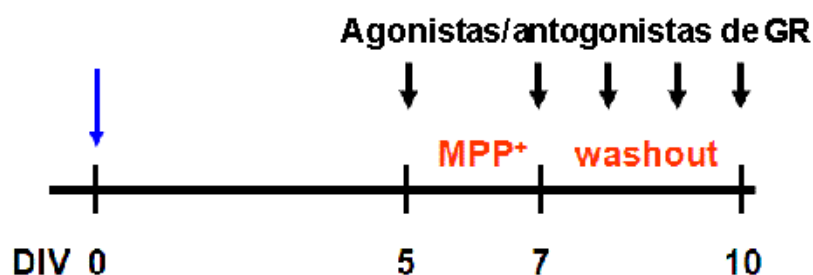
1.1.2.4 Procesamiento del tejido y marcajes específicos

Tras siete días de la última inyección de MPTP, los ratones fueron anestesiados con una sobredosis de ketamina (50 mg/kg) y perfundidos. Para la perfusión fue empleada una jeringa de 10 ml con cánula especial (BD Plastipak™). Se realizó un corte en la orejuela de la aurícula derecha y una posterior incisión en el ápex cardíaco. A través de este último se introdujo una cánula hacia el ventrículo izquierdo y se campló para su sujeción. Por la cánula



- ✓ Tratamiento subcrónico de MPTP (30 mg/Kg MPTP/día)
- ✓ 35 µg/ml CORT

B Cultivos mesencefálicos



- ✓ Bajas concentraciones de MPP⁺ (3µM)
- ✓ Toxicidad parcial y selectiva
- ✓ Estudio del impacto de agonistas (DEX, CORT) y antagonistas (RU486) de GR

Figura 15. (A) Esquema representativo del protocolo de administración de CORT y MPTP para ratones. Se establecieron cuatro grupos de ratones C57BL/6J (n=6/grupo) dependiendo del tratamiento recibido. Para los ratones GR^{DATCre} se establecieron seis grupos (n=5/grupo) al introducir la variable del genotipo. **(B) Protocolo de establecimiento de cultivos mesencefálicos a partir de embriones de rata.** Esquema representativo de las condiciones de cultivo y de los tratamientos utilizados.

se hicieron pasar 20 ml de tampón fosfato (PBS) 0.1M y, tras eliminar toda la sangre circulante, se perfundió con 20 ml de PFA al 4% diluido en PBS 0.1M. A continuación, el cerebro fue extraído cuidadosamente y post fijado en PFA al 4% durante 48 horas. Las regiones mesencefálicas y estriatales de los cerebros fueron cortadas en secciones coronales rostrocaudales de 40µm de grosor, haciendo uso del vibratomo (Leica VT1000 S). Para el análisis inmunohistoquímico se utilizaron series de secciones espaciadas de forma regular. Se realizaron los siguientes marcajes: 1) tinción de tionina (para cuantificar el número total de neuronas en la SNpc), 2) tirosina hidroxilasa (TH, anticuerpo monoclonal, 1:1000; Chemicon, Temecula, CA, USA) contrastado con tinción cresil violeta, y 3) GR (anticuerpo monoclonal, 1:100; 3D5 ab9568, Abcam, Cambridge, UK).

1.1.3 Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia (procedimientos comunes)

1.1.3.1 Tinciones histoquímicas e inmunohistoquímica

Para la inmunohistoquímica, las secciones, de 40 µm de grosor, fueron lavadas en PBS e incubadas con 0.3% H₂O₂ durante 15 minutos para inhibir la peroxidasa endógena. Los sitios de unión (Fc) inespecíficos fueron bloqueados por incubación con suero de caballo al 10% durante 1 hora. Posteriormente, las secciones fueron incubadas con los anticuerpos primarios expuestos anteriormente (anti-TH o anti-GR) disueltos en PBS con suero de caballo al 1%, 0.5% Triton X-100 y 0.01% de acida sódica, durante 48 horas en agitación y a 4°C. A continuación, las secciones fueron lavadas 3 veces con PBS e incubadas durante 4 horas con los anticuerpos secundarios biotinilados correspondientes: anti-cabra (1:1000; Vector Laboratories) y anti-ratón (1:1000 y 1:500; Vector Laboratories), para la detección de TH y GR, respectivamente. La unión del anticuerpo secundario fue detectada mediante el sistema avidina-biotina peroxidada (kit ABC, Vectastain de Vector Laboratories), mediante la incubación con la solución AB durante 3 horas y el revelado con diaminobenzidina (DAB; Peroxidase Substrate Kit; Vector Laboratories). Finalmente, las secciones fueron montadas en

portas gelatinizados, deshidratadas utilizando etanol a concentraciones crecientes (50%-70%-80%-95%-100%), delipidadas en xilol y cubiertas con medio de montaje (Eukitt; Labolan). Antes de la deshidratación, el marcaje de TH fue contrastado con cresil violeta para facilitar la cuantificación. Para ello, los portas (conteniendo las secciones marcadas para TH) fueron incubados en la solución cresil violeta (ver sección 1.1.5 del capítulo 2) entre 1 y 5 minutos (dependiendo del grado de intensidad del marcaje de TH y del grado de intensidad de cresil violeta que se quisiera obtener), y bañadas en las siguientes soluciones para su deshidratación: agua destilada (1 min), etanol 50% (1 min), etanol ácido 70% (2 min), etanol 95% (2 min), etanol 100% (1 min) y xileno (5 min).

Para la tinción de tionina, se incubaron los portas, conteniendo las secciones montadas y secas, en las siguientes soluciones: cloroformo con etanol 100% para la delipidación (en relación 1:1; dos pasos de 30 min), etanol a concentración decreciente (100%-90%-70%), agua destilada, solución de tionina (5 min), etanol a concentración creciente (70%-90% con ácido acético- 90%-100%) y xilol. Todos los baños en alcoholes y agua fueron de 1 minuto de duración.

1.1.3.2 Inmunofluorescencia

Para la inmunohistoquímica, las secciones (de 40 μm de grosor) recibieron un pretratamiento con tampón citrato al 0.5%, a 65°C, en agitación constante y durante 30 minutos, para incrementar la penetración del anticuerpo primario en el tejido. Los sitios de unión (Fc) inespecíficos fueron bloqueados por incubación con suero de caballo al 10% durante 1 hora. Posteriormente, las secciones fueron incubadas con los anticuerpos primarios expuestos anteriormente (anti-GR, seguido de anti-TH, anti-Iba1 o anti-GFAP) disueltos en PBS con suero de caballo al 1%, 0.5% Triton X-100 y 0.01% de ácido sódico, durante 48 horas en agitación y a 4°C. Para las dobles inmunofluorescencias, se incubaron los anticuerpos primarios de forma secuencial y no conjuntamente. A continuación, las secciones

fueron lavadas 3 veces con PBS e incubadas durante 4 horas con los anticuerpos secundarios marcados con fluorocromos: Alexa 594-conjugated anti-conejo, anti-ratón o anti-cabra (1:500, Molecular Probes) y Alexa 488-conjugated anti-ratón o anti-conejo (1:1000, Molecular Probes). Después, las secciones fueron lavadas con PBS e incubadas con DAPI (1:1000; Invitrogen) para detectar los núcleos. Finalmente, fueron lavadas y montadas en portas, utilizando Prolong® (Invitrogen) como medio de montaje.

1.1.3.3 Cuantificación y análisis estereológico

Los límites de la SNpc fueron definidos mediante los atlas de cerebro de mono y ratón (Herrero et al., 1993; Paxinos y Franklin, 2001; Paxinos y Huang, 2000). Las secciones de cerebro de ratón marcadas positivamente para TH, se analizaron con microscopio óptico convencional (Nikon) y la cuantificación se realizó con la ayuda de las herramientas de estereología proporcionadas por el software de análisis de imagen Mercator (Explora Nova, La Rochelle, France). Así, el número de células TH positivas fue cuantificado a partir de 5 secciones regularmente espaciadas, representativas de la SNpc.

Para las secciones de mesencéfalo de mono, la cuantificación de células TH positivas se llevó a cabo usando métodos estereológicos con un sistema de análisis de imagen asistido por ordenador, utilizando un microscopio (Zeiss Axioplan 2) conectado a una cámara digital. La región de interés fue delimitada utilizando el objetivo 1.25 x. El número de células fue estimado por medio de un disector óptico de 200 x 250 μm . Se realizó un muestreo sistemático con campos separados por 200 μm , en suficiente número para ocupar toda el área delimitada al inicio. El número de células se contó según los criterios de inclusión y exclusión estereológicos: las células se cuantifican cuando tocan los lados superior y derecho del disector, o están incluidas dentro del mismo, y se excluyen cuando tocan los lados inferior e izquierdo del disector. Los objetos cuantificados se expresaron en unidades de volumen según el principio del disector óptico (Sterio, 1984). Para el análisis se utilizaron dos secciones

representativas de la SNpc de cada mono. Tanto para ratón como para mono, los datos se expresan como número absoluto de células positivas TH (media \pm SEM) en cada región anatómica analizada.

Para la cuantificación de las células tiorina positivas en la SNpc de ratón, se utilizó el aumento 10 x del microscopio óptico (Zeiss Axioplan 2), con el objeto de tomar fotos de alta resolución en las que quedara englobada la totalidad de la SNpc. La cuantificación se realizó mediante el uso del software Image J, contando el número total de neuronas tiorina positivas de la SNpc para cada una de las 5 secciones seleccionadas, y realizando los cálculos estereológicos para la determinación del número absoluto de neuronas en la SNpc completa.

1.1.3.4 Microscopía de fluorescencia y confocal. Análisis y cuantificación

Para el análisis y cuantificación de las dobles-inmunofluorescencias contrastadas con DAPI se utilizó microscopía de fluorescencia convencional y confocal. Primero se realizó la cuantificación de células TH positivas con núcleo GR positivo en la SNpc de monos, usando un microscopio (Zeiss Axioplan 2) conectado a una cámara digital. Las imágenes para ambos anticuerpos fueron combinadas y cuantificadas usando el software Image J. Para realizar una cuantificación más exhaustiva de las células TH positivas que expresan GR en el núcleo en las distintas subregiones de la SNpc en monos y en la SNpc de los ratones, las secciones fueron analizadas con microscopía confocal (Leica DMIRE2), utilizó el objetivo 40x. Del mismo modo, se cuantificó el porcentaje de células gliales expresando GR en el núcleo (células Iba1 o GFAP/GR positivas) en la SNpc de monos, utilizando el objetivo de 63x. Un rango de series para cada sección fue establecido al determinar un límite superior e inferior mediante el eje de posición Z/Y, obteniendo una imagen espacial configurada por una serie o stack de sub-imágenes (Barcia et al., 2006; Barcia et al., 2008). El número de células doble positivas fue contado para cada stack o imagen espacial, a través de cada sección óptica y descartando las células doble positivas contadas en la sección óptica precedente. Para esta cuantificación se

utilizó el software LCS Lite (Leica). Las imágenes mostradas en las figuras pueden ser ilustradas como stacks simples (de $0.5\mu\text{m}$ de grosor) o como transparencia de todos los stacks que conforman una imagen superpuestos. Los resultados se expresan como % de células doble positivas para GR (nuclear) y TH, Iba-1 o GFAP dividido entre el total de células TH, Iba-1 o GFAP positivas respectivamente, por unidad de área.

1.2 Procedimientos experimentales para los estudios realizados in vitro

1.2.1 Establecimiento de cultivos mesencefálicos y tratamientos

Para el establecimiento de los cultivos primarios se utilizaron mesencéfalos ventrales extraídos de embriones de rata de 15.5 días de edad gestante (Janvier Breeding Center, Le Genest St Isle, France); para ello, se siguió el protocolo detallado en publicaciones previas (Escobar-Khondiker et al., 2008; Toulorge et al., 2010). Las células disociadas y en suspensión se obtubieron por trituración mecánica de la pieza de tejido mesencefálico, sin ayuda de tratamientos con enzimas proteolíticas. Las células fueron sembradas en densidad de $1.2\text{-}1.5 \times 10^5$ células/cm² en placas de cultivo de 24 pocillos (Costar, Coming Life Sciences, Acton, MA), pre-incubados con 1mg/ml de polietilenimina diluida en tampón borato (pH 8.3) (Michel et al., 1997). Los cultivos fueron mantenidos en medio N5 suplementado con glucosa 5mM, suero de caballo al 5% y suero fetal bovino inactivado por calor al 0.5% (FCS, Abcys, Paris, France), menos los tres primeros días in vitro (DIV), en los que la concentración del FCS fue del 2.5% para favorecer la maduración inicial de las células. Además, los cultivos fueron expuestos a K⁺ (30mM) y MK-801 ($1\mu\text{m}$, antagonista de los receptores NMDA de glutamato), para evitar el proceso de muerte espontánea que sufren las neuronas DA en este modelo de cultivo (Douhou et al., 2001; Escobar-Khondiker et al., 2008), las cuales solo representan alrededor del 2% del total de células neuronales en el momento del establecimiento del cultivo.

1.2.2 Tratamientos para el análisis del posible efecto neuroprotector mediado por GR

El potencial neuroprotector de los agonistas de GR fue evaluado mediante un paradigma en el que la muerte de neuronas DA ocurre por intoxicación de los cultivos con MPP⁺ (metabolito activo del MPTP) a una concentración baja (3 μ M), durante los DIV 5 a 7. Tres días después (DIV 10), los cultivos se lavan y se procede al análisis de la supervivencia neuronal. Con este protocolo de administración de MPP⁺ se produce una afectación selectiva y parcial de las neuronas DA.

Los cultivos fueron tratados con DEX y CORT (agonistas de GR) y RU486 (antagonista de GR) utilizando distintas concentraciones según el experimento realizado (indicadas en las sub-secciones de resultados correspondientes); todos los tratamientos fueron iniciados un día antes de la exposición a MPP⁺ y finalizados con el cultivo, en el DIV 10 (Fig. 15B). La CORT fue inicialmente solubilizada en etanol, para la preparación de la solución madre a 5mM. La solución madre de DEX (5mM) y de RU486 (50mM) fue preparada en dimetilsulfóxido (DMSO). Estas concentraciones finales de DMSO y etanol (0.0001%) añadidas al cultivo no tienen impacto sobre la supervivencia neuronal, como se ha podido comprobar en experimentos previos (Mourlevat et al., 2003).

Algunos cultivos fueron tratados con el antimitótico citosina arabinosa (ARA-C; 3 μ M) durante el periodo completo de cultivo. Este tratamiento no afecta la supervivencia de las neuronas DA, sin embargo reduce enormemente el número de células gliales (Mourlevat et al., 2003).

1.2.3 Inmunofluorescencia y cuantificación

Para la realización de técnicas de inmunofluorescencia, los cultivos fueron fijados en el DIV 10 mediante formaldehído al 4% diluido en *Dulbecco's phosphate-buffered* (DPBS, de

Sigma-Aldrich) y procesados para inmunofluorescencia. El protocolo que se utilizó fue esencialmente idéntico al realizado con tejido en flotación (ver apartado 1.1.3.2 del presente capítulo), pero sobre las placas de cultivo. Los anticuerpos primarios utilizados fueron los siguientes: 1) policlonal de conejo anti-TH (1:1000; Pelfreeze, Rogers, AR, USA) para detección de neuronas DA; 2) policlonal de conejo anti-GFAP (1:100; Dako France, Glostrup, Denmark) para detección de astrocitos; 3) policlonal de conejo anti-Iba-1 (1:500, Wako, Neuss, Germany) o 4) policlonal de ratón anti-OX-42 (1:50; clone MRC OX-42; Serotec, Oxford, Engly) para la detección de microglía; 5) anticuerpo monoclonal anti-vimentin (1:100; Clone V9, Dako France) para la detección de las células gliales en general. Además, en algunos experimentos la detección de TH, Iba-1 y GFAP fue seguida por la detección de GR usando el anticuerpo descrito anteriormente (1:100; 3D5 ab9568, Abcam, Cambridge, UK). Todos los anticuerpos fueron diluidos en PBS conteniendo 0.2% Triton X-100, excepto Iba-1 que fue diluido en PBS únicamente. La detección de los anticuerpos primarios se realizó mediante el uso de anticuerpos secundarios unidos a fluorocromos: anti-ratón conjugado con CY3 (para GR, vicentina y ox-42; 1:500; Sigma-Aldrich) o anti-conejo conjugado con Alexa Fluor 488 (para TH, GFAP e Iba-1; 1:500; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

El recuento celular se llevó a cabo utilizando un microscopio invertido TE-300 (Tokyo, Japan) equipado con una cámara digital ORCA-ER (Hamamatsu; Bridgewater, NJ). El número de las células TH positivas fue determinado tras el recuento de 20 disectores ópticos distribuidos al azar sobre el total del área de cada pocillo, utilizando el objetivo de 20x. La cuantificación de las células gliales se llevó a cabo de forma similar, pero utilizando 5 disectores ópticos.

1.2.4 Inmunoblot para GR

La expresión de GR en los cultivos fue verificada además por western-blot. Para ello, se extrajeron las proteínas de cultivos tratados con DEX, en el DIV 10, mediante el uso del kit

AllPrep RNA/Protein Kit (Qiagen group), y su concentración fue determinada mediante BCA protein assay (Thermo Scientific). Se utilizó un gel de poliacrilamida al 10% y se cargaron 10µg de proteína total en los pocillos, que fueron transferidos a una membrana de nitrocelulosa. La membrana fue bloqueada para inhibir la unión a sitios inespecíficos, mediante incubación con leche desnatada al 5% en PBS con Tween-20 al 0.1% (PBST 0.1%) durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, la membrana fue incubada con el anticuerpo primario monoclonal anti-GR utilizado para los estudios inmunohistoquímicos (a una concentración de 1:500) durante 48 horas a 4°C y en agitación. Tras ser lavada con PBST 0.1%, fue incubada con un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con peroxidasa (1:5000; Amersham Biosciences) durante 2 horas y revelado usando el kit Super Signal enhanced chemiluminescence (Pierce, Rockford, IL).

1.2.5 Cuantificación e identificación de células en proliferación

Para detectar las células en proliferación se utilizó el marcador radiactivo de la síntesis de ADN [Metil-³H]-timidina, siguiendo el protocolo descrito anteriormente por Mourlevat y colaboradores (Mourlevat et al., 2003). Los cultivos se mantuvieron hasta el DIV 7 y fueron tratados con los agonistas o antagonistas de GR durante 24 horas antes de su finalización. En el DIV 7, los cultivos fueron expuestos a 1µCi de [methyl-³H]thymidine (40 Ci/mmol; GE Healthcare) durante 2 horas a 37°C en medio N5 sin suero pero con glucosa (5mM). Tras 3 lavados rápidos en PBS, se permitió a las células liberar los excesos de radiactividad incorporada y después fueron incubadas en el mismo tipo de medio de cultivo durante 30 minutos para su recuperación. Posteriormente, los cultivos fueron fijados con PFA al 4% durante 15 minutos y procesados para la detección de vimentina por inmunofluorescencia. Finalmente, se procedió a la deshidratación del cultivo con etanol absoluto y su exposición a la emulsión Hypercoat LM-1 (GE Healthcare) durante 4 días a 4°C, para permitir la detección de la timidina tritiada incorporada al ADN.

1.2.6 Medida de la recaptación de DA

Este experimento, realizado normalmente para evaluar la integridad funcional y la función sináptica de las neuronas DA, se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito anteriormente por Guerreiro y colaboradores (Guerreiro et al., 2008). Los experimentos de recaptación de DA se realizaron en cultivos en DIV 5, que recibieron los tratamientos con DEX y un inhibidor específico del transportador de dopamina (DAT), GBR 12909 (Sigma-Aldrich), a distintas concentraciones, desde el DIV 4. La recaptación fue iniciada por adición de 50nM de dopamina marcada radioactivamente ($[^3\text{H}]\text{-DA}$; 40 Ci/ mmol) en los cultivos mantenidos a 37°C y 500 μl de PBS con glucosa 5mM y ácido ascórbico 100 μM . La reacción fue detenida 15 minutos después mediante dos lavados rápidos con PBS frío. Posteriormente las células fueron extraídas de los pocillos y se realizó la cuantificación de la radioactividad mediante un contador de centelleo líquido. Los valores para el blanco se obtuvieron en presencia de 1 μM GBR 12909.

1.2.7 Medidas de Calcio citoplasmático

Los niveles de calcio citoplasmático libre ($\text{Ca}^{2+}_{\text{cyt}}$) in vitro fueron medidos en neuronas individuales mediante el uso del cell permeant Fluo-4 (Invitrogen) un indicador verde-fluorescente de calcio. Para este experimento, los cultivos fueron establecidos en portaobjetos de cristal Lab-Teck glass-chamber slides (Nalge Nunc International, Rochester, NY), para optimizar la detección de la señal fluorescente. Los cultivos se mantuvieron hasta el DIV5, momento en el que se realizó la medida de $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyt}}$. Los tratamientos que recibieron fueron: i) tratamiento con DEX durante 24 horas antes de la finalización del cultivo y/o ii) tratamiento con MPP^+ durante 6 horas antes de la finalización en el DIV5; en este momento fueron incubados en presencia de 10 μM cell permeant Fluo-4 durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente fueron lavados dos veces con medio N5 sin suero pero con glucosa (5mM) para desechar el exceso de indicador; después fueron incubados en el mismo tipo de medio de

cultivo durante 30 minutos para su recuperación, y se midió la señal fluorescente con la ayuda del software Simple-PCI (C-Imaging Systems®) y el microscopio invertido descrito anteriormente (sección 1.2.3 del presente capítulo). Entre 6 y 10 imágenes se tomaron al azar para las diferentes condiciones del cultivo usando el objetivo de 40x. Posteriormente se midió la media de la intensidad de fluorescencia para cada neurona de una foto, restándole el valor del fondo; se calculó la media para cada condición y se transformó a porcentaje, tomando como referencia arbitraria que la fluorescencia total de la condición control sobre su fondo (F/F_0) corresponde a 100%.

1.3 Análisis estadísticos

Los resultados están expresados como medias \pm SEM. El criterio utilizado para elegir los distintos test estadísticos fue determinado por el tipo de comparación requerida y el número de factores presentes en los experimentos. El test t Student's se llevó a cabo para experimentos en los que se requerían comparaciones simples entre dos grupos. El test ANOVA de una vía, seguido por el test post-hoc Dunnett's test, se utilizó para los experimentos que requerían múltiples comparaciones contra un grupo de referencia. Finalmente, el test ANOVA de dos vías, seguido del test post-hoc Duncan's test, se utilizó para los experimentos en los que se comparaban dos factores. La hipótesis nula fue rechazada con un riesgo de 5%. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante el software SigmaStat 3.5 (Copyright 2005 SYSTAT Software).

2. Resultados

2.1 La expresión de GR en el núcleo de neuronas DA parece conferir neuroprotección en las regiones de la SNpc vulnerables a la intoxicación por MPTP en monos

Para analizar la posibilidad de que GR module la supervivencia de neuronas DA tras un daño neuronal, se examinó la expresión de GR en tejido cerebral proveniente de primates no-humanos parkinsonizados mediante inyecciones crónicas de MPTP (0.3 mg/kg) durante 3 meses. Estos animales desarrollaron un síndrome parkinsoniano que simula de forma casi idéntica la enfermedad en humanos (Barcia et al., 2004). Tras dos años de la última inyección de MPTP, los animales fueron sacrificados. El estudio de la expresión de células TH positivas en la SNpc de estos monos revela una pérdida significativa de neuronas DA en el grupo intoxicado con MPTP respecto al no tratado (Fig. 16A, B).

El análisis de la inmunohistoquímica para GR nos muestra dos grandes grupos de células marcadas positivamente: células que denominamos non-neuron like que por sus características de tamaño y forma podrían ser de naturaleza glial, y células que denominamos neuron like que por sus características parecen células neuronales (Fig. 16C). La cuantificación de estos dos tipos celulares en la SNpc muestra un aumento significativo del número de células non-neuron like GR positivas en el grupo parkinsoniano, mientras que se percibe una tendencia al descenso del número de células neuron like GR positivas en este mismo grupo (Fig. 16 D).

Tras la obtención de este resultado, nos preguntamos cuál podría ser el patrón de expresión de GR en las neuronas DA, afectadas en PD. Para analizarlo, se realizó doble inmunomarcaje para TH y GR en secciones de mesencéfalo al nivel de la SNpc y el área tegmental ventral (ATV). Estas secciones fueron analizadas inicialmente mediante microscopía de fluorescencia convencional y posteriormente mediante microscopía confocal,

con el objetivo de conseguir un análisis más exhaustivo de las distintas subregiones de la SNpc y la ATV. Las imágenes mostraron que la expresión de GR estaba concentrada en el núcleo de algunas neuronas TH positivas (Fig. 16E), sugiriendo un estado (principalmente) activo de GR, mientras que en otras neuronas no aparecía así. La cuantificación del porcentaje de neuronas DA que expresan GR en el núcleo reveló que, dos años después de la última intoxicación con MPTP, la proporción de neuronas DA remanentes en el grupo MPTP que expresaban GR en el núcleo era significativamente mayor que en el grupo control (Fig. 16F), lo que sugiere que la expresión nuclear de GR (previsiblemente activo) parece conferir resistencia o protección a las neuronas DA contra los efectos directos de la intoxicación con MPTP y los efectos subsecuentes que esta intoxicación produce en el medio celular (toxicidad, inflamación, etc) que también conducen a la neurodegeneración.

En primates, tanto humanos como no humanos, las distintas subregiones de la SNpc presentan una vulnerabilidad diferencial a la neurodegeneración DA en parkinsonismo y PD (esquema de las distintas subregiones de la SNpc en Fig. 16G). De esta forma, los mayores niveles de neurodegeneración se observan en la subregión ventrolateral ($\alpha+\beta$), seguida de las regiones lateral (lat) y dorsal (γ). Además, otras regiones mesencefálicas como la ATV se encuentran menos afectadas (Agid, 1991; Damier et al., 1999a; Fearnley y Lees, 1991; Herrero et al., 1993b; Hirsch et al., 1988). Para determinar si la expresión de GR es un factor que contribuye a la vulnerabilidad regional de la SNpc a la neurodegeneración, se realizó un análisis detallado de la expresión de GR en neuronas DA para las distintas subregiones citadas, mediante microscopía confocal. Los resultados muestran que la proporción de neuronas DA que expresan GR en el núcleo después de la intoxicación con MPTP es siempre mayor en todas las subregiones de la SNpc. Sin embargo, este valor es estadísticamente significativo únicamente en el área $\alpha+\beta$, que precisamente es el área más afectada por el MPTP (Fig. 16H). Por otra parte, en los animales intactos (control), el porcentaje de neuronas

DA que expresan GR es mayor en la ATV (región menos vulnerable en el parkinsonismo) que en el resto de las subregiones de la SN, y además, esta proporción se muestra inalterada en el grupo MPTP respecto al control. Estos resultados sugieren que la activación de GR en las neuronas DA puede ser un factor determinante de su vulnerabilidad y su susceptibilidad regional a la degeneración.

Ya que la reacción inflamatoria crónica que ocurre en la EP, estaría fuertemente relacionada con la continuidad del proceso de neurodegeneración, también nos interesamos por la expresión de GR en las principales células implicadas en los procesos inflamatorios en el CNS: la microglía y la astrogía. De esta forma, mediante experimentos de doble-inmunofluorescencia para marcadores gliales (GFAP para astrocitos e Iba-1 para microglía) y GR, se determinó si el patrón de expresión de GR en el núcleo de estas células variaba, al igual que lo hacía en las neuronas DA. Así, la cuantificación de las células doble positivas GR nuclear/GFAP o GR nuclear/Iba-1 en la SNpc completa no mostró diferencias entre el grupo control y el grupo parkinsoniano (recordemos, tras dos años de la última inyección de MPTP) al contrario de lo que ocurrió con las neuronas DA (Fig. 17).

Los resultados anteriores conducen a pensar que los GCs, al activar el GR de las neuronas DA, podrían actuar como agentes neuroprotectores en el PD. Por esta razón, procedimos al estudio de su función en la supervivencia de neuronas TH positivas en modelos de parkinsonismo in vivo (ratones C57BL/6J y GR^{DATCre}) e in vitro (cultivos mesencefálicos de rata).

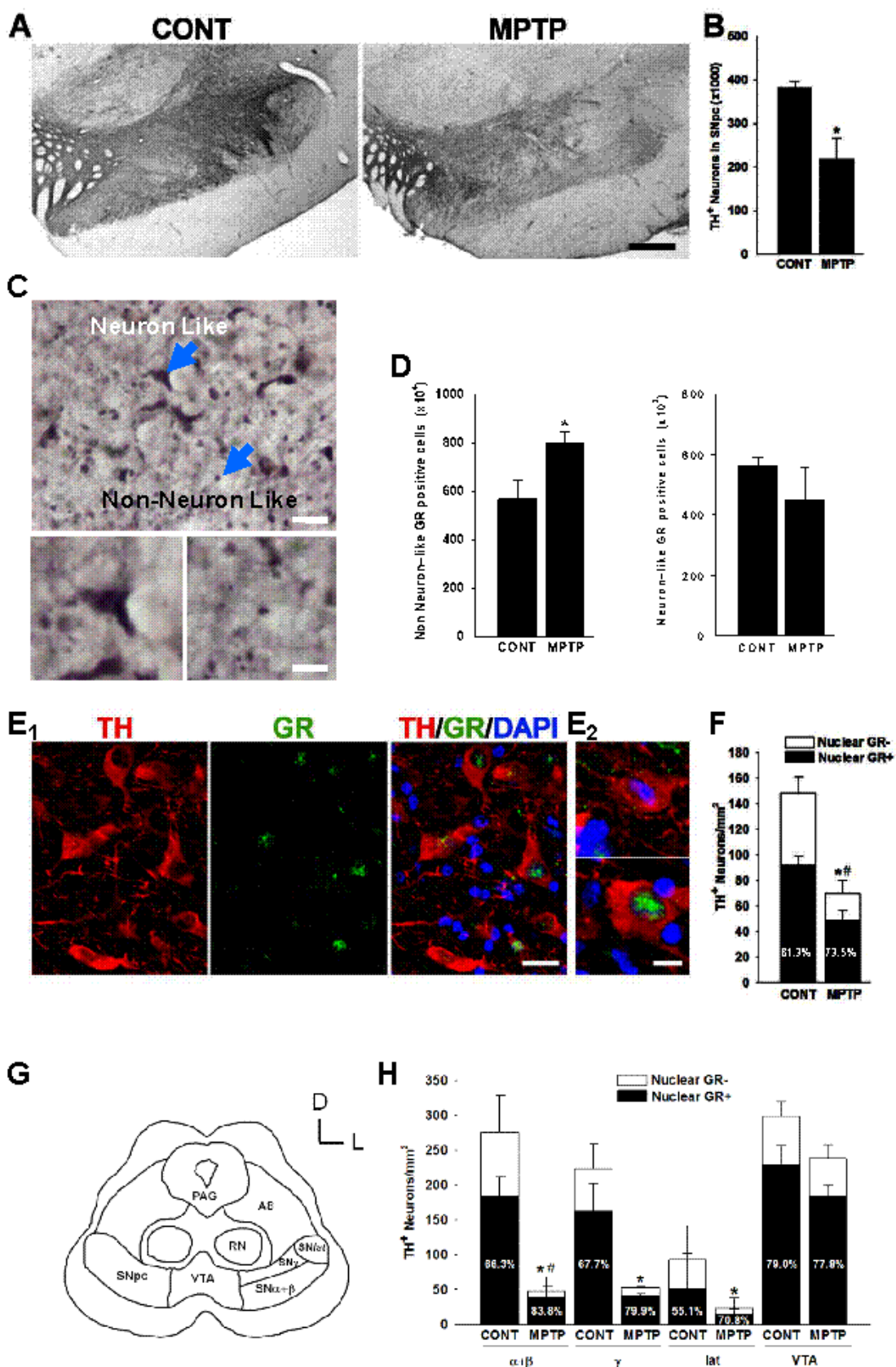


Figura 16. Las neuronas DA remanentes en la SNpc de monos parkinsonizados presentan una mayor proporción de expresión de GR en el núcleo, sugiriendo un efecto neuroprotector de GR. (A) Imágenes representativas de la expresión de TH en secciones cerebrales a nivel de la SNpc de monos. (B) El número de células TH+ fue cuantificado mediante métodos estereológicos (disector óptico) en la SNpc. Los análisis muestran una pérdida significativa de neuronas DA en la SNpc de monos parkinsonizados, tras dos años de la intoxicación con MPTP. (C) Imágenes representativas y detalladas de inmunohistoquímica para GR, en las que se pueden apreciar células con morfología neuronal (neuron like) y células con morfología no neuronal (non-neuron like). (D) La cuantificación de células GR+ muestra un incremento del número de células no-neuron like GR+ y una tendencia al descenso de las células neuron like GR+ en el grupo parkinsoniano. (E1) Imágenes representativas de microscopía confocal mostrando doble-inmunofluorescencia para TH y GR a nivel de la SNpc de un mono control. Se detecta alta inmunoreactividad para GR en el núcleo de un 60% de neuronas DA. (E2) Imágenes mostrando ejemplos característicos de una neurona DA que no expresa GR en su núcleo (TH+/Nuclear GR- cell) y otra que sí lo expresa (TH+/Nuclear GR+ cell). (F) La cuantificación muestra que la proporción de neuronas DA que expresan GR en el núcleo es mayor en el grupo parkinsoniano que en el grupo control, lo que sugiere que GR puede ejercer un efecto protector en las neuronas DA. (G) Diagrama del mesencéfalo de mono mostrando las diferentes subregiones de la SNpc y otras estructuras adyacentes: SNpc, sustancia negra pars compacta; ATV, area tegmental ventral; RN, núcleo rojo; SN $\alpha+\beta$, subregión ventrolateral; SN γ , subregión dorsal; SNlat, subregión lateral; D, dorsal; L, lateral. (H) El análisis detallado mediante microscopía confocal de las diferentes subregiones de la SNpc muestra una proporción mayor de neuronas DA con GR nuclear tras el tratamiento con MPTP en la subregión ventrolateral (la más afectada en PD). Sin embargo, el porcentaje de neuronas DA que expresan GR nuclear en animales intactos es mayor en la ATV (región menos afectada) con respecto al resto de subregiones; lo que sugiere que las regiones con mayor expresión de GR en el núcleo de las neuronas DA son menos susceptibles a los efectos del MPTP (* $P < 0.05$ comparado con el grupo control; T-student test, para B, D, F y H; # $P < 0.05$ comparado con el grupo control; T-student test, para H). Barra de escala = 0.5 μm en A, 100 μm panel grande en C y 50 μm paneles pequeños C y E.

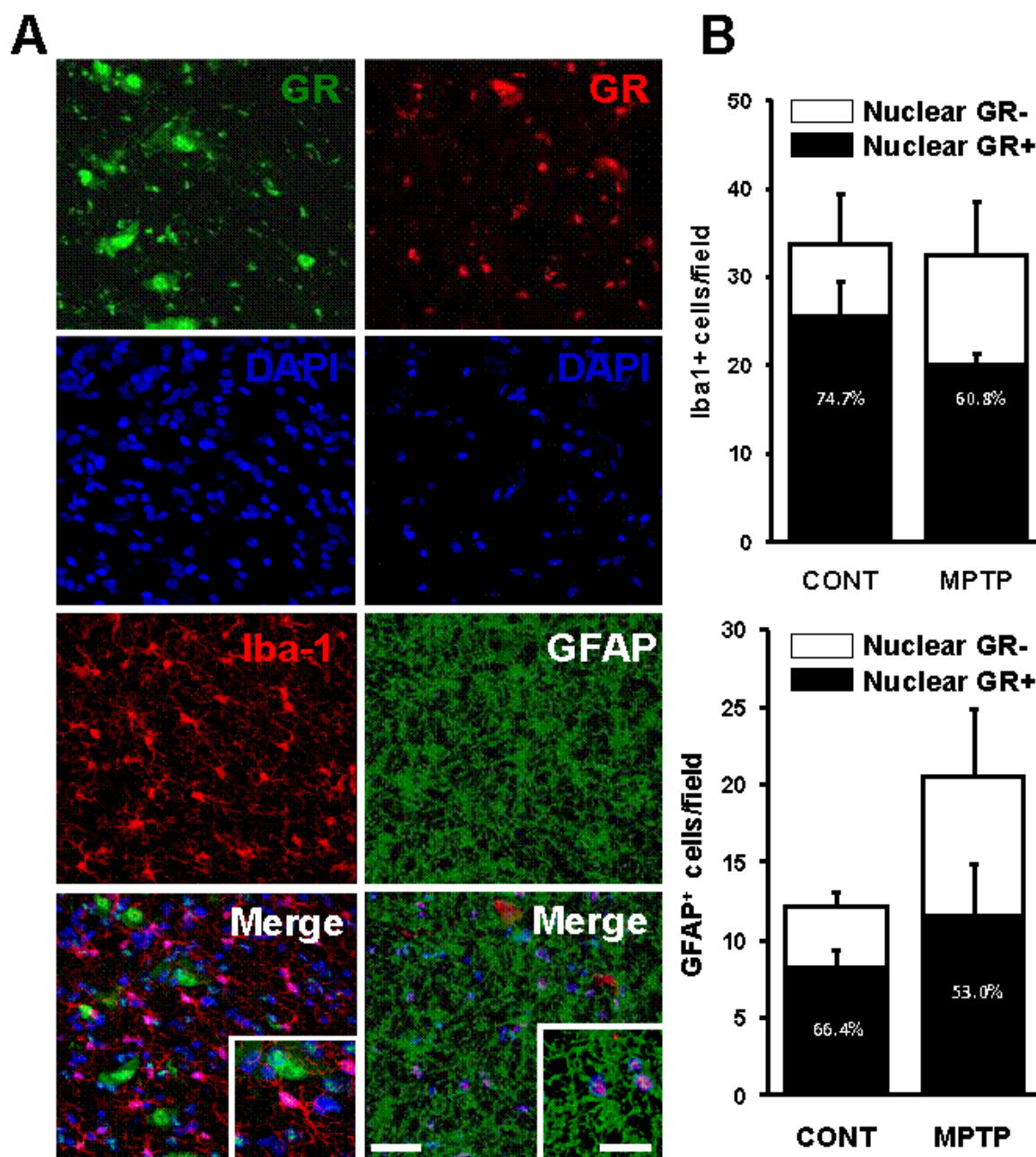


Figura 17. Expresión de GR en el núcleo de la microglía y la astroglía transcurridos 2 años de la intoxicación con MPTP en monos parkinsonianos. (A) Imágenes representativas de microscopía confocal mostrando doble-inmunofluorescencia para Iba-1 y GFAP combinadas con GR a nivel de la SNpc de un mono parkinsoniano. Los paneles pequeños muestran ejemplos característicos de una célula microglial o astroglial que expresa GR en su núcleo. (B) La cuantificación del porcentaje de células gliales que expresa GR en su núcleo, no mostró diferencias significativas entre el grupo control y el parkinsoniano. Barra de escala = 40µm para los paneles grandes y 15µm para los paneles pequeños.

2.2 La corticosterona y dexametasona protegen las neuronas DA en cultivos mesencefálicos expuestos a MPP⁺ mediante la activación de GR

Con los experimentos *in vitro* se evaluó el potencial neuroprotector de dos agonistas de GR, CORT y DEX, en cultivos mesencefálicos de rata expuestos a MPP⁺, el metabolito activo del MPTP. Para ello, los cultivos fueron expuestos a MPP⁺ (3 μ M) entre los DIV 5 y 7, y el análisis de la supervivencia neuronal se realizó tres días después. De forma consistente con trabajos anteriores, se detectó entre un 50 y un 60 % de muerte neuronal DA en los cultivos expuestos a este protocolo de intoxicación (Guerreiro et al., 2008) (Fig. 18A). Tras el tratamiento de los cultivos con diferentes dosis de DEX o CORT desde el DIV 4 hasta el final del cultivo (DIV10), se comprobó que se producía un efecto de neuroprotección dependiente de las dosis utilizadas (Fig. 18A). DEX y CORT presentaron similares eficacias en su efecto protector, sin embargo DEX resultó ser más potente que CORT. Así, la concentración efectiva 50 (EC₅₀ o concentración del agente que provoca una respuesta del 50% al compararla con el control) estimada en el DIV 10 de cultivo para DEX y CORT fue de 0.26 y 81nM respectivamente.

Además, se observó que el tratamiento con el antagonista de GR RU486 (1mM) previene el efecto neuroprotector producido por DEX y CORT utilizadas a concentraciones óptimas (10nM y 100nM respectivamente), lo que indica que el efecto está mediado por la activación de GR (Fig. 18B). Es importante resaltar que el tratamiento con RU486 no tiene efecto per se sobre la supervivencia de la neuronas DA en los cultivos control. Para el resto de experimentos *in vitro* se utilizó la DEX como ligando de GR debido a su mayor potencial

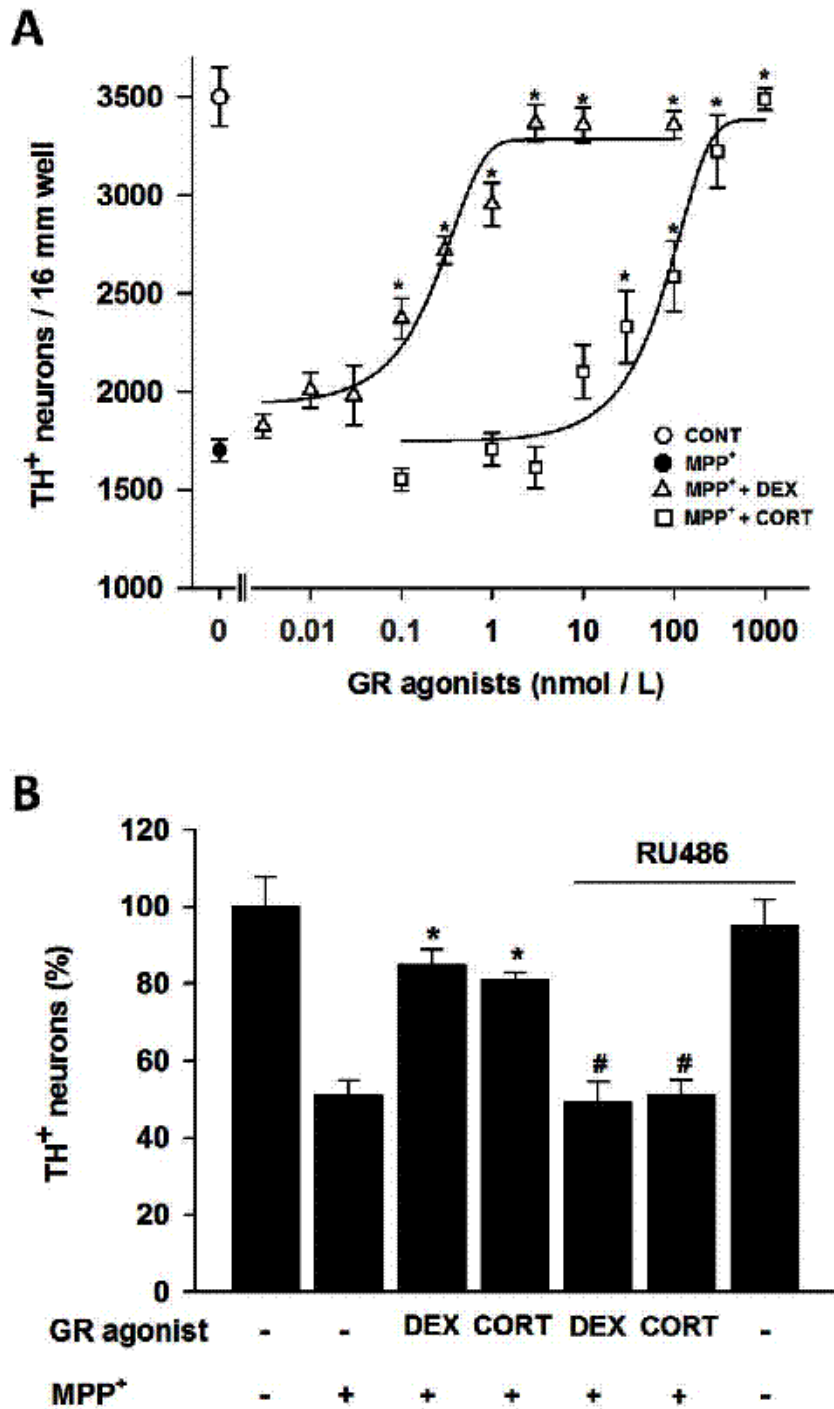


Figura 18. Efectos neuroprotectores de DEX y CORT sobre las neuronas DA en cultivos mesencefálicos. (A) El efecto protector sobre las neuronas TH+ en cultivos intoxicados con MPP+ (3µM) es dependiente de la concentración de DEX (0.01-100 nM) y CORT (1-1000 nM). (B) Número de neuronas TH+ en cultivos expuestos a MPTP en ausencia o presencia de DEX (10nM) o CORT (100nM), y el antagonista de GR RU486 (1µM). El tratamiento con CORT o DEX protege las neuronas DA y es abolido por RU486. RU486 no tiene efecto por sí mismo en la supervivencia de neuronas TH+. (*P<0.05, comparado con cultivos tratados con MPP+; #<0.05, comparado con cultivos expuestos a MPP+ y agonistas de GR).

neuroprotector y su facilidad de manipulación (mayor grado de solubilidad).

2.3 La presencia de las neuronas no DA y las células gliales no es esencial para que se produzcan los efectos neuroprotectores de los GCs in vitro

A continuación, se comprobó si el efecto neuroprotector de la DEX podía explicarse por sus efectos represores sobre las células gliales, ya que se podría pensar que GR puede proteger a las neuronas DA gracias a sus potentes efectos antiinflamatorios, mediante la inhibición de moléculas proinflamatorias secretadas por las células gliales, especialmente la microglia (Ros-Bernal et al., 2011; Anexo 1). Como preámbulo, se comprobó la expresión de GR en los tipos celulares de nuestro interés mediante doble-inmunofluorescencia. Así, se detectó la presencia de GR en el núcleo de células microgliales (Iba-1 positivas), astrocitos (GFAP positivas), y neuronas DA (Fig. 19A). La expresión de GR fue verificada además mediante el análisis con inmunoblot, utilizando extractos proteicos provenientes de cultivos mesencefálicos tratados con DEX. Los marcadores de masa molecular, permitieron la identificación de GR a 97 kDa, correspondiente a la masa indicada en la hoja de datos de la casa comercial del anticuerpo (Fig. 19A).

Mediante el estudio de la expresión de marcadores gliales, se comprobó que la DEX ejerce un potente efecto represor sobre las células gliales en división marcadas con vimentina y timidina tritiada, así como sobre las células que expresan el marcador microglial OX-42 (Fig. 19B, C). A una concentración de 10nM, la DEX era ligeramente más eficaz en su efecto de reducir el número de células microgliales (-73%) que en la reducción de la población celular total en división (-65%), representada en su mayor parte por astrocitos y sus precursores (Toullorge et al., 2010) (Fig. 19C).

Para determinar si la presencia y función del GR glial eran requeridas para el efecto neuroprotector ejercido por DEX, se evaluó su efecto en cultivos tratados con el antimitótico

ARA-C ($3\mu\text{M}$) durante todo el periodo del cultivo. Este tratamiento con ARA-C reduce el número de células gliales por debajo del 5% con respecto a los valores normales (Fig. 19C). En estas condiciones de cultivo, se comprobó que la DEX (10nM) sigue ejerciendo su efecto protector sobre las neuronas DA (Fig. 19D), lo cual indica que la glía no es necesaria para la protección de las neuronas DA *in vitro*. Además, se comprobó que el efecto neuroprotector de DEX era abolido en los cultivos tratados con ARA-C cuando eran expuestos al antagonista RU486 (Fig. 19D). Esto sugiere además que la protección es mediada por la acción de los GC sobre el receptor GR neuronal.

Posteriormente, se determinó si la neuroprotección mediada por DEX se producía en una forma autocrina o paracrina, es decir, si la DEX ejercía el efecto directamente sobre las neuronas DA, o si era indirectamente, al inducir la producción de una sustancia diferente por parte de otros tipos neuronales. Para ello, utilizamos la técnica de cultivo condicional, en nuestro caso tratado con ARA-C, para descartar el efecto de las células gliales. En este experimento, el medio de cultivo proveniente de los pocillos control o tratados con DEX (10nM) (pocillos donadores), fue transferido cada 12 horas a los pocillos receptores. Algunos de los pocillos receptores que recibieron medio condicional con DEX procedente de los pocillos donadores, fueron tratados con RU486 ($1\mu\text{M}$), para inhibir los efectos directos de la DEX. Cuando el medio de cultivo de los pocillos donadores era suplementado con DEX y transferido a los pocillos receptores tratados con MPP⁺, la pérdida de neuronas DA causada por la toxina se reducía (Fig. 19E). Para descartar que las células neuronales (de cualquier tipo) presentes en el cultivo pudieran liberar una molécula soluble con efectos protectores sobre las neuronas DA se añadió RU486 en los pocillos receptores y se comprobó que el efecto protector era neutralizado, lo que sugiere que dicho efecto es resultado únicamente de la presencia de DEX transferida en el medio condicional (Fig. 19E) y no de componentes intermedios creados. Estas evidencias apoyan la idea de que los GCs ejercen efectos

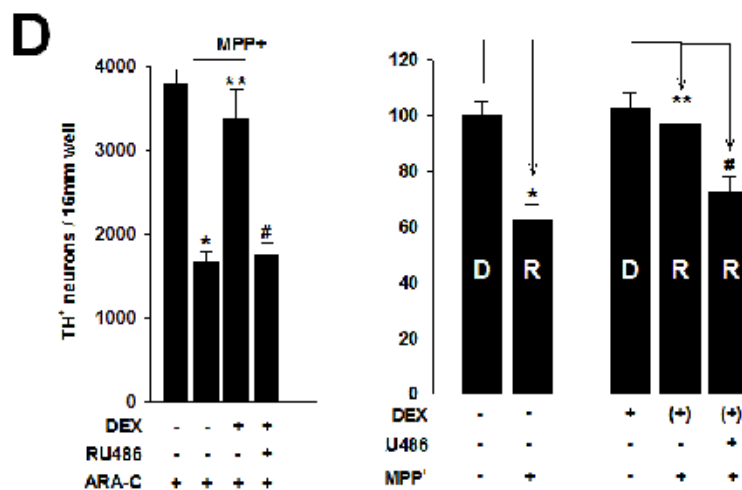
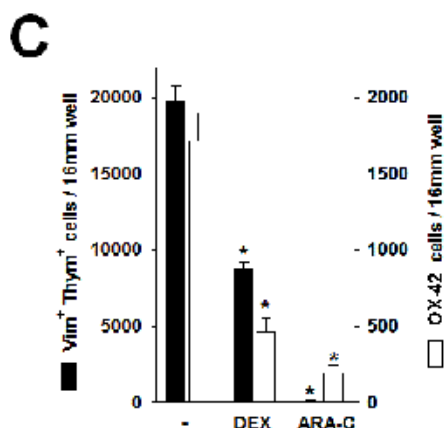
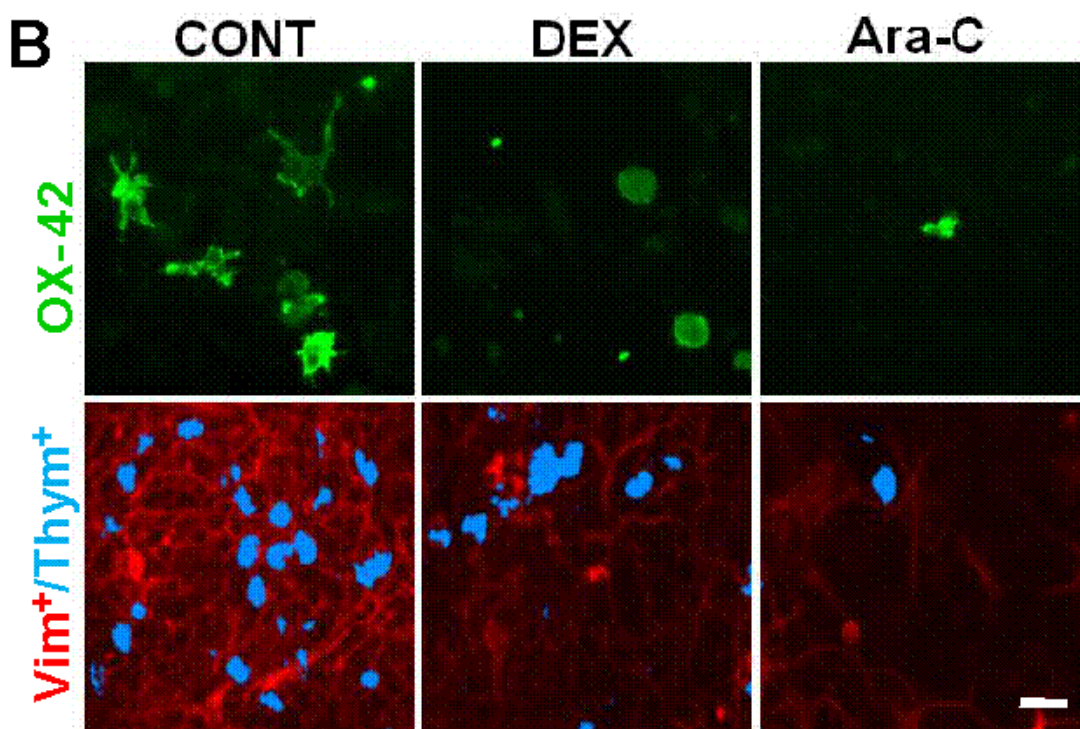
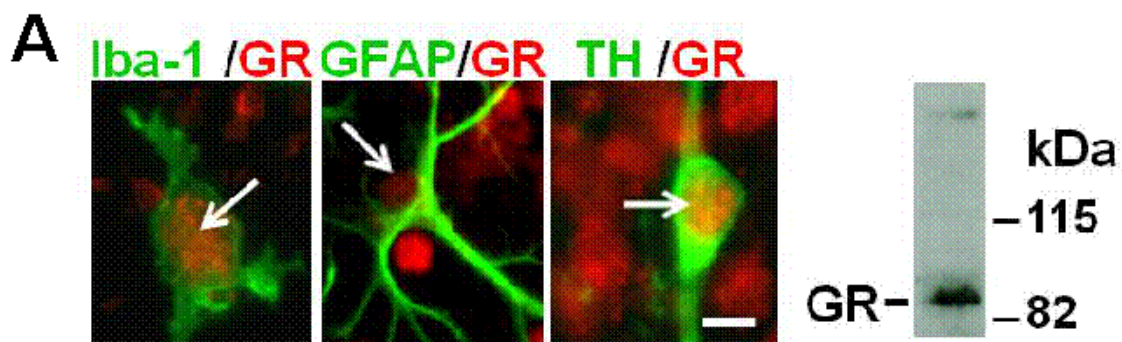


Figura 19. El efecto neuroprotector de los GCs contra la muerte neuronal DA inducida por MPP+ persisten en la ausencia de células gliales. (A) Imágenes de microscopía convencional de fluorescencia mostrando que GR se expresa en neuronas DA (TH+), microglía (Iba1+) y astrogliá (GFAP+). También se muestra la expresión de GR mediante análisis por western-blot de extractos proteicos de cultivos mesencefálicos. (B) Imágenes representativas mostrando microglía (OX-42+) y células gliales en proliferación (Vim+/Thym+) bajo diferentes condiciones de cultivo. Se pueden observar diferencias en el número y morfología de la microglía, así como en el número de células gliales proliferativas. (C) La cuantificación de células Vim+/Thym+ y OX-42+ se llevó a cabo en cultivos control y cultivos tratados con DEX (10nM) o ARA-C (3mM). El tratamiento con ARA-C elimina casi totalmente las poblaciones gliales. (D) Los cultivos tratados con ARA-C, fueron expuestos a MPP+ para inducir neurodegeneración DA. Se observa que los cultivos tratados con DEX desde el DIV4 al DIV10 están parcialmente protegidos del efecto neurotóxico del MPP+ incluso en ausencia de células gliales. Además el efecto neuroprotector es abolido mediante el tratamiento con RU486. (E) El medio condicional obtenido de los cultivos control donadores (D) transferido a los cultivos receptores (R), no interfiere en el efecto neurotóxico del MPP+. El cultivo condicional obtenido de cultivos donadores tratados con 10nM ejerce protección sobre las neuronas DA en los cultivos receptores expuestos a MPP+. El efecto protector es abolido cuando los cultivos receptores son expuestos a RU486 (1mM). ((+): provisto por el medio condicional; *P<0.05 comparado con los cultivos control; #P<0.05 comparado con los cultivos expuestos a MPP+ y DEX; ANOVA de una vía seguido de Dunnett's test). Barra de escala = 10mm para A y 15mm para B.

protectores directamente sobre las neuronas, independientemente de su acción sobre la glía.

2.4 Los GCs, mediante la acción de GR presente en las neuronas DA, previenen la pérdida neuronal DA en ratones intoxicados de forma subcrónica con MPTP

Los resultados precedentes *in vitro*, representan una fuerte evidencia de que los agonistas que se unen y activan a GR en las neuronas DA pueden actuar previniendo la neurotoxicidad producida por MPP⁺. Para determinar si los GCs a través de la activación de GR tienen acciones similares *in vivo*, se realizó un experimento en el que ratones C57BL/6J recibieron bajas dosis de CORT (35 µg/ml) disuelta en el agua de bebida gracias a la adición de β-CD (0.45%, que constituye el vehículo), según el protocolo descrito por David y colaboradores (David et al., 2009). Este tratamiento comenzó al mismo tiempo que la intoxicación subcrónica con MPTP (una inyección de 30mg/kg por día durante 5 días) y terminó el día del sacrificio (7 días después de la última inyección con MPTP) (Fig. 15A).

En los análisis postmortem, se cuantificó el número de neuronas DA remanentes en la SNpc 7 días después de la última inyección con MPTP o salino. Los resultados muestran que el número de neuronas TH positivas en el grupo salino que recibió CORT es similar al del grupo que recibió el vehículo, lo que indica que el tratamiento con CORT no afecta a estas neuronas. También se observó una pérdida significativa en el número de neuronas TH positivas en los grupos tratados con MPTP que no recibieron tratamiento con CORT (Fig. 20A, C). Llamativamente, el grupo intoxicado con MPTP que recibió el tratamiento con CORT presentaba una pérdida neuronal mucho menor de neuronas DA, sugiriendo que CORT ejerce una clara función de neuroprotección contra la neurotoxicidad del MPTP *in vivo* (Fig. 20A, C).

Habiendo sido descrito que los GCs pueden inducir la expresión de TH mediante regulación transcripcional *in vitro* (Goodman et al., 1978), decidimos cuantificar también las

células tironina positivas en le SNpc de todos los grupos, para comprobar si el patrón de pérdida o protección neuronal era similar al presentado por TH (Fig. 20B). Efectivamente, los resultados fueron similares a los encontrados para el marcaje con TH tras la intoxicación con MPTP, ya que se observó un descenso en el número total de células tironina positivas en el grupo tratado con MPTP y no tratado con CORT, mientras que se observó de nuevo el efecto neuroprotector en el grupo tratado con CORT (Fig. 20E). Mediante el uso de esta tinción, que no marca una proteína concreta cuya expresión pueda ser regulada por factores de transcripción, se comprobó que la CORT ejerce un verdadero efecto protector, que no está asociando a la variación de la expresión de TH.

Además, se analizaron los efectos del tratamiento con CORT en las terminaciones nerviosas DA del estriado mediante la medida de la densidad óptica (O.D., de optical density) del marcaje con TH. De forma análoga a la SNpc, los resultados mostraron un descenso de la O.D. significativo en el grupo inyectado con MPTP, indicando una pérdida de fibras DA. En cambio, el grupo MPTP tratado con CORT muestra las fibras DA menos afectadas (Fig. 20A, D).

De la misma forma que se realizaron los análisis en la SNpc de los monos, también se analizó la proporción de neuronas DA que expresan GR en el núcleo en la SNpc de los ratones C57BL/6J, encontrando igualmente que hay una mayor proporción de neuronas DA remanentes que expresan GR en el núcleo después de la intoxicación con MPTP como vimos en los primates. Sin embargo, no existen diferencias significativas en la proporción de neuronas DA-GR positivas entre el grupo intoxicado con MPTP que recibió tratamiento con CORT y el grupo control (Fig.20F).

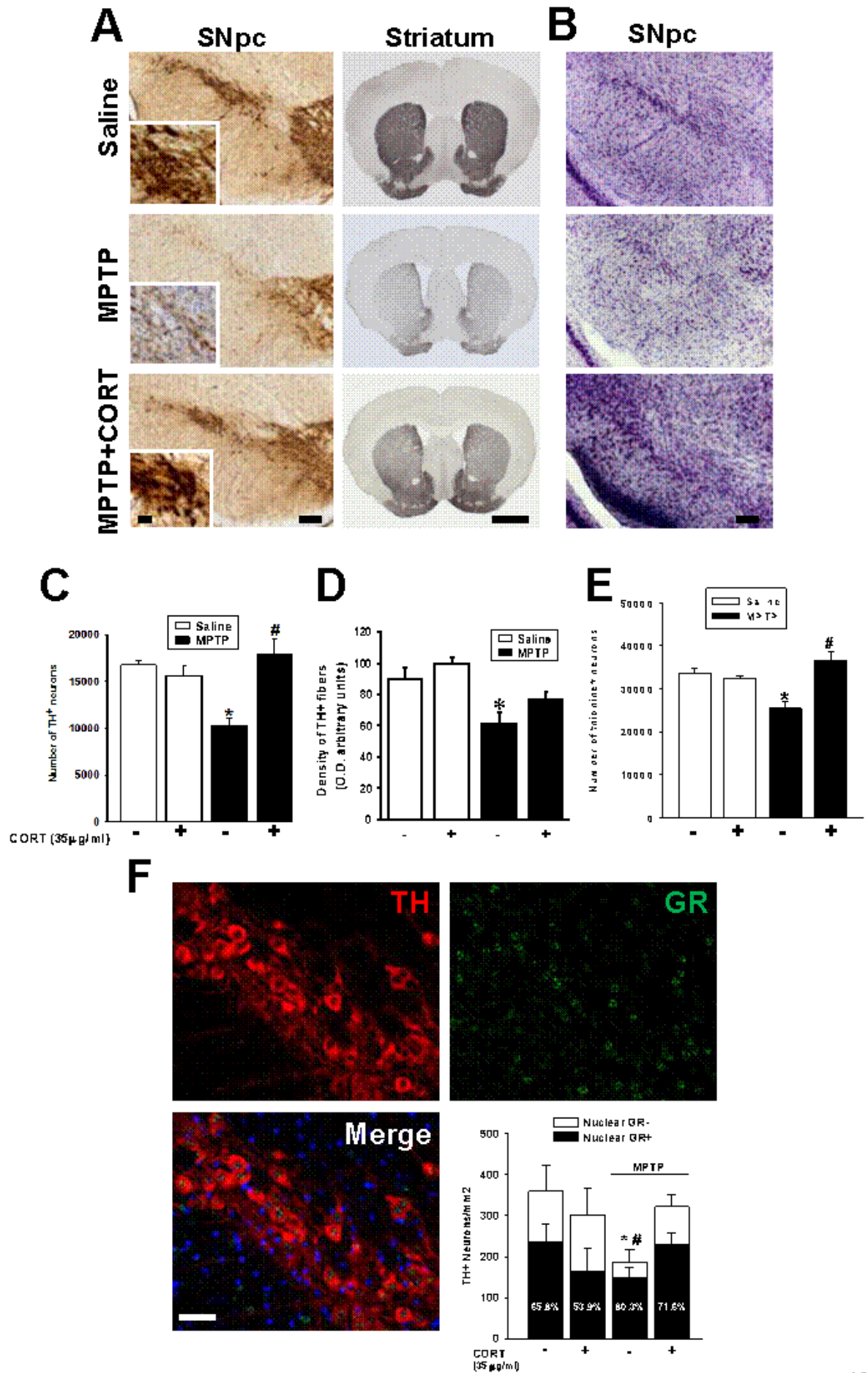


Figura 20. Efecto neuroprotector de los GCs contra la pérdida neuronal DA en ratones C57BL/6J intoxicados con MPTP. (A) Imágenes representativas de la expresión de TH en secciones cerebrales a nivel de la SNpc y el estriado para los diferentes grupos de ratones. (B) Imágenes de secciones a nivel de la SNpc teñidas con tionina. (C) Se observa una pérdida significativa de neuronas TH+ en la SNpc de los ratones inyectados con MPTP. Sin embargo, no se observa este descenso en el grupo MPTP tratado con CORT comparado con sus controles (salino o CORT), lo que indica un efecto neuroprotector de CORT. (D) Se observa una pérdida significativa de fibras DA en el grupo MPTP; sin embargo, están menos afectadas en el grupo MPTP tratado con CORT. (E) La cuantificación de las células tionina positivas muestra el mismo patrón de variación que el de TH (* $P < 0.05$ comparado con el grupo control; # $P < 0.05$ comparado con el grupo MPTP; ANOVA de dos vías seguido de Duncan's test; para C, D y E). (F) Imágenes de doble-inmunofluorescencia para TH y GR de un ratón control obtenidas mediante microscopía confocal. La cuantificación del porcentaje de neuronas DA que expresan GR mostró que las neuronas remanentes tras el tratamiento con MPTP expresan en mayor proporción GR en su núcleo en comparación con el grupo control, lo que refuerza la idea de que la expresión de GR puede ser un factor determinante de la supervivencia de estas neuronas (* $P < 0.05$ número de células TH+ comparado con el grupo control; ANOVA de una vía seguido de Dunnett's test; # $P < 0.05$ número de células TH+/GR+ nuclear comparado con grupo control; T-student test). Barra de escala = $40\mu\text{m}$ en los paneles pequeños, $100\mu\text{m}$ en los paneles izquierdos grandes y 1mm en los paneles derechos grandes A, $100\mu\text{m}$ en B y F.

Los resultados *in vitro* sugirieron que el papel neuroprotector de los GCs sobre la neurodegeneración DA se produce directamente a través del GR de las neuronas DA. Para determinar si los efectos protectores de la CORT *in vivo* están mediados por el GR de las neuronas DA, se replicó el mismo experimento realizado con ratones C57BL/6J, en ratones GR^{DATCre} , que presentan el gen de GR inactivado de forma selectiva en estas neuronas (Turiault et al., 2007). La cuantificación de las células TH positivas en la SNpc, mostró una pérdida neuronal similar en los ratones GR^{DATCre} y sus controles $GR^{loxP/loxP}$ intoxicados con MPTP. Sin embargo, el tratamiento con CORT no tenía ningún efecto protector en los ratones GR^{DATCre} , al contrario que sus controles (Fig. 21A, C). La cuantificación del número de células tiorina positivas en la SNpc de estos ratones mostró un patrón similar al obtenido en la cuantificación de neuronas TH positivas (Fig. 21B, E). Sin embargo, aunque el análisis de la densidad óptica para TH en el estriado mostró una pérdida significativa de fibras DA tras la intoxicación con MPTP, no se demostró protección en los ratones GR^{DATCre} ni en los $GR^{loxP/loxP}$ tratados con CORT, indicando que posiblemente el efecto neuroprotector comienza en los cuerpos celulares y se extiende lentamente y de forma anterógrada hacia las fibras (Fig. 21A, D).

En su conjunto, los resultados obtenidos en estos experimentos demostrarían que el efecto neuroprotector mediado por CORT en ratones tratados subcrónicamente con MPTP, estaría mediado por la activación de GR directamente en las neuronas DA y sería independientemente de la inhibición que pudiese ejercer sobre las células gliales.

La acción de los GCs está determinada por su concentración plasmática entre otros factores. Así, para determinar si el nivel de GCs plasmático estaba afectado en los ratones GR^{DATCre} , o si por el contrario era similar al de los ratones control, se realizaron medidas de CORT en muestras de plasma extraído 1 y 7 días después de la última inyección de MPTP (Fig. 21F). Los resultados muestran niveles cinco veces superiores de CORT en los ratones

GR^{DATCre} y GR^{loxP/loxP} que recibieron tratamiento con CORT independientemente del tratamiento con MPTP, lo que demuestra una contribución exógena de la hormona. También se observó un ligero incremento 1 día después de la última inyección de MPTP en los ratones GR^{DATCre} y GR^{loxP/loxP} intoxicados con MPTP pero no tratados con CORT. Sin embargo, los niveles de CORT se restablecieron a los 7 días, lo que sugiere que el MPTP no induce un aumento sostenido de los niveles de GCs en sangre. Hay que remarcar además que no se observaron diferencias significativas en los niveles de CORT plasmáticos entre ratones GR^{DATCre} y GR^{loxP/loxP} en ningún caso (Fig. 21F).

2.5 Mecanismos de neuroprotección mediados por GR. El efecto de inhibición producido por la dexametasona sobre el transportador de dopamina (DAT) no es suficiente para explicar su función neuroprotectora

Para descartar la posibilidad de que el efecto protector de la DEX se debe al bloqueo de la captación de MPP⁺ por parte de los DAT, se realizaron medidas de recaptación de DA marcada radioactivamente ([³H]-DA) en cultivos expuestos a diferentes concentraciones de DEX o GBR 12909, un potente inhibidor no competitivo del DAT, durante 24 horas antes de la medida de recaptación. Paralelamente, se analizó el efecto de DEX y GBR 12909 en la viabilidad neuronal DA en cultivos intoxicados con MPP⁺. De esta forma, se comprobó que GBR 12909 produce una inhibición de la recaptación de DA dependiente de concentración (Fig. 22). En un rango de concentraciones comprendido entre 1 y 100nM, se observó una correlación entre la inhibición de la recaptación DA y el aumento de la supervivencia DA, tanto para GBR 12909 como para DEX. Sin embargo, las interpolaciones gráficas nos permitieron constatar que a concentraciones similares, DEX ejerce un efecto neuroprotector mayor que GBR12909, produciendo escasa inhibición de la recaptación de DA, lo que sugiere que la inhibición del DAT llevada a cabo por DEX es mínima y no puede explicar el efecto neuroprotector mediado por GR. Además el máximo bloqueo de la captación por parte de

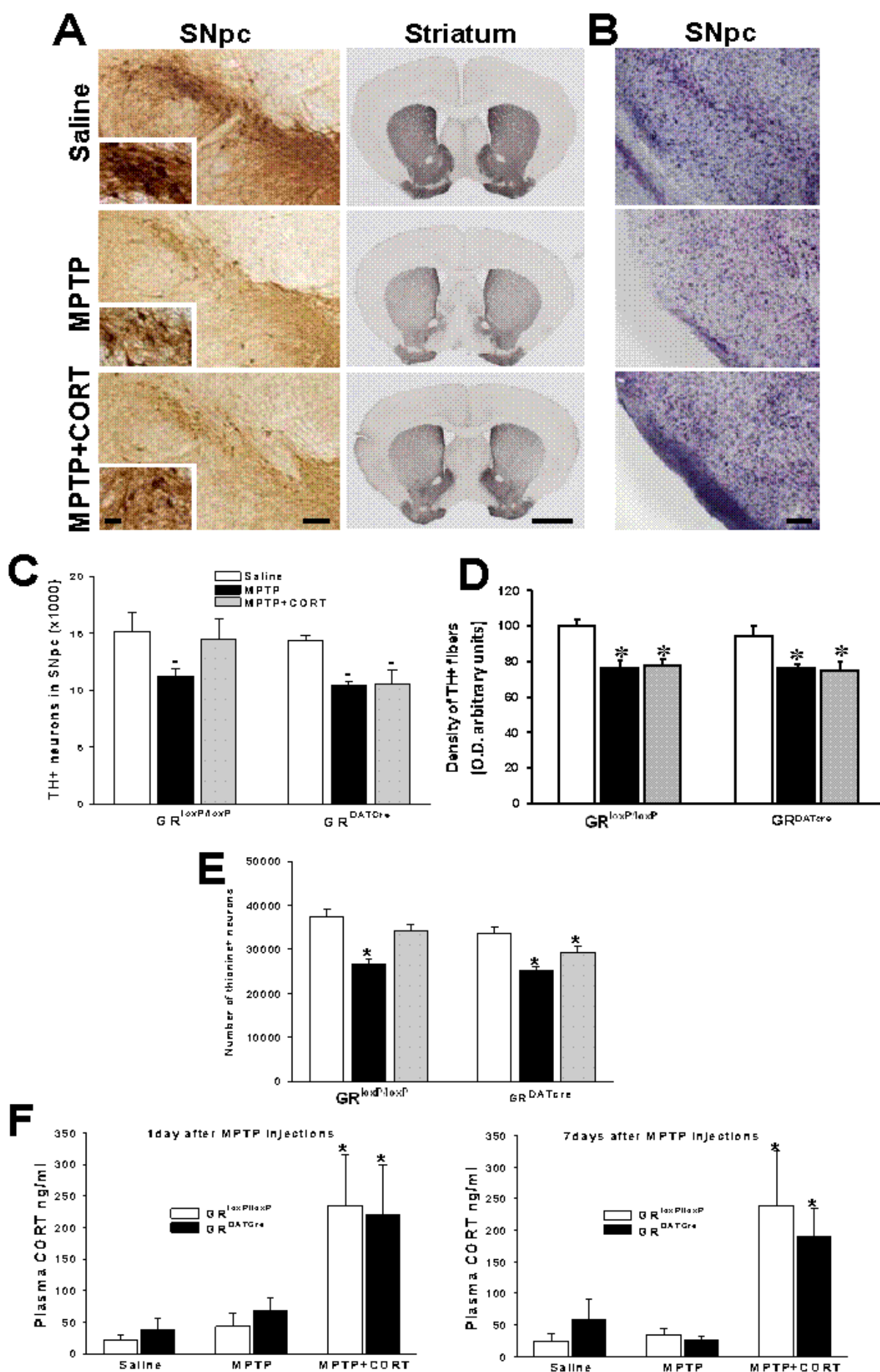


Figura 21. El efecto neuroprotector de los GCs no se observa en ratones GR^{DATCre} parkinsonizados y tratados con CORT. (A) Imágenes representativas de la expresión de TH en secciones cerebrales de ratones GR^{DATCre} para cada grupo experimental, a nivel de la SNpc y el estriado. (B) Imágenes de secciones a nivel de la SNpc teñidas con tiónina. (C) La cuantificación del número de células TH+ en la SNpc muestra una pérdida neuronal DA significativa en la SNpc de los ratones mutantes y control tratados con MPTP. El efecto neuroprotector de la CORT no se observa en los ratones GR^{DATCre} inyectados con MPTP y tratados con CORT. (D) Se observa una pérdida significativa de las fibras DA en los grupos MPTP tanto GR^{DATCre} como GR^{loxP/loxP}. Además, no se observa protección de las fibras DA en los grupos que recibieron CORT. (E) La cuantificación de las células tiónina positivas muestra el mismo patrón de variación que el de TH (*P<0.05 comparado con el grupo control; ANOVA de dos vías seguido de Duncan's test; para C, D y E). (F) La medida de los niveles de CORT 1 y 7 días después del tratamiento con MPTP no muestra diferencias significativas entre los ratones GR^{DATCre} y GR^{loxP/loxP} bajo las diferentes condiciones de tratamiento (*P<0.05 comparado con el grupo control y MPTP; ANOVA de dos vías seguido de Duncan's test). Barra de escala = 40µm en las imágenes insertadas de mayor magnificación en A, 100µm en las imágenes de la columna izquierda en A y 1mm en las imágenes de la columna derecha en A; 100µm en B.

GBR12909 no llega a producir el máximo de protección obtenida por el tratamiento con DEX.

2.6 La neuroprotección mediada por GR ocurre a través de la activación del receptor de rianodina.

Aunque son pocos los trabajos que lo muestran, parece haber indicios de que los GCs puede afectar procesos celulares dependientes de Ca^{2+} de los cuales puede depender la supervivencia neuronal (Bian et al., 1997; Du et al., 2009); por lo que se podría hipotetizar que el GR activo contribuye a la supervivencia de neuronas DA mediante la regulación de procesos dependientes del Ca^{2+} . Además, recientes hallazgos del grupo de trabajo con el cuál hemos realizado los experimentos in vitro expuestos en este capítulo, han demostrado que la movilización de los depósitos de Ca^{2+} del retículo endoplásmico tiene un papel importante en la supervivencia de las neuronas DA en el mismo modelo de parkinsonismo experimental (Guerreiro et al., 2008; Toulorge et al., 2010). Por esta razón, decidimos estudiar la implicación de unos canales de Ca^{2+} presentes en la membrana del RE que permiten la salida de éste al citosol [receptores de rianodina (RyR)¹] en los efectos mediados por DEX a través de GR en los cultivos mesencefálicos. Nuestros resultados mostraron que la inhibición de los canales RyR mediante tratamiento con el inhibidor dantroleno (DANT, 30 μM) evita el efecto neuroprotector de la DEX (Fig. 23A). Lo que indica que los canales RyR están implicados en los mecanismos de acción de GR que median la protección neuronal.

Al mismo tiempo, se realizaron medidas de los niveles de Ca^{2+} citoplasmático ($\text{Ca}^{2+}_{\text{cyl}}$) en cultivos tratados con MPP^+ el DIV 5, en presencia o ausencia de los tratamientos de interés (DEX y DANT). Para este experimento, los cultivos fueron incubados durante 6 horas con

¹ Los receptores de rianodina (RyR) son canales de Ca^{2+} que se encuentran en la membrana del retículo endoplásmico o sarcoplásmico. Junto con los receptores de inositol trifosfato (IP3), regulan la salida de Ca^{2+} almacenado en el retículo hacia el citosol. Su función es particularmente importante para el mantenimiento de la supervivencia neuronal y la correcta contracción del tejido muscular cardíaco. Existen 3 isoformas de este receptor, y aunque todas se expresan en el cerebro, parece que la más abundante es la de tipo 3.

MPP⁺, para detectar el sufrimiento neuronal DA en las primeras fases del proceso de muerte. Además, el MPP⁺ se administró a una concentración de 50 μ M para producir efectos tóxicos y perturbaciones en la homeostasis del calcio que pudiesen ser detectables en todos los tipos neuronales del cultivo. Utilizando estas condiciones experimentales, se comprobó que los niveles de Ca²⁺_{cyt} estaban reducidos un 30% después de las 6 horas de tratamiento con MPP⁺. Cuando se trató el cultivo sólo con DEX o en presencia de MPP⁺, los niveles de Ca²⁺_{cyt} se elevaron por encima de los niveles registrados para los cultivos control. Este efecto fue inhibido por el tratamiento con DANT (Fig. 23B). Estos resultados sugieren que la activación de GR inducida por DEX produce una elevación de Ca²⁺_{cyt} dependiente de la actividad de los canales RyR. Si este efecto resulta en aumentos moderados de los niveles de Ca²⁺_{cyt} conllevaría la protección de las neuronas DA frente a la neurodegeneración inducida por MPTP, de acuerdo con publicaciones previas (Guerreiro et al., 2008).

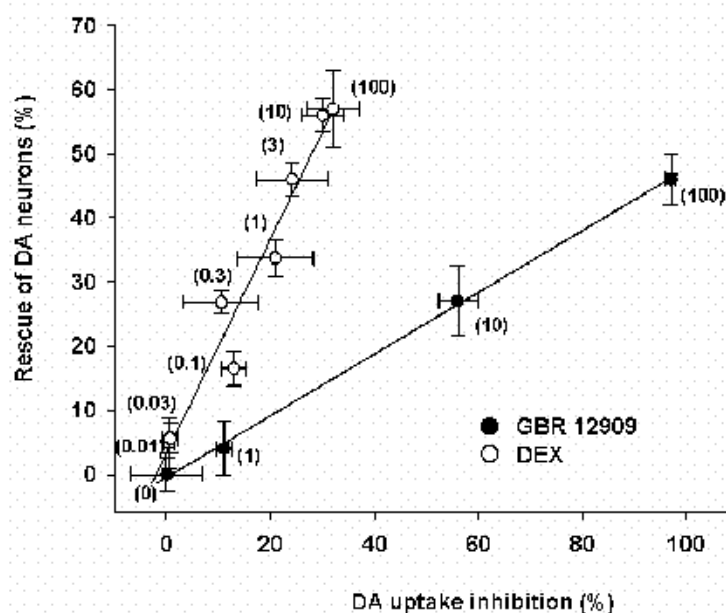


Figura 22. La neuroprotección mediada por GR no se correlaciona con una inhibición del DAT. Representación del efecto en la supervivencia de neuronas TH positivas por parte del inhibidor de DAT (GBR 12909) y de DEX en cultivos tratados con MPTP ($3\mu\text{M}$), representada en contraposición a sus efectos de inhibición sobre la recaptación de dopamina. El uptake de dopamina fue medido el DIV 5 en cultivos tratados con DEX durante el DIV4 de cultivo y la supervivencia neuronal en el DIV 10. Los cultivos fueron expuestos a diferentes concentraciones de DEX desde el DIV 4, y a GBR 12909 justo antes de la medida de recaptación.

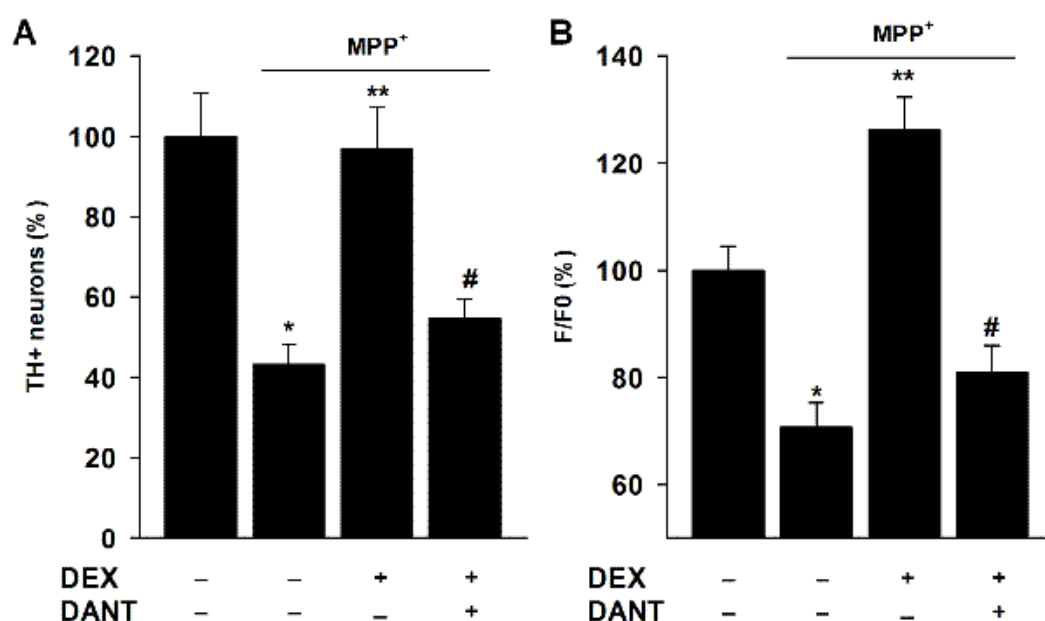


Figura 23. Papel de los canales receptor de rianodina en la neuroprotección mediada por GR. (A) Los efectos neuroprotectores de DEX (10nM) sobre las neuronas DA en cultivos tratados con MPP+ (3 μ M) son abolidos por bloqueo de los canales RyR con el antagonista dantroleno (30 μ M). (B) Representación de los niveles de Ca^{2+}_{cyt} intracelular en cultivos expuestos durante 6 horas a MPP+ (50 μ M), en presencia o ausencia de DEX, aplicada sola o en combinación con dantroleno (DANT). * $P < 0.05$, comparado con grupo control; ** $P < 0.05$ comparado con grupo MPP+; # $P < 0.05$ comparado con grupo MPP+ tratado con DEX.

3. Discusión

Los trabajos experimentales llevados a cabo en este capítulo nos han permitido demostrar que los GCs ejercen un efecto neuroprotector en el parkinsonismo experimental mediante la unión y activación del GR presente en las neuronas DA.

En la actualidad, la implicación del metabolismo de los GCs en la EP no se ha esclarecido y la información de la que disponemos resulta escasa. Trabajos previos han mostrado que los pacientes de EP presentan alteraciones del eje HPA (Bellomo et al., 1991; Charlett et al., 1998; Hartmann et al., 1997; Stypula et al., 1996); sin embargo, la administración de tratamientos con L-DOPA puede influir en las medidas de los niveles de hormonas, como el cortisol, pudiendo obtener resultados no conclusivos (Muller y Muhlack, 2007). Por otra parte, en algunos modelos de parkinsonismo experimental, también se ha descrito una desregulación del eje HPA, así como un aumento en las concentraciones de ACTH y cortisol, concretamente en el plasma de perros semanas después de la administración de MPTP (Hineno et al., 1992; Mizobuchi et al., 1993). Por el contrario, un año después de la administración de MPTP en monos, estos cambios no se detectan, y parecen estar compensados a pesar de que la respuesta inflamatoria local cerebral está aún activa (Barcia et al., 2003). Estas evidencias indican que probablemente el MPTP es capaz de inducir una alteración temprana del metabolismo de GCs, induciendo el aumento de cortisol circulante, que sería capaz de activar el GR neuronal e inducir mecanismos de neuroprotección.

En nuestros resultados, el estudio del patrón de expresión de GR en la SNpc de monos sacrificados tras 2 años de la última inyección con MPTP (Fig. 16C, D), nos ha permitido comprobar que existe un aumento del número de células GR positivas con morfología glial (o células non-neuron like) que estaría en concordancia con el aumento general y ampliamente conocido del número de células gliales en la SNpc que se ha descrito en este modelo y que

apoya la hipótesis de una perpetuación de los procesos inflamatorios en el parkinsonismo (Barcia et al., 2011; Forno et al., 1992; McGeer et al., 2003).

3.1 La expresión de GR en el núcleo de las neuronas DA confiere protección contra la neurodegeneración inducida por MPTP en monos parkinsonizados.

La translocación de GR al núcleo depende de los niveles extracelulares de GCs así como de otros estímulos que activan indirectamente su función (Kitchener et al., 2004; Marchetti et al., 2005). De hecho, el GR puede encontrarse en el núcleo y en el citoplasma tanto en su forma activada como en su forma no activada (Hache et al., 1999). Sin embargo, las formas no inducidas de GR (GR no activado por su ligando) se encuentran principalmente en el citoplasma, mientras que las formas inducidas de GR (activadas por ligando) se concentran principalmente en el núcleo (Beck et al., 2009). La retención en el núcleo de GR está determinada, entre otros factores, por las señales de retención nuclear (NRS) descritas por Carrigan y colaboradores (Carrigan et al., 2007), que contribuyen a inducir su potencial de modulación transcripcional. Considerando así que la detección de GR en el núcleo indica que se encuentra preferiblemente en estado activado, el análisis que hemos realizado sobre la activación de GR en neuronas DA y células gliales en un modelo de parkinsonismo crónico en monos, nos informa si GR tiene funciones directas sobre estos tipos celulares tras la neurodegeneración DA. De hecho, nuestros resultados muestran que 2 años después de la intoxicación con MPTP, existe una mayor proporción de neuronas DA remanentes que expresan GR en el núcleo con respecto al grupo control (Fig. 16F), indicando bien que la neurodegeneración DA activa las funciones de GR en las neuronas DA, y/o que las neuronas que expresan GR en su núcleo son menos susceptibles. Es decir, que la localización y acumulación de GR en el núcleo de algunas de estas neuronas podría estar provocada por la acción del MPTP (Fig. 16E), el cual podría inducir modificaciones en los patrones de

liberación de GCs endógenos promoviendo la activación y translocación de GR a su núcleo (Kitchener et al., 2004). Además la presencia previa de GR activo podría ejercer un efecto protector.

Ya que la distribución y activación de GR puede variar dependiendo de las regiones cerebrales y del estado fisiológico de las células que lo expresan (Sanchez et al., 2000), el hecho de que en la subregión ventrolateral de la SNpc ($\alpha+\beta$), que es más susceptible a la neurodegeneración, se identifique el mayor aumento en la proporción de neuronas DA remanentes con GR nuclear en el grupo parkinsoniano, junto con el hecho de que la ATV en monos controles presente una mayor proporción de este tipo neuronal con GR nuclear (Fig. 16H), sugiere que la activación de GR confiere protección en estas regiones, pudiendo ser considerado como un factor determinante de las diferencias regionales descritas de vulnerabilidad a la neurodegeneración producida por MPTP (Barcia et al., 2004; Herrero et al., 1993b; Hirsch et al., 1988). Este hecho sugiere que el tratamiento con GCs (y activación de GR) en la EP pudiera tener un efecto protector contra la neurodegeneración DA.

Además de las neuronas DA, también hemos querido determinar si la proporción de microglía y astrogía presente en la SNpc de monos variaba tras 2 años de la administración de MPTP. Sin embargo, los resultados no muestran un aumento de la proporción de células gliales que expresan GR en su núcleo, sino una tendencia a su disminución (Fig. 17). Estos resultados son coherentes con trabajos recientes de nuestro grupo, que detectan un aumento de la proporción de microglía que expresa GR nuclear en la SNpc de ratones sólo 3 días después de la intoxicación con MPTP, tendiendo a recuperar valores normales 3 semanas después de la intoxicación con MPTP (Ros-Bernal et al., 2011; Anexo 1). Estos datos sugieren que la activación de GR en la glia se produce en estadios tempranos tras la administración de MPTP,

coincidiendo con el momento de desencadenamiento de la reacción inflamatoria, con el objetivo de controlarla y regularla.

3.2 Los GCs ejercen un efecto protector contra la neurodegeneración inducida por MPTP tanto in vivo como in vitro, mediante un mecanismo que involucra al GR de las neuronas DA

Nuestros resultados en los experimentos realizados con roedores y con cultivos mesencefálicos nos confirman que los GCs protegen a las neuronas DA de la degeneración inducida por MPTP tanto in vivo como in vitro (Fig. 18, 20). La DEX y la CORT ejercen efectos neuroprotectores en cultivos mesencefálicos de forma dosis-dependiente (Fig. 18), en coherencia con estudios previos (Du et al., 2009). In vivo, los efectos neuroprotectores de la CORT son muy evidentes en los cuerpos neuronales dopaminérgicos de la SNpc, pero lo son menos si nos fijamos en las terminaciones nerviosas en el estriado. Este hecho podría explicarse ya que GR ejerce sus efectos principalmente mediante mecanismos transcripcionales, y su efecto protector podría ser iniciado de forma más efectiva a nivel del cuerpo celular sin haber llegado aún a las terminaciones nerviosas (Fig. 20).

Es importante remarcar, que aunque previamente se ha descrito el efecto neuroprotector de los GCs en el parkinsonismo experimental in vivo, los estudios hasta ahora publicados siempre se han focalizado en el papel de los GCs como inhibidores de la activación microglial, y por tanto de la respuesta inflamatoria mediada por estas células (Kurkowska-Jastrzebska et al., 1999; Morale et al., 2004; Ros-Bernal et al., 2011; Sugama et al., 2009). En esta línea, y en concordancia con estudios previos (Ganter et al., 1992; Sabolek et al., 2006; Tanaka et al., 1997), nuestros resultados en cultivos, muestran que el tratamiento con DEX inhibe de forma significativa, aunque no totalmente, la proliferación glial (Fig. 19). Este hecho nos puede llevar a pensar en un efecto neuroprotector de la DEX exclusivamente

por inhibición de la producción de mediadores pro-inflamatorios secretados por la glia. Sin embargo, es importante resaltar que en cultivos en los que la proliferación glial ha sido inhibida prácticamente al completo, mediante el tratamiento con agentes antimitóticos (ARA-C), podemos comprobar que la DEX sigue ejerciendo este efecto protector sobre la neurodegeneración DA inducida por MPP⁺ (Fig. 19D). Además, este efecto es abolido por el tratamiento con el antagonista de GR RU486, lo que indica que el efecto se produce específicamente a través del GR presente en neuronas DA. Asimismo, los experimentos con cultivos condicionales, tratados con ARA-C, muestran que los sobrenadantes de los pocillos donadores, previamente tratados con DEX, aún ejercen un efecto neuroprotector contra el MPP⁺ en los cultivos receptores y su efecto es además abolido por el tratamiento con RU486 (Fig. 19E). Estos resultados indican que la DEX es capaz de inducir neuroprotección directa en las neuronas DA sin la intervención de compuestos intermediarios producidos por otros tipos neuronales. Así, podemos postular que los GCs ejercerían sus efectos neuroprotectores sobre la neurodegeneración DA mediante dos vías: directamente por la activación del GR presente en las neuronas DA y/o indirectamente por inhibición de la inflamación mediada por la microglía (Ros-Bernal et al., 2011; Anexo 1); estas vías no son incompatibles, sino que refuerzan el efecto neuroprotector de GR mediante dos mecanismos diferentes.

Este efecto neuroprotector directo de los GCs mediante la activación del GR de neuronas DA in vivo, lo hemos podido demostrar mediante el uso de ratones con GR eliminado específicamente en las neuronas DA (ratones GR^{DA^{Cre}}). En estos ratones el efecto neuroprotector de la CORT contra la neurodegeneración inducida por MPTP no se produce (Fig. 21), lo que sugiere que la presencia y activación de GR en las neuronas DA debe ser crítica para su supervivencia. La diferencia esencial que existe entre nuestro trabajo y estudios precedentes radica en que los trabajos previos usaron modelos murinos genéticamente modificados para GR, en los que el gen para GR estaba silenciado en todos los tipos celulares,

lo cual hace imposible la discriminación entre los efectos de los GCs sobre cada tipo celular específico (Marchetti et al., 2005; Morale et al., 2004). Sin embargo, en los ratones desarrollados en nuestro equipo, podemos discriminar la función de cada tipo celular por la característica inhibición de GR en tipos celulares específicos. En resultados previos de nuestro equipo, utilizando la línea de ratones GR^{LysMCre} (Ros-Bernal et al., 2011), se observó un mayor nivel de muerte neuronal DA inducida por MPTP en los ratones mutantes respecto a sus controles como consecuencia de la ausencia de GR en la microglia. Sin embargo, nuestros resultados muestran un nivel de muerte neuronal similar en los ratones GR^{DATCre} comparado con sus controles, tanto después de la administración aguda de MPTP (Ros-Bernal et al., 2011) como tras la administración sub-crónica (Fig. 21), lo que sugiere que tanto el GR microglial como el GR dopaminérgico son determinantes de la vulnerabilidad y neuroprotección de las neuronas DA al daño producido por el MPTP. De hecho, nuestros resultados precedentes postulan que la actividad de GR podría estar afectada en pacientes con EP (Ros-Bernal et al., 2011), aunque son necesarios más estudios para delucidar la importancia de los GRs específicos de cada célula en la enfermedad.

En conclusión podemos afirmar que los efectos neuroprotectores mediados por CORT *in vivo* parecen ocurrir a través de la activación de GR en las neuronas DA, independientemente de sus efectos antiinflamatorios y la inhibición de la activación glial producida por los GCs. Podemos sugerir, por tanto, que la inhibición de la activación glial contribuiría también de forma indirecta a la protección de las neuronas DA, inhibiendo la liberación de moléculas pro-inflamatorias y evitando así el daño inflamatorio, en lugar de ejercer una protección directa como lo ejercería el GR en las neuronas DA.

Por otra parte, de forma coherente con los resultados obtenidos en monos, también existe una proporción mayor de neuronas DA remanentes que expresa GR en su núcleo tras la

intoxicación con MPTP en ratones C57Bl/J6 (Fig. 20F). Sorprendentemente, no se hallaron diferencias significativas en la proporción de neuronas DA GR positivas entre el grupo que recibió el tratamiento con CORT y el grupo control, lo que sugiere que probablemente la activación de GR y el efecto protector de los GCs se produzca en estadios tempranos a la intoxicación por MPTP, es decir, cuando éste está ejerciendo sus efectos neurotóxicos, volviendo a sus niveles casi normales de activación tras haber comenzado los mecanismos que conducirán a la protección de las neuronas DA; o bien, quizás es necesario el efecto estresor del MPTP para inducir la activación de GR.

3.3 La inhibición del transportador de dopamina ejercida por GR contribuye de forma marginal a sus efectos neuroprotectores

Tras la demostración del papel neuroprotector de los GCs en diferentes modelos de parkinsonismo a través de un efecto directo del GR presente en las neuronas DA, tratamos de identificar los posibles mecanismos que subyacen a dicho efecto. Principalmente, para descartar que la activación de GR por parte de CORT o DEX pueda conducir a una reducción en los niveles de recaptación de MPP⁺ en las neuronas DA a través del DAT, se realizaron experimentos de medida de la recaptación de DA. Nuestros resultados muestran que la DEX ejerce un escaso efecto de inhibición de la recaptación de DA de forma dosis-dependiente (Fig. 22) (Hill et al., 2010). Además, si comparamos el efecto de inhibición producido por la DEX con el que ejerce GBR 12909 (un potente inhibidor de DAT), podemos comprobar que son necesarias dosis extremadamente altas de DEX (normalmente tóxicas) para obtener una inhibición algo mayor del 30% del DAT que, sin embargo, GBR 12909 es capaz de ejercer a bajas dosis. Este hecho indica que la inhibición que ejerce la DEX sobre el DAT sólo influye de forma marginal en la neuroprotección mediada por GR y por lo tanto deben existir otros mecanismos, independientes del DAT, que expliquen este efecto protector.

3.4 La neuroprotección mediada por GR ocurre a través de la modulación de la homeostasis de Ca^{2+} , gracias a la activación de los canales de rianodina

Las neuronas DA funcionan de forma autónoma, debido en parte a la presencia de canales de Ca^{2+} tipo L en su membrana citoplasmática (Chan et al., 2009). Además, los niveles de Ca^{2+} intracelular se mantienen bajo un control muy fino debido la regulación que ejercen sobre enzimas implicadas en los procesos de apoptosis (Orrenius et al., 2003). De hecho, cualquier modulación o desajuste brusco en la concentración de Ca^{2+} intracelular puede tener un efecto decisivo en la supervivencia de las neuronas DA (Chan et al., 2009). Hoy en día, la hipótesis tradicional que defiende que altas concentraciones de Ca^{2+} en el citoplasma conducen irremediamente a fenómenos apoptóticos, no se acepta totalmente y está siendo revisada. Existen numerosas evidencias que evidencian la implicación decisiva de algunos factores en el desencadenamiento de la apoptosis mediada por Ca^{2+} : i) la importancia del almacenamiento del Ca^{2+} en compartimentos celulares (retículo endoplásmico y mitocondria), ii) el tráfico de Ca^{2+} entre estos compartimentos, y iii) el estrés del retículo endoplásmico (Orrenius et al., 2003; Paschen y Frysen, 2001). Sin embargo, se ha observado que el daño neuronal puede ser inducido por el incremento pero también por el descenso de los niveles citosólicos de Ca^{2+} (Paschen y Frysen, 2001). Aunque no está ampliamente documentado, parece que los GCs pueden influir positiva o negativamente en la función neuronal mediante la afectación de procesos que dependen de Ca^{2+} . Por ejemplo, se ha descrito que la apoptosis inducida por GCs en los timocitos está asociada a un aumento sostenido de los niveles de Ca^{2+} citosólico (Bian et al., 1997; McConkey et al., 1989), debido a la liberación de éste desde el retículo endoplásmico, vía receptor inositol trifosfato (IP3R), un canal de calcio presente en la membrana de esta organela (Khan et al., 1996). Sin embargo, recientes estudios describen efectos opuestos en el contexto de la activación de linfocitos T, dependiendo de la duración del tratamiento con GCs, y además no defienden la participación

de los canales IP3R en estos efectos (Davis et al., 2008; Harr et al., 2009). Por otra parte, otros estudios implican a otro tipo de canal de Ca^{2+} presente en la membrana del retículo endoplasmico, los receptores de rianodina (RyR), en la reprogramación intracelular de Ca^{2+} que puede favorecer la plasticidad neuronal (Ziviani et al., 2011). Esta elevación moderada de los niveles de Ca^{2+} citosólico vía RyR está mediada por un tratamiento con nicotina, cafeína y productos derivados, y puede ejercer un efecto neuroprotector en cultivos en los que ocurre una muerte neuronal DA selectiva (Guerreiro et al., 2008). Sin embargo, los efectos de los GCs sobre estos receptores RyR eran hasta la fecha desconocidos. Nuestros resultados muestran que el tratamiento con GCs ejerce un efecto sobre la homeostasis del Ca^{2+} en las neuronas, resultando en una elevación moderada de los niveles de Ca^{2+} citosólico en presencia de MPP⁺ in vitro. Este aumento de Ca^{2+} ocurre vía RyR y resulta precisamente en un efecto neuroprotector sobre las neuronas DA (Fig. 23).

Como conclusión de este capítulo, podemos afirmar que los GCs, a través de la activación de GR ejercen un efecto neuroprotector directamente sobre las neuronas DA en modelos de parkinsonismo. Este proceso de activación de GR en las neuronas DA, confiere neuroprotección directa a través de la modulación de Ca^{2+} a través de los canales de RyR en el retículo endoplásmico.

3.5 Usos clínicos de los GCs. Nuevas direcciones terapéuticas

Muy frecuentemente se recurre al tratamiento con GCs exógenos debido principalmente a sus efectos inmunosupresores y a su fuerte potencial antiinflamatorio. Así, por ejemplo, se utilizan en el tratamiento de enfermedades como la artritis reumatoide, asma, enfermedad de Crohn, colitis, eczemas y psoriasis, lupus eritematoso y esclerosis múltiple. Además, se utilizan para evitar el rechazo de órganos transplantados, en el tratamiento de quimioterapéutico de ciertos tumores y para reestablecer un equilibrio en las insuficiencias

suprarrenal primaria (enfermedad de Adisson) o secundaria (hiperplasia suprarrenal congénita) (Berlin, 2010; De Bosscher y Haegeman, 2009).

Sin embargo, su uso en clínica se ve comprometido debido a la aparición de un amplio abanico de efectos secundarios, debido fundamentalmente a la capacidad del GR (activado por GCs) de modular la expresión de genes implicados en el metabolismo de los azúcares, proteínas, grasas, músculo y hueso (como vimos en la revisión bibliográfica). En este contexto, algunos de los efectos secundarios que pueden padecerse por consecuencia de tratamientos prolongados y con dosis elevadas de GCs son trastornos asociados con un desequilibrio en la actividad del eje HPA, como desarrollo de diabetes, hipertensión, miopatías, y de forma más frecuente osteoporosis, obesidad centrípeta, retraso del crecimiento normal en niños, alteración de la cicatrización de heridas y riesgo de infección elevado, entre otros (Smoak y Cidlowski, 2008). Estos efectos secundarios pueden entenderse como respuestas fisiológicas que llegan a ser extremas, como consecuencia de altas concentraciones de GCs sintéticos (más potentes que los naturales) en el organismo o largos periodos de tratamiento (Clark, 2007). Principalmente la aparición de estos efectos secundarios es atribuida a mecanismos de transactivación de GR (De Bosscher y Haegeman, 2009; Schacke et al., 2002), aunque en menor medida también pueden originarse como consecuencia de mecanismos de transrepresión o combinación de ambos (Beck et al., 2009).

Durante la última década, la investigación en este campo ha apostado por la producción de agonistas selectivos de GR o GCs disociados, capaces de favorecer los mecanismos de transrepresión en detrimento de los mecanismos de transactivación. El propósito era conseguir agentes terapéuticos que ejerciesen los efectos antiinflamatorios e inmunosupresores disminuyendo los efectos secundarios (Beck et al., 2009; Berlin, 2010; Clark, 2007). Esta idea se basa en las observaciones obtenidas a partir de ratones GR^{dim}, cuyo GR es incapaz de

formar dímeros, perturbando la transactivación de ciertos genes que presentan sitios GRE, pero sin afectar los efectos antiinflamatorios mediados por la represión de AP-1 o NF- κ B (Reichardt et al., 2001). Sin embargo, considerando la complejidad de las rutas reguladas por GR es difícil imaginar que pueda desarrollarse un modulador exógeno de GR que desarrolle una función específica sin presentar efectos en otros sistemas. De hecho, estudios más recientes en esta línea de ratones muestran que, aunque en menor grado, siguen presentando efectos secundarios en respuesta a GCs, ya que no todos estos efectos están controlados por el mecanismo de transactivación clásico (De Bosscher y Haegeman, 2009; Kleiman y Tuckermann, 2007). Estos trabajos han hecho reflexionar sobre nuevas ideas para la búsqueda de estrategias terapéuticas mediante el uso de GCs, como son la confección de nuevos agonistas o moduladores disociados, la combinación de distintos compuestos antiinflamatorios (para obtener efectos antiinflamatorios similares, utilizando dosis más bajas), el uso de microARN para modular la transcripción de GR y el uso de drogas con efectos epigenéticos sobre GR (Beck et al., 2009). En esta línea, y teniendo en cuenta nuestros resultados, el uso de inductores de la liberación de GCs endógenos, y más recomendablemente, el diseño de moduladores exógenos específicos para el GR presente en las neuronas DA podría constituir una potencial vía terapéutica para el tratamiento de la EP.

Capítulo 2

*“Estudio de las acciones del receptor de glucocorticoides en los procesos de inflamación
agudos en el sistema nervioso central”*

Aunque existe amplia literatura sobre las acciones de los GCs a través de GR (GCs-GR) en la reacción inflamatoria mediada por las células inmunes periféricas, está menos dilucidado cómo controlan los procesos inflamatorios en el SNC.

El uso de ratones transgénicos con el GR inactivado de forma específica en las células inmunes del SNC, nos permite determinar el nivel de implicación de estas células en la regulación de la respuesta inflamatoria por medio de las acciones de GR.

En este capítulo hemos utilizado la línea de ratones $GR^{LysMCre}$ que presenta GR inactivado en la microglía. Así, hemos podido caracterizar la respuesta inflamatoria y el daño tisular inducido por una inyección intraparenquimal de LPS, comparándola con la desarrollada en ratones silvestres. Al mismo tiempo hemos contribuido al estudio del papel de GR en diferentes funciones microgliales como la motilidad, proliferación y diferenciación celular a estados activos.

1. Materiales y métodos

1.1 Procedimientos experimentales para los estudios realizados con animales

1.1.1 Ratones GR^{LysMCre} (con GR bloqueado en la microglía)

Los ratones GR^{LysMCre} fueron generados gracias al cruzamiento de los ratones GR^{loxP/loxP} (Tronche et al., 1999) con la línea de ratones transgénicos LysMCre, que expresan la recombinasa Cre bajo el control del promotor de la lisozima M (Clausen et al., 1999). La línea de ratones GR^{LysMCre} era congénita a los ratones C57BL/6J al comienzo de los experimentos, y fue mantenida por apareamientos de machos mutantes GR^{LysMCre} con hembras GR^{loxP/loxP}. Para distinguir si los ratones obtenidos eran o no mutantes (GR^{LysMCre}) se realizaron de forma habitual genotipajes mediante la técnica de Dot-Blot, determinando si el individuo portaba el gen Cre (mutantes) o no (controles). Esta técnica fue corroborada en todos los casos con PCR convencional para determinar la presencia del gen Cre. El ADN para ambas técnicas se extrajo de una pequeña porción de la cola de los individuos como ha sido descrito previamente (De Gendt et al., 2004; Raskin et al., 2009). La ausencia de GR en las células microgliales de los ratones GR^{LysMCre} se corroboró antes de comenzar nuestros experimentos mediante doble-inmunofluorescencia para GR y F4/80, así como con western blot para GR a partir de cultivos microgliales extraídos de estos ratones (Fig.24).

Para la realización de los experimentos se utilizaron ratones macho con edad comprendida entre 12 y 16 semanas, que fueron mantenidos en pequeños grupos en el animalario, bajo un fotoperiodo controlado y estable (ciclos de 12 horas luz-oscuridad), y a temperatura constante de 22°C. Los animales no tenían restringido el acceso a comida y agua. Todos los experimentos se llevaron a cabo teniendo en cuenta las normas europeas para la protección de animales de experimentación de la declaración de Helsinki y la Guidelines of

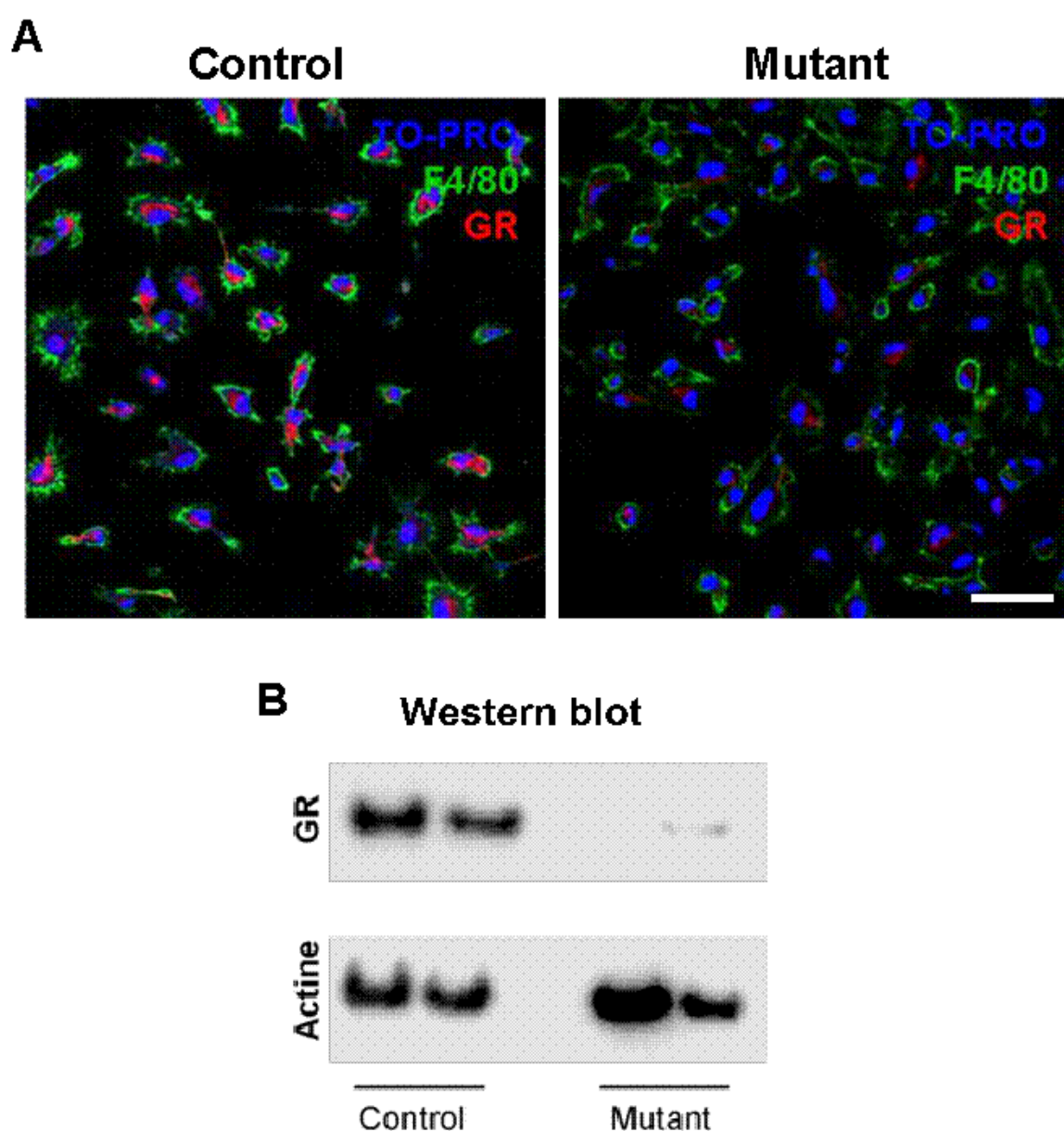


Figura 24. Los ratones $GR^{LysMCre}$ presentan ausencia selectiva de GR en la microglía. (A) La doble inmunofluorescencia para GR y F4/80 (marcador microglial) sobre cultivos primarios de microglía extraída del cortex de neonatos $GR^{loxP/loxP}$ (control) o $GR^{LysMCre}$ (mutante), muestra la ausencia de GR en las células microgliales de los mutantes. Barra=20 μ m. B. Análisis por western-blot de la proteína GR en dos animales control y 2 animales mutantes, utilizando como control de carga la proteína actina.

the European Convention for the protection of Vertebrate Animals used for Experimental y other scientific purposes (Council of Europe of 2006). Los grupos experimentales para los distintos experimentos estaban formados por 4 o 5 ratones mutantes o control (Tabla 1).

1.1.2 Cirugía estereotáxica y tratamientos con RU486 y BrdU

Para realizar la cirugía esterotáxica, los animales fueron anestesiados mediante inyección intraperitoneal (i.p.) de tribromoetanol (avertina) en una dosis de 0.5mg/g. A continuación, el cuero cabelludo fue rasurado y, una vez fijado el animal en el marco estereotáctico, se realizó una incisión en la piel para visualizar el cráneo, se determinó el punto de inyección superficial y se realizó un pequeño orificio con un microtaladro (DREMEL® 300 Series). Las coordenadas utilizadas para alcanzar el estriado derecho respecto a bregma fueron: +1.3 mm anteroposterior, +2 mm lateral y -2.9 mm dorsoventral de acuerdo con el atlas de Paxinos (Paxinos y Franklin, 2001). Los ratones recibieron una inyección intraparenquimal de 1µl de volumen conteniendo 1.5µg de lipopolisacárido (LPS) (*Escherichia coli*, serotype 055:B5; Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France) o vehículo (salino) para los grupos control; para ello se utilizó una microjeringa Halminton de 10µl de volumen total.

Los grupos que recibieron el antagonista de GR RU486 fueron inyectados i.p. 16 horas antes de la inyección esterotáxica de LPS. Se utilizó una dosis de 30mg/Kg de RU486 o 100µl de DMSO como vehículo.

Los animales utilizados para los estudios de proliferación glial, fueron inyectados i.p. durante 3 días con 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU; ref: HPLC, Sigma-5002), recibiendo una


Experimentos 	Grupos GR ^{loxP/loxP}	Grupos GR ^{LysMCre}	n por grupo
1. Inyección estx. LPS + estudio inmunocitoquímico (FJB, CV, LFB)	1	1	5
2. Inyección estx. LPS + medida niveles plasmáticos de CORT	1	1	4
3. Pre-inyección RU486 + inyección estx. LPS + estudio inmunocitoquímico (FJB, CV, LFB)	1	1	4
4. Pre-tratamiento BrdU + inyección estx. LPS + estudio inmunocitoquímico (Iba-1; F4/80-GR; GFAP-GR)	1	1	5
5. Inyección estx. LPS + estudios qPCR (6 y 24 horas)	2	2	4
6. Estrés crónico + estudio inmunocitoquímico (Iba-1) y medida niveles plasmáticos de CORT	1	1	5
7. Estrés crónico + inyección estx. LPS + estudio inmunocitoquímico (FJB)	1	1	5
Abreviaturas: estx., estereotáxica; LPS, lipopolisacárido; FJB, FluoroJade B; CV, cresil violeta; LFB, Luxol Fast Blue; CORT, corticosterona			

Tabla 1. Experimentos in vivo y grupos experimentales utilizados en los estudios correspondientes al capítulo 2. En la tabla se especifica cuántos grupos se utilizaron para cada experimento, el número de animales por cada grupo y el genotipo de los mismos.

dosis diaria de 50mg/kg en tampón PBS². La primera inyección se realizó el día de la cirugía estereotáxica.

1.1.3 Modelos de estrés

El protocolo de estrés utilizado constituye una variante del modelo descrito por de Pablos y colaboradores (de Pablos et al., 2006). Según este protocolo, los animales de los grupos de estrés, fueron sometidos a un paradigma que combinaba diferentes condiciones estresantes durante 6 días antes de la inyección intraparenquimal con LPS o de la extracción de sangre. En la tabla de la Fig.30 se especifican los estresores utilizados (deprivación de comida y agua, uso de jaulas sucias o desorientadas y restricción de espacio a temperatura ambiente o a 4°C), así como la duración de cada uno. Para la restricción de espacio, el ratón se ubicó en un tubo de plástico de 21x6 cm de tamaño, tapado (para que no pudiera moverse), pero con brechas para permitir la respiración. Los agentes estresantes se aplicaron a diferentes horas del día para minimizar la predictibilidad.

1.1.4 Determinación de los niveles de CORT en plasma

La determinación de los niveles basales de CORT se utilizó como índice del grado de estrés del animal. Un día después de la realización del protocolo de estrés, dos grupos de animales fueron utilizados para los estudios de cirugía estereotáxica y otros dos grupos para la extracción de sangre por decapitación, siempre entre las 7a.m. y las 9a.m.. A partir de la sangre se obtuvo el plasma por centrifugación (una primera vez a 1600g, 4°C durante 10 minutos, y una segunda vez a 2600g, 4°C durante 15 minutos) y se conservó a -80°C hasta su análisis. Los niveles de CORT fueron determinados mediante radioinmunoensayo (RIA) (kit ImmunoChen™ Corticosterone- MP Biomedicals, Orangeburg, NY, USA).

² El BrdU es un nucleósido sintético, análogo de la timidina, que se incorpora al ADN sintetizado de novo y por tanto sirve como marcador de células en proliferación.

1.1.5 Obtención de las muestras de tejido cerebral y realización de tinciones específicas

Tres días después de la inyección estereotáxica de LPS, los animales fueron anestesiados con CO₂ y perfundidos con PBS seguido de PFA al 4% (como se explica en la sección 1.1.2.4 del capítulo 1). A continuación, el cerebro fue cuidadosamente extraído, post-fijado durante 48 horas en PFA al 4% y conservado en PBS 0.1M con acida sódica 0.1%. Los cerebros fueron cortados en su totalidad en secciones coronales rostrocaudales de 30µm de grosor, utilizando un vibratomo (Leica VT1000 S). Estas secciones fueron conservadas a 4°C en PBS con acida sódica 0.1% hasta su procesamiento.

Las secciones a nivel de la lesión fueron marcadas con las siguientes tinciones histoquímicas o inmunohistoquímicas:

- Tinción con Luxol-Fast-Blue (LFB). Para teñir las fibras miélicas las secciones fueron lavadas en etanol al 70% durante 10 minutos e introducidas en una solución compuesta por 1% de Luxol Fast Blue, etanol al 95% y ácido acético al 0.05%, durante 6 horas a 56°C; posteriormente fueron lavadas en etanol al 95%, carbonato de litio al 5% (durante 30 minutos) y etanol al 70%.
- Tinción de cresil-violeta. Para el estudio de la citoarquitectura de las células nerviosas y gliales, las secciones fueron teñidas con una solución compuesta por cresil violeta (Merck) al 0.5% más ácido acético 0.3%, durante 2-5 minutos (controlando el viraje al microscopio). Posteriormente fueron deshidratadas.
- Tinción con FluoroJadeB (Histo-Chem Inc., P.O. Box 183, Jefferson, AR 72079, USA). Para evidenciar neuronas en proceso degenerativo se realizó la técnica específica de FluoroJadeB. Esta técnica se basa en el protocolo de (Schmued et al., 1997). Las secciones fijadas fueron montadas en portas gelatinizados y secadas en

la estufa a 45°C. El tejido totalmente seco se bañó en etanol 100% (3 minutos), etanol 70% (1 minuto) y agua destilada (1 minuto). Posteriormente se introdujo en permanganato potásico al 0.06% durante 15 minutos en agitación, se lavó en agua destilada y se incubó durante 30 minutos en solución FluoroJadeB (0.001% de FluoroJadeB en ácido acético 0.1% a partir de una solución stock al 0.01% de FluoroJadeB). Después las secciones fueron lavadas en agua destilada tres veces (1 minuto cada vez), secadas en la estufa y lavadas en xilol antes de cubrir las con el medio de montaje. Esta tinción es fluorescente y tiene su pico de emisión a 550 nm.

- **Inmunohistoquímica.** Para la tinción inmunohistoquímica para evidenciar la microglía, las secciones fueron lavadas en PBS, tratadas con H₂O₂ al 0.3% durante 15 min y con suero de cabra (Sigma-Aldrich) al 4% en PBST (PBS con 0.3% de Tritón X-100) durante 1 hora, para bloquear los posibles marcajes inespecíficos. Posteriormente, las secciones fueron incubadas con el anticuerpo primario policlonal de conejo anti-Iba-1 (Wako, Neuss, Germany), a una concentración de 1:750 en PBS con suero de cabra al 1%, 0.5% Triton X-100 y 0.01% de acida sódica, durante 48 horas en agitación y a 4°C. A continuación, las secciones fueron lavadas 3 veces con PBS e incubadas durante 4 horas con un anticuerpo secundario biotinilado anti-conejo (1:500; Vector Laboratories). La unión del anticuerpo secundario fue detectada mediante el sistema avidina-biotina peroxidasa (kit ABC, Vectastain de Vector Laboratories), mediante la incubación con solución AB durante 3 horas y el revelado con diaminobenzidina (DAB; Peroxidase Substrate Kit; Vector Laboratories). Finalmente, las secciones fueron montadas en portas gelatinizados, deshidratadas utilizando etanol a concentración

creciente (50%-70%-80%-95%-100%), delipidadas en xilol y cubiertas con medio de montaje (Eukitt; Labolan).

- **Immunofluorescencia.** Análogamente a la inmunohistoquímica no fluorescente, las secciones fueron lavadas en PBS y tratadas con suero de cabra (Sigma-Aldrich) al 4% en PBS-T (PBS con 0.3% de Tritón X-100) durante 1 hora, para bloquear los posibles marcajes inespecíficos. Posteriormente, las secciones fueron incubadas con los anticuerpos primarios adecuados durante 48 horas (a 4°C y en agitación): anticuerpo primario policlonal de conejo anti-GFAP (1:1000; Sigma-Aldrich) para el marcaje de astrocitos, o anticuerpo primario de rata policlonal anti-F4/80 (concentración 1:400; Serotec, Oxford) para el marcaje de microglía efectora. Seguidamente, fueron incubadas con anticuerpos secundarios marcados con fluorocromos que permiten su detección mediante microscopía de fluorescencia. Los anticuerpos utilizados fueron: anti IgG de conejo conjugado con cianina-3 (CY3, 1:500, Vector Lab) y Alexa 488 (1:1000, Molecular Probes) respectivamente.

Para el estudio de la proliferación glial, se realizó doble inmunofluorescencia con un anticuerpo anti-BrdU sobre las secciones ya marcadas para GFAP o F4/80. Para ello, estas secciones fueron lavadas con PBS y tratadas con ácido clorhídrico 2N a 37°C durante 30 minutos para desnaturalizar el ADN, seguido de tampón borato 0.1M (pH 8.5) durante 10 minutos, para neutralizar el ácido. Posteriormente y tras lavar con PBS-T 0.1%, el tejido fue bloqueado con gelatina al 0.25% en PBS-T 0.1% durante 1 hora e incubado con anticuerpo primario de rata monoclonal anti-BrdU [1:200; BUI (ICRI), Immunological Direct] durante 48h, a 4°C y en agitación. Finalmente, las secciones fueron lavadas con PBS-T e incubadas con los correspondientes anticuerpos secundarios: para la doble-inmunofluorescencia

GFAP-BrdU, las secciones fueron incubadas durante 4 horas con anti-rata conjugado con Alexa 488 (1:400, Molecular Probes); mientras que para el marcaje F4/80-BrdU, las secciones fueron incubadas 4 horas con anticuerpo anti-rata biotinilado (1:500; Vector), lavadas con PBS e incubadas con Streptavidin-Alexa Fluor 546 (1:500; Molecular Probes).

1.1.6 Análisis microscópico: microscopia convencional, de fluorescencia y confocal

El volumen de lesión en el estriado fue determinado mediante el análisis de cinco secciones seriadas a nivel del estriado marcadas con tinción de cresil violeta o Luxol Fast Blue. Para su análisis, se utilizó un microscopio óptico (Nikon) y las herramientas de estereología proporcionadas por el software de análisis de imagen Mercator (Explora Nova, La Rochelle, France), siguiendo el método de Cavalieri. La cuantificación de neuronas FluoroJadeB positivas se realizó mediante el mismo microscopio y software, pero utilizando los filtros de fluorescencia. El resultado se expresó como número de neuronas FluoroJadeB positivas por sección.

Los marcajes con doble-inmunofluorescencia fueron analizados utilizando un microscopio confocal TCS SP2 Leica. Se estableció un rango de series para cada sección al determinar un límite superior y un límite inferior utilizando el eje de posición Z/Y, obteniendo una imagen espacial configurada por una serie o stack de sub-imágenes. El número de células doble positivas fue contado para cada stack, a través de cada sección óptica y descartando las células doble positivas contadas en la sección óptica precedente. Para esta cuantificación se utilizó el software LCS Lite (Leica). Las imágenes mostradas en las figuras pueden ser ilustradas como secciones ópticas simples (de 0.5 μ m de grosor) o como transparencia del stack conformado por una imagen de planos superpuestos.

1.1.7 Análisis por PCR cuantitativa (qPCR)

Se realizaron RT-PCR cuantitativas (reverse transcriptase PCR), ya que el material utilizado fue ADN complementario (ADNc), sintetizado a partir de ARN extraído de tejido. Para ello, 6 ó 24 horas tras la inyección esterotáxica de LPS, el cerebro de los ratones fue rápidamente extraído y la región estriatal fue diseccionada mediante punching. Todo el proceso se realizó en condiciones de temperatura entre -5 y -10°C y en condiciones de esterilidad. El tejido fue conservado en tubos RNase free con solución estabilizante de RNA RNA Later (Qiagen®) en hielo. A continuación, el tejido fue triturado en una solución Qiazol (Qiagen®) con la ayuda de un homogenizador (Ultra-turrax®). La extracción de ARN se realizó siguiendo el protocolo del kit comercial RNeasy lipid mini kit (Qiagen®); su integridad y concentración fueron determinadas mediante el perfil de migración en pocillo utilizando chips para RNA (RN Nano LabChip®, Agilent Technologies). El RIN (RNA integrity number) se situó entre 8 y 9 como valor medio para el total de las muestras. Posteriormente, se utilizó 1µg de ARN para sintetizar el ADNc mediante transcripción inversa, utilizando la enzima super-transcriptasa III (InVitrogen Superscript III). Finalmente, se prepararon soluciones stock de 2ng/µl de ADNc para su amplificación mediante qPCR. Las reacciones fueron optimizadas para un volumen final de 20µl, con 2 µl de cDNA y la mezcla de reacción conteniendo SYBR Green master mix (AB, Foster City, CA), oligonucleótidos (directo y reverso) y agua DNase, RNase Free (MP Biomedicals) hasta completar el volumen final de la reacción. Se utilizó un termociclador para PCR a tiempo real (Applied Biosystem Inc). Se realizaron triplicados de cada muestra y se utilizó la media de los valores Ct (threshold cycle) para el cálculo de la cantidad relativa del producto amplificado, mediante el software qBaseplus. El gen para la hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (HPRT) se utilizó como control interno, también llamado housekeeping gene. Los genes analizados

fueron: $TNF\alpha$, $proIL-1\beta$, iNOS, COX-2, procaspasa-1, procaspasa-4, TLR-4, MyD88, todos ellos implicados en los procesos inflamatorios. Los experimentos fueron realizados por triplicado.

1.2 Procedimientos experimentales para los estudios *in vitro*

1.2.1 Establecimiento de cultivos celulares de microglía

La técnica que se utilizó se basa en el protocolo descrito por el grupo de Calvo y colaboradores (Calvo et al., 2005; Meme et al., 2006). Los cultivos primarios se establecieron a partir del cortex extraído de ratones $GR^{LysMCre}$ o $GR^{loxP/loxP}$ neonatos (P1 o P2), con la ayuda de instrumental esterilizado. Tras la disociación y homogenización del tejido (usando pipetas Pasteur de vidrio), las células fueron sembradas en placas de cultivo de 10cm de diámetro (NUNC, Polylabo, Strasbourg, France), que habían sido preincubadas con poliornitina (1.5mg/ml) para facilitar la adhesión celular. Se utilizó una densidad de 0.3×10^6 cells/ml para el sembrado, en medio esencial Dulbecco modificado (DMEM; D5523 Sigma-Aldrich), suplementado con penicilina/streptavidina (Gibco), bicarbonato sódico (Sigma-Aldrich) y enriquecido con un 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (FCS, Abcys, Paris, France). El medio de cultivo fue renovado los días 1 y 3 tras el establecimiento del mismo. En este tipo de cultivo, las células microgliales proliferan y se localizan por encima de los astrocitos que quedan fuertemente adheridos a la placa. Para establecer cultivos de microglía exclusivamente, en el día 12 de cultivo se procedió a su separación y recolección mediante fuerte agitación de las placas (durante 40 minutos), traspaso a tubos falcon de 15 ml y centrifugación de los mismos a 1000rpm, a 4°C, durante 15 minutos. Posteriormente, fueron re-sembradas en nuevas placas de 12 pocillos (preincubadas con poliornitina), en medio DMEM enriquecido con suero FCS al 4%.

La videomicroscopía comenzó 90 minutos después de la incubación a 37°C de los nuevos cultivos puros de microglía. En este momento las células fueron expuestas a distintos agentes: LPS (100 ng/ml), ATP 50 μ M y ATP oxidado (ox-ATP) 300 μ M (Sigma-Aldrich). El tiempo de grabación del cultivo fue de 10 ó 15 horas, y se capturaron imágenes cada 10 minutos, utilizando un microscopio Leica DM IRBE conectado a una cámara. Durante el periodo de grabación, las placas se mantuvieron recubiertas por una cámara que mantenía constantes las condiciones de temperatura (37°C) y de concentración de CO₂ (0.5%).

1.2.2 Análisis por qPCR

Para los estudios de expresión de citocinas y otra moléculas involucradas en los procesos inflamatorios mediante análisis con qPCR, los cultivos de microglía fueron tratados con 100 ng/ml de LPS y/o dexametasona 5 μ M (DEX, Sigma-Aldrich) durante 1 hora. Tras este tiempo, se reemplazó el medio de cultivo por medio fresco DMEM con 4% de suero FCS. Tras 1 hora se retiró el medio para proceder a la recolección de las células con la ayuda de la solución RTL, procedente del kit RNeasy Mini Kit (Qiagen®), y las muestras fueron conservadas a -80°C, hasta la posterior extracción del ARN utilizando el citado kit. A partir de aquí, los pasos seguidos para la realización de los análisis de qPCR coinciden con los expuestos en la sección 1.1.6 de este capítulo.

1.3 Análisis estadísticos

Los resultados están expresados como medias \pm SEM. El criterio utilizado para elegir los distintos test estadísticos fue determinado por el tipo de comparación requerida y el número de factores presentes en los experimentos. El test t Student's se llevó a cabo para experimentos en los que se requerían comparaciones simples entre dos grupos. El test ANOVA de una vía, seguido por el test post-hoc Dunnett's test, se utilizó para los

experimentos que requerían múltiples comparaciones contra un grupo de referencia. Finalmente, el test ANOVA de dos vías, seguido del test post-hoc Duncan's test, se utilizó para los experimentos en los que se comparaban dos factores. La hipótesis nula fue rechazada con un riesgo de 5%. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante el software SigmaStat 3.5 (Copyright 2005 SYSTAT Software).

2. Resultados

2.1 La ausencia de GR en la microglia agrava la lesión causada por la inyección intraparenquimal de LPS

Con el objetivo de estudiar el papel de GR en la respuesta inflamatoria en el SNC, se utilizó el modelo de inflamación local por inyección esterotáxica con LPS en el estriado de ratones GR^{loxP/loxP} (ratones control) y GR^{LysMCre} (ratones mutantes). Inicialmente, se examinó la lesión del tejido tras la inyección. Para ello, se recurrió a la tinción de cresil violeta que permite estudiar la citoarquitectura celular y determinar las zonas de daño tisular. Los resultados muestran que tres días después de la inyección con salino, el volumen de la lesión resulta mínimo tanto en los ratones GR^{loxP/loxP} como en los GR^{LysMCre} (Fig. 25A), sin embargo, el daño aumenta proporcionalmente con la dosis de LPS inyectada (1.5 mg/ml y 5 mg/ml), siendo este aumento significativo en los ratones mutantes con respecto a los controles, lo que sugiere que la presencia de GR en la microglía es importante para prevenir los daños tisulares. Las imágenes muestran que la inyección de LPS provoca daños celulares alrededor de la trayectoria seguida por la aguja, afectando tanto al cortex como al estriado (Fig. 25A).

Igualmente, se analizó el nivel de daño neuronal que causa este modelo de inflamación en nuestros ratones. Para determinarlo, se realizó la cuantificación del número de neuronas FluoroJadeB positivas en el área de la lesión (Fig. 25B). Los resultados revelan que tres días

después de la inyección, el LPS induce un efecto neurodegenerativo en los ratones GR^{LysMCre} pero no en los ratones GR^{loxP/loxP}. Sin embargo, siete días después de la inyección, el número de células FluoroJadeB positivas en los ratones mutantes desciende hasta niveles similares a los ratones control, lo que conduce a pensar que las neuronas dañadas han podido degenerar completamente o bien parte de ellas ha podido recuperarse (Fig. 25B). El hecho de que los ratones GR^{LysMCre} muestren una lesión agravada tras la inyección intraparenquimal de LPS sugiere que el GR microglial debe tener un papel importante en la regulación de la respuesta inflamatoria en el SNC y el subsecuente daño neuronal causado por la inflamación aguda.

Como algunos estudios muestran que los procesos inflamatorios en el cerebro conllevan una desmielinización de fibras axonales (Nadeau y Rivest, 2003), para verificar la implicación del GR microglial en este tipo de alteraciones, se llevó a cabo la tinción con LFB que pone de manifiesto las fibras mielínicas en azul, mientras que las desmielinizadas quedan blancas (Fig. 25C). Mediante esta tinción se detectaron principios de desmielinización en el cuerpo calloso (sustancia blanca), observando mayores niveles de desmielinización en los ratones GR^{LysMCre} que en los GR^{loxP/loxP}. Igualmente, se observó un aumento del volumen afectado proporcional a la dosis de LPS utilizada. Estos resultados sugieren que el GR microglial juega un papel importante en la protección de las fibras axonales en los procesos de desmielinización que ocurren durante la inflamación.

Finalmente, se sabe que cuando ocurre una reacción inflamatoria, se induce la liberación de GCs desde las glándulas adrenales por activación del eje HPA, con el objetivo de controlar el proceso de inflamación (Nadeau y Rivest, 2002). Así, la medida de los niveles plasmáticos de CORT es indicativa del estado de estrés de los ratones. Esta medida se realizó tres días después de la inyección intraparenquimal de LPS y reveló un aumento en los niveles de CORT tanto para los ratones GR^{LysMCre} como para los GR^{loxP/loxP}, sin diferencias

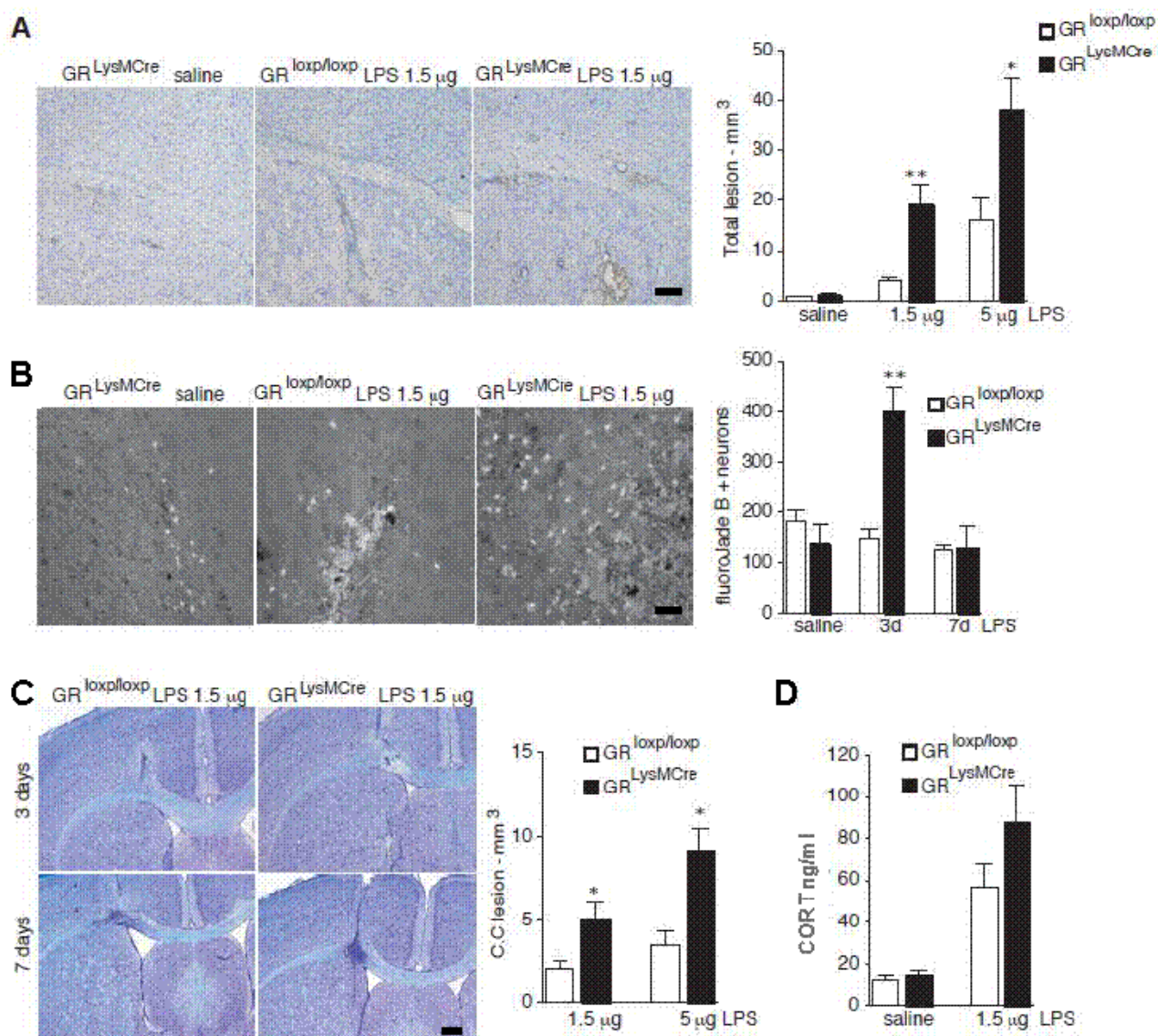


Figure 25. La ausencia de GR microglial exacerba el daño causado por una inyección de LPS intraparenquimal en ratones GR^{LysMCre}. (A) Imágenes representativas de tinción cresil violeta después de 3 días de la inyección de 1.5μg/μl LPS o salino. El volumen de la lesión es mayor en los ratones GR^{LysMCre} en una forma dosis-dependiente. (B) Imágenes representativas de marcaje con FluoroJade B en el cortex de ratones inyectados con 1.5μg/μl LPS o salino, después de 3 días de la inyección. La cuantificación del número de neuronas en proceso degenerativo muestra que el LPS induce daño neuronal en los ratones GR^{LysMCre} mientras que los controles no se ven afectados. (C) Imágenes representativas de marcaje con LFB después de 3 y 7 días de la inyección con LPS. Se observa desmielinización en el cuerpo calloso 3 días después, sin embargo, la agregación celular que se produce en los sitios de la lesión tras 7 días sugiere que podría producirse un proceso reparador. D. Niveles plasmáticos de CORT 3 días después de la inyección. ** $p \leq 0.02$, * $p \leq 0.05$ ratones GR^{loxP/loxP} respecto a GR^{LysMCre}. Barra de escala = 100μm.

significativas entre ellos, lo que muestra que no existe una desregulación en el proceso de activación y función del eje HPA por ausencia de GR en la microglía (Fig. 25D).

2.2 El pretratamiento con RU486 agrava la lesión inducida por la inyección intraparenquimal de LPS tanto en ratones GR^{LysMCre} como en GR^{loxP/loxP}

Trabajos anteriores han descrito que un pretratamiento con RU486, antagonista de GR, agrava la inflamación producida por LPS en el SNC (Nadeau y Rivest, 2003) sin embargo, el grado de participación de cada tipo celular en estos procesos es desconocido. Para determinar si el GR presente en otros tipos celulares distintos a la microglia está implicado en la regulación de la respuesta inflamatoria, se realizó un experimento en el cual ratones control y mutantes fueron pretratados con RU486 (inyección i.p. de 30mg/kg) disuelto en DMSO, 16 horas antes de la inyección intraparenquimal de LPS. Los resultados obtenidos muestran un mayor volumen de lesión (visualizada con tinción cresil violeta) en los ratones control y mutantes pretratados con RU486 respecto a los que recibieron vehículo (DMSO) (Fig. 26A). Además, la lesión es mayor en los ratones GR^{LysMCre} respecto a los GR^{loxP/loxP}, tres días después de la inyección con LPS. Aunque los ratones GR^{LysMCre} pretratados con DMSO presentan un importante volumen de lesión, resulta significativamente mayor cuando GR se bloquea con RU486. Resultados similares se observan tanto al analizar el volumen de lesión como de desmielinización mediante tinción con LFB (Fig. 26 B). El hecho de que el grado de lesión sea mayor en los ratones GR^{LysMCre} pretratados con RU486 que en los pretratados con DMSO, sugiere que el GR presente en otros tipos celulares implicados en la inflamación es también importante en la regulación de la respuesta inmune.

En cuanto a los procesos de daño neuronal, los resultados muestran un aumento de células FluoroJadeB positivas en los ratones mutantes, como se apuntó en la sección anterior (Fig. 25B, 26C); sin embargo, los ratones control pretratados con RU486 muestran también

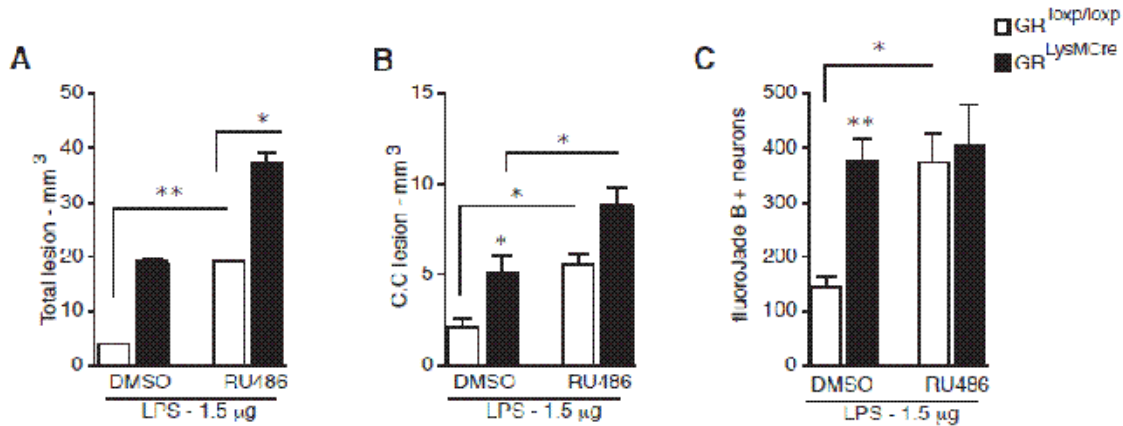


Figura 26. Los efectos del pretratamiento con RU486 sobre el daño producido por una inyección intraparenquimal de LPS sugieren un papel del GR de otros tipos celulares distintos a la microglía. Ratones GR^{loxP/loxP} y GR^{lysMCre} recibieron una inyección i.p. De RU486 o DMSO (vehículo) 16 horas antes de la inyección con LPS. (A) El volumen de la lesión fue determinado en secciones teñidas con cresil violeta, 3 días después de la inyección de LPS, mostrando una agravación en los ratones GR^{lysMCre} que recibieron tratamiento con RU486 en comparación con los que recibieron tratamiento con el vehículo y con los controles. (B) La desmielinización en el cuerpo calloso analizada mediante tinción con LFB también resultó mayor en los ratones GR^{loxP/loxP} y GR^{lysMCre} pretratados con RU486. (C) Los ratones GR^{lysMCre} presentaron un mayor número de neuronas en proceso degenerativo en el cortex (marcadas con FluoroJade B) respecto a los ratones GR^{loxP/loxP}, sin embargo no se detectaron diferencias entre los dos grupos pretratados con RU486. ** $p \leq 0.02$, * $p \leq 0.05$ ratones GR^{loxP/loxP} respecto a GR^{lysMCre}.

un aumento significativo al igual que ocurre con los ratones mutantes pretratados o no con RU486(Fig. 26C). Esto significa que aunque RU486 bloquee el GR de otros tipos celulares, se obtiene el mismo tipo de respuesta que eliminando sólo la acción de GR en la microglía, lo que supone un papel preponderante de la microglía en este tipo de alteraciones.

2.3 Papel del GR microglial en la proliferación y activación glial tras la inyección intraparenquimal de LPS

La reacción inflamatoria en el SNC se caracteriza, entre otras cosas, por una activación microglial y astrogliar. Algunos estudios muestran que el GR puede tener un efecto en la proliferación y activación de este tipo de poblaciones celulares (Tanaka et al., 1997). Para determinar si el GR microglial está implicado en estos procesos, se analizó la astrogliosis y microgliosis en ratones control y mutantes, a través de marcaje de GFAP y F4/80 respectivamente, en las zonas afectadas por la inyección de LPS tres días después de la misma. Los análisis muestran un aumento significativo de la superficie cubierta por microglia activa en ratones GR^{LysMCre} respecto a los GR^{loxP/loxP} e igualmente la astrogliosis muestra una tendencia a incrementar (Fig. 27B). Se observaron mayores niveles de microgliosis que de astrogliosis, siempre en el lado ipsilateral a la lesión y no así en el contralateral a la misma. El área ocupada por la glia activada incluye las zonas afectadas por la trayectoria de la aguja (cortex y estriado) (Fig. 27A, C). La cuantificación del porcentaje de células gliales que incorporan BrdU en su núcleo muestra un aumento de células microgliales F4/80-BrdU doble positivas en los ratones GR^{LysMCre}, lo que sugiere que el GR microglial podría estar implicado en la regulación de la proliferación de este tipo celular. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la proliferación astrogliar entre ambos grupos (Fig. 27D).

2.4 La ausencia de GR microglial implica cambios en el patrón de expresión de genes relacionados con la inflamación tanto *in vivo* como *in vitro*

En el contexto de un proceso inflamatorio en el cerebro, la microglía activada va a liberar citocinas ($\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ o COX-2) y otras moléculas, como caspasas proinflamatorias u óxido nítrico, que contribuyen a la amplificación de la reacción inflamatoria (Nguyen et al., 2002). Con el objetivo de determinar si los efectos deletéreos en la supervivencia neuronal y los daños axonales producidos por la inyección intraparenquimal de LPS están relacionados con cambios en la expresión de genes inflamatorios, se analizaron los niveles de expresión de genes proinflamatorios en el estriado ipsilateral a la inyección de LPS, tras 6 y 24 horas de la misma. Los resultados muestran un marcado incremento en los niveles de expresión de pro- $\text{IL-1}\beta$ y COX-2 tras 6 y 24 horas en los animales mutantes respecto a los controles; esta diferencia también se observa en los niveles de expresión de $\text{TNF}\alpha$, resultando significativa 24 horas después de la inyección de LPS (Fig. 28A). La medida de expresión de óxido nítrico se realizó indirectamente por determinación de los niveles de expresión de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). Los resultados muestran una rápida inducción de su expresión 6 horas después de la inyección de LPS en ratones $\text{GR}^{\text{LysMCre}}$; el nivel desciende hasta valores similares a los ratones control 24 horas después de la inyección (Fig. 28A). En conclusión, los valores de ARNm de genes proinflamatorios están incrementados en ratones $\text{GR}^{\text{LysMCre}}$ respecto a los $\text{GR}^{\text{loxP/loxP}}$ en el área de la lesión. Además de este aumento en los niveles de genes inflamatorios que se sabe están modulados por GR, se detectaron aumentos en los niveles de expresión de otras moléculas involucradas en la inflamación como la procaspasa 1 y 4 (Martinon y Tschopp, 2007), incrementadas 24 horas después de la inyección; y dos miembros de la vía del TLR4: el propio receptor TLR4 y la proteína adaptadora MyD88, cuyos niveles se encuentran aumentados tanto 6 como 24 horas después de la inyección (Fig. 28B).

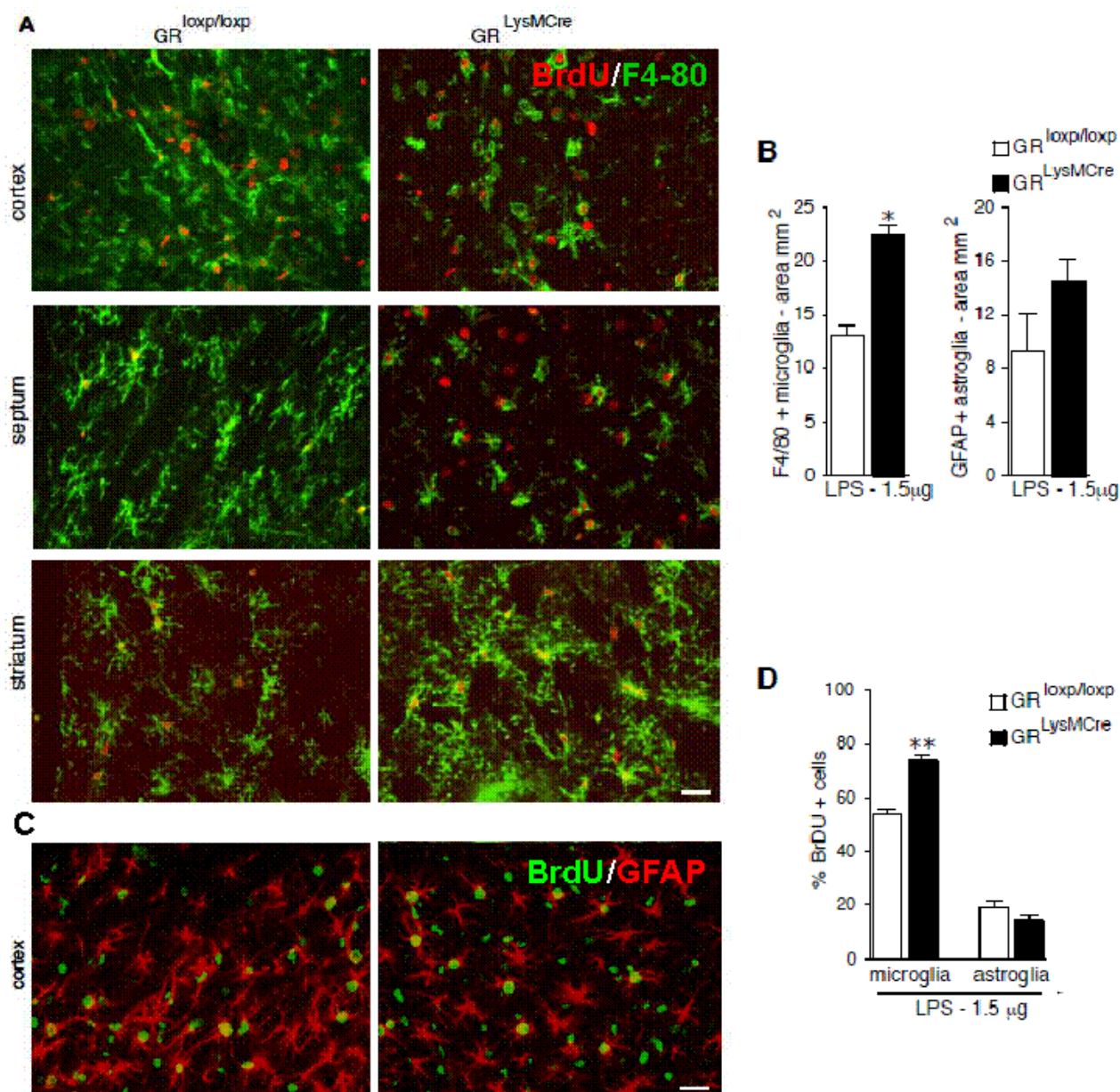


Figura 27. Efectos del GR microglial sobre la activación y proliferación glial producida por la inyección intraparenquimal de LPS. En el lado ipsilateral a la inyección de LPS se observó una activación microglial y astroglial. (A) Imágenes representativas de microscopía confocal mostrando doble-inmunofluorescencia para F4/80 y BrdU en el cortex, septum y estriado del lado ipsilateral a la inyección. BrdU se detecta incorporado en muchas de las células microgliales tanto en ratones GR^{LysMCre} como en controles. (B) Se observó un incremento del área cubierta por microglía y astroglía reactiva en los niveles de la lesión para los ratones GR^{LysMCre} respecto a los GR^{LoxP/LoxP}, 3 días después de la inyección con LPS. Este análisis se realizó sobre secciones procesadas con inmunohistoquímica para F4/80 y GFAP reveladas mediante DAB. (C) Imágenes representativas de microscopía confocal mostrando doble-inmunofluorescencia para GFAP y BrdU en el cortex. (D) La cuantificación de las células doble positivas F4/80-BrdU y GFAP-BrdU mostró un incremento de la proliferación microglial en los ratones mutantes con respecto a los controles. * $p \leq 0.05$ ratones GR^{LysMCre} respecto a GR^{LoxP/LoxP}. Barra de escala= 20mm.

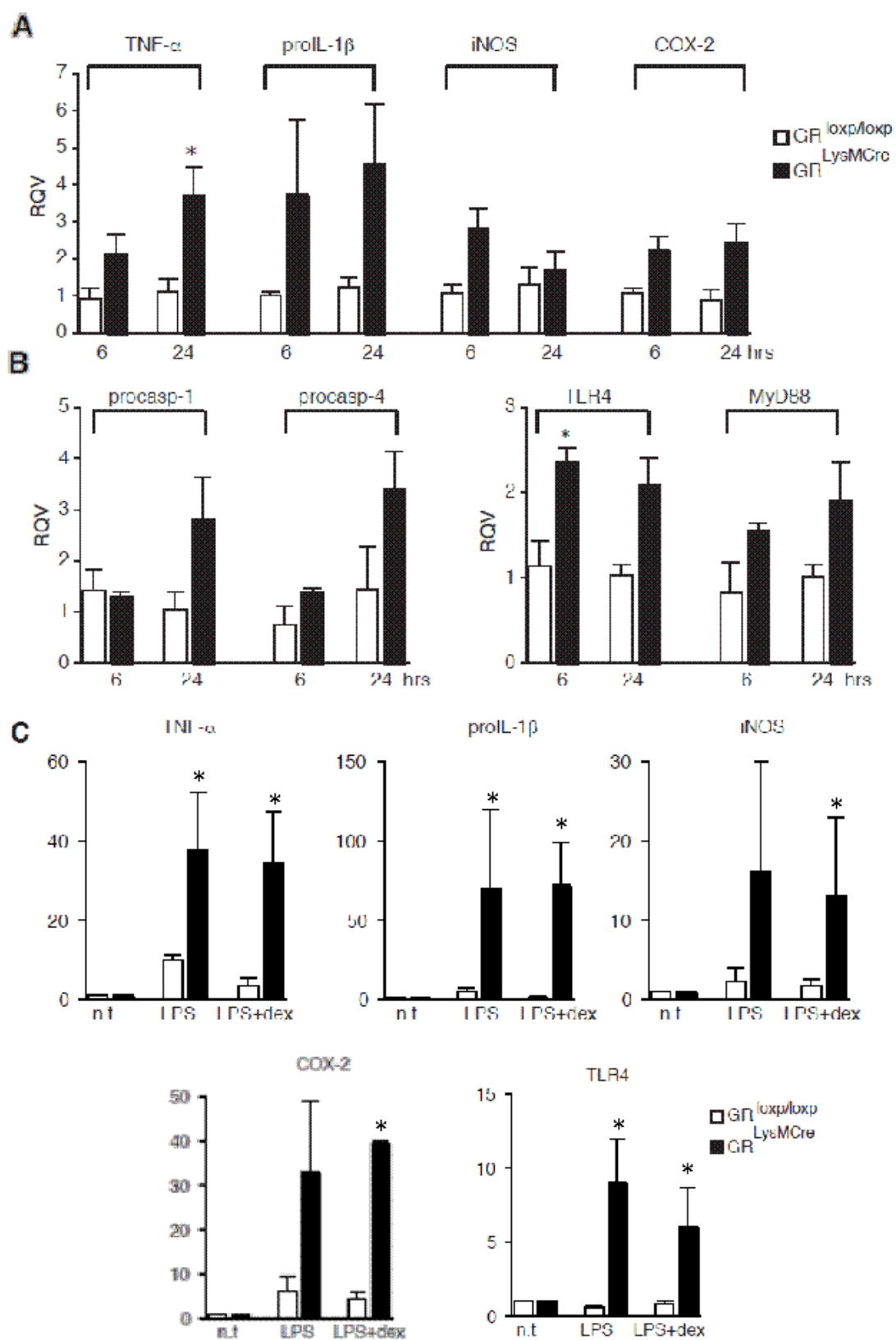


Figura 28. La ausencia de GR microglial conlleva cambios en el patrón de expresión de genes relacionados con los procesos inflamatorios tanto in vivo como in vitro. (A,B) Los niveles de mRNA que codifican proteínas inflamatorias, fueron analizados mediante qPCR, observándose un incremento en los ratones GR^{LysMCre} con respecto a los GR^{loxP/loxP}. El mRNA fue extraído de la región de la lesión tras 6 y 24 horas de la inyección de LP S. Algunos genes para los cuales no se conocía su regulación por GR fueron analizados (procaspasas 1 y 4, TLR4). (C) Los niveles de mRNA que codifican proteínas inflamatorias extraídos de cultivos establecidos a partir de ratones neonatos GR^{LysMCre} y GR^{loxP/loxP} también fueron analizados. De forma similar, se detectó un aumento en la expresión de estos genes en los cultivos GR^{LysMCre} con respecto a los GR^{loxP/loxP} tras la exposición a LPS. Además, el tratamiento con DEX afectó la inducción de genes proinflamatorios en los cultivos control pero no en los mutantes. * $p \leq 0.05$ ratones o cultivos GR^{loxP/loxP} respecto a GR^{LysMCre}.

Tras el análisis realizado a partir del tejido de ratones mutantes y control inyectados con LPS, quisimos verificar el efecto de la ausencia de GR en la expresión de algunas de estas moléculas en cultivos primarios de microglía extraídos a partir de ratones neonatos (P1). Igualmente, los resultados muestran un aumento pronunciado en los niveles de expresión de TNF α , pro-IL-1 β , iNOS y COX-2, así como TLR4 en cultivos microgliales procedentes de ratones GR^{LysMCre} con respecto a los cultivos procedentes de ratones control (Fig.28C). Remarcablemente, este aumento no es inhibido en cultivos microgliales procedentes de ratones mutantes por la exposición a DEX; sin embargo, sí se observa un cierto efecto de inhibición en los cultivos controles, sobre todo para TNF α , pro-IL-1 β (Fig. 28C). Esto sugiere un papel crucial del GR microglial en el control de los factores inflamatorios. Tanto los resultados in vivo como in vitro indican también que el GR microglial ejerce un papel importante en la regulación específica de la vía molecular de TLR4 activada por LPS.

2.5 Estudios in vitro revelan que la microglía desprovista de GR presenta una motilidad reducida y una tendencia a la morfología ameboide

Los continuos cambios conformacionales de la microglía están en función de su estado de activación y/o vigilancia, y le permiten un movimiento continuo. Para determinar si GR está implicado en la regulación de esta propiedades de la microglía, se analizaron las trayectorias de células microgliales individuales, a través de imágenes de videomicroscopía

tomadas de cultivos establecidos a partir del cortex de neonatos $GR^{loxP/loxP}$ o $GR^{LysMCre}$. Las imágenes fueron tomadas cada 10 min durante 10-15 horas y analizadas utilizando el software ImageJ. Además, los cultivos fueron tratados con el LPS (100ng/ml), ATP (50 μ M) u ox-ATP (300 μ M; un inhibidor del ATP que afecta la motilidad normal de la célula) (Fig. 29A). Los resultados muestran que las células mutantes son significativamente menos móviles que las provenientes de ratones control (Fig. 29A, B). El movimiento de las células $GR^{loxP/loxP}$ es dependiente de ATP, ya que el tratamiento con el inhibidor ox-ATP reduce significativamente su motilidad, mientras que los cultivos $GR^{LysMCre}$ no se afectan. (Fig.29B).

Las células microgliales cambian constantemente su tamaño y forma desde formas tubulares unipolares, bipolares o tripolares hasta formas ameboides típica de macrófagos. La cuantificación de las imágenes de videomicroscopía muestra una mayor proporción de células con morfología ameboide en los cultivos mutantes respecto a los controles tras el tratamiento con 100ng/ml de LPS (Fig. 29C). Además, las células parecen conservar esta morfología a lo largo del periodo de cultivo.

2.6 El GR microglial regula la respuesta neurodegenerativa estimulada por la exposición a estrés crónico antes de la inyección intraparenquimal de LPS

Está demostrado que el estrés crónico y agudo sensibilizan la respuesta neuroinflamatoria inducida por LPS. Además, se ha visto que en este proceso están implicados los GCs, al ser mediadores de esta sensibilización (de Pablos et al., 2006; Frank et al., 2010; Johnson et al., 2002; Munhoz et al., 2006). Para determinar en qué grado el GR microglial está implicado en este proceso de sensibilización, ratones $GR^{LysMCre}$ y $GR^{loxP/loxP}$ fueron expuestos a un protocolo de estrés crónico durante 6 días (Fig. 30A). Los ratones fueron sacrificados 24 horas después y se estudió la activación microglial mediante la determinación de cambios

morfológicos de las células Iba-1 positivas. Así, los resultados mostraron un mayor número de microglía hipertrofiada en la SNpc y en el hipocampo de los ratones GR^{LysMCre} con respecto a GR^{loxP/loxP} (Fig. 30B).

Además, ratones GR^{LysMCre} y GR^{loxP/loxP} recibieron una inyección intraparenquimal de LPS 24 horas después de la finalización del protocolo de estrés. 3 días después de esta inyección con LPS, los ratones fueron sacrificados y se cuantificó el daño neuronal mediante marcaje con FluoroJadeB. La cuantificación de células FluoroJadeB positivas muestra un mayor nivel de daño neuronal en los ratones mutantes respecto a los controles (Fig. 30C), lo que sugiere que el GR microglial es importante para la restricción de la respuesta neurodegenerativa inducida por LPS tras la sensibilización con estrés. Es importante remarcar que el estrés por sí solo no induce procesos de daño neuronal en nuestro modelo (Fig.30C), aunque exacerba la inflamación producida por LPS. Además, el aumento de los niveles de CORT plasmáticos medidos tras la exposición al estrés entre ratones mutantes y ratones control es similar (Fig. 30D).

3. Discusión

Como explicamos en la introducción, ante las acciones de un estresor, el organismo va a responder intentando restaurar la homeostasis, mediante las respuestas del sistema inmune, del SNC y del sistema endocrino que están intercomunicados entre sí. En nuestro caso, la inyección de LPS constituye el estresor que va a desencadenar la respuesta de estos tres sistemas. Existe por tanto el riesgo de que las respuestas de estos sistemas sean inapropiadas o prolongadas y se dejen de controlar correctamente los procesos de infección o aparezcan excesos en la respuesta inflamatoria que puedan conducir a daños tisulares y muerte neuronal

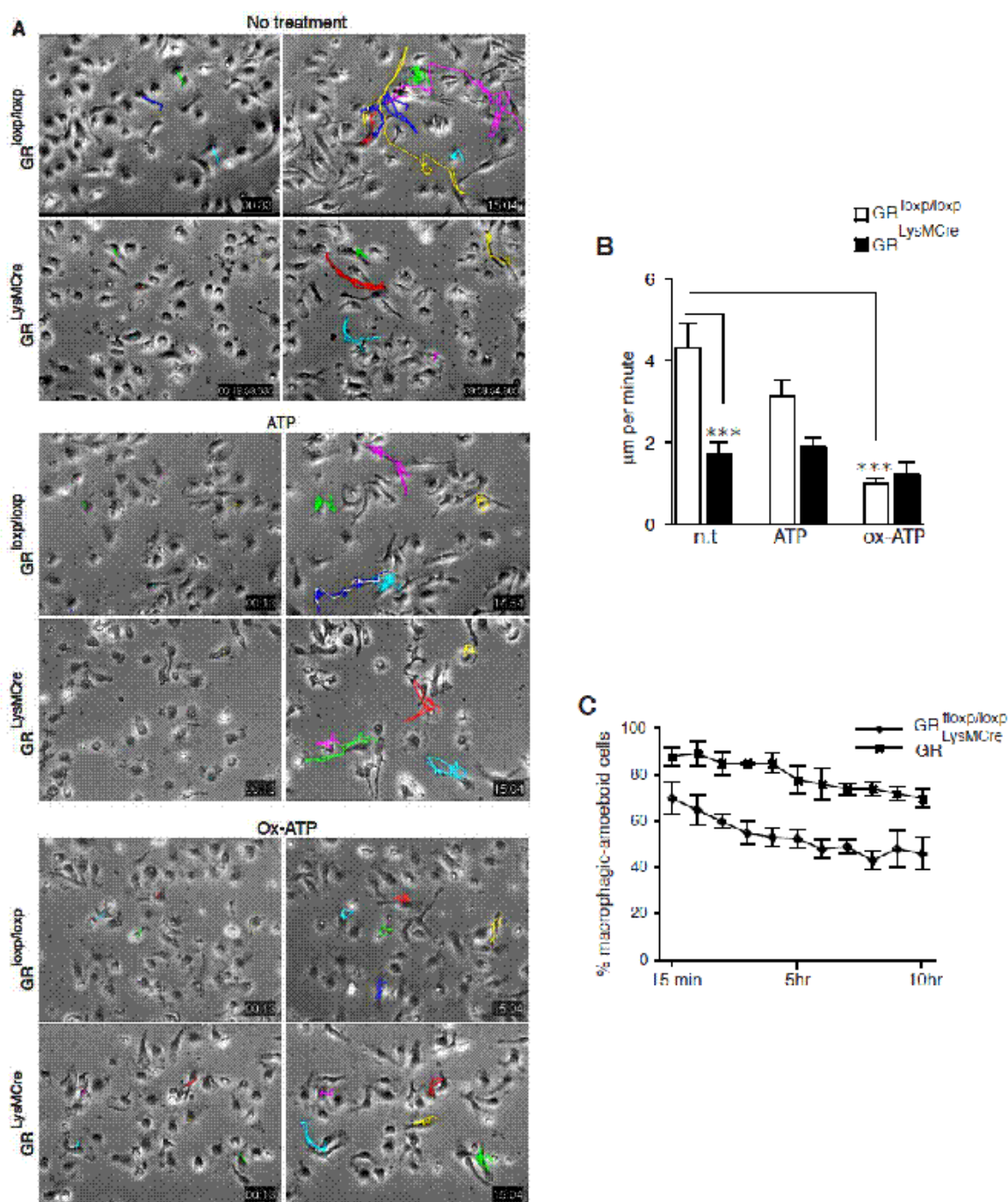


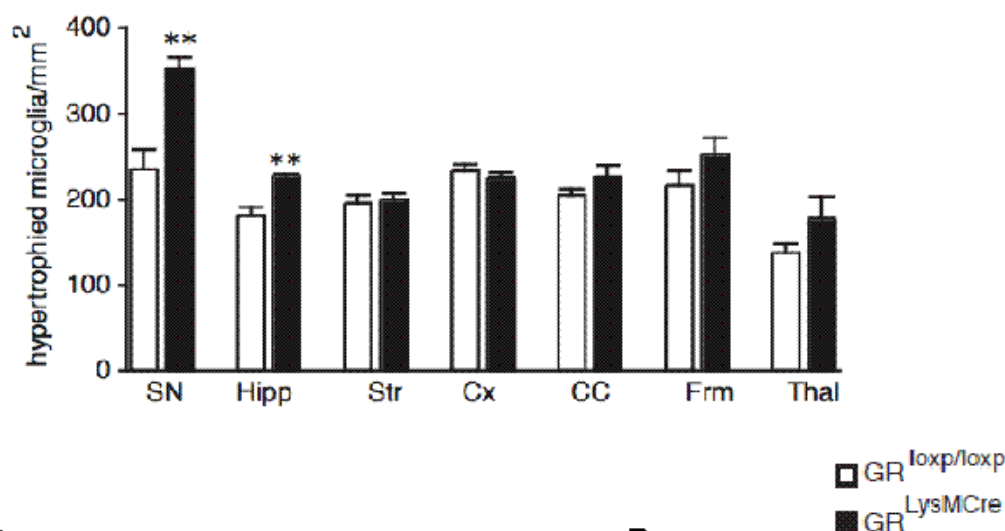
Figura 29. Análisis de la diferenciación y de la motilidad de células microgliales en cultivos establecidos a partir de neonatos GR^{loxP/loxP} y GR^{LysMCre}. (A) Ejemplos representativos de imágenes de videomicroscopía tomadas a diferentes intervalos. El tiempo se designa como “hrs:min:sec” o “hrs:min”; la duración total de grabación fue de 10 ó 15 horas. La microglía se encuentra en constante cambio morfológico entre formas tubulares y formas ameboides típicas de macrófagos. Estos cambios son menos frecuentes en las células mutantes. (B) El análisis del movimiento celular muestra que la microglía GR^{LysMCre} presenta una motilidad reducida comparada con las células GR^{loxP/loxP}. Los tratamientos con ATP y ox-ATP no afectan el movimiento de las células mutantes. (C) La gráfica muestra que los cultivos mutantes conservan un mayor porcentaje de células con morfología ameboides a lo largo del periodo de grabación que los cultivos control. *** $p \leq 0.01$, cultivos GR^{loxP/loxP} respecto a GR^{LysMCre}.

A

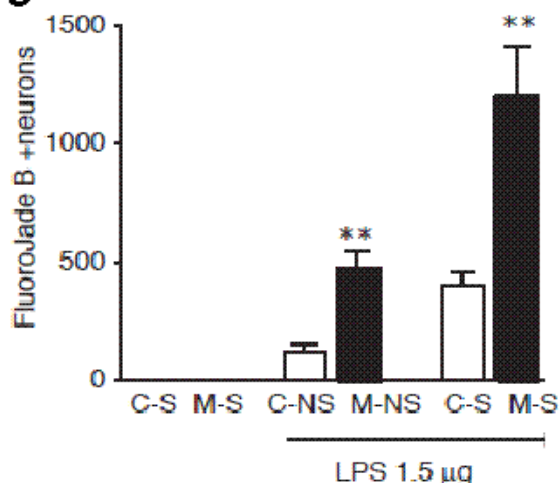
Día de tratamiento	Tipo de estrés	Duración
1	Privación de alimento	24 h
2	Privación de agua	24 h
3	Jaulas sucias	24 h
4	Restricción de espacio	2 h
5	Restricción de espacio a 4°C	2 h
6	Jaulas desorientadas	24h

Table 1. Agentes estresantes utilizados durante la exposición a estrés crónico

B



C



D

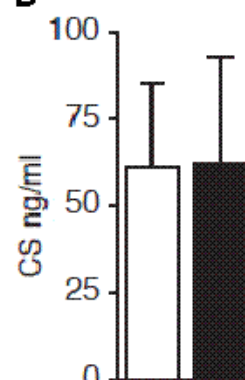


Figura 30. El estrés crónico agrava el daño neuronal causado por una inyección intraparenquimal de LPS. Papel del GR microglial. (A) Esquema del protocolo de estrés crónico al que fueron expuestos los ratones GR^{loxP/loxP} y GR^{LysMCre}. (B) Cuantificación del número de microglía con morfología hipertrófica 24 horas después de la finalización del protocolo de estrés. (C) Ratones GR^{loxP/loxP} y GR^{LysMCre} recibieron una inyección intraparenquimal de LPS 24 después de la finalización del protocolo de estrés. El número de neuronas en proceso degenerativo es mayor en los ratones GR^{LysMCre} que en los GR^{loxP/loxP}, lo que denota que el GR microglial reprime la sensibilización causada por el estrés. (D) Los niveles plasmáticos de CORT fueron medidos tras el protocolo de estrés, mostrando un aumento similar en ratones GR^{LysMCre} y GR^{loxP/loxP}. ** p ≤ 0.02, ratones GR^{loxP/loxP} respecto a GR^{LysMCre}. C, control; M, mutante; S, estresado; NS, no estresado.

(Stenberg, 2006). Los resultados de este capítulo reflejan este hecho, al mostrar que en el modelo de ratón descrito (con GR inactivo en la microglía), la inducción de una reacción inflamatoria mediante el uso de LPS produce efectos nefastos, debido a una regulación inadecuada de la respuesta inflamatoria. Así, observamos que el GR microglial es esencial para la regulación y represión de la respuesta inflamatoria inducida por LPS y se confirma la idea de que la comunicación entre el SNC, el sistema endocrino e inmune es esencial para el control de una correcta homeostasis.

Se presenta así una dicotomía sobre si los efectos de la inflamación en el SNC resultan positivos o negativos. Numerosos trabajos muestran que una respuesta inflamatoria controlada y rápida contribuye a la supervivencia neuronal y a la restauración de una situación de “equilibrio”; sin embargo un control inapropiado de la respuesta inflamatoria está asociado a un aumento de la sensibilidad de las neuronas a la neurodegeneración (ampliamente revisado en Nguyen et al., 2002; Simard y Rivest, 2007).

El modelo experimental utilizado en nuestro trabajo nos ha permitido conocer mejor los mecanismos de acción de GR en la represión de la inflamación en el SNC. Aunque está bien establecido que los GCs (a través de GR) son reguladores críticos de la inflamación sistémica, las acciones de GR en el SNC no están bien caracterizadas. La mayoría de los trabajos publicados que estudian las acciones de GCs y GR en el SNC han utilizado herramientas farmacológicas, como agonistas y antagonistas de GR, o la depleción de la liberación de GCs mediante adrenalectomía. Estas aproximaciones experimentales afectan a todos los tipos celulares y, por tanto, los resultados son una suma de múltiples efectos y no es posible discriminar las funciones de los distintos tipos celulares. Por ello, y puesto que GR se expresa de forma ubicua en todos los tipos celulares, en este capítulo de la tesis hemos estudiado su función particular en la microglía mediante el uso del ratón GR^{LysMCre}.

En este caso, hemos elegido la microglía porque constituye el principal tipo celular implicado en el desencadenamiento de la respuesta inmune innata en el SNC, en parte por su propiedad específica de expresión de las moléculas TLR4 y CD14 (Lehnardt et al., 2003; Takeda et al., 2003; Triantafilou y Triantafilou, 2002). En este contexto, la inyección intraestriatal de LPS resulta idónea como mecanismo experimental, ya que va a inducir la respuesta inflamatoria por unión y activación de receptores específicos como TLR4, a través del reconocimiento por parte de la molécula CD14 (Jiang et al., 2000). Además, el uso de la inyección intraestriatal de LPS presenta grandes ventajas, ya que simula la respuesta inflamatoria ante una infección por bacterias Gram-negativas, sin necesidad de realizar una infección activa, y el método estereotáxico permite la reproductibilidad de la inyección, gracias a la utilización de unas coordenadas específicas para determinar el punto diana en la región de interés. Teniendo en cuenta que los niveles de GCs endógenos están sometidos a ritmos circadianos, hemos realizado la cirugía estereotáxica y el sacrificio de todos los animales dentro de una misma franja horaria, evitando así las influencias de las oscilaciones circadianas de los niveles de CORT.

3.1 Agravamiento de la lesión asociada al proceso inflamatorio inducido por LPS en los ratones GR^{LysMCre}

La inyección intraestriatal de LPS produce una reacción inflamatoria localizada caracterizada por una activación de la población glial, así como una infiltración de leucocitos tanto en el foco de inyección como en las zonas adyacentes. Nuestros resultados muestran una mayor sensibilidad de los ratones GR^{LysMCre} a la inyección estereotáxica de LPS comparada con los ratones intactos GR^{loxP/loxP}. Esta sensibilidad es además dependiente de la cantidad de LPS inyectado (Fig.25A). Conjuntamente con una mayor área necrótica provocada por la inyección (medida mediante la tinción de cresil violeta), este daño tisular se refleja en un

mayor número de neuronas en proceso degenerativo, identificadas mediante tinción con FluoroJade B (Fig. 25B). Actualmente existe cierta controversia sobre la especificidad del marcaje de este compuesto, ya que no se conoce con exactitud ni la molécula, ni el mecanismo de unión a ella. Algunos trabajos defienden la idea de que marca las neuronas en proceso neurodegenerativo en un contexto de daño agudo, pero también podría marcar algunas células gliales reactivas en los procesos neurodegenerativos crónicos (Damjanac et al., 2007), por lo que su uso está en ocasiones sujeto a cierta discusión. Sin embargo, la mayoría de evidencias experimentales apuntan hacia la primera opción y se acepta como un marcador de neurodegeneración (Schmued y Hopkins, 2000).

Aunque el LPS induce una fuerte respuesta inflamatoria, existe controversia sobre si su efecto directo puede conducir a procesos neurodegenerativos o no. Así, ciertos autores defienden esta idea (Arimoto y Bing, 2003; Castano et al., 1998; Kim et al., 2000), mientras que otros no detectan neurodegeneración tras su aplicación local (Nadeau y Rivest, 2003). Estos últimos explican que se debe a que la inyección de LPS produce un aumento de los niveles sistémicos de GCs que son capaces de controlar el proceso inflamatorio, preservando a las neuronas de la muerte. Asumiendo que FluoroJade B marca las neuronas en proceso degenerativo, nuestros resultados muestran que, tres días después de la inyección, el LPS ejerce un efecto neurodegenerativo exacerbando únicamente en los ratones GR^{LysMCre} y no en sus controles (Fig.25B). El número de células FluoroJade B positivas desciende hasta niveles similares a los presentados por los ratones control transcurridos siete días de la inyección, indicando que las neuronas dañadas o bien han podido degenerar completamente o bien han dejado de ser positivas para FluorJade B y parte se ha recuperado. Estos resultados corroboran la hipótesis propuesta por Nadeau y Rivest (Nadeau y Rivest, 2002, 2003) y demuestran de forma fehaciente que la presencia de GR en la microglía es esencial para la correcta regulación de la inflamación en el SNC por parte de los GCs.

Además de un aumento de necrosis y de células en proceso degenerativo, la inyección intraestriatal de LPS también produce una desmielinización de las fibras mielínicas del cuerpo calloso que resulta significativamente más importante en los ratones GR^{LysMCre}; además, este proceso desmielinizante se acentúa con el aumento de la dosis de LPS (Fig.25C). Estos datos se corresponden con los presentados por Nadeau y Rivest (Nadeau y Rivest, 2003), que observaron una desmielinización importante en ratones inyectados intraparenquimalmente con LPS que recibieron además un pretratamiento con RU486. En nuestro modelo, sin embargo, podemos concluir que específicamente el GR microglial juega un papel importante en la protección de las fibras axonales en los procesos de desmielinización, ya que observamos la misma alteración que utilizando RU486 (Fig. 26B), lo que indica que la acción sobre otros tipos celulares no es crucial en este tipo de procesos.

3.2 No hay evidencias de disfunción del eje HPA que pueda contribuir al agravamiento de los efectos producidos por la reacción inflamatoria inducida por LPS en el SNC

Para Nadeau y Rivest era esperado que el pretratamiento con RU486 exacerbara la respuesta inmune innata en el cerebro inducida por una inyección de LPS, ya que los GCs actúan como los principales reguladores endógenos de las vías moleculares y la transcripción de genes involucrados en la señalización proinflamatoria aguda (Nadeau y Rivest, 2003; Webster et al., 2002). Sin embargo, el problema sobreviene cuando se producen altos niveles de GCs, ya que este hecho puede conducir a un aumento de la sensibilidad de las neuronas a la degeneración, sobretodo cuando ocurre durante periodos crónicos (Sapolsky, 1996). Por este motivo, quisimos comprobar si la mayor sensibilidad al proceso inflamatorio y a la neurodegeneración podía estar relacionado con variaciones en la regulación del eje HPA en los ratones GR^{LysMCre}. Así, la medida de los niveles de CORT plasmáticos tres días después de la inyección de LPS mostró un aumento significativo en los niveles circulantes de este GC en

los ratones GR^{loxP/loxP} (como se preveía) y una tendencia a un mayor aumento en los GR^{LysMCre} (Fig. 25D), que, sin embargo, no resultó significativo con respecto a los ratones GR^{loxP/loxP}. Por lo tanto, no parece existir una alteración en el proceso de activación y en la función del eje HPA debida a la ausencia de GR en la microglía, lo que sostiene que las posibles alteraciones en el eje HPA son independientes de la acción del GR en la microglía y que la exacerbación de los efectos de la inflamación que observamos en los ratones GR^{LysMCre} es debida exclusivamente a la ausencia de GR en la microglia y no a una disfunción del eje HPA.

3.3 El GR microglial es crucial en la respuesta inflamatoria inducida por LPS en el SNC, aunque el GR de otros tipos celulares también parece estar implicado en menor grado

El trabajo de Nadeau y Rivest anteriormente citado utiliza el pretratamiento con el antagonista de GR RU486 para mostrar que afectando la función de GR se produce exacerbación de la respuesta inflamatoria y muerte neuronal causada por el LPS en el parenquima cerebral. Sin embargo, este trabajo no pudo determinar qué tipo celular específico está implicado en este efecto. En una primera observación, nuestros resultados están en concordancia con los datos publicados previamente (Nadeau y Rivest, 2003), ya que cuando administramos un pretratamiento con RU486 se agrava significativamente el proceso de daño celular en ratones intactos GR^{loxP/loxP} (Fig. 26A). No obstante, nuestros resultados nos informan además sobre la implicación del GR microglial en este fenómeno; concretamente, si el GR microglial fuera el único responsable de este efecto, el nivel de daño tisular en ratones GR^{LysMCre} tras el pretratamiento con RU486 debería ser similar al encontrado en ratones control, sin embargo, es significativamente mayor (Fig. 26A); lo que sugiere que el GR microglial es el principal efector de esta respuesta, aunque otros tipos celulares también puedan estar implicados en buena parte de la regulación del proceso de inflamación. La

cuantificación del volumen de desmielinización del cuerpo calloso para los ratones GR^{loxP/loxP} y GR^{LysMCre} pretratados con DMSO (vehículo) o RU486 confirma esta hipótesis, ya que presenta los mismos patrones de variación que el cresil violeta (Fig. 26B), por lo que el GR de otros tipos celulares también estaría implicado en la regulación de este proceso. Sin embargo, el GR microglial parece tener un papel específico en prevenir el desencadenamiento de daños neuronales, ya que se produce un aumento prácticamente idéntico del número de neuronas en proceso degenerativo en los ratones GR^{LysMCre} pretratados o no con RU486 (Fig. 26C).

Con la finalidad de estudiar el papel del GR de otras células implicadas en la respuesta inmune, hemos generado además un modelo de ratón que no expresa GR específicamente en astrocitos mediante el sistema Cre/LoxP inducido por tamoxifeno. Igualmente hemos comenzado a realizar experimentos sobre la línea GR^{LCKCre} que no expresa GR en los linfocitos. Sin embargo, estos resultados preliminares no se incluyen en la presente tesis.

Al igual que un pretratamiento con RU486 puede sensibilizar la respuesta inmune inducida por una inyección intraparenquimal de LPS, está demostrado que someter al animal a un estrés crónico puede producir este mismo efecto (de Pablos et al., 2006; Frank et al., 2010; Johnson et al., 2002; Munhoz et al., 2006). Como comentamos en la sección de resultados, hemos querido comprobar si los ratones GR^{LysMCre} muestran un patrón distinto de sensibilización a la respuesta inmune por estrés con respecto a los ratones control. Nuestros resultados muestran que la microglía del hipocampo y de la SNpc es particularmente sensible al estrés, ya que la ausencia de GR microglial produce una elevación del número de microglía hipertrofiada en estas regiones (Fig. 30B). Además, podemos constatar que los ratones control que fueron inyectados con LPS intraparenquimalmente, tras haber sido sometidos al protocolo de estrés crónico, muestran una exacerbación de los efectos de la inflamación, ya que presentan un aumento del número de neuronas en proceso degenerativo positivas para

FluoroJadeB. Sin embargo, este aumento es mucho mayor en los ratones GR^{LysMCre} (Fig.30C), por lo que comprobamos nuevamente que el GR microglial está implicado de forma crucial en la regulación de la respuesta inmune del SNC, contribuyendo a la restricción de la respuesta neurodegenerativa inducida por LPS tras la sensibilización por estrés. Además, podemos asegurar que el protocolo de estrés fue efectivo ya que las medidas de los niveles plasmáticos de CORT, reflejaron valores elevados con respecto a los basales en ratones (10-20 ng/ml) a esa hora del día (Fig.30D). Este experimento nos confirma también que la ausencia de GR microglial parece no influir en el funcionamiento del eje HPA, ya que los ratones GR^{LysMCre} presentan los mismos niveles de CORT que los controles. Este resultado era previsto, puesto que la ausencia de GR específico de la microglía no afecta a otras células implicadas en los feedback regulatorios del eje HPA.

3.4 El GR microglial regula los procesos de gliosis inducidos por LPS

En el SNC, la reacción inflamatoria se caracteriza por un proceso de activación glial (Block et al., 2007; Chen y Swanson, 2003; Gehrman et al., 1995; Nguyen et al., 2002; Wang et al., 2010). Sin embargo, la función de los GCs en este contexto continúa poco explorada; por ello, nuestro estudio pretende clarificar si la presencia y función de GR microglial regula este proceso de gliosis y si tiene influencia sobre la proliferación glial. Nuestros resultados con marcadores de glia activos muestran un claro aumento de la astrogliosis y microgliosis en la región ipsilateral a la inyección con LPS (Fig.27A, C). Cabe destacar además que los niveles de microgliosis medidos después de tres días de la inyección de LPS son más elevados que los de astrogliosis; lo cual concuerda con estudios previos sobre la inflamación en otros contextos experimentales como los modelos de intoxicación con MPTP, donde se observa un pico de microgliosis anterior al de astrogliosis, siendo este segundo de menor relevancia (Hirsch y Hunot, 2009). Además, hemos podido constatar un

aumento significativo de la microgliosis, acompañado de una tendencia al incremento de la astrogliosis, en los ratones $GR^{LysMCre}$ (Fig. 27B). Los efectos beneficiosos o nocivos de la gliosis dependen de la cantidad de células y de la duración del estado de activación (Nadeau y Rivest, 2003; Streit et al., 1999); así, nuestros resultados confirman que la ausencia de GR microglial conlleva un exceso de activación glial que puede conducir a efectos nocivos y deletéreos.

Además, GR podría afectar a la diferenciación de la microglía y a los cambios morfológicos asociados a este proceso. Esta idea sobreviene a partir de la observación del predominio de células microgliales con morfología ameboide alrededor de la zona de inyección en el cortex de los ratones $GR^{LysMCre}$. Además, fijándonos en los experimentos *in vitro*, la cuantificación de las imágenes de videomicroscopía muestran una prevalencia de la microglía con morfología ameboide en los cultivos mutantes (Fig. 29C). Estos resultados están en concordancia con datos de nuestros trabajos previos que muestran la implicación de GR microglial en la regulación de la activación de este tipo celular tras la degeneración dopaminérgica inducida por MPTP (Ros-Bernal et al., 2011; Anexo1). Además, los análisis de la videomicroscopía sugieren que GR podría estar implicado en la motilidad de las células microgliales, en una forma dependiente de ATP, ya que los cultivos mutantes muestran una significativa reducción de la capacidad de movimiento, que además no está afectada por el tratamiento con el inhibidor del ATP, ox-ATP (Fig. 29B). Estudios previos han descrito que GR puede afectar las funciones mitocondriales (Du et al., 2009), por lo que es posible que su ausencia pudiera tener un efecto en la síntesis de ATP, lo que contribuiría a afectar el movimiento celular.

Aunque la literatura sobre la proliferación glial (sobretudo astrogliosis) inducida por inyección intraparenquimal de LPS es muy limitada, algunos trabajos muestran que la

exposición a LPS en ratones recién nacidos induce microgliogénesis (Bly et al., 2010). Nuestros estudios mediante tratamiento con BrdU muestran que la inyección de LPS en el cerebro desencadena un proceso de proliferación de astroglia y microglía (Fig. 27D), de acuerdo con resultados anteriores (Monje et al., 2003). Además, este fenómeno de proliferación microglial es significativamente mayor en los ratones GR^{LysMCre}, lo que sugiere que el GR de la microglía está involucrado en la regulación de la proliferación de este mismo tipo celular contribuyendo a la represión y control de la respuesta inflamatoria.

Ya que el BrdU fue inyectado durante tres días desde la inyección de LPS y hasta el sacrificio de los ratones, las células F4/80-BrdU positivas deben corresponder tanto a microglía que se ha dividido dentro del parénquima, como a monocitos que provienen de la periferia. Por tanto, no podemos distinguir entre las células microgliales activadas residentes y los macrófagos que provienen de la periferia y llegan por infiltración y extravasación. Esta es una de las razones que nos han conducido a estudiar el fenómeno de la extravasación e infiltración fijándonos en los linfocitos, los cuales no se presentan masivamente en el cerebro salvo en casos de inflamación (capítulo 3).

3.5 El GR microglial tiene un papel importante en la regulación de la expresión de citocinas y otras proteínas inflamatorias tanto in vivo como in vitro

La glia activada produce gran variedad de factores de crecimiento, citocinas (como TNF α , IL-1 β , COX-2), NO, ROS y neuropéptidos (como el glutamato) que pueden contribuir a sus propiedades neurotróficas o neurotóxicas (Chao et al., 1995; Garden y Moller, 2006; Glezer et al., 2007; Simard y Rivest, 2007; Streit et al., 1999; Vitkovic et al., 2000). Como explicamos en la introducción, los GCs gracias a su receptor y a través de la interacción con distintas vías moleculares, regulan la expresión y la liberación de citocinas y otras moléculas inflamatorias producidas por la glia, contribuyendo así al control de la inflamación (Beck et

al., 2009; Marchetti et al., 2005; Sternberg, 2006). Por estas razones, era esperable encontrar cambios en los patrones de expresión de ciertas citocinas y moléculas inflamatorias en los ratones GR^{LysMCre} tras la inyección de LPS. En concreto, la ausencia de GR en la microglía se traduce en la exacerbación de la expresión de los genes estudiados (TNF α , IL-1 β , iNOS, COX-2, procaspasas-1 y 4; y también TLR4 y MyD88) (Fig. 28A), con diferencias en los patrones de aumento para cada uno de ellos.

La ausencia de GR provoca la falta de represión de la síntesis de TNF α en la microglía lo que supone un aumento de los niveles de ARNm de esta citocina detectados tras 24 horas de la inyección. Esta mayor producción y liberación de TNF α por parte de la microglía va a causar un aumento en la duración de la respuesta inmune innata, potenciando la activación de las células microgliales y astrogliales vecinas, lo que conlleva a su vez un nuevo aumento de la expresión de citocinas. Esta inflamación, sin un control por feedback negativo (como la represión por GR), producirá efectos tóxicos en las células, lo que puede explicar el aumento de los procesos de daño tisular, neuronal y miélinico que observamos en los ratones GR^{LysMCre}. De hecho, la liberación de citocinas, como IL-1 β , puede tener un efecto similar al producido por bajas concentraciones de LPS (Schiltz y Sawchenko, 2002), induciendo factores inflamatorios como la producción de COX-2 y la consecuente liberación de prostraglandinas por parte de la microglía. En esta línea, nuestros resultados muestran una tendencia a un gran aumento de los niveles de IL-1 β , ya desde las 6 horas de la inyección, con un consecuente incremento de los niveles de COX-2 (Fig.28A). La producción de otros factores como iNOS también se induce más rápidamente que en los ratones controles, por lo que la liberación de NO y sus subsecuentes efectos deletéreos se efectúa también más rápidamente en ausencia de GR microglial.

En la reacción inflamatoria cerebral se produce una sobreexpresión del receptor TLR4, por el cuál actúa el LPS (Takeda et al., 2003). Hasta el momento no se conocen con exactitud los efectos de los GCs sobre la expresión de TLR4 tras la inyección de LPS en las células inmunes, aunque hay resultados que muestran efectos transcripcionales en células no inmunes, como células del epitelio respiratorio (Hermoso et al., 2004; Stenberg, 2006). Recientes trabajos de nuestro laboratorio, utilizando los ratones GR^{LysMCre} en modelos de EP con MPTP, muestran un incremento en la expresión de TLR9 y otros miembros de la familia (Ros-Bernal et al., 2011). Estos resultados apuntan a que GR podría también tener un efecto sobre la expresión de TLR4. El hecho de que se detecte una sobreexpresión tanto de TLR4 como de MyD88 (proteína adaptadora en la vía de señalización de TLR4) en los ratones GR^{LysMCre} tras la inyección con LPS, indica que el GR microglial ejerce un papel importante en la regulación de activadores de la inflamación en los primeros estadios de la señalización de la cascada inflamatoria. Esta idea se confirma además al observar un aumento en la expresión de otros genes, también implicados en las fases tempranas de la inflamación, como son las procaspasas 1 y 4 (Fig. 28B).

El análisis de la expresión de estos genes *in vitro* en cultivos primarios de microglía, establecidos a partir del cortex de neonatos GR^{LysMCre} o GR^{loxP/loxP}, confirma el importante papel regulador del GR microglial, ya que tratamientos con DEX tienden a afectar la inducción de la expresión de estos genes por LPS en cultivos controles, pero no en cultivos GR^{LysMCre} (Fig. 28C).

Aunque GR microglial no está presente en los ratones GR^{LysMCre}, el GR de otros tipos celulares como los astrocitos (también activos por inducción de las citocinas liberadas por microglia) puede contribuir a reprimir en parte los efectos de la expansión inflamatoria. De hecho, las medidas de los niveles de expresión de estos genes en los cultivos primarios de

microglía, muestra que en este modelo in vitro en el que hay una ausencia total de GR se produce un aumento desmesurado de la expresión de estos genes (Fig.28C), por lo que podemos concluir que el GR de otras células inmunes (o no inmunes) también debe contribuir a frenar esta reacción inflamatoria descontrolada.

Con estos resultados podemos afirmar que los genes que codifican para TLR4, MyD88 y las procaspasas 1 y 4 son diana de GR microglial y que éste controla la expresión de estas y de otras moléculas implicadas en la inflamación, facilitando su represión y en última instancia la expansión de la respuesta inflamatoria.

Capítulo 3

“Estudio de la implicación de MCP-1/CCL2 en la infiltración y extravasación linfocitaria en un modelo de inflamación aguda en el sistema nervioso central”

En el escenario inflamatorio provocado por una inyección intraparenquimal de LPS, además de ocurrir una microgliosis y astrogliosis (estudiados en el capítulo anterior), entra en juego el proceso de infiltración de células inmunes hacia el foco del daño tisular. Los tipos celulares que pueden infiltrarse son principalmente los linfocitos y los monocitos perivasculares o no residentes que se diferenciarán hasta macrófagos/microglía. Aunque en este trabajo de tesis nos hemos interesado especialmente en el papel de la microglía en la reacción inflamatoria, debido a la imposibilidad de diferenciar mediante técnicas inmunohistoquímicas entre microglía residente e infiltrada, hemos decidido estudiar el fenómeno de la infiltración fijándonos en los linfocitos T (ya que no se encuentran normalmente en el cerebro y, por tanto, su detección significa que se han producido fenómenos de infiltración y extravasación). Además, nos hemos interesado en el estudio de la quimiocina MCP-1/CCL2 (monocyte chemoattractant protein-1/Chemokine (C-C motif) ligand 2) ya que es una de las quimiocinas más importantes en los procesos de inflamación cerebral y además el GR puede regular su expresión (Dhawan et al., 2007). Concretamente nos hemos centrado en la identificación del tipo celular que la expresa en el cerebro y el estudio de su función en la infiltración celular; ya que hasta el momento, estas cuestiones no ha sido clarificadas de forma concluyente.

1. Materiales y métodos

1.1 Animales y tratamientos

En este estudio se utilizaron veintiún ratones macho C57BL/J6 de doce semanas de edad (Janvier, France). En el día 1, los ratones fueron anestesiados i.p. con una mezcla de ketamina (50mg/kg) y medetomidina (1mg/kg), e inyectados con 2 μ g/ μ l de LPS (n=14) o salino (n=7) en 1 μ l de volumen gracias al uso de un aparato de microinyección (KD Scientific, Holliston, MA) y una microjeringa Hamilton de 50 μ l. La inyección se realizó en el estriado derecho siguiendo las siguientes coordenadas: +0.5 mm anteroposterior, +2.2 mm lateral y -3.2 mm dorsoventral, de acuerdo con el atlas de cerebro de ratón (Paxinos y Franklin, 2001) y según se describe en trabajos anteriores (Zirger et al., 2006). Experimentos preliminares mostraron una muy baja tasa de infiltración linfocitaria en la zona inyectada después de 3 días de la inyección con LPS o salino. Por esta razón se dejaron transcurrir 4 días para asegurar el inicio de los procesos de infiltración en el cerebro, en concordancia con trabajos anteriores que describen este fenómeno en otros procesos inflamatorios cerebrales (Thomas et al., 2000). Para entender el papel de CCL2 en la infiltración de linfocitos en el parénquima se utilizó un anticuerpo bloqueante de CCL2: anticuerpo neutralizante de CCL2 goat anti-ratón (R&R Systems). 4 días después de la inyección de LPS, se inició un tratamiento con este anticuerpo bloqueante de CCL2 (n=7) o con isotipo (suero de cabra) (n=7). El tratamiento consistió en una inyección i.p. de 20 μ g, una vez al día, durante 4 días hasta el sacrificio el día 7. Se realizó una extensa revisión bibliográfica para tratar de establecer la dosis idóneas para la inyección i.p. de este anticuerpo bloqueante y ante la escasez de trabajos que describan su uso en el SNC, nos basamos en las dosis utilizadas por Frangogiannis y colaboradores (Frangogiannis et al., 2007).

1.2 Procesamiento del tejido y marcajes específicos. Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia

Tras siete días de la inyección de LPS o salino, los ratones fueron anestesiados con una sobredosis de ketamina (50 mg/kg) y perfundidos con PBS seguido de PFA al 4% (ver apartado 1.1.2.4, capítulo 1). Después, el cerebro fue extraído cuidadosamente y postfijado en PFA al 4% durante 48 horas. Los cerebros fueron cortados en su totalidad en secciones coronales rostrocaudales de 30 μ m de grosor, utilizando un vibratomo (Leica VT1000 S). Para el análisis inmunohistoquímico se utilizaron series de secciones espaciadas de forma regular correspondientes al área de inyección. Se realizó inmunohistoquímica mediante detección con DAB (ver sección 1.1.3.1, capítulo 1) para CCL2, utilizando el anticuerpo de conejo anti-CCL2 (1:200; Serotec); para linfocitos CD4, mediante uso del anticuerpo de rata anti-CD4 de ratón (1:750; Serotec), y linfocitos CD8, mediante el anticuerpo de rata anti-CD8 de ratón (1:500; Serotec). Además, se realizó inmunofluorescencia para la detección de linfocitos CD3 (ver sección 1.1.3.2, capítulo 1), con el anticuerpo primario de hamster anti-CD3 de ratón (1:750; Serotec), y doble-inmunofluorescencia para estudiar la colocalización de CCL2 (anticuerpo citado anteriormente) y astrocitos, mediante marcaje de GFAP, con el anticuerpo de ratón anti-GFAP (1:500; Chemicon, Millipore).

1.3 Cuantificación y análisis estereológico

Para los análisis cuantitativos se utilizaron las secciones cerebrales que contenían el tracto de la aguja de inyección, ya que se corresponden con las zonas de mayor inmunoreactividad. La cuantificación del número de células CCL2 positivas y el número de linfocitos CD3, CD4 y CD8 infiltrados en la región de la inyección se llevó a cabo utilizando campos de muestreo o fotografías que cubrían la totalidad de la región de interés. El patrón de toma de muestras se repitió idénticamente en cada una de las 5 secciones de cerebro,

regularmente espaciadas, que se analizaron para cada ratón. Las fotografías fueron tomadas con un microscopio óptico (Zeiss Axioplan 2) conectado a una cámara digital, utilizando el objetivo de 40x. Posteriormente, mediante el uso del software Image J, se delimitó una retícula de 5.7×10^6 píxeles² y se cuantificaron 10 sub-campos correspondientes a un área total de 2.5×10^6 píxeles². La cuantificación se llevó a cabo tomando en cuenta los criterios de inclusión y exclusión estereológicos (ver sección 1.1.3.3 del capítulo 1). Los datos se expresan como número de células positivas para cada marcador por campo (media \pm SEM).

El área de infiltración linfocitaria para CD4 y CD8 en el estriado se delimitó mediante el uso del software Image J. Los resultados se expresan como área ocupada por células positivas para cada marcador o superficie de infiltración (media \pm SEM) por unidad de área (píxeles²).

1.4 Análisis de colocalización mediante microscopía confocal

Secciones marcadas mediante doble-inmunofluorescencia para CCL2 y GFAP fueron analizadas con microscopía confocal (Leica DMIRE2), utilizando el objetivo de 63x. Un rango de series para cada sección fue establecido al determinar un límite superior y un límite inferior utilizando el eje de posición Z/Y, obteniendo una imagen especial configurada por una serie de sub-imágenes (Barcia et al., 2006; Barcia et al., 2008).

2. Resultados

2.1 La inflamación aguda causada por una inyección intraparenquimal de LPS provoca un aumento de la expresión de CCL2

Mediante el análisis de la inmunocitoquímica para CCL2, se comprobó que en los ratones inyectados con LPS se produce un aumento significativo de su expresión en la zona que rodea al tracto de la aguja de inyección (Fig. 31A, B). Esta expresión va descendiendo según nos alejamos de la zona de inyección, por lo que podemos distinguir un gradiente de inmunoreactividad desde las zonas colindantes al tracto de la aguja hasta las zonas menos afectadas por la inflamación local (Fig. 31A).

El tamaño y la morfología que presentan las células CCL2 positivas nos recuerda especialmente a la presentada por los astrocitos. Para comprobar qué tipo celular expresaba CCL2, se realizó un doble-inmunomarcaje con CCL2 y GFAP. Mediante microscopía confocal se estudió la colocalización de estas dos moléculas, identificando a los astrocitos como el principal tipo celular que expresa CCL2 en el área de inflamación local inducida por LPS (Fig. 31C).

2.2 Los astrocitos parecen contribuir a la extravasación de linfocitos al SNC mediante la producción de CCL2

Paralelamente al aumento en la expresión de CCL2, se produjo una infiltración específica de linfocitos CD3, CD8 y CD4 en la región de la inyección, mediante procesos de extravasación desde la periferia (Fig. 32A). Para determinar si CCL2 estaba involucrado en estos procesos de extravasación, un grupo de ratones inyectado con LPS recibió un tratamiento sistémico con un anticuerpo neutralizante de la actividad CCL2 durante 4 días,

comenzando el cuarto día tras la inyección de LPS y terminando el día del sacrificio. Tanto la cuantificación del número de linfocitos CD3, CD4 y CD8 positivos, como la determinación del área ocupada por la infiltración de linfocitos CD4 y CD8 tras la inyección estereotáxica de LPS, se ve reducida en los animales donde la actividad de CCL2 fue bloqueada mediante tratamiento con el anticuerpo bloqueante (Fig. 32B, C). Estos resultados sugieren que los astrocitos, mediante la expresión de CCL2, parecen estar implicados en la extravasación de linfocitos desde la circulación periférica hasta el parénquima cerebral afectado por un proceso de inflamación local inducido por LPS.

3. Discusión

Los procesos inflamatorios comienzan con una respuesta innata temprana iniciada por las células presentadoras de antígenos, siendo la microglia el principal tipo en el cerebro. Sin embargo, los siguientes eventos requieren el desarrollo de una respuesta específica o adaptativa que incluye el proceso de infiltración de linfocitos, la producción de anticuerpos y el desarrollo de memoria inmunológica (Nguyen et al., 2002; Stenberg, 2006). Así, la expresión de quimiocinas por parte de las células endoteliales y ciertas células inmunes es parte esencial en el desarrollo y consecución de una respuesta inmune e inflamatoria eficaz. Las quimiocinas inducen la extravasación de los linfocitos hacia la zona dañada.

Los experimentos descritos en este capítulo, junto con otros trabajos de nuestro equipo, forman parte de un proyecto más amplio, que estudia diferentes escenarios inflamatorios en el SNC, (como puede ser el glioblastoma humano o la infección viral en parénquima cerebral). En este contexto, nos hemos interesado en el estudio de la quimiocina MCP-1/CCL2, una de las quimiocinas más importantes en los procesos de inflamación cerebral y cuya expresión puede ser regulada por GR (Dhawan et al., 2007). Concretamente nos hemos centrado en la identificación del tipo celular que la expresa en el cerebro y el

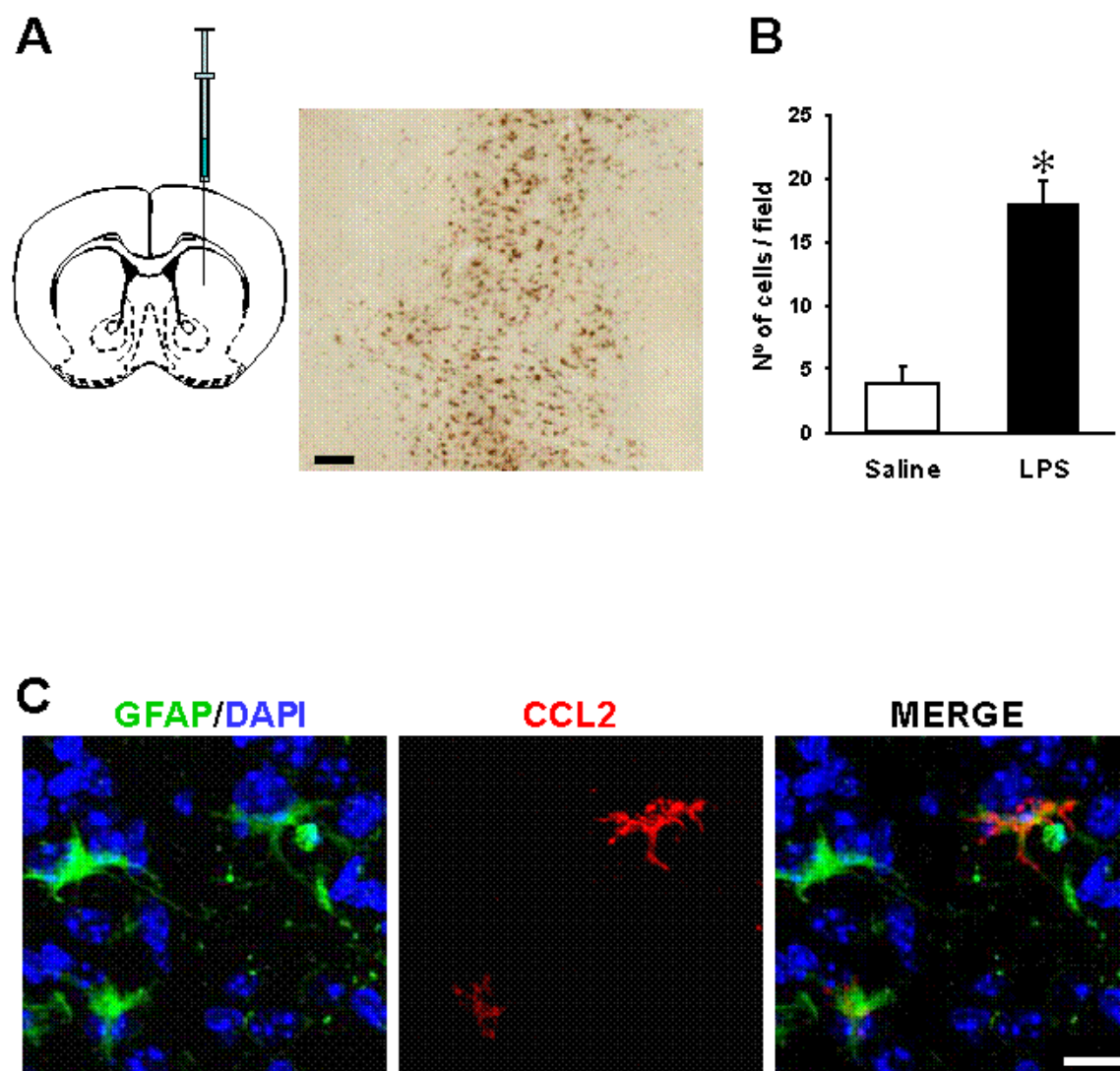


Figura 31. Aumento de la expresión de CCL2 tras inyección estereotáxica de LPS. (A) Imagen representativa de la inmunoreactividad de CCL2 en el área que rodea al tracto de la aguja de inyección. Se observa un gradiente de expresión de CCL2 desde las zonas más próximas a la inyección, donde se producen fenómenos de inflamación local inducidos por LPS, hacia las zonas más alejadas. (B) La cuantificación del número de células CCL2 positivas en el área de la inyección muestra un aumento significativo en el grupo inyectado con LPS con respecto al grupo inyectado con salino (* $P < 0.05$; T-student). (C) Imágenes de doble inmunofluorescencia para GFAP (astrocitos; en verde) y CCL2 (rojo) mostrando la colocalización de ambas moléculas. En azul se muestran los núcleos teñidos con DAPI. Barra de escala = 200 μ m en A y 15 μ m en C.

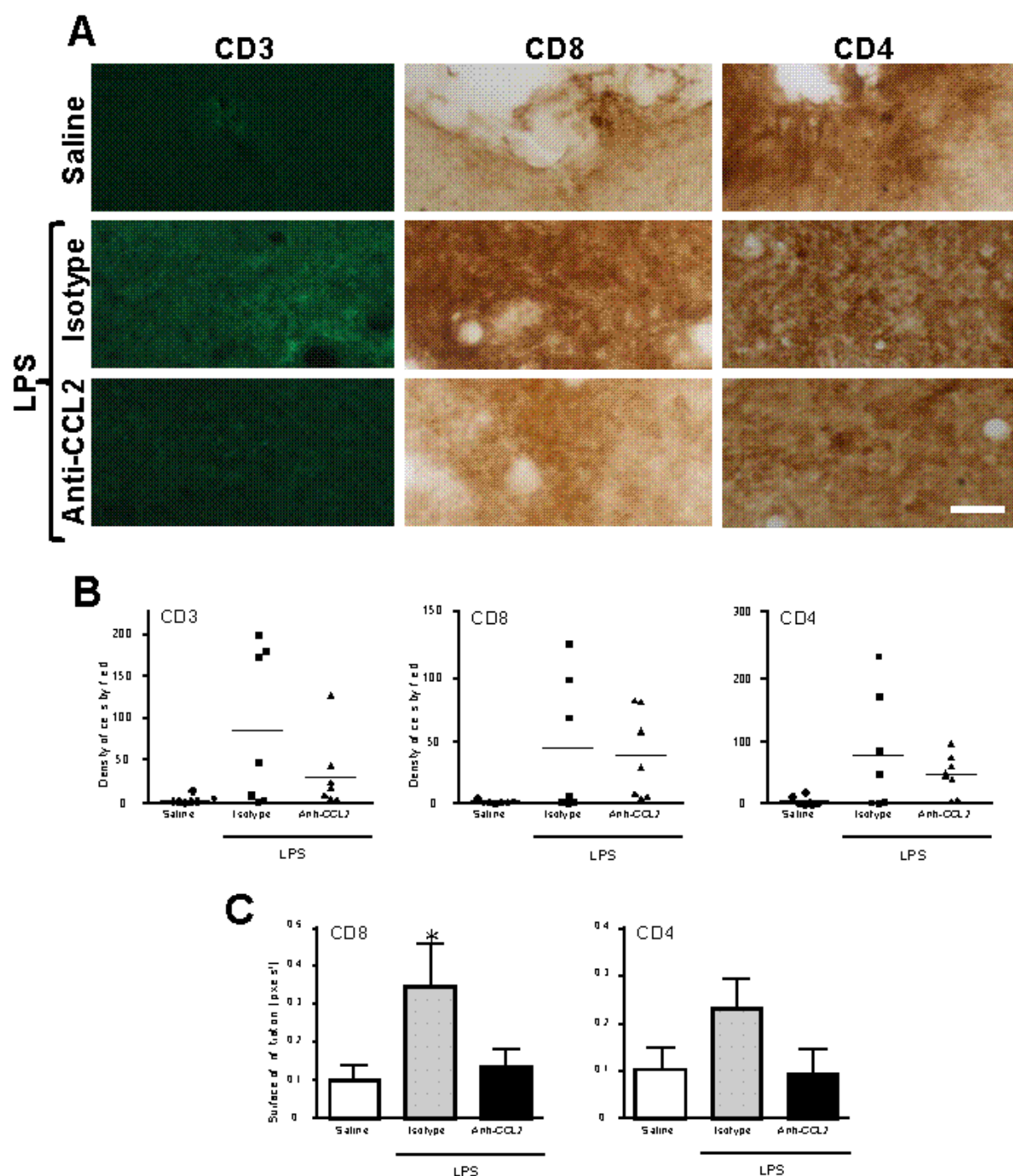


Figura 32. CCL2 está implicado en la extravasación linfocitaria al CNS. (A) Imágenes representativas de la inmunoreactividad de CD3, CD4 y CD8 en el área de inyección para cada una de las condiciones experimentales. (B) La cuantificación del número de células CD3, CD4 y CD8 positivas en el área de la inyección muestra un aumento en el grupo inyectado con LPS con respecto al grupo salino; este aumento se ve reducido en el grupo inyectado con LPS que recibió tratamiento con un anticuerpo neutralizante de CCL2. (C) La determinación de la superficie de infiltración de CD4 y CD8 muestra el mismo patrón de variación de infiltración (* $P < 0.05$; ANOVA de una vía seguido de Dunnett's test). Barra de escala = $100\mu\text{m}$ en A.

estudio de su función en la infiltración celular; ya que hasta el momento, estas cuestiones no ha sido clarificadas de forma concluyente.

3.1 Aumento de la expresión de CCL2 por parte de los astrocitos presentes en la zona de inflamación

Nuestros resultados, en el contexto de una inyección intraparenquimal de LPS, muestran un aumento del número de células que expresan CCL2 de forma específica en el área de inyección (Fig. 31A). Este aumento de CCL2 se puede observar en otros fenómenos neuroinflamatorios como en tejido procedentes de muestras de glioblastoma humano, así como en el parénquima cerebral de monos que recibieron inyecciones esterotáxicas con adenovirus, realizados recientemente en nuestro laboratorio (Anexo 2). Estos resultados están en concordancia con estudios previos que describen un aumento de quimiocinas asociado al desarrollo de algunas enfermedades y que destacan la implicación de CCL2 en los procesos neuroinflamatorios que ocurren en la epilepsia (Fabene et al., 2010), los traumatismos cerebrales (Semple et al., 2010), el dolor neuropático (Zhang et al., 2007), algunos tumores cerebrales (Platten et al., 2003), y enfermedades neurodegenerativas como en la enfermedad de Alzheimer (Hickman y El Khoury, 2010) o en la esclerosis múltiple (Gerard y Rollins, 2001).

En la actualidad, existe cierta controversia sobre el tipo celular que expresa CCL2 en el cerebro. La bibliografía apunta hacia una inespecificidad de expresión, indicando como potenciales productoras de CCL2 tanto a las células gliales (astrocitos y microglía), como a las neuronas (Babcock et al., 2003; Conductier et al., 2010; Yao et al., 2010; Zhang y De Koninck, 2006; Zhang et al., 2007). Sin embargo, no existen estudios que muestren una clara colocalización en la expresión de CCL2 con marcadores microgliales o neuronales. Por el contrario, un gran número de trabajos señala a los astrocitos residentes y en estado activo

como los principales productores de CCL2 tanto in vivo (ej. tras daños cerebrales en ratones, y en tejido de pacientes con esclerosis múltiple o en encefalitis autoinmune experimental) como in vitro (ej. células gliales humanas expuestas a estímulos inflamatorios) (Croitoru-Lamoury et al., 2003; Gao y Ji, 2010; Gao et al., 2009; Glabinski et al., 1996; Ransohoff et al., 1993; Simpson et al., 1998; Tanuma et al., 2006; Van Der Voorn et al., 1999). Sin embargo, no existen claras evidencias de colocación mediante estudios inmunohistoquímicos entre CCL2 y células astrocíticas. Nuestros resultados además de mostrar que las células CCL2 positivas tienen una morfología y tamaño similar a los astrocitos, muestran por primera vez una clara colocación de células CCL2 positivas con células positivas para el marcador astrocítico GFAP, mediante el análisis de imágenes tomadas con microscopía confocal (Fig.31B). Además, también hemos detectado esta colocación en tejido procedente de muestras de glioblastoma humano, así como en el parénquima cerebral de monos inyectados con adenovirus (Anexo 2). Estos resultados que muestran la colocación de GFAP con CCL2 en tres especies diferentes, con tres situaciones de infiltración linfocitaria vinculadas a procesos inflamatorios distintos y mediante el uso de dos anticuerpos diferentes, confirman la hipótesis de que los astrocitos perivasculares y presentes en la zona de inyección son responsables de la expresión de CCL2.

3.2 Los astrocitos están implicados en los fenómenos de infiltración linfocitaria gracias a la expresión de CCL2

Además, nuestros resultados demuestran que la expresión de CCL2 por los astrocitos induce específicamente la extravasación de linfocitos al parénquima cerebral. Como hemos descrito en la sección de resultados, 7 días después de la inyección estereotáxica de LPS podemos observar un importante proceso de infiltración de linfocitos, reflejado en una importante entrada de células CD3, CD4 y CD8 positivas en el parénquima, así como una

mayor extensión del área de infiltración en el parénquima (Fig. 32). Este aumento de CCL2 es anterior a la infiltración, ya que en ensayos previos en los que realizamos el sacrificio de los animales 3 días después de la inyección de LPS, se observó un aumento del número de células CCL2 positivas pero una escasa infiltración de linfocitos, de acuerdo con publicaciones previas (Babcock et al., 2003). Sin embargo, al esperar 7 días tras la inyección, momento en el que esperábamos apreciar el pico de infiltración como ocurre en otros procesos neuroinflamatorios (Barcia et al., 2007; Hirsch y Hunot, 2009; Thomas et al., 2000), observamos una infiltración masiva de linfocitos.

Trabajos previos ya muestran una implicación de CCL2 en la infiltración de leucocitos en los lugares de daño cerebral (Babcock et al., 2003; Desbaillets et al., 1994; Zhang y De Koninck, 2006). Sin embargo, la mayoría de estos trabajos se centran en el estudio de la infiltración de macrófagos periféricos (precedente a la infiltración de linfocitos). El estudio de la infiltración de macrófagos periféricos en el cerebro está normalmente sesgado y conlleva algunas dificultades técnicas respecto a los marcadores específicos, ya que las células microgliales comparten el 100% de sus marcadores de superficie y es imposible diferenciarlos. Por ejemplo, no podemos asumir de forma totalmente fiable diferencias con el marcaje de CD45 entre microglía/macrófagos residentes y macrófagos infiltrados, ya que CD45 está expresado en ambos tipos celulares (Babcock et al., 2003; Sedgwick et al., 1998). Sin embargo, para realizar una diferenciación fiable entre estos tipos celulares, se debe utilizar un modelo animal quimera que reciba células mieloides indiferenciadas de la médula ósea de animales que expresen GFP en todos sus tipos celulares o en los macrófagos específicamente (Zhang et al., 2007). Para evitar el problema de la identificación de macrófagos, en nuestro trabajo hemos querido centrarnos en el papel de CCL2 en la infiltración de linfocitos, ya que la presencia masiva de estas células en el tejido cerebral ocurre exclusivamente durante procesos inflamatorios patológicos. Es de resaltar que cuando

los ratones inyectados con LPS reciben un tratamiento con un anticuerpo bloqueante de CCL2 se atenúa la infiltración de linfocitos y, de forma más destacada, se reduce el área de infiltración, lo que sugiere que CCL2, expresado por los astrocitos, es clave para la inducción de la internalización de las células T en la zona afectada por la inyección (Fig.32). En conclusión, nuestros resultados demuestran que la extravasación de linfocitos al parénquima cerebral está mediada de forma importante por la quimiocina CCL2 producida por los astrocitos.

Por otra parte, aunque la función de CCL2 ha sido descrita principalmente como quimiotáctica, resultados de nuestro grupo muestran que en tejido de glioblastoma humano existen contactos entre las células T que están en proceso de infiltración y los astrocitos perivasculares que expresan CCL2. Todo ello sugiere que los astrocitos median la internalización de los linfocitos al parénquima tras los fenómenos de rodamiento y adhesión, contribuyendo al fenómeno de diapedesis, mediante la formación del uropodio y penetración a través del endotelio vascular (Anexo 2).

En principio, los procesos de infiltración de macrófagos y células T en el SNC contribuyen a regular los procesos inflamatorios y reparar los daños, ejerciendo un efecto neuroprotector (Schwartz et al., 1999); sin embargo, cuando los procesos inflamatorios se hacen crónicos, estos fenómenos pueden contribuir a la exacerbación de las respuestas inmunes conduciendo a procesos de neurodegeneración o neurotoxicidad (Nguyen et al., 2002). De hecho, en procesos neuroinflamatorios en el SNC, por ejemplo los asociados a traumas y a hemorragias cerebrales, así como en afecciones crónicas (ej. esclerosis múltiple o enfermedad de Alzheimer), una inflamación prolongada mediada por CCL2, entre otros factores, podría contribuir a agravar la enfermedad (Conductier et al., 2010). Por tanto, desde un punto de vista terapéutico, la manipulación de la expresión de CCL2 podría ser beneficiosa

para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, al limitar la infiltración de macrófagos y linfocitos. De hecho, se ha sugerido el uso de anticuerpos neutralizantes de CCL2 como posibles estrategias para el tratamiento de glioma (Zhu et al., 2010), con lo que se conseguiría modular su agresividad (Platten et al., 2003). Además, se han propuesto estas terapias como potencial tratamiento de otras enfermedades del SNC como la esclerosis múltiple (Sorensen et al., 2004), neuropatías periféricas como la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (Groh et al., 2010; Kohl et al., 2009) y otros procesos patológicos como el dolor neuropático causado por daños en los nervios periféricos (Zhang et al., 2007). Por tanto, la actuación contra la expresión de CCL2, específicamente en los astrocitos perivasculares, podría tener importantes perspectivas terapéuticas para el tratamiento de procesos ligados a la neuroinflamación.

IV. Conclusiones

Preámbulo conclusivo

Los trabajos realizados en esta tesis han permitido avanzar en el conocimiento de las funciones de los GCs y del receptor de GCs tanto en los procesos de neurodegeneración como en los procesos inflamatorios asociados que tienen lugar en el SNC. Además, la obtención de resultados novedosos junto con el interés por explorar nuevos conceptos en el campo de la Inmunología en el SNC, nos ha permitido ampliar el campo de trabajo e investigar sobre procesos específicos que ocurren durante una respuesta inflamatoria como la infiltración celular en el SNC.

Para la realización de esta tesis hemos utilizado una metodología experimental de amplio espectro que nos ha permitido abordar la problemática de trabajo desde distinto ángulos, y obtener resultados sólidos y coherentes. Concretamente, hemos utilizado modelos experimentales en los que se han inducido reacciones inflamatorias agudas y localizadas (como por ejemplo la inyección estereotáxica de LPS en el cerebro), así como modelos de neurodegeneración dopaminérgica con distinto grado de cronicidad (como son los modelos de parkinsonismo experimental mediante intoxicación con MPTP). Además, hemos podido llevar a cabo tanto aproximaciones *in vitro*, mediante uso de cultivos primarios de microglía y mesencefálicos de rata, como *in vivo*, mediante el uso de ratones y monos como animales de experimentación. El uso de ratones con GR inactivado mediante mutagénesis condicional en los tipos celulares implicados en los procesos inflamatorios en el SNC, o en neuronas DA, ha proporcionado una herramienta muy útil para clarificar las respuestas del sistema GC-GR en la neurodegeneración de la vía dopaminérgica en el parkinsonismo y la respuesta inflamatoria mediada por la microglía.

Uno de nuestros trabajos recientemente publicado muestra que el sistema GC-GR está alterado en los pacientes con EP (Ros-Bernal et al., 2011; Anexo 1). Además, ha sido descrito

que los GCs median el efecto neuroprotector en parkinsonismo experimental, el cuál está en parte causado por la inhibición de la activación glial (Marchetti et al., 2005; Morale et al., 2004; Ros-Bernal et al., 2011). De hecho, el GR microglial contribuye al efecto neuroprotector mediante el control y la recepción de los procesos inflamatorios asociados al parkinsonismo (Ros-Bernal et al., 2011).

Además, en el primer capítulo de este manuscrito mostramos que los GCs también pueden producir un efecto protector en el parkinsonismo directamente a través del GR localizado en las neuronas DA. Este efecto protector no se produce en ratones intoxicados con MPTP que carecen de GR en las neuronas DA y persiste en cultivos mesencefálicos deprivados de células gliales. Tomando en consideración todos los resultados, podemos postular que los GCs ejercen un efecto neuroprotector sobre las neuronas DA a través de dos vías: directamente, por activación de GR en las neuronas DA o indirectamente, por inhibición de la respuesta inflamatoria mediada por la microglía. Por lo tanto, variaciones en los niveles y en la liberación de GCs que puedan producirse en el parkinsonismo deben conducir a la activación y translocación de GR al núcleo de las neuronas DA, confiriéndoles neuroprotección. Finalmente, hemos demostrado que el mecanismo por el cuál GR ejerce su efecto neuroprotector parece implicar la modulación de la homeostasis de Ca^{2+} de las neuronas DA, a través de los canales RyR localizados en la membrana del RE.

En el segundo capítulo mostramos que el GR microglial tiene un papel esencial en la regulación de la inflamación aguda que se desencadena tras la inyección de LPS en el parénquima cerebral. El hecho de que los ratones GR^{LysMCre} muestren un daño exacerbado después de la inyección de LPS sugiere que la ausencia de GR microglial conlleva una inadecuada regulación de los procesos inflamatorios. Además, la ausencia de GR en este tipo celular desencadena una mayor activación microglial, que contribuye a agravar los efectos

deletéreos desencadenados por la inyección de LPS y potenciar de eventos de proliferación o infiltración de macrófagos/microglia, así como a la producción de citocinas y otras moléculas pro-inflamatorias.

En un último enfoque más amplio de los procesos inflamatorios que tienen lugar en el SNC y fijándonos específicamente en los fenómenos de infiltración, hemos estudiado el papel de los astrocitos en los procesos de infiltración linfocitaria que se producen desde la circulación periférica hacia el parénquima cerebral. Nuestro trabajo evidencia que los astrocitos están implicados en los fenómenos de extravasación linfocitaria hacia los focos de inflamación mediante la expresión de la quimiocina CCL2/MCP-1.

Conclusiones

1. La expresión y activación del receptor de glucocorticoides confiere protección a las neuronas dopaminérgicas tras la degeneración inducida por MPTP en modelos animales de enfermedad de Párkinson.
2. El tratamiento con glucocorticoides previene la neurodegeneración dopaminérgica en modelos de parkinsonismo tanto in vivo como in vitro.
3. La presencia y función del receptor de glucocorticoides en la microglía limita el daño producido por la inyección intraparenquimal de LPS previniendo la degeneración neuronal y de fibras mielínicas. Por tanto, el receptor de glucocorticoides microglial resulta esencial para el control de la respuesta inflamatoria en el sistema nervioso central.
4. El receptor de glucocorticoides en la microglía regula la respuesta inflamatoria al reprimir no solamente citocinas pro-inflamatorias sino también otras moléculas pertenecientes a la vía de señalización de TLR4 (como el receptor TLR4 y la proteína adaptadora MyD88) y caspasas pro-inflamatorias (concretamente tipo 1 y 4).

5. En ausencia del receptor de glucocorticoides en la microglía se produce un aumento de células microgliales en proliferación, lo que sugiere que el receptor de glucocorticoides: i) puede estar implicado en la regulación de la proliferación y la diferenciación de las células gliales; ii) permite la entrada de macrófagos periféricos de forma más evidente, iii) podría estar implicado en la regulación de la activación-motilidad de la microglía.
6. Los astrocitos promueven la extravasación de linfocitos hacia el foco de inflamación mediante la expresión de la quimioquina CCL2/MCP-1.
7. La prevención de la neurodegeneración ejercida por GR sobre las neuronas DA implica un mecanismo de modulación de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular, mediante la acción de los canales RyR del retículo endoplásmico.
8. Los efectos neuroprotectores de los glucocorticoides pueden ser tanto indirectos mediante la activación del receptor de glucocorticoides microglial, lo que conduce a la inhibición de la respuesta inflamatoria asociada a la enfermedad de Párkinson, como directos mediante la activación del receptor de glucocorticoides en las neuronas dopaminérgicas, lo que conduce a su protección. Ambos mecanismos no son incompatibles, sino que actúan en sinergia reforzando el efecto neuroprotector.
9. Estos resultados contribuyen a la comprensión de la posible implicación del receptor de glucocorticoides en los procesos neuroinflamatorios en neurodegeneración, y sugieren nuevas dianas terapéuticas para ralentizar la progresión de enfermedades del sistema nervioso y, por tanto, contribuir a mejorar la calidad de vida de los pacientes.

V. Sección en Inglés

Mención Europea y Cotutela entre la

Universidad de Murcia y la Universidad Pierre et Marie Curie (Paris VI)

English Section

European Mention and Co-tutelage between

University of Murcia and University Pierre et Marie Curie (Paris VI)

I. INTRODUCTION

1. Glucocorticoids, their receptors and their roles in the central nervous system

1.1 Glucocorticoids

Glucocorticoids (GCs) were first identified in studies concerning glucose metabolism, their name resulting by the fusion of the words: gluco- for glucose and -cortico, as they are synthesized in the cortex of the adrenal glands. In his pioneering work in 1936, Hans Selye described for the first time the critical role GCs in both stress and adaptation, and formulated the now famous “pendulum hypothesis” (Selye, 1952). In 1948, Hench and Kendall used for the first time cortisone as a treatment for arthritis with promising results (Hench et al., 1950).

Endogenous GCs, cortisol in human and corticosterone (CORT) in rodents, are synthesized from cholesterol by a series of cytochrome p450-catalyzed reactions in the cortex of the adrenal glands as well as in the gonads by a process called “steroidogenesis” during which other hormones are also synthesized (Fig. 1A). GCs are small lipophilic molecules able to cross the plasma membrane. The intracellular concentration of GCs are determined by several factors: i) their levels in the circulation and, as they travel linked to corticosteroid-binding globulin protein (CBG), the relative concentration of CBG is also important; ii) levels of their metabolizing enzymes, 11- β -hydroxysteroid dehydrogenase 1 (11- β -HSD-1 increases synthesis) and 2 (increases degradation). 11 β -HSD-1 is widely expressed at high levels in liver, brain and lungs, whereas 11 β -HSD-2 is predominantly expressed in aldosterone-containing tissues, to prevent GC binding to mineralocorticoid receptors (MR); iii) efficiency of the multi-drug resistance (MDR) efflux pump in the CNS at the level of the blood brain barrier (BBB), in kidneys and liver (Brien, 1981; de Kloet et al., 1990; Uhr et al., 2002).

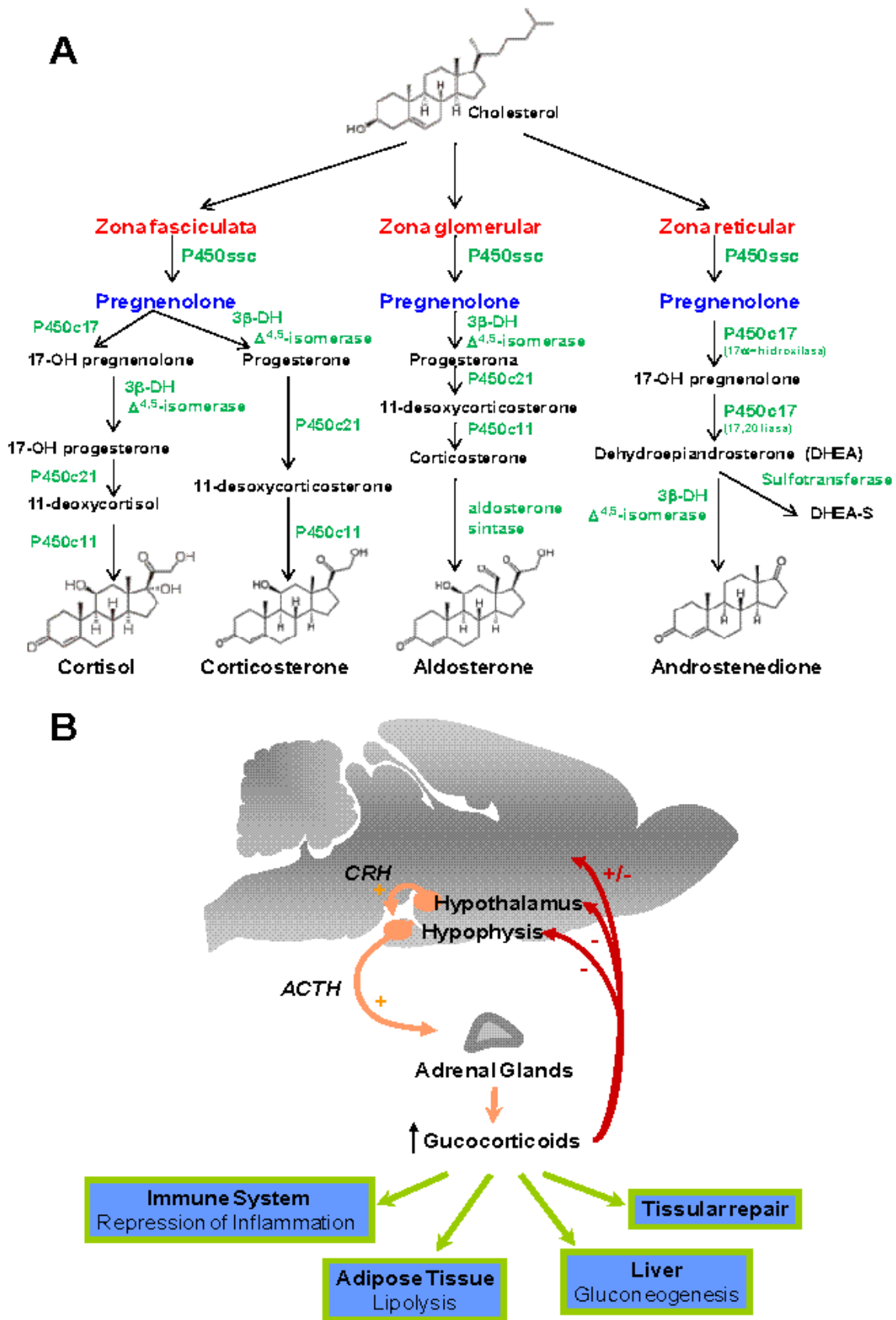


Figure 1. (A) Steroidogenesis. By this biological process steroids are generated from cholesterol and transformed into other steroids (androgens, estrogens, GCs and mineralocorticoids), in the cortex of adrenal glands. **(B) HPA axis.** Activation of HPA axis lead to production and release of GCs to systemic circulation from adrenal glands. GCs exert control of HPA axis at different levels and regulate different physiological process.

1.2 GC release regulated by HPA axis

GCs are released into the systemic circulation from the adrenal cortex in response to stress stimuli (e.g. emotions, pathogen invasion, cellular injury) upon activation of the Hypothalamus-Pituitary-Adrenal (HPA) axis. Briefly, the HPA axis is activated by the stimulation of neurons in the paraventricular nucleus (PVN) of the hypothalamus. This results in the release of the neuropeptides Corticotropin Release Factor (CRF) and Arginin Vasopressin Peptide (AVP) into the portal hypophysary system. Both neuropeptides can stimulate the synthesis of AdrenoCorticoTrophic Hormone (ACTH) in the anterior lobe of the hypophysis. ACTH secreted into the systemic circulation stimulates the synthesis of GCs in the cortical area of the adrenal glands (Herman and Cullinan, 1997; Tsigos and Chrousos, 2002) (Fig. 1B). Synthesis and secretion of GCs is principally regulated by neuronal circuitry in brain (e.g. at the level of hippocampus, prefrontal cortex, amygdala, stria terminalis) that exerts a feedback control on the HPA axis at the level of CRH and ACTH synthesis (De Kloet and Reul, 1987).

GC secretion occurs either as a tonic secretory process with an amplitude that varies according to the circadian cycle, or as a phasic response to an acute stressor. The circadian rhythm of ACTH and GCs secretion (high at the onset of the active phase and low at the inactive, or rest phases) which anticipates awakening and cycles of activity is a basic characteristic of the HPA axis activity (Keller-Wood and Dallman, 1984). In addition to diurnal variation, detailed 24 hr analysis revealed an oscillatory pattern of GC secretion with an hourly ultradian rhythm. Both these patterns (circadian and ultradian) provide the basis for a process of continuous dynamic equilibrium, a mechanism fundamental in the maintenance of homeostasis and allostasis (see also below) (Lightman and Conway-Campbell, 2010). Importantly, oscillating levels of GCs are crucial for the maintenance of stress responsivity,

providing the flexibility necessary to respond to, and recover from, stress (McEwen, 2007). Deregulation of the pulsatile pattern of GCs secretion is associated with various disease states, such as depression and affective disorders (Young et al., 2004).

1.3 GCs act via their cognate receptors

GCs act via two related receptors: receptor type I, or glucocorticoid receptor (GR) and receptor type II, or mineralocorticoid receptor (MR). GR and MR are members of a nuclear receptor superfamily, which also include progesterone (PR), androgen (AR) and estrogen (ER) receptors (Kumar and Thompson, 1999). MR expression is relatively restricted to the periphery, such as kidneys, salivary glands and colon, and in brain in the circumventricular organs (the organum vasculosum of the lamina terminalis, the subfornical organ, the median eminence and the area postrema) and the limbic system (hippocampus and hypothalamus) (Joels et al., 2008). At the periphery, the MR is known to regulate the electrolytic balance upon binding to aldosterone; differently, in brain the MR binds to GCs (Pippal and Fuller, 2008). The GR, on the other hand, is ubiquitously expressed both in the periphery and in the CNS (Nicolaidis et al., 2010). In the CNS the affinity of the MR for GCs is significantly higher ($K_d(\text{MR})=0.5\text{nM}$) compared to the GR ($K_d(\text{GR})=5\text{nM}$) in basal conditions. Therefore, it is believed that the GCs tonic activities are exerted through the MR, whereas the GRs are activated only in response to high levels of circulating GCs (de Kloet et al., 1990, 1998).

Structurally, GR is characterized by: a) an N-terminal domain, which comprise a transcriptional activation region crucial for binding to co-regulators and a PEST (Pro-Glu-Ser-Thr) domain for GR degradation; b) a DNA binding domain (DBD), which is responsible for the interaction with specific DNA sequences (GR responsive elements) present in the promoters of target genes. This region also contains nuclear localization and dimerization

sequences (with itself or with other transcription factors); c) a C-terminal domain, which a ligand (hormone)-binding domain (Fig. 2A).

In the classical model, in the absence of hormone, the cytoplasmic GR is similar to other members of nuclear receptor family, as it is inactive, bound to a complex formed by large number of proteins including HSP90 and immunophilin (Beck et al., 2009). The binding with GCs results in a conformational change, whereby the GR dissociates from the proteinaceous complex and translocates into the nucleus, where it regulates gene transcription. In the nucleus, GR exerts either a trans-activation or a trans-repression of target genes by different mechanisms, which could be dependent or independent of GR binding to DNA. Consequently, GR could either bind to the “glucocorticoid response elements” (GRE) sequences present in the promoters of target genes, or modulate the activity of other transcriptional factors (Beck et al., 2009) (Fig.2B). These genomic effects are slow and are seen hours after exposure to GCs; however, GCs are also able to exert faster effects by non-transcriptional mechanisms (Buttgereit and Scheffold, 2002). GR activity itself is also modified by post-translational mechanisms, e.g. by phosphorylation, SUMOylation, acetylation, nitrosylation, redox regulation, and ubiquitination (Beck et al., 2009).

1.4 GCs-GR actions in CNS

GC-GRs exert a wide variety of regulatory actions that range from embryonic developmental, metabolic (e.g. gluconeogenesis), cardiovascular and immune system activities to behavioral modifications (Tasker, 2006). Importantly, these roles are intrinsic part of the organism’s responses to external cues at the aim to maintain homeostasis, a process also called “allostasis” (the process of maintaining homeostasis by active means). This adaptation process is normally beneficial for the organism. However, malfunction of the HPA axis (such that the GC-GR actions are not sufficiently turned on, or are not properly turned

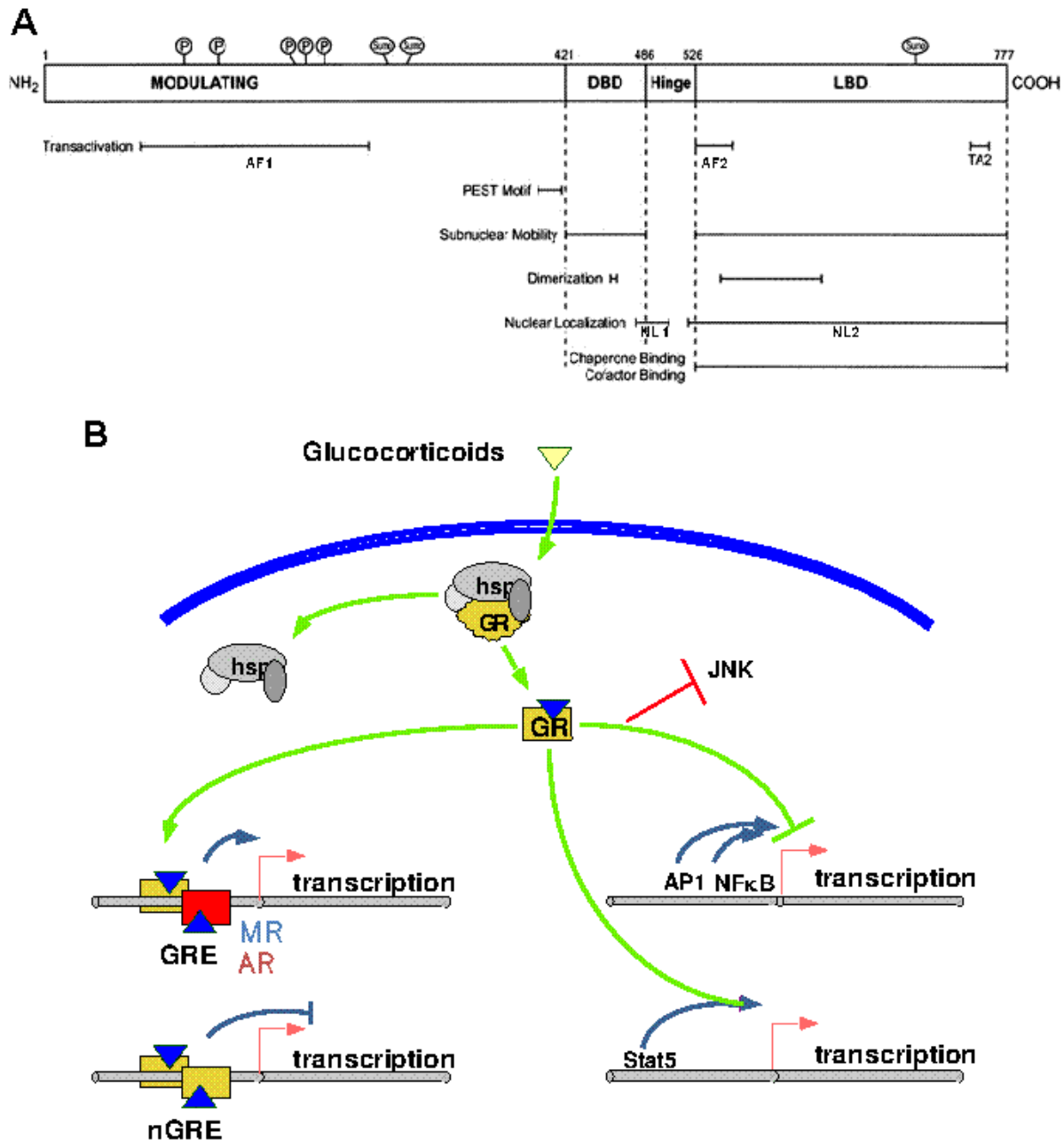


Figure 2. (A) Structure of Glucocorticoid Receptor (GR). Human GR is constituted by 3 domain. N-terminal domain (NTD) contains phosphorylation sites, AF1 transactivation sequence and a PEST sequence for degradation process. Portions of DNA binding domain (DBD) are critical for ligand-dependent nuclear translocation of the receptor (NL region) and receptor dimerization. Finally, ligand binding domain (LBD) contains two transactivation sequences (AF2 and TA2) as well as another nuclear localization sequence (NL2). P, phosphorylation sites; Sumo, sumoylation sites. (Modified from Lu and Cidlowski, 2004). **(B) Activation and nuclear actions of the GR.** The inactivated cytoplasmic GR is complexed with chaperone proteins. Binding of GCs to the GR instigates the nuclear translocation of GR. The binding of dimeric, activated GR onto GREs, DNA binding of GR in a concerted manner with another transcription factor, or binding of GR onto a transcription factor via a tethering mechanism can all result in GC-directed promoter activation. This transactivation results in the expression of metabolic gene products and anti-inflammatory proteins. The anti-inflammatory effects of GCs are predominantly mediated via interference of monomeric GR with the transactivation capacity of transcription factors such as NF-κB, via a tethering mechanism.

off) has been observed in a number of different pathological conditions, e.g. impaired immune responses, obesity or behavioral disorders (e.g. anxiety, depression or cognitive decline) (de Kloet et al., 2005).

Behavioral and electrophysiological studies in conjunction with pharmacological approaches, i.e. administration of GR antagonists, radioactive corticosterone binding assays and adrenalectomy have helped in identifying some of the GC-GR actions in the brain. Notably in the hippocampus, basal or acutely elevated GCs levels were found to increase synaptic plasticity and improve hippocampal-dependent cognition (de Kloet et al., 2008; McEwen and Magarinos, 2001). To understand the precise molecular actions of the GR, the creation of GR-knock-out mice was not a helpful approach, because of early lethality of mice due to insufficient lung development (Cole et al., 1995). In recent years, genetically modified mice models have been generated by: a) cre/loxP technology (detailed in “Experimental Approaches”) to inactivate GR; b) tetracycline system (tTA/TetO), to over-express GR in desired cell populations (Gossen and Bujard, 1992). Studies using these mouse models led to a greater comprehension of GR activity in the CNS, concerning its role in behavioral abnormalities, such as addiction, anxiety, depression and memory dysfunction. Therefore, working in mice with pan-inactivation of GR gene in neurons and glia, forebrain neuron-specific inactivation of GR gene (GR^{NesCre}), forebrain GR knockout mice (FBGRKO), GR inactivation in dopaminergic and dopaminergic neurons (GR^{D1RCre} , GR^{DATCre}) has unraveled the essential roles of GR in the development of anxiety, depression or addictive-like behaviors (Ambroggi et al., 2009; Deroche-Gamonet et al., 2003; Howell and Muglia, 2006; Tronche et al., 1999; Wei et al., 2004).

GC-GRs system is known to regulate neuronal survival. Chronically high circulating levels of GCs as well as clinical use of GCs to reduce CNS inflammation have unraveled the

deleterious effects that GCs can have on neuronal survival. The developing nervous system can be particularly sensitive to exogenous GCs, as it was shown that a single injection of GCs induces apoptotic cell death of developing granule cells of the cerebellum (Noguchi et al., 2008). Moreover, chronic exposure to GCs is known to injure hippocampal neurons, which are especially enriched in GR, exacerbating the excitotoxic glutamate-calcium-reactive oxygen species cascade. This has been observed particularly in the neurological setting of stroke and epileptic seizures, when a massive release of GCs also occurs (Kaufer et al., 2004). It is believed that, in the hippocampus low doses of GCs may exert pro-survival effects through the MR whereas prolonged GR activation induces neuronal death. It was also recently demonstrated in cortical neurons, that activation of GR by low doses of GCs results in GR binding to the anti-apoptotic protein Bcl-2 and, their translocation into mitochondria, increasing Ca^{2+} uptake efficiency into mitochondria and reducing the formation of reactive oxygen species. In response to high doses of GCs the binding of GR to Bcl-2 is inhibited resulting in an increased vulnerability of these neurons to cell death (Du et al., 2009; Sapolsky, 1996, 1999).

Another means by which GC-GRs can regulate neuronal survival is, indirectly, through their regulation of the inflammatory responses mediated by glial cells. Systemic pre-treatment with RU486 (or mifepristone, a GR receptor antagonist) was reported to exacerbate the inflammatory reaction triggered by intraparenchymal injections of lipopolysaccharide (LPS), leading to neuronal degeneration and suggesting an important role of the GR in neuronal survival (Nadeau and Rivest, 2003). On the other hand, systemic pre-treatment with LPS was found to reduce innate immune response triggered by this intraparenchymal injection of LPS, due to an increase in plasmatic levels of GCs (Nadeau and Rivest, 2002). Dexamethasone (DEX) was shown to prevent dopaminergic neurodegeneration triggered by LPS injection in the Substantia Nigra (SN) (Castano et al., 2002).

2. The inflammatory response in the CNS: role of GC-GR

2.1 Inflammation and innate immune response

Inflammation is, fundamentally, an adaptive response to noxious conditions. It is triggered by tissue injury or an infection as a protective response of an organism and its function is to repair damage and restore homeostasis. A typical inflammatory response is regulated by four classes of components: a) the inflammatory inducers; b) the sensors that detect them; c) the inflammatory mediators induced by the sensors; d) the target tissues affected by the mediators. The inflammatory reaction is initiated when cells of the innate immune system (e.g. macrophages, dendritic cells or microglia) use invariant receptors to detect a signal from a pathogen (pathogen-associated molecular patterns, or PAMPs), or damaged tissue (damage-associated molecular patterns, or DAMPs) triggers intracellularly a so-called “inflammatory cascade”, which is directed to: a) contain the damage or infection and b) activate the components of the adaptive immune system (lymphocyte infiltration, antibody production, development of an immunological memory). The hall marks of inflammation e.g. redness, swelling, heat or pain are mediated and resolved by innate immune cells. The recognition of highly conserved PAMPs by specific receptors expressed in innate immune cells (called pattern recognition receptors or PRRs) led to the elucidation of the molecular players involved in the triggering of the inflammatory cascade (Han and Ulevitch, 2005; Henson, 2005). The best characterized receptors are the Toll-like receptors (TLRs), which have been highly conserved through evolution. The list of TLR ligands include: peptidoglycan, lipoteichoic acid and Zymosan (TLR2), double-stranded RNA (TLR3), lipopolysaccharide or LPS (TLR4), flagellin (TLR5), single-stranded RNA (TLR7, TLR8), and non-methylated CpG motifs in DNA (TLR9) (Han and Ulevitch, 2005) (Fig.3). The stimulation of intracellular signaling cascade by these receptors results in the activation of

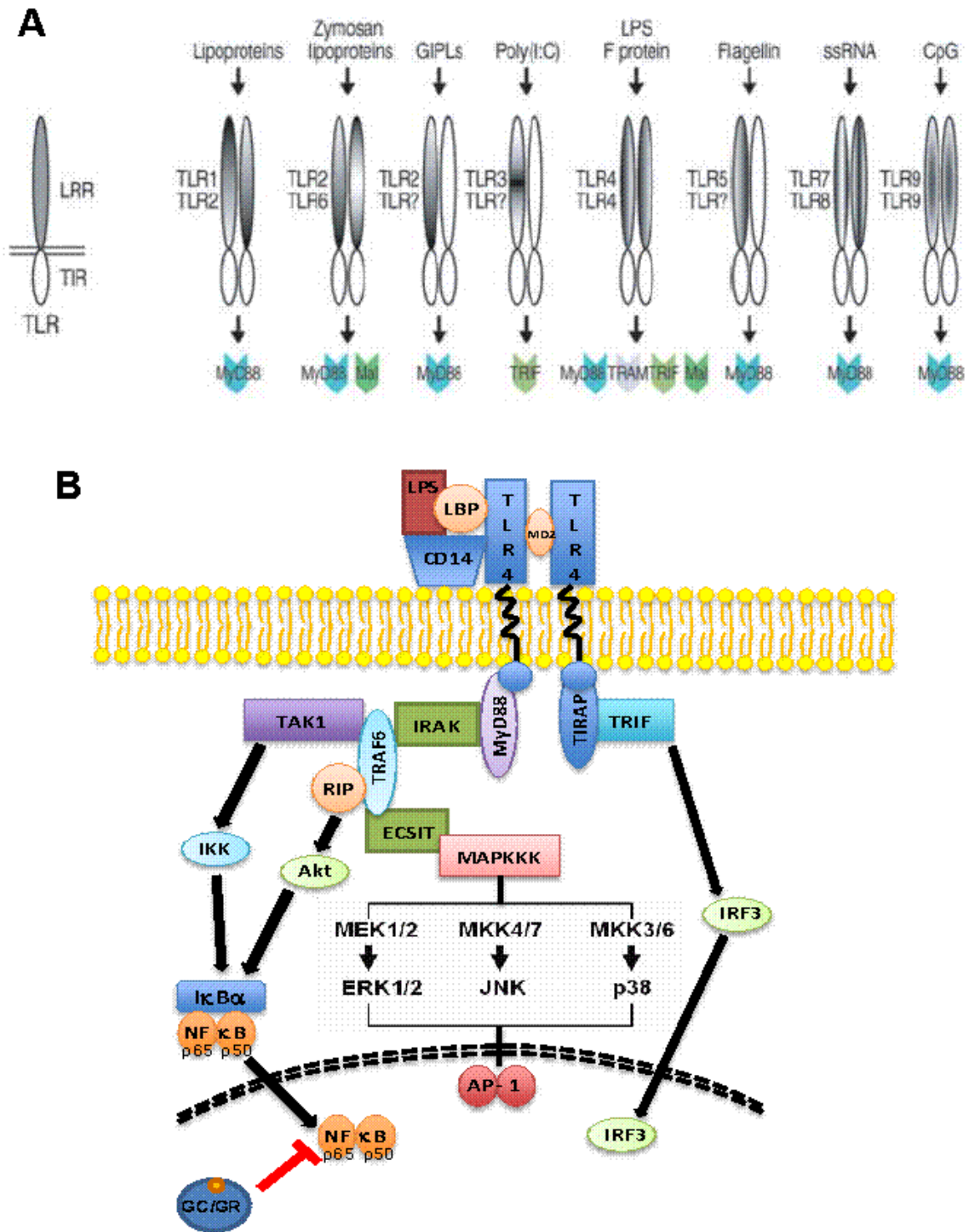


Figure 3. (A) Receptors of the innate immune system. TLRs recognize different structural components of microbes and act through selected adaptor molecules to initiate intracellular signaling. **(B) TLR4 signaling pathway.** LPS binds to CD14 and TLR4 inducing signaling pathways MyD88 dependent or independent. Finally, transcription factor like NF- κ B, IRF-3 y AP-1 are activated leading to an inflammatory response. (Modified from Dauphinee and Karsan, 2006 and from Han, 2005).

transcriptional factors, NF- κ B, interferon-regulatory factor (IRF) and Activated-Protein 1 (AP1). These transcription factors orchestrate the inflammatory reaction by regulating the expression of mediators, such as vasoactive peptides, some of the components of the complement system, lipid mediators, cytokines, chemokines and proteolytic enzymes. Among these factors, the cytokines and chemokines are crucial players in the inflammatory cascade (Luster, 1998). The cytokines Tumor Necrosis Factor α (TNF α) and Interleukine-6 (IL-6) can activate the brain endothelium to produce prostaglandins, in particular prostaglandin PGE2 that induces hypothalamic neurons to promote a sickness-associated behavior: fever, anorexia, fatigue, sleepiness and social withdrawal.

2.2 Inflammatory regulation. Role of GC-GR

The inflammatory process is tightly regulated, however all the regulatory mechanisms have not be fully uncovered yet. One hurdle is the great complexity and diversity in of the types inflammatory mediators, as well as their effects on target tissue. A major mode of regulation is the activation of anti-inflammatory signals that includes cytokines (i.e. IL-10), growth factors (i.e. TGF- β or BDNF) and GCs. These factors act on target tissues through receptors and by reversing the effects of pro-inflammatory mediators they can also regulate the duration of the inflammatory response.

GCs exert potent anti-inflammatory actions, however, their activity also dependent on the context of the inflammatory activation. GCs, by binding to GR, exert both transcriptional (trans-repression and trans-activation) and post-transcriptional actions (Beck et al., 2009; Clark, 2007; De Bosscher et al., 1997). By inhibiting the activity of transcription factors that orchestrate inflammation, namely NF- κ B and AP-1 or IRF, GC-GR can profoundly inhibit the inflammatory process. GC-GRs can inhibit genes activated through the TLR4 pathway by binding to p65 NF- κ B subunit (Ogawa et al., 2005) and modulate the expression of

molecules, which regulate and mediate inflammation. GR positively regulates positively the MAPK kinase pathway by up-regulating the expression of the DUSP1 (MKP-1) phosphatase that is expressed by macrophages/microglia and that dephosphorylates p38 kinase, thereby terminating JNK activation and AP-1 transcriptional activity (Abraham et al., 2006; Clark, 2007; Kassel et al., 2001). Its targets, which are inflammatory mediators, include cytokines (e.g. TNF α , IL-1), chemokines (e.g. RANTES and MCP-1/CCL2) and adhesion molecules (e.g. ICAM-1 or VCAM) (Barnes, 1998) (Fig. 4A).

At cellular levels GCs are able to induce apoptosis of immune cells like mast cells, eosinophils, macrophages, dendritic cells and T-lymphocytes (Smoak and Cidlowski, 2008) or decrease apoptosis in neutrophils and others cells of epithelial origin (Barnes, 1998) (Fig. 4B). This cell dependent regulation could be due to the existence of different GR isoforms, as well as to a variable genetic regulation specific for each cell type (Beck et al., 2009). GCs can induce clearance of apoptotic debris by increasing the phagocytic capacity of macrophages and inhibit immune cell trafficking by reducing the expression of cell adhesion molecules (Giles et al., 2001; Smoak and Cidlowski, 2008) (Fig.4B).

2.3 Acute versus chronic inflammatory reaction

There has been a considerable progress in understanding the molecular events involved in acute inflammatory reaction, particularly due to infection and, to a lesser extent to from tissue damage (Henson, 2005). In sterile tissue injury, acute inflammation promotes tissue repair and helps to prevent colonization of damaged tissue by opportunistic pathogens. The molecular triggers involved in sterile tissue injury have not been wholly characterized, although molecules from dying cells, chaperone proteins, extracellular matrix proteins have been suggested as candidates. The acute inflammatory reaction is terminated and the

A

TABLE 1 Effect of corticosteroids on gene transcription	
Increased transcription (trans-activation)	
Annexin I, lipocortin-1, phospholipase A ₂ inhibitor	
β ₂ -Adrenergic receptor	
Secretory leukoprotease inhibitor	
DC10 (phospholipase A ₂ inhibitor)	
IL-1 receptor antagonists	
IL-1 receptor type II (deacy receptor)	
iNOS	
GIL7	
MKP-1	
IL-10 (indirectly)	
Decreased transcription (trans-repression)	
Cytokines	
IL-1 to IL-6, IL-8, IL-11 to IL-13, IL-16 to IL-18, TNF-α, GM-CSF, SCF	
Chemokines	
IL-8, RANTES, MIP-1α, MCP-1, MCP-3, MCP-4, eotaxin	
Adhesion molecules	
ICAM-1, VCAM-1, E-selectin	
Inflammatory enzymes	
iNOS, inducible COX-2, cPLA ₂	
Inflammatory receptors	
Tachykinin NK ₁ and NK ₂ receptors, bradykinin B ₂ receptors	
Peptides	
Endothelin-1	
<p>CC10: Clara cell 10-kDa protein; IL: interleukin; iNOS: inhibitor of nuclear factor-κB; CLZ: glucocorticoid-induced leucine zipper protein; MKP: mitogen-activated protein kinase phosphatase; TNF: tumour necrosis factor; GM-CSF: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; SCF: stem cell factor; RANTES: regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted; MIP: macrophage inflammatory protein; MCP: monocyte chemoattractant protein; ICAM: intracellular adhesion molecule; VCAM: vascular cell adhesion molecule; iNOS: inducible nitric oxide synthase; cPLA₂: cytoplasmic phospholipase A₂.</p>	

B

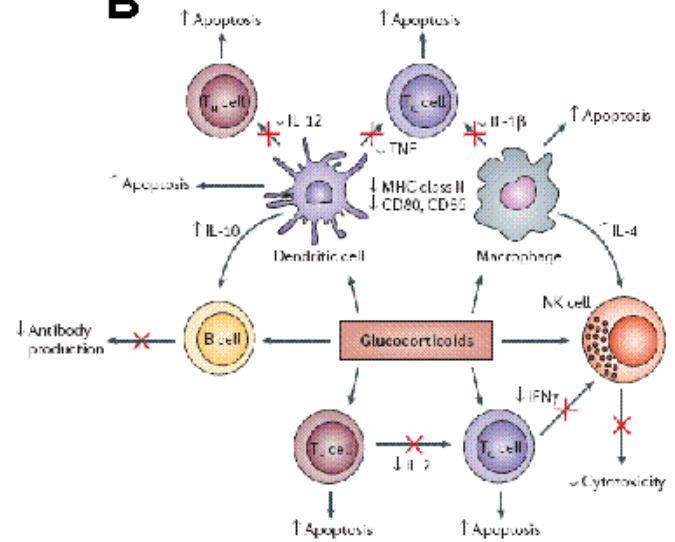


Figure 4. Effects of GCs on gene transcription and immune-cell populations. GCs inhibit transcription of inflammatory genes such as certain cytokines, chemokines and adhesion molecules, producing effects in fagocytosis, chemotaxis and cellular differentiation. Moreover GRs promote apoptosis of T-lymphocytes, eosinophils, macrophages and dendritic cells. (A) Summary table of GCs transcriptional effect over inflammatory genes. (B) Illustrated diagram of GCs effects on immune-cell populations (From Barnes et al., 2006 and Sternberg et al., 2006).

transition to homeostasis occurs once the initiating insult is eliminated and the damaged tissue is repaired. This termination process is highly regulated and is known as resolution of inflammation. If the inflammatory insult is not eliminated or the resolution phase does not function correctly chronic inflammatory state may occur which may be the result of chronic infections or persistent tissue damage (Nguyen et al., 2002). Nevertheless, there is a growing awareness that chronic inflammation may also occur when there is no obvious infectious agent or a tissue damage. This is observed in diseases, the incidence of which is increasing such as obesity, type 2 diabetes, cancer and neurodegenerative diseases. In these pathologies, there is a vicious cycle between inflammation and pathological process, where the chronic inflammatory state is often damaging the surrounding tissue (Perry et al., 2007). So far, little is known concerning the mechanisms that are involved in this type of chronic inflammation.

2.4 Resident microglia and astroglia are major effectors of innate immune responses in CNS

Classically, CNS is regarded as “immune-privileged” due to its particular anatomical location i.e. its special protection by the BBB (Sternberg, 2006). Although a linkage between immune system and CNS is known since long time, the first evidence of a way of communication between them was the description of the immune-HPA axis (Besedovsky and Rey, 2007). IL-1 was the first cytokine shown to activate the HPA axis, a characteristic shared by other cytokines, like IL-6. These are intimately involved with the neuronal populations that regulate the sickness-associated behavior. Another route by which immune activity in the periphery communicates with the brain is the afferent vagus nerve (Sternberg, 2006). By activating the HPA axis, the brain modulates immune cell responses through the release of GCs, which constitutes the main hormonal negative-feedback loop for CNS regulation of immunity (Sternberg, 2006).

In the brain, the resident microglia (brain macrophages) and astroglia form the first line of defense against any type of cell injury, or entry of an infectious agent. Microglia cells were first described in 1919 by Rio-Hortega as a cell population distinct from the other brain cells. Indeed, they have a myeloid origin and invade the CNS early in development as primitive macrophage. However, in the brain, we can differentiate between parenchymal microglia and perivascular microglia, which are continually renewed from the systemic monocytes (Hickey and Kimura, 1988; Hickey et al., 1992), being very abundant in highly vascularized brain areas. These perivascular macrophages have different phenotypes when compared to parenchymal microglia and appear differentially constrained by their local microenvironment (Ransohoff and Perry, 2009). Parenchymal microglia are distributed throughout the CNS and vary in density and morphology in different regions (Lawson et al., 1990). A “stranger” or “danger” signal rapidly leads to microglial activation, as can be appreciated by the characteristic morphological changes, from a resting state, with ramified morphology, to various activated forms, including amoeboid, rod-like or phagocytic morphology. However, this concept is changing because recent new studies, in particular in vivo imaging experiments of microglia expressing GFP (Nimmerjahn et al., 2005), indicate that in the healthy CNS, microglia should be regarded as “surveying” (and not “resting”). It is believed that, in normal conditions, microglia continuously act to maintain the homeostasis of the CNS environment; the exact roles in these conditions are not fully understood, except for their “surveillant” role, whereby their processes could be engulfing neuronal or glial debris. In response to changes in their microenvironment, the microglia can engage in various modes of progression, from the surveillant to the innate immune effector state (Ransohoff and Perry, 2009). The balance between positive and negative effects of activated/effector microglia depends on the activation conditions, the microenvironment changes, the molecules released by the microglia themselves or expressed at their cell surface and, not ultimately, how

microglia are receiving signals from neighboring cells (Hanisch and Kettenmann, 2007).

Several evidences suggest that also astrocytes have a role in the regulation of the local immune response (Farina et al., 2007). They form the glia limitans around blood vessels, limiting the access of immune cells to the brain parenchyma. TLR3 is the predominant PRR expressed in astrocytes and its activation results in the expression of cytokines (e.g. TNF, IL-6, GM-CSF, TGF-) and chemokines (e.g. CCL-2, CCL-5, CCL-8, CCL-10) (Bsibsi et al., 2002). This activation results in the disturbance of connexins and, thus, in the gap-junction-mediated communication between astrocytes.

During an inflammatory reaction, both microglia and astrocytes can contribute to brain injury through the release of cytokines and chemokines. Moreover, cytokines and chemokines are good candidates to be directly involved in the activation of adjacent glial cells in the brain, e.g. TNF seems to activate parenchymal microglia in a paracrine manner during endotoxaemia (Nguyen et al., 2002).

2.5 Chronic inflammation in neurodegenerative diseases

Glial activation is a histological hallmark of most neurodegenerative diseases. The presence of activated microglia have been described in brain of patients with Alzheimer, Parkinson's and Huntington diseases, as well as multiple sclerosis, suggesting that neuronal degeneration is associated with inflammatory events (McGeer et al., 1998; Nguyen et al., 2002). Moreover, high levels of inflammatory cytokines, such as IL-6, IL-1 and TNF have been found in serum and cerebrospinal fluid of patients with some of these neurodegenerative diseases (Mogi et al., 1994b; Mount et al., 2007; Nguyen et al., 2002; Reale et al., 2009). It is believed that chronic inflammatory process in the affected brain regions increases the susceptibility to cell death of specific neurons (Barcia et al., 2004; McGeer et al., 1988;

McGeer et al., 2003). In this scenario, use of anti-inflammatory drugs like GCs, apart from neutralizing antibodies and non-steroidal anti-inflammatory (NSAIDs), constitute a potential therapeutic tool (Allan and Rothwell, 2001).

3. Role of GC-GR in neurodegeneration: Parkinson's Disease

Parkinson's Disease (PD) is characterized by the loss of dopaminergic neurons (DNs) in the SN, which is responsible of striatal dopamine deficiency and subsequent alteration of basal ganglia circuitry. This phenomenon is the origin of the major motor symptoms of this neurodegenerative disease: akinesia/bradykinesia, tremor, rigidity and postural instability (Agid, 1991; Micheli, 2006). Although, non-motor fluctuations, like dysautonomic, mental and cognitive fluctuations, may also appear (Witjas et al., 2002).

3.1 The causes of Parkinson's Disease

About 90% of PD cases are sporadic forms and their appearance is determined by genetic and environmental factors. Only 10% of the cases belong to familiar forms, caused by mutations in key genes such as α -synuclein, parkin, PINK1, DJ-1 and LRRK2 (Bonifati et al., 2003; Hamza et al., 2010; Mata et al., 2004; Moore et al., 2005; Paisan-Ruiz et al., 2004; Singleton et al., 2003; Valente et al., 2004). The identification and study of genes involved in familial forms of PD has led to a greater comprehension of the molecular pathogenesis of PD, in particular of the involvement of oxidative stress, protein misfolding, impairment of the ubiquitin-proteasome system and inflammation (Fig. 5). Recently, and quite important for the present work of thesis, it has been described that sporadic PD may be related with polymorphism of the HLADR gene, involved in the development of inflammatory responses (Hamza et al., 2010).

On the other hand, in order to understand the pathogenesis of PD, many experimental

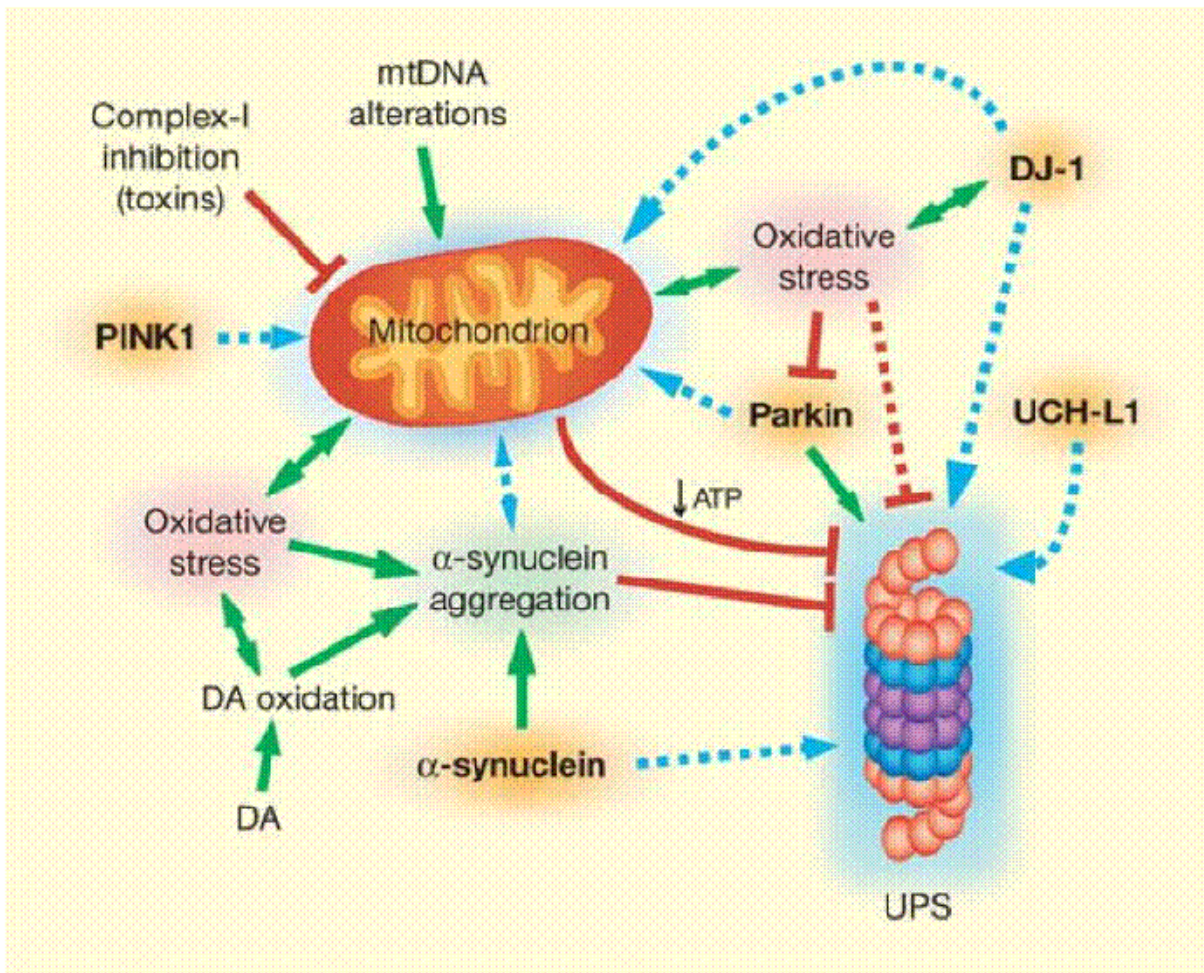


Figure 5. Pathogenesis of PD. Mutations in genes encoding α -synuclein, parkin, UCH-L1, PINK1, and DJ-1 are associated with familial forms of PD through pathogenic pathways that may commonly lead to deficits in mitochondrial and UPS function. PINK1, parkin, and DJ-1 may play a role in normal mitochondrial function, whereas parkin, UCH-L1, and DJ-1 may be involved in normal UPS function. α -synuclein fibrillization and aggregation is promoted by pathogenic mutations, oxidative stress, and oxidation of cytosolic dopamine (DA), leading to impaired UPS function and possibly mitochondrial damage. α -synuclein may normally be degraded by the UPS. Some environmental toxins and pesticides can inhibit complex-I and lead to mitochondrial dysfunction, whereas alterations in mitochondrial DNA (mtDNA) may influence mitochondrial function. Impaired mitochondrial function leads to oxidative stress, deficits in ATP synthesis, and α -synuclein aggregation, which may contribute to UPS dysfunction. Red lines indicate inhibitory effects, green arrows depict defined relationships between components or systems, and blue dashed arrows indicate proposed or putative relationships. (From Moore et al., 2005).

animal models have been developed. They are either toxin-administered animal models, which induce degeneration of DNs in the SNpc (e.g. 6-hydroxydopamine, rotenone, paraquat, trichloroethylene, MPTP), or transgenic mice, harboring the genes mutated in familial PD (Beal, 2010). The best characterized toxin-based model of PD is the intoxication with MPTP, which in primates replicates almost all of the cardinal clinical signs of PD. The use of these animal models of PD has allowed to establish different mechanisms, like oxidative stress, deficit in neuronal excitability and neuroinflammation, which may contribute to dopaminergic neurodegeneration in parkinsonism. The brains of animals intoxicated with MPTP show increased levels of reactive oxygen, accumulation of iron and nitrogen species, deficit in antioxidant processes, increasing oxidative stress and, finally, activation of apoptotic pathways. Similar alterations are seen in brains of PD patients (Hartmann and Hirsch, 2001; Jenner, 2003; Moore et al., 2005). Furthermore, as the disease progresses, deficit in excitability could also contribute to neurodegeneration. In fact, DNs survival require proper electrical stimulation and a decrease in electrophysiological activity may be detrimental. ROS production, accumulation of parkin and UCHL-1 protein dysfunction may result in a decrease of the excitatory activity in DNs (Michel et al., 2007). Ca^{2+} metabolism is another important factor for DN electrical activity and its alteration may be implicated in their vulnerability. Actually, it has been demonstrated that high cytoplasmic levels of Ca^{2+} , as well as Ca^{2+} inappropriate compartmentalization, can induce cytotoxicity, leading to DNs death by apoptosis or necrosis (Orrenius et al., 2003).

Both PD patients and human and monkeys parkinsonized with MPTP, show a dramatic mesencephalic dopaminergic loss, but, importantly, they present similar regional susceptibility to degeneration of the different dopaminergic populations. The SNpc is the most vulnerable region, followed by VTA, periretrorubral area and periaqueductal area. Moreover, the subregions in the SNpc also show different degrees of susceptibility: the

ventrolateral (SN $\alpha+\beta$) area is the most affected, followed by dorsal (SN γ) and lateral area (lat) (Damier et al., 1999b; Herrero et al., 1993b; Olszewski and Baxter, 1954) (Fig. 1 from study 1). The cause of this regional susceptibility is not completely known, but there are several hypotheses. For instance, the differential expression and post-transcriptional regulation of the dopamine transporter (DAT) and vesicular monoamine transporter (VMAT) (Afonso-Oramas et al., 2009; Miller et al., 1999; Uhl et al., 1994), the differential expression of proteasome activators (McNaught et al., 2010), as well as the glial reaction (Kanaan et al., 2008) and the presence of calbindin (a calcium binding protein) (Damier et al., 1999a; Yamada et al., 1990) have been proposed as possible reasons for this regional susceptibility.

3.2 Neuroinflammation in Parkinson's Disease

Among other factors, neuroinflammatory mechanisms have emerged as important contributors to the cascade of events leading to neuronal degeneration in PD. Post mortem histopathology of brains from patients with PD show activation of microglial cells and astrocytes, which suggests that the neuronal degeneration is associated with inflammatory responses (McGeer et al., 1988). However, it is still unclear whether glial activation precedes, or is secondary, to neurodegeneration. Previous studies in experimental parkinsonism have shown that exacerbated microglial activation lead to the degeneration of DNs (Barcia et al., 2004; Mount et al., 2007).

Besides local inflammation in damaged dopaminergic areas, characterized by activation of glial cells and infiltration of T cells (Barcia et al., 2011; Brochard et al., 2009; Forno et al., 1992; McGeer et al., 1998), in PD patients biochemical markers of the inflammatory response, such as certain cytokines, are also increased systemically (Hirsch and Hunot, 2009). Similarly, animal models of parkinsonism also show increased level of cytokines that may contribute to dopaminergic neurodegeneration (Barcia et al., 2011). In line

with this, epidemiological studies have shown that people who regularly use anti-inflammatory drugs have less risk of developing clinical PD (Chen et al., 2005; Chen et al., 2003). However, other studies only found a slight trend (Bower et al., 2006), or even no correlation, between the use of non-steroidal anti-inflammatory drugs and PD (Bornebroek et al., 2007; Hancock et al., 2007; Ton et al., 2006). These controversial evidences have led to test the neuroprotective role of anti-inflammatory drugs in Parkinsonism. A variety of non-steroid anti-inflammatory drugs (NSAIDs) has been tested in experimental Parkinsonism and many of them appear to be neuroprotective for DNs, being a potential therapeutic approach for PD (Bornebroek et al., 2007; Chen et al., 2005; Schiess, 2003; Wahner et al., 2007) Drugs, such as aspirin or ibuprofen, protect against induced dopaminergic degeneration (Aubin et al., 1998; Casper et al., 2000). The anti-inflammatory mechanisms may be diverse, but mainly NSAIDs act by inhibiting the enzyme cyclooxygenase-1 and -2 (COX-1 and COX-2) (Teismann and Ferger, 2001). In particular, in experimental Parkinsonism it has been established that COX-2, but not COX-1, is specifically involved in DN degeneration (Teismann et al., 2003). As the inflammatory response in Parkinsonism is not only observed locally in the brain, but also systemically, it has been suggested that other systems may be affected in response to inflammation. Cytokines may stimulate the release of other factors, such as acute phase protein or GCs, and may participate in the neurodegenerative disorder. In fact, alteration in HPA function has been described in PD patients (Stypula et al., 1996; Volpi et al., 1991), which suggest that dopaminergic degeneration may have an effect on GC metabolism, or vice-versa. We have recently demonstrated an increase in cortisol levels in PD patients (Ros-Bernal et al., 2011; Addendum-1) and, in experimental animals rendered parkinsonian with MPTP, a systemic increase in cortisol has also been reported (Mizobuchi et al., 1993; Ros-Bernal et al., 2011). This response could represent an attempt of the organism to protect, or rescue, damaged DNs.

In responses to neuronal damage, GCs mediate complex mechanisms, which are dependent on the status of the HPA axis and the levels of circulating GCs. Several reports (including studies performed in our laboratory) have shown that GC administration exerts a protective effect on DNs survival caused by the inhibition of the glial-mediated local inflammation (Kurkowska-Jastrzebska et al., 2004; Ros-Bernal et al., 2011), demonstrating the role of GC as modulator of the inflammatory response on glial cells (Marchetti et al., 2005; Morale et al., 2004; Ros-Bernal et al., 2011). However, GCs-GR signal is cell-type dependent (Herr et al., 2007; Sorrells et al., 2009), and even if GR is expressed at relatively high levels in most Tyrosine Hidroxilase (TH)-positive neurons of the mesencephalon (Ambroggi et al., 2009; Turiault et al., 2007), it remains unknown the direct effect that GCs-GR may exert on these neurons. To address this issue, one of the experimental sections of this thesis is focused on the direct role of GCs on DNs by using different models of Parkinsonism, both *in vivo* and *in vitro*. Our results demonstrate that GCs elicit a direct protecting effect on DNs, showing that not only the GR on microglia cells, but also that on dopaminergic neurons is essential for DNs survival (Fig.6). Therefore, therapies making use of GCs may contribute to the control of the neuroinflammatory process at different levels (Sorrells et al., 2009), directly on the inflammatory cells, as well as on the endogenous mechanisms of neuron survival.

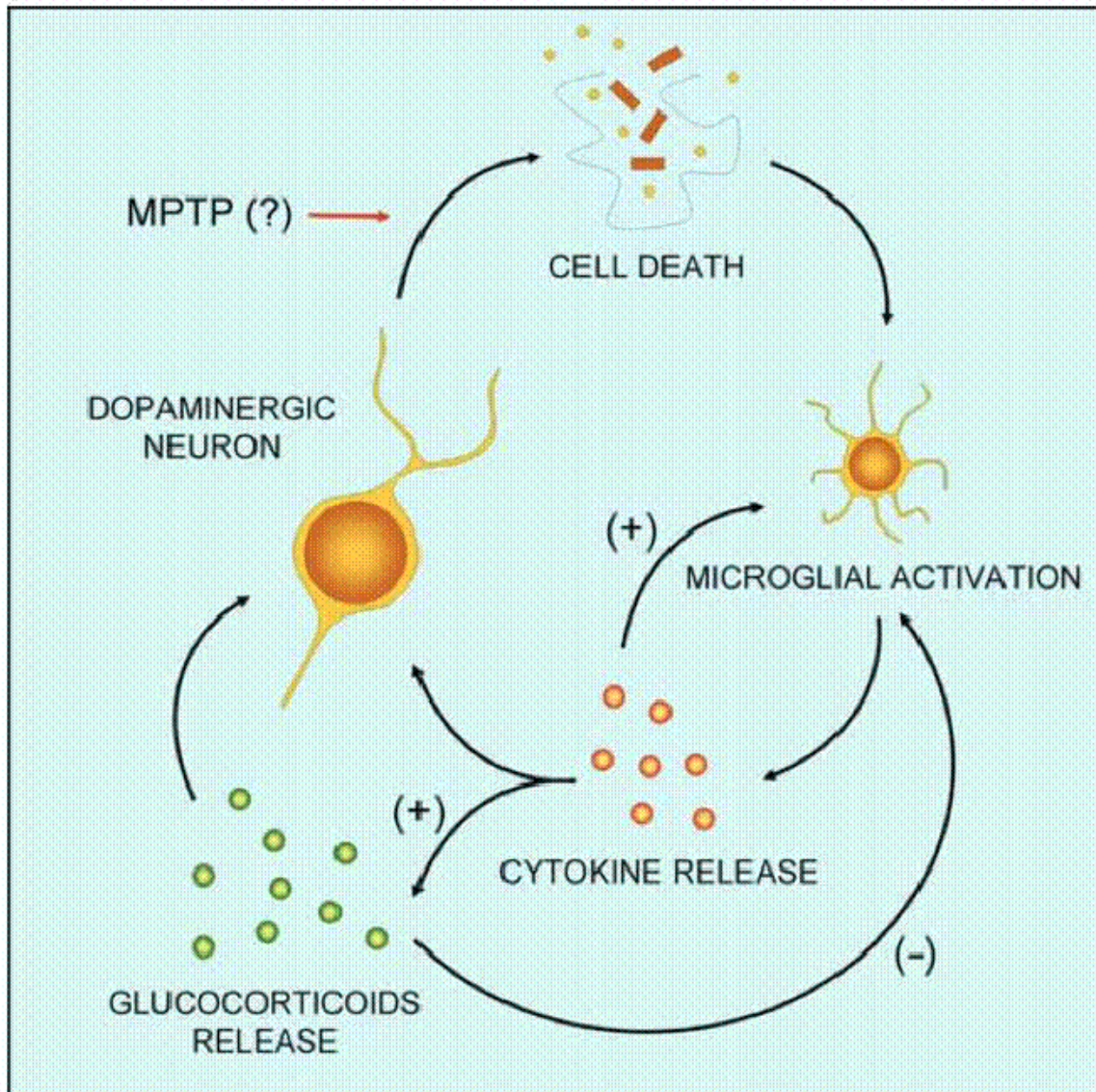


Figure 6. Role of cytokines and GCs in dopaminergic degeneration. MPTP or an unknown insult is able to induce cell death in DNs. This degeneration induces microglial activation characterized by cytokine release. Cytokine release may induce GCs release by HPA axis activation. GCs by their anti-inflammatory effects may indirectly protect DNs by microglial activation inhibition; however, GCS may also protect directly DNs through GR in these cells (From Barcia et al., 2009).

II. OBJECTIVES

Main objective of my research has been to examine the mechanisms by which glucocorticoids (GCs) and their receptors (GRs) regulate: a) dopaminergic neuronal survival in PD, and b) inflammation in the brain.

Although there is an extensive literature on the role of GCs-GR in inflammatory reactions mediated by peripheral immune cells, relatively less is known on how they govern inflammatory processes in the CNS, especially regarding the activation and the innate immune response of microglia and astroglia. This activation is known to promote either neuronal survival or neuronal injury; the outcome possibly depending on different factors, such as the state of the HPA axis and the levels of circulating GCs, which can affect GRs activation, the nature of insult and the intracellular signaling pathways triggered and the cell type(s) involved.

One of my objectives has been to examine the expression of GRs in DN_s and in activated glia in parkinsonian animal models developed in the laboratory at the University of Murcia (Campus Espinardo, Murcia). As previously specified, the evolution of motor symptoms in MPTP-intoxicated animal models resembles those observed in PD patients and so far it remains the drug-dependent model that is closest to PD. Therefore, to examine the role of GRs in inflammatory processes and neuron survival in the CNS, the objective persecuted in the laboratory in Paris, at the University Pierre et Marie Curie, has been to develop inflammatory and experimental PD models in mice, in which the GR gene has been selectively inactivated in cell type of interest. Specifically, principal aims were:

- 1) Determine GR expression pattern in the DN_s of SNpc in non-human primate model of PD.

- 2) Identify cells implicated in the neuroprotective role of GCs in PD by the use of parkinsonized mice, in which the GR is selectively inactivated in DN_s (GR^{DATCre} mice) and mesencephalic cultures.
- 3) Study the mechanisms through which the GR exerts its neuroprotective effects in Parkinsonism.
- 4) Characterize LPS-induced inflammation in a mouse line in which the GR is inactivated in microglia (GR^{LysMCre} mice) with respect to control mice
- 5) Study the potential role of the GR in microglia cell functions, as: proliferation, motility, and differentiation from an active to a phagocytic state.

III. EXPERIMENTAL APPROACHES

3.1 Murine models genetically modified in the GR gene: Cre/LoxP system

The use of genetically modified murine models is a very useful tool for a better understanding of the *in vivo* processes ruled by the complexity of GCs as active agents and the mechanisms of action of their GR. The GR is ubiquitously expressed in almost all kind of cells in the organism, showing different levels of expression in a tissue-dependent pattern: high levels are found in the liver, kidneys, spleen and certain brain areas, as the hippocampus (De Kloet et al., 1998; Pujols et al., 2002). This ubiquitous distribution makes impossible a study on the GR activity in adult animals by means of total-body gene knock-out, since the complete inactivation of the GR gene produces premature death. In order to solve this problem, previous works on GCs and the GR have used alternative pharmacological tools, such as GR agonists (DEX), GR antagonists (RU486) or the GCs depletion by adrenalectomy. However, these approaches equally resulted not efficacious, since they affect all cell types presenting the GR and produce mixed outcomes due to the sum of multiple changes.

At the aim to understand the effect of GCs-GR activity on each cell type and how they are involved in neurodegenerative diseases, we generated mouse lines in which GR is selectively inactivated in specific cell types by using the Cre/loxP system. This system uses the recombinase activity of the integrase Cre (Cyclisation recombination), which catalyzes the recombination of DNA between specific sites, known as loxP sequences, that flank specific binding sites for Cre. Then, the result of the recombination process depends on the localization of the loxP sites (Tronche et al., 2002). For GR gene, a GR^{loxP} allele was generated by inserting loxP sites flanking exon 3. GR^{loxP/loxP} mice are phenotypically similar to wild type mice (Tronche et al., 1998). Crossbreeding these mice with mouse lines presenting Cre under the control of the promoter region of a specific tissue or cell type, we

obtained mice devoid of the GR in these tissue, or cell type (Fig. 7). In the present work, we used GR^{DATCre} mice, which have the GR gene specifically inactivated in DN. These mice are generated by crossbreeding GR^{loxP/loxP} mice with DAT-iCre mice, which express the Cre recombinase under the control of the regulatory elements of the dopamine transporter (DAT) gene (Ambroggi et al., 2009; Turiault et al., 2007). In addition, we used GR^{LysMCre} mice, which have a specific inactivation of the GR gene in the monocyte/macrophages cell line (therefore, also in microglia), generated by crossbreeding the GR^{loxP/loxP} mice with LysMCre transgenic mice, which express the Cre recombinase under the control of the lysozyme M promoter (Clausen et al., 1999; Cross et al., 1988; Tuckermann et al., 2007). The experimental work of this thesis was based on the study of the specific role of the GR in microglia (GR^{LysMCre} mice) and DN (GR^{DATCre} mice) in an inflammatory and neurodegenerative animal model.

3.2 Experimental model of Parkinsonism: MPTP intoxication

One of the most accepted experimental models for studying the etiopathogenesis of PD is the intoxication with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), an analogue of the opioid drug MPPP, as described by Langston (Langston et al., 1983). MPTP induces selective dopaminergic neuron loss not only in humans, but also in several animal models, as non-human primates, in which MPTP produces an irreversible and severe Parkinsonism that mimics the clinical symptoms of PD (Herrero et al., 1993a; Herrero et al., 1993b; Przedborski et al., 2004). Moreover, MPTP treated monkeys significantly respond to L-DOPA treatments and develop dyskinesias (Herrero et al., 1996; Jenner, 2008).

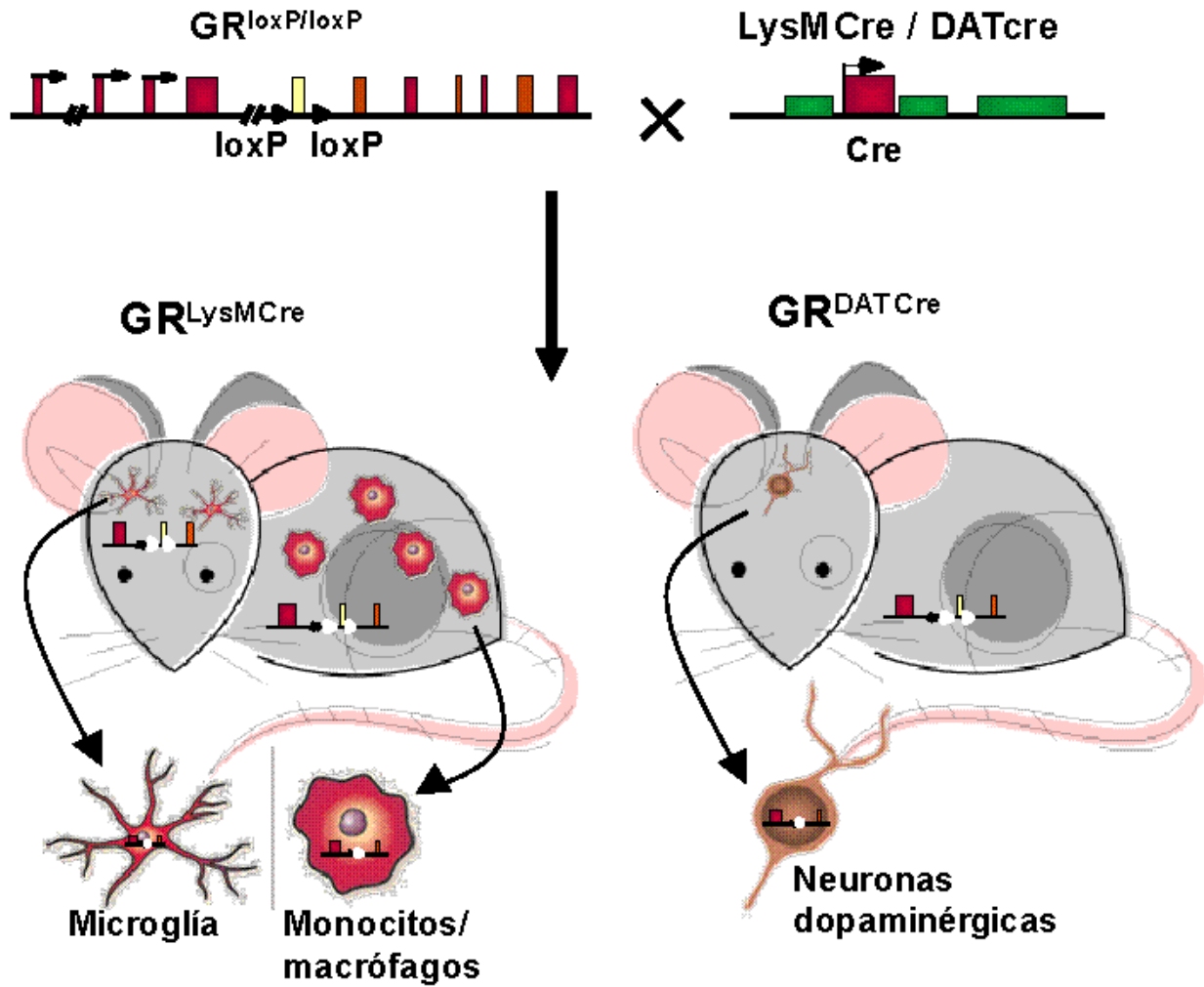


Figure 7. Genetically modified murine models by conditional mutagenesis with Cre/LoxP system. Crossing $GR^{loxP/loxP}$ mice with $LysMCre$ or $DATCre$ mice result in generation of $GR^{LysMCre}$ (with GR gene inactivated in monocytes/macrophages, therefore in microglia) or GR^{DATCre} (with GR gene inactivated in DNs) respectively.

MPTP itself is not toxic and, as any lipophilic compound, can cross the BBB. Once inside the brain, MPTP is metabolized to MPDP⁺ by the enzyme monoamine oxidase B present in glial and serotonergic cells and, finally, it is oxidized to MPP⁺, which is the active and neurotoxic compound. MPP⁺ is released into the extracellular space and captured by the dopamine transporter (DAT) present on the DNs membrane (Dauer and Przedborski, 2003) (Fig. 8). The main neurotoxic action of MPP⁺ is its capacity to inhibit the complex I of the mitochondrial electron transport chain. This effect alters ATP production, leading to toxic effects, as the production of reactive oxygen species (Przedborski and Vila, 2003).

In the experimental work of this thesis, we used the MPTP model of Parkinsonism for our *in vivo* and *in vitro* studies (see M&M study 1). Briefly, for the *in vivo* studies, we used brain tissue from: i) chronic parkinsonian macaques, which received MPTP injections during 3 months until they developed a stable Parkinsonism; ii) C57BL/6J and GR^{DAT^{Cre}} mice, which were intoxicated with a subchronic MPTP administration (30 mg/kg/day during 5 day and sacrificed 7 days after last injection) (Jackson-Lewis and Przedborski, 2007). The *in vitro* studies were established on mesencephalic cultures from rat embryos, exposed to low doses of MPP⁺, which was partially and selectively toxic for DNs (Escobar-Khondiker et al., 2008).

3.3 Model of acute inflammation: intraparenchymal injection of LPS

The reaction to the endotoxin LPS is the best-characterized example of innate immune recognition, which leads to an acute inflammatory response characterized by a dramatic accumulation of antigen presenting cells, that in the brain are represented by the microglia, surrounding the injected area (Nadeau and Rivest, 2002). As our objective was to analyze the role of the GCs-GR in the acute inflammatory processes in the brain, we performed a single LPS injection (1.5 g/l) in the striatum of the GR^{LysM^{Cre}} mice and their controls littermates, by using a stereotaxic apparatus (see M&M study 2). LPS striatal injections in GR^{LysM^{Cre}} mice

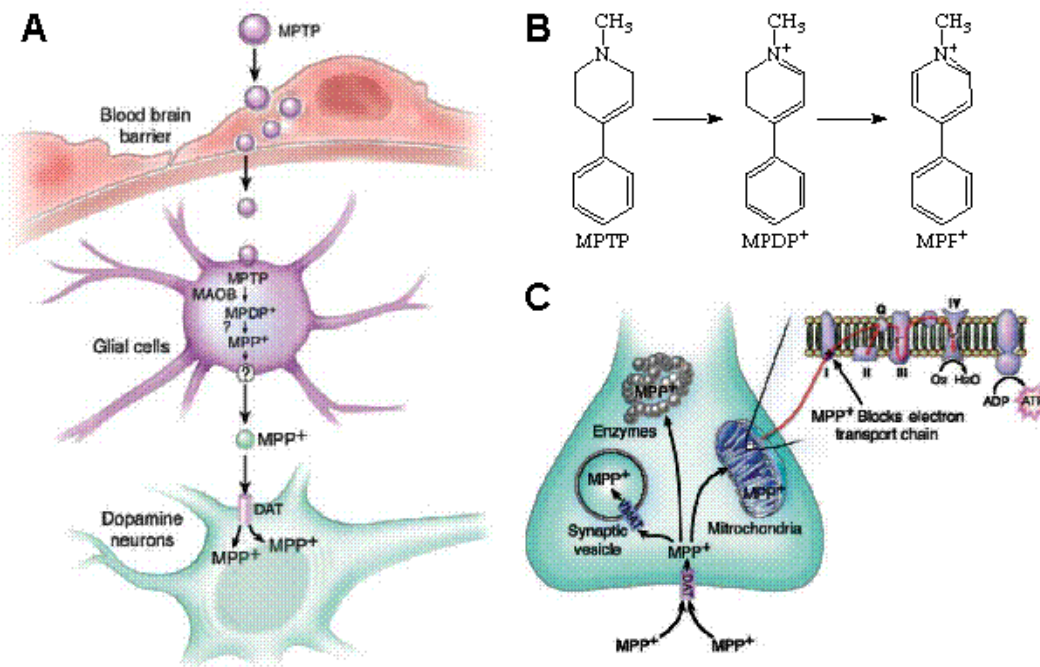


Figure 8. MPTP metabolism and intracellular pathways. (A) After systemic administration, MPTP crosses the blood-brain barrier. Once in the brain, MPTP is converted to MPDP⁺ by MAO-B in glial cells and serotonergic neurons and then to MPP⁺ by an unknown mechanism. Thereafter, MPP⁺ is released, again by an unknown mechanism into the extracellular space. MPP⁺ is concentrated into DNs via the dopamine transporter (DAT). (C) Inside DNs, MPP⁺ can go into the mitochondria and blocks complex I (X), which interrupts the transfer of electrons from complex I to ubiquinone (Q). This perturbation enhances the production of reactive oxygen species and decreases the synthesis of ATP. (B) Molecular structure of MPTP and its metabolites (From Dauer and Przedborski, 2003).

represent a reproducible model for studying the role of the inflammatory response mediated by GR activation.

IV. RESULTS

Summary manuscript 1

The role of glucocorticoids and glucocorticoid receptors in neuronal survival in Parkinsonism

Parkinson's disease (PD) is characterized by a slow and progressive degeneration of dopaminergic neurons (DNs) in the Substantia Nigra pars compacta (SNpc). This neuronal loss is responsible for a striatal dopamine deficiency, which leads to the development of representative motor symptoms of PD. Nowadays, although the cause of neuronal loss in PD is poorly understood, the discovery of genes associated with rare monogenic forms of the disease, designed as familial forms (10% of the total of cases), together with the intensive research using experimental animals models (i.e. MPTP intoxication), has allowed to identify factors and mechanisms, such as oxidative stress, excitotoxicity, protein misfolding, impairment of the ubiquitin-proteasome system and inflammation, as contributors to the molecular pathogenesis of the disease (Moore et al., 2005).

Numerous evidences from post-mortem and in vivo studies in PD suggest that neuroinflammatory processes are involved in dopaminergic neurons degeneration (Hirsch and Hunot, 2009). The primary immune response involves a glial-mediated response characterized by the release of pro-inflammatory cytokines and other factors. In line with this, glial (microglia and astroglia) activation has been described in the brain of PD patients and of subjects intoxicated with MPTP (Forno et al., 1992; Langston et al., 1999; McGeer et al., 1988). Along with this gliosis, CD8 and CD4 T lymphocytes have also been detected in the

brain of PD patients (Brochard et al., 2009). Moreover, serum and cerebrospinal fluid of patients with PD contain high levels of inflammatory cytokines, such as IL-6, IL-1, IFN and TNF (Mogi et al., 1994a; Mount et al., 2007; Reale et al., 2009). This inflamed environment may cause the interplay and cross-talk with endogenous anti-inflammatory compounds, such glucocorticoids (GCs), which may also participate in this response and, more importantly, confer neuroprotection. In fact, it has been previously shown that GCs mediate neuroprotective effects in experimental parkinsonism which is in part caused by inhibition of glial cell activation (Kurkowska-Jastrzebska et al., 2004; Marchetti et al., 2005; Morale et al., 2004). Moreover, in a previous study conducted in our laboratory on mice, which specifically lacked the glucocorticoid receptor (GR) in microglial cells (GR^{LysMCre}), we demonstrated that the GCs-GR signaling is indeed modulated in PD and that its deregulation can lead to a sustained inflammatory reaction and subsequent DNs injury (Addendum-1).

In the present study, our objective is to demonstrate that GCs confer dopaminergic neuroprotection, acting at different levels, not only by controlling the repression of glial cell activation and the release of pro-inflammatory molecule, but also by a direct activation of the GR residing in DNs. Our study on a chronic model of parkinsonism in primates has revealed that, after MPTP treatment, the survived DNs in the SNpc have higher levels of GR-activation, suggesting that the stimulation of activated GR may induce neuroprotection in parkinsonism. Moreover, we corroborate the neuroprotective effect of GCs in dopaminergic neurodegeneration in *in vitro* and *in vivo* parkinsonian models, showing that the absence of glial cells *in vitro* does not abolish the GC-mediated protection exerted over DNs and, importantly, that this effect is eliminated in the presence of the GR antagonist RU486. Our studies *in vivo* demonstrate that the specific silencing of the GR in DNs eliminates GC-mediated neuroprotection after MPTP administration. The neuroprotective role of GCs is not explained by their limited action by inhibiting the dopamine transporter present in DNs, but it

seems to be a consequence of the Ca^{2+} homeostasis modulation mediated by GR signaling in these neurons.

All together, these results demonstrate that the specific activation of the GR in DNs, both by endogenous or artificially administered GCs, may be beneficial for DNs and may contribute to neuronal survival in Parkinsonism. In conclusion, we establish that GCs exert a neuroprotective effect on dopaminergic neurodegeneration by activating the GR directly in DNs. Our results open up innovative therapeutic perspectives, since new approaches for PD treatment may be developed specifically targeting the neuronal GR.

The Stimulation of Glucocorticoid Receptor in Dopaminergic Neurons Mediates the Neuroprotective role of Glucocorticoids in Parkinsonism

María Ángeles Carrillo-de Sauvage^{1,2,3,4}, Serge Guerreiro^{5,6}, Carlos Barcia^{1,2}, Sébastien Parnaudeau³, Vicente de Pablos^{1,2}, Emiliano Fernandez-Villalba^{1,2}, Etienne C. Hirsch^{5,6,7}, François Tronche^{3,4}, Patrick P. Michel^{6,7}, Sheela Vyas^{3,4,5}, Herrero, M.T.^{1,2}

¹Clinical and Experimental Neuroscience, ²Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), School of Medicine, University of Murcia, Campus de Espinardo, 30071, Murcia, Spain.

³Institute of Biology, Collège de France, 11 Place Marcelin Berthelot, F-75505, Paris, France.

⁴CNRS UMR7224, INSERM U952, 9 Quai St Bernard, F-75005, Paris France

⁵CNRS, UMR7225, CRICM, Paris, France

⁶Université Pierre et Marie Curie Paris 06, Paris, France

⁷INSERM, UMR975, Paris, France

Running Title: Glucocorticoids and Parkinson's disease

Key Words: Parkinson's disease, inflammation, glucocorticoids, neuroprotection, glucocorticoids receptor, dopaminergic neurons.

Corresponding Author: Maria-Trinidad Herrero
Clinical and Experimental Neuroscience,
CIBERNED
School of Medicine, University of Murcia,
Campus de Espinardo, 30071,
Murcia, Spain.
mtherrer@um.es

ABSTRACT

Patients with Parkinson's disease (PD) present a plethora of altered pro-inflammatory compounds which may contribute to dopaminergic neurodegeneration. The primary immune response of the dopaminergic degenerating areas involves a glial-mediated response characterized by the release of pro-inflammatory cytokines and other factors. This inflamed environment may cause the interplay and cross-talk with endogenous anti-inflammatory compounds such Glucocorticoids (GCs) which may also participate in this response and, importantly, confer neuroprotection. It has been previously reported that GCs mediate a neuroprotective effect in experimental Parkinsonism, in part through inhibition of glial cell activation. In this study, we demonstrate that GCs elicit a protective role in experimental Parkinsonism also by directly stimulating the GCs receptor (GR) located in dopaminergic neurons even without the intervention of glial cells. We show that the absence of glial cells *in vitro* does not abolish the GCs-mediated protection exerted over dopaminergic neurons and importantly this effect is suppressed by the presence of the GR antagonist RU486. Importantly, studies *in vivo* demonstrate that the specific silencing of GR, exclusively in dopaminergic neurons, eliminates the GC-mediated neuroprotection after sub-chronic MPTP administration. Finally, in a chronic model of MPTP-induced Parkinsonism in primates, we show that survived dopaminergic neurons in the SNpc have higher levels of GR-activation respect to control monkeys, suggesting that the intracellular signaling derived from activated GRs may promote neuroprotection. All together, these results demonstrate that the specific activation of the GR in dopaminergic neurons, by either endogenous or artificial administration of GCs, may be beneficial for dopaminergic neurons and may contribute to neuron survival in parkinsonism.

INTRODUCTION

Parkinson's disease (PD) is a progressive neurodegenerative disorder, prevalent in aged population, characterized by a substantial loss of the neuro-melanized dopaminergic neurons (DNs) of the substantia nigra pars compacta (SNpc) (70-80%) and by dopamine levels depletion in the striatum. This loss is the primary cause of the cardinal motor symptoms that characterize PD: resting tremor, rigidity, bradykinesia and postural instability (Agid, 1991; Redgrave et al 2010). Previous studies have suggested that substantial DN loss and striatal dopamine depletion occurs in the 5-10 years preceding the clinical signs, representing the „acute“ phase of the disease, which is followed by a slower phase of progressive functional decline of the nigro-striatal pathway (Gibb and Lees, 1988; Nandhagopal et al., 2009; Redgrave et al, 2010).

Extensive studies on PD patients, as well as on experimental models based on the use of either animals (mice, monkeys) injected with neurotoxins, e.g. MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine), specifically affecting DNs or transgenic mice harboring mutated genes as identified in familial forms of PD, have shown the nigro-striatal degeneration results from the involvement of multiple molecular processes. Oxidative stress, mitochondria malfunctioning, altered protein degradation, loss of intracellular Ca^{2+} homeostasis and glia activation can all contribute to DN loss (Chan et al., 2009; Moore et al., 2005). MPTP administration in both mice and non-human primates, specifically affects DNs of the SNpc and their nerve endings in the striatum, as well as tyrosine hydroxylase (TH)-containing neurons in mesencephalic cell cultures, by inhibiting the complex I of the electron transport chain in mitochondria (Przedborski and Vila, 2003). Mechanistic studies on DN death caused by MPTP, revealed activation of apoptotic, or programmed cell death, pathways during degeneration (Mattson, 2000). Indeed, presence of apoptosis and modulation of the expression of its regulators and effectors, e.g. B1-2, Bcl-x1, Bax and activated caspases, was demonstrated in the SN and striatum of parkinsonian post-mortem brains (Fiskum et al., 2003; Hartmann et al., 2000; Hartmann et al., 2001; Vila et al., 2001). The deleterious effects of pro-inflammatory mediators released by activated microglia, astroglia and T cells during MPTP-induced

DN degeneration (Hirsch and Hunot, 2009) suggest that both apoptotic and necrotic effectors may be responsible for DN death. Moreover, it is well documented that pro-survival factors, such as GDNF or BDNF, as well as anti-apoptotic molecules can be promising therapeutic approaches in PD (Hou et al., 1996; Hyman et al., 1991). In this respect, it has been recently reported that the homeobox-containing transcription factors play a role in both maintaining dopaminergic neurotransmission and promoting DN survival (Haubenberger et al., 2011).

Glucocorticoids (GCs) are potential regulators of DN survival. GCs released in response to stress activate their receptors, the glucocorticoid receptors (GRs). GRs are members of a large family of nuclear receptor transcription factors, ubiquitously expressed, with wide range of actions (De Kloet et al., 1998; Elenkov and Chrousos, 2002). The anti-inflammatory role of GCs and their receptors was investigated in experimental MPTP animal models of PD, showing that inhibition of GRs down regulated glia-induced inflammation and protected DNs against MPTP intoxication (Marchetti et al., 2005; Morale et al., 2004). We recently reported, by using transgenic mice harboring selective inactivation of the GR gene in either microglia or DNs, that microglial GRs activated by endogenous GCs play a crucial role in DN survival in the MPTP model of PD (Ros-Bernal et al., 2011). In addition to their activity on glial cells, GC-GRs are also reported to concur to protective effects on neurons. Moderate levels of GCs were shown to exert their neuroprotective role via GR by different mechanisms: e.g. activating the tyrosine kinase B receptor (TrkB) or binding to Bcl-2 and therefore regulating mitochondrial Ca^{2+} levels (Benkovic et al., 2009; Du et al., 2009; Jeanneteau et al., 2008). However, GC-GR are also known to induce directly neuronal death in selected brain regions, as the striatum, hippocampus and prefrontal cortex (Almeida et al., 2000; Crochemore et al., 2005; Haynes et al., 2001; Haynes et al., 2003; Kaufer et al., 2004). In addition to this regional sensitivity, the pro-survival role of GRs is also dependent on the circulating levels of GCs, which are strictly regulated by the Hypothalamus Pituitary (HPA) axis. Therefore, in conditions of chronically high levels of endogenous GCs, the GR activity can be detrimental for both neurons and glial cells (Sorrells et al., 2009). In PD patients, several studies, including our recent work, found significantly high levels of circulating cortisol, as well as changes in its 24 hr secretory pattern (Hartmann et al., 1997; Stypula et

al., 1996; Volpi et al., 1991). In MPTP-treated animals, systemic levels of GCs were also increased, however, unlike in PD patients, this increase was not sustained (Barcia et al., 2003; Hineno et al., 1992; Mizobuchi et al., 1993), suggesting that changes in the HPA function in PD may be directly caused by the ongoing pathogenic processes, or be part of the disease itself. In addition to high cortisol levels, we also showed, in both PD patients and in MPTP-treated mice, that total GR levels are modulated (Ros-Bernal et al., 2011).

To explore the hypothesis that GR activity may play a role in DNs during PD, we examined their expression in macaque monkeys chronically treated with low doses of MPTP. Our results reveal that a high percentage of DNs in SNpc, which survive intoxication, express GRs, implying that these receptors may be important in sustaining DN survival. Moreover, we show that GRs activated by dexamethasone (DEX) exert a direct survival action on TH-positive neurons *in vitro* in mesecephalic cultures treated with MPTP. These *in vitro* results have been corroborated in *in vivo* studies, using transgenic mice in which the GR is specifically knocked out in the DNs. *In vivo*, the protective activity of the GR on DNs after sub-chronic MPTP treatment was found to occur only with supra-physiological levels of corticosterone (CORT). The results on potential neuroprotective mechanisms triggered by the GR activation in DNs reveals that these receptors are most likely involved in maintaining the physiological levels of cytoplasmic Ca^{2+} by modulating the activity of ryanodine receptors.

MATERIALS AND METHODS

Experimental procedures for animal studies

Parkinsonian monkeys

The brain tissue used in the present study was obtained from chronic parkinsonian and control macaques (*Macaca fascicularis*), which have been studied along the years in the Primate Unit of the University of Murcia. All studies were carried out in accordance with the Guidelines of the European Convention for the protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific

Purposes of the Council of Europe of 2006, the Helsinki Declaration, the International Primatological Society Guidelines and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Guide, revised 1996).

MPTP treatment. Four young adult animals of both sexes were injected weekly with low doses of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP; 0.3 mg/Kg) through the saphenous vein for a period of 3 months (Barcia et al., 2003; Herrero et al., 1993). Other four untreated monkeys were used as controls. No animal was treated with L-DOPA or other dopaminergic agonists. Parkinsonian symptoms were assessed using a previously described rating scale (Herrero et al., 1993; Luquin et al., 1992).

Tissue preparation and immunostaining. The monkeys were sacrificed with a lethal injection of pentobarbital after ketamine anaesthesia, two years after the last MPTP administration. The brains were removed and fixed for 3 days in 4% paraformaldehyde (PFA) dissolved in 0.1 M phosphate buffer (PB), after which the mesencephalon was sectioned into 40 μm thick coronal serial sections at a vibratome (Microm, HM400). Series of sections regularly spaced at intervals of 1440 μm were immunolabeled for tyrosine hydroxylase (TH) (sheep polyclonal antibody, diluted 1:500; Chemicon, Temecula, CA, USA), in order to quantify the loss of DNs, and for the GR (mouse monoclonal antibody, diluted 1:100; 3D5 ab9568, Abcam, Cambridge, UK), in order to determine the expression pattern of the GR in the population of mesencephalic DNs.

Parkinsonian mice

Twelve-week-old male C57BL/6J mice (Charles River, France) and fourteen-week-old male GR^{DATCre} mice and their littermates, generated in F. Tronche's laboratory (Turiault et al., 2007), were used in the present study. Mice were group-housed under a controlled photoperiod (12h day-night cycles), at constant room temperature (22°C) and had access to food and water ad libitum. GR^{DATCre} mice were genotyped for the presence of the Cre transgene either by dot- blot or polymerase chain reaction (PCR) analysis. All studies were performed in accordance with the Guidelines of the European

Convention for the protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes of the Council of Europe of 2006, the Helsinki Declaration.

MPTP treatment. Mice received a daily injection of MPTP (30 mg/kg), or the same volume of saline, for five consecutive days as previously described (Jackson-Lewis and Przedborski, 2007), and were sacrificed seven days after the last injection ($n = 6$ per group for the C57BL/6J mice, $n = 5$ per group for the GR^{DATCre} mice).

Corticosterone treatment. For the corticosterone (CORT) treatment, we used the protocol by David et al (David et al., 2009). Briefly, CORT (35 μ g/ml equivalent to 5 mg/kg/day) was dissolved in a solution of 0.45% β -cyclodextrine (β -CD) (both from Sigma-Aldrich) by bath sonication. Mice were given ad libitum either β -CD or CORT+ β -CD ad libitum in drinking water administered in opaque drinking bottles. For C57BL/6J mice, we established four different groups: 1) Saline injected/non-CORT treated-mice (to which β -CD was given); 2) Saline/CORT treated mice, which received CORT treatment during both saline injections and the following week until the sacrifice; 3) MPTP injected /non-CORT treated-mice (to which β -CD were given); 4) MPTP/CORT treated mice, which received CORT during both MPTP administration and the following week until the sacrifice. For GR^{DATCre} mice and their control littermates we established six different groups: 1) GR^{loxP/loxP}/Saline/Non-treated mice, 2) GR^{loxP/loxP} /MPTP/Non-treated mice, 3) GR^{loxP/loxP} /Saline/CORT treated mice, 4) GR^{DATCre}/Saline/Non-treated mice, 5) GR^{DATCre}/MPTP/Non-treated mice, 6) GR^{DATCre}/Saline/CORT treated mice. Drinking bottles were weighed every three days in order to control the drinking activity of the animals.

Plasma CORT levels analysis. Blood from GR^{DATCre} and GR^{loxP/loxP} mice was collected from the tail vein in chilled tubes containing an EDTA solution, within 120 seconds after starting mouse manipulating the mice, at day 1 and 7 after MPTP administration. The blood was centrifuged (a first time at 1600g, at 4°C, for 10 minutes and then at 2600g, at 4°C, for 15min) and the plasma collected and stored at -80°C for later analysis. Basal CORT levels were always determined in the blood taken

between 7 a.m. and 9 a.m. CORT levels were determined by using a highly specific CORT antiserum (kit Immunochem™ Corticosterone- MP Biomedicals, Orangeburg, NY, USA).

Tissue preparation and immunostaining. Seven days after MPTP injections the mice were anesthetized with an intraperitoneal overdose of Ketamine (50 mg/kg) and perfused with PBS followed by 4% PFA in 0.1 M PB. Brain tissue was removed and post-fixed in 4% PFA for 48 hours. The mesencephalon and the striatum were sectioned into 40 µm-thick coronal serial sections (Vibratome, Leica), immunolabeled for either TH (mouse monoclonal antibody, diluted 1:1000; Chemicon, Temecula, CA, USA) or GR, by using the same antibody as for monkeys. And then counterstained with cresyl violet.

Immunohistochemistry and immunofluorescence common procedures

Immunohistochemistry. Sections of the SNpc and striatum (40 µm) were incubated in 0.3% H₂O₂ to inhibit endogenous peroxidase activity and successively, in 10% horse serum, to block non-specific Fc binding sites were blocked with. Sections were, therefore, incubated for 48 hours (at 4°C, under constant shaking) with either of the primary antibodies (see above) diluted in PBS containing 1% horse serum, 0.5% Triton X-100, and 0.01% sodium azide. After a thorough rinse in pBS, sections were incubated for 4 hours in the appropriate secondary antibody, diluted 1:750 in the same solution as above. Antigen-antibody binding sites were detected with the avidin-biotin peroxidase system (ABC kit, Vectastain, Vector Labs). Sections were mounted on gelatin-coated slides and dehydrated in a graded ethanol series and xylene before being coverslipped.

Immunofluorescence. Sections of the SNpc and striatum were treated with 0.5% citrate buffer (at 65°C, under constant shaking) for 30 minutes to maximize antibody penetration into the tissue. Non-specific Fc binding sites were blocked with 10% horse serum and sections were then incubated for 48 hours (at 4°C, under constant shaking) with either of the primary antibodies diluted in PBS containing 1% horse serum, 0.5% Triton X-100, and 0.01% sodium azide. After several rinses in PBS, the sections were incubated for 4 hours in the appropriate fluorescence-labeled secondary antibody, Alexa 488-

conjugated and Alexa 594-conjugated (Molecular Probes), diluted 1:1000, rinsed again, and then incubated with the DAPI nuclear staining, diluted 1:1000 in 1X PBS, for 30 minutes. After a final rinse in PBS, sections were mounted and viewed under either a conventional fluorescence microscope (Zeiss Axioplan 2) or a confocal microscope (Leica DMIRE2) for quantitative analysis.

Quantification and stereological analysis. SNpc was defined according to the Monkey and Mouse Brain Atlas (Paxinos and Franklin, 2001; Paxinos and Huang, 2000). Quantification of immunopositive cells was performed on serial coronal sections analysed at bright-field microscopy (Nikon) equipped with a camera and the Mercator image analysis software (Explora Nova, La Rochelle, France). The quantification was performed blindly for the researcher. The number of cells was quantified stereologically on evenly spaced sections covering the whole SNpc. Data were expressed as the absolute number of positive cells in each anatomical region analyzed. As previously described (Barcia et al., 2004), the loss of dopaminergic fibers in the striatum was analyzed by measuring the optical density of the TH immunoreactivity with ImageJ software. Results were expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM).

Fluorescence microscopy and confocal analysis. Both analysis, with conventional fluorescence and confocal microscope were done. In order to quantify TH immunopositive (TH+) cells containing GR immunopositive profiles in the SNpc, a conventional microscope, connected to a digital camera, was used. Images taken with either one of fluorophores were combined and quantified using the ImageJ software. In order to conduct a more precise analysis of the different sub-regions of the SNpc, brain sections were examined at a Leica DMIRE2 confocal microscope. Samples were scanned with the 40 x oil objective and processed with the Leica Confocal Software (Leica Microsystems). A series range for each section was set, determining an upper and a lower threshold using the Z/Y position, obtaining a Spatial Image Series setting [for further details see previous publications (Barcia et al., 2006; Barcia et al., 2008)]. Images can be illustrated as they appear throughout the stack of sections as a simple 0.5 μ m layer or as a transparency of all layers merged together. Over the stacks of images we quantified more than two hundred neurons for each monkey and two pictures for each mouse SNpc.

Experimental procedures for in vitro studies

Establishment of midbrain cultures and treatments. Cultures were prepared from the ventral mesencephalon of Wistar rat embryos, at 15.5 days of gestation (Janvier Breeding Center, Le Genest St Isle, France) using a protocol previously described (Toulorge et al, 2010). The cultures were maintained in N5 medium supplemented with 5 mM glucose, 5% horse serum and 0.5% fetal calf serum, except for the first 3 days in vitro (DIV), when the concentration of fetal calf serum was 2.5% to favor initial maturation (Guerreiro et al., 2008). The cultures were additionally exposed to 30 mM K⁺ and 1μM MK-801 to stop the spontaneous death of DNs occurring in this experimental setting (Douhou et al., 2001). TH⁺ neurons, which represented ~ 2% of the total neuron number at the time of plating, were exclusively dopaminergic (Traver et al., 2006).

Treatments paradigms to evaluate GR-mediated neuroprotection. The neuroprotective potential of GR agonists was evaluated using a paradigm in which the death of DNs was triggered by treating the cultures from DIV 5 to DIV 7 with 3 μM MPP⁺ followed by a washout of 3 days before assessment of neuronal survival (Guerreiro et al., 2008). 3μM MPP⁺ concentration was chosen to produce a loss of TH⁺ neurons, which was only partial. Except when mentioned, treatments with GR agonists were initiated one day before adding MPP⁺ and terminated at 10 DIV.

Immunofluorescent detection protocols. The cells were fixed with 4% PFA in Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS) and processed for immunofluorescence. DNs were immunolocalized with a rabbit polyclonal anti-TH antibody (diluted 1:1000; Pelfreeze, Rogers, AR, USA), astrocytes with a rabbit glial fibrillary acidic protein (GFAP) antibody (diluted 1:100; Dako France, Glostrup, Denmark) and microglia with either a rabbit anti-ionized calcium binding adapter-1 (Iba-1) antibody (diluted 1:500; Wako, Neuss, Germany) or a mouse anti-OX42 antibody (diluted 1:50; clone MRC OX-42; Serotec, Oxford, England). A monoclonal anti-vimentin antibody (diluted 1:100; Clone V9; Dako, France) was utilized to label all glial cells, regardless of their phenotype. In some of the experiments, detection of TH, Iba-1 and GFAP, was followed by that of GR using a monoclonal antibody (3D5 ab9568, Abcam, Cambridge, UK), at a dilution of 1:100. All antibodies were diluted in PBS containing

0.2% Triton X-100, except for the anti-Iba-1 antibody, which was diluted in PBS only. Detection of primary antibodies was performed with a cyanin-3 (Cy3)-conjugated anti-mouse IgG antibody, for GR, vimentin and OX-42 (diluted 1:500; Sigma-Aldrich) and an Alexa Fluor 488 conjugate anti-rabbit IgG antibody, for TH, GFAP and Iba-1 (diluted 1:500; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Cell counting was performed at a 200X, using a 20X objective matched with a 10X ocular. The number of TH positive cells in each culture well was estimated after counting 20 visual fields distributed along the X- and Y-axes. Counts of glial cells were performed in five visual fields randomly distributed in the whole surface area of each culture well.

GR immunoblot. The expression of GR in our cultures was also verified by immunoblot. Proteins were extracted from cultures treated with DEX at DIV 10, using AllPrep RNA/Protein Kit (Qiagen group), and their concentration measured using the BCA protein assay (Thermo Scientific). 10g of total protein were loaded onto a 10% polyacrylamide gel and transferred onto a nitrocellulose membranes. The membrane was blocked with 5% low-fat milk in PBS + 0.1% Tween-20 at room temperature for 2 hours, in order to inhibit non-specific binding sites. The membrane was incubated for 48 h at 4°C with the mouse anti-GR antibody (diluted 1:500), rinsed in buffer and incubated for 2h with an anti-mouse peroxidase-conjugated secondary antibody, diluted 1:5000 (Amersham Biosciences). Antibody binding sites were revealed using the Super Signal enhanced chemiluminescence kit (Pierce, Rockford, IL).

Quantification and identification of proliferating cells. [Methyl-3H]-thymidine, a marker of DNA synthesis, was used to label and quantify proliferating cells, as previously described (Mourlevat et al., 2003). Mesencephalic cell cultures, maintained up to 7 DIV in the presence of test treatments, were exposed to 1Ci of [methyl-3H]thymidine (40 Ci/mmol; GE Healthcare) for 2 h, at 37°C, in the serum-free N5 medium supplemented with 5 mM of glucose. After three rapid washes, the cells were allowed to recover for 1 h in the same culture medium to remove unincorporated radioactivity. The cultures were fixed in 4% PFA for 15 min and, when necessary, subsequently processed for the detection of TH by immunofluorescence. The cultures were finally dehydrated in ethanol alcohol and exposed to Hypercoat LM-1 emulsion (GE Healthcare) for 4 days at 4°C to detect tritiated labeling in the cell nuclei.

Quantification of dopamine uptake. The uptake of dopamine was evaluated with [³H]-DA (40 Ci/ mmol) as described before (Guerreiro et al. 2008). Blank values were obtained in the presence of 1 μM GBR 12909.

Calcium measurements. Cytoplasmic free calcium (Ca^{2+}_{cyt}) levels were measured in individual neurons using the cell permeant Fluo-4 (Invitrogen; 10 μM), according to a previously described protocol (Guerreiro et al. 2008). Fluorescent images of randomly chosen fields (6-10 in each culture condition) were acquired with a 40X fluorescent objective. Fractional fluorescence (F/F₀) was evaluated by dividing the average fluorescence intensity of the neurons in each collected image of treated cultures by the average fluorescence levels of corresponding underground. A minimum of 300 neurons was analyzed for each test condition.

Statistical Analysis

Results are expressed as the mean ± SEM. The criteria used to choose the statistical test to analyze the data were determined by the comparison required and the number of factors present in the experiments. Student's t test was performed in experiments where simple comparisons between two groups were required. One-way ANOVA, followed by the post hoc test Dunnett's test, was performed in experiments where multiple comparisons against a single reference group were required. Finally, two-way ANOVA was performed, and the post hoc tests were carried out with Duncan's method, when there were two factors to compare. The null hypothesis was rejected for a risk equal to 5%. All statistical analyses were performed using the SigmaStat 3.5 software (Copyright 2005 SYSTAT Software).

RESULTS

GR nuclear expression is associated with surviving dopaminergic neurons in vulnerable regions of SNpc in MPTP-treated monkeys

In our previous study, we showed that the overall GR is reduced in the SN of PD patients, as well as of MPTP-treated mice (Ros-Bernal et al., 2011). To evaluate the hypothesis that GR levels may be modulated, and/or they may specific act on DNs after injury, we examined GR pattern of expression in brain tissue from macaque monkeys that had been chronically injected with low doses (0.3 mg/kg) of MPTP for a period of 3 months and sacrificed 2 years later. These animals developed a stable Parkinsonian syndrome, which mimicked the human PD (Barcia et al., 2004). The analysis of the number of TH positive neurons in the SNpc of these monkeys revealed a significant loss compared to non-treated monkeys (Fig.1 A, B). Series of sections at the level of the SNpc and VTA fluorescently immunolabeled for TH and GR were analyzed by confocal microscopy. GR immunolabeling was mainly localized in the nucleus of some TH+ DNs in mesencephalic sections (Fig. 1C), which suggests the presence of active GR. The quantification of the percentage of DNs expressing nuclear GR (calculated as % of nuclear GR+ TH+ neurons/total TH+ neurons) in the whole SNpc showed that 2 years after MPTP exposure, the proportion of double TH+/nuclear GR+ remaining neurons was significantly higher (Fig. 1D) than in the control group, suggesting that expression of the GR in the nucleus is a factor that confers DNs of resistance to MPTP intoxication.

In primates (human and non-human), a differential vulnerability of DNs to neurodegeneration is found within the SNpc, and, thus, this area is divided into subregions (Fig. 1E). The highest dopaminergic neurodegeneration is observed in the ventrolateral subregion ($\alpha+\beta$), followed by the lateral (lat) and the dorsal subregions (γ). Differently, by comparison, the VTA is poorly affected (Agid, 1991; Damier et al., 1999; Fearnley and Lees, 1991; Herrero et al., 1993; Hirsch et al., 1988). We, therefore, determined whether there is a regional variability in DNs expressing nuclear GR among these 3 sub-regions of the SNpc and the VTA. The results show that in MPTP intoxicated monkeys, the proportion of surviving DNs with nuclear GR labeling in the + area is statistically higher compared

to control group (Fig.1 F). Interestingly, in untreated animals, VTA has the highest percentage of GR+ DNs compared to all the sub-regions of the SNpc, and the proportion of neurons expressing or not GR remains unaltered in MPTP-treated animals compared to controls (Fig. 1F).

Overall, these results suggest that regions in which the GR is expressed within the nucleus of DNs are less vulnerable to the neurotoxic effects of MPTP.

The fact that activation of the GR confers protection to DNs suggests a potential effect of GCs through the GR as neuroprotector agent in Parkinsonism.

Corticosterone and dexamethasone protect DNs in midbrain cell cultures via a mechanism requiring GR activation

To examine the effect of the GR activity in DNs, we administered two GR agonists, either dexamethasone (DEX) or corticosterone (CORT), to MPP⁺- treated rat mesencephalic neuron cultures, as well as CORT treatment to wild type C57/Bl6 mice and to mice in which the GR was inactivated out specifically in DNs.

For the in vitro studies, cultures were incubated with 3 μ M MPP⁺ (the active metabolite of MPTP) between 5-7 DIV (days in vitro), followed by a washout period of 3 days in the absence of toxin, and then the number of survived dopaminergic cell was assessed. Consistent with previous reports, we found that ~50-60 % of the DNs were killed by MPP⁺ treatment (Guerreiro et al., 2008), evaluated by counting the number of TH+ cells (Fig.2B). Addition of the two GR agonists DEX and CORT provided protection to vulnerable DNs in a concentration-dependent manner (Fig.2A). The two GR agonists had similar efficacies, although DEX was much more potent than CORT. The EC₅₀s for DEX and CORT, graphically estimated in 10 DIV cultures, were 0.26 and 81 nM, respectively. Moreover, we observed that the GR antagonist RU486 (mifepristone) (1 μ M) was highly effective in preventing the protective effects provided by 10 nM DEX and 100 nM CORT, used at optimal concentrations, indicating that the effects of the two agonists are mediated via GR activation (Fig. 2B). RU486 had no effect per se on dopaminergic cell survival in control cultures.

It should be taken into account that in the following sets of experiments we used DEX as preferential ligand for the GR because of its higher effectiveness respect to CORT in promoting TH+ neuron survival.

The neuroprotective effect on dopaminergic neurons of the GR against MPP⁺ is not mediated indirectly via glia or no-DNs in midbrain cell cultures

Considering that the GR activity can protect DNs against MPP⁺ toxicity by inhibiting the potent pro-inflammatory mediators secreted by glia, especially microglia (Morale et al., 2004; Ros-Bernal et al., 2011; Sugama et al., 2009), we verified whether the neuroprotective effect exerted by the GR agonists, particularly DEX, could be explained by its repressive effects on active glial cell. Double immunofluorescence labeling revealed the presence of the GR in both microglial (Iba-1+) and astroglial (GFAP+) cells in midbrain cell cultures. The immunolabeling was diffuse within the cytosol in control conditions (not shown) and confined to the nucleus after a 24 hr treatment with DEX (Fig. 3A, left panel) or CORT (not shown). The GR was also ubiquitously expressed in neuronal cells and, more specifically, within the nuclei of DNs (Fig. 3A, left panel). The GR expression in these cultures was also assessed by immunoblot analysis on protein extracts from DEX-treated neuron/glia mesencephalic cultures. Molecular mass markers allowed identification of GR at a molecular mass of 97 kDa (Fig. 3A, right panel).

DEX exerted a potent repressive effects on dividing glial cells co-labeled with vimentin and tritiated thymidine and, more specifically, on cells expressing the microglial marker OX-42 (Fig. 3B, C). At a concentration of 10 nM, DEX was slightly more efficacious in reducing the number of microglial cell (-73%) than that of general dividing glial cells (-65 %) (Fig. 3C), which was represented for the most part by astrocytes and their precursor cells (Toulorge et al., 2010). To determine whether the GR in glial cells was required for DEX-mediated neuroprotection, we evaluated the survival-promoting effect of DEX in the presence of ARA-C (3 μ M), which reduces glial cell number to < 5% of control values. In this condition, DEX (10nM) still retained its protective function

on DNs, indicating that glial repression is not essential for neuronal rescue (Fig. 3D). Notably, the neuroprotective effect of DEX was abolished by RU486 in ARA-C-treated cultures (Fig.3D).

We, therefore, determined whether DEX-mediated neuroprotection was mediated by an autocrine/paracrine process using midbrain cell cultures in which glial cells were eliminated by the ARA-C treatment. When the culture medium of donor cultures was supplemented with DEX and then transferred onto receiving cultures treated with MPP⁺, loss of DNs caused by the toxin was substantially reduced. This suggested that DEX-treated midbrain neurons may release a soluble molecule which is protective for DNs. This protective effect was neutralized by addition of RU486 to receiving cultures, suggesting that it was uniquely due to the presence of DEX into the conditioned medium (Fig. 3E).

The in vivo inhibition of dopaminergic neuron loss by corticosterone treatment in mice during and following subchronic MPTP intoxication is mediated by GR expressed in DNs

In our previous work, acute MPTP treatment in GR^{DATCre} mice, in which GR is selectively inactivated in DNs, did not modulate DN death, whereas a significant decrease in the number of DNs was observed in mice in which GR was specifically inactivated in microglia (GR^{LysMCre}) (Ros-Bernal et al., 2011). This result indicated that the GR in DNs, if activated by endogenous GCs, does not affect neuron survival. We also showed that exogenous CORT treatment significantly protected the control GR^{loxP/loxP} mice but not GR^{LysMCre} mice indicating that microglial GR activated by either endogenous GC or exogenous CORT treatment protects DNs against MPTP.

To examine whether supra-physiological levels of GCs have an effect on GR in DNs, wild type C57/BL6 mice received either CORT added to their drinking water (35 µg/ml) or vehicle β-cyclodextrine (β-CD) (David et al., 2009) at the start of sub-chronic MPTP intoxication until their sacrifice 12 days later. Significantly protection of DNs against subchronic MPTP intoxication was observed (Fig. 4 A, B). In addition, to evaluate whether there was also a high proportion of DNs expressing GR in the nucleus after MPTP intoxication, we quantified the number of TH+ neurons

expressing nuclear GR in mice, which received either vehicle β -CD or CORT treatment. Similarly to what observed in MPTP intoxicated monkeys, we found a high proportion of surviving DNs expressing nuclear GR respect to control, CORT treatment not significantly affecting the nuclear localization of GR (Fig 4D).

To establish whether the activity of CORT on cell survival is mediated by the GR localized in the DNs and to examine the effects of this GR after exogenous CORT treatment, we used the sub-chronic MPTP intoxication paradigm in mice in which GR gene is selectively inactivated in DNs (Turiault et al., 2007). MPTP-treated GR^{DATCre} mice administered with vehicle β -CD in their drinking water showed a decrease in TH+ neurons similar to their control GR^{loxP/loxP} mice. This result is similar to what we observed after acute MPTP treatment (Ros-Bernal et al, 2011), thus validating that the GR in DNs has no effect on dopaminergic neuron survival when activated by endogenous GC levels. Measurement of CORT levels in the vehicle group paradigm showed that they were slightly higher 1 day but not 7 days after MPTP intoxication (Fig. 5E). Interestingly, exogenous CORT treatment, whilst protecting DNs of GR^{loxP/loxP} mice from sub-chronic MPTP intoxication, did not protect GR^{DATCre} mice (Fig 5A, B), indicating that GR activated by exogenous CORT levels can affect dopaminergic neuronal survival (Fig 5A, B). Measurement of CORT levels in the CORT group showed that they were 5-10 fold higher in GR^{loxP/loxP} and GR^{DATCre} mice compared to saline injected mice.

We also examined the effects of CORT treatment on the nerve terminals of DNs in the striatum after sub-chronic MPTP intoxication by measuring the optical density of TH immunostaining. As expected, TH immunolabeling in the striatum of both C57/BL6 and GR^{DATCre} mice was significantly reduced in β -CD mice injected with MPTP, indicating loss of dopaminergic fibers (Fig. 4A, C; Fig. 5A,C). MPTP intoxicated C57/BL6 mice treated with CORT, instead, showed less dopaminergic fibers affected respect to the MPTP group without CORT treatment (Fig. 4A, C), although a variability between animals was observed. In GR^{DATCre} mice, dopaminergic fibers were not protected at all by the CORT treatment (Fig. 5A, C).

Inhibition of the dopamine transporter accounts only marginally for GR-mediated neuroprotection

To understand the mechanisms through which the GR acts in DNs against MPTP toxicity, we hypothesized that GR activation may result in a reduced uptake of MPP⁺ by DNs through inhibition of DAT. To explore this possibility, we measured the uptake of [3H]-dopamine in MPP⁺-treated midbrain cell cultures after 5 DIV, in which DEX was applied at different concentrations 1 day before. In parallel, we evaluated the effect of GBR 12909, a non-competitive and potent inhibitor of this transport system, on TH⁺ neuron viability after MPP⁺ treatment. As expected, GBR 12909 produced a concentration-dependent inhibition of dopamine transport (Fig. 6). In a range of concentrations comprised between 1-100 nM, there was a strong correlation between inhibition of the dopamine uptake and the extent of dopaminergic cell rescue. Graphical interpolations allowed us to reveal that, at similar concentrations, DEX is more neuroprotective than GBR 12909, by reducing DA uptake inhibition, suggesting that DA transport inhibition accounts only marginally for GR-mediated neuroprotection.

GR-mediated neuroprotection occurs through ryanodine receptor channel activation

GCs can affect Ca²⁺ dependent processes, which are involved in neuronal function (Bian et al., 1997; Du et al., 2009). Therefore, activated GR could enhance dopaminergic survival by regulating Ca²⁺ -dependent neuronal survival processes. In light of our recent findings, indicating that the mobilization of Ca²⁺ from its storage in the endoplasmic reticulum play a key role in the control of dopaminergic cell survival (Guerreiro et al., 2008, Toulorge et al., 2010), we examined whether ryanodine receptor (RyR) channels, or inositol triphosphate (IP3) receptors, are involved in mediating DEX-GR activity in midbrain cell cultures. The IP3 receptor inhibitor, 2-APB (10 μM), failed to inhibit the effect of DEX (data not shown), whereas inhibition of RyRs by dantrolene (30 μM) completely abolished DEX protective action (Fig. 7A). In parallel, we performed a Ca²⁺_{cyt} measurements in 5 DIV cultures exposed to MPP⁺ in the presence or not of other test compounds. In this particular context, we incubated cell cultures with MPP⁺ for 6 hr, as we wished to detect signs of

neuron suffering in the early phase of the death process. Furthermore, MPP⁺ was used at a concentration of 50 μ M in order to generate toxic effects and, thus, perturbations in calcium homeostasis that could be detectable in all midbrain neurons, regardless of the neurotransmitters' phenotypes. Using this experimental setting, we found that Ca²⁺_{cyt} levels were reduced of approximately 30% respect to control 6 hr after MPP⁺ addition to the cultures. When DEX was applied alone (not shown), or in the presence of MPP⁺, Ca²⁺_{cyt} levels increased above control levels, an effect prevented by dantrolene (Fig. 7B). These data strongly suggest that GR activation by DEX results in an increase in Ca²⁺_{cyt} levels that is dependent on the activity of RyR channels.

DISCUSSION

Our results in MPTP intoxicated monkeys, verified also in mice, showed that most of the surviving DA neurons in the vulnerable region of SNpc expressed nuclear GR suggesting that GR may have a role in survival of DA neurons. Further experiments in vitro and in vivo indicated that GR, in the presence of sustained GCs, could exert protective actions on DA neurons against MPTP neurotoxicity.

The direct role of GR in DA neurons was analyzed in MPP⁺ intoxicated mesencephalic cultures by treatment with DEX or CORT. Dose response curves of TH+ neurons after MPP⁺ intoxication showed that at low concentrations (0.1-10 nM), DEX was significantly more potent than CORT (the EC50 value about x300 lower than CORT) in protecting DA neurons. This can be explained by both a higher binding affinity of DEX for GR and its slower dissociation from the receptor than CORT. The survival effect of DEX or CORT was abolished with GR antagonist RU486 and occurred only when the cultures were pretreated for 24 hrs with DEX or CORT before MPP⁺ intoxication. These results indicated that a likely prerequisite for GR actions might be sustained ligand binding. Experiments on treatment with an anti-mitotic agent, AraC, that destroyed most of microglia and astroglia, as well as the transfer of conditioned medium from treated cells to fresh cultures ruled out the possibilities that activated GR protects DA neurons through its anti-inflammatory actions on glia or acts via release of survival factors from neighboring neurons.

In vivo, quantification of GR expression in DA neurons of SNpc revealed that two thirds of DA neurons in SN have nuclear GR labeling in saline injected monkeys or mice. Even greater percentage DA neurons of VTA exhibited nuclear expression of GR and this proportion remained unchanged by MPTP treatment. Previous published reports on GR-IR in brain have also nuclear labeling in almost all of the neuronal populations examined (Cintra et al., 1994; van Steensel et al., 1995). This observed localization in neurons differs from glial cells (Cintra et al., 1994), thus for example, we previously observed nuclear GR in 30% of microglia in SN and striatum in basal conditions which increased to 80-90% upon MPTP treatment suggesting cytoplasmic to nuclear translocation of GR upon increase in endogenous GC levels (Ros-Bernal et al., 2011). Recent detailed analyses of pattern of GCs release and GR activation indicates that a pulsatile ultradian fluctuations in the release of GCs results in distinctive pulsatile GR activation and that unliganded GR can remain in the nucleus (unless cells are completely depleted of GCs) and be reactivated by GC in the nucleus (Conway-Campbell et al., 2010). It is likely that glial versus neuronal localization is related to disparate functions of GR in these cell types. The transcriptional regulation by GR during an inflammatory reaction mediated has been reported e.g. LPS injection (Glezer et al., 2007), in microglia in MPTP intoxicated mice (Ros-Bernal et al., 2011),

In acute MPTP intoxication paradigm, DA neuronal loss has a non-apoptotic component and is greater compared to sub-chronic paradigm in which DA neurons die by apoptosis (Jackson-Lewis et al., 1995; Jackson-Lewis and Przedborski, 2007). The difference may reside in the fact that, in acute intoxication, glial contribution in DA neuronal demise is greater compared to sub-chronic paradigm (Alvarez-Fischer et al., 2008; Furuya et al., 2004; Liberatore et al., 1999). Thus, in sub-chronic paradigm, most neuronal death may result from inhibition of mitochondrial complex I by MPP+. Our results showing no change in DA neuronal survival in GR^{DATCre} mice sub-chronically intoxicated with MPTP suggests that in response to acute increase in endogenous GC levels GR does not affect DA neuronal survival. However, CORT treatment, given throughout the 5 days intoxication period until their sacrifice 7 days later, significantly protected DA neurons of SN in both wild type C57/B16 and control GR^{loxP/loxP} mice against sub-chronic intoxication of MPTP. By contrast, CORT treatment did

not protect DA neurons in GR^{DATCre} mice. Measurement of endogenous GC levels in CORT-treated GR^{loxP/loxP} and GR^{DATCre} groups showed x10 fold increase 1 day after MPTP intoxication, which remained elevated until their sacrifice at 7 days. Thus sustained GR activation by supra-physiological levels of GC promotes survival of DA neurons.

As yet, little is known on the precise actions of GR in the DA neurons of VTA and SNpc. The results of behavioral tests pertaining to anxiety, depression or addiction in GR^{DATCre} mice did not reveal modulations in the absence of GR in DA neurons (Ambroggi et al., 2009; Turiault et al., 2007). The deleterious effects of chronic stress or high doses of CORT treatment on motor performance as well as DA neuronal loss in VTA and SN in 6-OH DA lesioned rats have been described (Smith et al., 2008), however, factors such as glial activation and excitotoxicity could also be involved in this model. It was shown that acute CORT treatment increased extra-cellular DA levels in nucleus accumbens and locomotor activity of rats indicating that CORT stimulates DA neurotransmission (Piazza et al., 1996).

As GCs have been reported to stimulate TH transcription in PC12 cells (Goodman et al., 1978), we verified by thionine staining that the quantification of TH-IR in our experiments with CORT were not affected by modulations in TH. The total number of thionine+ neurons of SNpc replicated the quantification of TH-IR neurons, thus the protective effect is not related to TH (data not shown).

To elucidate the putative mechanisms by which GR acts to regulate survival of DA neurons, we first verified in mesencephalic neuronal cultures that the effects of DEX are mediated or not by inhibition of DAT activity. Inhibiting DAT activity in a dose-dependent manner by treatment with irreversible inhibitor GBR 12909 revealed a progressive rescue of TH+ neurons from MPP+ intoxication. Thus total inhibition of DAT rescued 50% of TH+ neurons. In similar manner, DEX treatment rescued 50-60% TH+ neurons, however only about 30% of DAT activity was inhibited. As the survival action of GR cannot be explained by inhibition of DAT, we hypothesized that CORT may affect of DA neurons considering that acute CORT can stimulate DA transmission. The importance of Ca²⁺ dependent processes in DA neurons is illustrated by their autonomous pacemaker activity that is

independent of synaptic input. This continuous activity is dependent on $Ca_v1.3$ Ca^{2+} channels and a high metabolic demand (Chan et al., 2009). Both endoplasmic reticulum and mitochondria play important roles in the regulation of Ca^{2+} homeostasis (Orrenius et al., 2003). GCs through GRs induce T cell apoptosis by rise in intracellular Ca^{2+} levels (Bian et al., 1997; McConkey et al., 1989). Our results of mesencephalic cultures showed that MPP⁺ significantly decreased cytosolic Ca^{2+} levels, DEX acted to maintain cytosolic Ca^{2+} in neurons treated with MPP⁺. This could explain the pro-survival effect of GR. We have previously shown that activations of RyRs by methylxanthines e.g. caffeine increased cytosolic Ca^{2+} levels and prevented DA neuronal death in mesencephalic cultures (Guerreiro et al., 2008). Thus, treatment of cultures with dantrolene, an inhibitor of RyRs, abolished the protective effect of DEX on DA neurons after MPP⁺ intoxication and in parallel inhibited the rise in cytosolic Ca^{2+} induced by DEX.

In conclusion, sustained activation of GR was found to protect DA neurons against MPTP toxicity. Our results suggest that high GCs levels in PD may not be deleterious for DA neuron function and viability, nevertheless further is needed to elucidate the precise mode of GR activation and its functions in the mesencephalic DA neurons.

BIBLIOGRAPHY

- Agid, Y. (1991). Parkinson's disease: pathophysiology. *Lancet* 337, 1321-1324.
- Almeida, O.F., Conde, G.L., Crochemore, C., Demeneix, B.A., Fischer, D., Hassan, A.H., Meyer, M., Holsboer, F., and Michaelidis, T.M. (2000). Subtle shifts in the ratio between pro- and antiapoptotic molecules after activation of corticosteroid receptors decide neuronal fate. *FASEB J* 14, 779-790.
- Alvarez-Fischer, D., Guerreiro, S., Hunot, S., Saurini, F., Marien, M., Sokoloff, P., Hirsch, E.C., Hartmann, A., and Michel, P.P. (2008). Modelling Parkinson-like neurodegeneration via osmotic minipump delivery of MPTP and probenecid. *J Neurochem* 107, 701-711.
- Ambroggi, F., Turiault, M., Millet, A., Deroche-Gamonet, V., Parnaudeau, S., Balado, E., Barik, J., van der Veen, R., Maroteaux, G., Lemberger, T., et al. (2009). Stress and addiction: glucocorticoid receptor in dopaminergic neurons facilitates cocaine seeking. *Nat Neurosci* 12, 247-249.
- Barcia, C., Bautista, V., Sanchez-Bahillo, A., Fernandez-Villalba, E., Navarro-Ruis, J.M., Barreiro, A.F., Poza, Y.P.M., and Herrero, M.T. (2003). Circadian determinations of cortisol, prolactin and melatonin in chronic methyl-phenyl-tetrahydropyridine-treated monkeys. *Neuroendocrinology* 78, 118-128.
- Barcia, C., Sanchez Bahillo, A., Fernandez-Villalba, E., Bautista, V., Poza, Y.P.M., Fernandez-Barreiro, A., Hirsch, E.C., and Herrero, M.T. (2004). Evidence of active microglia in substantia nigra pars compacta of parkinsonian monkeys 1 year after MPTP exposure. *Glia* 46, 402-409.
- Barcia, C., Thomas, C.E., Curtin, J.F., King, G.D., Wawrowsky, K., Candolfi, M., Xiong, W.D., Liu, C., Kroeger, K., Boyer, O., et al. (2006). In vivo mature immunological synapses forming SMACs mediate clearance of virally infected astrocytes from the brain. *The Journal of experimental medicine* 203, 2095-2107.
- Barcia, C., Wawrowsky, K., Barrett, R.J., Liu, C., Castro, M.G., and Lowenstein, P.R. (2008). In Vivo Polarization of IFN- γ at Kupfer and Non-Kupfer Immunological Synapses during the Clearance of Virally Infected Brain Cells. *J Immunol* 180, 1344-1352.
- Benkovic, S.A., O'Callaghan, J.P., and Miller, D.B. (2009). Prolonged exposure to supraphysiological levels of corticosterone does not cause neuronal loss or damage and protects against kainic acid-induced neurotoxicity in the hippocampus of C57BL/6J mice. *Neurotoxicology* 30, 965-976.
- Bian, X., Hughes, F.M., Jr., Huang, Y., Cidlowski, J.A., and Putney, J.W., Jr. (1997). Roles of cytoplasmic Ca²⁺ and intracellular Ca²⁺ stores in induction and suppression of apoptosis in S49 cells. *Am J Physiol* 272, C1241-1249.
- Chan, C.S., Gertler, T.S., and Surmeier, D.J. (2009). Calcium homeostasis, selective vulnerability and Parkinson's disease. *Trends Neurosci* 32, 249-256.
- Cintra, A., Bhatnagar, M., Chadi, G., Tinner, B., Lindberg, J., Gustafsson, J.A., Agnati, L.F., and Fuxe, K. (1994). Glial and neuronal glucocorticoid receptor immunoreactive cell populations in developing, adult, and aging brain. *Ann N Y Acad Sci* 746, 42-61; discussion 61-43.
- Conway-Campbell, B.L., Sarabdjitsingh, R.A., McKenna, M.A., Pooley, J.R., Kershaw, Y.M., Meijer, O.C., De Kloet, E.R., and Lightman, S.L. (2010). Glucocorticoid ultradian rhythmicity directs cyclical gene pulsing of the clock gene period 1 in rat hippocampus. *J Neuroendocrinol* 22, 1093-1100.
- Crochemore, C., Lu, J., Wu, Y., Liposits, Z., Sousa, N., Holsboer, F., and Almeida, O.F. (2005). Direct targeting of hippocampal neurons for apoptosis by glucocorticoids is reversible by mineralocorticoid receptor activation. *Mol Psychiatry* 10, 790-798.
- Damier, P., Hirsch, E.C., Agid, Y., and Graybiel, A.M. (1999). The substantia nigra of the human brain. I. Nigrosomes and the nigral matrix, a compartmental organization based on calbindin D(28K) immunohistochemistry. *Brain* 122 (Pt 8), 1421-1436.
- David, D.J., Samuels, B.A., Rainer, Q., Wang, J.W., Marsteller, D., Mendez, I., Drew, M., Craig, D.A., Guind, B.P., Guilloux, J.P., et al. (2009). Neurogenesis-dependent and -independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression. *Neuron* 62, 479-493.
- De Kloet, E.R., Vreugdenhil, E., Oitzl, M.S., and Joels, M. (1998). Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr Rev* 19, 269-301.
- Du, J., Wang, Y., Hunter, R., Wei, Y., Blumenthal, R., Falke, C., Khairova, R., Zhou, R., Yuan, P., Machado-Vieira, R., et al. (2009). Dynamic regulation of mitochondrial function by glucocorticoids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 3543-3548.
- Elenkov, I.J., and Chrousos, G.P. (2002). Stress hormones, proinflammatory and antiinflammatory cytokines, and autoimmunity. *Ann N Y Acad Sci* 966, 290-303.
- Fearnley, J.M., and Lees, A.J. (1991). Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain* 114 (Pt 5), 2283-2301.
- Fiskum, G., Starkov, A., Polster, B.M., and Chinopoulos, C. (2003). Mitochondrial mechanisms of neural cell death and neuroprotective interventions in Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 991, 111-119.

- Furuya, T., Hayakawa, H., Yamada, M., Yoshimi, K., Hisahara, S., Miura, M., Mizuno, Y., and Mochizuki, H. (2004). Caspase-11 mediates inflammatory dopaminergic cell death in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 24, 1865-1872.
- Gibb, W.R., and Lees, A.J. (1988). A comparison of clinical and pathological features of young- and old-onset Parkinson's disease. *Neurology* 38, 1402-1406.
- Glezer, I., Chernomoretz, A., David, S., Plante, M.M., and Rivest, S. (2007). Genes involved in the balance between neuronal survival and death during inflammation. *PLoS One* 2, e310.
- Goodman, R., Edgar, D., Thoenen, H., Wechsler, W., and Herschman, H. (1978). Glucocorticoid induction of tyrosine hydroxylase in a continuous cell line of rat pheochromocytoma. *J Cell Biol* 78, R1-7.
- Guerreiro, S., Toulorge, D., Hirsch, E., Marien, M., Sokoloff, P., and Michel, P.P. (2008). Paraxanthine, the primary metabolite of caffeine, provides protection against dopaminergic cell death via stimulation of ryanodine receptor channels. *Mol Pharmacol* 74, 980-989.
- Hartmann, A., Hunot, S., Michel, P.P., Muriel, M.P., Vyas, S., Faucheux, B.A., Mouatt-Prigent, A., Turmel, H., Srinivasan, A., Ruberg, M., et al. (2000). Caspase-3: A vulnerability factor and final effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 2875-2880.
- Hartmann, A., Michel, P.P., Troade, J.D., Mouatt-Prigent, A., Faucheux, B.A., Ruberg, M., Agid, Y., and Hirsch, E.C. (2001). Is Bax a mitochondrial mediator in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease? *J Neurochem* 76, 1785-1793.
- Hartmann, A., Veldhuis, J.D., Deuschle, M., Standhardt, H., and Heuser, I. (1997). Twenty-four hour cortisol release profiles in patients with Alzheimer's and Parkinson's disease compared to normal controls: ultradian secretory pulsatility and diurnal variation. *Neurobiol Aging* 18, 285-289.
- Haubenberger, D., Reinthaler, E., Mueller, J.C., Pirker, W., Katzenschlager, R., Froehlich, R., Bruecke, T., Daniel, G., Auff, E., and Zimprich, A. (2011). Association of transcription factor polymorphisms PITX3 and EN1 with Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 32, 302-307.
- Haynes, L.E., Griffiths, M.R., Hyde, R.E., Barber, D.J., and Mitchell, I.J. (2001). Dexamethasone induces limited apoptosis and extensive sublethal damage to specific subregions of the striatum and hippocampus: implications for mood disorders. *Neuroscience* 104, 57-69.
- Haynes, L.E., Lendon, C.L., Barber, D.J., and Mitchell, I.J. (2003). 17 Beta-oestradiol attenuates dexamethasone-induced lethal and sublethal neuronal damage in the striatum and hippocampus. *Neuroscience* 120, 799-806.
- Herrero, M.T., Hirsch, E.C., Kastner, A., Ruberg, M., Luquin, M.R., Laguna, J., Javoy-Agid, F., Obeso, J.A., and Agid, Y. (1993). Does neuromelanin contribute to the vulnerability of catecholaminergic neurons in monkeys intoxicated with MPTP? *Neuroscience* 56, 499-511.
- Hineno, T., Mizobuchi, M., Hiratani, K., Inami, Y., and Kakimoto, Y. (1992). Disappearance of circadian rhythms in Parkinson's disease model induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in dogs. *Brain Res* 580, 92-99.
- Hirsch, E., Graybiel, A.M., and Agid, Y.A. (1988). Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease. *Nature* 334, 345-348.
- Hirsch, E.C., and Hunot, S. (2009). Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *Lancet Neurol* 8, 382-397.
- Hou, J.G., Lin, L.F., and Mytilineou, C. (1996). Glial cell line-derived neurotrophic factor exerts neurotrophic effects on dopaminergic neurons in vitro and promotes their survival and regrowth after damage by 1-methyl-4-phenylpyridinium. *J Neurochem* 66, 74-82.
- Hyman, C., Hofer, M., Barde, Y.A., Juhasz, M., Yancopoulos, G.D., Squinto, S.P., and Lindsay, R.M. (1991). BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic neurons of the substantia nigra. *Nature* 350, 230-232.
- Jackson-Lewis, V., Jakowec, M., Burke, R.E., and Przedborski, S. (1995). Time course and morphology of dopaminergic neuronal death caused by the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Neurodegeneration* 4, 257-269.
- Jackson-Lewis, V., and Przedborski, S. (2007). Protocol for the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Nat Protoc* 2, 141-151.
- Jeanneteau, F., Garabedian, M.J., and Chao, M.V. (2008). Activation of Trk neurotrophin receptors by glucocorticoids provides a neuroprotective effect. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 4862-4867.
- Kaufner, D., Ogle, W.O., Pincus, Z.S., Clark, K.L., Nicholas, A.C., Dinkel, K.M., Dumas, T.C., Ferguson, D., Lee, A.L., Winters, M.A., and Sapolsky, R.M. (2004). Restructuring the neuronal stress response with anti-glucocorticoid gene delivery. *Nat Neurosci* 7, 947-953.
- Liberatore, G.T., Jackson-Lewis, V., Vukosavic, S., Mandir, A.S., Vila, M., McAuliffe, W.G., Dawson, V.L., Dawson, T.M., and Przedborski, S. (1999). Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease. *Nat Med* 5, 1403-1409.
- Luquin, M.R., Scipioni, O., Vaamonde, J., Gershanik, O., and Obeso, J.A. (1992). Levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease: clinical and pharmacological classification. *Mov Disord* 7, 117-124.

- Marchetti, B., Serra, P.A., Tirolo, C., L'Episcopo, F., Caniglia, S., Gennuso, F., Testa, N., Miele, E., Desole, S., Barden, N., and Morale, M.C. (2005). Glucocorticoid receptor-nitric oxide crosstalk and vulnerability to experimental parkinsonism: pivotal role for glia-neuron interactions. *Brain Res Brain Res Rev* 48, 302-321.
- Mattson, M.P. (2000). Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 120-129.
- McConkey, D.J., Nicotera, P., Hartzell, P., Bellomo, G., Wyllie, A.H., and Orrenius, S. (1989). Glucocorticoids activate a suicide process in thymocytes through an elevation of cytosolic Ca²⁺ concentration. *Arch Biochem Biophys* 269, 365-370.
- Mizobuchi, M., Hineno, T., Kakimoto, Y., and Hiratani, K. (1993). Increase of plasma adrenocorticotrophin and cortisol in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-treated dogs. *Brain Res* 612, 319-321.
- Moore, D.J., West, A.B., Dawson, V.L., and Dawson, T.M. (2005). Molecular pathophysiology of Parkinson's disease. *Annu Rev Neurosci* 28, 57-87.
- Morale, M.C., Serra, P.A., Delogu, M.R., Migheli, R., Rocchitta, G., Tirolo, C., Caniglia, S., Testa, N., L'Episcopo, F., Gennuso, F., et al. (2004). Glucocorticoid receptor deficiency increases vulnerability of the nigrostriatal dopaminergic system: critical role of glial nitric oxide. *FASEB J* 18, 164-166.
- Mourlevat, S., Troadec, J.D., Ruberg, M., and Michel, P.P. (2003). Prevention of dopaminergic neuronal death by cyclic AMP in mixed neuronal/glia mesencephalic cultures requires the repression of presumptive astrocytes. *Mol Pharmacol* 64, 578-586.
- Nandhagopal, R., Kuramoto, L., Schulzer, M., Mak, E., Cragg, J., Lee, C.S., McKenzie, J., McCormick, S., Samii, A., Troiano, A., et al. (2009). Longitudinal progression of sporadic Parkinson's disease: a multi-tracer positron emission tomography study. *Brain* 132, 2970-2979.
- Orrenius, S., Zhivotovsky, B., and Nicotera, P. (2003). Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 552-565.
- Paxinos, G., and Franklin, K. (2001). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, 2 edn (San Diego: Academic Press).
- Paxinos, G., and Huang, X.-F. (2000). *The Rhesus Monkey Brain in Stereotaxic Coordinates*, 4 edn (San Diego: Academic Press).
- Piazza, P.V., Barrot, M., Rouge-Pont, F., Marinelli, M., Maccari, S., Abrous, D.N., Simon, H., and Le Moal, M. (1996). Suppression of glucocorticoid secretion and antipsychotic drugs have similar effects on the mesolimbic dopaminergic transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 15445-15450.
- Przedborski, S., and Vila, M. (2003). The 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model: a tool to explore the pathogenesis of Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 991, 189-198.
- Redgrave, P., Rodriguez, M., Smith, Y., Rodriguez-Oroz, M.C., Lehericy, S., Bergman, H., Agid, Y., DeLong, M.R., and Obeso, J.A. Goal-directed and habitual control in the basal ganglia: implications for Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci* 11, 760-772.
- Ros-Bernal, F., Hunot, S., Herrero, M.T., Parnadeau, S., Corvol, J.C., Lu, L., Alvarez-Fischer, D., Carrillo-de Sauvage, M.A., Saurini, F., Coussieu, C., et al. (2011). Microglial glucocorticoid receptors play a pivotal role in regulating dopaminergic neurodegeneration in parkinsonism. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Smith, L.K., Jadayji, N.M., Colwell, K.L., Katrina Perehudoff, S., and Metz, G.A. (2008). Stress accelerates neural degeneration and exaggerates motor symptoms in a rat model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci* 27, 2133-2146.
- Sorrells, S.F., Caso, J.R., Munhoz, C.D., and Sapolsky, R.M. (2009). The stressed CNS: when glucocorticoids aggravate inflammation. *Neuron* 64, 33-39.
- Stypula, G., Kunert-Radek, J., Stepień, H., Zylinska, K., and Pawlikowski, M. (1996). Evaluation of interleukins, ACTH, cortisol and prolactin concentrations in the blood of patients with parkinson's disease. *Neuroimmunomodulation* 3, 131-134.
- Sugama, S., Takenouchi, T., Kitani, H., Fujita, M., and Hashimoto, M. (2009). Microglial activation is inhibited by corticosterone in dopaminergic neurodegeneration. *J Neuroimmunol* 208, 104-114.
- Turiault, M., Parnaudeau, S., Milet, A., Parlato, R., Rouzeau, J.D., Lazar, M., and Tronche, F. (2007). Analysis of dopamine transporter gene expression pattern -- generation of DAT-iCre transgenic mice. *FEBS J* 274, 3568-3577.
- van Steensel, B., Brink, M., van der Meulen, K., van Binnendijk, E.P., Wansink, D.G., de Jong, L., de Kloet, E.R., and van Driel, R. (1995). Localization of the glucocorticoid receptor in discrete clusters in the cell nucleus. *J Cell Sci* 108 (Pt 9), 3003-3011.
- Vila, M., Jackson-Lewis, V., Vukosavic, S., Djaldetti, R., Liberatore, G., Offen, D., Korsmeyer, S.J., and Przedborski, S. (2001). Bax ablation prevents dopaminergic neurodegeneration in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 2837-2842.
- Volpi, R., Caffarra, P., Marcato, A., Scaglioni, A., Maestri, D., Delsignore, R., Chiodera, P., and Coiro, V. (1991). Reduced ACTH/cortisol responses to naloxone in men with Parkinson's disease. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect* 3, 127-132.

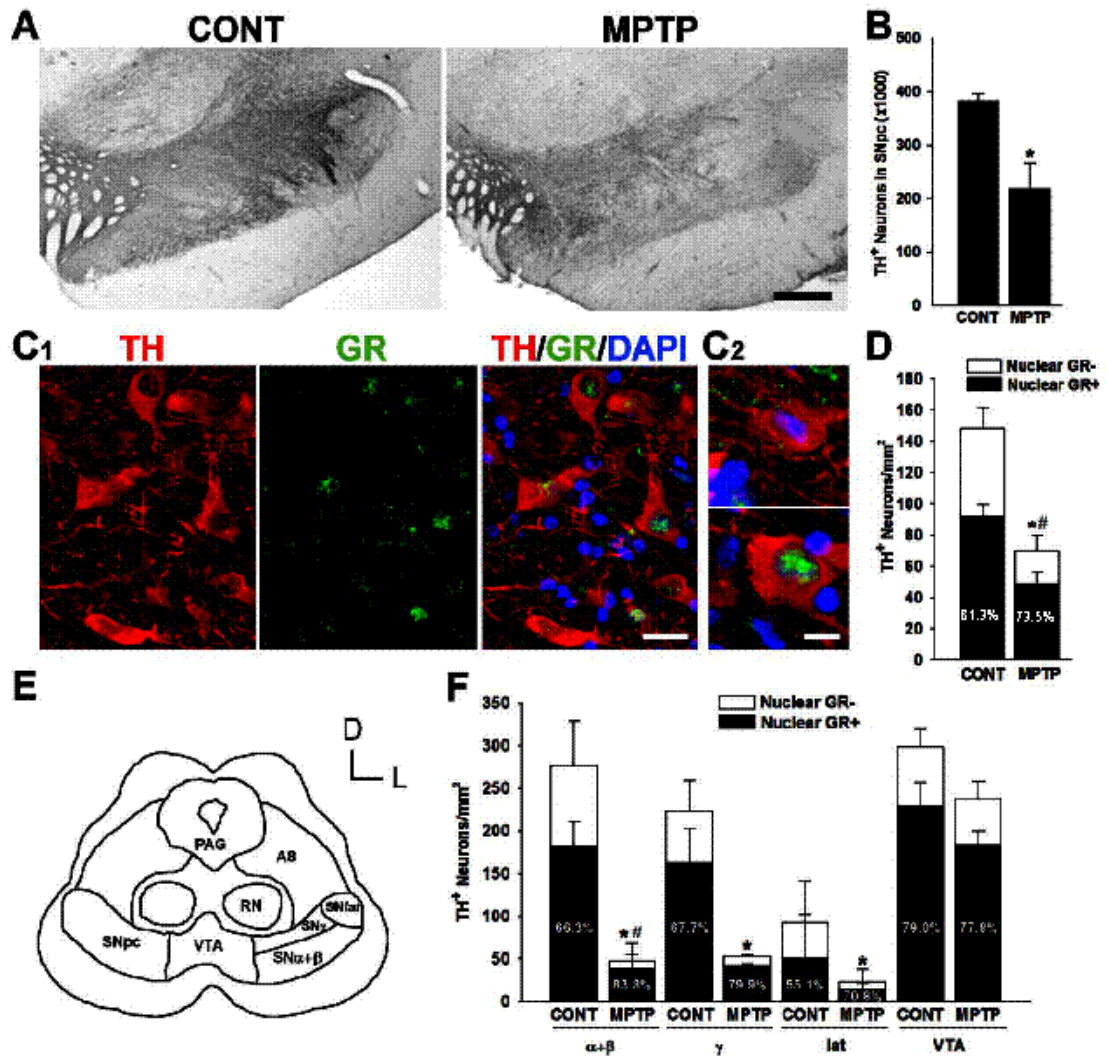


Figure 1. The surviving DNs after MPTP treatment display a higher proportion of GR expression in the SNpc compared with intact animals, suggesting a protective effect of GR in neurons. (A) Photographs illustrating TH expression from series of brain sections at the SNpc level. (B) The number of TH positive cells was quantified by stereological methods (optical fractionator) in the SNpc. A significant loss of DNs was observed in the SNpc of parkinsonian monkeys two years after the MPTP intoxication. (C1) Series of sections at the level of the SNpc were immunostained for TH and GR and analyzed in detail with confocal microscope. Representative confocal pictures from a control monkey are shown. Immunoreactivity for GR is highly expressed in the nucleus of 60% of the DNs. (C2) Small photographs on the right show a characteristic example of a DN with no GR expression in the nucleus (TH⁺/Nuclear GR⁻ cell) and a DNs expressing GR in the nucleus (TH⁺/Nuclear GR⁺ cell). (D) Quantification of the percentage of GR-expressing DNs showed that the surviving DNs after MPTP treatment display a higher proportion of nuclear GR expression in the SNpc compared with intact animals, suggesting a protective effect in GR expressing neurons. (E) Monkey mesencephalon diagram showing the different SNpc subregions and adjacent structures: SNpc, substantia nigra pars compacta; VTA, ventral tegmental area; RN, red nucleus; SNα+β, ventrolateral subregion of the SNpc; SNγ, dorsalis subregion of the SNpc; SNlat, lateralis subregion of the SNpc; D, dorsal; L, lateral. (F) Detailed analysis by confocal microscopy of the different subregions in the SNpc shows higher percentage of nuclear GR-expressing DNs after MPTP treatment in ventrolateral subregion (the most affected in parkinsonism). However, percentage of GR expressing DNs is higher in VTA (less affected region) in control monkeys, suggesting that regions where DNs express GR are less vulnerable to MPTP effect (*P<0.05 relative to the control group; student-T test; for B, D y F). Scale bar = 0.5mm for A and 50 mm for C.

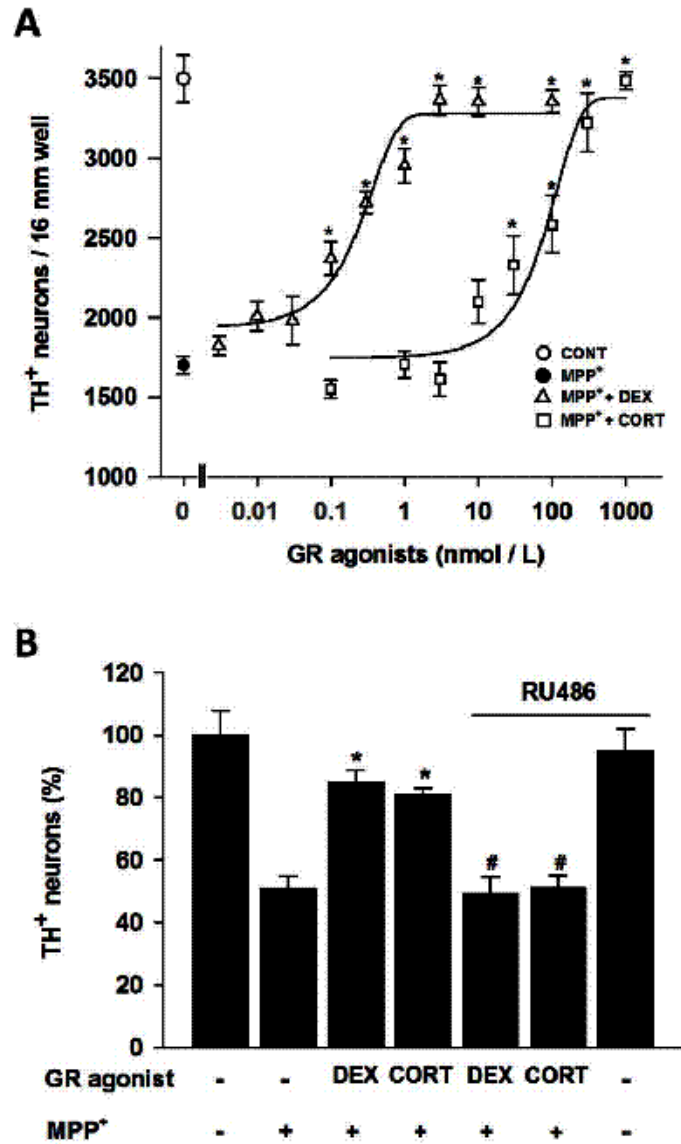


Figure 2. Neuroprotective effects of DEX and CORT for DNs in midbrain cultures. (A) Protection of TH+ neurons against MPP⁺ (3μM) as a function of the concentrations of DEX (0.01-100 nM) or CORT (1-1000 nM). (B) Number of TH+ neurons in cultures exposed to MPP⁺ (3μM) in the absence or the presence of DEX (10 nM) or CORT (100 nM), applied or not with the GR antagonist RU 486 (1 μM). Note that RU 486 had no effect in itself on TH+ cell survival. (* P<0.05, increased compared to MPP⁺-treated cultures; # P<0.05, reduced compared to corresponding cultures exposed to MPP+ and GR agonists).

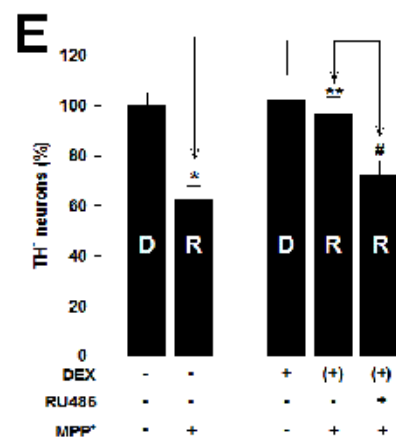
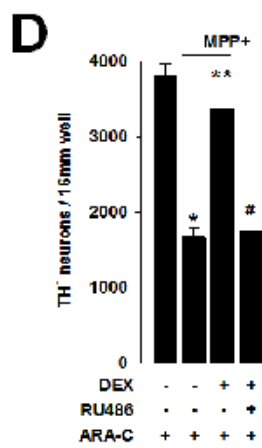
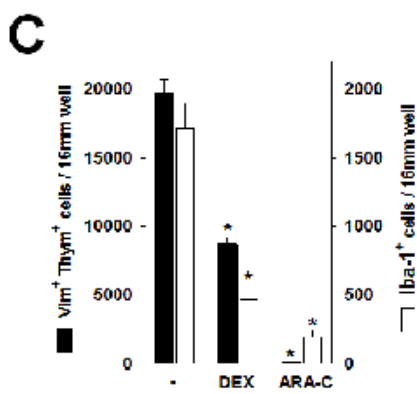
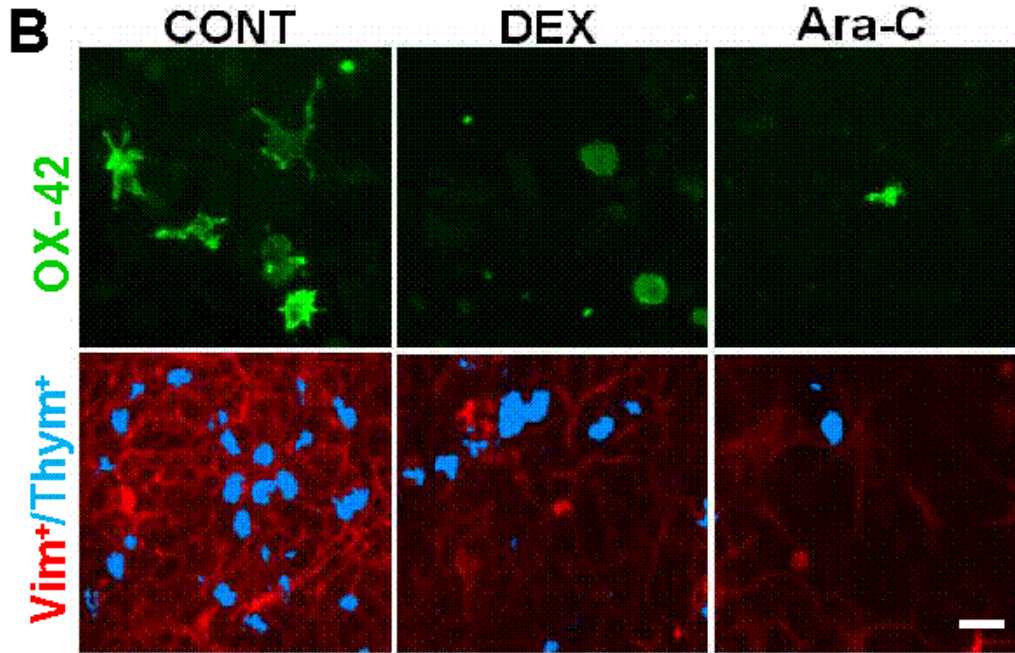
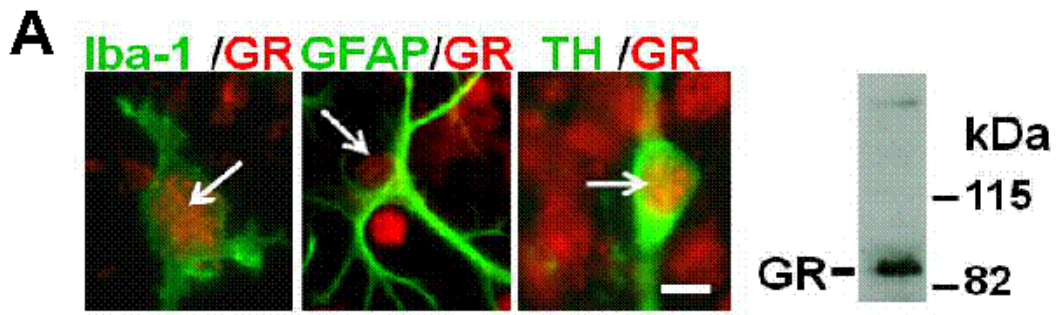


Figure 3. Neuroprotective effects of GCs against MPP⁺-induced dopaminergic cell death persist in the absence of glial cells. (A) GR is expressed in DNs (TH+), microglia (Ibal+), and astroglia (GPAP+). The expression of GR was also tested by western-blot analysis of extracts from mesencephalic cultures. (B) Representative images showing microglial (OX-42+) and glial cells in proliferation (Vim+/Thym+) under different culture conditions. Note differences in the number and morphology of microglial cells, as well as the number of proliferating glial cells. (C) Quantification of Vim+/Thym+ cells and OX-42+ cells was performed in control mesencephalic cultures and cultures treated with DEX (10 nM) or ARA-C (3 μ M). Note that the treatment with ARA-C eliminates almost completely glial cells populations. (D) Mesencephalic cultures treated with 3 μ M ARA-C, were exposed to 3 μ M MPP⁺ from DIV5 to DIV7 inducing DNs loss. However, cultures treated with DEX from DIV4 to DIV10 were partially protected against MPP⁺ effect even in the absence of glial cells. In addition the neuroprotective effect was abolished when cultures were exposed to RU486 treatment. (E) Conditioned medium, obtained from donor control cultures (D) and transferred to the receiving cultures (R), does not interfere in MPP⁺-induced dopaminergic cell death. Conditioned medium obtained from cultures treated with 10nM DEX exerts protection to the DNs in receiving cultures exposed to MPP⁺. The protective effect is abolished when receiving cultures are exposed to 1 μ M RU486. ((+): provided by conditioned medium; *P<0.05 relative to the control culture; ** P<0.05 relative to MPP⁺ culture, # P<0.05 relative to MPP⁺/DEX culture; one way ANOVA followed by Dunnett's test). Scale bar = 10 μ m for A and 15 μ m for B.

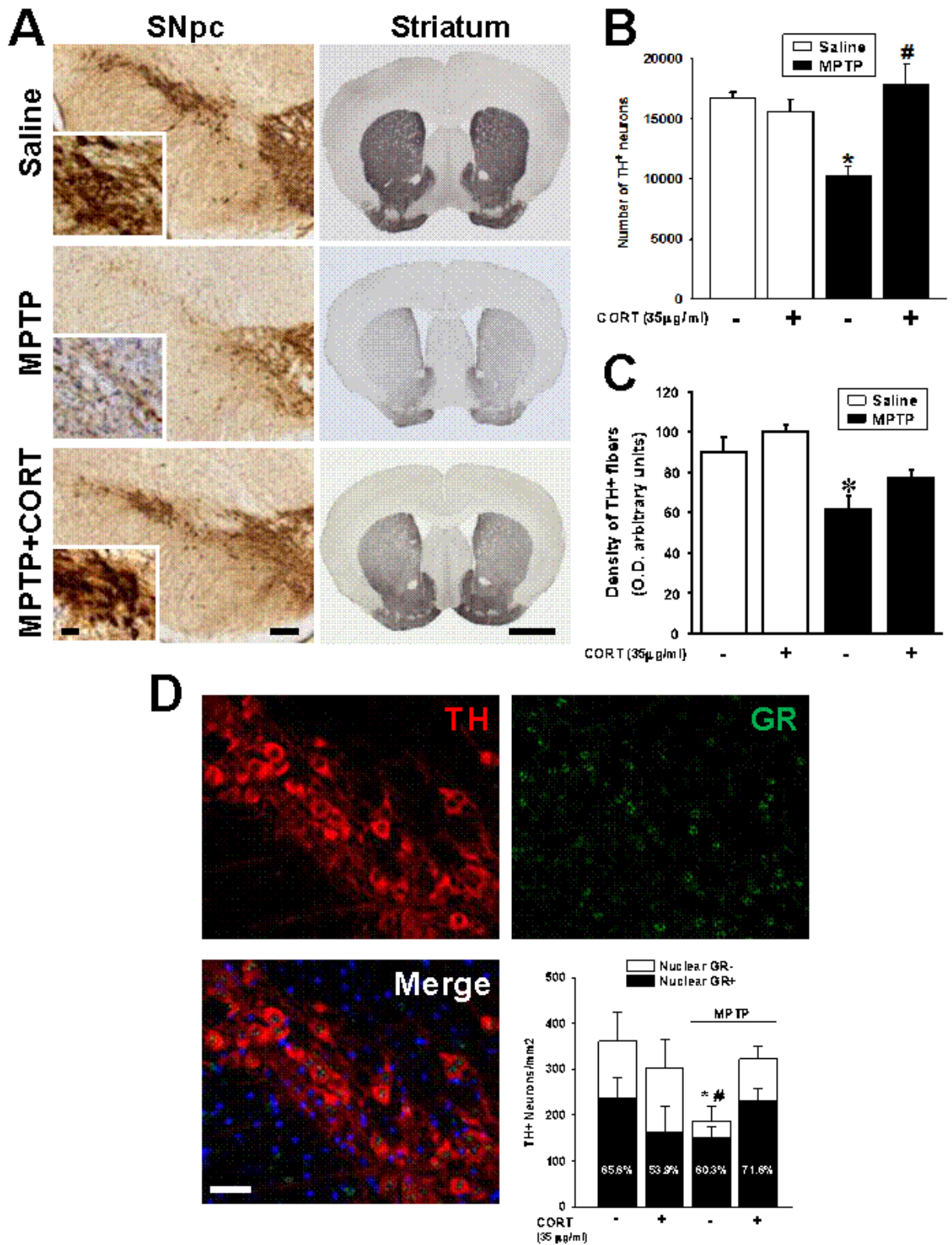


Figure 4. Neuroprotective effects of GCs against MPTP-induced dopaminergic cell death in C57BL/6J mice. (A) Representative images illustrating TH expression from series of mice brain sections at SNpc and Striatum level from Saline, MPTP and MPTP+CORT groups. (B) A significant DNsal loss was observed in the SNpc of MPTP injected mice. However, no decrease of TH positive neurons was seen in the animals treated with MPTP plus CORT compared with their controls (saline or CORT), indicating a neuroprotective effect of CORT against MPTP-induced dopaminergic cell death (* $P < 0.05$ relative to the control group; # $P < 0.05$ relative to the MPTP group; two way ANOVA followed by Duncan's test). (C) A significant loss of dopaminergic fibers in MPTP group was seen. In contrast dopaminergic fibers seem to be less affected in MPTP group treated with CORT (* $P < 0.05$ relative to the control group; two way ANOVA followed by Duncan's test). (D) Series of sections at the level of the SNpc were immunostained for TH and GR and analyzed in detail with confocal microscope. Representative confocal pictures from a control mouse are showed. Quantification of the percentage of GR-expressing DN showed that the surviving DN after MPTP treatment display a higher proportion of nuclear GR expression in the SNpc compared with intact animals, suggesting a protective effect in GR expressing neurons (* $P < 0.05$ number TH+ cells relative to the control group; one way ANOVA followed by Dunnett's test; # $P < 0.05$ number TH+/nuclear GR+ cells relative to control group; test student-T test). Scale bar = 40 μ m for small panels, 100 μ m for left big panels and 1mm for right big panels in A, and 100 μ m for D.

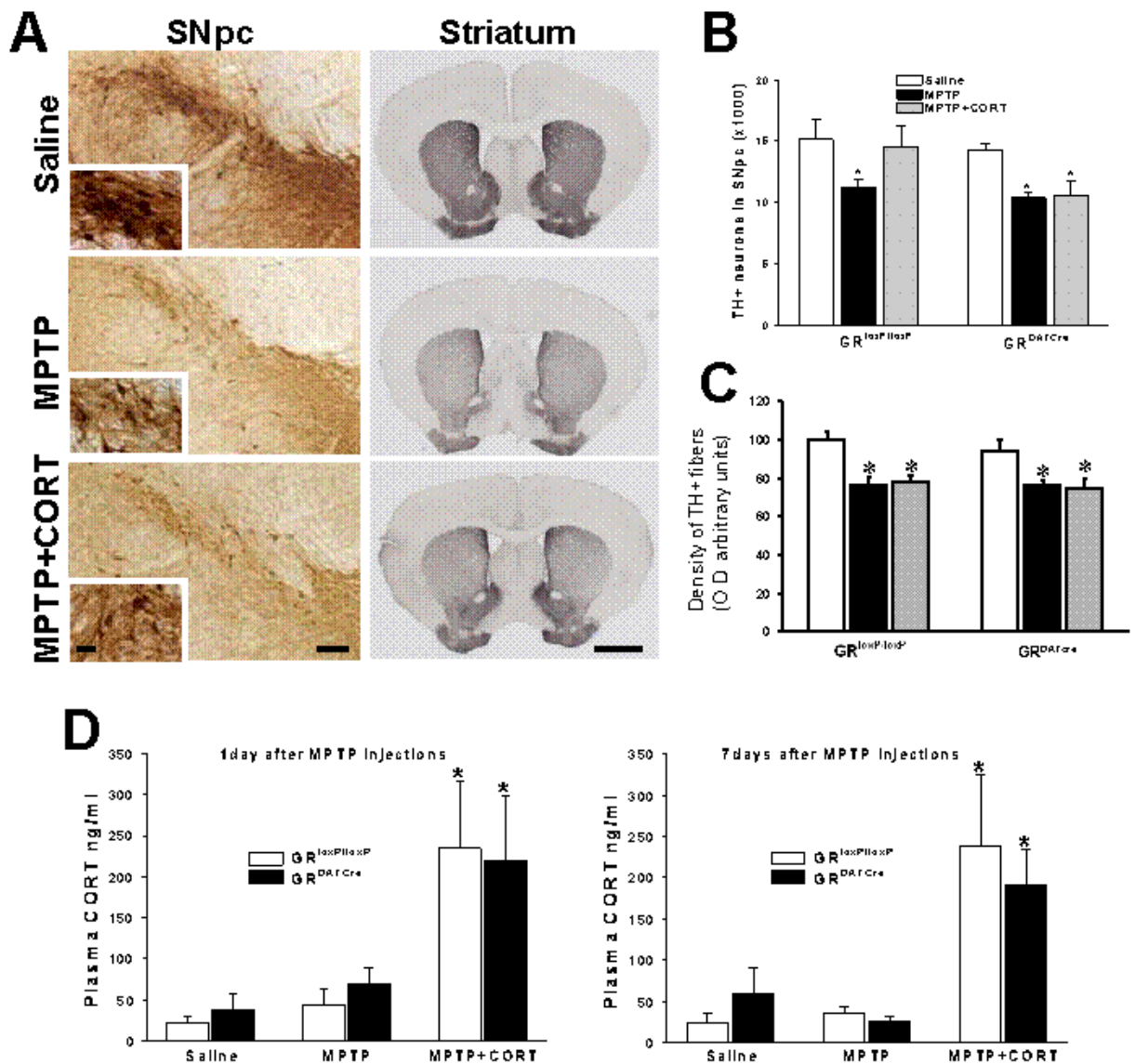


Figure 5. Absence of neuroprotective effect of GCs against MPTP-induced dopaminergic cell death in mice lacking GR in DNAs (GR^{DATCre} mice). (A) Representative images of TH expression from series of GR^{DATCre} mice brain sections at SNpc and striatum level. One representative example from saline, MPTP or MPTP treated with CORT group are shown. (B) A significant DNsal loss was observed in the SNpc of MPTP injected mice in both GR^{DATCre} and their littermates GR^{loxP/loxP}. The neuroprotective effect of CORT was abolished in GR^{DATCre} mice injected with MPTP. (C) A significant loss of dopaminergic fibers in MPTP group, in both GR^{DATCre} and GR^{loxP/loxP} was observed. dopaminergic fibers do not seem to be protected in mice that received CORT treatment (*P<0.05 relative to the control group; two way ANOVA followed by Duncan's test for B and C). (D) Measure of CORT levels 1 and 7 days after MPTP treatment show not different between GR^{DATCre} and GR^{loxP/loxP} mice under different treatments (*P<0.05 relative to the control and MPTP group; two way ANOVA followed by Duncan's test). Scale bar = 40µm for small panels, 100µm for left big panels and 1mm for right big panels in A.

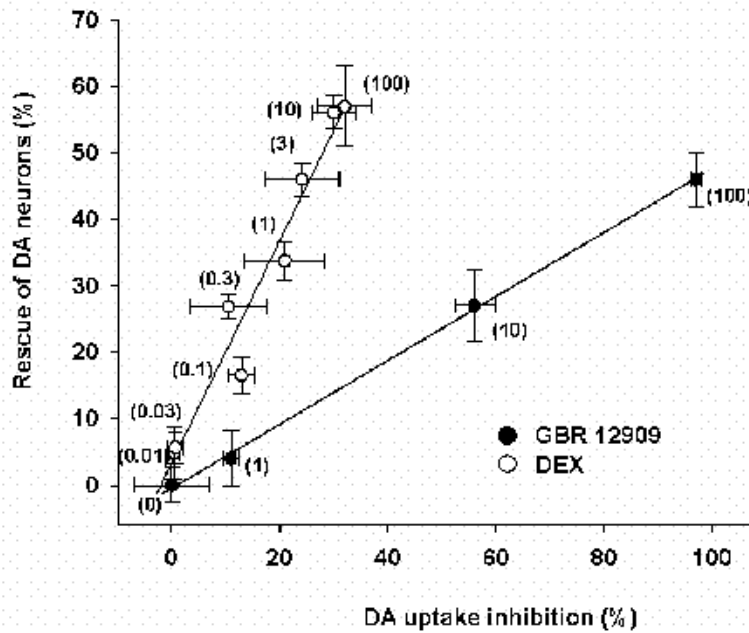


Figure 6. GR-mediated neuroprotection is not correlated to inhibition of dopamine uptake.

Efficacy of the DAT inhibitor GBR 12909 or of the GR agonist DEX to rescue TH⁺ neurons in MPP⁺ (3 μ M) -treated cultures plotted against the inhibitory effects of these compounds on dopamine accumulation. DEX and GRT 12909 concentration are indicated in brackets. Dopamine uptake was estimated at 5 DIV upon MPP⁺ intoxication and dopaminergic cell survival at 10 DIV. Different concentrations of DEX administered in 4 DIV were tested. Otherwise GBR 12909 treatments were applied just before uptake measurement. The survival of DNs in MPP⁺-treated cultures was 38.1 \pm 2,9% in this particular experiment.

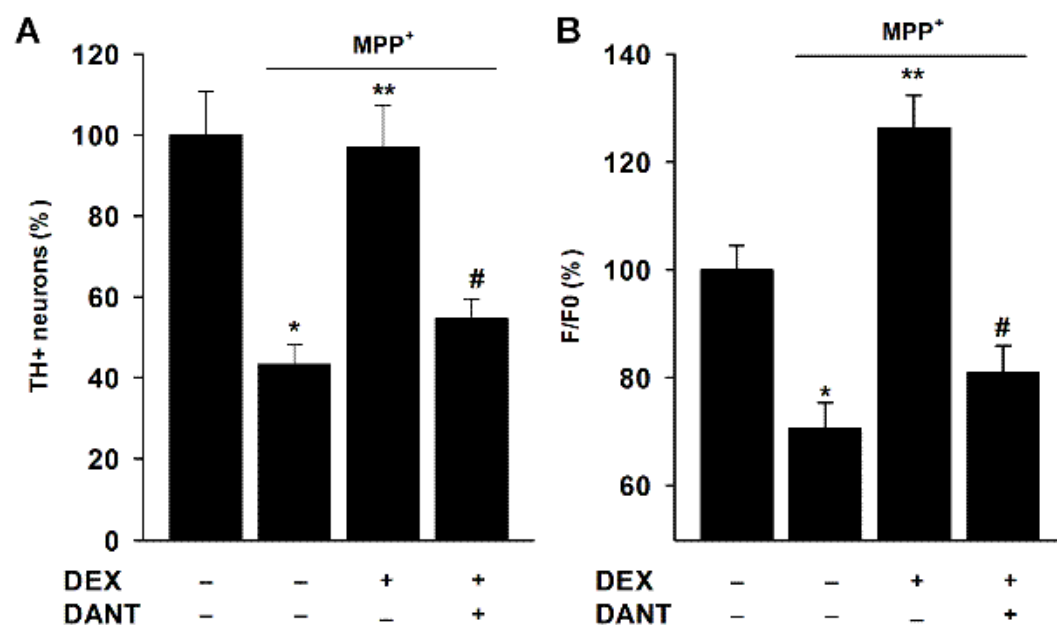


Figure 7. Role of ryanodine receptor channels in GR-mediated neuroprotection. (A) The protective effects of DEX (10 nM) for MPP⁺-treated DNs are prevented by blockade of RyR with dantrolene (30 μ M). (B) Measurement of intracellular Ca_{cyt}²⁺ levels in cultures exposed to MPP⁺ for 6 hr in the presence of not of DEX applied alone or in combination with dantrolene. MPP⁺ was used at 3 and 50 μ M in A and B, respectively. * P<0.05, relative to control group; ** P<0.05 relative to MPP⁺ group; # P<0.05 relative to MPP⁺ treated with DEX group.

Summary manuscript 2**Glucocorticoid receptor inactivation in microglia reveals its multiple actions during inflammation triggered by LPS**

Inflammatory response in the brain is characterized by an early innate response initiated by the activation of resident microglial and astrocytes, as well as by the infiltration of granulocytes and monocytes into the brain parenchyma. Subsequent events may require the establishment of a specific response, referred as adaptive immunity, including lymphocytes infiltration, antibody production and development of an immunological memory. The inflammatory reaction can be initiated by pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), recognized by specific receptors expressed at the surface of macrophages and microglia, the most representative of which are the members of the Toll-like receptors (TLR). The reaction to the endotoxin lipopolysaccharide (LPS), an important component of the outer membranes of gram-negative bacteria, is the best-characterized example of innate regulation, which leads to a robust inflammatory response by microglia (Nguyen et al., 2002). LPS is recognized by TLR4 expressed on macrophages and microglia and triggers intracellular molecular pathways, which lead to the production of pro-inflammatory molecules such as cytokines, chemokines, growth factors and adhesion molecules, but also anti-inflammatory factors such as GCs.

Glucocorticoids (GCs) are released upon activation of the HPA axis by stressful conditions, infection and disease. Their actions are mediated by glucocorticoid receptor (GR), a member of the nuclear receptor superfamily ubiquitously expressed. Activated GR is known to exert immunosuppressant and anti-inflammatory effects by complex mechanisms: direct or indirect trans-activation and trans-repression of target genes and non-genomic effects (Goulding, 2004). GR actions are important for development, suppression and resolution of inflammatory processes. For instance, GR activation can inhibit the expression of cytokines

and others pro-inflammatory molecules such as TNF, IL-1, COX-2 and nitric oxide (NO) (Barnes, 1998). Moreover, recent studies from our group have revealed that the GR may also modulate the expression of TLR receptors (Ros-Bernal et al., 2011; Addendum-1).

This section of the thesis is part of a larger project that studies the role of the GR in the cell types involved in the inflammatory process within the CNS, associated to infection, stress or neurodegenerative processes. To ascertain the relative involvement in vivo of each of these cell type (microglia, astroglia, neurons and endothelial cells), which are targets of GCs, the Dr. Tronche's laboratory has generated murine models genetically modified by the Cre/loxP system (see Experimental Approaches Section), in which the GR is inactivated in a specific cell type, without affecting the others. In the present section of the thesis, we study the role and mechanism of action of GR in the inflammatory processes in the CNS, analyzing its particular role in microglia during acute inflammation triggered by the lipopolysaccharide (LPS). At this aim, we used mice in which the GR gene is inactivated in macrophages/microglia ($GR^{LysMCre}$) (Clausen et al., 1999). We, therefore, compared the lesion caused by stereotaxic injections of LPS in $GR^{LysMCre}$ mice (mutant mice) and $GR^{loxP/loxP}$ mice (control mice), and observed that both lesion's volume and neuronal damage are significantly greater in mutant mice than in control. Similarly, demyelination of axons, triggered by the inflammatory reaction in the injection site, was exacerbated in mutant mice, indicating that microglial GR may have an important role in controlling the inflammatory events leading to axonal demyelination. Moreover, our results show that the LPS-induced neuronal damage is amplified by a chronic stress and is higher in mutant mice respect to control mice.

On the other hand, we also analyzed the state of activation of glial cells after LPS injection, showing a significantly greater microgliosis in mutant mice respect to control mice. Moreover, a higher number of reactive microglia with incorporated BrdU in their nucleus is

seen in mutant mice, suggesting a higher microglial proliferation. This reactive state is accompanied by an exacerbated increase in the expression of pro-inflammatory genes in both in vivo (in the striatum) and in vitro (in microglial cell cultures established from GR^{LysMCre} or GR^{loxP/loxP} mice). Concretely, in mutant mice, qPCR analysis shows higher level of activation, respect to control, of GR target genes (TNF, IL-1 iNOS, COX-2), but also of other genes codifying important molecules involved in the innate immune response, such as pro-caspases 1 and 4, TLR4 and MyD88.

In this study we demonstrate that microglial GR play an essential role in the regulation of acute inflammatory events after a single LPS injection in the brain parenchyma. The fact that GR^{LysMCre} mice showed an exacerbated injury after LPS intraparenchymal injection suggests that microglial GR may have an important role in the regulation of the inflammatory response in the CNS and, consequently, in the damage caused by acute inflammation. Absence of the microglial GR triggers a higher glial activation, amplifying the deleterious effects, and a higher microglial infiltration/proliferation respect to control, as well as the production of cytokines and other pro-inflammatory molecules.

In conclusion, we suggests that the absence of a negative feedback exerted by microglial GR on the expression of cytokines and other activators of innate immunity contributes to microglia activation, tissue damage and neuronal and myelin injury. In line with this, microglial GR activation may be considered as a potential therapeutic approach, in order to limit the inflammatory response in the CNS, reduce tissue injury and the neurodegenerative process occurring in a deregulated or exacerbated response in neuropathological processes.

Glucocorticoid receptor inactivation in microglia reveals its multiple actions during inflammation triggered by LPS

Carillo-de Sauvage MA^{1,2,3}, Pasco M^{1,2}, Newman T⁴, Delahaye M^{1,2}, Calvo CF³, Herrero MT³, Tronche F^{1,2}, Vyas S^{1,2,*}

¹CNRS UMR7224 and ¹INSERM U952, 9 Quai St Bernard, F-75005, Paris France

²Institute of Biology, Collège de France, 11 Place Marcelin Berthelot, F-75505, Paris, France.

³Clinical and Experimental Neuroscience, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), School of Medicine, University of Murcia, 30100 Murcia, Spain.

⁴ CNS Inflammation Group, School of Biological Sciences, University of Southampton, Bassett Crescent East SO16 7PX, UK

⁵INSERM U975, CNRS UMR 7225, UPMC, Centre de Recherche de l'Institut du Cerveau et de la Moelle Epiniere, Paris 75651, France.

*To whom correspondence should be addressed:

Sheela Vyas: Tel.: +33 144279135; Fax: +33 144276159

E-mail address: sheela.vyas@snv.jussieu.fr

ABSTRACT

The molecular mechanisms by which glucocorticoids (GCs), acting through their receptors (GR), affect neuronal integrity and viability, particularly in pathological situations, are not well defined. We used Cre/loxP-engineered macrophage/microglial-specific GR mutant (GR^{LysMCre}) mice to study the precise actions of GC-GRs in inflammatory process triggered by LPS-activated TLR4. Size of the necrotic lesion and white matter damage in the corpus callosum induced by intra-parenchymal LPS injection was greater in the GR^{LysMCre} mutant compared to control mice. LPS also triggered neuronal degeneration in mutant, but not in control, mice. Analysis of microgliosis and astrogliosis revealed increased microglial activation and proliferation in the GR^{LysMCre} mutant compared to control mice. An increased expression of potent pro-inflammatory molecules (TNF-, pro-IL-1, iNOS TLR4, procaspases) was also observed in mutant GR^{LysMCre} mice, underlining their role in the exacerbated inflammatory reaction and neuronal death. Pre-treatment of these mice with the GR antagonist RU 486 revealed that GR in other cell types plays a role in regulating inflammatory lesion produced by LPS and that microglial GR specifically regulates neuronal death. Furthermore, in vivo and in vitro analysis revealed that microglial GR also regulates microglial differentiation and motility. Stress and aging are both known to “prime” microglia that, in turn, increases microglial neurotoxicity. In GR^{LysMCre} mutants chronic mild unpredictable stress resulted in increased number of hypertrophied microglia in the substantia nigra and hippocampus, and significant neuronal degeneration following intra-parenchymal LPS injection. Overall our results show that the GR is a critical regulator of diverse microglial actions following its activation.

INTRODUCTION

Inflammatory reaction triggered by nerve injury, brain trauma, ischemia or pathogen invasion is characteristically associated with deleterious consequences for brain parenchyma. However, inflammation is fundamentally protective for the organism. Experimental evidences suggest that regulatory controls at multiple levels act not only to prevent inappropriate tissue damage but also to stimulate tissue repair processes (e.g. phagocytosis of cell debris, neovascularization, stimulation of neurogenesis and synaptic plasticity) (Fearon and Locksley, 1996). In the CNS, microglia, as initial sensors of danger signals and of altered microenvironment, plays a central role not only in mediating all aspects of inflammation, but also in influencing astrocyte activation and T cell recruitment (Nguyen et al., 2002). Changes in microglial morphology from the resting to the activated phenotype, often a signature of pro-inflammatory state, is observed in most CNS pathologies (Hanisch and Kettenmann, 2007). Whereas in acute inflammatory reactions (e.g. after acute nerve injury) microglia revert to resting phenotype, in neurodegenerative diseases, a chronically activated phenotype is observed, suggestive of a sustained inflammatory process (Ransohoff and Perry, 2009). Although mechanisms, such as transcriptional repression, expression of anti-inflammatory molecules and inhibitors of signaling pathways, are known to attenuate the active pro-inflammatory state of microglia, it is not precisely understood how microglia regulates the different modes of its actions, such as switching on and off the resting, inflammatory or reparative states.

Glucocorticoids (GCs) are well known for their anti-inflammatory properties. They are released from adrenal glands upon cellular injury, or pathogen invasion, and regulate the inflammatory response by binding to and activate the cognate glucocorticoid receptors (GRs) expressed in all immune cell types (De Bosscher et al., 2000). Their well-documented control of inflammatory gene expression is complex and multi-faceted; for example, they modulate transcriptional activities of NF- κ B, AP-1 (Activated protein-1) or IRF (IFN responsive factor) and can also bind directly to GRE sequences, present in promoters of target genes, to stimulate transcription of anti-inflammatory genes, such as MKP-1 (Clark, 2007). Therefore, GCs act to prevent inflammatory reaction from overshooting

through their binding to GR. In the CNS, administration of the GR antagonist RU486 was shown to exacerbate the damage caused by an inflammatory reaction triggered by a single injection of LPS (Nadeau and Rivest, 2003). Although this report demonstrated the central role of the GR in controlling inflammation in the CNS, its role in specific cells cannot be elucidated when globally inhibited. The GR is also activated by other stressors, particularly psychological, following activation of the HPA axis, (de Kloet et al., 2005). As these stressors can modulate the GC-GR actions during inflammation, in the early phase of stress response the GR is reported to be pro-inflammatory (De Kloet et al., 1998). Moreover, the activities of the GR are highly dependent on the time of permanence of high circulating levels of GCs and on the correct functioning of the HPA axis. Therefore, chronic stress, leading to protracted increase in GC levels, is known to cause dysfunction of the immune system (de Kloet et al., 2005; Munhoz et al., 2006) and, in the brain, an exacerbation of the inflammatory response (de Pablos et al., 2006).

To study the activities of the GR specifically in microglia, we generated mice with conditional inactivation of GR gene in macrophages (GR^{LysMCre}). We verified the specific absence of the GR in microglia and recently reported the crucial role of microglial GR in the survival of dopaminergic neurons (DNs) following treatment of these mice with the neurotoxin MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) (Ros-Bernal et al., 2011). In the present study, we have explored various roles of GR in microglia following its activation by LPS that specifically activate the TLR4. By intraparenchymal injection of LPS, we showed that microglial GR is critical in containing the inflammatory-induced damage. Although GRs in other cell types also play a role in regulating inflammatory-induced damages, GR in microglia specifically prevents neuronal degeneration triggered by active microglia. Results from in vivo and in vitro studies show that the GR regulates microglia proliferation, activation and motility. Moreover, GR plays an important role in inhibiting the increased capacity of activated microglia to inflict damage after chronic stress and in aging.

MATERIALS AND METHODS

Mice

Mice with conditional inactivation of GR gene. The GR^{LysMCre} mice were generated by crossing GR^{loxP/loxP} mice (Tronche et al., 1999) with LysMCre transgenic mice, which express Cre recombinase under the control of lysozyme M promoter (Clausen et al., 1999; Tuckermann et al., 2007). The mice were congenic to C57BL/6J at the start of the experiments. GR^{LysMCre} line was maintained by crossing GR^{LysMCre} mutant males with GR^{loxP/loxP} females.

Mice were group-housed under a controlled photoperiod (12h day-night cycles), at constant room temperature (22°C) and had access to food and water ad libitum. Both GR^{LysMCre} mice were genotyped for the presence of Cre transgene either by PCR or dot-blot analysis. All studies were performed in accordance with the Guidelines of the European Convention for the protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other scientific purposes of the Council of Europe of 2006, the Helsinki Declaration.

Treatments. For stereotaxic surgery, GR^{LysMCre} mutants mice and GR^{loxP/loxP} control littermates were anesthetised by an intra-peritoneal (i.p.) injection of avertin at a dose of 0.5mg/g. The scalp was shaved and a small hole was made at the surface for injection into the right striatum (David Kopf instruments) using the following stereotaxic co-ordinates (Paxinos and Franklin, 2001): from Bregma +1,1 mm anteroposterior, +2 mm lateral, and -2,9 mm dorsoventral. 1.5µg/µl LPS (LPS Escherichia coli, serotype 055:B5; Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France) dissolved in PBS was injected using a 10 µl Hamilton syringe into the right striatum over a 5 min period.

GR^{LysMCre} and GR^{loxP/loxP} mice were pre-treated by i.p. injection of 30mg/kg RU486 dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) or 100 µl DMSO alone as vehicle, 16 hrs before stereotaxic injection of LPS. GR^{LysMCre} and GR^{loxP/loxP} mice used for the experiments to examine glial cell proliferation were injected (i.p.) with 50mg/kg BrdU (HPLC, Sigma-B5002) once every 24 hours during a 3 day period, starting immediately after stereotaxic injection of LPS. In experiments on the effects of

systemic LPS injection on microglial reactivity, young (3-5 months of age) and old (15-30 months of age) GR^{LysMCre} and GR^{loxP/loxP} mice were injected i.p. with a low dose of 0.5mg/kg LPS or saline vehicle and sacrificed 24 hours after.

Chronic unpredictable mild stress paradigm Chronic variant stress was adapted from stress paradigm described in de Pablos et al. (de Pablos et al., 2006) with modifications. For GR^{LysMCre} and GR^{loxP/loxP} mice that received stress, a 6 days variant-stressor paradigm was used before LPS injection on the 7th day. Individual stressors and length of time applied each day are listed in Fig.6A. The following stressors were used: food deprivation, water deprivation and acute restraint at room temperature and at 4°C. Application of stress started at different time everyday to minimize predictability. Acute restraint stress was performed by placing a mouse in a plastic tube (50 ml Nalgen 21x6 cm tubes) that had holes in the caps and a slit on the side, and adjusting the tail with plaster tape on the outside so that the animal was unable to move.

Analysis of corticosterone levels. Blood from GR^{LysMCre} mice and their control littermates was collected by decapitation. The blood was centrifuged (first time at 1600g, 4°C, for 10 minutes and a second time at 2600 g, 4°C, for 15min) and the plasma stored at -80°C until analysis. Basal corticosterone (CORT) levels were always determined using the plasma obtained from blood taken between 7 a.m. and 9 a.m. CORT levels in plasma samples were determined by radioimmunoassay using a highly specific CORT antiserum (kit Immunochen™ Corticosterone- MP Biomedicals, Orangeburg, NY, USA).

Tissue preparation and specific staining

Three days after stereotaxic injections of LPS, GR^{LysMCre} and GR^{loxP/loxP} mice, both treated and not with either BrdU or RU486, were anesthetized with CO₂ and rapidly perfused transcardially with 0.1M sodium phosphate buffer (PBS) followed by 4% paraformaldehyde (PFA) in 0.1 M sodium phosphate buffer. Brains were removed from the skull and postfixed for 24 hours in 4% PFA. The entire

brain was sliced into 30 mm-thick coronal sections (Vibratome, Leica), and stored in PBS with 0.1% sodium azide.

Sections at the level of the lesion were stained for: i) luxol fast bleu (LFB) staining (1% LFB, 95% ethanol, 0.05% acetic acid) for 6 hours at 56°C, followed by 95% ethanol, 0.05%, lithium carbonate and 70% ethanol rinses; ii) cresyl violet staining (0.5% cresyl violet, 0.3% acetic acid, MERCK) for 2 min., followed by dehydration; iii) FluoroJade B (Histo-Chem Inc., Jefferson, AR) as described elsewhere (Schmued et al., 1997).

Immunohistochemistry. The sections were rinsed in PBS, treated with 0.3% H₂O₂ /PBS for 15 minutes and blocked in 4% goat serum (Sigma-Aldrich) in PBS-T (PBS/0.3% Triton X-100); sections were incubated with either a rabbit polyclonal anti-Iba1 (diluted 1:750; Wako Chemicals, Germany) or a rabbit polyclonal GFAP (diluted 1:1000, Sigma-Aldrich, France) primary antibody for 48 hrs (at 4°C, under constant shaking). Successively, sections were incubated for 4 hours in an anti-rabbit biotinylated secondary antibody (diluted 1:500; Vector Laboratories). Antigen-antibody binding sites were detected with the avidin-biotin peroxidase complex (ABC) kit (Vectastain, Vector Labs). Sections were mounted on superfrost plus slides, dehydrated in graded ethanol series and xylene and coverslipped.

Immunofluorescence. Non-specific Fc binding sites were blocked with 4% goat serum and sections were incubated for 48 hours (at 4°C, constant shaking) with one of the following primary antibodies: rabbit polyclonal anti-GFAP (1:1000) and rat polyclonal anti-F4/80 (1:400 Serotec, Oxford). Sections were incubated for 4 hours in the appropriate fluorescence-labeled secondary antibody and, after several washes in PBS, mounted and examined for quantification at a confocal microscope. Appropriate secondary antibodies were used: anti-rat Alexa 488-conjugated (diluted 1:1000, Molecular Probes) and cyanin-3 (CY3)-conjugated anti-mouse IgG antibody (diluted 1:500, Vector Lab). For double-staining with BrdU, the same sections were denatured with hydrochloric acid 2N at 37°C and neutralized with borate buffer 0.1M; after washes in PBS, the tissue was blocked with 0.25% gelatin and incubated for 48 hours (at 4°C, constant shaking) with a rat anti-BrdU (1:200; BUI (ICRI), Immunological Direct). For the GFAP-BrdU double labeling, sections were incubated for 4 hours with anti rat Alexa 488-

conjugated (diluted 1:400, Molecular Probes). For the F4/80-BrdU double labeling, sections were incubated for 4 hours with anti rat biotinylated secondary antibody (diluted 1:500), washed in PBS, and incubated with Streptavidin-Alexa Fluor 546 (1:500; Molecular Probes).

Quantification of the lesion, cell count, fluorescence microscopy and confocal analysis

FluoroJadeB positive cells, as well as the lesioned area stained with cresyl violet, or LFB, at the level of the cortex, corpus callosum and striatum were analyzed by bright-field microscopy (Nikon). Images were acquired with a camera and analyzed using the Mercator image analysis software (Explora Nova, La Rochelle, France). For quantification of activated microglia and astroglia, the ImageJ software was used. The genotype of mice was unknown to the investigator at the time of quantification.

Double labeling of BrDU with microglia and astroglia cell markers was analyzed at a Leica TCS SP2 confocal microscope. A series range for each field in the section was set by determining an upper and lower threshold using the Z/Y position obtained from a Spatial Image Series setting [for further details see (Barcia et al., 2006; Barcia et al., 2008)]. Images can be illustrated as they appear throughout the stack of sections as a simple 0.5 mm layer or as a transparency of all layers merged together. Over the stacks of the images, GFAP-BrdU positive and F4/80-BrdU positive cells were quantified using LCS Lite software (Leica).

In vitro experiments on primary microglial cells from P1 GR^{LysMCre} and GR^{loxP/loxP} pups

Cerebral hemispheres were dissected and the cortex extracted from newborn mice after removal of meninges. After dissociation and homogenization, cells were seeded into culture dishes (NUNC, Polylabo, Strasbourg, France) at 0.3×10^6 cells/ml in DMEM containing 10% heat-inactivated FCS (Abcys, Paris, France). Medium was changed at days 1 and 3, and microglial cells were collected at day 12 by shaking culture dishes to detach cells adhering to the astrocyte monolayer, as described (Meme et al., 2006).

For time-lapse video-microscopy studies, freshly collected microglia was seeded in DMEM containing 4% FCS. After 90 min of incubation at 37°C, the video-microscopy started up, with cells under different treatments: LPS (Sigma-Aldrich), 50 μ M ATP, 300 μ M oxidized ATP (ox-ATP) or without treatment (all products were purchased from Sigma-Aldrich).. The 12-well culture dish was put under microscopy stage in a 37°C heated chamber, with 5% CO². The images were captured every 10 minutes using Lecia DM IRBE microscope and camera. The treatments were initiated at the start of recording.

For qPCR studies, freshly collected microglia was seeded in DMEM containing 4% FCS and treated with 100 ng/ml LPS and/or 100 μ M dexamethasone (DEX, Sigma-Aldrich) for 1 h. After this treatment, LPS medium was replaced by fresh medium during 1 h. Then microglial cells were collected in RLT buffer from RNeasy Mini Kit (Qiagen) and stored at -80°C.

qPCR analysis

6 or 24 hr after LPS stereotactic injection, striata region was rapidly dissected by a punching at -5 to -10°C, in sterile conditions, and tissues were kept in RNA Later (Qiagen). Total RNA was prepared using the RNeasy lipid mini kit (Qiagen). The RNA integrity and concentration was determined by using Agilent gel and Agilent apparatus, on average the RIN values were between of 8-9. 1 μ g of total RNA was used for cDNA synthesis (InVitrogen SuperscriptIII) and QPCR experiments were carried out on Biorad Icyler. HPRT gene was used as an internal control.

Statistical Analysis

Results are expressed as mean \pm standar error of the mean (SEM). The criteria used to choose the statistical test to analyze the data were determined by the comparison required and the number of factors present in the experiments. Student's t test was performed in experiments where simple comparisons between two groups were required. One-way ANOVA, followed by the post hoc test Dunnett's test, was performed in experiments where multiple comparisons against a single reference group were required. Finally, two-way ANOVA was performed, and the post hoc tests were carried out

with Duncan's method, when there were two factors to compare. The null hypothesis was rejected for a risk equal to 5%. All statistical analyses were performed using software SigmaStat 3.5 (Copyright 2005 SYSTAT Software).

RESULTS

The absence of GR in microglia exacerbates inflammatory lesion and induces neuronal degeneration following a single intraparenchymal injection of LPS

We used mice in which GR gene is inactivated in microglia to examine its role during an acute inflammatory response in the parenchyma CNS triggered by a LPS injection. Lesion's volume, measured by cresyl violet staining, was evaluated 3 days after a unilateral injection of LPS, following the track of the needle, being more prominent in the cortex. In the control GR^{loxP/loxP} mice, little damage was observed in the striatum. On the contrary, mutant mice frequently displayed a striatal lesion. Analysis of lesion after administration of either a low (1.5 µg/µl) or high (5 µg/µl) dose of LPS injected in the right parenchymal region of both GR^{loxP/loxP} and GR^{LysMCre} mice, showed a significantly greater damage in the GR^{LysMCre} mutants compared to control (Fig.1A). To examine whether microglial GR has a specific role in regulating neuronal damage, fluorojade B positive degenerating neurons, present mostly in the cortical area, were quantified 3 days after injection. Injection of saline resulted in the degeneration of neurons around the site where the needle pierced the cortex and this number was comparable between control and mutant mice. Importantly, a further increase in the number of fluorojade B positive neurons after 1.5 µg/µl LPS injection was not observed in control GR^{loxP/loxP} mice, whereas a 2-3 fold increase in GR^{LysMCre} mutant mice was found (Fig.1B). 7 days after LPS injection, the number of FluoroJadeB positive neurons were comparable with the saline-injected mice (Fig.1B), suggesting that there may be an increase in the engulfment of degenerating neurons in the mutants.

LPS induced inflammation in the CNS can result in a damage to axonal fibers and demyelination (Nadeau and Rivest, 2003). To examine the implication of microglial GR in axonal damage, the sections were stained with Luxol Fast Blue (LFB). The results of LFB 3 days after 1.5 or 5

$\mu\text{g}/\mu\text{l}$ LPS injection suggested that demyelination may be occurring in the corpus callosum of the $\text{GR}^{\text{LysMCre}}$, but not in control $\text{GR}^{\text{loxP/loxP}}$, mice. Quantification of lesion at the level of corpus callosum showed a significant damage in mutants compared to controls (Fig.1C). CORT levels were analysed after intraparenchymal LPS or saline injection to verify for any differences in the levels between control and mutant mice. An increased of 4-5 folds in the levels of CORT was observed in both control and mutant mice 3 days after LPS compared to saline injection, indicating that there is not a de-regulation of the HPA axis in mutants. It is also likely that ongoing CNS inflammatory processes maintain high the CORT levels and that the resultant activation of the GR would affect the LPS-induced innate immune response (Nadeau and Rivest, 2002) (Fig.1D).

RU486 pre-treatment reveals the role of GR in cell types other than microglia in causing inflammatory lesion, however microglial GRs are the principal regulators of neuron degeneration

RU486, an antagonist of the GR, was shown to aggravate inflammatory-induced lesion triggered by LPS in the CNS (Nadeau and Rivest, 2003). To determine whether the GR expressed in other cell types rather than microglia plays a role in the LPS-induced innate immune response, we pre-treated $\text{GR}^{\text{LysMCre}}$ and $\text{GR}^{\text{loxP/loxP}}$ mice with RU486 (30 mg/kg) in DMSO 16 h before LPS intrastriatal injection. Both the total lesion quantified on cresyl violet stained sections and the lesion of the corpus callosum, evaluated 3 days after LPS injection, were significantly greater in pre-treated RU486 compared with vehicle DMSO-treated control $\text{GR}^{\text{loxP/loxP}}$ mice, in accordance with the results reported by Nadeau and Rivest (Nadeau and Rivest, 2003) (Fig. 2A, B). Interestingly, an increase in the lesion was also observed in mutant $\text{GR}^{\text{LysMCre}}$ mice strongly suggesting that, in addition to microglia, the GR present in other cell types regulates the inflammatory process. Importantly, although pre-treatment with the RU486 augments neuronal degeneration in control $\text{GR}^{\text{loxP/loxP}}$ mice, there is no further increase in mutant $\text{GR}^{\text{LysMCre}}$ mice indicating that microglial GR specifically regulates LPS-induced neuronal death (Fig. 2C).

Microglial GR regulates microglia proliferation and activation after intra-parenchymal injection of LPS

Both microglial and astroglial reactivity were evaluated by F4/80 and GFAP immunolabeling, respectively, in GR^{LysMCre} and GR^{loxP/loxP} mice 3 days after LPS injection. In addition, we also analyzed the proliferation of these cells by injections of BrdU and verified their identity by double-labelling anti-specific cell markers and BrdU antibodies. Both reactive microglia and astroglia were present in the cortical and septal areas of the ipsilateral side of LPS injection, surrounding the needle trajectory, and in the striatum (Fig. 3A). Morphologically, a greater number of F4/80 positive cells exhibiting an amoeboid morphology were observed in the cortical and septal areas in GR^{LysMCre} mice compared to GR^{loxP/loxP} mice (Fig. 3B). Measurement of the surface area occupied by these cells using DAB-labeled sections showed that the area covered by reactive microglia was almost double in the GR^{LysMCre} mutants compared to control GR^{loxP/loxP} mice (Fig 3B). Significant differences in reactive astroglial morphology, or the area covered by these cells, in GR^{LysMCre} and GR^{loxP/loxP} mice were not observed (Fig. 3 B and C). Quantification of the reactive microglia and astroglia that had incorporated BrdU showed that microglial proliferation was almost 3 times greater than that of astroglia and, notably, in GR^{LysMCre} mice microglial proliferation was significantly greater compared to GR^{loxP/loxP} mice (Fig. 3D), suggesting that the microglial GR likely regulates genes ruling cell cycle following the activation of the TLR4 signaling pathway.

Microglial GR regulates in vivo and in vitro the innate immune response initiated by the TLR4 following LPS treatment

Proinflammatory molecules such TNF, iNOS, IL-1 or COX-2 released from activated microglia can induce tissue damage and neuronal injury. To examine whether the exacerbated inflammatory damage observed in GR^{LysMCre} mice was the result of modulations in the expression of inflammatory genes, we analyzed the expression levels of some of the known GR target genes by qPCR in the lesioned cortical and striatal areas, 6 and 24 hrs after intra-parenchymal LPS injection. The relative quantitative values obtained in GR^{LysMCre} mice were compared to those obtained in GR^{loxP/loxP} mice (Fig.

4 A and B). An increase in the expression of TNF, iNOS, proIL-1 and COX-2 was already evident 6 hrs after LPS injection. However, the expression levels between animals were quite variable, so that statistical significance was only found for the TNF mRNA after 24 hrs (Fig. 4A). The genes coding for upstream activators of the innate immune response were also analyzed; among TLRs, only the TLR4 showed an increase in its mRNA level in GR^{LysMCre} mutant mice compared to control. Interestingly, an increase in the procaspase 1 and 4 mRNAs, although with an internal animal variability, was found after 24 hr (Fig. 4B)

To verify whether microglial GR indeed regulates the expression of these pro-inflammatory genes, we analyzed their mRNA levels in primary microglial cultures prepared from the cortices of GR^{loxP/loxP} and GR^{LysMCre} P1 pups. Microglial cultures were treated with 100 ng/ml of LPS or pre-treated with 100 M DEX, for 1hr, before treatment with LPS plus DEX. The obtained results indicates that in control GR^{loxP/loxP} cultures the expression of TNF- proIL-1 and COX-2 is DEX-sensitive. However, in GR^{LysMCre} cultures, there was a considerable increase in the expression of these genes and, notably, their expression was not sensitive to DEX (Fig. 4C). An increase in the expression of TLR4 was found only in the GR^{LysMCre} cultures, suggesting that the GR most likely tightly regulate its expression (Fig. 4C).

In vitro microglia exhibit reduced motility and increased amoeboid morphology in the absence of the GR

To examine whether the GR regulates any other properties of microglia, we performed video-microscopy analysis of microglia cultures from GR^{loxP/loxP} and GR^{LysMCre} pups, treated with either 50 M ATP or 300 M Ox-ATP. Upon ATP treatment, ruffling of the microglial membrane was observed in both GR^{loxP/loxP} and GR^{LysMCre} cultures (Fig 5A). From the video-microscopic images taken every 10 minutes for 10-15 hrs, cells were tracked at the beginning of the experiment until the end and the mean distance was calculated by using ImageJ software from 4 fields, in each condition in duplicates. This analysis showed that mutant GR^{LysMCre} cells have a drastically reduced capacity of motility compared to the control GR^{loxP/loxP} cells (Fig. 5B). The movement of the GR^{loxP/loxP} cells is dependent on ATP, as treatment of cells with the ATP inhibitor Ox-ATP, significantly reduced their motility. GR^{LysMCre}

cultures were unaffected by Ox-ATP treatment. The majority of the microglial cells in cultures exhibit either rod-like or amoeboid morphology. Quantification from the video-microscopic images showed a greater percentage of mutant GR^{LysMCre} cultures exhibiting amoeboid morphology compared to GR^{loxP/loxP} cultures and this feature remained unchanged with time in culture (Fig. 5C).

GR regulates the activation state of microglia during chronic unpredictable mild stress (CUMS) and in aging, its consequences on neuronal integrity

Acute or chronic stress is reported to sensitize or "prime" microglia for activation that can subsequently affect their responses to an inflammatory insult. The role of GCs in this regard has been evoked previously in stress-induced sensitization of neuro-inflammatory processes (de Pablos et al., 2006; Frank et al., 2010; Johnson et al., 2002; Munhoz et al., 2006). Additionally, the brains of aged rodents or human display a greater number of hypertrophic microglia than those of young animals, suggesting that the aging process may also sensitize microglia. To see whether microglial GR regulates this sensitization, young 3-5 month old GR^{loxP/loxP} and GR^{LysMCre} mice were subjected to CUMS for 6 days (Fig.6A). The mice were sacrificed 24 hr later and the brains treated for Iba-1 immunohistochemistry. The results showed that among all the regions analyzed, substantia nigra and hippocampus had an greater number of hypertrophic microglia in GR^{LysMCre} mutant mice compared to control GR^{loxP/loxP} mice (Fig.6B), indicating that microglial GR in these regions normally regulates microglia activation induced by stress.

GR^{loxP/loxP} and GR^{LysMCre} mice, either subjected to CUMS or left unstressed, were injected intraparenchymally with 1.5g/l LPS 24 hrs late The mice were sacrificed 3 days later and analyzed for neuronal degeneration by fluorojade B staining. Fluorojade B positive neurons were not observed in any brain region of un-injected animals, indicating that there is no spontaneous neuronal degeneration. The number of fluorojade B positive neurons in un-stressed GR^{loxP/loxP} and GR^{LysMCre} mice were similar to the results shown in Fig. 1B, however an increase of about 2-3 fold in degenerating neurons in the GR^{LysMCre} mutant mice was observed, suggesting an important role of the GR in restraining microglia

activation during stress (Fig. 6C). Analysis of the CORT levels after stress in control and mutant mice showed that stress increased CORT levels to comparable levels in both mice genotypes (Fig. 6D).

DISCUSSION

Signaling between immune cells, endocrine system and the CNS contributes to restore homeostatic state after an inflammatory insult. If the reaction of these systems is inappropriate, the inflammatory response can become excessive, triggering neuronal injury and cell death (Sternberg, 2006). Indeed, our results show that inflammatory reaction triggered by the TLR4 signaling in microglia lacking GR results in neuronal and axonal damage, as well as increased necrotic lesion due to an inadequate inflammatory regulation. GCs released in response to stress stimuli exert diverse effects in immune cells through the activation of GR. Their precise role in neuronal survival is not well understood. To dwell with this issue, previous works on GCs and the GR have used pharmacological tools, such as GR agonists or antagonists and depletion of GCs by adrenalectomy. However, these approaches affect all cell types and the results are thus the sum of multiple changes. To understand precisely how the GR acts in microglia, we used mice in which the GR gene is selectively inactivated in macrophages/microglia by the Cre/loxP system (GR^{LysMCre}).

In brain, microglia are the principal innate immune responsive cells that express the TLR4 and, thus, constitute the main effectors of LPS-induced inflammatory response (Lehnardt et al., 2003). Intra-parenchymal injection of LPS triggered a localized inflammatory response characterized by necrotic lesion and significant glial activation along the trajectory of injection. Intriguingly, as also reported by Nadeau and Rivest (2003) necrotic lesion in the striatum was less evident than in the cortex, particularly in control GR^{loxP/loxP} mice. It is possible that blood born monocyte infiltration had occurred at the surface of the cortex, which resulted in an increase in the proinflammatory mediators, and/or that there may be functional differences of the microglia localized in these two regions, for example in their expression of TLR4. We did not observe cells positively stained for Gr-1, suggesting that neutrophil infiltration had likely not occurred (data not shown). The lesion caused by saline injection was similar between control and mutant mice, with insignificant F4/80 labeled cells,

suggesting that microglial activation was minimal. However, necrotic lesion was significantly larger following LPS injection in GR^{LysMCre} mice. Moreover, demyelination and damage to the corpus callosum at the site of injection trajectory was also greater in the mutants. It is possible that pro-inflammatory mediators secreted by microglia in the corpus callosum directly affects axons and resident glia, e.g. oligodendrocytes, in this area. LPS, while from one side does not induce neuronal death, as demonstrated by fluorojade B staining in control GR^{loxP/loxP} mice, on the other side caused a significant neuronal degeneration in the GR^{LysMCre} mice. LPS was shown to have regional specificity with regard to neuronal damage, being the DN neurons in the SN sensitive, and the cortical and hippocampal neurons resistant, to LPS (Arimoto and Bing, 2003; Castano et al., 2002; Kim et al., 2000; Nadeau and Rivest, 2003). At this regard, our result clearly demonstrates that GR in microglia acts to prevent LPS-activated microglia from killing neurons. The similar systemic increases in the levels of CORT after LPS injection between GR^{loxP/loxP} and GR^{LysMCre} mice implies that GR inactivation in macrophages/microglia does not alter the HPA axis and that increased CORT levels activates the GR. In this respect, we previously showed that upon MPTP treatment in mice, there is a dramatic increase in nuclear the labeling for GR in microglia (Ros-Bernal et al., 2011).

Increased necrotic lesion by LPS in both GR^{loxP/loxP} and GR^{LysMCre} mice after pre-treatment with RU486 implies an involvement of other cells (e.g. astroglia, infiltrating T cells, oligodendrocytes) that also express TLR4. GR inhibition in these cells could result in increased levels of pro-inflammatory mediators. Astrocytes are known to express little, if any, TLR4 (Farina et al., 2007; Lehnardt et al., 2003). However, astrocytic reactivity is increased by microglia-secreted cytokines, e.g. TNF- or IL-1 (Nguyen et al., 2002), raising the possibility that the GR in these cells act as a brake in their pro-inflammatory response. It is also plausible that the GR in these cells play a role in their viability; in this respect, a pro-survival role of the GR has been described in oligodendrocytes (Glezer and Rivest, 2010). Interestingly, RU486 pre-treatment does not further affect neuronal degeneration in GR^{LysMCre} mice strongly indicating that GR specifically localized in the microglia is crucial in regulating LPS-triggered neuronal damage.

Glial activation characterizes the inflammatory reaction in the CNS (Block et al., 2007; Chen and Swanson, 2003; Gehrmann et al., 1995; Nguyen et al., 2002; Wang et al., 2010). The analysis of microgliosis and astrogliosis after intraparenchymal LPS injection showed an increased in microglial proliferation and activation in GR^{LysMCre} compared to GR^{loxP/loxP} mice. The GR likely affects the morphological differentiation of microglia from resting to hypertrophic to amoeboid, as we observed numerous amoeboid-shaped microglia around the trace of the needle at the cortical surface of GR^{LysMCre} mice. This finding was corroborated by quantification of video-microscopic images of amoeboid-shaped microglia in culture. This likely constitutes an important action of GR in microglia, as we showed its regulation of activation following injury of the DNs of SN by MPTP (Ros-Bernal et al., 2011). Video-microscopy analysis also revealed that GR likely regulates ATP-dependent microglial motility. qPCR analysis of GR^{loxP/loxP} and GR^{LysMCre} microglia cultures did not reveal any differences in the expression of purinergic receptors P2Y₁₂, P2Y₆ and P2X₄ (data not shown) known to be involved in microglial movement (Gyoneva et al., 2009). However, GR is known to affect mitochondrial functions (Du et al., 2009) and it is possible that it plays a role in ATP synthesis.

The inflammatory reaction mediated by microglia is characterized by production of both pro-inflammatory and anti-inflammatory factors, including growth factors, cytokines and neurotransmitters, which determine either neurotrophic or neurotoxic effects (Chao et al., 1995; Garden and Moller, 2006; Glezer et al., 2007; Simard and Rivest, 2007; Streit et al., 1999; Vitkovic et al., 2000). To identify genes modulated by the GR after TLR4 activation in microglia, we analyzed the expression of several pro- and anti-inflammatory genes by qPCR in vivo and in vitro. Among the cytokines, enzymes and growth factors (TNF-, IL-1, IL-6, IL-9, IL-10, IFN-, iNOS, COX-2, BDNF) analyzed, TNF-, IL-1, iNOS, COX-2 were up-regulated. The analysis of upstream activators of the inflammatory response, i.e. TLRs and pro-caspases, showed that GR specifically modulates TLR4 and pro-caspases 1 and 4. A wide variety of genes including multiple TLRs were modulated by the GR following MPTP intoxication (Ros-Bernal et al, 2011) compared to the modulation pattern seen after LPS intoxication. Although a more comprehensive analysis is necessary, these results suggest that gene regulation by the GR is dependent on the initiating signal. The increases in potent pro-

inflammatory mediators, together with a feed-forward inflammatory state induced by higher TLR4 and pro-caspases levels, suggest that they likely exacerbate necrotic lesion and induce neuronal damage in GR^{LysMCre} mutant mice. It has been shown that a preceding stress can “prime” microglia in various brain regions and exacerbate the inflammatory response triggered by LPS, resulting in neuronal death, whereas LPS treatment alone has no effect on neuronal viability (Espinosa-Oliva et al., 2009; Sugama et al., 2007). GCs may mediate stress-induced sensitization of these neuroinflammatory processes (de Pablos et al., 2006; Frank et al., 2010; Johnson et al., 2002; Munhoz et al., 2006). Our results on CUMS suggest that microglia in substantia nigra and hippocampus are particularly sensitive to stress, since in the absence of functional microglial GR there is an up-regulation of hypertrophic microglia in these regions. Exacerbated neuronal degeneration was also observed in stressed GR^{LysMCre} mice injected with LPS. This effect was not the result of a de-regulation of the HPA axis activity in GR^{LysMCre} mice, as the CORT levels were similarly high after stress in both GR^{loxP/loxP} and GR^{LysMCre} mice. The molecular changes, which occur in microglia in response to stress are not known, but it is plausible that GCs may act in a pro-inflammatory manner as previously evoked (Sorrells et al., 2009).

In conclusion, GR in microglia regulates, in addition to well-known inhibition of pro-inflammatory mediators, other important functions of microglia such as its proliferation, differentiation and motility in response to an inflammatory insult. This activity is dependent on the type of insult and further molecular characterization of its actions in “priming” the mechanisms of microglia during stress could help in understanding the roles of microglia in neurodegenerative diseases and neurological disorders, e.g. stroke.

BIBLIOGRAPHY

- Arimoto, T., and Bing, G. (2003). Up-regulation of inducible nitric oxide synthase in the substantia nigra by lipopolysaccharide causes microglial activation and neurodegeneration. *Neurobiol Dis* 12, 35-45.
- Barcia, C., Thomas, C.E., Curtin, J.F., King, G.D., Wawrowsky, K., Candolfi, M., Xiong, W.D., Liu, C., Kroeger, K., Boyer, O., et al. (2006). In vivo mature immunological synapses forming SMACs mediate clearance of virally infected astrocytes from the brain. *J Exp Med* 203, 2095-2107.
- Barcia, C., Wawrowsky, K., Barrett, R.J., Liu, C., Castro, M.G., and Lowenstein, P.R. (2008). In vivo polarization of IFN-gamma at Kupfer and non-Kupfer immunological synapses during the clearance of virally infected brain cells. *J Immunol* 180, 1344-1352.
- Barnes, P.J. (1998). Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin Sci (Lond)* 94, 557-572.
- Block, M.L., Zecca, L., and Hong, J.S. (2007). Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci* 8, 57-69.
- Castano, A., Herrera, A.J., Cano, J., and Machado, A. (2002). The degenerative effect of a single intranigral injection of LPS on the dopaminergic system is prevented by dexamethasone, and not mimicked by rh-TNF-alpha, IL-1beta and IFN-gamma. *J Neurochem* 81, 150-157.
- Clark, A.R. (2007). Anti-inflammatory functions of glucocorticoid-induced genes. *Mol Cell Endocrinol* 275, 79-97.
- Clausen, B.E., Burkhardt, C., Reith, W., Renkawitz, R., and Forster, I. (1999). Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using Ly^{MCh} mice. *Transgenic Res* 8, 265-277.
- Chao, C.C., Hu, S., and Peterson, P.K. (1995). Glia, cytokines, and neurotoxicity. *Crit Rev Neurobiol* 9, 189-205.
- Chen, Y., and Swanson, R.A. (2003). Astrocytes and brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 23, 137-149.
- De Bosscher, K., Vanden Berghe, W., and Haegeman, G. (2000). Mechanisms of anti-inflammatory action and of immunosuppression by glucocorticoids: negative interference of activated glucocorticoid receptor with transcription factors. *J Neuroimmunol* 109, 16-22.
- de Kloet, E.R., Joels, M., and Holsboer, F. (2005). Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci* 6, 463-475.
- De Kloet, E.R., Vreugdenhil, E., Oitzl, M.S., and Joels, M. (1998). Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr Rev* 19, 269-301.
- de Pablos, R.M., Villaran, R.F., Arguelles, S., Herrera, A.J., Venero, J.L., Ayala, A., Cano, J., and Machado, A. (2006). Stress increases vulnerability to inflammation in the rat prefrontal cortex. *J Neurosci* 26, 5709-5719.
- Du, J., Wang, Y., Hunter, R., Wei, Y., Blumenthal, R., Falke, C., Khairova, R., Zhou, R., Yuan, P., Machado-Vieira, R., et al. (2009). Dynamic regulation of mitochondrial function by glucocorticoids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 3543-3548.
- Espinosa-Oliva, A.M., de Pablos, R.M., Villaran, R.F., Arguelles, S., Venero, J.L., Machado, A., and Cano, J. (2009). Stress is critical for LPS-induced activation of microglia and damage in the rat hippocampus. *Neurobiol Aging* 32, 85-102.
- Farina, C., Aloisi, F., and Meini, E. (2007). Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol* 28, 138-145.
- Fearon, D.T., and Locksley, R.M. (1996). The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 272, 50-53.
- Frank, M.G., Miguel, Z.D., Watkins, L.R., and Maier, S.F. (2010). Prior exposure to glucocorticoids sensitizes the neuroinflammatory and peripheral inflammatory responses to *E. coli* lipopolysaccharide. *Brain Behav Immun* 24, 19-30.
- Garden, G.A., and Moller, T. (2006). Microglia biology in health and disease. *J Neuroimmune Pharmacol* 1, 127-137.
- Gehrmann, J., Matsumoto, Y., and Kreutzberg, G.W. (1995). Microglia: intrinsic immune effector cell of the brain. *Brain Res Brain Res Rev* 20, 269-287.
- Glezer, I., and Rivest, S. (2010). Oncostatin M is a novel glucocorticoid-dependent neuroinflammatory factor that enhances oligodendrocyte precursor cell activity in demyelinated sites. *Brain Behav Immun* 24, 695-704.
- Glezer, I., Simard, A.R., and Rivest, S. (2007). Neuroprotective role of the innate immune system by microglia. *Neuroscience* 147, 867-883.
- Goulding, N.J. (2004). The molecular complexity of glucocorticoid actions in inflammation - a four-ring circus. *Curr Opin Pharmacol* 4, 629-636.
- Gyoneva, S., Orr, A.G., and Traynelis, S.F. (2009). Differential regulation of microglial motility by ATP/ADP and adenosine. *Parkinsonism Relat Disord* 15 Suppl 3, S195-199.

- Hanisch, U.K., and Kettenmann, H. (2007). Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci* 10, 1387-1394.
- Johnson, J.D., O'Connor, K.A., Deak, T., Stark, M., Watkins, L.R., and Maier, S.F. (2002). Prior stressor exposure sensitizes LPS-induced cytokine production. *Brain Behav Immun* 16, 461-476.
- Kim, W.G., Mohney, R.P., Wilson, B., Jeohn, G.H., Liu, B., and Hong, J.S. (2000). Regional difference in susceptibility to lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in the rat brain: role of microglia. *J Neurosci* 20, 6309-6316.
- Lehnardt, S., Massillon, L., Follett, P., Jensen, F.E., Ratan, R., Rosenberg, P.A., Volpe, J.J., and Vartanian, T. (2003). Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8514-8519.
- Meme, W., Calvo, C.F., Froger, N., Ezan, P., Amigou, E., Koulakoff, A., and Giaume, C. (2006). Proinflammatory cytokines released from microglia inhibit gap junctions in astrocytes: potentiation by beta-amyloid. *FASEB J* 20, 494-496.
- Munhoz, C.D., Lepsch, L.B., Kawamoto, E.M., Malta, M.B., Lima Lde, S., Avellar, M.C., Sapolsky, R.M., and Scavone, C. (2006). Chronic unpredictable stress exacerbates lipopolysaccharide-induced activation of nuclear factor-kappaB in the frontal cortex and hippocampus via glucocorticoid secretion. *J Neurosci* 26, 3813-3820.
- Nadeau, S., and Rivest, S. (2002). Endotoxemia prevents the cerebral inflammatory wave induced by intraparenchymal lipopolysaccharide injection: role of glucocorticoids and CD14. *J Immunol* 169, 3370-3381.
- Nadeau, S., and Rivest, S. (2003). Glucocorticoids play a fundamental role in protecting the brain during innate immune response. *J Neurosci* 23, 5536-5544.
- Nguyen, M.D., Julien, J.P., and Rivest, S. (2002). Innate immunity: the missing link in neuroprotection and neurodegeneration? *Nat Rev Neurosci* 3, 216-227.
- Paxinos, G., and Franklin, K. (2001). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, 2 edn (San Diego: Academic Press).
- Ransohoff, R.M., and Perry, V.H. (2009). Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu Rev Immunol* 27, 119-145.
- Ros-Bernal, F., Hunot, S., Herrero, M.T., Parnadeau, S., Corvol, J.C., Lu, L., Alvarez-Fischer, D., Carrillo-de Sauvage, M.A., Saurini, F., Coussieu, C., et al. (2011). Microglial glucocorticoid receptors play a pivotal role in regulating dopaminergic neurodegeneration in parkinsonism. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Schmued, L.C., Albertson, C., and Slikker, W., Jr. (1997). Fluoro-Jade: a novel fluorochrome for the sensitive and reliable histochemical localization of neuronal degeneration. *Brain Res* 751, 37-46.
- Simard, A.R., and Rivest, S. (2007). Neuroprotective effects of resident microglia following acute brain injury. *J Comp Neurol* 504, 716-729.
- Sorrells, S.F., Caso, J.R., Munhoz, C.D., and Sapolsky, R.M. (2009). The stressed CNS: when glucocorticoids aggravate inflammation. *Neuron* 64, 33-39.
- Sternberg, E.M. (2006). Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens. *Nat Rev Immunol* 6, 318-328.
- Streit, W.J., Walter, S.A., and Pennell, N.A. (1999). Reactive microgliosis. *Prog Neurobiol* 57, 563-581.
- Sugama, S., Fujita, M., Hashimoto, M., and Conti, B. (2007). Stress induced morphological microglial activation in the rodent brain: involvement of interleukin-18. *Neuroscience* 146, 1388-1399.
- Tronche, F., Kellendonk, C., Kretz, O., Gass, P., Anlag, K., Orban, P.C., Bock, R., Klein, R., and Schutz, G. (1999). Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. *Nat Genet* 23, 99-103.
- Tuckermann, J.P., Kleiman, A., Moriggl, R., Spanbroek, R., Neumann, A., Illing, A., Clausen, B.E., Stride, B., Forster, I., Habenicht, A.J., et al. (2007). Macrophages and neutrophils are the targets for immune suppression by glucocorticoids in contact allergy. *J Clin Invest* 117, 1381-1390.
- Vitkovic, L., Bockaert, J., and Jacque, C. (2000). "Inflammatory" cytokines: neuromodulators in normal brain? *J Neurochem* 74, 457-471.
- Wang, P., Sun, L., Shen, A., Yang, J., Li, X., Liu, H., Tao, T., Cheng, C., and Lu, X. (2010). Involvement of SRC-suppressed C kinase substrate in neuronal death caused by the lipopolysaccharide-induced reactive astrogliosis. *Inflammation* 33, 359-373.

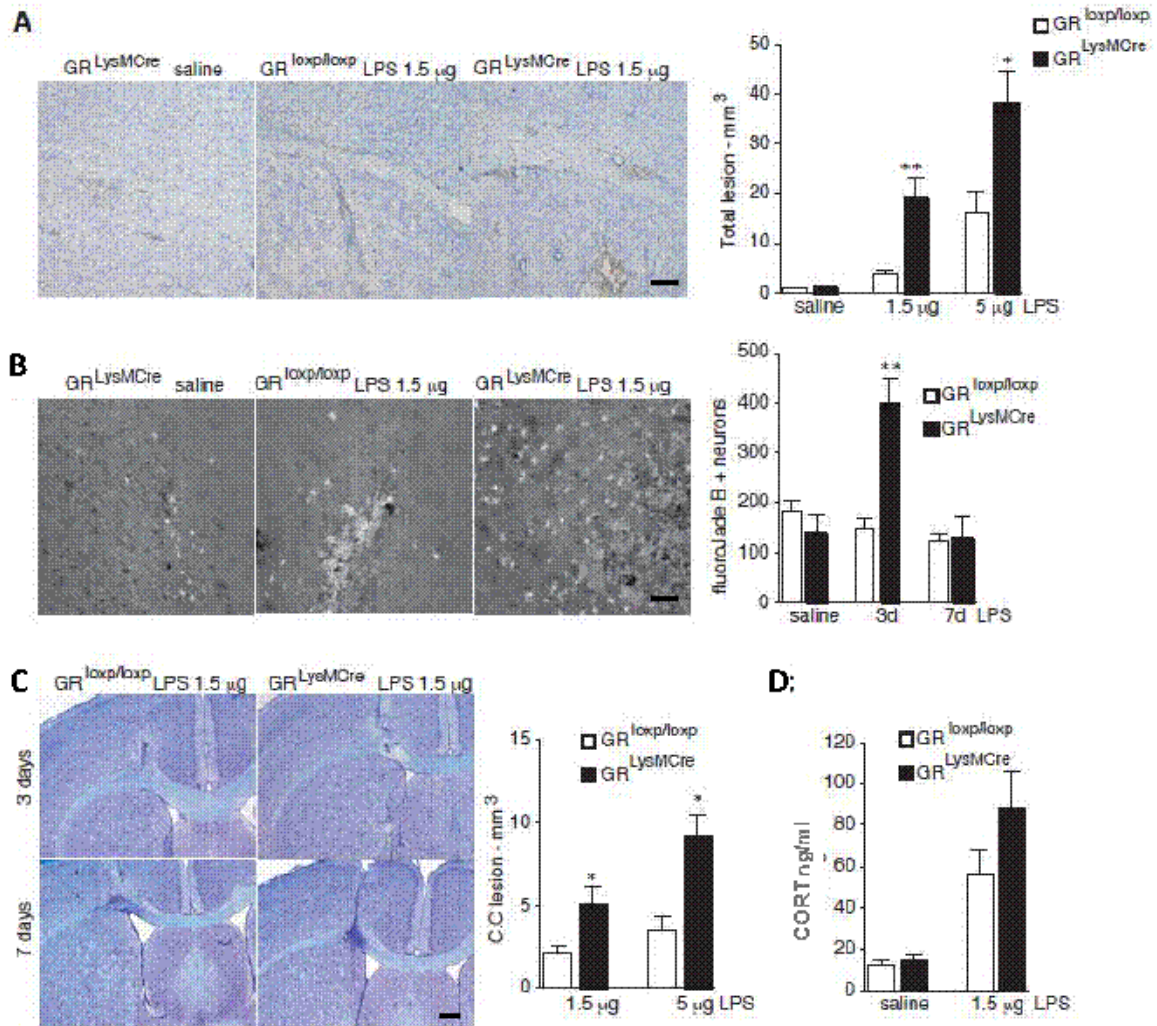


Figure 1. The absence of GR in microglia exacerbates injury in GR^{LysMCre} mice injected with a single intraparenchymal injection of LPS. (A) Panels depict representative examples of cresyl violet staining 3 days after a single injection of either 1µl saline or 1.5µg/µl LPS. The lesion volume is higher in GR^{LysMCre} mice than littermates in a dose dependent way. (B) Panels showing representative examples of FluoroJade B staining in the cortex 3 days after saline or 1.5µg/µl LPS injection in control GR^{fl/fl} and mutant GR^{LysMCre} mice. The quantification of the number of damaged neurons shows that LPS induces a significant neurodegeneration in GR^{LysMCre} mice whereas it has no effect in controls. (C) Panels showing examples of LFB staining 3 or 7 days following 1.5µg/µl LPS injection. Demyelination in corpus callosum is evident in GR^{LysMCre} mice at 3 days, however, aggregation of cells at injured sites in both controls and mutants at 7 days suggests an ongoing reparative processes. D. Plasmatic CORT levels measured after 3 days of injection (n=4-5/group. ** p ≤ 0.02, * p ≤ 0.05 GR^{loxP/loxP} vs GR^{LysMCre} mice). Scale bar = 100µm.

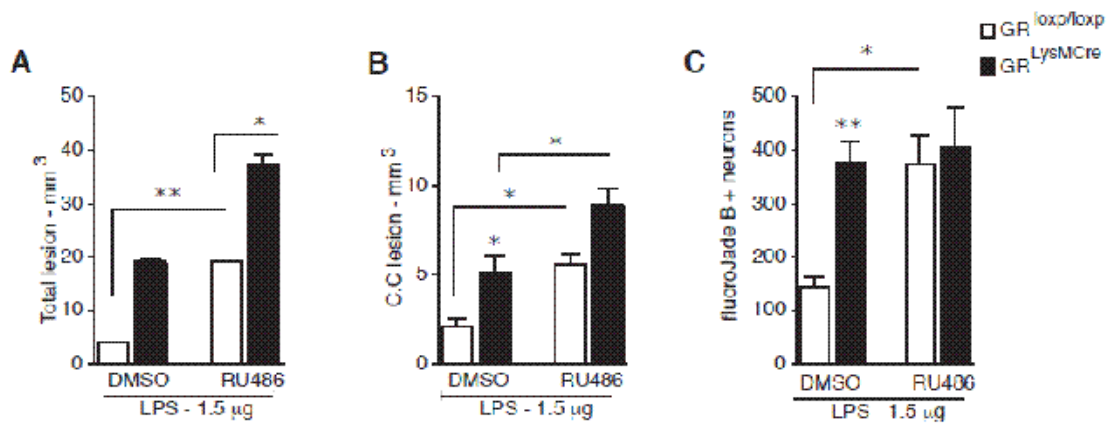


Figure 2. The effects of RU486 pre-treatment on injury triggered by a single intraparenchymal injection of 1.5µg/µl LPS showing the role of GR in other cell types than microglia. GR^{loxP/loxP} and GR^{LysMCre} mice were either given a single i.p injection of DMSO or RU486 16 hrs prior to single LPS injection. (A) The volume of the lesion was determined in cresyl violet stained sections 3 days after LPS injection in DMSO or RU486 pre-treated mice. The lesion mediated by LPS is significantly exacerbated in GR^{LysMCre} mice receiving RU486 treatment. (B) Injury to corpus callosum analysed by LFB staining is significantly greater in RU486 pre-treated GR^{loxP/loxP} and GR^{LysMCre} mice. (C) Quantification of FluoroJade B positive cells in the cortex 3 days after LPS injection in DMSO or RU486 pre-treated mice. RU486 pre-treatment significantly augments the number of damage neurons in GR^{loxP/loxP} control mice, however there is no effect in mutants. n=4/group. ** p ≤ 0.02, * p ≤ 0.05 GR^{loxP/loxP} vs GR^{LysMCre} mice.

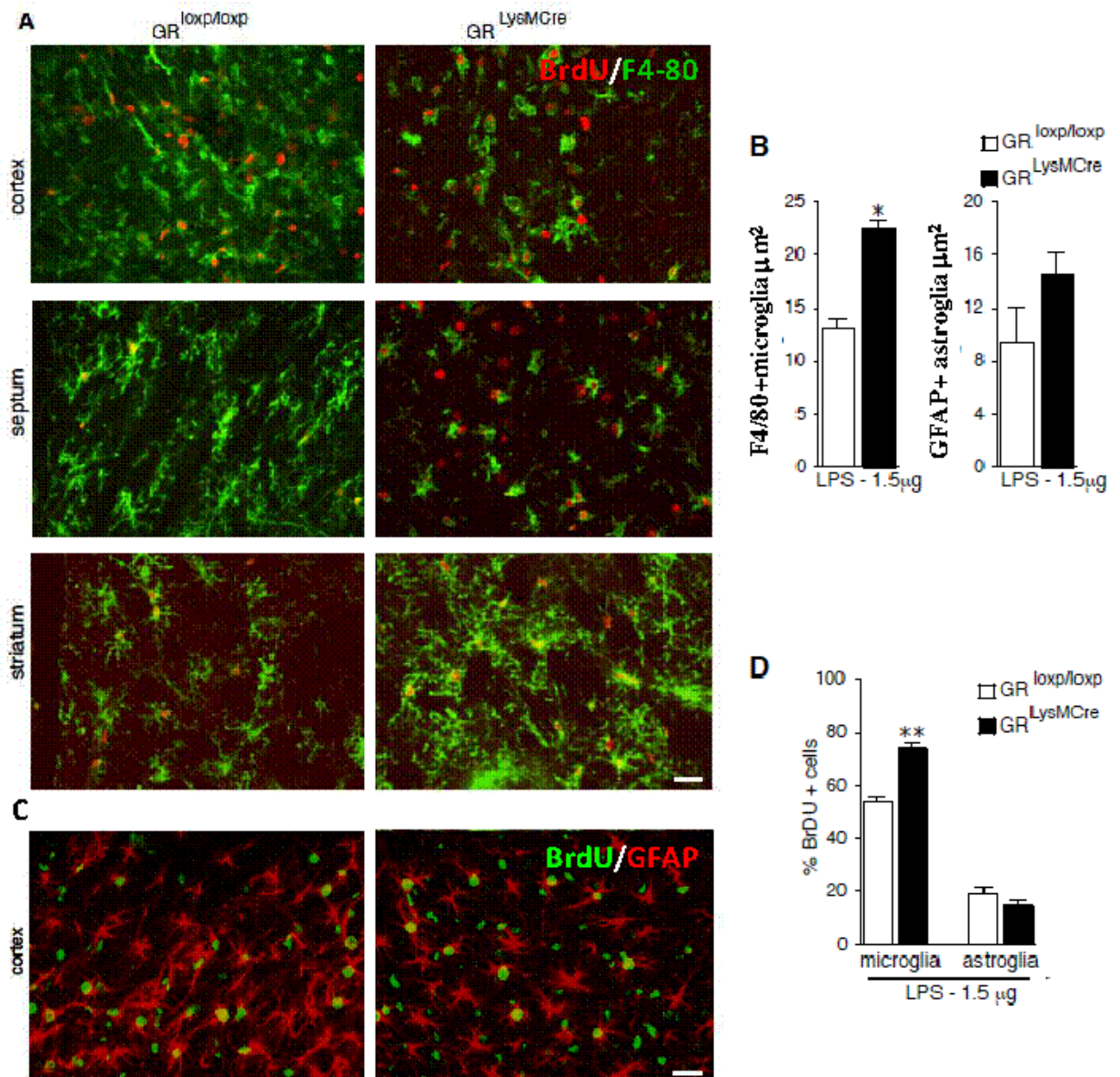


Figure 3. The effects of microglial GR on the activation and proliferation of microglia and astroglia triggered by a single intraparenchymal injection of LPS. The reactive microglia and astroglia were only observed on the ipsilateral side of injection. (A) Panels showing representative examples of confocal micrographs of double immuno-fluorescence of F4/80 and BrdU in the cortex, septum and the striatum. Note BrdU is incorporated in many reactive microglia in both control and mutant mice. In the cortex at the site of injection microglia show a typical amoeboid/ macrophagic morphology in GR^{LysMCre} mutants. (B) An increase in the area covered by reactive microglia and astroglia at lesion level was observed in GR^{LysMCre} respect to GR^{loxP/loxP} mice. This analysis was done in sections processed for DAB using anti-F4/80 and GFAP antibodies, 3 days after 1.5mg/ml LPS injection. (C) Confocal micrographs of double immunolabeling of BrdU and GFAP positive astrocytes in the cortex. D. Quantification of F4/80+ BrdU+ microglia and GFAP+ BrdU+ astroglia in GR^{loxP/loxP} and GR^{LysMCre} mice shows increased proliferation of microglia in GR^{LysMCre} mutants compared to GR^{loxP/loxP} control mice. n=4/group. * $p \leq 0.05$ GR^{loxP/loxP} vs GR^{LysMCre} mice. Scale bar = 20 μm .

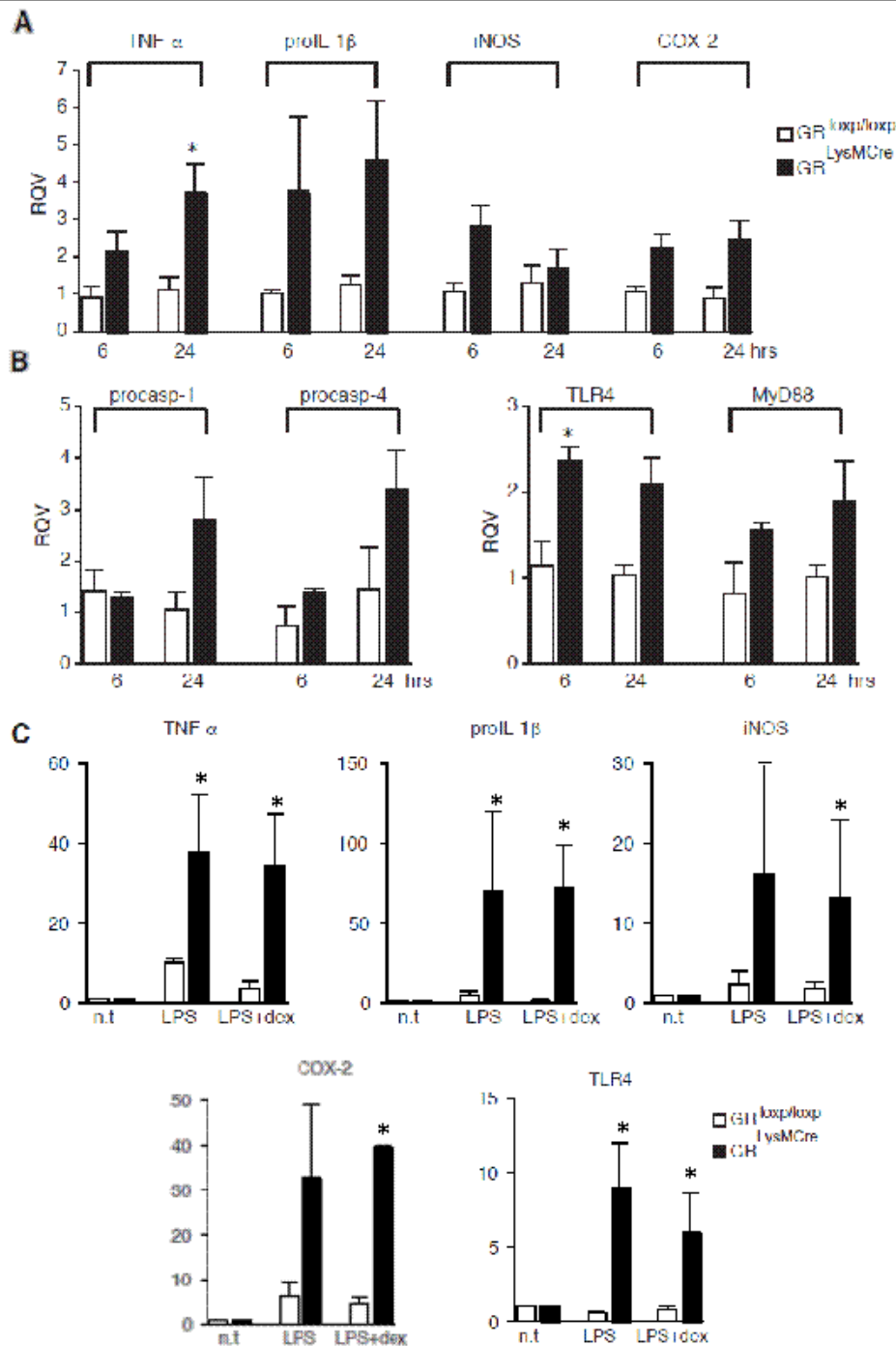


Figure 4. Microglial GR absence entails changes in the expression pattern of genes related with inflammation in vivo and in vitro. (A, B) mRNA levels of pro-inflammatory genes in lesion area were analyzed by qPCR 6 and 24 hrs after LPS injection and greater increased in GR^{LysMCre} mice than in GR^{loxP/loxP} mice in lesion area were detected. Moreover some pro-inflammatory genes not known to be regulated by GR were analyzed. (C) mRNA levels of pro-inflammatory genes extracted from microglial cultures and established from GR^{LysMCre} and GR^{loxP/loxP} were also analyzed; similarly, greater increased in GR^{LysMCre} than in GR^{loxP/loxP} cultures were detected after LPS treatment. Straightly, DEX treatment prevents LPS induction of pro-inflammatory genes transcription in GR^{loxP/loxP} but not in GR^{LysMCre} cultures. n=5/group. * p ≤ 0.05 GR^{loxP/loxP} vs GR^{LysMCre} mice.

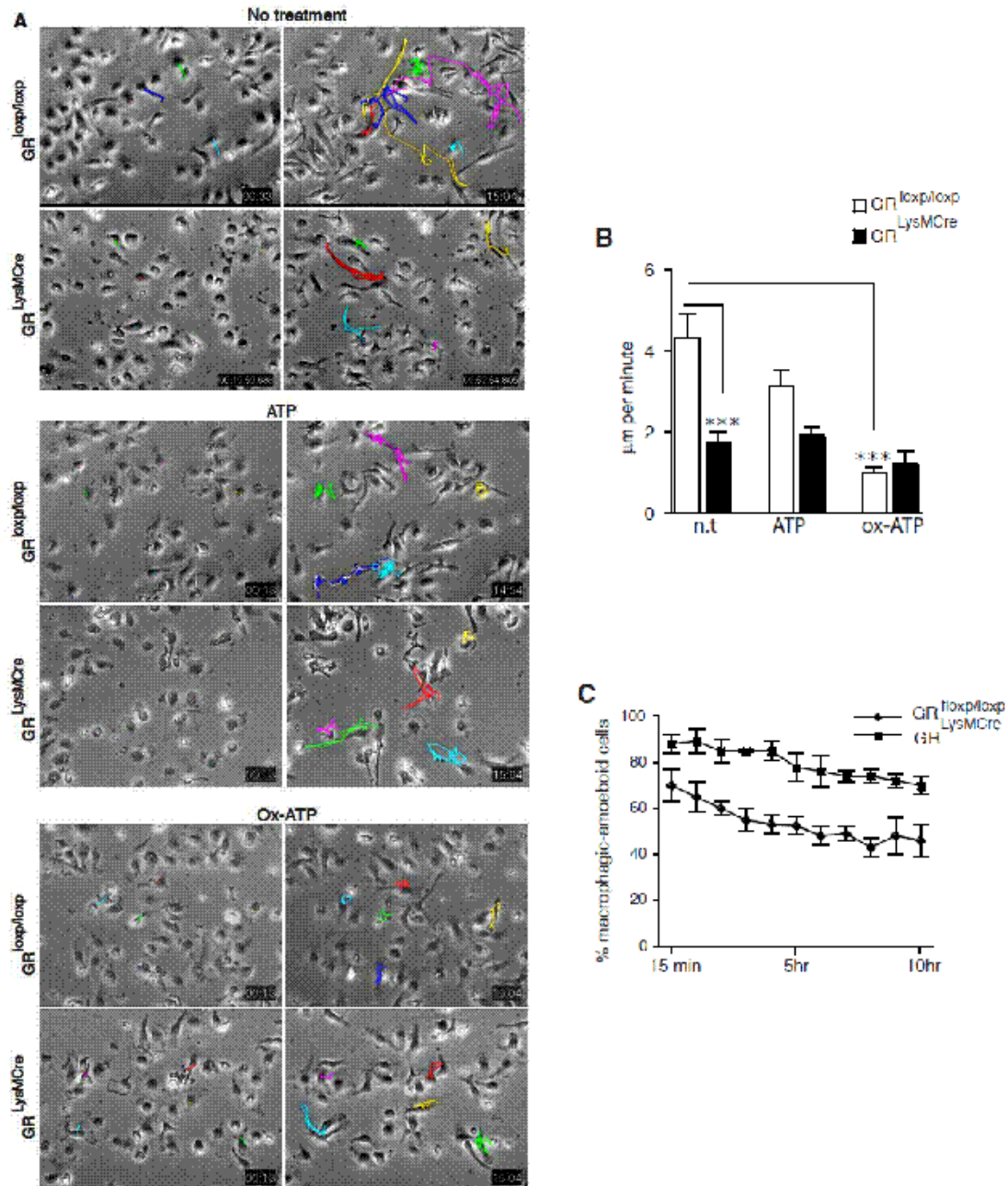


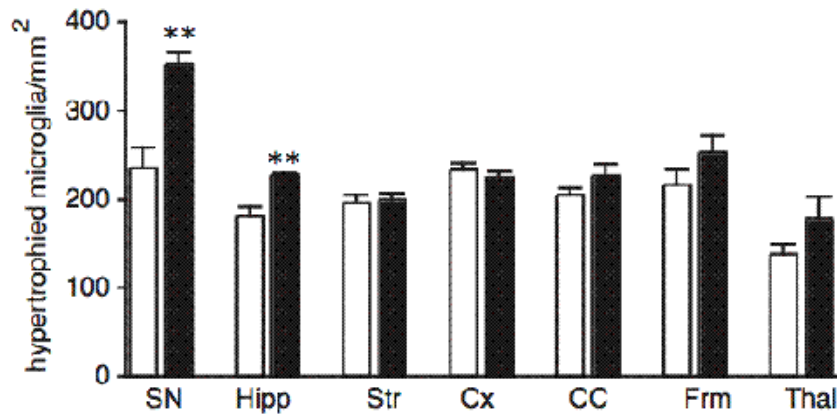
Figure 5. In vitro analysis of the microglial differentiation in primary microglia cultures prepared from P1 GR^{loxP/loxP} and GR^{LysMCre} pups. (A) Representative examples of time-lapse video microscopy images of cortical microglia cells from GR^{loxP/loxP} and GR^{LysMCre} pups. The images represent examples of frames at time points “hrs:min:sec” or “hrs:min” from the beginning of recording until the end at 10 or 15 hrs. The microglial cells constantly change their shape from tubular unipolar, bipolar and tripolar shape to an amoeboid macrophagic morphology, however the changes were less frequent in mutant cells. (B) The analysis of microglial cell movement showed mutant GR^{LysMCre} cells have reduced capacity for motility compared to the control GR^{loxP/loxP} cells. ATP and ox-ATP do not affect the movement of mutant cells (C) Graphs depicting the percentage of microglial cells from GR^{loxP/loxP} and GR^{LysMCre} pups displaying amoeboid morphology in the fields imaged at time points indicated with no treatment or in the presence of 100ng/ml LPS. The results are mean ± SEM of 3 separate experiments.

A

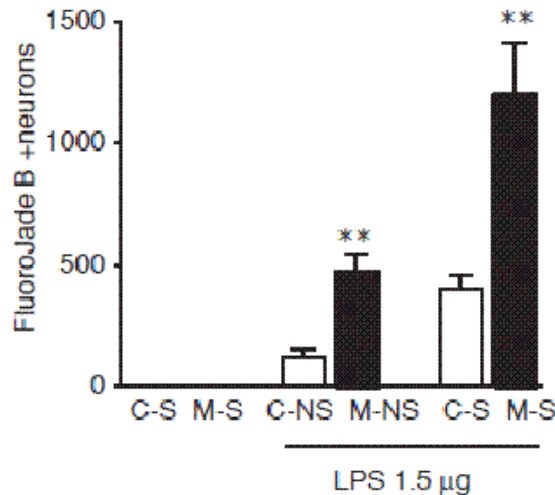
Day of treatment	Agent used	Duration
1	Food deprivation	24 h
2	Water deprivation	24 h
3	Dirty Cages	24 h
4	Restraint	2 h
5	Restraint at 4°C	2 h
6	Disoriented Cages	24h

Table 1. Schedule of stressing agents used during the chronic stress treatment

B



C



D

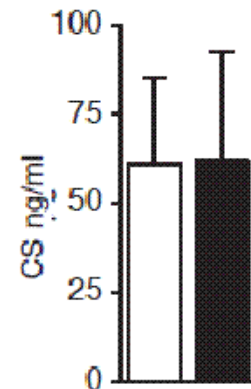


Figure 6. Microglial GR regulate neurodegenerative response primed by chronic stress prior to LPS. (A) GR^{loxP/loxP} and GR^{LysMCre} mice received either a chronic unpredictable mild stress (CUMS) during 6 days. (B). Quantification of hypertrophied microglia 24 hrs. after CUMS reveals an increase in substantia nigra and hippocampus. (C) GR^{loxP/loxP} and GR^{LysMCre} mice to either CUMS or left unstressed, and 24 hrs later they were injected intra-parenchymally with 1.5μg/μl LPS. The number of damaged neurons is increase in GR^{LysMCre} compare with GR^{loxP/loxP} mice in animal receiving stress protocol. (D) Plasmatic CORT levels were measured after protocol stress showing not differences. n=5/group. ** p ≤ 0.02, GR^{loxP/loxP} vs GR^{LysMCre} mice. prior to single LPS injection

V. CONCLUDING REMARKS

The experimental work of this thesis has allowed to reach a better understanding of the role of GCs and GRs in neurodegenerative diseases and associated inflammatory processes in the CNS. The use of mice in which the GR is inactivated by conditional mutagenesis in either microglia, a cell type particularly implicated in inflammatory process in the CNS, or in DNs, has provided a useful tool to elucidate the specific role of the GC-GR response in the degeneration of the dopaminergic pathway in Parkinsonism and in microglia's inflammatory response.

We recently showed that the GC-GR system is altered in patients with Parkinson Disease (Ros-Bernal et al., 2011; Addendum-1). Moreover, it was previously reported by others and ourselves that GCs mediate a neuroprotective effect in experimental Parkinsonism, which is in part caused by the inhibition of glial cell activation (Marchetti et al., 2005; Morale et al., 2004; Ros-Bernal et al., 2011). Moreover, we demonstrated that in MPTP-intoxicated mice, lacking the GR selectively in microglial cells, the neuroprotective effect of GCs is abolished, suggesting a crucial role of microglial GR in DN survival (Ros-Bernal et al., 2011). In fact, microglial GR contributes to the neuroprotective effect by controlling and repressing the inflammatory process associated with Parkinsonism. However, in the first section of the present thesis, we showed that GCs also elicit a protective effect in experimental Parkinsonism, directly stimulating the GR localized in DNs.

In the present work we corroborate the idea that GCs exerts protective effects against DN degeneration in experimental Parkinsonism trough the GR activation. Notably, this protective effect is abolished in MPTP-intoxicated mice lacking the GR in DNs and remains in mesencephalic cell cultures deprived of glial cells. All together our results suggest that GCs exert a neuroprotective effect on DNs by two pathways: directly, activating GRs in DNs,

and/or indirectly, by inhibiting the inflammatory response mediated by microglia. We propose that the expression of the GR may protect DNs after MPTP-induced intoxication in non-human primates and in mice. Therefore, changes in the release of GCs in Parkinsonism may reactivate/translocate GRs in DNs, conferring neuroprotection. Finally, we demonstrated that the mechanism by which the GR exerts a protective effect in DNs seems to implicate modulation of Ca^{2+} homeostasis via RyR channels localized on the endoplasmic reticulum.

In the second part of this thesis, our results demonstrate that the inflammatory reaction in mice lacking the microglial GR ($\text{GR}^{\text{LysMCre}}$ mice) triggers exacerbated harmful effect in the CNS, probably due to an inadequate regulation of the inflammatory process. $\text{GR}^{\text{LysMCre}}$ mice are more sensitive to intra-parenchymal LPS injection than their littermates $\text{GR}^{\text{loxP/loxP}}$ mice. This include higher levels of microglia activation and proliferation and, therefore, a greater production and release of pro-inflammatory molecules. These events may drive to the neurodegeneration, tissue damage and axon demyelination.

We demonstrated that the microglial GR is essential for the regulation and repression of the inflammatory response induced by LPS. Considering LPS as a stressor agent, our results suggest that a correct communication between the immune system, the endocrine system and the CNS is necessary to restore homeostasis after the activity of different stressors. The conclusion we can draw is that the microglial GR has an essential role in regulating microglial-mediated inflammatory response in the CNS. We specifically conclude that: i) microglial GR function is crucial in regulating the expression, not only of pro-inflammatory cytokines, but also of TLR4, MyD88 and pro-inflammatory caspases; ii) the GR regulates microglial/macrophages functions such as mobility, differentiation and/or parenchymal extravasation; iii) microglial GR limits the damage triggered by intra-parenchymal LPS injections, preventing neuronal and white matter injury.

In conclusion the results presented in this thesis demonstrate that the GR plays essential roles in regulating both acute and chronic inflammation, associated to a punctual injury in the CNS or a neurodegenerative process. In particular, GR seems to exert a neuroprotective effect in Parkinsonism independently of the anti-inflammatory pathways, such as the regulation of Ca²⁺ homeostasis. Thus, the understanding in-depth of the actions of the glial and neuronal GR may open innovative therapeutic perspectives to control the inflammatory response in the CNS. Both microglial and dopaminergic GR could be considered as potential targets to develop specific treatments for inflammatory-associated and dopaminergic neurodegenerative disorders respectively.

VI. Bibliografía

- Abeliovich, A., Schmitz, Y., Farinas, I., Choi-Lundberg, D., Ho, W.H., Castillo, P.E., Shinsky, N., Verdugo, J.M., Armanini, M., Ryan, A., et al. (2000). Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron* 25, 239-252.
- Abraham, S.M., Lawrence, T., Kleiman, A., Warden, P., Medghalchi, M., Tuckermann, J., Saklatvala, J., and Clark, A.R. (2006). Antiinflammatory effects of dexamethasone are partly dependent on induction of dual specificity phosphatase 1. *J Exp Med* 203, 1883-1889.
- Adams, J.S. (2005). "Bound" to work: the free hormone hypothesis revisited. *Cell* 122, 647-649.
- Afonso-Oramas, D., Cruz-Muros, I., Alvarez de la Rosa, D., Abreu, P., Giraldez, T., Castro-Hernandez, J., Salas-Hernandez, J., Lanciego, J.L., Rodriguez, M., and Gonzalez-Hernandez, T. (2009). Dopamine transporter glycosylation correlates with the vulnerability of midbrain dopaminergic cells in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 36, 494-508.
- Agarwal, S.K., and Marshall, G.D., Jr. (2001). Dexamethasone promotes type 2 cytokine production primarily through inhibition of type 1 cytokines. *J Interferon Cytokine Res* 21, 147-155.
- Agid, Y. (1991). Parkinson's disease: pathophysiology. *Lancet* 337, 1321-1324.
- Ajuebor, M.N., Flower, R.J., Hannon, R., Christie, M., Bowers, K., Verity, A., and Perretti, M. (1998). Endogenous monocyte chemoattractant protein-1 recruits monocytes in the zymosan peritonitis model. *J Leukoc Biol* 63, 108-116.
- Akira, S., Takeda, K., and Kaisho, T. (2001). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2, 675-680.
- Allan, S.M., and Rothwell, N.J. (2001). Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* 2, 734-744.
- Ambroggi, F., Turiault, M., Milet, A., Deroche-Gamonet, V., Parnaudeau, S., Balado, E., Barik, J., van der Veen, R., Maroteaux, G., Lemberger, T., et al. (2009). Stress and addiction: glucocorticoid receptor in dopaminergic neurons facilitates cocaine seeking. *Nat Neurosci* 12, 247-249.
- Arimoto, T., and Bing, G. (2003). Up-regulation of inducible nitric oxide synthase in the substantia nigra by lipopolysaccharide causes microglial activation and neurodegeneration. *Neurobiol Dis* 12, 35-45.
- Aubin, N., Curet, O., Deffois, A., and Carter, C. (1998). Aspirin and salicylate protect against MPTP-induced dopamine depletion in mice. *J Neurochem* 71, 1635-1642.
- Auphan, N., DiDonato, J.A., Rosette, C., Helmsberg, A., and Karin, M. (1995). Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science* 270, 286-290.
- Avitsur, R., Hunzeker, J., and Sheridan, J.F. (2006). Role of early stress in the individual differences in host response to viral infection. *Brain Behav Immun* 20, 339-348.
- Babcock, A.A., Kuziel, W.A., Rivest, S., and Owens, T. (2003). Chemokine expression by glial cells directs leukocytes to sites of axonal injury in the CNS. *J Neurosci* 23, 7922-7930.
- Bains, M., Cousins, J.C., and Roberts, J.L. (2007). Neuroprotection by estrogen against MPP4-induced dopamine neuron death is mediated by ER alpha in primary cultures of mouse mesencephalon. *Exp Neurol* 204, 767-776.
- Bale, T.L., and Vale, W.W. (2004). CRF and CRF receptors: role in stress responsivity and other behaviors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44, 525-557.
- Balsalobre, A., Brown, S.A., Marcacci, L., Tronche, F., Kellendonk, C., Reichardt, H.M., Schutz, G., and Schibler, U. (2000). Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science* 289, 2344-2347.
- Barcia, C., Bautista, V., Sanchez-Bahillo, A., Fernandez-Villalba, E., Navarro-Ruis, J.M., Barreiro, A.F., Poza, Y.P.M., and Herrero, M.T. (2003). Circadian determinations of cortisol, prolactin and melatonin in chronic methyl-phenyl-tetrahydropyridine-treated monkeys. *Neuroendocrinology* 78, 118-128.
- Barcia, C., Jimenez-Dalmaroni, M., Kroeger, K.M., Puntel, M., Rapaport, A.J., Larocque, D., King, G.D., Johnson, S.A., Liu, C., Xiong, W., et al. (2007). One-year expression from high-capacity adenoviral vectors in the brains of animals with pre-existing anti-adenoviral immunity: clinical implications. *Mol Ther* 15, 2154-2163.
- Barcia, C., Ros-Bernal, F., Carrillo, M., Aguado-Llera, D., Ros, C., Gomez, A., Nombela, C., De Pablos, V., Fernandez-Villalba, E., and Herrero, M.T. (2009). Inflammatory response in Parkinsonism. In *Birth, Life and Death of Dopaminergic Neurons in the Substantia Nigra*, G. Di Giovanni, V. Di Matteo, and E. Esposito, eds. (Springer).
- Barcia, C., Ros, C.M., Annesse, V., Gomez, A., Ros-Bernal, F., Aguado-Yera, D., Martinez-Pagan, M.E., de Pablos, V., Fernandez-Villalba, E., and Herrero, M.T. (2011). IFN-gamma signaling, with the synergistic contribution of TNF-alpha, mediates cell specific microglial and astroglial activation in experimental models of Parkinson's disease. *Cell Death and Disease* 2, e142.
- Barcia, C., Sanchez Bahillo, A., Fernandez-Villalba, E., Bautista, V., Poza, Y.P.M., Fernandez-Barreiro, A., Hirsch, E.C., and Herrero, M.T. (2004). Evidence of active microglia in substantia nigra pars compacta of parkinsonian monkeys 1 year after MPTP exposure. *Glia* 46, 402-409.

- Barcia, C., Thomas, C.E., Curtin, J.F., King, G.D., Wawrowsky, K., Candolfi, M., Xiong, W.D., Liu, C., Kroeger, K., Boyer, O., et al. (2006). In vivo mature immunological synapses forming SMACs mediate clearance of virally infected astrocytes from the brain. *The Journal of experimental medicine* 203, 2095-2107.
- Barcia, C., Wawrowsky, K., Barrett, R.J., Liu, C., Castro, M.G., and Lowenstein, P.R. (2008). In Vivo Polarization of IFN- γ at Kupfer and Non-Kupfer Immunological Synapses during the Clearance of Virally Infected Brain Cells. *J Immunol* 180, 1344-1352.
- Barden, N., Stec, I.S., Montkowski, A., Holsboer, F., and Reul, J.M. (1997). Endocrine profile and neuroendocrine challenge tests in transgenic mice expressing antisense RNA against the glucocorticoid receptor. *Neuroendocrinology* 66, 212-220.
- Barna, B.P., Pettay, J., Barnett, G.H., Zhou, P., Iwasaki, K., and Estes, M.L. (1994). Regulation of monocyte chemoattractant protein-1 expression in adult human non-neoplastic astrocytes is sensitive to tumor necrosis factor (TNF) or antibody to the 55-kDa TNF receptor. *J Neuroimmunol* 50, 101-107.
- Barnes, P.J. (1998). Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin Sci (Lond)* 94, 557-572.
- Barnes, P.J. (2006). Corticosteroid effects on cell signalling. *Eur Respir J* 27, 413-426.
- Bartoli, C., Civatte, M., Pellissier, J.F., and Figarella-Branger, D. (2001). CCR2A and CCR2B, the two isoforms of the monocyte chemoattractant protein-1 receptor are up-regulated and expressed by different cell subsets in idiopathic inflammatory myopathies. *Acta Neuropathol* 102, 385-392.
- Bayulkem, K., and Lopez, G. (2010). Nonmotor fluctuations in Parkinson's disease: clinical spectrum and classification. *J Neurol Sci* 289, 89-92.
- Beal, M.F. (2010). Parkinson's disease: a model dilemma. *Nature* 466, S8-10.
- Beck, I.M., Vanden Berghe, W., Vermeulen, L., Yamamoto, K.R., Haegeman, G., and De Bosscher, K. (2009). Crosstalk in inflammation: the interplay of glucocorticoid receptor-based mechanisms and kinases and phosphatases. *Endocr Rev* 30, 830-882.
- Bellomo, G., Santambrogio, L., Fiacconi, M., Scarponi, A.M., and Ciuffetti, G. (1991). Plasma profiles of adrenocorticotrophic hormone, cortisol, growth hormone and prolactin in patients with untreated Parkinson's disease. *Journal of neurology* 238, 19-22.
- Berlin, M. (2010). Recent advances in the development of novel glucocorticoid receptor modulators. *Expert Opin Ther Pat* 20, 855-873.
- Bernard, C., and Delhoume, L. (1947). *Principes de médecine expérimentale*. (Paris: Masson).
- Besedovsky, H., del Rey, A., Sorkin, E., and Dinarello, C.A. (1986). Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones. *Science* 233, 652-654.
- Besedovsky, H.O., and Rey, A.D. (2007). Physiology of psychoneuroimmunology: a personal view. *Brain Behav Immun* 21, 34-44.
- Bhattacharyya, S., Brown, D.E., Brewer, J.A., Vogt, S.K., and Muglia, L.J. (2007). Macrophage glucocorticoid receptors regulate Toll-like receptor 4-mediated inflammatory responses by selective inhibition of p38 MAP kinase. *Blood* 109, 4313-4319.
- Bian, X., Hughes, F.M., Jr., Huang, Y., Cidlowski, J.A., and Putney, J.W., Jr. (1997). Roles of cytoplasmic Ca²⁺ and intracellular Ca²⁺ stores in induction and suppression of apoptosis in S49 cells. *Am J Physiol* 272, C1241-1249.
- Black, B.E., Holaska, J.M., Rastinejad, F., and Paschal, B.M. (2001). DNA binding domains in diverse nuclear receptors function as nuclear export signals. *Curr Biol* 11, 1749-1758.
- Blalock, J.E. (1984). The immune system as a sensory organ. *J Immunol* 132, 1067-1070.
- Blalock, J.E. (1985). Proopiomelanocortin-derived peptides in the immune system. *Clin Endocrinol (Oxf)* 22, 823-827.
- Blalock, J.E. (2005). The immune system as the sixth sense. *J Intern Med* 257, 126-138.
- Bland, S.T., Beckley, J.T., Young, S., Tsang, V., Watkins, L.R., Maier, S.F., and Bilbo, S.D. (2010). Enduring consequences of early-life infection on glial and neural cell genesis within cognitive regions of the brain. *Brain Behav Immun* 24, 329-338.
- Block, M.L., Zecca, L., and Hong, J.S. (2007). Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci* 8, 57-69.
- Bodwell, J.E., Hu, J.M., Orti, E., and Munck, A. (1995). Hormone-induced hyperphosphorylation of specific phosphorylated sites in the mouse glucocorticoid receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol* 52, 135-140.
- Boelens, J., Lust, S., Van Bockstaele, F., Van Gele, M., Janssens, A., Derycke, L., Vanhoecke, B., Philippe, J., Bracke, M., and Offner, F. (2009). Steroid effects on ZAP-70 and SYK in relation to apoptosis in poor prognosis chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res* 33, 1335-1343.
- Bolt, R.J., van Weissenbruch, M.M., Lafeber, H.N., and Delemarre-van de Waal, H.A. (2001). Glucocorticoids and lung development in the fetus and preterm infant. *Pediatr Pulmonol* 32, 76-91.

- Bonifati, V., Rizzu, P., van Baren, M.J., Schaap, O., Breedveld, G.J., Krieger, E., Dekker, M.C., Squitieri, F., Ibanez, P., Joosse, M., et al. (2003). Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science* 299, 256-259.
- Bornebroek, M., de Lau, L.M., Haag, M.D., Koudstaal, P.J., Hofman, A., Stricker, B.H., and Breteler, M.M. (2007). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the risk of Parkinson disease. *Neuroepidemiology* 28, 193-196.
- Bosisio, D., Polentarutti, N., Sironi, M., Bernasconi, S., Miyake, K., Webb, G.R., Martin, M.U., Mantovani, A., and Muzio, M. (2002). Stimulation of toll-like receptor 4 expression in human mononuclear phagocytes by interferon-gamma: a molecular basis for priming and synergism with bacterial lipopolysaccharide. *Blood* 99, 3427-3431.
- Bower, J.H., Maraganore, D.M., Peterson, B.J., Ahlskog, J.E., and Rocca, W.A. (2006). Immunologic diseases, anti-inflammatory drugs, and Parkinson disease: a case-control study. *Neurology* 67, 494-496.
- Braak, H., Del Tredici, K., Rub, U., de Vos, R.A., Jansen Steur, E.N., and Braak, E. (2003). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 24, 197-211.
- Breuner, C.W., and Orchinik, M. (2002). Plasma binding proteins as mediators of corticosteroid action in vertebrates. *J Endocrinol* 175, 99-112.
- Brien, T.G. (1981). Human corticosteroid binding globulin. *Clin Endocrinol (Oxf)* 14, 193-212.
- Brochard, V., Combadiere, B., Prigent, A., Laouar, Y., Perrin, A., Beray-Berthet, V., Bonduelle, O., Alvarez-Fischer, D., Callebert, J., Launay, J.M., et al. (2009). Infiltration of CD4+ lymphocytes into the brain contributes to neurodegeneration in a mouse model of Parkinson disease. *J Clin Invest* 119, 182-192.
- Bsibsi, M., Ravid, R., Gveric, D., and van Noort, J.M. (2002). Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 61, 1013-1021.
- Buckingham, J.C., John, C.D., Solito, E., Tierney, T., Flower, R.J., Christian, H., and Morris, J. (2006). Annexin I, glucocorticoids, and the neuroendocrine-immune interface. *Ann N Y Acad Sci* 1088, 396-409.
- Buttgereit, F., and Scheffold, A. (2002). Rapid glucocorticoid effects on immune cells. *Steroids* 67, 529-534.
- Caelles, C., Gonzalez-Sancho, J.M., and Munoz, A. (1997). Nuclear hormone receptor antagonism with AP-1 by inhibition of the JNK pathway. *Genes Dev* 11, 3351-3364.
- Calvo, C.F., Amigou, E., Desaynard, C., and Glowinski, J. (2005). A pro- and an anti-inflammatory cytokine are synthesised in distinct brain macrophage cells during innate activation. *J Neuroimmunol* 170, 21-30.
- Callier, S., Morissette, M., Grandbois, M., Pelaprat, D., and Di Paolo, T. (2001). Neuroprotective properties of 17beta-estradiol, progesterone, and raloxifene in MPTP C57Bl/6 mice. *Synapse* 41, 131-138.
- Cannon, W. (1939). *The wisdom of the body* (New York: Norton).
- Carr, M.W., Roth, S.J., Luther, E., Rose, S.S., and Springer, T.A. (1994). Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 3652-3656.
- Carrigan, A., Walther, R.F., Salem, H.A., Wu, D., Atlas, E., Lefebvre, Y.A., and Hache, R.J. (2007). An active nuclear retention signal in the glucocorticoid receptor functions as a strong inducer of transcriptional activation. *J Biol Chem* 282, 10963-10971.
- Carson-Jurica, M.A., Schrader, W.T., and O'Malley, B.W. (1990). Steroid receptor family: structure and functions. *Endocr Rev* 11, 201-220.
- Cartelli, D., Ronchi, C., Maggioni, M.G., Rodighiero, S., Giavini, E., and Cappelletti, G. (2010). Microtubule dysfunction precedes transport impairment and mitochondria damage in MPP+ -induced neurodegeneration. *J Neurochem* 115, 247-258.
- Casper, D., Yaparpalvi, U., Rempel, N., and Werner, P. (2000). Ibuprofen protects dopaminergic neurons against glutamate toxicity in vitro. *Neurosci Lett* 289, 201-204.
- Castano, A., Herrera, A.J., Cano, J., and Machado, A. (1998). Lipopolysaccharide intranigral injection induces inflammatory reaction and damage in nigrostriatal dopaminergic system. *J Neurochem* 70, 1584-1592.
- Castano, A., Herrera, A.J., Cano, J., and Machado, A. (2002). The degenerative effect of a single intranigral injection of LPS on the dopaminergic system is prevented by dexamethasone, and not mimicked by rh-TNF-alpha, IL-1beta and IFN-gamma. *J Neurochem* 81, 150-157.
- Cissel, D.S., and Beaven, M.A. (2000). Disruption of Raf-1/heat shock protein 90 complex and Raf signaling by dexamethasone in mast cells. *J Biol Chem* 275, 7066-7070.
- Clark, A.R. (2007). Anti-inflammatory functions of glucocorticoid-induced genes. *Mol Cell Endocrinol* 275, 79-97.
- Clausen, B.E., Burkhardt, C., Reith, W., Renkawitz, R., and Forster, I. (1999). Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic Res* 8, 265-277.
- Cleeter, M.W., Cooper, J.M., and Schapira, A.H. (1992). Irreversible inhibition of mitochondrial complex I by 1-methyl-4-phenylpyridinium: evidence for free radical involvement. *J Neurochem* 58, 786-789.
- Cole, T.J., Blendy, J.A., Monaghan, A.P., Kriegstein, K., Schmid, W., Aguzzi, A., Fantuzzi, G., Hummler, E., Unsicker, K., and Schutz, G. (1995). Targeted disruption of the glucocorticoid receptor gene blocks adrenergic chromaffin cell development and severely retards lung maturation. *Genes Dev* 9, 1608-1621.

- Conductier, G., Blondeau, N., Guyon, A., Nahon, J.L., and Rovere, C. (2010). The role of monocyte chemoattractant protein MCP1/CCL2 in neuroinflammatory diseases. *J Neuroimmunol* 224, 93-100.
- Cookson, M.R. (2010). The role of leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) in Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci* 11, 791-797.
- Croitoru-Lamoury, J., Guillemain, G.J., Boussin, F.D., Mognetti, B., Gigout, L.I., Cheret, A., Vaslin, B., Le Grand, R., Brew, B.J., and Dormont, D. (2003). Expression of chemokines and their receptors in human and simian astrocytes: evidence for a central role of TNF alpha and IFN gamma in CXCR4 and CCR5 modulation. *Glia* 41, 354-370.
- Cross, M., Mangelsdorf, I., Wedel, A., and Renkawitz, R. (1988). Mouse lysozyme M gene: isolation, characterization, and expression studies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 6232-6236.
- Czlonkowska, A., Kurkowska-Jastrzebska, I., and Czlonkowski, A. (2000). Inflammatory changes in the substantia nigra and striatum following MPTP intoxication. *Ann Neurol* 48, 127.
- Chan, C.S., Gertler, T.S., and Surmeier, D.J. (2009). Calcium homeostasis, selective vulnerability and Parkinson's disease. *Trends Neurosci* 32, 249-256.
- Chandler, V.L., Maler, B.A., and Yamamoto, K.R. (1983). DNA sequences bound specifically by glucocorticoid receptor in vitro render a heterologous promoter hormone responsive in vivo. *Cell* 33, 489-499.
- Chao, C.C., Hu, S., and Peterson, P.K. (1995). Glia, cytokines, and neurotoxicity. *Crit Rev Neurobiol* 9, 189-205.
- Chapman, K.E., Coutinho, A., Gray, M., Gilmour, J.S., Savill, J.S., and Seckl, J.R. (2006). Local amplification of glucocorticoids by 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type I and its role in the inflammatory response. *Ann N Y Acad Sci* 1088, 265-273.
- Charlett, A., Dobbs, R.J., Purkiss, A.G., Wright, D.J., Peterson, D.W., Weller, C., and Dobbs, S.M. (1998). Cortisol is higher in parkinsonism and associated with gait deficit. *Acta neurologica Scandinavica* 97, 77-85.
- Chen, H., Jacobs, E., Schwarzschild, M.A., McCullough, M.L., Calle, E.E., Thun, M.J., and Ascherio, A. (2005). Nonsteroidal antiinflammatory drug use and the risk for Parkinson's disease. *Ann Neurol* 58, 963-967.
- Chen, H., Zhang, S.M., Hernan, M.A., Schwarzschild, M.A., Willett, W.C., Colditz, G.A., Speizer, F.E., and Ascherio, A. (2003). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the risk of Parkinson disease. *Arch Neurol* 60, 1059-1064.
- Chen, Y., and Swanson, R.A. (2003). Astrocytes and brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 23, 137-149.
- Choi, C., and Benveniste, E.N. (2004). Fas ligand/Fas system in the brain: regulator of immune and apoptotic responses. *Brain Res Brain Res Rev* 44, 65-81.
- Choi, W.S., Palmiter, R.D., and Xia, Z. (2011). Loss of mitochondrial complex I activity potentiates dopamine neuron death induced by microtubule dysfunction in a Parkinson's disease model. *J Cell Biol* 192, 873-882.
- Chrousos, G.P., and Gold, P.W. (1992). The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA* 267, 1244-1252.
- Damier, P., Hirsch, E.C., Agid, Y., and Graybiel, A.M. (1999a). The substantia nigra of the human brain. I. Nigrosomes and the nigral matrix, a compartmental organization based on calbindin D(28K) immunohistochemistry. *Brain* 122 (Pt 8), 1421-1436.
- Damier, P., Hirsch, E.C., Agid, Y., and Graybiel, A.M. (1999b). The substantia nigra of the human brain. II. Patterns of loss of dopamine-containing neurons in Parkinson's disease. *Brain* 122 (Pt 8), 1437-1448.
- Damier, P., Hirsch, E.C., Zhang, P., Agid, Y., and Javoy-Agid, F. (1993). Glutathione peroxidase, glial cells and Parkinson's disease. *Neuroscience* 52, 1-6.
- Damjanac, M., Rioux Bilan, A., Barrier, L., Pontcharraud, R., Anne, C., Hugon, J., and Page, G. (2007). Fluoro-Jade B staining as useful tool to identify activated microglia and astrocytes in a mouse transgenic model of Alzheimer's disease. *Brain Res* 1128, 40-49.
- Dauer, W., and Przedborski, S. (2003). Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 39, 889-909.
- Dauphinee, S.M., and Karsan, A. (2006). Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells. *Lab Invest* 86, 9-22.
- David, D.J., Samuels, B.A., Rainer, Q., Wang, J.W., Marsteller, D., Mendez, I., Drew, M., Craig, D.A., Guind, B.P., Guilloux, J.P., et al. (2009). Neurogenesis-dependent and -independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression. *Neuron* 62, 479-493.
- Davies, L., Karthikeyan, N., Lynch, J.T., Sial, E.A., Gkourtsa, A., Demonacos, C., and Krstic-Demonacos, M. (2008). Cross talk of signaling pathways in the regulation of the glucocorticoid receptor function. *Mol Endocrinol* 22, 1331-1344.
- Davies, T.H., Ning, Y.M., and Sanchez, E.R. (2005). Differential control of glucocorticoid receptor hormone-binding function by tetratricopeptide repeat (TPR) proteins and the immunosuppressive ligand FK506. *Biochemistry* 44, 2030-2038.

- Davis, M.C., McColl, K.S., Zhong, F., Wang, Z., Malone, M.H., and Distelhorst, C.W. (2008). Dexamethasone-induced inositol 1,4,5-trisphosphate receptor elevation in murine lymphoma cells is not required for dexamethasone-mediated calcium elevation and apoptosis. *J Biol Chem* 283, 10357-10365.
- De Bosscher, K., and Haegeman, G. (2009). Minireview: latest perspectives on antiinflammatory actions of glucocorticoids. *Mol Endocrinol* 23, 281-291.
- De Bosscher, K., Schmitz, M.L., Vanden Berghe, W., Plaisance, S., Fiers, W., and Haegeman, G. (1997). Glucocorticoid-mediated repression of nuclear factor-kappaB-dependent transcription involves direct interference with transactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 13504-13509.
- De Gendt, K., Swinnen, J.V., Saunders, P.T., Schoonjans, L., Dewerchin, M., Devos, A., Tan, K., Atanassova, N., Claessens, F., Lecureuil, C., et al. (2004). A Sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor causes spermatogenic arrest in meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 1327-1332.
- de Kloet, E.R., Joels, M., and Holsboer, F. (2005). Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci* 6, 463-475.
- de Kloet, E.R., Karst, H., and Joels, M. (2008). Corticosteroid hormones in the central stress response: quick-and-slow. *Front Neuroendocrinol* 29, 268-272.
- De Kloet, E.R., and Reul, J.M. (1987). Feedback action and tonic influence of corticosteroids on brain function: a concept arising from the heterogeneity of brain receptor systems. *Psychoneuroendocrinology* 12, 83-105.
- de Kloet, E.R., Reul, J.M., and Sutanto, W. (1990). Corticosteroids and the brain. *J Steroid Biochem Mol Biol* 37, 387-394.
- De Kloet, E.R., Vreugdenhil, E., Oitzl, M.S., and Joels, M. (1998). Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr Rev* 19, 269-301.
- de Pablos, R.M., Villaran, R.F., Arguelles, S., Herrera, A.J., Venero, J.L., Ayala, A., Cano, J., and Machado, A. (2006). Stress increases vulnerability to inflammation in the rat prefrontal cortex. *J Neurosci* 26, 5709-5719.
- Dehmer, T., Lindenau, J., Haid, S., Dichgans, J., and Schulz, J.B. (2000). Deficiency of inducible nitric oxide synthase protects against MPTP toxicity in vivo. *J Neurochem* 74, 2213-2216.
- del Pozo, M.A., Sanchez-Mateos, P., Nieto, M., and Sanchez-Madrid, F. (1995). Chemokines regulate cellular polarization and adhesion receptor redistribution during lymphocyte interaction with endothelium and extracellular matrix. Involvement of cAMP signaling pathway. *J Cell Biol* 131, 495-508.
- Denver, R.J. (2009). Structural and functional evolution of vertebrate neuroendocrine stress systems. *Ann N Y Acad Sci* 1163, 1-16.
- Deroche-Gamonet, V., Sillaber, I., Aouizerate, B., Izawa, R., Jaber, M., Ghzoul, S., Kellendonk, C., Le Moal, M., Spanagel, R., Schutz, G., et al. (2003). The glucocorticoid receptor as a potential target to reduce cocaine abuse. *J Neurosci* 23, 4785-4790.
- Desbaillets, I., Tada, M., de Tribolet, N., Diserens, A.C., Hamou, M.F., and Van Meir, E.G. (1994). Human astrocytomas and glioblastomas express monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in vivo and in vitro. *Int J Cancer* 58, 240-247.
- Deshmane, S.L., Kremlev, S., Amini, S., and Sawaya, B.E. (2009). Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res* 29, 313-326.
- Dhawan, L., Liu, B., Blaxall, B.C., and Taubman, M.B. (2007). A novel role for the glucocorticoid receptor in the regulation of monocyte chemoattractant protein-1 mRNA stability. *J Biol Chem* 282, 10146-10152.
- Diamond, M.I., Miner, J.N., Yoshinaga, S.K., and Yamamoto, K.R. (1990). Transcription factor interactions: selectors of positive or negative regulation from a single DNA element. *Science* 249, 1266-1272.
- Dluzen, D.E. (1996). Effects of testosterone upon MPTP-induced neurotoxicity of the nigrostriatal dopaminergic system of C57/B1 mice. *Brain Res* 715, 113-118.
- Dostert, A., and Heinzl, T. (2004). Negative glucocorticoid receptor response elements and their role in glucocorticoid action. *Curr Pharm Des* 10, 2807-2816.
- Douhou, A., Troadec, J.D., Ruberg, M., Raisman-Vozari, R., and Michel, P.P. (2001). Survival promotion of mesencephalic dopaminergic neurons by depolarizing concentrations of K⁺ requires concurrent inactivation of NMDA or AMPA/kainate receptors. *J Neurochem* 78, 163-174.
- Drake, A.J., Walker, B.R., and Seckl, J.R. (2005). Intergenerational consequences of fetal programming by in utero exposure to glucocorticoids in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288, R34-38.
- Du, J., Wang, Y., Hunter, R., Wei, Y., Blumenthal, R., Falke, C., Khairova, R., Zhou, R., Yuan, P., Machado-Vieira, R., et al. (2009). Dynamic regulation of mitochondrial function by glucocorticoids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 3543-3548.
- Duncan, G.S., Peers, S.H., Carey, F., Forder, R., and Flower, R.J. (1993). The local anti-inflammatory action of dexamethasone in the rat carrageenin oedema model is reversed by an antiserum to lipocortin I. *Br J Pharmacol* 108, 62-65.

- Echeverria, P.C., Mazaira, G., Erlejman, A., Gomez-Sanchez, C., Piwien Pilipuk, G., and Galigniana, M.D. (2009). Nuclear import of the glucocorticoid receptor-hsp90 complex through the nuclear pore complex is mediated by its interaction with Nup62 and importin beta. *Mol Cell Biol* 29, 4788-4797.
- Ehringer, H., and Hornykiewicz, O. (1960). [Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system]. *Klin Wochenschr* 38, 1236-1239.
- Engelhardt, B. (2008a). The blood-central nervous system barriers actively control immune cell entry into the central nervous system. *Curr Pharm Des* 14, 1555-1565.
- Engelhardt, B. (2008b). Immune cell entry into the central nervous system: involvement of adhesion molecules and chemokines. *J Neurol Sci* 274, 23-26.
- Escobar-Khondiker, M., Toulorge, D., Guerreiro, S., Hirsch, E., and Michel, P.P. (2008). Dissociated mesencephalic cultures: a research tool to model dopaminergic cell death in parkinson's disease. In *Parkinson's Disease. Molecular and therapeutic insights from model system*, R. Nass, and S. Przedborski, eds. (Academic Press, 2008), p. 652.
- Evans, S.J., Moore, F.L., and Murray, T.F. (1998). Solubilization and pharmacological characterization of a glucocorticoid membrane receptor from an amphibian brain. *J Steroid Biochem Mol Biol* 67, 1-8.
- Fabene, P.F., Bramanti, P., and Constantin, G. (2010). The emerging role for chemokines in epilepsy. *J Neuroimmunol* 224, 22-27.
- Fahn, S., and Cohen, G. (1992). The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease: evidence supporting it. *Ann Neurol* 32, 804-812.
- Farina, C., Aloisi, F., and Meinl, E. (2007). Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol* 28, 138-145.
- Fearnley, J.M., and Lees, A.J. (1991). Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain* 114 (Pt 5), 2283-2301.
- Fleshner, M., Deak, T., Spencer, R.L., Laudenslager, M.L., Watkins, L.R., and Maier, S.F. (1995). A long-term increase in basal levels of corticosterone and a decrease in corticosteroid-binding globulin after acute stressor exposure. *Endocrinology* 136, 5336-5342.
- Forno, L.S. (1996). Neuropathology of Parkinson's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 55, 259-272.
- Forno, L.S., DeLanney, L.E., Irwin, I., Di Monte, D., and Langston, J.W. (1992). Astrocytes and Parkinson's disease. *Prog Brain Res* 94, 429-436.
- Forno, L.S., DeLanney, L.E., Irwin, I., and Langston, J.W. (1993). Similarities and differences between MPTP-induced parkinsonism and Parkinson's disease. Neuropathologic considerations. *Adv Neurol* 60, 600-608.
- Franchimont, D. (2004). Overview of the actions of glucocorticoids on the immune response: a good model to characterize new pathways of immunosuppression for new treatment strategies. *Ann N Y Acad Sci* 1024, 124-137.
- Frangogiannis, N.G., Dewald, O., Xia, Y., Ren, G., Haudek, S., Leucker, T., Kraemer, D., Taffet, G., Rollins, B.J., and Entman, M.L. (2007). Critical role of monocyte chemoattractant protein-1/CC chemokine ligand 2 in the pathogenesis of ischemic cardiomyopathy. *Circulation* 115, 584-592.
- Frank, M.G., Miguel, Z.D., Watkins, L.R., and Maier, S.F. (2010). Prior exposure to glucocorticoids sensitizes the neuroinflammatory and peripheral inflammatory responses to *E. coli* lipopolysaccharide. *Brain Behav Immun* 24, 19-30.
- Galea, I., Bechmann, I., and Perry, V.H. (2007). What is immune privilege (not)? *Trends Immunol* 28, 12-18.
- Galliner-Beckley, A.J., Williams, J.G., Collins, J.B., and Cidlowski, J.A. (2008). Glycogen synthase kinase 3beta-mediated serine phosphorylation of the human glucocorticoid receptor redirects gene expression profiles. *Mol Cell Biol* 28, 7309-7322.
- Gametchu, B. (1987). Glucocorticoid receptor-like antigen in lymphoma cell membranes: correlation to cell lysis. *Science* 236, 456-461.
- Ganter, S., Northoff, H., Mannel, D., and Gebicke-Harter, P.J. (1992). Growth control of cultured microglia. *J Neurosci Res* 33, 218-230.
- Gao, H.M., Liu, B., Zhang, W., and Hong, J.S. (2003). Novel anti-inflammatory therapy for Parkinson's disease. *Trends Pharmacol Sci* 24, 395-401.
- Gao, Y.J., and Ji, R.R. (2010). Targeting astrocyte signaling for chronic pain. *Neurotherapeutics* 7, 482-493.
- Gao, Y.J., Zhang, L., Samad, O.A., Suter, M.R., Yasuhiko, K., Xu, Z.Z., Park, J.Y., Lind, A.L., Ma, Q., and Ji, R.R. (2009). JNK-induced MCP-1 production in spinal cord astrocytes contributes to central sensitization and neuropathic pain. *J Neurosci* 29, 4096-4108.
- Garden, G.A., and Moller, T. (2006). Microglia biology in health and disease. *J Neuroimmune Pharmacol* 1, 127-137.
- Gardet, A., Benita, Y., Li, C., Sands, B.E., Ballester, I., Stevens, C., Korzenik, J.R., Rioux, J.D., Daly, M.J., Xavier, R.J., and Podolsky, D.K. (2010). LRRK2 is involved in the IFN-gamma response and host response to pathogens. *J Immunol* 185, 5577-5585.

- Gehrmann, J., Matsumoto, Y., and Kreutzberg, G.W. (1995). Microglia: intrinsic immunoeffector cell of the brain. *Brain Res Brain Res Rev* 20, 269-287.
- Geiss-Friedlander, R., and Melchior, F. (2007). Concepts in sumoylation: a decade on. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 947-956.
- Gerard, C., and Rollins, B.J. (2001). Chemokines and disease. *Nat Immunol* 2, 108-115.
- Gerke, V., Creutz, C.E., and Moss, S.E. (2005). Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 449-461.
- German, D.C., Manaye, K.F., Sonsalla, P.K., and Brooks, B.A. (1992a). Midbrain dopaminergic cell loss in Parkinson's disease and MPTP-induced parkinsonism: sparing of calbindin-D28k-containing cells. *Ann N Y Acad Sci* 648, 42-62.
- German, D.C., Manaye, K.F., White, C.L., 3rd, Woodward, D.J., McIntire, D.D., Smith, W.K., Kalaria, R.N., and Mann, D.M. (1992b). Disease-specific patterns of locus coeruleus cell loss. *Ann Neurol* 32, 667-676.
- Gesina, E., Tronche, F., Herrera, P., Duchene, B., Tales, W., Czernichow, P., and Breant, B. (2004). Dissecting the role of glucocorticoids on pancreas development. *Diabetes* 53, 2322-2329.
- Ghosh, A., Roy, A., Liu, X., Kordower, J.H., Mufson, E.J., Hartley, D.M., Ghosh, S., Mosley, R.L., Gendelman, H.E., and Pahan, K. (2007). Selective inhibition of NF-kappaB activation prevents dopaminergic neuronal loss in a mouse model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 18754-18759.
- Giles, K.M., Ross, K., Rossi, A.G., Hotchin, N.A., Haslett, C., and Dransfield, I. (2001). Glucocorticoid augmentation of macrophage capacity for phagocytosis of apoptotic cells is associated with reduced p130Cas expression, loss of paxillin/pyk2 phosphorylation, and high levels of active Rac. *J Immunol* 167, 976-986.
- Glabinski, A.R., Balasingam, V., Tani, M., Kunkel, S.L., Strieter, R.M., Yong, V.W., and Ransohoff, R.M. (1996). Chemokine monocyte chemoattractant protein-1 is expressed by astrocytes after mechanical injury to the brain. *J Immunol* 156, 4363-4368.
- Glaser, R., and Kiecolt-Glaser, J.K. (2005). Stress-induced immune dysfunction: implications for health. *Nat Rev Immunol* 5, 243-251.
- Glezer, I., Simard, A.R., and Rivest, S. (2007). Neuroprotective role of the innate immune system by microglia. *Neuroscience* 147, 867-883.
- Gonzalez-Scarano, F., and Baltuch, G. (1999). Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. *Annu Rev Neurosci* 22, 219-240.
- Gonzalez, E., Rovin, B.H., Sen, L., Cooke, G., Dhanda, R., Mummidi, S., Kulkarni, H., Bamshad, M.J., Telles, V., Anderson, S.A., et al. (2002). HIV-1 infection and AIDS dementia are influenced by a mutant MCP-1 allele linked to increased monocyte infiltration of tissues and MCP-1 levels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 13795-13800.
- Goodman, R., Edgar, D., Thoenen, H., Wechsler, W., and Herschman, H. (1978). Glucocorticoid induction of tyrosine hydroxylase in a continuous cell line of rat pheochromocytoma. *J Cell Biol* 78, R1-7.
- Gossen, M., and Bujard, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 5547-5551.
- Grad, I., and Picard, D. (2007). The glucocorticoid responses are shaped by molecular chaperones. *Mol Cell Endocrinol* 275, 2-12.
- Groh, J., Heintz, K., Kohl, B., Wessig, C., Greeske, J., Fischer, S., and Martini, R. (2010). Attenuation of MCP-1/CCL2 expression ameliorates neuropathy in a mouse model for Charcot-Marie-Tooth IX. *Hum Mol Genet* 19, 3530-3543.
- Guerreiro, S., Toulorge, D., Hirsch, E., Marien, M., Sokoloff, P., and Michel, P.P. (2008). Paraxanthine, the primary metabolite of caffeine, provides protection against dopaminergic cell death via stimulation of ryanodine receptor channels. *Mol Pharmacol* 74, 980-989.
- Hache, R.J., Tse, R., Reich, T., Savory, J.G., and Lefebvre, Y.A. (1999). Nucleocytoplasmic trafficking of steroid-free glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* 274, 1432-1439.
- Halliday, G., Herrero, M.T., Murphy, K., McCann, H., Ros-Bernal, F., Barcia, C., Mori, H., Blesa, F.J., and Obeso, J.A. (2009). No Lewy pathology in monkeys with over 10 years of severe MPTP Parkinsonism. *Mov Disord* 24, 1519-1523.
- Hamza, T.H., Zabetian, C.P., Tenesa, A., Laederach, A., Montimurro, J., Yearout, D., Kay, D.M., Doheny, K.F., Paschall, J., Pugh, E., et al. (2010). Common genetic variation in the HLA region is associated with late-onset sporadic Parkinson's disease. *Nat Genet* 42, 781-785.
- Han, J., and Ulevitch, R.J. (2005). Limiting inflammatory responses during activation of innate immunity. *Nat Immunol* 6, 1198-1205.
- Hancock, D.B., Martin, E.R., Stajich, J.M., Jewett, R., Stacy, M.A., Scott, B.L., Vance, J.M., and Scott, W.K. (2007). Smoking, caffeine, and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in families with Parkinson disease. *Arch Neurol* 64, 576-580.

- Hanisch, U.K., and Kettenmann, H. (2007). Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci* 10, 1387-1394.
- Hard, T., Kellenbach, E., Boelens, R., Maler, B.A., Dahlman, K., Freedman, L.P., Carlstedt-Duke, J., Yamamoto, K.R., Gustafsson, J.A., and Kaptein, R. (1990). Solution structure of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain. *Science* 249, 157-160.
- Harr, M.W., Rong, Y., Bootman, M.D., Roderick, H.L., and Distelhorst, C.W. (2009). Glucocorticoid-mediated inhibition of Lck modulates the pattern of T cell receptor-induced calcium signals by down-regulating inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *J Biol Chem* 284, 31860-31871.
- Hartmann, A., and Hirsch, E.C. (2001). Parkinson's disease. The apoptosis hypothesis revisited. *Adv Neurol* 86, 143-153.
- Hartmann, A., Troade, J.D., Hunot, S., Kikly, K., Faucheux, B.A., Mouatt-Prigent, A., Ruberg, M., Agid, Y., and Hirsch, E.C. (2001). Caspase-8 is an effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease, but pathway inhibition results in neuronal necrosis. *J Neurosci* 21, 2247-2255.
- Hartmann, A., Veldhuis, J.D., Deuschle, M., Standhardt, H., and Heuser, I. (1997). Twenty-four hour cortisol release profiles in patients with Alzheimer's and Parkinson's disease compared to normal controls: ultradian secretory pulsatility and diurnal variation. *Neurobiol Aging* 18, 285-289.
- Hashioka, S., Klegeris, A., Schwab, C., and McGeer, P.L. (2009). Interferon-gamma-dependent cytotoxic activation of human astrocytes and astrocytoma cells. *Neurobiol Aging* 30, 1924-1935.
- Hayley, S., Crocker, S.J., Smith, P.D., Shree, T., Jackson-Lewis, V., Przedborski, S., Mount, M., Slack, R., Anisman, H., and Park, D.S. (2004). Regulation of dopaminergic loss by Fas in a 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 24, 2045-2053.
- Hench, P.S., Kendall, E.C., and et al. (1949). The effect of a hormone of the adrenal cortex (17-hydroxy-11-dehydrocorticosterone; compound E) and of pituitary adrenocorticotropic hormone on rheumatoid arthritis. *Mayo Clin Proc* 24, 181-197.
- Hench, P.S., Kendall, E.C., Slocumb, C.H., and Polley, H.F. (1950). Cortisone, its effects on rheumatoid arthritis, rheumatic fever, and certain other conditions. *Merck Rep* 59, 9-14.
- Henson, P.M. (2005). Dampening inflammation. *Nat Immunol* 6, 1179-1181.
- Herman, J.P., and Cullinan, W.E. (1997). Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosci* 20, 78-84.
- Herman, J.P., Ostrander, M.M., Mueller, N.K., and Figueiredo, H. (2005). Limbic system mechanisms of stress regulation: hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 29, 1201-1213.
- Hermoso, M.A., Matsuguchi, T., Smoak, K., and Cidlowski, J.A. (2004). Glucocorticoids and tumor necrosis factor alpha cooperatively regulate toll-like receptor 2 gene expression. *Mol Cell Biol* 24, 4743-4756.
- Herr, I., Gassler, N., Friess, H., and Buchler, M.W. (2007). Regulation of differential pro- and anti-apoptotic signaling by glucocorticoids. *Apoptosis* 12, 271-291.
- Herrero, M.T., Augood, S.J., Asensi, H., Hirsch, E.C., Agid, Y., Obeso, J.A., and Emson, P.C. (1996). Effects of L-DOPA-therapy on dopamine D2 receptor mRNA expression in the striatum of MPTP-intoxicated parkinsonian monkeys. *Brain Res Mol Brain Res* 42, 149-155.
- Herrero, M.T., Hirsch, E.C., Kastner, A., Luquin, M.R., Javoy-Agid, F., Gonzalo, L.M., Obeso, J.A., and Agid, Y. (1993a). Neuromelanin accumulation with age in catecholaminergic neurons from Macaca fascicularis brainstem. *Dev Neurosci* 15, 37-48.
- Herrero, M.T., Hirsch, E.C., Kastner, A., Ruberg, M., Luquin, M.R., Laguna, J., Javoy-Agid, F., Obeso, J.A., and Agid, Y. (1993b). Does neuromelanin contribute to the vulnerability of catecholaminergic neurons in monkeys intoxicated with MPTP? *Neuroscience* 56, 499-511.
- Hickey, W.F., and Kimura, H. (1988). Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo. *Science* 239, 290-292.
- Hickey, W.F., Vass, K., and Lassmann, H. (1992). Bone marrow-derived elements in the central nervous system: an immunohistochemical and ultrastructural survey of rat chimeras. *J Neuropathol Exp Neurol* 51, 246-256.
- Hickman, S.E., and El Khoury, J. (2010). Mechanisms of mononuclear phagocyte recruitment in Alzheimer's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 9, 168-173.
- Hill, J.E., Makky, K., Shrestha, L., Hillard, C.J., and Gasser, P.J. (2010). Natural and synthetic corticosteroids inhibit uptake(2)-mediated transport in CNS neurons. *Physiol Behav*.
- Hineno, T., Mizobuchi, M., Hiratani, K., Inami, Y., and Kakimoto, Y. (1992). Disappearance of circadian rhythms in Parkinson's disease model induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in dogs. *Brain Res* 580, 92-99.
- Hirsch, E., Graybiel, A.M., and Agid, Y.A. (1988). Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease. *Nature* 334, 345-348.

- Hirsch, E.C., and Hunot, S. (2009). Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *Lancet Neurol* 8, 382-397.
- Holmes, M.C., Carter, R.N., Noble, J., Chitnis, S., Dutia, A., Paterson, J.M., Mullins, J.J., Seckl, J.R., and Yau, J.L. (2010). 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression is increased in the aged mouse hippocampus and parietal cortex and causes memory impairments. *J Neurosci* 30, 6916-6920.
- Holmstrom, S.R., Chupreta, S., So, A.Y., and Iniguez-Lluhi, J.A. (2008). SUMO-mediated inhibition of glucocorticoid receptor synergistic activity depends on stable assembly at the promoter but not on DAXX. *Mol Endocrinol* 22, 2061-2075.
- Hollenberg, S.M., Weinberger, C., Ong, E.S., Cerelli, G., Oro, A., Lebo, R., Thompson, E.B., Rosenfeld, M.G., and Evans, R.M. (1985). Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature* 318, 635-641.
- Howell, M.P., and Muglia, L.J. (2006). Effects of genetically altered brain glucocorticoid receptor action on behavior and adrenal axis regulation in mice. *Front Neuroendocrinol* 27, 275-284.
- Hunot, S., Vila, M., Teismann, P., Davis, R.J., Hirsch, E.C., Przedborski, S., Rakic, P., and Flavell, R.A. (2004). JNK-mediated induction of cyclooxygenase 2 is required for neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 665-670.
- Ischiropoulos, H., and Beckman, J.S. (2003). Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: cause, effect, or association? *J Clin Invest* 111, 163-169.
- Ismaili, N., and Garabedian, M.J. (2004). Modulation of glucocorticoid receptor function via phosphorylation. *Ann N Y Acad Sci* 1024, 86-101.
- Ito, K., Barnes, P.J., and Adcock, I.M. (2000). Glucocorticoid receptor recruitment of histone deacetylase 2 inhibits interleukin-1beta-induced histone H4 acetylation on lysines 8 and 12. *Mol Cell Biol* 20, 6891-6903.
- Jackson-Lewis, V., and Przedborski, S. (2007). Protocol for the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Nat Protoc* 2, 141-151.
- Jeanneteau, F., Garabedian, M.J., and Chao, M.V. (2008). Activation of Trk neurotrophin receptors by glucocorticoids provides a neuroprotective effect. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 4862-4867.
- Jeffrey, K.L., Camps, M., Rommel, C., and Mackay, C.R. (2007). Targeting dual-specificity phosphatases: manipulating MAP kinase signalling and immune responses. *Nat Rev Drug Discov* 6, 391-403.
- Jenner, P. (2003). Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 53 Suppl 3, S26-36; discussion S36-28.
- Jenner, P. (2008). Functional models of Parkinson's disease: a valuable tool in the development of novel therapies. *Ann Neurol* 64 Suppl 2, S16-29.
- Jiang, Q., Akashi, S., Miyake, K., and Petty, H.R. (2000). Lipopolysaccharide induces physical proximity between CD14 and toll-like receptor 4 (TLR4) prior to nuclear translocation of NF-kappa B. *J Immunol* 165, 3541-3544.
- Joels, M., Karst, H., DeRijk, R., and de Kloet, E.R. (2008). The coming out of the brain mineralocorticoid receptor. *Trends Neurosci* 31, 1-7.
- Johnson, J.D., O'Connor, K.A., Deak, T., Stark, M., Watkins, L.R., and Maier, S.F. (2002). Prior stressor exposure sensitizes LPS-induced cytokine production. *Brain Behav Immun* 16, 461-476.
- Kanaan, N.M., Kordower, J.H., and Collier, T.J. (2008). Age and region-specific responses of microglia, but not astrocytes, suggest a role in selective vulnerability of dopamine neurons after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure in monkeys. *Glia* 56, 1199-1214.
- Karpus, W.J., Lukacs, N.W., Kennedy, K.J., Smith, W.S., Hurst, S.D., and Barrett, T.A. (1997). Differential CC chemokine-induced enhancement of T helper cell cytokine production. *J Immunol* 158, 4129-4136.
- Kassel, O., Sancono, A., Kratzschmar, J., Kreft, B., Stassen, M., and Cato, A.C. (2001). Glucocorticoids inhibit MAP kinase via increased expression and decreased degradation of MKP-1. *EMBO J* 20, 7108-7116.
- Kaufer, D., Ogle, W.O., Pincus, Z.S., Clark, K.L., Nicholas, A.C., Dinkel, K.M., Dumas, T.C., Ferguson, D., Lee, A.L., Winters, M.A., and Sapolsky, R.M. (2004). Restructuring the neuronal stress response with anti-glucocorticoid gene delivery. *Nat Neurosci* 7, 947-953.
- Kavelaars, A., and Heijnen, C.J. (2006). Stress, genetics, and immunity. *Brain Behav Immun* 20, 313-316.
- Keller-Wood, M.E., and Dallman, M.F. (1984). Corticosteroid inhibition of ACTH secretion. *Endocr Rev* 5, 1-24.
- Khan, A.A., Soloski, M.J., Sharp, A.H., Schilling, G., Sabatini, D.M., Li, S.H., Ross, C.A., and Snyder, S.H. (1996). Lymphocyte apoptosis: mediation by increased type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Science* 273, 503-507.
- Kim, W.G., Mohnney, R.P., Wilson, B., Jeohn, G.H., Liu, B., and Hong, J.S. (2000). Regional difference in susceptibility to lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in the rat brain: role of microglia. *J Neurosci* 20, 6309-6316.

- Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., Yokochi, M., Mizuno, Y., and Shimizu, N. (1998). Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 392, 605-608.
- Kitchener, P., Di Blasi, F., Borrelli, E., and Piazza, P.V. (2004). Differences between brain structures in nuclear translocation and DNA binding of the glucocorticoid receptor during stress and the circadian cycle. *Eur J Neurosci* 19, 1837-1846.
- Kleiman, A., and Tuckermann, J.P. (2007). Glucocorticoid receptor action in beneficial and side effects of steroid therapy: lessons from conditional knockout mice. *Mol Cell Endocrinol* 275, 98-108.
- Koeppen, B.M. (2009). *Berne Y Levy Fisiologia* (Elsevier - Health Sciences Division).
- Kohl, B., Fischer, S., Groh, J., Wessig, C., and Martini, R. (2009). MCP-1/CCL2 modifies axon properties in a PMP22-overexpressing mouse model for Charcot-Marie-tooth IA neuropathy. *Am J Pathol* 176, 1390-1399.
- Kopp, E., Medzhitov, R., Carothers, J., Xiao, C., Douglas, I., Janeway, C.A., and Ghosh, S. (1999). ECSIT is an evolutionarily conserved intermediate in the Toll/IL-1 signal transduction pathway. *Genes Dev* 13, 2059-2071.
- Kronenberg, H.M. (2009). *Williams Tratado de Endocrinología* (Elsevier - Health Sciences Division).
- Kumar, R., and Thompson, E.B. (1999). The structure of the nuclear hormone receptors. *Steroids* 64, 310-319.
- Kumar, R., and Thompson, E.B. (2005). Gene regulation by the glucocorticoid receptor: structure: function relationship. *J Steroid Biochem Mol Biol* 94, 383-394.
- Kurkowska-Jastrzebska, I., Litwin, T., Joniec, I., Ciesielska, A., Przybylkowski, A., Czlonkowska, A., and Czlonkowska, A. (2004). Dexamethasone protects against dopaminergic neurons damage in a mouse model of Parkinson's disease. *Int Immunopharmacol* 4, 1307-1318.
- Kurkowska-Jastrzebska, I., Wronska, A., Kohutnicka, M., Czlonkowski, A., and Czlonkowska, A. (1999). The inflammatory reaction following 1-methyl-4-phenyl-1,2,3, 6-tetrahydropyridine intoxication in mouse. *Exp Neurol* 156, 50-61.
- Lang, A.E., and Lozano, A.M. (1998). Parkinson's disease. First of two parts. *N Engl J Med* 339, 1044-1053.
- Langston, J.W., Ballard, P., Tetrud, J.W., and Irwin, I. (1983). Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* 219, 979-980.
- Langston, J.W., Forno, L.S., Tetrud, J., Reeves, A.G., Kaplan, J.A., and Karluk, D. (1999). Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure. *Ann Neurol* 46, 598-605.
- Lassmann, H., Schmied, M., Vass, K., and Hickey, W.F. (1993). Bone marrow derived elements and resident microglia in brain inflammation. *Glia* 7, 19-24.
- Laufen, T., Mayer, M.P., Beisel, C., Klostermeier, D., Mogk, A., Reinstein, J., and Bukau, B. (1999). Mechanism of regulation of hsp70 chaperones by DnaJ cochaperones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 5452-5457.
- Lawson, L.J., Perry, V.H., Dri, P., and Gordon, S. (1990). Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 39, 151-170.
- Lehnardt, S., Massillon, L., Follett, P., Jensen, F.E., Ratan, R., Rosenberg, P.A., Volpe, J.J., and Vartanian, T. (2003). Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8514-8519.
- Leroy, E., Boyer, R., Auburger, G., Leube, B., Ulm, G., Mezey, E., Harta, G., Brownstein, M.J., Jonnalagada, S., Chernova, T., et al. (1998). The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature* 395, 451-452.
- Lesage, S., and Brice, A. (2009). Parkinson's disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors. *Hum Mol Genet* 18, R48-59.
- Liberatore, G.T., Jackson-Lewis, V., Vukosavic, S., Mandir, A.S., Vila, M., McAuliffe, W.G., Dawson, V.L., Dawson, T.M., and Przedborski, S. (1999). Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease. *Nat Med* 5, 1403-1409.
- Lightman, S.L., and Conway-Campbell, B.L. (2010). The crucial role of pulsatile activity of the HPA axis for continuous dynamic equilibration. *Nat Rev Neurosci* 11, 710-718.
- Lim, L.H., and Pervaiz, S. (2007). Annexin I: the new face of an old molecule. *FASEB J* 21, 968-975.
- Linazasoro, G., Sesar, A., Valldeoriola, F., Compta, Y., Herrero, M.T., Martínez Castrillo, J.C., Lopez Lozano, J.J., Bergaretxe, A., Vela, L., Fernandez, J.M., et al. (2009). [Neuroprotection in Parkinson's disease: analysis through group of experts' methodology]. *Neurologia* 24, 113-124.
- Liss, B., and Roeper, J. (2001). Molecular physiology of neuronal K-ATP channels (review). *Mol Membr Biol* 18, 117-127.
- Lu, N.Z., and Cidlowski, J.A. (2004). The origin and functions of multiple human glucocorticoid receptor isoforms. *Ann N Y Acad Sci* 1024, 102-123.
- Luster, A.D. (1998). Chemokines-chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 338, 436-445.

- Maghazachi, A.A., al-Aoukaty, A., and Schall, T.J. (1994). C-C chemokines induce the chemotaxis of NK and IL-2-activated NK cells. Role for G proteins. *J Immunol* 153, 4969-4977.
- Marchetti, B., Serra, P.A., Tirolo, C., L'Episcopo, F., Caniglia, S., Gennuso, F., Testa, N., Miele, E., Desole, S., Barden, N., and Morale, M.C. (2005). Glucocorticoid receptor-nitric oxide crosstalk and vulnerability to experimental parkinsonism: pivotal role for glia-neuron interactions. *Brain Res Brain Res Rev* 48, 302-321.
- Marques-Deak, A., Cizza, G., and Sternberg, E. (2005). Brain-immune interactions and disease susceptibility. *Mol Psychiatry* 10, 239-250.
- Martinon, F., and Tschopp, J. (2007). Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation. *Cell Death Differ* 14, 10-22.
- Mata, I.F., Lockhart, P.J., and Farrer, M.J. (2004). Parkin genetics: one model for Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 13 Spec No 1, R127-133.
- Matthews, S.G. (2000). Antenatal glucocorticoids and programming of the developing CNS. *Pediatr Res* 47, 291-300.
- McCarthy, J.V., Ni, J., and Dixit, V.M. (1998). RIP2 is a novel NF-kappaB-activating and cell death-inducing kinase. *J Biol Chem* 273, 16968-16975.
- McConkey, D.J., Nicotera, P., Hartzell, P., Bellomo, G., Wyllie, A.H., and Orrenius, S. (1989). Glucocorticoids activate a suicide process in thymocytes through an elevation of cytosolic Ca²⁺ concentration. *Arch Biochem Biophys* 269, 365-370.
- McEwen, B.S. (2007). Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiol Rev* 87, 873-904.
- McEwen, B.S., Cameron, H., Chao, H.M., Gould, E., Magarinos, A.M., Watanabe, Y., and Woolley, C.S. (1993). Adrenal steroids and plasticity of hippocampal neurons: toward an understanding of underlying cellular and molecular mechanisms. *Cell Mol Neurobiol* 13, 457-482.
- McEwen, B.S., and Magarinos, A.M. (2001). Stress and hippocampal plasticity: implications for the pathophysiology of affective disorders. *Hum Psychopharmacol* 16, S7-S19.
- McEwen, B.S., and Stellar, E. (1993). Stress and the individual. Mechanisms leading to disease. *Arch Intern Med* 153, 2093-2101.
- McGeer, P.L., Itagaki, S., Boyes, B.E., and McGeer, E.G. (1988). Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology* 38, 1285-1291.
- McGeer, P.L., Itagaki, S., Boyes, B.E., and McGeer, E.G. (1998). Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology* 38, 1285-1291.
- McGeer, P.L., Schwab, C., Parent, A., and Doudet, D. (2003). Presence of reactive microglia in monkey substantia nigra years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine administration. *Ann Neurol* 54, 599-604.
- McNaught, K.S., Jnobaptiste, R., Jackson, T., and Jengelley, T.A. (2010). The pattern of neuronal loss and survival may reflect differential expression of proteasome activators in Parkinson's disease. *Synapse* 64, 241-250.
- Meda, L., Bernasconi, S., Bonaiuto, C., Sozzani, S., Zhou, D., Otvos, L., Jr., Mantovani, A., Rossi, F., and Cassatella, M.A. (1996). Beta-amyloid (25-35) peptide and IFN-gamma synergistically induce the production of the chemotactic cytokine MCP-1/JE in monocytes and microglial cells. *J Immunol* 157, 1213-1218.
- Meijsing, S.H., Pufall, M.A., So, A.Y., Bates, D.L., Chen, L., and Yamamoto, K.R. (2009). DNA binding site sequence directs glucocorticoid receptor structure and activity. *Science* 324, 407-410.
- Meme, W., Calvo, C.F., Froger, N., Ezan, P., Amigou, E., Koulakoff, A., and Giaume, C. (2006). Proinflammatory cytokines released from microglia inhibit gap junctions in astrocytes: potentiation by beta-amyloid. *FASEB J* 20, 494-496.
- Michel, P.P., Alvarez-Fischer, D., Guerreiro, S., Hild, A., Hartmann, A., and Hirsch, E.C. (2007). Role of activity-dependent mechanisms in the control of dopaminergic neuron survival. *J Neurochem* 101, 289-297.
- Michel, P.P., Ruberg, M., and Agid, Y. (1997). Rescue of mesencephalic dopamine neurons by anticancer drug cytosine arabinoside. *J Neurochem* 69, 1499-1507.
- Micheli, F. (2006). *Enfermedad de Parkinson y trastornos relacionados* (Buenos Aires: Médica Paramericana).
- Miller, A.L., Webb, M.S., Copik, A.J., Wang, Y., Johnson, B.H., Kumar, R., and Thompson, E.B. (2005). p38 Mitogen-activated protein kinase (MAPK) is a key mediator in glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoid cells: correlation between p38 MAPK activation and site-specific phosphorylation of the human glucocorticoid receptor at serine 211. *Mol Endocrinol* 19, 1569-1583.
- Miller, G.W., Gainetdinov, R.R., Levey, A.I., and Caron, M.G. (1999). Dopamine transporters and neuronal injury. *Trends Pharmacol Sci* 20, 424-429.
- Miller, W.L. (2008). Steroidogenic enzymes. *Endocr Dev* 13, 1-18.

- Mizobuchi, M., Hineno, T., Kakimoto, Y., and Hiratani, K. (1993). Increase of plasma adrenocorticotrophin and cortisol in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-treated dogs. *Brain Res* 612, 319-321.
- Mogi, M., Harada, M., Kondo, T., Riederer, P., Inagaki, H., Minami, M., and Nagatsu, T. (1994a). Interleukin-1 beta, interleukin-6, epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha are elevated in the brain from parkinsonian patients. *Neurosci Lett* 180, 147-150.
- Mogi, M., Harada, M., Riederer, P., Narabayashi, H., Fujita, K., and Nagatsu, T. (1994b). Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) increases both in the brain and in the cerebrospinal fluid from parkinsonian patients. *Neurosci Lett* 165, 208-210.
- Monat, A., and Lazarus, R. (1991). *Stress and coping: an anthology* (Columbia University Press).
- Monje, M.L., Toda, H., and Palmer, T.D. (2003). Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. *Science* 302, 1760-1765.
- Montgomery, D.W., LeFevre, J.A., Ulrich, E.D., Adamson, C.R., and Zukoski, C.F. (1990). Identification of prolactin-like proteins synthesized by normal murine lymphocytes. *Endocrinology* 127, 2601-2603.
- Moore, D.J., West, A.B., Dawson, V.L., and Dawson, T.M. (2005). Molecular pathophysiology of Parkinson's disease. *Annu Rev Neurosci* 28, 57-87.
- Morale, M.C., Serra, P.A., Delogu, M.R., Migheli, R., Rocchitta, G., Tirolo, C., Caniglia, S., Testa, N., L'Episcopo, F., Gennuso, F., et al. (2004). Glucocorticoid receptor deficiency increases vulnerability of the nigrostriatal dopaminergic system: critical role of glial nitric oxide. *FASEB J* 18, 164-166.
- Morale, M.C., Serra, P.A., L'Episcopo, F., Tirolo, C., Caniglia, S., Testa, N., Gennuso, F., Giaquinta, G., Rocchitta, G., Desole, M.S., et al. (2006). Estrogen, neuroinflammation and neuroprotection in Parkinson's disease: glia dictates resistance versus vulnerability to neurodegeneration. *Neuroscience* 138, 869-878.
- Morissette, M., Jourdain, S., Al Sweidi, S., Menniti, F.S., Ramirez, A.D., and Di Paolo, T. (2007). Role of estrogen receptors in neuroprotection by estradiol against MPTP toxicity. *Neuropharmacology* 52, 1509-1520.
- Mount, M.P., Lira, A., Grimes, D., Smith, P.D., Faucher, S., Slack, R., Anisman, H., Hayley, S., and Park, D.S. (2007). Involvement of interferon-gamma in microglial-mediated loss of dopaminergic neurons. *J Neurosci* 27, 3328-3337.
- Mourlevat, S., Troadec, J.D., Ruberg, M., and Michel, P.P. (2003). Prevention of dopaminergic neuronal death by cyclic AMP in mixed neuronal/glial mesencephalic cultures requires the repression of presumptive astrocytes. *Mol Pharmacol* 64, 578-586.
- Muller, T., and Muhlack, S. (2007). Acute levodopa intake and associated cortisol decrease in patients with Parkinson disease. *Clin Neuropharmacol* 30, 101-106.
- Munhoz, C.D., Lepsch, L.B., Kawamoto, E.M., Malta, M.B., Lima Lde, S., Avellar, M.C., Sapolsky, R.M., and Scavone, C. (2006). Chronic unpredictable stress exacerbates lipopolysaccharide-induced activation of nuclear factor-kappaB in the frontal cortex and hippocampus via glucocorticoid secretion. *J Neurosci* 26, 3813-3820.
- Nadeau, S., and Rivest, S. (2002). Endotoxemia prevents the cerebral inflammatory wave induced by intraparenchymal lipopolysaccharide injection: role of glucocorticoids and CD14. *J Immunol* 169, 3370-3381.
- Nadeau, S., and Rivest, S. (2003). Glucocorticoids play a fundamental role in protecting the brain during innate immune response. *J Neurosci* 23, 5536-5544.
- Neeck, G. (2002). Fifty years of experience with cortisone therapy in the study and treatment of rheumatoid arthritis. *Ann N Y Acad Sci* 966, 28-38.
- Nguyen, M.D., Julien, J.P., and Rivest, S. (2002). Innate immunity: the missing link in neuroprotection and neurodegeneration? *Nat Rev Neurosci* 3, 216-227.
- Nicolaides, N.C., Galata, Z., Kino, T., Chrousos, G.P., and Charmandari, E. (2010). The human glucocorticoid receptor: molecular basis of biologic function. *Steroids* 75, 1-12.
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., and Helmchen, F. (2005). Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308, 1314-1318.
- Nishimori, T., Inoue, H., and Hirata, Y. (2004). Involvement of the 3'-untranslated region of cyclooxygenase-2 gene in its post-transcriptional regulation through the glucocorticoid receptor. *Life Sci* 74, 2505-2513.
- Noguchi, K.K., Walls, K.C., Wozniak, D.F., Olney, J.W., Roth, K.A., and Farber, N.B. (2008). Acute neonatal glucocorticoid exposure produces selective and rapid cerebellar neural progenitor cell apoptotic death. *Cell Death Differ* 15, 1582-1592.
- Noguchi, T., Makino, S., Matsumoto, R., Nakayama, S., Nishiyama, M., Terada, Y., and Hashimoto, K. (2010). Regulation of glucocorticoid receptor transcription and nuclear translocation during single and repeated immobilization stress. *Endocrinology* 151, 4344-4355.
- Nordeen, S.K., Suh, B.J., Kuhnle, B., and Hutchison, C.A., 3rd (1990). Structural determinants of a glucocorticoid receptor recognition element. *Mol Endocrinol* 4, 1866-1873.

- Ogawa, S., Lozach, J., Benner, C., Pascual, G., Tangirala, R.K., Westin, S., Hoffmann, A., Subramaniam, S., David, M., Rosenfeld, M.G., and Glass, C.K. (2005). Molecular determinants of crosstalk between nuclear receptors and toll-like receptors. *Cell* 122, 707-721.
- Ohashi, K., Burkart, V., Flohe, S., and Kolb, H. (2000). Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J Immunol* 164, 558-561.
- Olszewski, J., and Baxter, D. (1954). Cytoarchitecture of the human brain stem (J.B. Lippincott).
- Orrenius, S., Zhivotovsky, B., and Nicotera, P. (2003). Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 552-565.
- Outeiro, T.F., and Lindquist, S. (2003). Yeast cells provide insight into alpha-synuclein biology and pathobiology. *Science* 302, 1772-1775.
- Owens, T., Bechmann, I., and Engelhardt, B. (2008). Perivascular spaces and the two steps to neuroinflammation. *J Neuropathol Exp Neurol* 67, 1113-1121.
- Paisan-Ruiz, C., Jain, S., Evans, E.W., Gilks, W.P., Simon, J., van der Brug, M., Lopez de Munain, A., Aparicio, S., Gil, A.M., Khan, N., et al. (2004). Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron* 44, 595-600.
- Palacino, J.J., Sagi, D., Goldberg, M.S., Krauss, S., Motz, C., Wacker, M., Klose, J., and Shen, J. (2004). Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in parkin-deficient mice. *J Biol Chem* 279, 18614-18622.
- Palframan, R.T., Jung, S., Cheng, G., Weninger, W., Luo, Y., Dorf, M., Littman, D.R., Rollins, B.J., Zweerink, H., Rot, A., and von Andrian, U.H. (2001). Inflammatory chemokine transport and presentation in HEV: a remote control mechanism for monocyte recruitment to lymph nodes in inflamed tissues. *J Exp Med* 194, 1361-1373.
- Paschen, W., and Frandsen, A. (2001). Endoplasmic reticulum dysfunction--a common denominator for cell injury in acute and degenerative diseases of the brain? *J Neurochem* 79, 719-725.
- Paxinos, G., and Franklin, K. (2001). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, 2 edn (San Diego: Academic Press).
- Paxinos, G., and Huang, X.-F. (2000). *The Rhesus Monkey Brain in Stereotaxic Coordinates*, 4 edn (San Diego: Academic Press).
- Pelaia, G., Vatrella, A., Cuda, G., Maselli, R., and Marsico, S.A. (2003). Molecular mechanisms of corticosteroid actions in chronic inflammatory airway diseases. *Life Sci* 72, 1549-1561.
- Perry, V.H., Cunningham, C., and Holmes, C. (2007). Systemic infections and inflammation affect chronic neurodegeneration. *Nat Rev Immunol* 7, 161-167.
- Piccoli, G., Condliffe, S.B., Bauer, M., Giesert, F., Boldt, K., De Astis, S., Meixner, A., Sarioglu, H., Vogt-Weisenhorn, D.M., Wurst, W., et al. (2011). LRRK2 Controls Synaptic Vesicle Storage and Mobilization within the Recycling Pool. *J Neurosci* 31, 2225-2237.
- Pippal, J.B., and Fuller, P.J. (2008). Structure-function relationships in the mineralocorticoid receptor. *J Mol Endocrinol* 41, 405-413.
- Platten, M., Kretz, A., Naumann, U., Aulwurm, S., Egashira, K., Isenmann, S., and Weller, M. (2003). Monocyte chemoattractant protein-1 increases microglial infiltration and aggressiveness of gliomas. *Ann Neurol* 54, 388-392.
- Polymeropoulos, M.H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S.E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., et al. (1997). Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276, 2045-2047.
- Potter, E., Sutton, S., Donaldson, C., Chen, R., Perrin, M., Lewis, K., Sawchenko, P.E., and Vale, W. (1994). Distribution of corticotropin-releasing factor receptor mRNA expression in the rat brain and pituitary. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 8777-8781.
- Pratt, W.B., Galigniana, M.D., Harrell, J.M., and DeFranco, D.B. (2004). Role of hsp90 and the hsp90-binding immunophilins in signalling protein movement. *Cell Signal* 16, 857-872.
- Przedborski, S., Tieu, K., Perier, C., and Vila, M. (2004). MPTP as a mitochondrial neurotoxic model of Parkinson's disease. *J Bioenerg Biomembr* 36, 375-379.
- Przedborski, S., and Vila, M. (2003). The 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model: a tool to explore the pathogenesis of Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 991, 189-198.
- Pujols, L., Mullol, J., Roca-Ferrer, J., Torregó, A., Xaubet, A., Cidlowski, J.A., and Picado, C. (2002). Expression of glucocorticoid receptor alpha- and beta-isoforms in human cells and tissues. *Am J Physiol Cell Physiol* 283, C1324-1331.
- Pype, J.L., Dupont, L.J., Menten, P., Van Coillie, E., Opendakker, G., Van Damme, J., Chung, K.F., Demedts, M.G., and Verleden, G.M. (1999). Expression of monocyte chemotactic protein (MCP)-1, MCP-2, and MCP-3 by human airway smooth-muscle cells. Modulation by corticosteroids and T-helper 2 cytokines. *Am J Respir Cell Mol Biol* 21, 528-536.

- Quan, Y., Jiang, C.T., Xue, B., Zhu, S.G., and Wang, X. (2011). High glucose stimulates TNF α and MCP-1 expression in rat microglia via ROS and NF- κ B pathways. *Acta Pharmacol Sin* 32, 188-193.
- Ransohoff, R.M., Hamilton, T.A., Tani, M., Stoler, M.H., Shick, H.E., Major, J.A., Estes, M.L., Thomas, D.M., and Tuohy, V.K. (1993). Astrocyte expression of mRNA encoding cytokines IP-10 and JE/MCP-1 in experimental autoimmune encephalomyelitis. *FASEB J* 7, 592-600.
- Ransohoff, R.M., and Perry, V.H. (2009). Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu Rev Immunol* 27, 119-145.
- Raskin, K., de Gendt, K., Duittoz, A., Liere, P., Verhoeven, G., Tronche, F., and Mhaouty-Kodja, S. (2009). Conditional inactivation of androgen receptor gene in the nervous system: effects on male behavioral and neuroendocrine responses. *J Neurosci* 29, 4461-4470.
- Reale, M., Iarlori, C., Thomas, A., Gambi, D., Perfetti, B., Di Nicola, M., and Onofri, M. (2009). Peripheral cytokines profile in Parkinson's disease. *Brain Behav Immun* 23, 55-63.
- Reichardt, H.M., Kaestner, K.H., Tuckermann, J., Kretz, O., Wessely, O., Bock, R., Gass, P., Schmid, W., Herrlich, P., Angel, P., and Schutz, G. (1998). DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival. *Cell* 93, 531-541.
- Reichardt, H.M., Tuckermann, J.P., Gottlicher, M., Vujic, M., Weih, F., Angel, P., Herrlich, P., and Schutz, G. (2001). Repression of inflammatory responses in the absence of DNA binding by the glucocorticoid receptor. *EMBO J* 20, 7168-7173.
- Rezai-Zadeh, K., Gate, D., and Town, T. (2009). CNS infiltration of peripheral immune cells: D-Day for neurodegenerative disease? *J Neuroimmune Pharmacol* 4, 462-475.
- Rezaie, P., and Male, D. (2002). Mesoglia & microglia--a historical review of the concept of mononuclear phagocytes within the central nervous system. *J Hist Neurosci* 11, 325-374.
- Ricketson, D., Hostick, U., Fang, L., Yamamoto, K.R., and Darimont, B.D. (2007). A conformational switch in the ligand-binding domain regulates the dependence of the glucocorticoid receptor on Hsp90. *J Mol Biol* 368, 729-741.
- Riggs, D.L., Roberts, P.J., Chirillo, S.C., Cheung-Flynn, J., Prapapanich, V., Ratajczak, T., Gaber, R., Picard, D., and Smith, D.F. (2003). The Hsp90-binding peptidylprolyl isomerase FKBP52 potentiates glucocorticoid signaling in vivo. *EMBO J* 22, 1158-1167.
- Rinner, W.A., Bauer, J., Schmidts, M., Lassmann, H., and Hickey, W.F. (1995). Resident microglia and hematogenous macrophages as phagocytes in adoptively transferred experimental autoimmune encephalomyelitis: an investigation using rat radiation bone marrow chimeras. *Glia* 14, 257-266.
- Roger, T., David, J., Glauser, M.P., and Calandra, T. (2001). MIF regulates innate immune responses through modulation of Toll-like receptor 4. *Nature* 414, 920-924.
- Rollins, B.J. (1997). Chemokines. *Blood* 90, 909-928.
- Ros-Bernal, F., Hunot, S., Herrero, M.T., Parnadeau, S., Corvol, J.C., Lu, L., Alvarez-Fischer, D., Carrillo-de Sauvage, M.A., Saurini, F., Coussieu, C., et al. (2011). Microglial glucocorticoid receptors play a pivotal role in regulating dopaminergic neurodegeneration in parkinsonism. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Sabolek, M., Herborg, A., Schwarz, J., and Storch, A. (2006). Dexamethasone blocks astroglial differentiation from neural precursor cells. *Neuroreport* 17, 1719-1723.
- Saijo, K., Winner, B., Carson, C.T., Collier, J.G., Boyer, L., Rosenfeld, M.G., Gage, F.H., and Glass, C.K. (2009). A Nurr1/CoREST pathway in microglia and astrocytes protects dopaminergic neurons from inflammation-induced death. *Cell* 137, 47-59.
- Sainz, B., Loutsch, J.M., Marquart, M.E., and Hill, J.M. (2001). Stress-associated immunomodulation and herpes simplex virus infections. *Med Hypotheses* 56, 348-356.
- Sairam, K., Saravanan, K.S., Banerjee, R., and Mohanakumar, K.P. (2003). Non-steroidal anti-inflammatory drug sodium salicylate, but not diclofenac or celecoxib, protects against 1-methyl-4-phenyl pyridinium-induced dopaminergic neurotoxicity in rats. *Brain Res* 966, 245-252.
- Sanchez-Pernaute, R., Ferree, A., Cooper, O., Yu, M., Brownell, A.L., and Isacson, O. (2004). Selective COX-2 inhibition prevents progressive dopamine neuron degeneration in a rat model of Parkinson's disease. *J Neuroinflammation* 1, 6.
- Sanchez-Vega, B., Krett, N., Rosen, S.T., and Gandhi, V. (2006). Glucocorticoid receptor transcriptional isoforms and resistance in multiple myeloma cells. *Mol Cancer Ther* 5, 3062-3070.
- Sanchez, M.M., Young, L.J., Plotsky, P.M., and Insel, T.R. (2000). Distribution of corticosteroid receptors in the rhesus brain: relative absence of glucocorticoid receptors in the hippocampal formation. *J Neurosci* 20, 4657-4668.
- Sapolsky, R.M. (1996). Stress, Glucocorticoids, and Damage to the Nervous System: The Current State of Confusion. *Stress* 1, 1-19.
- Sapolsky, R.M. (1999). Glucocorticoids, stress, and their adverse neurological effects: relevance to aging. *Exp Gerontol* 34, 721-732.

- Sartipy, P., and Loskutoff, D.J. (2003). Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 7265-7270.
- Sato, A., Arimura, Y., Manago, Y., Nishikawa, K., Aoki, K., Wada, E., Suzuki, Y., Osaka, H., Setsuie, R., Sakurai, M., et al. (2006). Parkin potentiates ATP-induced currents due to activation of P2X receptors in PC12 cells. *J Cell Physiol* 209, 172-182.
- Savory, J.G., Hsu, B., Laquian, I.R., Giffin, W., Reich, T., Hache, R.J., and Lefebvre, Y.A. (1999). Discrimination between NL1- and NL2-mediated nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *Mol Cell Biol* 19, 1025-1037.
- Schacke, H., Docke, W.D., and Asadullah, K. (2002). Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacol Ther* 96, 23-43.
- Schiess, M. (2003). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs protect against Parkinson neurodegeneration: can an NSAID a day keep Parkinson disease away? *Arch Neurol* 60, 1043-1044.
- Schultz, J.C., and Sawchenko, P.E. (2002). Distinct brain vascular cell types manifest inducible cyclooxygenase expression as a function of the strength and nature of immune insults. *J Neurosci* 22, 5606-5618.
- Schultz, J.C., and Sawchenko, P.E. (2007). Specificity and generality of the involvement of catecholaminergic afferents in hypothalamic responses to immune insults. *J Comp Neurol* 502, 455-467.
- Schmued, L.C., Albertson, C., and Slikker, W., Jr. (1997). Fluoro-Jade: a novel fluorochrome for the sensitive and reliable histochemical localization of neuronal degeneration. *Brain Res* 751, 37-46.
- Schmued, L.C., and Hopkins, K.J. (2000). Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration. *Brain Res* 874, 123-130.
- Schwartz, M., Moalem, G., Leibowitz-Amit, R., and Cohen, I.R. (1999). Innate and adaptive immune responses can be beneficial for CNS repair. *Trends Neurosci* 22, 295-299.
- Seckl, J.R., and Walker, B.R. (2004). 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 as a modulator of glucocorticoid action: from metabolism to memory. *Trends Endocrinol Metab* 15, 418-424.
- Sedgwick, J.D., Ford, A.L., Foulcher, E., and Airriess, R. (1998). Central nervous system microglial cell activation and proliferation follows direct interaction with tissue-infiltrating T cell blasts. *J Immunol* 160, 5320-5330.
- Selye, H. (1952). The story of the adaptation syndrome: told in the form of informal, illustrated lectures (Acta).
- Selye, H. (1974). Stress without distress (Toronto).
- Selye, H. (1998). A syndrome produced by diverse noxious agents. 1936. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 10, 230-231.
- Seple, B.D., Bye, N., Rancan, M., Ziebell, J.M., and Morganti-Kossmann, M.C. (2010). Role of CCL2 (MCP-1) in traumatic brain injury (TBI): evidence from severe TBI patients and CCL2-/- mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 30, 769-782.
- Serrats, J., Schultz, J.C., Garcia-Bueno, B., van Rooijen, N., Reyes, T.M., and Sawchenko, P.E. (2010). Dual roles for perivascular macrophages in immune-to-brain signaling. *Neuron* 65, 94-106.
- Shimazu, R., Akashi, S., Ogata, H., Nagai, Y., Fukudome, K., Miyake, K., and Kimoto, M. (1999). MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* 189, 1777-1782.
- Simard, A.R., and Rivest, S. (2007). Neuroprotective effects of resident microglia following acute brain injury. *J Comp Neurol* 504, 716-729.
- Simpson, J.E., Newcombe, J., Cuzner, M.L., and Woodroffe, M.N. (1998). Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and other beta-chemokines by resident glia and inflammatory cells in multiple sclerosis lesions. *J Neuroimmunol* 84, 238-249.
- Singleton, A.B., Farrer, M., Johnson, J., Singleton, A., Hague, S., Kachergus, J., Hulihan, M., Peuralinna, T., Dutra, A., Nussbaum, R., et al. (2003). alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 302, 841.
- Sionov, R.V., Cohen, O., Kfir, S., Zilberman, Y., and Yefenof, E. (2006). Role of mitochondrial glucocorticoid receptor in glucocorticoid-induced apoptosis. *J Exp Med* 203, 189-201.
- Sirinathsingji, D.J., Kupsch, A., Mayer, E., Zivin, M., Pufal, D., and Oertel, W.H. (1992). Cellular localization of tyrosine hydroxylase mRNA and cholecystikinin mRNA-containing cells in the ventral mesencephalon of the common marmoset: effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Brain Res Mol Brain Res* 12, 267-274.
- Smith, K. (2010). Treatment frontiers. *Nature* 466, S15-18.
- Smoak, A., and Cidlowski, J. (2008). Glucocorticoid Signaling in Health and Disease. In *The Hypothalamus-Pituitary-Adrenal Axis*, A. Del Rey, G.P. Chrousos, and H. Besedovsky, eds. (Elsevier), pp. 33-53.
- So, A.Y., Chaiworapol, C., Bolton, E.C., Li, H., and Yamamoto, K.R. (2007). Determinants of cell- and gene-specific transcriptional regulation by the glucocorticoid receptor. *PLoS Genet* 3, e94.
- Sorensen, T.L., Ransohoff, R.M., Strieter, R.M., and Sellebjerg, F. (2004). Chemokine CCL2 and chemokine receptor CCR2 in early active multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 11, 445-449.

- Sorrells, S.F., Caso, J.R., Munhoz, C.D., and Sapolsky, R.M. (2009). The stressed CNS: when glucocorticoids aggravate inflammation. *Neuron* 64, 33-39.
- Sozzani, S., Molino, M., Locati, M., Luini, W., Cerletti, C., Vecchi, A., and Mantovani, A. (1993). Receptor-activated calcium influx in human monocytes exposed to monocyte chemotactic protein-1 and related cytokines. *J Immunol* 150, 1544-1553.
- Springer, T.A. (1994). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76, 301-314.
- Stella, N., Tence, M., Glowinski, J., and Premont, J. (1994). Glutamate-evoked release of arachidonic acid from mouse brain astrocytes. *J Neurosci* 14, 568-575.
- Sterio, D.C. (1984). The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J Microsc* 134, 127-136.
- Sternberg, E.M. (2006). Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens. *Nat Rev Immunol* 6, 318-328.
- Stocklin, E., Wissler, M., Gouilleux, F., and Groner, B. (1996). Functional interactions between Stat5 and the glucocorticoid receptor. *Nature* 383, 726-728.
- Stockner, T., Sterk, H., Kaptein, R., and Bonvin, A.M. (2003). Molecular dynamics studies of a molecular switch in the glucocorticoid receptor. *J Mol Biol* 328, 325-334.
- Stolte, E.H., van Kemenade, B.M., Savelkoul, H.F., and Flik, G. (2006). Evolution of glucocorticoid receptors with different glucocorticoid sensitivity. *J Endocrinol* 190, 17-28.
- Streit, W.J., Walter, S.A., and Pennell, N.A. (1999). Reactive microgliosis. *Prog Neurobiol* 57, 563-581.
- Strickland, I., Kisich, K., Hauk, P.J., Vottero, A., Chrousos, G.P., Klemm, D.J., and Leung, D.Y. (2001). High constitutive glucocorticoid receptor beta in human neutrophils enables them to reduce their spontaneous rate of cell death in response to corticosteroids. *J Exp Med* 193, 585-593.
- Stypula, G., Kunert-Radek, J., Stepien, H., Zylinska, K., and Pawlikowski, M. (1996). Evaluation of interleukins, ACTH, cortisol and prolactin concentrations in the blood of patients with parkinson's disease. *Neuroimmunomodulation* 3, 131-134.
- Sugama, S., Takenouchi, T., Kitani, H., Fujita, M., and Hashimoto, M. (2009). Microglial activation is inhibited by corticosterone in dopaminergic neurodegeneration. *J Neuroimmunol* 208, 104-114.
- Sweet, M.J., Leung, B.P., Kang, D., Sogaard, M., Schulz, K., Trajkovic, V., Campbell, C.C., Xu, D., and Liew, F.Y. (2001). A novel pathway regulating lipopolysaccharide-induced shock by ST2/T1 via inhibition of Toll-like receptor 4 expression. *J Immunol* 166, 6633-6639.
- Takeda, K., Kaisho, T., and Akira, S. (2003). Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 21, 335-376.
- Tanaka, J., Fujita, H., Matsuda, S., Toku, K., Sakanaka, M., and Maeda, N. (1997). Glucocorticoid- and mineralocorticoid receptors in microglial cells: the two receptors mediate differential effects of corticosteroids. *Glia* 20, 23-37.
- Tang, Y., Getzenberg, R.H., Vietmeier, B.N., Stallcup, M.R., Eggert, M., Renkawitz, R., and DeFranco, D.B. (1998). The DNA-binding and tau2 transactivation domains of the rat glucocorticoid receptor constitute a nuclear matrix-targeting signal. *Mol Endocrinol* 12, 1420-1431.
- Tanuma, N., Sakuma, H., Sasaki, A., and Matsumoto, Y. (2006). Chemokine expression by astrocytes plays a role in microglia/macrophage activation and subsequent neurodegeneration in secondary progressive multiple sclerosis. *Acta Neuropathol* 112, 195-204.
- Tasker, J.G. (2006). Rapid glucocorticoid actions in the hypothalamus as a mechanism of homeostatic integration. *Obesity (Silver Spring)* 14 Suppl 5, 259S-265S.
- Teismann, P., and Ferger, B. (2001). Inhibition of the cyclooxygenase isoenzymes COX-1 and COX-2 provide neuroprotection in the MPTP-mouse model of Parkinson's disease. *Synapse* 39, 167-174.
- Teismann, P., Tieu, K., Choi, D.K., Wu, D.C., Naini, A., Hunot, S., Vila, M., Jackson-Lewis, V., and Przedborski, S. (2003a). Cyclooxygenase-2 is instrumental in Parkinson's disease neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 5473-5478.
- Teismann, P., Vila, M., Choi, D.K., Tieu, K., Wu, D.C., Jackson-Lewis, V., and Przedborski, S. (2003b). COX-2 and neurodegeneration in Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 991, 272-277.
- Terry, L.J., Shows, E.B., and Wentz, S.R. (2007). Crossing the nuclear envelope: hierarchical regulation of nucleocytoplasmic transport. *Science* 318, 1412-1416.
- Thomas, C.E., Schiedner, G., Kochanek, S., Castro, M.G., and Lowenstein, P.R. (2000). Peripheral infection with adenovirus causes unexpected long-term brain inflammation in animals injected intracranially with first-generation, but not with high-capacity, adenovirus vectors: toward realistic long-term neurological gene therapy for chronic diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 7482-7487.
- Thornton, J.W. (2001). Evolution of vertebrate steroid receptors from an ancestral estrogen receptor by ligand exploitation and serial genome expansions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 5671-5676.

- Ton, T.G., Heckbert, S.R., Longstreth, W.T., Jr., Rossing, M.A., Kukull, W.A., Franklin, G.M., Swanson, P.D., Smith-Weller, T., and Checkoway, H. (2006). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of Parkinson's disease. *Mov Disord* 21, 964-969.
- Toulorge, D., Guerreiro, S., Hirsch, E.C., and Michel, P.P. (2010). KATP channel blockade protects midbrain dopamine neurons by repressing a glia-to-neuron signaling cascade that ultimately disrupts mitochondrial calcium homeostasis. *J Neurochem* 114, 553-564.
- Triantafilou, K., Triantafilou, M., and Dedrick, R.L. (2001). A CD14-independent LPS receptor cluster. *Nat Immunol* 2, 338-345.
- Triantafilou, M., and Triantafilou, K. (2002). Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. *Trends Immunol* 23, 301-304.
- Tripanichkul, W., Sripianichkulchai, K., and Finkelstein, D.I. (2006). Estrogen down-regulates glial activation in male mice following 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine intoxication. *Brain Res* 1084, 28-37.
- Tronche, F., Casanova, E., Turiault, M., Sahly, I., and Kellendonk, C. (2002). When reverse genetics meets physiology: the use of site-specific recombinases in mice. *FEBS Lett* 529, 116-121.
- Tronche, F., Kellendonk, C., Kretz, O., Gass, P., Anlag, K., Orban, P.C., Bock, R., Klein, R., and Schutz, G. (1999). Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. *Nat Genet* 23, 99-103.
- Tronche, F., Kellendonk, C., Reichardt, H.M., and Schutz, G. (1998). Genetic dissection of glucocorticoid receptor function in mice. *Curr Opin Genet Dev* 8, 532-538.
- Tronche, F., Opherck, C., Moriggl, R., Kellendonk, C., Reimann, A., Schwake, L., Reichardt, H.M., Stangl, K., Gau, D., Hoefflich, A., et al. (2004). Glucocorticoid receptor function in hepatocytes is essential to promote postnatal body growth. *Genes Dev* 18, 492-497.
- Tsigos, C., and Chrousos, G.P. (2002). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosom Res* 53, 865-871.
- Tuckermann, J.P., Kleiman, A., Moriggl, R., Spanbroek, R., Neumann, A., Illing, A., Clausen, B.E., Stride, B., Forster, I., Habenicht, A.J., et al. (2007). Macrophages and neutrophils are the targets for immune suppression by glucocorticoids in contact allergy. *J Clin Invest* 117, 1381-1390.
- Turiault, M., Parnaudeau, S., Milet, A., Parlato, R., Rouzeau, J.D., Lazar, M., and Tronche, F. (2007). Analysis of dopamine transporter gene expression pattern -- generation of DAT-iCre transgenic mice. *FEBS J* 274, 3568-3577.
- Turnbull, A.V., and Rivier, C.L. (1999). Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. *Physiol Rev* 79, 1-71.
- Uhl, G.R., Walther, D., Mash, D., Faucheux, B., and Javoy-Agid, F. (1994). Dopamine transporter messenger RNA in Parkinson's disease and control substantia nigra neurons. *Ann Neurol* 35, 494-498.
- Uhr, M., Holsboer, F., and Muller, M.B. (2002). Penetration of endogenous steroid hormones corticosterone, cortisol, aldosterone and progesterone into the brain is enhanced in mice deficient for both *mdr1a* and *mdr1b* P-glycoproteins. *J Neuroendocrinol* 14, 753-759.
- Valente, E.M., Abou-Sleiman, P.M., Caputo, V., Muqit, M.M., Harvey, K., Gispert, S., Ali, Z., Del Turco, D., Bentivoglio, A.R., Healy, D.G., et al. (2004). Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in *PINK1*. *Science* 304, 1158-1160.
- Van Der Voorn, P., Tekstra, J., Beelen, R.H., Tensen, C.P., Van Der Valk, P., and De Groot, C.J. (1999). Expression of MCP-1 by reactive astrocytes in demyelinating multiple sclerosis lesions. *Am J Pathol* 154, 45-51.
- Vila, M., Jackson-Lewis, V., Vukosavic, S., Djaldetti, R., Liberatore, G., Offen, D., Korsmeyer, S.J., and Przedborski, S. (2001). Bax ablation prevents dopaminergic neurodegeneration in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 2837-2842.
- Visintin, A., Mazzoni, A., Spitzer, J.H., Wyllie, D.H., Dower, S.K., and Segal, D.M. (2001). Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. *J Immunol* 166, 249-255.
- Viswanath, V., Wu, Y., Boonplueang, R., Chen, S., Stevenson, F.F., Yantiri, F., Yang, L., Beal, M.F., and Andersen, J.K. (2001). Caspase-9 activation results in downstream caspase-8 activation and bid cleavage in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced Parkinson's disease. *J Neurosci* 21, 9519-9528.
- Vitkovic, L., Bockaert, J., and Jacque, C. (2000). "Inflammatory" cytokines: neuromodulators in normal brain? *J Neurochem* 74, 457-471.
- Volpi, R., Caffarra, P., Marcato, A., Scaglioni, A., Maestri, D., Delsignore, R., Chiodera, P., and Coiro, V. (1991). Reduced ACTH/cortisol responses to naloxone in men with Parkinson's disease. *Journal of neural transmission* 3, 127-132.
- Wahner, A.D., Bronstein, J.M., Bordelon, Y.M., and Ritz, B. (2007). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs may protect against Parkinson disease. *Neurology* 69, 1836-1842.
- Wallace, A.D., and Cidlowski, J.A. (2001). Proteasome-mediated glucocorticoid receptor degradation restricts transcriptional signaling by glucocorticoids. *J Biol Chem* 276, 42714-42721.

- Wang, P., Sun, L., Shen, A., Yang, J., Li, X., Liu, H., Tao, T., Cheng, C., and Lu, X. (2010). Involvement of SRC-suppressed C kinase substrate in neuronal death caused by the lipopolysaccharide-induced reactive astrogliosis. *Inflammation* 33, 359-373.
- Webster, J.C., Oakley, R.H., Jewell, C.M., and Cidlowski, J.A. (2001). Proinflammatory cytokines regulate human glucocorticoid receptor gene expression and lead to the accumulation of the dominant negative beta isoform: a mechanism for the generation of glucocorticoid resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 6865-6870.
- Webster, J.I., Tonelli, L., and Sternberg, E.M. (2002). Neuroendocrine regulation of immunity. *Annu Rev Immunol* 20, 125-163.
- Wei, Q., Lu, X.Y., Liu, L., Schafer, G., Shieh, K.R., Burke, S., Robinson, T.E., Watson, S.J., Seasholtz, A.F., and Akil, H. (2004). Glucocorticoid receptor overexpression in forebrain: a mouse model of increased emotional lability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 11851-11856.
- Weigent, D.A., and Blalock, J.E. (1987). Interactions between the neuroendocrine and immune systems: common hormones and receptors. *Immunol Rev* 100, 79-108.
- Wietek, C., Miggin, S.M., Jefferies, C.A., and O'Neill, L.A. (2003). Interferon regulatory factor-3-mediated activation of the interferon-sensitive response element by Toll-like receptor (TLR) 4 but not TLR3 requires the p65 subunit of NF-kappa. *J Biol Chem* 278, 50923-50931.
- Witjas, T., Kaphan, E., Azulay, J.P., Blin, O., Ceccaldi, M., Pouget, J., Poncet, M., and Cherif, A.A. (2002). Nonmotor fluctuations in Parkinson's disease: frequent and disabling. *Neurology* 59, 408-413.
- Wochnik, G.M., Ruegg, J., Abel, G.A., Schmidt, U., Holsboer, F., and Rein, T. (2005). FK506-binding proteins 51 and 52 differentially regulate dynein interaction and nuclear translocation of the glucocorticoid receptor in mammalian cells. *J Biol Chem* 280, 4609-4616.
- Woloski, B.M., Smith, E.M., Meyer, W.J., 3rd, Fuller, G.M., and Blalock, J.E. (1985). Corticotropin-releasing activity of monokines. *Science* 230, 1035-1037.
- Wooten, G.F., Currie, L.J., Bovbjerg, V.E., Lee, J.K., and Patrie, J. (2004). Are men at greater risk for Parkinson's disease than women? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 75, 637-639.
- Yamada, T., McGeer, P.L., Baimbridge, K.G., and McGeer, E.G. (1990). Relative sparing in Parkinson's disease of substantia nigra dopamine neurons containing calbindin-D28K. *Brain Res* 526, 303-307.
- Yang, G., Meng, Y., Li, W., Yong, Y., Fan, Z., Ding, H., Wei, Y., Luo, J., and Ke, Z.J. (2010). Neuronal MCP-1 Mediates Microglia Recruitment and Neurodegeneration Induced by the Mild Impairment of Oxidative Metabolism. *Brain Pathol*.
- Yao, H., Yang, Y., Kim, K.J., Bethel-Brown, C., Gong, N., Funa, K., Gendelman, H.E., Su, T.P., Wang, J.Q., and Buch, S. (2010). Molecular mechanisms involving sigma receptor-mediated induction of MCP-1: implication for increased monocyte transmigration. *Blood* 115, 4951-4962.
- Yao, M., Schulkun, J., and Denver, R.J. (2008). Evolutionarily conserved glucocorticoid regulation of corticotropin-releasing factor expression. *Endocrinology* 149, 2352-2360.
- Young, E.A., Abelson, J., and Lightman, S.L. (2004). Cortisol pulsatility and its role in stress regulation and health. *Front Neuroendocrinol* 25, 69-76.
- Yudt, M.R., and Cidlowski, J.A. (2002). The glucocorticoid receptor: coding a diversity of proteins and responses through a single gene. *Mol Endocrinol* 16, 1719-1726.
- Yudt, M.R., Jewell, C.M., Bienstock, R.J., and Cidlowski, J.A. (2003). Molecular origins for the dominant negative function of human glucocorticoid receptor beta. *Mol Cell Biol* 23, 4319-4330.
- Zarranz, J.J., Alegre, J., Gomez-Esteban, J.C., Lezcano, E., Ros, R., Ampuero, I., Vidal, L., Hoenicka, J., Rodriguez, O., Atares, B., et al. (2004). The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann Neurol* 55, 164-173.
- Zhang, J., and De Koninck, Y. (2006). Spatial and temporal relationship between monocyte chemoattractant protein-1 expression and spinal glial activation following peripheral nerve injury. *J Neurochem* 97, 772-783.
- Zhang, J., Shi, X.Q., Echeverry, S., Mogil, J.S., De Koninck, Y., and Rivest, S. (2007). Expression of CCR2 in both resident and bone marrow-derived microglia plays a critical role in neuropathic pain. *J Neurosci* 27, 12396-12406.
- Zhu, X., Fujita, M., Snyder, L.A., and Okada, H. (2010). Systemic delivery of neutralizing antibody targeting CCL2 for glioma therapy. *J Neurooncol*.
- Zipp, F., and Aktas, O. (2006). The brain as a target of inflammation: common pathways link inflammatory and neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci* 29, 518-527.
- Zirger, J.M., Liu, C., Barcia, C., Castro, M.G., and Lowenstein, P.R. (2006). Immune regulation of transgene expression in the brain: B cells regulate an early phase of elimination of transgene expression from adenoviral vectors. *Viral immunology* 19, 508-517.
- Ziviani, E., Lippi, G., Bano, D., Munarriz, E., Guiducci, S., Zoli, M., Young, K.W., and Nicotera, P. (2011). Ryanodine receptor-2 upregulation and nicotine-mediated plasticity. *EMBO J* 30, 194-204.

VII. Anexos

ANEXO 1

PNAS

PNAS

Microglial glucocorticoid receptors play a pivotal role in regulating dopaminergic neurodegeneration in parkinsonism

Francisco Ros-Bernal^{a,b,c,d,e,1}, Stéphane Hunot^{c,f,g,1}, María Trinidad Herrero^a, Sébastien Parnadeau^{a,b,c,d}, Jean-Christophe Corvol^{c,t,g,h}, Lixia Lu^{c,t,g,i}, Daniel Alvarez-Fischer^{c,t,g,j}, María Angeles Carrillo-de Sauvage^{a,b,c,d,e}, Françoise Saurini^k, Christiane Coussieu^l, Kiyoka Kinugawa^{c,t,g}, Annick Prigent^{c,t,g}, Günter Höglinger^j, Michel Hamon^{c,t}, François Tronche^{a,b,c,d,i}, Étienne C. Hirsch^{c,t,g,i}, and Sheila Vyas^{a,b,c,d,i}

^aCentre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Unité Mixte de Recherche (UMR) 7224, F-75005 Paris, France; ^bInstitut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Unité 952, F-75005 Paris, France; ^cUniversité Pierre et Marie Curie–Paris 06, F-75252 Paris Cedex 5, France; ^dInstitute of Biology, Collège de France, F-75005 Paris, France; ^eClinical and Experimental Neuroscience, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CERNED), School of Medicine, University of Murcia, 30100 Murcia, Spain; ^fInstitut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité Mixte de Recherche U975 Hôpital de la Salpêtrière, F-75013 Paris, France; ^gCentre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 7225, Centre de Recherche de l'Institut du Cerveau et de la Moëlle Épinrière, F-75013 Paris, France; ^hAssistance-Publique Hôpitaux de Paris, Clinical Investigation Center CIC-9503, Department of Neurology, Hôpital Salpêtrière, F-75013 Paris, France; ⁱDepartment of Regenerative Medicine, School of Medicine, Tongji University, Shanghai 200092, China; ^jExperimental Neurology, Philipps University, D-35033 Marburg, Germany; ^kInstitut National de la Santé et de la Recherche Médicale/Le Centre de Psychiatrie et Neurosciences, Unité Mixte de Recherche 894, Faculté de Médecine Pierre et Marie Curie, F-75013 Paris, France; and ^lBiochemistry Laboratory, Hôpital de la Salpêtrière, F-75013 Paris, France

Edited by Fred H. Gage, The Salk Institute, San Diego, CA, and approved February 24, 2011 (received for review December 7, 2010)

Among the pathogenic processes contributing to dopaminergic neuron (DN) death in Parkinson disease (PD), evidence points to non-cell-autonomous mechanisms, particularly chronic inflammation mounted by activated microglia. Yet little is known about endogenous regulatory processes that determine microglial actions in pathological states. We examined the role of glucocorticoid receptors (GRs), activated by glucocorticoids released in response to stress and known to regulate inflammation, in DN survival. Overall GR level was decreased in substantia nigra of PD patients and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-intoxicated mice. GR changes, specifically in the microglia after MPTP treatment, revealed a rapid augmentation in the number of microglia displaying nuclear localization of GR. Mice with selective inactivation of the GR gene in macrophages/microglia (GR^{LYMCre}) but not in DNs (GR^{DATCre}) showed increased loss of DNs after MPTP intoxication. This DN loss in GR^{LYMCre} mice was not prevented by corticosterone treatment, in contrast to the protection observed in control littermates. Moreover, absence of microglial GRs augmented microglial reactivity and led to their persistent activation. Analysis of inflammatory genes revealed an up-regulation of Toll-like receptors (TLRs) by MPTP treatment, particularly TLR9, the level of which was high in postmortem parkinsonian brains. The regulatory control of GR was reflected by higher expression of proinflammatory genes (e.g., TNF- α) with a concomitant decrease in anti-inflammatory genes (e.g., IL-1R2) in GR^{LYMCre} mice. Indeed, in GR^{LYMCre} mice, alterations in phosphorylated NF- κ B levels indicated its protracted activation. Together, our data indicate that GR is important in curtailing microglial reactivity, and its deregulation in PD could lead to sustained inflammation-mediated DN injury.

A major hallmark of Parkinson disease (PD) is the loss of dopaminergic neurons (DNs) of the substantia nigra (SN), which results in severe depletion of striatal dopamine (DA) levels with ensuing cardinal motor symptoms, including resting tremor, rigidity, and bradykinesia (1). The etiology of the sporadic form of PD that accounts for the majority of cases remains unknown. Substantial evidence indicates that among the pathogenic mechanisms conducive to degeneration of DNs is an ongoing chronic inflammatory response mounted by activated microglia and astroglia as well as infiltrating peripheral T cells (2–4). Activated microglia can contribute to neuronal toxicity through secretion of proinflammatory mediators that can increase oxidative stress, directly trigger neuronal cell-death mechanisms, or act to amplify the inflammatory response. In PD, the experimental evidence for

the role of microglia includes postmortem and PET studies that revealed the presence of reactive microglia both in the striatum and in the SN (5), an elevated expression of proinflammatory molecules such as TNF- α , IL-1 β , and IFN- γ , inducible nitric oxide synthase (iNOS), and cyclooxygenase 2 (COX-2) in the affected regions. The deleterious role of these inflammatory mediators on DN survival has been demonstrated in various experimental animal and non-human primate models of PD as well as in vitro mesencephalic cell culture studies using 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) intoxication that selectively destroys DNs (ref. 6 and refs. therein).

The mechanisms that trigger microglial activation and, more importantly, maintain it in a chronically activated state throughout disease progression in PD are poorly known. However, it can be postulated that the extent of DN injury inflicted by a chronic inflammatory reaction is likely to be determined by factors such as the intensity of the immune response as well as the activation of the mechanisms that can resolve it. One endogenous mechanism that is stimulated to restrict and terminate an inflammatory reaction is an activation of the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis that results in a rise in the systemic level of glucocorticoids (GCs), which are produced and released by adrenal glands (7). As well as being released in response to an inflammatory reaction, GCs are released as a response to stress, and, in both cases, they exert their actions mostly through ubiquitously expressed type II glucocorticoid receptors (GRs) (8).

GC-GR responses to neuronal injury are complex, for instance, an excess of GCs (such as occurs in chronic stress) was found to exacerbate neuronal injury in experimental ischemia (9), while an important neuronal survival effect of GR was demonstrated in an acute lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory lesion model (10). Several reports have suggested that the GC-GR responses might be crucially linked to PD pathogenesis. Thus, chronically high levels of GCs were shown to

Author contributions: S.H., M.T.H., F.T., F.C.H., and S.V. designed research; F.R.B., S.H., S.P., J.C.C., L.L., D.A.F., M.A.C.-d.S., F.S., C.C., K.K., A.P., and S.V. performed research; G.H., M.H., and F.T. contributed new reagents/analytic tools; F.R.B., J.C.C., L.L., D.A.F., and S.V. analyzed data; and S.H., F.C.H., and S.V. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

F.R.B. and S.H. contributed equally to this work.

To whom correspondence may be addressed. E-mail: francois.tronche@upmc.fr, etienne.hirsch@upmc.fr, or sheela.vyas@rnv.jussieu.fr.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1017820108/-DCSupplemental.

NEUROSCIENCE

exacerbate motor deficits in 6-hydroxy-DA-treated rats (11). This experimental observation corroborates clinical data showing that stress can trigger or worsen motor symptoms in PD patients (12). The involvement of GC-GR in DN survival after MPTP intoxication was suggested previously in adrenalectomized mice (13) as well as in transgenic mice harboring antisense GR (14). In these experimental approaches, GR activity is compromised in most tissues and therefore do not allow a precise dissection of the molecular actions of GR in cell types involved in PD pathogenesis. Moreover, it remains to be established whether GC-GR activity is altered in PD patients.

In this study, we examined the role of GR in PD both by analyzing the levels of GCs and GR in parkinsonian patients and by using MPTP treatment paradigms in mice that were generated for selective GR gene inactivation either in macrophages/microglia or in DN by Cre/loxP technology. Our results show that GR is modulated in PD and highlight the crucial regulatory actions of GR in microglia for DN survival.

Results

GR and Cortisol Levels Are Modulated in PD and in MPTP-Intoxicated Mice. The level of GR mRNA analyzed by quantitative PCR (qPCR) was lower in SN of parkinsonian patients compared with controls ($P = 0.012$) and, as expected, a reduction in tyrosine hy-

droxylase (TH) mRNA ($P = 0.014$) was also found (Fig. 1A). By contrast, an increase, not statistically significant ($P = 0.14$), in GR mRNA was observed in the putamen of parkinsonian patients (Fig. 1B). Because of the greater availability of striatal postmortem tissue, we were able to analyze GR protein levels in the putamen of parkinsonian patients and control subjects. An increase in GR protein level was found ($P = 0.049$) (Fig. 1C). To examine whether GC levels are modulated in PD, we measured plasma cortisol levels in nine healthy controls and 20 PD patients. Consistent with a previous report (15), our single-time point analysis revealed a twofold higher cortisol level in the PD group (Fig. 1D, $P = 0.00016$). These alterations in cortisol levels do not correlate with disease duration ($P = 0.517$, correlation coefficient $r = -0.154$) or the Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS) score indicative of the severity of motor dysfunction ($P = 0.652$, $r = -0.107$; nonparametric Spearman test) (Table S1). Altogether, data from human patients suggest that GC-GR responses are most likely altered during PD.

To ascertain whether GR levels are similarly affected in the well-established MPTP mouse model of PD, RNAs extracted from SN of C57/BL6 mice killed at different time points (12 h to 21 d) after acute MPTP intoxication were analyzed. A decrease in GR mRNA ($P = 0.027$) was observed at day 21, whereas a diminution in TH mRNA ($P = 0.014$) was already evident after

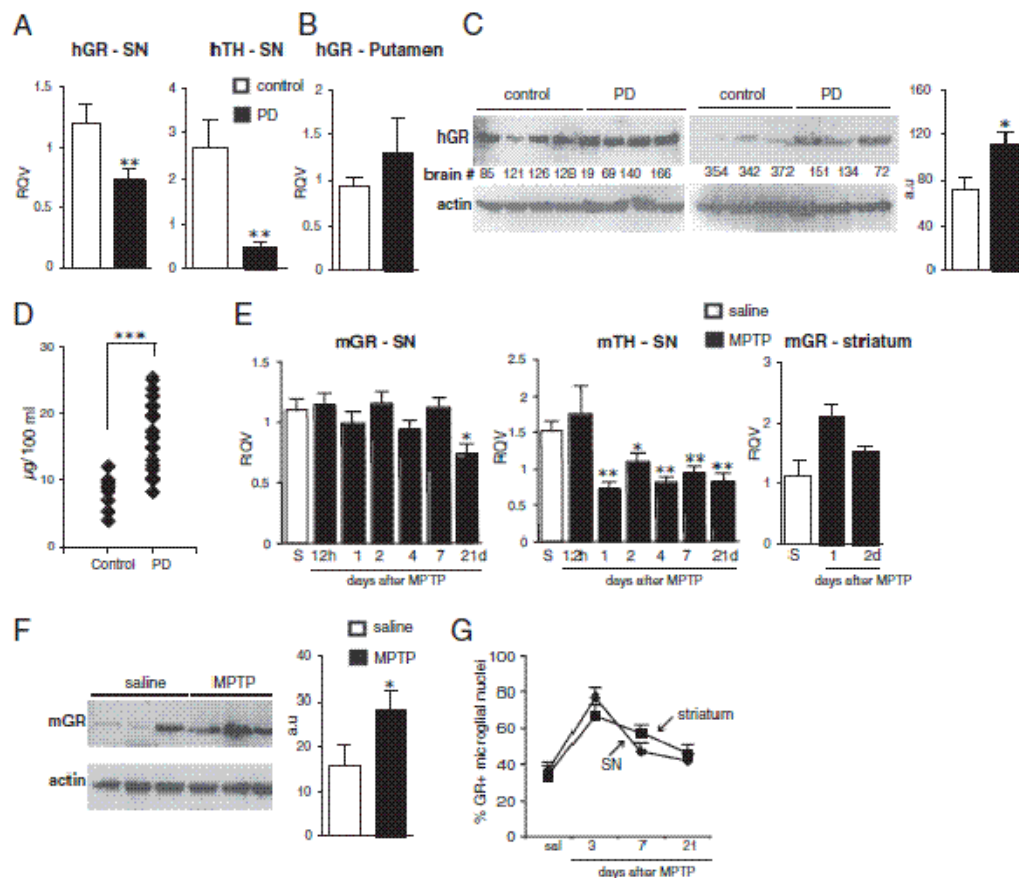


Fig. 1. GR expression in SN and striatum in PD and in MPTP-treated mice. RT-qPCR of human (h) GR and TH mRNA from SN (A) and putamen (B) of control and PD ($n = 5-6$). (C) Western blot analysis of human striatal GR protein of two groups of PD and control subjects. The results were quantified with actin as loading control, a.u., arbitrary units. (D) Plasma cortisol levels of control subjects ($n = 9$) and PD patients ($n = 20$). (E) Time course of mouse (m) GR and TH mRNA levels in SN after saline (S) or acute MPTP treatment. GR mRNA levels in striatum after saline (S) or 1 or 2 d after MPTP treatment. (F) A representative experiment of Western blot analysis of striatal GR protein levels in mice injected with saline (S) or 7 d after MPTP. (G) Percentage of microglia showing nuclear GR localization quantified from confocal images of GR, Iba-1, and DAPI immunofluorescence in SN and striatum of saline control and MPTP-intoxicated mice killed at indicated days. ($n = 3-5$ for saline group, and $n = 4-5$ for each MPTP group.) * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (human control subjects vs. PD; saline vs. MPTP-injected mice, Mann-Whitney test).

1 d (Fig. 1E). Striatal GR mRNA levels showed a tendency to increase after MPTP treatment ($P = 0.077$) and, in line with striatal PD results, an increase ($P = 0.048$) in protein level was seen 7 d after MPTP intoxication (Fig. 1E and F). We next took advantage of this experimental mouse model to examine whether there were intracellular changes occurring in GR, specifically in microglia after MPTP intoxication. Double immunofluorescence labeling of GR and microglial marker Iba-1 was performed on SN and striatal sections from mice either injected with saline or 3, 7, and 21 d after MPTP injections. Although GR labeling was not detected in the cytoplasm of microglia as previously reported (16), it was easily discernible in nuclei. Results of quantification of microglia with nuclear GR staining in SN and striatum revealed a sharp rise 3 d after MPTP treatment that subsequently declined at 7 and 21 d, raising the possibility that nuclear activity of GR is increased in microglia upon MPTP treatment (Fig. 1G). Collectively, our results indicate that MPTP-induced nigrostriatal pathway injury in mouse is associated with significant changes in the GC-GR system. To elucidate precisely the neuronal versus glial role of GR in DN injury, we produced mice by Cre/loxP technology that carried selective inactivation of GR gene either in macrophages ($GR^{LysMCre}$ mice) (17) or in DNs (GR^{DATCre} mice) (18).

Selective Absence of GR in the Microglia of $GR^{LysMCre}$ Mice and Resultant GR Levels After Acute MPTP Treatment. We first verified the efficiency of Cre recombination and microglial specificity of GR gene inactivation in $GR^{LysMCre}$ mice. Although 80–85% of microglial cells were positive for GR in primary cultures prepared from control $GR^{loxP/loxP}$ newborn pup brain cortices, only 15–20% of these cells expressed GR in cultures from $GR^{LysMCre}$ pups (Fig. S1A). This recombination efficiency is similar to that reported in macrophages (70%) (19). Additionally, Western blot analysis revealed an almost complete absence of GR protein in cultured mutant $GR^{LysMCre}$ microglia (Fig. S1B). Finally, although GR was expressed in both TH+ DNs and Iba1+ microglial cells in the SN of control $GR^{loxP/loxP}$ mice, it was almost completely absent in microglia from $GR^{LysMCre}$ mutants (Fig. S1C).

We examined whether the absence of microglial GR impacts the overall levels of GR after nigrostriatal pathway injury (SI Results) and found they were not overtly altered in $GR^{LysMCre}$ mice.

DN Loss Is Inhibited by Microglial GR and Not by GR in DA Neurons After Acute MPTP Treatment. The number of TH-immunoreactive (IR) DNs in SN after saline injections in control $GR^{loxP/loxP}$ and $GR^{LysMCre}$ mice was similar. MPTP triggered a loss of TH-IR neurons in SN of $GR^{loxP/loxP}$ controls ($P < 0.0001$, saline vs. MPTP, post hoc Bonferroni/Dunn test); however, in the $GR^{LysMCre}$ mutants, a greater decrease was observed at all time points ($P = 0.001$, 3 d; $P = 0.0007$, 7 d; $P = 0.001$, 21 d; $GR^{LysMCre}$ mutants vs. controls, post hoc Bonferroni/Dunn test) (Fig. 2A). The analysis of DA nerve terminal parameters in $GR^{LysMCre}$ mutants and controls (SI Results and Fig. S2) showed similar neuropathological aggravation except for delayed diminution in [³H]DA uptake in mutants.

To rule out the possibility that the increased DN loss in mutants was not a result of an altered HPA axis and thus a difference in GC levels, basal corticosterone (CS) plasma levels were measured 1 and 7 d after MPTP treatment. A three- to fourfold rise in CS level after 1 d of MPTP treatment and a decline to pretreatment level at day 7 was of comparable magnitude in $GR^{LysMCre}$ mutant and $GR^{loxP/loxP}$ control mice (Fig. 2B). Also, differences in MPTP metabolism do not contribute to an increased susceptibility of mutant mice because striatal 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) levels were identical between mutants and control animals (Fig. S3A). Finally, the increased DN loss seen in $GR^{LysMCre}$ mutants is unlikely through a direct activating effect of MPP+ on mutant microglia because TNF- α mRNA expression was not induced by treatment of microglial cultures with MPP+, whereas significant induction was found with LPS (Fig. S3B).

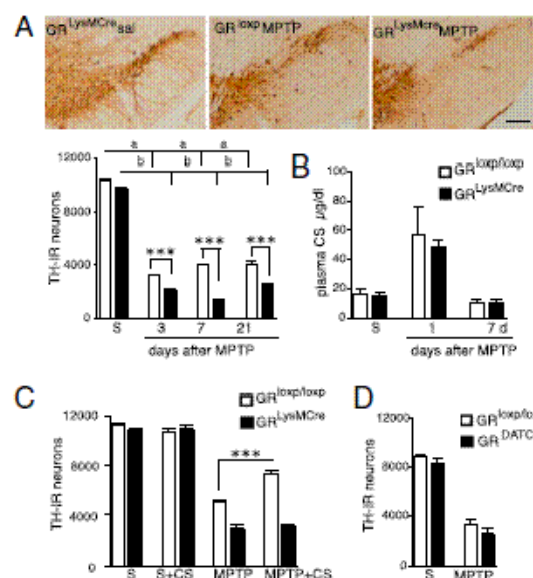


Fig. 2. Microglial GR protects DNs after acute MPTP intoxication. (A) TH immunohistochemistry in SN of $GR^{loxP/loxP}$ and $GR^{LysMCre}$ mice 7 d after either saline (sal) or MPTP treatment. (Bar = 100 μ m.) Quantification of the number of TH-IR neurons in SN shows a significant reduction in $GR^{LysMCre}$ mutants compared with $GR^{loxP/loxP}$ controls after MPTP injections. Two-way ANOVA analysis followed by post hoc Bonferroni/Dunn test showed statistical significance for genotype on MPTP treatment at all time points and significance of $P = 0.01$ with $F = 9.3$, degrees of freedom = 1 at 7 d for genotype \times treatment. a, b = $***P < 0.001$ saline vs. MPTP for $GR^{loxP/loxP}$ and $GR^{LysMCre}$ mice. $***P < 0.001$, $**P < 0.01$ MPTP $GR^{loxP/loxP}$ vs. $GR^{LysMCre}$ MPTP mice. (B) Basal CS levels in saline-injected (S) and MPTP-treated control and mutant mice at times indicated. (C) $GR^{loxP/loxP}$ and $GR^{LysMCre}$ were treated with β -cyclodextrin or CS + β -cyclodextrin for 7 d after saline or acute MPTP intoxication. The results show number of TH-IR neurons in SN. $***P < 0.001$. (D) TH-IR cells in SN in control $GR^{loxP/loxP}$ and GR^{DATCre} mice after saline (S) or MPTP. ($n = 5$ – 7 mice per group and per time point.)

To show functionally that GR activation in microglia protects DNs against MPTP intoxication, $GR^{loxP/loxP}$ and $GR^{LysMCre}$ mice were given CS in drinking water starting immediately after the last saline or MPTP injection until their death 7 d later. Quantification of TH-IR neurons in SN showed that CS treatment has a significant protective effect on DNs in $GR^{loxP/loxP}$ but not $GR^{LysMCre}$ mice (Fig. 2C, $P < 0.0001$, $GR^{loxP/loxP}$ MPTP vs. $GR^{loxP/loxP}$ MPTP + CS mice, post hoc Bonferroni/Dunn test).

DN loss was also analyzed after acute MPTP treatment in mice selectively inactivated for the GR gene in DNs (GR^{DATCre}). The cre recombination and GR inactivation in these mice has been previously reported (18, 20). No significant difference in the number of TH-IR neurons between $GR^{loxP/loxP}$ controls and GR^{DATCre} mice was observed (Fig. 2D).

Overall, our data suggest that CS-stimulated GR nuclear localization and its activity in microglia are critical for maintaining the survival of DNs under PD-like neurodegeneration.

Microglial GR Gene Inactivation Exacerbates both Microglial and Astroglial Reactivity After Acute MPTP Treatment.

To examine whether microglial GRs have a role in determining the magnitude of glial activation after acute MPTP treatment, microglial and astroglial reactivity in striatum and in SN were analyzed by Iba-1 and GFAP staining, respectively. At day 3 after MPTP treatment, Iba-1 labeling revealed hypertrophied activated microglia in both SN and striatum of $GR^{loxP/loxP}$ controls and $GR^{LysMCre}$ mutants and, by day 7, this activation had declined (Fig. S4A). Quantification of hypertrophied microglia at day 3 after MPTP treatment revealed an increase in SN and striatum

of GR^{LysMCre} mutants compared with GR^{loxP/loxP} controls (Fig. S4A, $P = 0.04$). Analysis of microglial soma size in the SN showed that $27.9 \pm 5.0\%$ of activated microglia in GR^{LysMCre} mutants had a surface area $>200 \mu\text{m}^2$ [i.e., a cell body width $>16 \mu\text{m}$, normally hypertrophied cell body being $\approx 16 \mu\text{m}$ (21)] compared with $12.9 \pm 3.8\%$ in GR^{loxP/loxP} control mice ($P = 0.04$; one-way ANOVA). In addition, a significant difference was found in the number of GFAP-IR astrocytes between genotypes after MPTP treatment (Fig. S4B). Quantification of GFAP+ cells at day 7 after MPTP treatment showed a two- and eightfold increase in SN and striatum, respectively, in GR^{LysMCre} mutants compared with GR^{loxP/loxP} controls. This result is in concordance with increased GFAP protein levels at day 7 in the striatum, which remained high at day 21 in mutants (Fig. S4C).

Subchronic MPTP Treatment in GR^{LysMCre} Mutants Leads to an Increased DN Vulnerability Associated with Sustained Activation of Microglia. The substantial loss of nigral TH-IR neurons in the acute MPTP paradigm is known to be, at least in part, attributable to a strong activation of microglia (22). By contrast, the evidence for a similar microglial activation and its putative role in inducing DN death after moderate subchronic MPTP intoxication death is less well documented (19, 23). We therefore examined microglial GR activity in a subchronic MPTP paradigm. Analysis of nigral TH-IR neurons 7 d after the last MPTP injection showed a significant diminution in GR^{LysMCre} mutants compared with GR^{loxP/loxP} controls ($P = 0.0019$, post hoc Bonferroni/Dunn test). Moreover, this decrease in DN was sustained, as revealed by the analysis of mice 10 wk after the last MPTP injection ($P = 0.0012$, GR^{loxP/loxP} MPTP vs. GR^{LysMCre} MPTP mice) (Fig. 3A). Analysis of striatal levels of DA, its metabolites, and other monoamines 7 d after MPTP treatment showed a decrease in DA in GR^{LysMCre} mutants compared with GR^{loxP/loxP} controls ($P = 0.049$) (Fig. 3B) and a small increase in the dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC)/DA ratio (0.366 in mutants vs. 0.255 in controls).

Strikingly, 7 d after the last MPTP injection, a threefold increase in the number of Iba-1-positive hypertrophied microglia was found in GR^{LysMCre} mutants in both the striatum and SN. This activation was sustained in both regions even at 10 wk after MPTP treatment (Fig. 3C). In GR^{loxP/loxP} controls, microglial activation in the SN and striatum was negligible at day 7 but slightly increased in the SN at 10 wk postintoxication. In contrast to the results showing a strong astroglial response in mutants after acute MPTP treatment, no difference in the number of GFAP+ astrocytes was found either in SN or striatum between controls and GR^{LysMCre} mutants 7 d after subchronic MPTP injections (Fig. 3D). At 10 wk, the number of GFAP+ astrocytes in the SN was also similar in controls and mutants; however, GFAP+ astrocytes were absent in the striatum.

Levels of Pro- and Anti-Inflammatory Genes and Upstream Activators of Innate Immunity Are Modulated by Microglial GR After MPTP-Induced DN Injury. GR regulates the expression of a wide variety of inflammatory mediators and does so in part by restraining the transcriptional activation potential of NF- κ B, activator protein 1 (AP-1), or IFN regulatory factor (IRF) (24). To gain insight into the identity of genes modulated by microglial GR in response to MPTP-triggered neurotoxicity, the nigral and striatal expressions of different classes of inflammatory genes were analyzed by RT-qPCR and compared between GR^{loxP/loxP} control and GR^{LysMCre} mutant mice (Fig. S6A–C). Additionally, changes in the expression of these genes resulting from MPTP intoxication relative to saline treatment in GR^{loxP/loxP} control mice were also examined (SI Results and Fig. S5). Overall, our data indicate that absence of microglial GR results in higher expression of proinflammatory factors [e.g., TNF- α and intracellular adhesion molecule 1 (ICAM-1)] concomitantly with lower expression of anti-inflammatory mediators [e.g., IL-1R2 and MAPK phosphatase 1 (MKP-1)] in the injured mesencephalon after MPTP exposure.

We observed an increased expression of procaspase-1 ($\times 2$) and procaspase-4 ($\times 1.8$) only in the SN in GR^{LysMCre} mutants relative to GR^{loxP/loxP} controls 48 h after MPTP intoxication,

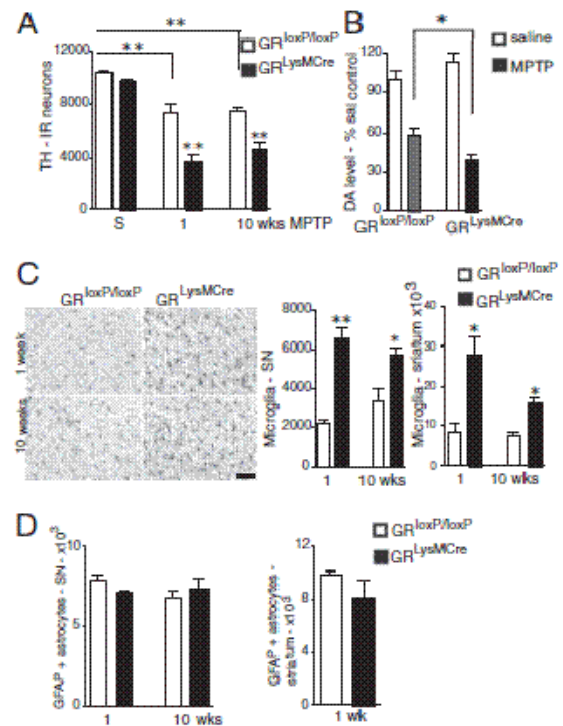


Fig. 3. Absence of GR increases loss of TH-IR neurons in SN and chronically activates microglia in GR^{LysMCre} mutant mice after subchronic MPTP treatment. (A) Quantification of TH-IR neurons in SN of saline (S) or subchronically MPTP-intoxicated control GR^{loxP/loxP} and GR^{LysMCre} mutant mice, 1 wk or 10 wk after last injection. Two-way ANOVA followed by post hoc Bonferroni/Dunn test showed genotype \times MPTP treatment effect: $P = 0.02$, $F = 0.47$, degrees of freedom = 2 ($n = 4$ –5). (B) DA levels 1 wk after MPTP or saline injections. The results are calculated as percentage change from values obtained in corresponding saline-injected mice. (C) Immunohistochemistry with anti-Iba-1 antibody in SN 1 and 10 wk after MPTP treatment shows strong microglial activation in the GR^{LysMCre} mutants. (Bar = 50 μm). The hypertrophied Iba1+ cells were quantified both in SN and striatum; the activation persists in GR^{LysMCre} mutants at 10 wk. (D) Quantification of GFAP+ astrocytes in the SN and striatum show no difference between GR^{loxP/loxP} control and GR^{LysMCre} mutants. Note that GFAP+ cells are absent in striatum in controls and mutants 10 wk after MPTP treatment. * $P < 0.05$ ($n = 5$).

indicating that GR controls their expression (Fig. 4A). Toll-like receptors (TLRs) were the other major class of core innate-immunity components examined because GR is known to regulate the expression of some family members (25). MPTP treatment itself resulted in a strong induction of several TLRs (TLR3, TLR4, TLR7, and TLR9) and MyD88, a key adaptor in the TLR signaling pathway (Fig. S5). The levels of TLR3, TLR4, TLR9, and MyD88 in GR^{LysMCre} mutant mice showed a further up-regulation, in the SN, 48 h after MPTP treatment (Fig. 4A). These results indicate that microglial GRs regulate important upstream activators of innate immunity during DN injury.

To test the relevance of these findings to PD, we examined TLR9 expression in human striatal homogenates. Our results showed a dramatic two- to threefold increase in TLR9 level in striatal lysates from PD patients compared with control subjects (Fig. 4B). Moreover, a significant increase in TLR9 level in the striatum was also seen in MPTP-treated GR^{loxP/loxP} and GR^{LysMCre} mice (Fig. 4C), suggesting that glial cells trigger an innate immune response upon stimulation by endogenous signals produced by degenerating DA nerve terminals.

Absence of Microglial GR Alters NF- κ B Activity. To gain insights into the mechanistic actions of microglial GR, we examined its effect

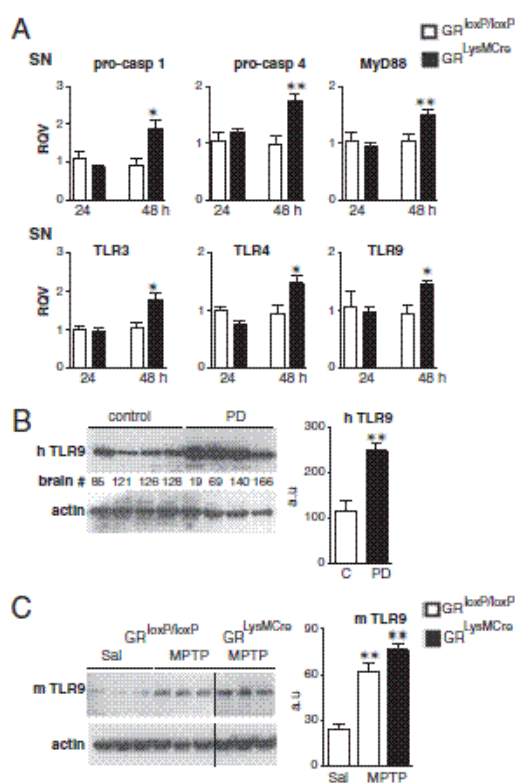


Fig. 4. GR regulation of upstream activators of innate immune response and relevance to PD. (A) qPCR results show up-regulation in the mRNA levels in SN of proinflammatory caspases and TLRs in GR^{lysMCre} mutant mice compared with controls after MPTP. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, MPTP-treated GR^{loxP/loxP} vs. GR^{lysMCre} mice ($n = 4$). (B) TLR9 protein levels in striatum of human control subjects (C) and parkinsonian patients (PD). ** $P < 0.01$, control subjects vs. PD ($n = 5$). (C) A representative Western blot experiment showing striatal protein levels of TLR9 in GR^{loxP/loxP} control and GR^{lysMCre} mutant mice 7 d after either saline (sal) or acute MPTP treatment. The signals were quantified in relation to actin. ** $P < 0.01$, saline vs. MPTP treatment ($n = 5$).

on NF- κ B because GR negatively regulates NF- κ B-induced expression of proinflammatory genes like TNF- α , iNOS, and ICAM, which are also up-regulated in PD. We observed that GR immunoprecipitated from nuclear extracts of microglia cells is associated with p65 NF- κ B (Fig. S7A). To show that NF- κ B transcriptional activity in microglia is regulated by GR activation, primary microglia prepared from control and GR^{lysMCre} pups were transiently transfected with pGL4.3luc2p/NF- κ B-RE vector comprising the luciferase reporter gene under the control of κ B enhancer elements. Measurement of luciferase activity after LPS or LPS plus dexamethasone treatment in these cells showed that dexamethasone inhibits luciferase activity in control but not in mutant microglia ($P = 0.033$; Fig. S7B).

To test the possibility that microglial GR inactivation results in sustained NF- κ B transcriptional function, we analyzed the phosphorylated NF- κ B levels. p65 NF- κ B phosphorylation at Ser²⁷⁶ is associated with induction of proinflammatory genes (26). The results showed that in both GR^{loxP/loxP} and GR^{lysMCre} microglial cell cultures, LPS treatment induces phospho-Ser²⁷⁶ p65 and phospho-Ser³³⁷ p105 NF- κ B levels (Fig. S7C). However, in the dexamethasone pretreatment condition, the magnitude of reduction of these phosphorylated subunits was greater in GR^{loxP/loxP} control compared with mutant cultures. (Fig. S7C). At 2 d after MPTP intoxication, phospho-Ser²⁷⁶ p65 and phospho-Ser³³⁷ p105 NF- κ B levels were higher in SN and striatum of GR^{lysMCre} mice than in controls (Fig. S7D). Next, we investigated the Ser⁵³⁶-phosphory-

lated p65 NF- κ B. In macrophages, Ser⁵³⁶ phosphorylation by IKK α has been evoked in the clearance of p65 NF- κ B from inflammatory target gene promoters (27). In vitro, we observed a strong induction of phospho-Ser⁵³⁶ p65 NF- κ B upon LPS exposure of GR^{loxP/loxP} but not GR^{lysMCre} microglia (Fig. S7C). This induction was not observed in dexamethasone-pretreated GR^{loxP/loxP} microglia cultures, indicating that it is sensitive to GR. Interestingly, the level of phospho-Ser⁵³⁶ was reduced in GR^{lysMCre} compared with GR^{loxP/loxP} mice after MPTP intoxication (Fig. S7D). Thus, mechanisms involved in the resolution of NF- κ B activation at target genes are compromised in the absence of microglial GR.

Discussion

In this study, we appraised the role of GC-GR in DN degeneration in PD. Overall GR transcript level was lower in the SN of PD patients compared with control subjects. Our data obtained in humans revealed twofold higher cortisol levels in PD patients compared with control subjects. Although our study is limited because plasma cortisol levels were analyzed at one single time point, which obviously cannot reflect 24-h cortisol status, a study by Hartmann et al. (15) on the 24-h cortisol secretory pattern also showed a significantly high overall cortisol concentration in PD patients and, interestingly, a diminution of the normal diurnal changes. Because chronically high levels of GCs are known to compromise immune functions, in part by downregulating GR (28), we have studied the consequences of GR inactivation for the survival of DNs by using mouse models in which GR is specifically ablated in microglia or in DNs.

In the absence of microglial GR (GR^{lysMCre} mice), DN loss in the SN was significantly higher after both acute and subchronic MPTP intoxication compared with control mice. In contrast, MPTP-induced nigrostriatal pathway injury was not affected by GR ablation in DNs. The increased cell death of DNs observed in GR^{lysMCre} mutants was also correlated with reductions in DA uptake and DA levels in the striatum. The exacerbation of neuropathological parameters in GR^{lysMCre} mutants are not linked to altered MPTP metabolism, HPA axis, or receptiveness of mutant microglial cells to MPP⁺. Therefore, we suggest that microglial GR is a key determinant of DN survival. Additional evidence supporting this view is our finding that, although CS treatment immediately after acute MPTP intoxication significantly protected nigral DNs of GR^{loxP/loxP} control mice, it was ineffective in the GR^{lysMCre} mutants. Although we observed a significant increase in the number of microglia displaying nuclear localization of GR after MPTP, suggesting stimulation of transcriptional control of GR, the results of CS treatment underscore the point that endogenous CS rise after MPTP treatment is probably not of sufficient magnitude or rapid enough to enable GR to suppress microglial neurotoxicity.

GRs were found to regulate the magnitude of microglial activation. Thus, 3 d after acute MPTP intoxication, the number and size of hypertrophied microglia, particularly in the SN of GR^{lysMCre} mutants, was augmented compared with controls. However, by day 7, this activation had declined (in mutants and controls), an observation in accordance with past studies (22). Our work on GR extends the findings reported by Sugama et al. (13) on the time course of exacerbation of microglial activation in adrenalectomized mice acutely intoxicated with MPTP. They also showed that CS treatment suppressed this activation and in parallel increased DN survival. Yet the short duration of activation by acute MPTP toxicity does not mirror the known chronic inflammatory response described in PD and in MPTP-intoxicated monkeys (6). Strikingly, however, our results obtained with the subchronic MPTP paradigm, in which overall MPTP toxicity is moderate, revealed significant microglial activation in the SN and striatum in GR^{lysMCre} mice 7 d after treatment, with almost negligible activation in GR^{loxP/loxP} controls. Importantly, this activation was still present at 10 wk, suggesting that it was chronic in nature. LPS injections in the nigral area have demonstrated that DN survival is particularly sensitive to the activation state of microglia. It is therefore conceivable that the actions of GR in regulating microglial activation in response to environmental

changes around DN are vital. The importance of controlling the magnitude of microglial activation during DN injury was also illustrated in mice lacking the myeloid-specific chemokine receptor CX3CR1 and work on nuclear hormone receptor Nurr1 (29, 30).

Molecular analysis of gene levels of potent proinflammatory mediators after acute MPTP treatment revealed a clear increase in TNF- α mRNA as well as comparatively smaller increases in iNOS and pro-IL-1 β mRNA in the GR^{LysMCre} mutants. Interestingly, significant up-regulation of IL-1R2 and MKP-1 expression was observed after MPTP treatment in control mice, indicating that there is a tight control of proinflammatory reaction. By contrast, their levels were lower in GR^{LysMCre} mutants, suggesting that the gene induction action of GR is equally as important as its transrepressive action. MPTP treatment led to strong stimulation of genes coding for upstream core components of innate immunity, particularly TLR9, TLR3, TLR4, MyD88, and procaspase-1, indicating that they are involved in cross-talk between microglia and injured DA neurons. TLRs most likely play a role in PD because a strong up-regulation of TLR9 levels was observed in the striatum of PD patients. In MPTP-treated GR^{LysMCre} mutant mice, there was further up-regulation in SN of procaspases-1 and -4, TLR3, TLR4, TLR9, and the adaptor protein MyD88, suggesting that they are targets of microglial GR and have a role in sustaining a positive feed-forward proinflammatory process that is likely to be deleterious for DNs or for crucial steps of phagocytic process of dying DNs.

Our results linking neuroinflammation in PD pathogenesis and the mechanistic actions of GR reveal that GR associates with the p65 subunit of NF- κ B in microglial nuclei and regulates the transactivation potential of NF- κ B. Selective inhibition of NF- κ B activity was found to inhibit glial-associated neuroinflammation and DN loss in MPTP-treated mice (31); thus, NF- κ B may be crucially involved in PD-associated neurodegeneration. Phosphorylation of Ser²⁷⁶ p65 NF- κ B is essential for NF- κ B oligomerization and DNA binding at promoter regions of inflammatory genes (26). Conversely, phosphorylation of Ser⁵³⁶ p65 NF- κ B by IKK α was shown to be required for NF- κ B turnover in macrophagic nuclei (27). Thus, our results in MPTP-treated mice showing increased phospho-Ser²⁷⁶ p65 NF- κ B levels in the absence of microglial GR indicate

prolongation of NF- κ B transcriptional activity. Also, down-regulation of phospho-Ser⁵³⁶ p65 NF- κ B in the absence of microglial GR suggests that termination of NF- κ B activity is compromised in mutant microglial cells. Collectively, our data strongly suggest that GR-dependent regulation of NF- κ B activity in microglial cells plays a key role in determining the intensity, pattern, and chronicity of inflammatory processes in the lesioned nigrostriatal pathway, which consequently influence the neurodegenerative outcome.

In conclusion, our results show that the GC-GR system is modulated in PD and that this may adversely affect DN survival. GR dysfunction in PD may result in a chronic inflammatory reaction, and further in-depth work on its glial actions might open innovative therapeutic perspectives.

Materials and Methods

All methods used in this article are routinely used in our laboratories except for the production of the mice, which are referenced (8, 24) and described in detail in *SI Materials and Methods*.

GR^{LysMCre} and GR^{DATCre} Mice and Genotyping. The GR^{LysMCre} mouse line was produced by crossing *Nr3c1^{loxP/loxP}* (designated GR^{loxP/loxP}) mice with *LysMCre* mice (17, 32). Mice were backcrossed to 10 generations on C57/BL6 background at the start of experiments. The 2- to 4-mo-old male GR^{LysMCre} and GR^{loxP/loxP} mice used were generated by crossing male GR^{LysMCre} mice with female GR^{loxP/loxP}. Generation of DATCre (Tg BAC-DATCre) and GR^{DATCre} mice is described in Turiault et al. (20) and Ambroggi et al. (18). The animals were genotyped for the presence of *Gr* transgene either by dot blot or PCR analysis.

ACKNOWLEDGMENTS. We are grateful to C. Lobsiger, S. O'Regan, and S. Rivaud for helpful comments. This work was supported by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Centre National de la Recherche Scientifique, Université Pierre et Marie Curie, Direction de l'Hospitalisation et de l'Organisation des Soins (J.-C.C.), European Economic Community Grant LSHM-CT-2006-037378 (to F.T.), Association France Parkinson (S.V.), and Fondation de France (S.V.). F.R.B. had a short-term European Molecular Biology Organization fellowship, a studentship from the Spanish Ministry of Science and Innovation (BECA FPI BES-2005-8437), and Fundación Séneca (PI-05662). G.H. and D.A.-F. acknowledge support from the German Ministry of Education and Research (NGFNplus 01GS08136-4).

- Dauer W, Przedborski S (2003) Parkinson's disease: Mechanisms and models. *Neuron* 39:889-909.
- McGeer PL, Itagaki S, Akiyama H, McGeer EG (1988) Rate of cell death in parkinsonism indicates active neuropathological process. *Ann Neurol* 24:574-576.
- Kurkowska-Jastrzebska I, Wrońska A, Kohutnicka M, Członkowska A, Członkowska A (1999) The inflammatory reaction following 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine intoxication in mouse. *Exp Neurol* 156:50-61.
- Benner EJ, et al. (2008) Nitrated α -synuclein immunity accelerates degeneration of nigral dopaminergic neurons. *PLoS ONE* 3:e1376.
- Ouchi Y, et al. (2005) Microglial activation and dopamine terminal loss in early Parkinson's disease. *Ann Neurol* 57:168-175.
- Hirsch EC, Hunot S (2009) Neuroinflammation in Parkinson's disease: A target for neuroprotection? *Lancet Neurol* 8:382-397.
- Clark AR (2007) Anti-inflammatory functions of glucocorticoid-induced genes. *Mol Cell Endocrinol* 275:79-97.
- De Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Joëls M (1998) Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr Rev* 19:269-301.
- Sorrells SF, Casó JR, Munhoz CD, Sapolsky RM (2009) The stressed CNS: When glucocorticoids aggravate inflammation. *Neuron* 64:33-39.
- Nadeau S, Rivest S (2003) Glucocorticoids play a fundamental role in protecting the brain during innate immune response. *J Neurosci* 23:5536-5544.
- Smith LK, Jadavji NM, Colwell KL, Katrina Perchudoff S, Metz GA (2008) Stress accelerates neural degeneration and exaggerates motor symptoms in a rat model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci* 27:2133-2146.
- Smith AD, Castro SL, Zigmund MJ (2002) Stress-induced Parkinson's disease: A working hypothesis. *Physiol Behav* 77:527-531.
- Sugama S, Takenouchi T, Kitani H, Fujita M, Hashimoto M (2009) Microglial activation is inhibited by corticosterone in dopaminergic neurodegeneration. *J Neuroinflammation* 208:104-114.
- Morale MC, et al. (2004) Glucocorticoid receptor deficiency increases vulnerability of the nigrostriatal dopaminergic system: Critical role of glial nitric oxide. *FASEB J* 18:164-166.
- Hartmann A, Veldhuis JD, Deuschle M, Standhardt H, Heuser I (1997) Twenty-four hour cortisol release profiles in patients with Alzheimer's and Parkinson's disease compared to normal controls: Ultradian secretory pulsatility and diurnal variation. *Neurobiol Aging* 18:285-289.
- Sierra A, Gottfried-Blackmore A, Milner TA, McEwen BS, Bullock K (2008) Steroid hormone receptor expression and function in microglia. *Glia* 56:659-674.
- Tuckermann JP, et al. (2007) Macrophages and neutrophils are the targets for immune suppression by glucocorticoids in contact allergy. *J Clin Invest* 117:1381-1390.
- Ambroggi F, et al. (2009) Stress and addiction: Glucocorticoid receptor in dopamine neurons facilitates cocaine seeking. *Nat Neurosci* 12:247-249.
- Mount MP, et al. (2007) Involvement of interferon- γ in microglial-mediated loss of dopaminergic neurons. *J Neurosci* 27:3328-3337.
- Turiault M, et al. (2007) Analysis of dopamine transporter gene expression pattern—Generation of DAT-1Cre transgenic mice. *FEBS J* 274:3568-3577.
- Glenn JA, Ward SA, Stone CR, Booth PL, Thomas WE (1992) Characterisation of ramified microglial cells: Detailed morphology, morphological plasticity and proliferative capability. *J Anat* 180:109-118.
- Liberatore GT, et al. (1999) Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease. *Nat Med* 5:1403-1409.
- Alvarez-Fischer D, et al. (2008) Modeling Parkinson-like neurodegeneration via osmotic minipump delivery of MPTP and probenecid. *J Neurochem* 107:701-711.
- Ogawa S, et al. (2005) Molecular determinants of cross-talk between nuclear receptors and toll-like receptors. *Cell* 122:707-721.
- Chinenov Y, Rogatsky I (2007) Glucocorticoids and the innate immune system: Crosstalk with the toll-like receptor signaling network. *Mol Cell Endocrinol* 275:30-42.
- Chen LF, Greene WC (2004) Shaping the nuclear action of NF- κ B. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:392-401.
- Lawrence T, Bebbien M, Liu GY, Nizet V, Karin M (2005) IKK α limits macrophage NF- κ B activation and contributes to the resolution of inflammation. *Nature* 434:1138-1143.
- Pace TW, Hu F, Miller AH (2007) Cytokine effects on glucocorticoid receptor function: Relevance to glucocorticoid resistance and the pathophysiology and treatment of major depression. *Brain Behav Immun* 21:9-19.
- Cardona AE, et al. (2006) Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nat Neurosci* 9:917-924.
- Saïjo K, et al. (2009) A Nurr1/CoREST pathway in microglia and astrocytes protects dopaminergic neurons from inflammation-induced death. *Cell* 137:47-59.
- Ghosh A, et al. (2007) Selective inhibition of NF- κ B activation prevents dopaminergic neuronal loss in a mouse model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:18754-18759.
- Clausen BE, Burkhardt C, Reith W, Renkawitz R, Förster I (1999) Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using *LysMcre* mice. *Transgenic Res* 8:265-277.

ANEXO 2**CCL2-expressing astrocytes mediate the extravasation of T lymphocytes in the brain. Evidence from patients with glioma and experimental models in vivo**

Maria Angeles Carrillo de Sauvage^{1,2}, Aurora Gómez^{1,2*}, Carmen María Ros^{1,2}, Francisco Ros-Bernal^{1,2}, Ana Perez-Vallés⁴ MD, José M. Gallego-Sanchez³, Emiliano Fernández-Villalba MD, PhD^{1,2}, Carlos Barcia Sr, MD, PhD³, Carlos Barcia Jr PhD^{1,2}, María-Trinidad Herrero MD, PhD^{1,2}

¹Clinical and Experimental Neuroscience, ²Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), School of Medicine, University of Murcia, Campus de Espinardo, 30071, Murcia, Spain.

³Department of Neurosurgery, ⁴Department of Pathology, Hospital General Universitario de Valencia, 46014, Valencia, Spain.

Running head: Astrocytes mediate T-cell infiltration

Key Words: Astrocyte, CCL2, T-Cell, glioma, Neuroinflammation

Corresponding Author:

María-Trinidad Herrero, MD, PhD

Clinical and Experimental Neuroscience and Centro de Investigación Biomedica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), School of Medicine, University of Murcia, Campus de Espinardo, 30071 Murcia, Spain.

Tel. +34 868 88 46 83

Fax. +34 868 88 41 50

mtherrer@um.es

Characters in the Title: **150**

Characters in the running head: **34**

Number of words:

Abstract: **100**

Text body: **2,324**

Number of Figures: **2**

Number of References: **15**

* María Angeles Carrillo de Sauvage and Aurora Gómez contributed equally to this work.

Abstract

CCL2 is a chemokine involved in brain inflammation, but the way in which it contributes to the entrance of lymphocytes in the parenchyma is unclear. Imaging of the cell type responsible for this task and details on how the process takes place in vivo remain elusive. Herein, we analyze the cell type that overexpresses CCL2 in multiple scenarios of T-cell infiltration in the brain and in three different species. We observe that CCL2⁺ astrocytes mediate the infiltration of T-cells in the brain and our analysis shows that the contact of T-cells with perivascular astrocytes may be crucial for lymphocyte extravasation.

Introduction

Lymphocyte infiltration is an important phenomenon in the inflammatory response and is an event involved in many degenerative scenarios of the CNS. Many brain tissue diseases, such as brain tumors and viral or bacterial infections, among many others, show infiltrated T cell subsets. The effect of such T cell infiltration may vary in different CNS diseases, but controlling the entrance of blood cells may have important clinical and therapeutic implications. The phenomenon of extravasation is regulated by a cascade of molecular events that involves the adhesion of lymphocytes to the endothelium following their migration into tissue [1,2,3]. Selectin-mediated interactions cause lymphocytes to roll over the endothelial cells, at the same time coming into contact different factors. The adhesion molecules involved in the recruitment of lymphocytes into the tissue (such as ICAM-1, VCAM or LFA-1) are well defined but less is known about the factors that trigger the adhesion and direct the extravasation. It has been proposed that chemokines or chemoattractive cytokines trigger the adhesion and migration of lymphocytes either as soluble chemoattractants or as immobilized molecules bound to proteoglycans of the endothelial surface [4]. CCL2 (formerly MCP-1) is one of the most important chemokines involved in the recruitment of blood cells, especially macrophages [5], into the tissues but less is known about its effect on T lymphocytes. Significantly, CCL2 induces the formation of the uropod in T cells [1], a cellular formation crucial for the cell's entrance into the parenchyma. However, identification of the brain cells in charge of this phase of extravasation in the CNS and data on how the process takes place remain elusive. In the present work we analyze the cellular expression

of CCL2 in three independent scenarios of T cell infiltration in the brain in vivo. We observe that the perivascular astrocytes highly express CCL2, independently of the species and the inflammatory situation, anatomically facilitating the entrance of lymphocytes into the brain. CCL2-expressing astrocytes are specifically localized in the T cell-infiltration areas independently of the inflammatory scenario. Importantly, blocking CCL2 attenuates the penetration of T cell infiltration in the brain, while physical contact between T cells and CCL2⁺ astrocytes seems to be crucial for lymphocyte internalization.

Material and Methods

Patients and Samples

Fourteen patients from the General Hospital of Valencia (Spain) were diagnosed with glioma of different degrees and were cited for intracranial surgery. The fourteen cases showed the typical features of astrocytoma, with the classic clinical evolution, neuroimaging, spectroscopy, and anatomopathological examination. The study was carried out according to the approved protocols of all the institutions involved (General Hospital of Valencia and University of Murcia). The approval from the IRB of the University of Murcia was received regarding the project (RYC-2010-06729) and a written informed consent was obtained from all participants involved in the study (General Hospital Permits # 07B0002707-09B0010238; University of Murcia Project ID: RYC-2010-06729). The brain tumors presented characteristic glioma morphology. Tumors were excised and processed with a previously published protocol [6].

Adenovirally injected monkeys

All primate samples were collected for previously published studies [7]. In the present work, we analyzed the brain tissue sections from seven adult (either male or female) cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) (5 kg body weight) that were processed in preceding studies [7]. Briefly, the animals were injected bilaterally with 1×10^7 infective units of Ad-mCMV- β gal adenovirus (Kindly provided by Dr. P.R. Lowenstein and Dr. M.G. Castro) in six brain coordinates, including cortex and white matter and the tissue was processed as described previously [7]. The referenced study was

carried out according to the approved protocols of the University of Murcia (Project ID: FEDER FD1/97-1931) and all the experiments were conducted in accordance with the Guidelines of the European Convention for the protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other scientific purposes of the Council of Europe of 2006, the Helsinki Declaration, the International Primatological Society Guidelines and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Guide, revised 1996).

Mice

Twenty-one adult male C57BL6 mice were used to test the role of CCL2 in the infiltration of lymphocytes in the brain. For this purpose the CCL2 action was blocked using a goat anti-mouse CCL2 neutralizing antibody (R&D Systems). On day 0, mice were anesthetized using ketamine (50 mg/kg) and medetomidine (1 mg/kg) and either 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ of LPS (n=14) or saline (n=7) in 1 μl of volume was injected into the right striatum as previously described [8]. Four days were allowed to pass waiting for the immune response to be stimulated, after which time the animals were treated daily with an intraperitoneal injection of either 20 μg of a goat anti-mouse CCL2 neutralizing antibody (R&D Systems) (n=7) or goat serum as isotype (n=7) for 5 days until sacrifice on day 7, at the peak of the potential T cell response as has been previously described [9]. Mice were anesthetized with an overdose of ketamine/xylazine for perfusion-fixation (with PBS followed by 4% PFA). Brain tissue was then removed and post-fixed in PFA for 48 hours. The study was carried out according to the approved protocols of the University of Murcia (Project ID: FIS/PI10/02827). All the experiments were conducted in accordance with the Guidelines of the European Convention for the protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other scientific purposes of the Council of Europe of 2006, the Helsinki Declaration and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Guide, revised 1996).

Immunocytochemical procedures.

Brain tumor sections (60 μm) were cut serially through the entire sample, and immunofluorescence or diaminobenzidine (DAB) detection was performed as described previously [6]. Coronal monkey brain

sections (50 μm) were cut serially through the entire brain, and DAB detection or immunofluorescence was performed as described previously [7]. For human or monkey tissue the following primary antibodies were used: anti-human CCL2 (MCP-1) (1:40, mouse IgG2b; R&D), anti-human CD3 (1:100, Rabbit; Dako), anti-human CD20 (1:500, mouse, IgG2a; Dako), anti-GFAP (1:500, Rabbit; Chemicon), anti LFA-1 (1:50, Rabbit; Abcam), anti-human ICAM-1 (1:100, Mouse, IgG1; Sigma-Aldrich), and anti-human VCAM-1 (1:50, mouse, IgG1k; Dako). Mouse brains was sectioned in 30 μm serial sections using a vibratome (Leica), and were stained for immunofluorescence or DAB detection using previously published protocols [8]. The following antibodies were used: anti-mouse CCL2 (1:200, Rabbit, Serotec), anti-mouse CD4 (1:750, Rat; Serotec), anti- mouse CD8 (1:750, Rat; Serotec), and anti-GFAP (1:500; mouse, Chemicon, Millipore).

Quantification and sterological analysis.

The number of labeled cells was quantified as previously described [10]. The area of CD4 and CD8 lymphocyte infiltration in mouse striatum was analyzed using image-J software. Results were expressed as the mean \pm SEM.

Confocal imaging.

Brain sections from human biopsies, monkey and mouse brain were examined by confocal microscopy as described previously [7].

Results

All biopsies of patients with glioma presented high expression of CCL2 in tumorigenic areas (**Figure 1A**). Importantly, all the cases studied showed CCL2 immunoreactive cells, while the shape of the areas of immunoreactivity differed according to the structure of the tumor (**Figure 1A, images 1-24**). Areas far from the tumorigenic center, putatively healthy tissue, did not show CCL2 immunoreactivity (**Figure 1A, image 3**) and a gradient of immunoreactivity from non tumorigenic to tumorigenic areas could be clearly seen in most cases (**Figure 1A, image 10**). CCL2 was especially high around blood vessels' lumen (**Figure 1A, images 16-19**) and single cells showed star shape structures (**Figure 1A, images 20-24**) similar to astrocyte-specific GFAP staining (**Figure 1B**). Blood vessels, inside and

close to tumorigenic areas, strongly expressed CCL2, but did not do so outside the tumorigenic areas (Figure 1C). Importantly, confocal co-localization analysis revealed that astrocytes were the CCL2-expressing cells in the tumor area (Figure 2A).

These CCL2⁺ areas were seen to present the specific infiltration of CD3⁺ T cells in brain tumors (Figure 2B). However, in order to understand the role of CCL2 in the specific extravasation of CD3⁺ lymphocytes, the correlation between the number of tumor infiltrating CD3⁺ T cells and the number of expressing CCL2 cells in the glioma samples was calculated. Importantly, we divided the T cells into two different populations: T cells inside the blood vessel lumen and those that were extravasated. Interestingly, we found that the amount of T cells circulating in the blood vessel lumen was independent of CCL2 expression and no correlation was observed (Figure 2C). Conversely, a significant correlation was seen between the expression of CCL2 and the infiltration of T cells in the tumorigenic parenchyma (Figure 2C), suggesting that the presence of CCL2⁺ cells is crucial for the extravasation of lymphocytes and not for the chemotaxis induced in the blood circulation.

To investigate the role and cell type of CCL2 in other inflammatory scenarios two animal experimental models of inflammation and T cell infiltration were studied, first using brain tissue from monkeys that had been infected stereotactically in the cerebral cortex with artificially engineered adenoviral vectors. Previous published analyses have shown that adenoviral injections in the CNS elicit a specific infiltration of lymphocytes restricted to the injection areas [7]. We analyzed the presence of lymphocytes in the areas of injection, which were seen to express ICAM-1, VCAM and LFA-1 (Supplementary figures 1, 2 and 3). Moreover, these areas of viral injection showed a particular expression of CCL2 limited to the injection area (Figure 3A). Importantly, confocal analysis of the infiltrated areas showed highly immunoreactive CCL2-expressing cells around blood vessels that were not present in intact (non-injected) areas (Figure 3B). In addition, detailed analysis of the virally injected areas demonstrated co-localization of CCL2⁺ and GFAP⁺ cells (Figure 3C).

In order to understand the functionality of CCL2 we induced lymphocyte infiltration into the brain with the stereotaxic injection of LPS in the cortex and striatum of mice. The specific infiltration of

CD8 and CD4 T cells in the brain after LPS was observed concomitantly with an increase in CCL2 expression in the injection areas (**Supplementary Figure 4**). Importantly, the infiltration of CD8 and CD4 T cells diminished with the systemic administration of a neutralizing antibody against CCL2. In fact, the most important reduction was observed in the area of infiltration, which suggests that the CCL2 expression is important for penetration into the brain parenchyma (**Figure 4A**). Furthermore, detailed confocal co-localization analysis demonstrated that the CCL2⁺ cells were also astrocytes in LPS-induced infiltration in mice (**Figure 4B**).

Our results suggest that astrocytes may contribute to the specific extravasation of lymphocytes, producing CCL2, but the physical contact, unlike simple chemotaxis, seems to be important for this phenomenon. To explore these possible contact events, a detailed high-resolution confocal analysis of the anatomical location of infiltrating T cells in the blood vessels and in the brain parenchyma of inflammatory areas was carried out. Importantly, specific contacts between CCL2⁺ cells and CD3⁺ lymphocytes were found in the peripheral boundaries of blood vessels (**Figure 5**), suggesting that the specific attachment of T cells to the perivascular astrocytes may be a crucial event in the extravasation of T cells in the inflamed brain.

Discussion

In the present work, we show that, independently of the species and of the CNS inflammatory scenario, the extravasation of lymphocytes is crucially mediated by CCL2-expressing astrocytes. In the three inflammatory situations illustrated, we found a specific increase of CCL2⁺ cells in the affected areas with a concomitant T cell infiltration. Importantly, our confocal images demonstrate that perivascular astrocytes are responsible for the expression of CCL2 in the three analyzed T cell-infiltration situations in the brain, in the three different species and with multiple antibodies specific for CCL2. Our results demonstrate that the expression of CCL2 by astrocytes specifically mediates the entrance of lymphocytes in the brain parenchyma. In the experiments performed in mice, the blocking of CCL2 by a specific neutralizing antibody attenuated the infiltration of lymphocytes but importantly, there was a clear reduction of the area of infiltration which suggests that CCL2, expressed by

astrocytes, mediates the anatomical internalization of the T cells into the parenchyma. Furthermore, the fact that the level of CCL2 expression correlates with the T cell infiltration proper and not with the number of lymphocytes circulating in the blood vessels, strongly suggests that the presence of CCL2⁺ astrocytes mediates the process of lymphocyte extravasation and directly mediates the cellular entrance. In addition, our data demonstrate that the anatomical contact between lymphocytes and CCL2⁺ astrocytes takes place in the internal wall of BV and seems to have a crucial role in the actual infiltration to the brain parenchyma.

Our results also narrow down the controversy regarding the cell type that is responsible of CCL2 expression in the brain. Previous studies in biopsies of patients with multiple sclerosis and after brain injury in mice have suggested that CCL2 is expressed by astrocytes but no co-localization analysis of the proteins was conducted [11,12]. In the present work, we show that CCL2 co-localizes with GFAP in three different species, with two different antibodies, and in three different situations of inflammatory-mediated lymphocyte infiltration.

Importantly, our study strongly suggests that the anatomical apposition of T cells and CCL2⁺ astrocytes is an important event in the internalization of lymphocytes in the brain parenchyma. The CCL2 function was thought to be mainly chemotactic, but our results suggest that the physical contact between T cells and astrocytes mediate the actual internalization into the brain parenchyma proper, after the two phenomena of rolling and adhesion, which is coherent with the induction of the uropod formation by CCL2 and penetration through the endothelium, contributing to diapedesis (Figure 5C).

From a therapeutic point of view, the manipulation of CCL2 may have beneficial effect in neurodegenerative diseases. CCL2 expression has been related with the aggressiveness of the glioma [13] and, in fact, the use of CCL2 neutralizing antibodies has been suggested as a possible strategy for their treatment [14]. However, research into CCL2-mediated infiltration has mainly focused on the role of tumor-infiltrated macrophages but not other cell types [15]. Our present work suggests that, like macrophages, the CCL2 may also mediate lymphocyte infiltration in the glioma, and contribute to the level of aggressiveness. In fact, in a previous report, we demonstrated that T cells infiltrate gliomas

to contact tumorigenic cells although a very low percentage shows cytolytic features [6]. This suggests that the most tumor-infiltrated lymphocytes are regulatory, reducing the activity of the cytolytic cells and allowing the tumor to grow. Therefore, the manipulation of CCL2 may be one of the particular therapeutic targets to control the infiltration of lymphocytes in brain tumors. Accordingly, in other neuroinflammatory processes, such as acute brain trauma, stroke, as well as during chronic affections like multiple sclerosis or Alzheimer's disease, prolonged and sustained inflammation mediated by CCL2 may have cytotoxic effects, aggravating the incidence and the severity of the disease [16]. Therefore, targeting CCL2, more specifically in perivascular astrocytes, in CNS inflammatory scenarios may be particularly important from a therapeutic perspective.

Acknowledgements

This work was supported by grants from: the Spanish Ministry of Science and Innovation (SAF 2004 07656 C02-02, FIS PI10 02827, RYC-2010-06729), Fundación Séneca (FS/05662/PI/07) and CIBERNED (Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas). We thank María G. Castro and Pedro R. Lowenstein, from the Board of Governors' Gene Therapeutics Research Institute at Cedars-Sinai Medical, Center, Los Angeles, USA, for kindly providing the adenoviral vectors used in the monkey study. We would also like thank all the personnel from SAI (Servicio de Apoyo a la Investigación), for the help provided at the University of Murcia, especially María García. The authors would also like to thank Mr. P. Thomas for comments and language suggestions on this manuscript. Finally, the authors declare that there is no conflict of interests in the present work.

Figure Legends

Figure 1. (A) The 14 cases of glioma analyzed show CCL2 expression in the tumorigenic areas. Samples of gliomas were immunostained to detect the expression of CCL2. All 14 cases analyzed showed expression of CCL2 in the neoplastic areas. CCL2-expressing cells are localized in the brain parenchyma itself and their number and intensity increase towards the necrotic areas. CCL2-expressing cells can also be seen around blood vessels. Scale bar; 1-21: 400 μm , 22-24: 60 μm . (B) Tumor cells present high immunoreactivity for GFAP in tumor areas, demonstrating the typical astrocytic origin of the tumors. CCL2⁺ cells show a characteristic astrocytic morphology. Scale bar: 30 μm . (C) Blood vessels in, or close to the putative tumorigenic areas show high immunoreactivity for CCL2 in contrast to normal tissue. Scale bar: 100 μm .

Figure 2. (D) Confocal images show co-localization of CCL2-expressing cells (red) with GFAP (green). Scale bar: 30 μm . (E) Detail of a single CCL2-expressing cell (red) co-localizing with GFAP (green) and counterstained with DAPI (blue). (F) Areas of infiltration of CD3⁺ T cells (green) coincide with the areas of CCL2-expressing cells (red). Detailed confocal analysis of samples of gliomas, revealed that the areas with CCL2-expressing cells are infiltrated with CD3⁺ T cells. Confocal images show a tumorigenic area, infiltrated with CD3⁺ T cells (green), together with CCL2-expressing cells (red), combined with a counterstaining with DAPI to detect the nucleus (blue). Scale bar: 50 μm . (G) CCL2 is highly expressed in perivascular astrocytes where T cells infiltrate the brain tumor. Detailed confocal analysis of samples of gliomas revealed that blood vessels in tumorigenic areas show CCL2-expressing astrocytes (red) with infiltration of CD3⁺ T cells (green). Nuclei are stained with DAPI (blue). CCL2 expression correlates with the infiltration of T cells in the tumor areas. The quantification of the number of T cells, either infiltrated or located in the blood vessel lumen, revealed that the level of infiltration of CD3⁺ T cells (green) is positively correlated with the level of CCL2 expression (BV; blood vessel lumen).

Figure 3. (A) Immunofluorescence shows the specific CCL2 expression located at the area of adenoviral injection in the macaque brain. Drawing on the right shows the anatomical location of the

stereotaxic injection in the brain cortex. (B) Confocal images of blood vessels in an intact area and an injected area of the monkey brain. Perivascular astrocytes marked with GFAP (green) show CCL2 expression (red) in the adenoviral-injected areas. DAPI (blue) was used as a nuclear counterstaining. (C) CCL2 is expressed by astrocytes. The staining of CCL2 (red) colocalizes with the astrocyte marker GFAP (green) in monkey cortex.

Figure 4. (A) Systemic injection of anti-CCL2 antibodies attenuates the LPS-induced infiltration of lymphocytes in the mouse brain parenchyma. Graphs show the surface occupied by infiltrated CD8 and CD4 T cells (higher graphs) and the density of CD8 and CD4 T cells (lower graphs) in the brain parenchyma. (B) Astrocytes express CCL2 after LPS injection in mouse brain. Confocal images show the co-localization of GFAP⁺ astrocytes (green) and CCL2 (red) in mouse brain. DAPI (blue) was used as a nuclear counterstaining.

Figure 5. (A) Perivascular expression of CCL2 is the driving force behind the entrance of lymphocytes in the parenchyma. Confocal images of a blood vessel in a human tumorigenic biopsy (BV) with CCL2-expressing perivascular astrocytes (red), infiltration of CD3⁺ T cells (green). (B) Infiltration of T cells occurs throughout multiple anatomical contacts between T cells and CCL2-expressing astrocytes. Image G1 shows numerous CD3⁺ T cells (green) establishing specific contacts with CCL2⁺ cells (red) in the internal wall of a blood vessel (BV). In pictures G2, 3 and 4, a detail of T cells (green) in contact with CCL2 perivascular astrocytes in the internal wall of BV is shown. Image G4 shows a specific detail of a CD3/CCL2 contact on the xy axis and the two lateral views on the z axis. Details of CD3⁺ T cells in contact with CCL2-expressing astrocytes. (C) Diagram showing how T cells may come into contact with CCL2-expressing astrocytes in the edge of blood vessels suggesting that CCL2⁺ astrocytes direct the extravasation of T cells in the brain parenchyma.

Supplementary figure legends

Supplementary figure 1. ICAM-1 expression in blood vessels in areas of infiltration after viral injection in monkey brain. Top panel shows over-expression of ICAM-1 (red) in perivascular areas, where T cells (green) infiltrate the brain parenchyma. DAPI was used to stain the nuclei (blue). Bottom panel shows different putative steps (from 1 to 6) of T cell infiltration in the brain. (1, 2) T cells (green) rolling through the ICAM-1⁺ endothelial wall (red). Picture 2 shows a rolling T cell displaying a putative uropod (white arrow). (3, 4) T cells (green) in the adhesion process. (5, 6) T cells in the extravasation process.

Supplementary figure 2. VCAM-1 expression in blood vessels in areas of infiltration after viral injection in monkey brain. Top panel shows over-expression of VCAM-1 (red) in perivascular areas, where T cells (green) infiltrate in the brain parenchyma. DAPI was used to stain the nuclei (blue). Bottom panel show a detail of the area of infiltration.

Supplementary figure 3. LFA-1 expression in lymphocytes in areas of infiltration after viral injection in monkey brain. Top panel shows over-expression of LFA-1 (magenta) in perivascular areas, where T cells (green) and B cells (red) infiltrate the brain parenchyma. DAPI was used to stain the nuclei (blue). Bottom panel shows a detail of the area of infiltration of T and B lymphocytes co-localizing with LFA-1.

Supplementary figure 4. Increase in the number of CCL2 cells in the mouse brain after LPS intrastriatal injection. (A) Representative picture of CCL2⁺ cells in the mouse striatum after LPS injection. (B) Quantification of CCL2⁺ cells in the injected striatum in a group of mice injected with saline compared with a group of mice injected with LPS. A dramatic increase of CCL2⁺ cells can be observed in the LPS injected mice. * $p < 0.05$ Student T test.

References

1. del Pozo MA, Cabanas C, Montoya MC, Ager A, Sanchez-Mateos P, et al. (1997) ICAMs redistributed by chemokines to cellular uropods as a mechanism for recruitment of T lymphocytes. *J Cell Biol* 137: 493-508.
2. del Pozo MA, Sanchez-Mateos P, Nieto M, Sanchez-Madrid F (1995) Chemokines regulate cellular polarization and adhesion receptor redistribution during lymphocyte interaction with endothelium and extracellular matrix. Involvement of cAMP signaling pathway. *J Cell Biol* 131: 495-508.
3. Sanchez-Madrid F, Serrador JM (2009) Bringing up the rear: defining the roles of the uropod. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 353-359.
4. Oppenheim JJ, Zachariae CO, Mukaida N, Matsushima K (1991) Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. *Annu Rev Immunol* 9: 617-648.
5. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE (2009) Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res* 29: 313-326.
6. Barcia C, Jr., Gomez A, Gallego-Sanchez JM, Perez-Valles A, Castro MG, et al. (2009) Infiltrating CTLs in human glioblastoma establish immunological synapses with tumorigenic cells. *Am J Pathol* 175: 786-798.
7. Barcia C, Gomez A, de Pablos V, Fernandez-Villalba E, Liu C, et al. (2008) CD20, CD3, and CD40 ligand microclusters segregate three-dimensionally in vivo at B-cell-T-cell immunological synapses after viral immunity in primate brain. *J Virol* 82: 9978-9993.
8. Zirger JM, Liu C, Barcia C, Castro MG, Lowenstein PR (2006) Immune regulation of transgene expression in the brain: B cells regulate an early phase of elimination of transgene expression from adenoviral vectors. *Viral Immunol* 19: 508-517.
9. Barcia C, Jimenez-Dalmaroni M, Kroeger KM, Puntel M, Rapaport AJ, et al. (2007) One-year expression from high-capacity adenoviral vectors in the brains of animals with pre-existing anti-adenoviral immunity: clinical implications. *Mol Ther* 15: 2154-2163.
10. Thomas CE, Schiedner G, Kochanek S, Castro MG, Lowenstein PR (2000) Peripheral infection with adenovirus causes unexpected long-term brain inflammation in animals injected intracranially with first-generation, but not with high-capacity, adenovirus vectors: toward realistic long-term neurological gene therapy for chronic diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 7482-7487.
11. Van Der Voorn P, Tekstra J, Beelen RH, Tensen CP, Van Der Valk P, et al. (1999) Expression of MCP-1 by reactive astrocytes in demyelinating multiple sclerosis lesions. *Am J Pathol* 154: 45-51.
12. Glabinski AR, Balasingam V, Tani M, Kunkel SL, Strieter RM, et al. (1996) Chemokine monocyte chemoattractant protein-1 is expressed by astrocytes after mechanical injury to the brain. *J Immunol* 156: 4363-4368.
13. Platten M, Kretz A, Naumann U, Aulwurm S, Egashira K, et al. (2003) Monocyte chemoattractant protein-1 increases microglial infiltration and aggressiveness of gliomas. *Ann Neurol* 54: 388-392.
14. Zhu X, Fujita M, Snyder LA, Okada H (2010) Systemic delivery of neutralizing antibody targeting CCL2 for glioma therapy. *J Neurooncol*.
15. Desbaillets I, Tada M, de Tribolet N, Diserens AC, Hamou MF, et al. (1994) Human astrocytomas and glioblastomas express monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in vivo and in vitro. *Int J Cancer* 58: 240-247.
16. Conductier G, Blondeau N, Guyon A, Nahon JL, Rovere C (2010) The role of monocyte chemoattractant protein MCP1/CCL2 in neuroinflammatory diseases. *J Neuroimmunol* 224: 93-100.

Figure 1

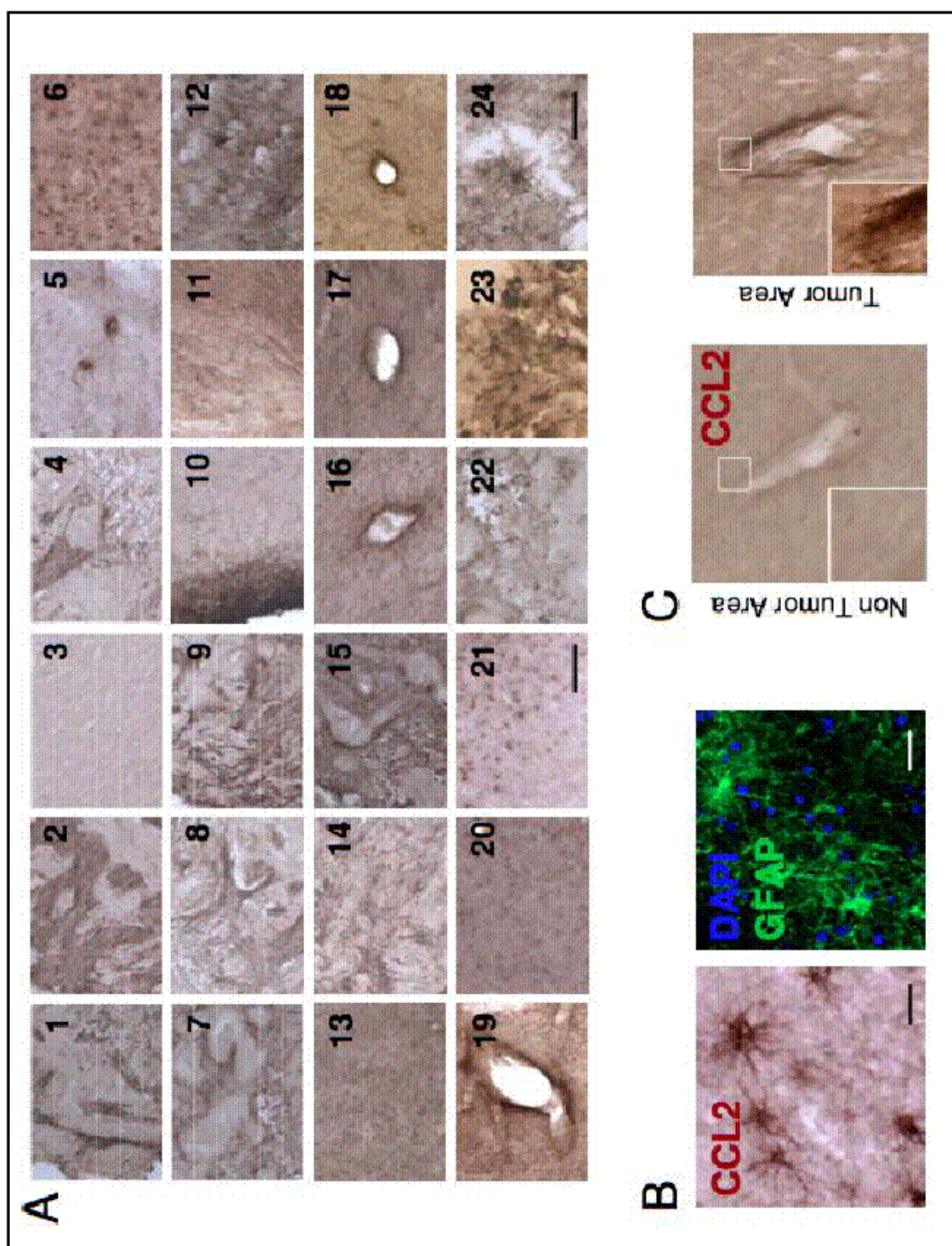


Figure 2

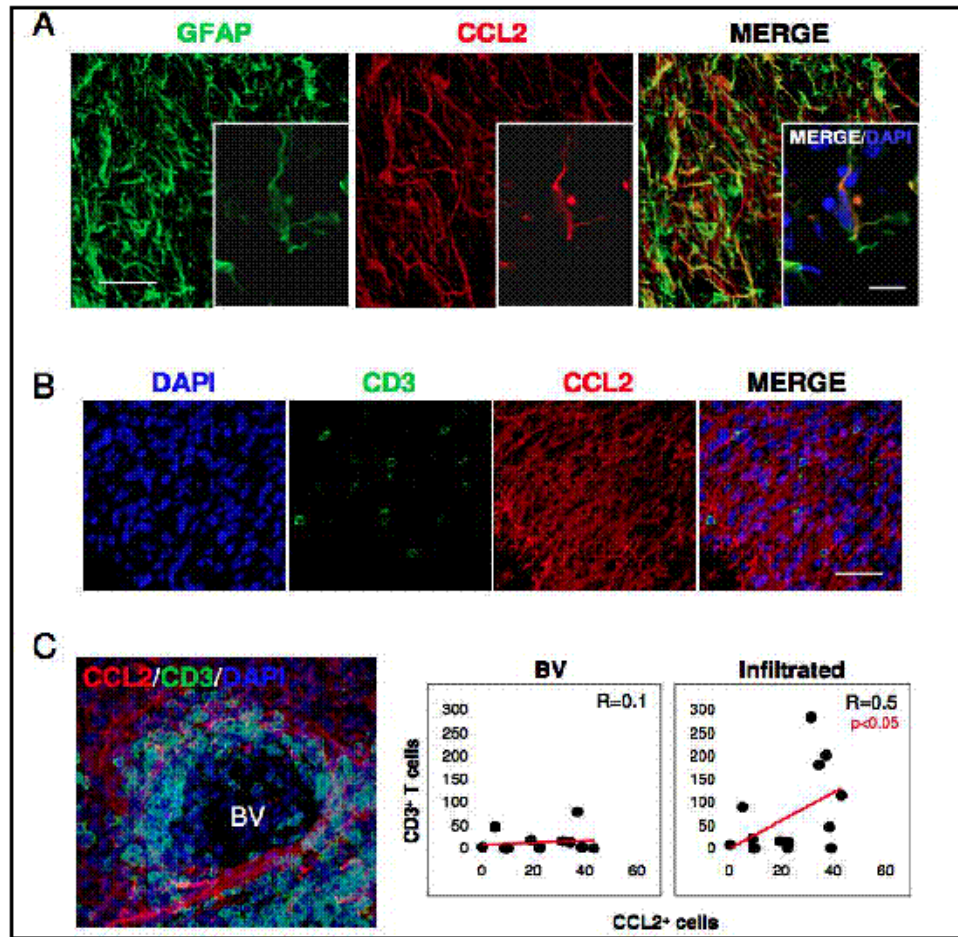


Figure 3

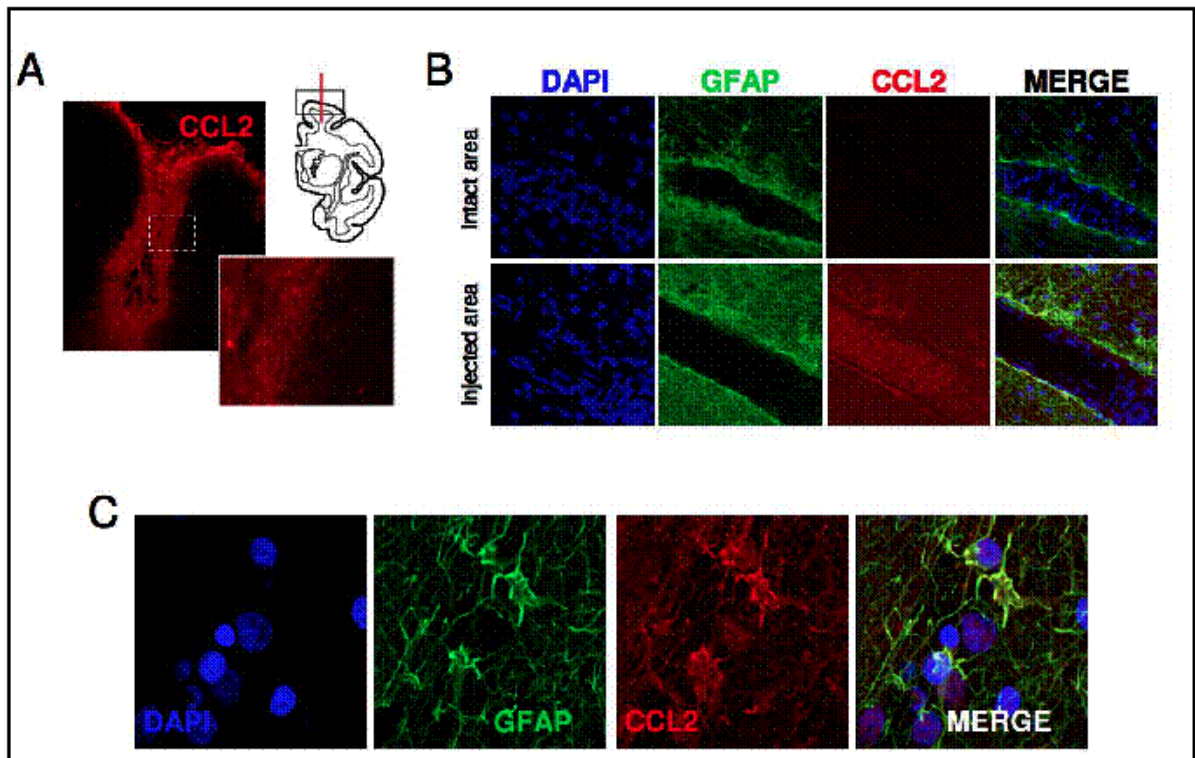


Figure 4

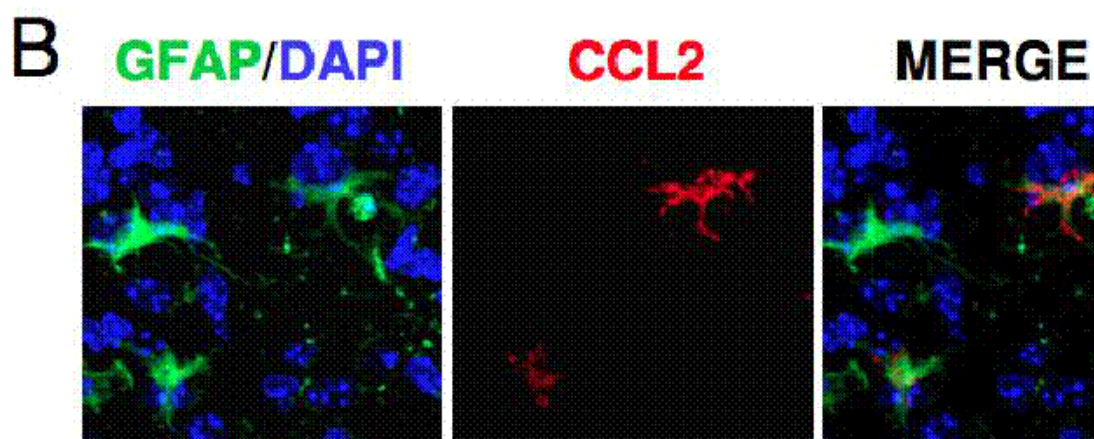
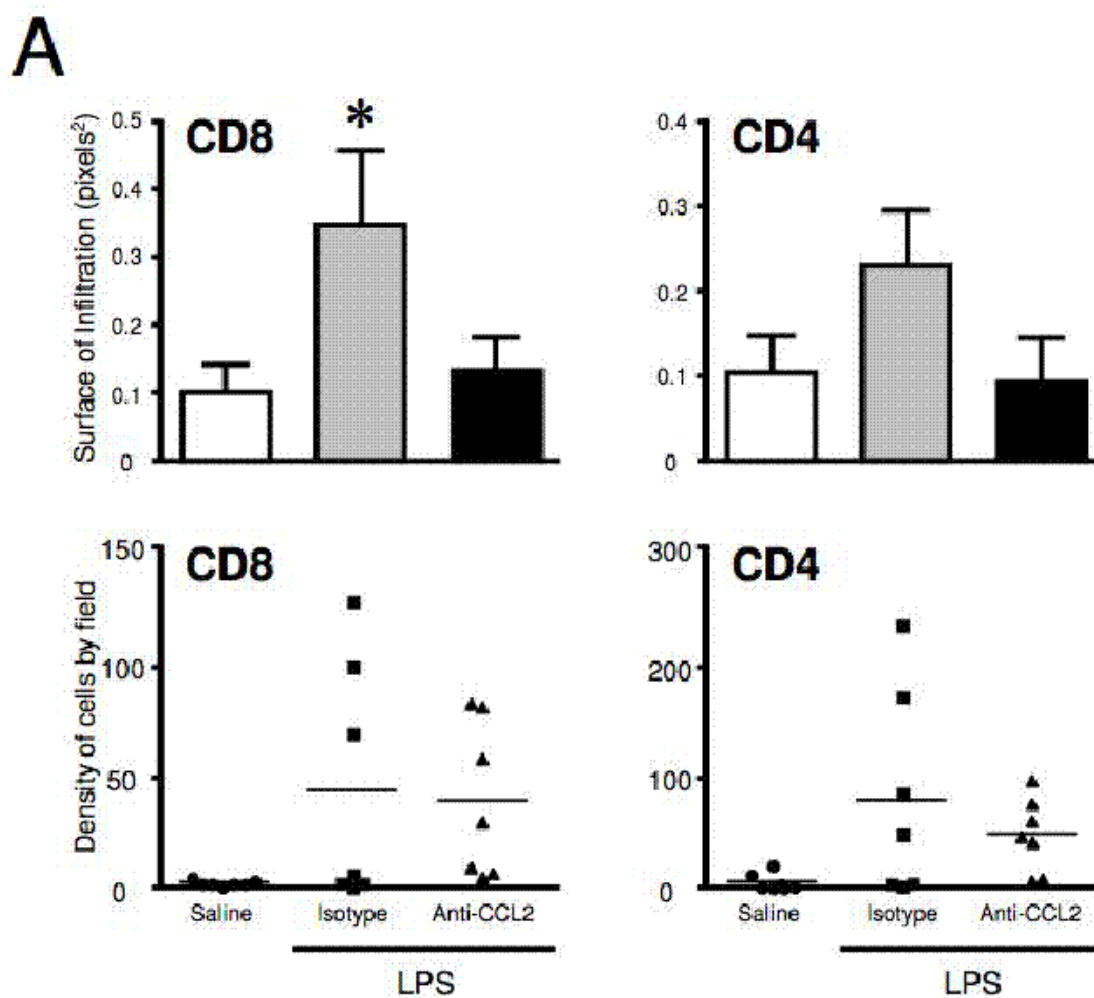
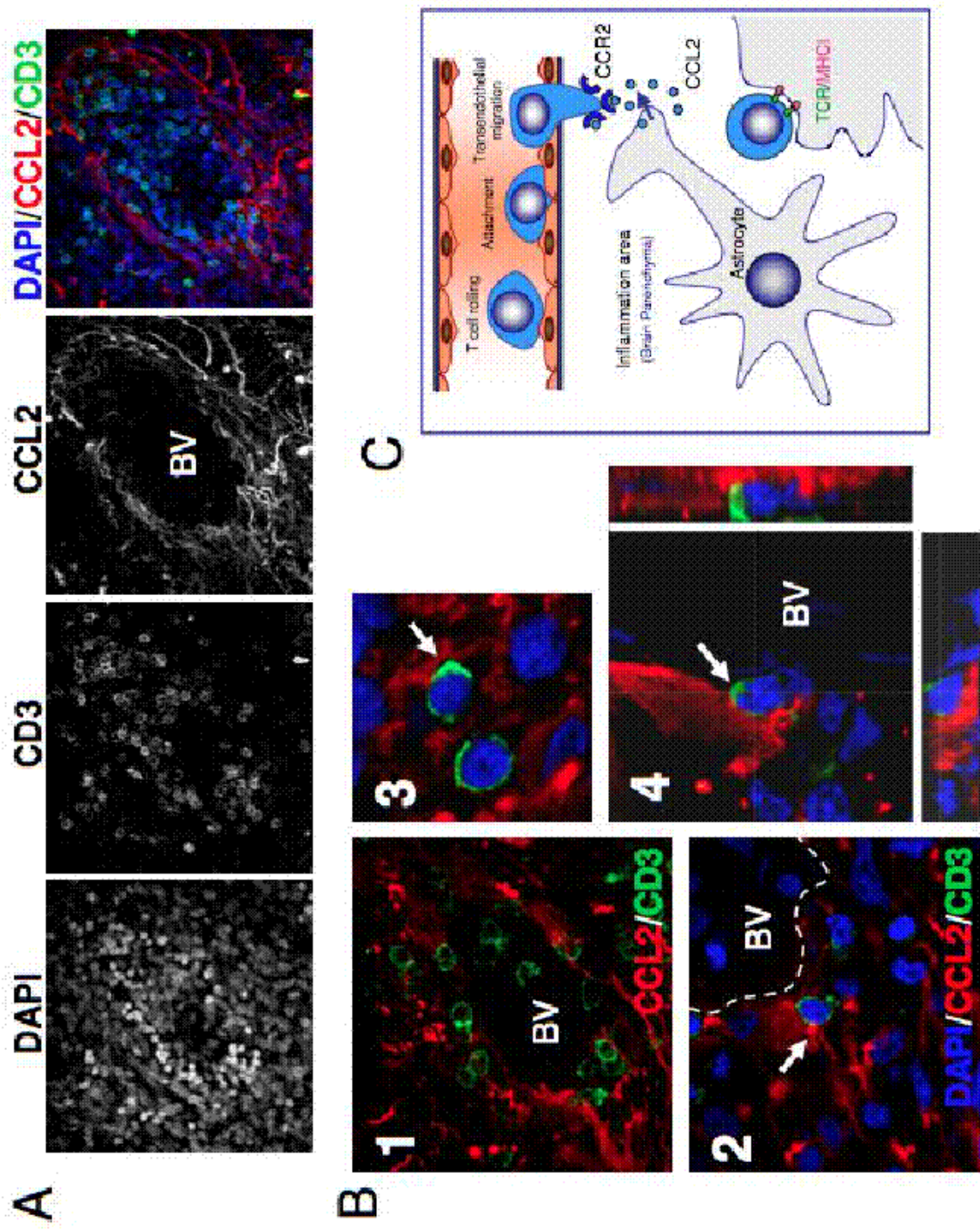
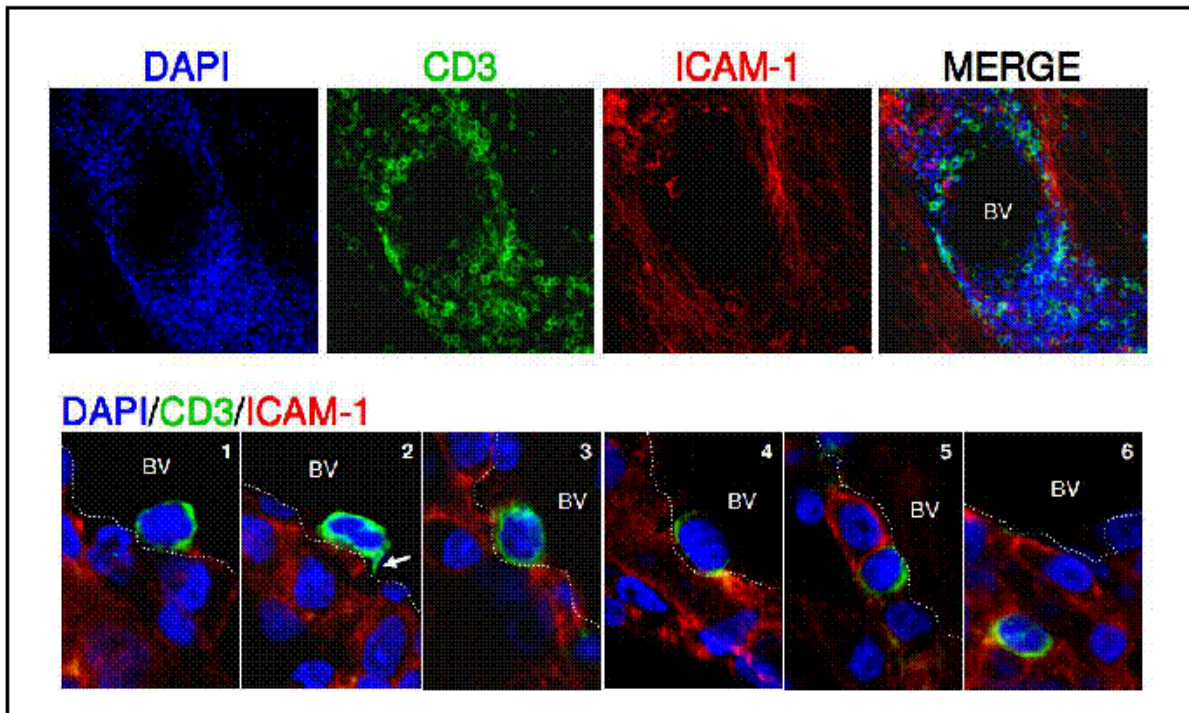


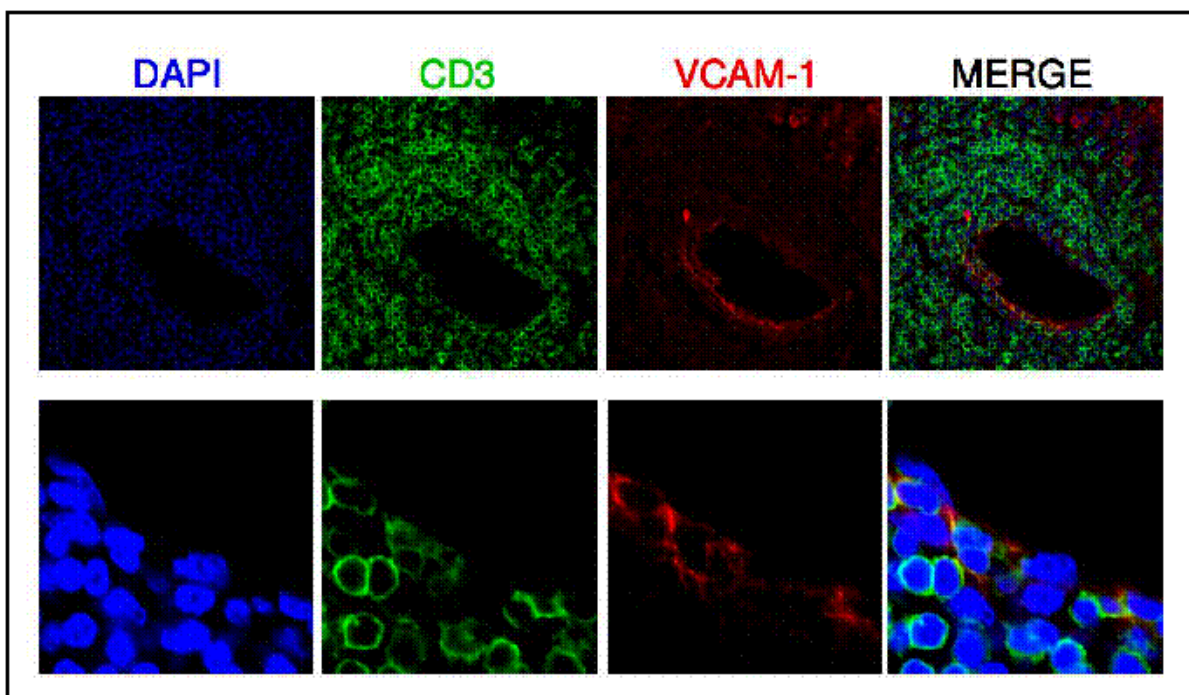
Figure 5



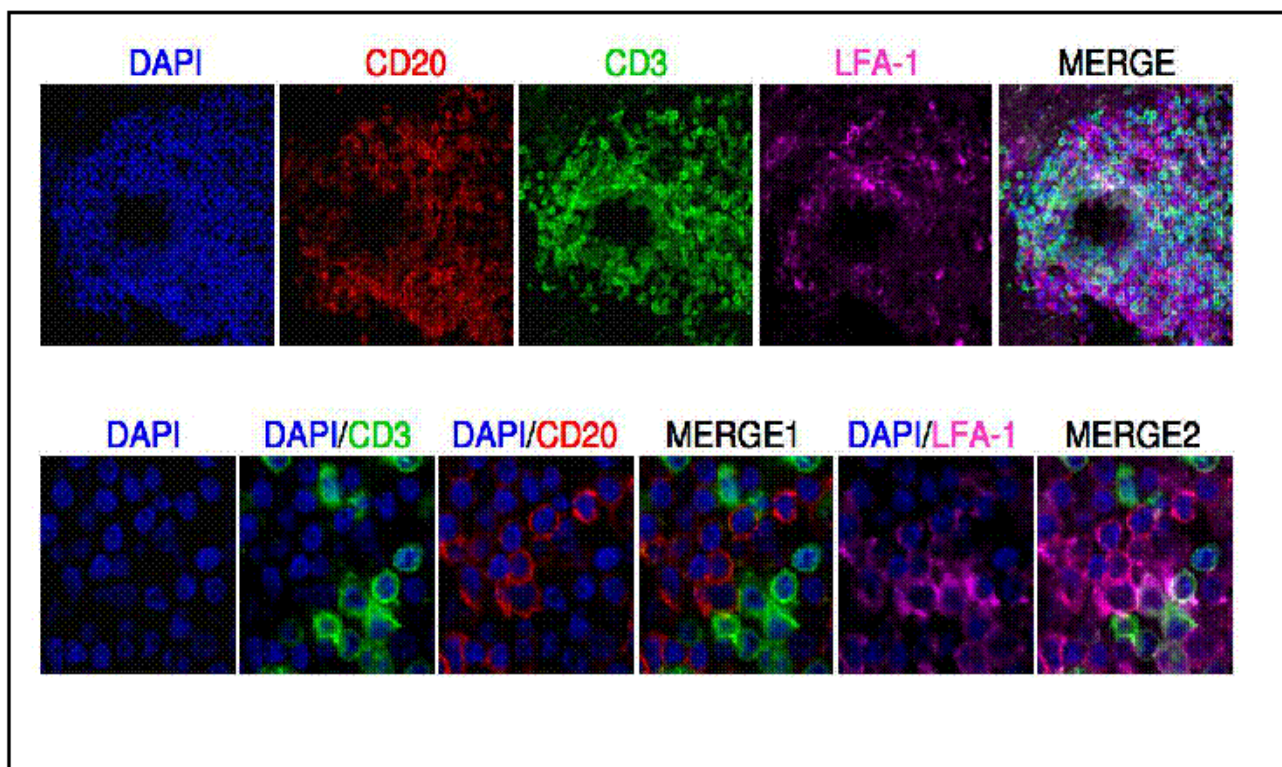
Supplementary Figure 1



Supplementary Figure 2



Supplementary Figure 3



Supplementary Figure 4

