



UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

**Programa de Doctorado de BIOMEDICINA, INVESTIGACIÓN
TRASLACIONAL Y NUEVAS TECNOLOGÍAS EN SALUD**

**Facultad de Medicina
Universidad de Málaga**

TESIS DOCTORAL

Efecto del factor de crecimiento insulínico tipo II sobre el daño oxidativo y neuronal en modelos de la enfermedad de Parkinson

Nadia María Valverde Moreno

Directoras:

Elisa Martín Montañez

Belén Gago Calderón

Tutora:

María Inmaculada García Fernández


Junio, 2024





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTORA: Nadia María Valverde Moreno

 <https://orcid.org/0000-0002-8626-3025>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



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

<https://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 NADIA MARÍA VALVERDE MORENO

Estudiante del programa de doctorado DE 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 Y NEURONAL EN MODELOS DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

Realizada bajo la tutorización de MARÍA INMACULADA GARCÍA FERNÁNDEZ y dirección de ELISA MARTÍN MONTAÑEZ Y BELÉN GAGO CALDERÓN (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 31 de MAYO de 2024

Fdo.: NADIA MARÍA VALVERDE MORENO Doctorando/a	Fdo.: MARÍA INMACULADA GARCÍA FERNÁNDEZ Tutor/a





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Escuela de Doctorado

Fdo.: ELISA MARTÍN MONTAÑEZ Y BELÉN GAGO CALDERÓN
Director/es de tesis

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



EFQM AENOR



Edificio Pabellón de Gobierno. Campus El Ejido.
29071
Tel.: 952 13 10 28 / 952 13 14 61 / 952 13 71 10
E-mail: doctorado@uma.es

D^a MARÍA INMACULADA GARCÍA FERNÁNDEZ,

Catedrática de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Málaga

D^a ELISA MARTÍN MONTAÑEZ,

Profesora Titular de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Málaga

D^a BELÉN GAGO CALDERON

Profesora Titular de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Málaga

CERTIFICAN Que D^a. NADIA MARÍA VALVERDE MORENO

ha obtenido y estudiado personalmente bajo mi dirección los datos clínicos necesarios para la realización de su Tesis Doctoral, titulada: “Efecto del factor de crecimiento insulínico tipo II sobre el daño oxidativo y neuronal en modelos de la enfermedad de Parkinson”, que considero tiene el contenido y rigor científico necesario para ser sometido al superior juicio de la Comisión que nombre la Universidad de Málaga para optar a grado de Doctor.

Y que la publicación en coautoría que avalan la presentación de esta tesis y cuyas referencias son:

Elisa Martín-Montañez, Nadia Valverde, David Ladrón de Guevara-Miranda, Estrella Lara, Yanina S. Romero-Zerbo, Carmelo Millon, Federica Boraldi, Fabiola Ávila-Gámiz, Ana M. Pérez-Cano, Pablo Garrido-Gil, Jose Luis Labandeira-Garcia, Luis J. Santin, Jose Pavia, Maria Garcia-Fernandez, Insulin-like growth factor II prevents oxidative and neuronal damage in cellular and mice models of Parkinson's disease, Redox Biology, Volume 46,2021,102095,ISSN 2213-2317, <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.102095>.

no ha sido utilizada en tesis anteriores ni en la Universidad de Málaga ni en otras Universidades.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expido el presente certificado en

Málaga a 13 de junio 2024.

Directora: Elisa Martín Montañez

Directora: Belén Gago Calderón

Tutora: María Inmaculada García Fernández



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Agradecimientos



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

En estas líneas quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que han sido parte en cierto modo en la culminación de esta tesis doctoral.

Primero agradecer a la tutora de mi tesis doctoral María Inmaculada García Fernández, catedrática del Departamento de Fisiología Humana de la Facultad de Medicina; gracias de todo corazón por esta oportunidad y por haber depositado en mi toda la confianza que me has mostrado. Junto a ti he crecido personal y profesionalmente, he encontrado mi sitio en este equipo de investigación y he podido trabajar en ciencia, sueño que tengo desde pequeña. Tu apoyo incondicional, tanto personal como profesional, ha sido una parte muy importante en la consecución de este trabajo.

Me gustaría también agradecer a una de las directoras de esta tesis, Elisa Martín Montañez, profesora titular del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina. Tu constancia, esfuerzo y dedicación han sido toda una inspiración para mí. Gracias por enseñarme todo lo que sabes sobre cultivos celulares y por la confianza que has depositado en mí. Agradecerte también tu comprensión y apoyo en los buenos y malos momentos, cosa que nunca olvidaré.

A la profesora Belén Gago Calderón, directora de esta tesis y profesora titular del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina, agradecerle el esfuerzo y apoyo mostrado en el proceso de maduración de este trabajo. Gracias por ese aporte de vitalidad y confianza que me has transmitido.

No puedo olvidarme del equipo de investigación al que pertenezco, sin todos vosotros este trabajo no hubiera sido posible. Gracias al profesor José Pavía Molina, por abrirme las puertas del laboratorio y por sus consejos científicos y no tan científicos. Gracias a Estrella por tus enseñanzas en el laboratorio; gracias a Yanina, Silvia y Pablo por estar también al pie del cañón siempre.

Agradecer eternamente al Catedrático de Pediatría Javier Pérez Frías, por sus historias, aventuras, consejos, lecciones, su compañía en el despacho y por esos desayunos. Fuiste un gran apoyo en momentos difíciles para mí, por lo que sin tu ayuda esta tesis no se hubiera culminado. Espero que no "crezcamos" nunca.

A los profesores Laura Leyva, Irene Zapata y Sergio Pérez por su compañía y apoyo en la resolución de dudas sobre la tesis, gracias compañeros de despacho.

mi compañera de laboratorio Patricia Macías y ya amiga, gracias por tu ayuda en el trabajo y nuestras charlas, has sido un gran apoyo. Gracias también a Eva Ortega, por su amistad y ayuda en este tiempo, te estamos echando mucho de menos.

Agradecer a los demás profesores y demás compañeros del Departamento de Farmacología y Pediatría por acogerme con los brazos abiertos, aquí me he sentido arropada y como en casa, gracias a todos.

No puedo dejar de agradecer a los compañeros del Departamento de Fisiología por acogerme ya hace unos cuantos años y ser testigos de mis primeros pasos en la Facultad de Medicina.

Por supuesto, agradecer a mis queridos padres Paco e Inma por todo el apoyo, dedicación y confianza que han depositado en mí. Estos años han tenido momentos difíciles y sin vosotros todo esto no sería posible. Desde que llegué a Málaga habéis sido un apoyo incondicional, aunque a veces yo no haya sabido agradecerlo como se debe, espero que este trabajo os enorgullezca y sepáis que en gran parte es más vuestra obra que mía.

A mi querido hermano, Fran, por siempre apoyarme sin excusas y sin cuestionarme, por toda tu dedicación al ayudarme cuando lo he necesitado, por la confianza, los logros, los lloros y sobre todo las risas que siempre nos acompañan. Has sabido ser un escalón al que subirme cuando no alcanzaba a ver, gracias.

A Jesús, que, aunque nuestras vidas se hayan separado siempre estarás presente en mi corazón. Junto a Blue habéis sido mi apoyo en primera línea y habéis aguantado el tipo pese a las dificultades e infortunios que han ido apareciendo. Nunca olvidaré el día que recogimos a Blue y la llevamos a casa, gracias por todo.

A mi familia





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Abreviaturas:

- **6-OHDA:** 6-hidroxi-dopamina
- **AAV:** Virus adenoasociados
- **ADN:** Ácido desoxirribonucleico
- **ADN:** Adenosin difosfato
- **ADNmt:** ADN mitocondrial
- **AOPP:** Productos de oxidación avanzada de proteínas
- **ARE:** Elementos de respuesta antioxidante (Antioxidant Response Element)
- **ARN:** Ácido ribonucleico
- **ATP:** Adenosin trifosfato
- **BSA:** Albumina de suero bovino
- **CAT:** Enzima catalasa
- **CDNB:** 1-cloro-2,4-dinitrobenzenuo
- **COX:** Enzima citocromo c oxidasa
- **Cpu:** Caudado putamen
- **CTE:** Cadena de transporte electrónico
- **DA:** Dopamina
- **Daérgica:** Dopaminérgica
- **DAPI:** 4',6-diamidino-2-fenilindol
- **DAT:** Transportador de dopamina (Dopamine Transporter)
- **EA:** Enfermedad de Alzheimer
- **EK:** Enzima Esfingosín quinasa
- **EP:** Enfermedad de Parkinson
- **ERK 1/2:** Quinasa regulada por señales extracelulares 1/2
- **FADH2:** Dinucleótido flavín adenín reducido
- **GFAP:** Proteína ácida fibrilar
- **GPx:** Enzima glutatión peroxidasa
- **GSH:** Glutatión
- **GSSG:** Glutatión disulfuro
- **GST:** Enzima glutatión S-transferasa
- **IGFBPs:** Proteínas de unión a IGFs

- **IGF-I:** Factor de crecimiento insulínico tipo I, del inglés Insuline Grow Factor I
- **IGF-II:** Factor de crecimiento insulínico tipo II, del inglés Insuline Grow Factor II
- **Ins:** Insulina
- **INT:** 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolio
- **JC-1:** Sonda 5, 5', 6', 6' tetracloro-1,1', 3, 3' tetrametil bencimidazol carbocianina yoduro
- **Keap 1:** Kelch ECH asociada a proteína 1
- **LDH:** Enzima lactato deshidrogenasa
- **L-DOPA:** Levodopa
- **LEU:** LEU[27]-IGF-II, agonista específico de IGF-II
- **LOOH:** Hidroperóxidos lipídicos
- **m $\Delta\Psi$:** Potencial de membrana mitocondrial
- **M6P:** Manosa 6 fosfato
- **MAO-B:** Enzima monoamina oxidasa B
- **MPP+:** 1-metil-4-fenilpiridina
- **MPTP/p:** MPTP más probenecid
- **MPTP:** 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
- **NAD⁺:** Dinucleotido de nicotinamida oxidado
- **NADH:** Dinucleótido nicotin adenin reducido
- **NADPH:** Dinucleótido nicotinamida adenina fosfato
- **NOQ1:** Enzima NAD(P)H quinona reductasa 1
- **NRF2:** Factor nuclear derivado de eritroide 2
- **OCR:** Tasa de consumo de oxígeno
- **p:** Probenecid
- **PBS:** Tampón fosfato salino
- **PGC-1 α :** Coactivador del receptor 1 α activado por el proliferador de peroxisomas
- **PKC:** Proteína quinasa C
- **rIGF-I:** Receptor del factor de crecimiento insulínico tipo I
- **rIGF-II:** Receptor del factor de crecimiento insulínico tipo II
- **rIns:** Receptor de insulina
- **RNS:** Especies reactivas de nitrógeno
- **ROS:** especies reactivas de oxígeno (Reactive Oxygen Species)

- **S1P:** Esfingosina 1 fosfato
- **S1PR:** Receptor de esfingosina 1 fosfato
- **SN:** Sustancia negra
- **SNC:** Sistema nervioso central
- **SNpc:** Sustancia negra pars compacta
- **SOD:** Superoxido dismutasa
- **STEM:** Microscopia de transmision de barrido
- **TFAM:** Factor de transcripción mitocondrial A
- **TH:** Enzima tirosina hidroxilasa
- **TNF- α :** Factor de necrosis tumoral alfa
- **TRx:** Enzima tiorredoxina
- **TRxR:** Enzima tiorredoxina reductasa
- **Vmat2:** Transportador de monoaminas
- **α -sin:** α -sinucleína

RESUMEN

La enfermedad de Parkinson (EP) es una enfermedad neurodegenerativa crónica y progresiva que se caracteriza por el desarrollo de una sintomatología que repercute tanto en la capacidad motora del afectado, que se caracteriza por el desarrollo progresivo de síntomas motores como temblor en estado de reposo, rigidez muscular e inestabilidad postural; y síntomas no motores como trastornos del sueño o ansiedad. Anatómicamente, la EP se caracteriza principalmente por una neurodegeneración de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra (SN) cerebral y por una agregación proteica intracelular de α -sinucleína fibrilar y ubiquitinada en el cuerpo celular. Se cree que la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo generado por las neuronas dopaminérgicas desempeña un papel importante en la neurotoxicidad dopaminérgica. Asimismo, diversos estudios científicos, incluidos los de nuestro equipo de investigación apuntan a que factor de crecimiento insulínico tipo II, IGF-II, podría ejercer efectos neuroprotectores y antioxidantes, posiblemente gracias a la interacción con su receptor específico rIGF-II. Por tanto, el objetivo principal de este trabajo es el estudio del efecto de la administración de IGF-II en dos modelos, uno celular y otro animal, de la EP basados en la administración de la neurotoxina MPTP en ratón o su metabolito activo MPP⁺ en células neuronales de SN. Así el estudio del modelo celular se centra en el análisis de los efectos de IGF-II en la supervivencia y neurodegeneración neuronal, los marcadores dopaminérgicos, la homeostasis mitocondrial, las vías intracelulares implicadas, además del papel de rIGF-II en los efectos obtenidos. En el modelo murino, se analiza su acción sobre la vía dopaminérgica, la astrogliía y la neuroinflamación. Los resultados obtenidos muestran que IGF-II es capaz de evitar la muerte y neurodegeneración celular inducidos por MPP⁺ además de revertir los cambios morfológicos observados. También recupera los marcadores celulares asociados a la neurotransmisión dopaminérgica estudiados. A nivel mitocondrial IGF-II induce una reducción del daño oxidativo con la recuperación de la actividad enzimática antioxidante, su funcionalidad y morfología. La vía intracelular antioxidante de NRF2 y algunas de sus enzimas dependientes, se recuperan al igual que la vía de mTOR tras la coadministración de IGF-II y MPP⁺. En el modelo murino, la administración de IGF-II bloquea la pérdida de coordinación motora y la reducción del auto-aseo inducido por el MPTP. Asimismo, IGF-II contrarresta el efecto

neurodegenerativo y proinflamatorio del MPTP en la vía dopaminérgica nigroestriatal. Todos estos efectos podrían explicarse gracias al mantenimiento de la vía intracelular de NRF2, que aumentaría las defensas enzimáticas antioxidantes celulares, evitando el daño a nivel celular y más concretamente mitocondrial como se deduce de los resultados obtenidos. En conclusión, el tratamiento con IGF-II en un modelo celular y otro animal de EP, basados en la administración de MPP+ y MPTP respectivamente, es capaz de revertir el efecto nocivo de los neurotóxicos sobre las neuronas dopaminérgicas, principalmente gracias a la interacción con su receptor específico rIGF-II; pudiendo, esta molécula endógena, ser una potencial diana para el desarrollo de una herramienta terapéutica preventiva o paliativa antioxidante para el tratamiento de la EP.

Contenido

INTRODUCCIÓN.....	6
1. La enfermedad de Parkinson.....	34
1.1. Breve introducción histórica	34
1.2. Contexto actual e importancia del estudio de la enfermedad	38
2. Sintomatología.....	39
3. Etiopatogenia	40
4. Estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial.....	42
5. Estrés oxidativo y neuroinflamación.....	47
6. Mecanismos antioxidantes celulares.....	47
7. Factores de crecimiento insulínico tipo I y II.....	52
7.1. IGF-II	54
7.2. La interacción IGF-II y rIGF-II: mecanismos de neuroprotección.....	55
8. Modelos animales y celulares para el estudio de la etiología	56
8.1. Modelos celulares de EP	57
8.2. Modelos animales de EP	58
8.3. Modelo celular y animal inducido por la neurotoxina MPTP.....	60
9. Tratamientos farmacológicos.....	62
HIPOTESIS Y OBJETIVOS	65
MATERIAL Y MÉTODOS.....	41
1. Cultivo celular.....	65
1.1 Mantenimiento de la línea celular y caracterización de la expresión del receptor IGF-II.....	65
1.2. Cultivo experimental.....	65
1.3. Tratamientos.....	66
1.4. Determinación de las dosis de IGF-II y MPP ⁺	68

1.5. Diseño experimental.....	68
1.6. Supervivencia neuronal	69
1.6.1. Muerte celular.....	69
1.6.2. Morfología celular	71
1.6.3. Neurodegeneración.....	72
1.7. Marcadores dopaminérgicos.....	73
1.7.1. Tirosina hidroxilasa y transportador vesicular de monoaminas 2	73
1.7.2. Actividad del transportador de dopamina	74
1.8. Homeostasis redox.....	74
1.7.1. Peroxidación lipídica	74
1.7.2. Productos de oxidación avanzada de proteínas o AOPP.....	75
1.9. Estudio mitocondrial.....	76
1.9.1. Morfología mitocondrial	76
1.9.2. Potencial de membrana	76
1.9.3. Velocidad de consumo de oxígeno mitocondrial.....	77
1.9.4. Actividad de enzimas antioxidantes.....	78
1.9.5. Producción de radical superóxido.....	79
1.9.6. Factor de transcripción mitocondrial A.....	80
1.10. Vías de señalización intracelular	80
1.10.1. Factor nuclear eritroide 2.....	80
1.10.2. Actividad de enzimas dependientes de NRF2	80
1.10.3. p-mTOR	81
2. Animales de experimentación.....	82
2.1. Generación del modelo animal: tratamiento farmacológico	82
2.2. Estudios de comportamiento.....	84
2.2.1. Prueba de cilindro giratorio	84
2.2.1. Prueba de auto-aseo en campo abierto.....	85
2.3. Procesamiento de los tejidos	86
2.4. Inmunohistoquímica.....	86
2.5. Concentración de MPP ⁺ tisular.....	88
3. Análisis estadístico.....	89

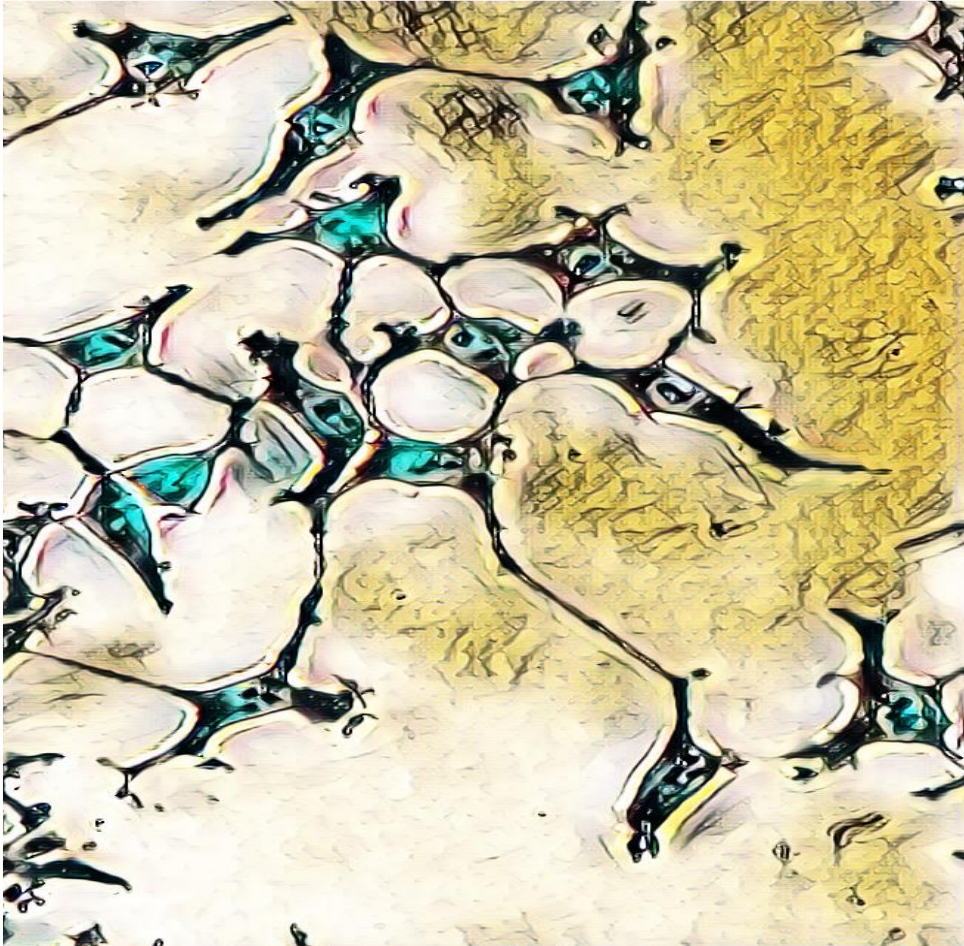
RESULTADOS.....	91
1. Papel protector de IGF-II en un modelo celular de EP	93
1.1. Las células DAérgicas de la línea SN4741 expresan el receptor de IGF-II.....	93
1.2. Elección de la concentración de IGF-II y MPP ⁺ para los tratamientos mediante la determinación de viabilidad celular.....	93
1.3. Efectos sobre la supervivencia neuronal.....	95
1.3.1. EL IGF-II, a través del rIGF-II, reduce la muerte celular inducida por MPP ⁺	95
1.3.2. El IGF-II revierte los cambios morfológicos inducidos por el MPP ⁺	96
1.3.3. El IGF-II reduce la neurodegeneración inducida por el MPP ⁺	97
1.3.4. El IGF-II, a través del rIGF-II, reduce el daño oxidativo inducido por MPP ⁺	98
1.4. Efectos sobre marcadores dopaminérgicos	99
1.4.1. La reducción de la expresión de la enzima tirosina hidroxilasa y transportador vesicular 2 de monoaminas inducida por MPP ⁺ es bloqueada por IGF-II mediante el receptor rIGF-II.....	99
1.4.2. El IGF-II bloqueó parcialmente el descenso de la actividad del transportador de dopamina inducido por MPP ⁺ , mediado por el receptor rIGF-II	102
1.5. Efectos sobre las mitocondrias	103
1.5.1. El IGF-II previno los cambios en la morfología de las mitocondrias inducidos por MPP ⁺	103
1.5.2. El IGF-II bloqueó la reducción del potencial de membrana mitocondrial producido tras el tratamiento con MPP ⁺	104
1.5.3. La coadministración de MPP ⁺ e IGF-II indujo una menor reducción de la velocidad de consumo de oxígeno mitocondrial que el tratamiento con MPP ⁺	104
1.5.4. Efecto sobre enzimas antioxidantes mitocondriales	106
1.5.5. El IGF-II revierte el incremento de producción de ROS causado por el tratamiento con MPP ⁺	107
1.5.6. El IGF-II inhibe, mediante su unión al receptor rIGF-II, la reducción de la expresión del Factor de transcripción mitocondrial A (TFAM) inducido por MPP ⁺	108
1.6. Efectos sobre vías de señalización molecular intracelular.....	110
1.6.1. El IGF-II inhibe el efecto del MPP ⁺ sobre la expresión y traslocación al núcleo del factor de transcripción NRF2 y la viabilidad celular.....	110
1.6.2. El IGF-II bloquea, mediante sus receptores rIGF-II, la reducción de los niveles de pmTOR inducida por MPP ⁺	114
1.6.3. Efectos del agonista selectivo LEU del receptor IGF-II	116
2. Papel del IGF-II en un modelo animal de EP crónico y progresivo.....	120

2.1. La administración de IGF-II bloquea la pérdida de coordinación motora y la reducción del auto-aseo inducido por el MPTP.....	121
2.2. EL IGF-II contrarresta el efecto neurodegenerativo y proinflamatorio del MPTP en la vía dopaminérgica nigroestriatal.....	123
2.3. La actividad del IGF-II no está interferida por el metabolismo del neurotóxico MPTP en el caudado putamen.....	126
DISCUSIÓN.....	128
1. Evaluación del efecto del IGF-II en un modelo celular de EP	129
1.1. El IGF-II aumenta la viabilidad de las neuronas incubadas con MPP ⁺	130
1.2. El efecto protector de IGF-II sobre la integridad y la funcionalidad mitocondrial	132
1.3. Efecto de IGF-II en la activación y mantenimiento de vías intracelulares	134
1.4. Efecto protector de IGF-II en la función dopaminérgica neuronal	138
1.5. Implicación de rIGF-II en la actividad neuroprotectora de IGF-II	140
2. Papel protector de IGF-II en un modelo murino de EP	143
CONCLUSIONES	149
BIBLIOGRAFÍA.....	153

Índice

INTRODUCCIÓN.....	1
1. La enfermedad de Parkinson.....	3
1.1. Breve introducción histórica.....	3
1.2. Contexto actual e importancia del estudio de la enfermedad.....	7
2. Sintomatología.....	8
3. Etiopatogenia.....	9
4. Estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial.....	11
5. Estrés oxidativo y neuroinflamación.....	16
6. Mecanismos antioxidantes celulares.....	17
7. Factores de crecimiento insulínico tipo I y II.....	21
7.1. IGF-II.....	23
7.2. La interacción IGF-II y rIGF-II: mecanismos de neuroprotección.....	24
8. Modelos animales y celulares para el estudio de la etiología.....	25
8.1. Modelos celulares de EP.....	26
8.2. Modelos animales de EP.....	27
8.3. Modelo celular y animal inducido por la neurotoxina MPTP.....	29
9. Tratamientos farmacológicos.....	31

INTRODUCCIÓN





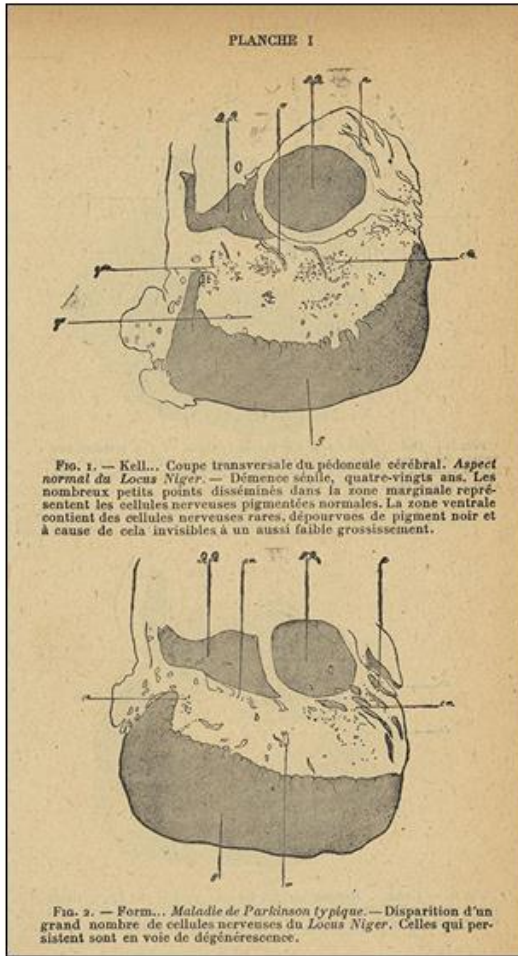
UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1. La enfermedad de Parkinson

1.1. Breve introducción histórica

La enfermedad de Parkinson (EP) fue descrita por primera vez en 1817 por el médico británico James Parkinson en su obra "*An Essay on the Shaking Palsy*" (monografía original impresa por Whittingham y Rowland y publicada por Sherwood, Neely y Jones en Londres, 1817) (Jost & Reichmann, 2017) (Figura 1). En este ensayo, Parkinson incluyó casos clínicos de 6 sujetos y, con bastante precisión en sus observaciones, describió algunos de los síntomas motores característicos de la enfermedad a la que denominó "parálisis agitante": temblores en reposo, postura flexionada y festinación de la marcha. También describió sintomatología no motora, como la perturbación del sueño y los problemas de motilidad intestinal en etapas avanzadas de la enfermedad. Igualmente, en su obra, Parkinson dejó constancia de las posibles causas etiológicas de la enfermedad, además de señalar que, con el avance del conocimiento sobre la naturaleza de la afección, podrían aparecer tratamientos que pudieran paliar su sintomatología (Obeso et al., 2017).

En 1876, Jean-Martin Charcot en el hospital *La Salpêtrière* (París), tras varios años del estudio de la enfermedad y del ensayo escrito por Parkinson, propuso que ésta se denominara "enfermedad de Parkinson", reconociendo la remarcable labor del médico británico (Walusinski, 2018). Además, propuso e introdujo como tratamiento el uso del alcaloide anticolinérgico hiosciamina extraído de la planta *Atropa belladonna*, que junto a otros derivados, se mantuvo en uso hasta la aparición de la levodopa (o L-DOPA) (Parent & Parent, 2010). Gracias a la aportación de Charcot, además de que se añadieran como síntomas clave de la enfermedad la rigidez y la bradicinesia; se propuso que los temblores no eran un signo de diagnóstico esencial y se empezó a considerar la EP como una entidad clínica reconocida y estudiada por la medicina moderna.



AN
ESSAY
 ON THE
SHAKING PALSY.

CHAPTER I.
 DEFINITION—HISTORY—ILLUSTRATIVE CASES.

SHAKING PALSY. (*Paralysis Agitans*.)

Involuntary tremulous motion, with lessened muscular power, in parts not in action and even when supported; with a propensity to bend the trunk forwards, and to pass from a walking to a running pace: the senses and intellects being uninjured.

The term Shaking Palsy has been vaguely employed by medical writers in general. By some it has been used to designate or-

153

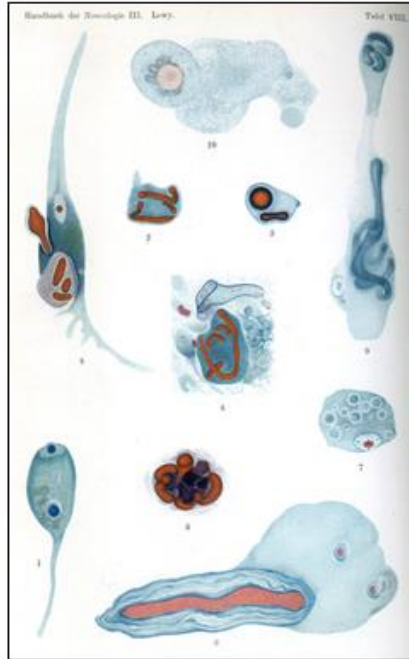


Figura 1. Principales aportaciones sobre la EP de diversos neurocientíficos. De izquierda a derecha y de arriba abajo: Dibujos de Konstantin Tretiakoff, donde se muestra la apariencia de la sustancia negra en secciones del cerebro (1919, *Bibliothèque interuniversitaire de santé, Paris*); Portada del "An Essay on the Shaking Palsy" de James Parkinson (1817, Londres); Dibujo de Charcot de la marcha de un enfermo de Parkinson (1887, *Lecciones de martes en La Salpêtrière, París*); Dibujos de Friedrich Heinrich Lewy de inclusiones de cuerpos eosinofílicos, donde células 1-6 del núcleo dorsal del nervio vago (tinción de Mann 1-6 + 8), células 7-10 del núcleo paraventricular y sustancia innominata (tinción de Mallory), (Lewy 1912); Reproducción de un dibujo de Santiago Ramón y Cajal que muestra una sección coronal de la sustancia negra de un gato de pocos días con tinción del método de Golgi, donde el pedúnculo cerebral está en la parte inferior ("D") y las letras "B" y "A" indican neuronas de la parte inferior (*pars reticulata*) y zona superior (*pars compacta*), respectivamente (*Histología del sistema nervioso del hombre y de los vertebrados. Vol. 2. Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 1911*).

No fue hasta 1895 cuando se descubrieron indicios patológicos de la enfermedad. Primero, Georges Marinesco, alumno en La Salpêtrière, y Paul Blocq, y después Edouard Brissaud, discípulo de Charcot, descubrieron una posible relación entre los temblores de la EP y lesiones en la *substantia nigra* (SN) cerebral, tras el estudio de un único paciente con sintomatología parkinsoniana. Tras este indicio, Brissaud hipotetizó que la SN podría estar involucrada en el control del tono muscular y que una lesión en su estructura causaría la EP. Estos hechos no tuvieron mucha repercusión durante los siguientes 20 años y la mayoría de los estudios patológicos se centraron en otras áreas como el cuerpo estriado y el fascículo lenticular (Parent & Parent, 2010). Cabe destacar la pionera descripción de la SN realizada en 1899 por Santiago Ramón y Cajal en su obra magna "Histología del sistema nervioso del hombre y de los vertebrados", en la que usando la tinción de Golgi describió los diferentes tipos neuronales que poblaban cada una de las dos porciones a las que denominó inferior y superior, aunque no pudo rastrear las proyecciones axonales de estas neuronas (Figura 1). Tras unos años, la confirmación de la teoría de la SN llegaría de la mano de Constantin Tretiakoff, al final de la primera Guerra Mundial (1918), cuando surgió una pandemia de encefalitis letárgica que llevaba asociada un aumento del número de casos de EP. En su laboratorio de La Salpêtrière, realizó un estudio neuropatológico detallado de la SN de 54 pacientes, de los que 9 poseían la enfermedad y 3 de ellos presentaban parkinsonismo postencefalítico. Tretiakoff observó en todos los enfermos de EP, una pérdida de neuronas nigrales, hinchazón de los cuerpos celulares, degeneración grumosa y alteraciones fibrilares (Figura 1); además, pudo advertir que las neuronas de la SN que no se habían degenerado, presentaban unos depósitos típicos a los que denominó cuerpos de Lewy. Esta denominación se realizó en honor a Friedrich Heinrich Lewy, neuropatólogo que describió por primera vez estas inclusiones citoplasmáticas en el núcleo dorsal del vago y la *substantia innominata* de pacientes de EP, en una publicación en 1912, además de realizar un estudio de anatomía patológica sobre la enfermedad (Lewy, 1912; Holdorff et al., 2013) (Figura 1).

Durante los siguientes años se produjo un gran desarrollo científico respecto a la EP. Cabe destacar la figura de Arvid Carlsson que, junto a su equipo, descubrió en la década de 1950 que un descenso en los niveles de dopamina (DA) provocaba síntomas muy

similares a los de la enfermedad, y que este neurotransmisor se encontraba más concentrado en ciertas zonas cerebrales como los ganglios basales. Además, mostró que la L-DOPA, precursor de la DA, era efectiva en el tratamiento de la sintomatología. Actualmente la EP se sigue tratando de este modo (Carlsson, 1972, 1993; Yeragani et al., 2010), aunque gracias al avance científico/médico se combinan aquellos tratamientos basados en la administración de L-DOPA con otros, como los agonistas dopaminérgicos y la estimulación cerebral profunda (Poewe et al., 2017).

1.2. Contexto actual e importancia del estudio de la enfermedad

Según el último informe sobre el envejecimiento de las Naciones Unidas de 2021, se espera que en el año 2050 el fragmento de la población mundial de personas mayores de 65 años aumente al 16% con respecto a las de este año (9%). Los avances tecnológicos y científico-sanitarios, la mejora en los factores socioeconómicos y ambientales han permitido que la esperanza de vida se duplique, sobre todo en los países más desarrollados, pasando de unos 40 a 80 años de edad en los últimos cien años. Sin embargo, con este aumento gradual de la esperanza de vida se hace más notable el aumento en la prevalencia de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (EA) y la EP, asociadas a un deterioro de la calidad de vida en personas que las padecen.

De hecho, uno de los principales factores de riesgo de la EP es el envejecimiento (Hirsch et al., 2016) y actualmente es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común después de la EA, con una prevalencia de entre 0,5 y el 1% en las personas de entre 65 a 69 años de edad y del 1 al 3% entre las personas con 80 años o más, existiendo mundialmente más de 6 millones de enfermos de EP (Tolosa et al., 2021). Asimismo, la prevalencia de la EP se ha duplicado en los últimos 25 años y las estimaciones mundiales en 2019 mostraban una cifra superior a 8,5 millones de personas con esta enfermedad (OMS: Enfermedad de Parkinson <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/parkinson-disease>. Acceso: 2024-01-31).

El envejecimiento demográfico junto al descenso de la fracción de población en edad de trabajar, han puesto en alerta a los sistemas de protección social, económicos y

sanitarios, principalmente de los países europeos, América del Norte y este asiático. Con la población mundial envejeciendo, existe una creciente necesidad de estudio sobre cómo mejorar la salud y la calidad de vida en la tercera edad, que incluye la investigación sobre la etiopatogenia y posibles tratamientos de las enfermedades relacionadas con el envejecimiento y la neurodegeneración, como la EP (Ben-Shlomo et al., 2024). Por último, cabe destacar, que el estudio de las enfermedades neurodegenerativas puede contribuir también al avance del conocimiento y la comprensión del funcionamiento del cerebro humano.

2. Sintomatología

La EP es una enfermedad neurodegenerativa crónica y progresiva que se caracteriza por el desarrollo de una sintomatología que repercute en la capacidad motora del afectado, causando una discapacidad paulatina que deteriora su calidad de vida. El diagnóstico de la EP es clínico por los criterios del Banco de Cerebros de la Sociedad de Enfermedad de Parkinson del Reino Unido (UK Parkinson's Disease Society Brain Bank), determinado por la aparición de bradicinesia y uno de los siguientes signos motores: temblor en estado de reposo (4-6 Hz), rigidez muscular e inestabilidad postural no causada por disfunción primaria visual, vestibular, cerebelosa o propioceptiva (Alonso Cánovas et al., 2016). Aunque estos signos son los definitorios, existen otros para establecer criterios de apoyo y de exclusión, como unilateralidad sintomática, familiares afectados y respuesta a levodopa (Alonso Cánovas et al., 2016). La discapacidad progresiva del enfermo de EP también se debe a otros signos y síntomas motores y no motores: alteración de la marcha, disfagia, disartria, hiposmia, estreñimiento, disfunción urinaria, hipotensión ortostática, pérdida de memoria, alteraciones del ánimo, dolor, etc. (Tolosa et al., 2021). De hecho, algunos de ellos son manifestaciones no motoras prodrómicas, que orientan en el posible diagnóstico, como son anosmia (en el 90% de los casos), estreñimiento, trastornos del sueño, depresión y ansiedad (Lang, 2011). Con el paso del tiempo, el cuadro clínico se va complicando, apareciendo la sintomatología mencionada, pero pudiendo complicarse con la aparición de trastornos psiquiátricos como deterioro cognitivo y demencia, que pueden derivar en una incapacidad total. Sin embargo, el

curso de la enfermedad manifestado en los diferentes pacientes es muy heterogéneo, hecho que actualmente aún no ha sido explicado en su totalidad (Obeso et al., 2017).

3. Etiopatogenia

Anatopatológicamente, la EP se caracteriza principalmente por una neurodegeneración de las neuronas dopaminérgicas de la SN (y en menor medida en el área tegmental ventral), haciéndose evidente histológicamente gracias a la despigmentación de esta zona cerebral, y por una agregación proteica intracelular de α -sinucleína (α -sin) fibrilar y ubiquitinada (denominados cuerpos de Lewy) en el cuerpo celular (King et al., 2019) (figura 2). Sin embargo, también existe neurodegeneración en los sistemas serotoninérgico (núcleo dorsal del rafe) y noradrenérgico (locus coeruleus) (Paredes-Rodriguez et al., 2020; Politis & Niccolini, 2015). La pérdida de todas estas neuronas da lugar a los síntomas motores y no motores mencionados anteriormente (Buddhala et al., 2015).

Aunque la etiología de la EP es desconocida, en la patogenia están involucrados multitud de factores, interaccionando factores genéticos, ambientales y moleculares, como acumulación de α -sin, disfunción mitocondrial y neuroinflamación, derivadas del estrés oxidativo causado por la formación de radicales libres (Poewe et al., 2017).

Respecto a la α -sin, como ya se ha mencionado anteriormente, en estudios histológicos *postmortem* de pacientes con EP se observan agregados proteicos intracelulares de esta proteína. La α -sin se expresa con bastante abundancia en el cerebro y se puede encontrar en el citoplasma, asociada a mitocondrias o al núcleo neuronal, y en los terminales presinápticos (Wojewska et al., 2023). En condiciones patológicas, la α -sin se encuentra mal plegada y en agregados o depósitos de oligómeros y fibrillas conformando los cuerpos de Lewy, que definen múltiples enfermedades neurodegenerativas llamadas sinucleopatías, entre las que se encuentra la EP (Wojewska et al., 2023). Sin embargo, aunque se sabe que niveles elevados de α -sin pueden llegar a ser neurotóxicos, aún se

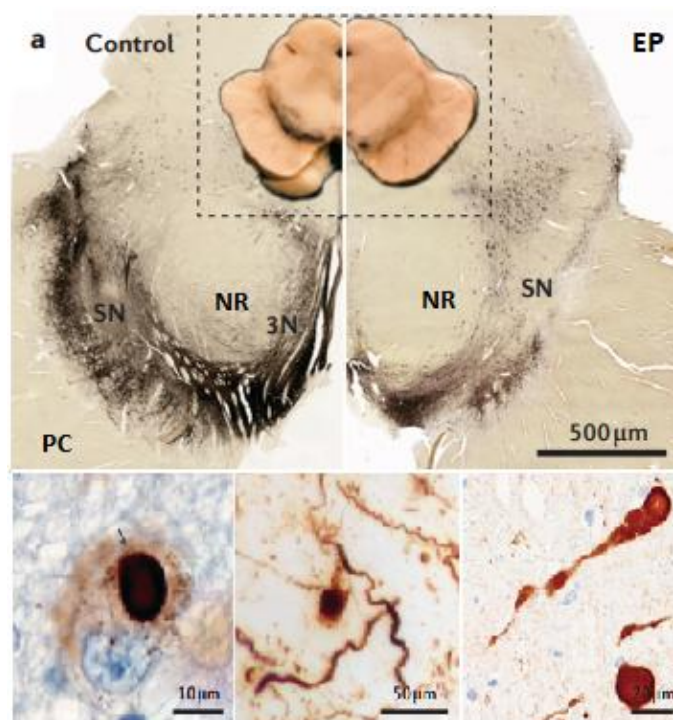


Figura 2. Anatomopatología cerebral de la enfermedad de Parkinson (EP). Arriba, secciones de mesencéfalo inmunomarcadas para la detección de la enzima tirosina hidroxilasa que muestran la neurodegeneración dopaminérgica (EP) con respecto al control. Abajo: ejemplos de inmunomarcaje para α -sinucleína (α -sin), en las que se observan cuerpos de Lewy intracelulares en somas (imágenes izquierda y central), y depósitos difusos de α -sin en procesos celulares (imagen derecha). Abreviaturas: SN, sustancia negra; NR, núcleo rojo; 3N, fibras del tercer nervio; PC, pedúnculo cerebral. Imagen modificada de Poewe et al., 2017.

desconocen los mecanismos con los que contribuye a la neurodegeneración (Burré et al., 2018). Relacionado con esta proteína, hay cada vez más evidencias de la implicación del eje intestino/cerebro en la etiología de la EP, sobre todo en pacientes con disfunción gastrointestinal prodrómica. Esta hipótesis sugiere que las perturbaciones en la homeostasis intestinal contribuyen a la agregación de α -sin en las neuronas entéricas y que ésta se expande durante el transcurso de décadas hacia las neuronas cerebrales, provocando la neurodegeneración en el sistema nervioso central (SNC) y la sintomatología anteriormente mencionada (Gorecki et al., 2021).

A continuación, se describirá en mayor detalle el papel del estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial y la neuroinflamación en la etiopatología de la EP.

4. Estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial

Las principales causas fisiopatológicas que se atribuyen al envejecimiento y a la mayor parte de las enfermedades neurodegenerativas como el EA y EP son el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial (Elfawy & Das, 2019).

Se cree que el estrés oxidativo generado por las neuronas dopaminérgicas desempeña un papel importante en la neurotoxicidad dopaminérgica. Así, existen varios factores que podrían ser responsables del estrés oxidativo en estas neuronas, como el metabolismo de la DA, la disfunción mitocondrial y la neuroinflamación, que son las manifestaciones de la generación de radicales libres y/o especies reactivas de oxígeno (por sus siglas en inglés *reactive oxygen species*, ROS). Todo ello contribuye significativamente y está asociado con la disfuncionalidad del complejo I de la cadena de transporte electrónico (CTE) mitocondrial, hecho que se detectó accidentalmente tras la exposición de personas al fármaco sintético 1-metil-4-fenil-1, 2,3,6. -tetrahidropiridina (MPTP) (figura 3) (Elfawy & Das, 2019).

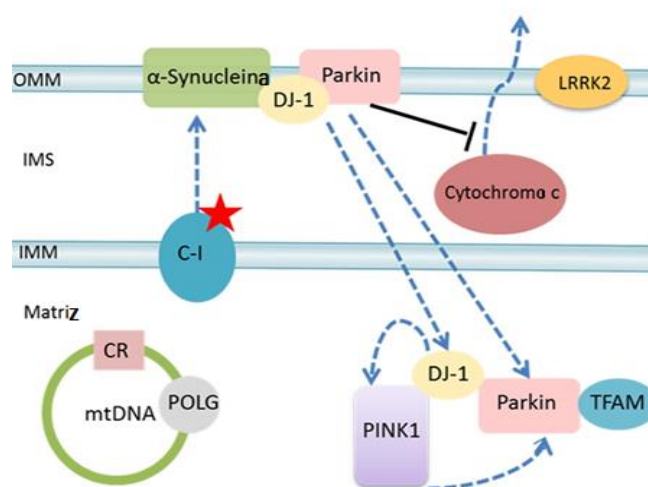


Figura 3: El papel de la mitocondria en la etiopatogenia de la enfermedad de Parkinson (EP). En el desarrollo de la EP, la actividad del complejo I de la cadena de transporte de electrones (C-I) se ve alterada. Mutaciones en las subunidades de dicho complejo codificadas por el ADN mitocondrial (ADNmt), el 12SrRNA y la polimerasa γ (POLG), también causan parkinsonismo. Por otro lado, muchas proteínas asociadas a la EP, incluidas α -sin (asociada a los cuerpos de Lewy), desglucosa (DJ-1), Parkin y la quinasa LRRK2, están localizadas parcial o totalmente dentro de las mitocondrias, viéndose afectadas por las alteraciones en el C-I. Imagen modificada de Elfawy & Das, 2019.

La pérdida de homeostasis redox celular se produce cuando la producción de ROS, como son el anión superóxido ($O_2^{\cdot -}$), los radicales hidroxilo (HO^{\cdot}) y el peróxido de hidrogeno (H_2O_2), sobrepasa la capacidad antioxidante celular (Sies, 2015). Los radicales libres son moléculas muy reactivas e inestables, ya que poseen uno o varios electrones desapareados en su orbital más externo. Las ROS se pueden formar por tres mecanismos: (i) por la escisión homolítica de un enlace covalente de una molécula normal, donde cada fragmento retiene uno de los electrones apareados; (ii) por la pérdida de un solo electrón de una molécula normal; (iii) por la adición de un solo electrón a una molécula normal; siendo este último proceso el más común en los sistemas biológicos debido a que la fisión homolítica generalmente requiere un alto aporte de energía y son necesarias altas temperaturas, luz ultravioleta o radiación ionizante. A nivel funcional, en condiciones fisiológicas normales, las ROS se encuentran en niveles basales y en equilibrio en las células, produciéndose como subproductos del metabolismo celular, ejerciendo un papel fundamental en el desarrollo, apoyando el metabolismo y la proliferación celular, e incluso actuando como moléculas clave para la transducción de señales de importantes vías metabólicas y reguladoras de las células, como el proceso de fagocitosis. Este proceso se encuentra regulado por una serie de mecanismos antioxidantes que mantienen una homeostasis redox en la célula (Elfawy & Das, 2019). Por el contrario, en respuesta a condiciones patológicas, la liberación de estas especies puede aumentar, favoreciendo el estrés oxidativo y haciendo ineficaces a los mecanismos antioxidantes, lo que provoca daños celulares a diferentes niveles por la oxidación de diversas moléculas esenciales para la viabilidad celular, entre las que se destacan el ácido desoxirribonucleico (ADN), las proteínas y los lípidos (figura 4), que son los más susceptibles a la oxidación (Bhat et al., 2015). Así, las membranas celulares son fuentes ricas en ácidos grasos poliinsaturados, que son atacados por ROS y destruidos mediante una reacción conocida como peroxidación lipídica, que es particularmente dañina porque funciona como una reacción en cadena que se perpetúa a sí misma. El ataque de las ROS sobre las proteínas es poco dañino a menos que sea muy extenso, siendo significativo para la viabilidad de la célula ya que permite acumular daños. La proximidad de la producción de ROS al ADN lo hace un objetivo vulnerable, ya que, si se eluden los

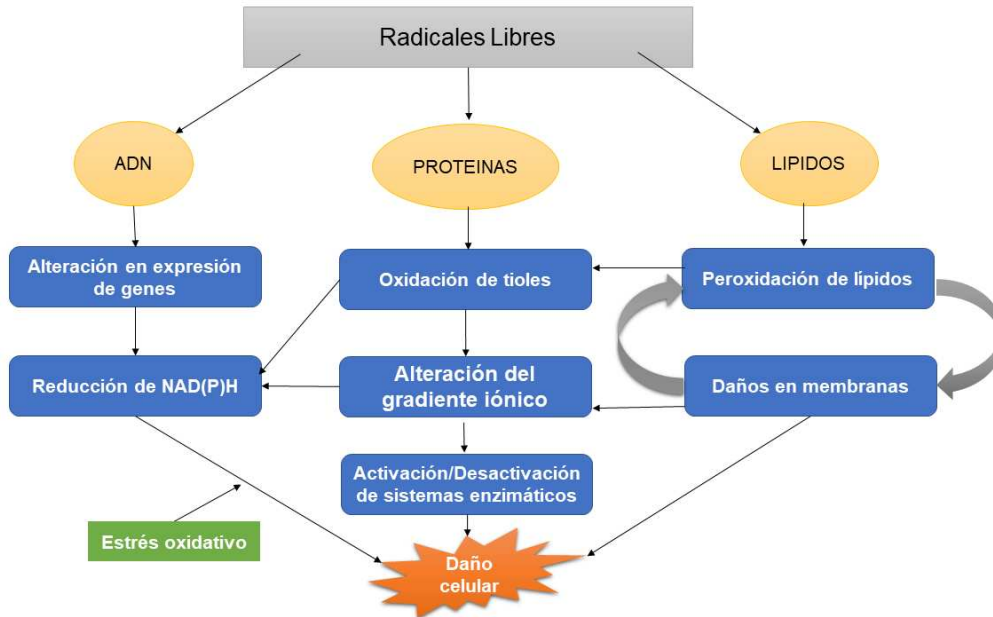


Figura 4. Esquema resumen del efecto de especies reactivas de oxígeno (ROS) a nivel celular sobre el ADN, las proteínas y los lípidos. Imagen modificada de Bhat et al., 2015.

mecanismos de reparación, se pueden acumular suficientes daños a lo largo del tiempo y provocar mutaciones (Cheeseman & Slater, 1991, Elfawy & Das, 2019).

Así, se puede resumir que la interacción de las ROS con estos tres tipos de moléculas producirá en ellas una modificación estructural, que se traducirá en una alteración funcional. Además, si el estado oxidativo en la célula persiste, pueden activarse diferentes respuestas celulares como la muerte celular, la apoptosis, la necrosis o la autofagia entre otras (Zandalinas & Mittler, 2018), procesos que conllevan a la neurodegeneración. Un ejemplo de esto es que el estrés oxidativo en las células puede inhibir la actividad de la proteína mTOR (diana de rapamicina en células de mamífero), que participa en vías de señalización intracelular para la inhibición de la autofagia y la apoptosis o para la activación de síntesis de proteínas, ácido ribonucleico (ARN) y ADN, activándose así el mecanismo de autofagia mediada por ROS (He et al., 2017).

En las células existen diferentes orgánulos productores de ROS, el retículo endoplasmático, los peroxisomas y las mitocondrias, siendo estas últimas la fuente más importante de ROS (Dröse et al., 2014). Estos orgánulos se caracterizan por poseer doble membrana y genoma autorreplicante, tienen funciones esenciales para el metabolismo

celular, como la obtención de energía o ATP (adenosín trifosfato) a través de la oxidación de NADH (dinucleótido nicotín adenín reducido), FADH_2 (dinucleótido flavín adenín reducido) y la fosforilación del ADP (adenosín difosfato), la producción de Ca^{+2} intracelular, y además son participes en los procesos de muerte celular y apoptosis (Murphy & Hartley, 2018) (figura 5). En las neuronas, la producción de ATP por las mitocondrias se asocia a muchas funciones clave, como el movimiento de las vesículas presinápticas y el ensamblaje del citoesqueleto en las zonas pre y postsináptica, además es la encargada de la retención de Ca^{+2} durante la transmisión de potenciales de acción entre neuronas (Sheng & Cai, 2012). La mayor parte de las ROS generadas por las mitocondrias está constituida por el anión superóxido (O_2^-), que principalmente se produce en los complejos I y III de la CTE, por lo que el ataque de estos radicales libres suele ocurrir directamente en la propia mitocondria, en la cadena respiratoria mitocondrial (figura 5). Pero el estrés oxidativo crónico también produce daños en el ADN nuclear y mitocondrial (ADNmt), afectando al desarrollo de las funciones mitocondriales (disfunción mitocondrial) e incluso promoviendo la autofagia (Murphy & Hartley, 2018) (figura 5). La integridad de la secuencia del ADNmt es esencial para la función respiratoria mitocondrial puesto que codifica, entre otros, genes de los polipéptidos que conforman los complejos enzimáticos de la CTE que produce la fosforilación oxidativa y la generación de ATP (Elfawy & Das, 2019). Por tanto, su inestabilidad provocaría un sistema de obtención energética defectuoso, que podría resultar en un aumento de la producción de ROS persistentemente, causando disfunción metabólica, inestabilidad genómica y lesión celular (Murphy & Hartley, 2018). En relación a esto, el factor de transcripción mitocondrial A (TFAM) es una proteína de codificación nuclear con un papel esencial en el metabolismo del ADNmt (Kang et al., 2018), pues posee funciones parecidas a las histonas y su unión al ADNmt es necesaria para la correcta transcripción, replicación, estabilidad y protección de genes mitocondriales, sobre todo frente a moléculas dañinas como las ROS. De hecho, es conocido que la ausencia de TFAM debilita seriamente la fosforilación oxidativa de las mitocondrias, reduce la producción de ATP y aumenta la producción de ROS mitocondrial (Jiang et al., 2023).

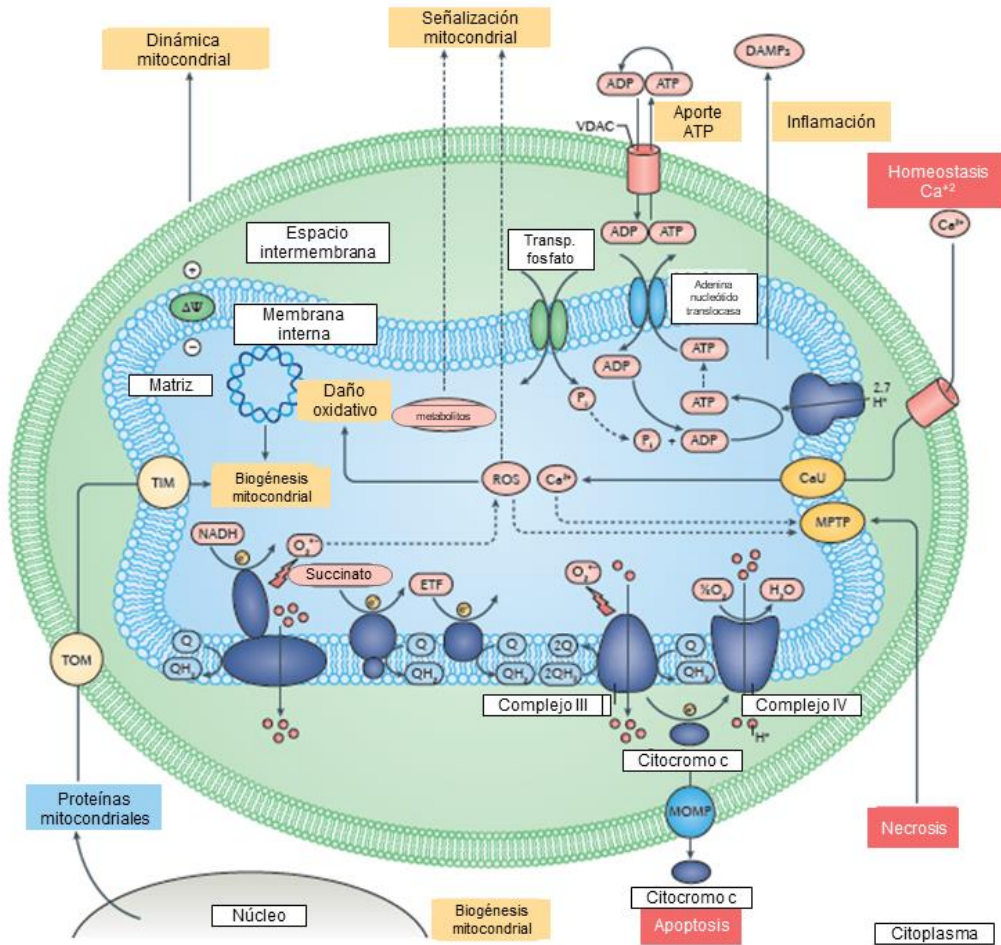


Figura 5. Imagen resumen de la función mitocondrial y su alteración patológica. La alteración de la función mitocondrial, debida a factores estresantes como el estrés oxidativo, puede afectar a diferentes vías: producción y suministro de ATP; biogénesis mitocondrial; control de calidad de fisión y / o fusión mitocondrial y otros orgánulos; producción de ROS; inducción de la formación de poros de transición de permeabilidad mitocondrial (MPTP); liberación de factores proapoptóticos al citosol por permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP); señalización mitocondrial; y homeostasis de calcio. Abreviaturas: $\Delta\psi$, potencial de membrana; CaU, uniportador de calcio; e^- , electrón; ETF, flavoproteína de transferencia de electrones; P_i , fosfato; Q, ubiquinona; QH₂, ubiquinol; TIM, translocasa de la membrana interna; TOM, translocasa de la membrana externa; VDAC, canal de aniones dependiente de voltaje. Imagen modificada de Murphy & Hartley, 2018.

Además, algunos estudios apuntan a un descenso de los niveles de TFAM y una pérdida de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial de las neuronas dopaminérgicas

en los casos de EP (Kang et al., 2018). Por otro lado, las ROS alteran la estabilidad de la permeabilidad de la membrana mitocondrial, propiciando la aparición de poros mitocondriales en la membrana mitocondrial externa que provoca la liberación de citocromo c y otros factores proapoptóticos (figura 5) que, en última instancia, desencadenan la activación de la caspasa y la muerte celular (He et al., 2017). Todas estas alteraciones facilitan la fisión y el agotamiento mitocondrial.

Por otro lado, cabe destacar que la producción de las ROS puede generar igualmente disfunción del retículo endoplasmático, provocando la acumulación de proteínas mal plegadas como la α -sin en la EP (Bhat et al., 2015, 2017).

5. Estrés oxidativo y neuroinflamación

La inflamación es una respuesta del sistema inmune que aparece para favorecer la reparación de los tejidos por el daño derivado de algún estímulo extraño y/o nocivo. Durante condiciones patológicas de estrés oxidativo, las ROS inducen la aparición de moléculas proinflamatorias en los tejidos (citoquinas como el TNF- α) provocando inflamación crónica, la cual tiene un papel importante en el envejecimiento y muchas enfermedades relacionadas, incluyendo los desórdenes cardiovasculares, enfermedades autoinmunes, enfermedades respiratorias y enfermedades neurodegenerativas como la EA y la EP (Mittal et al., 2014). La inflamación en la EP se ve iniciada por el daño neuronal y la agregación de proteínas en el estriado y en la SN, y puede agravar el curso de la enfermedad (Członkowska et al., 2002; Goedert, 2004). Así, diversos estudios indican que el proceso inflamatorio en la EP se caracteriza por la activación de la microglía residente, involucrando a los mecanismos autoinmunes en la patogenia del daño neuronal en la EP (Yamada et al., 1991; Langston et al., 1999). Por todo ello, actualmente la investigación científica está orientada a estudiar los mecanismos antioxidantes, y por ende antiinflamatorios, para encontrar tratamientos que puedan detener el curso de la enfermedad en los pacientes de EP (Bonifati & Kishore, 2007).

6. Mecanismos antioxidantes celulares

Las células eucariotas poseen mecanismos antioxidantes capaces de contrarrestar el efecto perjudicial inducido por un aumento en la producción de ROS, que conlleva a la pérdida de homeostasis redox celular. Estos mecanismos se pueden clasificar como enzimáticos y no enzimáticos (Figura 6).

Los mecanismos antioxidantes enzimáticos son los sistemas basados en las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y tiorredoxina (TRx). Estos mecanismos son los más efectivos frente al ataque oxidativo activo y masivo, debido a que pueden disociar las ROS directa o indirectamente (He et al., 2017). A continuación, se muestran las principales reacciones generales en las que participan:

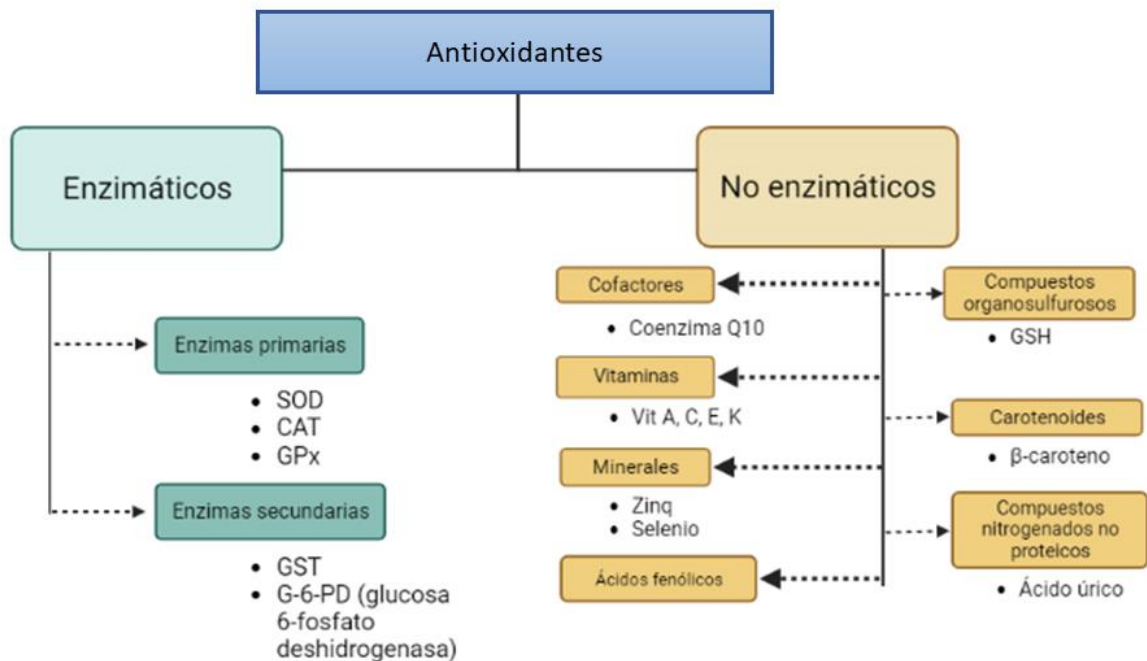
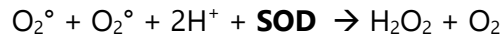


Figura 6. Esquema resumen de los principales mecanismos antioxidantes celulares. Imagen modificada de Carochó & Ferreira, 2013 y creada en BioRender.com.

Los sistemas de SOD y CAT son los sistemas antioxidantes más importantes (He et al., 2017). La SOD es la primera línea de defensa celular frente a las ROS, ya que puede ser inducida rápidamente, y la CAT es capaz de disociar el peróxido de hidrogeno en oxígeno y agua, aunque su presencia en el SNC es muy baja (Ma et al., 2010). En la mitocondria, principal productora de ROS y receptora por tanto del deterioro oxidativo, se puede encontrar la Mn-SOD para paliar estos efectos (He et al., 2017). La enzima GPx usa el glutati6n (GSH) como reductor para catalizar la disociaci6n de H₂O₂ o hidroper6xidos org6nicos en agua o en los alcoholes correspondientes respectivamente m6s glutati6n disulfuro (GSSG). Existen diferentes tipos de GPx seg6n la zona donde ejercen su funci6n antioxidante. As6, GPx1 est6 presente de forma ubicua en el citosol y las mitocondrias, GPx2 en el citosol y el n6cleo, GPx3 en el plasma, y GPx4 est6 asociado a la membrana y parece protegerlas del estr6s oxidativo (Brigelius-Floh6 & Maiorino, 2013). Por 6ltimo, el sistema TRx est6 compuesto por NADPH (Nicotinamida adenina dinucle6tido fosfato), la enzima tiorredoxina reductasa (TRxR) y la TRx. Es muy importante contra el estr6s oxidativo gracias a su actividad disulfuro reductasa y tienen una funci6n en la reparaci6n del ADN y las prote6nas al reducir la ribonucle6tido reductasa y las metionina sulf6xido reductasas (Lu & Holmgren, 2014).

Por otro lado, entre las mol6culas antioxidantes no enzim6ticas se pueden destacar el GSH, la vitamina E y la vitamina C, entre otras muchas (Carocho & Ferreira, 2013) (figura 6). Es de destacar el papel antioxidante de los tioles, que son compuestos organosulfurosos proteicos (presentan grupos sulfhidrilo (-SH) en los amino6cidos ciste6na que funcionan como amortiguadores redox y ayudan a mantener el potencial redox celular. El principal contribuyente al total de los tioles dentro de la c6lula es el GSH, un trip6ptido no enzim6tico que en su forma reducida est6 formado por glutamina - ciste6na - glicina, que se caracteriza por ser el antioxidante m6s abundante en las c6lulas de mam6feros, actuando como agente reductor para mantener el estatus redox (Franco & Cidlowski, 2009; Hess et al., 2005). As6, la determinaci6n de la cantidad de tioles totales presentes en una c6lula o tejido es utilizada ampliamente en la investigaci6n y la pr6ctica cl6nica como biomarcador de estr6s oxidativo (Gross et al., 2021).

Cabe resaltar tambi6n la regulaci6n de la expresi6n de genes que codifican para estas enzimas antioxidantes a trav6s de factores de transcripci6n, entre los que resaltan el

factor nuclear eritroide 2 (NRF2) y el coactivador transcripcional-1 α proliferante de peroxisomas activados del receptor- γ (PGC-1 α), considerados clave en la regulación bioenergética mitocondrial y de la homeostasis redox (Figura 7).

El factor PGC-1 α participa activamente en la regulación de numerosos genes de moléculas con capacidad antioxidante, principalmente mitocondriales, demostrado ser un regulador principal de la biogénesis mitocondrial y del metabolismo energético de neuronas (Mudò et al., 2012), y por tanto de la densidad mitocondrial (Wareski et al., 2009) (figura 7).

Por otra parte, el factor NRF2 es posiblemente el regulador transcripcional más importante de moléculas antioxidantes dentro de la célula, ya que su activación regula cerca de 250 genes relacionados con la respuesta antioxidante celular (Cuadrado, 2016). De hecho, NRF2 controla la expresión de los componentes clave del sistema antioxidante SOD, GPx y TRx (figura 7), así como enzimas involucradas en la regeneración de NADPH, ROS y desintoxicación de xenobióticos, desempeñando un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis redox de la célula. Su activación y posterior transcripción se produce en respuesta a la presencia de ROS o electrolitos en el interior de la célula. En condiciones normales, NRF2 está constantemente ubiquitinado por la proteína Keap1 (Kelch ECH asociada a proteína 1) entre otras y es degradado por el

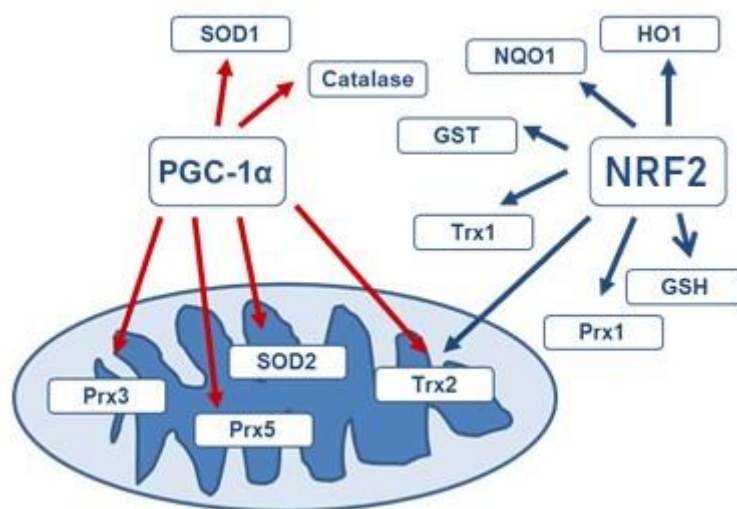


Figura 7. Regulación de enzimas antioxidantes mitocondriales y citosólicas por PGC-1 α y NRF2. Imagen modificada de Clark & Simon, 2009.

proteosoma (figura 8). La exposición a los estímulos estresantes inactiva Keap1 liberando al factor NRF2, que a continuación se transloca hacia el núcleo donde se une a una secuencia genética específica de ADN, denominada elementos de respuesta antioxidante o ARE (por sus siglas en inglés *antioxidant response element*), y activa la transcripción de diversos genes citoprotectores que codifican enzimas detoxificantes y proteínas antioxidantes (figura 7). Así, además de permitir la síntesis de GSH, controla la expresión de numerosos enzimas detoxificantes de ROS como GPx2, NQO1 (NAD(P)H quinona deshidrogenasa 1) y varias glutatión S-transferasas (GST) (Tonelli et al., 2018).

El estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial, unidos a las alteraciones observadas en los niveles/actividad de NRF2 y PGC-1 α , observados en enfermedades como esclerosis múltiple, enfermedad de Huntington o EP (Mudò et al., 2012; Van Horsen et al., 2011; Weydt et al., 2006) sugieren que el mantenimiento o la recuperación de la homeostasis

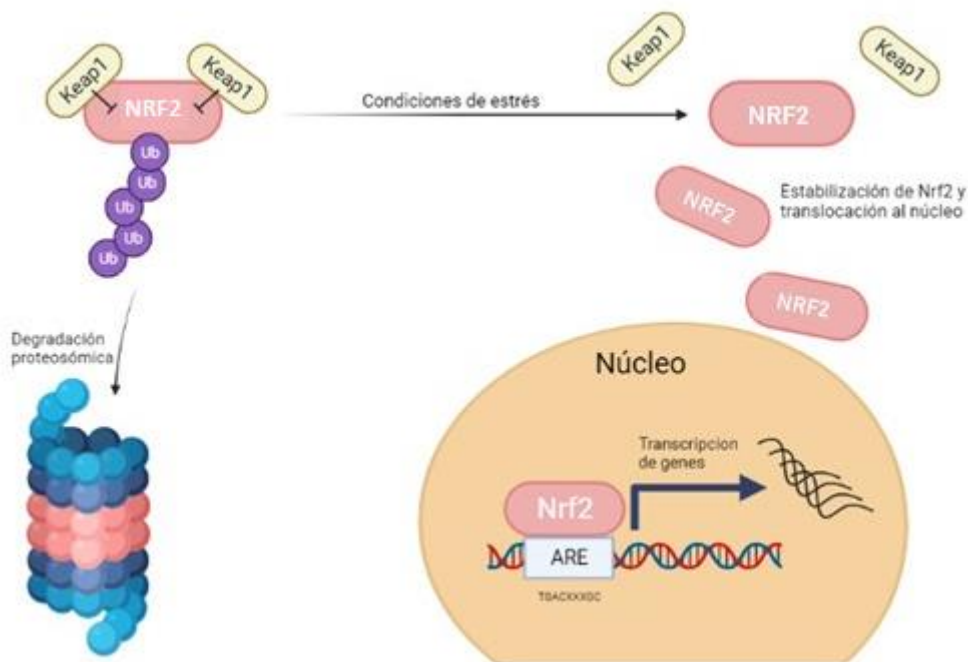


Figura 8. Sistema Keap1–NRF2. Bajo condiciones normales, NRF2 se encuentra ubiquitinado (Ub), proceso mediado por Keap1, y es degradado en el proteosoma. La exposición a ROS, hace que Keap1 se inactive y NRF2 se estabilice, traslocándose hacia el núcleo, donde activa la transcripción de genes de respuesta antioxidante tras unirse a la región ARE. Imagen modificada de Tonelli et al., 2018 y creada en BioRender.com.

redox celular y la función mitocondrial en dichas enfermedades neurodegenerativas, puede ser considerado como una diana terapéutica ante este tipo de trastornos (Joshi & Johnson, 2012; Saharan & Mandal, 2014), por lo que es necesaria la búsqueda de dianas biológicas óptimas para ello, existiendo datos prometedores de algunas de ellas, como los factores de crecimiento insulínico tipo I y II (IGF-I e IGF-II, por sus siglas en inglés *Insulin-like Growth Factor type I/II*).

7. Factores de crecimiento insulínico tipo I y II

Los factores IGF-I e IGF-II se definieron como factores séricos con actividad y morfología similares a la insulina (Rinderknecht & Humbel, 1978) (figura 9). Son polipéptidos pleiotrópicos que se distribuyen ampliamente en varios tejidos, incluido el SNC, mediando un amplio espectro de funciones tanto en etapas de desarrollo como en

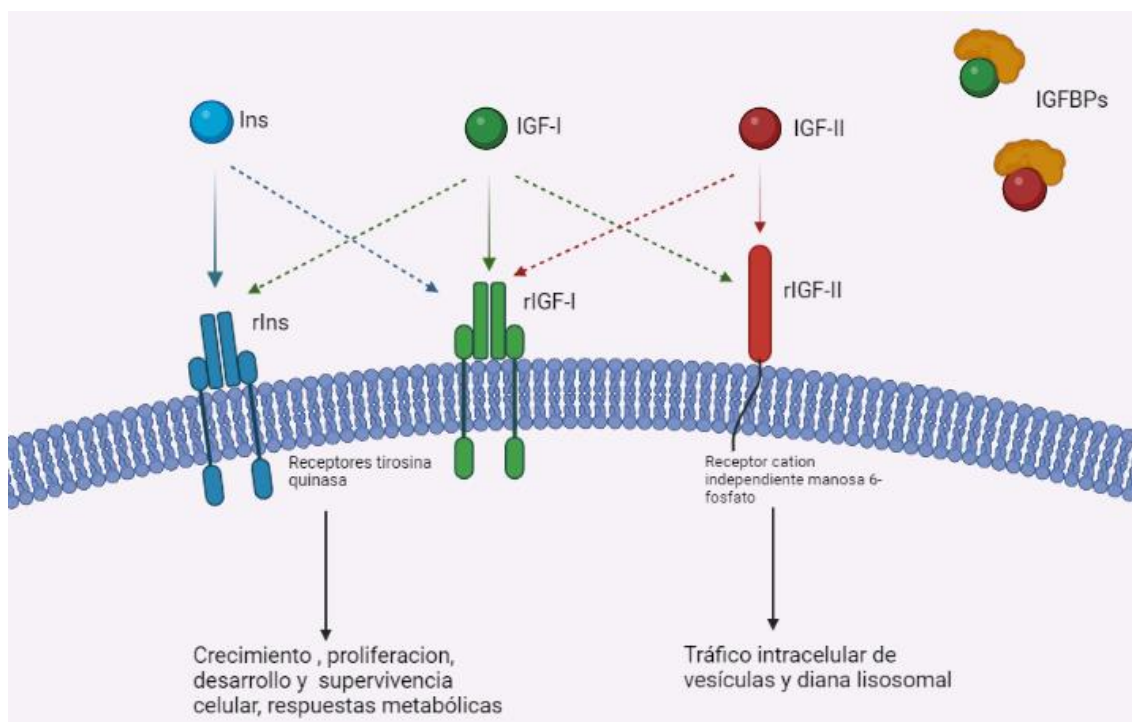


Figura 9. Sistema Insulina/factores de crecimiento insulínico (IGF) de tipo I y II. Las flechas discontinuas indican menor afinidad entre factor y receptor. Abreviaturas: Ins, insulina; IGFBPs, proteínas de unión a IGF; rIGF-I, receptores de IGF-I; rIGF-II, receptores de IGF-II; rIns, receptores de insulina. Imagen modificada de Alberini, 2023 y creada en BioRender.com

las etapas adultas (Fernandez & Torres-Alemán, 2012). Así, se conoce que la expresión de IGF-I se produce en todas las células cerebrales, principalmente en fases tempranas de edad y disminuyendo los niveles en edades adultas. IGF-II se produce a niveles elevados durante el desarrollo en el plexo coroideo, leptomeninges e hipotálamo, permaneciendo alta en los dos primeros durante la edad adulta (Beletskiy et al., 2021).

A nivel celular, ambos actúan como factores autocrinos, paracrinos y endocrinos interviniendo en el desarrollo, la supervivencia, la diferenciación y la quimiotaxis (Fernandez & Torres-Alemán, 2012, Werner & LeRoith, 2014). La biodisponibilidad de IGFs depende de sus tasas de síntesis y de eliminación, además de su unión a una serie de proteínas llamadas proteínas de unión a IGF de alta afinidad o IGFbps (por sus siglas de inglés *IGF binding proteins*) (El-Shewy & Luttrell, 2009) (figura 9). Estas proteínas influyen en la vida media de los IGFs ya que los transportan y modulan su unión a los receptores específicos en las células diana. Normalmente la unión a las IGFbps disminuye la actividad de estos factores y decrece su eliminación, prolongando el tiempo de biodisponibilidad. Asimismo, hay evidencias que sugieren que la estimulación con IGFs promueven la síntesis de algunas de estas IGFbps promoviendo una regulación de retroalimentación (Alberini, 2023). Por otro lado, se conocen diversas enzimas capaces de proteolizar estas proteínas de unión, actuando por tanto como reguladoras clave en la modulación de los niveles de IGFbps e IGFs (Wang et al., 2017). En el cerebro existen 6 IGFbps diferentes, siendo IGFbp-2 la más abundante, aunque IGF-II posee mayor afinidad hacia IGFbp-6 (Fernandez & Torres-Alemán, 2012).

Los IGF-I e IGF-II ejercen sus funciones uniéndose, con distinta afinidad, a los mismos receptores, llamados receptor de alta afinidad de IGF-I (rIGF-I) y receptor de alta afinidad de IGF-II (rIGF-II) (Alberini, 2023) (figura 9). Ambos receptores son estructural y funcionalmente distintos; mientras rIGF-I presenta una estructura similar al receptor de insulina (rIns), siendo un receptor de tipo tirosina quinasa, el rIGF-II es un dímero de glucoproteína transmembrana tipo I que consta de cuatro dominios estructurales, incluyendo una secuencia señal amino terminal, un dominio extracitoplasmático grande, una región transmembrana única y una cola citoplásmica carboxiterminal (Wang et al., 2017). Además de la unión a IGF-II, el rIGF-II es capaz de unir residuos de manosa 6-fosfato (M6P) que intracelularmente se encuentran unidos a glicoproteínas, por lo que

también se le conoce como receptor independiente de cationes de manosa-6-fosfato (IGF-II/M6P) (El-Shewy & Luttrell, 2009).

De los 2 factores, el IGF-II tiene un interés especial por su posible papel en mecanismos de neuroprotección en enfermedades neurodegenerativas como la EP (Lewitt & Boyd, 2019).

7.1. IGF-II

En el SNC adulto, el IGF-II es sintetizado por los plexos coroideos, meninges, células endoteliales y células progenitoras de la zona subgranular del hipocampo, por lo que es muy abundante en el líquido cefalorraquídeo, desde donde pasa al tejido cerebral (Walter et al., 1999).

Independientemente o en sinergia con IGF-I, se ha descrito que IGF-II tiene funciones relacionadas con la homeostasis, crecimiento y desarrollo neuronal, aunque diversos estudios también le atribuyen efectos estimulantes en la memoria, aprendizaje, modulación de la liberación de neurotransmisores, neurogénesis hipocampal adulta y plasticidad sináptica (Chen et al., 2011; Ziegler et al., 2015).

Por su papel en el proceso de desarrollo y el correcto funcionamiento del SNC, el IGF-II podría tener a su vez un papel clave, o al menos en parte, en el origen y desarrollo de distintas enfermedades neuropsiquiátricas y neurodegenerativas. Existen diversos estudios en los que se ha observado que la expresión de este factor estaba alterada en distintas enfermedades. Así, por ejemplo, enfermos de esquizofrenia que no recibían tratamiento alguno para la psicosis mostraban una concentración sérica de IGF-II disminuida en comparación a los controles sanos y a aquellos pacientes que sí eran tratados con antipsicóticos (Yang et al., 2020). Asimismo, diferentes análisis de cerebros *postmortem* de enfermos de EA han demostrado que los niveles de IGF-II están disminuidos con respecto a personas sanas en algunas zonas cerebrales (Rivera et al., 2005; Steen et al., 2005). En enfermos de EP se ha observado un descenso significativo de los niveles de IGF-II en plasma, junto con una desregulación de distintos componentes de las etapas iniciales del proceso de autofagia en comparación con personas sanas

(Sepúlveda et al., 2022). Por otra parte, un estudio muestra el descenso de los niveles de proteína IGF-II en el caudado putamen y en el plasma de pacientes con enfermedad de Huntington (García-Huerta et al., 2020).

Con relación a esto, diversos estudios, incluidos los de nuestro grupo de investigación, indican que el IGF-II muestra efectos neuroprotectores y antioxidantes frente al envejecimiento (Alberini, 2023; Castilla-Cortázar et al., 2011) y en algunas patologías (Fitzgerald et al., 2023; Martín-Montañez et al., 2014, 2017, 2021; Ouchi et al., 2013; Pardo et al., 2019; Steinmetz et al., 2018), por lo que puede constituir una diana para el desarrollo de futuras terapias.

7.2. La interacción IGF-II y rIGF-II: mecanismos de neuroprotección

Desde el descubrimiento del receptor rIGF-II, a lo largo de los años ha sido conocido principalmente por su participación en la captación y conducción hacia la degradación lisosomal de IGF-II, obviando otras posibles acciones. Sin embargo, actualmente las evidencias sugieren que la interacción IGF-II/rIGF-II participa en múltiples funciones de señalización (El-Shewy et al., 2006; McKinnon et al., 2001; Wang et al., 2017). Entre ellas se encuentran la regulación del aclaramiento/activación de ligandos extracelulares, el transporte intracelular de enzimas lisosomales, así como la activación de señales específicas de transducción a través de proteínas G; aunque éstas últimas son poco conocidas a nivel cerebral. Un ejemplo de los mecanismos celulares en los que participaría este complejo IGF-II/rIGF-II sería el reclutamiento y la activación de la enzima esfingosina quinasa (EK) en la membrana citoplasmática, produciendo esfingosina 1-fosfato (S1P) que es excretado al medio extracelular donde participa como ligando del receptor S1P acoplado a proteínas G (El-Shewy et al., 2011). A través de la transactivación dependiente de EK, IGF-II activa la vía ERK1/2 (quinasa regulada por señales extracelulares) de los receptores S1P acoplados a proteína G, una vía de señalización conocida por mediar la proliferación, la supervivencia y las respuestas angiogénicas (El-Shewy et al., 2011).

El estudio de los mecanismos que subyacen a la posible función neuroprotectora de IGF-II está aún en sus primeras fases, habiéndose descrito este efecto ante el estrés mediado por glucocorticoides (Martín-Montañez et al., 2014, 2017), en patologías

neurodegenerativas como la EA y la EP (Fitzgerald et al., 2023; Martín-Montañez et al., 2021) y en algunos desordenes neuropsiquiátricos como el autismo y la esquizofrenia (Ouchi et al., 2013; Pardo et al., 2019; Steinmetz et al., 2018).

Para su estudio, se considera clave el papel del receptor específico rIGF-II, el tipo celular donde se localiza y las áreas que muestran una mayor expresión. Así, en la EP, la existencia del rIGF-II en todas las áreas de lesión neuronal característica puede sugerir su participación en posibles efectos neuroprotectores. Esta enfermedad, junto con las condiciones normales y patológicas donde IGF-II ha mostrado su capacidad neuroprotectora y moduladora de la actividad sináptica comentadas (envejecimiento, EA, esquizofrenia, autismo y neurotoxicidad mediada por glucocorticoides), tienen algunos elementos etiopatogénicos comunes, como son, el estrés oxidativo, el daño de la función mitocondrial, y la desregulación sináptica (Beletskiy et al., 2021). En definitiva, el IGF-II, a través de su interacción con el rIGF-II, podría ejercer una función neuroprotectora y antioxidante en condiciones neurotóxicas y neurodegenerativas, como en la EP. Pero son necesarios estudios más extensos en modelos celulares y animales de esta enfermedad neurodegenerativa para conocer los mecanismos subyacentes que permitan desarrollar posibles nuevas vías de tratamientos en pacientes.

8. Modelos animales y celulares para el estudio de la etiología

Como ya se ha comentado, la EP es una enfermedad neurodegenerativa que cursa a lo largo del tiempo con síntomas motores y no motores distintivos. Estos signos están ocasionados principalmente por una pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas en la SN, facilitada por diversos factores de etiología muy variable (figura 10). En investigación los modelos celulares y animales buscan reproducir los principales signos patológicos de la enfermedad estudiada para estudiar los mecanismos fisiopatológicos y probar nuevas terapias.

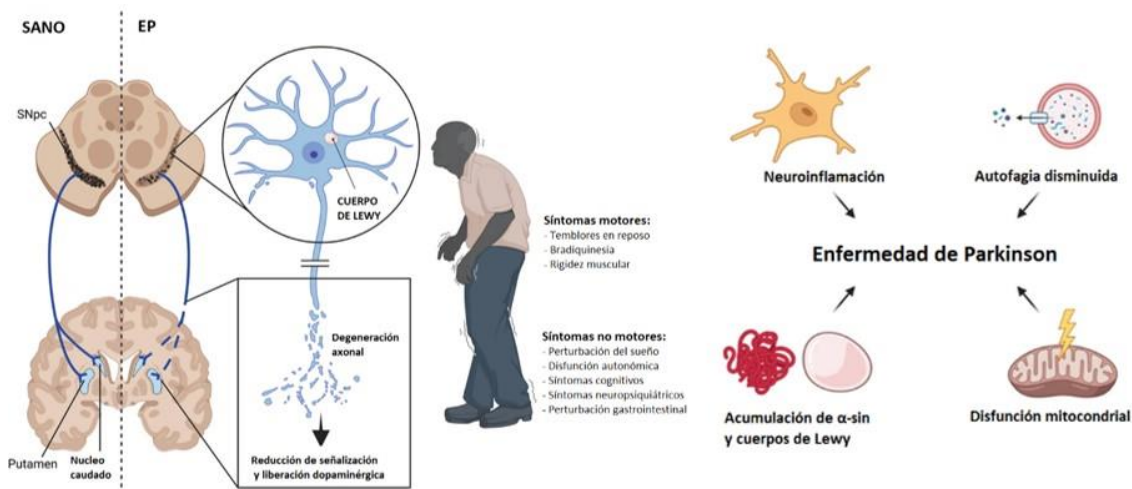


Figura 10. Características distintivas de la enfermedad de Parkinson (EP). Los síntomas motores predominantes de la EP surgen de la pérdida de neuronas dopaminérgicas (DAérgicas) en la sustancia negra pars compacta (SNpc) y de la denervación de sus axones en los núcleos caudado y el putamen, también llamados cuerpo estriado. La causa de la EP aún no está clara, pero implica pérdida de neuronas DA, agregación de α -sin, disfunción mitocondrial, alteraciones de la autofagia y neuroinflamación. Los pacientes con EP presentan además síntomas no motores. Imagen modificada de Dovonou et al., 2023.

8.1. Modelos celulares de EP

Los modelos celulares son una primera vía en el estudio de las enfermedades neurodegenerativas a nivel molecular. Asimismo, las preocupaciones éticas y morales del uso de animales de experimentación y en ocasiones el fracaso de la transferibilidad de los resultados en estos modelos animales a pacientes humanos, incitan al uso de modelos celulares con los que se puede realizar una detección preliminar de posibles fármacos terapéuticos para las enfermedades neurodegenerativas (Cetin et al., 2022). En este sentido existen diferentes tipos de modelos en el estudio de la EP, pudiendo encontrar modelos celulares basados en neurotoxinas (Bisbal & Sanchez, 2019), modelos basados en el uso de fibrillas preformadas de α -sin (Ross et al., 2020), modelos genéticos (Dawson et al., 2010), modelos derivados de células madre pluripotenciales (Takahashi & Yamanaka, 2006; Ferrari et al., 2020), y en los últimos años ya se han empezado a usar modelos de organoides 3D derivados de células madre pluripotenciales, en los que se permite la autoorganización de estas células en identidades discretas, formando en este

caso, un "cerebro humano" en desarrollo temprano (Lancaster & Knoblich, 2014; Pavoni et al., 2018).

Para este trabajo se ha elegido el modelo basado en el uso del metabolito tóxico 1-metil-4-fenilpiridina o MPP⁺, derivado de MPTP, en una línea celular inmortalizada de SN de ratón (SN4741), del que hablaremos en los siguientes apartados.

8.2. Modelos animales de EP

Aunque los modelos animales establecidos son incompletos ya que no manifiestan todos los signos y síntomas característicos de la enfermedad, siguen siendo utilizados para el estudio patológico y etiológico en la complejidad del cerebro, las vías involucradas en patologías cerebrales o para evaluar el impacto de posibles enfoques terapéuticos en un sistema más complejo que el celular. De manera general, los modelos animales de la EP se pueden clasificar según la metodología y los animales utilizados para la generación del modelo. De entre los animales, los modelos en roedores son los más utilizados ya que presentan muchas ventajas con respecto a otros animales: similitudes genéticas y fisiológicas con los humanos, la asequibilidad, vida útil relativamente corta, la firmeza de las tecnologías de modulación genética y la abundancia de referencias sobre la fisiología y el comportamiento (Ke et al., 2021). En base a la metodología para la inducción de la patología, se distinguen los siguientes modelos animales (figura 11):

- Modelos basados en la administración de fármacos: La administración de reserpina fue uno de los primeros modelos en utilizarse. Este fármaco inhibe el transportador de monoaminas tipo 2 (Vmat2), provocando en roedores disfunción motora y cognitiva. Otro fármaco usado es el haloperidol, un antipsicótico antagonista de los receptores postsinápticos dopaminérgicos tipo D2, que induce rigidez muscular y catalepsia, además de producir una deficiencia del complejo I de la CTE en corteza, hipocampo, estriado y mesencéfalo (Dovonou et al., 2023).

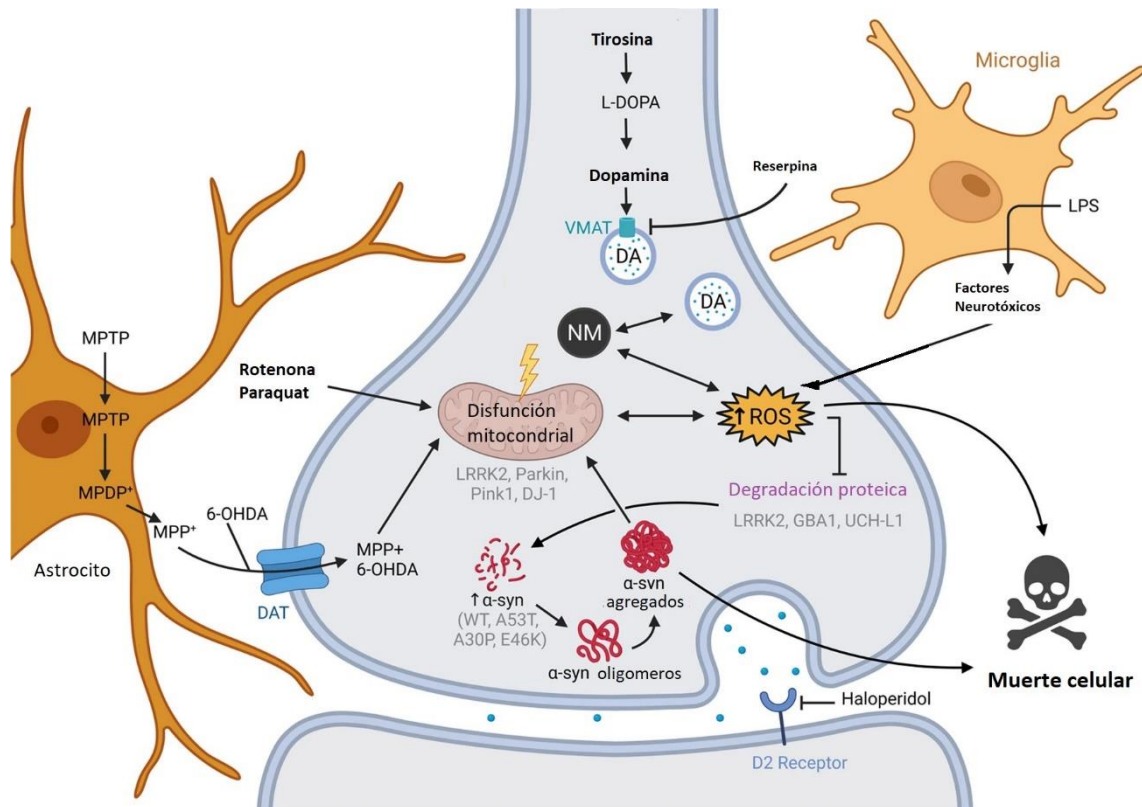


Figura 11. Esquema resumen de los mecanismos conocidos actualmente que desencadenan la muerte de la neurona dopaminérgica (DAérgica) mediante la acción de diferentes genes y compuestos utilizados para modelar la enfermedad de Parkinson (EP). La pérdida de neuronas DAérgicas podría deberse a una alteración del proceso de degradación de proteínas, disfunción mitocondrial, agregación de α -syn y neuroinflamación, que puede ser inducida por una alteración neurotóxica o genética. La reducción de la señalización de DA a través de la inhibición de fármacos también podría conducir a un fenotipo similar a la EP. Abreviaturas: DAT, transportador de dopamina; VMAT, transportador vesicular de monoamina; NM, neuromelanina; DA, dopamina; LPS, lipopolisacáridos. Imagen modificada de Dovonou et al., 2023.

- **Modelos basados en neurotoxinas:** Estos modelos han sido los más ampliamente utilizados a lo largo de los años. Entre ellos encontramos la 6-hidroxidopamina (6-OHDA) y el MPTP. Ambos inducen la disfunción mitocondrial, al afectar al complejo I de la CTE, generando ROS y disfunción mitocondrial. La 6-OHDA es incapaz de atravesar la barrera hematoencefálica por lo que es necesaria su administración mediante inyección intracraneal. Fornai y colaboradores descubrieron que la exposición continua a bajas dosis de MPTP en ratones

mediante inyección sistémica causaba la formación de cuerpos de inclusión en las neuronas de la SNpc (Fornai et al., 2005).

Recientemente se ha desarrollado un nuevo modelo en ratas que utiliza la exposición crónica al β -sitosterol y al β -D-glucósido para desencadenar parkinsonismo, aunque todavía está pendiente de replicación y validación. Estas neurotoxinas inducen pérdida neuronal en la SNpc, déficit olfativo, agregación α -sin y deterioro cognitivo tardío. La condición lenta y progresiva de este modelo lo hace ideal para la detección de posibles terapias neuroprotectoras para el tratamiento de la EP (Trigo-Damas et al., 2018).

- Modelos basados en la administración de agroquímicos: Paraquat y rotenona son los químicos más usados para la producción del modelo de EP. La rotenona induce daños en el complejo I de la CTE mitocondrial y además favorece la agregación de α -sin, provocando en ratones degeneración selectiva de las neuronas DA de la SN y la denervación axonal en el cuerpo estriado, acompañado de alteraciones motoras (Yuan et al., 2015).
- Modelos basados en agregados de α -sin: Oligómeros de α -sin en forma de protofibras o fibras conforman agregados insolubles y tóxicos para las neuronas. Como constituyente principal de los cuerpos de Lewy, estos agregados pueden alterar la integridad de la membrana celular, la funcionalidad de las mitocondrias, el aparato de Golgi y el retículo endoplasmático (Huang et al., 2019).
- Modelos basados en vectores virales: En animales también es posible sobreexpresar α -sin sin mutaciones (*wild type*, WT) o con mutaciones asociadas a la EP, incluidas las formas A53T y A30P, utilizando vectores lentivirales o virus adenoasociados (AAV). Estos vectores virales pueden transducir diversos tipos de células e impulsar la expresión de α -sin en distintas regiones de interés.

8.3. Modelo celular y animal inducido por la neurotoxina MPTP

Como se ha mencionado, el estrés oxidativo es considerado una de las principales causas de la muerte de neuronas DAérgicas s en la EP, células que tienen un gran requerimiento energético y son muy sensibles al desequilibrio redox. Por ello, en este trabajo para el estudio del papel del estrés oxidativo en la patogenia de la enfermedad, se ha utilizado

el modelo animal y celular de la EP inducido por la neurotoxina MPTP, que daña la mitocondria a nivel de la CTE, en el complejo I, favoreciendo una producción de ROS elevada y provocando finalmente la muerte neuronal (Guo et al., 2018).

Más concretamente, se usará el modelo celular mediante el empleo del metabolito tóxico MPP⁺, derivado del MPTP, en una línea celular inmortalizada de SN de ratón denominada SN4741. Esta línea celular se ha utilizado ampliamente en el estudio de la neurodegeneración y de diferentes dianas terapéuticas (Chang et al., 2019; Chen et al., 2021; Chun et al., 2001; Zeng et al., 2017). En el modelo animal, el mecanismo de acción del MPTP se explica en base a que es una molécula lipofílica capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, llegando al cerebro, donde puede ser oxidado hacia el metabolito tóxico 1-metil-4-fenilpiridina o MPP⁺ mediante la enzima monoamino oxidasa-B o MAO-B (Przedborski & Vila, 2003). En ambos modelos, el MPP⁺ ingresa rápidamente en las neuronas DAérgicas a través del transportador de dopamina o DAT (de sus siglas en inglés *dopamine transporter*), donde se une al Vmat y se transloca a vesículas sinaptosómicas, a las mitocondrias o permanece en el citosol. En las mitocondrias induce un descenso agudo en la formación de ATP y un aumento en la producción de ROS, mediante la unión al complejo I de la CTE (Dovonou et al., 2023). En respuesta a esta disfunción mitocondrial y agotamiento energético se liberan moléculas proapoptóticas dentro de la neurona, lo que finalmente conlleva a la muerte neuronal. De hecho, diversos estudios *postmortem* de pacientes de la EP muestran un déficit específico en la actividad del complejo I en la SN (Hattori et al., 1991; Schapira et al., 1990), y se ha descrito, que esta disfunción mitocondrial se da en otras áreas cerebrales (estriado y corteza) y en otros tejidos (plaquetas sanguíneas, músculo esquelético, fibroblastos y linfocitos) (Guo et al., 2018).

Además, la pérdida de neuronas DAérgicas en el modelo de ratón MPTP está asociada a una respuesta de células microgliales activadas y, en menor medida, por astrocitos reactivos (figura 11), lo que podría contribuir al proceso neurodegenerativo (Vila et al., 2001).

9. Tratamientos farmacológicos

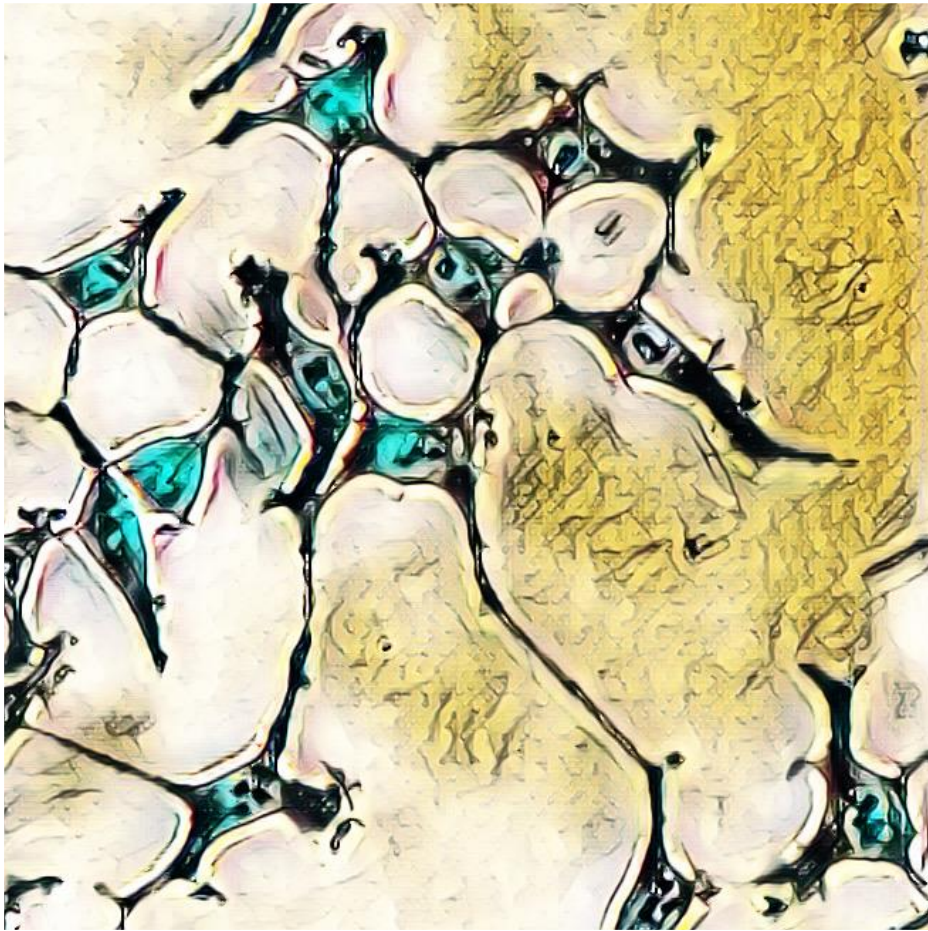
Actualmente, los tratamientos farmacológicos para tratar los síntomas motores de la EP se basan en la DA y su metabolismo (Armstrong & Okun, 2020). Principalmente se usan la levodopa, los agonistas dopaminérgicos (por ejemplo, apomorfina, ropinirol, o pramipexol) y los inhibidores de MAO-B (rasagilina y selegilina). En los casos de enfermos jóvenes con temblor prominente se suelen utilizar también los fármacos anticolinérgicos, aunque suelen inducir síntomas adversos, sobre todo relacionados con la actividad cognitiva. El tratamiento puede ir cambiando con la evolución de la enfermedad (Armstrong & Okun, 2020), pero inicialmente deben tenerse en cuenta los posibles efectos beneficiosos y adversos de los fármacos en el paciente a largo plazo: la levodopa es capaz de mejorar más eficazmente las condiciones motoras que otros fármacos, pero provoca mayor incidencia de discinesias (movimientos coreicos) y fluctuaciones motoras, particularmente a dosis altas; los inhibidores de la MAO-B y los agonistas de la dopamina se asocian con un alivio de los síntomas menos intenso, pero con un menor riesgo de discinesia; además, los agonistas dopaminérgicos pueden inducir trastornos del control de impulsos (adicciones conductuales) que merman la calidad de vida de los pacientes y su entorno social. Por tanto, lo que finalmente se busca es un tratamiento combinado, con el paciente obtenga los máximos beneficios posibles con el menor número de efectos adversos, con un alto control de la dosis de los fármacos (Armstrong & Okun, 2020).

Los tratamientos para la sintomatología no motora suelen ser similares a los utilizados en la población general (Armstrong & Okun, 2020). Así, la demencia puede tratarse con rivastigmina, donezepilo o galantamina, todos inhibidores de la acetilcolinesterasa para elevar los niveles del neurotransmisor acetilcolina en diversas regiones cerebrales. Los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina, los inhibidores de la recaptación de norepinefrina y los antidepresivos tricíclicos suelen ser útiles para tratar la depresión en la EP. En el caso de sintomatología de psicosis es necesario ajustar la dosis de los fármacos dopaminérgicos y acetilcolinérgicos si es posible, ya que estos pueden favorecer su aparición y si la psicosis persiste, se pasaría a tratar con pimavanserina, clozapina y quetiapina (Seppi et al., 2019). La fatiga, el insomnio, la somnolencia diurna y otros trastornos del sueño son habitualmente sintomatología incapacitante en la EP,

pero no existe un tratamiento farmacológico efectivo que palie estos efectos; normalmente se aconseja a los pacientes la toma de melatonina y si es necesario, clonazepam. Los problemas intestinales suelen tratarse con procinéticos y laxantes, y para el tratamiento de la disfunción sexual sildenafil suele ser útil (Armstrong & Okun, 2020).

Todos estos tratamientos mencionados se utilizan en la sintomatología de la EP, pues no existen en la actualidad fármacos que puedan frenar la evolución de la misma (Armstrong & Okun, 2020). Pero se están haciendo esfuerzos en la búsqueda de dianas terapéuticas; para ello, y de forma más importante, para la prevención de la enfermedad. En relación a esto, el estudio de moléculas antioxidantes con valor terapéutico para la EP es un desafío de la medicina traslacional (Duarte-Jurado et al., 2021), y puede ser una vía prometedora. Como se ha sugerido para la EA (Fitzgerald et al., 2023) el IGF-II podría ser una molécula candidata al tratamiento y prevención de la EP, pero son necesarios estudios celulares, moleculares y fisiológicos que lo determinen.

HIPOTESIS Y OBJETIVOS





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Debido a la alta prevalencia de las enfermedades neurodegenerativas en la población de avanzada edad, que se ha incrementado en la última década, es necesario el estudio de nuevas dianas terapéuticas para la consecución de fármacos capaces de mitigar o revertir los daños patológicos. En la EP, la neurodegeneración está asociada al deterioro funcional y pérdida de neuronas DAérgicas, principalmente en la SN. La disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo parecen ser una de las principales causas de este daño neuronal. Investigaciones recientes de nuestro grupo muestran al factor IGF-II como una nueva posible diana terapéutica, debido a su efecto neuroprotector frente a la neurodegeneración en diferentes patologías neuronales en las que el estrés oxidativo tiene un papel importante como principal factor etiopatogénico.

De acuerdo con esto, la presente tesis doctoral se centra en la valoración de los posibles efectos antioxidantes y neuroprotectores de IGF-II en la EP, estableciéndose como

objetivo principal:

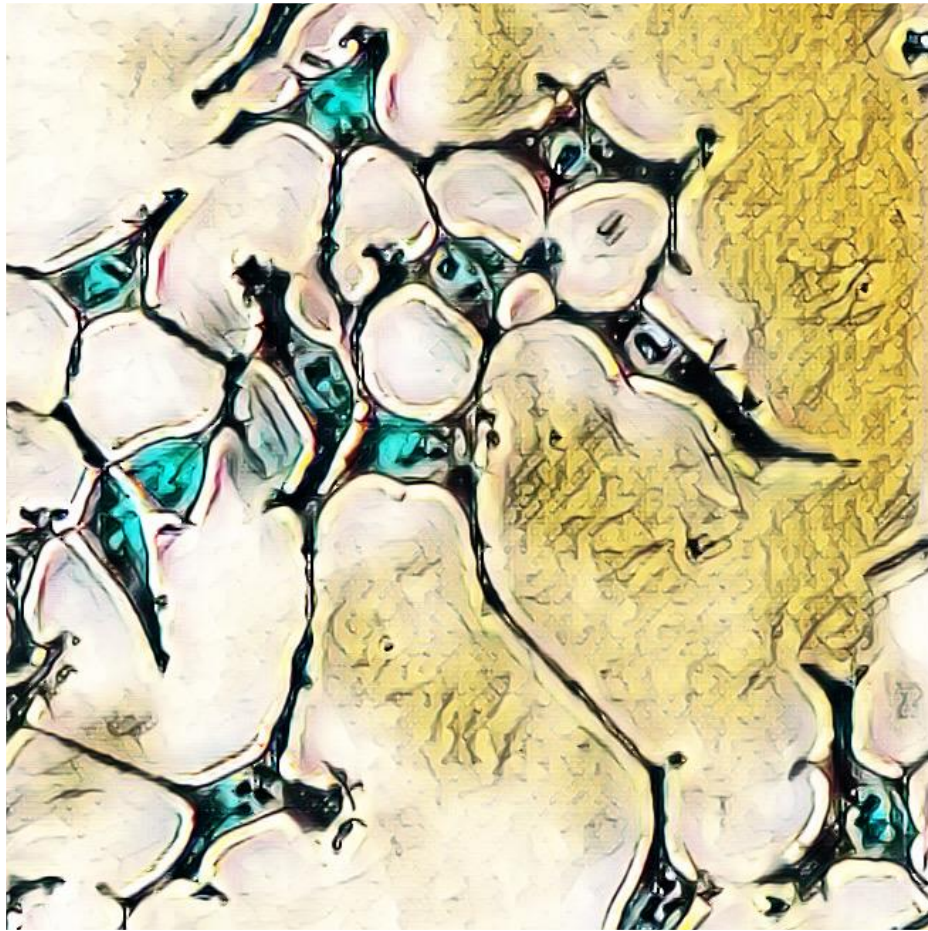
- El estudio del efecto de la administración de IGF-II en dos modelos, uno celular y otro animal, de la EP basados en la administración de la neurotoxina MPTP en ratón o su metabolito activo MPP⁺ en células neuronales de SN.

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

- Analizar el efecto del IGF-II sobre el daño inducido por MPP⁺ en neuronas DAérgicas respecto a neurodegeneración y la expresión de marcadores celulares asociados a la neurotransmisión de DA.
- Determinar el efecto del IGF-II sobre el daño inducido por la administración de MPP⁺, en neuronas DAérgicas, en relación al daño oxidativo-mitocondrial.
- Identificar vías de señalización intracelular implicadas en el efecto del IGF-II sobre el daño inducido por la administración de MPP⁺ en neuronas DAérgicas.
- Estudiar la implicación del receptor específico rIGF-II en el efecto de IGF-II en neuronas DAérgicas tratadas con MPP⁺.
- Desarrollo de un modelo murino de EP con neurodegeneración mediada por MPTP para estudiar el efecto del IGF-II *in vivo* sobre la neurodegeneración DAérgica.

- Evaluación de las vías de señalización implicadas en el efecto de IGF-II sobre el daño inducido por la administración de MPTP en el modelo animal de EP.

MATERIAL Y MÉTODOS





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1. Cultivo celular

1.1 Mantenimiento de la línea celular y caracterización de la expresión del receptor IGF-II

En este trabajo se ha utilizado la línea celular SN4741, proporcionada por el Profesor Ernest Arenas del Instituto Karolinska de Estocolmo (Suecia). Estas células SN4741 son neuronas dopaminérgicas derivadas de la sustancia negra de ratón (Son et al., 1999).

Para el mantenimiento de la línea y su crecimiento, se utilizaron frascos de cultivo de 75 cm² y el medio D-MEM con elevada concentración de glucosa (1M), suplementado con un 10% de suero fetal bobino, un 1% de Penicilina/Estreptomicina y L-glutamina a 4 mM (Life Technologies). Las células se mantuvieron en una estufa a 37°C y en una atmosfera con un 5% de CO₂. Cuando la confluencia celular rondaba el 90% (cada 3 días aproximadamente) se realizaba un cambio de soporte o pase, con el fin de evitar la senescencia asociada a situaciones prolongadas de alta densidad celular. Por el mismo motivo, los pases comprendidos entre el 3 y el 10 fueron los utilizados para la realización de los experimentos, evitando el envejecimiento del cultivo y posibles mutaciones que pudieran provocar una alta variabilidad en los resultados obtenidos.

Se comprobó que las neuronas de esta línea celular expresan el receptor de IGF-II mediante inmunomarcaje. La metodología se explica concisamente en el apartado 1.7.1. El anticuerpo primario utilizado fue anti-IGF-IIr (R&D System) a una concentración de 5 µg/mL y el anticuerpo secundario marcado con el fluorocromo Alexafluor™ 568 (Molecular Probes) se usó añadiendo 2 gotas/mL.

1.2. Cultivo experimental

Los soportes de cultivo y número de células utilizados fueron diferentes, dependiendo del protocolo a llevar a cabo en cada experimento. El recuento celular para la siembra se realizó mediante tinción con azul tripán (Life Technologies) al 0,4% y conteo en cámara de Neubauer. En las placas de 24, 12 y 6 pozos se sembraron 20.000, 100.000 y 200.000 células/pozo respectivamente. En todos los casos, los experimentos se llevaron a cabo

tras 24 horas de incubación desde la siembra (Tabla 1). En los ensayos de microscopía confocal, tinción de Giemsa, inmunocitoquímica y medida del consumo de oxígeno mitocondrial, las placas de cultivo se trataron con poli-D-lisina (Sigma-Aldrich) a una concentración de 100 µg/mL. La adición de este compuesto permite una mayor adhesión de las neuronas al soporte donde son sembradas, ya que produce una alteración en las cargas de éste, no estimula la actividad biológica celular y no introduce en el cultivo ningún tipo de impurezas.

Tabla 1. *Tabla esquema de la metodología de la siembra del cultivo de SN4741 para la realización de los diferentes ensayos.*

Tipo de placa	Área crecimiento (cm ²)	Células por pozo	Incubación pre-tto. (horas)
6 pozos	9,6	200.000	24
12 pozos	3,4	100.000	
24 pozos	2	20.000	



1.3. Tratamientos

La adición de las diferencias sustancias para los tratamientos se llevó a cabo en una solución Locke modificada (Tabla 2).

Tabla 2. *Composición de la solución Locke modificada, utilizada como medio para la aplicación de los tratamientos al cultivo neuronal.*

Compuesto	Concentración (mM)	pH final
Cloruro de sodio (NaCl)	137	7,4
Cloruro de calcio (CaCl ₂)	5	
Cloruro de potasio (KCl)	10	
Glucosa	25	
Hepes	10	
Penicilina/Estreptomina	100	
L-Glutamina	4	

En todos los experimentos las células fueron tratadas con MPP⁺ (nº Cas 36913-39-0, Sigma-Aldrich) a una concentración de 400 µM, IGF-II a 25 ng/mL (proporcionado por Lilly Laboratories [Madrid, Spain]), y/o BMS-536924 a 1 µM (nº Cas 468740-43-4, Tocris Bioscience) (figura 14). Este último fármaco inhibe la tirosina quinasa de los receptores rIGF-II y rIns, evitando con su uso que IGF-II actúe a través de ellos (figura 14A). Asimismo, con la intención de comprobar que los efectos de la acción de IGF-II están mediados por el rIGF-II, se empleó el anticuerpo AF-292 (20 ng/mL) (nº Cat. AF-292-NA, R&D Systems) para bloquearlo, ya que no existen antagonistas específicos hacia dicho receptor (Chen et al., 2011, Martin-Montañez et al., 2014, 2017), y se añadió al cultivo 20 minutos antes de proceder con los experimentos (figura 14A). Con la misma finalidad, en varios experimentos se usó el agonista específico LEU[27]-IGF-II (LEU) (GroPep, Adelaide, SA, Australia), que muestra una mayor afinidad por el receptor rIGF-II que por rIGF-I y rIns (Beukers et al., 1991), a una concentración de 10 nM (figura 14B). Además, se utilizó un inhibidor de NRF2, que bloquea la expresión del gen objetivo de NRF2, denominado ML-385 (Tocris) a una concentración de 5 µM con la finalidad de discernir si el posible efecto de IGF-II se veía modificado al inhibir esta vía antioxidante.

1.4. Determinación de las dosis de IGF-II y MPP⁺

El establecimiento de las dosis utilizadas en el cultivo celular se dedujo a partir del estudio de curvas de viabilidad celular con diferentes concentraciones de IGF-II y MPP⁺. Para ello, tras la administración de concentraciones crecientes de dichas moléculas, se determinó la muerte celular mediante la cuantificación de los niveles de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH, EC 1.1.1.27) en el medio de cultivo. Todos los tipos celulares presentan LDH citoplasmática, por cuya actividad el piruvato es reducido a lactato en presencia de dinucleótido de nicotinamida adenina reducido (NADH), que es oxidado a NAD⁺ (Koh & Choi, 1987). Cuando las células se lesionan, la gran mayoría libera esta enzima al espacio extracelular, por lo que experimental y clínicamente es un marcador útil de la muerte celular, cuantificada en el medio de cultivo (Pasquali-Ronchetti et al., 2006). Las concentraciones de IGF-II analizadas fueron: 1, 100, 1000 y 5000 ng/mL; y las de MPP⁺: 0, 100, 200, 400 y 800 µM. Tras los tratamientos, se recogió el sobrenadante libre de células de cada situación y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos. A

continuación, se procedió según las especificaciones del kit comercial espectrofotométrico (Randox Laboratories Ltd.), adaptando la metodología para la lectura en un autoanalizador Cobas Mira (ABX Diagnostics). Se determinaron los niveles de LDH en tanto por ciento con respecto al control para cada condición experimental, y con estos datos se realizaron las curvas logarítmicas de viabilidad.

1.5. Diseño experimental

Como ya se ha mencionado, inicialmente la siembra de las células se llevó a cabo en los soportes adecuados para cada determinación y los cultivos se mantuvieron durante 24 horas a 37°C. A continuación, los tratamientos farmacológicos combinando diferentes sustancias se aplicaron durante distintos intervalos de tiempo, según la finalidad de los experimentos: los efectos neuroprotectores de IGF-II a tiempo final se estudiaron incubaciones de 6 horas (figura 14A1); para el análisis de los mecanismos implicados con la homeostasis redox así como con la función neuronal, la duración de las incubaciones fue más corta, de 2,5 horas (figura 14A2, A3, A4).

1.6. Supervivencia neuronal

1.6.1. Muerte celular

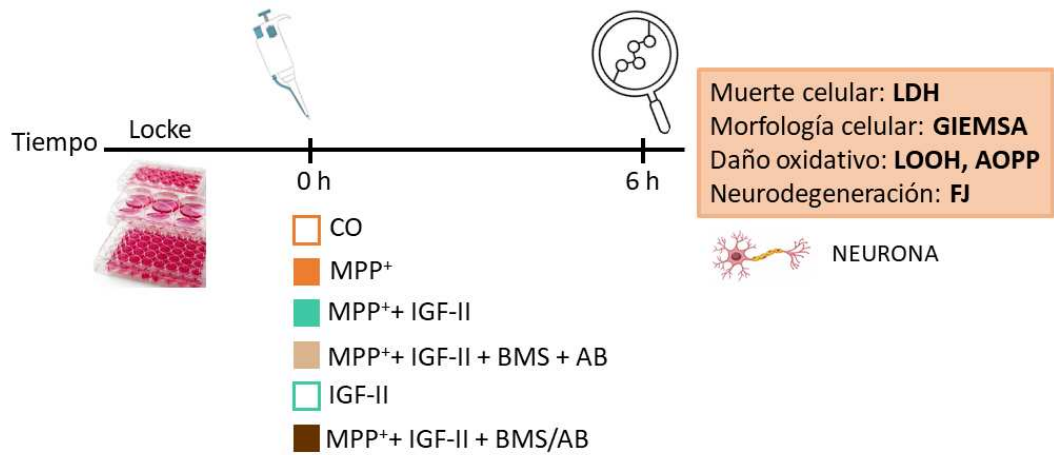
La muerte celular tras los tratamientos farmacológicos fue estudiada también mediante la cuantificación de los niveles de LDH en el medio de cultivo, siguiendo la metodología descrita en el apartado anterior 1.4.

En este caso, se determinaron y expresaron los datos como el tanto por ciento de LDH con respecto al control para cada condición experimental.

A(1)

Cultivo neuronal SN4741

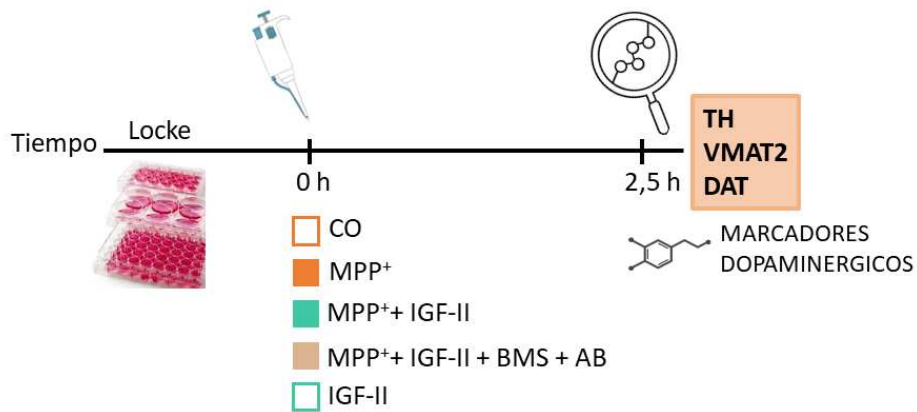
Efecto neuroprotector de IGF-II



A(2)

Cultivo neuronal SN4741

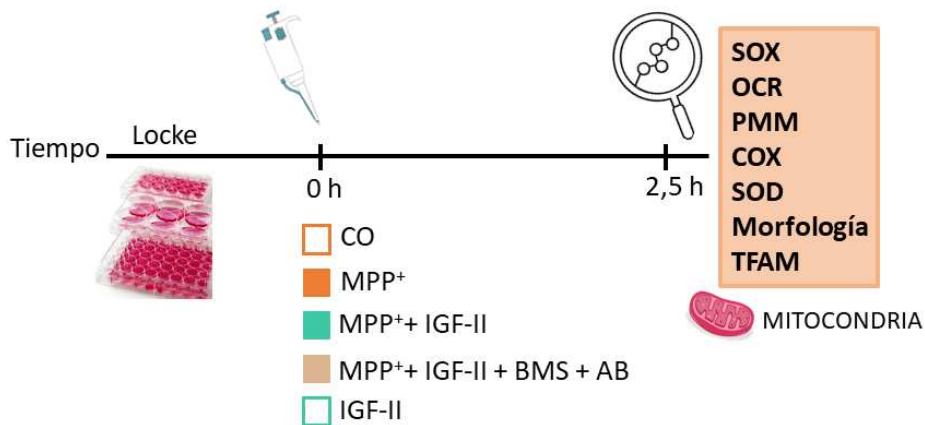
Efecto neuroprotector de IGF-II



A(3)

Cultivo neuronal SN4741

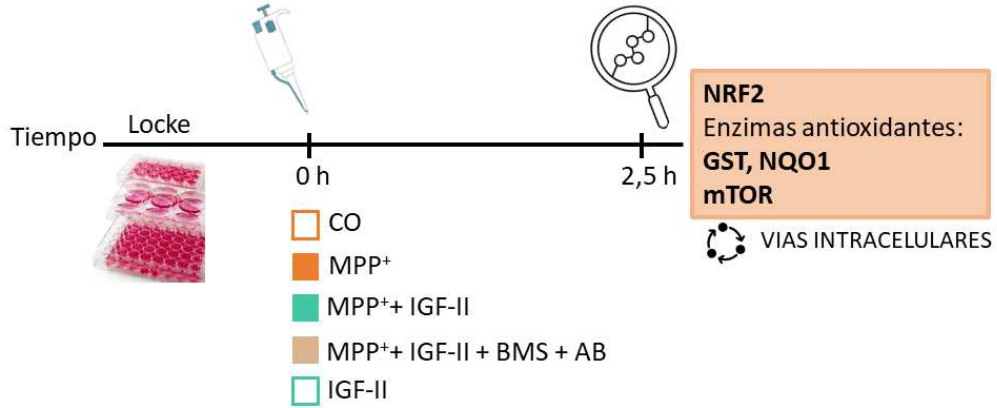
Efecto neuroprotector de IGF-II



A(4)

Cultivo neuronal SN4741

Efecto neuroprotector de IGF-II



B

Cultivo neuronal SN4741

Efecto neuroprotector de LEU[27] – IGF-II

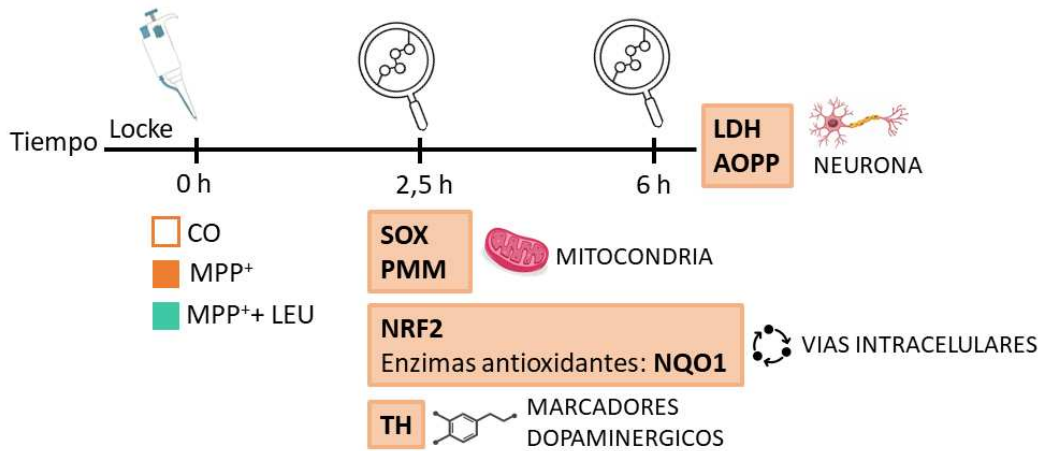


Figura 12. A, Diseño experimental del estudio del efecto neuroprotector del IGF-II: (1) en la supervivencia neuronal y homeostasis redox; (2) marcadores dopaminérgicos (3) función, integridad y homeostasis mitocondrial; (4) vías de señalización intracelulares. B, Diseño experimental del estudio para evaluar la implicación del rIGF-II en la actividad de IGF-II.

1.6.2. Morfología celular

Para el estudio de la morfología celular se llevó a cabo una tinción de Giemsa, con la que se pretendió detectar diferencias morfológicas en el núcleo, citoplasma y membrana celular entre las neuronas que fueron sometidas a los diferentes tratamientos. La siembra de las células se realizó sobre cubreobjetos redondos de cristal de 12 mm de diámetro, adaptados a cada pozo de placas de 12 pocillos. Para realizar la tinción, las células inicialmente fueron fijadas en los cubreobjetos con metanol absoluto e incubadas durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, cada cristal se lavó tres veces con agua destilada y se les añadió la solución de Giemsa (Merk) al 10%, dejándola actuar durante 10 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, con el fin de eliminar el exceso de colorante, se realizaron una serie de lavados con agua destilada, tras lo cual los cristales se dejaron secar al aire (figura 15).

Por último, se realizó el montaje sobre portaobjetos, por el que los cristales con las células se fijaron con una gota de DPX (Sigma-Aldrich). Las imágenes obtenidas se realizaron mediante microscopia de campo claro en un microscopio UHGLPS modelo BX53F (Olympus).

1.6.3. Neurodegeneración

La neurodegeneración fue determinada mediante el uso del fluorocromo Fluoro-Jade B™ (Merck-Millipore), capaz de marcar las neuronas que sufren cierta degeneración (Schmued & Hopkins, 2000). Después de los tratamientos, las células fueron fijadas en la placa con etanol absoluto (100%) frío durante 30 minutos. A continuación, las células se lavaron 3 veces con agua destilada y se tiñeron con el fluorocromo a una concentración

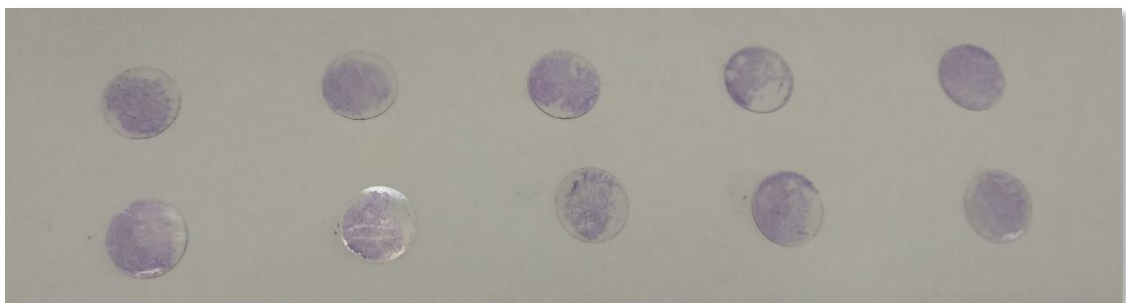


Figura 13: *Cubreobjetos con células SN4741 teñidas con solución de Giemsa (etapa de secado).*

final de 0,0004% (diluido en ácido acético al 0,1%). La tinción se realizó a temperatura ambiente, en oscuridad y en agitación durante 30 minutos. Para la cuantificación de la intensidad del marcaje obtenido, se empleó un espectrofotómetro FLUOstar Galaxy (BMG, Lab Technologies) con unas longitudes de onda de absorción/emisión de 485/530 nm (Schmuck & Kahl, 2009).

1.7. Marcadores dopaminérgicos

1.7.1. *Tirosina hidroxilasa y transportador vesicular de monoaminas 2*

La detección y análisis de los marcadores dopaminérgicos, enzima tirosina hidroxilasa (TH) y transportador Vmat2, se realizó mediante la técnica inmunocitoquímica en un mínimo de tres experimentos con 3 réplicas de cada condición farmacológica. Las células fueron sembradas sobre cubreobjetos tratados con poli-D- lisina y con un diámetro de 12 mm. Tras los tratamientos, los cultivos se lavaron 1 vez con la solución Locke y fueron fijados mediante la incubación en metanol absoluto (100%) enfriado a -20°C durante 20 minutos a esa misma temperatura. Después de dos lavados con PBS, los cubreobjetos donde se encontraban las células fueron incubados en cámara fría junto con el anticuerpo primario anti-TH (Sigma-Aldrich Ref.: ab152) a una concentración de 1/5.000 v/v y 1/1.000 v/v para anti-Vmat 2 (Abcam Ref.: ab259970), en una solución de PBS/BSA al 3% y azida de sodio al 0,02% a 4 °C durante la noche. Tras 3 lavados con PBS frío, se incubaron con el anticuerpo secundario marcado con el fluorocromo Alexafluor™ 568 (Molecular Probes, en el caso de TH) a una concentración de 2 gotas/mL y una excitación de 579 nm y emisión a 603 nm y Alexafluor™ 488 (Molecular Probes, en el caso de Vmat2) con una excitación y emisión de 493 y 518 nm respectivamente y una concentración de 2 gotas/mL; ambos diluidos en PBS y suero fetal bovino (BSA) al 3% durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Para analizar el marcaje individual en cada célula, se recurrió al marcador fluorescente DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, Sigma-Aldrich), el cual se une fuertemente al ADN, con una máxima absorción a 358 nm y emisión a 461 nm, y se incubó junto al anticuerpo secundario. Para finalizar, los cubreobjetos se lavaron 3 veces con PBS frío, montados sobre portaobjetos con Fluoromount™ (Sigma-Aldrich),

y sellados con laca de uñas transparente. Para la visualización de las muestras se usó un microscopio confocal LEICA SP5 II (Wetzlar). Las imágenes fueron procesadas con los paquetes informáticos LAS AF Lite (Leica) e ImageJ (US National Institute of Health; <http://rsbweb.nih.gov/ij/>). La señal de intensidad se cuantificó determinando el perfil de los objetos en la imagen (células), para poder fijar los píxeles que pertenecen al objeto y que deben ser tenidos en cuenta para la medida de la intensidad; para ello se realizó una segmentación, con la herramienta " *threshold*", y tras la selección de estos píxeles se procedió a cuantificar la intensidad de éstos sobre una imagen binaria que era copia de la original.

1.7.2. Actividad del transportador de dopamina

El estudio de la actividad del transportador DAT se llevó a cabo mediante el *Neurotransmitter Transporter Uptake Assay Kit* (Molecular Devices) (Jørgensen et al., 2008). Para ello, las células se sembraron en placas negras con fondo transparente de 24 pocillos, con una densidad de 100.000 células/pozo, en un mínimo de 3 experimentos con 3 réplicas para cada condición experimental. Tras la retirada de los tratamientos farmacológicos de cada condición experimental, se añadió la solución de sustrato fluorescente (primero reconstituida con 10 mL de Locke y posteriormente añadida a una dilución $\frac{1}{2}$ a cada pocillo). Este sustrato fluorescente mimetiza al neurotransmisor biogénico amino DA, por lo que al ser transportado por el DAT el fluorocromo se traslada al interior celular. Las células se incubaron durante 10 minutos a 37 °C con presencia de 5% CO₂, y a continuación se procedió a determinar la fluorescencia intracelular mediante un lector de fluorescencia en placas FL600 (Bio-tek), con los filtros de excitación/emisión 485/20 y 530/25 respectivamente. Las lecturas de fluorescencia se realizaron en intervalos de 2 minutos, hasta concluir a los 30 minutos. Para desestimar la captación inespecífica se determinó la actividad DAT en presencia de benztropina 10 µM, un inhibidor de la captación de la dopamina. Los resultados se expresaron como unidades de fluorescencia por minuto y por cada 10⁶ células.

1.8. Homeostasis redox

El daño causado por el estrés oxidativo se evaluó mediante la cuantificación del grado de peroxidación lipídica y de los niveles de productos de oxidación avanzada de proteínas (AOPP), como se explica a continuación.

1.7.1. Peroxidación lipídica

La degradación oxidativa de lípidos se ha determinado mediante la cuantificación de hidroperóxidos lipídicos (LOOH). Estos son considerados como marcadores de estrés oxidativo al ser moléculas intermediarias de reacciones de peroxidación inducidas por ROS de fosfolípidos, glicolípidos y colesterol (Girotti, 1998). Para la cuantificación se llevó a cabo el método FOX2 (Arab & Steghens, 2004) adaptado a un autoanalizador Cobas Mira (ABX Diagnostics). Se analizaron 25 μL de cada muestra (3 réplicas de cada condición experimental), a los que se añadió 180 μL de naranja de xilenol a una concentración de 167 μM . Antes de la lectura óptica a 600nm, se incorporaron 45 μL de d-gluconato de hierro II (833 μM). Los niveles de LOOH se calcularon en proporción a una curva estándar de peróxido de hidrógeno y se expresaron como nmol/mg de proteína (García-Fernández et al., 2008).

1.7.2. Productos de oxidación avanzada de proteínas o AOPP

La cuantificación de los niveles de AOPP se llevó a cabo adaptando el ensayo de Witko-Sarsat y colaboradores (Witko-Sarsat et al., 1996) al autoanalizador Cobas Mira (ABX Diagnostics). Para ello, se utilizaron 18 μL de homogeneizado de cada muestra y de soluciones estándar de cloramina T de concentraciones ascendentes entre 6,25 y 400 $\mu\text{mol/L}$ para realizar la curva patrón; siendo cada condición experimental replicada 3 veces en cada experimento. A continuación, se agregaron 200 μL de mezcla de reacción, con una composición de ácido acético al 15% y yoduro de potasio 1,16 mM al 4% en solución tampón fosfato salino (PBS). Para el blanco se utilizó PBS en lugar de muestra. La lectura de la absorbancia se realizó con un filtro de 340 nm. La determinación de la concentración de AOPP se obtuvo en base a los equivalentes de cloramina T obtenidos

medidos en nmol/L y expresada finalmente en nmol/mg de proteína celular (García-Fernández et al., 2008).

1.9. Estudio mitocondrial

1.9.1. Morfología mitocondrial

Tras los tratamientos farmacológicos, las células fueron recogidas y fijadas con un tampón específico para microscopía electrónica: glutaraldehído al 2,5% (Electron Microscopy Sciences), tampón de cacodilato 0,1 M (Thermo Scientific) y tetróxido de osmio al 1% (Agar Scientific). A continuación, se procedió a la deshidratación gradual de las células mediante series de etanol (al 30%, 50%, 70%, 95% y 100%). Finalmente, las células se incluyeron en Araldite (Electroforesis Serva) y se obtuvieron secciones de 70 nm de grosor. Las secciones fueron recogidas en rejillas de malla de cobre 150 y teñidas con UranylLess (Electron Microscopy Sciences), además de una tinción con citrato de plomo de Reynolds (Taverna, Boraldi, De Santis, Caprioli, & Quaglino, 2015). Las diferentes secciones se examinaron con un microscopio NOVA NanoSEM 450 (FEI) y las imágenes se obtuvieron con el modo STEM utilizando un detector de estado sólido con voltaje a 30 kV (Martín-Montañez et al., 2014, 2019). Las mitocondrias indexadas, 100 por cada condición experimental, fueron analizadas mediante el software ImageJ. Se tuvieron en cuenta 6 factores mitocondriales: 1) área de superficie (tamaño mitocondrial), 2) perímetro externo, 3) relación de aspecto [(eje mayor) / (eje menor)], 4) circularidad [$4\pi \cdot (\text{área}) / (\text{perímetro}^2)$], 5) redondez [$4 \cdot (\text{área}) / \pi \cdot (\text{eje mayor}^2)$] y 6) factor de forma [$(\text{perímetro}^2) / (4\pi \cdot \text{área de superficie})$].

1.9.2. Potencial de membrana

Para estimar el potencial de membrana mitocondrial se usó la sonda catiónica 5, 5', 6', 6'-tetracloro-1,1', 3, 3'-tetrametil bencimidazol carbocianina yoduro o JC-1 (Sigma-Aldrich). La JC-1 es una carbocianina lipofílica que se introduce en las mitocondrias de forma monomérica. En presencia de un potencial de membrana ($m\Delta\Psi$) alto, los monómeros

penetrarán en las células y las mitocondrias, formando agregados en ellas (de manera reversible) que, mediante la excitación a 488 nm, emiten fluorescencia en el canal naranja/rojo (FL2-590 nm). El colapso del $m\Delta\Psi$ provoca una disminución de la formación de agregados de JC-1, quedando como monómeros que emiten fluorescencia en el canal verde (FL1-525 nm). Así, cuando se produce una reducción del potencial de membrana, el número de agregados desciende, detectándose un incremento de la fluorescencia verde en detrimento de la roja. Por tanto, la proporción de fluorescencia roja/verde de JC-1 depende solo del potencial de membrana y no está influenciada por el tamaño, la forma o la densidad mitocondrial. Respecto al procedimiento, tras los tratamientos farmacológicos correspondientes, las células se incubaron en 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de JC-1 durante 20 minutos a 37°C. Como control interno se utilizó el ionóforo de potasio valinomicina (Sigma-Aldrich), que a una concentración de 1 μM colapsa completamente el $m\Delta\Psi$. Tras dos lavados con solución Locke, las células se separaron de las placas mediante el uso de acutasa (Life Technologies) y se analizaron inmediatamente utilizando filtros FL1 y FL2 en un citómetro de flujo Accuri™ C6 (BD biosciences). El ratio FL2/FL1 obtenido proporcionó la estimación más reproducible de $m\Delta\Psi$. Se registraron y evaluaron diez mil eventos (células) para cada condición experimental usando el paquete informático FCS Express 5 (De Novo Software).

1.9.3. Velocidad de consumo de oxígeno mitocondrial

La cuantificación del consumo de oxígeno mitocondrial (OCR) fue realizada mediante un analizador Seahorse Bioscience XF24 (Agilent). Esta metodología requiere que el cultivo se realice sobre unas placas específicas de 24 pocillos, en las que se sembraron 20.000 células por pozo 18 h antes del análisis, dejando desocupados 4 de ellos como pocillos de corrección de variaciones de temperatura, repartidos uniformemente por la placa (Martín-Montañez et al., 2019). Para cada condición experimental se analizaron 8 réplicas. Previamente al análisis, el medio de cultivo fue sustituido por 590 μL de Medio Base Agilent Seahorse XF sin rojo fenol. Tras un periodo de 15 minutos de calibrado, los tratamientos farmacológicos concentrados (x10) son depositados en cada pocillo por los inyectores del aparato; este aumento de la concentración es necesario para conseguir que los fármacos se encuentren a la dilución correcta en el medio de cultivo. A

continuación, el instrumento realiza 3 intervalos de medidas sucesivas, con una duración de 2 minutos cada una, de la concentración de oxígeno en cada pocillo. Durante los periodos sin mediciones de 3 minutos, se produce una fase de mezcla en el que la concentración de oxígeno y de H⁺ del medio se homogenizan. Para normalizar los resultados de OCR obtenidos, se procedió a la cuantificación de proteínas de cada pocillo mediante el método de Bradford, usando como patrón de concentraciones BSA (albumina de suero bovino) (Kielkopf et al., 2020).

1.9.4. Actividad de enzimas antioxidantes

La determinación de la actividad de las enzimas antioxidantes se llevó a cabo en un homegeneizado celular para cada condición experimental (3 réplicas de cada una) que se obtuvo siguiendo el siguiente protocolo: tras el tratamiento farmacológico y separación del soporte de cultivo con acutasa, se obtuvieron células en suspensión en una solución de pH 7,4 compuesta por HEPES 10 mM, KCl 10 mM, (Fisher Bioreagents) e inhibidores de proteasas y fosfatasa (Sigma-Aldrich), y se mantuvieron a 0°C durante 20 minutos. A continuación, se homogeneizaron en presencia de digitonina al 0,01% (Sigma-Aldrich) y se recogieron los sobrenadantes para las determinaciones, después de eliminar los restos celulares y los núcleos mediante una centrifugación a 15.000 g durante 30 minutos a una temperatura de 4°C. La cuantificación proteica se llevó a cabo mediante el método de Bradford. A continuación, se explican los procedimientos para la determinación de la actividad de diferentes enzimas antioxidantes.

1.9.4.1. Citocromo C Oxidasa

Para cuantificar la actividad de la enzima citocromo c oxidasa (COX, EC 1.9.3.1) se usó el kit de ensayo COX (Sigma-Aldrich), adaptado al analizador Cobas Mira (ABX Diagnostics), sobre los homegeneizados de células de cada condición experimental (3 réplicas de cada una). Este ensayo colorimétrico optimizado se basa en la disminución de la absorbancia (550 nm) debida a la oxidación del ferrocitocromo c a ferricitocromo c, proceso realizado por la COX. Para la expresión de los resultados se definió una unidad como la oxidación de 1,0 μmol de ferrocitocromo c por minuto a pH 7 y 37°C (García-Fernández et al., 2012).

1.9.4.2. Superóxido dismutasa

La actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD, EC 1.15.1.1) se determinó utilizando el kit comercial Ransod (Randox), adaptado al analizador Cobas Mira (ABX Diagnostics). Esta enzima es la responsable de catalizar la dismutación del anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) en oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). En humanos, se conocen 3 tipos de SOD según el metal que utilizan como cofactor y su localización: CuZn-SOD, tanto citosólica como extracelular, y Mn-SOD en mitocondrias. La actividad de SOD mitocondrial se diferenció de la actividad de Cu-Zn-SOD gracias a su sensibilidad por el cianuro de sodio (3 mM) (Pasquali-Ronchetti et al., 2006). En el ensayo se emplea xantina y xantina oxidasa (XOD) para generar radicales superóxido que reaccionan con cloruro de 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolio (INT) para formar un compuesto colorimétrico. La actividad de la SOD se estima mediante el grado de inhibición de esta reacción. Una unidad de SOD es aquella que provoca una inhibición del 50% de la tasa de reducción de INT en las condiciones del ensayo.

1.9.5. Producción de radical superóxido

La producción celular de radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) fue estimada mediante la cuantificación del indicador MitoSOX (Thermo Fisher Scientific). Este compuesto se dirige selectivamente a las mitocondrias y además se oxida rápidamente únicamente por superóxidos ($O_2^{\cdot-}$), y no por otros sistemas de especies reactivas de oxígeno (ROS) ni de especies reactivas de nitrógeno (RNS). El producto oxidado es altamente fluorescente con una absorción y emisión a 510 y 580 nm respectivamente. Por lo tanto, la intensidad de la fluorescencia emitida puede ser cuantificada mediante técnicas fluorimétricas, siendo ésta proporcional a la producción total del ion superóxido. Unos 30 minutos antes de terminar el tratamiento celular se añadió la sonda a una concentración de 2,5 μ M y se incubó junto a las células a 37°C. Tras la retirada del medio y un lavado con PBS se añadió acutasa y se recogieron las células para su análisis mediante citometría de flujo con Accuri™ C6 (BD biosciences) (Kauffman et al., 2016). Los datos obtenidos en 3 experimentos distintos se expresan mediante un histograma en el que se indica la

intensidad media de fluorescencia o producción del radical superóxido de cada tratamiento según el número de eventos (células) registrados.

1.9.6. Factor de transcripción mitocondrial A

Se comprobó la presencia y la localización del Factor de transcripción mitocondrial A (TFAM) en las neuronas SN4741 tras la administración de los tratamientos mediante procedimientos de inmunocitoquímica en un mínimo de tres experimentos con 3 réplicas de cada condición farmacológica, siguiendo el procedimiento anteriormente mencionado. Antes de terminar los tratamientos, las células se incubaron con la sonda MitoTracker® Deep Red FM (Molecular Probes) a una concentración de 200 nM durante 20 minutos a 37 °C. Esta sonda, con absorción/emisión de 644 nm/665 nm, se usó como marcaje mitocondrial debido a que ésta es retenida en la célula tras la fijación (por permeabilización). A continuación, se utilizó como anticuerpo primario, anti-mtTFA (Abcam Ref.: ab252432) a una concentración de 1/400 v/v y el anticuerpo secundario fluorescente Alexafluor™ 488 (Molecular Probes, 2 gotas/mL). Las fotografías se tomaron y procesaron del mismo modo a como se ha indicado anteriormente.

1.10. Vías de señalización intracelular

1.10.1. Factor nuclear eritroide 2

La cuantificación del factor nuclear eritroide 2 (NRF2) se realizó mediante una técnica inmunocitoquímica, con un procedimiento y réplicas experimentales similares a los citados anteriormente. Como anticuerpo primario se utilizó anti-NRF2 (Santa Cruz Biotechnology Ref.: SC-722) a una concentración de 1/50 v/v, diluido en una solución de PBS/BSA al 3%. El anticuerpo secundario fluorescente fue Alexafluor™ 488. Las fotografías se tomaron y procesaron de la misma forma que en los apartados anteriores.

1.10.2. Actividad de enzimas dependientes de NRF2

Las siguientes determinaciones se realizaron en un mínimo de 3 experimentos en 3 réplicas de homogeneizados de células de cada condición experimental obtenidos con el procedimiento anteriormente descrito en el apartado 1.8.4.

1.10.2.1. Actividad de la enzima glutatión S-transferasa

La glutatión S-transferasa (GST, EC2.5.1.18) es una enzima encargada de catalizar la conjugación de glutatión con diferentes xenobióticos, desempeñando un papel en la inactivación de radicales libres. Su actividad se determinó espectrofotométricamente mediante la modificación de la técnica descrita por Habig y colaboradores (1974). Brevemente, se cuantifica la formación del conjugado 2, 4-dinitrofenil-S-glutatión usando como sustratos GSH y 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB), midiendo a 340 nm en un analizador Cobas Mira (ABX Diagnostics). Una unidad internacional se definió como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 μmol de 2, 4-dinitrofenil-S-glutatión por minutos a 37°C utilizando una concentración de 1 mM de GSH y CDNB.

1.10.2.2. Actividad de la enzima NAD(P)H quinona deshidrogenasa 1

La NAD(P)H quinona oxidoreductasa 1 (NQO1, EC 1.6.99.2) una enzima antioxidante que cataliza la reducción de diversas quinonas hasta sus correspondientes hidroquinonas, usando como donantes de electrones tanto NADH como NADPH. Su actividad se analizó mediante la técnica descrita por Lind y colaboradores (1990). La mezcla de reacción con un volumen final de 200 μL contuvo, además del homogeneizado celular, Tris-HCl 25 mM (pH 7.5, Thermo Fisher Scientific), Tween 20 al 0.01% (Sigma-Aldrich), BSA 0.7 mg/mL (pH 7.4, Thermo Fisher Scientific), menadiona 40 μM (Sigma-Aldrich), FAD 5 μM y NADH 200 μM (Sigma-Aldrich). La reducción de niveles de absorbancia de NADH a 340 nm se cuantificó con medidas a intervalos de 25 s durante 10 minutos. Una unidad internacional de actividad enzimática se definió como la oxidación de 1 μmol de NADH a NAD por minuto a 37°C.

1.10.3. p-mTOR

El estudio de mTOR fosforilado se efectuó mediante técnica inmunocitoquímica con un protocolo similar al anteriormente citado en el apartado 1.7.1. El anticuerpo primario anti-phospho-mTOR (Ser2448) (Cell Signaling Ref.: 2976S) se incubó a una concentración de 1/1000 v/v. Asimismo los núcleos también fueron teñidos con DAPI, y las fotografías fueron tomadas y tratadas con la misma metodología que en el apartado 1.7.1.

2. Animales de experimentación

En el presente trabajo se han utilizado 35 ratones macho de la cepa C57BL/6J de 10 semanas de edad y con un peso corporal por individuo de entre 20 y 22 gramos. Estos animales fueron suministrados por Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, Francia) y se dividieron en grupos de 3-4 individuos en cada jaula de tamaño estándar.

Durante los experimentos, los ejemplares se mantuvieron bajo condiciones estándares de estabulación en el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Málaga, a temperatura ambiental de $20 \pm 2^\circ\text{C}$, humedad relativa del $40 \pm 5\%$, y sometidos a fotoperiodos de luz-oscuridad de 12 horas comenzando con el ciclo de luz a las 8 am. Tanto el alimento (estándar) como el agua se administraron *ad libitum* (dieta SAFE A04, Panlab, Barcelona).

El procedimiento experimental fue aprobado por el comité de ética de investigación de la Universidad de Málaga (CEUMA nº 10/06/2019/104), y se realizó conforme a la legislación española para el uso y cuidado de animales de experimentación (Real Decreto 53/2013, Ley 32/2007 y 9/2003, Real Decreto 178/2004 y Decreto 320/2010) y a las directivas europeas (Directiva 2010/63/UE).

2.1. Generación del modelo animal: tratamiento farmacológico

Para desarrollar el modelo animal de EP se empleó el compuesto MPTP (Sigma-Aldrich) combinado con Probenecid (p) (Sigma-Aldrich), antidiurético que inhibe la excreción

renal de aniones orgánicos como el MPTP, favoreciendo su concentración en el cuerpo y por lo tanto en el cerebro. Durante 5 semanas, se administró a los animales 24 mg/kg MPTP por vía subcutánea (s.c.) y 250 mg/Kg de Probenecid por vía intraperitoneal (i.p.), dos veces a la semana (separadas por 84 h) (Petroske et al., 2001). Esta combinación MPTP/p induce la pérdida crónica de DA estriatal durante al menos 6 meses después de la finalización del tratamiento, y una disminución del rendimiento en la prueba de comportamiento *rotarod*, como se describe más adelante, que está asociado a una pérdida gradual de neuronas DAérgicas en sustancia negra (Carvey, 2010). Los animales control se trataron con sustancias vehículo para reproducir el mismo tratamiento que los demás grupos experimentales, NaCl al 0,9% para la sustitución de MPTP y PBS pH 7.4 para la de Probenecid, siguiendo el mismo patrón de administración.

A continuación, se explica el diseño y tratamientos de los diferentes grupos de animales (figura 16):

- El grupo Control (**CO + veh; n=8**) fue tratado por vía s.c. e i.p. con los dos vehículos cada 84 h durante 35 días, además de PBS 0,1M (pH 7,4) por vía s.c. dos veces al día durante 44 días.

Modelo murino C57BL/6J
Efecto neuroprotector de IGF-II

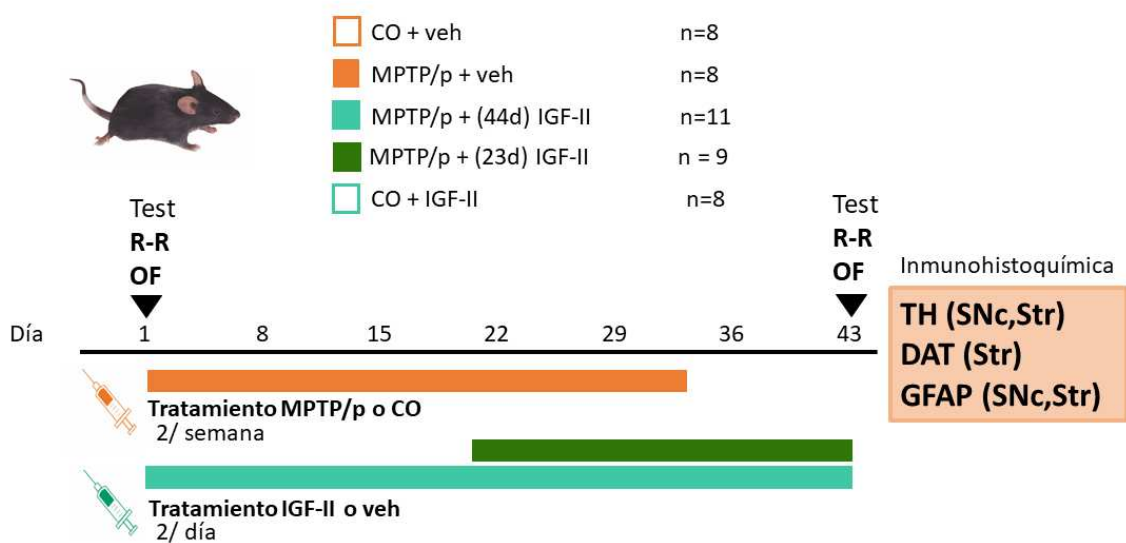


Figura 14. *Diseño experimental del modelo animal y los tratamientos farmacológicos administrados.*



- A los animales del grupo IGF-II (**CO + IGF-II; n=8**) se les coadministró por vía s.c. e i.p. los vehículos cada 84 h durante 35 días e IGF-II por vía s.c. 7.5 µg/kg, diluido en PBS 0.1 M pH 7.4, dos veces al día durante 44 días.
- Al grupo **MPTP/p + veh (n=8)** se le administró por vía s.c. e i.p. con MPTP/p 2 veces a la semana (cada 84 h) durante 35 días. Además, los animales fueron tratados con PBS 0.1 M pH 7.4 dos veces al día por vía s.c. durante 44 días.
- En los animales del grupo **MPTP/p +(44d) IGF-II (n=11)** la coadministración de MPTP/p se realizó dos veces a la semana como en los grupos anteriores, y además fueron tratados diariamente por vía s.c. con IGF-II. Este tratamiento también tuvo una duración de 44 días.
- Por último, al grupo **MPTP/p + (23d) IGF-II (n=9)** se le administró MPTP/p de manera idéntica a los grupos anteriores y los animales fueron tratados inicialmente con el vehículo PBS 0.1 M pH 7.4, hasta el día 22 (dos veces a la semana), y a partir del día 23 hasta el día 44 se les administró IGF-II diariamente por vía s.c.

Los animales fueron sacrificados y procesados tras las pruebas de comportamiento en el día 44. En la figura 16 se resume el diseño experimental realizado.

2.2. Estudios de comportamiento

Para valorar si el tratamiento con IGF-II recupera la disfunción conductual inducida por MPTP/p se usaron dos tipos de test comportamentales, valorando la actividad locomotora a través de la prueba de rendimiento en varilla giratoria o *rotarod* y la valoración de auto-aseo en el laberinto campo abierto o *self-grooming in the open field*. Ambos comportamientos dependen de la integridad de la vía DAérgica nigroestriatal. Estos test se llevaron a cabo en condiciones basales, es decir antes de que los sujetos recibieran los tratamientos, y una vez finalizados los mismos. Es importante señalar que ambas pruebas de comportamiento se llevaron a cabo diez días después de la última administración de MPTP/p y 12 h después de la última inyección de IGF-II, para evitar los posibles efectos agudos de los tratamientos.

2.2.1. Prueba de cilindro giratorio

Es una prueba estándar de coordinación motora, equilibrio y cansancio en roedores, y se evaluó utilizando el aparato rota-rod (R-R) (Panlab). El aparato R-R constaba de cuatro carriles idénticos con un ancho de 11 cm, que contenían una varilla giratoria (30 mm de diámetro) elevada 16 cm por encima del fondo del dispositivo (figura 17). Los ratones fueron colocados en una varilla, que estaba programada para girar a una velocidad creciente de 4 a 41 rpm durante 5 minutos, aumentando la velocidad 1 rpm cada ~ 7 segundos. Se registró el tiempo que los animales permanecieron en la barra en 3 ensayos consecutivos, tanto en condiciones basales (día 1) como después de los tratamientos (día 43). Que un animal pase menos tiempo en la varilla giratoria del normal sugiere un déficit de coordinación motora (Shiotsuki et al., 2010).

2.2.1. Prueba de auto-aseo en campo abierto

El comportamiento de los roedores para su aseo y cuidado personal, como lamer su cola o su cuerpo, lavarse la cabeza o rascarse el pelaje (*self-grooming*, en inglés), son acciones comportamentales que se han identificado como altamente dependientes de la vía nigroestriatal (Poeran, 2017). Esta tarea fue evaluada en el laberinto de campo abierto que consta de una arena cuadrada de 50 × 50 cm de dimensión rodeada por paredes opacas de 38 cm de altura (figura 18). Los ratones fueron sometidos a dos sesiones de

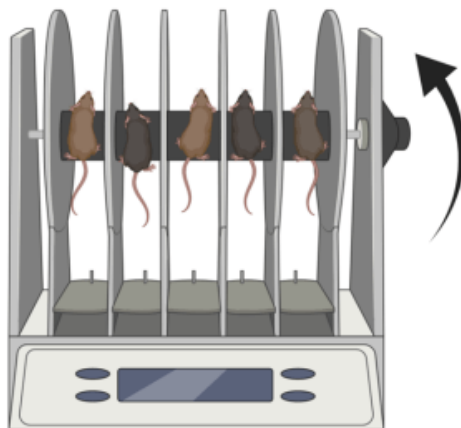


Figura 15. Dibujo representativo del funcionamiento del aparato rota-rod (R-R).

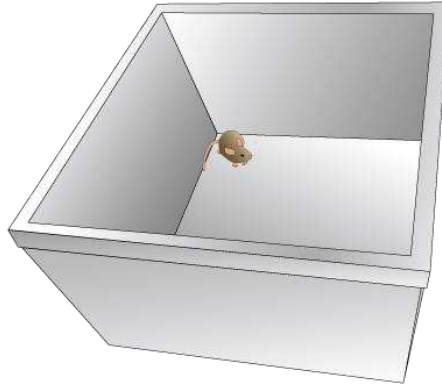


Figura 16. *Esquema representativo del laberinto campo abierto.*

5 minutos cada una, en las que se evaluó el auto-aseo basal (día 1) y post-tratamiento (día 43). Las sesiones se grabaron con una cámara digital, y las imágenes obtenidas se analizaron registrando el tiempo (segundos) utilizado por el animal para su aseo personal mediante el módulo de puntuación manual del software Ethovision XT9 (Noldus).

2.3. Procesamiento de los tejidos

Una vez finalizada la fase de pruebas de comportamiento, los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (200 mg/kg, i.p.) y perfundidos con paraformaldehído (PFA) al 4% tamponado en PBS 0,1 M (pH 7,4). El cerebro se extrajo con cuidado y se postfijó en PFA al 4% durante 48 h a 4°C. Posteriormente se obtuvieron secciones coronales de 50 μm seriadas 1/6 utilizando un vibratomo (MICROM), que fueron almacenadas en PBS junto con azida al 0,002% a 4°C.

2.4. Inmunohistoquímica

La técnica inmunohistoquímica en flotación se realizó siguiendo métodos previamente publicados (Ladrón de Guevara-Miranda et al., 2019). Se procesaron para el análisis 6 secciones de cada zona y animal. Éstas se incubaron 30 minutos en oscuridad en solución de bloqueo de peroxidasa endógena (80% PBS, 10% metanol y 10% H_2O_2), a continuación se incubaron durante la noche a 4°C en uno de los siguientes anticuerpos primarios: anti-

TH (monoclonal de ratón; Sigma-Aldrich) para detectar células DAérgicas TH⁺ en SNc (dilución 1:5.000) y la expresión de TH en el estriado dorsal (caudado-putamen, CPu; dilución 1:10.00); anti-DAT (policlonal de cabra; 1:1000; Santa Cruz Biotechnology) para detectar la expresión de DAT en CPu; anti-proteína ácida fibrilar glial (GFAP; policlonal de conejo; 1:1000; DakoCytomation) para marcar astrocitos tanto en SNc como en CPu. En el segundo día, el tejido se incubó durante 120 minutos en un anticuerpo secundario conjugado con biotina (cabra anti-ratón o conejo anti-cabra, diluido 1: 800; Dako) y durante 1 h en ExtraVidin® peroxidasa (1:1000 en PBS; Sigma-Aldrich) en la oscuridad. Los anticuerpos primarios y secundarios se diluyeron en PBS, Triton X-100 al 0,5% y suero de burro al 2,5%. La solución de revelado contuvo diaminobencidina (DAB; 5% en PBS y H₂O₂; Sigma-Aldrich) como cromógeno. Cada paso fue seguido de tres lavados con PBS a intervalos de 5 minutos. En el caso de las secciones de SNc inmunoteñidas con anti-TH, se realizó una contratinción adicional con galocianina-alumbre de cromo (2 h a 50°C) para facilitar la identificación de los núcleos de las células TH⁺.

El número total (N) de células TH⁺ en la SNc bilateral se determinó mediante estereología utilizando el fraccionador óptico en un microscopio Olympus BX53 equipado con una cámara Olympus DP73 (Olympus, Glostrup) y el software newCAST (Visiopharm). El recuento de células se realizó en una de cada seis secciones coronales representativas de SNc que se tomaron a intervalos uniformes (300 µm) que cubrían -2,70 mm a -3,80 mm en relación con Bregma. La cuantificación de los núcleos de células TH⁺ contrateñidos con galocianina se realizó con un aumento de 100x en aceite de inmersión utilizando un muestreo de meandro aleatorio y un disector óptico. Se contaron unas 100 células TH⁺ por animal con un marco de conteo de 1000 µm² y longitudes de paso de 80 µm × 80 µm (dx, dy; cubrió ~15% de la fracción de la región de interés [ROI]). El número total de células TH⁺ se calculó para cada animal siguiendo la fórmula:

$$N = \Sigma Q^{-} \frac{t}{h} \frac{1}{asf} \frac{1}{ssf}$$

donde ΣQ^{-} es el número total de partículas contadas, t es el espesor promedio de la sección, h es la altura del disector óptico, asf es la fracción de muestreo del área y ssf es la fracción de muestreo de la sección.

La expresión cuantitativa de TH y DAT en CPu bilateral se analizó mediante densitometría utilizando fotografías de alta resolución tomadas con un aumento de 10× y el software ImageJ. Se realizaron análisis densitométricos en una de cada seis secciones representativas de CPu que abarcaron de 1,34 mm a -0,22 mm con respecto a Bregma.

Las células GFAP⁺ se contaron en fotografías de alta resolución tomadas con un aumento de 10x utilizando una macro basada en la función "buscar máximos" del software ImageJ. Primero, se aislaron las ROI (SNc o CPu) y las imágenes se convirtieron a 8 bits. Se aplicaron filtros de desenfoque gaussiano (establecido en valor 2) y de mejora de contraste (saturación normalizada a 0). Posteriormente, se ejecutó el algoritmo 'buscar máximos' con la prominencia establecida en el valor 35, seleccionando un fondo claro y características de selección de puntos. El recuento de células se llevó a cabo en una de cada seis secciones representativas de SNc/CPu como se describe anteriormente. Los datos se expresaron como el número de células GFAP⁺ por unidad de área (mm²).

2.5. Concentración de MPP⁺ tisular

Para comprobar que el IGF-II no tenía interferencias con el metabolismo del MPTP, se cuantificaron los niveles de MPP⁺ en el CPu mediante cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS), según la metodología descrita anteriormente (Muñoz-Manchado et al., 2013). En primer lugar, se trataron ratones macho C57BL/6J (n=7) con IGF-II por vía s.c. (15 µg/kg en PBS 0,1 M) o con el vehículo (n=8). Veinte minutos después, a todos los ratones se les inyectó p (i.p.; 250 mg/kg en NaOH) y MPTP (s.c.; 30 mg / kg, diluido en NaCl al 0,9%). Dos horas después de la dosis de MPTP/p, los ratones fueron sacrificados, se extrajeron los cerebros y se diseccionó el estriado en una placa helada. El tejido obtenido se pesó y se almacenó a - 80°C hasta el análisis.

Para realizar la medición, se llevó a cabo una homogeneización del tejido del estriado en una solución 0,4 M de ácido perclórico (Merck) que contenía metabisulfito de sodio al 0,1% (p/v) (Panreac), L-cisteína al 0,1% (Merck) y EDTA al 0,01% (Merck). Como patrón interno se añadió a cada homogeneizado benzoilecgonina (BE)-d3 (0,04 µg/mL; Merck). A continuación, las muestras se sonicaron y centrifugaron a 14.000 g durante 20 minutos a 4°C. Las fracciones líquidas (sobrenadante) se recogieron y se inyectaron en el equipo

de LC (Alliance 2795 system, Waters). Tras la separación por cromatografía líquida de alto rendimiento con una columna Atlantis dC18 (Milford), el MPP⁺ se detectó con un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Quattro Micro™ API ESI equipado con spray Z (Waters). Los datos se adquirieron y fueron analizados con el software Masslynx y se expresaron como ng por mg de tejido húmedo. Los estándares de MPP⁺ se prepararon en soluciones de tejido estriado de ratones sin tratar y se utilizaron con fines de calibración.

3. Análisis estadístico

Las comparaciones de grupos múltiples se realizaron utilizando el análisis de varianza de una o dos vías (ANOVA) seguido de una prueba de comparación múltiple *post hoc* (Tukey's o Duncan's tests). La comparación entre dos grupos se realizó utilizando la prueba t de Student para datos no apareados. El análisis estadístico fue realizado utilizando los paquetes informáticos Statistica 8 (StatSoft Power Solutions Inc., Tulsa, OK), IBM SPSS 20 (IBM, Armonk, NY) y Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA). Las diferencias con un valor $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativas. Los datos se representan como media \pm SEM. En las leyendas de las figuras, se mostrará información detallada de los test estadísticos utilizados y los valores de p.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1. Papel protector de IGF-II en un modelo celular de EP

1.1. Las células DAérgicas de la línea SN4741 expresan el receptor de IGF-II

En primer lugar, se confirmó la expresión de rIGF-II en las células DAérgicas usadas, como se puede observar en la Figura 17.

1.2. Elección de la concentración de IGF-II y MPP⁺ para los tratamientos mediante la determinación de viabilidad celular

En función de los niveles de LDH liberados al medio, se determinó que la mínima concentración no tóxica de IGF-II fue 25 ng/ml (Figura 18). Para el MPP⁺, la concentración 400 μ M indujo unos niveles de LDH liberada al medio de cultivo unas 4 veces mayor con respecto a la concentración cero (100%) y redujo el porcentaje de células vivas al 55% aproximadamente (Figura 19).

Una vez determinadas las dosis de MPP⁺ e IGF-II a usar, se desarrollaron los diferentes estudios con tratamientos farmacológicos para determinar el efecto neuroprotector de IGF-II en un modelo celular de la EP (Figura 20).

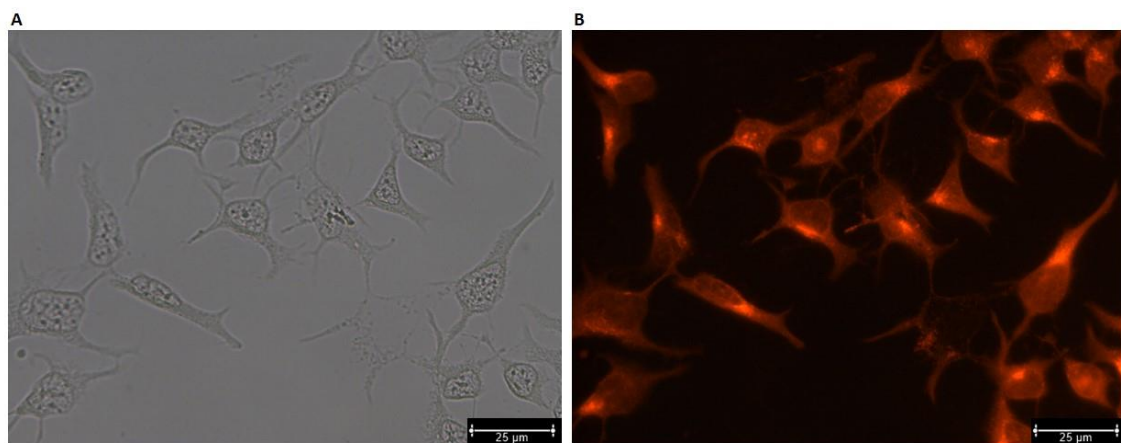


Figura 17. *Imágenes representativas de las neuronas dopaminérgicas de la línea celular SN4741 en campo claro (A, 40X) e inmunoteñidas para la detección del receptor de IGF-II (rIGF-II) (B, 40x).*

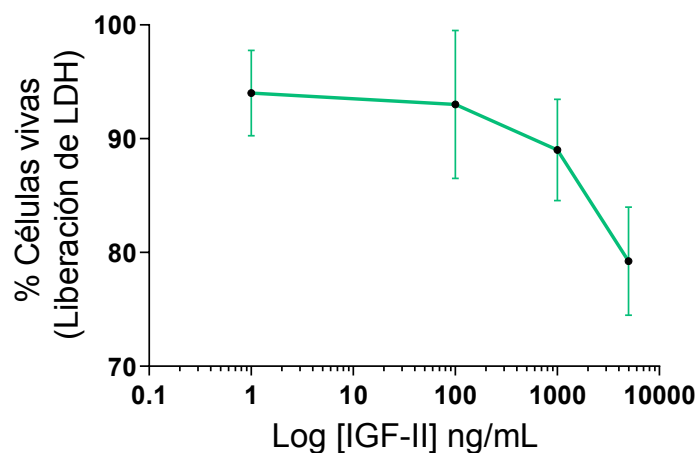


Figura 18. Efecto de IGF-II en la viabilidad celular de la línea SN4741. Determinación de la liberación de LDH al medio de cultivo, expresada mediante curva de viabilidad en tanto por ciento, tras 6h de incubación con concentraciones crecientes de IGF-II. Los datos se representan como media \pm SEM ($n = 6$ en cada grupo y 3 experimentos independientes).

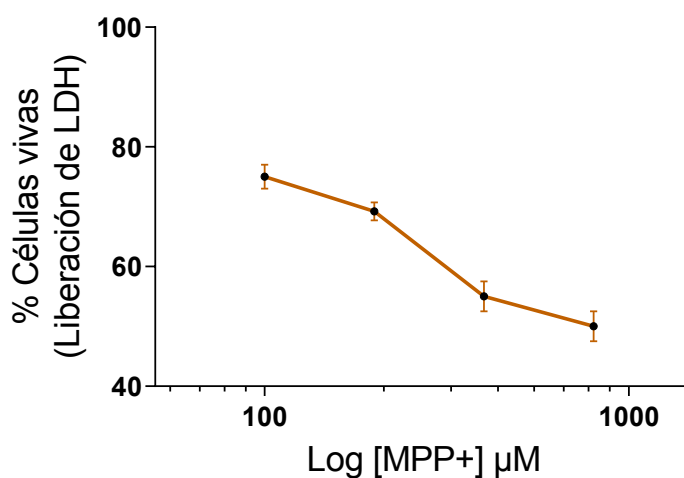


Figura 19. Efecto de MPP⁺ en la viabilidad celular de la línea SN4741. Determinación de la liberación de LDH al medio de cultivo, expresada mediante curva de viabilidad en tanto por ciento tras 6h de incubación con concentraciones crecientes del tóxico. Los datos se representan como media \pm SEM ($n = 6$ en cada grupo y 3 experimentos independientes).

Cultivo neuronal SN4741

Efecto neuroprotector de IGF-II

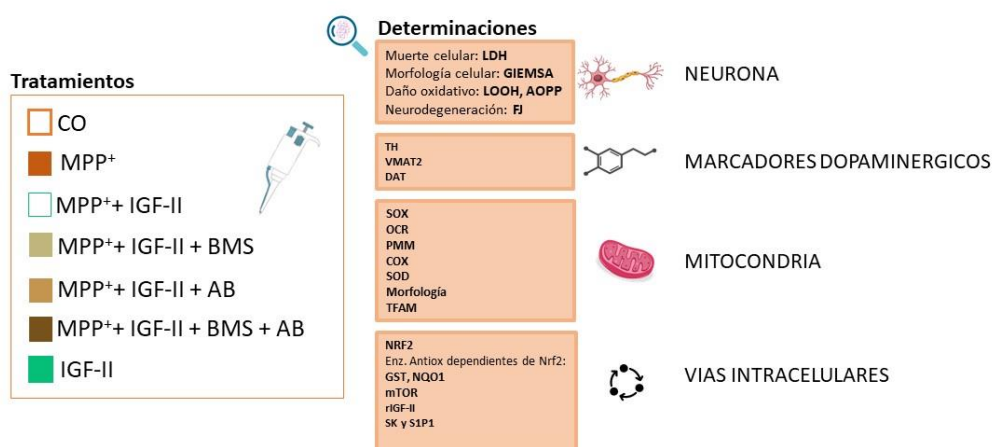


Figura 20. Esquema resumen de tratamientos y determinaciones realizadas para el estudio del efecto neuroprotector de IGF-II en un modelo celular de la EP.

1.3. Efectos sobre la supervivencia neuronal

1.3.1. EL IGF-II, a través del rIGF-II, reduce la muerte celular inducida por MPP⁺

La citotoxicidad fue determinada mediante la cuantificación de LDH liberada. Al coincubar MPP⁺ e IGF-II la liberación de LDH se redujo respecto a la incubación con solo MPP⁺, obteniéndose valores similares a los del grupo control ($P < 0,05$). Tras la incubación en presencia de BMS (inhibidor de los receptores rIGF-I e rInS) el efecto del IGF-II no se modificó; sin embargo, la presencia del anticuerpo frente al receptor específico rIGF-II (AB) provocó la anulación del efecto del IGF-II ($P < 0,05$) (Figura 21).

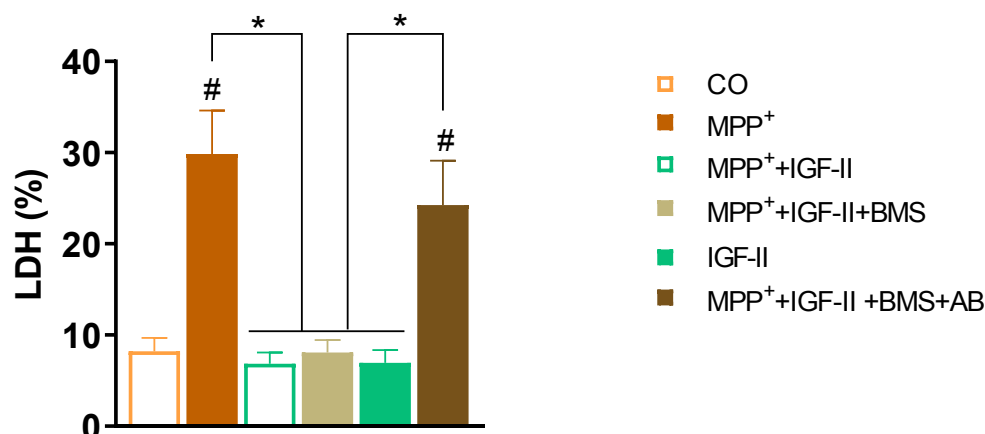


Figura 21. Cuantificación de la liberación de LDH en células control (CO) y tratadas con MPP⁺, MPP⁺+IGF-II, MPP⁺+IGF-II+BMS, IGF-II o MPP⁺+IGF-II+BMS+AB, expresada como porcentaje respecto al CO). Los datos se representan como media \pm SEM ($n = 6$ en cada grupo experimental, 3 experimentos independientes). ANOVA de una vía, seguido del test de Tukey de comparación múltiple. # $P < 0,05$ versus CO e IGF-II; * $P < 0.05$, versus grupos conectados con barras.

1.3.2. El IGF-II revierte los cambios morfológicos inducidos por el MPP⁺

El estudio morfológico celular se llevó a cabo mediante el análisis de las neuronas tras la tinción de Giemsa. Estos experimentos mostraron cambios objetivos en la morfología de las células tratadas con MPP⁺, observándose una gran heterogeneidad en tamaño y forma de las neuronas, con núcleos picnóticos condensados y reducidos. Asimismo, algunas neuronas mostraron afectación en la integridad de la membrana plasmática y de los apéndices neuronales, y así como un ligero aumento del volumen citoplasmático. Tras la coincubación con IGF-II, se observó una recuperación de la forma, el tamaño y las interconexiones neuronales, siendo la morfología celular similar a la del grupo control; características que se mantienen en el grupo tratado con BMS, pero no en el tratado con AB (Figura 22).

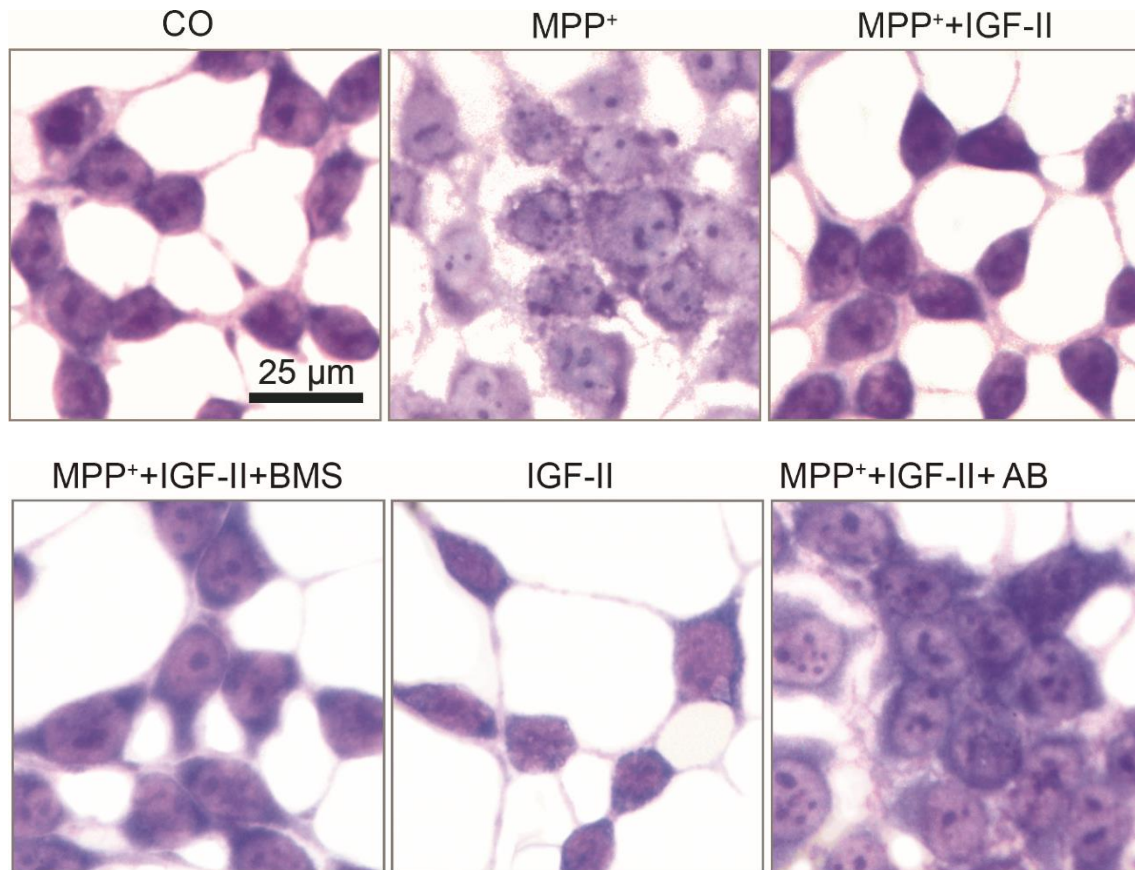


Figura 22. Imágenes representativas (40x) de células SN4741 marcadas con la tinción de Giemsa en las distintas condiciones experimentales: control (CO), MPP⁺, MPP⁺ + IGF-II, MPP⁺ + IGF-II + BMS (inhibidor de rIGF-I y rIns), IGF-II, MPP⁺ + IGF-II + AB (anticuerpo frente a rIGF-II).

1.3.3. El IGF-II reduce la neurodegeneración inducida por el MPP⁺

Mediante el marcaje con Fluoro-Jade B™ se determinó el grado de neurodegeneración. Se observó un incremento significativo de la fluorescencia (100%) en las neuronas tratadas con MPP⁺ respecto al grupo control ($P < 0.05$). La adición de IGF-II en el tratamiento, que no tuvo efecto por sí solo, restauró la intensidad a niveles similares al grupo control. Las células cotratadas incluyendo el BMS tampoco mostraron diferencias frente al grupo control (Figura 23).

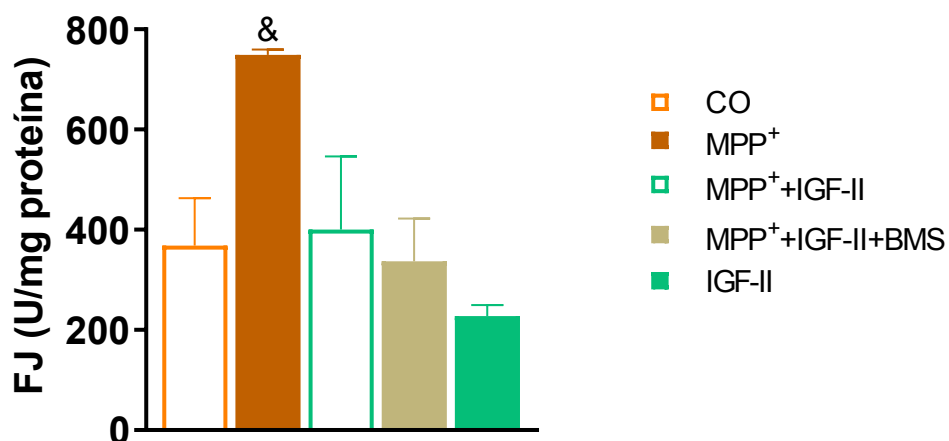


Figura 23. Determinación de la neurodegeneración mediante la cuantificación de la intensidad de marcaje celular con Fluoro-Jade B™ (FJ) en células control (CO) y tratadas con MPP⁺, MPP⁺ + IGF-II o MPP⁺ + IGF-II + BMS. Los datos se representan como media \pm SEM ($n = 6$ en cada grupo, 3 experimentos independientes). ANOVA de una vía seguido del test de Tukey de comparación múltiple. &P < 0,05 versus todos los grupos.

1.3.4. El IGF-II, a través del rIGF-II, reduce el daño oxidativo inducido por MPP⁺

Con la intención de evaluar el daño oxidativo se determinaron tanto los niveles de hidróxidos lipídicos como los de AOPP. Se observó un incremento de los niveles de ambos biomarcadores en las neuronas tratadas con MPP⁺; en el caso de LOOH en un 27% (Figura 24A) y un 32% para los AOPP (Figura 24B) con respecto al grupo control ($P < 0.05$). Tras la coincubación con IGF-II, las células mostraron niveles de LOOH y AOPP similares a los del grupo control. Sin embargo, la presencia del anticuerpo frente a rIGF-II bloqueó este efecto (Figura 24).

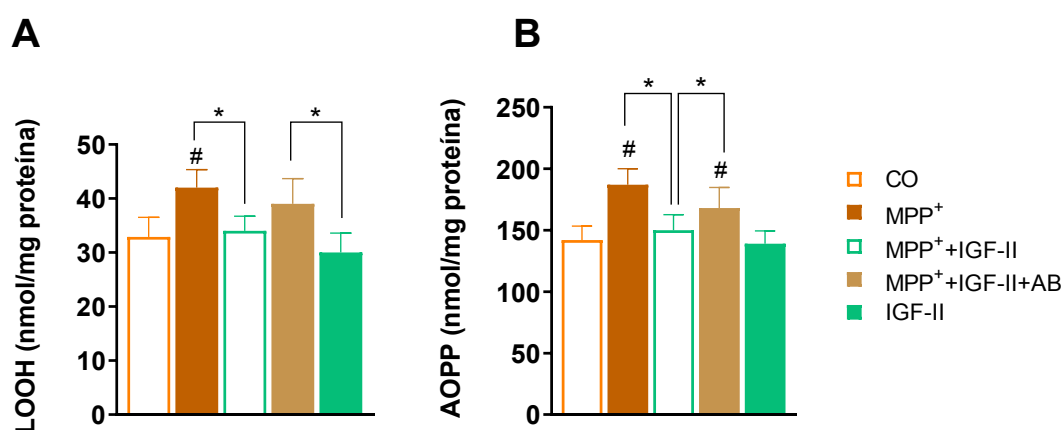


Figura 24. Determinación del daño oxidativo de lípidos evaluado como niveles de LOOH (**A**) y de la oxidación de proteínas evaluado como niveles de AOPP (**B**) en células control (CO) y tratadas con MPP⁺, MPP⁺+IGF-II o MPP⁺+IGF-II+AB. Los datos se representan como media \pm SEM ($n = 6$ en cada grupo, 3 experimentos independientes). ANOVA de una vía, seguido del test de Tukey de comparación múltiple. # $P < 0,05$ versus CO e IGF-II; * $P < 0,05$, versus grupos conectados con barras.

1.4. Efectos sobre marcadores dopaminérgicos

1.4.1. La reducción de la expresión de la enzima tirosina hidroxilasa y transportador vesicular 2 de monoaminas inducida por MPP⁺ es bloqueada por IGF-II mediante el receptor rIGF-II

La cuantificación del inmunomarcaje para TH reveló un importante declive de un 90% en su expresión en las neuronas incubadas con MPP⁺ respecto a las células control ($P < 0.05$) (Figuras 25 y 27A). Esta reducción fue bloqueada en un 70% por la presencia de IGF-II en el medio de cultivo. La inhibición de los receptores rIns y rIGF-I mediante BMS, no modificó el papel de IGF-II. Respecto a la expresión del Vmat2, se observó también un descenso en las neuronas tratadas con MPP⁺ del 36% respecto al control ($P < 0.05$) (Figuras 26 y 27B). La coincubación con MPP⁺ e IGF-II en el medio de cultivo redujo el descenso inducido por MPP⁺. En este caso, la adición de AB frente al rIGF-II en el medio de cultivo bloqueó la acción del IGF-II.

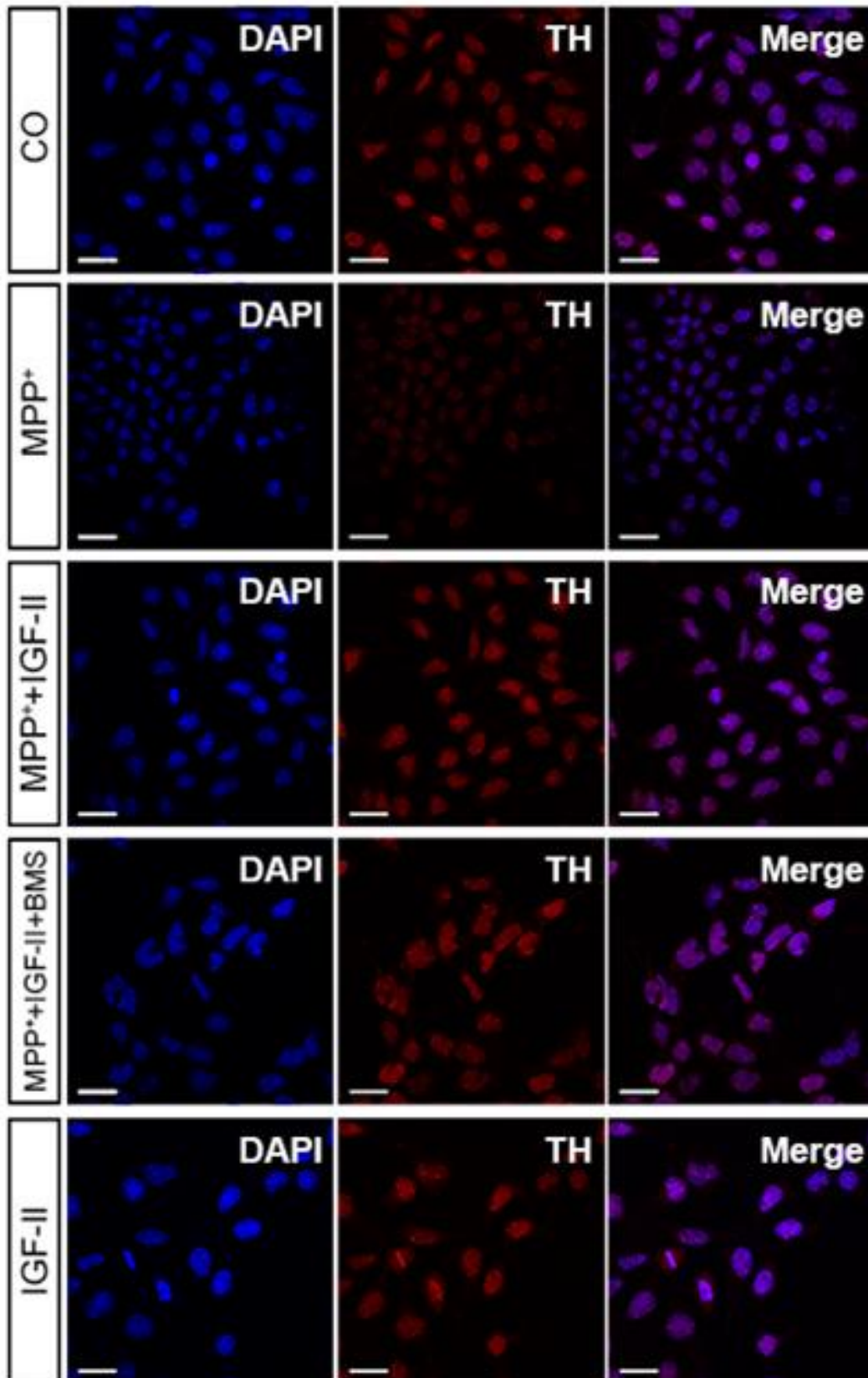


Figura 25. Imágenes representativas del marcaje fluorescente mediante inmunocitoquímica de tirosina hidroxilasa (TH; rojo) y Dapi (azul) en células control (CO) y tratadas con MPP⁺, MPP⁺ +IGF-II o MPP⁺ +IGF-II+BMS. Barra de escala: 25 μ m.

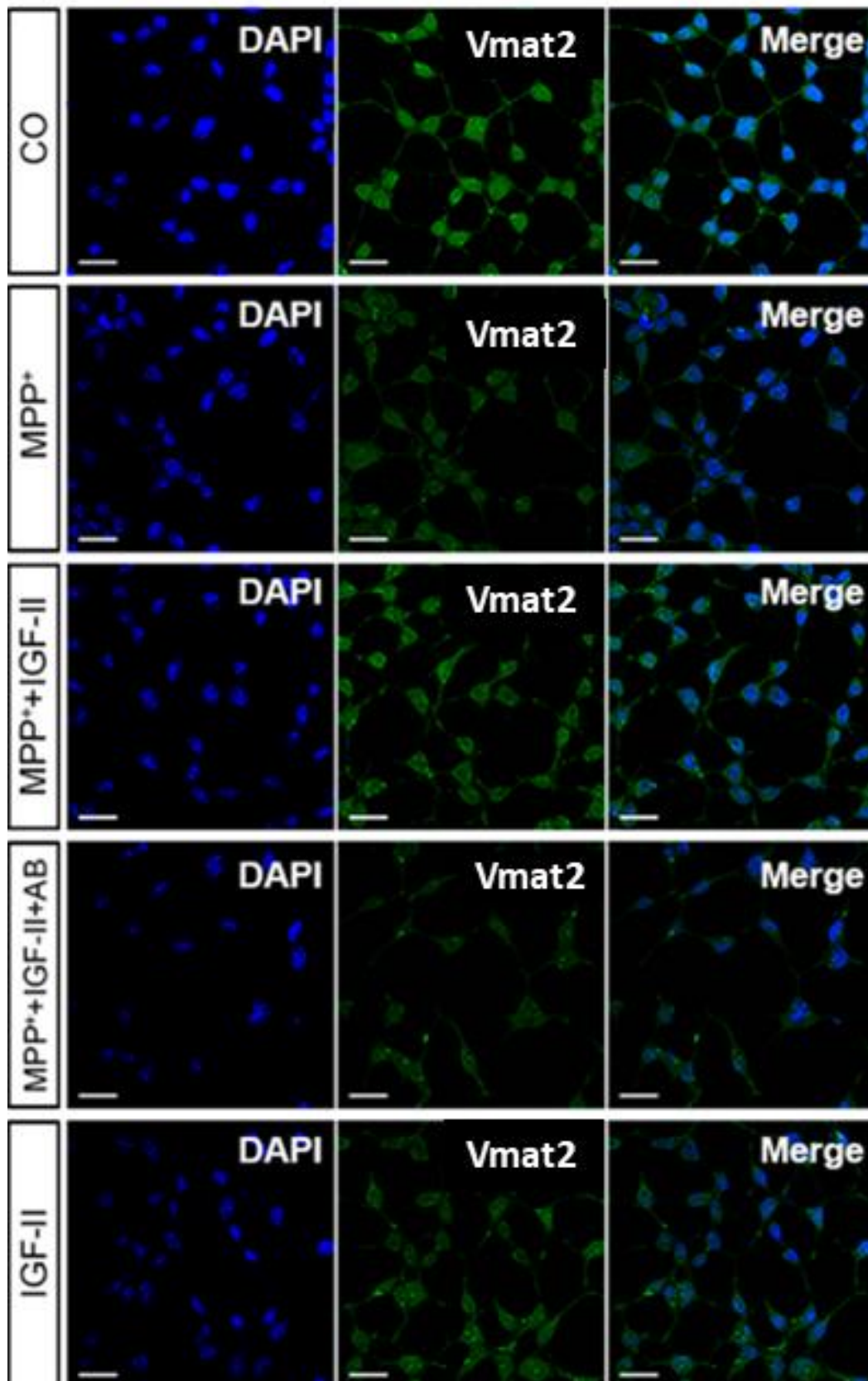


Figura 26. Imágenes representativas del marcaje fluorescente mediante inmunocitoquímica del transportador vesicular 2 de monoaminas (Vmat2; verde) y Dapi (azul) en células control (CO) y tratadas con MPP⁺, MPP⁺ +IGF-II o MPP⁺ +IGF-II+BMS. Barra de escala: 25 μ m.

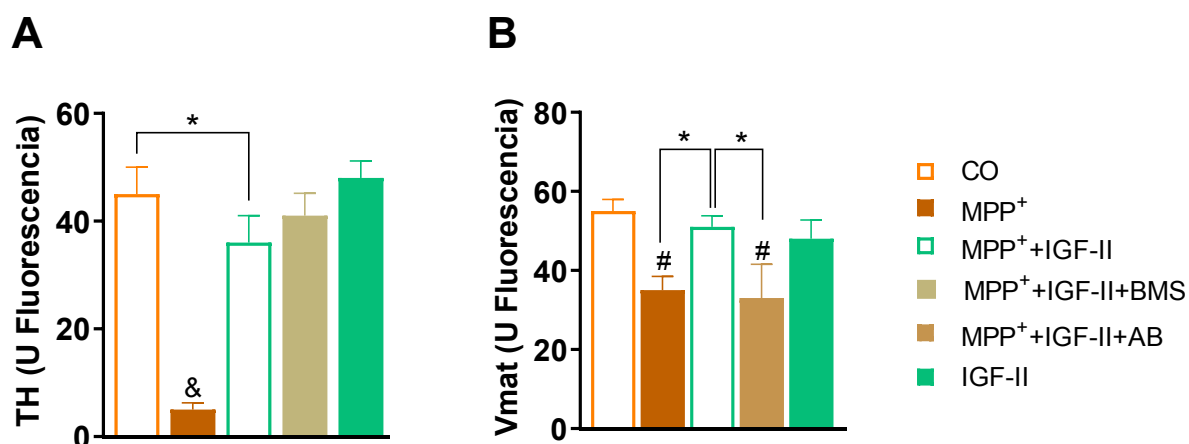


Figura 27. Cuantificación de los niveles de expresión de la enzima tirosina hidroxilasa (TH) **(A)** y del transportador vesicular 2 de monoaminas (Vmat) **(B)** en células control (CO) y tratadas con MPP⁺, MPP⁺+IGF-II, MPP⁺+IGF-II+BMS o MPP⁺+IGF-II+AB. Los datos se expresan como media \pm SEM ($n = 6$ en cada grupo y 3 experimentos independientes). ANOVA de una vía, seguido del test de Tukey de comparación múltiple. # $P < 0,05$ versus CO e IGF-II; & $P < 0,05$ versus todos los grupos; * $P < 0,05$ versus grupos conectados con barras.

1.4.2. El IGF-II bloqueó parcialmente el descenso de la actividad del transportador de dopamina inducido por MPP⁺, mediado por el receptor rIGF-II

El análisis fluorimétrico mostró que la actividad de DAT se vio completamente comprometida en las neuronas tratadas solo con MPP⁺ en el medio de cultivo. El cotratamiento con IGF-II bloqueó parcialmente el descenso de la actividad de forma significativa. La presencia del AB frente al rIGF-II en el medio de cultivo bloqueó específicamente el efecto del IGF-II (Figura 28).

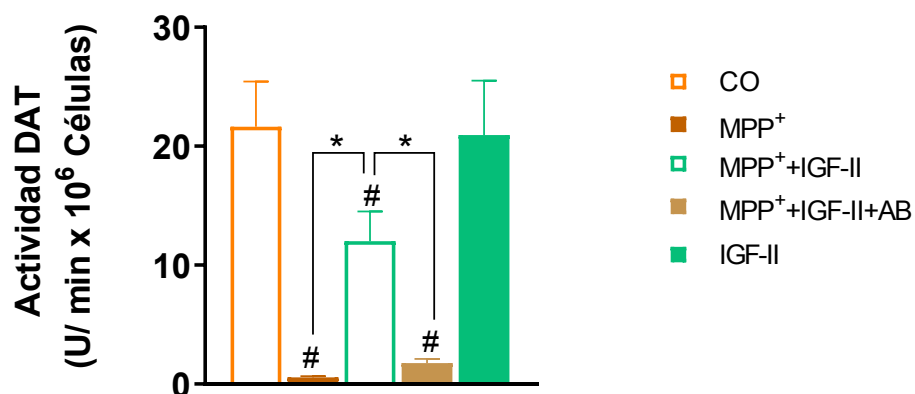


Figura 28. Cuantificación de la actividad del transportador de dopamina (DAT) en células control (CO) y tratadas con MPP⁺, MPP⁺ + IGF-II o MPP⁺ + IGF-II + AB. Los datos se expresan como unidades de fluorescencia por minuto y por cada 10⁶ células y se representan como media ± SEM (n = 6 en cada grupo y 3 experimentos independientes). ANOVA de una vía, seguido del test de Tukey de comparación múltiple. #P < 0,05 versus CO e IGF-II; *P < 0,05 versus grupos conectados con barras.

1.5. Efectos sobre las mitocondrias

1.5.1. El IGF-II previno los cambios en la morfología de las mitocondrias inducidos por MPP⁺

Las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica fueron analizadas con el fin de comparar el número y la morfología mitocondrial de las neuronas tras los diferentes tratamientos. De manera general, con respecto a las células control, se apreció un descenso del 16% en el número de mitocondrias por neurona en las tratadas con MPP⁺. Igualmente, estas células presentaron un aumento en el volumen mitocondrial, además de pérdida estructural, ya que acumulan daños en las crestas y en la matriz electrolúcida. Cuando el IGF-II estuvo presente junto al MPP⁺ en el medio de cultivo, las mitocondrias mostraron un aspecto redondeado o elíptico, sus membranas externa e interna no se encontraron afectadas y su número no se vio reducido respecto al control (Figura 29).

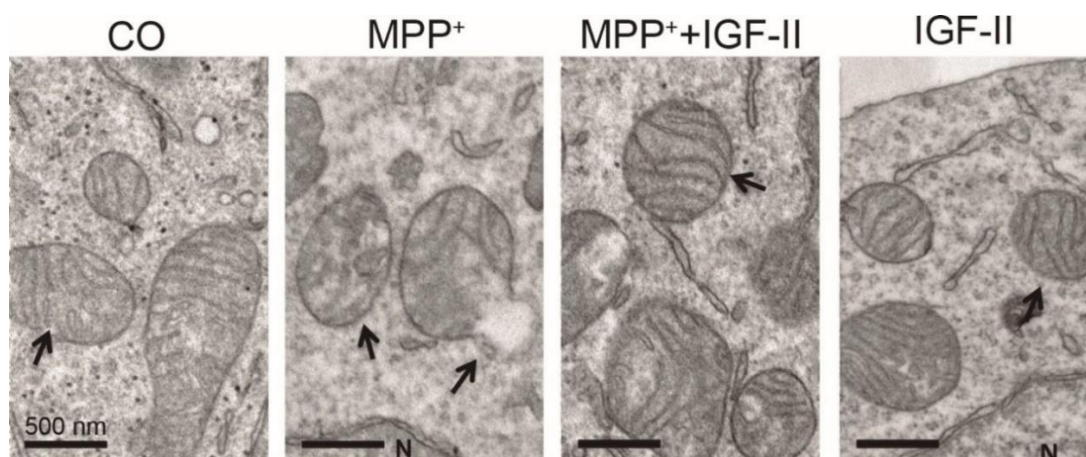


Figura 29. Estudios de la morfología mitocondrial. Imágenes de microscopía electrónica representativas para la visualización de mitocondrias de neuronas SN4741 en distintos grupos experimentales. Las flechas indican las mitocondrias sanas en los grupos control (CO), IGF-II y MPP+IGF-II y las dañadas en el grupo MPP+. Abreviaturas: N, núcleo.

1.5.2. El IGF-II bloqueó la reducción del potencial de membrana mitocondrial producido tras el tratamiento con MPP⁺

El estudio del $m\Delta\Psi$, mediante la cuantificación de la fluorescencia de la sonda JC-1, mostró una disminución del 48% del potencial en presencia de MPP⁺ en el medio de cultivo ($P < 0.05$). La coadministración con IGF-II produjo un valor del parámetro similar al obtenido para las células control. El bloqueo de rIns y rIGF-I con BMS no modificó el efecto protector de IGF-II (Figura 30).

1.5.3. La coadministración de MPP⁺ e IGF-II indujo una menor reducción de la velocidad de consumo de oxígeno mitocondrial que el tratamiento con MPP⁺

En la figura 31 se muestra el análisis, a lo largo del tiempo, de la velocidad OCR durante la incubación con los diferentes fármacos, solos o en combinación. Respecto a las células control, debido a la presencia del tóxico MPP⁺ y tras el transcurso de dos horas, la OCR se vio reducida en un 70% ($P < 0.05$). Sin embargo, a ese mismo punto temporal, el cotratamiento de MPP⁺ e IGF-II solo indujo un descenso significativo de OCR del 50% respecto al control ($P < 0.05$).

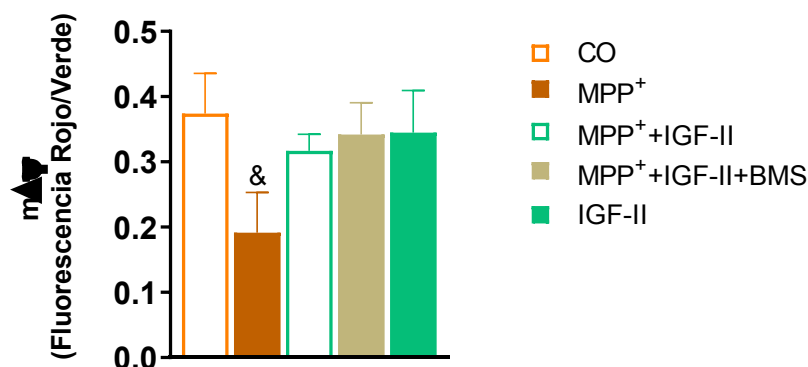


Figura 30. Potencial de membrana mitocondrial ($m\Delta\psi$) evaluado mediante la fluorescencia de la sonda JC1 en células control (CO) y tratadas con MPP⁺, MPP⁺ + IGF-II, MPP⁺ + IGF-II + BMS o IGF-II. Los datos se expresan como el cociente de fluorescencia entre el canal rojo y verde y se representan como media \pm SEM ($n = 6$ en cada grupo y 3 experimentos independientes). ANOVA de una vía, seguido del test de Tukey de comparación múltiple. &P < 0,05 versus todos los grupos.

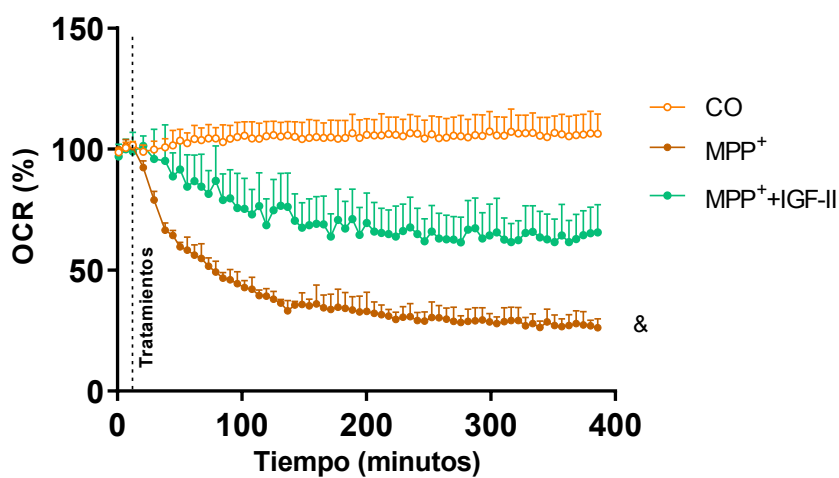


Figura 31. Evaluación de la velocidad de consumo de oxígeno mitocondrial (OCR) a lo largo del tiempo tras la adición de los tratamientos en células control (CO), MPP⁺, MPP⁺ + IGF-II. Los datos se expresan como % respecto al control y se representan como media \pm SEM ($n = 6$ en cada grupo y 3 experimentos independientes). ANOVA de una vía, seguido del test de Tukey de comparación múltiple. &P < 0,05 versus todos los grupos.

1.5.4. Efecto sobre enzimas antioxidantes mitocondriales

Se analizó el efecto de los diferentes tratamientos sobre la actividad de las enzimas antioxidantes mitocondriales COX y SOD.

1.5.4.1. El IGF-II, a través del rIGF-II, bloquea la reducción de la actividad de la enzima mitocondrial COX inducida por MPP⁺

La actividad de la enzima COX mitocondrial se redujo en un 68% tras la incubación con MPP⁺ respecto al grupo control (P < 0.05). En el caso de la coincubación de MPP⁺ con IGF-II, la actividad de la enzima es similar a la del grupo control. Este efecto fue bloqueado parcialmente por la presencia del anticuerpo específico de rIGF-II (Figura 32).

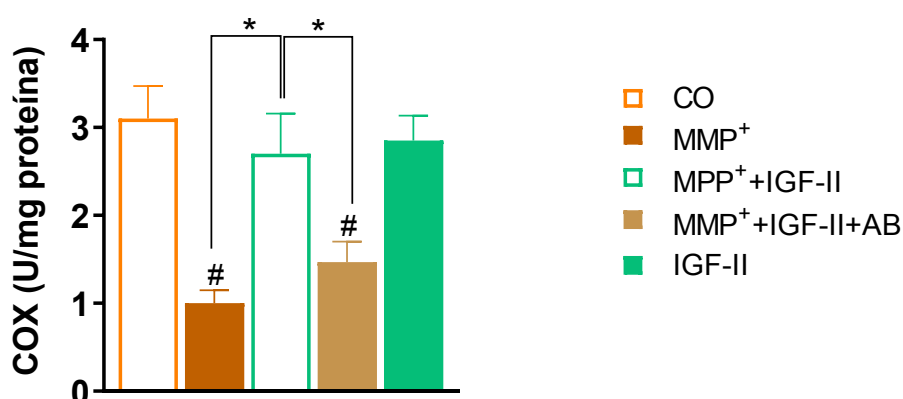


Figura 32. Evaluación de la actividad de la enzima COX en células control (CO) y tratadas con MPP⁺, MPP⁺ + IGF-II, MPP⁺ + IGF-II + AB o IGF-II. Los datos se expresan en unidades (U), siendo una unidad la oxidación de 1 μ mol de ferrocitocromo c por minuto a pH 7 y 37°C; y se representan como media \pm SEM (n = 6 en cada grupo y 3 experimentos independientes). ANOVA de una vía, seguido del test de Tukey de comparación múltiple. #P < 0,05 versus CO e IGF-II; *P < 0.05 versus grupos conectados con barras.

1.5.4.2. El IGF-II bloquea, mediante su unión al rIGF-II, la reducción de la actividad de la enzima mitocondrial SOD inducida por MPP⁺

Respecto a la SOD mitocondrial, se observó un aumento de actividad (cercano al 150%) de esta enzima en las células tratadas con MPP⁺ en comparación con las neuronas control ($P < 0,05$). La adición de IGF-II al medio de cultivo junto a MPP⁺ bloqueó este incremento, ya que los niveles de actividad medidos en esta condición experimental fueron similares a los del grupo control. Por otro lado, el uso del anticuerpo frente a rIGF-II impidió parcialmente el efecto de IGF-II (Figura 33).

1.5.5. El IGF-II revierte el incremento de producción de ROS causado por el tratamiento con MPP⁺

El análisis de los datos del marcaje con MitoSOX mostró que el tratamiento con MPP⁺ aumentó la generación de ROS mitocondrial respecto al grupo control (figura 36). Estos niveles de ROS se normalizaron en presencia de IGF-II e igualmente, se mantuvieron normales cuando se añadió BMS al medio de cultivo (Figura 34).

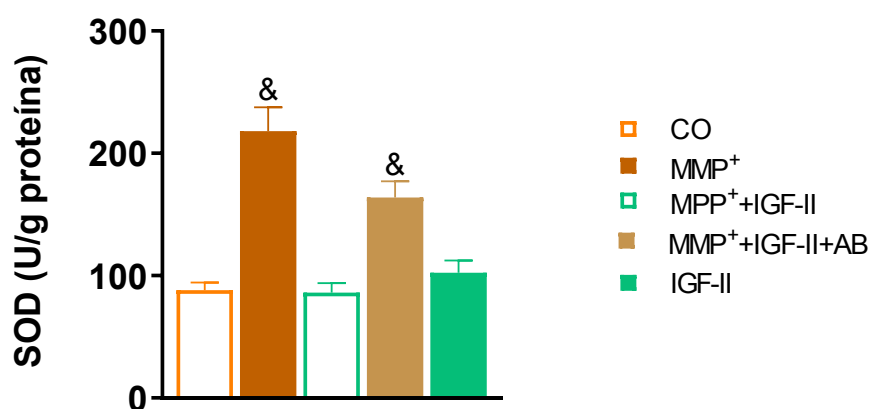


Figura 33. Evaluación de la actividad de la enzima mitocondrial SOD en células control (CO) y tratadas con MPP⁺, MPP⁺ + IGF-II, MPP⁺ + IGF-II + AB o IGF-II. Los datos se expresan en unidades (U), siendo una unidad de SOD aquella que provoca una inhibición del 50% de la tasa de reducción de INT en las condiciones del ensayo; y se representan como media \pm SEM ($n = 6$ en cada grupo y 3 experimentos independientes). ANOVA de una vía, seguido del test de Tukey de comparación múltiple. $\&P < 0,05$ versus todos los grupos.

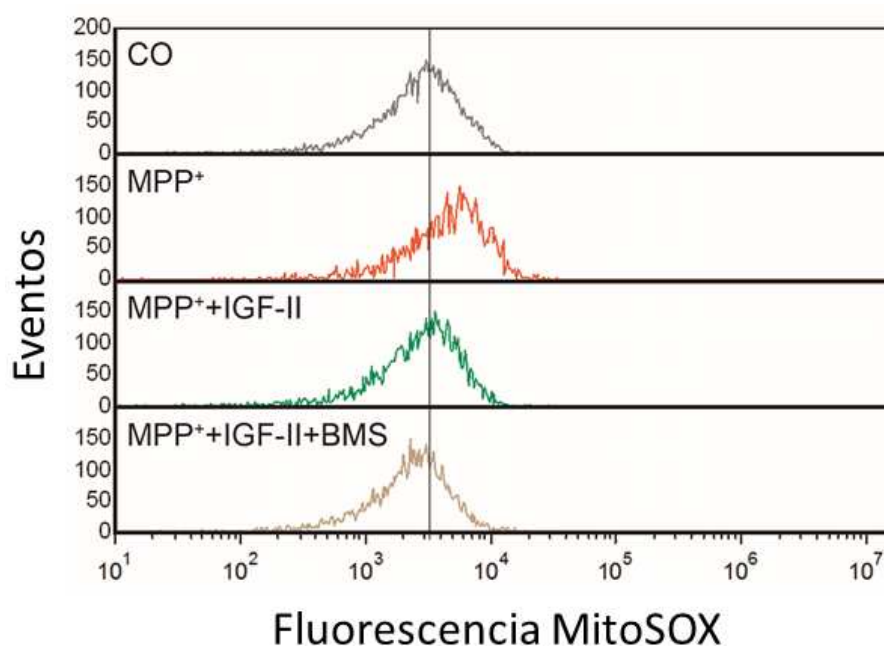


Figura 34. Histograma representativo de la producción mitocondrial de ROS evaluada mediante el marcaje fluorescente de MitoSOX. Los valores expresan el número de células (eventos) que emiten una determinada intensidad de marcaje fluorescente en células control (CO) y tratadas con MPP⁺, MPP⁺ + IGF-II o MPP⁺ + IGF-II + BMS.

1.5.6. El IGF-II inhibe, mediante su unión al receptor rIGF-II, la reducción de la expresión del Factor de transcripción mitocondrial A (TFAM) inducido por MPP⁺

La figura 35 muestra imágenes representativas del marcaje inmunocitoquímico de TFAM en las células tras los diferentes tratamientos. El análisis de los niveles de inmunofluorescencia mostró una reducción (30%) debida a la presencia de MPP⁺ en el medio de cultivo respecto al grupo control ($P < 0,05$). Este efecto fue inhibido por la adición de IGF-II al medio de cultivo con MPP⁺, que a su vez fue revertido por el bloqueo específico del rIGF-II ($P < 0,05$) (Figura 36).

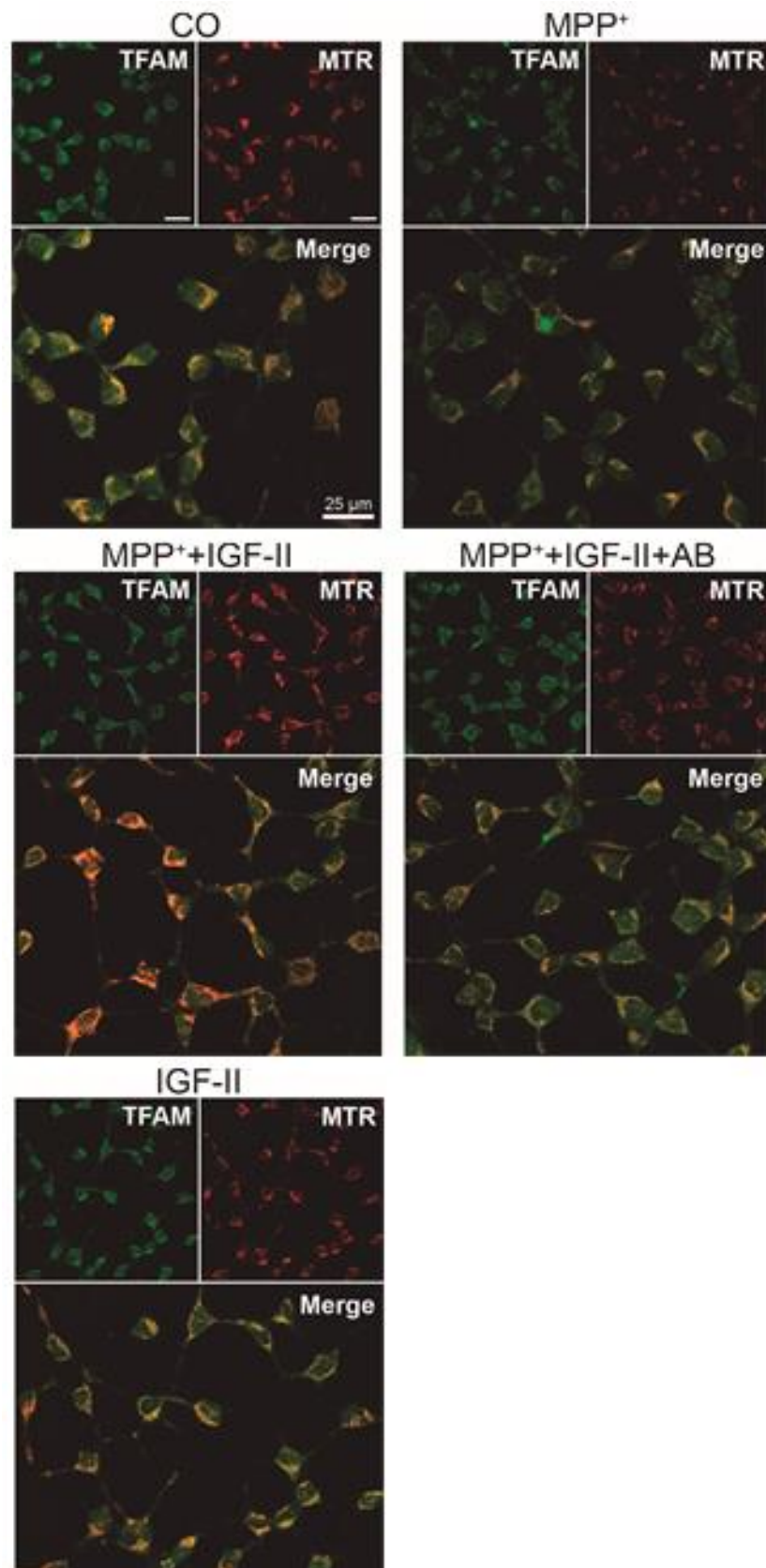


Figura 35. Imágenes representativas del marcaje fluorescente mediante inmunocitoquímica de TFAM (verde), Dapi (azul) y Mitotracker Red (MTR, rojo) en células control (CO) y tratadas con MPP⁺, MPP⁺+IGF-II, MPP⁺+IGF-II+AB o IGF-II.

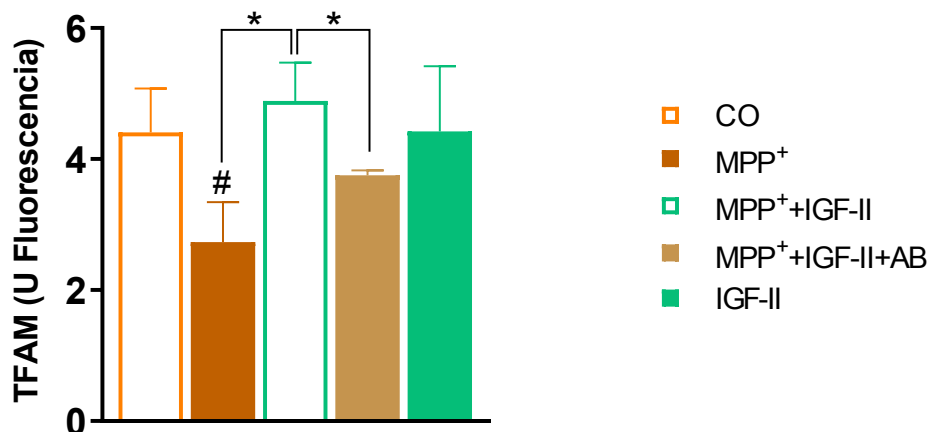


Figura 36. Cuantificación de los niveles de fluorescencia de TFAM en células control (CO) y tratadas con MPP⁺, MPP⁺+IGF-II, MPP⁺+IGF-II+AB o IGF-II. Los datos se expresan como media \pm SEM ($n = 6$ en cada grupo y 3 experimentos independientes). ANOVA de una vía, seguido del test de Tukey de comparación múltiple. # $P < 0,05$ versus CO e IGF-II; * $P < 0,05$ versus grupos conectados con barras.

1.6. Efectos sobre vías de señalización molecular intracelular

A continuación, se estudiaron cambios, debido a los diferentes tratamientos farmacológicos, en marcadores de vías de señalización molecular intracelular: factor de transcripción NRF2, las enzimas GST y NQO1 (con expresión dependiente de NRF2), y pmTOR.

1.6.1. El IGF-II inhibe el efecto del MPP⁺ sobre la expresión y traslocación al núcleo del factor de transcripción NRF2 y la viabilidad celular

Para el estudio de la participación del NRF2 en los efectos del IGF-II, se realizó en primer lugar un estudio de su expresión y distribución celular mediante técnicas inmunocitoquímicas. Posteriormente, para confirmar la implicación de IGF-II, se inhibió la expresión del NRF2 y se analizó la muerte celular mediante la cuantificación de los niveles liberados de LDH al medio de cultivo.

El análisis del marcaje de inmunofluorescencia (Figuras 37 y 38) mostró un descenso del 26% en la expresión del factor inducido por el MPP⁺ con respecto al control ($P < 0,05$),

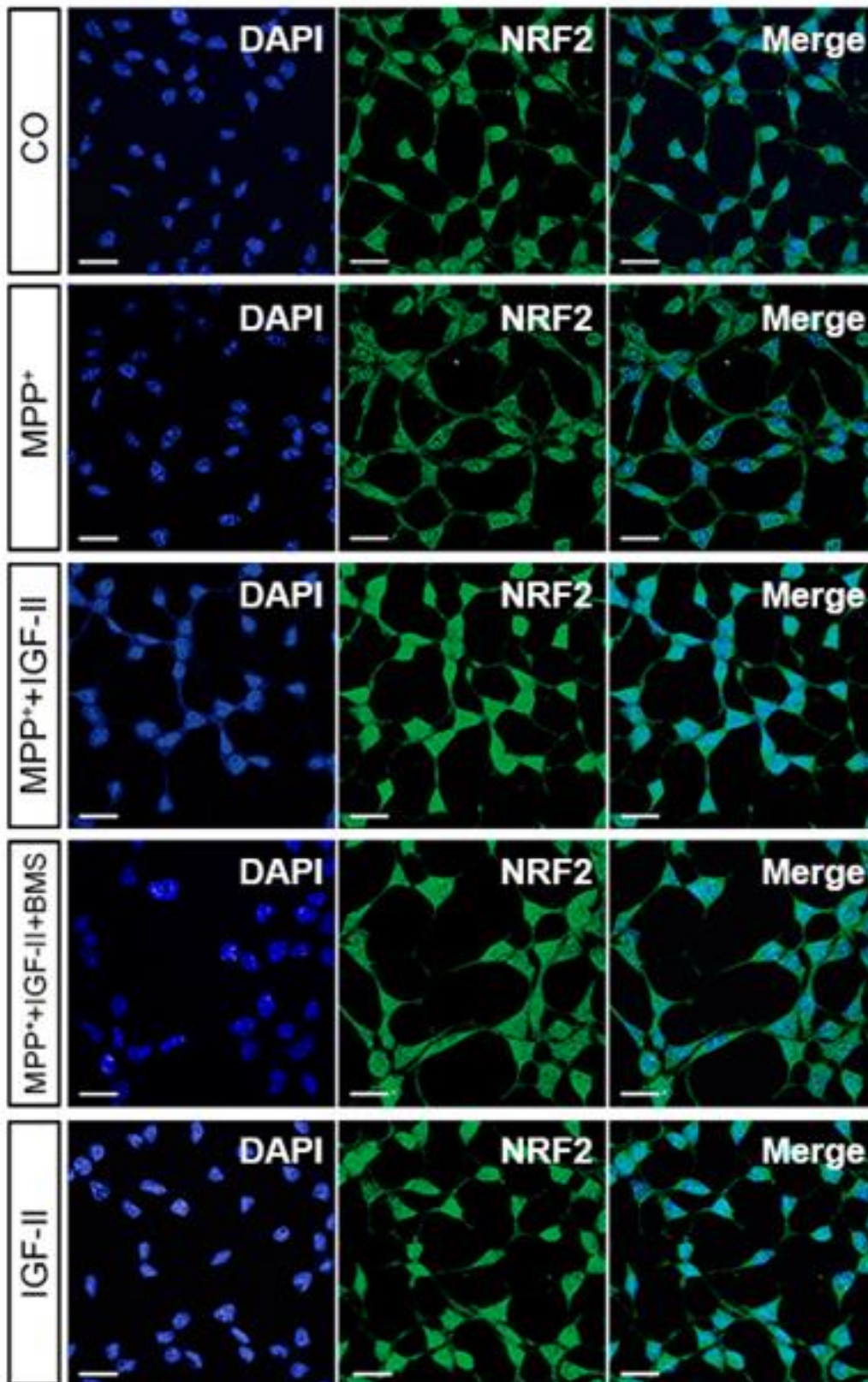


Figura 37. Imágenes representativas del marcaje fluorescente mediante inmunocitoquímica de NRF2 (verde) y Dapi (azul) en células en células control (CO) y tratadas con MPP⁺, MPP⁺+IGF-II, MPP⁺+IGF-II+BMS o IGF-II. Barra de escala: 25 μ m.

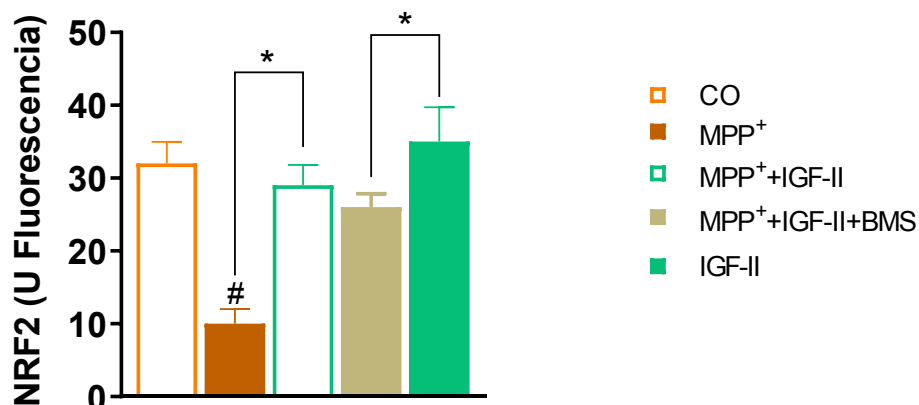


Figura 38. Cuantificación de los niveles de fluorescencia de NRF2 en células control (CO) y tratadas con MPP⁺, MPP⁺ + IGF-II, MPP⁺ + IGF-II + BMS o IGF-II. Los datos se expresan como unidades (U) de fluorescencia y se representan como media \pm SEM ($n = 6$ en cada grupo y 3 experimentos independientes). ANOVA de una vía, seguido del test de Tukey de comparación múltiple. [#] $P < 0,05$ versus CO e IGF-II; * $P < 0,05$ versus grupos conectados con barras.

efecto que fue inhibido significativamente por la adición de IGF-II. Respecto a la translocación de este factor de transcripción al núcleo, donde ejecuta su acción pro-antioxidante, se observó que en las neuronas tratadas con el neurotóxico MPP⁺ la expresión del NRF2 en el núcleo fue menor en comparación con el grupo control (figura 40). Sin embargo, las células coincubadas con MPP⁺ e IGF-II mostraron una intensidad nuclear similar a la obtenida en las células control, evidenciando un efecto bloqueador. La presencia de BMS en el medio de cultivo no limitó el efecto de IGF-II (Figura 38).

A continuación, para confirmar la implicación de NRF2 en las acciones del IGF-II, se estudió la viabilidad celular en presencia del inhibidor del factor NRF2, ML-385. Su adición no afectó a la viabilidad celular en ninguno de los grupos experimentales excepto en aquel tratado con MPP+IGF-II, que mostró un descenso de la viabilidad celular de 7,5 veces, lo que indica una reversión del efecto del IGF-II (Figura 39).

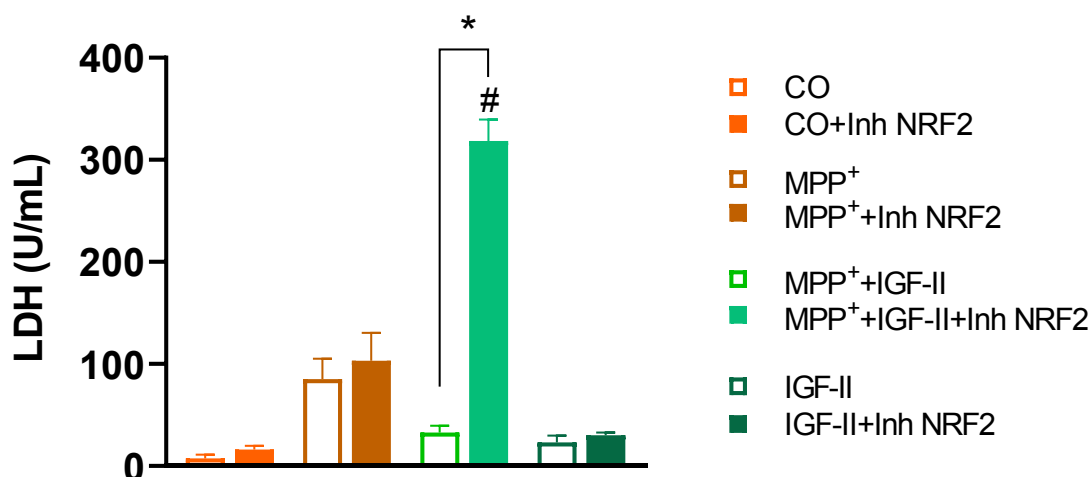


Figura 39. Cuantificación de la liberación de LDH al medio de cultivo tras la adición del inhibidor NRF2 ML-385 (Inh NRF2) en células control (CO) y tratadas con MPP⁺, MPP⁺+IGF-II o IGF-II. Los datos se expresan como U/mL y se representan como media \pm SEM ($n = 6$ en cada grupo y 3 experimentos independientes). ANOVA de una vía, seguido del test de Tukey de comparación múltiple. # $P < 0,05$ versus todos los grupos; * $P < 0,05$, versus grupos conectados con barras.

1.6.1.1. El IGF-II bloquea la inhibición inducida por MPP⁺ de la actividad de las enzimas GST y NQO1, dependiente de NRF2

Se completó el estudio de la vía de señalización del factor de transcripción NRF2 analizando la actividad de las enzimas GST y NQO1. Respecto a la GST, los datos no muestran una alteración significativa de la actividad de la enzima por la presencia de MPP⁺. Sin embargo, la adición de IGF-II, por si solo o junto a MPP⁺, al medio de cultivo producía un aumento de actividad con respecto a los demás grupos ($P < 0.05$), efecto revertido por la presencia del anticuerpo frente al rIGF-II (Figura 40A).

En el caso de la enzima NQO1 (Figura 40B), cuando el tóxico se encontraba presente en el medio de cultivo la actividad de esta enzima descendía en un 70% en comparación con las células control ($P < 0.05$). La inclusión de IGF-II en el cultivo, solo o junto a MPP⁺, bloqueó el descenso de la actividad de esta enzima, siendo similar al grupo control, efecto que fue revertido por el bloqueo del rIGF-II con el anticuerpo específico.

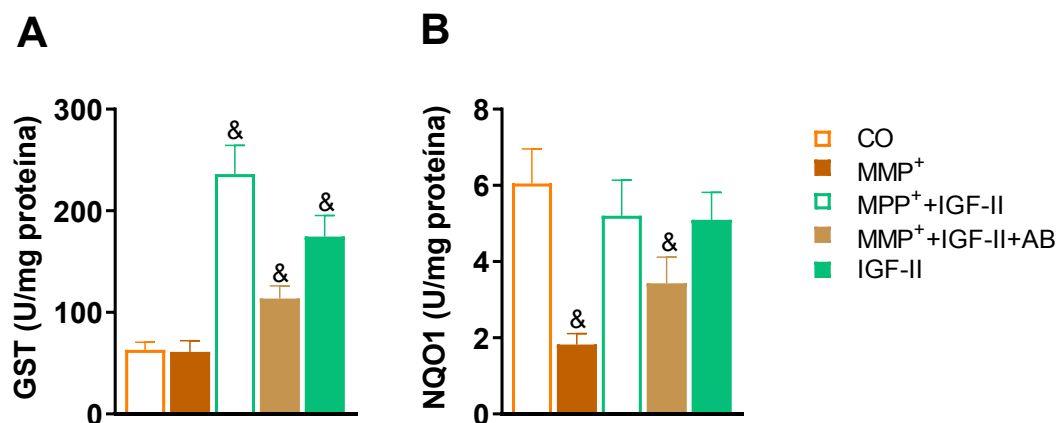


Figura 40. Cuantificación de la actividad de las enzimas diana del factor de transcripción NRF2 GST (A) y NQO1 (B) en células control (CO) y tratadas con MPP⁺, MPP⁺+IGF-II, MPP⁺+IGF-II+AB o IGF-II. Los datos se expresan como unidad (U) definida como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 μ mol de 2, 4-dinitrofenil-S-glutiación por minuto en A y como la oxidación de 1 μ mol de NADH a NAD por minuto a 37°C en B. y se representan como media \pm SEM ($n = 6$ en cada grupo y 3 experimentos independientes). ANOVA de una vía, seguido del test de Tukey de comparación múltiple. &P < 0,05 versus todos los grupos.

1.6.2. El IGF-II bloquea, mediante sus receptores rIGF-II, la reducción de los niveles de pmTOR inducida por MPP⁺

El análisis de los niveles de la diana de Rapamicina en mamíferos pmTOR mediante inmunocitoquímica (Figuras 41 y 42) mostró un descenso (25%) de este factor en las células tratadas con MPP⁺ en comparación con las células control ($P < 0.05$) y una inhibición de dicho efecto en las células coincubadas con MPP⁺ e IGF-II, que fue contrarrestado por la presencia del anticuerpo frente al rIGF-II. Cabe destacar el aumento de pmTOR de un 20% respecto al control en las células tratadas únicamente con IGF-II ($P < 0.05$).

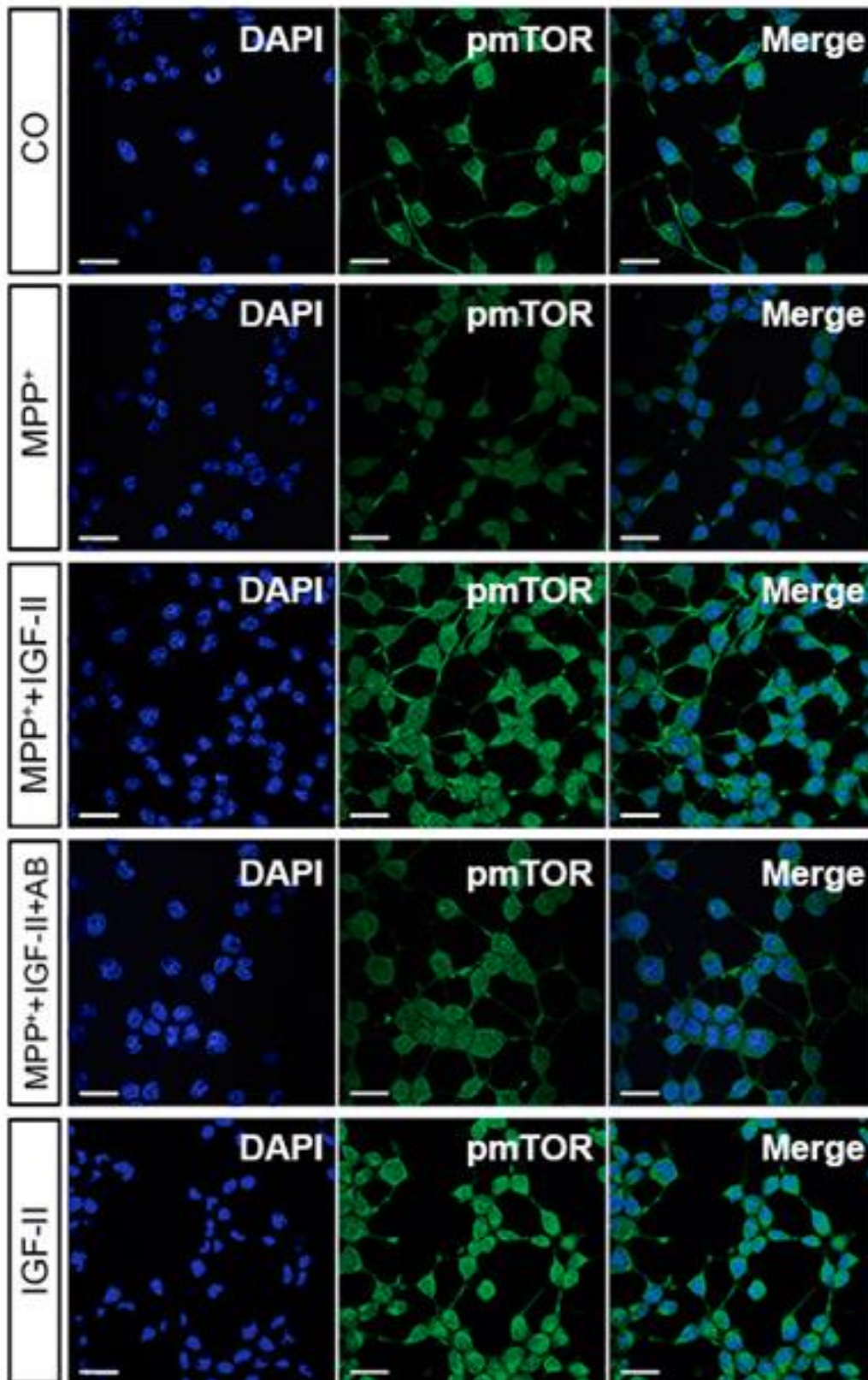


Figura 41. Imágenes representativas del marcaje fluorescente mediante inmunocitoquímica de pmTOR (verde) y Dapi (azul) en células control (CO) y tratadas con MPP⁺, MPP⁺ + IGF-II, MPP⁺ + IGF-II + AB o IGF-II. Barra de escala: 25 μ m.

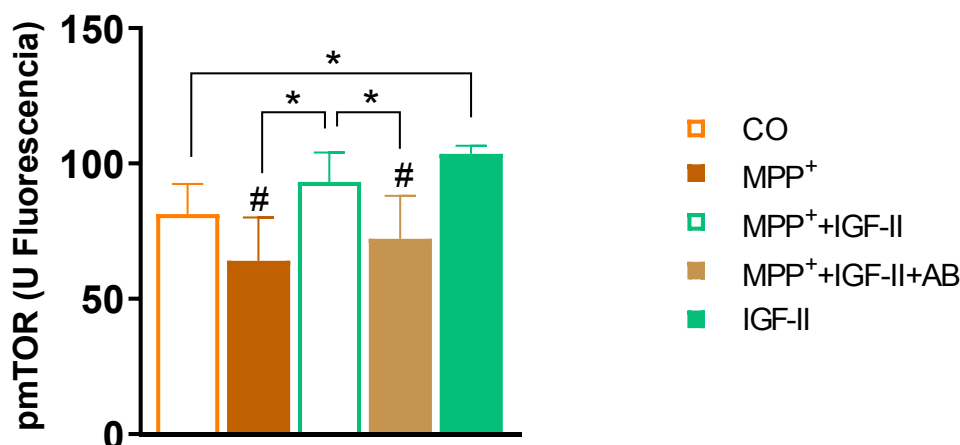


Figura 42. Cuantificación de los niveles de fluorescencia de pmTOR en células control (CO) y tratadas con MPP⁺, MPP⁺ + IGF-II, MPP⁺ + IGF-II + AB o IGF-II. Los datos se expresan como unidades de intensidad de fluorescencia y se representan como media \pm SEM ($n = 6$ en cada grupo y 3 experimentos independientes). ANOVA de una vía, seguido del test de Tukey de comparación múltiple. # $P < 0,05$ versus CO e IGF-II; * $P < 0.05$, versus grupos conectados con barras.

1.6.3. Efectos del agonista selectivo LEU del receptor IGF-II

En este apartado se muestra el conjunto de resultados obtenidos en los experimentos llevados a cabo con el agonista selectivo LEU del rIGF-II, para confirmar su implicación en los efectos observados y descritos hasta ahora del IGF-II.

1.6.3.1. El LEU no altera la viabilidad de las células SN4741

En primer lugar, se comprobó la ausencia de toxicidad celular del agonista. En la figura 45 se muestra que la adición de LEU al medio de cultivo (CO+LEU) no provocó un aumento de la muerte celular tras 6 h de exposición, comparado con las células control. Como control positivo se utilizó el proapoptótico estaurosporina (CO+EST), que produjo un descenso de la viabilidad celular, como se puede apreciar en la Figura 43 por la presencia de núcleos teñidos de azul como consecuencia del aumento de permeabilidad al azul de tripán.

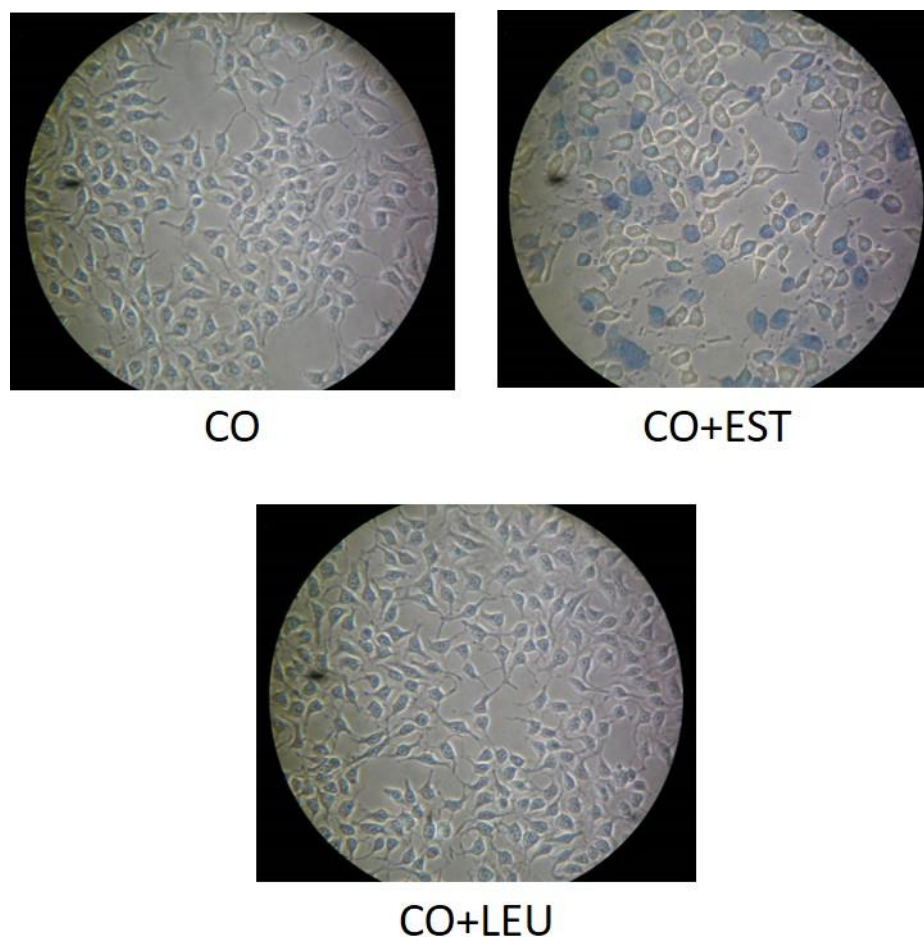


Figura 43. Imágenes representativas de la tinción de células SN4741 (CO) con azul Tripán tras 6 h de tratamiento, en presencia del proapoptótico estaurosporina (EST) o del agonista selectivo de rIGF-II LEU, para el estudio de la viabilidad celular.

1.6.3.2. La coadministración de LEU bloquea el efecto deletéreo del MPP⁺ en las células SN4741

El análisis de la viabilidad celular (niveles de LDH; Figura 44A), oxidación de proteínas (niveles de AOPP; Figura 44B), producción de radicales libres (MitoSOX; Figura 45), potencial de membrana mitocondrial ($m\Delta\Psi$; Figura 46), la vía de señalización de NRF2 y NQO1 (Figura 47), y de los niveles de la enzima TH (Figura 48) mostró valores similares en las células cotratadas con MPP⁺+LEU y en las células control, confirmando el efecto de bloqueo del IGF-II sobre la toxicidad de MPP⁺.

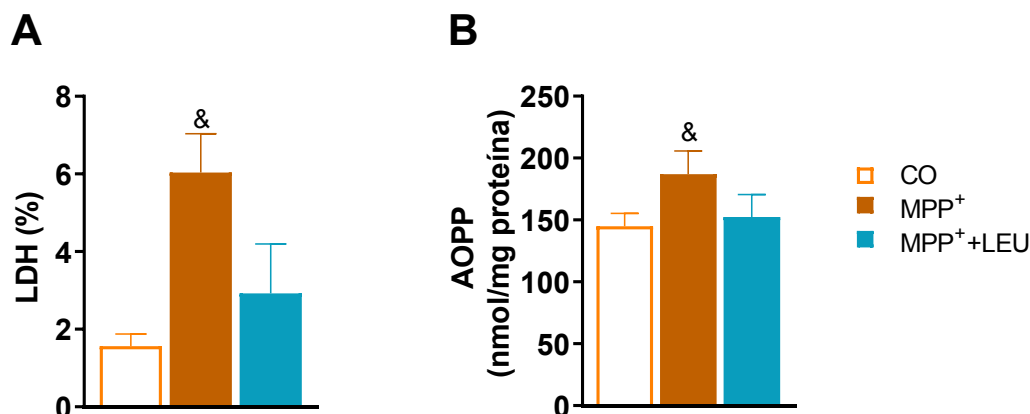


Figura 44. Efecto de LEU sobre la viabilidad celular y la oxidación de proteínas en la línea celular SN4741 (CO) tratada con MPP⁺. Determinación de la muerte celular cuantificada mediante los niveles de LDH en medio extracelular expresados como % del control **(A)** y de la oxidación de proteínas evaluada como niveles de AOPP expresados como nmol/mg proteína **(B)**. Los datos se representan como media \pm SEM ($n = 6$ en cada grupo y 3 experimentos independientes). ANOVA de una vía, seguido del test de Tukey de comparación múltiple. &P < 0,05 versus todos los grupos.

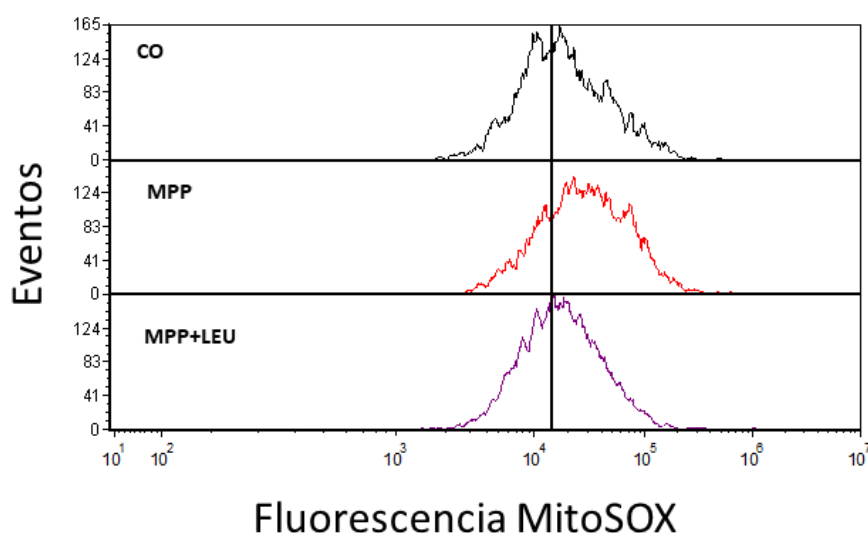


Figura 45. Efecto de LEU sobre la producción mitocondrial de ROS, evaluada como fluorescencia MitoSOX, en la línea celular SN4741 (CO) tratada con MPP⁺. Los datos se expresan como el número de células (eventos) que emiten una determinada intensidad de fluorescencia y se representan como media \pm SEM ($n = 6$ en cada grupo y 3 experimentos independientes).

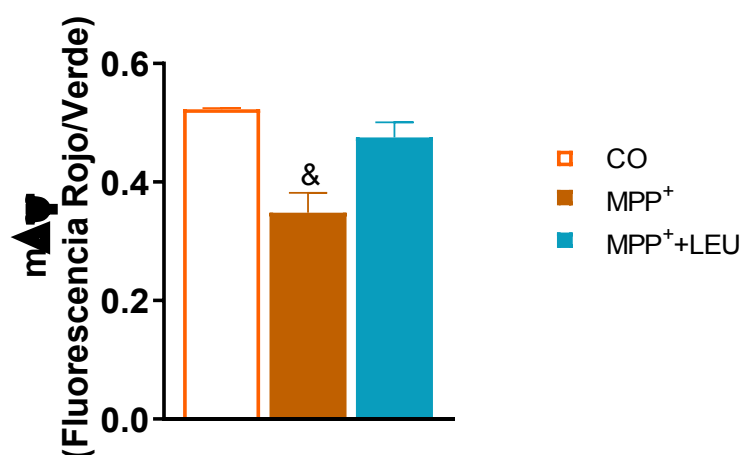


Figura 46. Efecto de LEU sobre el potencial de membrana mitocondrial ($m\Delta\Psi$), medido mediante los niveles de fluorescencia de JC1, en la línea celular SN4741 (CO) tratada con MPP⁺. Los datos se expresan como el cociente entre la fluorescencia roja y verde y se representan como media \pm SEM ($n = 6$ en cada grupo y 3 experimentos independientes). ANOVA de una vía, seguido del test de Tukey de comparación múltiple. &P < 0,05 versus todos los grupos.

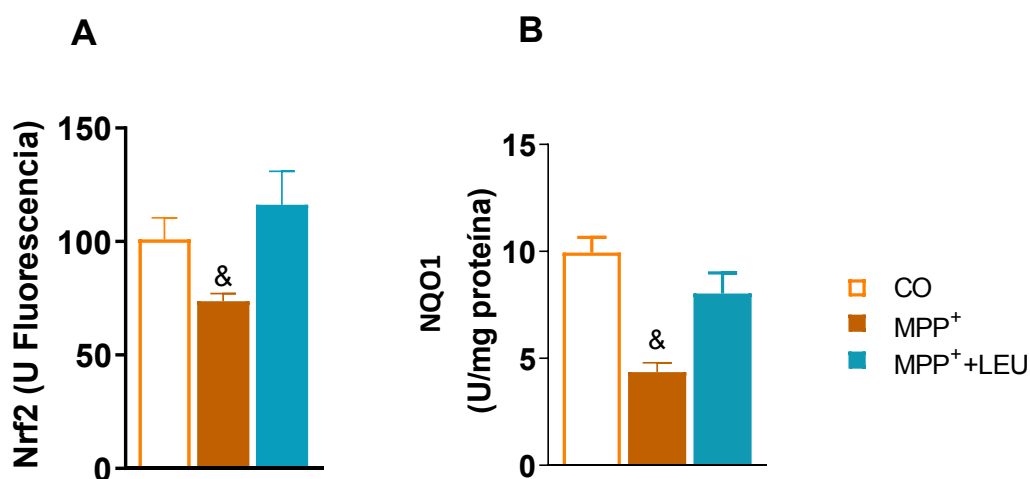


Figura 47. Efecto de LEU sobre la vía de señalización de NRF2 en la línea celular SN4741 (CO) tratada con MPP⁺. Determinación de los niveles de NRF2 expresados como unidades de intensidad de fluorescencia (**A**) y de su diana NQO1 expresados como U/mg proteína (**B**). Los datos se representan como media \pm SEM ($n = 6$ en cada grupo y 3 experimentos independientes). ANOVA de una vía, seguido del test de Tukey de comparación múltiple. &P < 0,05 versus todos los grupos.

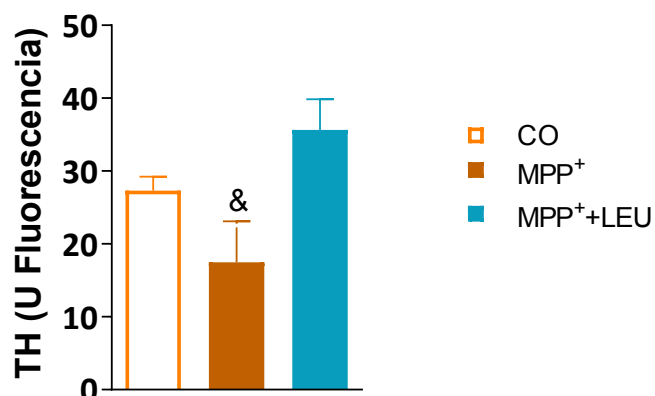


Figura 48. Efecto de LEU sobre la expresión de la enzima tirosina hidroxilasa (TH) en la línea celular SN4741 (CO) tratada con MPP⁺. Los datos se expresan como unidades de fluorescencia y se representan como media \pm SEM ($n = 6$ en cada grupo y 3 experimentos independientes). ANOVA de una vía, seguido del test de Tukey de comparación múltiple. $\&P < 0,05$ versus todos los grupos.

2. Papel del IGF-II en un modelo animal de EP crónico y progresivo

Los datos obtenidos en el modelo celular de EP mostraron un efecto bloqueador del IGF-II sobre los de MPP⁺. Debido a ello, nuestro grupo de investigación decidió comprobar si este hecho también se producía en animal, en concreto en un modelo murino de EP crónico y progresivo. El modelo consistió en la utilización de ratones a los que se les administró MPTP/p, que induce pérdida de DA estriatal, degeneración de neuronas DAérgicas TH⁺ en la *pars compacta* de la sustancia negra (SNc), y neuroinflamación, que conllevan finalmente un déficit del comportamiento del animal (Carta, 2010; Petroske et al., 2001). La administración de IGF-II se produjo coincidiendo con la del tóxico (MPTP/p + (44d) IGF-II) o tras un periodo de tiempo tras comenzar la administración de éste (MPTP/p + (23d) IGF-II) (Figura 49).

Modelo murino C57BL/6J

Efecto neuroprotector de IGF-II

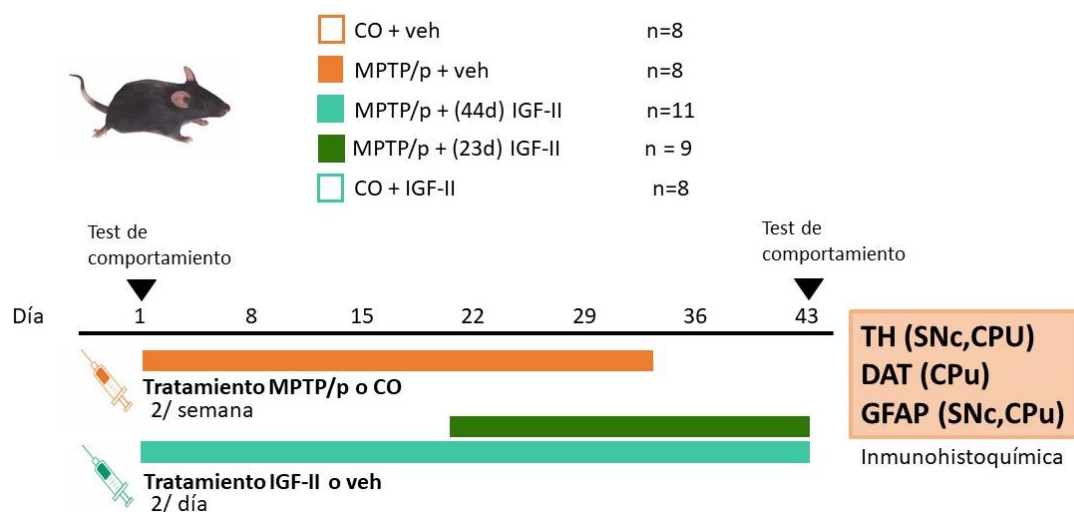


Figura 49. Diseño experimental del modelo murino de EP mediado por la administración de MPTP y Probenecid (MPTP/p) para analizar el efecto del IGF-II sobre el comportamiento y los niveles de expresión de tirosina hidroxilasa (TH), transportador de dopamina (DAT) y GFAP en sustancia negra pars compacta (SNc) y caudado-putamen (CPu).

2.1. La administración de IGF-II bloquea la pérdida de coordinación motora y la reducción del auto-aseo inducido por el MPTP

Tanto la prueba de cilindro giratorio como la prueba de auto-aseo en campo abierto se realizaron antes del inicio de los tratamientos farmacológicos, recogiendo datos basales de referencia, y tras 10 días de la última dosis administrada de MPTP/p, para detectar los posibles efectos comportamentales inducidos por el tratamiento.

A nivel basal no existieron diferencias significativas en la latencia en la caída y el tiempo de auto-aseo entre los diferentes grupos experimentales. En los animales sometidos al tratamiento solo con MPTP/p el tiempo entre caídas y el periodo de auto-aseo se redujo considerablemente respecto al grupo control, sobre todo en este último comportamiento ($P < 0.05$). Tanto el cotratamiento preventivo con IGF-II (MPTP/p + (44d) IGF-II) como el de coadministración tras el inicio del efecto del neurotóxico (MPTP/p + (23d) IGF-II) indican que IGF-II fue capaz de prevenir los déficits en la actividad

motora y el acicalamiento individual, mostrando estos animales tiempos cercanos a los registrados en los ratones control en ambas pruebas (Figuras 50 y 51).

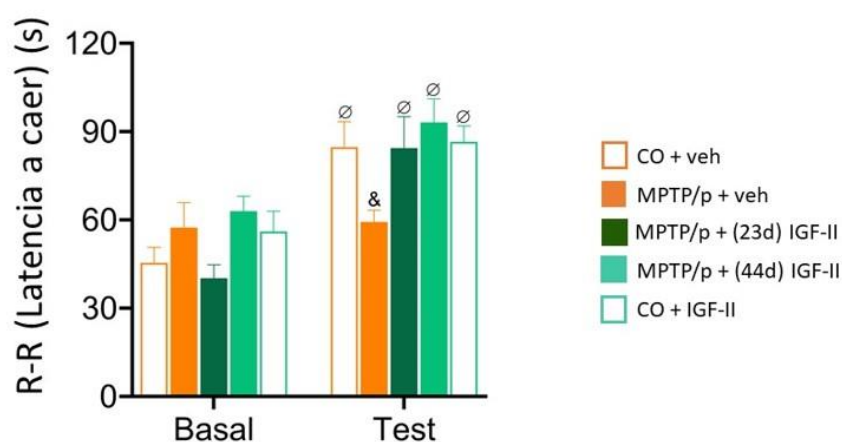


Figura 50. Efecto en la prueba de cilindro giratorio (rotarod o R-R) a nivel basal y después de los tratamientos en animales control (CO + veh) y tratados con MPTP y Probenecid, solos (MPTP/p + veh) o junto a IGF-II (MPTP/p + (23d) IGF-II o MPTP/p + (44d) IGF-II), o con IGF-II (CO + IGF-II). Los datos de latencia a caer se expresan en segundos (s) y se representan como media \pm SEM ($n = 8, 8, 9, 11, 8$ respectivamente en cada grupo). ANOVA de dos vías de medidas repetidas seguido del test de Duncan de rango múltiple. &P <0,05 versus todos los grupos; ØP <0,05 versus basal.

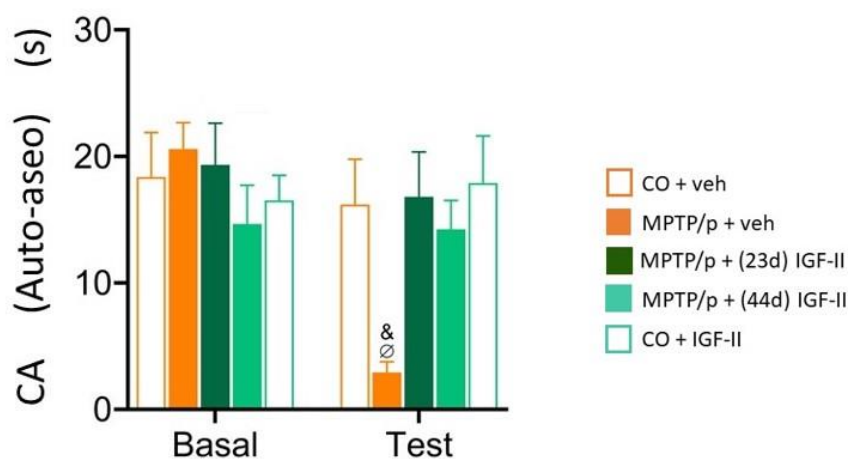


Figura 51. Efecto en la prueba de auto-aseo en el campo abierto (CA) a nivel basal y después de los tratamientos en animales control (CO + veh) y tratados con MPTP y Probenecid, solos (MPTP/p + veh) o junto a IGF-II (MPTP/p + (23d) IGF-II o MPTP/p + (44d) IGF-II), o con IGF-II (CO + IGF-II). Los datos de periodo de auto-aseo se expresan en segundos (s) y se representan como media \pm SEM ($n = 8, 8, 9, 11, 8$ respectivamente en cada grupo). ANOVA de dos vías con varias medidas seguido del test de Duncan de rango múltiple. &P <0,05 versus todos los grupos; ØP <0,05 versus basal.

Los animales a los que se les administró únicamente IGF-II no mostraron cambios comportamentales significativos con respecto a los controles en ninguna de las dos pruebas realizadas (Figuras 50 y 51).

2.2. EL IGF-II contrarresta el efecto neurodegenerativo y proinflamatorio del MPTP en la vía dopaminérgica nigroestriatal

Las diferencias comportamentales encontradas en los animales fueron corroboradas por los estudios de inmunohistoquímica para el recuento de neuronas DAérgicas TH⁺ y astroglia GFAP⁺ y la expresión de TH y DAT (Figura 52). En los animales tratados solo con MPTP se redujo significativamente el número de neuronas TH⁺ (~67%) en la SNc y la expresión de TH y DAT (>80%) en el CPu, respecto al grupo control (P <0.05) (Figura 53). En ambas zonas neuronales el número de astrocitos GFAP⁺ fue mayor que en el grupo control (Figura 53).

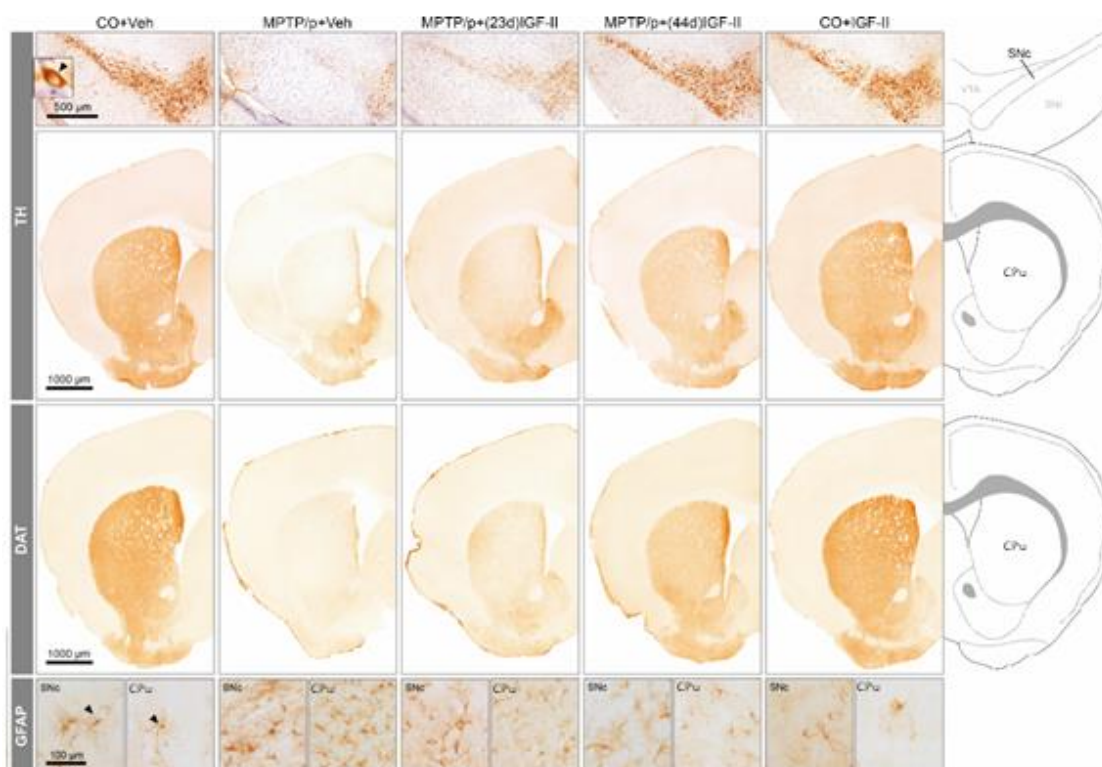


Figura 52. Imágenes representativas de la inmunotinción de tirosina hidroxilasa (TH), transportador de dopamina (DAT) y microglía (GFAP) en sustancia negra compacta (SNc) y caudado putamen (CPu) en todas las condiciones experimentales. Las flechas negras indican inmunomarcaje positivo.

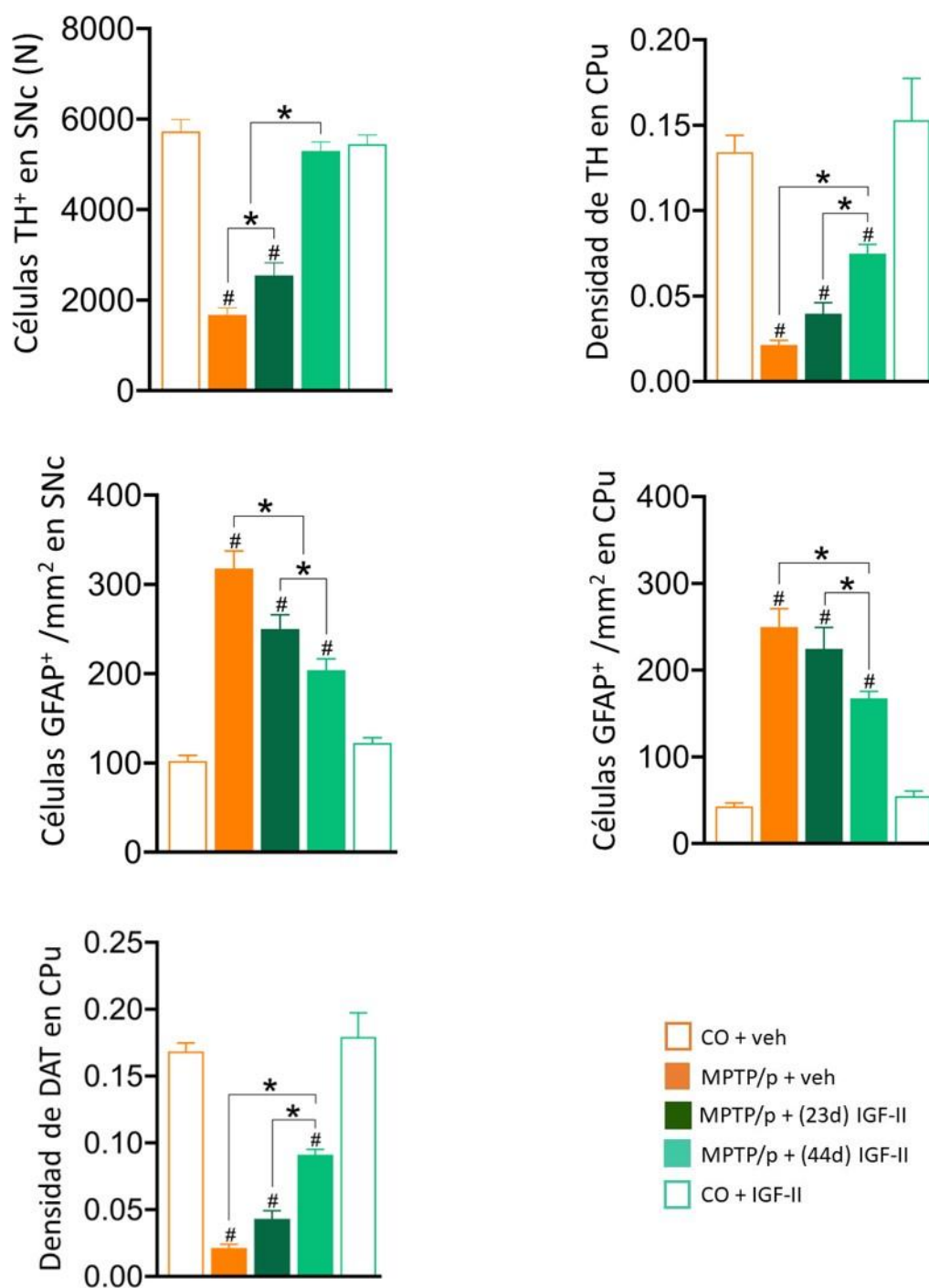


Figura 53. Cuantificación del inmunomarcaje de tirosina hidroxilasa (TH; número de células y densidad óptica), GFAP (número de células), y transportador de dopamina (DAT; densidad óptica) en sustancia negra compacta (SNc) y caudado putamen (CPu) en todas las condiciones experimentales. Los datos se expresan como número de células/mm² o valores de densidad óptica y se representan como la media \pm SEM ($n = 8, 8, 9, 11, 8$ respectivamente en cada grupo). Se usó ANOVA de una vía seguido del test de Duncan de comparación múltiple. # $P < 0,05$ versus CO e IGF-II; * $P < 0,05$ versus grupos conectados con barras.

2.3. La actividad del IGF-II no está interferida por el metabolismo del neurotóxico MPTP en el caudado putamen

Con el fin de descartar la posibilidad de que el efecto del IGF-II esté favorecido por una inhibición en la transformación de MPTP en su metabolito toxicológicamente activo MPP⁺, se determinaron los niveles de éste 2 horas después de la administración de MPTP/p solo o con pretratamiento con IGF-II (MPTP/p + (44d) IGF-II). Los resultados mostraron que el cotratamiento con IGF-II no alteró la concentración de MPP⁺ en el CPu, lo que demuestra que IGF-II no interfiere en el metabolismo del MPTP por parte de los astrocitos ($P > 0.05$, Figura 54).

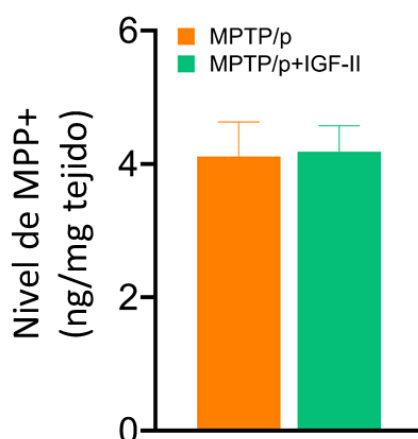
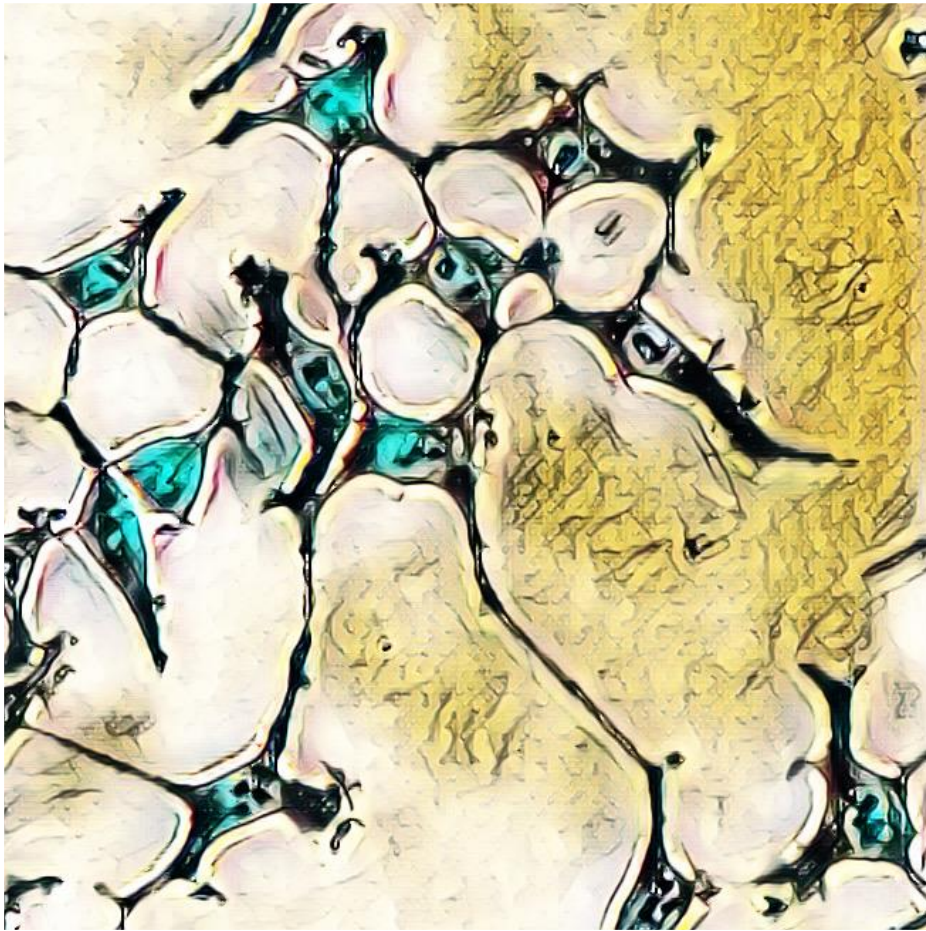


Figura 54. Niveles del metabolito MPP⁺ en el caudado putamen tras 2h en animales tratados MPTP y Probenecid solo (MPTP/p + veh) o junto a IGF-II (MPTP/p + (44d) IGF-II). Los datos se expresan como ng/mg de tejido y se representan como la media \pm SEM ($n = 6$ en cada grupo). Prueba *t* de Student para datos no apareados ($P > 0,05$).

DISCUSIÓN





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Los indicios, cada vez más evidentes, muestran al estrés oxidativo celular como una de las causas fisiopatológicas de las enfermedades neurodegenerativas, y entre ellas la EP, contribuyendo el daño oxidativo junto con la disfunción mitocondrial a la degeneración y muerte neuronal observadas en estas enfermedades (Blesa et al., 2015). En el estudio que se ha llevado a cabo en la presente Tesis Doctoral se han valorado los efectos antioxidantes y neuroprotectores de IGF-II en un modelo celular y en un modelo animal de la EP inducidos por MPP⁺ y MPTP, respectivamente, que desencadenan daños oxidativos.

1. Evaluación del efecto del IGF-II en un modelo celular de EP

Con objeto de facilitar la discusión, en la tabla 3 se muestra un resumen de los resultados obtenidos en el modelo celular de EP.

1.1. El IGF-II aumenta la viabilidad de las neuronas incubadas con MPP⁺

El daño neuronal y la consecuente neurodegeneración y/o muerte celular provocada por el estrés oxidativo a través de este compuesto neurotóxico se debe, en parte, a la oxidación de ADN y ADNmt, y por ende a la disfunción mitocondrial (Buneeva et al., 2020). Este proceso de senescencia neuronal se puede producir por mecanismos de muerte celular como la apoptosis, necrosis o ferroptosis (Ito et al., 2017). Para la activación de la vía apoptótica se produce una desregulación del ciclo celular en las neuronas, especialmente por una reentrada del ciclo celular por parte de dichas células (Martínez-Cué & Rueda, 2020). Además, la apoptosis y la desregulación del ciclo celular constituye una característica molecular subyacente clave de la mayoría de los trastornos neurodegenerativos, incluida la EP (Joseph et al., 2020; Requejo-Aguilar, 2023). Este hecho podría explicar, al menos en parte, el aumento de la mortalidad neuronal y la neurodegeneración encontrados en este trabajo debido a la presencia de MPP⁺; y el hecho de que el IGF-II previene este efecto posiblemente disminuyendo la apoptosis (Tabla 3), puesto que hemos demostrado que IGF-II reequilibra el ciclo celular neuronal, reduciendo la cantidad de apoptosis y muerte celular gracias a la regulación de factores

Tabla 3. Resumen de los resultados obtenidos en los experimentos en el modelo celular de EP descritos en esta Tesis Doctoral. Abreviaturas y símbolos: ↑, aumento significativo respecto al control; ↓, descenso significativo respecto al control; ↔, no efecto significativo respecto al control, n.a., no analizado.

Modelo celular						
Grupo experimental	MPP+	MPP+ + IGF-II	MPP+ + IGF-II + BMS	IGF-II	MPP+ + IGF-II + BMS + AB	MPP+ + IGF-II + AB
Viabilidad celular	↓	↔	↔	↔	↓	n.a.
Cambios morfológicos célula	Cambios	No cambios	n.a.	No cambios	n.a.	Cambios
Neurodegeneración	↑	↔	↔	↔	n.a.	n.a.
Niveles de LOOH	↑	↔	n.a.	↔	n.a.	↑ (vs IGF-II)
Niveles de AOPP	↑	↔	n.a.	↔	n.a.	↑
Niveles de TH	↓	↓ (↑ vs MPP+)	↔	↔	n.a.	n.a.
Niveles de Vmat2	↓	↔	n.a.	↔	n.a.	↓
Actividad DAT	↓	↓ (↑ vs MPP+)	n.a.	↔	n.a.	↓
Cambios morfológicos mitocondriales	cambios	no cambios	n.a.	no cambios	n.a.	n.a.
mΔΨ	↓	↔	↔	↔	n.a.	n.a.
OCR	↓	↔	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Actividad COX	↓	↔	n.a.	↔	n.a.	↓
Actividad SOD	↑	↔	n.a.	↔	n.a.	↑
Producción mitocondrial de ROS	↑	↔	↔	n.a.	n.a.	n.a.
Niveles de TFAM	↓	↔	n.a.	↔	n.a.	↔ (↓ vs MPP+ + IGF-II)
Expresión y traslocación NRF2	↓	↔	↔ (↓ vs IGF-II)	↔	n.a.	n.a.
Viabilidad celular con Inh. Nfr2	↔	↓	n.a.	↔	n.a.	n.a.
Actividad GST	↔	↑	n.a.	↑	n.a.	↑
Actividad NQO1	↓	↔	n.a.	↔	n.a.	↓
Niveles de p-mTOR	↓	↔	n.a.	↑	n.a.	↓

de transcripción, como la quinasa de control 1 o Chk1 (por sus siglas en inglés Checkpoint kinase 1) (Romero-zerbo et al., 2024).

Los efectos negativos de las ROS también se hacen evidentes en otras macromoléculas, como las proteínas y los lípidos. Como consecuencia, se produce una alteración estructural y funcional de las membranas y diversos orgánulos celulares, llegando también a ocasionar finalmente la muerte de la neurona. Asimismo, los productos derivados del proceso de oxidación en las células, como son LOOH y AOPP, pueden a su vez participar en reacciones redox que finalmente agravan el daño celular (Guo et al., 2018; Puspita et al., 2017). Los resultados obtenidos en el modelo celular usado respecto a la determinación de ROS mitocondrial (Tabla 3) muestran el desequilibrio oxidativo que se produce en presencia de MPP⁺ (X. L. Wang et al., 2014; Song et al., 2021). El IGF-II es capaz de revertir este efecto, hecho que queda constatado por la reducción concomitante de LOOH y AOPP (Tabla 3), además de la disminución del daño estructural y muerte celular, según se desprende del análisis de la tinción de Giemsa y la liberación de LDH (Tabla 3). Así, el descenso en los niveles de LOOH y AOPP por IGF-II concuerda con resultados previos de nuestro equipo de investigación, obtenidos en el estudio de un modelo celular de daño oxidativo y estrés inducido por corticosterona (Claros et al., 2021). Igualmente, aunque se comentará más adelante, no se puede obviar que el IGF-II pudiera inducir la actividad antioxidante de diversas enzimas, como la GST, que eliminan y/o neutralizan estos productos de oxidación (Tew & Townsend, 2012), lo que contribuiría a su efecto neuroprotector.

1.2. El efecto protector de IGF-II sobre la integridad y la funcionalidad mitocondrial

El desequilibrio oxidativo asociado a la génesis de la EP y de otras muchas enfermedades neurodegenerativas estaría causado principalmente por una disfunción mitocondrial, lo que conlleva un aumento en los niveles de ROS (Area-Gomez et al., 2019), en sinergia con otros factores como alteraciones en el sistema antioxidante celular (Jenner & Olanow, 1996).

En este trabajo se ha comprobado que los niveles de anión superóxido se ven aumentados en el modelo celular por MPP⁺ de EP, hecho que conlleva al consecuente aumento de la presencia de la enzima antioxidante SOD (Tabla 3), dado que este anión induce su síntesis (Pasquali-Ronchetti et al., 2006; Gil et al., 2021). Esto, a su vez, provoca un exceso en los niveles de H₂O₂, lo que puede inducir tanto la peroxidación de lípidos, en presencia de metales redox como el Fe²⁺, como la inactivación de ciertas enzimas, como la aconitasa o la succinato deshidrogenasa, ambas participes en el ciclo de Krebs (Raha & Robinson, 2000; Poprac et al., 2017). En este punto, la oxidación de lípidos de la membrana mitocondrial retroalimentaría este ciclo de producción de ROS, provocando más daño a los lípidos y proteínas y por tanto favoreciendo la neurodegeneración. Así, el deterioro oxidativo de la bicapa lipídica mitocondrial dañaría a la COX (Tabla 3), responsable de la regulación de la CTE, que dejaría de oxidar adecuadamente al citocromo C y, por tanto, el metabolismo energético celular se ve afectado por el consecuente descenso de $m\Delta\Psi$ y disminución de OCR (Tabla 3) (Wallace et al., 2010). La pérdida de potencial de membrana puede desencadenar la proteólisis de las proteínas encargadas de la dinámica de fusión/fisión mitocondrial, incrementando la división y fragmentando las mitocondrias, que adquieren una forma redondeada y menor tamaño, tal y como se aprecia en las fotografías de ME obtenidas (Figura 29). En estas condiciones, el orgánulo ya no es funcional y ocurren procesos de mitofagia, reduciendo el número de mitocondrias en la célula y/o se produce una liberación citosólica de citocromo c y una activación de la apoptosis, lo que conlleva finalmente a la muerte celular (Friedman & Nunnari, 2014).

El efecto de IGF-II produce un descenso en la producción de ROS mitocondrial (Tabla 3). Esta acción antioxidante llevaría al mantenimiento de la integridad de la membrana de la mitocondria, y del $m\Delta\Psi$, y evitaría la disminución y desajuste funcional de la COX. Así, todos estos efectos ayudarían a conservar la dinámica y morfología del orgánulo además de su actividad metabólica (OCR), y, por tanto, evitaría la entrada en un ciclo progresivo de aumento de producción de ROS y estrés oxidativo. Por ello, las neuronas tratadas con IGF-II tendrían mejor capacidad de adaptarse, serían más resilientes a condiciones de estrés oxidativo, favoreciendo su viabilidad como consecuencia de la corrección de la función mitocondrial (elemento principal de la bioenergética celular), ayudando a conservar la funcionalidad e integridad neuronal, y en definitiva, evitando la

neurodegeneración (Muddapu et al., 2020). Estos resultados sobre IGF-II, concuerdan con los obtenidos en trabajos anteriores de este equipo de investigación y de otros grupos, donde se ha demostrado que IGF-II ejerce un efecto neuroprotector en procesos de envejecimiento y de estrés oxidativo neuronal, mejorando la actividad antioxidante enzimática y reduciendo la producción de ROS; además también se ha observado que es capaz de participar en la regulación de los procesos de neuroinflamación (Castilla-Cortázar et al., 2011; Martín-Montañez et al., 2014; Dong et al., 2015; Du et al., 2019; X. Wang et al., 2020).

1.3. Efecto de IGF-II en la activación y mantenimiento de vías intracelulares

En la actualidad, muchos de los trabajos dedicados al estudio de la EP y otras enfermedades neurodegenerativas, tratan de encontrar posibles y nuevas dianas terapéuticas con las que suprimir el desequilibrio oxidativo que las causan.

Al estudiar otros posibles mecanismos putativos a través de los cuales el IGF-II induciría una protección frente el estrés oxidativo mitocondrial provocado por MPP⁺, comprobamos el papel de los factores de transcripción mitocondriales. Entre estos factores, concretamente el TFAM tiene un papel protector en enfermedades causadas por estrés oxidativo y disfunción mitocondrial (Grünewald et al., 2019) y ha sido relacionado con enfermedades neurodegenerativas. En este sentido, se ha observado que el factor TFAM se encuentra disminuido en la EP y la EA (Kang et al., 2018). Su importancia radica en que es un factor fundamental para la regulación del ADNmt, con una doble función: por un lado, actúa como componente central en la iniciación de la transcripción, y por otro, como elemento clave en el empaquetamiento en los nucleoides mitocondriales (Falkenberg et al., 2002; Alam et al., 2003). De hecho, se ha constatado que los niveles de TFAM controlan directamente la cantidad de copias de ADNmt (Bonekamp et al., 2021), además de mejorar la actividad de los complejos I y IV en las neuronas y, por tanto, la función de la cadena respiratoria mitocondrial, favoreciendo la disminución en la producción de ROS y aumentando el ADNmt y la biogénesis mitocondrial (Piao et al., 2012). En nuestro trabajo, los niveles de TFAM se recuperan tras el cotratamiento celular de IGF-II con MPP⁺ (Tabla 3), sugiriendo que la regulación de

este factor puede ser uno de los mecanismos de acción del IGF-II que mediaría la protección mitocondrial y consecuentemente la disminución de la muerte neuronal. Por otro lado, el NRF2 es el regulador transcripcional más importante de moléculas antioxidantes y detoxificantes dentro de la célula, que induce la expresión de diversos genes llamados elementos de respuesta antioxidante (Figura 55) (Esteras et al., 2016).

En nuestro modelo celular se ha observado un descenso de la traslocación al núcleo de NRF2 tras el tratamiento con MPP⁺ en comparación con el control (Tabla 3). Este hecho, como algunos autores exponen en sus trabajos, puede deberse a diferentes motivos: reducción de la expresión del factor (Meng et al., 2017; Zhao et al., 2021), o una alteración en su metabolismo (Li et al., 2018) y/o una traslocación al núcleo reducida a causa de la toxicidad de MPP⁺ (Li et al., 2020; Kasai et al., 2020). En presencia de IGF-II, se evita el descenso de los niveles de NRF2 (Tabla 3), sugiriendo que éste contrarresta los efectos del neurotóxico. Asimismo, otra de las funciones del factor NRF2 es el mantenimiento de la función bioenergética y la estructura mitocondrial, y por ende del metabolismo en condiciones de desequilibrio oxidativo celular (Dinkova-Kostova & Abramov, 2015). Además, diversos estudios implican al NRF2 como factor de regulación en la biogénesis, dinámica y mitofagia mitocondrial (Dinkova-Kostova & Abramov, 2015). En este sentido, en nuestro modelo celular de EP, la protección del metabolismo mitocondrial y celular del IGF-II también podría entenderse gracias a la conservación de la vía de NRF2 (Figura 55) junto al incremento de TFAM (Tufekci et al., 2011; Fu et al., 2018). Además, nuestros resultados muestran que la inhibición de NRF2, a través de la molécula ML385, induce un descenso de la viabilidad celular en las situaciones experimentales donde IGF-II está presente, revirtiendo los efectos beneficiosos (Figura 39). Este hecho confirma que este factor podría estar involucrado en la actividad neuroprotectora y antioxidante de IGF-II.

Por otro lado, en la literatura se muestra que la inhibición de la expresión de NRF2 produce una reducción de la expresión de diferentes proteínas antioxidantes relacionadas con esta vía (Jiang et al., 2023). En este trabajo, para el estudio de enzimas dependientes de la translocación de NRF2 al núcleo celular se analizaron GST y NQO1 (Tabla 3). La GST es una enzima de fase II detoxificante caracterizada por su conjugación con GSH para metabolizar y eliminar productos tóxicos formados por los ROS. Así, media el proceso de glutationización, provoca la solubilización de los productos tóxicos y

facilita su eliminación (Smeyne & Smeynen, 2013; Ma, 2013). En modelos animales de EP se ha estudiado la relación entre la GST y la etiopatogenia de la enfermedad, encontrando que la vía enzimática GST es clave en el efecto neuroprotector dopaminérgico tras diversos tratamientos en modelos animales inducidos por tóxicos como α -sin y 6-OHDA (Pohl et al., 2019; Jewett et al., 2018; Pieńkowska et al., 2023); debido en parte a que participa en el metabolismo de un derivado neurotóxico de la DA, evitando su acumulación (Huenchuguala & Segura-Aguilar, 2023). Todo esto sugiere que esta enzima pueda tener una función protectora en relación con el desarrollo de la EP. En el modelo celular utilizado en el presente trabajo, el tratamiento con MPP⁺ no indujo ningún cambio en la actividad de la enzima, hecho observado por otros autores, sobre todo, tras la utilización de dosis elevadas del tóxico (Castro-Caldas et al., 2009). Sin embargo, la incubación con IGF-II solo o en coincubación con el neurotóxico, incrementó la actividad de GST en las neuronas, lo que sugiere que el IGF-II aumenta la actividad de la GST posiblemente a través del aumento de la translocación de NRF2 para mediar así su efecto neuroprotector, como se ha observado en otros trabajos (J. Zhang et al., 2023). En el caso de NQO1, que al igual que GST pertenece a la familia de enzimas detoxificantes de fase II, cataliza la reducción de quinonas cíclicas y de DA en condiciones de estrés oxidativo hacia hidroquinonas menos tóxicas, por lo que podría ejercer también un papel protector frente al desarrollo de la EP (Xiao et al., 2011; Luo et al., 2019). Nuestros datos indican que la actividad de NQO1 se ve atenuada tras la incubación con MPP⁺, de acuerdo con resultados obtenidos por otros autores (Xiao et al., 2011; Son et al., 2015). Sin embargo, IGF-II evita este descenso, posiblemente también a través del factor NRF2. Por último, cada vez hay más evidencias de que NRF2 podría participar, por un lado, en la regulación de la respuesta celular a proteínas mal plegadas (desencadenado por la acumulación de éstas en el retículo endoplasmático) (Meakin et al., 2014)) y por otro lado, en la eliminación de las proteínas mal plegadas o dañadas mediando su degradación por proteosomas (Kwak et al., 2003; Kapeta et al., 2010).

Todo lo expuesto pone de manifiesto la necesidad de incrementar el conocimiento de las vías moleculares que regulan NRF2 en relación a la neurodegeneración producida por el envejecimiento o diversas patologías, como la EP, ya que podría contribuir al desarrollo de posibles dianas terapéuticas (Villavicencio Tejo & Quintanilla, 2021).

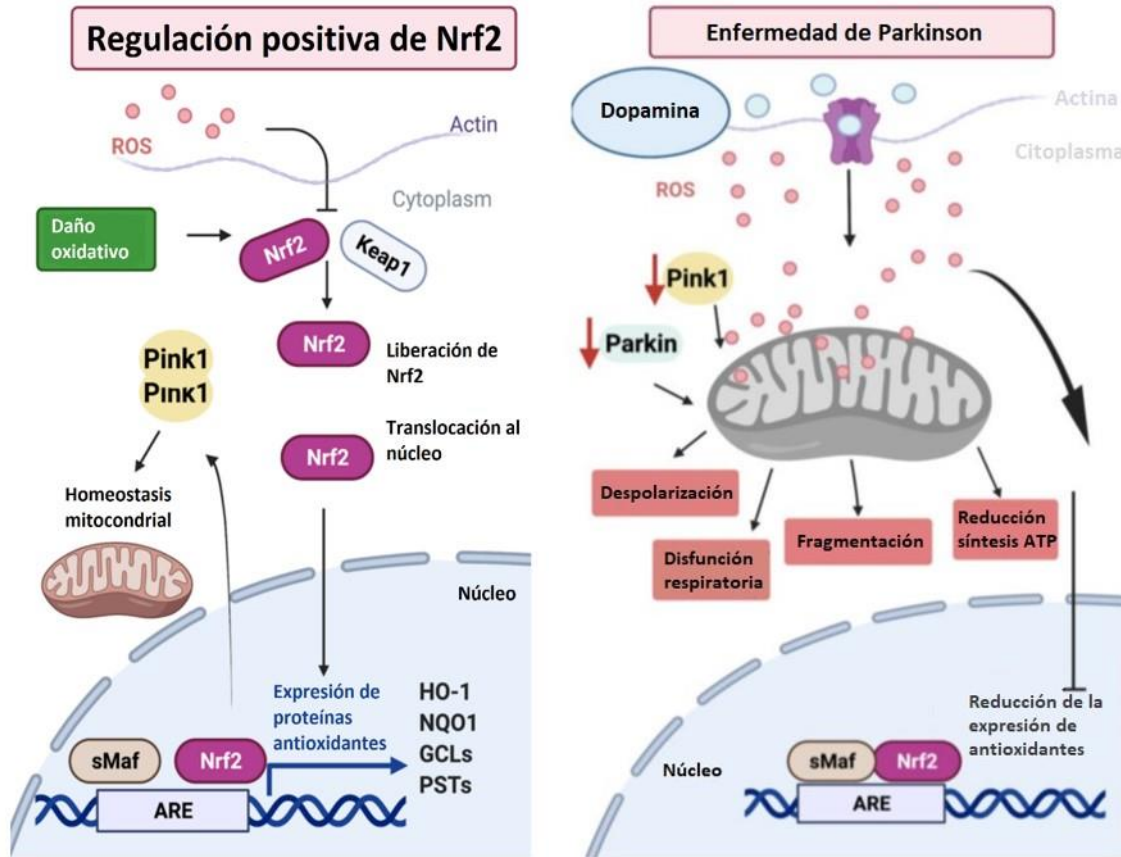


Figura 55: Izquierda, regulación positiva de Nrf2. En presencia de altos niveles de ROS, Nrf2 se libera de la unión a Keap1 y se transloca al núcleo, uniéndose a secuencias ARE (del inglés antioxidant-responsive element), lo que permite la activación de genes antioxidantes como NQO1. La expresión de PINK1 se encuentra regulada positivamente por Nrf2 y promueve la homeostasis mitocondrial a través de varios mecanismos, como la eliminación de mitocondrias dañadas. Derecha, Papel de la vía de Nrf2 en la EP. La mayor liberación intracelular de dopamina podría afectar la función mitocondrial produciendo un aumento en los niveles de ROS y afectando la actividad de Nrf2 y a la respuesta contra el daño oxidativo. Además, la disminución en los niveles de expresión de Parkin y PINK que se muestra en la EP, podría afectar a la función mitocondrial, induciendo despolarización, fragmentación, deficiencia respiratoria y reducción de ATP. Estos cambios afectarán la función sináptica, contribuyendo a la neurodegeneración y al deterioro de la función cognitiva que se dan en la EP. Imagen modificada de Villavicencio Tejo & Quintanilla, 2021.

Otro de los factores celulares involucrados de manera decisiva en la regulación de procesos como el crecimiento, el metabolismo y el tamaño celular es la proteína quinasa mTOR. Se ha observado que su actividad puede verse modificada en las enfermedades neurodegenerativas como la EP, la EA, la enfermedad de Huntington o la esclerosis amiotrófica lateral (Zhu et al., 2019; Bockaert & Marin, 2015), por lo que la analizamos en el presente estudio. Los resultados obtenidos en las células incubadas con MPP⁺ indican un descenso en los niveles de pmTOR (Tabla 3), lo que concuerda con lo descrito previamente por otros autores (Zhu et al., 2019; Xu et al., 2014). Cabe destacar que ciertos estudios apuntan a una recuperación y/o mantenimiento de las vías lisosomal y de autofagia por efecto de IGF-II, donde mTOR actúa como quinasa inhibitoria de la actividad de autofagia (Sepúlveda et al., 2022); vía celular necesaria para la eliminación de proteínas mal plegadas como la α -sin (Arcos et al., 2023). Además, hemos demostrado que el restablecimiento de la expresión de pmTOR por IGF-II podría estar mediado por el aumento de los niveles de NRF2, ya mencionado y como otros autores indican (Bendavit et al., 2016; Torrente et al., 2020). Asimismo, se ha descrito que en las neuronas ciertos neurotransmisores, como la DA, inducen la expresión de pmTOR (Bockaert & Marin, 2015; Switon et al., 2017). En el modelo celular empleado se ha encontrado un aumento de TH (enzima limitante de la síntesis de DA) (Tabla 3) (Vazin et al., 2009) inducido en la condición de cotratamiento respecto a la incubación solo con el neurotóxico, por lo que podemos suponer un aumento en la síntesis de DA que justificaría también el aumento observado de pmTOR. Es de resaltar que en las células control tratadas con IGF-II, se observó un aumento de la expresión de pmTOR. Se conoce que el complejo mTOR 1 promueve su asociación con IGF-II mejorando la traducción de dicho factor, además promueve la entrada ribosómica del ARNm de IGF-II, lo que conduce a una mayor síntesis de proteínas de IGF-II (Holly, Jeff M. P., Biernacka & Perks, 2019). Por tanto, este mecanismo podría relacionarse con los conocidos efectos metabólicos y como factor neurotrófico del IGF-II. (Dai et al., 2011; Castilla-Cortázar et al., 2011)

1.4. Efecto protector de IGF-II en la función dopaminérgica neuronal

Una de las características definitorias de la EP es la disminución de la síntesis y liberación de DA por las neuronas DAérgicas (Przedborski, 2017). Como se ha mencionado anteriormente, la coadministración de IGF-II con el neurotóxico revirtió parcialmente la reducción de la enzima TH inducida por MPP⁺ (Tabla 3). Respecto a la relación entre IGF-II y TH, los datos obtenidos por Pai y colaboradores (2019) sugieren que en pacientes psicóticos la activación epigenética del potenciador del gen de IGF-II podría a su vez potenciar la síntesis de TH, y por tanto de DA. Futuros estudios serían necesarios para determinar los mecanismos subyacentes a la relación entre IGF-II y la síntesis de TH asociados al parkinsonismo.

Por otro lado, tras su síntesis, la DA es almacenada en vesículas intracelulares, principalmente por el transportador Vmat2, con el fin de evitar su autooxidación y efecto deletéreo (Gainetdinov & Caron, 2003). En el presente modelo celular, el MPP⁺ redujo la expresión de Vmat2 mientras que el cotratamiento con IGF-II permitió la recuperación de los niveles normales (Tabla 3). Este efecto podría deberse a un incremento en la síntesis de Vmat2 en la red trans Golgi, por lo que el nivel de dopamina citosólica disminuiría, impidiendo su oxidación y participación en la formación de ROS (Smeyne & Smeynen, 2013).

Sin embargo, los niveles de dopamina citosólica no solamente se encuentran regulados por la acción de Vmat2, sino que también están influidos por el transportador DAT localizado en la membrana citoplasmática (Lohr et al., 2017). Así, el correcto equilibrio entre ambos transportadores es esencial para el mantenimiento de la homeostasis DAérgica, y por ende de la neurotransmisión y la supervivencia celular, y se ve alterado en la EP (Lohr et al., 2017). Nuestros datos indican que la actividad de DAT se ve altamente comprometida en las neuronas tratadas con MPP⁺ y que es parcialmente recuperada por el efecto de IGF-II (Tabla 3). Una de las proteínas involucradas en la regulación del DAT es la proteína quinasa C (PKC), de forma que una disminución de ésta conlleva un aumento de la actividad del DAT (German et al., 2015). Por ello, la recuperación de la actividad de DAT producida por el IGF-II podría explicarse por la disminución de la PKC tras el tratamiento, como se ha observado en trabajos anteriores (Martin-Montañez et al., 2014; Claros et al., 2021). Cabe señalar que, como se observa en

el modelo animal IGF-II no interfiere en la captación neuronal de MPP⁺ a través de DAT (figura 55), descartándose que el papel neuroprotector de IGF-II pueda deberse a dicho mecanismo.

1.5. Implicación de rIGF-II en la actividad neuroprotectora de IGF-II

Como ya se comentó en la introducción, la interacción entre IGF-II con diferentes receptores celulares dificulta la definición de los mecanismos a través de los cuales se lleva a cabo su actividad biológica (Dupont & LeRoith, 2001; Y. Wang et al., 2017). En el modelo celular usado en esta tesis doctoral se han utilizado varias estrategias para determinar a través de qué receptor ejerce IGF-II su acción neuroprotectora: bloqueando el receptor rIGF-II con un anticuerpo específico (AB) e inhibiendo los receptores de insulina y rIGF-I con BMS. Ambas estrategias han demostrado que la mayor parte de las acciones neuroprotectoras de IGF-II posiblemente se deban a su interacción específica con rIGF-II.

Nuestros resultados sobre la presencia de ROS se pueden contrastar con el trabajo de Dong et al, donde se observa que IGF-II a través de su receptor específico rIGF-II promueve el descenso en la producción de ROS, de la muerte celular y de biomarcadores de estrés oxidativo como LOOH, en un modelo neuronal de estrés oxidativo (Dong et al., 2015). Cabe destacar que parte de la protección oxidativa referida a IGF-II podría estar apoyada por la inducción de un aumento en la actividad del sistema endosomal-lisosomal que se produciría a través de rIGF-II, degradando proteínas anormales que pudieran producirse por la presencia de ROS celular (Y. Wang et al., 2017).

Asimismo, el efecto beneficioso y protector de IGF-II observado en los ensayos sobre las mitocondrias en este modelo celular, se encuentran al menos en gran parte, mediados por la unión a su receptor específico rIGF-II.

Por otro lado, la acción de IGF-II a través de su unión a su receptor específico, también es observada en cuanto a los niveles de NRF2 (Figura 57), sugiriendo que contrarresta los efectos del neurotóxico. Vemos como en la enzima NQO1, los niveles también se ven aumentados gracias a la interacción de IGF-II con su receptor específico.

La vía intracelular estudiada y definida por mTOR, donde éste se ve atenuado por MPP⁺ es recuperada cuando IGF-II ejerce su actividad mediante su interacción con rIGF-II en las neuronas dopaminérgicas.

En cuanto a la función dopaminérgica neuronal, encontramos que el efecto de recuperación de la TH también se desarrolla a partir de la interacción de IGF-II con su receptor específico. Este efecto beneficioso de IGF-II también es atribuible a su interacción con rIGF-II, en el estudio de Vmat2 y del DAT.

Aunque no se haya estudiado en el presente trabajo, uno de los mecanismos por el cual el IGF-II ejerce sus efectos al unirse al rIGF-II es conocido. Así, se ha descrito que la unión de IGF-II con el receptor promueve el reclutamiento hacia la membrana celular y la activación de la esfingosina quinasa, facilitando la producción y liberación al medio extracelular de esfingosina 1 fosfato (S1P), que actúa como ligando del receptor S1P (S1PR) acoplado a proteína G (El-Shewy & Luttrell, 2009). Además, nuestro grupo ha demostrado anteriormente que la activación del S1PR por el agonista Fingolimod produce un aumento de los niveles de NRF2 y su translocación al núcleo (E. Martín-Montañez et al., 2019). Por tanto, los efectos neuroprotectores del IGF-II podrían estar mediados por este mecanismo ya que se ha descrito que la activación del S1PR previene la activación de astrocitos y la neurodegeneración dopaminérgica en modelos de parkinsonismo de ratones tratados con MPTP (Pépin et al., 2020) o rotenona (Rajan et al., 2024). No obstante, esta hipótesis debe ser contrastada en futuros trabajos ya que el conocimiento del papel de S1PR en la EP o en otras enfermedades neurodegenerativas es escaso (Motyl et al., 2021).

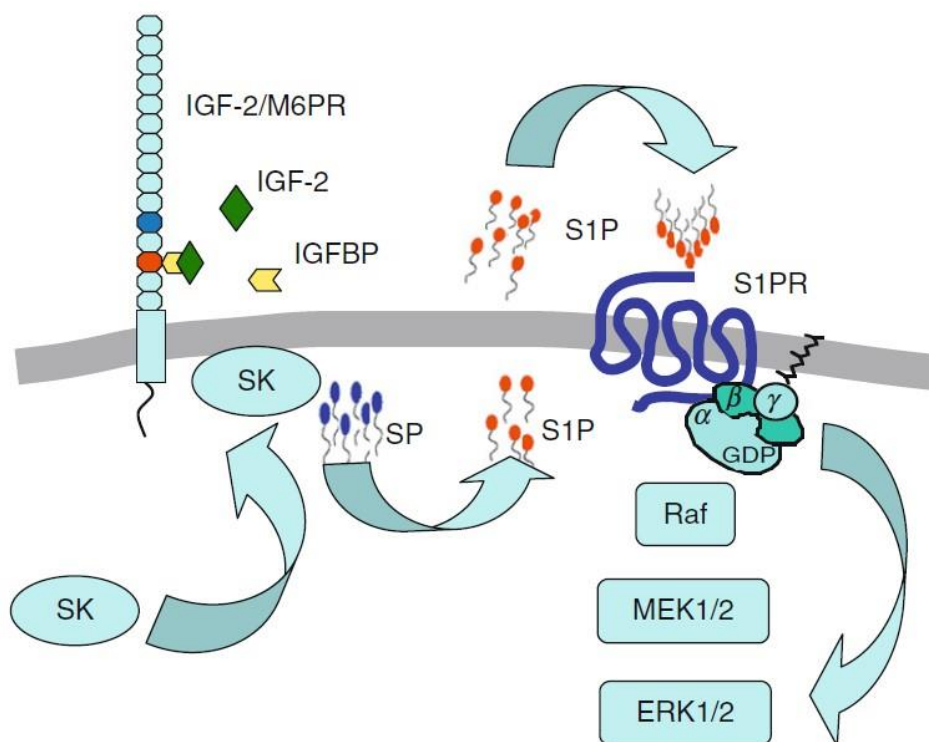


Figura 56: Activación por IGF-II del receptor esfingosina fosfato 1 (S1PR) acoplado a proteína G. La unión de IGF-II a su receptor específico promueve una rápida translocación y activación de la esfingosina quinasa (SK), lo que resulta en la producción y liberación extracelular de esfingosina 1-fosfato (S1P) que actúa como ligando para el grupo de receptores S1P acoplados a proteína G. Siendo la vía RAF/MEK/ERK fundamental para la proliferación, diferenciación y supervivencia celular. Imagen tomada de El-Shewy & Luttrell, 2009.

Otra consideración a tener en cuenta es que, a pesar de los resultados obtenidos, no se puede descartar que parte de estos efectos se deban a una interacción de la molécula con rIGF-I o rIns. Por ello, con la intención de concretar mejor la posible vía de acción del IGF-II, se analizó el uso de LEU, un análogo estructural de IGF-II al que se ha sustituido Tyr (Y) en la posición 27 por Leu (L) (SEQ ID NO: 7) de la secuencia de aminoácidos que lo conforman y que interactúa selectivamente con el rIGF-II, mostrando una afinidad mayor en más de 100 veces para este receptor que para el rIGF-I o rIns (Beukers et al., 1991). Por todo esto, y debido a la concentración utilizada en este estudio, asumimos que sólo rIGF-II es estimulado con la utilización de LEU (Beukers et al., 2000; Amritraj et al., 2012). Por tanto, si los efectos de IGF-II observados en este trabajo estuvieran mediados por su interacción con su receptor específico, entonces serían reproducibles

en presencia de otros agonistas como es LEU. Así, como prueba de concepto, se comprobó los efectos del agonista en relación a mecanismos esenciales para la neuroprotección, como la supervivencia neuronal, la producción de ROS, el potencial de membrana mitocondrial, AOPP, actividad de enzimas antioxidantes y expresión de TH neuronal. Los resultados obtenidos en estos ensayos (Tabla 4) fueron muy similares a los obtenidos con el tratamiento con IGF-II, por lo que se puede afirmar que la acción neuroprotectora observada se deba probablemente a la activación de rIGF-II.

2. Papel protector de IGF-II en un modelo murino de EP

Se ha demostrado que los pacientes de Parkinson exhiben una reducción en la actividad del complejo I mitocondrial (Winklhofer & Haass, 2010). Por ello, para el desarrollo de modelos animales de la EP se usan inhibidores de este complejo, como el MPTP o la rotenona, que inducen la aparición de neurodegeneración parkinsoniana y muestran una sintomatología que remeda, aunque no en su totalidad, a la de los pacientes (Betarbet et al., 2000; Mustapha & Taib, 2021; Verma et al., 2020).

Tabla 4. Resumen de los resultados obtenidos en los experimentos con LEU en el modelo celular de EP descritos en esta tesis doctoral. Abreviaturas y símbolos: ↑, aumento significativo respecto al control; ↓, descenso significativo respecto al control; ↔, no efecto significativo respecto al control.

Modelo celular		
Grupo experimental	MPP ⁺	MPP ⁺ + LEU
Viabilidad celular	↓	↔
Niveles de AOPP	↑	↔
Producción mitocondrial de ROS	↑	↔
mΔΨ	↓	↔
Expresión y traslocación NRF2	↓	↔
Actividad NQO1	↓	↔
Expresión de TH	↓	↔

En consecuencia, las propiedades neuroprotectoras de IGF-II en las neuronas dopaminérgicas fueron analizadas en un modelo murino de EP progresivo inducido por la administración conjunta de MPTP/p. Este modelo se caracteriza por la degeneración progresiva de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales del animal, mediada por la conversión de MPTP al metabolito neurotóxico MPP⁺ en los astrocitos por la enzima MAO-B (Sanfeliu et al., 2023), que posteriormente es captado por las neuronas dopaminérgicas a través del DAT (Sanfeliu et al., 2023) A partir de ese momento, el mecanismo de acción neurotóxico es similar al observado en el modelo celular basado en la administración de MPP⁺, donde se inhibe la actividad del complejo I mitocondrial causando un desequilibrio oxidativo provocado por la producción de ROS, que induce una disfunción mitocondrial y neurotoxicidad (Sanfeliu et al., 2023).

En los estudios comportamentales, los diferentes grupos experimentales no mostraron diferencias significativas a nivel basal en la latencia en la caída y el tiempo de auto-aseo de los diferentes grupos, pero tras administración crónica de MPTP se observó un deterioro motor en los animales (Tabla 5), hecho que coincide con los datos publicados del modelo animal propuesto por otros autores; (Carta et al. 2013; Petroske et al., 2001; Narmashiri et al., 2022). Por otro lado, los grupos de animales tratados con IGF-II, mostraban la movilidad y auto-aseo similar a la obtenida en el grupo control en campo abierto y también en la actividad en las pruebas de R-R. Cabe destacar que el trabajo presentado en esta tesis doctoral es el primero publicado en relación con el estudio del efecto de IGF-II en un modelo murino de EP. Actualmente, otro grupo de investigación ha utilizado IGF-II con administración intranasal en un modelo murino de EP mediante 6-OHDA, obteniendo resultados de restauración de la movilidad en este caso, en la prueba de rotación inducida por apomorfina (H. Y. Zhang et al., 2023); en general sugieren que se revierten los déficits motores conductuales inducidos por 6-OHDA, la pérdida de neuronas DAérgicas y la agregación de α -sin (H. Y. Zhang et al., 2023). En otras patologías como el autismo se ha observado que IGF-II mejora las interacciones sociales y los problemas de memoria en ratones (Steinmetz et al., 2018; Stern et al., 2014).

Tabla 5. Resumen de los resultados obtenidos en los experimentos en el modelo murino de EP descritos en esta tesis doctoral. Abreviaturas y símbolos: ↑, aumento significativo respecto al control; ↓, descenso significativo respecto al control; ↔, no efecto significativo respecto al control, n.a., no analizado.

Modelo murino				
Grupo experimental	MPTP/p	MPTP/p + (23d) IGF-II	MPTP/p + (44d) IGF-II	CO + IGF-II
Prueba R-R	↓	↔	↔	↔
Prueba CA (auto-aseo)	↓	↔	↔	↔
Número de neuronas TH ⁺ SNc	↓ (↓ vs MPTP/p + (44d) IGF-II)	↓ (↓ vs MPTP/p + (44d) IGF-II)	↔	↔
Expresión de TH en CPu	↓ (↓ vs MPTP/p + (44d) IGF-II y MPTP/p + (23d) IGF-II)	↓ (↓ vs MPTP/p + (44d) IGF-II)	↓	↔
Expresión de DAT en CPu	↓ (↓ vs MPTP/p + (44d) IGF-II y MPTP/p + (23d) IGF-II)	↓ (↓ vs MPTP/p + (44d) IGF-II)	↓	↔
Número de células GFAP ⁺ SNc	↑ (↑ vs MPTP/p + (44d) IGF-II y MPTP/p + (23d) IGF-II)	↑ (↑ vs MPTP/p + (44d) IGF-II)	↑	↔
Número de células GFAP ⁺ CPu	↑ (↑ vs MPTP/p + (44d) IGF-II)	↑ (↑ vs MPTP/p + (44d) IGF-II)	↑	↔

Aunque no hemos estudiado los mecanismos de acción celulares y moleculares del IGF-II en el modelo animal, los resultados obtenidos sugieren una capacidad neuroprotectora del IGF-II sobre las neuronas dopaminérgicas de la vía nigroestriatal, que podría estar asociada a la prevención del daño oxidativo y la disfunción mitocondrial inducidas por MPTP/p (Tabla 5) y que por ende conserva la capacidad motora de los animales.

Por otro lado, los resultados muestran diferencias significativas entre los grupos de coadministración de 23 días y 44 días en las cuantificaciones de TH, DAT y GFAP; se aprecia que la administración de IGF-II tras el daño de MPTP (MPTP/p + (23d) IGF-II) es capaz de recuperar parte del daño inducido hacia los niveles control, sin embargo el grupo en el que la coadministración se inicia simultáneamente a la de MPTP (MPTP/p + (44d) IGF-II) la recuperación y/o protección frente al tóxico es más considerable (Tabla 5).



Como se ha indicado anteriormente, IGF-II en el modelo animal no interfiere en la metabolización de MPTP a MPP⁺ (figura 54), ya sea a través de su transformación en los astrocitos o en su captación neuronal por DAT (figuras 52 y 53), descartando, por tanto, que su efecto neuroprotector en la vía nigroestriatal pueda estar relacionado con alguno de estos mecanismos. Sin embargo, el IGF-II parece tener un efecto inhibitor sobre la astrogliía y por tanto de reducción de la neuroinflamación. Así, los animales tratados con MPTP/p mostraron una neuroinflamación evidente, tanto en el estriado como en SNc, al presentar una sobreexpresión de astrocitos reactivos (Tabla 5). Sin embargo, la administración de IGF-II fue capaz de atenuar la respuesta inflamatoria, siendo este efecto mayor cuando se coadministró con MPTP/p desde el día 1 (Tabla 5). Otros autores han observado que existe un efecto antiinflamatorio mediado por los factores de crecimiento de tipo insulínico, como IGF-I; al inhibir parte de la respuesta proinflamatoria provocada por astrocitos activados por MPTP (Yuan et al., 2021). Estos datos, junto a los obtenidos en este trabajo inducen a pensar que IGF-II podría tener también un papel en la regulación de la respuesta inflamatoria, mediante la unión a alguno de sus receptores.

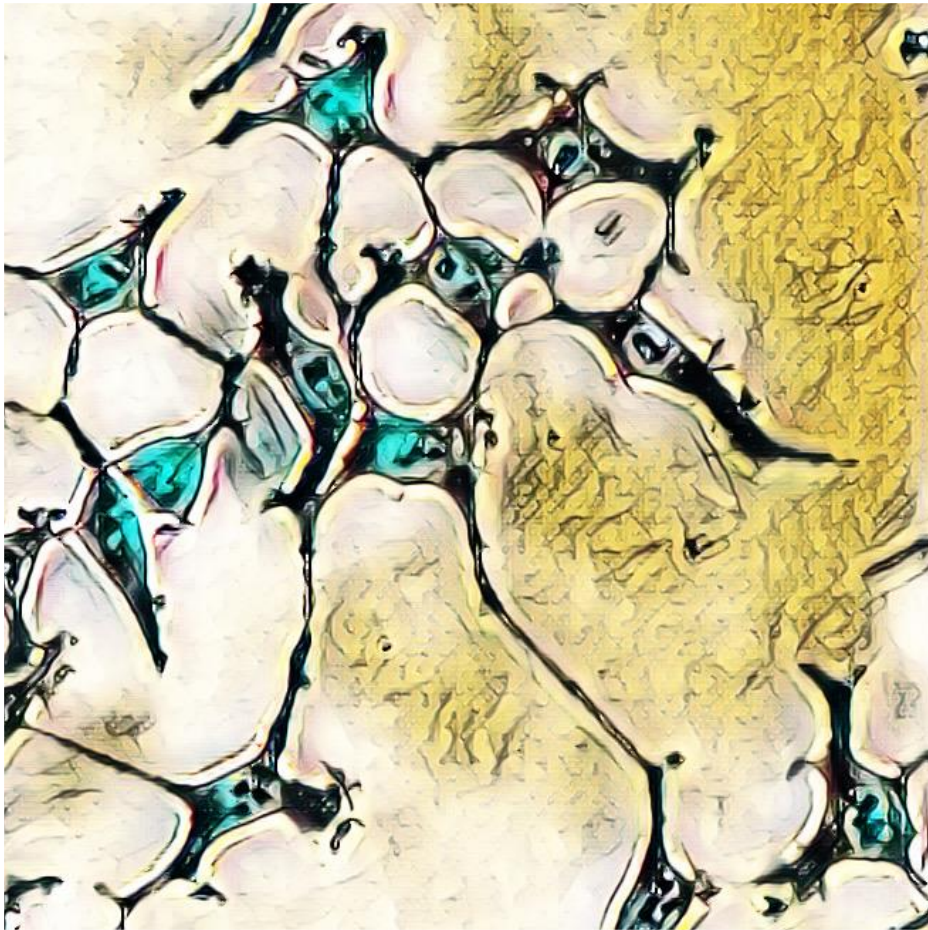
Además de los posibles efectos antioxidantes directos sobre las neuronas dopaminérgicas, no se debe descartar que IGF-II en el modelo animal, pueda ejercer acciones neuroprotectoras y antiparkinsonianas. Acciones que involucren otros mecanismos complementarios como son la degradación por autofagia y el tráfico de proteínas dañadas o modificadas, entre ellas la α -sin, asociados a la fisiopatología de la EP (Wang et al., 2017; X. Wang et al., 2020; García-Huerta et al., 2020). En este sentido, algunos estudios señalan que el deterioro de la vía de señalización insulínica, así como la de los factores IGF-I e IGF-II y sus receptores, favorece la acumulación de α -sin y el aumento del estrés oxidativo en las neuronas (Tong et al., 2009). Aunque en el presente trabajo no se ha estudiado la expresión de esta proteína, no podemos descartar la relación entre la α -sin y el efecto neuroprotector de IGF-II en este modelo animal.

Cabe mencionar que el estudio de la implicación del rIGF-II en la neuroprotección de la vía dopaminérgica no se pudo llevar a cabo en animales debido a la falta de fármacos agonistas y/o antagonistas selectivos específicos para su administración, lo que constituye una limitación del trabajo. No obstante, dados los resultados obtenidos en el estudio realizado en el modelo celular sobre la implicación de este receptor, incluidos

aquellos derivados del uso del agonista específico LEU, es esperable que la mayoría, si no todos estos efectos estén ligados a la activación de rIGF-II.

En resumen, en ambos modelos de EP incluidos en este trabajo e inducidos por MPP⁺ y MPTP se ha observado un aumento de neurodegeneración y muerte celular, con alteraciones en la función neuronal a consecuencia de un desequilibrio oxidativo y una disfunción mitocondrial. Además, la interacción específica de IGF-II, o su análogo LEU, con su receptor rIGF-II tiene efectos neuroprotectores frente a las toxinas al promover vías antioxidantes como NRF2 y mTOR, además de evitar el deterioro estructural y funcional de las mitocondrias, permitiendo la viabilidad neuronal. Por tanto, la vía IGF-II/rIGF-II, podría constituir una nueva diana terapéutica para el tratamiento de diferentes patologías neurodegenerativas en las que el estrés oxidativo neuronal es un factor etiopatogénico fundamental (E. Martín-Montañez et al., 2017; 2014; 2021; Romero-zerbo et al., 2024).

CONCLUSIONES





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

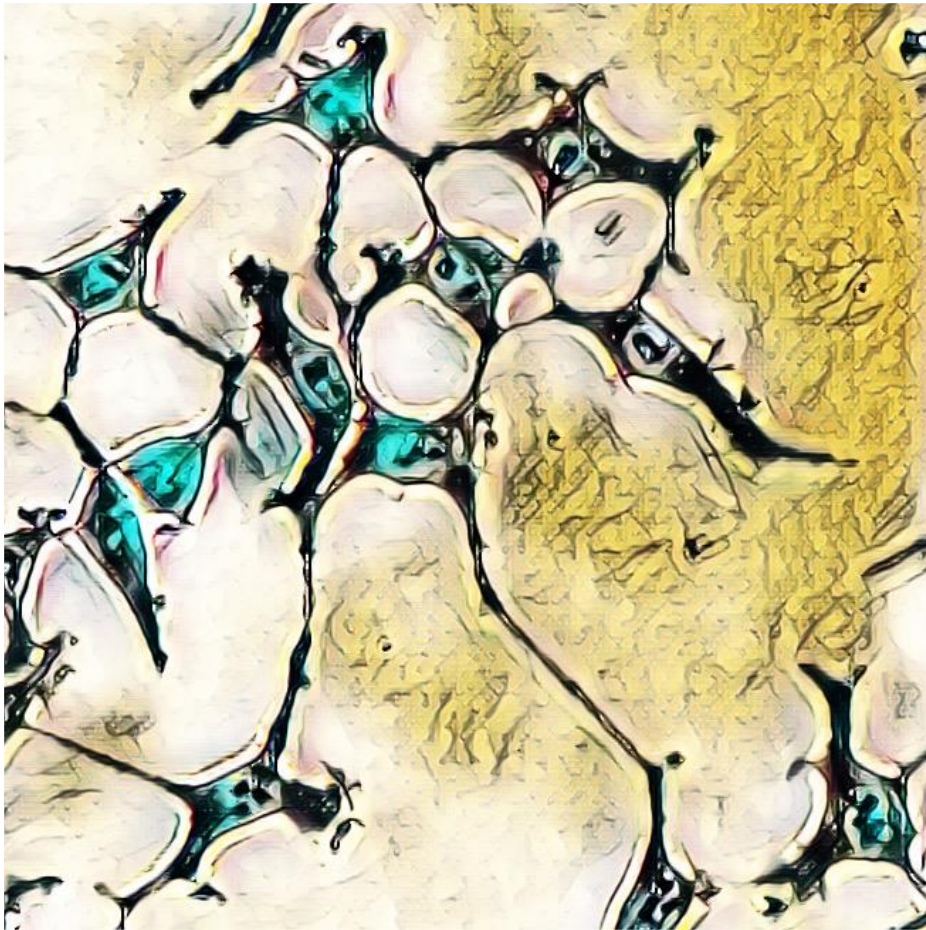
Del análisis pormenorizado de los resultados obtenidos en el presente trabajo se extraen las siguientes conclusiones:

1. El tratamiento con IGF-II en un modelo celular y otro animal de EP, basados en la administración de MPP⁺ y MPTP respectivamente, es capaz de revertir el efecto nocivo de los neurotóxicos sobre las neuronas DAérgicas.
2. En el modelo celular, el IGF-II inhibe la neurodegeneración y recupera la expresión de marcadores celulares asociados a la neurotransmisión de DA.
3. El IGF-II también tiene un efecto antioxidante, inhibiendo la producción excesiva de ROS y recuperando la funcionalidad y morfología mitocondrial en los cultivos de neuronas DAérgicas.
4. Estos efectos antioxidantes del IGF-II en neuronas DAérgicas se deben parcialmente al mantenimiento de vías intracelulares clave en los mecanismos antioxidantes celulares, implicando la vía de señalización de NRF2.
5. Todos estos efectos beneficiosos observados en las neuronas DAérgicas están mediados por la interacción específica de IGF-II con su receptor rIGF-II.
6. En el modelo murino de EP, la administración crónica subcutánea y a dosis bajas de IGF-II evita el desarrollo de deficiencias motoras que remedan a los síntomas motores de pacientes, siendo mayor el efecto si la coadministración de IGF-II y MPTP se realiza desde el primer día del tratamiento con el neurotóxico.
7. De forma asociada, la administración de IGF-II en el modelo murino reduce el daño neurodegenerativo y proinflamatorio del neurotóxico MPTP en la vía dopaminérgica nigroestratal.
8. Considerando la capacidad de IGF-II para proteger las neuronas DAérgicas en ambos modelos estudiados, se propone que esta molécula endógena pueda ser una potencial diana para el desarrollo de una herramienta terapéutica preventiva o paliativa antioxidante para el tratamiento de la EP.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

BIBLIOGRAFÍA





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

- Alam, T. I., Kanki, T., Muta, T., Ukaji, K., Abe, Y., Nakayama, H., Takio, K., Hamasaki, N., & Kang, D. (2003). Human mitochondrial DNA is packaged with TFAM. *Nucleic Acids Research*, *31*(6), 1640–1645. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg251>
- Alberini, C. M. (2023). IGF2 in memory, neurodevelopmental disorders, and neurodegenerative diseases. *Trends in Neurosciences*, *46*(6), 488–502. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2023.03.007>
- Alonso Cánovas, A., Arbizu Lostao, J., Ares Pensado, B., Avilés Olmos, I., Bayés Rusiñol, À., Bellosta Diago, E., Bergareche Yarza, A., Calopa Garriga, M., Carrillo García, F., Carrilla Padilla, F. J., Compta, Y., Cubo Delgado, E., de Fabregues Nebot, O., Gaig Ventura, C., García Caldentey, J., García Ramos, R., Giménez de Béjar, V., Gómez Esteban, J. C., Infante Ceberio, J., ... Valero Merino, C. (2016). *Guías diagnósticas y terapéuticas de la Sociedad Española de Neurología*. https://www.sen.es/pdf/guias/Guia_oficial_de_practica_clinica_en_la_enfermedad_de_Parkinson_2016.pdf
- Amritraj, A., Posse De Chaves, E. I., Hawkes, C., MacDonald, R. G., & Kar, S. (2012). Single-transmembrane domain IGF-II/M6P receptor: Potential interaction with g protein and its association with cholesterol-rich membrane domains. *Endocrinology*, *153*(10), 4784–4798. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1139>
- Arab, K., & Steghens, J. P. (2004). Plasma lipid hydroperoxides measurement by an automated xylene orange method. *Analytical Biochemistry*, *325*(1), 158–163. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2003.10.022>
- Arcos, J., Grunenwald, F., Sepulveda, D., Jerez, C., Urbina, V., Huerta, T., Troncoso-Escudero, P., Tirado, D., Perez, A., Diaz-Espinoza, R., Nova, E., Kubitscheck, U., Rodriguez-Gatica, J. E., Hetz, C., Toledo, J., Ahumada, P., Rojas-Rivera, D., Martín-Montañez, E., Garcia-Fernandez, M., & Vidal, R. L. (2023). IGF2 prevents dopaminergic neuronal loss and decreases intracellular alpha-synuclein accumulation in Parkinson's disease models. *Cell Death Discovery*, *9*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41420-023-01734-1>
- Area-Gomez, E., Guardia-Laguarta, C., Schon, E. A., & Przedborski, S. (2019). Mitochondria, OxPhos, and neurodegeneration: cells are not just running out of gas.

- Journal of Clinical Investigation*, 129(1), 34–45. <https://doi.org/10.1172/JCI120848>
- Armstrong, M. J., & Okun, M. S. (2020). Diagnosis and Treatment of Parkinson Disease: A Review. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 323(6), 548–560. <https://doi.org/10.1001/jama.2019.22360>
- Beletskiy, A., Chesnokova, E., & Bal, N. (2021). Insulin-Like Growth Factor 2 As a Possible Neuroprotective Agent and Memory Enhancer—Its Comparative Expression, Processing and Signaling in Mammalian CNS. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1849. <https://doi.org/10.3390/ijms22041849>
- Ben-Shlomo, Y., Darweesh, S., Llibre-Guerra, J., Marras, C., San Luciano, M., & Tanner, C. (2024). The epidemiology of Parkinson's disease. *The Lancet*, 403(10423), 283–292. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(23\)01419-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(23)01419-8)
- Bendavit, G., Aboukassim, T., Hilmi, K., Shah, S., & Batist, G. (2016). Nrf2 transcription factor can directly regulate mTOR: Linking cytoprotective gene expression to a major metabolic regulator that generates redox activity. *Journal of Biological Chemistry*, 291(49), 25476–25488. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.760249>
- Betarbet, R., Sherer, T. B., Mackenzie, G., Garcia-osuna, M., Panov, A. V., & Greenamyre, J. T. (2000). Chronic systemic pesticide exposure produces pd symptoms Betarbet. *Nat. Neurosci.*, 26, 1301–1306. All Papers/B/Betarbet et al. 2000 - Chronic systemic pesticide exposure produces pd symptoms Betarbet.pdf
- Beukers, M. W., Oh, Y., Zhang, H., Ling, N., & Rosenfeld, R. G. (1991). [Leu27] insulin-like growth factor II is highly selective for the type-II IGF receptor in binding, cross-linking and thymidine incorporation experiments. *Endocrinology*, 128(2), 1201–1203. <https://doi.org/10.1210/endo-128-2-1201>
- Beukers, M. W., Oh, Y., Zhang, H., Ling, N., & Rosenfeld, R. G. (2000). [Leu 27] INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR II IS HIGHLY SELECTIVE FOR THE TYPE-II IGF RE-CEPTOR IN BINDING , CROSS-LINKING AND THYMIDINE INCORPORATION EXPERIMENTS Margot W Beukers , Youngman Oh , Heping Zhang *, Nicholas Ling *, Ron G Rosenfeld I-IGF-II I-IGF. 128(2), 1201–1203.
- Bhat, A. H., Dar, K. B., Anees, S., Zargar, M. A., Masood, A., Sofi, M. A., & Ganie, S. A. (2015).

- Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *74*, 101–110. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2015.07.025>
- Bhatti, J. S., Bhatti, G. K., & Reddy, P. H. (2017). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders — A step towards mitochondria based therapeutic strategies. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, *1863*(5), 1066–1077. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.11.010>
- Bisbal, M., & Sanchez, M. (2019). Neurotoxicity of the pesticide rotenone on neuronal polarization: A mechanistic approach. *Neural Regeneration Research*, *14*(5), 762–766. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.249847>
- Blesa, J., Trigo-Damas, I., Quiroga-Varela, A., & Jackson-Lewis, V. R. (2015). Oxidative stress and Parkinson's disease. *Frontiers in Neuroanatomy*, *9*, 91. <https://doi.org/10.3389/fnana.2015.00091>
- Bockaert, J., & Marin, P. (2015). mTOR in brain physiology and pathologies. *Physiological Reviews*, *95*(4), 1157–1187. <https://doi.org/10.1152/physrev.00038.2014>
- Bonekamp, N. A., Jiang, M., Motori, E., Villegas, R. G., Koolmeister, C., Atanassov, I., Mesaros, A., Park, C. B., & Larsson, N. G. (2021). High levels of TFAM repress mammalian mitochondrial DNA transcription in vivo. *Life Science Alliance*, *4*(11), 1–17. <https://doi.org/10.26508/LSA.202101034>
- Bonifati, D. M., & Kishore, U. (2007). Role of complement in neurodegeneration and neuroinflammation. *Molecular Immunology*, *44*(5), 999–1010. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2006.03.007>
- Brigelius-Flohé, R., & Maiorino, M. (2013). Glutathione peroxidases. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, *1830*(5), 3289–3303. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.11.020>
- Buddhala, C., Loftin, S. K., Kuley, B. M., Cairns, N. J., Campbell, M. C., Perlmutter, J. S., & Kotzbauer, P. T. (2015). Dopaminergic, serotonergic, and noradrenergic deficits in Parkinson disease. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, *2*(10), 949–959. <https://doi.org/10.1002/acn3.246>

- Buneeva, O., Fedchenko, V., Kopylov, A., & Medvedev, A. (2020). Mitochondrial dysfunction in parkinson's disease: Focus on mitochondrial DNA. *Biomedicines*, *8*(12), 1–22. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8120591>
- Burré, J., Sharma, M., & Südhof, T. C. (2018). Cell biology and pathophysiology of α -synuclein. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *8*(3), 1–28. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a024091>
- Carocho, M., & Ferreira, I. C. F. R. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, *51*(1), 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.09.021>
- Carvey, P. M. (2010). Dopamine. In *Encyclopedia of Movement Disorders*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374105-9.00319-1>
- Castilla-Cortázar, I., García-Fernández, M., Delgado, G., Puche, J. E., Sierra, I., Barhoum, R., & González-Barón, S. (2011). Hepatoprotection and neuroprotection induced by low doses of IGF-II in aging rats. *Journal of Translational Medicine*, *9*(1), 103. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-9-103>
- Castro-Caldas, M., Neves Carvalho, A., Peixeiro, I., Rodrigues, E., Lechner, M. C., & Gama, M. J. (2009). GSTpi expression in MPTP-induced dopaminergic neurodegeneration of C57BL/6 mouse midbrain and striatum. *Journal of Molecular Neuroscience*, *38*(2), 114–127. <https://doi.org/10.1007/s12031-008-9141-z>
- Cetin, S., Knez, D., Gobec, S., Kos, J., & Pišlar, A. (2022). Cell models for Alzheimer's and Parkinson's disease: At the interface of biology and drug discovery. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *149*(April). <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.112924>
- Chang, J., Zhang, X. Le, Yu, H., & Chen, J. (2019). Downregulation of RTN1-C attenuates MPP + -induced neuronal injury through inhibition of mGluR5 pathway in SN4741 cells. *Brain Research Bulletin*, *146*(August 2018), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2018.11.026>
- Chen, D. Y., Stern, S. A., Garcia-Osta, A., Saunier-Rebori, B., Pollonini, G., Bambah-Mukku, D., Blitzer, R. D., & Alberini, C. M. (2011). A critical role for IGF-II in memory

- consolidation and enhancement. *Nature*, *469*(7331), 491–499. <https://doi.org/10.1038/nature09667>
- Chen, J., Li, M., Zhou, X., Xie, A., Cai, Z., Fu, C., Peng, Y., Zhang, H., & Liu, L. (2021). Rotenone-Induced Neurodegeneration Is Enabled by a p38–Parkin–ROS Signaling Feedback Loop. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *69*(46), 13942–13952. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c04190>
- Chun, H. S., Gibson, G. E., Degiorgio, L. A., Zhang, H., Kidd, V. J., & Son, J. H. (2001). Dopaminergic cell death induced by MPP+, oxidant and specific neurotoxicants shares the common molecular mechanism. *Journal of Neurochemistry*, *76*(4), 1010–1021. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00096.x>
- Clark, J., & Simon, D. K. (2009). Transcribe to survive: Transcriptional control of antioxidant defense programs for neuroprotection in parkinson's disease. *Antioxidants and Redox Signaling*, *11*(3), 509–528. <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2241>
- Claros, S., Gil, A., Martinelli, M., Valverde, N., Lara, E., Boraldi, F., Pavia, J., Martín-Montañez, E., & Garcia-Fernandez, M. (2021). Impact of Glucocorticoid on a Cellular Model of Parkinson's Disease: Oxidative Stress and Mitochondrial Function. *Brain Sciences*, *11*(8). <https://doi.org/10.3390/BRAINSCI11081106>
- Cuadrado, A. (2016). NRF2 in neurodegenerative diseases. *Current Opinion in Toxicology*, *2*, 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2016.09.004>
- Członkowska, A., Kurkowska-Jastrzębska, I., Członkowski, A., Peter, D., & Stefano, G. B. (2002). Immune processes in the pathogenesis of Parkinson's disease - A potential role for microglia and nitric oxide. *Medical Science Monitor*, *8*(8), 165–178.
- Dai, N., Rapley, J., Ange, M., Yanik, F. M., Blower, M. D., & Avruch, J. (2011). mTOR phosphorylates IMP2 to promote IGF2 mRNA translation by internal ribosomal entry. *Genes and Development*, *25*(11), 1159–1172. <https://doi.org/10.1101/gad.2042311>
- Dawson, T. M., Ko, H. S., & Dawson, V. L. (2010). Genetic Animal Models of Parkinson's Disease. *Neuron*, *66*(5), 646–661. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.04.034>

- Dinkova-Kostova, A. T., & Abramov, A. Y. (2015). The emerging role of Nrf2 in mitochondrial function. *Free Radical Biology and Medicine*, *88*, 179–188. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.04.036>
- Dong, W., Hu, L., & Xu, X. (2015). 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*(7), 1191. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v14i7.10>
- Dovonou, A., Bolduc, C., Soto Linan, V., Gora, C., Peralta, M. R., & Lévesque, M. (2023). Animal models of Parkinson's disease: bridging the gap between disease hallmarks and research questions. *Translational Neurodegeneration*, *12*(1), 1–25. <https://doi.org/10.1186/s40035-023-00368-8>
- Dröse, S., Brandt, U., & Wittig, I. (2014). Mitochondrial respiratory chain complexes as sources and targets of thiol-based redox-regulation. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, *1844*(8), 1344–1354. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2014.02.006>
- Du, L., Lin, L., Li, Q., Liu, K., Huang, Y., Wang, X., Cao, K., Chen, X., Cao, W., Li, F., Shao, C., Wang, Y., & Shi, Y. (2019). IGF-2 Preprograms Maturing Macrophages to Acquire Oxidative Phosphorylation-Dependent Anti-inflammatory Properties. *Cell Metabolism*, *29*(6), 1363–1375.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.01.006>
- Duarte-Jurado, A. P., Gopar-Cuevas, Y., Saucedo-Cardenas, O., Loera-Arias, M. de J., Montes-De-oca-luna, R., Garcia-Garcia, A., & Rodriguez-Rocha, H. (2021). Antioxidant therapeutics in parkinson's disease: Current challenges and opportunities. *Antioxidants*, *10*(3), 1–19. <https://doi.org/10.3390/antiox10030453>
- Dupont, J., & LeRoith, D. (2001). Insulin and insulin-like growth factor I receptors: Similarities and differences in signal transduction. *Hormone Research*, *55*(SUPPL. 2), 22–26. <https://doi.org/10.1159/000063469>
- El-Shewy, H. M., Abdel-Samie, S. A., al Qalam, A. M., Lee, M. H., Kitatani, K., Anelli, V., Jaffa, A. A., Obeid, L. M., & Luttrell, L. M. (2011). Phospholipase C and protein kinase C- β 2 mediate insulin-like growth factor ii-dependent sphingosine kinase 1 activation.

- Molecular Endocrinology*, 25(12), 2144–2156. <https://doi.org/10.1210/me.2011-0101>
- El-Shewy, H. M., Johnson, K. R., Lee, M.-H., Jaffa, A. A., Obeid, L. M., & Luttrell, L. M. (2006). Insulin-like Growth Factors Mediate Heterotrimeric G Protein-dependent ERK1/2 Activation by Transactivating Sphingosine 1-Phosphate Receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 281(42), 31399–31407. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605339200>
- El-Shewy, H. M., & Luttrell, L. M. (2009). Insulin-Like Growth Factor-2/Mannose-6 Phosphate Receptors. In *Vitamins and Hormones* (1st ed., Vol. 80). Elsevier Inc. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(08\)00624-9](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(08)00624-9)
- Elfawy, H. A., & Das, B. (2019). Crosstalk between mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and age related neurodegenerative disease: Etiologies and therapeutic strategies. *Life Sciences*, 218(December 2018), 165–184. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.12.029>
- Esteras, N., Dinkova-Kostova, A. T., & Abramov, A. Y. (2016). Nrf2 activation in the treatment of neurodegenerative diseases: A focus on its role in mitochondrial bioenergetics and function. *Biological Chemistry*, 397(5), 383–400. <https://doi.org/10.1515/hsz-2015-0295>
- Falkenberg, M., Gaspari, M., Rantanen, A., Trifunovic, A., Larsson, N. G., & Gustafsson, C. M. (2002). Mitochondrial transcription factors B1 and B2 activate transcription of human mtDNA. *Nature Genetics*, 31(3), 289–294. <https://doi.org/10.1038/ng909>
- Fernandez, A. M., & Torres-Alemán, I. (2012). The many faces of insulin-like peptide signalling in the brain. *Nature Reviews Neuroscience*, 13(4), 225–239. <https://doi.org/10.1038/nrn3209>
- Ferrari, E., Cardinale, A., Picconi, B., & Gardoni, F. (2020). From cell lines to pluripotent stem cells for modelling Parkinson's Disease. *Journal of Neuroscience Methods*, 340(April), 108741. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2020.108741>
- Fitzgerald, G. S., Chuchta, T. G., & McNay, E. C. (2023). Insulin-like growth factor-2 is a promising candidate for the treatment and prevention of Alzheimer's disease. *CNS*

- Neuroscience and Therapeutics*, June 2022, 1–21. <https://doi.org/10.1111/cns.14160>
- Fornai, F., Schlüter, O. M., Lenzi, P., Gesi, M., Ruffoli, R., Ferrucci, M., Lazzeri, G., Busceti, C. L., Pontarelli, F., Battaglia, G., Pellegrini, A., Nicoletti, F., Ruggieri, S., Paparelli, A., & Südhof, T. C. (2005). Parkinson-like syndrome induced by continuous MPTP infusion: Convergent roles of the ubiquitin-proteasome system and α -synuclein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(9), 3413–3418. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409713102>
- Franco, R., & Cidlowski, J. A. (2009). Apoptosis and glutathione: Beyond an antioxidant. *Cell Death and Differentiation*, *16*(10), 1303–1314. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.107>
- Friedman, J. R., & Nunnari, J. (2014). Mitochondrial form and function. *Nature*, *505*(7483), 335–343. <https://doi.org/10.1038/nature12985>
- Fu, M. H., Wu, C. W., Lee, Y. C., Hung, C. Y., Chen, I. C., & Wu, K. L. H. (2018). Nrf2 activation attenuates the early suppression of mitochondrial respiration due to the α -synuclein overexpression. *Biomedical Journal*, *41*(3), 169–183. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2018.02.005>
- Gainetdinov, R. R., & Caron, M. G. (2003). Monoamine Transporters: From Genes To Behavior. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *43*(3), 261–284. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.43.050802.112309>
- García-Fernández, M., Castilla-Ortega, E., Pedraza, C., Blanco, E., Hurtado-Guerrero, I., Barbancho, M. A., Chun, J., Rodríguez-De-Fonseca, F., Estivill-Torrús, G., & Núñez, L. J. S. (2012). Chronic immobilization in the malpar1 knockout mice increases oxidative stress in the hippocampus. *International Journal of Neuroscience*, *122*(10), 583–589. <https://doi.org/10.3109/00207454.2012.693998>
- García-Fernández, M. I., Gheduzzi, D., Boraldi, F., Paolinelli, C. D., Sanchez, P., Valdivielso, P., Morilla, M. J., Quaglino, D., Guerra, D., Casolari, S., Bercovitch, L., & Pasquali-Ronchetti, I. (2008). Parameters of oxidative stress are present in the circulation of PXE patients. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, *1782*(7–8), 474–481. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2008.05.001>

- García-Huerta, P., Troncoso-Escudero, P., Wu, D., Thiruvalluvan, A., Cisternas-Olmedo, M., Henríquez, D. R., Plate, L., Chana-Cuevas, P., Saquel, C., Thielen, P., Longo, K. A., Geddes, B. J., Lederkremer, G. Z., Sharma, N., Shenkman, M., Naphade, S., Sardi, S. P., Spichiger, C., Richter, H. G., ... Hetz, C. (2020). Insulin-like growth factor 2 (IGF2) protects against Huntington's disease through the extracellular disposal of protein aggregates. *Acta Neuropathologica*, *140*(5), 737–764. <https://doi.org/10.1007/s00401-020-02183-1>
- German, C. L., Baladi, M. G., McFadden, L. M., Hanson, G. R., & Fleckenstein, A. E. (2015). Regulation of the Dopamine and Vesicular Monoamine Transporters: Pharmacological Targets and Implications for Disease. *Pharmacological Reviews*, *67*(4), 1005–1024. <https://doi.org/10.1124/pr.114.010397>
- Gil, A., Martín-Montañez, E., Valverde, N., Lara, E., Boraldi, F., Claros, S., Romero-Zerbo, S. Y., Fernández, O., Pavia, J., & Garcia-Fernandez, M. (2021). Neuronal metabolism and neuroprotection: Neuroprotective effect of fingolimod on menadione-induced mitochondrial damage. *Cells*, *10*(1), 1–15. <https://doi.org/10.3390/cells10010034>
- Girotti, A. W. (1998). Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *Journal of Lipid Research*, *39*(8), 1529–1542. [https://doi.org/10.1016/s0022-2275\(20\)32182-9](https://doi.org/10.1016/s0022-2275(20)32182-9)
- Goedert, M. (2004). α -Synuclein and Neurodegeneration. *Primer on the Autonomic Nervous System: Second Edition*, *2*(July), 204–207. <https://doi.org/10.1016/B978-012589762-4/50055-4>
- Gorecki, A. M., Anyaegbu, C. C., & Anderton, R. S. (2021). TLR2 and TLR4 in Parkinson's disease pathogenesis: the environment takes a toll on the gut. *Translational Neurodegeneration*, *10*(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/s40035-021-00271-0>
- Gross, E. C., Putananickal, N., Orsini, A. L., Vogt, D. R., Sandor, P. S., Schoenen, J., & Fischer, D. (2021). Mitochondrial function and oxidative stress markers in higher-frequency episodic migraine. *Scientific Reports*, *11*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84102-2>
- Grünewald, A., Kumar, K. R., & Sue, C. M. (2019). New insights into the complex role of

- mitochondria in Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology*, 177(September 2018), 73–93. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2018.09.003>
- Guo, J., Zhao, X., Li, Y., Li, G., & Liu, X. (2018). Damage to dopaminergic neurons by oxidative stress in Parkinson's disease (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 41(4), 1817–1825. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3406>
- Habig, W. H., Pabst, M. J., Fleischner, G., Gatmaitan, Z., Arias, I. M., & Jakoby, W. B. (1974). The identity of glutathione S transferase B with ligandin, a major binding protein of liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 71(10), 3879–3882. <https://doi.org/10.1073/pnas.71.10.3879>
- Hattori, N., Tanaka, M., Ozawa, T., & Mizuno, Y. (1991). Immunohistochemical studies on complexes I, II, III, and IV of mitochondria in parkinson's disease. *Annals of Neurology*, 30(4), 563–571. <https://doi.org/10.1002/ana.410300409>
- He, L., He, T., Farrar, S., Ji, L., Liu, T., & Ma, X. (2017). Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 44(2), 532–553. <https://doi.org/10.1159/000485089>
- Hess, D. T., Matsumoto, A., Kim, S. O., Marshall, H. E., & Stamler, J. S. (2005). Protein S-nitrosylation: Purview and parameters. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(2), 150–166. <https://doi.org/10.1038/nrm1569>
- Hirsch, L., Jette, N., Frolkis, A., Steeves, T., & Pringsheim, T. (2016). The Incidence of Parkinson's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Neuroepidemiology*, 46(4), 292–300. <https://doi.org/10.1159/000445751>
- Holdorff, B., Rodrigues e Silva, A. M., & Dodel, R. (2013). Centenary of Lewy bodies (1912–2012). *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)*, 120(4), 509–516. <https://doi.org/10.1007/s00702-013-0984-2>
- Holly, Jeff M. P., Biernacka, K., & Perks, C. M. (2019). *The Neglected Insulin: IGF-II, a Metabolic Regulator with Implications for Diabetes, Obesity, and Cancer*.
- Huang, M., Wang, B., Li, X., Fu, C., Wang, C., & Kang, X. (2019). A-Synuclein: A multifunctional player in exocytosis, endocytosis, and vesicle recycling. *Frontiers in*

- Neuroscience*, 13(JAN), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00028>
- Huenchuguala, S., & Segura-Aguilar, J. (2023). Why are neuromelanin-containing dopaminergic neurons lost in idiopathic Parkinson's disease? *Cellular and Molecular Life Sciences*, 80(10), 1–4. <https://doi.org/10.1007/s00018-023-04880-y>
- Ito, K., Eguchi, Y., Imagawa, Y., Akai, S., Mochizuki, H., & Tsujimoto, Y. (2017). MPP+ induces necrostatin-1-and ferrostatin-1-sensitive necrotic death of neuronal SH-SY5Y cells. *Cell Death Discovery*, 3(December 2016), 1–10. <https://doi.org/10.1038/cddiscovery.2017.13>
- Jenner, P., & Olanow, C. W. (1996). Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurology*, 47(6 SUPPL. 3). https://doi.org/10.1212/wnl.47.6_suppl_3.161s
- Jewett, M., Dickson, E., Brolin, K., Negrini, M., Jimenez-Ferrer, I., & Swanberg, M. (2018). Glutathione S-transferase alpha 4 prevents dopamine neurodegeneration in a rat alpha-synuclein model of Parkinson's disease. *Frontiers in Neurology*, 9(APR). <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00222>
- Jiang, X., Yang, J., & Wang, J. (2023). TFAM knockdown undermines SQSTM1 mRNA stability but retards autophagy flux and inhibits tumor cells proliferation under starvation conditions. *Cell Biology International*, 1–13. <https://doi.org/10.1002/cbin.12031>
- Jiang, Y., Xie, G., Alimujiang, A., Xie, H., Yang, W., Yin, F., & Huang, D. (2023). Protective Effects of Quercetin against MPP+-Induced Dopaminergic Neurons Injury via the Nrf2 Signaling Pathway. *Frontiers in Bioscience - Landmark*, 28(3). <https://doi.org/10.31083/j.fbl2803042>
- Jørgensen, S., Nielsen, E. Ø., Peters, D., & Dyhring, T. (2008). Validation of a fluorescence-based high-throughput assay for the measurement of neurotransmitter transporter uptake activity. *Journal of Neuroscience Methods*, 169(1), 168–176. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2007.12.004>
- Joseph, C., Mangani, A. S., Gupta, V., Chitranshi, N., Shen, T., Dheer, Y., Devaraj, K. B., Mirzaei, M., You, Y., Graham, S. L., & Gupta, V. (2020). Cell cycle deficits in neurodegenerative disorders: Uncovering molecular mechanisms to drive

- innovative therapeutic development. *Aging and Disease*, 11(4), 946–966. <https://doi.org/10.14336/AD.2019.0923>
- Joshi, G., & Johnson, J. A. (2012). The Nrf2-ARE pathway: A valuable therapeutic target for the treatment of neurodegenerative diseases. *Recent Patents on CNS Drug Discovery*, 7(3), 218–229. <https://doi.org/10.2174/157488912803252023>
- Jost, W. H., & Reichmann, H. (2017). "An essay on the shaking palsy" 200 years old. *Journal of Neural Transmission*, 124(8), 899–900. <https://doi.org/10.1007/s00702-017-1684-0>
- Kang, I., Chu, C. T., & Kaufman, B. A. (2018a). The mitochondrial transcription factor TFAM in neurodegeneration: Emerging evidence and mechanisms. *FEBS Letters*, 592(5), 793–811. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12989>.The
- Kang, I., Chu, C. T., & Kaufman, B. A. (2018b). The mitochondrial transcription factor TFAM in neurodegeneration: emerging evidence and mechanisms. *FEBS Letters*, 592(5), 793–811. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12989>
- Kapeta, S., Chondrogianni, N., & Gonos, E. S. (2010). Nuclear erythroid factor 2-mediated proteasome activation delays senescence in human fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*, 285(11), 8171–8184. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.031575>
- Kasai, S., Shimizu, S., Tatara, Y., Mimura, J., & Itoh, K. (2020). Regulation of Nrf2 by mitochondrial reactive oxygen species in physiology and pathology. *Biomolecules*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/biom10020320>
- Kauffman, M. M. K. M. E. M., Kauffman, M. M. K. M. E. M., Traore, K., Zhu, H., Trush, M. A., Jia, Z., & Li, Y. R. (2016). MitoSOX-Based Flow Cytometry for Detecting Mitochondrial ROS. *Reactive Oxygen Species*, 2(5), 361–370. <https://doi.org/10.20455/ros.2016.865>
- Ke, M., Chong, C. M., Zhu, Q., Zhang, K., Cai, C. Z., Lu, J. H., Qin, D., & Su, H. (2021). Comprehensive perspectives on experimental models for Parkinson's disease. *Aging and Disease*, 12(1), 223–246. <https://doi.org/10.14336/AD.2020.0331>
- Kielkopf, C. L., Bauer, W., & Urbatsch, I. L. (2020). Bradford assay for determining protein

- concentration. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2020(4), 136–138. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot102269>
- King, E., O'Brien, J., Donaghy, P., Williams-Gray, C. H., Lawson, R. A., Morris, C. M., Barnett, N., Olsen, K., Martin-Ruiz, C., Burn, D., Yarnall, A. J., Taylor, J. P., Duncan, G., Khoo, T. K., & Thomas, A. (2019). Inflammation in mild cognitive impairment due to Parkinson's disease, Lewy body disease, and Alzheimer's disease. *International Journal of Geriatric Psychiatry*, 34(8), 1244–1250. <https://doi.org/10.1002/gps.5124>
- Koh, J. Y., & Choi, D. W. (1987). Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay. *Journal of Neuroscience Methods*, 20(1), 83–90. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(87\)90041-0](https://doi.org/10.1016/0165-0270(87)90041-0)
- Kwak, M.-K., Wakabayashi, N., Greenlaw, J. L., Yamamoto, M., & Kensler, T. W. (2003). Antioxidants Enhance Mammalian Proteasome Expression through the Keap1-Nrf2 Signaling Pathway. *Molecular and Cellular Biology*, 23(23), 8786–8794. <https://doi.org/10.1128/mcb.23.23.8786-8794.2003>
- Ladrón de Guevara-Miranda, D., Moreno-Fernández, R. D., Gil-Rodríguez, S., Rosell-Valle, C., Estivill-Torrús, G., Serrano, A., Pavón, F. J., Rodríguez de Fonseca, F., Santín, L. J., & Castilla-Ortega, E. (2019). Lysophosphatidic acid-induced increase in adult hippocampal neurogenesis facilitates the forgetting of cocaine-contextual memory. *Addiction Biology*, 24(3), 458–470. <https://doi.org/10.1111/adb.12612>
- Lancaster, M. A., & Knoblich, J. A. (2014). Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells. *Nature Protocols*, 9(10), 2329–2340. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.158>
- Lang, A. E. (2011). A critical appraisal of the premotor symptoms of Parkinson's disease: Potential usefulness in early diagnosis and design of neuroprotective trials. *Movement Disorders*, 26(5), 775–783. <https://doi.org/10.1002/mds.23609>
- Langston, J. W., Forno, L. S., Tetrud, J., Reeves, A. G., Kaplan, J. A., & Karluk, D. (1999). Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure. *Annals of Neurology*,

46(4), 598–605. [https://doi.org/10.1002/1531-8249\(199910\)46:4<598::AID-ANA7>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/1531-8249(199910)46:4<598::AID-ANA7>3.0.CO;2-F)

- Lewitt, M. S., & Boyd, G. W. (2019). The Role of Insulin-Like Growth Factors and Insulin-Like Growth Factor–Binding Proteins in the Nervous System. *Biochemistry Insights*, 12, 117862641984217. <https://doi.org/10.1177/1178626419842176>
- Li, Q., Niu, C., Zhang, X., & Dong, M. (2018). 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 Chemical Neuroscience*, 9(3), 482–493. <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.7b00247>
- Li, X., Zhang, J., Zhang, X., & Dong, M. (2020). Puerarin suppresses MPP⁺/MPTP-induced oxidative stress through an Nrf2-dependent mechanism. *Food and Chemical Toxicology*, 144, 111644. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111644>
- Lind, C., Cadenas, E., Hochstein, P., & Ernster, L. (1990). DT-diaphorase: Purification, properties, and function. *Methods in Enzymology*, 186(C), 287–301. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86122-C](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86122-C)
- Lohr, K. M., Masoud, S. T., Salahpour, A., & Miller, G. W. (2017). Membrane transporters as mediators of synaptic dopamine dynamics: implications for disease. *European Journal of Neuroscience*, 45(1), 20–33. <https://doi.org/10.1111/ejn.13357>
- Lu, J., & Holmgren, A. (2014). The thioredoxin antioxidant system. *Free Radical Biology and Medicine*, 66, 75–87. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.036>
- Luo, S., Kang, S. S., Wang, Z.-H., Liu, X., Day, J. X., Wu, Z., Peng, J., Xiang, D., Springer, W., & Ye, K. (2019). Akt Phosphorylates NQO1 and Triggers its Degradation, Abolishing Its Antioxidative Activities in Parkinson's Disease. *The Journal of Neuroscience*, 39(37), 7291–7305. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0625-19.2019>
- Ma, Q. (2013). Role of Nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 53, 401–426. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-011112-140320>

- Ma, X., He, P., Sun, P., & Han, P. (2010). Lipoic acid: An immunomodulator that attenuates glycinin-induced anaphylactic reactions in a rat model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(8), 5086–5092. <https://doi.org/10.1021/jf904403u>
- Martín-Montañez, E., Millon, C., Boraldi, F., Garcia-Guirado, F., Pedraza, C., Lara, E., Santin, L. J., Pavia, J., & Garcia-Fernandez, M. (2017). IGF-II promotes neuroprotection and neuroplasticity recovery in a long-lasting model of oxidative damage induced by glucocorticoids. *Redox Biology*, *13*(May), 69–81. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.05.012>
- Martin-Montañez, E., Pavia, J., Santin, L. J., Boraldi, F., Estivill-Torru, G., Aguirre, J. A., & Garcia-Fernandez, M. (2014a). Involvement of IGF-II receptors in the antioxidant and neuroprotective effects of IGF-II on adult cortical neuronal cultures. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, *1842*(7), 1041–1051. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.03.010>
- Martin-Montañez, E., Pavia, J., Santin, L. J., Boraldi, F., Estivill-Torru, G., Aguirre, J. A., & Garcia-Fernandez, M. (2014b). Involvement of IGF-II receptors in the antioxidant and neuroprotective effects of IGF-II on adult cortical neuronal cultures. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, *1842*(7), 1041–1051. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.03.010>
- Martín-Montañez, E., Pavia, J., Valverde, N., Boraldi, F., Lara, E., Oliver, B., Hurtado-Guerrero, I., Fernandez, O., & Garcia-Fernandez, M. (2019). The S1P mimetic fingolimod phosphate regulates mitochondrial oxidative stress in neuronal cells. *Free Radical Biology and Medicine*, *137*, 116–130. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.04.022>
- Martín-Montañez, Elisa, Valverde, N., Ladrón de Guevara-Miranda, D., Lara, E., Romero-Zerbo, Y. S., Millon, C., Boraldi, F., Ávila-Gámiz, F., Pérez-Cano, A. M., Garrido-Gil, P., Labandeira-Garcia, J. L., Santin, L. J., Pavia, J., & Garcia-Fernandez, M. (2021). Insulin-like growth factor II prevents oxidative and neuronal damage in cellular and mice models of Parkinson's disease. *Redox Biology*, *46*. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.102095>
- Martínez-Cué, C., & Rueda, N. (2020). Cellular Senescence in Neurodegenerative

- Diseases. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14(February).
<https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00016>
- McKinnon, T., Chakraborty, C., Gleeson, L. M., Chidiac, P., & Lala, P. K. (2001). Stimulation of human extravillous trophoblast migration by IGF-II is mediated by IGF type 2 receptor involving inhibitory G protein(s) and phosphorylation of MAPK. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 86(8), 3665–3674.
<https://doi.org/10.1210/jcem.86.8.7711>
- Meakin, P. J., Chowdhry, S., Sharma, R. S., Ashford, F. B., Walsh, S. V., McCrimmon, R. J., Dinkova-Kostova, A. T., Dillon, J. F., Hayes, J. D., & Ashford, M. L. J. (2014). Susceptibility of Nrf2-Null Mice to Steatohepatitis and Cirrhosis upon Consumption of a High-Fat Diet Is Associated with Oxidative Stress, Perturbation of the Unfolded Protein Response, and Disturbance in the Expression of Metabolic Enzymes but Not with I. *Molecular and Cellular Biology*, 34(17), 3305–3320.
<https://doi.org/10.1128/mcb.00677-14>
- Meng, F., Wang, J., Ding, F., Xie, Y., Zhang, Y., & Zhu, J. (2017). Neuroprotective effect of matrine on MPTP-induced Parkinson's disease and on Nrf2 expression. *Oncology Letters*, 13(1), 296–300. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.5383>
- Mittal, M., Siddiqui, M. R., Tran, K., Reddy, S. P., & Malik, A. B. (2014). Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxidants and Redox Signaling*, 20(7), 1126–1167. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5149>
- Motyl, J. A., Strosznajder, J. B., Wencel, A., & Strosznajder, R. P. (2021). Recent insights into the interplay of alpha-synuclein and sphingolipid signaling in parkinson's disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(12).
<https://doi.org/10.3390/ijms22126277>
- Muddapu, V. R., Dharshini, S. A. P., Chakravarthy, V. S., & Gromiha, M. M. (2020). Neurodegenerative Diseases – Is Metabolic Deficiency the Root Cause? *Frontiers in Neuroscience*, 14, 213. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00213>
- Mudò, G., Mäkelä, J., Di Liberto, V., Tselykh, T. V., Olivieri, M., Piepponen, P., Eriksson, O., Mälkiä, A., Bonomo, A., Kairisalo, M., Aguirre, J. A., Korhonen, L., Belluardo, N., &

- Lindholm, D. (2012). Transgenic expression and activation of PGC-1 α protect dopaminergic neurons in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *69*(7), 1153–1165. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0850-z>
- Muñoz-Manchado, A. B., Villadiego, J., Suárez-Luna, N., Bermejo-Navas, A., Garrido-Gil, P., Labandeira-García, J. L., Echevarría, M., López-Barneo, J., & Toledo-Aral, J. J. (2013). Neuroprotective and reparative effects of carotid body grafts in a chronic MPTP model of Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging*, *34*(3), 902–915. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2012.06.001>
- Murphy, M. P., & Hartley, R. C. (2018). Mitochondria as a therapeutic target for common pathologies. *Nature Reviews Drug Discovery*, *17*(12), 865–886. <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.174>
- Mustapha, M., & Taib, C. N. M. (2021). MPTP-induced mouse model of Parkinson's disease: A promising direction for therapeutic strategies. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, *21*(4), 422–433. <https://doi.org/10.17305/bjbms.2020.5181>
- Narmashiri, A., Abbaszadeh, M., & Ghazizadeh, A. (2022). The effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on the cognitive and motor functions in rodents: A systematic review and meta-analysis. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *140*(July), 104792. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2022.104792>
- Obeso, J. A., Stamelou, M., Goetz, C. G., Poewe, W., Lang, A. E., Weintraub, D., Burn, D., Halliday, G. M., Bezdard, E., Przedborski, S., Lehericy, S., Brooks, D. J., Rothwell, J. C., Hallett, M., DeLong, M. R., Marras, C., Tanner, C. M., Ross, G. W., Langston, J. W., ... Stoessl, A. J. (2017). Past, present, and future of Parkinson's disease: A special essay on the 200th Anniversary of the Shaking Palsy. *Movement Disorders*, *32*(9), 1264–1310. <https://doi.org/10.1002/mds.27115>
- Ouchi, Y., Banno, Y., Shimizu, Y., Ando, S., Hasegawa, H., Adachi, K., & Iwamoto, T. (2013). 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*(22), 9408–9419. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2700-12.2013>

- Pai, S., Li, P., Killinger, B., Marshall, L., Jia, P., Liao, J., Petronis, A., Szabó, P. E., & Labrie, V. (2019). Differential methylation of enhancer at IGF2 is associated with abnormal dopamine synthesis in major psychosis. *Nature Communications*, *10*(1), 2046. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09786-7>
- Pardo, M., Cheng, Y., Sitbon, Y. H., Lowell, J. A., Grieco, S. F., Worthen, R. J., Desse, S., & Barreda-Diaz, A. (2019). Insulin growth factor 2 (IGF2) as an emergent target in psychiatric and neurological disorders. Review. *Neuroscience Research*, *149*, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2018.10.012>
- Paredes-Rodriguez, E., Vegas-Suarez, S., Morera-Herrerias, T., De Deurwaerdere, P., & Miguelez, C. (2020). The Noradrenergic System in Parkinson's Disease. *Frontiers in Pharmacology*, *11*(April), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00435>
- Parent, M., & Parent, A. (2010). Substantia nigra and Parkinson's disease: A brief history of their long and intimate relationship. *Canadian Journal of Neurological Sciences*, *37*(3), 313–319. <https://doi.org/10.1017/S0317167100010209>
- Pasquali-Ronchetti, I., Garcia-Fernandez, M. I., Boraldi, F., Quaglino, D., Gheduzzi, D., De Vincenzi Paolinelli, C., Tiozzo, R., Bergamini, S., Ceccarelli, D., & Muscatello, U. (2006). Oxidative stress in fibroblasts from patients with pseudoxanthoma elasticum: Possible role in the pathogenesis of clinical manifestations. *Journal of Pathology*, *208*(1), 54–61. <https://doi.org/10.1002/path.1867>
- Pavoni, S., Jarray, R., Nassor, F., Guyot, A. C., Cottin, S., Rontard, J., Mikol, J., Mabondzo, A., Deslys, J. P., & Yates, F. (2018). Small-molecule induction of A β -42 peptide production in human cerebral organoids to model Alzheimer's disease associated phenotypes. *PLoS ONE*, *13*(12), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209150>
- Pépin, É., Jalinier, T., Lemieux, G. L., Massicotte, G., & Cyr, M. (2020). Sphingosine-1-Phosphate Receptors Modulators Decrease Signs of Neuroinflammation and Prevent Parkinson's Disease Symptoms in the 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine Mouse Model. *Frontiers in Pharmacology*, *11*(February), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00077>
- Petroske, E., Meredith, G. E., Callen, S., Totterdell, S., & Lau, Y. S. (2001). Mouse model of

- Parkinsonism: A comparison between subacute MPTP and chronic MPTP/probenecid treatment. *Neuroscience*, *106*(3), 589–601. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(01\)00295-0](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(01)00295-0)
- Piao, Y., Kim, H. G., Oh, M. S., & Pak, Y. K. (2012). Overexpression of TFAM, NRF-1 and myr-AKT protects the MPP + -induced mitochondrial dysfunctions in neuronal cells. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, *1820*(5), 577–585. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.08.007>
- Pieńkowska, N., Bartosz, G., & Sadowska-Bartosz, I. (2023). Effect of 6-hydroxydopamine increase the glutathione level in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Acta Biochimica Polonica*, *70*(2), 457–464. https://doi.org/10.18388/abp.2020_6847
- Poeran. (2017). Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience. *Physiology & Behavior*, *176*(12), 139–148. <https://doi.org/10.1038/nrn.2015.8.Neurobiology>
- Poewe, W., Seppi, K., Tanner, C. M., Halliday, G. M., Brundin, P., Volkman, J., Schrag, A.-E., & Lang, A. E. (2017). Parkinson disease. *Nature Reviews Disease Primers*, *3*(1), 17013. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.13>
- Pohl, F., Teixeira-Castro, A., Costa, M. D., Lindsay, V., Fiúza-Fernandes, J., Goua, M., Bermano, G., Russell, W., Maciel, P., & Lin, P. K. T. (2019). Gst-4-dependent suppression of neurodegeneration in c. Elegans models of parkinson's and machado-joseph disease by rapeseed pomace extract supplementation. *Frontiers in Neuroscience*, *13*(OCT), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01091>
- Politis, M., & Niccolini, F. (2015). Serotonin in Parkinson's disease. *Behavioural Brain Research*, *277*, 136–145. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.07.037>
- Poprac, P., Jomova, K., Simunkova, M., Kollar, V., Rhodes, C. J., & Valko, M. (2017). Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases. *Trends in Pharmacological Sciences*, *38*(7), 592–607. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2017.04.005>
- Przedborski, S. (2017). The two-century journey of Parkinson disease research. *Nature Reviews Neuroscience*, *18*(4), 251–259. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.25>

- Przedborski, S., & Vila, M. (2003). The 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model: A tool to explore the pathogenesis of Parkinson's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 991, 189–198. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2003.tb07476.x>
- Puspita, L., Chung, S. Y., & Shim, J. (2017). Oxidative stress and cellular pathologies in Parkinson's disease. *Molecular Brain*, 10(1), 53. <https://doi.org/10.1186/s13041-017-0340-9>
- Raha, S., & Robinson, B. H. (2000). Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends in Biochemical Sciences*, 25(10), 502–508. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(00\)01674-1](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(00)01674-1)
- Rajan, S., Sood, A., Jain, R., Kamatham, P. T., & Khatri, D. K. (2024). Fingolimod exerts neuroprotection by regulating S1PR1 mediated BNIP3-PINK1-Parkin dependent mitophagy in rotenone induced mouse model of Parkinson's disease. *Neuroscience Letters*, 820(November 2023), 137596. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2023.137596>
- Requejo-Aguilar, R. (2023). Cdk5 and aberrant cell cycle activation at the core of neurodegeneration. *Neural Regeneration Research*, 18(6), 1186–1190. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.360165>
- Rinderknecht, E., & Humbel, R. E. (1978). Primary structure of human insulin-like growth factor II. *FEBS Letters*, 89(2), 283–286. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(78\)80237-3](https://doi.org/10.1016/0014-5793(78)80237-3)
- Rivera, E. J., Goldin, A., Fulmer, N., Tavares, R., Wands, J. R., & De La Monte, S. M. (2005). Insulin and insulin-like growth factor expression and function deteriorate with progression of Alzheimer's disease: Link to brain reductions in acetylcholine. *Journal of Alzheimer's Disease*, 8(3), 247–268. <https://doi.org/10.3233/JAD-2005-8304>
- Romero-zerbo, S., Valverde, N., Claros, S., Zamorano-gonzalez, P., Boraldi, F., Lofaro, F., Lara, E., Pavia, J., Garcia-fernandez, M., Gago, B., & Martin-montañez, E. (2024). New molecular mechanisms to explain the neuroprotective effects of insulin-like growth factor II in a cellular model of Parkinson ' s disease. *Journal of Advanced Research*, xxxx. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2024.01.036>

- Ross, A., Xing, V., Wang, T. T., Bureau, S. C., Link, G. A., Fortin, T., Zhang, H., Hayley, S., & Sun, H. (2020). Alleviating toxic α -Synuclein accumulation by membrane depolarization: Evidence from an in vitro model of Parkinson's disease. *Molecular Brain*, *13*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13041-020-00648-8>
- Saharan, S., & Mandal, P. K. (2014). The emerging role of glutathione in alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, *40*(3), 519–529. <https://doi.org/10.3233/JAD-132483>
- Sanfeliu, C., Bartra, C., Suñol, C., & Rodríguez-Farré, E. (2023). New insights in animal models of neurotoxicity-induced neurodegeneration. *Frontiers in Neuroscience*, *17*(January), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fnins.2023.1248727>
- Schapira, A. H. V., Cooper, J. M., Dexter, D., Clark, J. B., Jenner, P., & Marsden, C. D. (1990). Mitochondrial Complex I Deficiency in Parkinson's Disease. *Journal of Neurochemistry*, *54*(3), 823–827. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1990.tb02325.x>
- Schmuck, G., & Kahl, R. (2009). The use of Fluoro-Jade in primary neuronal cell cultures. *Archives of Toxicology*, *83*(4), 397–403. <https://doi.org/10.1007/s00204-008-0360-4>
- Schmued, L. C., & Hopkins, K. J. (2000). Fluoro-Jade B: A high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration. *Brain Research*, *874*(2), 123–130. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)02513-0](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)02513-0)
- Seppi, K., Ray Chaudhuri, K., Coelho, M., Fox, S. H., Katzenschlager, R., Perez Lloret, S., Weintraub, D., Sampaio, C., Chahine, L., Hametner, E. M., Heim, B., Lim, S. Y., Poewe, W., & Djamshidian-Tehrani, A. (2019). Update on treatments for nonmotor symptoms of Parkinson's disease—an evidence-based medicine review. *Movement Disorders*, *34*(2), 180–198. <https://doi.org/10.1002/mds.27602>
- Sepúlveda, D., Grunenwald, F., Vidal, A., Troncoso-Escudero, P., Cisternas-Olmedo, M., Villagra, R., Vergara, P., Aguilera, C., Nassif, M., & Vidal, R. L. (2022). Insulin-like growth factor 2 and autophagy gene expression alteration arise as potential biomarkers in Parkinson's disease. *Scientific Reports*, *12*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-05941-1>



- Sheng, Z. H., & Cai, Q. (2012). Mitochondrial transport in neurons: impact on synaptic homeostasis and neurodegeneration. *Nature Reviews Neuroscience*, *217 A(2)*, 97–100. <https://doi.org/10.1038/nrn3156>. Mitochondrial
- Shiotsuki, H., Yoshimi, K., Shimo, Y., Funayama, M., Takamatsu, Y., Ikeda, K., Takahashi, R., Kitazawa, S., & Hattori, N. (2010). A rotarod test for evaluation of motor skill learning. *Journal of Neuroscience Methods*, *189(2)*, 180–185. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2010.03.026>
- Sies, H. (2015). Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine. *Redox Biology*, *4*, 180–183. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.002>
- Smeyne, M., & Smeynen, R. J. (2013). Glutathione metabolism and Parkinson's disease. *Free Radical Biology and Medicine*, *62*, 13–25. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.001>
- Son, H. J., Choi, J. H., Lee, J. A., Kim, D. J., Shin, K. J., & Hwang, O. (2015). Induction of NQO1 and Neuroprotection by a Novel Compound KMS04014 in Parkinson's Disease Models. *Journal of Molecular Neuroscience*, *56(2)*, 263–272. <https://doi.org/10.1007/s12031-015-0516-7>
- Son, J. H., Chun, H. S., Joh, T. H., Cho, S., Conti, B., & Lee, J. W. (1999). Neuroprotection and neuronal differentiation studies using substantia nigra dopaminergic cells derived from transgenic mouse embryos. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *19(1)*, 10–20. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9870933>
- Song, Q., Peng, S., & Zhu, X. (2021). Baicalein protects against MPP+/MPTP-induced neurotoxicity by ameliorating oxidative stress in SH-SY5Y cells and mouse model of Parkinson's disease. *NeuroToxicology*, *87*, 188–194. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2021.10.003>
- Steen, E., Terry, B. M., Rivera, E. J., Cannon, J. L., Neely, T. R., Tavares, R., Xu, X. J., Wands, J. R., & De La Monte, S. M. (2005). Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease - Is this type 3 diabetes? *Journal of Alzheimer's Disease*, *7(1)*, 63–80. <https://doi.org/10.3233/JAD->

2005-7107

Steinmetz, A. B., Stern, S. A., Kohtz, A. S., Descalzi, G., & Alberini, C. M. (2018). Insulin-Like Growth Factor II Targets the mTOR Pathway to Reverse Autism-Like Phenotypes in Mice. *The Journal of Neuroscience*, *38*(4), 1015–1029. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2010-17.2017>

Stern, S. A., Kohtz, A. S., Pollonini, G., & Alberini, C. M. (2014). Enhancement of Memories by Systemic Administration of Insulin-Like Growth Factor II. *Neuropsychopharmacology*, *39*(9), 2179–2190. <https://doi.org/10.1038/npp.2014.69>

Switon, K., Kotulska, K., Janusz-Kaminska, A., Zmorzynska, J., & Jaworski, J. (2017). Molecular neurobiology of mTOR. *Neuroscience*, *341*, 112–153. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.11.017>

Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, *126*(4), 663–676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>

Tew, K. D., & Townsend, D. M. (2012). Glutathione-S-Transferases As Determinants of Cell Survival and Death. *Antioxidants & Redox Signaling*, *17*(12), 1728–1737. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4640>

Tolosa, E., Garrido, A., Scholz, S. W., & Poewe, W. (2021). Challenges in the diagnosis of Parkinson's disease. *The Lancet Neurology*, *20*(5), 385–397. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(21\)00030-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(21)00030-2)

Tonelli, C., Chio, I. I. C., & Tuveson, D. A. (2018). Transcriptional Regulation by Nrf2. *Antioxidants & Redox Signaling*, *29*(17), 1727–1745. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7342>

Tong, M., Dong, M., & De La Monte, S. M. (2009). Brain insulin-like growth factor and neurotrophin resistance in parkinson's disease and dementia with lewy bodies: Potential role of manganese neurotoxicity. *Journal of Alzheimer's Disease*, *16*(3), 585–599. <https://doi.org/10.3233/JAD-2009-0995>

- Torrente, Y., Bella, P., Tripodi, L., Villa, C., & Farini, A. (2020). Role of Insulin-Like Growth Factor Receptor 2 across Muscle Homeostasis: Implications for Treating Muscular Dystrophy. *Cells*, *9*(2), 441. <https://doi.org/10.3390/cells9020441>
- Trigo-Damas, I., Del Rey, N. L. G., & Blesa, J. (2018). Novel models for parkinson's disease and their impact on future drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, *13*(3), 229–239. <https://doi.org/10.1080/17460441.2018.1428556>
- Tufekci, K. U., Civi Bayin, E., Genc, S., & Genc, K. (2011). The Nrf2/ARE Pathway: A Promising Target to Counteract Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease. *Parkinson's Disease*, *2011*, 1–14. <https://doi.org/10.4061/2011/314082>
- Van Horsen, J., Witte, M. E., Schreibelt, G., & de Vries, H. E. (2011). Radical changes in multiple sclerosis pathogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, *1812*(2), 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.06.011>
- Vazin, T., Becker, K. G., Chen, J., Spivak, C. E., Lupica, C. R., Zhang, Y., Worden, L., & Freed, W. J. (2009). A Novel Combination of Factors, Termed SPIE, which Promotes Dopaminergic Neuron Differentiation from Human Embryonic Stem Cells. *PLoS ONE*, *4*(8), e6606. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006606>
- Verma, M., Zhu, J., Wang, K. Z. Q., & Chu, C. T. (2020). Chronic treatment with the complex I inhibitor MPP+ depletes endogenous PTEN-induced kinase 1 (PINK1) via upregulation of Bcl-2-associated athanogene 6 (BAG6). *Journal of Biological Chemistry*, *295*(23), 7865–7876. <https://doi.org/10.1074/JBC.RA119.010474>
- Vila, M., Jackson-Lewis, V., Guégan, C., Chu Wu, D., Teismann, P., Choi, D. K., Tieu, K., & Przedborski, S. (2001). The role of glial cells in Parkinson's disease. *Current Opinion in Neurology*, *14*(4), 483–489. <https://doi.org/10.1097/00019052-200108000-00009>
- Villavicencio Tejo, F., & Quintanilla, R. A. (2021). Contribution of the nrf2 pathway on oxidative damage and mitochondrial failure in parkinson and alzheimer's disease. *Antioxidants*, *10*(7). <https://doi.org/10.3390/antiox10071069>
- Wallace, D. C., Fan, W., & Procaccio, V. (2010). Mitochondrial Energetics and Therapeutics. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, *5*(1), 297–348. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.4.110807.092314>

- Walter, H. J., Berry, M., Hill, D. J., Cwyfan-Hughes, S., Holly, J. M. P., & Logan, A. (1999). Distinct sites of insulin-like growth factor (IGF)-II expression and localization in lesioned rat brain: Possible roles of IGF binding proteins (IGFBPS) in the mediation of IGF-II activity. *Endocrinology*, *140*(1), 520–532. <https://doi.org/10.1210/endo.140.1.6463>
- Walusinski, O. (2018). Jean-Martin Charcot and Parkinson's disease: Teaching and teaching materials. *Revue Neurologique*, *174*(7–8), 491–505. <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2017.08.005>
- Wang, X. L., Xing, G. H., Hong, B., Li, X. M., Zou, Y., Zhang, X. J., & Dong, M. X. (2014). Gastrodin prevents motor deficits and oxidative stress in the MPTP mouse model of Parkinson's disease: Involvement of ERK1/2-Nrf2 signaling pathway. *Life Sciences*, *114*(2), 77–85. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2014.08.004>
- Wang, X., Lin, L., Lan, B., Wang, Y., Du, L., Chen, X., Li, Q., Liu, K., Hu, M., Xue, Y., Roberts, A. I., Shao, C., Melino, G., Shi, Y., & Wang, Y. (2020). IGF2R-initiated proton rechanneling dictates an anti-inflammatory property in macrophages. *Science Advances*, *6*(48), eabb7389. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abb7389>
- Wang, Y., MacDonald, R. G., Thinakaran, G., & Kar, S. (2017). Insulin-Like Growth Factor-II/Cation-Independent Mannose 6-Phosphate Receptor in Neurodegenerative Diseases. *Molecular Neurobiology*, *54*(4), 2636–2658. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-9849-7>
- Wareski, P., Vaarmann, A., Choubey, V., Safiulina, D., Liiv, J., Kuum, M., & Kaasik, A. (2009). PGC-1 α and PGC-1 β regulate mitochondrial density in neurons. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(32), 21379–21385. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.018911>
- Werner, H., & LeRoith, D. (2014). Insulin and insulin-like growth factor receptors in the brain: Physiological and pathological aspects. *European Neuropsychopharmacology*, *24*(12), 1947–1953. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2014.01.020>
- Weydt, P., Pineda, V. V., Torrence, A. E., Libby, R. T., Satterfield, T. F., Lazarowski, E. R. R., Gilbert, M. L., Morton, G. J., Bammler, T. K., Strand, A. D., Cui, L., Beyer, R. P., Easley,

- C. N., Smith, A. C., Krainc, D., Luquet, S., Sweet, I. R. R., Schwartz, M. W., & La Spada, A. R. (2006). Thermoregulatory and metabolic defects in Huntington's disease transgenic mice implicate PGC-1 α in Huntington's disease neurodegeneration. *Cell Metabolism*, 4(5), 349–362. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.10.004>
- Winklhofer, K. F., & Haass, C. (2010). Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1802(1), 29–44. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.08.013>
- Witko-Sarsat, V., Friedlander, M., Capeillère-Blandin, C., Nguyen-Khoa, T., Nguyen, A. T., Zingraff, J., Jungers, P., & Descamps-Latscha, B. (1996). Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney International*, 49(5), 1304–1313. <https://doi.org/10.1038/ki.1996.186>
- Wojewska, M. J., Otero-Jimenez, M., Guijarro-Nuez, J., & Alegre-Abarategui, J. (2023). Beyond Strains: Molecular Diversity in Alpha-Synuclein at the Center of Disease Heterogeneity. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(17). <https://doi.org/10.3390/ijms241713199>
- Xiao, H., Lv, F., Xu, W., Zhang, L., Jing, P., & Cao, X. (2011). Deprenyl prevents MPP $^{+}$ -induced oxidative damage in PC12 cells by the upregulation of Nrf2-mediated NQO1 expression through the activation of PI3K/Akt and Erk. *Toxicology*, 290(2–3), 286–294. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.10.007>
- Xu, Y., Liu, C., Chen, S., Ye, Y., Guo, M., Ren, Q., Liu, L., Zhang, H., Xu, C., Zhou, Q., Huang, S., & Chen, L. (2014). Activation of AMPK and inactivation of Akt result in suppression of mTOR-mediated S6K1 and 4E-BP1 pathways leading to neuronal cell death in in vitro models of Parkinson's disease. *Cellular Signalling*, 26(8), 1680–1689. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.04.009>
- Yamada, T., McGeer, P. L., & McGeer, E. G. (1991). Relationship of complement-activated oligodendrocytes to reactive microglia and neuronal pathology in neurodegenerative disease. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, 2(2), 71–77. <https://doi.org/10.1159/000107179>
- Yang, Y.-J., Luo, T., Zhao, Y., Jiang, S.-Z., Xiong, J.-W., Zhan, J.-Q., Yu, B., Yan, K., & Wei, B.

- (2020). Altered insulin-like growth factor-2 signaling is associated with psychopathology and cognitive deficits in patients with schizophrenia. *PLOS ONE*, 15(3), e0226688. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226688>
- Yeragani, V., Tancer, M., Chokka, P., & Baker, G. (2010). Arvid Carlsson, and the story of dopamine. *Indian Journal of Psychiatry*, 52(1), 87. <https://doi.org/10.4103/0019-5545.58907>
- Yuan, L. J., Zhang, M., Chen, S., & Chen, W. F. (2021). Anti-inflammatory effect of IGF-1 is mediated by IGF-1R cross talk with GPER in MPTP/MPP+-induced astrocyte activation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 519(308), 111053. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.111053>
- Yuan, Y. he, Yan, W. fen, Sun, J. dong, Huang, J. yang, Mu, Z., & Chen, N. H. (2015). The molecular mechanism of rotenone-induced α -synuclein aggregation: EMPHASIZING the role of the calcium/GSK3 β pathway. *Toxicology Letters*, 233(2), 163–171. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.11.029>
- Zandalinas, S. I., & Mittler, R. (2018). ROS-induced ROS release in plant and animal cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 122(December 2017), 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.11.028>
- Zeng, W., Zhang, W., Lu, F., Gao, L., & Gao, G. (2017). Resveratrol attenuates MPP+-induced mitochondrial dysfunction and cell apoptosis via AKT/GSK-3 β pathway in SN4741 cells. *Neuroscience Letters*, 637, 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.11.054>
- Zhang, H. Y., Jiang, Y. C., Li, J. R., Yan, J. N., Wang, X. J., Shen, J. B., Ke, K. F., & Gu, X. S. (2023). Neuroprotective effects of insulin-like growth factor-2 in 6-hydroxydopamine-induced cellular and mouse models of Parkinson's disease. *Neural Regeneration Research*, 18(5), 1099–1106. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.355815>
- Zhang, J., Bai, Q., Wen, Q., Han, L., Shi, Y., & Zhang, X. (2023). Paeoniflorin protects 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced Parkinson's disease mice by inhibiting oxidative stress and neuronal apoptosis through activating the Nrf2/HO-

1 signaling pathway. *NeuroReport*, 34(5), 255–266.
<https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000001884>

Zhao, M., Wang, B., Zhang, C., Su, Z., Guo, B., Zhao, Y., & Zheng, R. (2021). The DJ1-Nrf2-STING axis mediates the neuroprotective effects of Withaferin A in Parkinson's disease. *Cell Death & Differentiation*, 28(8), 2517–2535.
<https://doi.org/10.1038/s41418-021-00767-2>

Zhu, Z., Yang, C., Iyaswamy, A., Krishnamoorthi, S., Sreenivasmurthy, S. G., Liu, J., Wang, Z., Tong, B. C.-K. K., Song, J., Lu, J., Cheung, K.-H. H., & Li, M. (2019). Balancing mTOR Signaling and Autophagy in the Treatment of Parkinson's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3), 728. <https://doi.org/10.3390/ijms20030728>

Ziegler, A. N., Levison, S. W., & Wood, T. L. (2015). Insulin and IGF receptor signalling in neural-stem-cell homeostasis. *Nature Reviews Endocrinology*, 11(3), 161–170.
<https://doi.org/10.1038/nrendo.2014.208>