

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA
FACULTAD DE MEDICINA



UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

TESIS DOCTORAL

**Efecto del factor de crecimiento insulínico tipo
II sobre el daño oxidativo-mitocondrial y
neuronal inducido por MPP⁺ y corticosterona
en neuronas dopaminérgicas en cultivo**

**Programa de Doctorado en Biomedicina, Investigación
Traslacional y Nuevas Tecnologías en Salud**

PABLO CABRERA GARCÍA

DIRECTORAS:

ELISA MARTÍN MONTAÑEZ


SILVANA YANINA ROMERO ZERBO

MÁLAGA, 2023



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Pablo Cabrera García

 <https://orcid.org/0009-0000-3650-1171>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es



DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR

D./Dña PABLO CABRERA GARCÍA

Estudiante del programa de doctorado BIOMEDICINA, INVESTIGACIÓN TRASLACIONAL Y NUEVAS TECNOLOGÍAS EN SALUD de la Universidad de Málaga, autor/a de la tesis, presentada para la obtención del título de doctor por la Universidad de Málaga, titulada: "EFECTO DEL FACTOR DE CRECIMIENTO INSULÍNICO TIPO II SOBRE EL DAÑO OXIDATIVO-MITOCONDRIAL Y NEURONAL INDUCIDO POR MPP+ Y CORTICOSTERONA EN NEURONAS DOPAMINÉRGICAS EN CULTIVO"

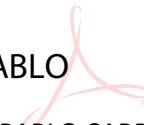

Realizada bajo la tutorización de ELISA MARTÍN MONTAÑEZ y dirección de ELISA MARTÍN MONTAÑEZ Y SILVANA YANINA ROMERO ZERBO (si tuviera varios directores deberá hacer constar el nombre de todos)

DECLARO QUE:

La tesis presentada es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, conforme al ordenamiento jurídico vigente (Real Decreto Legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo.

Igualmente asumo, ante a la Universidad de Málaga y ante cualquier otra instancia, la responsabilidad que pudiera derivarse en caso de plagio de contenidos en la tesis presentada, conforme al ordenamiento jurídico vigente.

En Málaga, a 9 de ENERO de 2023

<p>CABRERA GARCIA PABLO</p>  <p>Fdo.: PABLO CABRERA GARCÍA Doctorando/a</p>	<p>MARTIN MONTAÑEZ ELISA -</p>  <p>Fdo.: ELISA MARTÍN MONTAÑEZ Tutor/a</p>



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Escuela de Doctorado

Fdo.:

MARTIN
MONTAÑEZ
ELISA -

ROMERO
--- SILVANA
YANINA -

ELISA MARTÍN MONTAÑEZ/SILVANA YANINA ROMERO ZERBO
Director/es de tesis



UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Dña. Elisa Martín Montañez, Profesora Titular de Farmacología de la Universidad de Málaga y **Dña. Silvana Yanina Romero Zerbo**, Profesora Ayudante Doctora de Fisiología Humana de la Universidad de Málaga,

INFORMAN:

Que el trabajo de investigación que presenta **D. Pablo Cabera García**, titulado "Efecto del factor de crecimiento insulínico tipo II sobre el daño oxidativo-mitocondrial y neuronal inducido por MPP⁺ y corticosterona en neuronas dopaminérgicas en cultivo" ha sido realizado bajo nuestra dirección y consideramos que tiene el contenido y rigor científico necesarios para ser sometido al superior juicio de la comisión que nombre la Universidad de Málaga para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes y surta los efectos oportunos, firmamos el presente documento en Málaga, a 9 de enero de 2023.

MARTIN
MONTAÑEZ
ELISA -

Fdo: Dra. Elisa Martín Montañez

ROMERO ---
SILVANA
YANINA -

Fdo: Dra. Silvana Yanina Romero Zerbo



AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Elisa Martín Montañez, por su esfuerzo, dedicación infinita, apoyo incondicional, por haber confiado en mí desde el inicio, por coordinar, dirigir y tutorizarme en este trabajo que sin ella no hubiese sido posible.

Al Dr. José Pavía Molina, por su dedicación a la enseñanza y a la investigación, por haber confiado y apostado por mí desde que nos conocimos en tercero de carrera, ya que sin su influencia jamás habría llegado hasta aquí.

A mi otra directora, la Dra. S. Yanina Romero Zerbo y a la Dra. María García Fernández ya que sin ellas este proyecto no habría sido posible.

A todas las personas del laboratorio que sin su colaboración y esfuerzo este proyecto nunca habría visto la luz.

A mi hermana, a mi padre, a mis sobrinos, y a mi madre que allá donde esté seguro que estará orgullosa de ver en la persona que me he convertido.

A Jesús, mi marido y compañero de viaje, que sin su apoyo incondicional y su esfuerzo no me habría permitido adentrarme en este proyecto.

Por último y no menos importante a mi perro, Zeus, que me ha acompañado en los largos días de escritura de este trabajo sacando una sonrisa siempre de mí.



1.2.2.2.	Factor de necrosis tumoral (TNF)	13
1.2.2.3.	Péptido similar al glucógeno tipo 1 (GLP1)	13
1.2.2.4.	Ciclooxigenasa-2 (COX2)	13
1.3.	Enfermedades neurodegenerativas: relación con estrés oxidativo y disfunción mitocondrial	14
1.4.	Estrés y eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HPA)	15
1.5.	Modelos celulares de la EP	18
1.5.1.	Mediante neurotoxinas	19
1.5.2.	Modelos basados en la inclusión de fibrillas preformadas	20
1.5.3.	Modelos derivados de células madres pluripotenciales	20
1.5.4.	Modelos genéticos	20
1.6.	Factor de crecimiento insulínico tipo II (IGF-II) y receptor del factor de crecimiento insulínico tipo II (IGF-IIR)	21
2.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	24
3.	MATERIAL Y MÉTODOS	26
3.1.	Cultivo celular y tratamiento	26
3.2.	Expresión de receptores	27
3.3.	Muerte celular	28
3.4.	Visualización de morfología celular	28
3.5.	Actividad antioxidante y daño oxidativo celular	28
3.6.	Marcadores mitocondriales	29
3.6.1.	Distribución mitocondrial	29
3.6.2.	Niveles mitocondriales de especies reactivas de oxígeno (ROS)	30
3.6.3.	Potencial de membrana mitocondrial	30
3.6.4.	Tasa de consumo de oxígeno mitocondrial	31
3.7.	Marcador dopaminérgico y neurodegeneración	32
3.8.	Vías de señalización intracelular	33
3.9.	Análisis estadístico	34
4.	RESULTADOS	35
4.1.	Modelo experimental	35
4.1.1.	Muerte celular	36
4.1.2.	Actividad antioxidante y daño oxidativo celular	37
4.1.3.	Producción de ROS mitocondrial y función mitocondrial	38

4.1.4. Neurodegeneración	40
4.2. Efecto del IGF-II en el modelo experimental	41
4.2.1. Viabilidad celular: muerte celular y morfología	41
4.2.2. Actividad antioxidante y daño oxidativo celular	42
4.2.3. Marcadores mitocondriales	44
4.2.4. Marcador dopaminérgico y neurodegeneración	49
4.2.5. Vías de señalización intracelular	52
5. DISCUSIÓN	58
5.1. Puesta en marcha de un modelo in vitro sobre neuronas dopaminérgicas como base de un modelo combinado de Enfermedad de Parkinson y estrés emocional leve-moderado	58
5.1.1. Daño oxidativo-mitocondrial en el modelo	58
5.1.2. Neurodegeneración en el modelo	60
5.2. Efecto de IGF-II sobre el daño inducido por la coadministración de MPP ⁺ y corticosterona en neuronas dopaminérgicas	61
5.2.1. Efecto de IGF-II sobre daño oxidativo-mitocondrial	61
5.2.2. Efecto de IGF-II sobre marcador dopaminérgico y neurodegeneración	64
5.2.3. Vías de señalización intracelular implicadas	64
6. CONCLUSIONES	67
7. BIBLIOGRAFÍA	68
ANEXOS	79



ÍNDICE DE FIGURAS

- Fig. 1: Representación gráfica del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal
- Fig. 2: Diferentes métodos para la obtención de modelos celulares de enfermedad
- Fig. 3: Afinidad relativa de insulina, IGF-I e IGF-II y señales de transducción de los receptores de insulina, IGF-I e IGF-II
- Fig. 4: Representación temporal del experimento
- Fig. 5: Representación gráfica del Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kit
- Fig. 6: Inmunocitoquímica del receptor específico para IGF-II (IGF-IIR)
- Fig. 7: Inmunocitoquímica del receptor de glucocorticoides (GR)
- Fig. 8: Efecto sobre la viabilidad celular de diferentes concentraciones (μM) de los tóxicos
- Fig. 9: Equilibrio REDOX tras la administración de CORT, MPP⁺ o CORT+MPP⁺
- Fig. 10: Niveles mitocondriales de ROS tras la administración de CORT, MPP⁺ o CORT+MPP⁺
- Fig. 11: Análisis funcional a nivel mitocondrial ante la administración de CORT, MPP⁺ o CORT+MPP⁺
- Fig. 12: Neurodegeneración evaluada como intensidad del fluorocromo específico Fluoro-Jade BTM (FJ) ante la administración de CORT, MPP⁺ o CORT+MPP⁺
- Fig. 13: Muerte celular expresada como porcentaje de LDH liberada al medio en las distintas situaciones a estudio
- Fig. 14: Morfología celular tras la administración de CORT+MPP⁺ en ausencia o presencia de IGF-II
- Fig. 15: Actividad antioxidante ante la administración de CORT+MPP⁺ en ausencia o presencia de IGF-II
- Fig. 16: Daño oxidativo celular tras la administración de CORT+MPP⁺ en ausencia o presencia de IGF-II
- Fig. 17: Marcador mitocondrial MitoTrackerTM Green ante la administración de CORT+MPP⁺ en ausencia o presencia de IGF-II
- Fig. 18: Niveles mitocondriales de ROS tras la administración de CORT+MPP⁺ en ausencia o presencia de IGF-II

- Fig. 19: Análisis citofluorimétrico del potencial de membrana mitocondrial ($m\Delta\Psi$) ante la administración de CORT+MPP⁺ en ausencia o presencia de IGF-II
- Fig. 20: Medición de parámetros clave de la función mitocondrial tras 90 minutos de incubación con CORT+MPP⁺ en ausencia o presencia de IGF-II
- Fig. 21: Tasa de consumo de oxígeno (OCR) evaluada en diferentes condiciones tras la administración de CORT+MPP⁺ en ausencia o presencia de IGF-II
- Fig. 22: Análisis cuantitativo de la inmunocitoquímica de la enzima tirosina hidroxilasa (TH) ante la administración de CORT+MPP⁺ en ausencia o presencia de IGF-II o mifepristona
- Fig. 23: Inmunocitoquímica de la enzima tirosina hidroxilasa (TH) ante la administración de CORT+MPP⁺ en ausencia o presencia de IGF-II o mifepristona
- Fig. 24: Neurodegeneración evaluada como intensidad del fluorocromo específico Fluoro-Jade BTM (FJ) ante la administración de CORT+MPP⁺ en ausencia o presencia de IGF-II
- Fig. 25: Expresión de pPKC α/β ante la administración de CORT+MPP⁺ en ausencia o presencia de IGF-II o mifepristona
- Fig. 26: Inmunocitoquímica del factor de transcripción nuclear eritroide 2 (Nrf2) ante la administración de CORT+MPP⁺ en ausencia o presencia de IGF-II o mifepristona
- Fig. 27: Análisis cuantitativo de la inmunocitoquímica del factor de transcripción nuclear eritroide 2 (Nrf2) ante la administración de CORT+MPP⁺ en ausencia o presencia de IGF-II o mifepristona
- Fig. 28: Análisis cuantitativo de la inmunocitoquímica del receptor de glucocorticoides (GR) ante la administración de CORT+MPP⁺ en ausencia o presencia de IGF-II o mifepristona
- Fig. 29: Inmunocitoquímica del receptor de glucocorticoides (GR) ante la administración de CORT+MPP⁺ en ausencia o presencia de IGF-II o mifepristona

ABREVIATURAS

ABTS: 2,2'-azinobis [3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico]-sal de diamonio

ANOVA: Análisis de la varianza

AOPP: Productos de la oxidación avanzada de las proteínas

ARE: Elementos de respuesta antioxidante, del inglés Antioxidant Response Elements

ATP: Trifosfato de adenosina

AVP: Argenina VasoPresina

BSA: Albúmina de Suero Bovino

CORT: Corticosterona

COX2: Ciclooxygenasa-2

CRH: Hormona liberadora de corticotropina, del inglés Corticotropin Release Hormone

DAPI: Marcador fluorescente 4',6-diamidino-2-fenilindol

Dat SPECT: Tomografía computarizada por emisión de fotón único con transportador de dopamina

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

EP: Enfermedad de Parkinson

FBS: Suero bovino fetal

FCCP: Carbonilcianuro-4-trifluorometoxifenilhidrazona

FJ: Fluoro-Jade B™

GC: Glucocorticoides

GLP1: Péptido similar al glucógeno tipo 1, del inglés Glucagon-Like Peptide-1

GPX: Glutation Peroxidasa

GR: Receptor de Glucocorticoides

GSK3: Glucógeno Sintasa Kinasa -3, del inglés Glycogen Synthase Kinase-3

HEPES: 4-(2-hidroxietilo)-1-ácido piperazinetanosulfónico

HPA: Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal

IGF-I: Crecimiento similar a la Insulina tipo I, del inglés Insuline Grow factor I

IGF-II: Crecimiento similar a la Insulina tipo II, del inglés Insuline Grow factor II

IGF-IIR: Receptor del Factor de Crecimiento similar a la Insulina tipo II, del inglés Insuline Grow factor II receptor

IGF-IR: Receptor del Factor de Crecimiento similar a la Insulina tipo I, del inglés
Insuline Grow factor I receptor

IMAO-B: Inhibidores de la monoaminoxidasa tipo B

ISRS: Inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina

ISRSN: Inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina y norepinefrina

LDH: Lactato deshidrogenasa

LOOH: Lípidos hidroperóxidos

MERGE: Fusión

MIFE: Mifepristona

MPP⁺: 1-metil-4-fenilpiridinio

MTG: MitoTracker™ Green

mTOR: Diana de rapamicina en células de mamíferos, del inglés mammalian
Target of Rapamycin

mΔΨ: Potencial de membrana mitocondrial

NADP: Nicotiamida-Adenina Dinucleotido fosfato

Nrf2: Factor de transcripción nuclear eritroide tipo 2

O₂: Oxígeno

O₂^{-•}: Anión superóxido

OCR: Ratio de consumo de oxígeno, del inglés Oxygen Consumption Rate

PBS: Tampón Fosfato Salino

PKC: Proteína Kinasa C

REDOX: Reacción de Oxidación-Reducción

ROS: Especies Reactivas de Oxígeno, del inglés Reactive Oxygen Species

SEM: Desviación estándar de la media

SNC: Sistema Nervioso Central

SNCA: Proteína alfa sinucleína

TAS: Estado antioxidante total, del inglés Total Antioxidant Status

TH: Tirosin Hidroxilasa

TNF: Factor de Necrosis Tumoral

VMAT: Transportador vesicular de monoaminas, del inglés Vesicular Monoamine
transporter

6-OHDA: 6-hidroxidopamina o 2,4,5-trihidroxipenilamin

RESUMEN TESIS

La Enfermedad de Parkinson (EP), es el trastorno de movimiento más frecuente, siendo la segunda causa de enfermedad neurodegenerativa en todo el mundo ¹. Se caracteriza por la aparición progresiva de síntomas motores y disautonomía que van en aumento hasta el final de la enfermedad pudiendo producir un grado de dependencia total ^{2,3}.

Ha sido ampliamente estudiado el papel de la pérdida de neuronas dopaminérgicas de sustancia negra mediante la inclusión de cuerpos de Lewy compuestos principalmente por alfa sinucleína fibrilar y ubiquitinada ⁴.

Diversos estudios experimentales apuestan porque una causa importante de pérdida de neuronas dopaminérgicas se produce por las especies reactivas de oxígeno (ROS) ^{5,6}.

Se cree que el estrés puede jugar un papel clave en la EP ⁷, sugiriendo además una conexión entre la disfunción dopaminérgica y la hiperactividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, mediante la liberación de glucocorticoides como repuesta endocrina mediada por el estrés ^{8,9}.

La mitocondria juega un papel fundamental tanto en la producción de ROS como en el daño oxidativo que éstas le pueden causar^{10,11}.

Debido a la gran susceptibilidad que presenta el sistema nervioso central a ROS, cabe pensar que tanto el estrés oxidativo como la disfunción mitocondrial contribuyen de forma significativa a la neurodegeneración en EP al igual que lo hacen en otros trastornos neurológicos como la esclerosis múltiple, Alzheimer o Huntington ¹²⁻¹⁴, llevándonos a estudiar en este trabajo el impacto de los glucocorticoides en un modelo celular de EP por MPP⁺.

Por otro lado, el papel observado del IGF-II como factor neuroprotector y antioxidante en el envejecimiento celular, situaciones de estrés mediadas por glucocorticoides, enfermedades neurodegenerativas como Enfermedad de Alzheimer y trastornos neuropsiquiátricos ¹⁵⁻²⁰, nos han llevado a estudiar también en esta tesis el papel que desempeña esta molécula en un modelo *in vitro* de EP y estrés emocional leve-moderado basado en la administración de la

neurotoxina MPP⁺ y corticosterona (CORT) como marcador de la respuesta endocrina al estrés. Para ello se han medido parámetros de viabilidad y morfología celular; actividad antioxidante y daño oxidativo celular; producción de ROS y función mitocondrial; marcadores dopaminérgicos y de neurodegeneración; y vías de señalización intracelular.

Hemos observado que el IGF-II contrarresta el daño oxidativo-mitocondrial producido por el efecto tóxico del sinergismo de CORT+MPP⁺, protegiendo a las neuronas dopaminérgicas de la neurodegeneración y en última instancia de su muerte. El IGF-II promueve la activación de la PKC y la respuesta antioxidante del Nrf2 en una vía dependiente del receptor de glucocorticoides, previniendo por tanto el daño oxidativo celular y promoviendo el mantenimiento de la función mitocondrial. Por todo ello, podemos concluir que el IGF-II podría ser una herramienta potencial para el tratamiento y prevención de la EP en los pacientes que sufren esta enfermedad y que se ve agravada por el estrés leve-moderado.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La Enfermedad de Parkinson

1.1.1. Epidemiología

La Enfermedad de Parkinson (EP), es el trastorno de movimiento más frecuente y representa la segunda causa de enfermedad neurodegenerativa del sistema nervioso en todo el mundo ¹. El principal factor de riesgo para padecer esta enfermedad es el envejecimiento, siendo los hombres más susceptibles que las mujeres a padecerla ²¹. Así, tanto la incidencia como la prevalencia es de 1,5 a 2 veces mayor en los hombres que en las mujeres ²². Se estima que su prevalencia en países industrializados es del 0,3% de la población general, ascendiendo hasta el 1% en los mayores de 60 años y hasta el 3% en los mayores e 80 años, con una ratio de incidencia de 8-18 por cada 100.000 persona-año ³.

Presenta una edad media de inicio de los síntomas en torno a los 60 años, y una duración media desde que se diagnostica hasta el fallecimiento de unos 15 años, aunque algunos pacientes pueden vivir con esta enfermedad durante décadas ^{3,23}. La edad de inicio en las mujeres se retrasa en aproximadamente dos años respecto a los hombres. Además, las mujeres presentan mayor temblor que los varones. Estudios animales sugieren que los estrógenos presentan un papel protector en la muerte celular de las neuronas dopaminérgicas estriatales, de ahí que el inicio en las mujeres sea posterior al inicio de la enfermedad en los hombres. Los síntomas no motores más prevalentes en las mujeres son ansiedad, depresión, y estreñimiento, mientras que los hombres sufren más de trastornos del sueño, salivación y síntomas relacionados con la esfera sexual ²⁴.

1.1.2. Historia natural de la enfermedad

Se basa fundamentalmente en la disautonomía y síntomas motores progresivos que van apareciendo en el transcurso de la enfermedad, ya descritos desde los primeros artículos por Hoehn y Yahr en 1967 ². La escala de estos autores, es la más comúnmente usada para describir la EP. La

transición en dicha escala del estadio II al III es clave, ya que pone de manifiesto la afectación en la marcha y el equilibrio, lo que conlleva a una alteración de las actividades básicas como caminar, vestirse, realización de autocuidados y actividades de la casa, que en algunos casos presentan un empeoramiento progresivo hasta la dependencia total ³.

1.1.3 Diagnóstico y diagnóstico diferencial de la EP

El diagnóstico de la EP se basa principalmente en los datos clínicos obtenidos a través de una historia clínica minuciosa junto con la exploración física. La historia debe recoger de forma exhaustiva los datos motores y no motores, así como también la historia de los familiares de primer grado con la enfermedad ya que, en caso de haberlos, aumenta la probabilidad de diagnóstico de EP ²⁵. La afectación clínica clásica de la EP se basa en la bradicinesia, el temblor de reposo y la rigidez.

Para la EP clínicamente establecida, los pacientes deben cumplir al menos 2 de los siguientes cuatro criterios:

- Temblor de reposo.
- Mejoría clínica evidente con terapia dopaminérgica (por ejemplo, carbidopa-levodopa).
- La presencia de discinesias inducidas por Levodopa.
- Presencia de pérdida olfativa o denervación simpática cardíaca en gammagrafía miocárdica con yodo 123-meta-yodobencilguanidina ²⁶.

Con respecto a la discinesia, movimientos coreiformes involuntarios similares a un baile, que se produce cuando administramos fármacos agonistas dopaminérgicos, ocurren años después de iniciar el tratamiento para la EP, por lo que tienen un rol limitado en el diagnóstico inicial de la enfermedad ²⁷.

En cuanto a las pruebas complementarias que ayudan al diagnóstico se cuenta con la Dat SPECT (Tomografía computarizada por emisión de fotón único con transportador de dopamina) que identifica la disfunción neuronal de dopamina presináptica presente en la EP y otros parkinsonismos neurodegenerativos, al demostrar una captación reducida de un trazador radiactivo que se une a los

transportadores de dopamina en los ganglios basales. Esta prueba es altamente precisa (98% - 100% de sensibilidad y especificidad) para detectar la pérdida de células nigroestriatales en individuos con parkinsonismo. Además, resulta muy útil cuando el diagnóstico clínico no está claro y, por tanto, apoya el diagnóstico ante situaciones de incertidumbre, pero no se usa en el diagnóstico rutinario de la enfermedad ²⁸.

Las imágenes por resonancia magnética no suelen ser útiles, aunque pueden ayudar a diferenciar la EP de otros parkinsonismos y pueden ayudar a demostrar si se ha producido por causa vascular ²⁹.

1.1.4. Pronóstico en la EP

La EP implica una neurodegeneración progresiva y, por tanto, un incremento progresivo de los síntomas. Un metaanálisis de estudios post mortem encontró que las personas típicamente vivían de 6,9 a 14,3 años después de su diagnóstico, sin embargo, había una heterogeneidad sustancial ³⁰, siendo la progresión de la enfermedad variable. En una evaluación clínico-patológica en la que se propusieron 3 subtipos, el grupo maligno difuso tuvo un tiempo medio desde el diagnóstico hasta el primer hito (caídas regulares, dependencia de silla de ruedas, demencia o colocación residencial / en un hogar de ancianos) de $3,5 \pm 3,2$ años, en comparación con $8,2 \pm 5,3$ años para la forma intermedia y $14,3 \pm 5,7$ años para la forma de predominio motor leve. La supervivencia media después del diagnóstico fue de $8,1 \pm 5,4$ años para el grupo maligno difuso, $13,2 \pm 6,7$ años para el subtipo intermedio y $20,2 \pm 7,8$ años para la forma de predominio motor leve ²⁴.

Se conoce que las personas con EP maligna tienen síntomas más tempranos y graves, respuesta deficiente a los medicamentos y progresión rápida. Sin embargo, la mayoría de las personas con EP tienen una respuesta a la medicación dopaminérgica de moderada a buena, aunque pueden experimentar periodos de desconexión y discinesias ³¹.

El avance en la genómica nos ha permitido estudiar los genes implicados en la EP y sus variantes, mostrando que esta enfermedad es altamente compleja en su etiopatogenia a nivel genético ya que presenta distintas mutaciones tanto para

la EP clásica como para sus variantes ³². Los test genéticos en el diagnóstico de la EP están en aumento y deben utilizarse cuando el inicio de los síntomas se da en menores de 40 años o cuando hay antecedentes familiares de la misma ³³. Los principales genes implicados en la EP se pueden dividir en los que producen un parkinsonismo clásico (PARK-SNCA, PARK-LRRK2, PARK-VPS35 y PARK-CHCHD2), un parkinsonismo de inicio temprano (PARK-parquin, PARK-PINK1, PARK-DJ1), y por último en el de alto riesgo genético con el gen GBA ¹.

1.1.5. Etiopatogenia de la Enfermedad de Parkinson

La etiopatogenia de esta enfermedad se caracteriza por presentar distintas vías y mecanismos que conllevan a su desarrollo. Las más clásicas y aceptadas se deben a la importante pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra, y a la presencia de inclusiones de los cuerpos de Lewy compuestos principalmente de α -sinucleína fibrilar y ubiquitinada, dentro de neuronas nigrales ⁴.

La inmensa producción de especies reactivas de oxígeno (del inglés ROS) en el cerebro podría ser una explicación de la magnitud del papel que desempeña en la EP ya que el cerebro consume un 20% del O₂ producido en nuestro organismo y gran parte de éste se convierte en ROS ³⁴.

Diversos estudios experimentales apuestan porque una causa importante de pérdida de neuronas dopaminérgicas es producida a causa de ROS destacando los radicales de anión superóxido como elementos principales de ROS ^{5,6}.

La cadena transportadora de electrones de la mitocondria es la mayor productora de ROS intracelulares, siendo ésta además objetivo importante de las propias ROS ^{35,36}.

Respecto a la inflamación, su cronicidad puede actuar como factor estresante ambiental para promover la degeneración progresiva de las neuronas dopaminérgicas. En el microambiente del cerebro, las células gliales juegan un papel fundamental en la homeostasis que promueve la supervivencia neuronal. Siendo la microglía la principal responsable en la liberación de citosinas,

quimiocinas, prostaglandinas, especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, así como de factores tróficos³⁷.

El estrés puede jugar un papel clave en la EP. Como se ha comentado, el principal factor de riesgo para padecer EP es la edad, habiéndose demostrado que, a mayor edad, mayores niveles de cortisol⁷. El cortisol está también más elevado en los pacientes con EP respecto a la población general y el tratamiento agudo con levodopa en la EP puede reducir los niveles de cortisol en dichos pacientes, lo que sugiere una conexión entre la disfunción dopaminérgica y la hiperactividad del eje hipotálamo–hipófisis–adrenal⁸. Las situaciones estresantes también pueden participar en el desarrollo de la EP como se pudo observar en un estudio realizado a los prisioneros de guerra, en los que se observó un incremento en EP tras 35 años de haber permanecido presos³⁸.

1.2. Tratamiento farmacológico actual de la Enfermedad de Parkinson

1.2.1. Tratamiento sintomático:

1.2.1.1. Tratamiento dirigido a paliar los síntomas motores:

Las terapias de inicio se basan fundamentalmente en preparados de Levodopa-Carbidopa, agonistas de la dopamina (Pramipexol, Ropinirol, parches transdérmicos de Rotigotina y Bromocriptina) e inhibidores de la monoamino oxidasa - B (Rasagilina y Selegilina)³⁹. En los individuos jóvenes con temblor prominente se pueden usar fármacos anticolinérgicos y Amantadina⁴⁰, aunque hay que tener precaución con el uso de éstos ya que presentan muchos efectos adversos. En el pasado existía reticencia a empezar en formas tempranas con Levodopa, pero estudios posteriores demostraron que el uso de Levodopa de forma temprana es beneficioso a largo plazo. También puede usarse Apomorfina en perfusión en los casos más refractarios⁴¹.

1.2.1.2. Tratamiento dirigido a paliar los síntomas no motores:

1.2.1.2.1. Depresión: para el tratamiento de los síntomas relacionados con la depresión se utilizan los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS) y los

inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina y norepinefrina (ISRSN). Siendo los más utilizados la Paroxetina y Venlafaxina respectivamente por no empeorar los síntomas motores ⁴².

1.2.1.2.2. Apatía: para el tratamiento de la apatía no hay fármacos específicos, pero basado en un pequeño estudio publicado hace unos años, parece que los inhibidores de la acetilcolinesterasa como la Rivastigmina podrían ser útiles ⁴³.

1.2.1.2.3. Ansiedad: de nuevo, ISRS como el Citalopram o la Sertralina, así como ISRSN como la Venlafaxina y la Mirtazapina, y fármacos no selectivos de la recaptación de serotonina como el Bupropion podrían ser útiles⁴⁴. Además el uso de agonistas cannabinoides como la Nabilona ha demostrado disminuir la ansiedad y el insomnio con efectos adversos similares al grupo placebo ⁴⁵.

1.2.1.2.4. Deterioro cognitivo: parece que los fármacos que mayor beneficio pueden aportar a los pacientes con EP y demencia son los inhibidores de la acetilcolinesterasa⁴³.

1.2.1.2.5. Psicosis: el antipsicótico con mayor evidencia científica para el tratamiento de la psicosis relacionada con la EP es la Pimavanserina ⁴⁶. También se puede usar Quetiapina aunque su evidencia y eficacia es mixta ⁴⁷.

1.2.1.2.6. Insomnio: para los pacientes con EP que sufren de este problema los fármacos que mayor beneficio aportan son la Melatonina ⁴⁸ y un antidepresivo tricíclico llamado Doxepina ⁴⁹.

1.2.1.2.7. Somnolencia diurna y fatiga: se recomienda ajustar el tratamiento con Levodopa–Carbidopa, así como tratar los problemas nocturnos que pueden llevar a producir esa falta de sueño y cansancio durante el día. Los fármacos más usados y con mayor evidencia si no funciona lo anterior son la Amantadina y el Metilfenidato⁵⁰.

1.2.1.2.8. Disfagia: para la prevención de la disfagia se han usado fármacos agonistas dopaminérgicos de forma temprana pero existe controversia al respecto ⁵¹.

1.2.1.2.9. Disfunción autonómica:

1.2.1.2.9.1. Estreñimiento: para combatir el estreñimiento se han usado laxantes osmóticos como el Polietileno glicol, probióticos y prebióticos ⁴³.

1.2.1.2.9.2. Rinorrea: para combatir este síntoma el fármaco propuesto es Bromuro de Ipratropio en spray nasal ⁵².

1.2.1.2.9.3. Disfunción eréctil: el fármaco más usado es el Sildenafil ⁵³, pudiéndose usar también, Tadalafil, Vardenafil y administración de prostaglandinas intrauretral ⁵⁴.

1.2.1.2.9.4. Hipotensión ortostática: ésta se produce por la propia enfermedad o por el uso de agonistas dopaminérgicos, Levodopa e inhibidores de la MAO - B. Los fármacos más usados para el tratamiento de este síntoma incluyen la Droxidopa, Fludrocortisona y Midodrina ⁴³.

1.2.2. Nuevas estrategias en investigación:

1.2.2.1. Nrf2: Los activadores del Nrf2 reducen los procesos inflamatorios, el estrés oxidativo y la proteínopatía asociada a EP ^{55,56}.

1.2.2.2. TNF: Los anticuerpos anti TNF parecen tener un papel protector en la neuroinflamación en EP como se observó en una cohorte retrospectiva de pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal, en la que los pacientes que recibían tratamiento con un anti TNF desarrollaban menos EP ⁵⁷.

1.2.2.3. GLP1: El tratamiento con Semaglutida y Liraglutida (análogos de GLP1), aumenta la autofagia, inhibe el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial en la EP ⁵⁸.

1.2.2.4. COX2: Los Antiinflamatorios no esteroideos selectivos previnieron la inflamación en los modelos de EP con Rotenona en roedores ⁵⁹.

En diferentes enfermedades neurodegenerativas, entre ellas la EP, se observa una considerable disfunción mitocondrial que incluso ha llevado a agruparlas como mitocondriopatías ⁶⁰. Este hecho pone de manifiesto la importancia de encontrar herramientas terapéuticas que actúen sobre el daño oxidativo-mitocondrial producido, el cual puede agravarse en situaciones de estrés.

1.3. Enfermedades neurodegenerativas: relación con estrés oxidativo y disfunción mitocondrial

El estrés oxidativo causado principalmente por ROS juega un papel crucial en fases tempranas y tardías de diferentes trastornos neurológicos ^{13,61}. La mitocondria, además de ser la principal fuente de generación de energía celular es también una de las principales fuentes celulares de productos prooxidantes ¹⁰, ya que durante el proceso de transporte electrónico a través de la cadena respiratoria mitocondrial (CRM), un pequeño porcentaje (menos de un 5 %) de los electrones que fluyen a través de la misma, escapan y se unen directamente al O₂ formando anión superóxido (O₂⁻) ¹¹. Dada la gran susceptibilidad del sistema nervioso central (SNC) a ROS, cabe pensar que el estrés oxidativo, junto con la disfunción mitocondrial, contribuyan de forma significativa a la neurodegeneración en EP, al igual que en otros trastornos neurológicos como esclerosis múltiple, Alzheimer o Huntington ¹²⁻¹⁴.

Para contrarrestar el desequilibrio producido ante una elevada producción de ROS, la célula cuenta con mecanismos de defensa, formados entre otros, por la fracción del pool antioxidante (TAS, por sus siglas en inglés: Total Antioxidant Status) y enzimas antioxidantes como la glutatión peroxidasa (GPX) ⁶², que ayuda a proteger la célula catalizando la reducción del peróxido o lipoperóxido mediante el uso del glutatión reducido ^{63,64}. En este sentido cabe destacar la regulación de la expresión de genes de estas enzimas antioxidantes a través de factores de transcripción, entre ellos el factor nuclear eritroide 2 (Nfr2) considerado clave en la regulación bioenergética mitocondrial y de la homeostasis REDOX ⁶⁵.

El factor Nrf2, regula la expresión de más de 250 genes implicados en acciones antioxidantes ⁶⁶, siendo la activación de la vía de señalización del Nrf2 un mecanismo importante en la defensa celular contra el estrés oxidativo o electrófilo ^{67,68} y la disfunción mitocondrial ⁶⁹. Este factor responde ante el estrés oxidativo mediante su translocación al núcleo y unión a una secuencia específica de DNA conocida como ARE (Antioxidant Response Element) induciendo así la expresión de enzimas antioxidantes ^{13,70}, esenciales para el control de la homeostasis mitocondrial, la regulación de la apoptosis y la viabilidad celular relacionada con procesos neurodegenerativos ⁷¹. En este sentido, la regulación de la expresión de Nrf2 para el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas es cada vez más patente ^{64,66}.

Estudios realizados en tejido cerebral post-mortem de pacientes con EP han confirmado la presencia de disfunciones a nivel del complejo mitocondrial ^{72,73}, con disminución de la producción de ATP y aumento del estrés oxidativo ⁷⁴.

En cuanto a la distribución mitocondrial observada mediante la sonda fluorescente MitoTracker™ Green FM (MTG), se produce una alteración de la distribución de las mismas, que en condiciones normales son fusiformes, con distribución homogénea a lo largo de la neurona tanto en el cuerpo como en el axón; mientras que en situación de disfunción mitocondrial debido al estrés oxidativo, se localizan de forma más desorganizada con predominio en el cuerpo respecto al axón y son más grandes y esféricas ⁷⁵.

Estas consideraciones, unidas a las alteraciones observadas en los niveles/actividad de Nrf2 en enfermedades como esclerosis múltiple, Huntington o Parkinson ^{61,76-78}, sugieren que mantener o recuperar la homeostasis REDOX y la función mitocondrial en dichas enfermedades neurodegenerativas, puede ser considerado como una diana terapéutica ante este tipo de trastornos ^{79,80}.

1.4. Estrés y eje HPA

La respuesta al estrés es activada mediante el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HPA) y el sistema simpático adrenomedular. La rápida respuesta al estrés es mediada por la activación de los nervios simpáticos espláncnicos que conllevan la liberación de catecolaminas en la médula adrenal. El estrés además produce

la liberación de hormona liberadora de corticotropina (CRH) y hormona antidiurética o argenina vasopresina (AVP). Éstas conllevan la liberación de ACTH desde la pituitaria, activando la producción de glucocorticoides (GC) y mineralocorticoides en la corteza adrenal (Fig. 1) ⁹.

Los GC se unen a los receptores de mineralocorticoides y de glucocorticoides (GR) actuando como factores de transcripción ⁸¹. De tal forma, que una vez secretados, los GC producen la regulación de varios procesos fisiológicos como el metabolismo y la respuesta inmune. Diversos estudios demuestran que los GC pueden ejercer tanto una acción antiinflamatoria como proinflamatoria en función del tipo celular sobre el que actúan y su concentración ⁸². Distintos autores han puesto de manifiesto que tras un estrés agudo se produce un aumento de los niveles de GC y de mediadores inflamatorios ⁸³⁻⁸⁵.

Además, los GC pueden activar a la proteína kinasa C a través de los receptores de glucocorticoides (GR) ⁸⁶, pudiendo producir a su vez la activación del factor de transcripción nuclear Nrf2 ⁸⁷.

La administración de corticosterona (CORT) induce estrés oxidativo con aumento de los niveles de ROS y bloqueo de la actividad mitocondrial consiguiendo una disminución de la producción de ATP mitocondrial en neuronas hipotalámicas ⁸⁸.

El estrés emocional también puede empeorar los síntomas motores por su efecto agudo en la función nigroestriatal. La aparición de EP tras un periodo estresante puede reflejar el daño previo de la sustancia nigroestriada en un estado preclínico ⁸⁹.

dopamina extracelular. Esto, apoya la idea de que el estrés puede modular el daño en el sistema nigroestriatal ⁹². Ambos estudios indican que el estrés afecta a nivel dopaminérgico en el control motor, y que los GC posiblemente afectan a la respuesta compensatoria del sistema motor dañado ⁹³. Otras formas de estrés pueden influir en la estructura nigroestriatal y función motora en modelos animales como por ejemplo la separación materna de ratas a edades tempranas ⁸.

En cuanto al papel del eje HPA en la EP, se ha postulado que una desregulación del eje puede traducirse en niveles elevados de cortisol pudiendo contribuir a la progresión de la misma, así como exacerbar los síntomas motores. Se cree que el estrés crónico puede producir unas condiciones energéticas desfavorables para las neuronas provocando la degeneración de éstas. Además, la administración de Levodopa en la EP reduce la actividad del eje HPA, presentando una disminución en los niveles de cortisol significativamente mayor en los pacientes que se encuentran en un estadio más avanzado de la EP ⁹⁴.

1.5. Modelos celulares de la EP

Para la obtención de modelos celulares de esta enfermedad, como en otros casos, se pueden utilizar líneas celulares provenientes tanto de humanos como de roedores, cultivos primarios embrionarios o de animales adultos, cultivos organotópicos, y la inducción de células pluripotenciales ⁹⁵, como se detalla a continuación en la figura 2.

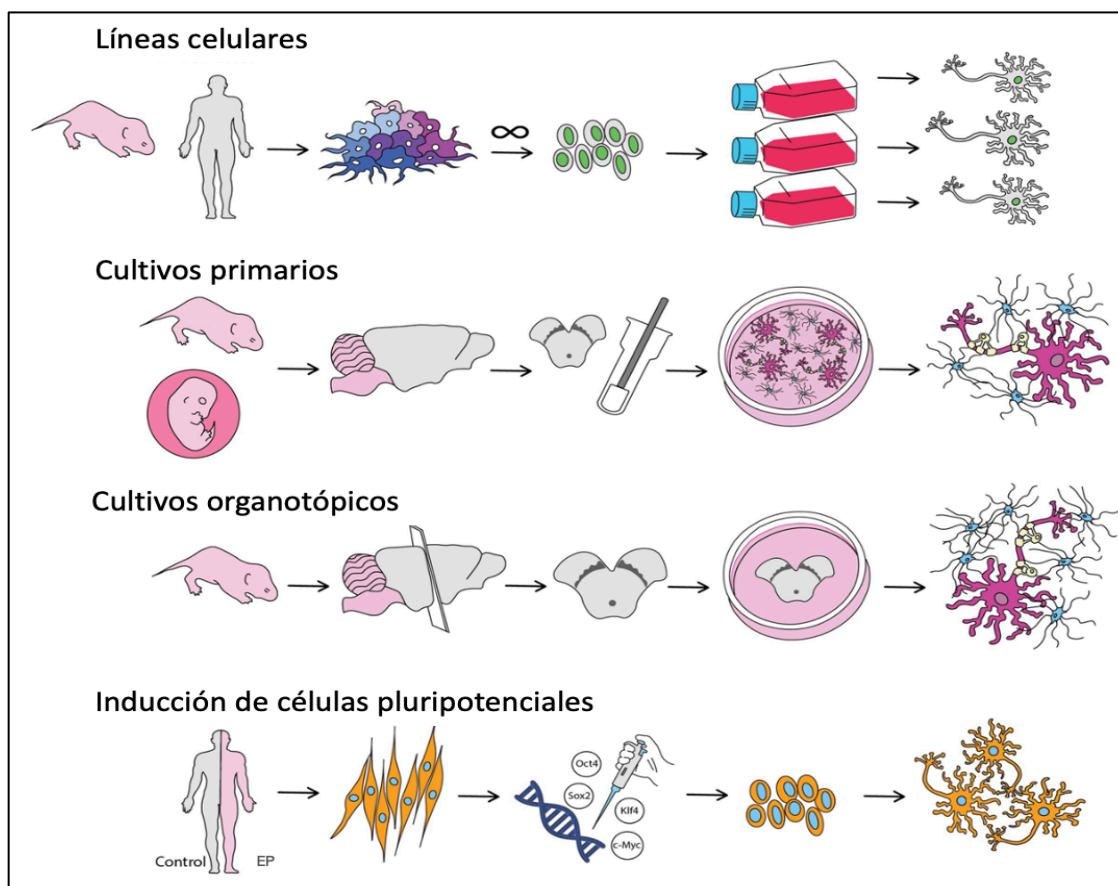


Fig. 2: Adaptación de López et al 2017 ⁹⁵. Diferentes métodos para la obtención de modelos celulares de enfermedad

Con el fin de conseguir que las células se dañen y simular el daño producido en la EP, se pueden realizar diferentes procedimientos, siendo los más utilizados los que se describen a continuación:

1.5.1. Mediante neurotoxinas: para producir la EP a nivel celular se pueden usar tres toxinas principalmente: 6-OHDA, rotenona y MPP⁺. El 6-OHDA a nivel celular produce daño neuronal tanto por la rápida oxidación que sufre produciendo ROS como el peróxido de hidrógeno, los radicales superóxido y los radicales hidroxilo que conducen a la disfunción mitocondrial ⁹⁶, como por el acúmulo en el citosol donde inhibe a las enzimas de los complejos I y IV de la CRM, disminuyendo la síntesis de ATP y produciendo por tanto la muerte celular ⁹⁷. La Rotenona inhibe el complejo mitocondrial tipo I ⁹⁸. El MPP⁺ a nivel intracelular principalmente se une en su mayor parte al transportador vesicular de monoaminas (del

inglés VMAT), pero una pequeña cantidad se absorbe a través de las mitocondrias inhibiendo la actividad del complejo mitocondrial tipo I. Este proceso altera el transporte de electrones a lo largo de la CRM, disminuyendo la producción de ATP y aumentando la generación de ROS. La combinación de estos efectos son probablemente los responsables del inicio de activación de las vías de señalización relacionadas con la muerte celular ^{99,100}.

1.5.2. Modelos basados en la inclusión de fibrillas preformadas: se basan en la producción mediante agitación de las mismas por agregación. Para ello se necesita la agitación constante de alfa sinucleína humana monomérica recombinante. Una vez producidos estos agregados, se inoculan al cultivo celular, donde producirán la pérdida de viabilidad de las neuronas por el mismo mecanismo que ocurre en la EP ^{101,102}.

1.5.3. Modelos derivados de células madre pluripotenciales: se consiguen mediante la expresión de cuatro factores transcripcionales, Oct3/4, c-Myc, Sox2 y Klf4. Este tipo de modelo ofrece la ventaja de que se pueden realizar directamente en células aisladas de pacientes con ciertas mutaciones que han proporcionado información importante sobre la patología molecular de la EP. La manipulación de estos modelos es muy rápida en comparación con modelos animales ^{96,103,104}.

1.5.4. Modelos genéticos: los modelos genéticos se basan en la manipulación de los genes diana en la EP, que se pueden realizar principalmente mediante la expresión transgénica de mutantes o sobreexpresión de genes autosómicos dominante de tipo salvaje como los SNCA, o mediante la desactivación de genes autosómicos recesivos como los DJ – 1, PINK – 1. Dentro de ellos, los modelos basados en agregados proteicos anómalos de α sinucleína son los más estudiados y usados hasta la fecha ¹⁰⁵.

En la actualidad, no hay modelos celulares que estudien el efecto del estrés emocional en la EP, aunque sí existen modelos animales en los que se demuestra la asociación del estrés con dicha enfermedad como

potencial de riesgo para la neurodegeneración ^{8,106}. En estos modelos se empleó el uso de corticosterona como marcador de la respuesta endocrina al estrés ¹⁰⁷, por lo que basándonos en los resultados obtenidos en las publicaciones de los modelos animales junto con las publicaciones sobre modelos celulares de estrés oxidativo inducido por corticosterona ^{17,18}, en este trabajo, decidimos utilizar la corticosterona como marcador de estrés hormonal en un modelo *in vitro* de EP inducido por la neurotoxina MPP⁺.

1.6 Factor de crecimiento insulínico tipo II (IGF - II) y receptor del factor de crecimiento insulínico tipo II (IGF - IIR)

El IGF-II es una hormona ampliamente distribuida por todo el SNC de los vertebrados, incluyendo por supuesto la sustancia negra, plexos coroideos, meninges, sistema vascular cerebral, núcleos del hipocampo y cerebro medio. Sus funciones están reguladas por su unión a los receptores de los factores de crecimiento similares a insulina (IGF), es decir, receptor de IGF-I (IGF-IR) y receptor específico IGFII/Manosa-6-Fosfato (IGF-IIR), así como al receptor de Insulina (IR) ¹⁰⁸.

Es conocida desde estadios embrionarios, la expresión del receptor específico IGF-IIR abundante en plexos coroideos, meninges y red vascular, así como en distintos núcleos del hipocampo, corteza cerebral, cerebelo y otras zonas del cerebro medio ¹⁰⁹ manteniéndose ampliamente distribuido en el cerebro adulto ^{108,110}. El IGF-II está involucrado en la homeostasis energética, el crecimiento y desarrollo, pero sus funciones en el individuo adulto son poco conocidas. Así recientemente, se ha propuesto que los efectos de IGF-II, independiente o sinérgicamente con IGF-I, pueden ser relevantes no solo para las funciones mencionadas, sino también en procesos de aprendizaje y memoria, modulando la liberación de neurotransmisores, la neurogénesis hipocampal adulta y la plasticidad sináptica ¹¹¹⁻¹¹³.

Sin embargo, el IGF-II no se ha estudiado mucho en adultos a pesar de tener múltiples e importantes funciones en la homeostasis celular, crecimiento y

desarrollo, en un principio estudiadas sólo para el aprendizaje y la memoria tanto en sinergia con el IGF-I como de forma independiente ^{114,115}.

Recientemente hay nuevas evidencias que proponen el IGF-II como un factor neuroprotector en condiciones en las que se conoce que hay un daño celular, como en las enfermedades neurodegenerativas ¹¹⁶. El IGF-II ha demostrado tener actividad neuroprotectora y antioxidante en el envejecimiento celular, en situaciones de estrés mediadas por glucocorticoides, enfermedades neurodegenerativas como la Enfermedad de Alzheimer y trastornos neuropsiquiátricos ¹⁵⁻²⁰.

Los mecanismos por los que el IGF-II constituye un factor neuroprotector se encuentran aún en estadios iniciales de investigación. Un aspecto clave en la función del IGF-IIR, es el tipo de célula donde se encuentra. Existen funciones asociadas a este receptor como son la activación y limpieza de ligandos extracelulares, formación lisosomal, y la activación de señales específicas de transducción. Sin embargo, esto último no se conocen con detalle ^{117,118}. El IGF-IIR, es un receptor de tipo II, por lo que se une a proteínas G, poniendo en marcha cascadas de señalización intracelular. Se conoce su implicación en la activación de la fosfolipasa C produciendo aumento del calcio intracelular, y en la fosforilación de la proteína kinasa C, activándose ésta y por consiguiente la liberación de acetilcolina. Esta proteína kinasa C también se ve modulada por los corticoides y las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Fig. 3) ^{86,119}. Por otro lado también se ve implicado en la activación de la GSK3.

Además a parte de las acciones intracelulares mediadas a través de la proteína G, IGF-IIR se encuentra involucrado en la activación del tráfico endolisosomal dando lugar a la autofagia entre otros ^{109,110,120}.

El IGF-II, principalmente a través de su interacción con IGF-IIR, presenta efectos antioxidantes y/o neuroprotectores en diferentes condiciones experimentales y clínicas relacionadas con el envejecimiento, el estrés mediado por glucocorticoides, la enfermedad de Alzheimer, esquizofrenia, autismo y EP ^{15-19,121}.

La existencia del IGF-IIR en todos los lugares de lesión neuronal característicos de la EP, puede indicar que los posibles efectos neuroprotectores de IGF-II en este trastorno neurodegenerativo, impliquen la participación de este receptor^{110,122}.

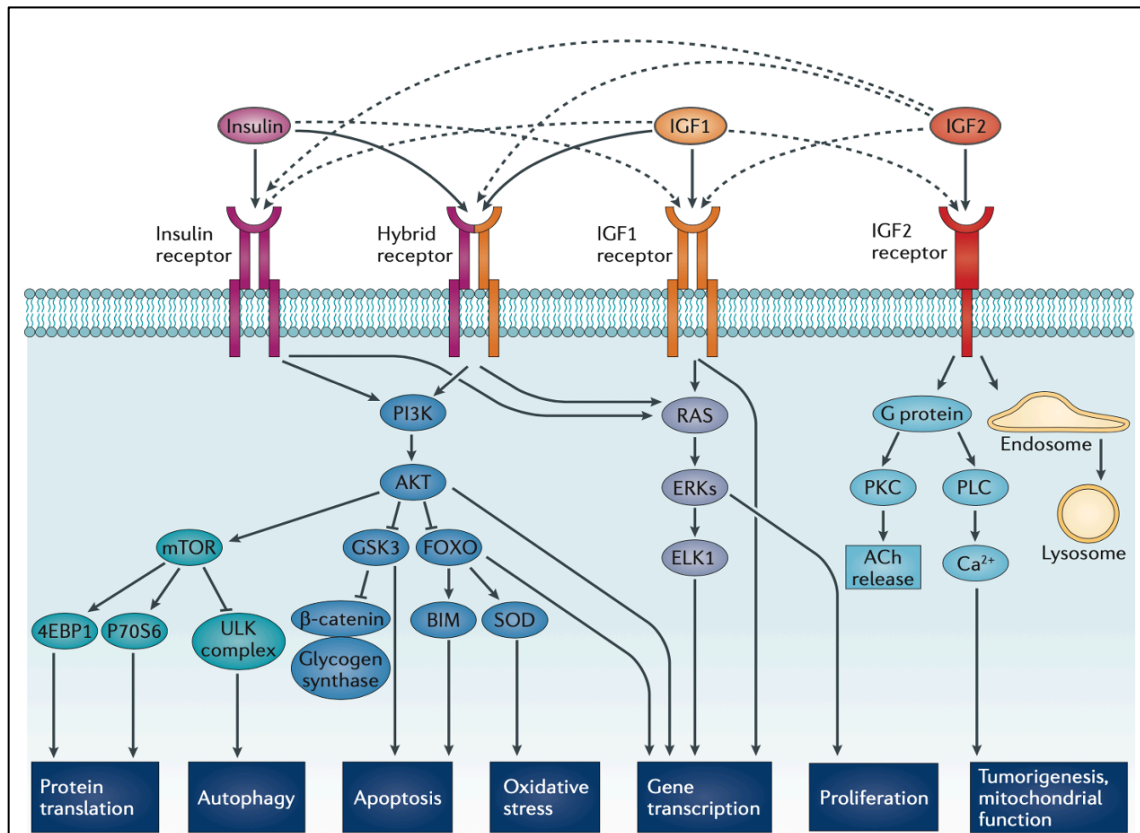


Fig. 3: Afinidad relativa de insulina, IGF-I e IGF-II y señales de transducción de los receptores de insulina, IGF-I e IGF-II. El receptor de IGF-II puede inducir endocitosis de ligandos extracelulares, tráfico lisosomal y activación de mediadores celulares a través de proteínas G. La afinidad relativa de IGF-I, IGF-II e insulina para cada receptor es diferente. Las flechas discontinuas indican baja afinidad de los ligandos por los receptores. Adaptación de ¹⁰⁹.



2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La EP representa la segunda causa de enfermedad neurodegenerativa del sistema nervioso en todo el mundo ¹.

A pesar de que desde décadas se ha estudiado el papel de la pérdida de neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra mediante inclusión de cuerpos de Lewy formados principalmente por alfa sinucleína fibrilar y ubiquitinada ⁴, nuevas investigaciones plantean la importancia que podría tener el estrés emocional en los pacientes con EP, hecho que estaría relacionado con un incremento de glucocorticoides a nivel del eje HPA. Este aumento de glucocorticoides a su vez podría incrementar el estrés oxidativo, la inflamación, y la disfunción mitocondrial. Por lo que podrían ser dianas importantes tanto para el desarrollo como para el empeoramiento de la EP ^{5,35,36,69}.

Investigaciones recientes ponen de manifiesto el papel del IGF-II en cuanto a la neuroprotección, actividad antioxidante en el envejecimiento celular, protección en situaciones de estrés mediadas por glucocorticoides, y enfermedades neurodegenerativas como Enfermedad de Alzheimer y trastornos neuropsiquiátricos ¹⁵⁻²⁰.

Por lo expuesto, la **hipótesis principal** del presente trabajo se ha centrado en el papel protector del IGF-II en un modelo celular de EP y estrés emocional leve-moderado.

De acuerdo con lo anterior, se estableció el **objetivo principal**:

Estudiar el efecto del IGF-II en un modelo *in vitro* de EP y estrés emocional leve-moderado basado en la administración de la neurotoxina MPP⁺ y CORT (como marcador de la respuesta endocrina al estrés).

Además, se establecieron los siguientes **objetivos secundarios**:

- Puesta en marcha de un modelo *in vitro* sobre neuronas dopaminérgicas como base de un modelo combinado de EP y estrés emocional leve-moderado, a través del análisis del daño oxidativo-mitocondrial y la

neurodegeneración producida tras la administración de CORT, MPP⁺, y la combinación de ambos tóxicos.

- Determinar el efecto de IGF-II sobre el daño inducido por la coadministración de MPP⁺ y CORT en neuronas dopaminérgicas en relación con el daño oxidativo-mitocondrial.
- Analizar el efecto de IGF-II sobre el daño inducido por la coadministración de MPP⁺ y CORT en neuronas dopaminérgicas respecto a la expresión de marcadores dopaminérgicos y neurodegeneración.
- Identificar vías de señalización intracelular implicadas en el efecto de IGF-II sobre el daño inducido por la coadministración de MPP⁺ y CORT en neuronas dopaminérgicas.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Cultivo celular y tratamiento

Para el desarrollo de este trabajo se usó la línea celular SN4741 derivada de células neuronales dopaminérgicas de sustancia negra de ratón transgénico (CBA/J x C57BL/6) F2 SV40-tsA58¹²³ (cedida por el Dr. Ernest Arenas, División de Neurobiología Molecular del Departamento de Bioquímica Médica y Biofísica, Instituto Karolinska de Estocolmo, Suecia).

Las células se cultivaron en el medio indicado para esta línea celular (DMEM 4,5 g/L glucosa, 10% FBS, 2 mM L-glutamina, 1% penicilina/estreptomicina 10.000 U/mL, Gibco-Thermo Fisher Scientific) en condiciones estándares de incubación (37°C, 5% CO₂ y humedad controlada). Se esperó a obtener una confluencia de entre el 70 y el 80% para realizar tanto los subcultivos como los experimentos. El tipo de soporte o placa y la densidad celular sembrada se determinó en función de las técnicas a realizar, utilizándose placas multipocillo de 24, 12 y 6 pozos a las concentraciones de 20.000, 50.000-100.000 y 200.000 células por pozo respectivamente. Los tratamientos se aplicaron tras 24 h de crecimiento.

Para estudiar el consumo de oxígeno mitocondrial, realizar los estudios inmunocitoquímicos y la tinción de Giemsa, los pocillos se pretrataron con 100 µg/mL de poli-D-lisina (Merck/Millipore-Sigma). Para las técnicas de microscopía, las células se sembraron sobre cubreobjetos redondos acoplados en placas de 12 pocillos.

Los tratamientos se realizaron en solución de Locke modificada (137 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 10 mM KCl, 25 mM glucosa, 10 mM HEPES, pH: 7,4), suplementada con un 1% de penicilina/estreptomicina y 2 mM L-glutamina¹⁸. Las células se incubaron con 200 µM del metabolito activo de la neurotoxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina, el 1-metil-4-fenilpiridinio o MPP⁺ (nº CAS: 36913-39-0), 0,5 µM de CORT (nº CAS: 50-22-6) (Merck/Millipore-Sigma), y 25 ng/mL IGF-II (proporcionado por Laboratorios Lilly, Madrid, España) durante 2,5 o 6 h en función del tipo de experimento a desarrollar (Fig. 4). Los efectos neuroprotectores de IGF-II considerados a tiempo final se estudiaron a las 6 h y el análisis de los mecanismos implicados a las 2,5 h.

La molécula BMS-536924 a la concentración de 1 μM (nº CAS: 468740-43-4, Tocris Bioscience) se usó para inhibir el efecto tirosinkinasa de los receptores IGF-I e insulina, y como inhibidor del efecto glucocorticoideo de CORT se usó Mifepristona (MIFE) a una concentración de 10 μM (nº CAS: 84371-65-3, Merck/Millipore-Sigma).

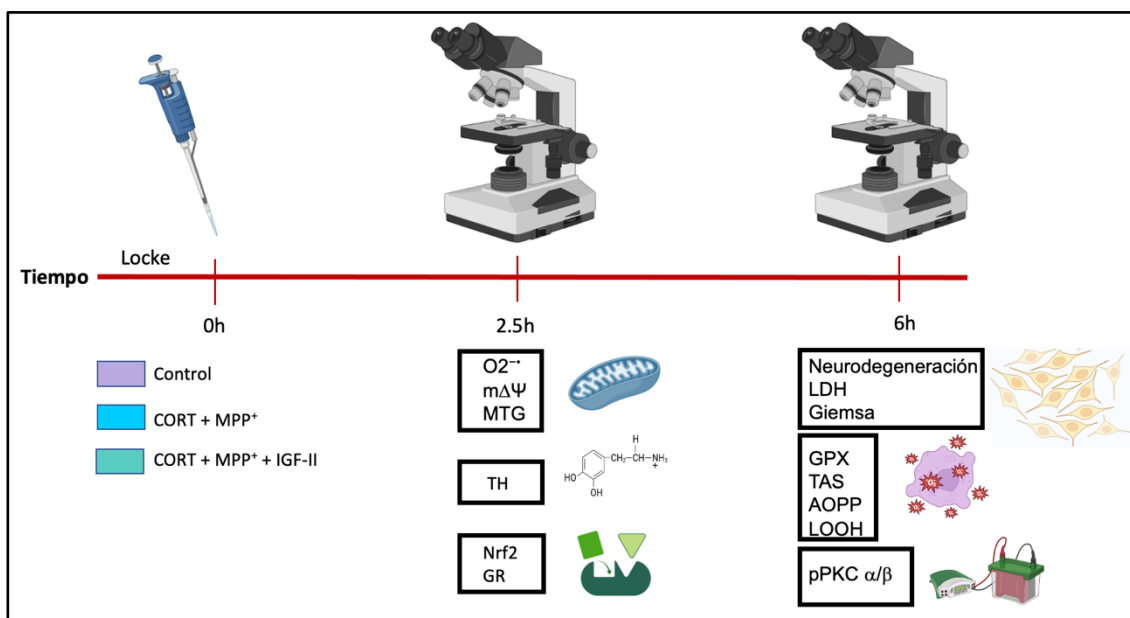


Fig. 4: Representación temporal del experimento.

3.2. Expresión de receptores

Antes de iniciar el estudio, se comprobó si la línea celular SN4741 expresaba los receptores específicos para IGF-II (IGF-IIR) y para glucocorticoides (GR) a través de la técnica de inmunocitoquímica. Tras el crecimiento de las células, se procedió a su fijación con metanol absoluto durante 20 min a -20°C , después se lavaron con PBS, y se incubaron con los anticuerpos primarios anti-IGF-IIR (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, R&D System) y anti-GR (1/250, Abcam) en PBS/3% BSA y acida sódica 0,02% a 4°C durante 24 h. Tras lavar las muestras se incubaron con los anticuerpos secundarios fluorescentes Alexafluor™ 568 y Alexafluor™ 488 (2 gotas/mL, Thermo Fisher Scientific) diluidos en PBS/3% BSA durante 30 min a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente, los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos con Fluoromount™ (Merck/Millipore-Sigma). Las imágenes se adquirieron en un microscopio confocal de la marca LEICA, modelo SP 5II y se procesaron mediante el uso del software LAS AF Lite (Leica Microsystems AG).

3.3. Muerte celular

Se determinó la liberación al medio de LDH (Lactato deshidrogenasa, EC 1.1.1.27), enzima que es liberada al espacio extracelular o medio de cultivo, caso de este estudio, tras producirse un daño. Esta enzima es ampliamente utilizada como marcador de muerte celular en estudios experimentales y clínicos ¹²⁴. Para ello se usó un kit comercial de ensayo espectrofotométrico (Laboratorios Randox) adaptado al autoanalizador ICubio (ICubio Biomedical Technology). Así, tras 6 h de tratamiento, se midieron los niveles de LDH en sobrenadante libre de células, expresándose los resultados para cada situación experimental en tanto por ciento en relación con LDH total (medio y células lisadas con Triton XTM-100).

3.4. Visualización de la morfología celular

Para examinar los cambios morfológicos celulares tras 6 h desde la administración de los tratamientos se tiñeron las células con solución de Giemsa al 10% durante 10 min a temperatura ambiente ⁷⁵. Previamente, las células se fijaron con metanol absoluto 20 min a -20°C. Las muestras se montaron sobre portaobjetos fijándose con DPX (Merck/Millipore-Sigma). Con la finalidad de poder examinar las estructuras celulares (membrana, citoplasma y núcleo) se tomaron imágenes en campo claro con un microscopio de la marca Olympus, modelo U-HGLPS BX53F.

3.5. Actividad antioxidante y daño oxidativo celular

Previo a la cuantificación de los siguientes marcadores por espectrofotometría y tras 6 h de incubación con los diferentes tratamientos, se procedió a la obtención de homogeneizados celulares de cada situación experimental. Así, las células se resuspendieron en una solución (10 mM HEPES, 10 mM KCl, pH: 7,4) que contenía inhibidores de proteasas (Thermo Fisher Scientific), se homogeneizaron en presencia de digitonina (0,01%) a 4°C y se centrifugaron a 15.000 g 30 min a 4°C. En el sobrenadante se realizaron las determinaciones ¹⁷. Para la determinación de la concentración de proteínas se usó el método de Bradford ¹²⁵.

Se determinó la actividad de la enzima Glutación Peroxidasa (E.C.1.11.1.9) o GPX a través del kit comercial Ransel (Laboratorios Randox) adaptado al autoanalizador ICubio (ICubio Biomedical Technology) ¹²⁴. Donde la unidad de actividad se definió como la oxidación de 1 μ mol de NADPH a NADP por min a 37°C.

La fracción del pool antioxidante (TAS, por sus siglas en inglés: Total Antioxidant Status), y el daño oxidativo celular, definido como los niveles de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) y los productos de oxidación avanzada de proteínas (AOPP), fueron evaluados a partir de los siguientes métodos también adaptados al autoanalizador ICubio:

TAS: Método ABTS ¹²⁶ basado en la producción del radical ABTS^{•+} usando ABTS[™] (Merck/Millipore-Sigma) en presencia de peroxidasa (metamioglobina) y H₂O₂.

LOOH: Método FOX2 ¹²⁷, basado en la detección de la oxidación ferrosa en xilenol naranja.

AOPP: Ensayo desarrollado por Witko-Sarsat y colaboradores ¹²⁸ basado en la detección de equivalentes de cloramina T obtenidos por la oxidación.

Los niveles de estos marcadores se expresaron como nmol/mg de proteína y μ mol/mg de proteína (caso del TAS).

3.6. Marcadores mitocondriales

3.6.1. Distribución mitocondrial

Para localizar las mitocondrias en las distintas condiciones de tratamiento se utilizó la sonda fluorescente MitoTracker[™] Green FM (MTG) (excitación 488 nm/emisión ~530 nm, Thermo Fisher Scientific) ^{75,129}. El núcleo se marcó con la sonda de unión al ADN fluorescente rojo lejano DRAQ5[™] (excitación 647 nm/emisión 665 nm, Thermo Fisher Scientific). Las células se incubaron en 75 nM MTG y 10 μ M DRAQ5 durante 30 min a 37°C, se lavaron con solución de Locke y se observaron en un

microscopio confocal (LEICA, modelo SP 5II) a las 2,5 horas. Las imágenes se adquirieron en el microscopio confocal y se procesaron con el software LAS AF Lite (Leica Microsystems AG).

3.6.2. Niveles mitocondriales de especies reactivas de oxígeno

Los niveles de la producción mitocondrial del anión superóxido $O_2^{\cdot-}$, se midieron a las 2,5 h de incubación con el test comercial MitoSOX™ Red (Thermo Fisher Scientific) y en el citómetro de flujo Accur™ C6 (BD biosciences) ^{75,130}. Para su análisis se utilizó el programa informático FCS 5 software (De Novo Software) teniendo en cuenta los eventos registrados (10.000 células por situación). Treinta minutos antes del final de la incubación, se añadió a cada situación 2,5 μ M de la sonda fluorescente. Tras retirar el medio, las células se lavaron con solución de Locke, se despegaron con accutase® (Gibco-Thermo Fisher Scientific) y se resuspendieron en Locke. Finalmente, se analizaron en el citómetro anteriormente indicado utilizando el filtro (FL2) 585/40 nm.

3.6.3. Potencial de membrana mitocondrial

La medida del potencial de membrana mitocondrial ($m\Delta\Psi$) se realizó mediante el uso de la sonda lipofílica catiónica, 5, 5, 6', 6' tetracloro-1,1', 3, 3' tetraetil bencimidazol carbocianina yoduro o JC-1 (Merck/Millipore-Sigma) ^{75,131}. Veinte minutos antes del final de la incubación (2,5 h), se añadió a cada situación 1 μ g/mL de JC-1. Como en la técnica anterior, tras retirar el medio, las células se lavaron con solución de Locke, se despegaron con accutase®, resuspendieron en Locke y se analizaron en el citómetro indicado anteriormente, utilizando en este caso los filtros FL1 (530/30 nm) y FL2 (585/40 nm), el mismo software, y el mismo número de eventos. Para provocar el colapso completo del $m\Delta\Psi$ se usó el ionóforo de potasio valinomicina (1 μ M, Merck/Millipore-Sigma). El $m\Delta\Psi$ se expresa como ratio FL2/FL1 debido a que la sonda puede encontrarse en el interior de la mitocondria en forma de monómeros o como agregados. Cuando el $m\Delta\Psi$ es elevado, JC-1 se agrega y tras la excitación a 488 nm emite en el canal naranja/rojo; mientras que cuando el potencial de

membrana se colapsa, disminuye el número de agregados de JC-1 y aumenta, en consecuencia, el número de monómeros que emiten en el canal verde. Este comportamiento indica que la proporción de fluorescencia FL2/FL1 depende únicamente del $m\Delta\Psi$ y no de la forma, tamaño o densidad.

3.6.4. Tasa de consumo de oxígeno mitocondrial

También llamada OCR por sus siglas en inglés (Oxygen Consumption Rate), se monitorizó a tiempo real mediante el analizador Seahorse Bioscience XF24 (Agilent Technologies) ^{132,133}. Para ello, es necesario sembrar las células en placas específicas de 24 pocillos (densidad 20.000 células) y utilizar, durante el análisis, un medio de cultivo específico sin rojo fenol (Agilent Seahorse XF Base Medium). Así, tras incubar las células, se realizó un lavado con PBS y se añadieron 590 μL del medio específico suplementado (1mM piruvato, 25 mM glucosa) a cada pocillo. Tras equilibrar la placa durante 15 min, se procedió al desarrollo del test Seahorse XF Cell Mito Stress que, a partir de la OCR, además de determinar el consumo de O_2 debido a la respiración basal, proporciona la medida de importantes parámetros funcionales de la mitocondria tras la administración secuencial durante 90 min de los siguientes moduladores de la respiración celular (Fig. 5)¹³⁴.

Oligomicina, macrólido que actúa inhibiendo la fosforilación oxidativa a través del bloqueo del canal de protones de la ATP sintasa (concentración: 1 μM). Su administración ocasiona una disminución de la OCR basal mostrando así el consumo de O_2 utilizado para producir ATP. La respiración basal restante se denomina fuga de protones.

Carbonilcianuro-4-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP), agente desacoplante que provoca la estimulación máxima de la cadena respiratoria consiguiendo la máxima respiración celular (concentración: 0,5 μM). A partir de este parámetro se puede calcular la capacidad respiratoria de reserva de la célula o capacidad de respuesta ante una

demanda energética (diferencia entre respiración máxima y respiración basal).

Rotenona/Antimicina A (0,5 μ M/ 0,5 μ M), inhibidores de los complejos I (NADH deshidrogenasa) y III de la cadena transportadora de electrones respectivamente. Su administración inhibe por completo el consumo de O_2 mitocondrial, quedando solo el consumido por un subconjunto de enzimas celulares. Su detección es importante para obtener una medida precisa de la respiración mitocondrial.

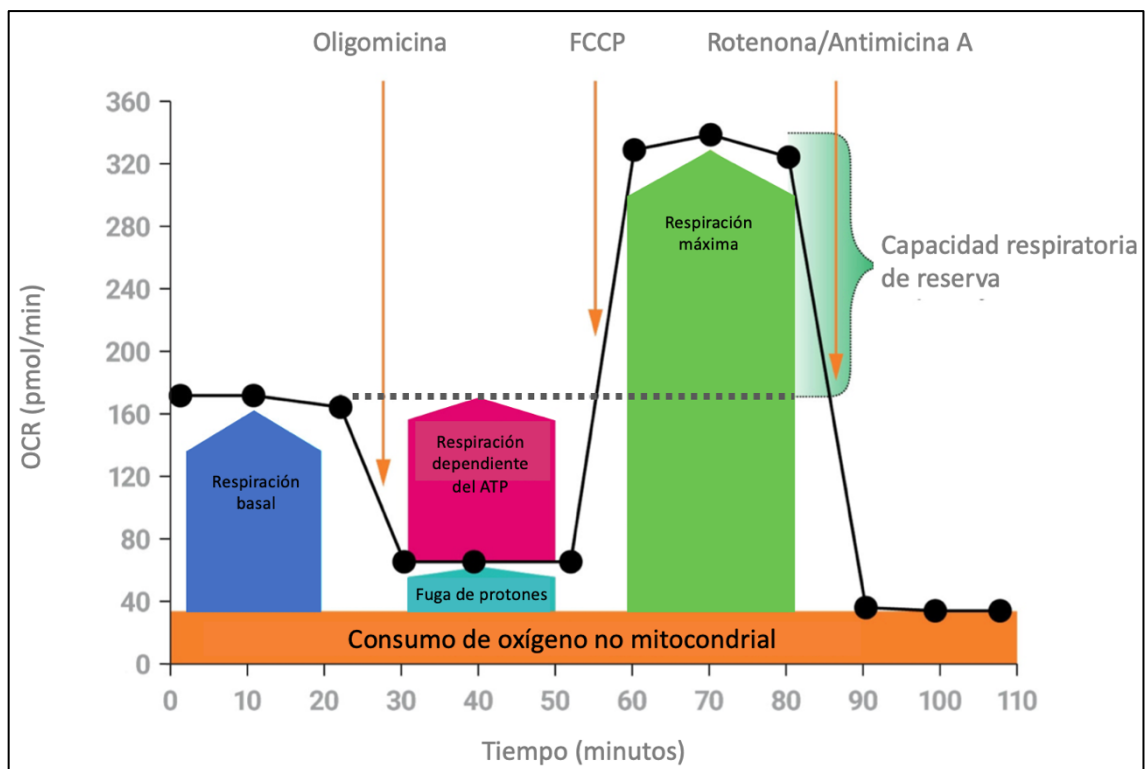


Fig. 5. Representación gráfica del Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kit.

3.7. Marcador dopaminérgico y neurodegeneración

Como marcador dopaminérgico se usó la Tirosina hidroxilasa (TH), que se analizó mediante inmunocitoquímica según técnica anteriormente descrita. Tras 2,5 h de tratamiento, las células se fijaron con metanol absoluto. Como anticuerpo primario se utilizó anti-TH (1/5000, Merck/Millipore-Sigma) y como secundario fluorescente Alexafluor™ 488 (2 gotas/mL, Thermo Fisher Scientific). Para el marcaje del núcleo se utilizó la sonda de unión al ADN azul fluorescente DAPI (1/1000, Merck/Millipore-Sigma). Las imágenes se adquirieron en el microscopio confocal de la marca LEICA, modelo SP 5II, se procesaron mediante

el uso del software LAS AF Lite (Leica Microsystems AG) y analizaron con ImageJ (US National Institute of Health; <http://rsbweb.nih.gov/ij/>)^{135,136}.

Para evaluar el grado de neurodegeneración de las células tras 6 h de tratamiento, se utilizó el fluorocromo específico Fluoro-Jade B™ (FJ) (Merck/Millipore-Sigma^{108,131}). Una vez fijadas con metanol absoluto, se lavaron con PBS y se incubaron con FJ al 0,0004% en 0,1% CH₃COOH en la oscuridad y a temperatura ambiente, durante 30 min en agitación. Tras retirar el fluorocromo, la intensidad de fluorescencia se midió en un lector de microplacas FL 600 (Bio Tek Instruments, filtros excitación/emisión: 485/20 y 530/ 25, respectivamente).

3.8 Vías de señalización intracelular

La expresión de la proteína kinasa C alfa/beta fosforilada (pPKC α/β) se determinó mediante la técnica de *western blot*; electroforesis en gel de los lisados celulares y transferencia de proteínas a membrana usando un sistema de transferencia semiseca (Trans-Blot Turbo Transfer System, Bio-Rad Laboratories). Previamente, y tras 6 h de incubación con los diferentes tratamientos, se procedió a la obtención de homogeneizados celulares de cada situación experimental y a la determinación de la concentración de proteínas, según lo anteriormente descrito para la cuantificación de marcadores espectrofotométricos. Una vez realizada la transferencia de proteínas a la membrana, ésta se bloqueó 1h en TBS-Tween con un 5% de leche desnatada y se incubó durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios anti- pKC α/β y anti- β actina (1/1000, Cell Signaling Technology). Ambas proteínas se detectaron con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (1/1500, Bio-Rad Laboratories) y su sustrato quimioluminiscente SuperSinal™ West Pico PLUS (Thermo Fisher). La cuantificación se llevó a cabo mediante el software Image Lab™ (Laboratorios Bio-Rad).

La expresión del factor de transcripción nuclear eritroide 2 (Nrf2) y del GR se llevó a cabo mediante inmunocitoquímica con el mismo procedimiento explicado anteriormente. Después de 2,5 h de tratamiento y tras fijar las células con metanol absoluto, las distintas situaciones se incubaron con los anticuerpos

primarios anti-Nrf2 (1/1000, Santa Cruz Biotechnology) y anti-GR (1/250; Abcam). Posteriormente se usó el anticuerpo fluorescente secundario Alexafluor™ 488 (Thermo Fisher Scientific); y el marcador nuclear DAPI (Merck/Millipore-Sigma). Imágenes adquiridas por microscopía confocal y analizadas con ImageJ.

3.9 Análisis estadístico

Los resultados se expresan como media \pm error estándar de la media. Las diferencias estadísticas se determinaron mediante el análisis de la varianza de un solo factor (One-way ANOVA). La comparación por pares se realizó mediante prueba *post-hoc* Tukey, un test de comparación múltiple. Para el análisis estadístico y la elaboración de las gráficas se ha utilizado el programa GraphPad Prim versión 9.4.1 (GraphPad Software) licenciado por la Universidad de Málaga. La significancia estadística se fijó en $p < 0,05$.



4. RESULTADOS

4.1. Modelo experimental

Antes de iniciar el estudio, se comprobó si la línea celular SN4741 expresaba los receptores IGF-IIR y GR a través de la técnica de inmunocitoquímica. Como se puede observar en las figuras 6 y 7, ambos receptores se expresan.

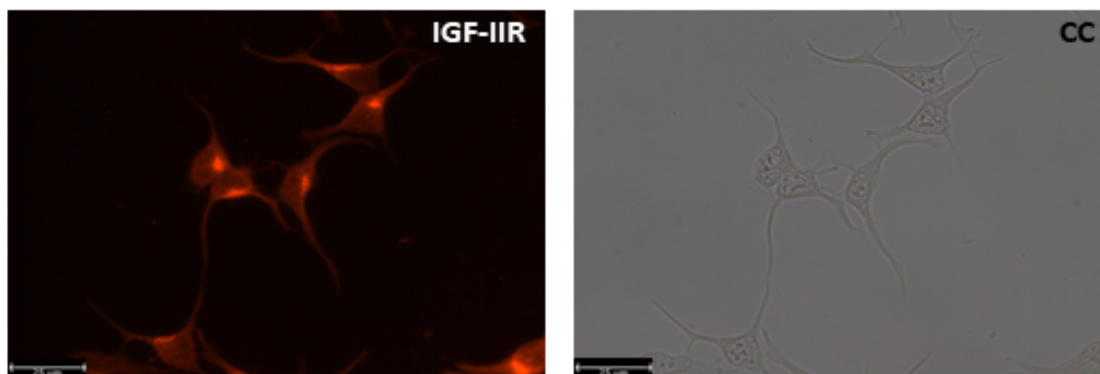


Fig. 6: Inmunocitoquímica del receptor específico para IGF-II (IGF-IIR). Imagen representativa. CC: campo claro.

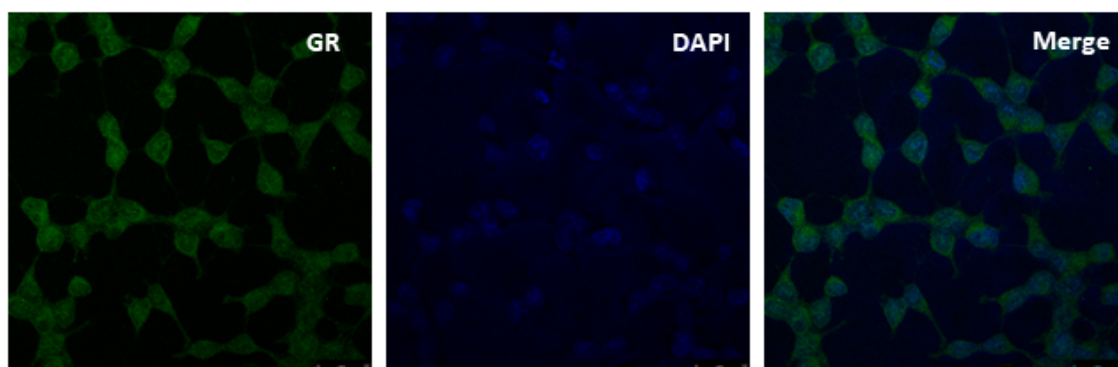
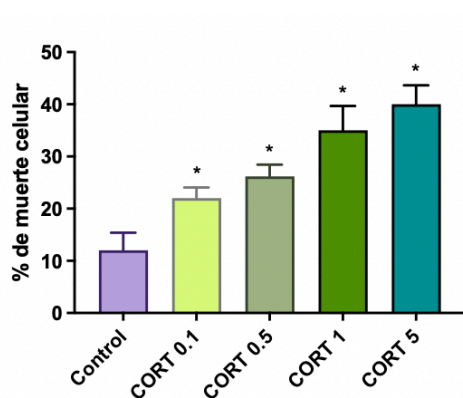


Fig. 7: Inmunocitoquímica del receptor de glucocorticoides (GR). Imagen representativa. Núcleo marcado con la sonda DAPI.

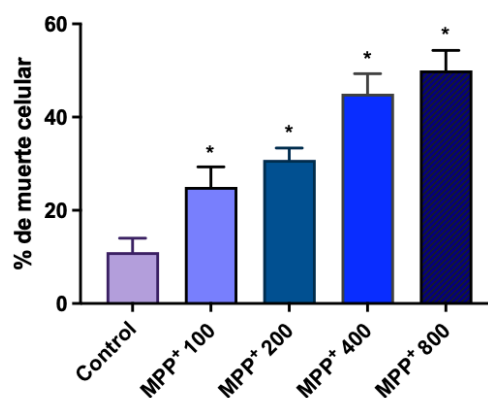
Previo al estudio del efecto de IGF-II se determinó el impacto de la CORT, como marcador de la respuesta endocrina al estrés, en el modelo *in vitro* de EP inducido por la neurotoxina MPP⁺.

4.1.1. Muerte celular

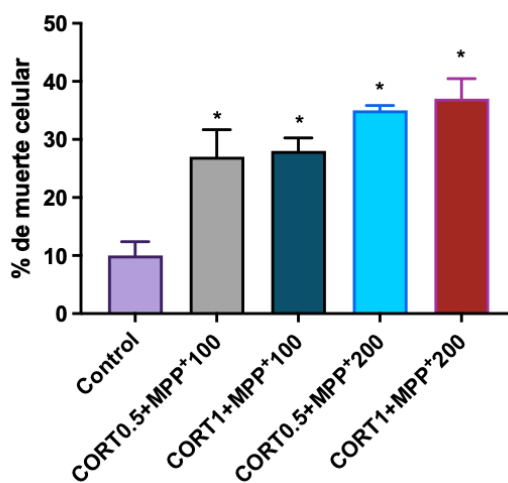
Para seleccionar las concentraciones de los tóxicos a utilizar, se probaron diferentes concentraciones de CORT, MPP⁺ y su administración simultánea, en adelante llamada CORT+MPP⁺. Las concentraciones elegidas fueron 0,5 μ M CORT y 200 μ M MPP⁺. De forma aislada, los valores de LDH aumentaron respecto al control en un 14,2% (Fig. 8a) y un 19,8% (Fig. 8b) respectivamente. En el caso de CORT+MPP⁺, se encontró un incremento del 25,3% (Fig. 8c), considerándose un daño neuronal adecuado para el desarrollo de este estudio, es decir, sin provocar citotoxicidad irreversible.



(8a)



(8b)



(8c)

Fig. 8: Efecto sobre la viabilidad celular de diferentes concentraciones (μM) de los tóxicos. (a) Corticosterona (CORT), (b) MPP^+ , (c) su combinación (CORT+ MPP^+). Datos presentados como media \pm SEM (3 experimentos independientes, $n=3$ en cada grupo). * $p < 0,05$ comparado con grupo control.

4.1.2. Actividad antioxidante y daño oxidativo celular

El estado antioxidante total, o fracción del *pool* antioxidante disponible, fue significativamente menor en las células incubadas con CORT, MPP^+ o CORT+ MPP^+ en comparación con las células control (13,3%, 20,6% y 26,9%, respectivamente) (Fig. 9a). Tras la incubación con CORT+ MPP^+ también se observó una disminución de TAS comparado con la administración individual de CORT (15,7%, $p < 0,05$).

El daño oxidativo, evaluado según los niveles de AOPP, se vio incrementado de forma significativa en las 3 situaciones a estudio frente a las células control en un 54,4%, 41,83% y 76,58%, respectivamente (Fig. 9b). CORT+ MPP^+ provocó un aumento en los niveles de AOPP significativamente mayor que CORT o MPP^+ (12,6% y 19,7%, respectivamente).

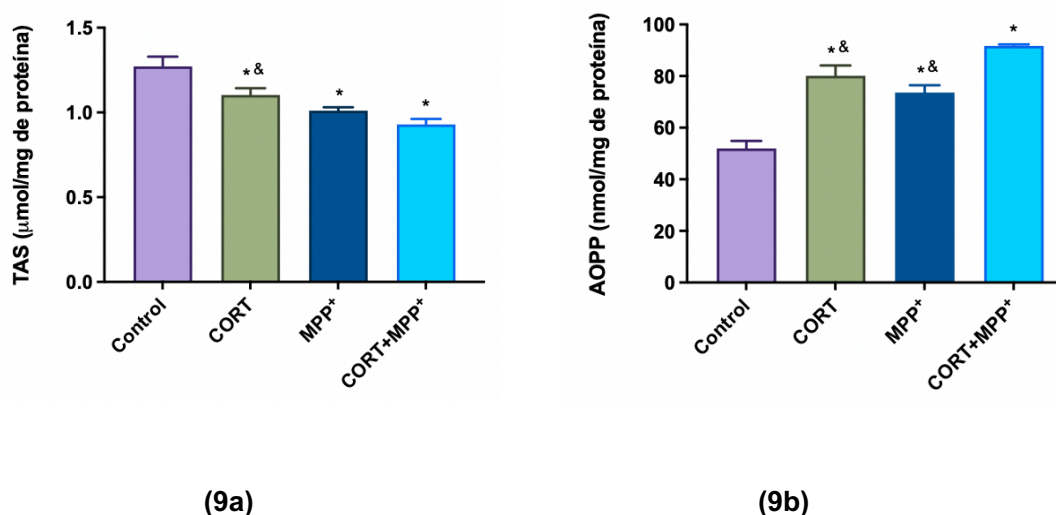


Fig. 9: Equilibrio REDOX tras la administración de CORT, MPP^+ o CORT+ MPP^+ . (a) Niveles de estado antioxidante total, (b) Niveles de productos de oxidación avanzada de proteínas. Datos presentados como media \pm SEM (4 experimentos independientes, $n=3$ en

cada grupo). * $p < 0,05$ comparado con grupo control; & $p < 0.05$ comparado con la combinación de tóxicos.

4.1.3. Producción de ROS mitocondrial y función mitocondrial

A nivel celular, las mitocondrias son la principal fuente de ROS fisiológico y patológico. Tras la administración de forma individual de CORT o MPP⁺, se produjo un aumento de la producción de O₂-• mitocondrial (evaluado según la fluorescencia de la sonda MitoSOX™ Red) significativamente superior a la encontrada en las células control (16,6% y 21,9% respectivamente) (Fig. 10). La coincubación de ambas sustancias, aumentó drásticamente su producción frente al grupo control (54,8%), y fue significativamente mayor que la producida por la incubación de CORT (24,7%) o MPP⁺ (21,7%).

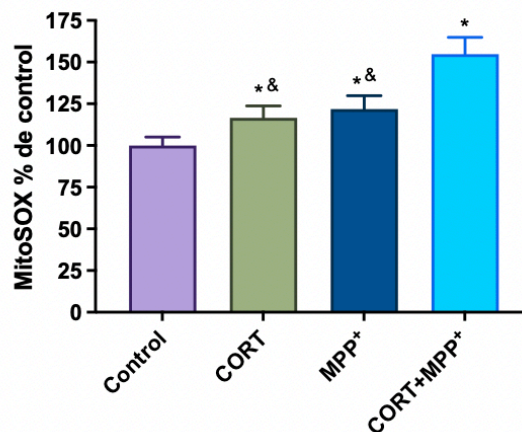


Fig. 10: Niveles mitocondriales de ROS tras la administración de CORT, MPP⁺ o CORT+MPP⁺. Datos presentados como media \pm SEM (3 experimentos independientes, n=3 en cada grupo). * $p < 0,05$ comparado con grupo control; & $p < 0.05$ comparado con la combinación de tóxicos.

La función mitocondrial se evaluó a través de la medición del $m\Delta\Psi$ y la OCR. Como se observa en la Fig. 11, la incubación de las células con CORT, MPP⁺ o CORT+MPP⁺ produjo disminuciones significativas (21,1%, 12,7% y 25,4%) en el $m\Delta\Psi$ frente a las células control. La coincubación de ambas sustancias también disminuyó el $m\Delta\Psi$ en comparación con la administración de MPP⁺ (11,6%, $p < 0,05$). En cuanto a la evaluación

bioenergética, la administración de CORT mantuvo la respiración basal de las neuronas en los niveles de las células control, mientras que la administración de MPP⁺ de forma individual o en combinación con CORT disminuyó significativamente la OCR (38,8% y 56,5%, respectivamente) tras 90 min (Figuras. 11a y 11b). Tendencias que se mantuvieron durante 5 h.

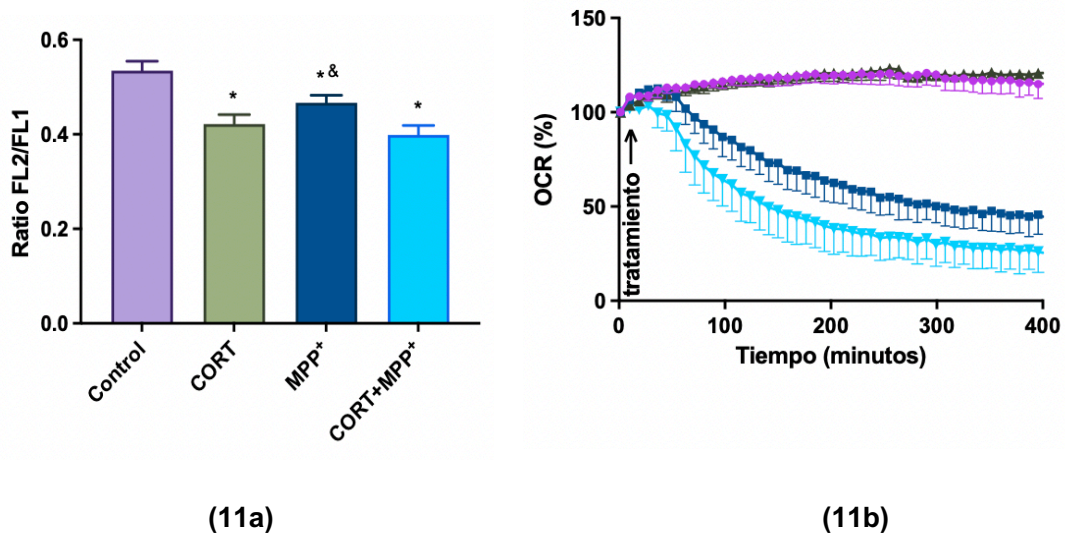


Fig. 11: Análisis funcional a nivel mitocondrial ante la administración de CORT, MPP⁺ o CORT+MPP⁺. (a) Análisis citofluorimétrico del potencial de membrana mitocondrial ($m\Delta\Psi$). Datos presentados como media \pm SEM (4 experimentos independientes, $n=3$ en cada grupo). * $p < 0,05$ comparado con grupo control; & $p < 0,05$ comparado con la combinación de tóxicos, (b) Curso temporal de la tasa de oxígeno mitocondrial (OCR) después de la administración de los tratamientos. Experimento representativo. OCR expresada como % con respecto al control. Línea púrpura: Control; línea verde: CORT; línea azul oscuro: MPP⁺; línea celeste: CORT+MPP⁺.

4.1.4. Neurodegeneración

Dado que el daño oxidativo-mitocondrial desempeña un papel crucial en la neurodegeneración, se examinó la degeneración específica de estas células con FJ. Con respecto a las células control, se detectó un aumento significativo de la intensidad de la sonda fluorescente en las neuronas tratadas con CORT, MPP⁺ y CORT+MPP⁺ (44,2%, 40% y 66,8%, respectivamente) (Fig. 12). El aumento de la intensidad de FJ producido por la coadministración de las sustancias fue significativamente mayor que en las células incubadas con CORT o MPP⁺ individualmente (13,5% y 16%, respectivamente).

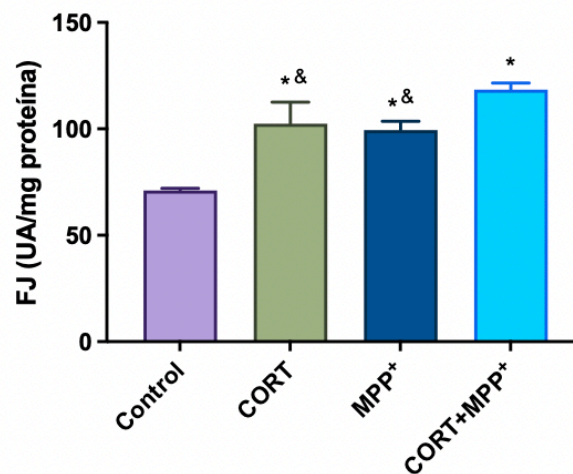


Fig. 12: Neurodegeneración evaluada como intensidad del fluorocromo específico Fluoro-Jade BTM (FJ) ante la administración de CORT, MPP⁺ o CORT+MPP⁺. Datos presentados como media \pm SEM (4 experimentos independientes, n=3 en cada grupo). * $p < 0,05$ comparado con grupo control; & $p < 0.05$ comparado con la combinación de tóxicos. UA: unidades arbitrarias.

4.2. Efecto del IGF-II en el modelo experimental

Tras determinar el impacto de CORT en el modelo *in vitro* de EP, se estudió el efecto de IGF-II sobre el daño inducido por la administración de CORT+MPP⁺.

4.2.1. Viabilidad celular: muerte celular y morfología

Como se describió previamente, la muerte celular se determinó mediante la concentración de LDH liberada al medio (Fig. 13). Tras la incubación con CORT+MPP⁺ los niveles de LDH incrementaron un 28,5% ($p < 0,05$) respecto al grupo control mientras que la coadministración de los 2 tóxicos en presencia de IGF-II evitó dicho incremento. La incubación en presencia de BMS no modificó el efecto de IGF-II observado, indicando que el efecto beneficioso de IGF-II estaría mediado por su interacción con el IGF-IIR. Para demostrar la inocuidad de la molécula en estudio (IGF-II) a la concentración utilizada, se incluyó una situación experimental donde las células fueron tratadas con la misma. En dicha situación, se observó un porcentaje de muerte celular similar al grupo control. Por último, la coincubación con el antagonista del GR, MIFE, y ambos tóxicos disminuyó parcialmente la muerte celular encontrada con la administración de CORT+MPP⁺ (16,5% $p < 0,05$), poniendo de manifiesto de nuevo el papel de CORT en este modelo.

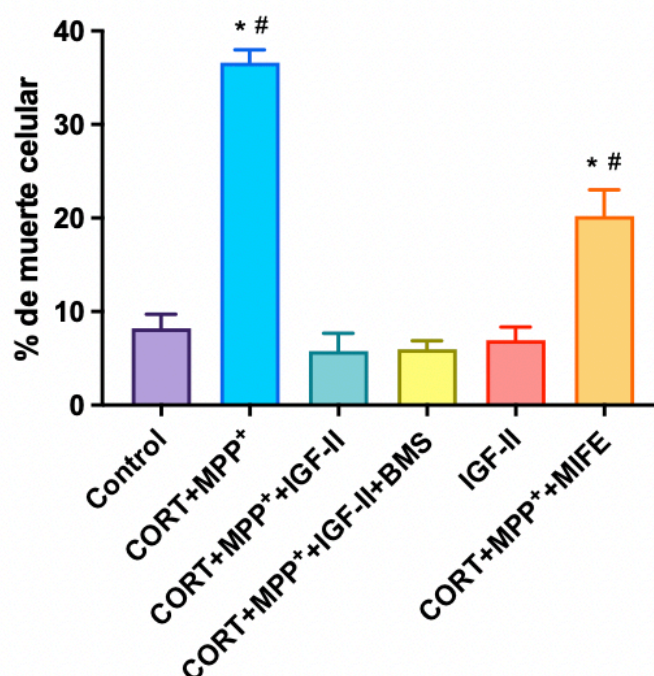


Fig. 13: Muerte celular expresada como porcentaje de LDH liberada al medio en las distintas situaciones a estudio. Datos presentados como media \pm SEM (4 experimentos independientes, $n=3$ en cada grupo). * $p < 0,05$ comparado con grupo control; # $p < 0,05$ comparado con el resto de los grupos.

En cuanto al estudio de la morfología celular, el análisis de la tinción de Giemsa (Fig. 14) mostró en el grupo control una morfología acorde con la estirpe celular utilizada, la línea SN4741. La incubación con CORT+MPP⁺ provocó cambios morfológicos en comparación con el control, apreciándose una clara heterogeneidad en tamaño y forma de las células, con núcleos picnóticos condensados y encogidos. Tras la administración de IGF-II en combinación con ambos tóxicos, se observó una morfología celular similar a la del grupo control.

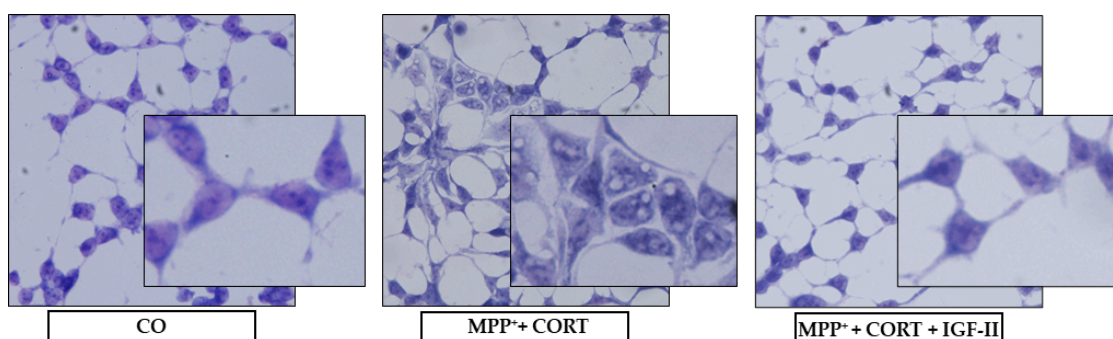


Fig. 14: Morfología celular tras la administración de CORT+MPP⁺ en ausencia o presencia de IGF-II. Imágenes representativas (microscopía óptica).

4.2.2. Actividad antioxidante y daño oxidativo celular

La actividad antioxidante se determinó mediante la medición de los niveles de TAS y la actividad de la enzima GPX (Fig. 15). En cuanto a los niveles de TAS, se encontró una disminución significativa del 27,7% frente al control cuando las células se incubaron con CORT+MPP⁺, en la línea de lo observado en el apartado 4.1.1. Al realizar la incubación en presencia de IGF-II + CORT+MPP⁺, la reducción producida por los tóxicos se vio disminuida ($p < 0,05$). La misma tendencia se encontró en la actividad de GPX. Así, la coadministración de CORT+MPP⁺ la disminuyó un 29,3% en

comparación con el grupo control ($p < 0,05$) y el cotratamiento de ambos tóxicos junto a IGF-II previno por completo la disminución de la actividad de GPX, mostrando unos niveles similares al grupo control ($p < 0,05$).

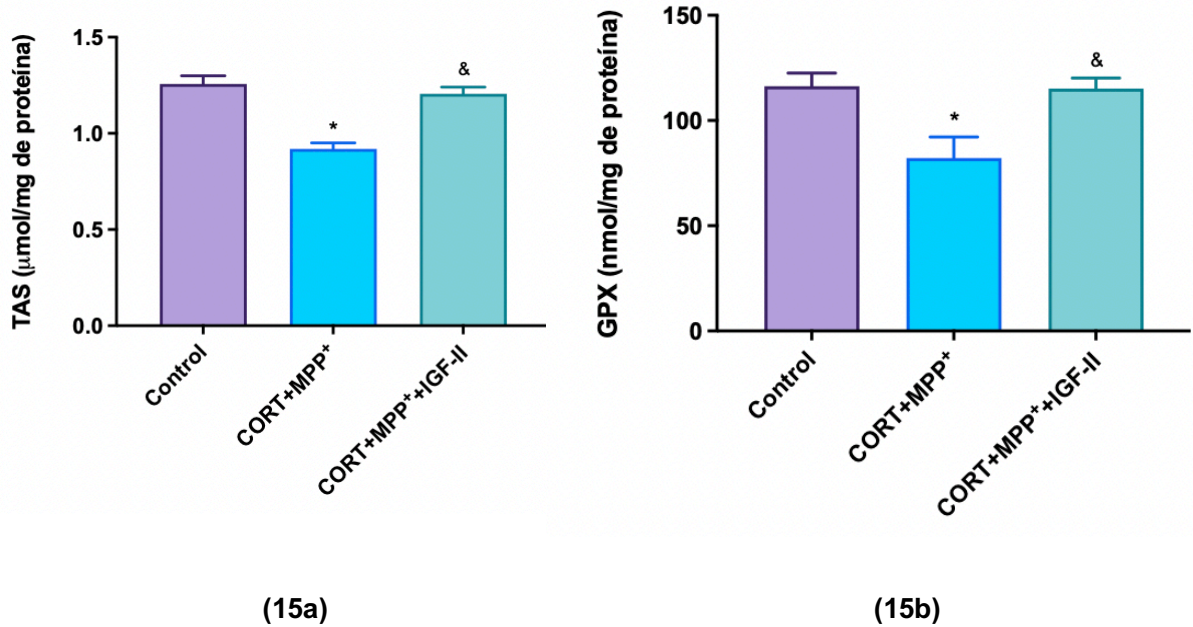


Fig. 15: Actividad antioxidante ante la administración de CORT+MPP⁺ en ausencia o presencia de IGF-II expresada como (a) Niveles de estado antioxidante total, (b) Actividad de la enzima glutatión peroxidasa. Datos presentados como media \pm SEM (4 - 6 experimentos independientes, $n=3$ en cada grupo). * $p < 0,05$ comparado con grupo control; & $p < 0,05$ comparado con la combinación de tóxicos.

Para evaluar el daño oxidativo celular, se analizaron los niveles de LOOH y AOPP (Fig. 16). Ambos aumentaron drásticamente tras la incubación con CORT+MPP⁺ (85% y 67%, respectivamente) frente al grupo control ($p < 0,05$). La inclusión de IGF-II en el tratamiento llevó los niveles de estos marcadores a valores cercanos a los encontrados en las células control ($p < 0,05$).

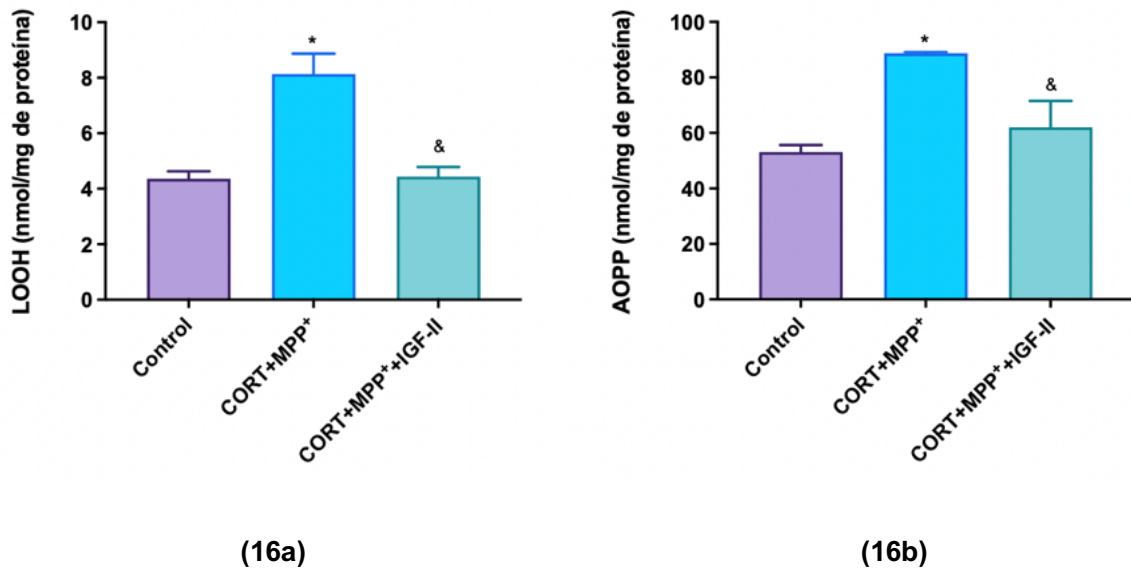


Fig. 16: Daño oxidativo celular tras la administración de CORT+MPP⁺ en ausencia o presencia de IGF-II. expresado como niveles de (a) Hidroperóxidos lipídicos, (b) Oxidación avanzada de proteínas. Datos presentados como media \pm SEM (4 - 5 experimentos independientes, n=3 en cada grupo). * $p < 0,05$ comparado con grupo control; & $p < 0.05$ comparado con la combinación de tóxicos.

4.2.3. Marcadores mitocondriales

Distribución mitocondrial

La figura 17 muestra la localización de las mitocondrias a través del marcador fluorescente MTG en las 3 condiciones experimentales. En las células control, se observan mitocondrias distribuidas uniformemente en cuerpos neuronales y axones, mientras que la incubación con CORT+MPP⁺ muestra un cambio en el patrón de la red, pues las mitocondrias se encuentran principalmente en los cuerpos neuronales, además de una disminución en el $m\Delta\Psi$. La coadministración de ambos tóxicos junto a IGF-II tiende a recuperar en parte la localización de las mitocondrias en el axoplasma, localización necesaria para desarrollar la función mitocondrial, denotando un efecto protector de IGF-II a este nivel.

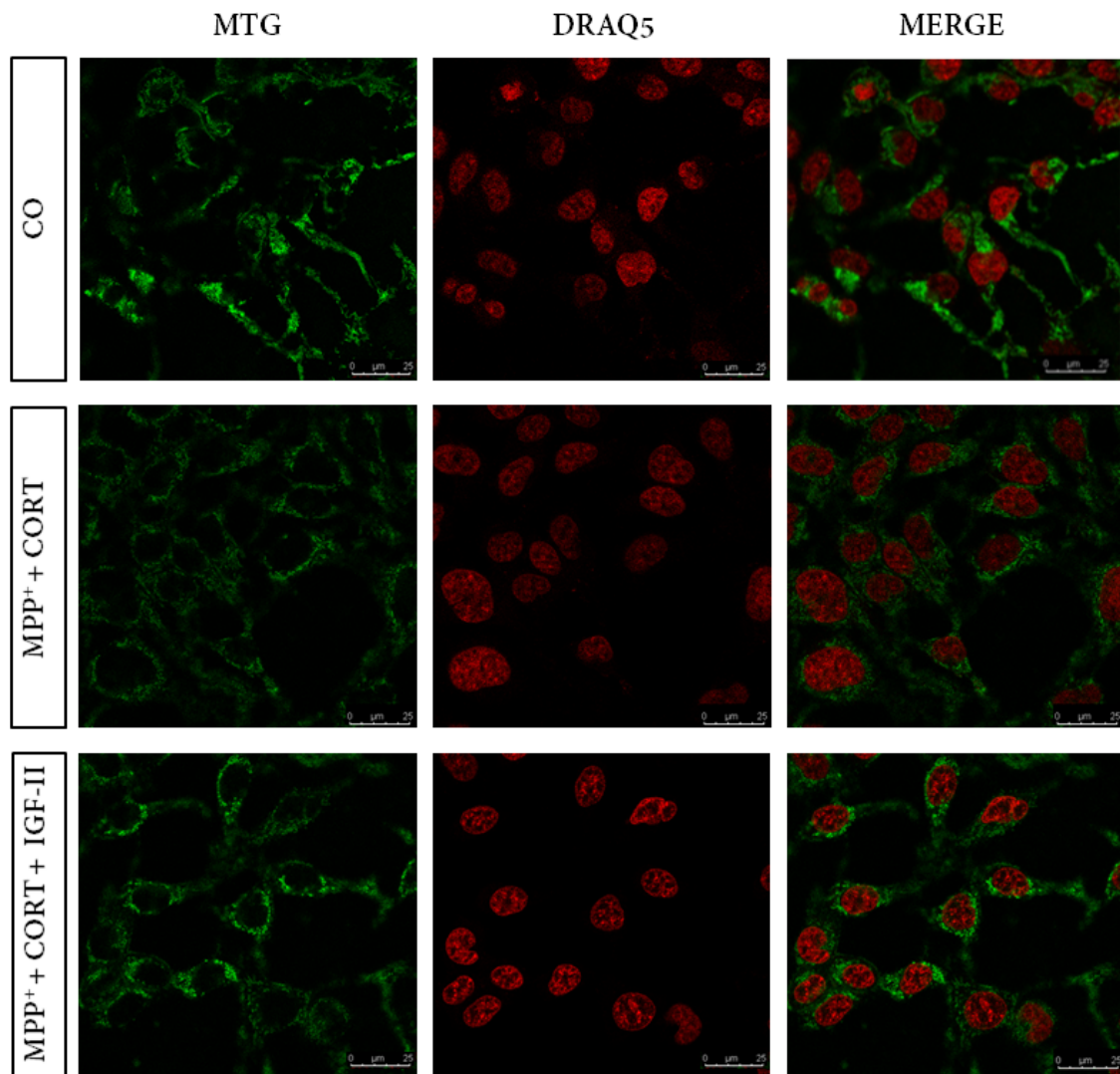
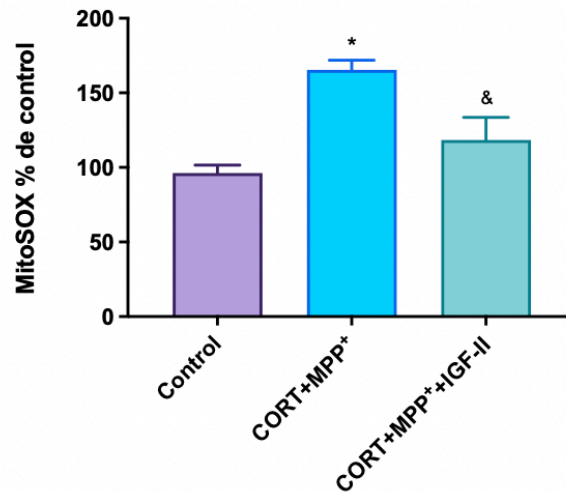


Fig. 17: Marcador mitocondrial MitoTracker™ Green ante la administración de CORT+MPP⁺ en ausencia o presencia de IGF-II. Imágenes representativas. Núcleo marcado con la sonda DRAQ5™. CO: control.

Como se comentó previamente, la mitocondria es la fuente principal de producción de radicales libres celulares tanto fisiológicos como patológicos siendo capaz, por tanto, de modificar su función según las condiciones en las que se encuentre. Para evaluar la función mitocondrial y la producción de radicales libres en presencia de IGF-II, se estudiaron el $m\Delta\Psi$, la OCR y la producción del $O_2^{\cdot-}$ mitocondrial, respectivamente.

Niveles mitocondriales de especies reactivas de oxígeno

El tratamiento con CORT+MPP⁺, produjo de nuevo en el modelo experimental estudiado un incremento drástico de los niveles de ROS mitocondrial (> 50%, $p < 0,05$) comparado con las células control (Fig. 18). Sin embargo, cuando se administraron ambos tóxicos en presencia de



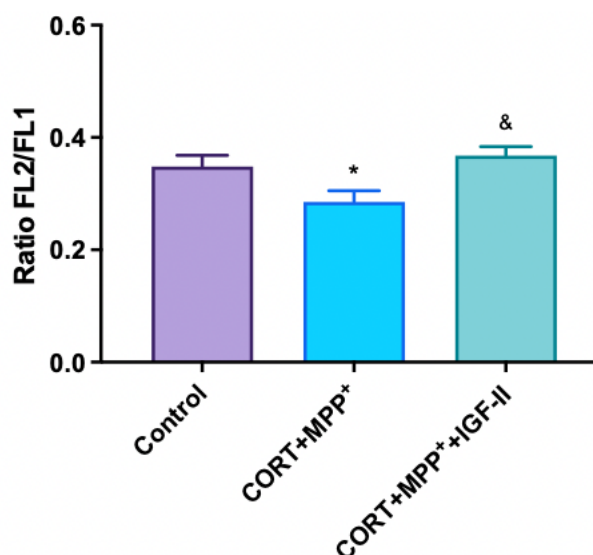
IGF-II, la producción de O₂^{-•} se acercó a los niveles observados en el grupo control ($p < 0,05$).

Fig. 18: Niveles mitocondriales de ROS tras la administración de CORT+MPP⁺ en ausencia o presencia de IGF-II. Datos presentados como media \pm SEM (5 experimentos independientes, $n=3$ en cada grupo). * $p < 0,05$ comparado con grupo control; & $p < 0.05$ comparado con la combinación de tóxicos.

Función mitocondrial

Como se muestra en la figura 19, y en la línea de lo observado en el apartado 4.1.3, la incubación con CORT+MPP⁺ conllevó una disminución del $m\Delta\Psi$ (en torno al 20 %) con respecto a la situación control ($p < 0,05$), mientras que la inclusión de IGF-II en dicho tratamiento lo estabilizó (valores similares a las células control, $p < 0,05$).

Fig. 19: Análisis citofluorimétrico del potencial de membrana mitocondrial ($m\Delta\Psi$) ante la administración de CORT+MPP⁺ en ausencia o presencia de IGF-II. Datos presentados como media \pm SEM (3 experimentos independientes, n=3 en cada grupo). * $p < 0,05$ comparado con grupo control; & $p < 0,05$ comparado con la combinación de tóxicos.



En cuanto a la evaluación bioenergética, la administración de CORT+MPP⁺ produjo un descenso significativo de la OCR (62,5%) respecto al grupo control (Fig. 20) en la línea de lo observado en el curso temporal de OCR (apartado 4.1.3) a partir de los 90 min desde su administración. La presencia en el medio de ambos tóxicos junto a IGF-II contrarrestó parcialmente esta disminución (37,1%, $p < 0,05$).

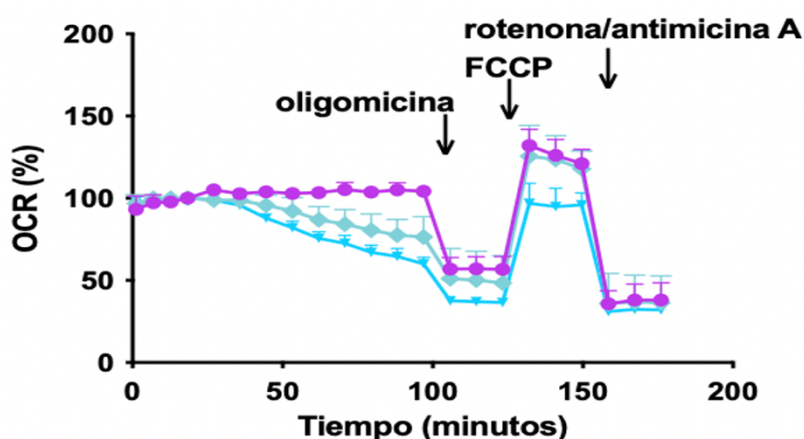


Fig. 20: Medición de parámetros clave de la función mitocondrial tras 90 minutos de incubación con CORT+MPP⁺ en ausencia o presencia de IGF-II. Experimento representativo de la OCR expresada como % con respecto al control. Línea púrpura: Control; línea celeste: CORT+MPP⁺; línea verde: CORT+MPP⁺+IGF-II.

Los parámetros clave de la función mitocondrial se vieron modificados de forma significativa tras la administración de los tóxicos estudiados (Fig. 21, $p < 0,05$). Así, el consumo de oxígeno utilizado para producir ATP mitocondrial disminuyó un 86,4% respecto al control (Fig. 21b), el descenso observado en la capacidad respiratoria de reserva fue de un 46,7% (Fig. 21d) y de un 66,2% en la respiración máxima (Fig. 21e), mientras que la respiración no acoplada a ATP (fuga de protones) se incrementó en un 62,2% (Fig. 21c). La presencia en el medio de IGF-II junto con CORT+MPP⁺, previno (caso de la fuga de protones, $p < 0,05$) o atenuó el efecto dañino de estas sustancias de forma significativa. En concreto, para la síntesis de ATP la disminución de la OCR fue del 34,3% frente al grupo control, lo que supuso un incremento de la misma del 52,1% frente a la administración de los tóxicos ($p < 0,05$). Con respecto a la capacidad respiratoria de reserva la disminución observada fue del 21,1% y, para la respiración máxima, del 27,6%. En estos casos el incremento frente a CORT+MPP⁺ fue del 25,6% y 38,6% respectivamente ($p < 0,05$).

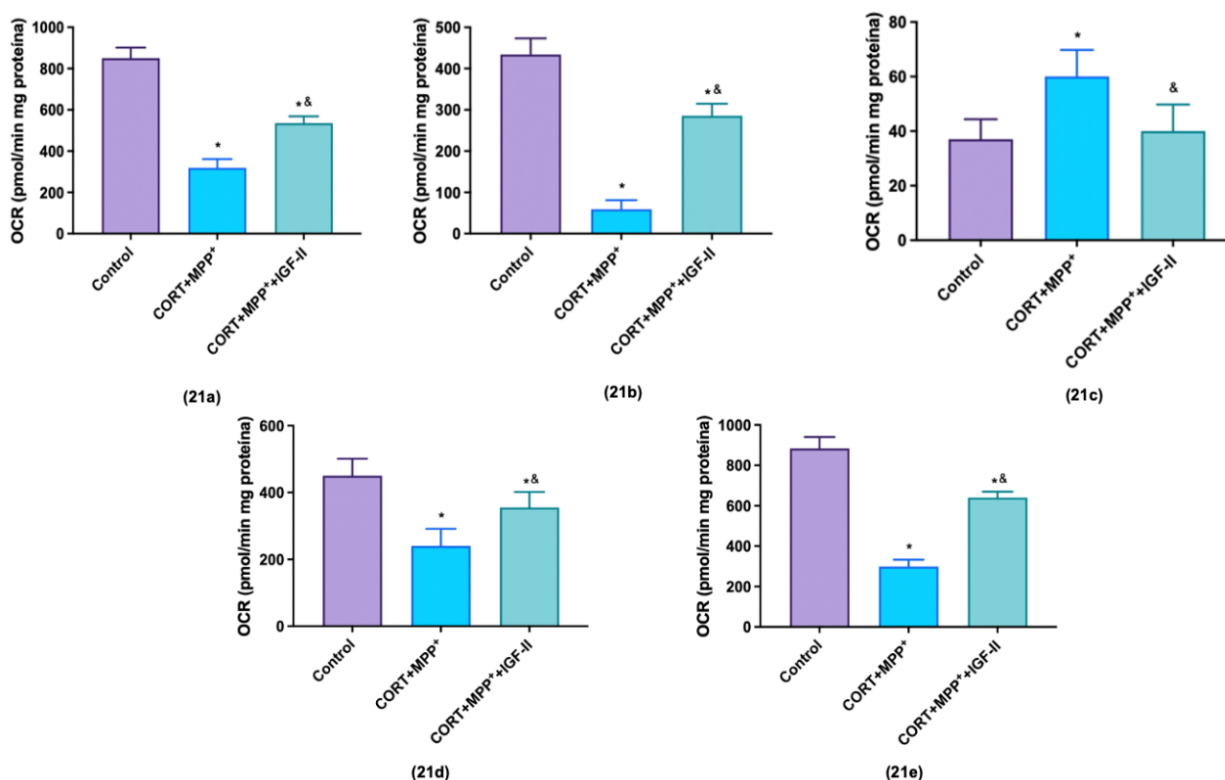


Fig. 21: Tasa de consumo de oxígeno (OCR) evaluada en diferentes condiciones tras la administración de CORT+MPP⁺ en ausencia o presencia de IGF-II. (a) Respiración

basal. (b) Producción de ATP, medida tras la adición de oligomicina. (c) Fuga de protones, considerada como el consumo residual de O₂ tras la adición de oligomicina. (d) Capacidad respiratoria de reserva o diferencia entre la respiración máxima (observada tras la administración de FCCP) y la respiración basal. (e) Respiración máxima. OCR expresadas como pmol/min mg de proteína. Datos presentados como media ± SEM (7 experimentos independientes, n=3 en cada grupo). * $p < 0,05$ comparado con grupo control; &p < 0.05 comparado con la combinación de tóxicos.

4.2.4. Marcador dopaminérgico y neurodegeneración

Como se indica en el apartado material y métodos, la línea celular utilizada en este modelo de la EP deriva de células neuronales dopaminérgicas de sustancia negra, por lo que además de analizar neurodegeneración, se usó un marcador dopaminérgico específico (TH) para la evaluación de la integridad celular.

Expresión de la enzima tirosina hidroxilasa

El tratamiento de las células con CORT+MPP⁺ produjo un descenso significativo de un 24,7% en los niveles de TH con respecto al grupo control, mientras que la incubación de ambos tóxicos e IGF-II mostró valores de expresión de TH cercanos a los encontrados en células control ($p < 0,05$). Por otra parte, la coincubación de las células con el antagonista del GR, MIFE, y ambos tóxicos previno parcialmente el descenso en los niveles de TH observados en la situación CORT+MPP⁺ (13,9% $p < 0,05$), poniendo de manifiesto de nuevo el papel de CORT en este modelo (Figuras 22 y 23).

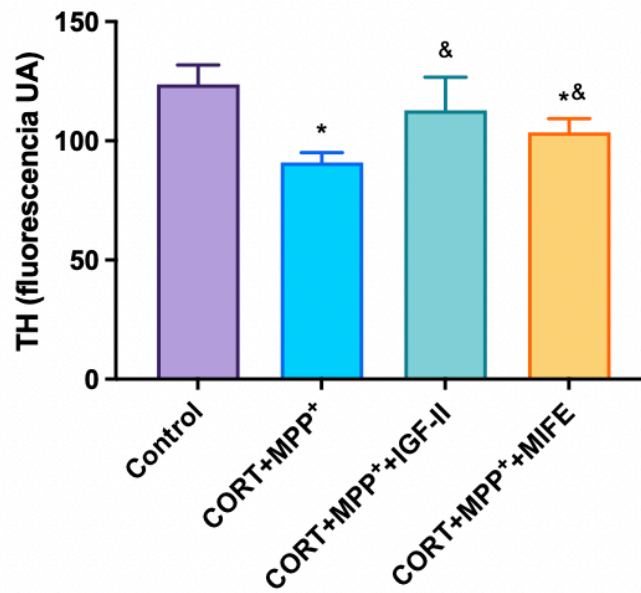


Fig. 22: Análisis cuantitativo de la inmunocitoquímica de la enzima tirosina hidroxilasa (TH) ante la administración de CORT+MPP⁺ en ausencia o presencia de IGF-II o mifepristona. Datos presentados como media \pm SEM (3 experimentos independientes, n=3 en cada grupo). * $p < 0,05$ comparado con grupo control; & $p < 0.05$ comparado con la combinación de tóxicos. UA: unidades arbitrarias.

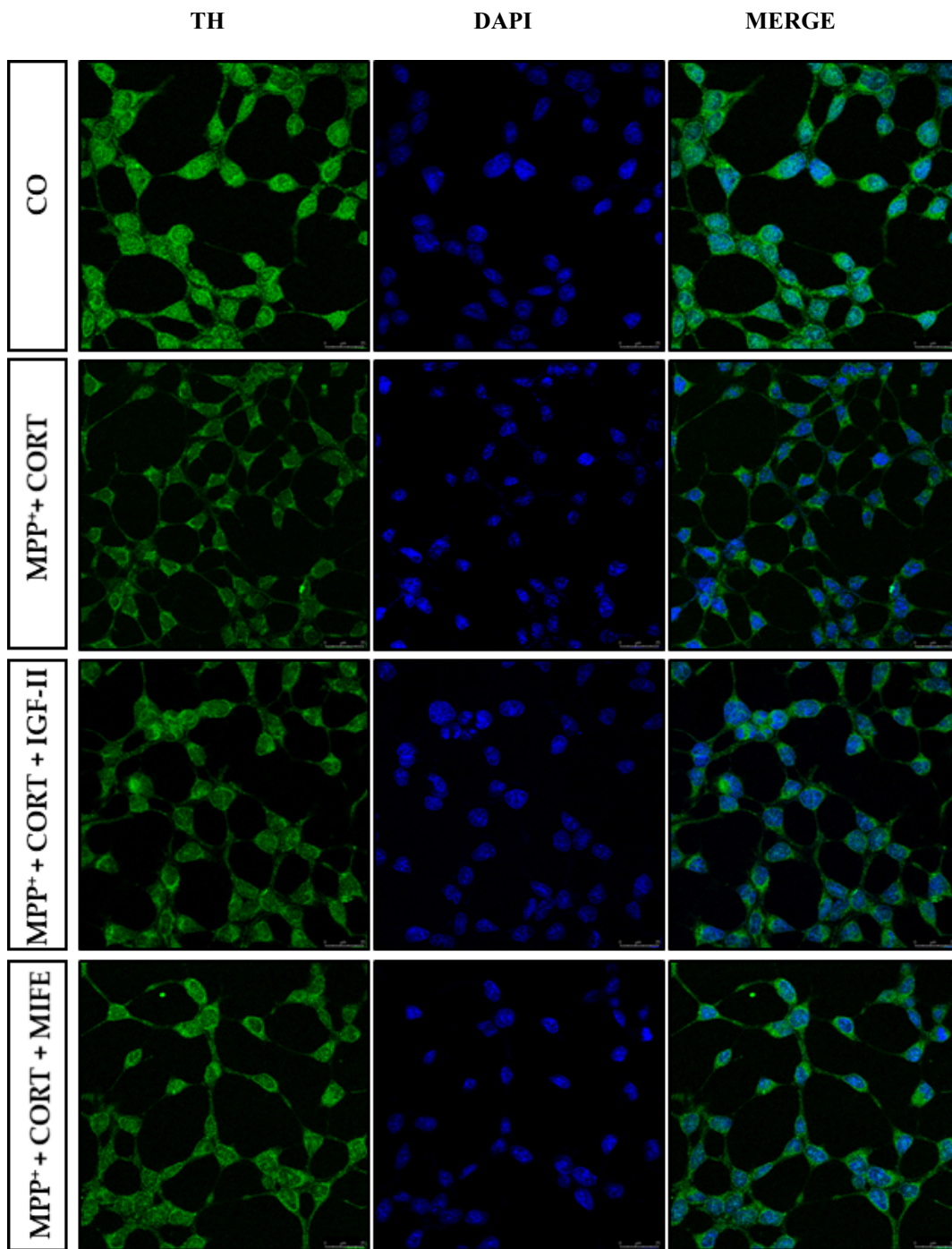


Fig. 23: Inmunocitoquímica de la enzima tirosina hidroxilasa (TH) ante la administración de CORT+MPP⁺ en ausencia o presencia de IGF-II o mifepristona. Imágenes representativas. Núcleo marcado con la sonda DAPI. CO: control.

Neurodegeneración

Con respecto a las células control, y en la línea de lo observado en el apartado 4.1.4, la incubación de las células dopaminérgicas con CORT+MPP⁺ produjo un marcado incremento en la intensidad de FJ (87,3%, $p < 0,05$), mientras que la incubación de ambos tóxicos en presencia de IGF-II contrarrestó este incremento en un 50,2% ($p < 0,05$) (Fig. 24).

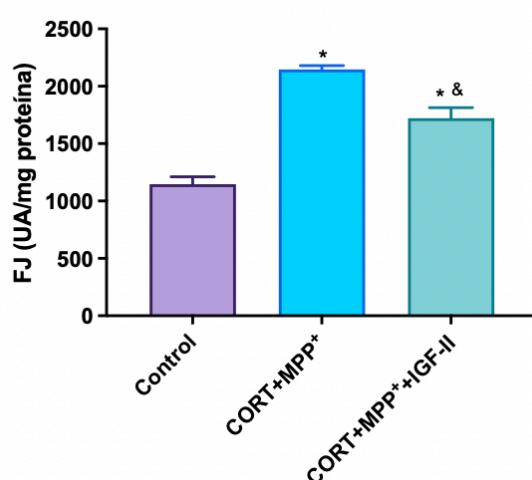


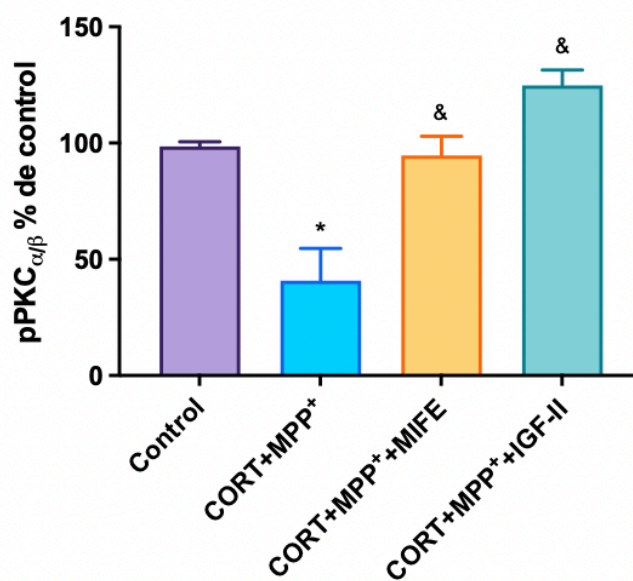
Fig. 24: Neurodegeneración evaluada como intensidad del fluorocromo específico Fluoro-Jade B™ (FJ) ante la administración de CORT+MPP⁺ en ausencia o presencia de IGF-II. Datos presentados como media \pm SEM (3 experimentos independientes, $n=3$ en cada grupo). * $p < 0,05$ comparado con grupo control; & $p < 0.05$ comparado con la combinación de tóxicos. UA: unidades arbitrarias.

4.2.5. Vías de señalización intracelular

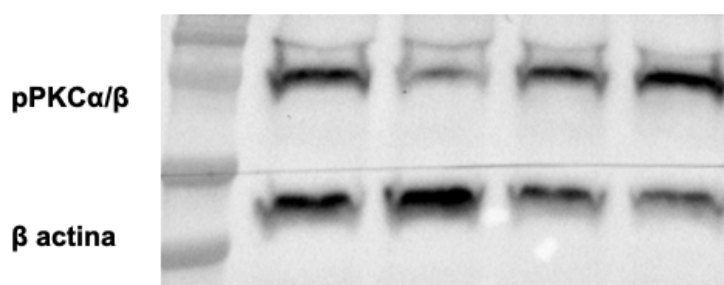
En este sentido, se ha estudiado la expresión de la PKC, la cual es modulada por glucocorticoides, ROS y por la propia molécula a estudio IGF-II^{137,138}. También se evaluó la expresión de Nrf2, factor de transcripción que funciona como uno de los principales reguladores de la respuesta antioxidante endógena frente al estrés oxidativo, y la expresión del receptor GR, ya que su expresión nuclear podría considerarse un posible regulador de los patrones de expresión génica relacionados con el estrés¹³⁷.

Con respecto a la expresión de pPKC α/β (Fig. 25), la administración de CORT+MPP⁺, produjo un claro y significativo descenso (58,8%) en comparación con el grupo control, mientras que la incubación de ambos

tóxicos en presencia de IGF-II o del antagonista MIFE, la mantuvo en valores próximos a los encontrados en las células control ($p < 0,05$).



(25a)



(25b)

Fig. 25: Expresión de pPKC α/β ante la administración de CORT+MPP⁺ en ausencia o presencia de IGF-II o mifepristona. (a) Cuantificación tras normalizar con β actina, (b) Imagen representativa de western blot. Datos presentados como media \pm SEM (6 experimentos independientes, $n=3$ en cada grupo). * $p < 0,05$ comparado con grupo control; & $p < 0,05$ comparado con la combinación de tóxicos.

Como se puede observar en la figura 26, no se aprecian diferencias en la expresión total de Nrf2 en las distintas condiciones a estudio, pero, sin embargo, la administración de CORT+MPP⁺ produjo una disminución significativa del 62,6% en su expresión nuclear frente al control (Fig. 27). Cuando se incubaron ambos tóxicos en presencia de MIFE, se previno parcialmente esa disminución (28,3%, $p < 0,05$) y en el caso de la

incubación de CORT+MPP⁺ junto a IGF-II, la expresión nuclear se acercó a los valores encontrados en las células control ($p < 0,05$).

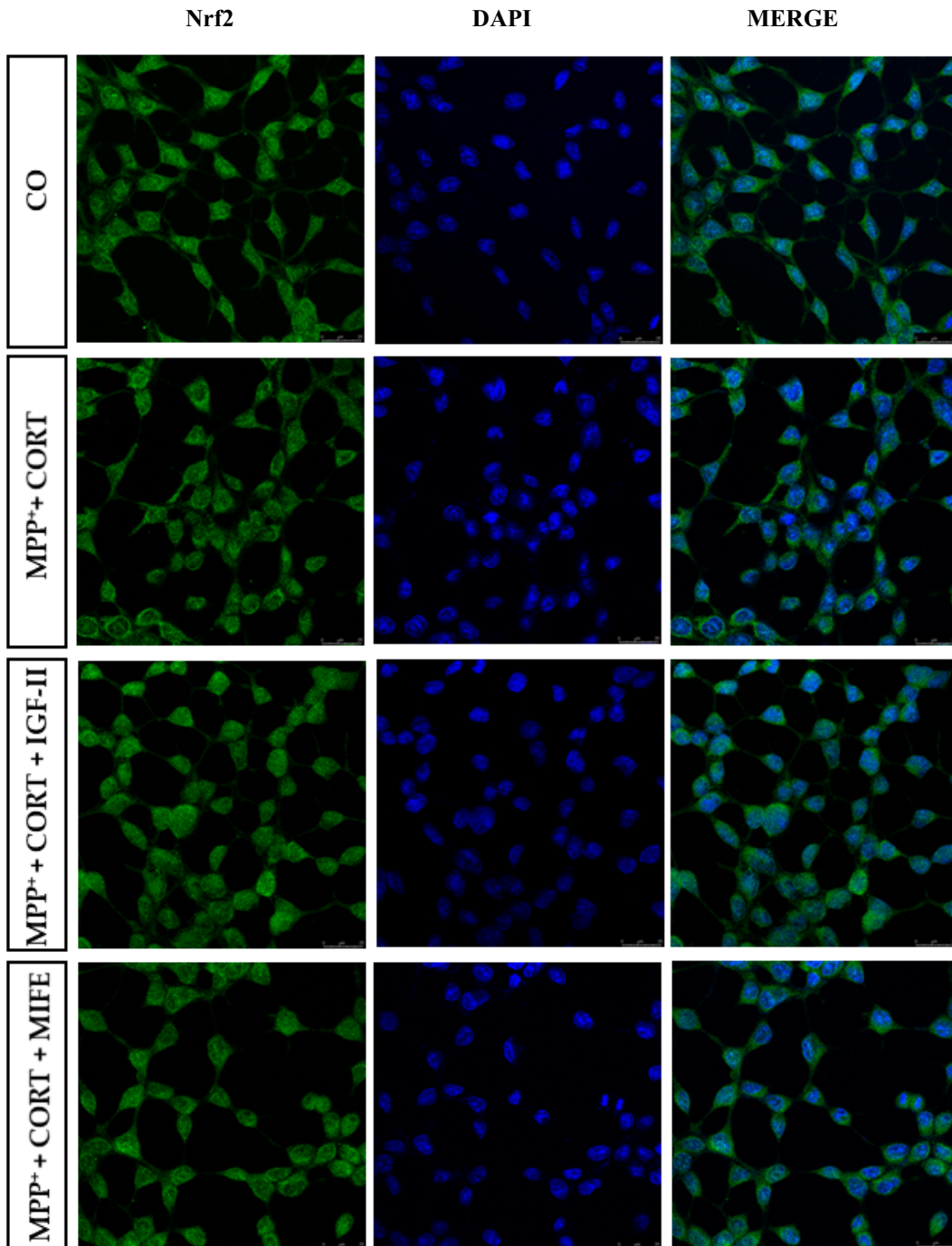


Fig. 26: Inmunocitoquímica del factor de transcripción nuclear eritroide 2 (Nrf2) ante la administración de CORT+MPP⁺ en ausencia o presencia de IGF-II o mifepristona. Imágenes representativas. Núcleo marcado con la sonda DAPI. CO: control.

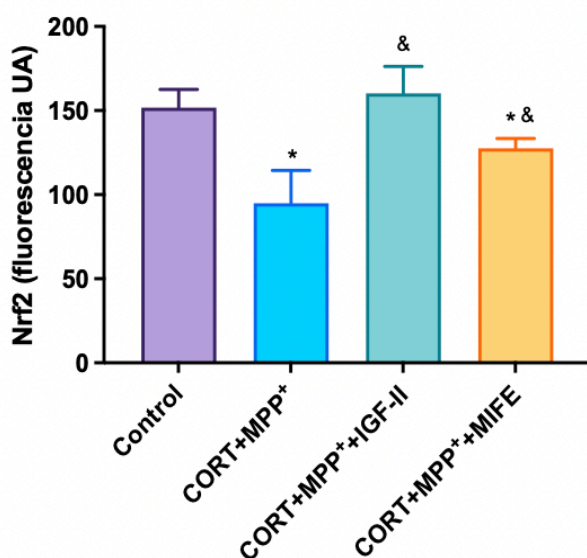


Fig. 27: Análisis cuantitativo de la inmunocitoquímica del factor de transcripción nuclear eritroide 2 (Nrf2) ante la administración de CORT+MPP⁺ en ausencia o presencia de IGF-II o mifepristona. Datos presentados como media \pm SEM (3 experimentos independientes, n=3 en cada grupo). * $p < 0,05$ comparado con grupo control; & $p < 0.05$ comparado con la combinación de tóxicos. UA: unidades arbitrarias.

Con respecto a la expresión nuclear del GR, la incubación con ambos tóxicos produjo un incremento significativo comparado con las células control (41,4%), sin embargo, la administración de CORT+MPP⁺ en presencia de IGF-II mantuvo la expresión en los niveles del grupo control ($p < 0,05$). Como era de esperar, el bloqueo del GR con MIFE inhibió su translocación al núcleo, traducándose este hecho en una expresión nuclear de GR similar a la observada en células control ($p < 0,05$) (Fig. 28). La expresión total del GR fue semejante en las diferentes condiciones estudiadas (Fig. 29).

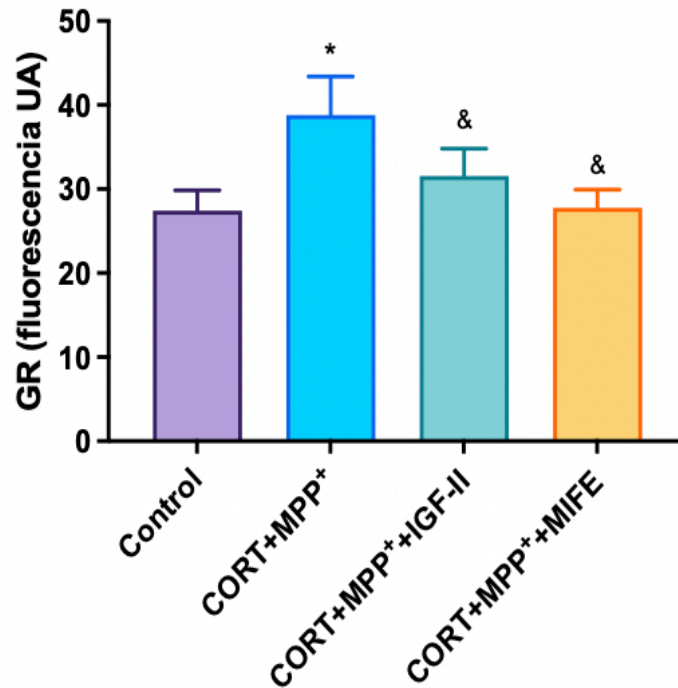


Fig. 28: Análisis cuantitativo de la inmunocitoquímica del receptor de glucocorticoides (GR) ante la administración de CORT+MPP⁺ en ausencia o presencia de IGF-II o mifepristona. Datos presentados como media \pm SEM (3 experimentos independientes, n=3 en cada grupo). * $p < 0,05$ comparado con grupo control; & $p < 0.05$ comparado con la combinación de tóxicos. UA: unidades arbitrarias.

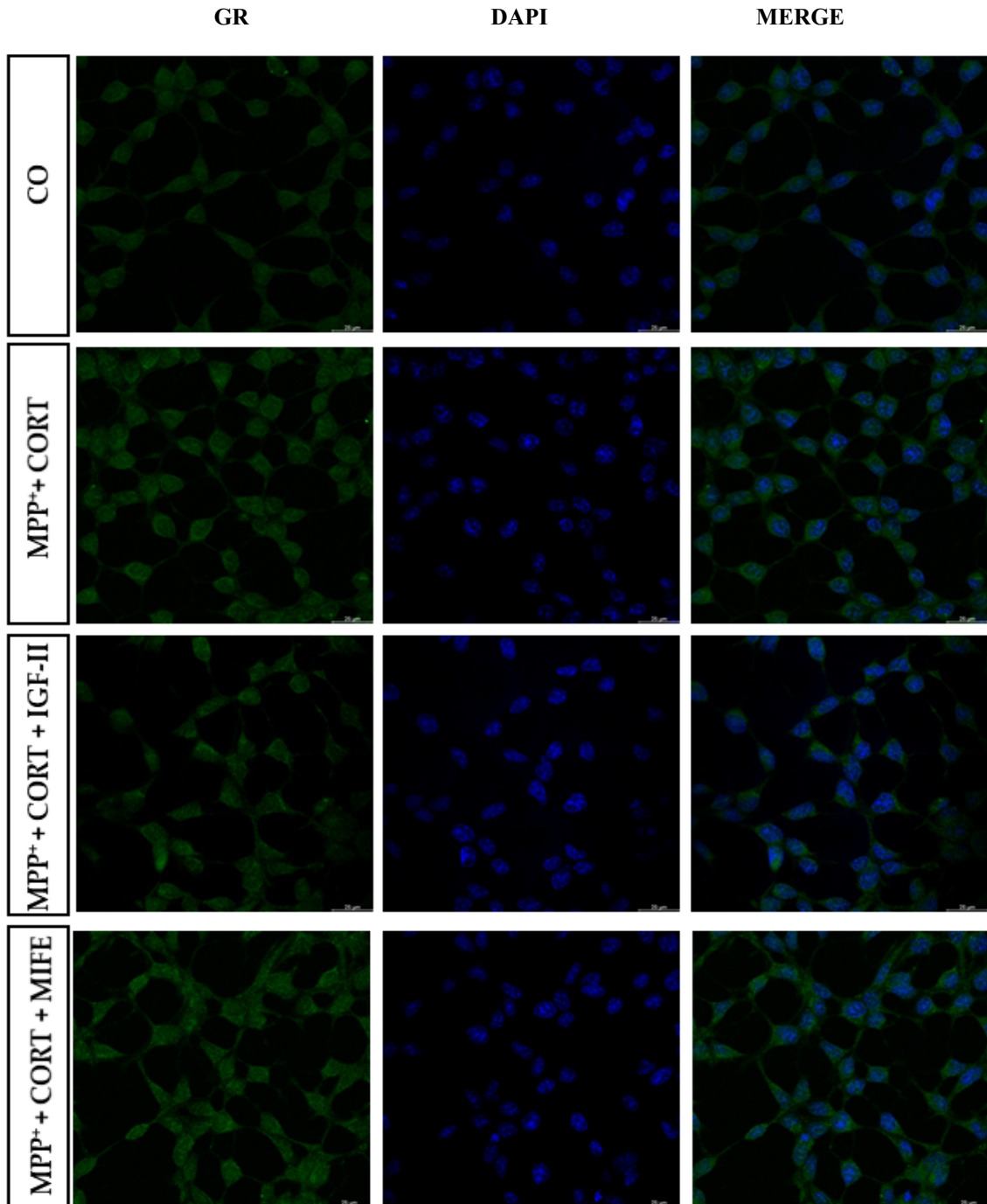


Fig. 29: Inmunocitoquímica del receptor de glucocorticoides (GR) ante la administración de CORT+MPP⁺ en ausencia o presencia de IGF-II o mifepristona. Imágenes representativas. Núcleo marcado con la sonda DAPI. CO: control.



5. DISCUSIÓN

5.1. Puesta en marcha de un modelo *in vitro* sobre neuronas dopaminérgicas como base de un modelo combinado de Enfermedad de Parkinson y estrés emocional leve-moderado

A pesar de conocerse la relación existente entre los niveles de glucocorticoides, estrés emocional leve-moderado y la EP, previo a este estudio, no se había desarrollado un modelo *in vitro* de EP y estrés emocional. Así, con la intención de demostrar el efecto negativo del estrés emocional leve-moderado en la EP se determinó la interacción de la CORT¹³⁹, como marcador de la respuesta endocrina al estrés, y la neurotoxina MPP⁺, administrada en el bien establecido modelo celular de EP^{76,140}, sobre el cultivo de neuronas dopaminérgicas.

Los resultados obtenidos en este potencial modelo celular combinado de EP y estrés emocional leve-moderado (apartado 4.1) sugieren que la patología de la EP se ve agravada por el estrés hormonal. Hemos observado que tanto la administración individual de CORT como de MPP⁺ produjeron daño oxidativo-mitocondrial y neurodegeneración frente a las células control, mientras que la coadministración de ambas sustancias dio lugar a mayores daños como consecuencia del efecto sinérgico de los tóxicos. Estos hallazgos respaldan, por un lado, que los glucocorticoides se consideren factores de riesgo para la progresión de la EP y, por otro, los resultados anteriores encontrados en modelos animales y pacientes¹⁴¹⁻¹⁴⁴ donde se pone de manifiesto el empeoramiento de la EP producido por el estrés emocional. Por tanto, el desarrollo de herramientas que ayuden a investigar la relación del estrés leve-moderado con la EP es crucial para poder encontrar posibles dianas terapéuticas.

5.1.1. Daño oxidativo-mitocondrial en el modelo

En condiciones de estrés emocional en la EP, el aumento del estrés oxidativo y del daño mitocondrial contribuyen a neurodegeneración y/o muerte celular como se han descrito en estudios previos^{131,145-147}. En este modelo, también se encontró un incremento de muerte celular tras la coincubación de CORT+MPP⁺, y se duplicó la producción de ROS en comparación con lo observado ante la

administración individualizada de las sustancias (figura 10). Este drástico incremento en los niveles de ROS conllevaría un importante desequilibrio en las reacciones REDOX. Los AOPP pueden participar en estas reacciones produciendo mayor daño celular ^{5,148} y en este modelo (figura 9b) la coadministración de los tóxicos incrementó de forma drástica los niveles de AOPP además de provocar una disminución de los niveles del TAS. Los cambios producidos a nivel de TAS y AOPP están en la misma línea que los descritos en modelos celulares de estrés oxidativo y EP ^{17,18,75,149}.

Dado que la mitocondria es una de las mayores productoras de energía y de ROS, y la EP y el estrés emocional están íntimamente relacionados con la producción de ROS ^{17,18,35,36,131}, el estudio de la función mitocondrial a través, por ejemplo, de la medición del $m\Delta\Psi$ y la bioenergética celular resulta esencial. En este sentido, y en la línea de otros trabajos ^{17,18,76,139} la administración individual de CORT o MPP⁺ produjo una disminución en el $m\Delta\Psi$, efecto que se vio potenciado al administrar CORT+MPP⁺ (figura 11a). Además, un excesivo estrés oxidativo y el descenso del $m\Delta\Psi$ produce una alteración de la energía y el metabolismo neuronal, hecho también observado en este modelo con la administración conjunta de ambos tóxicos. A lo largo del tiempo, se produjo un descenso progresivo en la respiración basal que se estabilizó a los 90 min y se mantuvo durante 5 h. La administración de MPP⁺ de forma individual disminuyó también la respiración basal, aunque en menor proporción, lo que pone de manifiesto un probable efecto sinérgico en cuanto a toxicidad con el uso combinado de CORT+MPP⁺. Sin embargo, el comportamiento de la OCR tras la administración de CORT fue similar a lo observado en las células control (11b). Este hecho podría relacionarse con el efecto dual de CORT sobre la regulación de la función mitocondrial ya conocido ¹³⁹ y que podría representar un mecanismo adaptativo en cuanto a la producción de energía para mantener la adecuada función neuronal bajo condiciones de estrés ¹⁵⁰. Esta actividad mitocondrial elevada llevaría a la consecuente producción de ROS y a una disminución de la propia actividad que se traduciría en una disfunción mitocondrial permanente. El daño causado por la administración de estas sustancias, solas y en combinación, agotarían los recursos energéticos celulares a través de diferentes mecanismos contribuyendo al deterioro de la integridad y

de la función neuronal haciendo que éstas sean menos resistentes a la neurodegeneración ¹²³.

5.1.2. Neurodegeneración en el modelo

Entre los principales mecanismos que provocan neurodegeneración, se encuentran la excesiva producción de ROS y la disfunción mitocondrial ¹⁵¹. De hecho, en este modelo donde se aprecian estos mecanismos de forma contundente, se detectó un incremento en los niveles de fluorescencia de la sonda FJ tras la incubación de los tóxicos de forma individual y en coincubación, siendo el efecto mayor en este caso (figura 12). Resultado que indica la producción de una intensa neurodegeneración en el modelo. Intensa neurodegeneración que también se aprecia en los modelos animales de EP, en los que el estrés leve es considerado como un factor de riesgo ambiental que provoca una robusta neurodegeneración progresiva en un contexto de susceptibilidad a la EP ¹⁴¹. Así, estudiaron la relación de la degeneración de la sustancia negra y el empeoramiento de los síntomas motores de la EP con los efectos combinados del estrés emocional y la pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas ^{8,152}. En la misma línea, estudios realizados en humanos sugieren una posible relación entre sintomatología de la EP y niveles de glucocorticoides ⁹⁴. Existe una clara evidencia entre la disfunción del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal y un aumento de glucocorticoides en la EP, y aunque los estudios tienden a sugerir una relación entre aumento de glucocorticoides con el empeoramiento tanto motor como no motor de los síntomas en la EP, los resultados son en algunos casos contradictorios ^{94,153}. Contradicción que probablemente se deba al limitado número de estudios que relacionan de forma directa los niveles de corticoides con la clínica de la EP, las diferentes muestras evaluadas, y la falta de estudios que midan a largo plazo el efecto de éstos en la EP ⁹⁴. En este sentido los niveles de cortisona capilar podrían aportar información relevante sobre la disfunción del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal en la EP.

Hace dos décadas se planteó la hipótesis de que el estrés contribuía a la neuropatología de la EP, posiblemente al aumentar la vulnerabilidad de las células dopaminérgicas del cerebro medio a la degeneración ¹⁵⁴. Dada la fuerte

conexión entre la EP y el estrés emocional leve-moderado, es imperativo entender su relación. El modelo celular de EP propuesto en esta tesis doctoral, basado en el marcador de la respuesta endocrina al estrés, CORT, y la neurotoxina dopaminérgica MPP⁺, sugiere que el efecto del estrés hormonal leve a moderado agrava la patología de la EP, con un papel central del daño oxidativo-mitocondrial. Este modelo podría ser un modelo apropiado para investigar dianas neuropatológicas y evaluar nuevas herramientas terapéuticas dirigidas a los pacientes con EP que sufren estrés emocional leve-moderado.

5.2. Efecto de IGF-II sobre el daño inducido por la coadministración de MPP⁺ y corticosterona en neuronas dopaminérgicas

El efecto protector del IGF-II anteriormente descrito sobre neuronas corticales tanto en el modelo celular de estrés oxidativo inducido por CORT^{17,18} como en el modelo de EP por administración de MPP⁺⁶², está mediado principalmente a través de su interacción con su receptor específico IGF-IIR, lo que podría sugerir una potencial disminución del daño oxidativo-mitocondrial producido por la coadministración de ambos tóxicos en el modelo propuesto en este trabajo, protegiendo así IGF-II a las neuronas dopaminérgicas de la muerte celular. Los resultados obtenidos están en la línea de lo descrito en cultivos de neuronas de corteza^{17,18,62}. La administración de CORT+MPP⁺ en presencia de IGF-II previno la liberación de LDH producida tras la coadministración de ambos tóxicos (figura 13), mientras que la presencia de BMS en el medio, inhibidor del efecto tirosinkinasa de IGF-IR e InsR, no modificó el efecto de IGF-II, indicando que el efecto beneficioso de IGF-II podría estar mediado por su interacción con el IGF-IIR.

5.2.1. Efecto de IGF-II sobre daño oxidativo-mitocondrial

El estrés emocional y la EP están íntimamente relacionados con la producción de ROS, hecho que se observa en este modelo combinado donde la producción de O₂^{-•} es considerablemente mayor con respecto al control o la administración individual de los tóxicos. Su producción llevaría por tanto a una disminución del TAS y también de la actividad de la enzima GPX, la cual tiene la capacidad de neutralizar los LOOH mediante GSH y NADH¹⁵⁵. Esta disminución en la actividad

de la enzima probablemente esté relacionada, por un lado, con el aumento de los niveles de LOOH encontrados, y por otro, con la depleción de GSH que se produciría como consecuencia de la regulación negativa de la vía de señalización Nrf2-ARE. Lípidos y proteínas celulares son dianas de ROS y estos producen daños estructurales en las membranas celulares llevando a un mayor desequilibrio en las reacciones REDOX ^{5,6,156}. La administración de IGF-II protege a las neuronas contra la producción de ROS (figura 14) y previene del drástico incremento en la liberación de marcadores de daño celular como son LOOH y AOPP (figura 16); Contrarrestando también el TAS y la actividad de la GPX (figura 15). Estos cambios producidos en nuestro modelo están en consonancia con los resultados previos de modelos celulares de EP ⁶² y tras la administración de CORT en cultivos celulares ¹⁷, donde IGF-II previno el desequilibrio oxidativo y los cambios en la expresión de GPX inducidos por el mismo.

La mitocondria es la fuente principal de producción de ROS y de energía ^{35,157-159}. Al igual que ocurre en otras enfermedades neurodegenerativas, la EP está en íntima relación con el equilibrio entre la producción de ROS y los procesos de eliminación de los mismos ^{5,160}, y en este modelo combinado de EP y estrés emocional, como en otras condiciones de toxicidad mitocondrial ^{17,18,75,133}, se observó una disminución de la función mitocondrial y un aumento en la producción de ROS, lo que conlleva daño neuronal. Con la inclusión de IGF-II en el tratamiento, se preservaron el $m\Delta\Psi$ (figura 19), en parte su localización en el axoplasma (figura 17), tan necesaria para desarrollar la función mitocondrial, y el equilibrio de ROS ya comentado, así como la protección parcial de los siguientes parámetros bioenergéticos celulares: consumo de O₂ debido a la respiración basal, consumo de O₂ utilizado para producir ATP, respiración máxima y la capacidad respiratoria de reserva de la célula (figura 21). Con respecto a este último parámetro, se conoce que las neuronas utilizan esta reserva en función de su actividad ¹⁵¹. Así, en las neuronas en reposo su uso es del 7% mientras que las neuronas activas pueden usar hasta el 80%. Por tanto, la capacidad respiratoria de reserva de la célula tiene como cometido ayudar a las neuronas cuando precisan un aumento de demanda energética, siendo crucial para el mantenimiento de la homeostasis celular en situaciones de estrés

celular ¹⁵¹, resultando su deterioro nefasto para las neuronas. IGF-II mantuvo la capacidad respiratoria de reserva evitando así la muerte celular. Por todo ello, se puede inferir que tanto la activación del sistema antioxidante como el aumento en la función mitocondrial contribuyen a los efectos neuroprotectores de IGF-II frente al estrés oxidativo. En este sentido se conoce que IGF-II mejora la función mitocondrial en otros tejidos, hígado y músculo esquelético, bajo condiciones de estrés ^{161,162}. Como molécula anabólica, IGF-II aumenta la disponibilidad de ATP ¹⁶³ lo que hace pensar que el efecto observado en este trabajo podría estar relacionado con esta capacidad. En cuanto a la fuga de protones (figura 21c), el tratamiento con IGF-II previno el incremento producido por ambos tóxicos en combinación, mejorando la eficiencia mitocondrial ¹⁶⁴, probablemente mediante la preservación de la oxidación de la membrana y/o la modulación en el desacoplamiento de las proteínas. Los desacopladores suaves son compuestos con funciones antioxidantes que dan lugar al desajuste de los procesos de fosforilación y transporte mitocondrial de electrones y que, en última instancia, mantienen el ATP en un nivel adecuado para satisfacer las demandas metabólicas celulares. Esta característica ha producido un marcado interés por el posible uso terapéutico de dichas moléculas, también en relación con los trastornos neurológicos ¹⁶⁵. El efecto observado en este trabajo de IGF-II posiblemente esté mediado en gran medida por su interacción con el IGF-IIR ^{17,18}, lo que hace pensar que no actúe como una molécula antioxidante convencional o un desacoplador suave, aunque sí podría actuar como un modulador ¹⁶⁵. En todo caso, parece claro que el efecto descrito para IGF-II en este trabajo podría mejorar la disfunción mitocondrial y también disminuir la producción de ROS, mejorando dos de los principales mecanismos causantes de neurodegeneración ¹⁶⁶.

5.2.2. Efecto de IGF-II sobre marcador dopaminérgico y neurodegeneración

Una de las características principales en la EP es la disminución en la síntesis de dopamina ¹⁶⁷. La TH es la enzima limitante de la tasa de producción de dopamina, por lo que se puede considerar esta enzima como un marcador de neuronas dopaminérgicas para evaluar su integridad. El estrés leve-moderado en la EP, según modelos animales, es considerado un factor de riesgo ambiental que provoca neurodegeneración progresiva ¹⁴¹. La hipótesis de que el estrés emocional contribuye a la neuropatología en la EP se basa posiblemente en su efecto deletéreo en las neuronas del mesencéfalo ¹⁶⁸. En el modelo planteado en este trabajo, se pone de manifiesto el papel fundamental del estresor hormonal CORT en la expresión de la TH (figura 22) en neuronas dopaminérgicas de sustancia negra donde la administración de MIFE inhibió parcialmente el efecto tóxico de la coincubación de CORT+MPP⁺. Toxicidad que en presencia de IGF-II fue prevenida, lo que denota un efecto neuroprotector de IGF-II frente al daño provocado por la neurotoxina y la CORT. En la misma línea, IGF-II contrarrestó parcialmente los altos niveles de neurodegeneración encontrados tras la incubación con ambos tóxicos (figura 24). Los modelos animales combinados de EP y estrés leve-moderado, han demostrado una pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas y una degeneración de la sustancia negra, exponiendo que el estrés emocional produce un empeoramiento en la sintomatología de la EP que acelera la neurodegeneración en dicha estructura ^{8,152}. En estudios con humanos esta posible relación también se ha sugerido ⁹⁴.

5.2.3. Vías de señalización intracelular implicadas

La implicación de PKC en la regulación del metabolismo mitocondrial es conocido ¹⁶⁹ y su activación podría relacionarse con efectos protectores. En este sentido, se ha observado que su inhibición produce un aumento en la muerte de neuronas hipocámpales ¹⁷⁰ mientras que su activación, podría provocar la activación de Nrf2 y el mantenimiento de las defensas antioxidantes como ocurre en cardiomiocitos postcondicionados de rata ⁸⁷. En el potencial modelo celular combinado de EP y estrés emocional leve-moderado utilizado en el presente trabajo, se observó una disminución de la expresión de pPKC α/β tras la

coincubación con ambos tóxicos, la cual se previno en presencia de IGF-II (figura 25) en la línea de lo encontrado en cardiomioblastos ¹²⁰. Este resultado podría indicar que el efecto beneficioso de IGF-II sobre los parámetros de función mitocondrial estudiados estaría mediado por la activación de la PKC y protegería los recursos energéticos en la EP con estrés leve-moderado contribuyendo a mantener la integridad de la neurona y sus funciones, haciendo que las células sean menos vulnerables a la neurodegeneración.

Como se comentó en el apartado introducción, Nrf2 es considerado un factor sensible a REDOX que regula la expresión de más de 250 genes implicados en acciones antioxidantes ¹⁷¹⁻¹⁷³. Este factor potencia la transcripción de elementos de respuesta antioxidante, convirtiéndose en una diana clave de numerosos desórdenes, también para las enfermedades neurodegenerativas. Con respecto a EP se piensa que Nrf2 suprime el daño oxidativo celular, la proteinopatía y la neuroinflamación ¹⁷⁴. En este estudio, la administración de CORT+MPP⁺ produjo una disminución en la expresión nuclear de Nrf2, en la línea de lo observado en un modelo celular oxidativo de neuronas dopaminérgicas ⁷⁵, lo cual podría contribuir a la disminución que se aprecia en el presente trabajo en GPX. Con respecto al efecto de IGF-II en la expresión nuclear de Nrf2, la administración de ambos tóxicos en presencia de IGF-II impidió dicha disminución (figura 27) como consecuencia directa de IGF-II y/o a través de la interacción con otros factores. En cualquier caso, la disminución en la expresión nuclear de Nrf2 apreciada en este modelo de daño podría atribuirse a alteraciones del metabolismo de Nrf2 ¹⁷⁵, a una reducción inducida por MPP⁺ ^{176,177} o al efecto de CORT mediado por la interacción entre GR y Nrf2 ¹⁷⁸.

En la progresión fisiopatológica de la EP se ha observado el papel de los glucocorticoides a través de su interacción con los GR. De hecho, los niveles plasmáticos basales de cortisol están elevados en los pacientes con EP, sugiriendo una desregulación en el eje HPA, que afecta a la actividad de los GR ¹⁷⁹. En un modelo animal de EP inducido por fármacos, la administración crónica de CORT aumentó la densidad de GR en las áreas motoras ¹⁸⁰, lo que lleva a pensar en el rol de estos receptores sobre la regulación de la neurodegeneración en la EP ¹⁴⁶. En el presente trabajo, la coincubación de ambos tóxicos en

presencia del antagonista del GR MIFE, contrarrestó parcialmente la muerte celular y la expresión nuclear de Nrf2 y mantuvo la expresión de pPKC α/β en valores próximos a los encontrados en las células control. Con respecto a la expresión nuclear de GR, ésta aumentó tras la administración de CORT+MPP⁺, mientras que la coincubación de ambos tóxicos en presencia de MIFE, bloqueó el efecto de la CORT sobre GR inhibiendo su translocación al núcleo como era de esperar. Como ocurrió en la expresión nuclear de Nrf2, la coincubación de los tóxicos en presencia de IGF-II previno el incremento de la expresión nuclear de GR (figura 28).

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que, en el modelo combinado de EP y estrés leve-moderado propuesto, donde CORT juega un papel central en el efecto tóxico sinérgico observado, se produce un incremento en la neurodegeneración y muerte celular como consecuencia de un aumento en el estrés oxidativo y una disfunción mitocondrial. Por otra parte, el efecto neuroprotector de IGF-II podría deberse principalmente a su función como activador de PKC y de la respuesta antioxidante de Nrf2 a través de la vía de señalización dependiente de GR, previniendo el daño oxidativo-mitocondrial y la neurodegeneración y manteniendo la función mitocondrial. La capacidad de IGF-II para proteger las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra ante el daño oxidativo-mitocondrial inducido por la neurotoxina MPP⁺ y la CORT, como marcador de la respuesta endocrina al estrés, revela su potencial uso terapéutico como herramienta para tratar y prevenir la progresión de la EP en pacientes que sufren estrés emocional leve-moderado.



6. CONCLUSIONES

1. Este modelo *in vitro*, muestra el papel central de corticosterona en el efecto sinérgico tóxico observado, y sugiere que el estrés hormonal, agrava la patología de la Enfermedad de Parkinson, siendo fundamental para ello el daño oxidativo-mitocondrial producido.
2. El modelo *in vitro* propuesto, podría ser un modelo válido para investigar dianas neuropatológicas y evaluar nuevas herramientas terapéuticas para los pacientes con Enfermedad de Parkinson y estrés emocional leve-moderado.
3. Este trabajo revela el efecto neuroprotector del IGF-II, sobre el daño inducido por la coadministración de MPP⁺ y corticosterona en neuronas dopaminérgicas de sustancia negra.
4. Se demuestra la capacidad del IGF-II, para proteger a las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra contra el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial, y la neurodegeneración inducida por los tóxicos corticosterona y MPP⁺.
5. Este efecto neuroprotector del IGF-II, podría deberse principalmente a su función activadora sobre la proteína quinasa C, y la respuesta antioxidante del factor de transcripción nuclear eritroide tipo 2, dependiente a su vez del receptor de glucocorticoides. La activación de estas vías de señalización, podría prevenir el daño oxidativo-mitocondrial y la neurodegeneración, así como favorecer el mantenimiento de la función mitocondrial.
6. Considerando la capacidad protectora del IGF-II en el modelo, proponemos a esta molécula como potencial herramienta terapéutica para el tratamiento y prevención de la progresión de la Enfermedad de Parkinson en los pacientes con estrés emocional leve-moderado.



7. BIBLIOGRAFÍA

1. Tolosa, S. *et al.* Challenges in the diagnosis of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* vol. 20 www.thelancet.com/neurology (2021).
2. Hoehn, M. M. & Yahr, M. D. Parkinsonism: onset, progression, and mortality. *Neurology* **17**, 427–427 (1967).
3. Lee, A. & Gilbert, R. M. Epidemiology of Parkinson Disease. *Neurologic Clinics* vol. 34 955–965 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2016.06.012> (2016).
4. King, E. *et al.* Inflammation in mild cognitive impairment due to Parkinson's disease, Lewy body disease, and Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry* **34**, 1244–1250 (2019).
5. Puspita, L., Chung, S. Y. & Shim, J. Oxidative stress and cellular pathologies in Parkinson's disease. *Mol Brain* **10**, 53 (2017).
6. Guo, J., Zhao, X., Li, Y., Li, G. & Liu, X. Damage to dopaminergic neurons by oxidative stress in Parkinson's disease (Review). *Int J Mol Med* (2018) doi:10.3892/ijmm.2018.3406.
7. van der Heide, A. *et al.* Stress and mindfulness in Parkinson's disease – a survey in 5000 patients. *NPJ Parkinsons Dis* (2021) doi:10.1038/s41531-020-00152-9.
8. Hemmerle, A. M., Herman, J. P. & Seroogy, K. B. Stress, depression and Parkinson's disease. *Experimental Neurology* vol. 233 79–86 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.09.035> (2012).
9. Berger, I., Werdermann, M., Bornstein, S. R. & Steenblock, C. The adrenal gland in stress – Adaptation on a cellular level. *J Steroid Biochem Mol Biol* **190**, 198–206 (2019).
10. Dröse, S. & Brandt, U. Molecular Mechanisms of Superoxide Production by the Mitochondrial Respiratory Chain. in 145–169 (2012). doi:10.1007/978-1-4614-3573-0_6.
11. Pedersen, P. L. Mitochondrial events in the life and death of animal cells: a brief overview. *J Bioenerg Biomembr* **31**, 291–304 (1999).
12. Lin, M. T. & Beal, M. F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* **443**, 787–795 (2006).

13. van Horsen, J., Witte, M. E., Schreibelt, G. & de Vries, H. E. Radical changes in multiple sclerosis pathogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1812**, 141–150 (2011).
14. Franco-Iborra, S., Vila, M. & Perier, C. Mitochondrial Quality Control in Neurodegenerative Diseases: Focus on Parkinson's Disease and Huntington's Disease. *Front Neurosci* **12**, (2018).
15. Castilla-Cortázar, I. *et al.* Hepatoprotection and neuroprotection induced by low doses of IGF-II in aging rats. *J Transl Med* **9**, 103 (2011).
16. Ouchi, Y. *et al.* Reduced Adult Hippocampal Neurogenesis and Working Memory Deficits in the Dgcr8-Deficient Mouse Model of 22q11.2 Deletion-Associated Schizophrenia Can Be Rescued by IGF2. *Journal of Neuroscience* **33**, 9408–9419 (2013).
17. Martín-Montañez, E. *et al.* Involvement of IGF-II receptors in the antioxidant and neuroprotective effects of IGF-II on adult cortical neuronal cultures. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1842**, 1041–1051 (2014).
18. Martín-Montañez, E. *et al.* IGF-II promotes neuroprotection and neuroplasticity recovery in a long-lasting model of oxidative damage induced by glucocorticoids. *Redox Biol* **13**, 69–81 (2017).
19. Steinmetz, A. B., Stern, S. A., Kohtz, A. S., Descalzi, G. & Alberini, C. M. Insulin-Like Growth Factor II Targets the mTOR Pathway to Reverse Autism-Like Phenotypes in Mice. *The Journal of Neuroscience* **38**, 1015–1029 (2018).
20. Pardo, M. *et al.* Insulin growth factor 2 (IGF2) as an emergent target in psychiatric and neurological disorders. Review. *Neurosci Res* **149**, 1–13 (2019).
21. Steiner, J. A., Quansah, E. & Brundin, P. The concept of alpha-synuclein as a prion-like protein: ten years after. *Cell Tissue Res* **373**, (2018).
22. Haaxma, C. A. *et al.* Gender differences in Parkinson's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* **78**, 819–824 (2007).
23. Tysnes, O. B. & Storstein, A. Epidemiology of Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission* vol. 124 901–905 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s00702-017-1686-y> (2017).

24. de Pablo-Fernández, E., Lees, A. J., Holton, J. L. & Warner, T. T. Prognosis and Neuropathologic Correlation of Clinical Subtypes of Parkinson Disease. *JAMA Neurol* **76**, 470 (2019).
25. Berg, D. *et al.* MDS research criteria for prodromal Parkinson's disease. *Movement Disorders* **30**, 1600–1611 (2015).
26. Postuma, R. B. *et al.* MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Movement Disorders* **30**, 1591–1601 (2015).
27. Ahlskog, J. E. & Muenter, M. D. Frequency of levodopa-related dyskinesias and motor fluctuations as estimated from the cumulative literature. *Movement Disorders* **16**, 448–458 (2001).
28. Suwijn, S. R. *et al.* The diagnostic accuracy of dopamine transporter SPECT imaging to detect nigrostriatal cell loss in patients with Parkinson's disease or clinically uncertain parkinsonism: a systematic review. *EJNMMI Res* **5**, 12 (2015).
29. Armstrong, M. J. & Okun, M. S. Diagnosis and Treatment of Parkinson Disease: A Review. *JAMA - Journal of the American Medical Association* vol. 323 548–560 Preprint at <https://doi.org/10.1001/jama.2019.22360> (2020).
30. Macleod, A. D., Taylor, K. S. M. & Counsell, C. E. Mortality in Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. *Movement Disorders* **29**, 1615–1622 (2014).
31. Fereshtehnejad, S.-M., Zeighami, Y., Dagher, A. & Postuma, R. B. Clinical criteria for subtyping Parkinson's disease: biomarkers and longitudinal progression. *Brain* **140**, 1959–1976 (2017).
32. Blauwendraat, C., Nalls, M. A. & Singleton, A. B. The genetic architecture of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* **19**, 170–178 (2020).
33. Berardelli, A. *et al.* EFNS/MDS-ES recommendations for the diagnosis of Parkinson's disease. *Eur J Neurol* **20**, 16–34 (2013).
34. Johnson, W. M., Wilson-Delfosse, A. L. & Miéyal, John. J. Dysregulation of Glutathione Homeostasis in Neurodegenerative Diseases. *Nutrients* **4**, 1399–1440 (2012).
35. Schon, E. A. & Przedborski, S. Mitochondria: The Next (Neurode)Generation. *Neuron* **70**, 1033–1053 (2011).

36. Blesa, J., Trigo-Damas, I., Quiroga-Varela, A. & Jackson-Lewis, V. R. Oxidative stress and Parkinson's disease. *Front Neuroanat* **9**, (2015).
37. Pavón Fuentes, N. & Lorigados Pedre, L. *ARTÍCULOS DE REVISIÓN Neuroinflamación y Enfermedad de Parkinson*. vol. RNPS <http://www.revpanorama.sld.cu/index.php/rpan/article/view/>.
38. Gibberd, F. B. & Simmonds, J. P. NEUROLOGICAL DISEASE IN EX-FAR-EAST PRISONERS OF WAR. *The Lancet* **316**, 135–137 (1980).
39. Grimes, D. *et al.* Canadian guideline for Parkinson disease. *Can Med Assoc J* **191**, E989–E1004 (2019).
40. Fox, S. H. *et al.* International Parkinson and movement disorder society evidence-based medicine review: Update on treatments for the motor symptoms of Parkinson's disease. *Movement Disorders* **33**, 1248–1266 (2018).
41. Grimes, D. *et al.* Canadian guideline for Parkinson disease. *Can Med Assoc J* **191**, E989–E1004 (2019).
42. Richard, I. H. *et al.* A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of antidepressants in Parkinson disease. *Neurology* **78**, 1229–1236 (2012).
43. Seppi, K. *et al.* Update on treatments for nonmotor symptoms of Parkinson's disease—an evidence-based medicine review. *Movement Disorders* **34**, 180–198 (2019).
44. Troeung, L., Egan, S. J. & Gasson, N. A Meta-Analysis of Randomised Placebo-Controlled Treatment Trials for Depression and Anxiety in Parkinson's Disease. *PLoS One* **8**, e79510 (2013).
45. Peball, M. *et al.* Non-Motor Symptoms in Parkinson's Disease are Reduced by Nabilone. *Ann Neurol* **88**, 712–722 (2020).
46. Cummings, J. *et al.* Pimavanserin for patients with Parkinson's disease psychosis: a randomised, placebo-controlled phase 3 trial. *The Lancet* **383**, 533–540 (2014).
47. Seppi, K. *et al.* The Movement Disorder Society Evidence-Based Medicine Review Update: Treatments for the non-motor symptoms of Parkinson's disease. *Movement Disorders* **26**, S42–S80 (2011).
48. Ma, H., Yan, J., Sun, W., Jiang, M. & Zhang, Y. Melatonin Treatment for Sleep Disorders in Parkinson's Disease: A Meta-Analysis and Systematic Review. *Front Aging Neurosci* **14**, (2022).

49. Rios Romenets, S. *et al.* Doxepin and cognitive behavioural therapy for insomnia in patients with Parkinson's disease – A randomized study. *Parkinsonism Relat Disord* **19**, 670–675 (2013).
50. Elbers, R. G., Verhoef, J., van Wegen, E. E., Berendse, H. W. & Kwakkel, G. Interventions for fatigue in Parkinson's disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews* **2015**, (2015).
51. Chang, M. C., Park, J.-S., Lee, B. J. & Park, D. Effectiveness of pharmacologic treatment for dysphagia in Parkinson's disease: a narrative review. *Neurological Sciences* **42**, 513–519 (2021).
52. Thomsen, T. R., Galpern, W. R., Asante, A., Arenovich, T. & Fox, S. H. Ipratropium bromide spray as treatment for sialorrhea in Parkinson's disease. *Movement Disorders* **22**, 2268–2273 (2007).
53. Raffaele, R. Efficacy and Safety of Fixed-Dose Oral Sildenafil in the Treatment of Sexual Dysfunction in Depressed Patients with Idiopathic Parkinson's Disease. *Eur Urol* **41**, 382–386 (2002).
54. Padma-Nathan, H. *et al.* Treatment of Men with Erectile Dysfunction with Transurethral Alprostadil. *New England Journal of Medicine* **336**, 1–7 (1997).
55. Cuadrado, A. *et al.* Therapeutic targeting of the NRF2 and KEAP1 partnership in chronic diseases. *Nat Rev Drug Discov* **18**, 295–317 (2019).
56. Pajares, M., Cuadrado, A. & Rojo, A. I. Modulation of proteostasis by transcription factor NRF2 and impact in neurodegenerative diseases. *Redox Biol* **11**, 543–553 (2017).
57. Peter, I. *et al.* Anti-Tumor Necrosis Factor Therapy and Incidence of Parkinson Disease Among Patients With Inflammatory Bowel Disease. *JAMA Neurol* **75**, 939 (2018).
58. Liu, D., Zhao, C., Wei, X., Ma, Y. & Wu, J. Semaglutide Protects against 6-OHDA Toxicity by Enhancing Autophagy and Inhibiting Oxidative Stress. *Parkinsons Dis* **2022**, 1–10 (2022).
59. Teema, A. M., Zaitone, S. A. & Moustafa, Y. M. Ibuprofen or piroxicam protects nigral neurons and delays the development of L-dopa induced dyskinesia in rats with experimental Parkinsonism: Influence on angiogenesis. *Neuropharmacology* **107**, 432–450 (2016).

60. Islam, Md. T. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders. *Neurol Res* **39**, 73–82 (2017).
61. van Horssen, J. *et al.* Severe oxidative damage in multiple sclerosis lesions coincides with enhanced antioxidant enzyme expression. *Free Radic Biol Med* **45**, 1729–1737 (2008).
62. Dong, W., Hu, L. & Xu, X. Neuroprotective Effect of Insulin-like Growth Factor-II on 1-Methyl-4-Phenyl Pyridinium-Induced Oxidative Damage in Cortical Neuronal Cells. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* **14**, 1191 (2015).
63. Girotti, A. W. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J Lipid Res* **39**, 1529–42 (1998).
64. Fernández-Espejo, E. *et al.* Myeloperoxidase and Advanced Oxidation Protein Products in the Cerebrospinal Fluid in Women and Men with Parkinson's Disease. *Antioxidants* **11**, 1088 (2022).
65. Buelna-Chontal, M. *et al.* Nrf2-regulated antioxidant response is activated by protein kinase C in postconditioned rat hearts. *Free Radic Biol Med* **74**, 145–156 (2014).
66. Cuadrado, A. NRF2 in neurodegenerative diseases. *Curr Opin Toxicol* **1**, 46–53 (2016).
67. Königsberg-Fainstein M. Nrf2: la historia de un nuevo factor de transcripción que responde a estrés oxidativo. *Rev Educ Bioquímica* **26**, 18–25 (2007).
68. Hur, W. & Gray, N. S. Small molecule modulators of antioxidant response pathway. *Curr Opin Chem Biol* **15**, 162–173 (2011).
69. Dinkova-Kostova, A. T. & Abramov, A. Y. The emerging role of Nrf2 in mitochondrial function. *Free Radic Biol Med* **88**, 179–188 (2015).
70. Mazzetti, A. P., Fiorile, M. C., Primavera, A. & Io Bello, M. Glutathione transferases and neurodegenerative diseases. *Neurochem Int* **82**, 10–18 (2015).
71. Holzerova, E. *et al.* Human thioredoxin 2 deficiency impairs mitochondrial redox homeostasis and causes early-onset neurodegeneration. *Brain* **139**, 346–354 (2016).

72. Jastroch, M., Divakaruni, A. S., Mookerjee, S., Treberg, J. R. & Brand, M. D. Mitochondrial proton and electron leaks. *Essays Biochem* **47**, 53–67 (2010).
73. Bose, A. & Beal, M. F. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *J Neurochem* **139**, 216–231 (2016).
74. Cadenas, E. & Davies, K. J. A. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging¹¹This article is dedicated to the memory of our dear friend, colleague, and mentor Lars Ernster (1920–1998), in gratitude for all he gave to us. *Free Radic Biol Med* **29**, 222–230 (2000).
75. Martín-Montañez, E. *et al.* The S1P mimetic fingolimod phosphate regulates mitochondrial oxidative stress in neuronal cells. *Free Radic Biol Med* **137**, 116–130 (2019).
76. Mudò, G. *et al.* Transgenic expression and activation of PGC-1 α protect dopaminergic neurons in the MPTP mouse model of Parkinsons disease. *Cellular and Molecular Life Sciences* **69**, 1153–1165 (2012).
77. Weydt, P. *et al.* Thermoregulatory and metabolic defects in Huntington's disease transgenic mice implicate PGC-1 α in Huntington's disease neurodegeneration. *Cell Metab* **4**, 349–362 (2006).
78. Haider, L. *et al.* Oxidative damage in multiple sclerosis lesions. *Brain* **134**, 1914–1924 (2011).
79. Carvalho, A. N., Lim, J. L., Nijland, P. G., Witte, M. E. & van Horsen, J. Glutathione in multiple sclerosis: More than just an antioxidant? *Multiple Sclerosis Journal* **20**, 1425–1431 (2014).
80. Neves Carvalho, A., Firuzi, O., Joao Gama, M., van Horsen, J. & Saso, L. Oxidative Stress and Antioxidants in Neurological Diseases: Is There Still Hope? *Curr Drug Targets* **18**, 705–718 (2017).
81. Ramamoorthy, S. & Cidlowski, J. A. Corticosteroids. *Rheumatic Disease Clinics of North America* **42**, 15–31 (2016).
82. Herrero, M.-T., Estrada, C., Maatouk, L. & Vyas, S. Inflammation in Parkinson's disease: role of glucocorticoids. *Front Neuroanat* **9**, (2015).
83. Sorrells, S. F. & Sapolsky, R. M. An inflammatory review of glucocorticoid actions in the CNS. *Brain Behav Immun* **21**, 259–272 (2007).

84. O'Connor, K. A. *et al.* Peripheral and central proinflammatory cytokine response to a severe acute stressor. *Brain Res* **991**, 123–132 (2003).
85. Dhabhar, F. S. Stress-induced augmentation of immune function—The role of stress hormones, leukocyte trafficking, and cytokines. *Brain Behav Immun* **16**, 785–798 (2002).
86. Yoshiya, M. *et al.* Corticosterone rapidly increases thorns of CA3 neurons via synaptic/extranuclear glucocorticoid receptor in rat hippocampus. *Front Neural Circuits* **7**, (2013).
87. Buelna-Chontal, M. *et al.* Nrf2-regulated antioxidant response is activated by protein kinase C in postconditioned rat hearts. *Free Radic Biol Med* **74**, 145–156 (2014).
88. Fujita, C. *et al.* Direct effects of corticosterone on ATP production by mitochondria from immortalized hypothalamic GT1-7 neurons. *J Steroid Biochem Mol Biol* **117**, 50–55 (2009).
89. Snyder, A. M., Stricker, E. M. & Zigmond, M. J. Stress-induced neurological impairments in an animal model of parkinsonism. *Ann Neurol* **18**, 544–551 (1985).
90. Kibel, A. & Drenjančević-Perić, I. Impact of glucocorticoids and chronic stress on progression of Parkinson's disease. *Med Hypotheses* **71**, 952–956 (2008).
91. Ahima, R. S. & Harlan, R. E. Charting of Type II glucocorticoid receptor-like immunoreactivity in the rat central nervous system. *Neuroscience* **39**, 579–604 (1990).
92. Keefe, K. A., Stricker, E. M., Zigmond, M. J. & Abercrombie, E. D. Environmental stress increases extracellular dopamine in striatum of 6-hydroxydopamine-treated rats: in vivo microdialysis studies. *Brain Res* **527**, 350–353 (1990).
93. Metz, G. A. Stress as a Modulator of Motor System Function and Pathology. *Rev Neurosci* **18**, (2007).
94. Soares, N. M., Pereira, G. M., Altmann, V., de Almeida, R. M. M. & Rieder, C. R. M. Cortisol levels, motor, cognitive and behavioral symptoms in Parkinson's disease: a systematic review. *Journal of Neural Transmission* vol. 126 219–232 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s00702-018-1947-4> (2019).

95. Lopes, F. M., Bristot, I. J., da Motta, L. L., Parsons, R. B. & Klamt, F. Mimicking Parkinson's Disease in a Dish: Merits and Pitfalls of the Most Commonly used Dopaminergic In Vitro Models. *Neuromolecular Med* **19**, 241–255 (2017).
96. Chia, S. J., Tan, E.-K. & Chao, Y.-X. Historical Perspective: Models of Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci* **21**, 2464 (2020).
97. Glinka, Y., Tipton, K. F. & Youdim, M. B. H. Nature of Inhibition of Mitochondrial Respiratory Complex I by 6-Hydroxydopamine. *J Neurochem* **66**, 2004–2010 (2002).
98. Bisbal, M. & Sanchez, M. Neurotoxicity of the pesticide rotenone on neuronal polarization: a mechanistic approach. *Neural Regen Res* **14**, 762 (2019).
99. Karunakaran, S. *et al.* Selective Activation of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase in Dopaminergic Neurons of Substantia Nigra Leads to Nuclear Translocation of p53 in 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine-Treated Mice. *Journal of Neuroscience* **28**, 12500–12509 (2008).
100. Nicklas, W. J., Youngster, S. K., Kindt, M. V. & Heikkila, R. E. IV. MPTP, MPP+ and mitochondrial function. *Life Sci* **40**, 721–729 (1987).
101. Ross, A. *et al.* Alleviating toxic α -Synuclein accumulation by membrane depolarization: evidence from an in vitro model of Parkinson's disease. *Mol Brain* **13**, 108 (2020).
102. Guiney, S. J. *et al.* Fibrillar α -synuclein toxicity depends on functional lysosomes. *Journal of Biological Chemistry* **295**, 17497–17513 (2020).
103. Nguyen, H. N. *et al.* LRRK2 Mutant iPSC-Derived DA Neurons Demonstrate Increased Susceptibility to Oxidative Stress. *Cell Stem Cell* **8**, 267–280 (2011).
104. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* **126**, 663–676 (2006).
105. Dawson, T. M., Ko, H. S. & Dawson, V. L. Genetic Animal Models of Parkinson's Disease. *Neuron* **66**, 646–661 (2010).

106. Wu, Q., Yang, X., Zhang, Y., Zhang, L. & Feng, L. Chronic mild stress accelerates the progression of Parkinson's disease in A53T α -synuclein transgenic mice. *Exp Neurol* **285**, 61–71 (2016).
107. Burtscher, J. *et al.* Chronic corticosterone aggravates behavioral and neuronal symptomatology in a mouse model of alpha-synuclein pathology. *Neurobiol Aging* **83**, 11–20 (2019).
108. Wang, Y., MacDonald, R. G., Thinakaran, G. & Kar, S. Insulin-Like Growth Factor-II/Cation-Independent Mannose 6-Phosphate Receptor in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol* **54**, 2636–2658 (2017).
109. Fernandez, A. M. & Torres-Alemán, I. The many faces of insulin-like peptide signalling in the brain. *Nat Rev Neurosci* **13**, 225–239 (2012).
110. Hawkes, C. & Kar, S. The insulin-like growth factor-II/mannose-6-phosphate receptor: structure, distribution and function in the central nervous system. *Brain Res Rev* **44**, 117–140 (2004).
111. Ziegler, A. N., Levison, S. W. & Wood, T. L. Insulin and IGF receptor signalling in neural-stem-cell homeostasis. *Nat Rev Endocrinol* **11**, 161–170 (2015).
112. Stern, S. A., Kohtz, A. S., Pollonini, G. & Alberini, C. M. Enhancement of Memories by Systemic Administration of Insulin-Like Growth Factor II. *Neuropsychopharmacology* **39**, 2179–2190 (2014).
113. Beletskiy, A., Chesnokova, E. & Bal, N. Insulin-Like Growth Factor 2 As a Possible Neuroprotective Agent and Memory Enhancer—Its Comparative Expression, Processing and Signaling in Mammalian CNS. *Int J Mol Sci* **22**, 1849 (2021).
114. Ziegler, A. N., Levison, S. W. & Wood, T. L. Insulin and IGF receptor signalling in neural-stem-cell homeostasis. *Nat Rev Endocrinol* **11**, 161–170 (2015).
115. Stern, S. A., Kohtz, A. S., Pollonini, G. & Alberini, C. M. Enhancement of Memories by Systemic Administration of Insulin-Like Growth Factor II. *Neuropsychopharmacology* **39**, 2179–2190 (2014).
116. Beletskiy, A., Chesnokova, E. & Bal, N. Insulin-Like Growth Factor 2 As a Possible Neuroprotective Agent and Memory Enhancer—Its Comparative Expression, Processing and Signaling in Mammalian CNS. *Int J Mol Sci* **22**, 1849 (2021).

117. Beletskiy, A., Chesnokova, E. & Bal, N. Insulin-Like Growth Factor 2 As a Possible Neuroprotective Agent and Memory Enhancer—Its Comparative Expression, Processing and Signaling in Mammalian CNS. *Int J Mol Sci* **22**, 1849 (2021).
118. Werner, H. & LeRoith, D. Insulin and insulin-like growth factor receptors in the brain: Physiological and pathological aspects. *European Neuropsychopharmacology* **24**, 1947–1953 (2014).
119. Cosentino-Gomes, D., Rocco-Machado, N. & Meyer-Fernandes, J. R. Cell Signaling through Protein Kinase C Oxidation and Activation. *Int J Mol Sci* **13**, 10697–10721 (2012).
120. Chu, C.-H. *et al.* IGF-II/mannose-6-phosphate receptor signaling induced cell hypertrophy and atrial natriuretic peptide/BNP expression via Gαq interaction and protein kinase C-α/CaMKII activation in H9c2 cardiomyoblast cells. *Journal of Endocrinology* **197**, 381–390 (2008).
121. Pascual-Lucas, M. *et al.* Insulin-like growth factor 2 reverses memory and synaptic deficits in <scp>APP</scp> transgenic mice. *EMBO Mol Med* **6**, 1246–1262 (2014).
122. Wilczak, N. *et al.* Insulin-like growth factor II receptors in human brain and their absence in astroglitic plaques in multiple sclerosis. *Brain Res* **863**, 282–288 (2000).
123. Son, J. H. *et al.* Neuroprotection and Neuronal Differentiation Studies Using Substantia Nigra Dopaminergic Cells Derived from Transgenic Mouse Embryos. *The Journal of Neuroscience* **19**, 10–20 (1999).
124. Pasquali-Ronchetti, I. *et al.* Oxidative stress in fibroblasts from patients with pseudoxanthoma elasticum: possible role in the pathogenesis of clinical manifestations. *J Pathol* **208**, 54–61 (2006).
125. Bradford, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* **72**, 248–254 (1976).
126. Re, R. *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* **26**, 1231–1237 (1999).
127. Arab, K. & Steghens, J.-P. Plasma lipid hydroperoxides measurement by an automated xylenol orange method. *Anal Biochem* **325**, 158–163 (2004).

128. Witko-Sarsat, V. *et al.* Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int* **49**, 1304–1313 (1996).
129. Pendergrass, W., Wolf, N. & Poot, M. Efficacy of MitoTracker Green? and CMXrosamine to measure changes in mitochondrial membrane potentials in living cells and tissues. *Cytometry* **61A**, 162–169 (2004).
130. Kauffman, M. E. *et al.* MitoSOX-Based Flow Cytometry for Detecting Mitochondrial ROS. *Reactive Oxygen Species* **2**, 361–370 (2016).
131. Raha, S. & Robinson, B. H. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends Biochem Sci* **25**, 502–508 (2000).
132. Wu, M. *et al.* Multiparameter metabolic analysis reveals a close link between attenuated mitochondrial bioenergetic function and enhanced glycolysis dependency in human tumor cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **292**, C125–C136 (2007).
133. Gil, A. *et al.* Neuronal Metabolism and Neuroprotection: Neuroprotective Effect of Fingolimod on Menadione-Induced Mitochondrial Damage. *Cells* **10**, 34 (2020).
134. Agilent Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kit. *User Guide* (2019).
135. Claros, S. *et al.* Impact of Glucocorticoid on a Cellular Model of Parkinson's Disease: Oxidative Stress and Mitochondrial Function. *Brain Sci* **11**, 1106 (2021).
136. Claros, S. *et al.* Insulin-like Growth Factor II Prevents MPP+ and Glucocorticoid Mitochondrial-Oxidative and Neuronal Damage in Dopaminergic Neurons. *Antioxidants* **11**, 41 (2021).
137. Cosentino-Gomes, D., Rocco-Machado, N. & Meyer-Fernandes, J. R. Cell Signaling through Protein Kinase C Oxidation and Activation. *Int J Mol Sci* **13**, 10697–10721 (2012).
138. Yoshiya, M. *et al.* Corticosterone rapidly increases thorns of CA3 neurons via synaptic/extranuclear glucocorticoid receptor in rat hippocampus. *Front Neural Circuits* **7**, (2013).
139. Du, J. *et al.* Dynamic regulation of mitochondrial function by glucocorticoids. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 3543–3548 (2009).

140. Wang, J. *et al.* Pentazocine Protects SN4741 Cells Against MPP⁺-Induced Cell Damage via Up-Regulation of the Canonical Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway. *Front Aging Neurosci* **9**, (2017).
141. Wu, Q., Yang, X., Zhang, Y., Zhang, L. & Feng, L. Chronic mild stress accelerates the progression of Parkinson's disease in A53T α -synuclein transgenic mice. *Exp Neurol* **285**, 61–71 (2016).
142. Burtscher, J. *et al.* Chronic corticosterone aggravates behavioral and neuronal symptomatology in a mouse model of alpha-synuclein pathology. *Neurobiol Aging* **83**, 11–20 (2019).
143. Zheng, Z., Zou, K., Guo, W., Tang, G. & Zheng, B. A case of early onset Parkinson's disease after major stress. *Neuropsychiatr Dis Treat* **1067** (2013) doi:10.2147/NDT.S48455.
144. Håglin, L. & Bäckman, L. Covariation between plasma phosphate and daytime cortisol in early Parkinson's disease. *Brain Behav* **6**, (2016).
145. Craenenbroeck, K. van, Bosscher, K. de, Berghe, W. vanden, Vanhoenacker, P. & Haegeman, G. Role of glucocorticoids in dopamine-related neuropsychiatric disorders. *Molecular and Cellular Endocrinology* vol. 245 10–22 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.mce.2005.10.007> (2005).
146. Ros-Bernal, F. *et al.* Microglial glucocorticoid receptors play a pivotal role in regulating dopaminergic neurodegeneration in parkinsonism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 6632–6637 (2011).
147. Wallace, D. C., Fan, W. & Procaccio, V. Mitochondrial Energetics and Therapeutics. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* **5**, 297–348 (2010).
148. Williams, G. P. *et al.* Targeting of the class II transactivator attenuates inflammation and neurodegeneration in an alpha-synuclein model of Parkinson's disease. *J Neuroinflammation* **15**, 244 (2018).
149. Küçükdoğan, R. *et al.* Neuroprotective effects of boron nitride nanoparticles in the experimental Parkinson's disease model against MPP⁺ induced apoptosis. *Metab Brain Dis* **35**, 947–957 (2020).
150. Boeck, C. *et al.* The association between cortisol, oxytocin, and immune cell mitochondrial oxygen consumption in postpartum women with childhood maltreatment. *Psychoneuroendocrinology* **96**, 69–77 (2018).

151. Brand, M. D. & Nicholls, D. G. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochemical Journal* **435**, 297–312 (2011).
152. Du, X. & Pang, T. Y. Is Dysregulation of the HPA-Axis a Core Pathophysiology Mediating Co-Morbid Depression in Neurodegenerative Diseases? *Front Psychiatry* **6**, (2015).
153. Costa, C. M. *et al.* Levels of cortisol and neurotrophic factor brain-derived in Parkinson's disease. *Neurosci Lett* **708**, 134359 (2019).
154. van den Heuvel, L. L. *et al.* Hair glucocorticoid levels in Parkinson's disease. *Psychoneuroendocrinology* **117**, 104704 (2020).
155. Brigelius-Flohé, R. & Maiorino, M. Glutathione peroxidases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1830**, 3289–3303 (2013).
156. Dexter, D. T. *et al.* Increased levels of lipid hydroperoxides in the parkinsonian substantia nigra: An HPLC and ESR study. *Movement Disorders* **9**, 92–97 (1994).
157. Grünewald, A., Kumar, K. R. & Sue, C. M. New insights into the complex role of mitochondria in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* **177**, 73–93 (2019).
158. Area-Gomez, E., Guardia-Laguarta, C., Schon, E. A. & Przedborski, S. Mitochondria, OxPhos, and neurodegeneration: cells are not just running out of gas. *Journal of Clinical Investigation* **129**, 34–45 (2019).
159. González-Rodríguez, P. *et al.* Author Correction: Disruption of mitochondrial complex I induces progressive parkinsonism. *Nature* **603**, E1–E1 (2022).
160. Dauer, W. & Przedborski, S. Parkinson's Disease. *Neuron* **39**, 889–909 (2003).
161. Gui, W. *et al.* Knockdown of insulin-like growth factor 2 gene disrupts mitochondrial functions in the liver. *J Mol Cell Biol* (2021) doi:10.1093/jmcb/mjab030.
162. Zhu, Y. *et al.* IGF2 deficiency causes mitochondrial defects in skeletal muscle. *Clin Sci* **135**, 979–990 (2021).
163. Garcia-Fernandez, M., Sierra, I., Puche, J. E., Guerra, L. & Castilla-Cortazar, I. Liver mitochondrial dysfunction is reverted by insulin-like growth factor II (IGF-II) in aging rats. *J Transl Med* **9**, 123 (2011).

164. Giordano, S., Lee, J., Darley-USmar, V. M. & Zhang, J. Distinct Effects of Rotenone, 1-methyl-4-phenylpyridinium and 6-hydroxydopamine on Cellular Bioenergetics and Cell Death. *PLoS One* **7**, e44610 (2012).
165. Zorov, D. B. *et al.* Neuroprotective Potential of Mild Uncoupling in Mitochondria. Pros and Cons. *Brain Sci* **11**, 1050 (2021).
166. Wang. Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. *Front Aging Neurosci* (2010) doi:10.3389/fnagi.2010.00012.
167. Przedborski, S. The two-century journey of Parkinson disease research. *Nat Rev Neurosci* **18**, 251–259 (2017).
168. SMITH, A., CASTRO, S. & ZIGMOND, M. Stress-induced Parkinson's disease: a working hypothesis. *Physiol Behav* **77**, 527–531 (2002).
169. Wu, P.-Y. *et al.* Different oxidants and PKC isozymes mediate the opposite effect of inhibition of Qi and Qo site of mitochondrial complex III on calcium currents in rat cortical neurons. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1803**, 1072–1082 (2010).
170. Kowalczyk, J. E. *et al.* Protein kinase C beta in postischemic brain mitochondria. *Mitochondrion* **12**, 138–143 (2012).
171. Brandes, M. S. & Gray, N. E. NRF2 as a Therapeutic Target in Neurodegenerative Diseases. *ASN Neuro* **12**, 175909141989978 (2020).
172. Esteras, N., Dinkova-Kostova, A. T. & Abramov, A. Y. Nrf2 activation in the treatment of neurodegenerative diseases: a focus on its role in mitochondrial bioenergetics and function. *Biol Chem* **397**, 383–400 (2016).
173. Ma, Q. Role of Nrf2 in Oxidative Stress and Toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **53**, 401–426 (2013).
174. Jayaram, S. & Krishnamurthy, P. T. Role of microgliosis, oxidative stress and associated neuroinflammation in the pathogenesis of Parkinson's disease: The therapeutic role of Nrf2 activators. *Neurochem Int* **145**, 105014 (2021).
175. Li, Q., Niu, C., Zhang, X. & Dong, M. Gastrodin and Isorhynchophylline Synergistically Inhibit MPP⁺-Induced Oxidative Stress in SH-SY5Y Cells by Targeting ERK1/2 and GSK-3 β Pathways: Involvement of Nrf2 Nuclear Translocation. *ACS Chem Neurosci* **9**, 482–493 (2018).

176. Kasai, S., Shimizu, S., Tatara, Y., Mimura, J. & Itoh, K. Regulation of Nrf2 by Mitochondrial Reactive Oxygen Species in Physiology and Pathology. *Biomolecules* **10**, 320 (2020).
177. Li, X., Zhang, J., Zhang, X. & Dong, M. Puerarin suppresses MPP+/MPTP-induced oxidative stress through an Nrf2-dependent mechanism. *Food and Chemical Toxicology* **144**, 111644 (2020).
178. Alam, Md. M. *et al.* Glucocorticoid receptor signaling represses the antioxidant response by inhibiting histone acetylation mediated by the transcriptional activator NRF2. *Journal of Biological Chemistry* **292**, 7519–7530 (2017).
179. Vyas, S. *et al.* Chronic Stress and Glucocorticoids: From Neuronal Plasticity to Neurodegeneration. *Neural Plast* **2016**, 1–15 (2016).
180. Hao, Y., Shabanpoor, A. & Metz, G. A. Stress and corticosterone alter synaptic plasticity in a rat model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett* **651**, 79–87 (2017).



Article

Insulin-like Growth Factor II Prevents MPP+ and Glucocorticoid Mitochondrial-Oxidative and Neuronal Damage in Dopaminergic Neurons

Silvia Claros ^{1,†}, Pablo Cabrera ^{2,†}, Nadia Valverde ², Silvana Y. Romero-Zerbo ¹, Manuel Víctor López-González ¹, Kirill Shumilov ^{3,4}, Alicia Rivera ³, Jose Pavia ², Elisa Martín-Montañez ^{2,*,†} and María García-Fernandez ^{1,*,†}

¹ Department of Human Physiology, Faculty of Medicine, Biomedical Research Institute of Malaga, Malaga University, 29010 Malaga, Spain; silviacg@uma.es (S.C.); yaninaromero@uma.es (S.Y.R.-Z.); manuelvictor@uma.es (M.V.L.-G.)

² Department of Pharmacology and Paediatrics, Faculty of Medicine, Biomedical Research Institute of Malaga, Malaga University, 29010 Malaga, Spain; pablo.cabrera.sspa@juntadeandalucia.es (P.C.); nadiavm@uma.es (N.V.); pavia@uma.es (J.P.)

³ Department of Cell Biology, Faculty of Science, Biomedical Research Institute of Malaga, Malaga University, 29010 Malaga, Spain; kirill@wustl.edu (K.S.); arivera@uma.es (A.R.)

⁴ School of Medicine, Washington University in St. Louis, St. Louis, MO 63101, USA

* Correspondence: emartinm@uma.es (E.M.-M.); igf@uma.es (M.G.-F.)

† These authors contributed equally to this work.



Citation: Claros, S.; Cabrera, P.; Valverde, N.; Romero-Zerbo, S.Y.; López-González, M.V.; Shumilov, K.; Rivera, A.; Pavia, J.; Martín-Montañez, E.; García-Fernandez, M. Insulin-like Growth Factor II Prevents MPP+ and Glucocorticoid Mitochondrial-Oxidative and Neuronal Damage in Dopaminergic Neurons. *Antioxidants* **2022**, *11*, 41. <https://doi.org/10.3390/antiox11010041>

Academic Editors: Stefania Pizzimenti, Giuliana Muzio and Giuseppina Barrera

Received: 24 November 2021

Accepted: 22 December 2021

Published: 24 December 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Stress seems to contribute to Parkinson's disease (PD) neuropathology, probably by dysregulation of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis. Key factors in this pathophysiology are oxidative stress and mitochondrial dysfunction and neuronal glucocorticoid-induced toxicity. The insulin-like growth factor II (IGF-II), a pleiotropic hormone, has shown antioxidant and neuroprotective effects in some neurodegenerative disorders. Our aim was to examine the protective effect of IGF-II on a dopaminergic cellular combined model of PD and mild to moderate stress measuring oxidative stress parameters, mitochondrial and neuronal markers, and signalling pathways. IGF-II counteracts the mitochondrial-oxidative damage produced by the toxic synergistic effect of corticosterone and 1-methyl-4-phenylpyridinium, protecting dopaminergic neurons from death and neurodegeneration. IGF-II promotes PKC activation and nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 antioxidant response in a glucocorticoid receptor-dependent pathway, preventing oxidative cell damage and maintaining mitochondrial function. Thus, IGF-II is a potential therapeutic tool for treatment and prevention of disease progression in PD patients suffering mild to moderate emotional stress.

Keywords: insulin-like growth factor II; oxidative stress; mitochondria; neuroprotection; hormonal stress; Parkinson's disease

1. Introduction

The neurodegenerative Parkinson's disease (PD) affects 1–3% of the population aged over 65 [1]. A wide range of pathways and mechanisms are involved in its pathogenesis, such as oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and inflammation [2,3], which ultimately produce a progressive loss of nigral dopamine neurons [3,4]. Dopamine depletion leads to the development of major motor symptoms that are key to diagnosis, although the disease comes with other non-motor symptoms, such as sleep disorders, cognitive impairment, and depression, which increase disability [2]. Repeated and persistent occurrence of emotional stress seems to promote the development of neurodegenerative diseases [5,6], and it has been suggested that a dysregulation of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis (HPA) arises in PD [7]. This dysregulation may be involved in triggering, exacerbation, or progression of PD. Thus, the identification of new targets and the concomitant design of