



PAPEL DE RECEPTOR DE DOPAMINA D3 EN LA ACTIVACIÓN DE MICROGLIAS Y ASTROCITOS

Tesis

Entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al grado de

Doctor en Ciencias con Mención en

Biología Molecular, Celular y Neurociencias

Facultad de Ciencias

por

ANDRO MONTOYA RIVEROS

Junio, 2018

Directora de Tesis Dra: María Rosa Bono

Co-Director de Tesis Dr: Rodrigo Pacheco.



**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE**

INFORME DE APROBACION

TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato.

ANDRO MONTOYA RIVEROS

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias, mención Biología Molecular, Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día viernes 2 de Marzo del 2018.

Directora de Tesis:

Dra. María Rosa Bono

Co-Director de Tesis:

Dr. Rodrigo Pacheco

Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dr. Marco Tulio Nuñez

Dra. Alejandra Alvarez

Dr. Alejandro Roth

Dr. Flavio Salazar

DEDICATORIA

Dedicada especialmente a mi dulce, hermosa, poderosa y habilidosa madre, Edith Riveros Caniguante, a mi fantástico, eterno y alucinante padre Carlos Enrique "Chino" Montoya Aguirre, y a toda mi linda gente que ha alimentado con fraternidad, cariño y alegría los sueños y exploraciones vividas.

BIOGRAFÍA



Respiro desde el 81, marzo 19, era jueves. Desde el Barros Luco a la población San Joaquín. Criado en los territorios de la hoy comuna de Pedro Aguirre Cerda, tuve la dulce fortuna de cursar hasta sexto básico en el colegio público de mi barrio, el Liceo Enrique Backausse, a menos de cien pasos me esperaba la comidita caliente en el hogar.

Desde pequeño con el gusto de saber cómo funcionan las cosas, desarmaba autitos eléctricos y pedía que me contaran una y otra vez sobre la circulación sanguínea. Fanático de robots, computadores, lápices y colores. Mis padres me pusieron en el bosque desde bebé, ahí aprendí a apreciar la exuberante naturaleza.

A mis 12 años ingresé a séptimo básico en el Liceo de Aplicación y terminé ahí la etapa escolar. Supe más de biología y alucinaba, hasta que estando en tercero medio escuché por ahí el término Biotecnología, me estremeció.

Entré a la Universidad de Chile, a Ingeniería en Biotecnología Molecular en la Facultad de Ciencias. Realicé la memoria de título en el Laboratorio de Neurobiología Celular y Molecular de la Facultad de Medicina, lugar donde también aprendí un nuevo método de desarrollo y satisfacción personal, pintar los grises muros de la ciudad con coloridas criaturas de aerosol.

Encontré donde deseaba conducir mi exploración: los ámbitos que unen la mente con el cuerpo. Quedé en el programa de Doctorado en Ciencias, con mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencias y realicé mi tesis en el laboratorio de Neuroinmunología de la Fundación Ciencia y Vida.

Hoy soy un convencido de la necesidad de la unión entre ciencia y arte para desarrollar una perspectiva holística sobre la exploración de nuestro ser y el entorno.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco especialmente a mi Madre, Edith Riveros Caniguante. Por todo el amor que me has entregado desde el primer latido de mi corazón. Amor que envuelve el eterno apoyo, la tibia contención, la dulce compañía. Hemos vivido máximas alegrías y profundos dolores, y queremos seguir respirando y riendo, abrazándonos fuerte en pena y en risas, lo aprendimos bien de nuestro maestro Chinito. Eres mi fuerza, mi estabilidad, mis ganas, mi diversidad, mi sensibilidad, mi linda historia y mi proyectado futuro, mi hermoso y privilegiado presente por tenerte. Te amo!!!

A mi Padre, Carlos Enrique “Chino” Montoya Aguirre, quien persiste en nosotros y en nuestra atmosfera. Comenzamos juntos esta aventura en este plano físico, lo terminamos igual juntos, yo donde mismo, tú en la divina dimensión del todo. Inspirador de toda mi exploración, me inundaste de conciencia, de arte, de imaginación, de humor, de juego, de fraternidad, de besos y de abrazos. Mi mejor amigo, mi mejor maestro, yo sé que estás conmigo, se siente todo el tiempo tu efecto.

A mis familiares, tíos, tías, primas y primos, que me han entregado tanta buena vida, un lugar calentito de cariño, unas lindas palabras de aliento, una mirada de orgullo por mis locuras. Siempre han creído en mi muchísimo más que yo mismo, infinitas gracias por ello. A mi tata Alberto “Beto” Montoya, quién repletó mis repisas infantiles de enciclopedias obtenidas por capitulo en el periódico, acercándome al mundo del conocimiento desde mi temprana edad y desde su voluntad de maestro gasfiter, él impulsó todo este camino exploratorio. A mi awelita María Caniguante, quien con su extrema dulzura y luminosidad siempre logró anestesiar mis momentos más estresantes, un paraíso terrenal, felicidad y disfrute de la vida ante todo, fortaleza y ternura fundidas en su actitud maravillosa.

Al amor que este último año me ha llenado de alegrías, serenidad, pasión y dulzura. Gracias Macarena, tu abrazo cálido me permitió enfocarme y me dio luz y esperanza en mis días de temor. Adoro tu suave y hermosa presencia.

A mis lindas amistades, amigas y amigos que me han bridado tanta sonrisa, tanta confianza. Cada instante con ustedes me da vitalidad, me hacen sentir especial y capaz. Han acompañado mis “pelás de cable” y las incentivan. Comentamos nuestros sueños y nos acompañamos a cumplirlos. Me encanta crecer con ustedes.

A mi tutor Rodrigo Pacheco, quién pudo contra mis vientos y mis mareas sostenerme e impulsarme a realizar esto. Su actitud paciente, contenida, cercana y fraterna fueron fundamentales para lograr pasar la tormenta. Gracias por creer en mí y promover mi actitud perseverante, entender mis sueños y valorizar mí dispersa exploración del universo. Gracias por

tu innovadora visión de integración y tu motivación que generó el espacio e instancia en los cuales pude explorar lo que me alucina.

A mi co-tutora, la Profesora María Rosa Bono, quien desde su experiencia como académica y mujer, supo motivarme científica y emocionalmente para lograr esto. Gracias por su patrocinio que me permitió estar donde estuve, por su apoyo y contención en la incertidumbre, gracias por alentarme.

Muchas gracias a mis compañeras y compañeros de laboratorio por tanta fraternidad, comprensión y atención. Gracias por sus críticas y ejemplo, siempre las recibí con humildad y aceptación como lo hace un discípulo a su maestro, porque ustedes siempre han producido una atmosfera de afecto que hizo grato llegar a compartir espacio con ustedes aún en mis días más oscuros y ensimismados. Cuantas veces llenaron de lágrimas emotivas mis ojos con sus gestos dulces en mis apariciones fugaces, muchas gracias por eso! Y otras tantas veces en que me sentí débil, su actitud acogedora siempre me levantó el ánimo y el espíritu. No logré aprovecharlos tanto como me hubiese gustado, pero sin duda el observarlos en su paso firme y prodigioso, fue el referente del camino a seguir, y gracias a mirarlos logré finalizar. Los quiero mucho más de lo que expreso. Gracias Carolina Prado, Pancho Contreras, Hugo González, Daniela Elgueta, Dafne Franz y Francisco Osorio que me acompañaron en esto por tantos años. Y gracias Valentina Ugalde, Nicole Rivera, Alexandra Espinoza, Javier Campos y Paola Tiozzo por perpetuar esa calurosa atmosfera de buena onda que continua recibéndome cada vez que piso el Laboratorio de Neuroinmunología en la Fundación Ciencia y Vida.

Agradezco a quienes me prestaron con dedicación su ayuda técnica y varias enriquecedoras conversaciones. Su buena voluntad siempre fue un componente esencial de mis logros. Gracias Sebastián Valenzuela por tu gestión en el Bioterio, que junto a tu generosa atención y persistente soporte dieron sustento a mis experimentos. Gracias Paz Reyes y María José Fuenzalida por su amable y entretenida compañía y asesoría para lograr el registro de mis resultados en la Unidad de Citometría de Flujo. Gracias Hugo Uribe, por ser mi amigo y por proveerme de materiales y variadas risas.

Gracias al financiamiento que ha creído en el proyecto aquí expuesto. A CONICYT por la beca para la realización de Doctorados en Chile 2011-21110148. Al financiamiento otorgado por FONDECYT 1130271 y 1170093, al proporcionado por el proyecto Basal PFB-16, y al otorgado por la Fundación Michael J. Fox proyecto 10332.

Y muchísimas gracias a todas y todos quienes en este camino me han impregnado de conocimiento, optimismo y felicidad. Apariciones fugaces o duraderas, todas me han formado y generan lo que hoy soy, un agradecido, un afortunado, de vivir y de establecer aunque sea por un instante, un vínculo con ustedes.

INDICE GENERAL

INDICE GENERAL	v
INDICE DE TABLAS	vi
INDICE DE FIGURAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	vii
1.- RESUMEN	ix
2.- ABSTRACT	xi
3.- INTRODUCCIÓN	1
4.- HIPÓTESIS	17
5.- Objetivo general.	17
6.- Objetivos específicos.	17
7.- MATERIALES Y MÉTDOOS	18
7.1.- Animales.	18
7.2.- Cultivos de glías.	19
7.3.- Tratamientos <i>in vitro</i> .	20
7.4.- Análisis por RT-PCR.	20
7.5.- Obtención de glías de ratones adultos.	21
7.6.- Citometría de flujo y análisis de inmunofluorescencia.	23
7.7.- Análisis estadístico.	24
8- RESULTADOS	25
8.1.- Análisis de activación de glías in vivo sin estímulo pro-inflamatorio.	25
8.2.- Análisis del estado de activación de glías in vivo sin estímulo pro-inflamatorio previo.	28
8.3.- Análisis de activación de glías in vivo usando el modelo de neuroinflamación inducido por LPS sistémico.	31
8.3.1- Análisis de la neuroinflamación inducida por LPS mediante qPCR.	33
8.3.2.- Inhibición farmacología del receptor de dopamina D3 y análisis de fenotipos activados de microglías in vivo.	34

8.3.3.- Análisis de fenotipos activados de astrocitos in vivo usando el modelo de neuroinflamación inducido por LPS.	37
8.4.- Análisis de marcadores moleculares relacionados con inflamación en cerebro de ratones intoxicados con LPS.	38
8.5.- Análisis de expresión de marcadores moleculares asociados a inflamación en cultivos primarios de glía mixta.	40
9.- DISCUSIÓN	45
10.- BIBLIOGRAFÍA	59
11.- ANEXO	73
Publicaciones	73

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Secuencias de partidores para genes relacionados con neuroinflamación analizados	21
----------	--	----

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Obtención de cultivos primarios de glía mixta e identificación de microglías y astrocitos	26
Figura 2.	Astrocitos de estriado/cerebro-medio en cultivo expresan el receptor de dopamina D3.	27
Figura 3.	Esquema que ilustra la estrategia experimental para análisis de fenotipos activados de glías.	29
Figura 4.	Microglías de ratones D3RKO no presentan diferencias significativas en su activación basal.	30
Figura 5.	Astrocitos de ratones D3RKO presentan basalmente un perfil activado mixto M1-M2.	31
Figura 6.	Aumento de los niveles de citoquinas pro-inflamatorias en cerebro de ratones WT tratados con LPS i.p.	34

Figura 7.	La carencia genética o la inhibición farmacológica del D3R exacerba el aumento de la razón M1/M2 inducido por LPS in vivo.	36
Figura 8.	La deficiencia de D3R resulta en un fenotipo de astrocitos que no responde frente a la neuroinflamación inducida por LPS.	38
Figura 9.	La deficiencia de D3R resulta en una alteración en el patrón de expresión de genes inflamatorios en el cerebro de ratones tratados con LPS sistémico.	39
Figura 10.	Activación de cultivos de Glía mixta WT y D3RKO.	42

LISTA DE ABREVIATURAS

Arg1	:	Arginasa-1
ATP	:	Adenosín trifosfato
BDNF	:	Factor neural derivado de cerebro
cAMP	:	Adenosín monofosfato cíclico
DARs	:	Receptores de dopamina
D3R	:	Receptor de dopamina D3
DAMPs	:	Patrones moleculares asociados a daño
ELA	:	Esclerosis lateral amiotrófica
EM	:	Esclerosis múltiple
EP	:	Enfermedad de Parkinson
GDNF	:	Factor neural derivado de glías
GFAP	:	Proteína ácida fibrilar glial
IL	:	Interleuquina
IFN	:	Interferón
iNOS	:	Óxido nítrico sintetasa inducible
I.p.	:	Intraperitoneal
LPS	:	Lipopolisacárido
MPTP	:	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina

NO	:	Óxido nítrico
PAMPs	:	Patrones moleculares asociados a patógenos
P.i.	:	Posterior a las inyecciones
PRRs	:	Receptores de reconocimiento de patrones
RNS	:	Especies reactivas del nitrógeno
RT-PCR	:	Transcripción reversa seguida por la reacción en cadena de la polimerasa
ROS	:	Especies reactivas del oxígeno
SNC	:	Sistema nervioso central
TGF β	:	Factor de crecimiento tumoral beta
TLRs	:	Receptores tipo Toll
TNF	:	Factor de necrosis tumoral
WT	:	Tipo silvestre (wild type)

1.- RESUMEN

La neuroinflamación constituye un proceso patogénico que conduce a la neurodegeneración en varios trastornos, que incluyen la enfermedad de Parkinson (EP) y la sepsis, entre otros. A pesar de que las células microgliales son los actores centrales en la neuroinflamación, los astrocitos desempeñan un papel regulador clave en este proceso. Nuestros resultados previos indicaron que tanto el antagonismo farmacológico como la deficiencia genética del receptor de dopamina D3 (D3R) atenuaron la neuroinflamación y la neurodegeneración en un modelo de EP inducido por 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP). Aquí, estudiamos cómo la señalización de D3R afecta la dinámica de activación de microglía y astrocitos en el contexto de la sepsis. La neuroinflamación fue inducida por la administración intraperitoneal de LPS. El efecto de la deficiencia genética o el antagonismo farmacológico de D3R en el fenotipo funcional de los astrocitos y la microglía se determinó mediante citometría de flujo. Nuestros resultados muestran que D3R se expresó exclusivamente en astrocitos, pero no en células microgliales. La deficiencia de D3R atenúa la adquisición del fenotipo M2 por células microgliales e induce un fenotipo insensible de astrocitos en el mesencéfalo de ratones que sufren inflamación sistémica. Además, se observaron alteraciones similares en los fenotipos funcionales de las células gliales promovidas por el antagonismo de D3R y por la deficiencia genética de D3R tras la exposición a LPS. Los análisis mecanísticos muestran que la deficiencia de D3R resultó en una fuerte reducción en la expresión de la enzima pro-inflamatoria iNOS y una expresión exacerbada de la proteína anti-inflamatoria Fizz1 *in vivo*. Además, los análisis

realizados en cultivos primarios de células gliales *in vitro* muestran que la deficiencia de D3R resultó nuevamente en una expresión exacerbada de Fizz1 inducida por IL-4, y en una expresión elevada de IL-1 β inducida por LPS. Estos resultados sugieren que la señalización de D3R regula la adquisición de características pro-inflamatorias y anti-inflamatorias por los astrocitos y la microglía, favoreciendo finalmente la activación microglial y promoviendo la neuroinflamación.

2.- ABSTRACT

Neuroinflammation constitutes a pathogenic process leading to neurodegeneration in several disorders, including Parkinson's disease (PD) and sepsis. Despite microglial cells are the central players in neuroinflammation, astrocytes play a key regulatory role in this process. Our previous results indicated that pharmacologic-antagonism or genetic deficiency of dopamine receptor D3 (D3R) attenuated neuroinflammation and neurodegeneration in a PD model induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). Here, we studied how D3R-signalling affects the dynamic of activation of microglia and astrocyte in the context of sepsis. Neuroinflammation was induced by intraperitoneal administration of LPS. The effect of genetic D3R-deficiency or pharmacologic D3R-antagonism in the functional phenotype of astrocytes and microglia was determined by flow cytometry. Our results show that D3R was exclusively expressed in astrocytes, but not in microglial cells. D3R-deficiency attenuates the acquisition of M2-phenotype by microglial cells and promotes an unresponsive phenotype of astrocytes in the midbrain of mice undergoing systemic inflammation. Furthermore, similar alterations in the functional phenotypes of glial cells were observed by D3R-antagonism and genetic deficiency of D3R upon LPS challenge. Mechanistic analyses show that D3R-deficiency resulted in dramatic reduction in the expression of the pro-inflammatory enzyme iNOS and exacerbated expression of the anti-inflammatory protein Fizz1 in glial cells *in vivo*. Additionally, *in vitro* analyses show that D3R-deficiency resulted again in a exacerbated expression of Fizz1 induced by IL-4 and an

elevated expression of IL-1 β induced by LPS. These results suggest that D3R-signalling regulates the acquisition of pro-inflammatory and anti-inflammatory features by astrocytes and microglia, finally favouring microglial activation and promoting neuroinflammation.

3.- INTRODUCCIÓN

Por mucho tiempo se pensó que el sistema nervioso central (SNC) carecía de inmunovigilancia, y que por eso constituía un lugar inmunoprevilegiado. Sin embargo, actualmente existe evidencia contundente indicando que, de manera similar a otros tejidos, el SNC presenta vasos linfáticos que drenan hacia los nódulos linfáticos locales (cervicales) (Louveau y cols., 2015). Además, se sabe que existe una vigilancia inmune constante y dinámica de los tejidos nerviosos, en donde participan células del sistema inmune innato y adaptativo. Con respecto a la inmunovigilancia ejercida por el sistema inmune innato, es sabido actualmente que las células del propio SNC juegan un importante papel detectando señales de peligro mediante receptores específicos en su superficie y consecuentemente iniciando procesos inflamatorios asociados a una posterior infiltración de leucocitos provenientes de la periferia (Ransohoff, 2016; Lucin y Wyss-Coray, 2009).

Dentro del SNC, la microglía son las células inmunes innatas que responden de manera más rápida y robusta frente a perturbaciones del ambiente homeostático de este tejido, tales como infecciones, traumas mecánicos o agregación de proteínas. Frente a este tipo de estímulos, la microglía secreta gran cantidad de moléculas inflamatorias y agentes oxidantes, tales como especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS) promoviendo así la neuroinflamación y destrucción del estímulo inicial (Shemer y cols., 2015; Nayak y cols., 2014; Hellwig y cols., 2013; Beynon y Walker, 2012; Saijo y Glass, 2011; Graeber, 2010; Biber y cols.,

t2007). Más recientemente, los astrocitos han cobrado importancia en la regulación de la neuroinflamación, ya que son partícipes activos en la determinación del comportamiento microglial que ocurre en el SNC (Sofroniew, 2015; Verkhratsky y cols., 2015; Rossi y cols, 2014). Otros tipos celulares, como las células endoteliales, pericitos y hasta las mismas neuronas, también expresan componentes moleculares que son detectados e integrados por la respuesta de la microglía y que, por lo tanto, constituyen componentes relevantes en la regulación de la respuesta inmune. Sin embargo, el rol de estos tipos celulares en la regulación de la respuesta de la microglía ha sido menos estudiado (Ransohoff y Engelhardt, 2012; Ransohoff, 2010).

La respuesta inflamatoria de las células gliales es desencadenada por la estimulación de receptores de membrana que pueden detectar diversas moléculas consideradas señales de peligro. Entre estas moléculas se pueden encontrar componentes estructurales de patógenos, como el lipopolisacárido bacteriano (LPS) presente en la superficie de bacterias Gram-negativas (Poltorak y cols., 2000), o desde el interior de células propias muertas, tales como restos de ácidos nucleicos, metabolitos como el ácido úrico o el ATP, o proteínas mal plegadas acumuladas por el estrés celular (Hanamsagar y cols., 2012).

Los receptores capaces de detectar estas señales de peligro conforman el grupo de los llamados receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), y sus ligandos son denominados en conjunto como patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) o a patógenos (PAMPs). Entre ellos se encuentran los receptores tipo Toll (TLRs) denominados así por su semejanza estructural a los receptores Toll descubiertos en mosca en donde cumplen un papel importante en el desarrollo embrionario. Entre los TLRs se destaca el TLR4 por ser el receptor que media la inflamación causada en el organismo por la presencia del pirógeno LPS (Carpentier y cols.,

2008). La interacción con su ligando genera señales intracelulares que inducen la expresión y secreción de moléculas pro-inflamatorias tales como IL-1 β , IL-6 y TNF α entre otras, efecto mediado por la acción de los factores de transcripción NF- κ B y AP-1 de conocida acción pro-inflamatoria (Lehnardt y cols., 2010). Esta respuesta a su vez, provoca la reactividad de otras células vecinas dando pie de inicio al proceso inflamatorio, que por ser en el SNC, es denominado como neuroinflamación. Inicialmente, las señales pro-inflamatorias inducen la producción de moléculas destinadas a crear un ambiente hostil para los patógenos invasores, tales como especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS). Entre estas especies oxidantes destaca el óxido nítrico (NO), el cual es generado por la acción de la forma inducible de la enzima óxido nítrico sintetasa (iNOS). Además, se promueve la fagocitosis de patógenos, restos de células muertas y agregados de proteínas mal plegadas y oxidadas, todos ellos compuestos nocivos para el ambiente neuronal. Una vez eliminada la amenaza es necesario detener este estrés oxidativo inducido, reparar los tejidos dañados y volver a los parámetros homeostáticos del SNC, proceso que es guiado por señales de carácter anti-inflamatorio como las citoquinas IL-4 y TGF β , y de factores de crecimiento como BDNF y GDNF, entre otros. Como se puede suponer, cuando la etapa anti-inflamatoria no se induce de manera apropiada, el tejido nervioso permanece bajo un ambiente pro-inflamatorio crónico el cual puede producir un deterioro persistente y progresivo, promoviendo muerte neuronal. Es así, como la literatura describe a la neuroinflamación crónica como un elemento perjudicial común entre diversas enfermedades neurodegenerativas, como lo son la enfermedad de Parkinson (EP), de Alzheimer, la esclerosis múltiple (EM) o la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) (Heneka y cols., 2014).

Como se mencionó anteriormente, el actor principal en la neuroinflamación es la microglía. A diferencia de la mayoría de las células del SNC que poseen un origen ectodermal como neuronas, astrocitos y oligodendrocitos, las microglías provienen de tejido mesodermal y colonizan el cerebro en etapas tempranas del desarrollo. Conforman entre el 5 al 20% de las células del SNC según la zona de cerebro observada. Las microglías son consideradas los macrófagos residentes del SNC y como tales, también exhiben estados de activación similares a los descritos según el contexto inflamatorio. Sin embargo, a diferencia de los macrófagos, las microglías pueden proliferar para renovarse en número, sin depender de los precursores hematopoyéticos de la médula ósea (Bruttger y cols., 2015).

En condiciones inflamatorias las microglías adquieren un fenotipo denominado M1, en el cual ha sido descrito el cambio morfológico de las microglías hacia una forma ameboide con pocos y cortos procesos celulares, y que molecularmente es caracterizado por la secreción de citoquinas pro-inflamatorias y de otras moléculas destinadas a eliminar patógenos o células infectadas. Este tipo de activación es acompañado por un aumento en la expresión de ciertas proteínas en la superficie celular como la integrina CD11b, la cual forma parte del antígeno de macrófago-1 (Mac1; dímero formado por CD11b y CD18), y de los receptores del fragmento constante de inmunoglobulinas G, FcγR III y FcγR II, conocidos también como CD16 y CD32, respectivamente. CD11b es un clásico marcador de monocitos y el aumento de su expresión es ampliamente utilizado como señal de una microglía reactiva de fenotipo M1 en estudios *in vivo* mediante técnicas de inmunodetección (Hoogland y cols., 2015). Por otra parte, estímulos anti-inflamatorios como las citoquinas IL-4, IL-10, IL-13 o TGF- β inducen en las microglías la adquisición de un fenotipo denominado M2, caracterizado por un cuerpo celular delgado con numerosos procesos ramificados, producción de mediadores anti-inflamatorios como IL-10 y la

enzima Arginasa1, expresión de proteínas de membrana como el receptor de manosa CD206, y la secreción de una variedad de factores tróficos que incluyen entre otros, BDNF, GDNF, IGF-1, NT-3, NGF, VEGF y PDGF, importantes para promover procesos asociados a la reparación de tejidos dañados, como lo son crecimiento axonal, maduración de oligodendrocitos, remielinización de neuronas y angiogénesis (Cherry y cols., 2014; Appel y cols., 2011; David y Kroner, 2011; Derecki y col., 2011). Existen además otros marcadores usados para identificar el fenotipo M2 como las proteínas secretadas Ym1, la cual es una lectina capaz de unir heparina, y Fizz1, proteína rica en cisteínas, ambas asociadas a la mantención de la matriz extracelular (Raes y cols., 2012).

Tal como se mencionó más arriba, otro actor relevante en los procesos inflamatorios dentro del SNC son los astrocitos, los cuales, además de poseer una variedad de funciones esenciales para el desempeño óptimo de las neuronas en un SNC sano, expresan distintos tipos de RRP en su superficie que le permiten detectar señales de peligro y responder frente a un daño, generando una respuesta comúnmente conocida como astrogliosis. Los astrocitos son el tipo celular más abundantes del SNC comprendiendo casi el 50 % del total de células que lo componen, y al igual que las neuronas se originan a partir de precursores ectodermales. Morfológicamente se clasifican en dos grandes grupos: astrocitos protoplasmáticos, presentes en la materia gris, y los astrocitos fibrilares, presentes principalmente en las zonas altamente mielinizadas de la materia blanca del SNC. En condiciones homeostáticas los astrocitos dominan territorios exclusivos que cubren con sus procesos celulares altamente ramificados sin sobreposición de unos con otros, funcionalmente regulan la osmolaridad y el metabolismo neuronal, controlan la concentración de iones y neurotransmisores en el espacio extracelular, interactúan directamente con la sinapsis neuronal regulando su actividad, y son parte de la unidad de

acoplamiento neurovascular que regula el flujo sanguíneo del SNC. En condiciones patológicas reaccionan generando una serie de cambios moleculares, funcionales y estructurales dependiendo del grado de severidad de la lesión. Frente a un daño leve como un pequeño traumatismo encefálico, infección difusa, o una hipoglicemia o hipoxia transitoria, se produce una respuesta de cambios relativamente menores que incluyen la hipertrofia de los astrocitos y modificaciones en la expresión génica, sin cambios significativos en la morfología o proliferación. Usualmente esta reacción puede ser revertida una vez que ha desaparecido la amenaza volviendo los tejidos a su condición normal. Por otro lado, cuando el daño es más severo, como en una lesión cerebral por contusión, necrosis celular por infarto, presencia de tumores o infiltración de linfocitos autoreactivos, la astrogliosis es de un grado mayor, y durante este proceso ocurre proliferación celular de astrocitos y un extenso sobreposicionamiento de sus procesos celulares formando un denso y firme entretejido, el cual es mediado por numerosas uniones estrechas y que da origen a una estructura conocida como cicatriz glial. Esta respuesta cumple un papel benéfico al crear una barrera que aísla el tejido dañado y sus componentes inflamatorios del resto del tejido sano circundante en el SNC, limitando así la expansión del daño. Sin embargo, la cicatriz glial a su vez se transforma en un impedimento físico para la regeneración y el crecimiento axonal de neuronas dañadas. Histológicamente, el aumento en la expresión de un marcador clásico de tipo celular para astrocitos, como lo es la proteína ácida fibrilar de glía (GFAP), es ampliamente usado como indicador de astrogliosis.

Al igual que las microglías, dependiendo de la naturaleza de la señal de activación, los astrocitos exhiben distintos fenotipos que comprenden patrones de expresión génica propios. Frente a estímulos pro-inflamatorios tales como el LPS o la citoquina interferón gamma (IFN- γ)

son capaces de producir y secretar variadas moléculas que mantienen o exacerbaban la inflamación, tales como las citoquinas IL-1 β , IL-6, IL-17, TNF- α , moléculas pequeñas como la prostaglandina E y el óxido nítrico (NO), además de quimioquinas como CCL2 y CXL10, que inducen reclutamiento de leucocitos perivasculares durante la inflamación provocada por autoinmunidad. Por otro lado, cuando la señal es de naturaleza anti-inflamatoria como la IL-4, los astrocitos expresan citoquinas tales como TFG- β , IL-10, secretan las proteínas Ym1, Fizz1 y el receptor antagonista de la IL-1 (IL-1ra), y aumenta la expresión de Arg1 y la presencia en la membrana de CD206 (Jang y cols, 2013), todos componentes que ayudarán a disminuir el proceso inflamatorio y regenerar el tejido dañado.

Como se ha descrito, tanto microglía como astrocitos son capaces de exacerbar o disminuir la inflamación dentro del SNC, proceso que por ocurrir en el ambiente habitado por las sensibles neuronas debe ser finamente regulado tanto en su fase pro-inflamatoria como en su fase anti-inflamatoria, y por tanto, cualquier defecto en la regulación de alguna de estas fases puede tener repercusión en el funcionamiento y supervivencia neuronal. Ya que la condición sana del SNC es esencialmente anti-inflamatoria debido a numerosas señales que provienen de las mismas glías en estado de reposo, de neuronas y otros tipos celulares, inicialmente se han establecido distintas estrategias que pretenden evitar la inflamación, anulando en su totalidad la reactividad de glías, y evitando el ingreso de células inflamatorias desde la periferia. Sin embargo, estas aproximaciones en las que se usan drogas anti-inflamatorias para combatir el progreso de enfermedades o lesiones del SNC no han tenido la respuesta terapéutica esperada, puesto que al evitar la activación glial, se detienen los procesos propios de la inflamación anteriormente descritos tanto en su fase de eliminación de patógenos y sustancias nocivas (M1), como en su fase de reparación de tejidos (M2), truncando la capacidad propia del SNC de

responder y sanar los daños en sus tejidos. Es por esto que las actuales estrategias para combatir lesiones del SNC y enfermedades neurodegenerativas están orientadas a manipular el balance entre glías pro y anti-inflamatorias, intentando guiar a las células que presentan un fenotipo M1 a convertirse en M2, para así potenciar el poder regenerativo y anti-inflamatorio de estos fenotipos activados. Como es necesaria la predominancia inicial de la activación citotóxica M1 para luego dar paso a la activación regenerativa M2, es importante conocer el tipo de activación de las glías y estudiar la dinámica del balance M1/M2 en las distintas patologías del SNC, con lo cual poder determinar el momento adecuado para llevar a las células con activación M1 hacia el fenotipo neuroprotector M2. Diversas publicaciones existen en este sentido, describiendo la dinámica de aparición de uno u otro fenotipo activado durante el desarrollo de patologías en SNC, concentrando la atención en la activación de microglías, además de macrófagos infiltrados como sucede, por ejemplo, durante una lesión traumática en que hay destrucción de vasos sanguíneos y la consecuente extravasación de células del sistema inmune periférico. En cuanto a los astrocitos, la información sobre la dinámica de activación de estas células se refiere mayormente a la generación de la cicatriz glial y a la activación pro-inflamatoria. Sin embargo, considerando las recientes evidencias que muestran un papel anti-inflamatorio de los astrocitos y algunos de los mecanismos que lo regulan (Jang y cols, 2013), se hace necesario evaluar la dinámica de activación con potencial inflamatorio o anti-inflamatorio de estas células durante el proceso neuroinflamatorio presente en distintas patologías que afectan al SNC.

Adicional a la regulación que ejercen las citoquinas, los neurotransmisores también pueden inducir cambios en las funciones de las glías. Microglías y astrocitos expresan una variedad de receptores de neurotransmisores que regulan funciones como proliferación, migración,

diferenciación, extensión y retracción de procesos celulares, metabolismo y plasticidad sináptica, entre otros, y con el paso del tiempo, también se han acumulado antecedentes acerca del efecto modulador que ejercen algunos neurotransmisores en la neuroinflamación.

Un ejemplo ilustrativo de la regulación de neuroinflamación inducida por neurotransmisores es la ejercida por glutamato. En microglías se ha descrito la expresión funcional de receptores de glutamato ionotrópicos (AMPA, NMDA) y metabotrópicos, los que al unir su sustrato modulan la activación inmunogénica de ellas. La estimulación de receptores AMPA induce la liberación de TNF- α y generan remodelamientos del citoesqueleto relacionados con la fagocitosis y la migración de microglías activadas. Por su lado, la inhibición de los receptores NMDA suprime la activación inducida por LPS y por la proteína neurotóxica Tat del virus de inmunodeficiencia humana en microglías de ratón en cultivo, mientras que *in vivo* suprime la rápida activación de microglías en el hipocampo que se genera frente a un daño isquémico. En cuanto al actuar de los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs) se conoce que la estimulación de los receptores del grupo I atenúa la producción de nitrito (NO₂(-)), TNF- α y L- glutamato, además de inhibir la adquisición de la morfología ameboide clásicamente asociada a la activación de microglías expuestas a LPS (Farso. 2009). Al igual que los mGluRs del grupo I, la estimulación de los receptores mGluR del grupo III disminuye la neurotoxicidad de microglías activadas mediante LPS o por Cromogranina A, péptido secretado que forma parte de placas neuríticas presentes durante la enfermedad de Alzheimer (Taylor, 2003). Por el contrario, la estimulación de los mGluRs del grupo II posee un carácter pro-inflamatorio al promover la liberación de TNF- α , y la neurotoxicidad inducida por cromogranina A (Taylor 2002, 2005).

En astrocitos existe expresión de receptores AMPA, NMDA y metabotrópicos. Inicialmente, los receptores AMPA fueron descritos en astrocitos en cultivo usando técnicas electrofisiológicas, estudio en el cual no se pudo detectar la respuesta de los astrocitos a NMDA. Posteriormente se ha reportado la expresión funcional del receptor NMDA *in situ* (Verkhatsky y Kirchhoff, 2007). Respecto a los receptores metabotrópicos existe algo más de información que los relacionan con la activación de astrocitos. La activación del receptor mGluR3 potencia la liberación de IL-6 en astrocitos activados mediante IL-1 β (Aronica, 2005). Por otro lado, también se ha reportado que su actividad reduce la muerte de astrocitos por apoptosis inducida por un dador de NO, además de atenuar la expresión de iNOS y la liberación de NO en astrocitos activados con LPS (Durand, 2010). La inhibición del receptor mGluR5 en una línea de astrocitos conlleva una disminución de aproximadamente la mitad de la producción de las citoquinas pro-inflamatorias IL-6 e IL-8 inducidas por metanfetamina (Shah y cols., 2012). Acorde a esto, astrocitos provenientes de ratones carentes del receptor mGluR5 presentan resistencia a la muerte por apoptosis inducida por la carencia de oxígeno y glucosa (Paquet y cols., 2012).

Otro ejemplo ilustrativo de receptores de neurotransmisores involucrado en la regulación de la respuesta inflamatoria en células gliales es la familia de los receptores purinérgicos, el cual se divide en tres subgrupos: los receptores metabotrópicos de adenosina P1, los puriceptores metabotrópicos P2Y y los inotrópicos P2X (Burnstock y cols., 2007). La activación del receptor de adenosina A1 presente en microglía produce efectos neuroprotectivos en modelo de trauma encefálico (Haselkorn y cols., 2010), mientras que la estimulación del receptor A2a aumenta la producción de NO en microglías expuestas a LPS (Saura y cols., 2005), induce la expresión de Cox2 y prostaglandina E (Fiebich y cols., 1996) y promueve el cambio morfológico hacia una

forma ameboides (Orr y cols., 2009). Por otro lado, la activación del receptor A2b induce la liberación de la citoquina anti-inflamatoria IL-10 (Koscsó y cols., 2012). El receptor purinérgico P2X4 está involucrado en la iniciación del dolor neuropático y su inhibición farmacológica reduce los síntomas en modelos animales (Inoue y cols., 2007; Tsuda y cols., 2003). Por otro lado, la inhibición de la actividad del receptor P2X7 produce una disminución en la secreción de citoquinas pro-inflamatorias inducidas por LPS (Choi y cols., 2007) y previene la muerte masiva de microglías provocada por la administración combinada de LPS más ATP a un cultivo organotípico de hipocampo de rata (Bernardino y cols., 2008). Además, la deficiencia genética del receptor P2X7 en ratones resulta en una menor producción de IL-1 β y TNF- α en el cerebro de los ratones normales como respuesta a la administración sistémica de LPS (Mingam y cols., 2008). Acorde con esto, la estimulación del receptor P2X7 promueve la producción de superóxido, IL-1 α e IL-1 β en microglías en cultivo. Por el contrario, los receptores P2Y están involucrados en la activación de microglías principalmente orientadas hacia un fenotipo anti-inflamatorio. En este sentido, se ha descrito que la estimulación de estos receptores inhibe la liberación de IL-1 β , IL-6, IL-12 y TNF- α por parte de microglías activadas en cultivo tanto de rata como de ratón (Boucsein y cols., 2003; Ogata y cols., 2003). Sumado a esto, la actividad de los receptores P2Y1/P2Y11 promueve la liberación de IL-10 en microglías de rata expuestas a LPS (Seo, 2008).

La expresión de estos receptores y parte de su papel inflamatorio también han sido descritos en astrocitos. La activación de los receptores de adenosina A2 ha sido asociada a un papel más bien neurotóxico. En este sentido, se ha reportado que el aumento de expresión y actividad del receptor A2a está relacionado con la pérdida de memoria asociada a enfermedad de Alzheimer (Orr, 2015), mientras que estimulación del receptor A2b induce la liberación e IL-6

en una línea celular de astrocitos humanos (Fiebich, 2005) y en el estriado de ratón (Vásquez y cols., 2008). En cambio, la activación de los receptores A1 y A3 en astrocitos inhibe la expresión del factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1) y la producción de NO inducidos por LPS (Gessi y cols., 2013), otorgándoles un carácter neuroprotector. En cuanto a los puriceptores inotrópicos, el aumento de actividad del receptor P2X7 en astrocitos incrementa la secreción de TNF- α (Liu y cols., 2012) y de IL-1 β (Di Virgilio, 2007). Por el contrario, la actividad de los puriceptores metabotrópicos en astrocitos parece tener un papel protector similar al descrito en microglías. La señalización a través del receptor P2Y1 promueve protección, aumentando su capacidad de respuesta frente al daño oxidativo generado por el peróxido de hidrógeno. Esto, mediante la secreción de IL-6 y el aumento de la maquinaria antioxidante, que incluye la expresión de la enzima súper oxido dismutasa 3 (SOD3) y de genes que participan en la síntesis del glutatión (GSH) (Fujita y cols., 2009; Förster y cols., 2016). Sumado a esto, la estimulación de P2Y6 en astrocitos reduce su muerte inducida por TNF- α (Kim, 2003).

Así como el caso de la regulación glutamatérgica y purinérgica de la función glial en neuroinflamación, también hay vasta evidencia sobre la acción de otros neurotransmisores en el control de la neuroinflamación, tales como serotonina (El Oussini y cols., 2016; Glebov y cols., 2015; Miyazaki, 2013; Zeinstra y cols., 2006; Lieb y cols., 2005; Mahé y cols., 2005), noradrenalina (Laureys y cols., 2014; Hinojosa, 2011; Färber y cols., 2005; Prinz y cols., 2001; Tanaka y cols., 2002; Fujita, 1998) y acetilcolina (Di Cesare Mannelli, 2015; Moon y cols., 2008; Carnevale y cols., 2007; Suzuki y cols., 2006), entre otros.

En cuanto a la dopamina, esta constituye un importante mediador que ha sido descrito recientemente como un potente modulador de la inflamación (González y cols., 2013; Pacheco

y cols., 2014; Prado y cols., 2013; Shao y cols., 2013; Torres-Rosas y cols., 2014; Yan y cols., 2015; Sarkar y cols., 2010; Arreola y cols., 2016). Con respecto a esto, varias líneas de evidencias han mostrado que, en tejidos que contienen altos niveles de dopamina en condiciones homeostáticas, ocurre una fuerte disminución de los niveles de dopamina en condiciones de inflamación. Así, la reducción de los niveles de este neurotransmisor se asocia con la aparición de un ambiente pro-inflamatorio en la mucosa intestinal en el caso de las enfermedades inflamatorias intestinales, o en la sustancia *nigra* y estriado en el caso de EP (Pacheco, 2017).

La dopamina puede ejercer sus efectos a través de la estimulación de cinco receptores, los cuales se denominan D1R, D2R, D3R, D4R y D5R. Los receptores de dopamina (DARs) poseen 7 segmentos transmembrana, y señalizan intracelularmente mediante su interacción con la proteína G, regulando la actividad de la enzima adenilato ciclasa encargada de producir cAMP. Se subdividen en dos grupos (tipo I y tipo II) basado en su homología de secuencia aminoacídica con los dos primeros DARs descritos (D1R y D2R), en sus propiedades farmacológicas y en su acoplamiento con la proteína G. Los DARs del tipo I son el D1R y D5R, se acoplan a la subunidad $G\alpha$ estimuladora, por lo que su actividad aumenta la producción de cAMP. Por otro lado, D2R, D3R y D4R conforman grupo de los DARs tipo II, y su señalización induce una caída en el nivel de cAMP, ya que se encuentran acoplados a la subunidad $G\alpha$ inhibitoria (Sibley y cols, 1993). Además de éstas diferencias, los DARs presentan diferentes afinidades por la dopamina, lo que implica por lo tanto, una activación diferencial de los DARs según el nivel de dopamina existente. El receptor de mayor afinidad es el D3R, el cual posee el valor menor de su constante de inhibición ($K_i = 27$ nM), luego viene el D5R ($K_i = 228$ nM), lo sigue el D4R ($K_i = 450$ nM), el D2R ($K_i = 1705$ nM), y finalmente el D1R ($K_i = 2340$ nM) (Strange y cols., 2009).

En cuanto a la expresión y actividad de los DARs en glías, se ha descrito que las microglías corticales de rata expresan D1R, D2R, D4R y D5R, mientras que en ratón, solo se detectaron D1R y D5R (Färber y cols., 2005). Tanto en microglías de rata como de ratón, el uso de dopamina o agonistas de los DARs del tipo I o del tipo II, inducen la capacidad migratoria y disminuyen la producción de óxido nítrico como consecuencia de la exposición a LPS (Färber y cols., 2005). En otro estudio, llevado a cabo con microglías de humanos, obtenidas *post mortem* desde pacientes ancianos o afectados por la enfermedad de Parkinson, se observó la expresión de todos los DARs, excepto el D5R. Además, al igual que en ratón y rata, las microglías de humanos se vuelven migratorias al ser estimuladas con dopamina, efecto contrarrestado por antagonistas de los receptores del tipo II (Mastroeni y cols., 2009). Por otro lado, en un modelo murino de esclerosis lateral amiotrófica, la administración crónica de un antagonista del D4R suprime la activación de microglías, y retarda la aparición y el desarrollo de esta enfermedad neurodegenerativa asociada a neuroinflamación (Tanaka y cols., 2008).

Con respecto a la expresión de DARs en astrocitos, se ha reportado la presencia de los cinco DARs en rata (Miyazaki y cols., 2004) y del D2R en ratón (Li y cols., 2012; Shao y cols., 2013). La estimulación de astrocitos mediante dopamina, induce la fosforilación de la proteína de unión en respuesta a cAMP (CREB), lo cual es un indicador de la actividad de DARs (Miyazaki y cols., 2004). Más recientemente, se ha descrito el papel anti-inflamatorio del receptor D2R expresado en astrocitos, cuyo efecto estaría mediado por el aumento de expresión de la proteína α B-cristalina. La activación de D2R mediante un agonista específico induce neuroprotección en un modelo murino de enfermedad de Parkinson mediado por la toxina MPTP. A su vez, la carencia de este receptor específicamente en astrocitos induce una

tactivación pro-inflamatoria de las glías a nivel basal, que repercute en una mayor neurodegeneración frente a esta toxina (Shao y cols., 2013).

En cuanto a la regulación de las funciones celulares en microglías y astrocitos, mediada específicamente por el receptor de dopamina de mayor afinidad (D3R), no existe mayor información. Sin embargo, se ha demostrado que una mezcla de citoquinas producidas por linfocitos Th1 (IFN- γ , IL-2, TNF- α), Th2 (IL-4, IL-5, IL-10), o por monocitos/macrófagos (IL-1, IL-6, IL-12), induce una potente disminución de la expresión del D3R en cultivos de glía mixta (Lisak y cols., 2009). Este hecho sugiere la existencia de un posible papel de este receptor expresado en glías, en procesos de neuroinflamación. Sumado a esto, el hecho de que la inflamación de tejidos que son ricos en dopamina en condiciones homeostáticas resulte en una fuerte reducción en los niveles de este mediador, refuerzan aún más la hipótesis de que el D3R debe jugar un papel relevante en inflamación, ya que sería estimulado de manera selectiva en condiciones de inflamación (Pacheco, 2017).

Como se mencionó anteriormente, la enfermedad de Parkinson (EP) es una de las patologías en que ocurre una importante caída de los niveles de dopamina respecto del estado saludable, y que además es acompañada por un activo proceso inflamatorio. Esta patología se caracteriza por la pérdida progresiva de las neuronas que producen dopamina en el núcleo del mesencéfalo ventral denominado sustancia *nigra*. Las neuronas dopaminérgicas de la sustancia *nigra*, presentan sus somas en este núcleo del cerebro medio, y prolongan sus axones hacia el cerebro anterior realizando descargas de dopamina en la estructura denominada como núcleo estriado ubicada en la parte ventral del telencéfalo. En este sentido, se ha descrito la disminución de aproximadamente 50 veces del nivel de dopamina presente en el núcleo

estriado a consecuencia de la muerte de éstas neuronas, usando el modelo de EP inducido por MPTP (Brochard y cols., 2009). Esto podría estar restringiendo la actividad de los DARs con menor afinidad y privilegiando la activación selectiva del D3R, el cual posee la mayor afinidad por este neurotransmisor (Pacheco, 2017). Sumado a esto, ratones deficientes de este receptor (D3RKO) presentan una completa resistencia a la neurodegeneración inducida por MPTP (González y cols., 2013).

Considerando el conjunto de estos antecedentes expuestos, decidimos estudiar el papel que podría tener el D3R en microglías y astrocitos, las cuales son las células que residen dentro del SNC con capacidad de regular la inflamación y por lo tanto, son actores relevantes de los procesos neuroinflamatorios.

4.- HIPÓTESIS

El receptor de dopamina D3, expresado en células gliales potencia la activación de microglías y astrocitos favoreciendo la neuroinflamación.

5.- OBJETIVO GENERAL.

Determinar el papel del receptor de dopamina D3 en la activación de glías asociada a neuroinflamación.

6.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- 1.- Determinar la expresión del receptor de dopamina D3 en microglías y astrocitos.
- 2.- Evaluar el papel del receptor de dopamina D3 en la activación de Microglías y Astrocitos en un modelo de neuroinflamación *in vivo*.
- 3.- Estudiar el papel del receptor de dopamina D3 expresado en glías en la activación de estas células *in vitro*

7.- MATERIALES Y MÉTDOOS

7.1.- Animales.

Ratones machos tipo silvestre (WT) C57BL/6 adultos (25 – 35 g) de entre 8 y 14 semanas de edad fueron obtenidos desde The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Ratones de las mismas características pero carentes del receptor D3R (D3RKO) fueron donados por el Dr. M. Caron (Duke University Medical Center, Durham, NC) (Joseph y cols., 2002). En los experimentos de neuroinflamación mediada por MPTP los ratones fueron inyectados intraperitonealmente (i.p.) con cuatro dosis separadas de MPTP-HCl (4 X 20 mg MPTP/kg; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Cada inyección fue administrada en intervalos de 2 h y los ratones fueron sacrificados a los 3, 7 y 10 días posteriores a las inyecciones (p.i.). Para los tratamientos con LPS los ratones fueron inyectados con una única dosis de LPS (5 mg/kg) administrada intraperitonealmente, y los ratones fueron sacrificados a 4 y 24 h después de las inyecciones. Ratones control recibieron inyecciones que contienen solución salina. Para experimentos en que se usaron cultivos de glía mixta, se usaron ratones C57BL/6 (Jackson Laboratories) recién nacidos de 1 a 4 días de edad. Entre 4 a 5 ratones por caja fueron mantenidos a 23°C en un ambiente de humedad controlada, en un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 h, iniciando la luz a las 8 a.m., con acceso a comida y agua *ad libitum*. Todos los procedimientos con animales estuvieron acorde a las guías institucionales para el cuidado y uso de animales establecidas por el bioterio de animales libre de patógenos de la Fundación Ciencia y Vida.

7.2.- Cultivos de glías.

Los cultivos de glía mixta fueron generados a partir de ratones de 1 a 3 días de vida. Los cerebros fueron removidos desde el cráneo, se quitaron las meninges y se disectó la región que contiene al cerebro medio y estriado. El tejido fue disociado usando tripsina al 0.01% en HBSS durante 10 min. Posteriormente, las células fueron lavadas, resuspendidas en medio DME/F12 (HyClone, Utah, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS; Gibco, New York, USA) y el tejido fue disgregado completamente usando pipetas Pasteur de vidrio. Las células obtenidas de cerebro fueron sembradas en botellas T-75 con 10 mL de DMEM/F12 suplementado con L-glutamina 2.5mM y 10% de FBS. Después de incubar por 24 h, el medio de cultivo y el tejido flotando fue retirado y remplazado por medio fresco. Luego, la mitad del volumen del medio se removió cada 72 h hasta lograr 90% de confluencia. En este punto, las células son replaqueadas en una nueva botella T-75. Los cultivos de glía mixta fueron mantenidos a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ y usados entre 14 a 28 días *in vitro*. Las microglías fueron obtenidas desde cultivos de glía mixta de entre 14 y 28 días mediante extracción mecánica usando un agitador rotatorio horizontal a 200 rpm por 2 h. Las microglías contenidas en el sobrenadante fueron centrifugadas a 500 g, resuspendidas en medio DME/F12 (suplementado con L-glutamina 2.5mM y 10% de FBS) y plaqueadas en botella T-25 hasta su uso. La pureza de las microglías obtenidas fue evaluada por inmunotinción con CD11b (98% células CD11b+). La purificación de astrocitos fue realizada desde cultivos de glía mixta mediante la depleción de microglías. Para este propósito, después de 7 días de incubación, los cultivos de glía mixta fueron agitados durante toda la noche a 180 rpm dos veces por semana y el sobrenadante que contiene las microglías fue remplazado por medio fresco cada vez. Luego de esto, la capa de astrocitos fue despegada mediante incubación con

ttripsina 0.01% en HBSS por 30 min, y se sembraron en botella T-75 con medio DME/F12 suplementado con L-glutamina 2.5mM y 10% de FBS. La pureza del cultivo de astrocitos fue evaluada por inmunotinción de GFAP (96% células GFAP+).

7.3.- Tratamientos *in vitro*.

Los cultivos celulares de glía mixta, microglías o astrocitos, fueron expuestos a estímulos pro- o anti-inflamatorio durante 24 h. Para otorgar el estímulo pro-inflamatorio se usó LPS 1µg/mL, mientras que el estímulo anti-inflamatorio se realizó usando IL-4 25 ng/mL. Posteriormente se recuperaron las células y se realizó la extracción de RNA para los análisis de expresión mediante PCR cuantitativo (qPCR).

7.4.- Análisis por RT-PCR.

Se extrajo RNA total desde cultivos de glía mixta, microglía o astrocitos usando el kit E.Z.N.A. total RNA (Omega, Georgia, USA), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La transcripción reversa se efectuó usando Transcriptasa Reversa M-MLV (Invitrogen, California, USA) y partidores de oligo(dT). El PCR de tiempo real fue realizado usando el Master Mix Brilliant II Ultra Fast QPCR (Agilent Technologies, California, USA), seguido por la detección usando el termociclador Stratagene Mx 3000P QPCR System (Stratagene, California, USA). Se evaluaron los niveles de mRNA de Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) para usarlos como control de expresión. La secuencia nucleotídica de los partidores usados se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Secuencias de partidores para genes relacionados con neuroinflamación analizados.

Gen	Partidor directo 5'→3'	Partidor reverso 5'→3'
arg1	TGACATCAAACTCCCCTGACAAC	GCCTTTTCTTCTTCCCAGCAG
fizz1	ACCTTTCCTGAGATTCTGCCCC	CAGTGGTCCAGTCAACGAGTAAGC
ym1	GGCTACACTGGAGAAAATAGTCCCC	CCAACCACTCATTACCCTGATAG
nrf2	TCACACGAGATGAGCTTAGGGCAA	TACAGTTCTGGGCGGCGACTTTAT
nos2	GGTCTTTGACGCTCGGAACTGTAG	CACAAGTGGGTGAACTCCAAGGTG
igf-1	GGACCAGAGACCCTTTGCGGGG	GGCTGCTTTTGTAGGCTTCAGTGG
nt-3	CCGGTGGTAGCCAATAGAACC	GCTGAGGACTTGTGCGGTAC
ngf	TGATCGGCGTACAGGCAGA	GAGGGCTGTGTCAAGGGAAT
bdnf	CCTTACTATGGTTATTTACTACTTCGGTT	TCAGCCAGTGATGTCGTCGTC
gdnf	GCCACCATTAAGACTGAAAAGG	GCCTGCCGATTCTCTCTCT
d3r	GAACCTTAAGCCCACCAT	GAAGGCCCCGAGCACAAT
gadph	TCCGTGTTCTACCCCAATG	GAGTGGGAGTTGCTGTTGAAG

Las reacciones de PCR se realizaron mediante un calentamiento inicial de 5 min a 95°C, seguido de 40 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 60°C y 60 s a 72°C. Los resultados fueron analizados con el programa MxPro e Mx 3000P (Stratagene). El tamaño de los amplicones fue verificado por electroforesis en un gel de agarosa al 1,5% seguido de tinción con bromuro de etidio.

7.5.- Obtención de glías de ratones adultos.

Los ratones fueron anestesiados con una sobredosis de isofluorano al 5% (Sigma-Aldrich) y sacrificados mediante perfusión cardiaca usando PBS 0.125M (pH 7,4). Se extrajeron los cerebros rápidamente y se colocaron en hielo dentro de tubo falcon de 15 ml que contenga 3 ml

de Solución Salina Balanceada de Hank helada hasta comenzar la disección del segmento que contiene al cerebro medio y estriado. Antes de disectar, se lavó el cerebro sobre una placa de tPetri plástica (p60) agregando 3 ml HBSS, se agitó suavemente la placa y se descartó el líquido repitiendo este paso dos veces. Una vez lavado el cerebro se disectó usando un molde para obtener el segmento deseado. Para disgregar el tejido se cortó en trozos pequeños (inferior a 1 mm) sobre una placa Petri usando un bisturí. Realizado esto, se agregaron 3 ml de solución de disgregación sobre el tejido molido, y usando una punta de 1 mL con la punta cortada (para hacerla más ancha y no dañe el tejido) se tomó el contenido de la placa y se pasó a un tubo falcon nuevo de 15 mL con 2 mL de solución de disgregación (en total quedan 5 mL de sol. de disgregación más el tejido molido). La solución de disgregación se preparó en HBSS con 1mg/ml de Colagenasa Type IV (Gibco, NewYork, USA) y 0.25 mg/mL de DNasa I (Roche, Mannheim, Germany). El tejido molido, se incubó a 37°C durante 45 minutos con agitación suave usando un rotador. Luego se extrajo el contenido del tubo usando una punta de 1 mL con la punta cortada y depositó dentro de un canastillo con maya de 70 micrones colocado sobre una placa de Petri p60. Para terminar de disgregar el tejido se usó la parte de atrás del embolo de una jeringa de 1 ml para hacer presión sobre la maya del canastillo y obtener la suspensión de células disgregadas. Durante el proceso se agregaron 3 a 5 mL para ir arrastrando restos del tejido que puedan quedar pegados en las paredes del canastillo o dentro del tubo. Todo el líquido se pasó a un tubo falcon de 15 mL nuevo y se centrifugó a 400 g durante 5 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 5 mL de HBSS helado. Los tubos se mantuvieron siempre en hielo. A partir de esta suspensión de células disgregada se tomó una muestra para marcarla con anticuerpos y realizar el análisis por citometría de flujo.

7.6.- Citometría de flujo y análisis de inmunofluorescencia.

Las secciones del cerebro que contienen al cerebro medio y estriado de ratones adultos fueron trozados y disgregados usando Colagenasa Tipo IV 1 mg/ml (Gibco, NewYork, USA) y DNase I 0.25 mg/mL (Roche, Mannheim, Germany). Después de la disgregación las células son pasadas por un canastillo con maya de 70 micrones para obtener una suspensión de células disgregadas. Para la detección de los marcadores fenotípicos de superficie en microglías, las células fueron fijadas y luego inmunoteñidas usando los siguientes anticuerpos acoplados a flurocromos: anti-ratón CD45 acoplado a PE, anti-ratón CD11b acoplado a PE-Cy7, anti-ratón CD206 acoplado a APC, y anti-ratón CD16/32 acoplado a APC-Cy7, todos de Biolegend (San Diego, CA, USA). Para la detección intracelular de los marcadores fenotípicos en astrocitos, las células fueron previamente fijadas y permeabilizadas. Luego, las células son inmunoteñidas usando los siguientes anticuerpos acoplados a flurocromos: anti-ratón GFAP acoplado a PE (BD, California, USA), anti-ratón iNOS acoplado a FITC (BD), y anti-ratón Arg1 acoplado a APC (R&D Systems Inc., Minneapolis, USA). Los análisis de citometría de flujo se realizaron usando el equipo FACS Canto II (BD) con una configuración idéntica del instrumento. Los datos fueron analizados usando el programa BD FACSDiva (BD).

Para el análisis de inmunofluorescencia, las células extraídas desde cultivos de glía mixta, microglía o astrocitos fueron montadas sobre cubre objeto de vidrio circular y fijadas con 4% de paraformaldehído, permeabilizadas usando Triton X-100 al 0.1% en PBS y luego se saturadas con solución de bloqueo que contiene BSA al 5% y Triton X-100 al 0.1% en PBS. Luego de esto, las células fueron incubadas toda la noche a 4°C en solución de incubación (BSA al 1% and Triton al 0.1% X-100 en PBS) que contiene los siguientes anticuerpos primarios: Rata anti-ratón CD11b (1:500; Serotec, Raleigh, USA), Conejo anti-ratón GFAP (1:1000; Synaptic System,

tGoettingen, Germany) y Conejo anti-ratón D3R (1:100; AbCam, Boston, USA). Luego de tres lavados con solución de incubación, las células fueron incubadas por 1 hr. a temperatura ambiente con los anticuerpos Cabra anti-conejo acoplado a Alexa-fluor 488 (para la inmunotinción de D3R) o Cabra anti-conejo acoplado a Alexafluor 546 (para la inmunotinción de GFAP) (1:200; Invitrogen, Oregon, USA) y Cabra anti-rata acoplado a DyLigth 488 (para la inmunotinción de CD11b) (1:200; Jackson ImmunoResearch Laboratories), y después de repetidos lavados, las células fueron montadas usando Medio de Montaje Fluorescente DAKO (Dako, California, USA). Los núcleos de las células fueron marcados con DAPI. Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio de fluorescencia invertido Olympus IX71 (Olympus, Tokyo, Japan) acoplado a una unidad de fuente de poder (Olympus U-RFL-T).

7.7.- Análisis estadístico.

Todos los valores con expresados como la media \pm SEM. Los análisis estadísticos fueron realizados con la prueba t de Student no pareado de dos colas, cuando se compararon sólo dos grupos y con ANOVA de una dirección seguido de una prueba pos-hoc de Tukey, cuando se compararon más de dos grupos (GraphPad Software). Valores $P < 0.05$ fueron considerados significativos.

8- RESULTADOS

8.1.- Expresión del receptor de dopamina D3 en glías.

Para determinar la expresión del D3R en células gliales, establecimos un protocolo de purificación y cultivo primario de microglías y astrocitos. Mediante inmunofluorescencia usando marcadores específicos para microglías o astrocitos, y DAPI para marcar los núcleos celulares, realizamos el conteo de células dentro del campo visual y determinamos los porcentajes de purificación. El método de purificación mediante extracción usado para las microglías generó cultivos con una pureza de 98%, mientras que los astrocitos purificados mostraron un 96% de pureza (Figura 1).

Establecidos los protocolos de cultivo y purificación de glías, analizamos la expresión del D3R a nivel transcripcional mediante RT-PCR en los cultivos primarios de glía mixta, y cultivos de microglías y astrocitos purificados (Figura 2A). Como control positivo usamos RNA mensajero (mRNA) proveniente del núcleo estriado de ratón. Mediante reacciones de PCR usando mRNA obtenido de cultivos de glía mixta y de astrocitos purificados obtuvimos el amplicón correspondiente indicando la expresión transcripcional de D3R, lo cual no ocurrió al usar mRNA de microglías como templado. En la literatura ya está reportada la expresión del D3R en cultivo de glía mixta de rata a nivel transcripcional (Lisak y cols., 2009) sin especificar el tipo celular responsable de ella. El resultado aquí obtenido muestra evidencia de que serían los astrocitos, y no las microglías, las células que expresan el transcrito de D3R detectado en los cultivos primarios de glía mixta de ratón (Figura 2A).

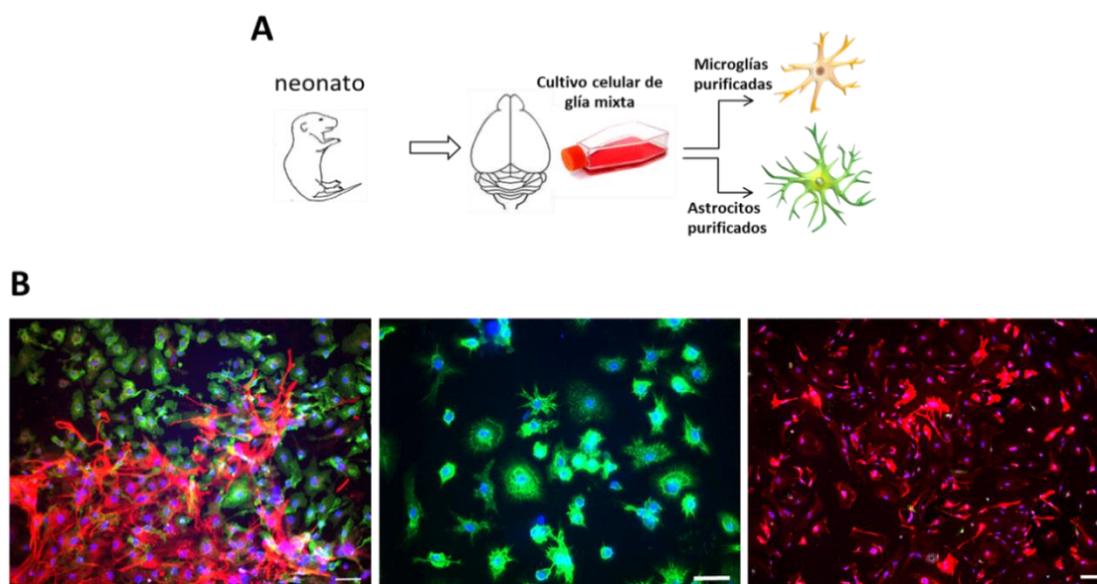


Figura 1. Obtención de cultivos primarios de glía mixta e identificación de microglías y astrocitos.

Se establecieron cultivos primarios de glía mixta a partir de estriado/cerebro-medio disgregado de ratones recién nacidos (1 a 3 días de vida). **(A)** Diagrama del procedimiento experimental. Posteriormente microglías y astrocitos fueron purificados y sometidos a inmunofluorescencia para identificación de los tipos celulares de interés y el análisis de su pureza. **(B)** Identificación mediante inmunofluorescencia de microglías y astrocitos en el cultivo primario de glía mixta y en cultivos purificados. Imágenes representativas muestran la tinción de microglías, las cuales son identificadas como células CD11b+ (verde), mientras que los astrocitos como células GFAP+ (rojo), en un cultivo de glía mixta (izquierda), y en cultivos purificados de microglías (centro) y de astrocitos (derecha). La barra representa 20 μm .

Una vez determinada la expresión transcripcional de D3R en astrocitos mediante RT-PCR, evaluamos la expresión traduccional de D3R usando la técnica de inmunofluorescencia. Para detectar la presencia de D3R usamos un anticuerpo primario comercial y su control de isotipo respectivo para verificar la especificidad de la tinción. Como anticuerpo secundario usamos un anticuerpo acoplado al fluoróforo Alexa 488. En el resultado obtenido se observó una evidente marca fluorescente verde en la mayoría de los astrocitos analizados, aunque en algunos casos, la marca fue más tenue (Figura 2B). La inmunofluorescencia dió cuenta de una marca distribuida en la superficie y citoplasma de las células analizadas. Como se esperaba, al usar el

control de isotipo del anticuerpo primario no se observó la tinción fluorescente verde, lo que confirma la especificidad de la detección. Este resultado indica que los astrocitos, obtenidos de cultivos primarios de estriado/cerebro-medio de ratones, son capaces de producir efectivamente tanto el mRNA como la proteína correspondiente al receptor de dopamina D3 (Figura 2).

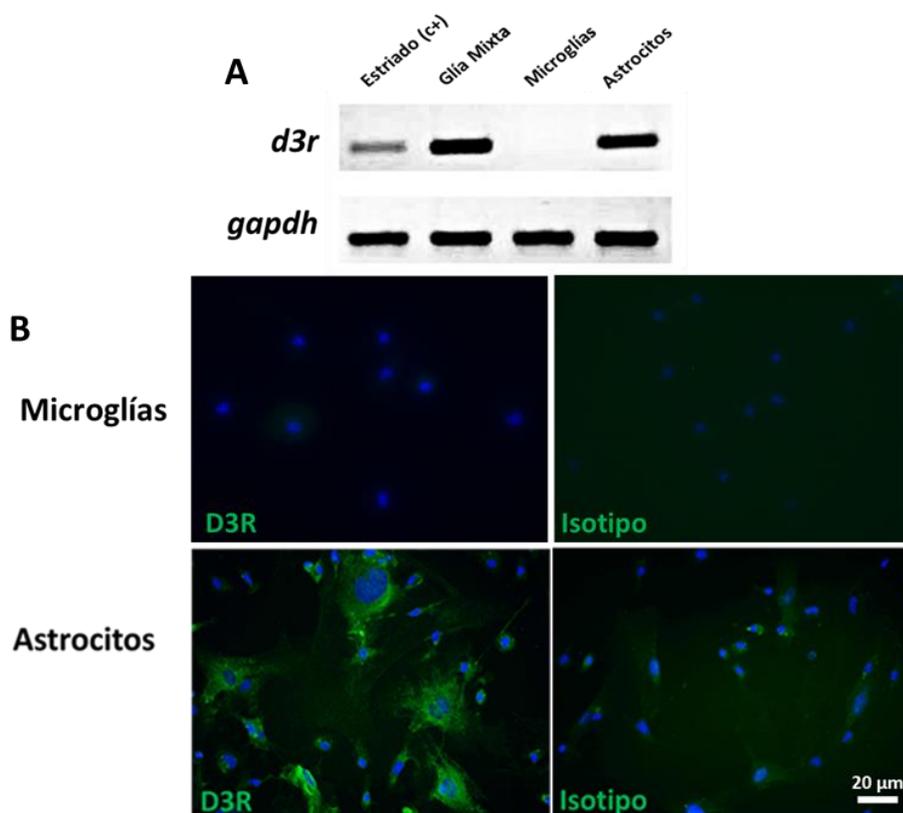


Figura 2. Astrocytes de estriado/cerebro-medio en cultivo expresan el receptor de dopamina D3.

(A) Análisis de la expresión transcripcional de D3R mediante RT-PCR en cultivo de glía mixta, y microglías y astrocitos purificados. mRNA de tejido del estriado se usó como control positivo.

(B) Expresión de la proteína D3R en cultivo de astrocitos purificados. Las imágenes del panel superior corresponden a microglías, mientras que el panel inferior corresponde a astrocitos, ambos purificados desde cultivo primario de glía mixta obtenido de estriado/cerebro-medio de ratones C57BL6. La inmunofluorescencia muestra la marca verde que indica la presencia de la proteína al usar el anticuerpo contra D3R (izquierda), la cual no se apreció al usar su control de isotipo (derecha). Los núcleos de las células fueron teñidos con DAPI. La barra representa 20 μ m.

8.2- Análisis del estado de activación de glías *in vivo* sin estímulo pro-inflamatorio previo.

Para abordar el segundo objetivo de evaluar el papel de D3R en la adquisición de fenotipos activados por parte de las glías *in vivo*, inicialmente decidimos observar el estado de activación de microglías y astrocitos en una condición basal sin ningún tipo de daño o estímulo pro-inflamatorio, más que el provocado durante el procedimiento para obtener los cerebros y la solución de células disgregadas para análisis por citometría de flujo.

Para este propósito, ratones WT y D3RKO sin ningún estímulo previo, fueron sacrificados y procesados para obtener una suspensión de células disgregadas proveniente de la sección del cerebro que contiene al estriado y al cerebro-medio (Figura 3A).

El fenotipo pro-inflamatorio de las microglías está asociado al aumento de la proteína CD16/32 en la superficie de la célula y a la ausencia del receptor de manosa CD206, mientras que el fenotipo anti-inflamatorio está asociado a la expresión de ambas proteínas de membrana a la vez (Bedi y cols., 2013) (Figura 3B). Por lo tanto, se analizó la expresión de CD16/32 y CD206 en la población de microglías identificadas mediante los marcadores CD11b y CD45 (Figura 3C). También analizamos el fenotipo de activación de los astrocitos, los cuales son identificados por la presencia de la proteína GFAP. En la población de células GFAP+ evaluamos la presencia de las proteínas óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) y Arginasa-1 (Arg1), las que están asociadas a un fenotipo pro- y anti-inflamatorio, respectivamente (Jang y cols., 2013) (Figura 3D y 3E).

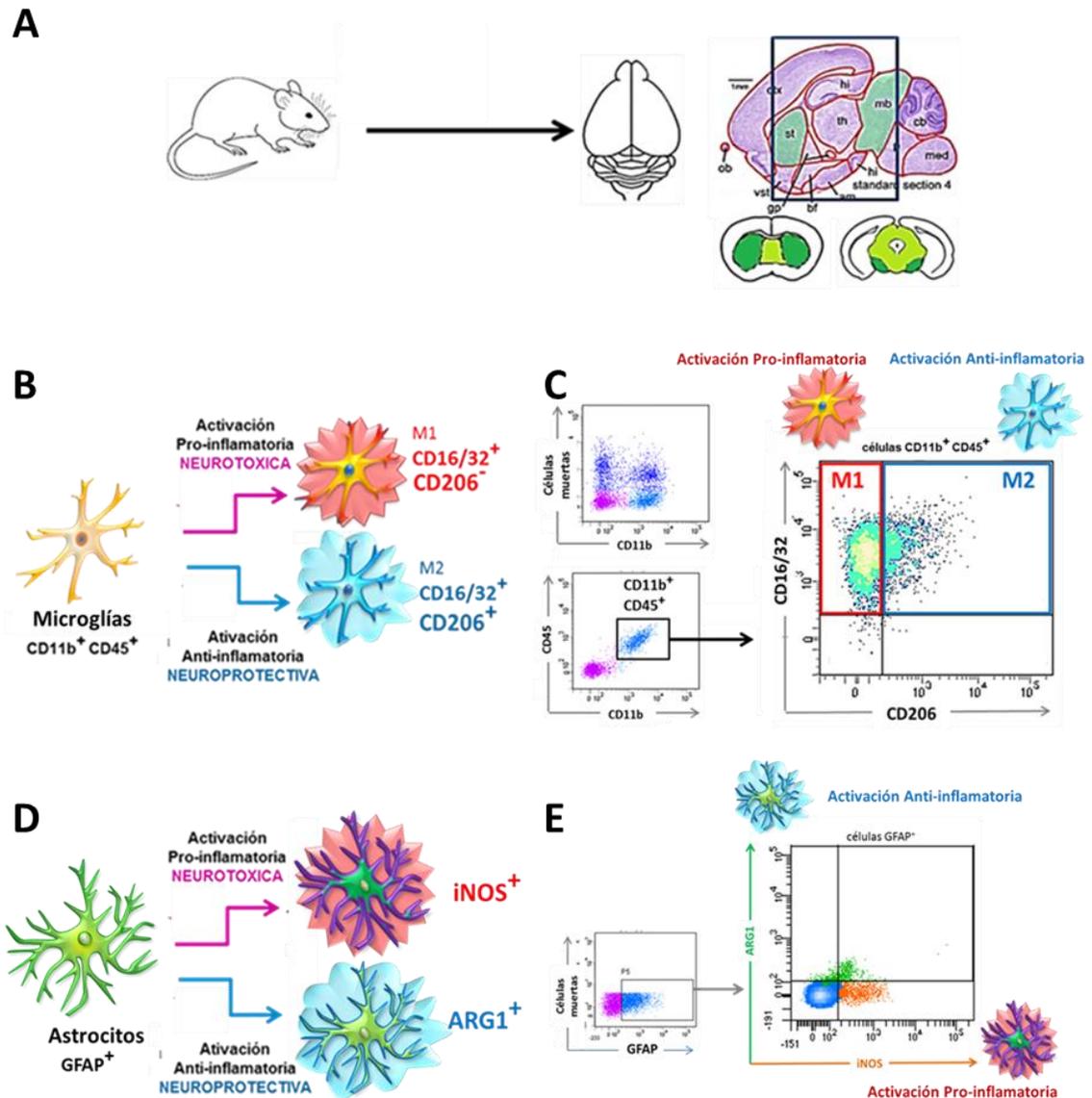


Figura 3. Esquema que ilustra la estrategia experimental para análisis de fenotipos activados de glías.

(A) Se extrajo la sección estriado/cerebro-medio que contiene el núcleo estriado y la sustancia nigra (marco azul), y se analizó la sección ventral (destacada en verde en ilustraciones inferiores) descartando el tejido cortical (en blanco). **(B)** Esquema que resume los marcadores moleculares utilizados para identificar la adquisición de los diferentes fenotipos en la microglía. **(C)** Análisis representativo mostrando la estrategia de gating utilizada en el análisis del fenotipo de la microglía. Se escoge la población de células vivas usando el marcador Zombie (Biolegend) (grupo de color celeste en el gráfico superior izquierdo), luego se selecciona la población positiva para los marcadores CD11b y CD45 correspondiente a las microglías (grupo celeste en gráfico inferior izquierdo), y posteriormente se analizan los porcentajes de microglías pro y anti-inflamatorias. Las microglías CD16/32+, CD206- son identificadas como tipo M1 (cuadrante rojo superior izquierdo), mientras que microglías CD16/32+, CD206+ son identificadas como tipo M2 (cuadrante azul superior derecho). **(D)** Esquema que resume los marcadores moleculares utilizados para identificar la adquisición de los diferentes fenotipos en astrocitos. **(E)** Análisis representativo mostrando la estrategia de gating utilizada en el análisis del

fenotipo de astrocitos. Se escoge la población de células vivas usando el marcador Zombie, luego se selecciona la población positiva para GFAP correspondiente a los, y posteriormente se analizan los porcentajes de astrocitos pro- y anti-inflamatorios. Los astrocitos iNOS⁺ son identificadas como tipo pro-inflamatorio (destacado en color naranja), mientras que astrocitos Arg1⁺ son identificadas como tipo anti-inflamatorio (destacado en color verde).

El análisis de las microglías no mostró diferencias significativas entre los ratones WT y D3RKO en ninguno de los parámetros evaluados. (Figura 4). Por otro lado, los resultados obtenidos a partir del análisis de astrocitos de ratones en condición basal, mostraron interesantes diferencias entre ratones WT y D3RKO. Astrocitos de ratones D3RKO presentaron basalmente un nivel mayor de la proteína GFAP y de la enzima iNOS (Figura 5A y B). No se apreciaron diferencias en el nivel de expresión de Arg1 (Figura 5C), Sin embargo, si existe una frecuencia significativamente mayor de astrocitos que expresan este marcador anti-inflamatorio en ratones D3RKO (Figura 5F). No se detectó diferencia significativa en la frecuencia de astrocitos iNOS(+) entre ambos genotipos (Figura 5E).

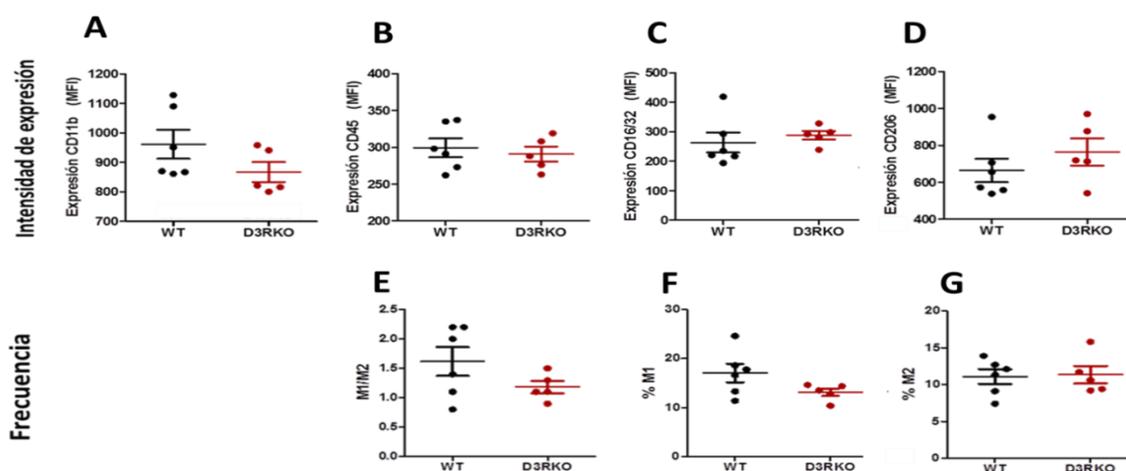


Figura 4. Microglías de ratones D3RKO no presentan diferencias significativas en su activación basal. Ratones WT y D3RKO fueron procesados para obtener tejido de estriado/cerebro-medio, y realizar análisis de la activación de glías mediante citometría de flujo. **(A, B, C y D)** Expresión de CD11b, CD45, CD16/32 y CD206, respectivamente. **(E)** Razón M1/M2. **(F y G)** Frecuencias de la población de microglías M1 y M2, respectivamente. Los datos fueron obtenidos desde 5-6 ratones por grupo experimental. Cada símbolo representa los datos obtenidos de un ratón individual. En cada grupo experimental se indica la media (línea horizontal) \pm SEM.

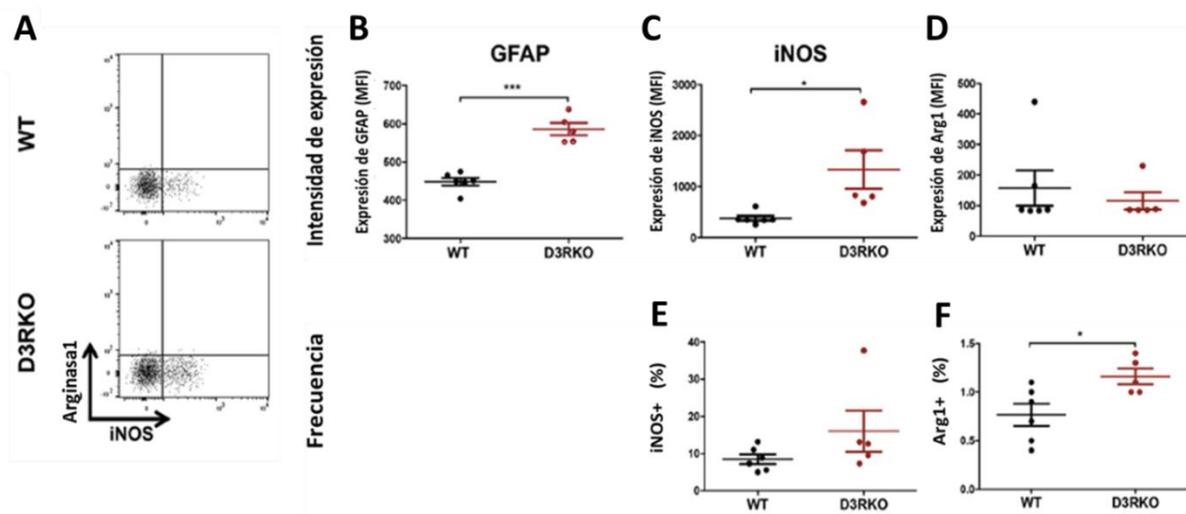


Figura 5. Astrocitos de ratones D3RKO presentan basalmente un perfil activado mixto M1-M2. Ratones WT y D3RKO fueron procesados para obtener tejido de estriado/cerebro-medio, y realizar análisis de la activación de glías mediante citometría de flujo. **(A)** Gráfico de puntos representativo del análisis. **(B, C y D)** Expresión de GFAP, iNOS y Arg1, respectivamente. **(D y E)** Frecuencia de las poblaciones de astrocitos iNOS(+) y astrocitos Arg1(+), respectivamente. Los datos fueron obtenidos desde 5-6 ratones por grupo experimental. Cada símbolo representa los datos obtenidos de un ratón individual. En cada grupo experimental se indica la media (línea horizontal) \pm SEM. *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$ según el test t de Student no paerado.

8.3.- Análisis de activación de glías *in vivo* usando el modelo de neuroinflamación inducido por LPS sistémico.

El sistema inmune periférico puede afectar de manera rápida y potente lo que sucede en el SNC, una muestra de esto es el proceso neuroinflamatorio que sucede en el cerebro como consecuencia de una intoxicación periférica con LPS (Qin y cols., 2007; Biesman y cols., 2013; Norden y cols., 2015; Hoogland y cols., 2015). En este sentido, se ha reportado que LPS inyectado intraperitonealmente produce un alza de las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β y TNF- α , que son detectadas en el cerebro una hora después de la intoxicación (Qin y cols., 2007), y específicamente en microglías a las 2 h (Norden y cols., 2015). Adicional a esto, los

fenómenos de la activación clásica (M1) en microglías también ocurren en ratones y ratas expuestos a LPS. Las microglías aumentan la inmunoreactividad de marcadores clásicos de activación como CD11b, Iba1 y CD68, cambian su morfología hacia un aspecto ameboso y proliferan (Hoogland y cols., 2015). Estos cambios son apreciables en tiempos tan tempranos como 3 h después de una inyección intraperitoneal de LPS (5mg/Kg) (Qin y cols., 2007). En cuanto a los astrocitos, se ha descrito el aumento de su marcador clásico de identidad y activación (GFAP), a las 6 h después de la intoxicación con LPS usando un ratón reportero GFAP-Luc (Biesman y cols., 2013). En tanto que el incremento del mRNA de GFAP se ha detectado a las 24 h posteriores (Norden y cols., 2015). El transcrito de las moléculas pro-inflamatorias TNF- α , IL-1 β y CCL2 es detectado a 12 h, en tanto que la citoquina anti-inflamatoria TGF- β disminuye a las 4 h y aumenta a las 24 h posteriores a la intoxicación (Norden y cols., 2015).

El modelo de neuroinflamación inducida por LPS utilizado consistió en la administración intraperitoneal de una sola dosis de 5 mg/kg, la cual es capaz de inducir rápidamente un aumento de citoquinas y factores inflamatorios tales como IL-1 β , NF- κ B en el cerebro, que en el caso del TNF- α , puede persistir en el tiempo de manera crónica y producir un cambio morfológico en las microglías asociado a su activación (Qin y cols. 2007). Además, este modelo ha sido reportado como un método capaz de generar la pérdida de neuronas dopaminérgicas de la sustancia *nigra* por sobre el 45% al cabo de 10 meses p.i., por lo que guarda cierta relación con el modelo neurodegenerativo mediado por MPTP usado en experimentos realizados en nuestro laboratorio anteriormente. Los tiempos escogidos para el análisis de la activación de glías fueron 4 y 24 h p.i. con el fin de evaluar etapas tempranas de un proceso

neuroinflamatorio, que en este caso, inclusive podría desencadenar una posterior pérdida neuronal similar a la que ocurre en la enfermedad de Parkinson.

Ratones WT y D3RKO fueron intoxicados con una inyección i.p. de LPS (5mg/Kg), se extrajeron los cerebros y se seleccionó la sección estriado/cerebro-medio, de la cual obtuvimos mRNA total para análisis de la neuroinflamación mediante qPCR, y una solución de células disgregadas para análisis por citometría de flujo. Las poblaciones de glías y sus fenotipos de activación fueron identificados de la misma forma que en los experimentos sin estímulo inflamatorio.

8.3.1- Análisis de la neuroinflamación inducida por LPS mediante qPCR.

Inicialmente, realizamos experimentos para verificar la factibilidad del uso de este modelo en nuestro laboratorio usando solamente ratones WT, y analizamos la expresión de IL-1 β y TNF- α en tejido cerebral correspondiente a estriado/cerebro-medio. Debido a que gran parte de los trabajos realizados por otros investigadores evalúan la neuroinflamación que produce este modelo en tejido cortical del cerebro (Hoogland y cols., 2015), analizamos también ésta estructura (Figura 6). Como se esperaba, la administración intraperitoneal de LPS indujo un aumento en la expresión de TNF- α detectada a las 24 h p.i. (Figura 6A). Además, evaluamos la expresión de IL-1 β a las 4 y 24 h p.i., la cual mostró un aumento progresivo (Figura 6B). El análisis comparativo entre tejido cortical y estriado/cerebro-medio indicó que la citoquina pro-inflamatoria IL-1 β aumenta progresivamente en ambos tejidos, mostrando una expresión levemente mayor en las muestras obtenidas a partir de estriado/cerebro-medio (Figura 6C). Este resultado muestra la factibilidad de producir signos característicos de neuroinflamación mediante el protocolo usado, y por lo tanto permite el análisis de microglías y astrocitos activados hacia fenotipos asociados a la inflamación.

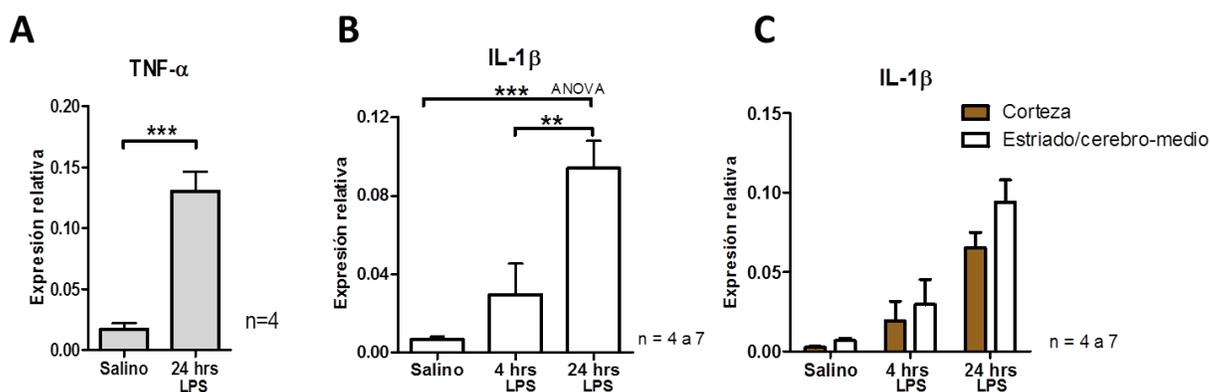


Figura 6. Aumento de los niveles de citoquinas pro-inflamatorias en cerebro de ratones WT tratados con LPS i.p. Ratones WT fueron inyectados intraperitonealmente con medio salino (PBS) o con LPS (5 mg/Kg). Luego 4 y 24 h, se extrajo la sección de estriado/cerebro-medio y se analizó la expresión transcripcional de genes pro-inflamatorios mediante qPCR. **(A)** Expresión de TNF- α a 24 h posterior a la inyección de LPS (p.i.). **(B)** Expresión de IL-1 β a 4 y 24 h p.i. **(C)** Comparación de la expresión de IL-1 β en tejido cortical y en estriado/cerebro-medio. Los datos fueron obtenidos desde 4-7 ratones por grupo experimental. Los valores representan la media \pm SEM. **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ según el test t de Student no pareado (A) o ANOVA de una vía (B).

8.3.2.- Inhibición farmacología del receptor de dopamina D3 y análisis de fenotipos activados de microglías *in vivo*.

Una vez establecido el protocolo de neuroinflamación inducido por LPS sistémico, determinamos las frecuencias en que se presentan los fenotipos pro- y anti-inflamatorios de microglías y astrocitos. Con el propósito de obtener evidencias tanto genéticas como farmacológicas sobre el papel del D3R en la activación de glías realizamos experimentos usando ratones WT y D3RKO tratados o no con un antagonista selectivo para el D3R. Para ello, repetimos la intoxicación mediante LPS intraperitoneal durante 24 h, pero usando ratones D3RKO para compararlos con su contraparte WT. Además, adicionamos grupos de ratones tratados con un antagonista selectivo para el D3R (denominado PG01037), para el cual se ha evaluado su efecto terapéutico en ratones anteriormente en nuestro laboratorio (Elgueta y cols., 2017) (Figura 7). En este estudio previo, Elgueta y cols. demostraron que la

administración intraperitoneal de 30mg/kg de PG01037 resulta en la distribución preferencial de la droga en el cerebro y ejerce una mejora significativa en el comportamiento locomotor, una clara reducción en la pérdida de neuronas dopaminérgicas de la vía nigro-estriatal, una exacerbación de la astrogliosis observado mediante el aumento de la inmunoreactividad de GFAP en estriado, y un incremento en la densidad de ramificaciones de las microglías en un modelo de EP inducido por intoxicación crónica con MPTP.

Los ratones WT y D3RKO fueron tratados de igual forma al experimento de intoxicación con LPS anteriormente descrito. Los grupos de ratones tratados con PG01037, recibieron una única dosis de 30mg/kg del compuesto mediante una inyección intraperitoneal una hora antes de la inyección con LPS o medio salino. Los ratones fueron evaluados pasadas 24 h de la inyección de LPS para analizar la activación de glías. Los resultados de este set de experimentos mostraron un claro aumento de la frecuencia de microglías M1 a consecuencia de la intoxicación inducida por LPS en ambos genotipos sin mayores diferencias entre ellos, excepto en el grupo de ratones tratados solo con PG01037 y solución salina. En ellos se observó una frecuencia significativamente menor de microglías M1 en los ratones D3RKO con PG01037 respecto de su contraparte WT (Figura 7A). En el caso de las microglías M2, se observó que la administración previa de PG01037 a ratones WT, exagera la disminución de esta población de microglías anti-inflamatorias a consecuencia de la intoxicación con LPS, llegando a valores similares a los observados en ratones D3RKO intoxicados con LPS. De acuerdo a lo esperado, este efecto exacerbado en la disminución de la población de microglías M2 en ratones WT intoxicados con LPS a causa del tratamiento previo con PG01037, no se produjo en ratones D3RKO (Figura 7B). El efecto sobre la neuroinflamación que ejerce el antagonista farmacológico del D3R queda mejor evidenciado al observar la razón M1/M2. En ambos genotipos se observó un incremento

de la razón M1/M2 a consecuencia de la intoxicación con LPS. Sin embargo, el valor de la razón M1/M2 es mayor en los ratones D3RKO comparado con su contraparte WT (Figura 7C).

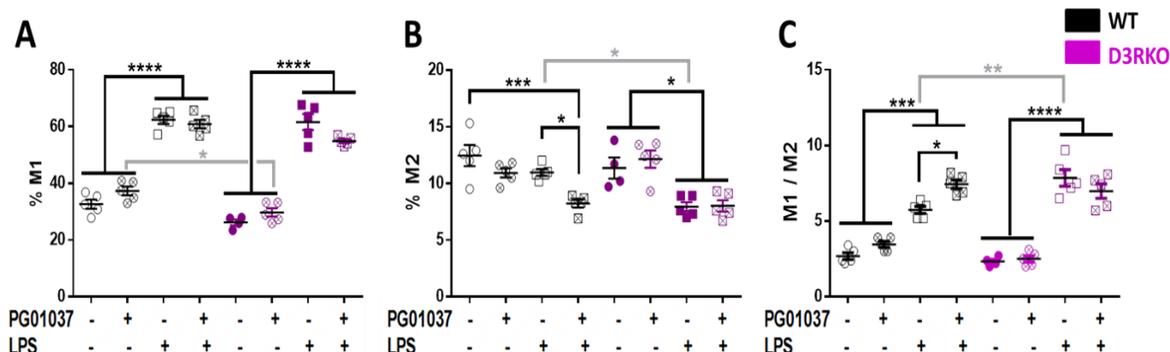


Figura 7. La carencia genética o la inhibición farmacológica del D3R exacerba el aumento de la razón M1/M2 inducido por LPS *in vivo*. Ratones WT y D3RKO fueron sometidos a intoxicación o no, mediante una inyección intraperitoneal de LPS (5mg/Kg). Adicionalmente, ratones de cada genotipo fueron tratados con el antagonista específico del D3R PG01037 (30mg/kg) mediante una inyección intraperitoneal administrada 1 h antes de la intoxicación con LPS. Pasadas 24 h después de la inyección con LPS, los ratones fueron sacrificados, se extrajo la sección estriado/cerebro-medio y se analizó la frecuencia de microglías M1 y M2. **(A)** Frecuencia de microglías M1. **(B)** Frecuencia de microglías M2. **(C)** Razón entre las poblaciones M1 y M2. Los datos fueron obtenidos desde 5 ratones por grupo experimental. Los valores representan la media \pm SEM. *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$ según ANOVA de una vía.

Al analizar el grupo de ratones intoxicados con LPS que fueron tratados previamente con el antagonista del D3R, observamos un aumento significativo de la razón M1/M2 respecto de los ratones que sólo recibieron LPS en el caso de los ratones WT, lo cual no se observó en ratones D3RKO ya que carecen de éste receptor (Figura 7C). Estos resultados sugieren que la señal de D3R podría de algún modo regular la mantención del fenotipo M2 en las microglías de ratones intoxicados con LPS, lo cual incide en el balance M1/M2 en un modelo de neuroinflamación inducido por LPS.

8.3.3.- Análisis de fenotipos activados de astrocitos *in vivo* usando el modelo de neuroinflamación inducido por LPS.

Para averiguar si la alterada respuesta inflamatoria que presentaron las microglías de ratones D3RKO en este modelo de neuroinflamación inducido por LPS sistémico, sucede también en los astrocitos, analizamos las frecuencias de sus fenotipos pro- y anti-inflamatorios (Figura 8). A las 24 h p.i. la frecuencia de astrocitos pro-inflamatorios aumentó en ratones WT intoxicados respecto de su control salino, en cambio en los ratones D3RKO, la frecuencia de este fenotipo no mostró alteración significativa respecto de la condición control (Figura 8A).

A las 24 h p.i., la frecuencia de astrocitos Arg1(+) no varió significativamente entre los grupos analizados. En términos de tendencia, la frecuencia de astrocitos Arg1(+) fue menor sólo en ratones WT intoxicados respecto de su control salino. Al contrario de esta disminución, los astrocitos anti-inflamatorios de los ratones D3RKO intoxicados presentaron un aumento de su frecuencia con respecto a sus controles salinos (Figura 8B). Adicional a este análisis, se evaluó la razón entre la población de astrocitos pro- y anti-inflamatorios (iNOS/Arg1). Este parámetro indica el balance inflamatorio de los astrocitos, y al igual que la razón M1/M2 en microglías, puede ser usado para tener una idea de la orientación pro- o anti-inflamatoria que está tomando la población de astrocitos (Jang y cols., 2013). El análisis de la razón iNOS/Arg1 indicó que ratones WT intoxicados que aumentaron la razón iNOS/Arg1 respecto de sus controles salinos (Figura 6C). En cambio, astrocitos de ratones D3RKO intoxicados con LPS no presentaron variación de la razón iNOS/Arg1 respecto su control salino. Estos resultados sugieren que D3R podría estar involucrado en la adquisición del fenotipo pro-inflamatorio en astrocitos que son sometidos a la intoxicación periférica inducida por LPS, regulando tal vez la presencia de la enzima iNOS.

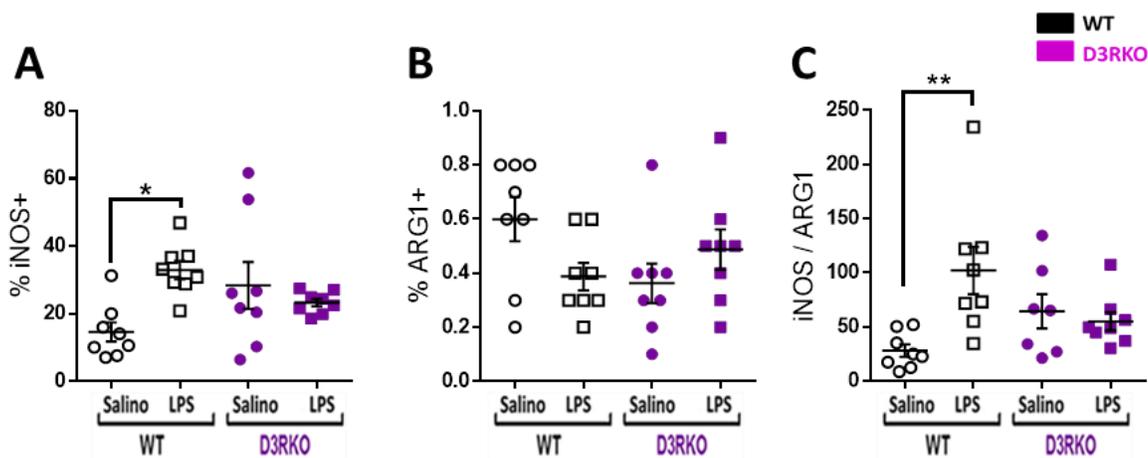


Figura 8. La deficiencia de D3R resulta en un fenotipo de astrocitos que no responde frente a la neuroinflamación inducida por LPS. Ratones WT y D3RKO fueron sometidos a intoxicación o no, mediante una inyección intraperitoneal de LPS (5mg/Kg). Luego de 24 h se extrajo la sección estriado/cerebro-medio y se analizó la frecuencia de astrocitos pro y anti-inflamatorios (GFAP(+),iNOS(+)) y GFAP(+),Arg1(+), respectivamente. **(A)** Frecuencia de astrocitos pro-inflamatorios. **(B)** Frecuencia de astrocitos anti-inflamatorios. **(C)** Razón entre las poblaciones iNOS(+) y Arg1(+). Los datos fueron obtenidos desde 8 ratones por grupo experimental. Los valores representan la media \pm SEM. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ según ANOVA de una vía.

8.4.- Análisis de marcadores moleculares relacionados con inflamación en cerebro de ratones intoxicados con LPS.

Usando mRNA obtenido de estriado/cerebro-medio de ratones WT y D3RKO, intoxicados o no con LPS sistémico, analizamos la expresión de los marcadores pro-inflamatorios iNOS, IL-1 β y TNF- α , y de los marcadores anti-inflamatorio Arg1 y Fizz1 mediante qPCR (Figura 8). Los resultados muestran una inducción de la expresión de *il-1 β* y de *tnf- α* a consecuencia de la intoxicación con LPS, tanto en ratones WT como D3RKO, la cuales no presentan diferencia entre ambos genotipos (Figura 9A y 9B). Más llamativo es el resultado obtenido sobre la expresión de iNOS en el cerebro de ratones intoxicados.

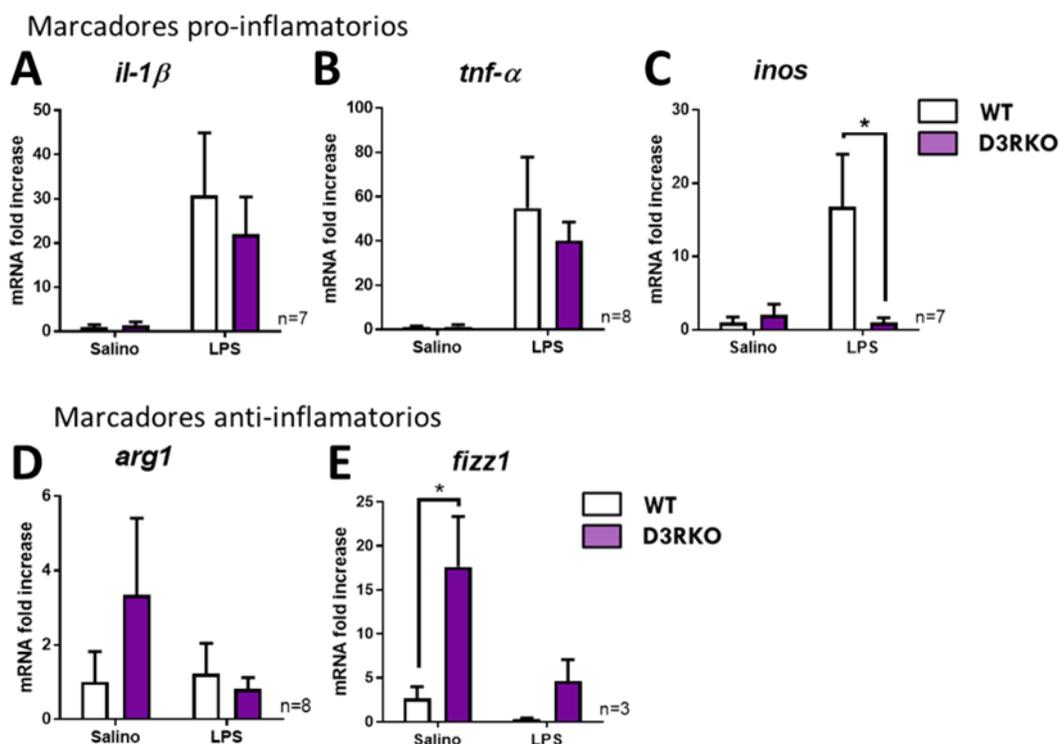


Figura 9. La deficiencia de D3R resulta en una alteración en el patrón de expresión de genes inflamatorios en el cerebro de ratones tratados con LPS sistémico. Ratones WT y D3RKO fueron sometidos o no a intoxicación, mediante una inyección intraperitoneal de LPS (5mg/Kg). Luego de 24 h extrajo la sección estriado/cerebro-medio y se analizó la expresión transcripcional de genes involucrados en inflamación mediante qPCR. Cuantificación de la expresión de los genes pro-inflamatorios IL-1 β (A), TNF- α (B) e iNOS (C) o del gen anti-inflamatorio Arg1 (D). Los datos fueron obtenidos desde 4 (A) o 5 (B-D) ratones por grupo experimental. Los valores representan la media \pm SEM. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ según el test t de Student no pareado (B) o ANOVA de una vía (A y C).

En este análisis los ratones WT mostraron un aumento significativo del nivel de mRNA de iNOS a las 24 h posteriores a la intoxicación, mientras que los ratones D3RKO mostraron una casi nula producción de este marcador pro-inflamatorio al mismo tiempo analizado (Figura 9C). Este resultado concuerda con la incapacidad de aumentar la frecuencia de astrocitos iNOS(+) en respuesta a la intoxicación sistémica con LPS que exhiben los ratones D3RKO (Figura 8A) y se relaciona con la idea de que la carencia del D3R perturba la respuesta pro-inflamatoria en el SNC de ratones intoxicados con LPS sistémico. Sumado a esto, el análisis de la expresión del

marcador anti-inflamatorio *arg1*, mostró un nivel mayor de su mRNA en ratones D3RKO respecto de ratones WT en la condición basal (control salino), sin embargo, esta diferencia no alcanza a ser estadísticamente significativa (Figura 8D). Más interesante resulta la observación del nivel de expresión del *fizz1*. Éste marcador anti-inflamatorio presentó un nivel significativamente mayor en cerebros de ratones D3RKO respecto de su contraparte WT en la condición basal.

La casi nula expresión de *inos* en cerebro de ratones D3RKO intoxicados con LPS, sumada a la mayor expresión de *fizz1* en cerebros de ratones D3RKO en la condición basal respecto de lo observado en ratones WT, entregan nuevamente evidencia de un proceso neuroinflamatorio distinto en ratones que carecen del D3R comparado con ratones WT.

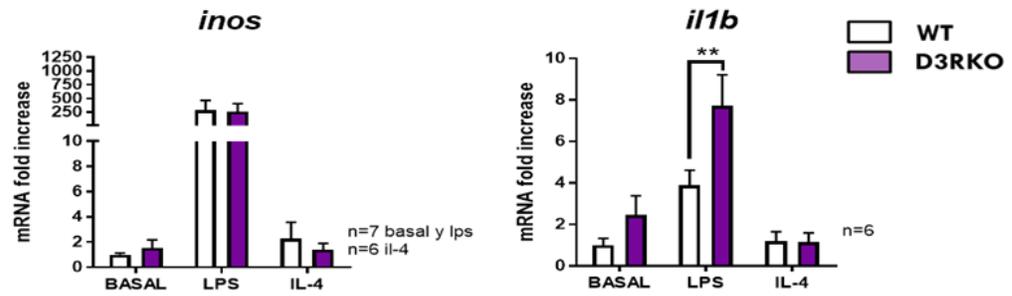
8.5.- Análisis de expresión de marcadores moleculares asociados a inflamación en cultivos primarios de glía mixta.

Sabiendo que las microglías son las células que poseen la más robusta respuesta frente a señales de peligro en el SNC, y considerando que no fue posible detectar la presencia de D3R en microglías purificadas desde cultivo primario, la diferencia encontrada entre WT y D3RKO en los experimentos anteriores podría estar originada por la ausencia del D3R en los astrocitos. En relación a esto, existen diversos reportes que describen moléculas relacionadas con la comunicación entre astrocitos y microglías que podrían regular los estados de activación de éstas células en ambas direcciones (Kettenmann y cols., 2011). La producción de estas señales podría verse alterada por la ausencia de D3R en el cultivo de glía mixta cambiando la “pre-disposición” de las microglías para adquirir el fenotipo M1, o bien favoreciendo la adquisición del fenotipo M2, dando como consecuencia una alteración de la neuroinflamación como lo

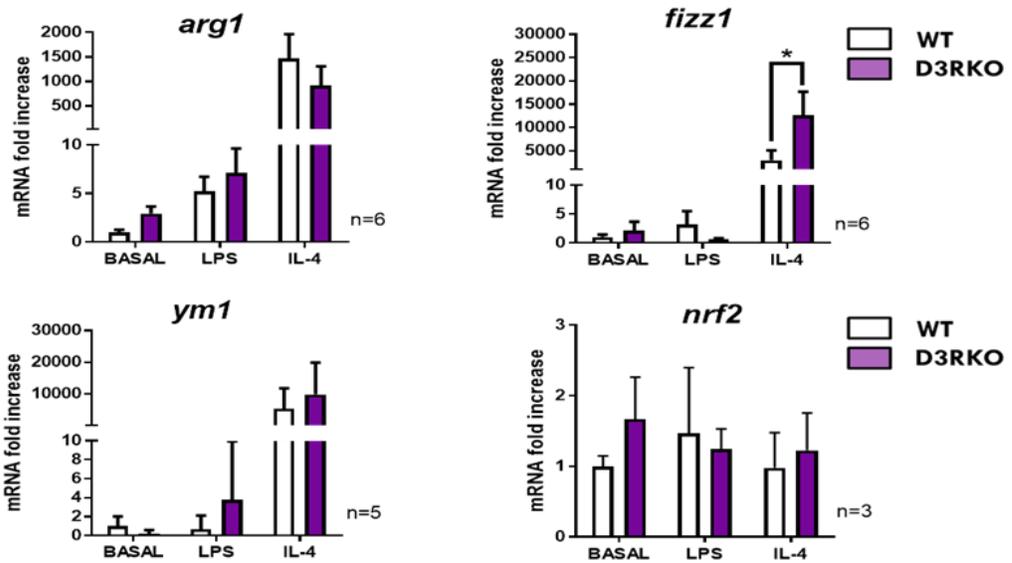
observado en cerebros de ratones D3RKO intoxicados con LPS sistémico. Para verificar esta idea realizamos ensayos de activación pro- y anti-inflamatoria usando los cultivos de glía mixta completos originados a partir de ratones WT o D3RKO, y analizamos la expresión de distintas moléculas relacionadas con la activación de glías mediante qPCR (Figura 10). La expresión de genes asociados con la activación pro-inflamatoria como *inos* e *il1b*, fueron analizadas mediante qPCR. El aumento del marcador pro-inflamatorio *inos* inducido por LPS, fue visible en ambos genotipo. Sin embargo, el resultado no mostró diferencias en la expresión de *inos* entre ambos genotipos en ninguna de las condiciones analizadas. Situación contraria se observó respecto de la expresión de *il1b*, en donde se observó un mayor aumento de su expresión en cultivos de glíamixta proveniente de ratones D3RKO al ser estimulados con LPS (Figura 10A).

Esto sugiere que los cultivos de glía mixta D3RKO reaccionan más pronunciadamente ante el estímulo del LPS comparados con su contraparte WT. Por otro lado, la estimulación con la citoquina anti-inflamatoria IL-4 no afecta la expresión de ninguno de los marcadores moleculares pro-inflamatorios en ninguno de los genotipos (Figura 10A). Factores anti-inflamatorios también fueron evaluados mediante PCR cuantitativo. El transcrito de *arg1* incrementó su expresión frente a ambos estímulos en los dos genotipos analizados. Sin embargo, la tendencia de los datos sugiere una mayor expresión de *arg1* en la condición basal y con LPS en ratones D3RKO (Figura 10B). Otro resultado interesante y que podría explicar el fenotipo menos pro-inflamatorio de los astrocitos de ratones D3RKO, es lo observado en la expresión de *fizz1*. Este marcador de fenotipo anti-inflamatorio mostró un incremento en su nivel de mRNA a consecuencia exclusiva de IL-4, condición en la cual alcanzó un nivel mayor de expresión en cultivos de glíamixta provenientes de ratones D3RKO comparado con su contraparte WT (Figura 10B).

A Moléculas proinflamatorias



B Moléculas anti-inflamatorias



C Factores tróficos

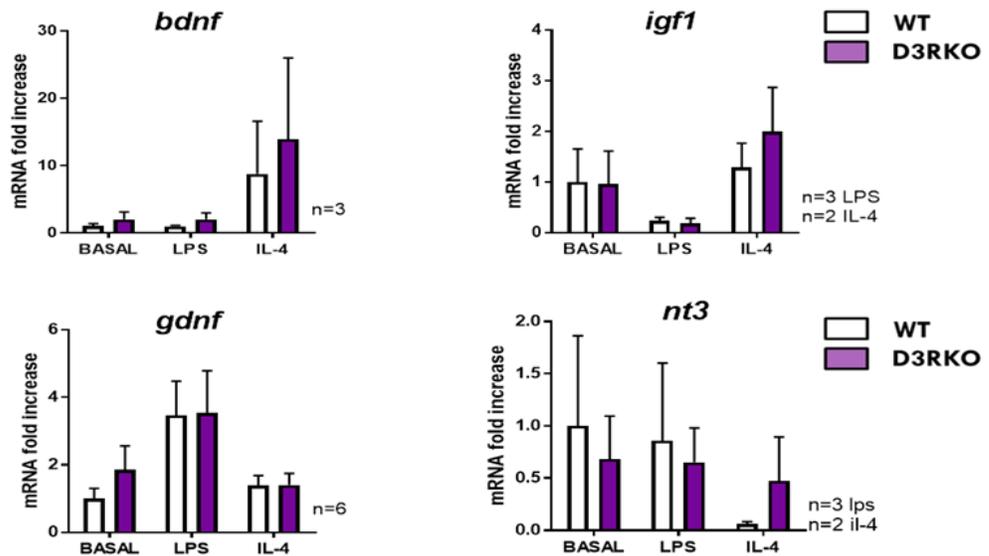


Figura 10. Activación de cultivos de Glía mixta WT y D3RKO. Cultivos de glía mixta proveniente de estriado/cerebro-medio de ratones WT y D3RKO fueron activados mediante LPS o IL-4. Luego de 24 h se extrajo mRNA para análisis de genes involucrados en neuroinflamación mediante qPCR. **(A)** Expresión de genes relacionados al fenotipo pro-inflamatorio. **(B)** Expresión de genes relacionados al fenotipo anti-inflamatorio. **(C)** Expresión de genes de factores de crecimiento asociados a neuroprotección. Los datos fueron obtenidos desde dos, tres, seis o siete experimentos independientes, según lo que se indica en cada gráfico. Los valores indican la media \pm SEM. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ según ANOVA de dos vías.

Éste resultado es coincidente con lo obtenido en los experimentos *in vivo* con LPS en donde se observó que los cerebros de ratones D3RKO presentaron mayores niveles del transcrito de *fizz1* que su contraparte WT en la condición basal (Figura 9E). La expresión de *ym1* mostró un aumento inducido por IL-4 acorde a lo descrito en la literatura en ambos genotipos, sin diferencias significativas entre ellos (Figura 10B). La expresión del gen del factor de transcripción *Nfr2*, el cual está asociado con un efecto anti-inflamatorio, parece no variar con ningún estímulo (Figura 10B).

El análisis de expresión de factores tróficos no mostró diferencia entre ambos genotipos en ninguna de las condiciones. Hablando en términos de las tendencias observadas en los gráficos, como era de esperarse, la adición de IL-4 incrementó la expresión de algunos de los factores tróficos analizados, tal es el caso de *bdnf* e *igf1*. Lo contrario sucedió respecto de la expresión de *nt3*, en donde el estímulo anti-inflamatorio de la IL-4 parece reducir la expresión de este factor trófico. Por otro lado, el LPS parece tener efecto en *igf1*, en donde indujo una aparente disminución del transcrito analizado, y también parece tener un efecto en la expresión *gndf*, la cual aumenta a consecuencia del estímulo pro-inflamatorio del LPS. (Figura 10C).

La alteración en la expresión de *il1b* a consecuencia de un estímulo pro-inflamatorio, junto a la exacerbada expresión de *fizz1* frente a un estímulo anti-inflamatorio observada en los cultivos primarios de glíamixta proveniente de ratones D3RKO respecto de su contraparte WT, sugieren

una vez más que el D3R está involucrado en la activación de glías relacionada con neuroinflamación.

9.- DISCUSIÓN

La expresión de los DARs en glías ha sido documentada previamente por diferentes estudios realizados en rata, ratón y humano. Usando distintas técnicas de detección, estos trabajos informan sobre la presencia o ausencia de los cinco DARs, cuyo patrón de expresión varía según sea la especie analizada y la estructura cerebral de donde provengan las células. Algunos investigadores han detectado la presencia de los DARs de manera funcional, mientras que otros han reportado además evidencia a nivel de mRNA o de proteína. Inicialmente, nosotros detectamos la presencia de D3R a nivel de mRNA en cultivo primario de glía mixta proveniente de tejido cerebral de ratón que abarca tanto el área correspondiente al cerebro medio, como el área del telencéfalo que contiene al núcleo estriado (Figura 3A). La parte ventral del cerebro medio contiene el núcleo de neuronas dopaminérgicas denominado sustancia *nigra*, el cual extiende sus axones hacia el cerebro anterior, liberando dopamina en el núcleo estriado localizado en la parte ventral del telencéfalo. Debido a que las condiciones de cultivo usadas en este trabajo no permiten la sobrevivencia de neuronas provenientes de los tejidos mencionados, el mRNA de D3R detectado es atribuido a un origen glial, sin poder determinar con esto, si es que proviene de microglías o astrocitos. Este resultado está acorde con lo reportado en un trabajo previo, en donde se detecta el mRNA de D3R además de una variedad de otros receptores de neurotransmisores y proteínas involucradas en señalización en cultivos primarios de glía mixta, pero que a diferencia de éste trabajo son establecidos a partir de cerebros completos de rata (Lisak y cols, 2009).

Según lo descrito por Färber y cols. en 2005, las microglías de un cultivo primario de ratón solo expresan los DARs del tipo I, es decir, D1R y D5R, mientras que las microglías de rata expresan todos los DARs exceptuando el D3R. Sin embargo, ambos cultivos son generados desde tejido cortical y no desde cerebro medio o estriado. Pese a la diferencia en cuanto a la estructura cerebral de la cual provienen las células analizadas, los datos de expresión de los DARs informados en este trabajo nos permite suponer que la producción del mRNA de D3R detectado por nosotros es responsabilidad de otro tipo celular distinto a las microglías que está presente en el cultivo de glía mixta, lo cual nos hace pensar inmediatamente en los astrocitos. Para corroborar la ausencia de D3R en microglía, y la posible presencia de astrocitos expresando el mRNA de D3R, establecimos cultivos purificados de cada uno de estos tipos celulares. El análisis por separado de la expresión de D3R, determinó la ausencia de su mRNA en microglías, resultado acorde con lo informado por Färber y cols previamente. De manera opuesta a estos resultados, un trabajo reciente identifica la expresión de los cinco DARs en microglías de ratón (Huck y cols, 2015). Las discrepancias al respecto pueden explicarse para cada caso. Pese a que en el trabajo de Färber y cols. se usaron microglías provenientes de la misma estructura cerebral que la analizada por Huck y cols., las cepas de ratones usados para los experimentos no fue la misma. Mientras que los primeros usaron la cepa NMRI, los segundos utilizaron la cepa C57BL6. Respecto a nuestro resultado, si bien usamos la cepa C57BL6 al igual que Huck y cols., como mencionamos anteriormente, nuestros cultivos fueron preparados a partir de cerebro medio y estriado.

Al analizar el cultivo purificado de astrocitos logramos detectar el mRNA de D3R, dando cuenta de que su expresión detectada en el cultivo de glía mixta efectivamente se debía a los astrocitos presentes. Posteriormente, decidimos verificar la traducción del mRNA detectado y

estudiar la presencia de la proteína mediante inmunofluorescencia (Figura 2B). El análisis de las imágenes obtenidas mediante microscopia de fluorescencia aportó evidencia clara de la expresión de D3R a nivel de proteína en astrocitos del núcleo estriado/cerebro medio de ratón. Este resultado concuerda con lo reportado previamente por otros autores, pero en especies o zonas del cerebro distintas a la usada en este trabajo. En 2004, Miyazaki y cols. demostraron la expresión de D3R, junto a otros DARs, en astrocitos cultivados provenientes del estriado de embriones de rata (Miyazaki y cols., 2004). Tiempo después, mediante inmunohistoquímica en análisis *post mortem* de la corteza frontal, se encontró la expresión de D3R en astrocitos de humanos sanos de avanzada edad y en otros que padecían de enfermedad de Alzheimer (Kumar y cols., 2007). Este trabajo además da cuenta de una leve alza en la expresión del D3R en personas que padecían enfermedad de Alzheimer, sugiriendo un posible papel del D3R en la neuroinflamación existente en esta patología neurodegenerativa. Más reciente es la evidencia recogida a partir de astrocitos corticales de ratón, que indica la expresión de todos los DARs en estas células (Huck y cols., 2015).

Adicionalmente, existe evidencia sobre la expresión de D3R durante el proceso de diferenciación de oligodendrocitos, la cual desaparece en su estado de maduración (Bongarzone y cols., 1998). En el cultivo de glía mixta establecido por nosotros, la observación mediante inmunofluorescencia parece descartar la posible existencia de otro tipo celular distinto a microglías y astrocitos, ya que no se observaron núcleos que no estuvieran rodeados por inmunoreactividad de CD11b (marcador de microglía), o inmunoreactividad de GFAP (marcador de astrocito) (Figura 1B). Sin embargo, no podemos asegurar la completa inexistencia de precursores de oligodendrocitos responsables de la expresión de D3R detectada

por nosotros en el cultivo de glía mixta, ya que no usamos marcadores específicos para identificar su presencia.

Además de las evidencias mencionadas respecto de la expresión de receptores de neurotransmisores en glías, existen también antecedentes sobre cambios en los niveles de expresión de éstos, frente a estímulos inflamatorios o en el contexto de una enfermedad neurodegenerativa. En cuanto a las variaciones de los niveles de D3R presentes en glías, Lisak y cols. utilizaron cultivos primarios de glía mixta de rata, en los cuales se analizó el cambio de los niveles de mRNA de distintos genes, involucrados en metabolismo, mecanismos regulatorios y señalización celular, a consecuencia de la exposición a una mezcla de citoquinas asociadas a los fenotipos linfocitarios Th1 (IL-2, IFN- γ , TNF- α , G-CSF) y Th2 (IL-4, IL-5, G-CSF, TGF- β_1), además de las relacionadas a una activación tipo M1 de macrófagos (IL-1 β , IL-6, IL-12p40) (Lisak y cols, 2009). Uno de los resultados que más destacan los autores de este trabajo, es precisamente la marcada disminución en la expresión de D3R inducida por las tres mezclas de citoquinas. Esta disminución es de aproximadamente 10 veces a consecuencia de las citoquinas relacionadas con el fenotipo pro-inflamatorio Th1 y de 8 veces en el caso de la mezcla tipo Th2, la cual posee un carácter más bien anti-inflamatorio. Este resultado es llamativo, puesto que sugiere que la expresión del D3R podría tener relación con el proceso de activación, independientemente si se trata de una activación M1 o M2.

En la literatura también se describen cambios en la expresión de receptores para neurotransmisores distintos a la dopamina en procesos relacionados con la inflamación. En este sentido, la activación *in vivo* de microglías del estriado de ratón mediante una inyección intracraneal de LPS induce una caída progresiva en la expresión del receptor purinérgico de

preferencia por ADP P2Y₁₂, disminución que desaparece al cabo de 4 días después del daño (Hesse y cols., 1997). La presencia de éste receptor es importante para la activación morfológica y la quimiotaxis de microglías en respuesta a un daño cerebral (Honda y cols., 2001). Al igual que el D3R, el receptor P2Y₁₂ es una proteína de 7 segmentos transmembrana unida a una proteína G cuya actividad está asociada a la inhibición de la adenilato-ciclasa y por lo tanto, a una disminución de los niveles intracelulares de cAMP. Otro receptor de neurotransmisor que cambia su expresión en glías, asociado al proceso de neuroinflamación, y que además su activación inhibe la producción de cAMP, es el receptor de glutamato mGluR5. Sin embargo, éste receptor aumenta su expresión frente a un daño en el SNC (Drouin-Ouellet y cols., 2011), en lugar de disminuirla como ocurre con el D3R frente a estímulos pro-inflamatorios (Lisak y cols, 2009).

Respecto del cAMP y su relación con la neuroinflamación, se ha descrito recientemente que el nivel de este mensajero intracelular es clave para la transformación de microglías con fenotipo M1 hacia al fenotipo anti-inflamatorio M2, declarando la necesaria coexistencia de una señal anti-inflamatoria como la IL-4 junto a un alto nivel de cAMP en la célula para que esto suceda (Ghosh y cols., 2016). Este fenómeno fue descrito usando una línea celular de microglía, cultivo primario y un modelo experimental de lesión al SNC. En estudios *in vitro*, microglías activadas hacia el fenotipo M1 mediante LPS o TNF- α , son expuestas a IL-4, sumando o no un análogo de cAMP al medio de cultivo para evaluar el paso hacia una activación tipo M2. Solo la presencia conjunta de IL-4 y cAMP es capaz de aumentar notoriamente la expresión de Arg1 y de bajar la producción de citoquinas pro-inflamatorias y especies reactivas de oxígeno, sin generar alteraciones en la capacidad fagocítica. Usando un modelo de neuroinflamación *in vivo* consistente en la lesión por contusión de la medula espinal, se demostró que la administración

sistémica de IL-4 más cAMP produce un cambio significativo de fenotipo M1 hacia M2 en las poblaciones de macrófagos y microglías presentes en el sitio de la lesión (Ghosh y cols., 2016).

Como se mencionó anteriormente, tanto el receptor de glutamato mGluR5 como el D3R señalizan al interior de la célula mediante su acoplamiento con la proteína G inhibitoria de la adenilato ciclasa, por lo que su actividad implicaría un descenso en el nivel de cAMP al interior de la célula (Franz y cols., 2015). Además, ambos receptores han sido relacionados con la actividad pro-inflamatoria de las células que lo expresan (Contreras y cols., 2016; González y cols., 2013; Drouin-Ouellet y cols., 2011). Sin embargo y según los antecedentes expuestos, estos receptores presentan una dinámica contraria en cuanto a su expresión, ya que el D3R disminuye, mientras que el mGluR5 aumenta frente a un contexto pro-inflamatorio. Esto hace algo más complejo el análisis respecto de la implicancia que tienen los receptores acoplados a proteína G en la activación M1-M2 mediada por la regulación que ejercen sobre los niveles de cAMP. Sumado a esto, el receptor D2R, que al igual que el D3R se encuentra acoplado a proteína G inhibitoria, ha sido destacado recientemente por su relevancia en la activación anti-inflamatoria de astrocitos mediada por el aumento de la proteína α B-crystallin. La estimulación de D2R mediante el uso de un agonista específico otorga protección frente al efecto neurotóxico del MPTP, mientras que su eliminación específica en astrocitos induce una exacerbada neurodegeneración y activación pro-inflamatoria de las glías (Shao y cols. 2013).

Otros receptores también cambian su expresión en el momento que las células son expuestas a un contexto pro-inflamatorio, como es el caso del receptor AMPA GluR4 en astrocitos, el cual disminuye su expresión en un modelo de daño agudo a la médula espinal (Park y cols, 2003). Otro ejemplo es el receptor purinérgico P2X7 en astrocitos humanos que son estimulados con

IL-1 β , en donde su expresión tanto a nivel de mRNA como de proteína, aumenta de manera transitoria por efecto de esta citoquina pro-inflamatoria (Narcisse y cols, 2005).

La neuroinflamación es un proceso que acompaña a muchas patologías del SNC incluidas enfermedades neurodegenerativas y lesiones traumáticas, y ha sido indicada como un factor fundamental en el deterioro progresivo y muerte neuronal. En base a diversos experimentos que demostraron que las microglías expuestas a factores pro-inflamatorias adquirían características de los macrófagos, incluidas cambio de forma y alta producción de citoquinas pro-inflamatorias, inicialmente se consideró a la activación inflamatoria dentro del SNC como un elemento de carácter perjudicial y peligroso para el ambiente celular y en especial para las neuronas. Con esta perspectiva en mente, se diseñaron estrategias para combatir la neuroinflamación presente en patologías neurodegenerativas del SNC, basadas en el tratamiento con drogas anti-inflamatorias de amplio espectro. Sin embargo, muchas de estas estrategias fallaron en lograr mejoras en las pruebas clínicas (Peña-Altamira y cols., 2015). La explicación a esto vino con la identificación del fenotipo anti-inflamatorio M2 de las microglías y la comprensión de su potencial benéfico, capaz de generar la disminución de los componentes inflamatorios, además de inducir la reparación en los tejidos afectados. Este fenotipo benéfico era igualmente inhibido por las drogas anti-inflamatorias usadas inicialmente, impidiendo el desarrollo de la respuesta neuroprotectora. Hoy en día, se tiene un mejor conocimiento respecto de la dinámica de activación de las microglías, y se acumula cada vez mayor evidencia sobre la existencia de esta polarización fenotípica también en astrocitos, posicionándolos como un actor relevante en el control de la inflamación dentro del SNC (Liddelow y cols., 2017; Jang y cols., 2013).

De este modo, se torna necesario estudiar la activación de microglías y astrocitos en función de sus fenotipos pro- y anti-inflamatorios en modelos de neuroinflamación *in vivo*, en donde existen todos los componentes y actores que participan en la respuesta neuroinmune. Desde hace tiempo se han identificado las glías activadas principalmente mediante análisis histológico. El aumento de expresión de CD11b o Iba1 y el cambio morfológico de una forma altamente ramificada hacia una forma ameboide, han sido signos clásicamente observados en microglías para determinar su activación, mientras que el aumento de GFAP y la proliferación celular son los fenómenos más evaluados en el caso de los astrocitos. Si bien, este análisis efectivamente da cuenta de un estado reactivo de las microglía y astrocitos, poco habla sobre si la activación detectada es de carácter pro- o anti-inflamatoria (Tang y Le., 2016). Adicional a esto, en un modelo de neuroinflamación *in vivo* inducido por LPS, se ha descrito que microglías altamente ramificadas son las responsables de la producción de diversas moléculas pro-inflamatorias tales como IL-1 β , IL-6, TNF- α y CCL2, en los inicios de la respuesta, mientras que posteriormente adquieren un fenotipo desramificado y aumentan la expresión del marcador de activación Iba1, cambios comúnmente asociadas a una activación M1. Pese a ello, dejan de producir moléculas pro-inflamatorias y además expresan proteínas anti-inflamatorias como Ym1 e IL-10. Similar sucede con los astrocitos, los cuales en la etapa inicial disminuyen la producción de la citoquina anti-inflamatoria TGF- β y luego comienzan a producir los mismos componentes pro-inflamatorios que las microglías, todo esto sin ningún cambio en la expresión del marcador de astrogliosis GFAP. Este clásico indicador de la reactividad de los astrocitos solo comienza a incrementar su expresión en el tiempo en que también aumenta la producción de TGF- β , proceso coincidente con la presencia de una microglía desramificada que expresa componentes anti-inflamatorios (Norden y cols., 2016). Estos resultados evidencian la dinámica

y compleja respuesta inmune de las glías, y hacen patente la necesidad de un análisis más acorde, que considere la observación de ambos fenotipos activados en el transcurso temporal del proceso neuroinflamatorio. En este sentido, diversos investigadores del área recalcan la importancia de obtener un método que permita analizar la dinámica de aparición de uno y otro fenotipo activado, para así generar información que permita implementar estrategias de conversión del fenotipo M1 hacia el fenotipo M2 en el momento adecuado durante el proceso inflamatorio propio de cada patología, tiempo denominado como “ventanas terapéuticas” (Tang y Le., 2016; Jha y cols., 2016; Moehle y West, 2015).

En EP, si bien existe abundante información sobre el efecto que ejercen las glías con activación tipo M1, la información respecto el fenotipo M2 presente en esta patología es más escasa (Pisanu y cols., 2014). Sin embargo, en estudios *post mortem* se demostró la coexistencia de ambos fenotipos en el cerebro de humanos con EP (Rojo y cols, 2010). Adicional a esto, evidencia recogida *in vivo* en modelos de distintas enfermedades neurodegenerativas indican que la activación de glías al parecer, no es en realidad un proceso polarizado en donde existan de manera excluyente los fenotipos solo M1 o solo M2, sino más bien se trata de un espectro de activación en donde los extremos se encuentran los fenotipos descritos como M1 y M2.

El análisis de los marcadores asociados a estos dos fenotipos es una buena herramienta para seguir el desarrollo de la respuesta inflamatoria de las glías y describir su estado de activación. El uso de la citometría de flujo permite observar la expresión de estos marcadores en una cantidad de células superior al que permite el análisis histológico mediante la aplicación de alguna técnica de inmunotinción (Bedi y cols., 2013). En este sentido, se ha reportado el uso de esta estrategia para estudiar la activación de microglías en un modelo de daño al SNC

consistente en una lesión traumática en el cerebro de ratón, provocada por un golpe controlado en el cráneo (Bedi y cols., 2013). El método descrito por Bedi y cols., considera el aumento de las proteínas de superficie CD16/32 y la expresión de CD206 como marcadores de la activación M1 y M2, respectivamente.

En este trabajo, los experimentos con el modelo de LPS mostraron una respuesta pro-inflamatoria menor en ratones D3RKO comparados con ratones WT. Los astrocitos pro-inflamatorios, identificados como iNOS(+), aumentan a las 24 h p.i. en ratones WT, lo cual no ocurre en los ratones D3RKO. Esto podría explicar lo observado por qPCR respecto de la expresión de la enzima pro-inflamatoria iNOS en el cerebro de ratones intoxicados con LPS. Los resultados de este análisis indicaron que a 24 h p.i. los ratones WT presentan un elevado nivel de iNOS, en cambio en los ratones D3RKO, la presencia de iNOS en el cerebro es casi nula (Figura 9C). Otorgando sustento a la idea de que el D3R tiene un papel en la activación de glías.

Debido a que el D3R tiene una función relevante en el SNC en ausencia de inflamación (Moraga-Amaro et al., 2014), decidimos evaluar como la carencia de D3R afecta basalmente el fenotipo de células gliales (Figura 4 y 5).

Los resultados de estos experimentos sugieren que astrocitos D3RKO se encuentran basalmente más activados que los astrocitos WT (debido a la mayor expresión de GFAP), pero con un fenotipo combinado con aspectos pro- y anti-inflamatorio (mayor expresión de iNOS y mayor frecuencia de astrocitos Arg1(+), respectivamente) (Figura 5). Pese a parecer extraño este fenotipo activado de astrocito, investigadores del tema consideran cada vez más el hecho de que la activación tanto de microglías, como de macrófagos, no es un proceso que conste de dos polos (uno M1 y otro M2), ni tampoco un espectro que oscila entre estos dos fenotipos

extremos y antagonistas, sino más bien, se trataría de un poliedro estrellado tridimensional con fenotipos de activación que se extienden en todas direcciones (Ransohoff, 2016). Dado el aumento progresivo de publicaciones que describen estados de activación polarizados en astrocitos, similares a los descritos en microglías (Jang y cols, 2013), la idea sobre activación del poliedro estrellado se puede extender a los astrocitos, lo cual ayudaría a comprender de mejor manera el fenotipo que exhiben ratones D3RKO basalmente. Este nuevo concepto de activación glial implica la importancia de identificar mediante el uso de nuevos métodos y herramientas, a los fenotipos de glías activadas en un proceso neuroinflamatorio.

Teniendo en cuenta que las microglías son las células que poseen la respuesta inflamatoria más robusta, y que justamente no expresan el D3R, las diferencias observadas entre los ratones WT y D3RKO sometidos al modelo de neuroinflamación inducido por LPS, puede tener su origen en los astrocitos que sí lo expresan.

De este modo, astrocitos que no poseen el D3R podrían predisponer de alguna forma a las microglías para que no se activen normalmente frente a un estímulo pro-inflamatorio. En este sentido, se ha descrito que las microglías son capaces de activar y regular el comportamiento de los astrocitos (Kettenmann y cols., 2011). No obstante, también se ha visto que los astrocitos pueden ejercer regulación sobre la activación de las microglías. La secreción específica de IL-10 en astrocitos transgénicos, induce cambios en la reactividad de las microglías y en la infiltración de linfocitos, lo cual promueve características neuroprotectoras en estos ratones, evitando la muerte de neuronas motoras en el modelo de daño al nervio facial (Villacampa y cols., 2015). Adicionalmente se conoce que la producción de galectina-9 por parte de los astrocitos potencia la producción de TNF- α en las microglías (Steelman y Li., 2014).

Para analizar el papel preciso del D3R en células gliales respecto de la producción de mediadores en respuesta a un ambiente pro- o anti-inflamatorio, llevamos a cabo experimentos usando cultivos primarios de glía mixta, los cuales contienen sólo microglías y astrocitos y observamos la presencia de distintos marcadores asociados al proceso de neuroinflamación (Figura 10). Los resultados de estos experimentos mostraron que los cultivos de glía mixta D3RKO presentaron una mayor expresión de *il1b* al ser estimulados con LPS. Considerando que la IL-1 β es un mediador temprano del proceso pro-inflamatorio, esto podría relacionarse con lo observado en microglías en el modelo de neuroinflamación inducido por LPS, en donde la deficiencia de D3R, tanto genética como farmacológica, induce una mayor razón M1/M2. Por otro lado, la expresión de componentes anti-inflamatorios es mayor en los cultivos D3RKO al ser expuestos a IL-4, lo cual se ve reflejado claramente en una mayor expresión de *fizz1*. Se ha descrito que una inyección de IL-4 en un ventrículo del cerebro induce el aumento de su expresión en más de 100 veces (Pepe et al, 2014). Además, Fizz1 ha sido descrito como un potente inhibidor de la inflamación pulmonar mediada por Th2 (Nair et al, 2009). Esta diferencia en la expresión génica encontrada en los cultivos de glía mixta, podría estar relacionada con las alteraciones en la adquisición de fenotipos activados de microglías y astrocitos observadas *in vivo*. Y podrían quizás, ser la causa del efecto neuroprotector que poseen los ratones D3RKO.

En resumen, la deficiencia de D3R impidió el aumento en la frecuencia de astrocitos pro-inflamatorios (iNOS+) en el modelo de neuroinflamación inducida por LPS observada en ratones WT. En cuanto a las microglías, la deficiencia genética o la inhibición farmacológica del D3R exacerbó la disminución de la población de microglías anti-inflamatorias que sucede 24 h posteriores a la intoxicación con LPS en ratones WT. Esto hizo que la deficiencia de D3R

produjera un fenotipo de microglías activadas con una razón M1/M2 superior a la de microglías de ratones WT. Observando la expresión génica en cerebro descubrimos que los ratones D3RKO no aumentaron la producción del mRNA de iNOS, como si sucedió en ratones WT. Además, pudimos determinar que la expresión basal de Fizz1 es superior en ratones D3RKO.

Al observar los fenotipos de microglías y astrocitos de ratones sin estímulo pro-inflamatorio previo, notamos que los astrocitos de ratones D3RKO presentan una mayor expresión de iNOS y GFAP, pero a su vez, también una mayor frecuencia de astrocitos anti-inflamatorios (ARG1+).

Mediante experimentos *in vitro*, determinamos que el D3R se expresa en astrocitos y no en microglías. Analizando la expresión génica bajo contextos pro- y anti-inflamatorios, observamos que los cultivos de glía mixta proveniente de ratones D3RKO producen más IL-1 β en un contexto pro-inflamatorio, y también, producen más Fizz1 en un contexto anti-inflamatorio.

Los resultados presentados en esta tesis sugieren que la señalización desencadenada por el receptor de dopamina D3 *in vivo* regula la adquisición de fenotipos funcionales de células gliales. Esta señalización inhibiría la producción de la molécula anti-inflamatoria Fizz1 y mantendría una menor frecuencia de astrocitos activados en condiciones basales. Ante un proceso de neuroinflamación, el receptor de dopamina D3 favorecería una adquisición de fenotipo pro-inflamatorio por los astrocitos y una mayor frecuencia de fenotipo M2 por la microglía junto a una fuerte producción de iNOS. La integración de este conjunto de efectos desencadenados por la señalización del receptor de dopamina D3 promovería finalmente la neuroinflamación.

Además, las evidencias obtenidas por experimentos *in vitro* indicaron que el receptor de dopamina D3 se expresa de manera selectiva solo en astrocitos, pero no en células microgliales. En concordancia con las evidencias obtenidas *in vivo*, estos análisis además mostraron que el receptor D3 de dopamina expresado en astrocitos inhibe fuertemente la producción de Fizz1 y en menor grado la producción de IL-1 β por células gliales.

En conjunto, estos resultados sugieren que la señalización desencadenada por el receptor D3 de dopamina juega un papel relevante en la regulación del proceso de neuroinflamación a través de un mecanismo complejo que involucra la modificación funcional tanto de células microgliales así como de astrocitos.

10.- BIBLIOGRAFÍA

Arreola R, Alvarez-Herrera S, Pérez-Sánchez G, Becerril-Villanueva E, Cruz-Fuentes C, Flores-Gutierrez EO, Garcés-Alvarez ME, de la Cruz-Aguilera DL, Medina-Rivero E, Hurtado-Alvarado G, Quintero-Fabián S, Pavón L. 2016. Immunomodulatory Effects Mediated by Dopamine. *J Immunol Res.*;2016:3160486.

Aronica E, Gorter JA, Rozemuller AJ, Yankaya B, Troost D. 2005. Activation of metabotropic glutamate receptor 3 enhances interleukin (IL)-1 β -stimulated release of IL-6 in cultured human astrocytes. *Neuroscience.*;130(4):927-33.

Appel SH, Zhao W, Beers DR, Henkel JS. 2011. The microglial-motoneuron dialogue in ALS. *Acta Myol. Jun*;30(1):4-8.

Bedi SS, Smith P, Hetz RA, Xue H, Cox CS. 2013. Immunomagnetic enrichment and flow cytometric characterization of mouse microglia. *J Neurosci Methods. Sep 30*;219(1):176-82.

Beers DR, Henkel JS, Zhao W, Wang J, Huang A, Wen S, Liao B, Appel SH. 2011. Endogenous regulatory T lymphocytes ameliorate amyotrophic lateral sclerosis in mice and correlate with disease progression in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Brain. May*;134(Pt 5):1293-314.

Bernardino L, Balosso S, Ravizza T, Marchi N, Ku G, Randle JC, Malva JO, Vezzani A. 2008. Inflammatory events in hippocampal slice cultures prime neuronal susceptibility to excitotoxic injury: a crucial role of P2X7 receptor-mediated IL-1 β release. *J Neurochem* 106: 271–280.

Beynon SB, Walker FR. 2012. Microglial activation in the injured and healthy brain: what are we really talking about? Practical and theoretical issues associated with the measurement of changes in microglial morphology. *Neuroscience. Dec 6*;225:162-71.

Biber K, Neumann H, Inoue K, Boddeke HW. 2007. Neuronal 'On' and 'Off' signals control microglia. *Trends Neurosci.* Nov;30.

Biesmans S, Meert TF, Bouwknecht JA, Acton PD, Davoodi N, De Haes P, Kuijlaars J, Langlois X, Matthews LJ, Ver Donck L, Hellings N, Nuydens R. 2013. Systemic immune activation leads to neuroinflammation and sickness behavior in mice. *Mediators Inflamm.* 2013:271359.

Boucsein C, Zacharias R, Farber K, Pavlovic S, Hanisch UK, Kettenmann H. 2003. Purinergic receptors on microglial cells: functional expression in acute brain slices and modulation of microglial activation in vitro. *Eur J Neurosci* 17: 2267–2276.

Bongarzone ER, Howard SG, Schonmann V, Campagnoni AT. 1998. Identification of the dopamine D3 receptor in oligodendrocyte precursors: potential role in regulating differentiation and myelin formation. *J Neurosci.* Jul 15;18(14):5344-53.

Brochard V, Combadière B, Prigent A, Laouar Y, Perrin A, Beray-Berthat V, Bonduelle O, Alvarez-Fischer D, Callebert J, Launay JM, Duyckaerts C, Flavell RA, Hirsch EC, Hunot S. 2009. Infiltration of CD4+ lymphocytes into the brain contributes to neurodegeneration in a mouse model of Parkinson disease. *J Clin Invest.* Jan;119(1):182-92.

Bruttger J, Karram K, Wörtge S, Regen T, Marini F, Hoppmann N, Klein M, Blank T, Yona S, Wolf Y, Mack M, Pinteaux E, Müller W, Zipp F, Binder H, Bopp T, Prinz M, Jung S, Waisman A. 2015. Genetic Cell Ablation Reveals Clusters of Local Self-Renewing Microglia in the Mammalian Central Nervous System. *Immunity.* Jul 21;43(1):92-106.

Burnstock G. 2007. Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci* 64: 1471–1483.

Carnevale D, De Simone R, Minghetti L. 2007. Microglia-neuron interaction in inflammatory and degenerative diseases: role of cholinergic and noradrenergic systems. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 6: 388–397.

Carpentier PA, Duncan DS, Miller SD. 2008. Glial toll-like receptor signaling in central nervous system infection and autoimmunity. *Brain Behav Immun.* Feb;22(2):140-7.

Cherry JD, Olschowka JA, O'Banion MK. 2014. Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. *J Neuroinflammation*. Jun 3;11:98.

Choi HB, Ryu JK, Kim SU, McLarnon JG. 2007. Modulation of the purinergic P2X7 receptor attenuates lipopolysaccharide-mediated microglial activation and neuronal damage in inflamed brain. *J Neurosci* 27: 4957–4968.

Contreras F, Prado C, González H, Franz D, Osorio-Barríos F, Osorio F, Ugalde V, Lopez E, Elgueta D, Figueroa A, Lladser A, Pacheco R. 2016. Dopamine Receptor D3 Signaling on CD4+ T Cells Favors Th1- and Th17-Mediated Immunity. *J Immunol*. May 15;196(10):4143-9.

Cunningham C. 2013. Microglia and neurodegeneration: the role of systemic inflammation. *Glia*. 61(1):71–90.

David S, Kroner A. 2011. Repertoire of microglial and macrophage responses after spinal cord injury. *Nat Rev Neurosci*. 12:388–99.

Di Cesare Mannelli L, Tenci B, Zanardelli M, Failli P, Ghelardini C. 2015. $\alpha 7$ Nicotinic Receptor Promotes the Neuroprotective Functions of Astrocytes against Oxaliplatin Neurotoxicity. *Neural Plast*. 2015:396908.

Di Virgilio F. Liaisons dangereuses: P2X(7) and the inflammasome. *Trends Pharmacol Sci*. 2007 Sep;28(9):465-72.

Drouin-Ouellet J, Brownell AL, Saint-Pierre M, Fasano C, Emond V, Trudeau LE, Lévesque D, Cicchetti F. 2011. Neuroinflammation is associated with changes in glial mGluR5 expression and the development of neonatal excitotoxic lesions. *Glia*. Feb;59(2):188-99.

Durand D1, Caruso C, Carniglia L, Lasaga M. 2010. Metabotropic glutamate receptor 3 activation prevents nitric oxide-induced death in cultured rat astrocytes. *J Neurochem*. Jan;112(2):420-33.

El Oussini H, Bayer H, Scekcic-Zahirovic J, Vercruyssen P, Sinniger J, Dirrig-Grosch S, Dieterlé S, Echaniz-Laguna A, Larmet Y, Müller K, Weishaupt JH, Thal DR, van Rheenen W, van Eijk K, Lawson R, Monassier L, Maroteaux L, Roumier A, Wong PC, van den Berg LH, Ludolph AC,

Veldink JH, Witting A, Dupuis L. 2016. Serotonin 2B receptor slows disease progression and prevents degeneration of spinal cord mononuclear phagocytes in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol.* Mar;131(3):465-80.

Elgueta D, Aymerich MS, Contreras F, Montoya A, Celorrio M, Rojo-Bustamante E, Riquelme E, González H, Vásquez M, Franco R, Pacheco R. 2017. Pharmacologic antagonism of dopamine receptor D3 attenuates neurodegeneration and motor impairment in a mouse model of Parkinson's disease. *Neuropharmacology.* Feb;113.

Färber, K., Pannasch, U., Kettenmann, H. 2005. Dopamine and noradrenaline control distinct functions in rodent microglial cells. *Mol Cell Neurosci.* May;29(1):128-38.

Färber K, Pannasch U, Kettenmann H. 2005. Dopamine and noradrenaline control distinct functions in rodent microglial cells. *Mol Cell Neurosci.* May;29(1):128-38.

Farso MC, O'Shea RD, Beart PM. 2009. Evidence group I mGluR drugs modulate the activation profile of lipopolysaccharide-exposed microglia in culture. *Neurochem Res.* Oct;34(10):1721-8.

Fiebich BL, Biber K, Lieb K, van Calker D, Berger M, Bauer J, Gebicke-Haerter PJ. 1996. Cyclooxygenase-2 expression in rat microglia is induced by adenosine A2a-receptors. *Glia* 18: 152–160.

Fiebich B. L., Akundi R. S., Biber K., Hamke M., Schmidt C., Butcher R. D., Van Calker D. and Willmroth F. 2005. IL-6 expression induced by adenosine A2b receptor stimulation in U373 MG cells depends on p38 mitogen activated kinase and protein kinase C. *Neurochem. Int.* 46, 501–512.

Förster D, Reiser G. 2016. Nucleotides protect rat brain astrocytes against hydrogen peroxide toxicity and induce antioxidant defense via P2Y receptors. *Neurochem Int.* Mar;94:57-66.

Franz D, Contreras F, González H, Prado C, Elgueta D, Figueroa C, Pacheco R. 2015. Dopamine receptors D3 and D5 regulate CD4(+)T-cell activation and differentiation by modulating ERK activation and cAMP production. *J Neuroimmunol.* Jul 15;284:18-29.

Fujita H, Tanaka J, Maeda N, Sakanaka M. 1998. Adrenergic agonists suppress the proliferation of microglia through beta 2-adrenergic receptor. *Neurosci Lett*. Feb 6;242(1):37-40.

Fujita T, Tozaki-Saitoh H, Inoue K. 2009. P2Y1 receptor signaling enhances neuroprotection by astrocytes against oxidative stress via IL-6 release in hippocampal cultures. *Glia*. Feb;57(3):244-57.

Gessi S, Merighi S, Stefanelli A, Fazzi D, Varani K, Borea PA. A(1) and A(3) adenosine receptors inhibit LPS-induced hypoxia-inducible factor-1 accumulation in murine astrocytes. *Pharmacol Res*. 2013 Oct;76:157-70. 2010. Glass CK, Saijo K, Winner B, Marchetto MC, Gage FH. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell*. Mar 19;140(6):918-34.

Ghosh M, Xu Y, Pearse DD. 2016. Cyclic AMP is a key regulator of M1 to M2a phenotypic conversion of microglia in the presence of Th2 cytokines. *J Neuroinflammation*. Jan 13;13:9.

Glebov K, Löchner M, Jabs R, Lau T, Merkel O, Schloss P, Steinhäuser C, Walter J. 2015. Serotonin stimulates secretion of exosomes from microglia cells. *Glia*. Apr;63(4):626-34.

González H, Contreras F, Prado C, Elgueta D, Franz D, Bernales S, Pacheco R. 2013. Dopamine receptor D3 expressed on CD4+ T cells favors neurodegeneration of dopaminergic neurons during Parkinson's disease. *J Immunol*. May 15;190(10):5048-56.

Graeber MB. 2010. Changing face of microglia. *Science*. Nov 5;330(6005):783-8.

Heese K, Fiebich BL, Bauer J, Otten U. 1997. Nerve growth factor (NGF) expression in rat microglia is induced by adenosine A2 receptors. *Neurosci Lett* 231: 83–86.

Hanamsagar R, Hanke ML, Kielian T. 2012. Toll-like receptor (TLR) and inflammasome actions in the central nervous system. *Trends Immunol*. Jul;33(7):333-42.

Haselkorn ML, Shellington D, Jackson E, Vagni VA, Janesko KL, Dubey RK, Gillespie DG, Cheng D, Bell MJ, Jenkins LW, Homanics GE, Schnermann J, Kochanek PM. 2010. Adenosine A1 receptor activation as a brake on the microglial response after experimental traumatic brain injury in mice. *J Neurotrauma* 27: 901–910.

Hellwig S1, Heinrich A, Biber K. 2013. The brain's best friend: microglial neurotoxicity revisited. *Front Cell Neurosci.* May 16;7:71.

Heneka MT, Kummer MP, Latz E. 2014. Innate immune activation in neurodegenerative disease. *Nat Rev Immunol.* Jul;14(7):463-77.

Hinojosa AE, García-Bueno B, Leza JC, Madrigal JL. 2011. Regulation of CCL2/MCP-1 production in astrocytes by desipramine and atomoxetine: involvement of α 2 adrenergic receptors. *Brain Res Bull.* Nov 25;86(5-6):326-33.

Honda S, Sasaki Y, Ohsawa K, Imai Y, Nakamura Y, Inoue K, Kohsaka S. 2001. Extracellular ATP or ADP induce chemotaxis of cultured microglia through Gi/o-coupled P2Y receptors. *J Neurosci* 21: 1975–1982.

Hoogland IC, Houbolt C, van Westerloo DJ, van Gool WA, van de Beek D. 2015. Systemic inflammation and microglial activation: systematic review of animal experiments. *J Neuroinflammation.* Jun 6;12:114.

Huck JH, Freyer D, Böttcher C, Mladinov M, Muselmann-Genschow C, Thielke M, Gladow N, Bloomquist D, Mergenthaler P, Priller J. 2015. De novo expression of dopamine D2 receptors on microglia after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* Nov;35(11):1804-11.

Inoue K, Tsuda M, Tozaki-Saitoh H. 2007. Modification of neuropathic pain sensation through microglial ATP receptors. *Purinergic Signal* 3: 311–316.

Jang E, Kim JH, Lee S, Kim JH, Seo JW, Jin M, Lee MG, Jang IS, Lee WH, Suk K. 2013. Phenotypic polarization of activated astrocytes: the critical role of lipocalin-2 in the classical inflammatory activation of astrocytes. *J Immunol.* Nov 15;191(10):5204-19

Jha MK, Lee WH, Suk K. 2016. Functional polarization of neuroglia: Implications in neuroinflammation and neurological disorders. *Biochem Pharmacol.* Mar 1;103:1-16.

Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A. 2011. Physiology of microglia. *Physiol Rev.* Apr;91(2):461-553.

Kim SG, Soltysiak KA, Gao ZG, Chang TS, Chung E, Jacobson KA. 2003. Tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis in astrocytes is prevented by the activation of P2Y6, but not P2Y4 nucleotide receptors. *Biochem Pharmacol.* Mar 15;65(6):923-31.

Koscsó B, Csóka B, Selmeczy Z, Himer L, Pacher P, Virág L, Haskó G. 2012. Adenosine augments IL-10 production by microglial cells through an A2B adenosine receptor-mediated process. *J Immunol.* Jan 1;188(1):445-53.

Kumar U, Patel SC. 2007. Immunohistochemical localization of dopamine receptor subtypes (D1R-D5R) in Alzheimer's disease brain. *Brain Res.* Feb 2;1131(1):187-96.

Laureys G, Gerlo S, Spooren A, Demol F, De Keyser J, Aerts JL. 2014. β_2 -adrenergic agonists modulate TNF- α induced astrocytic inflammatory gene expression and brain inflammatory cell populations. *J Neuroinflammation.* Jan 30;11:21.

Lehnardt S. 2010. Innate immunity and neuroinflammation in the CNS: the role of microglia in Toll-like receptor-mediated neuronal injury. *Glia.* Feb;58(3):253-63.

Li Y, Kuzhikandathil EV. 2012. Molecular characterization of individual D(3) dopamine receptor-expressing cells isolated from multiple brain regions of a novel mouse model. *Brain Struct Funct.* Jan 29.

Liddel SA, Guttenplan KA, Clarke LE, Bennett FC, Bohlen CJ, Schirmer L, Bennett ML, Münch AE, Chung WS, Peterson TC, Wilton DK, Frouin A, Napier BA, Panicker N, Kumar M, Buckwalter MS, Rowitch DH, Dawson VL, Dawson TM, Stevens B, Barres BA. 2017. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature.* Jan 26;541(7638):481-487.

Lieb K, Biersack L, Waschbisch A, Orlikowski S, Akundi RS, Candelario-Jalil E, Hüll M, Fiebich BL. 2005. Serotonin via 5-HT7 receptors activates p38 mitogen-activated protein kinase and protein kinase C epsilon resulting in interleukin-6 synthesis in human U373 MG astrocytoma cells. *J Neurochem.* May;93(3):549-59.

Lisak RP., Benjamins JA., Bealmear B., Nedelkoska L., Studzinski D., Retland E., Yao B., Land S. 2009. Differential effects of Th1, monocyte/macrophage and Th2 cytokine mixtures on early

gene expression for molecules associated with metabolism, signaling and regulation in central nervous system mixed glial cell cultures. *J Neuroinflammation*. Jan 21;6:4

Liu J, Gao XF, Ni W, Li JB. 2012. Effects of propofol on P2X7 receptors and the secretion of tumor necrosis factor- α in cultured astrocytes. *Clin Exp Med*. Mar;12(1):31-7.

Louveau A, Smirnov I, Keyes TJ, Eccles JD, Rouhani SJ, Peske JD, Derecki NC, Castle D, Mandell JW, Lee KS, Harris TH, Kipnis J. 2015. Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature*. Jul 16;523(7560):337-41.

Lucin KM, Wyss-Coray T. 2009. Immune activation in brain aging and neurodegeneration: too much or too little? *Neuron*. Oct 15;64

Mahé C, Loetscher E, Dev KK, Bobirnac I, Otten U, Schoeffter P. 2005. Serotonin 5-HT7 receptors coupled to induction of interleukin-6 in human microglial MC-3 cells. *Neuropharmacology*. Jul;49(1):40-7.

Mastroeni, D., Grover, A., Leonard, B., Joyce, JN., Coleman, PD., Kozik, B., Bellinger, DL., Rogers, J. 2009. Microglial responses to dopamine in a cell culture model of Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*. Nov;30(11):1805-17.

Mingam R, De Smedt V, Amedee T, Bluthe RM, Kelley KW, Dantzer R, Laye S. 2008. *In vitro* and *in vivo* evidence for a role of the P2X7 receptor in the release of IL-1 β in the murine brain. *Brain Behav Immun* 22: 234–244.

Miyazaki I, Asanuma M, Diaz-Corrales FJ, Miyoshi K, Ogawa N. 2004. Direct evidence for expression of dopamine receptors in astrocytes from basal ganglia. *Brain Res*. Dec 10;1029(1):120-3.

Miyazaki I, Asanuma M, Murakami S, Takeshima M, Torigoe N, Kitamura Y, Miyoshi K. 2013. Targeting 5-HT(1A) receptors in astrocytes to protect dopaminergic neurons in Parkinsonian models. *Neurobiol Dis*. Nov;59:244-56.

Moehle MS, West AB. 2015. M1 and M2 immune activation in Parkinson's Disease: Foe and ally? *Neuroscience*. Aug 27;302:59-73.

Moraga-Amaro R, Gonzalez H, Pacheco R, Stehberg J. 2014. Dopamine receptor D3 deficiency results in chronic depression and anxiety. *Behav Brain Res*. Nov 1;274:186-93.

Moon JH, Kim SY, Lee HG, Kim SU, Lee YB. 2008. Activation of nicotinic acetylcholine receptor prevents the production of reactive oxygen species in fibrillar β amyloid peptide (1– 42)-stimulated microglia. *Exp Mol Med* 40: 11–18.

Nair MG, Du Y, Perrigoue JG, Zaph C, Taylor JJ, Goldschmidt M, Swain GP, Yancopoulos GD, Valenzuela DM, Murphy A, Karow M, Stevens S, Pearce EJ, Artis D. 2009. Alternatively activated macrophage-derived RELM- α is a negative regulator of type 2 inflammation in the lung. *J Exp Med*. Apr 13;206(4):937-52

Nagai Y, Ueno S, Saeki Y, Soga F, Hirano M, Yanagihara T. 1996. Decrease of the D3 dopamine receptor mRNA expression in lymphocytes from patients with Parkinson's disease. *Neurology*. Mar;46(3):791-5.

Narcisse L1, Scemes E, Zhao Y, Lee SC, Brosnan CF. 2005. The cytokine IL-1 β transiently enhances P2X7 receptor expression and function in human astrocytes. *Glia*. Jan 15;49(2):245-58.

Nayak D, Roth TL, McGavern DB. 2014. Microglia development and function. *Annu Rev Immunol*.;32:367-402.

Norden DM, Trojanowski PJ, Villanueva E, Navarro E, Godbout JP. 2016. Sequential activation of microglia and astrocyte cytokine expression precedes increased Iba-1 or GFAP immunoreactivity following systemic immune challenge. *Glia*. Feb;64(2):300-16.

Ogata T, Chuai M, Morino T, Yamamoto H, Nakamura Y, Schubert P. 2003. Adenosine triphosphate inhibits cytokine release from lipopolysaccharide-activated microglia via P2y receptors. *Brain Res* 981: 174–183.

Orr AG, Orr AL, Li XJ, Gross RE, Traynelis SF. 2009. Adenosine A2A receptor mediates microglial process retraction. *Nat Neurosci* 12: 872–878.

Orr AG, Hsiao EC, Wang MM, Ho K, Kim DH, Wang X, Guo W, Kang J, Yu GQ, Adame A, Devidze N, Dubal DB, Masliah E, Conklin BR, Mucke L. 2015. Astrocytic adenosine receptor A2A and Gs-coupled signaling regulate memory. *Nat Neurosci.* Mar;18(3):423-34.

Pacheco R, Contreras F, Zouali M. 2014. The dopaminergic system in autoimmune diseases. *Front Immunol.* Mar 21;5:117.

Pacheco R. 2017. Targeting dopamine receptor D3 signalling in inflammation. *Oncotarget.* Jan 31;8(5):7224-7225

Pannell M, Szulzewsky F, Matyash V, Wolf SA, Kettenmann H. 2014. The subpopulation of microglia sensitive to neurotransmitters/neurohormones is modulated by stimulation with LPS, interferon- γ , and IL-4. *Glia.* May;62(5):667-79.

Paquet M1, Ribeiro FM, Guadagno J, Esseltine JL, Ferguson SS, Cregan SP. 2013. Role of metabotropic glutamate receptor 5 signaling and homer in oxygen glucose deprivation-mediated astrocyte apoptosis. *Mol Brain.* Feb 14;6:9.

Park E, Liu Y, Fehlings MG. 2003. Changes in glial cell white matter AMPA receptor expression after spinal cord injury and relationship to apoptotic cell death. *Exp Neurol.* Jul;182(1):35-48.

Pepe G, Calderazzi G, De Maglie M, Villa AM, Vegeto E. 2014. Heterogeneous induction of microglia M2a phenotype by central administration of interleukin-4. *J Neuroinflammation.* Dec 31;11:211.

Pisanu A, Lecca D, Mulas G, Wardas J, Simbula G, Spiga S, Carta AR. 2014. Dynamic changes in pro- and anti-inflammatory cytokines in microglia after PPAR- γ agonist neuroprotective treatment in the MPTPp mouse model of progressive Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* Nov;71:280-91.

Poltorak A, Ricciardi-Castagnoli P, Citterio S, Beutler B. 2000. Physical contact between lipopolysaccharide and toll-like receptor 4 revealed by genetic complementation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Feb 29;97(5):2163-7.

Prado, C., Contreras, F., Gonzalez, H., Diaz, P., Elgueta, D., Barrientos, M., Herrada, A.A., Lladser, A., Bernales, S., Pacheco, R., 2012. Stimulation of dopamine receptor D5 expressed on dendritic cells potentiates Th17-mediated immunity. *J. Immunol.* 188, 3062–3070.

Prado C, Bernales S, Pacheco R. 2013. Modulation of T-cell mediated immunity by dopamine receptor d5. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.* Jun;13(2):184-94.

Prinz M, Häusler KG, Kettenmann H, Hanisch U. 2001. beta-adrenergic receptor stimulation selectively inhibits IL-12p40 release in microglia. *Brain Res.* Apr 27;899(1-2):264-70.

Raes G, De Baetselier P, Noël W, Beschin A, Brombacher F, Hassanzadeh Gh G. 2002. Differential expression of FIZZ1 and Ym1 in alternatively versus classically activated macrophages. *J Leukoc Biol.* Apr;71(4):597-602

Ransohoff, R.M. & Cardona, A.E. 2010. The myeloid cells of the central nervous system parenchyma. *Nature* 468, 253–262.

Ransohoff RM, Engelhardt B. 2012. The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system. *Nat Rev Immunol.* Sep;12(9):623-35

Ransohoff RM. 2016. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. *Science.* Aug 19;353(6301)

Rojo, A.I., Innamorato, N.G., Martín-Moreno, A.M., De Ceballos, M.L., Yamamoto, M., Cuadrado, A., 2010. Nrf2 regulates microglial dynamics and neuroinflammation in experimental Parkinson's disease. *Glia* 58, 588–598.

Rossi D. 2015. Astrocyte physiopathology: At the crossroads of intercellular networking, inflammation and cell death. *Prog Neurobiol.* Jul;130:86-120.

Saijo K, Glass CK. 2011. Microglial cell origin and phenotypes in health and disease.. *Nat Rev Immunol.* Oct 25;11(11):775-8

Sarkar C, Basu B, Chakroborty D, Dasgupta PS, Basu S. 2010. The immunoregulatory role of dopamine: an update. *Brain Behav Immun.* May;24(4):525-8.

Saura J, Angulo E, Ejarque A, Casado V, Tusell JM, Moratalla R, Chen JF, Schwarzschild MA, Lluís C, Franco R, Serratos J. 2005. Adenosine A2A receptor stimulation potentiates nitric oxide release by activated microglia. *J Neurochem* 95: 919–929.

Seo DR, Kim SY, Kim KY, Lee HG, Moon JH, Lee JS, Lee SH, Kim SU, Lee YB. 2008. Cross talk between P2 purinergic receptors modulates extracellular ATP-mediated interleukin-10 production in rat microglial cells. *Exp Mol Med* 40: 19–26.

Shah A1, Silverstein PS, Singh DP, Kumar A. 2012. Involvement of metabotropic glutamate receptor 5, AKT/PI3K signaling and NF- κ B pathway in methamphetamine-mediated increase in IL-6 and IL-8 expression in astrocytes. *J Neuroinflammation*. Mar 15;9:52.

Shao W, Zhang SZ, Tang M, Zhang XH, Zhou Z, Yin YQ, Zhou QB, Huang YY, Liu YJ, Wawrousek E, Chen T, Li SB, Xu M, Zhou JN, Hu G, Zhou JW. 2013. Suppression of neuroinflammation by astrocytic dopamine D2 receptors via α B-crystallin. *Nature*. Feb 7;494(7435):90-4.

Shemer A, Erny D, Jung S, Prinz M. 2015. Microglia Plasticity During Health and Disease: An Immunological Perspective. *Trends Immunol*. Oct;36(10):614-24

Sibley DR, Monsma FJ Jr, Shen Y. 1993. Molecular neurobiology of dopaminergic receptors. *Int Rev Neurobiol*.;35:391-415.

Sofroniew MV. 2015. Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation. *Nat Rev Neurosci*. May;16(5):249-63

Steelman AJ, Li J. 2014. Astrocyte galectin-9 potentiates microglial TNF secretion. *J Neuroinflammation*. Aug 27;11:144

Strange PG. 1993. New insights into dopamine receptors in the central nervous system. *Neurochem Int*. Mar;22(3):223-36.

Suzuki T, Hide I, Matsubara A, Hama C, Harada K, Miyano K, Andra M, Matsubayashi H, Sakai N, Kohsaka S, Inoue K, Nakata Y. 2006. Microglial α 7 nicotinic acetylcholine receptors drive a phospholipase C/IP3 pathway and modulate the cell activation toward a neuroprotective role. *J Neurosci Res* 83: 1461–1470.

- Tanaka KF, Kashima H, Suzuki H, Ono K, Sawada M. 2002. Existence of functional beta1- and beta2-adrenergic receptors on microglia. *J Neurosci Res.* Oct 15;70(2):232-7.
- Tanaka K, Okada Y, Kanno T, Otomo A, Yanagisawa Y, Shouguchi-Miyata J, Suga E, Kohiki E, Onoe K, Osuga H, Aoki M, Hadano S, Itoyama Y, Ikeda JE. 2008. A dopamine receptor antagonist L-745,870 suppresses microglia activation in spinal cord and mitigates the progression in ALS model mice. *Exp Neurol.* Jun;211(2):378-86
- Tang Y, Le W. 2016. Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol.* Mar;53(2):1181-94
- Taylor DL, Diemel LT, Cuzner ML, Pocock JM. 2002. Activation of group II metabotropic glutamate receptors underlies microglial reactivity and neurotoxicity following stimulation with chromogranin A, a peptide up-regulated in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 82: 1179–1191.
- Taylor DL, Diemel LT, Pocock JM. 2003. Activation of microglial group III metabotropic glutamate receptors protects neurons against microglial neurotoxicity. *J Neurosci* 23: 2150–2160.
- Taylor DL, Jones F, Kubota ES, Pocock JM. 2005. Stimulation of microglial metabotropic glutamate receptor mGlu2 triggers tumor necrosis factor α -induced neurotoxicity in concert with microglial-derived Fas ligand. *J Neurosci* 25: 2952–2964.
- Torres-Rosas R, Yehia G, Peña G, Mishra P, del Rocio Thompson-Bonilla M, Moreno-Eutimio MA, Arriaga-Pizano LA, Isibasi A, Ulloa L. 2014. Dopamine mediates vagal modulation of the immune system by electroacupuncture. *Nat Med.* Mar;20(3):291-5.
- Tsuda M, Shigemoto-Mogami Y, Koizumi S, Mizokoshi A, Kohsaka S, Salter MW, Inoue K. 2003. P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature* 424: 778–783.
- Vazquez JF, Clement HW, Sommer O, Schulz E, van Calker D. 2008. Local stimulation of the adenosine A2B receptors induces an increased release of IL-6 in mouse striatum: an in vivo microdialysis study. *J Neurochem.* May;105(3):904-9.

Verkhatsky A, Kirchhoff F. NMDA Receptors in glia. *Neuroscientist*. 2007 Feb;13(1):28-37

Verkhatsky A, Nedergaard M, Hertz L. 2015. Why are astrocytes important? *Neurochem Res*. Feb;40(2):389-401.

Villacampa N, Almolda B, Vilella A, Campbell IL, González B, Castellano B. 2015. Astrocyte-targeted production of IL-10 induces changes in microglial reactivity and reduces motor neuron death after facial nerve axotomy. *Glia*. Jul;63(7):1166-84.

Yan Y, Jiang W, Liu L, Wang X, Ding C, Tian Z, Zhou R. 2015. Dopamine controls systemic inflammation through inhibition of NLRP3 inflammasome. *Cell*. Jan 15;160(1-2):62-73.

Zeinstra EM, Wilczak N, Wilschut JC, Glazenburg L, Chesik D, Kroese FG, De Keyser J. 2006. 5HT4 agonists inhibit interferon-gamma-induced MHC class II and B7 costimulatory molecules expression on cultured astrocytes. *J Neuroimmunol*. Oct;179(1-2):191-5.

11.- ANEXO

Papers

Publicado:

Elgueta D, Aymerich MS, Contreras F, **Montoya A**, Celorrio M, Rojo-Bustamante E, Riquelme E, González H, Vásquez M, Franco R, Pacheco R. 2017. Pharmacologic antagonism of dopamine receptor D3 attenuates neurodegeneration and motor impairment in a mouse model of Parkinson's disease. *Neuropharmacology*. Feb;113.

En preparación:

Andro Montoya, María Rosa Bono, Rodrigo Pacheco. Dopamine receptor D3 signalling in astrocytes promotes neuroinflammation.

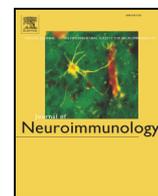
Reviews

González H, Elgueta D, **Montoya A**, Pacheco R. 2014. Neuroimmune regulation of microglial activity involved in neuroinflammation and neurodegenerative diseases. *J Neuroimmunol*. Sep 15;274(1-2):1-13.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Neuroimmunology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jneuroim

Review article

Neuroimmune regulation of microglial activity involved in neuroinflammation and neurodegenerative diseases

Hugo González^a, Daniela Elgueta^{a,b}, Andro Montoya^a, Rodrigo Pacheco^{a,c,*}^a Laboratorio de Neuroinmunología, Fundación Ciencia & Vida, Ñuñoa 7780272, Santiago, Chile^b Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Andrés Bello, 8370146 Santiago, Chile^c Programa de Biomedicina, Universidad San Sebastián, Ñuñoa 7780272, Santiago, Chile

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 March 2014

Received in revised form 27 June 2014

Accepted 16 July 2014

Available online xxxx

Keywords:

Neuroinflammation

Neurodegenerative disorders

Microglia

T-cells

Neo-antigens

Blood–brain barrier

ABSTRACT

Neuroinflammation constitutes a fundamental process involved in the progression of several neurodegenerative disorders, such as Parkinson's disease, Alzheimer's disease, amyotrophic lateral sclerosis and multiple sclerosis. Microglial cells play a central role in neuroinflammation, promoting neuroprotective or neurotoxic microenvironments, thus controlling neuronal fate. Acquisition of different microglial functions is regulated by intercellular interactions with neurons, astrocytes, the blood–brain barrier, and T-cells infiltrating the central nervous system. In this study, an overview of the regulation of microglial function mediated by different intercellular communications is summarised and discussed. Afterward, we focus in T-cell-mediated regulation of neuroinflammation involved in neurodegenerative disorders.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	0
2. Overview of microglial function	0
3. Molecular regulation of microglia in neuroinflammation	0
4. Neurons and astrocytes, two cellular regulators of neuroinflammation	0
4.1. Involvement of astrocytes in neuroinflammation and neurodegeneration	0
4.2. Involvement of neuron–microglia interactions in neuroinflammation and neurodegeneration	0
5. T-cells: the engine of chronic neuroinflammation	0
5.1. T-cells play important roles in the CNS during health and neuroinflammatory diseases	0
5.2. BBB disruption: a key step in T-cell-dependent neurodegeneration	0
5.3. Inflammatory and anti-inflammatory T-cells participate in regulating neuroinflammation	0
6. Antigens involved in the adaptive immune response associated with neurodegenerative diseases	0
6.1. Modified CNS-self antigens are involved in neurodegenerative diseases	0
6.2. Presentation of neo-antigens	0
7. Concluding remarks	0

Abbreviations: α -syn, α -synuclein; A β , β -amyloid peptide; AD, Alzheimer's disease; ALCAM, activated leukocyte cell adhesion molecule; ALS, amyotrophic lateral sclerosis; AMPA, α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid; APCs, antigen-presenting cells; BBB, blood–brain barrier; CCLn, C–C chemokine ligand n; CCRn, C–C chemokine receptor n; CDn, cluster of differentiation n; CNS, central nervous system; CSF, cerebrospinal fluid; CTLA4, cytotoxic T-lymphocyte antigen 4; CXCLn, C–X–C chemokine ligand n; CXCRn, C–X–C chemokine receptor n; DCs, dendritic cells; GATA3, GATA binding protein 3; GFAP, Glial Fibrillary Acidic Protein; GM-CSF, granulocyte macrophage-colony stimulating factor; HLA, human leukocyte antigen; HMGB1, high mobility group box 1; ICAM-1, intercellular adhesion molecule 1; IFN- γ , interferon γ ; IL-n, interleukin n; iNOS, inducible Nitric Oxide Synthase; LFA-1, lymphocyte function-associated antigen 1; LPS, lipopolysaccharide; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; MHC, Major Histocompatibility Complex; MPTP, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine; MS, multiple sclerosis; mSOD1, mutant SOD1; NF- κ B, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; NMDA, N-methyl-D-aspartate; NO, nitric oxide; PD, Parkinson's disease; P2Y6, purine-receptor 6; RNS, reactive nitrogen species; ROS, reactive oxygen species; SNpc, *substantia nigra pars compacta*; SOD1, superoxide dismutase 1; TCR, T-cell receptor; Thn, T helper n; TLRs, Toll like receptors; TLRn, Toll like receptor n; TGF- β , transforming growth factor β ; TNF- α , tumour necrosis factor α ; TNFR1, TNF- α receptor 1; VCAM-1, vascular cell adhesion molecule 1.

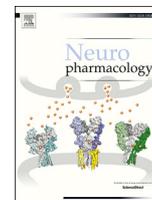
* Corresponding author at: Fundación Ciencia & Vida, Avenida Zañartu #1482, Ñuñoa 7780272, Santiago, Chile. Tel.: +56 2 23672046; fax: +56 2 22372259.

E-mail addresses: rpacheco@cienciavida.cl, rpacheco@gmail.com (R. Pacheco).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jneuroim.2014.07.012>

0165-5728/© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

Please cite this article as: González, H., et al., Neuroimmune regulation of microglial activity involved in neuroinflammation and neurodegenerative diseases, *J. Neuroimmunol.* (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jneuroim.2014.07.012>



Pharmacologic antagonism of dopamine receptor D3 attenuates neurodegeneration and motor impairment in a mouse model of Parkinson's disease



Daniela Elgueta^{a, b}, María S. Aymerich^{c, d, e}, Francisco Contreras^a, Andro Montoya^a, Marta Celorrio^c, Estefanía Rojo-Bustamante^{c, d}, Eduardo Riquelme^a, Hugo González^a, Mónica Vásquez^f, Rafael Franco^{g, h}, Rodrigo Pacheco^{a, b, *}

^a Fundación Ciencia & Vida, Ñuñoa, Santiago 7780272, Chile

^b Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Andres Bello, Santiago 8370146, Chile

^c Division of Neurosciences, Center for Applied Medical Research (CIMA), University of Navarra, Pamplona 31008, Spain

^d Department of Biochemistry and Genetics, School of Science, University of Navarra, Pamplona 31008, Spain

^e IdiSNA, Navarra Institute for Health Research, Pamplona, 31008, Spain

^f Department of Molecular Genetics and Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Pontificia Universidad Católica de Chile, Av. Libertador Bernardo O'Higgins 340, Santiago, Chile

^g Department of Biochemistry and Molecular Biomedicine, University of Barcelona, Barcelona 08028, Spain

^h CIBERNED. Centro de Investigación en Red. Enfermedades Neurodegenerativas, Instituto de Salud Carlos III, 28049, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 February 2016

Received in revised form

25 August 2016

Accepted 27 September 2016

Available online 28 September 2016

Keywords:

Parkinson's disease

Neuroinflammation

Dopamine receptors

Astrocytes

Microglia

ABSTRACT

Neuroinflammation involves the activation of glial cells, which is associated to the progression of neurodegeneration in Parkinson's disease. Recently, we and other researchers demonstrated that dopamine receptor D3 (D3R)-deficient mice are completely refractory to neuroinflammation and consequent neurodegeneration associated to the acute intoxication with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). In this study we examined the therapeutic potential and underlying mechanism of a D3R-selective antagonist, PG01037, in mice intoxicated with a chronic regime of administration of MPTP and probenecid (MPTPp). Biodistribution analysis indicated that intraperitoneally administered PG01037 crosses the blood-brain barrier and reaches the highest concentration in the brain 40 min after the injection. Furthermore, the drug was preferentially distributed to the brain in comparison to the plasma. Treatment of MPTPp-intoxicated mice with PG01037 (30 mg/kg, administered twice a week for five weeks) attenuated the loss of dopaminergic neurons in the *substantia nigra pars compacta*, as evaluated by stereological analysis, and the loss of striatal dopaminergic terminals, as determined by densitometric analyses of tyrosine hydroxylase and dopamine transporter immunoreactivities. Accordingly, the treatment resulted in significant improvement of motor performance of injured animals. Interestingly, the therapeutic dose of PG01037 exacerbated astrogliosis and resulted in increased ramification density of microglial cells in the striatum of MPTPp-intoxicated mice. Further analyses suggested that D3R expressed in astrocytes favours a beneficial astrogliosis with anti-inflammatory consequences on microglia. Our findings indicate that D3R-antagonism exerts a

Abbreviations: AUC, area under curve; BDNF, brain-derived neurotrophic factor; DARs, dopamine receptors; DAT, dopamine transporter; DnR, dopamine receptor *n*; DnRKO, DnR knockout; FBS, fetal bovine serum; GAPDH, Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; GDNF, Glial cell-derived neurotrophic factor; GFAP, Glial Fibrillary Acidic Protein; HBSS, Hank's Balanced Salt Solution; IGF-1, Insulin-like growth factor 1; iNOS, inducible Nitric Oxide Synthase; MPTP, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine; MPTPp, MPTP and probenecid; SNpc, *substantia nigra pars compacta*; TH, tyrosine hydroxylase; TLRs, Toll like receptors; TLRn, Toll like receptor *n*; RNS, reactive nitrogen species; ROS, reactive oxygen species.

* Corresponding author. Av. Zañartu 1482, Ñuñoa, Santiago 7780272, Chile.

E-mail addresses: rpacheco@cienciavida.org, rodrigo.pacheco@unab.cl (R. Pacheco).

Dopamine receptor D3 signalling in astrocytes promotes neuroinflammation

Andro Montoya^a, María Rosa Bono^b, Rodrigo Pacheco^{a,c,*}

^aFundación Ciencia & Vida, Ñuñoa (7780272), Santiago, Chile.

^bDepartamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile (7800003), Santiago, Chile.

^cDepartamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Andres Bello (8370146), Santiago, Chile.

*Correspondence: Rodrigo Pacheco; Av. Zañartu 1482, Ñuñoa (7780272), Santiago, Chile; Phone: +56-2-23672046; Fax: +56-2-22372259; Emails: rpacheco@cienciavida.org; rodrigo.pacheco@unab.cl

Running title: Dopaminergic signalling favours neuroinflammation

Language Style: British English

Keywords: neuroinflammation; dopamine receptors; astrocytes; microglia.

ABSTRACT (structured; max 350 words)

Background. Neuroinflammation constitutes a pathogenic process leading to neurodegeneration in several disorders, including Parkinson's disease (PD) and sepsis. Despite microglial cells are the central players in neuroinflammation, astrocytes play a key regulatory role in this process. Our previous results indicated that pharmacologic-antagonism or genetic deficiency of dopamine receptor D3 (DRD3) attenuated neuroinflammation and neurodegeneration in a PD model induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). Here, we studied how DRD3-signalling affects the dynamic of activation of microglia and astrocyte in the context of PD and sepsis.

Methods. Neuroinflammation was induced by intraperitoneal administration of LPS or MPTP. The effect of genetic DRD3-deficiency or pharmacologic DRD3-antagonism in the functional phenotype of astrocytes and microglia was determined by flow cytometry at different time-points.

Results. Our results show that DRD3 was exclusively expressed in astrocytes, but not in microglial cells. DRD3-deficiency resulted in exacerbated acquisition of M1 phenotype by microglia and in unresponsiveness of astrocytes upon systemic inflammation. Furthermore, similar alterations in the functional phenotypes of glial cells were observed by DRD3-antagonism and genetic deficiency of DRD3 upon LPS challenge. Mechanistic analyses show that DRD3-deficiency resulted in exacerbated expression of the anti-inflammatory protein Fizz1 in glial cells both *in vitro* and *in vivo*. Similar analyses were performed in a model of neuroinflammation induced by MPTP. The results show that DRD3-deficiency resulted in a basal increase in the frequency of M1 phenotype by microglia which resulted in a faster reduction of this pro-inflammatory phenotype at later time-points. On the other hand, the frequency of pro-inflammatory phenotype in astrocytes was reduced in DRD3-deficient mice, which resulted in unresponsiveness of astrocytes at later time-point.

Conclusions. These results suggest that DRD3-signalling regulates the dynamic of the acquisition of pro-inflammatory and anti-inflammatory features by astrocytes and microglia, finally favouring microglial activation and promoting neuroinflammation.