

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**Departamento de Farmacología**



**ESTUDIO DEL PAPEL DE MCP-1 EN LOS MECANISMOS  
NEUROPROTECTORES DE LA NORADRENALINA**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

Ara Escudero Hinojosa

Bajo la dirección de los doctores

José Luis Muñoz Madrigal  
Javier Rubén Caso Fernández

**Madrid, 2014**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA



ESTUDIO DEL PAPEL DE MCP-1 EN LOS  
MECANISMOS NEUROPROTECTORES DE LA  
NORADRENALINA

TESIS DOCTORAL

2013

Ara Escudero Hinojosa

Directores:

Dr. José Luis Muñoz Madrigal  
Dr. Javier Rubén Caso Fernández



a Vosotras...



## Agradecimientos

En primer lugar tengo que agradecer al Dr. Juan Carlos Leza el haber confiado en mí y el haberme permitido realizar esta Tesis Doctoral en su grupo de investigación. Por tener siempre una sonrisa, por encontrar una solución aunque pareciera imposible, por su optimismo, por volcarse en todos nosotros y hacernos sentir una familia. Gracias Juan Carlos por tu cariño, por tu apoyo y por todo lo que me has enseñado, tanto en el ámbito científico como en el personal.

En segundo lugar quisiera agradecer a mi Director de Tesis, José Luis Muñoz Madrigal, el confiar en mí cuando ni yo misma lo hacía dándome la oportunidad de realizar esta Tesis Doctoral junto a él. Agradecerle el haberme enseñado todo lo que sabe con cariño y con paciencia. Por escucharme en todo momento, por sus buenos consejos, por su apoyo, por perdonar mis despistes y sobre todo por tener siempre una sonrisa para mí. Por todo eso y por más GRACIAS PEPE. Sin lugar a dudas has sido el mejor director de Tesis que he podido tener.

Por supuesto quisiera agradecer también al Dr. Javier Rubén Caso Fernández, mi otro director de Tesis, aunque se incorporó más tarde a nuestro grupo de investigación, el haber estado tan pendiente de mí, dándome ánimos, consejos y arrancándome siempre una sonrisa. Gracias Javi por confiar en mí y darme un empujón cuando lo necesité. Gracias por tu dosis de alegría y cómo no, gracias por ayudarme a llevar adelante esta Tesis.

Al Dr. Borja García Bueno, que aunque no haya dirigido mi Tesis, ha contribuido a que saliese adelante. Gracias Borja por tus buenos consejos, gracias por los buenos ratos que hemos pasado en el laboratorio y fuera de él. Gracias por tu cariño y por las risas que hemos compartido.

Al Dr. Pedro Lorenzo, por su simpatía y por sus palabras de ánimo. Gracias Pedro por la alegría que traes el laboratorio cada vez que llegas.

A Karina, Silvia e Iciar, mis compañeras de laboratorio, que han estado conmigo desde el primer día que llegué a este grupo y que desde el inicio me hicieron sentir como una más. Agradecerles todos sus consejos y cariño. Agradecerles los buenos ratos que hemos pasado juntas y las tardes de charla científico-personal en la pecera. Iciar gracias por

tener siempre algo que decir y estar dispuesta siempre a escuchar, Silvia gracias por tener siempre una sonrisa y Karina gracias por haber estado a mi lado, gracias por ser mi amiga.

A David, Aline y Sandra, los últimos en llegar al grupo, pero no por ello menos importantes, agradecerles el cariño y el apoyo que me han dado, animándome cada vez que me escuchaban decir “no puedo”. Gracias chicos por aguantarme en mis últimos momentos pre-tesis. Creo que me llevo tres buenos amigos. Aline, mami, gracias por tu simpatía, por los días que hemos compartido en Madrid y sobre todo por todas las preguntas sobre la PCR que me has hecho en el último mes, creo que gracias a ti he aprendido mucho más. David gracias por escucharme y quererme, gracias por los buenos momentos que hemos pasado y las risas que hemos compartido.

A la Dra. María Isabel Colado Megía, Directora del Departamento de Farmacología, por su acogida, su dedicación y simpatía. A la secretaria del Departamento, María Elena, por resolver todos los problemas administrativos y las dudas que me han surgido siempre con una sonrisa. Al resto del personal del Departamento, a los técnicos y a todos los becarios, por haber hecho más fácil y agradable mi trabajo.

Agradecer al Ministerio de Ciencia e Innovación de España por el proyecto SAF2010-21948 concedido al Dr. José Luis Muñoz madrigal, gracias al cual se ha financiado el material utilizado para la realización de esta Tesis Doctoral.

Agradecer al Dr. Juan Antonio Micó Segura por concederme una beca dentro de su Catedra Externa del Dolor en la Universidad de Cádiz, patrocinada por Günenthal y por haberme dado la oportunidad de colaborar con su grupo de investigación. Agradecer también a Centro de Investigación Biomédica en Red (CIBERSAM) por haberme contratado en el grupo de investigación del Dr. Juan Carlos Leza durante los dos últimos años y haberme permitido finalizar esta Tesis.

A mi madre, que ha estado siempre a mi lado, que cuando he querido abandonar me lo ha impedido, que cuando me ha entrado el miedo me ha animado, que cuando he perdido las fuerzas me las ha dado, que cuando he estado a punto de lanzarme al vacío me ha agarrado la mano. Gracias mamá, sin ti no hubiese sido posible.

A mi padre, por haberme apoyado en este camino, por su cariño y por sus consejos cuando los he necesitado. Gracias papa.

Gracias a ti, a pesar de nuestras idas y venidas, por tu amor y por tus palabras de ánimo cuando sólo podía llorar, porque aunque ya no estés a mi lado, también has formado parte de esta historia.

A mis amigas Carmen y Cris, por escucharme, por aconsejarme y por estar a mi lado siempre que las he necesitado. Por esos viernes que hemos pasado juntas en el césped de medicina, donde nos contábamos todo lo ocurrido en la semana, donde hablábamos de nuestros sueños y nuestros miedos. Gracias niñas.

A mis compañeras de piso Anna, Irene y Bibi, por los buenos ratos que hemos pasado juntas, por haber estado a mi lado en los buenos momentos y en los días que parecía que todo se acababa. Por haberme dado todo su cariño y por mucho más.

A mis compañeros de ruta, Mario y Rafa, con los que he compartido tardes de miércoles, alegrías y tristezas. Gracias por vuestros buenos consejos, por animarme y por ayudarme cuando os lo pedí. Gracias por haberme hecho sentir tan querida.

A mis Antonias, de las que no he podido disfrutar demasiado durante estos años, pero que siempre me han animado y han estado a mi lado desde la distancia. Gracias chicas por vuestro cariño incondicional.

Y en general a todos aquellos que de una forma u otra han contribuido a que esto saliese adelante, GRACIAS.



ABREVIATURAS.....	5
I.RESUMEN .....	7
II. ENGLISH SUMMARY .....	11
III. INTRODUCCIÓN .....	15
1 NORADRENALINA .....	15
1.1 FISIOLÓGÍA DEL SISTEMA NORADRENÉRGICO CENTRAL.....	20
1.1.1 <i>Locus Coeruleus</i> .....	21
1.2 REDUCCIÓN DE NA EN ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS .....	23
1.3 ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.....	25
1.3.1 FISIOPATOLOGÍA DE LA EA .....	26
1.3.2 HIPÓTESIS COLINÉRGICA DE LA EA.....	28
1.3.3 HIPÓTESIS DOPAMINÉRGICA DE LA EA .....	29
1.3.4 NEUROINFLAMACION Y EA .....	30
1.3.5 TERAPIAS.....	32
1.4 EFECTO NEUROPROTECTOR DE LA NA EN LA EA.....	35
2 QUIMIOQUINAS.....	38
2.1 QUIMIOQUINAS Y ENFERMEDADES DEL SNC.....	41
2.2 PRODUCCIÓN DE QUIMIOQUINAS EN CÉLULAS GLIALES.....	44
2.2.1 ASTROCITOS .....	45
2.2.2 MICROGLÍA.....	47
2.3 PROTEÍNA 1 QUIMIOATRAYENTE DE MONOCITOS (MCP-1/CCL2) .....	49
2.3.1 EFECTOS DE MCP-1/CCL2 EN EL SNC.....	52
IV. ANTECEDENTES INMEDIATOS, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	57
1 ANTECEDENTES INMEDIATOS .....	57
2 HIPÓTESIS .....	58
3 OBJETIVOS .....	58
V. MATERIAL Y MÉTODOS .....	59
1 ANIMALES.....	59
1.1 Ratas Wistar .....	59
1.2 Tratamientos farmacológicos.....	59
1.3 Modelo experimental de estrés .....	60
1.4 Obtención de muestras de tejido fresco.....	61
2 CULTIVOS CELULARES.....	61

## INDICE

---

2.1	Reactivos.....	61
2.2	Cultivo de células gliales.....	61
2.3	Cultivo de neuronas .....	66
2.4	Co-cultivo de neuronas y microglía ..	66
2.5	Tratamientos .....	63
<b>3</b>	<b>DETERMINACIONES ANALÍTICAS .....</b>	<b>64</b>
3.1	Ensayo de BrdU .....	64
3.2	Ensayo de LDH .....	64
3.3	Ensayo de Griess.....	65
3.4	Ensayo de actividad de caspasa 3/7 .....	65
3.5	Ensayo de quimiotaxis.....	66
3.6	Inmunocitoquímica.....	67
3.7	Análisis morfológico .....	67
3.8	Cuantificación de PGE <sub>2</sub> .....	68
3.9	RT-PCR 68	
3.9.1	Extracción de RNA.....	68
3.9.2	Retrotranscripción .....	69
3.9.3	PCR.....	70
3.10	Ensayo de Bradford .....	71
3.11	ELISA 72	
3.12	Determinación de corticosterona plasmática .....	73
3.13	Western blot.....	73
3.14	Inmunoprecipitación .....	75
<b>4</b>	<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....</b>	<b>75</b>
<b>VI.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>77</b>
<b>1</b>	<b>MODULACIÓN DE MCP-1 POR NORADRENALINA EN ASTROCITOS.....</b>	<b>77</b>
1.1	El tratamiento agudo con desipramina induce MCP-1 en el cerebro .....	77
1.2	Efecto del estrés en la regulación de MCP-1 en corteza cerebral.....	78
1.3	La corticosterona reduce la expresión de MCP-1 en cultivos de astrocitos.....	79
1.4	La corticosterona bloquea la inducción por noradrenalina de MCP-1 en cultivos de astrocitos..	80
1.5	Desipramina y Atomoxetina inducen la expresión de MCP-1 .....	82
1.6	La activación de receptores $\alpha_2$ adrenérgicos inhibe la producción de MCP-1.....	84
1.7	El tratamiento con yohimbina potencia la inducción de MCP-1 .....	85
<b>2</b>	<b>EFFECTO NEUROPROTECTOR DE MCP-1 FRENTE A AGENTES PROAPOPTÓTICOS.....</b>	<b>87</b>
2.1	MCP-1 modula la expresión de P-Bad, P-Akt y Akt .....	87
2.1.1	MCP-1 regula la ubiquitinación de Akt .....	88
2.1.2	MCP-1 incrementa la actividad de Akt .....	89
2.2	MCP-1 protege neuronas frente a staurosporina .....	89
2.3	MCP-1 inhibe la actividad de caspasas 3/7 .....	90

<b>3 MODULACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN Y DE LA ACTIVACIÓN MICROGLIAL POR MCP-1</b>	<b>91</b>
3.1 MCP-1 induce la proliferación microglial .....	91
3.1.1 Ensayo de BrdU .....	91
3.1.2 Estudio de la regulación de proteínas del ciclo celular .....	92
3.2 MCP-1 no induce la activación microglial.....	93
3.2.1 Actividad de NOS-2.....	93
3.2.2 Estudio morfológico de la microglía.....	95
3.2.3 Cuantificación de citoquinas inflamatorias .....	96
3.2.4 MCP-1 no induce toxicidad neuronal .....	97
3.3 MCP-1 modula la expresión de factores tróficos en la microglía.....	98
<b>4 EFECTO DUAL DE LA NORADRENALINA SOBRE QUIMIOQUINAS Y MEDIADORES INFLAMATORIOS EN ASTROCITOS</b>	<b>100</b>
4.1 Efecto de la noradrenalina en la producción de Fractalkina .....	100
4.1.1 La noradrenalina induce la expresión y síntesis de Fractalkina .....	100
4.1.2 La noradrenalina en presencia de LPS inhibe la expresión y síntesis de Fractalkina.....	102
4.2 La NA en presencia de LPS inhibe la expresión y síntesis de MCP-1 .....	103
4.3 Evaluación de la toxicidad de NA y LPS en astrocitos.....	105
4.4 Efecto dual de la NA en la regulación de CCL6, CCL7, CCL12 y CXCL16.....	105
4.5 Efecto dual de la NA en la regulación de agentes proinflamatorios .....	108
4.5.1 Efecto dual de la noradrenalina en la regulación de TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , NOS-2 y COX-2.....	108
<b>VII. DISCUSIÓN</b> .....	<b>115</b>
<b>1. REGULACIÓN POR NORADRENALINA DE MCP-1 EN ASTROCITOS</b> .....	<b>115</b>
<b>2. EFECTO NEUROPROTECTOR DE MCP-1</b> .....	<b>120</b>
<b>3. EFECTO DE MCP-1 SOBRE LA MICROGLÍA</b> .....	<b>122</b>
<b>4. EFECTO DUAL DE LA NORADRENALINA EN LA REGULACIÓN DE QUIMIOQUINAS Y OTROS MEDIADORES INFLAMATORIOS</b> .....	<b>126</b>
<b>VIII. CONCLUSIONES</b> .....	<b>129</b>
<b>IX. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>131</b>
<b>X. PUBLICACIONES DERIVADAS DEL ESTUDIO</b> .....	<b>156</b>



**ACTH:** Hormona adrenocorticotropa  
**AINEs:** Antiinflamatorios no-esteroides  
**Akt:** Proteína kinasa B  
**AMPc:** Adenosín monofosfato cíclico  
**APP:** Proteína precursora de amiloide  
**ATP:** Adenosín trifosfato

**βA:** β-Amiloide  
**BDNF:** Factor neurotrófico derivado del cerebro  
**BHE:** Barrera hematoencefálica

**CDK:** ciclina dependiente de Kinasa  
**COMT:** Catecol-O-metiltransferasa  
**COX:** Ciclooxygenasa  
**CRH:** Hormona liberadora de corticotropina

**DA:** Dopamina  
**DMSO:** Dimetilsulfóxido  
**DNA:** Ácido desoxirribonucleico

**EAE:** Encefalomiелitis alérgica experimental  
**EIA:** Método inmuno-enzimático de adsorción  
**ELISA:** *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*  
**EM:** Esclerosis múltiple  
**EP:** Enfermedad de Parkinson  
**ERK:** *Extracelular signal-regulated kinase* (kinasa regulada por señales extracelulares)

**FGF:** *Fibroblast growth factor* (Factor de crecimiento de fibroblastos)

**GABA :** Ácido gamma-aminobutírico  
**GC:** Glucocorticoides  
**GDNF:** Factor nuclear derivado de la glía  
**Glu:** Glutamato

**HIF:** Factor inducible por hipoxia  
**HIV:** *Human immunodeficiency virus* (Virus de la inmunodeficiencia humana)  
**HHA:** Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal

**i.p.:** Intraperitoneal  
**IFN:** Interferón  
**IGF:** *Insulin-like growth factor* (Factor de crecimiento análogo a la insulina)  
**IkB:** Inhibidor de kappa B  
**IL:** Interleuquina  
**iNOS/NOS-2:** Óxido nítrico sintasa inducible  
**IP:** Inmunoprecipitación

**JNK:** Quinasa C-jun del extremo N-terminal

**KDa:** kilodalton

**LC:** *Locus coeruleus*  
**L-DOPA:** L-Dihidroxifenilacético

## ABREVIATURAS

---

**LPS:** Lipopolisacárido

**MAO:** Monoaminoxidasa

**MAP:** Proteína activada por mitógenos

**MAPK:** Proteínquinasa activada por mitógenos

**MCP-1/CCL2:** Proteína quimioatrayente de monocitos

**MIP-1 $\alpha$ :** Proteína inflamatoria de macrófagos

**mRNA:** RNA mensajero

**MSH:** Hormona estimuladora de los melanocitos

**NBM:** Medio neurobasal

**NF- $\kappa$ B:** Factor nuclear kappa B

**NFT:** Neurofibrillary tangles

**NGF:** Factor de crecimiento neuronal

**NK:** *Natural Killer*

**NMDA:** Ácido N-metil-D-aspartico

**NO:** Óxido nítrico

**NOS:** Óxido nítrico sintasa

**PCNA:** Antígeno nuclear de proliferación nuclear

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**PG:** Prostaglandinas

**PI-3K:** Fosfoinositol 3 kinasa

**PKA:** Proteína kinasa A

**PKC:** Proteína kinasa C

**PPAR:** Receptor nuclear activado por proliferación de peroxisomas

**PS:** Presenilina

**RIA:** Radioinmuno ensayo

**RNA:** Ácido ribonucleico

**SNA:** Sistema nervioso autónomo

**SNC:** Sistema nervioso central

**SNS:** Sistema nervioso simpático

**TNF $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral alfa

**WB:** *Western blot*

## I.RESUMEN



## I. RESUMEN

La noradrenalina (NA), también conocida como Norepinefrina (NE), es uno de los principales neurotransmisores del Sistema Nervioso Simpático (SNS). Junto a dopamina y adrenalina, constituye la familia de las catecolaminas, las cuales pueden generarse en las glándulas suprarrenales, ejerciendo una función hormonal, o en las terminaciones nerviosas, actuando entonces como neurotransmisores (Herrmann *et al.* 2004).

Actualmente se sabe que el Sistema Noradrenérgico juega un papel importante en muchas funciones cognitivas, afectivas o de comportamiento (Tellioglu and Roberston, 2001; Herrmann *et al.* 2004; Benarroch, 2009) y contribuye al aprendizaje y a la consolidación de la memoria (Gibbs and Summers, 2002). De hecho, la NA parece ser un factor clave en la plasticidad neuronal durante el desarrollo cerebral, así como durante la recuperación del SNC tras una lesión, actuando de forma directa o indirecta en la plasticidad cortical mediante diferentes mecanismos. También ha demostrado tener efectos antiinflamatorios y neuroprotectores (Feinstein *et al.* 2002b; Mori *et al.* 2002; Troadec *et al.* 2002; Traver *et al.* 2005; Madrigal *et al.* 2007; Madrigal *et al.* 2009). Por ello, la NA se considera un agente neuroprotector que disminuye la respuesta inflamatoria en el Sistema Nervioso Central (SNC) ante diversas patologías o lesiones. De acuerdo con esto hay diferentes estudios que demuestran que esta catecolamina protege a las neuronas frente al péptido  $\beta$ -amiloide ( $\beta$ A) (Madrigal *et al.* 2007), excitotoxicidad (Madrigal *et al.* 2009), estrés metabólico (Madrigal *et al.* 2009) o estrés oxidativo (Troadec *et al.* 2002; Traver *et al.* 2005). Además, se le ha atribuido a la NA un papel neuroprotector frente a la encefalomiелitis alérgica experimental (EAE), modelo experimental de esclerosis múltiple (Polak *et al.* 2011), así como en la enfermedad de Alzheimer (EA) (Counts and Mufson, 2010). Esto está de acuerdo con las alteraciones del sistema noradrenérgico observadas en enfermedades neurodegenerativas que cursan con demencia y daño cognitivo tales como esta última o la enfermedad de Parkinson (EP), por lo que el restablecimiento de su normal funcionamiento podría contribuir a la mejora de las mismas (Heneka *et al.* 2010).

En estudios previos del grupo de investigación donde se ha realizado esta Tesis Doctoral se demostró que la NA induce la expresión y síntesis de la quimioquina proteína 1 quimioatrayente de monocitos (MCP-1/CCL-2) en astrocitos, y que el bloqueo de la misma inhibe la neuroprotección generada por NA (Madrigal *et al.* 2009). Existen numerosos estudios sobre el papel de MCP-1 en la respuesta inflamatoria como quimioatrayente de células inmunes (Charo

and Taubman 2004; Ballantyne and Nambi, 2005). Sin embargo, este efecto atrayente también se ejerce sobre progenitores neuronales contribuyendo al desarrollo cerebral y a la recuperación de lesiones (Belmadani *et al.* 2006; Widera *et al.* 2004). Además, a MCP-1 se le han atribuido propiedades neuroprotectoras frente a diferentes agentes como la proteína tat del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el ácido N-metil-D-aspartico (NMDA) (Eugenin *et al.* 2003) o el péptido  $\beta$ A (Bruno *et al.* 2000). También, estudios llevados a cabo por el grupo de investigación donde se ha realizado esta Tesis Doctoral indican que MCP-1 puede proteger neuronas en un modelo *in vitro* de isquemia cerebral (Madrigal *et al.* 2009).

Estos antecedentes nos condujeron a pensar que MCP-1 podría participar en los procesos a través de los cuales la NA ejerce sus efectos neuroprotectores. Por ello se decidió analizar el mecanismo por el cual la NA induce la síntesis de MCP-1 en astrocitos, principal fuente de esta quimioquina en el SNC, así como el efecto directo de MCP-1 sobre la microglía, responsable de generar la respuesta inflamatoria en el SNC, y la capacidad neuroprotectora de MCP-1.

Además, con el fin de seguir caracterizando los mecanismos neuroprotectores proporcionados por la NA, y basándonos en nuestra hipótesis de que la inducción de MCP-1 podría formar parte de ellos, decidimos estudiar el efecto de la NA sobre otras quimioquinas y sobre ciertos mediadores celulares, los cuales en condiciones constitutivas son beneficiosos y necesarios para el correcto funcionamiento del SNC, pero que en determinadas situaciones, como ante un estímulo inflamatorio, elevan su concentración, resultando tóxicos para las neuronas.

Los estudios aquí presentados se han realizado en neuronas y células gliales de corteza cerebral ya que ésta es una de las áreas más afectadas en la EA (Wenk *et al.* 2006). Se han utilizado diferentes técnicas bioquímicas para caracterizar y cuantificar proteínas, como son Inmunotinción, Western Blot, Inmunoprecipitación o ELISA, y la técnica RT-PCR para determinar y cuantificar la expresión del mRNA. Además se han llevado a cabo distintos ensayos químicos para determinar la viabilidad celular, la muerte celular por apoptosis o la concentración de nitritos.

En esta Tesis Doctoral hemos demostrado, tanto *in vivo* como *in vitro*, que la elevación de los niveles cerebrales de NA induce la síntesis de MCP-1 y que los glucocorticoides (GC) inhiben este proceso. Estos resultados sugieren que la NA y los GC ejercen efectos opuestos sobre la regulación de MCP-1 en la corteza cerebral, lo que indica la existencia de una regulación compleja de la síntesis de la quimioquina MCP-1, en la cual la alteración de alguno de estos componentes podría conducir a una sobreexpresión o a una sobrerrepresión de la misma.

En cuanto al mecanismo por el cual la NA induce la expresión de MCP-1, los datos presentados demuestran la implicación de receptores  $\beta$  y  $\alpha$  adrenérgicos en la regulación de la expresión de MCP-1 en astrocitos aislados. La reducción por clonidina (agonista  $\alpha_2$  adrenérgico) del efecto de NA observada en astrocitos indica que el receptor  $\alpha_2$  podría actuar conteniendo la excesiva producción de MCP-1, pero en condiciones normales la activación de receptores  $\beta$  adrenérgicos por NA prevalece sobre su efecto sobre los receptores  $\alpha_2$ . El incremento en la producción de MCP-1 causado por antagonistas  $\alpha_2$  (yohimbina) en presencia del agonista  $\beta$  isoproterenol confirma esta hipótesis.

En el estudio del efecto directo de MCP-1 sobre la microglía no hemos encontrado cambios morfológicos ni hemos podido detectar la liberación de mediadores inflamatorios, como son la proteína inflamatoria de macrófagos  $1\alpha$  (MIP- $1\alpha$ ), interleuquinas  $1\beta$  y  $6$  (IL- $1\beta$ , IL- $6$ ) o el enzima oxido nítrico sintasa inducible (NOS- $2$ ) por parte de la microglía, indicando que MCP-1 en las condiciones estudiadas no induce cambios proinflamatorios, aunque sí hemos visto la capacidad de esta quimioquina para reclutar y estimular la formación de nueva microglía. Esto sugiere que MCP-1 podría elevar la concentración de microglía en las áreas lesionadas, mediante la atracción de estas células o bien induciendo o facilitando su proliferación, sin causar su activación o la generación de agentes neurotóxicos. Junto a esto, hemos demostrado que el tratamiento con MCP-1 es capaz de inducir en estas células la expresión del factor de crecimiento análogo a insulina (IGF, insulin growth factor), factor neurotrófico conocido como protector neuronal e inductor de la proliferación de progenitores neuronales, así como de células gliales. Además, existen diferentes estudios donde se demuestra que IGF juega un papel crítico en la enfermedad de Alzheimer, proporcionando protección frente a ella (Carro *et al.* 2004; Kong *et al.* 2010). La inducción de IGF podría apoyar nuestra hipótesis de que MCP-1 es inducida por la NA participando en la neuroprotección de ésta frente a la generación de placas de  $\beta$ -amiloide, por lo que proponemos que éste podría ser uno de los mecanismos por el cual MCP-1 proporciona neuroprotección.

Hemos demostrado también que la NA induce en astrocitos la síntesis de Fractalkina, otra quimioquina a la que al igual que a MCP-1 se le han atribuido propiedades neuroprotectoras (Re and Przedborski, 2006), por lo que podría formar parte de los mecanismos a través de los cuales la NA protege neuronas frente a diferentes estímulos. Hay que destacar que junto a las propiedades antiinflamatorias y neuroprotectoras, la Fractalkina también presenta una función como quimioatrayente capaz de activar la respuesta inflamatoria (Bazan *et al.* 1997). De hecho, una actividad exagerada de esta quimioquina en determinadas lesiones puede llevar a un daño

neuronal irreversible (Denes *et al.* 2008; Fuhrmann *et al.* 2010; Lee *et al.* 2010). Así, hemos encontrado que la NA presenta un efecto dual en la regulación de Fractalkina, de otras quimioquinas relacionadas y de ciertos mediadores celulares proinflamatorios, inhibiendo la inducción de éstos por LPS. Esto nos ha permitido elaborar una hipótesis según la cual, en condiciones basales la NA podría contribuir al mantenimiento en el SNC de los niveles de ciertas quimioquinas y otros agentes necesarios para el mantenimiento de la homeostasis celular, mientras que en condiciones de inflamación la NA actuaría previniendo una producción exagerada de estos mediadores.

En el estudio del efecto de MCP-1 sobre neuronas hemos determinado que esta quimioquina es capaz de proteger frente un agente proapoptótico como la staurosporina. En este proceso podrían estar implicadas las proteínas Akt y P-Bad, puesto que hemos observado que el tratamiento con MCP-1 aumenta su producción en neuronas.

Con los resultados expuestos aquí, nosotros proponemos que uno de los mecanismos a través de los cuales la NA ejerce su acción neuroprotectora es mediante el mantenimiento de los niveles basales de ciertas quimioquinas y otros mediadores celulares, necesarios para el mantenimiento homeostático celular. Además, sugerimos que puesto que la NA induce la síntesis de MCP-1 en astrocitos, ciertos tipos de fármacos que modulan los niveles de NA podrían usarse para modular la producción de esta quimioquina en el cerebro. Así, en condiciones normales, la producción constitutiva de MCP-1 podría tener efectos neuroprotectores y su ausencia o inhibición, podría conducir al desarrollo de ciertos procesos neurotóxicos. Sin embargo, la actividad de MCP-1 es un elemento fundamental en el desarrollo de la respuesta inflamatoria, por lo que la inhibición de MCP-1 o su actividad deben ser cuidadosamente estudiadas como una diana terapéutica, ya que alguna de sus funciones podría ser necesaria para el mantenimiento homeostático u otras necesidades celulares aún desconocidas. De hecho existen estudios donde se demuestra que la eliminación total de MCP-1 es perjudicial para la supervivencia celular en el SNC (Zisma *et al.* 1997; Braun *et al.* 2000).

## II. ENGLISH SUMMARY



## II. ENGLISH SUMMARY

Noradrenaline (NA), also known as norepinephrine (NE), is one of central nervous system (CNS) main neurotransmitters. NA, dopamine and adrenaline constitute the catecholamines group of neurotransmitters. Catecholamines can be generated in the suprarenal glands and work as hormones or in the nervous fibers and act as neurotransmitters (Deshmane *et al.* 2009).

It is known nowadays that the noradrenergic system plays an important role in many cognitive affective or behavioral functions (Benarroch, 2005; Tellioglu and Robertson 2001) and contributes to learning and memory consolidation (Gibbs and Summers, 2002). In fact, NA seems to be a key factor in neuronal plasticity during brain development as well as during CNS recovery after an injury, acting directly or indirectly on cortical plasticity through different mechanisms. It has also shown to have anti-inflammatory and neuroprotective effects (Feinstein *et al.* 2002a; Madrigal *et al.* 2007 ;Madrigal *et al.* 2009; Mori *et al.* 2002; Traver *et al.* 2005; Troadec *et al.* 2001). Thus, NA is considered as a neuroprotective agent which reduces CNS inflammatory response against different injuries or pathologies. In agreement with this, different studies demonstrate that this catecholamine protects neurons against amyloid  $\beta$  peptide ( $A\beta$ ), metabolic stress (Feinstein *et al.* 2002a; Madrigal *et al.* 2007; Madrigal *et al.* 2009) or oxidative stress (Feinstein *et al.* 2002a; Troadec *et al.* 2002; Traver *et al.* 2005). In addition, recently a neuroprotective role has been associated with NA in the progression of neurodegenerative diseases like experimental allergic encephalomyelitis (EAE), a experimental model of multiple sclerosis (Polak *et al.* 2011), as well as the Alzheimer's disease (Counts and Mufson, 2010). This is in agreement with noradrenergic system alterations observed in neurodegenerative diseases with dementia and cognitive damage associated to them such as Alzheimer's or Parkinson's diseases, so the re-establishment of its normal functioning could contribute to their improvement (Feinstein *et al.* 2002a; Heneka *et al.* 2010c)

Previous studies from our research group proved that NA induces the expression and synthesis of the chemokine MCP-1 in astrocytes and that its blockade inhibits NA neuroprotection (Feinstein *et al.* 2002a; Madrigal *et al.* 2009). This led us to consider that one of the mechanisms through which NA exerts its protective action, for example against AD characteristic accumulation of  $A\beta$ , could be MCP-1 induction. There are many studies about MCP-1 role in the inflammatory response as a chemoattractant of immune cells (Charo *et al.* 1994; Ballantyne and Nambi, 2005). However, this attractant effect is also exerted on neural progenitors contributing this way to brain

development and injury recovery (Widera *et al.* 2004; Belmadani *et al.* 2006). Also, MCP-1 has been attributed neuroprotective properties against different agents such as human immunodeficiency virus tat protein, N-methyl-D-aspartate (NMDA) (Eugenin *et al.* 2003) or  $\beta$ A peptide (Bruno *et al.* 2000). In addition, studies developed by our research group indicate that MCP-1 can protect neurons against ischemic conditions (Madrigal *et al.* 2009).

These previous data made us hypothesize that MCP-1 could participate in the processes through which NA exerts its neuroprotective effects. So, we decided to analyze the mechanism through which NA induces MCP-1 synthesis in astrocytes (main source of this chemokine in the CNS) and also MCP-1 direct effect on microglia, a cell type with a key role in the development of CNS inflammatory response. Finally, MCP-1 neuroprotective potential was also analyzed.

In addition to this, in order to further characterize NA neuroprotective mechanisms and based on our hypothesis according to which MCP-1 induction could be part of them, we decided to study NA effect on other chemokines and certain cell mediators which can be helpful at constitutive levels but in certain situations, can change their concentration resulting toxic for neurons.

Our studies have been developed in brain cortex cells (neurons and glial cells) since this is one of the most affected areas in Alzheimer's disease (Wenk, 2006). Different biochemical techniques have been used to characterize and quantify proteins such as immunostaining, Western Blot, Immunoprecipitation or ELISA and RT-PCR to determine and quantify mRNA expression. Also, different chemical assays have been developed to determine cell viability, apoptotic cell death or nitrites concentration.

We demonstrate here that the elevation of brain NA levels induces MCP-1 synthesis *in vivo* and that glucocorticoids inhibit this process. These data suggest that NA and glucocorticoids exert opposite actions on MCP-1 regulation in brain cortex which confirms the complexity of MCP-1 regulation.

The data presented here show that  $\alpha$  and  $\beta$  adrenergic receptors are involved in the regulation of MCP-1 expression in isolated astrocytes. Clonidine ( $\alpha_2$  agonist) reduction of NA effect indicates that this receptor could act containing MCP-1 excessive production, but in normal conditions the activation of  $\beta$  adrenergic receptors by NA prevails over its effect on  $\alpha_2$  receptors. The increase on MCP-1 production caused by an  $\alpha_2$  antagonist (yohimbine) in the presence of the  $\beta$  agonist isoproterenol confirms this hypothesis.

The study of MCP-1 direct effect on microglia did not allow us to observe morphological changes nor were we able to detect the release of inflammatory mediators like macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$ , (MIP-1 $\alpha$ ), interleukin (IL1 $\beta$ )1 $\beta$ , interleukin 6 (IL-6) and the enzyme nitric oxide synthase 2 (NOS2) by these cells. This indicates that, in the conditions studied, MCP-1 does not induce pro-inflammatory changes, although we were able to observe the capacity of this chemokine to recruit and stimulate the formation of new microglia. This suggests that MCP-1 could elevate microglia concentration in injured areas through the attraction of these cells or inducing their proliferation, and this fact does not have to be related to their activation and the generation of neurotoxic agents.

In addition, we have also demonstrated that MCP-1 treatment is able to induce the expression of insulin-like growth factor (IGF) in microglia. IGF is a trophic factor known to protect neurons and to induce the proliferation of neural progenitors, as well as glial cells. Different studies show that IGF plays a key role in Alzheimer's disease providing neuroprotection (Carro and Torres-Aleman, 2004; Kong *et al.* 2010). Based on this, IGF induction could support our hypothesis according to which MCP-1 is induced by NA and helps protect against  $\beta$ A-associated damage.

We have also shown that NA induces the synthesis of fractalkine in astrocytes. Fractalkine is another chemokine to which neuroprotective actions have been attributed (Re and Przedborski, 2006). So it could participate of the mechanisms through which NA protects neurons against different stimuli (Madrigal *et al.* 2005; Traver *et al.* 2005; Kalinin *et al.* 2007). Fractalkine also presents a chemoattractant effect able to activate an inflammatory response (Bazan *et al.* 1997; Kalinin *et al.* 2007), in fact, an exaggerated activity of this chemokine could lead to an irreversible neuronal damage.

We have also found that NA presents a dual effect on the expression of MCP-1, fractalkine and other chemokines as well as certain cellular mediators known to be necessary for cell survival at basal concentrations but that can be neurotoxic when their concentrations are elevated. This way, NA seems to counteract LPS effects. This could be in agreement with our hypothesis according to which NA contributes to the maintenance of the levels of certain chemokines in the CNS, while preventing an exaggerated production in pathologic conditions.

Finally, we also show that MCP-1 may protect neurons against pro-apoptotic agents by inducing Akt and P-Bad.

## ENGLISH SUMMARY

---

Based on the data presented here, we propose that one of the mechanisms through which NA exerts its neuroprotective action is the maintenance of the basal levels of certain chemokines and other cell mediators necessary for the maintenance of cell homeostasis. Also, since NA induces MCP-1 synthesis in astrocytes, certain drugs able to modulate brain levels of NA could be used to regulate the production of this chemokine in the brain.

In summary, our results suggest that in normal conditions constitutive production of MCP-1 could have neuroprotective effects while its absence or inhibition could lead to the development of certain neurotoxic processes. Since MCP-1 is able to attract those cells necessary for the development of the inflammatory response, the blockade of its synthesis could reduce inflammation and those changes associated to it. But the inhibition of MCP-1 expression or activity should be carefully considered as a therapeutic target because some of its functions may be necessary for the maintenance of homeostasis or other cell requirements not yet known. In fact, some studies indicate that total elimination of MCP-1 affects the survival of CNS cells (Zisman *et al.* 1997; Braun *et al.* 2000).

### III.INTRODUCCIÓN



### III. INTRODUCCIÓN

#### 1. NORADRENALINA

La Noradrenalina (NA), también conocida como Norepinefrina (NE), siendo la primera nomenclatura de origen latino y griega la segunda, es una catecolamina descubierta en 1946 por el fisiólogo sueco Ulf Svante Von Euler-Chelpin, quien consiguió aislarla y demostrar que ésta era uno de los principales neurotransmisores del Sistema Nervioso Simpático. Von Euler estudió además, su distribución en diferentes órganos y nervios, su excreción, su concentración en condiciones tanto fisiológicas como patológicas, su almacenamiento y su acción en la transmisión nerviosa. En 1970 obtuvo el premio Nobel de Fisiología y Medicina, conjuntamente con Bernard Katz y Julius Axelrod, por sus trabajos y descubrimientos sobre la transmisión, almacenamiento, liberación e inactivación de los neurotransmisores.

Hoy en día se sabe que la NA presenta distintas funciones fisiológicas, homeostáticas y forma parte del sistema noradrenérgico de neurotransmisión del Sistema Nervioso Simpático (SNS). Pertenece a la familia de las catecolaminas (también denominadas aminohormonas), las cuales son un grupo de sustancias que incluyen además, la adrenalina y la dopamina, todas ellas sintetizadas a partir del aminoácido Tirosina y estructuralmente relacionadas por tener un grupo catecol y un grupo amino. Las catecolaminas pueden generarse en las glándulas suprarrenales, ejerciendo una función hormonal, o en las terminaciones nerviosas, actuando entonces como neurotransmisor (Herrmann *et al.* 2004).

Como se ha mencionado anteriormente, la biosíntesis de la NA en las neuronas noradrenérgicas se produce a partir del aminoácido L-Tirosina, el cual es transportado desde la sangre. La L-tirosina es transformada, en una primera etapa en ácido L-dihidroxifenilacético (L-dopa) por la tirosina hidroxilasa, enzima limitante de la vía metabólica. La L-dopa, posteriormente se transforma en dopamina (DA), molécula precursora de NA, mediante la acción del enzima dopamina descarboxilasa. Las células especializadas sintetizan el enzima dopamina  $\beta$ -hidroxilasa que transforma la dopamina en Noradrenalina, la cual es liberada bien por la médula suprarrenal en el torrente sanguíneo como una hormona, o bien en el sistema nervioso central simpático como neurotransmisor por neuronas noradrenérgicas. La NA puede transformarse en adrenalina, mediante la adición de un grupo metilo, formando una amina secundaria. La secuencia de reacciones puede verse en la figura 1.

## INTRODUCCIÓN

El metabolismo y la eliminación de estas catecolaminas se regulan mediante los enzimas monoaminoxidasa (MAO), presente principalmente en neuronas noradrenérgicas, y catecol-O-metiltransferasa (COMT).

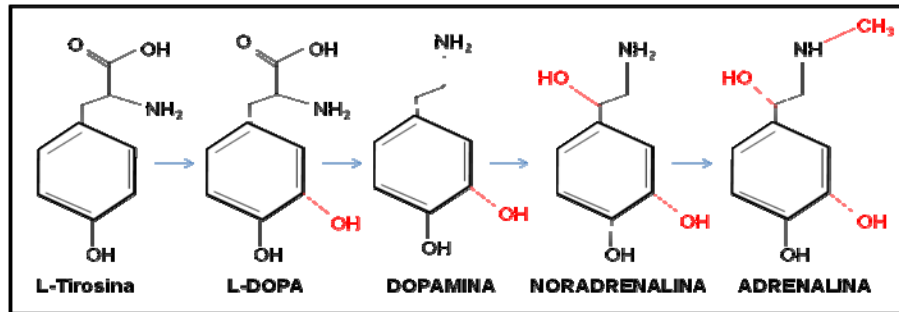
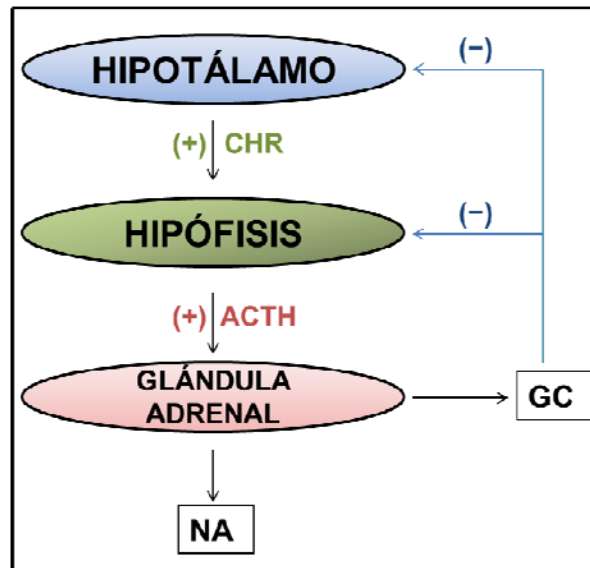


Figura 1: Biosíntesis de catecolaminas a partir de L-Tirosina

Como se ha mencionado anteriormente, una de las funciones más importantes de la NA es su papel como neurotransmisor, siendo uno de los principales neurotransmisores del Sistema Nervioso Simpático (SNS) en la periferia y en el cerebro. De hecho, es el neurotransmisor fisiológico de todas las sinápsis neuroefectoras posganglionares simpáticas. Así, mientras que la noradrenalina es el neurotransmisor primordial en el SNS periférico, la adrenalina se libera mayoritariamente de la médula suprarrenal, y la dopamina es un importante neurotransmisor de los ganglios basales del SNC, aunque también posee acciones periféricas, fundamentalmente cardiovasculares y renales. La NA, además, presenta un importante efecto vasoconstrictor, ya que el músculo liso de la pared vascular está inervado por el SNS y es la NA la encargada de generar la contracción de dicho músculo (Blanco-Rivero *et al.* 2013; Zerpa *et al.* 2013).

La NA también participa en la respuesta al estrés, la llamada reacción de “lucha o huida”, activándose el eje Hipotalámico-Hipofisario-Adrenal (HHA), e incrementando directamente la frecuencia cardíaca, favoreciendo la liberación de las reservas de glucosa, y aumentando el flujo sanguíneo hacia el músculo esquelético, lo que produce un aumento en el suministro de oxígeno al cerebro, siendo este efecto inhibido por los glucocorticoides (GC) (Fig. 2).



**Figura 2: Activación del eje HHA durante el estrés.** El hipotálamo, tras un estímulo estresante libera la hormona corticotropina (CHR) la cual activa la hipófisis haciendo que libere la hormona adrenocorticotropa (ACTH), que actúa sobre la glándula adrenal induciendo la liberación de noradrenalina (NA) y glucocorticoides (GC).

Actualmente se conoce que el Sistema Noradrenérgico juega un papel importante en muchas de las funciones cognitivas, afectivas y de comportamiento (Tellioglu and Robertson, 2001; Herrmann *et al.* 2004; Benarroch 2005) y contribuye al aprendizaje y a la consolidación de la memoria (Gibbs and Summers, 2002). De hecho, la NA parece ser un factor clave en la plasticidad neuronal durante el desarrollo cerebral, así como durante la recuperación del SNC tras una lesión, actuando de forma directa o indirecta en la plasticidad cortical mediante diferentes mecanismos. La NA puede activar sistemas tróficos como el del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, *brain-derived neurotrophic factor*) o el del factor de crecimiento neuronal (NGF, *neuronal growth factor*), y modular otros neurotransmisores como la acetilcolina (Marien *et al.* 2004). También es capaz de regular negativamente la transcripción de genes inflamatorios tanto en astrocitos como en microglía, los cuales expresan receptores noradrenérgicos (Feinstein *et al.* 2002b; Mori *et al.* 2002). Por ello, la NA se considera un agente neuroprotector que disminuye la respuesta inflamatoria en el SNC ante diversas patologías o lesiones. De acuerdo con esto hay diferentes estudios que demuestran que esta catecolamina protege neuronas frente a  $\beta$ -amiloide ( $\beta$ A) (Madrigal *et al.* 2007), excitotoxicidad, estrés metabólico (Madrigal *et al.* 2009) o estrés oxidativo (Trodec *et al.* 2002; Traver *et al.* 2005).

## INTRODUCCIÓN

---

La NA participa en los procesos de memoria y aprendizaje (Murchison *et al.* 2004). Esto está de acuerdo con las alteraciones del sistema noradrenérgico observadas en enfermedades neurodegenerativas que cursan con demencia y daño cognitivo tales como la enfermedad de Alzheimer (EA), por lo que el reestablecimiento de su normal funcionamiento podría contribuir a la mejora de las mismas (Heneka *et al.* 2010).

Además, la vía noradrenérgica se usa como diana farmacológica en tratamientos de trastornos mentales como la depresión. Existen numerosos fármacos cuyo principio activo es un agonista de receptores  $\beta$ -adrenérgicos o un antagonista del receptor  $\alpha_2$  adrenérgico. Un ejemplo de este último tipo de fármacos es la Desipramina, un antidepresivo tricíclico (Fishman and Finberg 1987; Geddes *et al.* 2003; Zhang *et al.* 2009), que se usa también en el tratamiento de diferentes trastornos comportamentales y cognitivos, de hecho se encuentra en fase II de ensayo clínico para el tratamiento del síndrome de Rett (ClinicalTrials.gov, 2012). Otro fármaco de este tipo es la Atomoxetina, un inhibidor selectivo de la recaptación de noradrenalina que actúa a nivel presináptico. Está indicada para el tratamiento de los desórdenes conductuales (hiperactividad nerviosa) o los síndromes asociados al trastorno por déficit de atención con hiperactividad en niños, adolescentes y adultos. La atomoxetina se encuentra en fase II de ensayo clínico, para el tratamiento de los déficits cognitivos que se dan en la enfermedad de Parkinson (ClinicalTrials.gov, 2012).

### **RECEPTORES ADRENÉRGICOS :**

Existen receptores específicos para la adrenalina y la noradrenalina, denominados receptores adrenérgicos. Estos receptores se localizan en la membrana celular y se dividen en dos subtipos,  $\alpha$  y  $\beta$ , de los cuales cada uno tiene distintas isoformas:  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_3$

La noradrenalina, al igual que la adrenalina, activa receptores  $\alpha$  y  $\beta$  en el sistema nervioso tanto a nivel periférico como central. Su efecto va a depender del balance global de la presencia y activación de los dos tipos de receptores. Ambas moléculas se diferencian en la potencia del efecto que generan al unirse a su receptor  $\beta_2$ , siendo bastante mayor el de la unión con la adrenalina.

Los receptores del subtipo  $\alpha_1$  predominan en el Sistema Nervioso Central (SNC), aunque también se encuentran en el Sistema Nervioso Periférico (SNP). En el primero desempeñan una función excitatoria y su localización es principalmente postsináptica, mientras que en el SNP su

función principal es mediar la contracción, y se encuentran en el músculo liso. En otras regiones tienen diferentes funciones. Así, en el hígado median la gluconeogénesis y liberación de potasio, en el corazón median un efecto ionotrópico positivo.

Los receptores del subtipo  $\alpha_2$  se encuentran tanto en el SNC como en el SNP, y en ambos casos su localización es presináptica y postsináptica. Están involucrados en funciones inhibitorias. La activación de los presinápticos inhibe la liberación de más neurotransmisor, regulando así la eficacia sináptica en la unión neuroefectora simpática. Los postsinápticos, en cambio, se localizan en células del SNP (células hepáticas, plaquetas y músculo liso vascular), y su activación causa agregación plaquetaria y vasoconstricción.

Los receptores del subtipo  $\beta_1$  son en su mayoría postsinápticos y se localizan principalmente en el corazón, aunque también se encuentran en las plaquetas, en las glándulas salivares y en el aparato gastrointestinal. Su activación provoca un incremento de la fuerza y velocidad de contracción del corazón, relajación del tubo gastrointestinal, agregación plaquetaria y secreción de amilasa en las glándulas salivares.

Los receptores del subtipo  $\beta_2$  se encuentran en todos los tipos celulares del SNC y son en su mayoría postsinápticos. Estos receptores, al contrario que los  $\alpha_2$ , facilitan la liberación de NA. En el SNP, se localizan en diversos tejidos como vasos, bronquios, aparato gastrointestinal, músculo esquelético, hígado y mastocitos, y su activación provoca vasodilatación, broncodilatación, relajación gastrointestinal, gluconeogénesis hepática, temblor muscular e inhibición de la liberación de histamina en mastocitos.

Los receptores del subtipo  $\beta_3$  se expresan principalmente en el tejido adiposo y su activación está relacionada con los cambios en el metabolismo energético inducidos por NA, principalmente vía lipólisis y termogénesis.

Los receptores  $\beta$  adrenérgicos postsinápticos activan proteínas del tipo Gs, las cuales estimulan la Adenil ciclasa, generando AMPc como segundo mensajero. El receptor adrenérgico  $\alpha_2$ , localizado tanto en neuronas presinápticas como postsinápticas, estimula proteínas tipo  $G_{i/o}$ , lo que produce una inhibición de la Adenil ciclasa y una activación de canales iónicos de  $K^+$ . Este receptor, además es el encargado de modular la recaptación de la NA de la hendidura sináptica, produciendo una disminución en sus niveles. El receptor adrenérgico  $\alpha_1$ , localizado en terminales postsinápticos estimula, en cambio, la acción de la proteína Kinasa C (PKC), a través de una proteína tipo  $G_{i/q}$  (Herrmann *et al.* 2004). También se sabe que la NA estimula la producción de

factores tróficos y neuroprotectores en astrocitos por mediación de los receptores  $\beta$ , sin la participación de los  $\alpha_2$  (Schwartz and Nishiyama, 1994; Juric *et al.* 2008).

En el SNC se han encontrado receptores adrenérgicos en neuronas y en células gliales (Feinstein *et al.* 2002b; Mori *et al.* 2002), lo que indica su gran importancia en el correcto funcionamiento del mismo. Apoyando esta idea, diferentes estudios han demostrado que el receptor adrenérgico  $\beta_1$  tiene un papel importante en la memoria a corto y largo plazo (Szelenyi 2001; Gibbs and Summers 2002; Murchison *et al.* 2004; Ramos and Arnsten 2007; Counts and Mufson 2010), que participa en la regulación de la ansiedad (Harro *et al.* 1999) y que su supresión genera déficits cognitivos (Jardanhazi-Kurutz *et al.* 2011). Por otro lado, estudios postmortem de cerebros de pacientes con enfermedad de Alzheimer (EA) demuestran que los niveles de adrenoreceptores  $\alpha_2$  pre- y post-sinápticos no están reducidos, o incluso presentan una elevación, mientras que los niveles de mRNA del receptor  $\alpha_1$  se encuentran disminuidos (Szot *et al.* 2005).

Además, hay numerosos estudios que demuestran que agonistas  $\beta$ -adrenérgicos y antagonistas  $\alpha_2$ -adrenérgicos son capaces de modular aspectos de la respuesta inmune tales como la iniciación de dicho proceso, la proliferación celular o la producción de citoquinas proinflamatorias, mediante la generación del segundo mensajero AMPc (Gavrilyuk *et al.* 2001; Szelenyi 2001).

### 1.1 FISIOLOGÍA DEL SISTEMA NORADRENÉRGICO CENTRAL

El Sistema Noradrenérgico Central está compuesto por dos grupos de proyecciones diferentes, uno originado desde células del segmento ventrolateral (involucradas en las respuestas sexuales y de apetito) (Aston-Jones *et al.* 2000) que fluyen a través de la parte anterior del cerebro (un área asociada comúnmente con lesiones traumáticas cerebrales que conducen a comportamientos violentos y a la reducción del control de la rabia) (Auld *et al.* 2002). Y otro grupo de proyecciones generadas a partir de neuronas del *Locus Coeruleus* (LC), que se encuentra en la región lateral del cuarto ventrículo (Baker *et al.* 1989) y está asociado con funciones cognitivas. Así, las neuronas noradrenérgicas dan lugar a proyecciones axonales que inervan grandes áreas cerebrales, incluyendo cerebelo, tálamo, hipotálamo o corteza (Aston-Jones *et al.* 2000), y que pueden explicar la influencia de la noradrenalina sobre diferentes funciones del SNC.

El LC y el segmento ventrolateral, por tanto, componen las dos agrupaciones celulares que generan las proyecciones noradrenérgicas cerebrales dorsal y ventral respectivamente. El grupo medular inerva el tronco cerebral y el hipotálamo, y parece estar involucrado principalmente en la regulación neuroendocrina. Y es el LC quien constituye la mayor fuente de noradrenalina en el SNC (Aston-Jones *et al.* 1991). De hecho, se ha estimado que el número total de neuronas noradrenérgicas en el LC de un cerebro normal, joven o adulto, oscila entre 45.000 y 60.000 (Mann *et al.* 1983).

En esta Tesis Doctoral nos vamos a centrar en la vía noradrenérgica del LC ya que es considerada la fuente de noradrenalina más importante en el cerebro y abarca las áreas implicadas en funciones cognitivas, tales como el aprendizaje, la memoria y la atención. Siendo éstas las que se ven afectadas en enfermedades neurodegenerativas que cursan con alteraciones cognitivas, como es el caso de la Enfermedad de Alzheimer.

### **1.1.1 *Locus Coeruleus***

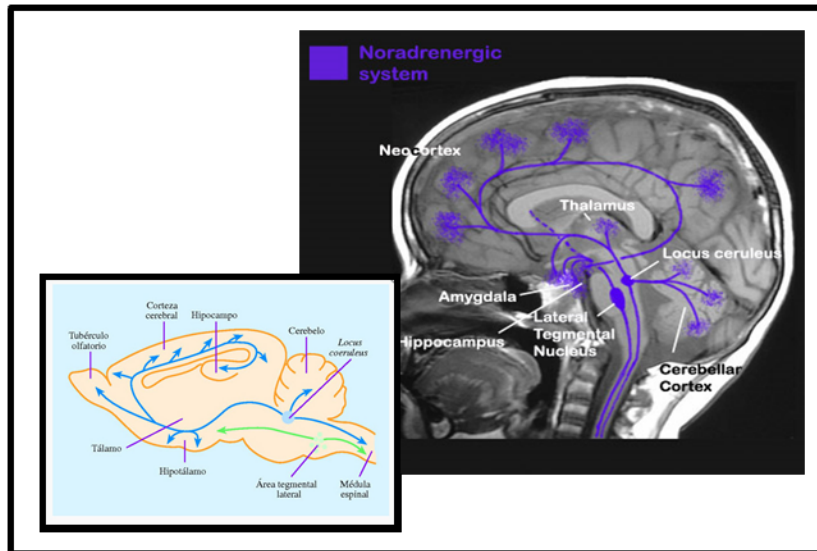
El área cerebral conocida como *Locus Coeruleus*, cuyo nombre proviene del latín y significa “núcleo azul”, fue descrita por primera vez en 1809 por el neuroanatomista alemán Johann Christian Reil, quién lo denominó así debido al tono azul que presentaba en tinciones de cerebros humanos (Cinthia *et al.* 1997).

En el sistema nervioso central de mamíferos los axones de las células noradrenérgicas del LC se ramifican extensamente para llegar a regiones muy separadas del mismo, siendo la mayoría (90%) de las proyecciones eferentes ipsolaterales. Además se han descrito dos tipos diferentes de terminales axonales en el LC, por un lado, estructuras convencionales sinápticas, y por otro lado, gradientes que parecen ser el resultado de la liberación extrasináptica de noradrenalina, la cual puede difundirse a cierta distancia antes de unirse a su receptor adrenérgico en neuronas, células gliales o vasos sanguíneos por el denominado volumen de transmisión. Así, esta falta de sinapsis especializada podría estar de acuerdo con la función paracrina que se le atribuye a la noradrenalina, creando un microentorno alrededor de los gradientes (Marien *et al.* 2004).

En la figura 3 se muestra un esquema de estas proyecciones noradrenérgicas tanto en cerebro humano como en el de rata, siendo éste último el modelo animal, junto con el de primate, usado principalmente para estudiar enfermedades neurodegenerativas que afectan al

## INTRODUCCIÓN

LC, ya que en estas especies el núcleo se compone casi exclusivamente de neuronas noradrenérgicas, asemejándose al humano. La utilización de otras especies animales, como el gato, no son recomendables, ya que no presentan un LC compuesto exclusivamente por neuronas noradrenérgicas (Cinthia *et al.* 1997).



**Figura 3: Proyecciones noradrenérgicas del LC en rata y en humano.** Imágenes tomadas de *Farmacología Básica y Clínica Velázquez* (Editorial médica Panamericana, 17ª Ed.) y de [www.neuropolitics.org](http://www.neuropolitics.org).

Las neuronas del LC, como se ha comentado anteriormente, tienen tanto ramas axonales ascendentes como descendentes. Las descendentes van a la médula (predominantemente por el cuerno ventral a través del sistema cerebroespinal) y al tronco cerebral mismo, mientras que las proyecciones ascendentes terminan en el diencefalo (más ampliamente en la zona dorsal del tálamo y con pequeñas proyecciones en el hipotálamo), en el cerebelo, en el hipocampo y en el neocórtex, configurando así una extensa red. Además, el LC recibe aferencias de posiblemente todas las modalidades sensoriales de la periferia (Cinthia *et al.* 1997).

Se ha demostrado que el LC se activa por estímulos como el dolor, la pérdida de sangre, el colapso cardiovascular y el estrés, y que participa en numerosas actividades fisiológicas tales como el ciclo circadiano, el estado de alerta o las funciones de aprendizaje (Marien *et al.* 2004). También se sabe que las proyecciones noradrenérgicas cerebrales iniciadas en el LC modulan, además de la reactividad al estrés, el comportamiento adaptativo, el sueño, la inflamación, la atención selectiva, el aprendizaje y la memoria (Sara, 2009). De hecho, el LC parece ejercer un papel crítico y bastante complejo en los procesos de aprendizaje, atención y memoria, ya que las proyecciones noradrenérgicas participan en la adquisición, consolidación y retención de ciertas tareas de aprendizaje (Thomas and Palmiter, 1997), las cuales se ven afectadas al producirse un

deterioro en las neuronas noradrenérgicas. De acuerdo con esto, diferentes estudios centrados en el receptor adrenérgico  $\alpha_2$ , han demostrado que la pérdida progresiva de funciones noradrenérgicas contribuye al deterioro de la memoria dependiente de la edad, siendo la activación del sistema noradrenérgico del LC capaz de disminuir estos déficits (Herrman *et al.* 2004).

Una característica importante del LC, que confirma la importancia de su funcionamiento para la supervivencia del organismo, es que presenta un metabolismo energético único. Éste se basa en una ausencia casi total de metabolismo aeróbico de glucosa y un aumento considerable del catabolismo anaeróbico y del ciclo de las pentosas (donde se fija  $\text{CO}_2$  produciéndose glucosa y sus derivados), dándole una mayor independencia ante los sustratos que llegan a través de la sangre.

Dada la importancia de este núcleo cerebral y sus extensas proyecciones noradrenérgicas en un gran número de zonas cerebrales, no es de extrañar que su alteración se vea implicada en diferentes enfermedades neurológicas, como la Epilepsia, la Depresión, la Ansiedad, la Encefalomielitis, la Esclerosis Múltiple y las enfermedades de Parkinson o Alzheimer (Libet, 1992; Ordway *et al.* 1994; Jobe *et al.* 1994; Grace *et al.* 1998; Polak *et al.* 2011).

### **1.2. REDUCCIÓN DE NORADRENALINA EN ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS**

Existen numerosos estudios que confirman la teoría según la cual una deficiencia en el sistema noradrenérgico central, originado en el LC, podría jugar un papel decisivo en la generación y progresión de enfermedades neurodegenerativas que incluyen, entre otras, la enfermedad de Parkinson (EP) y la EA. La pérdida de neuronas del LC puede llevar a la aparición de diferentes sintomatologías dependientes de otros circuitos neuronales y de otras regiones cerebrales (Marien *et al.* 2004).

Fue Colpaert en 1994 el primero en proponer esta teoría (Marien *et al.* 2004) basándose inicialmente en el efecto del déficit noradrenérgico en la EP. Consideró esta enfermedad como miembro de una familia de enfermedades con naturaleza neurológica caracterizadas por una neurodegeneración progresiva con síntomas funcionales (motor, sensorial y psicológico) similares, y típicamente asociadas a la segunda mitad de la vida normal de un individuo. Generalmente se consideran la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Alzheimer como los miembros más

## INTRODUCCIÓN

---

representativos de esta familia de enfermedades neurodegenerativas donde puede ser aplicada la teoría noradrenérgica.

Esta teoría consta de tres puntos, el primero es que la edad constituye el primer factor de riesgo, pero también, la herencia genética y factores ambientales, que incluyen toxinas tanto endógenas como exógenas, pueden influir en el desarrollo de la enfermedad (Galasko *et al.* 1994). El segundo postula que la degeneración no tiene por qué ocurrir necesariamente como resultado de déficits neurológicos y psicológicos, ya que, entonces, podría combatirse mediante un mecanismo endógeno de compensación o neuroprotección que podría incluir factores neurotróficos, cambios en el metabolismo de oxidación, mecanismos antiexcitotóxicos o alteraciones en los neurotransmisores o receptores. Finalmente, en tercer lugar, se postula que las proyecciones noradrenérgicas del LC juegan un papel importante a la hora de dirigir y mantener esos mecanismos compensatorios y protectores. Así, el sistema noradrenérgico del LC podría actuar sobre este mecanismo directamente mediante la noradrenalina, o indirectamente mediante otros transmisores o factores influenciados por ésta, o co-liberados también desde las terminales sinápticas. Además, la noradrenalina participa tanto en la señalización celular como en la modulación de mecanismos neurotróficos (Marien *et al.* 2004).

Hay que destacar que la teoría noradrenérgica no es incompatible con otras teorías relacionadas con estas enfermedades, sino que pueden ser complementarias.

Descubrimientos que se remontan al siglo pasado implican la degeneración del LC en la EA (Iversen *et al.* 1983; Bondareff *et al.* 1987). Hay numerosos estudios que demuestran que los pacientes con esta enfermedad presentan una importante pérdida de células del LC, llegando a alcanzar el 70% y causando una disminución significativa de los niveles de NA en los sistemas límbico y cortical (Matthews *et al.* 2002). Estos cambios en los niveles del neurotransmisor están estrechamente relacionados con la progresión del daño cognitivo y la pérdida de memoria característicos de la demencia que aparece en enfermedades neurodegenerativas. Así, la degeneración del LC se ha observado en pacientes con daño cognitivo medio (MCI, *mild cognitive impairment*) (Grudzien *et al.* 2007) y en etapas tempranas de la EA, de hecho, el 80% de los pacientes con MCI generalmente llegan a padecer la EA (Petersen *et al.* 2001).

La degeneración de neuronas del LC produce la pérdida progresiva de dos tipos de axones, aquellos con contactos sinápticos convencionales y los que generan gradientes. Éstos últimos son

los encargados de liberar neurotransmisores extrasinápticamente en el entorno, donde podrían actuar sobre neuronas, células gliales, y vasos sanguíneos (Marien *et al.* 2004).

### 1.3. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Actualmente, en países desarrollados, la demencia es uno de los mayores problemas médicos en personas ancianas, con una prevalencia que llega a ser del 1% a la edad de 60 años y hasta del 35% en individuos de 90 años (van Marum, 2008). En el espectro de las demencias, la asociada a la enfermedad de Alzheimer es el subtipo más prevalente, englobando hasta el 70% de todas las demencias. Se estima que esta enfermedad afecta a más de 800.000 personas en España, más de 3.2 millones en Europa y a 35.6 millones de personas en el mundo. Se espera que en el año 2030 haya 65.7 millones, y en 2050 115.4 millones de personas con Alzheimer en el mundo (Gustavsson *et al.* 2010b; Gustavsson *et al.* 2010a Wimo *et al.* 2011). Además, el creciente número de ancianos y el aumento de la esperanza de vida pronostican un rápido incremento en el número de pacientes que sufrirán demencia, lo cual justifica el gran número de estudios acerca de éstas enfermedades, así como la búsqueda de nuevas terapias farmacológicas para su prevención y tratamiento (van Marum, 2008).

La Enfermedad de Alzheimer, descubierta por Alois Alzheimer en el año 1906, es una enfermedad neurodegenerativa progresiva que afecta principalmente a individuos de más de 60 años y se caracteriza por una pérdida gradual de las funciones cognitivas. En el curso de esta enfermedad se produce una atrofia cerebral en la región neocortical y en el hipocampo, debida a una pérdida neuronal progresiva, a la acumulación extracelular del péptido  $\beta$ -amiloide, pudiendo generar placas (denominadas placas seniles), y a la formación de ovillos intracelulares de proteína Tau hiperfosforilada (neurofibrillas, NFT). Además, aparece también una degeneración progresiva del núcleo colinérgico basal del encéfalo y del núcleo noradrenérgico del tronco cerebral, principalmente el LC (Heneka *et al.* 2010a).

La degeneración y la pérdida de los axones derivados del LC están asociadas con la disminución de los niveles de noradrenalina en determinadas regiones del cerebro en pacientes con EA (Bondareff *et al.* 1987; Matthews *et al.* 2002). Aun así, aunque la reducción de neuronas del LC se correlaciona con el aumento de la densidad de placas amiloides, con el número de NFT y con el aumento de la demencia, sigue sin estar claro cuándo comienzan a morir las células de este área cerebral y si esta degeneración estructural es precedida por un periodo de tiempo

significativo de disfunción noradrenérgica (Bondareff *et al.* 1987). Hoy en día, aunque la EA es la causa más común de demencia y a pesar de que se ha avanzado mucho en su estudio, todavía no se sabe qué eventos se dan inicialmente en los estadios tempranos de esta enfermedad para que se produzca la acumulación de  $\beta$ -amiloide.

Además del déficit noradrenérgico, en esta enfermedad también se ven alterados otros neurotransmisores como la serotonina, el glutamato, la sustancia P o la somatostatina, y en menor grado la dopamina (Marien *et al.* 2004). En relación a esto, se ha descubierto recientemente que inhibidores de la recaptación de serotonina generan protección frente a la toxina DSP-4 que degrada las células noradrenérgicas del LC (Hammerschmidt *et al.* 2013). También se ha demostrado la existencia de una forma hereditaria o familiar de la EA (FAD, *familiar Alzheimer disease*) que parece ser la responsable del 10% de los casos y suele aparecer antes de los 65 años de edad (Harman, 2006). Si bien se ha demostrado la asociación de factores genéticos, todo parece indicar que existe una importante heterogeneidad genética. Así, se han identificado 3 genes relacionados con FAD, el de la proteína precursora del péptido amiloide (APP) (Kowalska, 2004), los que codifican para las presenilinas 1 y 2 (PS1, PS2) (Bird, 2005) y el gen que codifica para la isoforma ApoE  $\epsilon$ 4, que aumenta el riesgo de sufrir la EA (Poirier *et al.* 1993; Corder *et al.* 1993).

### 1.3.1. FISIOPATOLOGÍA DE LA EA

Según la hipótesis amiloide, la alteración del metabolismo de la proteína precursora de amiloide (APP), seguida de la agregación y deposición del péptido  $\beta$ -amiloide son responsables de la cascada de fenómenos que conducen a la pérdida neuronal, demencia y deterioro cognitivo característicos de esta enfermedad. La APP es una glicoproteína integral de membrana tipo 1 expresada de forma ubicua con varias isoformas. Su gen reside en el cromosoma 21 y es por esto que los individuos con Síndrome de Down, que presentan tres cromosomas 21, desarrollan una demencia temprana. El procesamiento proteolítico de la proteína APP por medio de las secretasas se da de dos formas diferentes, la amiloidogénica y la no amiloidogénica. Como se esquematiza en la figura 4, la APP es procesada por la  $\alpha$  y la  $\beta$  secretasa, liberando  $\alpha$  y  $\beta$  APP soluble a la matriz extracelular, mientras que la  $\gamma$  secretasa procesa el fragmento carboxiterminal (CTF) que permanece anclado a la membrana (de *et al.* 1993). En la ruta no amiloidogénica la  $\gamma$  secretasa procesa el fragmento CTF liberando el fragmento p3, mientras que en la ruta amiloidogénica este

procesamiento libera péptidos  $\beta$ -amiloide de diferente longitud, siendo las formas más comunes  $\beta A_{1-40}$  y  $\beta A_{1-42}$ . Ambos péptidos resultan tóxicos, aunque la forma  $\beta A_{1-42}$  es insoluble y más proclive a generar agregados que posteriormente darán lugar a las placas. Así, el péptido  $\beta A$  existe primero como monómero, agrupándose después como oligómeros, protofibrillas y fibrillas, siendo tóxicos tanto los oligómeros intermedios, como las fibrillas maduras, aunque se ha demostrado que presentan mayor toxicidad las protofibrillas que las fibrillas maduras o las placas de  $\beta A$  (Walsh *et al.* 2002).

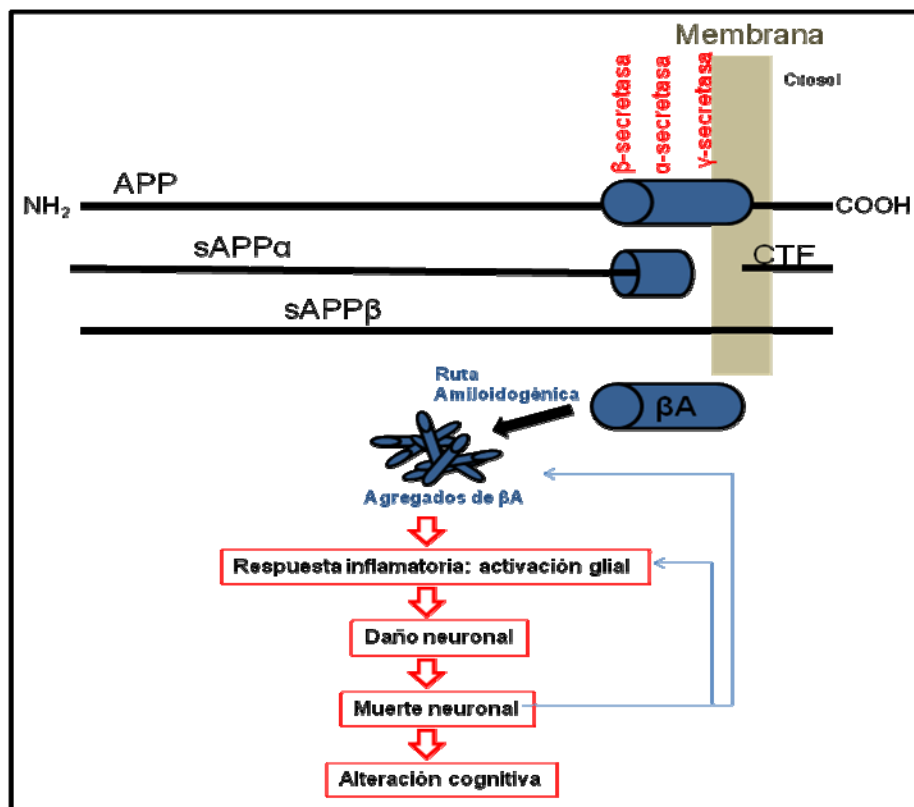


Figura 4: Generación de agregados del péptido  $\beta A$

En condiciones normales el péptido  $\beta A$  se elimina del cerebro bien degradándose por medio de las peptidasas enzima degradadora de insulina (IDE, *insulin-degrading enzyme*), Presenilinas (PS) y la enzima convertidora de endotelina (ECE) (Carson and Turner 2002), o bien mediante un proceso de difusión a través de la barrera hematoencefálica (BHE) (Tanzi *et al.* 2004), siendo la proteína LRP (*low density lipoprotein receptor related protein*) la que controla el flujo del péptido  $\beta A$  desde el cerebro a la periferia y RAGE (*receptor for advanced glycation end products*) la que controla su flujo dentro del cerebro. Así, como se ha explicado anteriormente, el péptido  $\beta A$  soluble en el parénquima cerebral puede agregarse en especies fibrillogénicas que pueden llegar a formar placas, o pueden ser retiradas del cerebro mediante degradación enzimática o por eliminación mediada por receptor. En el primer caso, el péptido  $\beta A$  puede ser internalizado y

degradado por la microglía activada o por las enzimas específicas. En la ruta alternativa de eliminación, el péptido puede ser trasladado desde el cerebro a la sangre mediante la unión directa a LRP, o por unión a las chaperonas LRP/  $\beta$ A (apoE y  $\alpha$ -2M), y una vez en la circulación sanguínea puede volver a entrar en el cerebro vía RAGE o ser transportado a lugares periféricos para su degradación (principalmente hígado o riñón).

Otro hecho histopatológico en la EA es la formación de ovillos neurofibrilares que constituyen acumulaciones citoplasmáticas de haces denominadas PHF (*paired helical filaments*) formadas por proteína Tau hiperfosforilada (Grundke-Iqbal *et al.* 1986; Wood *et al.* 1986). Las proteínas Tau, que juegan un papel crucial en el mantenimiento estructural de las neuronas, estabilizando los microtúbulos y promoviendo su ensamblaje, en estado anormal pierden totalmente su funcionalidad y además, secuestra a proteínas Tau normales, MAP1 y MAP2, causando un desensamblaje de los microtúbulos. El estado de fosforilación de la fosfoproteína Tau está mediado por diferentes kinasas y fosfatasas, así, una de las causas de la hiperfosforilación en cerebros con EA es un descenso en la actividad de la proteína fosfatasa 2A (PP-2A), lo que produce, no solo un descenso en la desfosforilación, sino también una activación de las kinasas de Tau, como es el caso de la proteína kinasa 2 dependiente de calcio o calmodulina kinasa 2 (CaMKII), de la proteína kinasa A (PKA) y de kinasas activadas por mitógenos (MAPK), siendo estas últimas el factor más importante en la regulación de la fosforilación de Tau (Iqbal and Grundke-Iqbal, 2005).

### 1.3.2. HIPÓTESIS COLINÉRGICA DE LA EA

Frecuentemente, la EA se ha caracterizado como un desorden en la inervación colinérgica, ya que se produce una disminución en la síntesis de acetilcolina y de Acetiltransferasa de entre el 60% y el 90%, tanto en la corteza cerebral como en el hipocampo. Además, también se produce una reducción en el número de neuronas colinérgicas del núcleo basal de Meynert (nbM) de entre el 30% y el 90%. Así, esta disminución colinérgica se correlaciona con los daños cognitivos que aparecen en esta enfermedad, aunque la pérdida de neuronas del LC es más extensa y se correlaciona mejor con la EA que la pérdida de células colinérgicas observada en el nbM (Forstl *et al.* 1994; Zarow *et al.* 2003).

Tanto en roedores como en primates existe una estrecha relación entre el sistema noradrenérgico y el sistema colinérgico, ya que las células del nbM reciben contactos sinápticos

desde fibras noradrenérgicas. Además, pueden darse también interacciones, tanto pre- como post-sinápticas, entre estos dos sistemas por la superposición de sus campos terminales. De hecho, la NA puede regular la transmisión colinérgica mediante la acción de los receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  presinápticos situados en las terminales colinérgicas de la corteza basal, o a nivel del cuerpo celular de nervios colinérgicos del encéfalo. También se ha demostrado que la NA, a través de sus receptores  $\beta$  y  $\alpha_1$ , produce un efecto excitatorio en las neuronas colinérgicas del encéfalo, generando la liberación del neurotransmisor Acetilcolina. El receptor  $\alpha_2$ , en cambio, inhibe esta vía. Así, pueden usarse agonistas o antagonistas de los receptores noradrenérgicos para modular farmacológicamente los niveles de Acetilcolina (Marien *et al.* 2004).

Todo esto sugiere que la pérdida colinérgica producida en la EA, depende directamente del déficit noradrenérgico, y aunque el daño colinérgico es importante, no es suficiente por sí sólo para generar el deterioro cognitivo observado en esta enfermedad. Por lo cual no suelen aceptarse modelos animales de la EA donde se produzca únicamente déficit colinérgico. De hecho, los modelos animales usados, generalmente, están basados en un déficit noradrenérgico o en la generación de animales transgénicos que superproduzcan la APP o el  $\beta$ -amiloide. Actualmente, también existe otro modelo de animales transgénicos que expresan anti-NGF, y es considerado uno de los mejores, ya que se generan conjuntamente una disfunción cognitiva, un aumento en las placas de  $\beta$ -amiloide y una hiperfosforilación de proteínas Tau, tanto en corteza cerebral como en hipocampo (Counts and Mufson 2010).

### 1.3.3. HIPÓTESIS DOPAMINÉRGICA DE LA EA

Como se ha comentado existe una estrecha relación entre las enfermedades de Alzheimer y de Parkinson ya que en ambas se produce una pérdida de neuronas del LC, así como del núcleo basal y de la *substantia nigra*. (Eisen and Calne 1992; Dunnett and Bjorklund 1999; Zarow *et al.* 2003). En las dos enfermedades se ven afectados los mismos sistemas de neurotransmisión en diferentes proporciones según el estadio de la misma y se producen síntomas análogos en diferentes proporciones (daño cognitivo y motor). De hecho la EA y la EP podrían considerarse los estados finales de una enfermedad que también incluye estados intermedios de la enfermedad o síndromes mixtos, como se esquematiza en la figura 5.

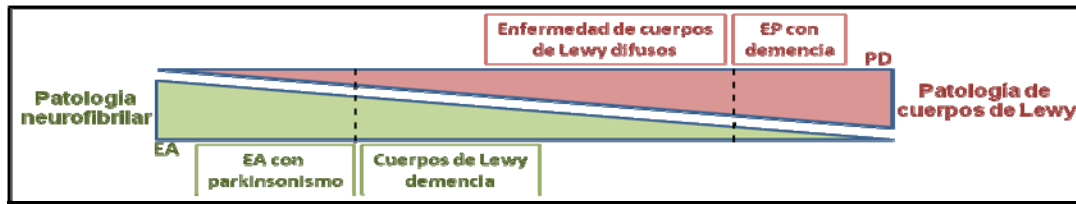


Figura 5: Relación entre la EA y EP. Esquema adaptado de Marien et al., 2004.

La EP está caracterizada por la formación de “cuerpos de Lewy” en células dopaminérgicas y una disminución en los niveles del neurotransmisor dopamina (DA) principalmente, causada por la pérdida de neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra compacta* y del estriado, así como de neuronas noradrenérgicas del LC. Esto es debido a que existe una interacción entre el sistema noradrenérgico y el dopaminérgico, ya que el LC genera proyecciones noradrenérgicas directamente al núcleo basal. En cambio, el estriado es aparentemente “inmune” a la inervación del LC (Marien *et al.* 2004).

En relación con la dependencia de estos dos sistemas catecolaminérgicos, recientemente se ha descrito la existencia de un posible efecto compensatorio en la degradación del LC por la dopamina  $\beta$ -hidroxilasa (DBH), enzima principal en la vía de formación de la dopamina (Hammerschmidt *et al.* 2013).

### 1.3.4. NEUROINFLAMACIÓN Y EA

Uno de los problemas asociados a las enfermedades neurodegenerativas es la neuroinflamación, siendo uno de los mecanismos patógenos más importantes en la progresión de la EA, aunque no está totalmente caracterizada la etiología de este proceso. (Akiyama *et al.* 2000b; Akiyama *et al.* 2000a; Van Eldik *et al.* 2002; Heneka *et al.* 2010a). Al analizar cerebros postmortem de pacientes con esta enfermedad se ha encontrado que en los depósitos de  $\beta$ A hay una gran acumulación de células gliales, de las cuales, la mayoría presentan cambios morfológicos que indican su activación (Mrak *et al.* 1995; Sheng *et al.* 1995; Akiyama *et al.* 2000b; Akiyama *et al.* 2000a). Una vez activada, la microglía libera una gran cantidad de mediadores inflamatorios que contribuyen a la disfunción neuronal. Además, estos mediadores aumentan la deposición del péptido  $\beta$ A o disminuyen su degradación, lo que lleva a un círculo vicioso que es decisivo para el progreso de esta enfermedad (Griffin *et al.* 1998). La presencia de depósitos de  $\beta$ A activa también a los astrocitos, los cuales liberan especies reactivas de oxígeno, citoquinas y quimioquinas que

conducen a la muerte neuronal. La microglía recluta también astrocitos y viceversa, aumentando la respuesta inflamatoria. Esta microglía va a participar en la degradación y en el procesamiento de APP y de  $\beta A$ , confiriendo protección (Tuppo and Arias, 2005). Aunque, por otra parte, al activarse en etapas tempranas de la enfermedad, la neuroinflamación puede prolongarse hasta llegar a producir neurodegeneración (Wegiel and Wisniewski, 1990; Paresce *et al.* 1996; El *et al.* 1996; Alarcon *et al.* 2005). De acuerdo con el efecto nocivo que genera una neuroinflamación prolongada, se ha demostrado que los agentes inflamatorios TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , solos o sinérgicamente, pueden regular la secreción de  $\beta A$ , ya que activan el procesamiento de APP (Blasko *et al.* 1999).

El mecanismo de acumulación de la glía en la EA ha sido descrito por diferentes investigadores, lo que indica por tanto, que las células microgliales están íntimamente asociadas con los agregados amiloides desde los estadios tempranos de su formación. Esta asociación puede sugerir que la microglía no ha sido capaz de degradar de manera eficiente  $\beta A$ , o incluso que podría llegar a formar parte del microprocesamiento de la APP, el cual puede seguir diferentes mecanismos (Ambrosini and Aloisi, 2004; El and Luster, 2008).

Se ha propuesto que la formación de placas seniles podría depender de alteraciones en la función microglial, causadas bien por una inducción anormal de la respuesta inflamatoria, o bien por un déficit en el procesamiento de APP, por lo que la modulación de la reactividad microglial frente a derivados de APP podría ser una nueva vía para entender tanto la patogénesis de EA como de otras enfermedades neurodegenerativas (Von, 2007; Von *et al.* 2007).

Por otro lado, se sabe que los astrocitos modulan la activación microglial según las condiciones del medio y en función de los agentes proinflamatorios presentes ( Von and Eugenin, 2004; Ramirez *et al.* 2005). Así, puede decirse que las condiciones proinflamatorias promueven el daño neuronal inducido por  $\beta A$ , produciéndose una disminución en la fagocitosis y degradación del péptido por las células microgliales.

Otra causa de la activación de la microglía y los astrocitos es también la edad, la cual genera un aumento de la inflamación en el SNC, pudiendo, por sí sola ser la causa de la aparición de la EA (Von, 2007; Von *et al.* 2007). Está demostrado que durante el envejecimiento se producen cambios celulares y moleculares que hacen a las células más susceptibles a la inflamación, facilitando incluso su degeneración. Así, en un cerebro envejecido se establece un entorno proinflamatorio donde hay un incremento de citoquinas, de estrés oxidativo, y de

## INTRODUCCIÓN

---

activación glial (Beckman and Ames, 1998; Terao *et al.* 2002; Bodles and Barger, 2004; Barja 2004). Al mismo tiempo, hay pruebas de que las células microgliales pierden funcionalidad con el aumento de la edad y la consecuente disminución de noradrenalina (Richartz *et al.* 2005b; Richartz *et al.* 2005a), lo que podría estar de acuerdo con la aparición de la EA a edades avanzadas, cuando existe un entorno proinflamatorio en el cerebro.

En relación con lo anterior, se sabe que la inflamación produce numerosos cambios en las funciones microgliales, que van desde el procesamiento y la degradación de APP o la generación de factores de crecimiento, hasta la inducción de neurodegeneración. De hecho, actualmente está aceptado que la inflamación tiene un papel dual, mediando tanto procesos neurodegenerativos como protectores (Marien *et al.* 2004). Junto a esto, existen estudios que relacionan el consumo de los AINEs (Antiinflamatorios no esteroideos) con la disminución en la aparición temprana de la EA, pudiendo incluso evitarla (Stewart *et al.* 1997; Etmnan *et al.* 2003; Imbimbo *et al.* 2010).

### 1.3.5. TERAPIAS

El tratamiento farmacológico de la EA ha resultado ineficaz hasta la fecha, consiguiendo únicamente paliar algunos síntomas. Esto es debido principalmente, al desconocimiento de las causas iniciales de la enfermedad y a la falta de marcadores tempranos que permitan detectarla a tiempo para su tratamiento. Muchas de las terapias se han enfocado a compensar el déficit de acetilcolina que se produce por la pérdida de neuronas colinérgicas y que parece ser responsable de los síntomas cognitivos. También se ha aprobado por la FDA (*Food and Drug Administration*) y por la EMEA (Agencia Europea del Medicamento) el uso de antagonistas del receptor de NMDA, así como de ciertas vitaminas y antiinflamatorios no esteroideos (AINEs). Aunque actualmente se están dirigiendo las terapias hacia la disminución de la deposición del péptido  $\beta$ -amiloide o hacia un aumento en su degradación. Concretamente, se encuentran en ensayo clínico vacunas anti- $\beta$ A (Stewart *et al.* 1997; van Marum, 2008; Wilkinson *et al.* 2012).

A continuación se expone una relación de los tratamientos farmacológicos utilizados, o en estudio, para la enfermedad de Alzheimer:

**Inhibidores de la acetilcolinesterasa:** Tacrina, Donepezilo, Rivastigmina y Galantamina. Se han demostrado efectos significativos con varios de ellos, sin embargo la enfermedad sigue

progresando a pesar del tratamiento, y la magnitud de la eficacia promedio es modesta, con un retraso de entre 2 y 7 meses en el patrón progresivo de la evolución.

**Memantina:** Es un antagonista no competitivo del receptor NMDA, que actúa uniéndose al mismo lugar al que lo hace el magnesio, pero con mayor afinidad. Así, bloquea la unión de glutamato al receptor, disminuyendo la entrada masiva de calcio a la célula nerviosa y evitando la excitotoxicidad. Este tratamiento parece ser eficaz para la demencia y podría tener efectos neuroprotectores, aunque necesita aún más estudios que lo corroboren. Además, solamente está indicado para casos moderados o graves.

**Selegilina y vitamina E:** Se ha demostrado que son capaces de producir un cierto retraso en la evolución de la enfermedad, disminuyendo así mismo la institucionalización de los pacientes. No se prescriben simultáneamente ya que no presentan efecto aditivo, siendo la vitamina E mejor tolerada que la selegilina.

**Prednisona y Estrógenos:** Aunque varios estudios epidemiológicos sugieren efectos protectores frente al desarrollo de la enfermedad de Alzheimer por parte de esteroides y estrógenos, hasta ahora los ensayos clínicos llevados a cabo para corroborarlo han arrojado resultados negativos.

**Estatinas:** Varios estudios epidemiológicos retrospectivos sugieren que hay una menor incidencia (en torno a un 70% menos de media) de enfermedad de Alzheimer entre sujetos que estaban tomando estatinas como tratamiento para controlar el colesterol, al compararlos con otros que tomaban hipolipemiantes diferentes (fibratos, colestiramina o ácido nicotínico) y con aquellos que no tomaban ninguno. El mecanismo no está aún claro, aunque algunos estudios indican que las estatinas estimulan la vía de la  $\alpha$ -secretasa para la escisión de la APP.

**Antiinflamatorios no esteroideos:** Estudios retrospectivos han demostrado una menor incidencia de la enfermedad de Alzheimer en sujetos tratados durante dos o más años con AINEs, pudiendo tener más eficacia en este sentido los antiinflamatorios con efecto inhibitor de la  $\beta$ -secretasa.

**Inhibición de la síntesis del  $\beta$ A:** Se está intentando modular la actividad de las secretasas, responsables de la escisión de la APP. Así, existen inhibidores de la  $\gamma$ -secretasa que se encuentran en ensayo clínico en fase III, como el LY450139. El problema de estos fármacos es que la  $\gamma$ -

## INTRODUCCIÓN

---

secretasa tiene otros sustratos y desempeña papeles importantes en procesos fisiológicos, como la embriogénesis y la hematopoyesis, por lo que su bloqueo podría tener efectos adversos. Alternativas más selectivas consisten en utilizar moduladores de estas secretasas favoreciendo la producción de formas menos patógenas de  $\beta$ A. En este sentido, algunos AINEs han demostrado su capacidad para ello, siendo el compuesto más avanzado en desarrollo clínico el Flurbiprofeno. Este agente, en concentraciones terapéuticas, carece de actividad antiinflamatoria (no inhibe el enzima COX-2) pero es un efectivo modulador de la  $\gamma$ -secretasa. También se está tratando de favorecer la ruta no amiloidogénica en el procesamiento de la APP, estimulando la  $\alpha$ -secretasa, una acción que parecen realizar los agonistas muscarínicos mediante la estimulación de la PKC.

**Inhibición de la agregación del  $\beta$ A:** Otra posibilidad de evitar la toxicidad del  $\beta$ A es inhibiendo su agregación. Para ello existen compuestos como el Tramiprosato (Alzhemed®), que es capaz de unirse a las péptidos bloqueando su agregación e impidiendo así la formación de placas. Otra manera de conseguir esto es mediante la reducción de los cationes de  $Zn^{2+}$  y de  $Cu^{2+}$ , los cuales son inductores de la agregación de  $\beta$ A en condiciones fisiológicas. Este efecto se ha conseguido empleando el antibiótico Clloquinol, el cual ha pasado las fases clínicas I y II. Sin embargo, aún no está claro si mostrará resultados clínicos positivos en pacientes con EA, ya que su efecto no se mantiene 36 semanas después de su administración. Además su uso oral se ha asociado con una neuropatía causada posiblemente por una deficiencia en vitamina B12.

**Aumento de la degradación de  $\beta$ A:** Otra posible estrategia puede ser inducir la degradación de  $\beta$ A. Así, se está estudiando el uso de enzimas como la Nephrylisina (NEP, encefalinasa o CD10), principal enzima de degradación de  $\beta$ A. Este enzima actúa sobre la forma soluble de  $\beta$ A, pero no sobre las placas amiloides. Los ensayos clínicos con NEP actualmente están en fase II y III. NEP puede aumentarse mediante el uso de somatostatina, pero los efectos de ésta en pacientes con EA no se han analizado todavía. Otras metaloproteasas que han mostrado una disminución del péptido  $\beta$ A son el enzima de degradación de insulina (IDE), el enzima convertidora de endotelina (ECE) y el enzima convertidora de angiotensina (ACE). (van Marum, 2008). Esta última, presenta una relación especialmente interesante con la EA, encontrándose actualmente en debate.

Otra vía para degradar  $\beta$ A es mediante inmunización. La inmunización activa del péptido causó graves problemas con la vacuna que se ensayó, debido a procesos inflamatorios en el SNC que llevaron a producir meningoencefalitis aséptica. Hoy en día está en estudio una vacuna de segunda generación, la ACC-001. La inmunización pasiva es más costosa y molesta, ya que implica

la administración frecuente de anticuerpos monoclonales anti-  $\beta$ A. Ejemplo de ellos son Sibapineuzumab, LY2062430 y RN1219.

**Inhibición de la hiperfosforilación de la proteína Tau:** Existen inhibidores de la glucógeno sintasa 3 $\beta$  (GS3 $\beta$ ) y de la Kinasa tipo cdc2 (CDK5), enzimas implicados en la fosforilación de Tau.

**Otras estrategias:** Se están estudiando otras estrategias para tratar la enfermedad de Alzheimer, como son la utilización del factor de crecimiento neuronal (NGF), la terapia génica o los compuestos miméticos de NGF. Aunque estos estudios son todavía muy preliminares.

#### 1.4. EFECTO NEUROPROTECTOR DE LA NA EN LA EA

Como se ha comentado anteriormente, tanto las neuronas como las células gliales presentan receptores adrenérgicos, actuando la NA como inmunomodulador en sistemas extra e intracelulares, y ejerciendo un papel de neuroprotector endógeno con propiedades antiinflamatorias, inhibiendo la expresión de citoquinas y otros agentes inflamatorios (Troadec *et al.* 2002; Feinstein *et al.* 2002b; Galea *et al.* 2003; Dello *et al.* 2004). Así, en múltiples estudios se ha demostrado que la NA es capaz de regular negativamente la transcripción de genes inflamatorios en células gliales, ejerciendo su efecto mediante la activación del receptor  $\beta_2$ -adrenérgico (Feinstein *et al.* 2002b; Feinstein *et al.* 2002a; Mori *et al.* 2002; Dello *et al.* 2004). Por lo que la NA, a través de AMPc, regula multitud de procesos cerebrales, incluyendo la inducción de diferentes vías neuroprotectoras.

De acuerdo con esto se ha observado que la NA, a través de los receptores  $\beta$  adrenérgicos, activa la vía metabólica que incluye al segundo mensajero adenosin monofosfato cíclico (AMPc) y a la proteína de unión en respuesta a AMPc (pCREB, *cAMP response element-binding protein*), produciendo finalmente los factores tróficos NGF y BDNF. Este mecanismo se confirmó mediante el uso anticuerpos bloqueantes anti-NGF y anti-BDNF, que inhibieron el efecto neuroprotector de la NA frente a  $\beta$ A en cultivos primarios de neuronas hipocampales y en neuronas humanas (hNT). Por tanto, estos estudios sugieren que el efecto neuroprotector de las proyecciones noradrenérgicas del LC se debe, en parte, a la estimulación de NGF y BDNF, con funciones autocrinas o paracrinas (Counts and Mufson, 2010). Además, en este estudio se demuestra también que la NA y su co-transmisor Galanina son efectivos previniendo la muerte neuronal

## INTRODUCCIÓN

---

inducida por  $\beta$ A, inhibiendo la despolarización de la membrana mitocondrial, la activación de caspasas y el aumento intracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS).

El efecto neuroprotector de la NA parece ser debido también a la activación de sistemas antioxidantes, lo cual estaría apoyado por hecho de que la NA aumente en neuronas la producción de glutatión en su forma reducida (GSH) y del receptor nuclear activado por proliferadores de peroxisomas  $\delta$  (PPAR $\delta$ ) (Madrigal *et al.* 2007). Por lo que la combinación de propiedades antiinflamatorias y antioxidantes de este neurotransmisor lo hacen ser un buen candidato para reducir daños neurotóxicos en enfermedades neurodegenerativas como la EA.

Además, la NA actúa como un importante regulador de funciones microgliales, facilitando, por ejemplo, la eliminación del péptido  $\beta$ A. De acuerdo con esto, estudios realizados sobre la EA ponen de manifiesto que el LC es capaz de modular, mediante sus proyecciones noradrenérgicas, la migración y la fagocitosis, principales mecanismos en la respuesta de las células gliales ante la deposición crónica del péptido  $\beta$ A (Heneka *et al.* 2010a; Heneka *et al.* 2010c; Kong *et al.* 2010). El hecho de que la NA sea determinante en el mecanismo de reclutamiento y fagocitosis microglial de placas de  $\beta$ -amiloide se ve apoyado por diferentes estudios como el de Kong *et al.* (2010) donde se le atribuye a la NA el papel de nexo de unión entre neuronas y microglía en presencia de  $\beta$ A, ya que actúa, mediante la activación del receptor noradrenérgico  $\beta_2$ , como mediador en la comunicación celular microglía-neurona generando una cascada de señalización que incluye ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinase 1/2*), NF $\kappa$ B, p38 y la enzima de degradación de insulina (IDE, *insulin-degrading enzyme*), promoviendo la eliminación del péptido  $\beta$ A por parte de la microglía.

Por otro lado, al disminuir las proyecciones noradrenérgicas del LC se facilitan las reacciones inflamatorias de las células microgliales. Se ha demostrado, tanto *in vitro* como *in vivo*, que la NA actúa como modulador positivo inhibiendo la transcripción de genes proinflamatorios y eliminando la producción de citoquinas y quimoquinas en microglía activada por  $\beta$ A, y que este efecto de supresión de los agentes inflamatorios por parte de la NA en las células gliales está mediado por un incremento en la expresión de la proteína inhibitoria I $\kappa$ B $\alpha$ . Así, estudios realizados con la toxina DSP-4, la cual degrada células del LC, confirman este hecho, demostrando un aumento de agentes proinflamatorios, como iNOS, IL-1 $\beta$  e IL-6 en la corteza cerebral, tras la inyección de  $\beta$ A mayor por la presencia de DSP-4 (Heneka *et al.* 2002; Heneka *et al.* 2003) De hecho, se ha propuesto que la muerte neuronal del LC por sí misma podría desencadenar una

respuesta inflamatoria que potencie la acumulación de  $\beta$ -amiloide y/o impida su degradación (Heneka *et al.* 2010a; Heneka *et al.* 2010c; Kong *et al.* 2010b).

De acuerdo con lo expuesto anteriormente, existen diferentes estudios con modelos animales de la EA, donde se ha demostrado que la degeneración del LC induce neuroinflamación y cambios en los distintos sistemas adrenérgicos. Así, el daño del LC en la EA produce el aumento de los niveles de diferentes marcadores inflamatorios, y la alteración de receptores noradrenérgicos confirmando que la pérdida de NA está correlacionada con este incremento (Jardanhazi-Kurutz *et al.* 2011). Por otra parte, recientemente se ha demostrado que la degeneración del LC, y el consecuente déficit noradrenérgico que se produce en la EA, puede contribuir a los déficits cognitivos característicos de esta enfermedad mediante la alteración de los niveles de la proteína calmodulina kinasa dependiente de calcio II (CaMK-II) y del receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) (Hammerschmidt *et al.* 2013).

### 2. QUIMIOQUINAS

Las quimioquinas (o citoquinas quimiotácticas) son una familia de pequeñas proteínas (60-100 aminoácidos) de bajo peso molecular (8-14 KDa), relacionadas estructuralmente con las citoquinas, que juegan un papel esencial en la migración celular y en la comunicación intercelular (Ambrosini and Aloisi, 2004; Deshmane *et al.* 2009). Su principal fuente de producción en el SNC son los astrocitos (Berman *et al.* 1996; Berman *et al.* 1996; Ransohoff *et al.* 1996; Van, V *et al.* 1999; Rezaie *et al.* 2002).

Aunque las quimioquinas se definieron inicialmente como citoquinas inducibles que facilitaban el reclutamiento de diferentes subtipos de leucocitos al sitio de inflamación, hoy en día se sabe que también están implicadas en la vigilancia cerebral mediante el control de la circulación de células inmunes entre la sangre, los tejidos y los órganos linfoides. Junto con esto, las quimioquinas regulan además numerosos procesos celulares como son la adhesión, la apoptosis, la proliferación, la fagocitosis o la secreción de citoquinas, y están implicadas en procesos como la homeostasis, desarrollo celular, angiogénesis, crecimiento de tumores o metástasis (Ambrosini and Aloisi, 2004; Deshmane *et al.* 2009). Así, desde que se descubrió la primera quimioquina hasta nuestros días, se han identificado más de 50 quimioquinas humanas y 20 receptores de éstas.

#### **CLASIFICACIÓN:**

Las quimioquinas se clasifican estructuralmente en cuatro subfamilias según la localización y el número de aminoácidos entre cisteínas que presentan en su extremo N-terminal (Nt) y se nombran como CXC, CC, CX<sub>3</sub>C y XC, según la disposición de cisteínas (C) y otros aminoácidos (X), siendo X<sub>n</sub> el número de aminoácidos entre cisteínas. Generalmente tienen cuatro residuos de cisteína que se unen por puentes disulfuro, el primero con el tercero, y el segundo con el cuarto. Las primeras dos cisteínas están muy próximas y se encuentran situadas cerca del extremo Nt de la proteína madura, la tercera cisteína se sitúa en el centro de la molécula y la cuarta cerca del extremo C-terminal. La separación entre los residuos 3 y 4 es de la que depende la nomenclatura (X<sub>n</sub>). Además de esta clasificación, las quimioquinas CXC se dividen a su vez en ELR-positivas o negativas, dependiendo de la presencia o ausencia de motivos estructurales ELR (Ácido Glutámico-Leucina-Arginina) en el extremo Nt (Ambrosini and Aloisi 2004; Deshmane *et al.* 2009). En general, la estructura de una quimioquina contiene tres dominios diferentes, uno N-terminal muy flexible sostenido por enlaces de puentes disulfuro entre residuos de cisteína del mismo, un segundo dominio formado por un loop de láminas β antiparalelas y un

tercero formado por una estructura de hélices- $\alpha$  que conectan los dos anteriores. Además de tener en común este patrón tridimensional, se han encontrado homologías en la estructura primaria de las quimioquinas, conservándose incluso algunos aminoácidos. Estudios estructurales han demostrado la importancia del dominio N-terminal para su unión y activación del receptor (Clore and Gronenborn, 1995; Rossi and Zlotnik, 2000; Bacon *et al.* 2002;).

También existe una clasificación funcional general de las quimioquinas, basada en la actividad específica de éstas sobre diferentes poblaciones celulares del sistema inmune, teniendo en cuenta que pueden ser promiscuas en su acción. Así, están las quimioquinas tipo CXC ERL<sup>+</sup> (e.j. CXCL8/IL8; CXCL1/Gro- $\alpha$ ) que estimulan la angiogénesis y actúan específicamente sobre neutrófilos; las tipo CXC ERL<sup>-</sup> (e.j. CXCL9/Mig; CXCL10/IP-10; CXCL11/I-TAC; CXCL12/SDF-1; CXCL13/BLC) que estimulan la migración de monocitos y linfocitos, y a excepción de CXCL12/SDF-1, presentan propiedades angiostáticas, neurogénicas y sinaptogénicas. Las quimioquinas tipo CC, en cambio, actúan sobre células involucradas en la respuesta inmune adaptativa, como monocitos, basófilos, eosinófilos, células natural killer (NK), células dendríticas y linfocitos T. Y finalmente, la quimioquina CX3CL/Fractalkina, único miembro conocido de la familia CX3C, que es también la única quimioquina conocida que presenta tanto una forma soluble como una forma insoluble unida a la membrana celular, actúa sobre monocitos, células NK, células dendríticas y células T. Por último, las de la familia XC (XCL1/linfotactina; XCL2/SCM-1 $\beta$ ) atraen específicamente células T (Rollins, 1997; Bazan *et al.* 1997b; Bajetto *et al.* 2002) .

Además de la clasificación estructural y la funcional, las quimioquinas también se clasifican en dos categorías atendiendo a su expresión. Por un lado están las “quimioquinas constitutivas” o “quimioquinas homeostáticas”, las cuales son responsables del tráfico basal de leucocitos y del desarrollo y organización de órganos linfoides y no linfoides. Y por otro lado están las “quimioquinas inducibles o inflamatorias”, que se producen en respuesta a señales microbiológicas, inmunes o inflamatorias, y conducen a un aumento en el reclutamiento de leucocitos bajo esas condiciones. Aunque esta clasificación se usa ampliamente, actualmente se sabe que existen quimioquinas constitutivas que se producen también de forma inducible ante ciertas condiciones inflamatorias. De igual forma, existen algunas quimioquinas inducibles que son expresadas y reguladas de manera constitutiva en diferentes tejidos (Ambrosini and Aloisi, 2004).

Las quimioquinas realizan algunas funciones siguiendo diferentes vías, pueden, bien formar dímeros en disolución o bien interactuar con glicosaminoglicanos (GAG), como es el caso

## INTRODUCCIÓN

---

de las tipo CC o CXC (Crown *et al.* 2006; Deshmane *et al.* 2009). Esta dimerización se facilita dada la estructura tridimensional de tres dominios que presentan.

### RECEPTORES:

Las quimioquinas ejercen su efecto quimioatrayente a través de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), involucrando también moléculas de adhesión y glicosaminoglicanos (Hyduk *et al.* 2007). Las quimioquinas se unen específicamente al receptor transmembrana de la superficie celular, el cual se encuentra acoplado a una proteína G trimérica que es capaz de generar una respuesta intracelular determinada (Leonard and Yoshimura, 1990).

La mayoría de las respuestas a las quimioquinas pueden ser bloqueadas mediante el tratamiento con la toxina *Pertussis*, lo que indica que las proteínas G acopladas al receptor son principalmente de la clase  $G_{i/o}$  (Leonard and Yoshimura, 1990; Bajetto *et al.* 2002). Tras la activación de la proteína G el complejo se disocia en las subunidades  $\alpha$  y  $\beta\gamma$ , llevando a la inhibición del efector Adenil Ciclasa por parte de la subunidad  $\alpha$  (no generándose el segundo mensajero AMPc) y a la activación de la fosfolipasa C (PLC) por parte de la subunidad  $\beta\gamma$ , liberándose por tanto calcio intracelular. Además ésta última es capaz de activar también la fosfoinositol 3 kinasa (PI3K) que a su vez activa la proteína kinasa B, llegando finalmente a regular la proteína kinasa regulada por señales extracelulares (ERK1/2). Además, la subunidad  $\alpha$  puede generar también la activación de esta kinasa (ERK1/2) a través de las quinasas de la familia Src (Thelen, 2001).

Otros estudios demuestran que existen mecanismos independientes de las proteínas G por los cuales las quimioquinas también pueden actuar. Éstos están mediados por quinasas Janus (JAK-quinasas), que incluyen transductores de señales y activadores de transcripción (STAT), así como proteínas tirosina-fosfatasa (SHP1 y SHP2) (Ganju *et al.* 2000; Mellado *et al.* 1998).

La capacidad de los diferentes tipos celulares para responder a la acción de las quimioquinas es un proceso complejo, que depende de varios factores como la composición del receptor (tipo de proteína G) y su nivel de expresión, así como del estado de diferenciación y de activación celular (Ambrosini and Aloisi, 2004).

Los receptores de quimioquinas, a su vez, se clasifican en base al tipo de ligando al que responden. Hay seis receptores que transducen señales de las quimioquinas CXC (CXCR1-6), once receptores para las quimioquinas CC (CCR1-11) y un receptor para cada una de las quimioquinas CX3CL/Fractalkina y XC (CX3CR1 y XCR1) (Bajetto *et al.* 2002).

El sistema Quimioquina/Receptor tiene dos propiedades importantes en su acción sobre células del sistema inmune, es redundante y promiscuo, lo que quiere decir que una quimioquina no activa únicamente a un receptor ni a un solo tipo de población celular. De igual forma, cada población celular puede responder a diferentes quimioquinas y cada receptor puede responder a más de una quimioquina y con diferente intensidad (Mantovani, 1999; Rossi and Zlotnik, 2000), esto hace que sea complejo estudiar la cascada de señalización de forma individual para cada quimioquina y para cada tipo celular *in vivo*.

### 2.1. QUIMIOQUINAS Y ENFERMEDADES DEL SNC

El hallazgo de las quimioquinas en el SNC se remonta a principios de los años noventa, cuando se demostró la importancia de estos señalizadores proteicos en la neuroinflamación, al asociarse su incremento con el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), modelo animal para la esclerosis múltiple (EM) (Hulkower *et al.* 1993; Ransohoff *et al.* 1993). Se identificaron entonces a los astrocitos, a la microglía y a otras células inmunes infiltradas, como fuentes de quimioquinas, y reguladores del reclutamiento de leucocitos en la inflamación (Aloisi *et al.* 1992; Ransohoff *et al.* 1993; Vanguri and Farber 1994). Este descubrimiento de la producción intracerebral de quimioquinas contribuyó a cambiar el concepto tradicional del SNC, pasando de ser considerado como inmunológicamente privilegiado, a ser un tejido con propiedades inmunocompetentes (Ransohoff, 1999). Además, estudios posteriores demostraron que la expresión de las quimioquinas y sus receptores juegan un papel importante en el desarrollo y funcionamiento normal del SNC (Glabinski and Ransohoff, 1999; Asensio and Campbell, 1999; Bajetto *et al.* 2001; Biber *et al.* 2002). En la tabla 1 aparecen las quimioquinas y los receptores que se han descrito en el SNC en condiciones tanto patológicas como fisiológicas.

FAMILIA	RECEPTOR	LIGANDO	FAMILIA	RECEPTOR	LIGANDO
CXC	CXCR1	CXCL8/IL-8	CC	CCR2	CCL2/MCP-1 CCL6/C10 CCL7/MCP-3 CCL8/MCP-2 CCL12
	CXCR2	CXCL1/Gro- $\alpha$ CXCL2/Gro- $\beta$ CXCL3/Gro- $\gamma$ CXCL8/IL-8			
	CXCR3	CXCL9/MIG CXCL10/IP-10 CXCL11/ITAC CXCL12/SDF-1 $\alpha,\beta$			
	CXCR4	CXCL13/BLC			
	CXCR5				
	CXCR6				
CC	CCR1	CCL3/MIP-1 $\alpha$ CCL5/RANTES CCL7/MCP-3 CCL8/MCP-2 CCL6/C10		CCR3	CCL5/RANTES CCL7/MCP-3 CCL8/MCP-2 CCL11/eotaxina
				CCR4	CCL22/MDC
				CCR5	CCL3/MIP-1 $\alpha$ CCL4/MIP-1 $\beta$ CCL5/RANTES CCL8/MCP-2
				CCR6	CCL20/MIP-3 $\alpha$
			CCR8	CCL1/I-309	
			CCR9	—	
			CCR10	—	
			<b>CX3C</b>	CX3CR1	CX3CL1/Fractalkina

**TABLA 1: Las quimioquinas y sus principales receptores en el SNC.** Tabla adaptada de Ambrosini and Aloisi (2004)

Aunque se han identificado varias quimioquinas y sus receptores en el SNC en condiciones normales, todavía no se conoce el papel exacto de estas moléculas en el contexto psicológico y comportamental del individuo. Se ha demostrado que regulan la migración y proliferación celular durante el desarrollo cerebral, que son capaces de modular la excitabilidad y la supervivencia neuronal y que participan en la comunicación intercelular neurona-glía. Esto último podría evidenciar la relación de la actividad de las quimioquinas en el contexto neuropsicológico (Asensio and Campbell 1999; Bajetto *et al.* 2001; Bajetto *et al.* 2002; Biber *et al.* 2002; Cho and Miller 2002; Rezaie *et al.* 2002). En la figura 6 se muestra un esquema de las funciones en las que están involucradas las quimioquinas en el SNC.



Figura 6: Actividad de las quimioquinas en el SNC. Adaptado de Ambrosini and Aloisi (2004)

Muchas quimioquinas y sus receptores, por tanto, tienen un papel importante en el control del desarrollo cerebral, en la excitabilidad neuronal y en transmisión sináptica. Esto hace interesante el estudio de procesos biológicos mediados por estas proteínas señalizadoras, tales como la migración, la proliferación y la supervivencia de neuronas y precursores gliales, ya que podrían ser posibles dianas farmacológicas en el estudio de enfermedades neurodegenerativas, o bien podrían ser marcadores del normal funcionamiento del SNC.

Con todo esto, podría decirse que las quimioquinas actúan sobre células inmunes, atrayéndolas y activándolas, y sobre neuronas, modulando su actividad y supervivencia (Conductier *et al.* 2010). Existen numerosos estudios que demuestran la relación de las quimioquinas derivadas de la glía con diferentes enfermedades neurodegenerativas donde se produce neuroinflamación, como son EM, EA, encefalitis derivada del HIV, isquemia cerebral o tumores (Ambrosini and Aloisi, 2004). También se asocian a otras enfermedades que cursan con inflamación como daño isquémico y enfermedades coronarias (Canoui-Poitrine *et al.* 2011). Por otro lado, en los últimos años, han aparecido estudios donde también se pone de manifiesto la implicación de algunas quimioquinas en mecanismos neuroprotectores, mostrando, por tanto, un efecto dual, lo cual lleva a una gran controversia sobre el papel de estas moléculas en algunas enfermedades neurodegenerativas (Ambrosini and Aloisi, 2004).

Otra propiedad importante de las quimioquinas es su participación en el mecanismo de extravasación de leucocitos a través de la BHE. Las quimioquinas son esenciales para que se produzca una adhesión fuerte en la superficie celular del leucocito mediante la activación de integrinas. En relación a esto, se ha demostrado que las células endoteliales cerebrovasculares pueden por sí mismas producir quimioquinas *in vitro*, y expresarlas junto a sus receptores *in vivo* en condiciones de inflamación. Este mecanismo permite a las quimioquinas producidas por células del tejido intraparenquimal alcanzar la cara endotelial unida a la sangre y estimular la migración de leucocitos (Ambrosini and Aloisi, 2004).

### 2.2. PRODUCCIÓN DE QUIMIOQUINAS EN CÉLULAS GLIALES

Uno de los primeros pasos necesarios para el desarrollo de la respuesta inflamatoria es la atracción o reclutamiento de ciertos tipos celulares al sitio de inflamación (Luster *et al.* 2005). En este proceso, entre otros factores, participan las quimioquinas, consideradas los agentes más importantes en la generación del gradiente hacia el cual migran tanto los leucocitos como otras células (Rot and von Andrian, 2004). Así, de acuerdo con esto, la supresión de las quimioquinas, o de su actividad, llevarían a la supresión de la respuesta inflamatoria (Gerard and Rollins 2001; Gerard and Gerard 2001).

Por tanto, existe una estrecha relación entre las quimioquinas, implicadas en la neuroinflamación, que se asocia a enfermedades neurodegenerativas del SNC, y las células gliales. Cuando se produce daño cerebral o una enfermedad neurodegenerativa, son los astrocitos y la microglía las células efectoras, encargadas de generar la respuesta inmune local. Éstas actúan reconociendo proteínas modificadas o agregadas, sinapsis degeneradas o neuronas dañadas (Wyss-Coray and Mucke 2002; Guenette 2003). En la figura 7, se presenta un esquema de las diferentes funciones descritas para las quimioquinas expresadas por células gliales (astrocitos y microglía).

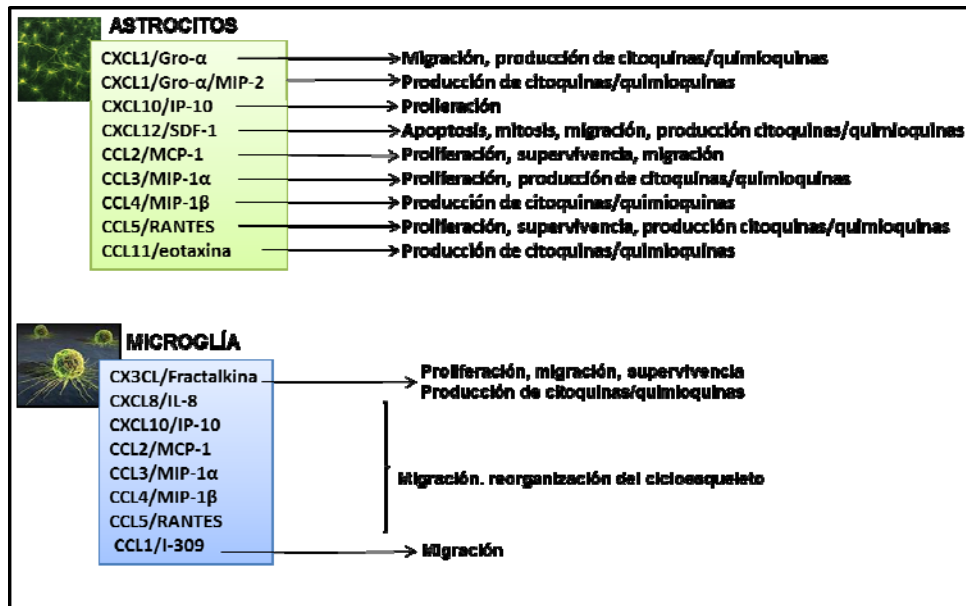


Figura 7: Función de las quimioquinas en las células gliales. Adaptado de Ambrosini and Aloisi (2004)

### 2.2.1. ASTROCITOS

Los astrocitos, o astrogliá, son la población más abundante de las células gliales en el cerebro. Están encargados de regular el pH y la concentración extracelular de iones, de metabolizar los neurotransmisores y de dar soporte estructural, entre otras funciones. Por tanto, controlan la homeostasis y el desarrollo cerebral mediante la generación del soporte trófico a las neuronas y participando en los procesos de reparación (Dong and Benveniste 2001). Además, forman parte integral de la barrera hematoencefálica (BHE), por lo que desempeñan un papel importante en la generación de señales para el reclutamiento de leucocitos en situaciones de neuroinflamación.

Los astrocitos son considerados actualmente como agentes determinantes en la regulación de las complejas cascadas de señalización que presentan las quimioquinas en el SNC, ya que hay una gran variedad que se expresan en estas células, tanto en condiciones normales como patológicas (Ambrosini and Aloisi, 2004). En la tabla 2 se muestran las diferentes quimioquinas liberadas por astrocitos *in vivo*, así como las inducidas por diferentes estímulos inflamatorios en tratamientos *in vitro*.

## INTRODUCCIÓN

QUIMIOQUINAS	EXPRESIÓN <i>in vivo</i>	ESTÍMULOS <i>in vitro</i>
CXCL1/Gro- $\alpha$	Desarrollo del SNC,EAE	IL-1 $\beta$ /TNF $\alpha$ ,CCL5
MIP-2	EAE	TNF $\alpha$ ,CCL5,ICAM-1,S. aureus, MHV
CXCL8/IL-8	—	IL-1 $\beta$ /TNF $\alpha$ ,IL-1 $\beta$ ,TNF $\alpha$ ,INF $\gamma$ /TNF $\alpha$ ,C3a,C5a,HIV y otros virus
CXCL9/MIG	EM	IL-1 $\beta$ /INF $\gamma$ ,TNF $\alpha$ /INF $\gamma$
CXCL10/IP-10	EAE,EM,isquemia,ET,ciertos virus	IL-1 $\beta$ /TNF $\alpha$ ,IL-1 $\beta$ /INF $\gamma$ ,INF $\gamma$ ,CXCL1,MIP-2,C3a,HIV y otros virus
CXCL11/I-TAC	—	INF $\gamma$ ,IL-1 $\beta$ /INF $\gamma$ ,IL-1 $\beta$ /INF $\beta$ ,INF $\gamma$ /TNF $\alpha$
CXCL12/SDF-1 $\alpha$ , $\beta$	En el SNC normal	LPS
CCL1/I-309	—	INF $\gamma$ ,INF $\beta$ ,S. aureus
CCL2/MCP-1	Trauma, isquemia,HIV, EAE, EM, ET,meningitis, tumores	IL-1 $\beta$ /TNF $\alpha$ ,IL-1 $\beta$ ,TNF $\alpha$ ,TGF- $\beta$ /TNF $\alpha$ ,INF $\gamma$ /TNF $\alpha$ , CCL5,CXCL1, MIP-2C3a, $\beta$ A,ATP,HIV y otros virus
CCL3/MIP-1 $\alpha$	EAE,EM,isquemia,HIV	CCL5,C3a,C5a
CCL4/MIP-1 $\beta$	EA,EAE,trauma,HIV	MHV, S. aureus
CCL5/RANTES	Desarrollo del SNC,EAE,EM,meningitis	IL-1 $\beta$ ,IL-1 $\beta$ /INF $\gamma$ ,TNF $\alpha$ ,INF $\gamma$ /TNF $\alpha$ ,CXCL1,MIP-2, C3a,C5a, $\beta$ A,HIV y otros virus
CCL7/MCP-3	EM	MHV
CCL8/MCP-2	EM	—
CXCL19/MIP-3 $\beta$	EAE	IL-1 $\beta$ /TNF $\alpha$
CCL20/MIP-3 $\alpha$	EAE	IL-1 $\beta$ /TNF $\alpha$ ,IL-1 $\beta$ ,TNF $\alpha$
CX3CL1/Fractalkina	HAD,enfermedad de priones	IL-1 $\beta$ ,TNF $\alpha$ ,INF $\gamma$ /TNF $\alpha$ ,TNF $\alpha$

**TABLA 2: Quimioquinas expresadas en astrocitos bajo diferentes estímulos *in vivo* e *in vitro*.**

Tabla adaptada de Ambrosini and Aloisi (2004)

Dentro de la familia de quimioquinas tipo CC, la proteína 1 quimioatrayente de monocitos (MCP-1/CCL2) ha sido la más estudiada. Se expresa abundantemente en astrocitos, siendo estas células su principal fuente en el cerebro tras producirse daño neuronal o durante enfermedades infecciosas o autoinmunes del SNC (Ambrosini and Aloisi 2004).

Por último, se sabe que los astrocitos expresan un gran número de receptores, la mayoría acoplados a proteínas G, como los receptores de quimioquinas, los cuales responden a neurotransmisores, a neuromoduladores y a hormonas, mediante cambios en los niveles de Ca<sup>2+</sup> citosólico o de AMPc. Aun así, es difícil determinar todas las dianas específicas de los astrocitos, ya que la mayoría de estos receptores se expresan también en otras poblaciones celulares. Con todo ello los astrocitos podrían ser usados como dianas farmacológicas efectivas contra diversas enfermedades del SNC (Kimmelberg and Nedergaard, 2010). De hecho cada vez son más los estudios que apuntan en esta dirección, ya que estas células pueden actuar tanto de forma autocrina como paracrina, regulando los procesos de inflamación y la respuesta glial a lesiones del SNC.

### 2.2.2. MICROGLÍA

Las células de microglía son los macrófagos del SNC y, al igual que las demás células del sistema inmune innato, producen un alto número de mediadores inflamatorios y citotóxicos que generan una defensa adecuada ante cualquier patología, reparan tejido dañado y actúan como inmunorreguladores. Aunque la microglia tiene una función protectora, si su activación es inadecuada o demasiado persistente, puede contribuir al daño neuronal en enfermedades del SNC, como en EA, EM o encefalitis asociada al HIV-1 (Streit 2002).

Al igual que ocurre con otras moléculas proinflamatorias, como las citoquinas, la síntesis de las quimioquinas en la microglía se produce bajo un estricto control. Así moléculas antiinflamatorias generadas en el SNC en condiciones normales o patológicas, como neuropéptidos (VIP, péptido vasoactivo intestinal; PACAP, péptido activador de la adenil ciclasa) y citoquinas (interleuquina 4, IL-4; interleuquina 10, IL-10; o el factor de crecimiento transformante  $\beta$ ; TGF- $\beta$ ), regulan la expresión de las quimioquinas, disminuyéndola en la microglía activada (Ambrosini and Aloisi, 2004).

En condiciones patológicas la acumulación y activación de la microglía es estimulada en gran parte por quimioquinas, las cuales dirigen su reclutamiento hacia la zona lesionada, la activan y contribuyen así a la amplificación de la inflamación cerebral. La quimioquina MCP-1/CCL2 produce una señal más fuerte respecto a otras, para que los monocitos o macrófagos migren a la zona lesionada y la recubran. Además es capaz de dirigir la migración de éstos a través de la BHE, según modelos humanos *in vitro* (Weiss *et al.* 1998).

En la tabla 3 aparecen algunas de las diferentes quimioquinas y sus receptores, expresadas por las células microgliales, que se han encontrado asociadas a distintas enfermedades del SNC.

QUIMIOQUINAS	EXPRESIÓN <i>in vivo</i>	ESTÍMULOS <i>in vitro</i>
CXCL1/Gro- $\alpha$	Desarrollo del SNC, Isquemia, EM	LPS, IL-1 $\beta$ /TNF $\alpha$ , Trombina, pneumococcal cell wall
CXCL2/Gro- $\beta$	Isquemia	—
CXCL3/Gro- $\gamma$	Isquemia	—
MIP-2	—	LPS, TMEV, pneumococcal cell wall, S. aureus
CXCL8/IL-8	Isquemia	LPS, IL-1 $\beta$ /TNF $\alpha$ , cryptococcal, CMV $\beta$ A
CXCL9/MIG	ET	—
CXCL10/IP-10	—	LPS, INF $\gamma$ , INF $\gamma$ /CD40, INF- $\beta$ , ciertos virus
CXCL12/SDF-1 $\alpha$ , $\beta$	—	—
CCL1/I-309	EAE	LPS, INF $\gamma$ , INF- $\beta$ , S. aureus
CCL2/MCP-1	Isquemia, excitotoxicidad, EA, tumores	LPS, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , INF $\gamma$ , INF- $\beta$ , INF $\gamma$ /CD40, $\beta$ A, HIV, otros virus
CCL3/MIP-1 $\alpha$	Isquemia, encefalitis asociada al HIV-1, EM	LPS, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , INF $\gamma$ , INF- $\beta$ , INF $\gamma$ /CD40, $\beta$ A, HIV, otros virus
CCL4/MIP-1 $\beta$	Encefalitis asociada al HIV-1, EM	LPS, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , INF $\gamma$ , INF- $\beta$ , INF $\gamma$ /CD40, $\beta$ A, HIV, otros virus
CCL5/RANTES	Encefalitis asociada al HIV-1, meningitis, ET	LPS, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , INF $\gamma$ , INF- $\beta$ , $\beta$ A, HIV, otros virus
CXCL19/MIP-3 $\beta$	EAE	INF $\gamma$
CCL22/MDC	EAE	LPS, INF $\gamma$ /CD40
CX3CL1/Fractalkina	—	—

**TABLA 3: Quimioquinas expresadas en microglía bajo diferentes estímulos *in vivo* e *in vitro*.**  
 Tabla adaptada de Ambrosini and Aloisi (2004)

Como puede verse en la tabla 3, se ha encontrado que en diferentes enfermedades del SNC, la microglía activada libera una gran cantidad de quimioquinas tipo CC. Así, por ejemplo, se ha detectado *in vivo* la existencia de MCP-1/CCL2 en las placas de  $\beta$ A de la EA (Ishizuka *et al.* 1997), en isquemia cerebral o en daño excitotóxico (Calvo *et al.* 1996; Gourmala *et al.* 1997). Se ha observado lo mismo en tratamientos *in vitro* de microglía con agentes bacterianos o víricos, así como con  $\beta$ A y diferentes citoquinas inflamatorias (Ambrosini and Aloisi 2004).

Con respecto a los receptores de las quimioquinas, existen bastantes estudios que muestran su expresión y regulación en la microglía. De hecho existen estudios *in vitro* e *in vivo* que demuestran la expresión microglial de CCR1, CCR2, CCR3 y CCR5 en enfermedades autoinmunes o infecciosas del SNC, así como en la EA o en el daño neuronal producido tras la isquemia cerebral (Ambrosini and Aloisi, 2004). También se ha implicado a CCR2 en el reclutamiento y la activación de la microglía en modelos de dolor neuropático (Malan *et al.* 2002; Abbadie *et al.* 2003; Tanaka *et al.* 2004).

Por otro lado, confirmando el papel dual que juegan las quimioquinas en otros procesos celulares a parte de la inflamación, se ha visto por ejemplo que la Fractalkina (CX3CL1), en estudios *in vitro*, produce un aumento en la supervivencia microglial por inhibición de ligando Fas (Boehme *et al.* 2000) y reduce los niveles de TNF $\alpha$ , inducidos por LPS, disminuyendo también la neurotoxicidad. Se ha sugerido, por tanto, que CX3CL1/Fractalkina actúa de mensajero entre neuronas y microglía (Lauro *et al.* 2010), y que en determinadas circunstancias puede ser neuroprotectora (Zujovic *et al.* 2000). Otro ejemplo es el efecto neuroprotector que presenta la quimioquina CCL5/RANTES en la EA (Tripathy *et al.* 2010).

### 2.3. PROTEÍNA 1 QUIMIOATRAYENTE DE MONOCITOS (MCP-1/CCL2)

La proteína 1 quimioatrayente de monocitos (MCP-1/CCL2) es una quimioquina perteneciente a la familia tipo CC cuya principal función conocida es la de regular la migración de monocitos, linfocitos T de memoria y células *Natural killer* (NK), hacia la zona lesionada, participando por tanto en la inflamación.

MCP-1 pertenece a una familia compuesta por, al menos, cinco miembros (MCP-1/CCL2, MCP-2/CCL8, MCP-3/CCL7, MCP-4/CCL13 y MCP-5/CCL12) y todos ellos comparten una alta homología en su secuencia. Fue la primera quimioquina humana de este tipo descubierta, su gen se localiza en el cromosoma 17 y la proteína está formada por 76 aminoácidos, con un peso molecular de 13 KDa. Además, se han purificado diferentes isoformas de MCP-1, con variaciones en la masa molecular según el grado de O-glicosilación, lo cual puede interferir en su acción quimioatrayente (Deshmane *et al.* 2009).

## INTRODUCCIÓN

Esta quimioquina se produce, tanto de forma constitutiva como inducida, por diferentes poblaciones celulares, que incluyen células epiteliales, endoteliales, fibroblastos, células del músculo liso y células gliales (astrocitos y microglía). Siendo todas éstas importantes en la respuesta inmune innata. En el SNC MCP-1 se expresa de forma constitutiva por parte de neuronas y de células gliales (Berman *et al.* 1996; Glabinski and Ransohoff, 1999b; Banisadr *et al.* 2002; Banisadr *et al.* 2005), siendo los astrocitos su mayor fuente de producción (Mann *et al.* 1983; Ransohoff *et al.* 1996). Y se ha localizado en distintas áreas cerebrales, con niveles muy elevados en corteza, hipocampo, LC y cerebelo (Rostene *et al.* 2007).

## ESTRUCTURA

La estructura de MCP-1, al igual que todas las quimioquinas, consta de tres dominios, uno de láminas- $\beta$  antiparalelas, otro de hélices- $\alpha$  y un extremo N-terminal flexible. Concretamente tiene cuatro láminas- $\beta$ :  $\beta_0$  que comprende residuos del 9 al 11,  $\beta_1$ , del 27 al 31,  $\beta_2$  del 40 al 45 y  $\beta_3$  del 51 al 54; y una región con dos hélices- $\alpha$  que se extienden aproximadamente desde el residuo 58 hasta el 69. En la figura 8 se muestra una representación esquemática de la estructura.

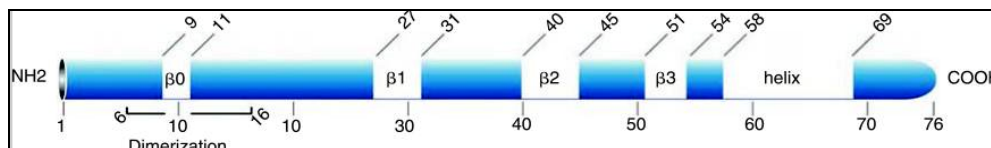
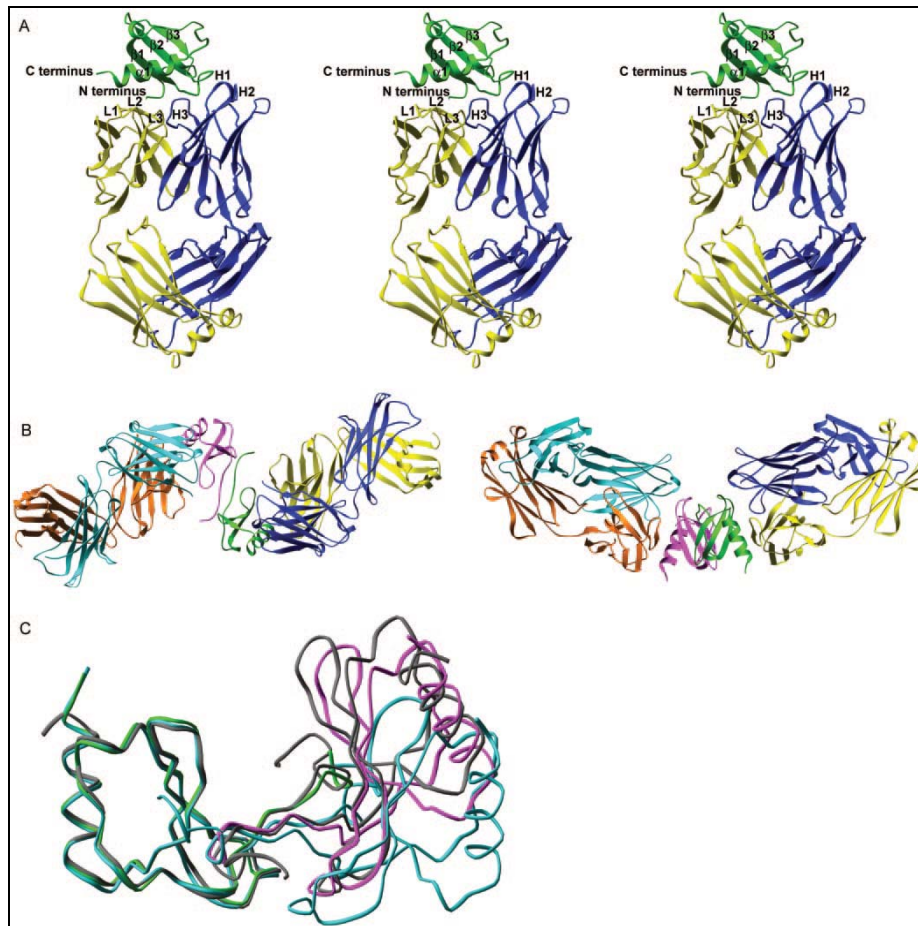


Figura 8: Estructura de CCL2/MCP-1. Adaptada de Deshmane *et al.* 2009

Experimentos de Resonancia Magnética Nuclear indican que MCP-1 forma una estructura cuaternaria de heterodímeros simétricos (Fig. 9), siendo los residuos del 6 al 16 los involucrados en la dimerización de la superficie de MCP-1 (Handel and Domaille, 1996; Zhang and Rollins, 1995). Esta estructura se parece a la de otras quimioquinas como RANTES o MIP-1 $\alpha$  (Meunier *et al.* 1997). El complejo proteico parece estar orientado de tal forma que los dos monómeros forman un gran bolsillo. Las estructuras monoméricas y diméricas, denominadas I y P respectivamente, fueron determinadas mediante rayos X por varios investigadores (Lubkowski *et al.* 1997; Reid *et al.* 2006).



**Figura 9:** Diagrama de Ribbon de la estructura dimérica tridimensional de hMCP-1 acomplejada con el anticuerpo específico 11K2. Adaptada de Reid *et al.* 2006. **A)** Estructura de un monómero de hMCP-1 (verde) unida a 11K2; **B)** Estructura del dímero de hMCP-1 (rosa; verde) unidos a dos moléculas de 11K2. Las dos figuras difieren por una rotación de 90°; **C)** Superposición de los dímeros de hMCP-1 (gris; magenta).

Además, existen diversos estudios que demuestran la importancia de la estructura de dímeros para la correcta unión de MCP-1 con su receptor, CCR2, la cual depende de los extremos N-terminal de cada monómero ( Zhang and Rollins 1995; Ni *et al.* 2001; Kitamoto and Egashira 2003). Recientemente se ha implicado al extremo C terminal (Ct) de la quimioquina en su inhibición, demostrando que es capaz de autoinhibirse. Por tanto además de la importancia del extremo Nt en la unión al receptor, característico de todas las quimioquinas, también es relevante para su función el extremo Ct, de hecho de él depende la activación de la vía de MAPK en células microgliales (Yao and Tsirka, 2011).

Por otro lado, se sabe que la expresión de MCP-1 requiere la translocación de factores de transcripción como el AP-1 (proteína activadora 1) y el NFkB (Factor Nuclear *kappa* B) los cuales pueden ser activados por citoquinas u otros agentes de diferente naturaleza (Rollins *et al.* 1989; Shyy *et al.* 1990; El *et al.* 2007).

### 2.3.1. EFECTOS DE MCP-1/CCL2 EN EL SNC

Los efectos de MCP-1 parecen estar mediados a través de su principal receptor, CCR2. Este receptor tiene dos isoformas, CCR2A y CCR2B, que varían en su extremo C, siendo dominante la segunda con un 90% de expresión (Charo *et al.* 1994; Van *et al.* 1999).

A diferencia de MCP-1, la expresión constitutiva de CCR2 está restringida a algunas áreas cerebrales, como el cerebelo o el LC. Aunque también se ha encontrado este receptor, tanto en neuronas como en astrocitos, en diferentes áreas como en corteza, *nucleus accumbens*, estriado, amígdala, tálamo, hipotálamo, *substantia nigra* y en los cuerpos mamilares (Banisadr *et al.* 2002; Banisadr *et al.* 2005). Además, las diferentes isoformas están restringidas dependiendo del tipo celular, así, CCR2A es la forma mayoritaria en células mononucleares y células vasculares del músculo liso, mientras que CCR2B lo es en monocitos y células NK activadas (Bartoli *et al.* 2001).

Es posible que cada isoforma del receptor active vías de señalización diferentes, ejerciendo por tanto distintas acciones. De acuerdo con esto, hay estudios que demuestran que mientras que MCP-1 genera quimiotaxis en células CCR2A<sup>+</sup> sin que se produzca flujo de Ca<sup>2+</sup>, en células CCR2B<sup>+</sup> sí se da una movilización de Ca<sup>2+</sup> (Sanders *et al.* 2000; Cho *et al.* 2007). Por otro lado se sabe que las dianas de señalización de CCR2 incluyen fosfatidilinositol-3-kinasa (PI3K), proteínas kinasa activadas por mitógenos (MAPK) y proteína kinasa C (PKC), lo que indica el amplio rango de actuación de este receptor (Deshmane *et al.* 2009; Yadav *et al.* 2010).

Se ha demostrado que este receptor está presente constitutivamente en células inmunes que incluyen a monocitos, células T activadas y células dendríticas, como astrocitos y microglía, y también en neuronas. De hecho, en neuronas dopaminérgicas y colinérgicas se ha encontrado que la expresión de CCR2 está co-localizada con la de neurotransmisores clásicos, lo cual junto con su expresión en condiciones normales en diferentes áreas cerebrales, podría indicar que está involucrado en la comunicación neuronal y posiblemente asociado a enfermedades relacionadas con neuronas dopaminérgicas o colinérgicas (Conductier *et al.* 2010). Esta teoría se ve apoyada también por el descubrimiento en ratas de la expresión constitutiva del su ligando MCP-1 en neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra*, produciendo un incremento en la excitabilidad celular con la consiguiente liberación del neurotransmisor dopamina (Guyon *et al.* 2009).

MCP-1 ha sido la quimioquina tipo CC más estudiada, y como se ha desvelado en múltiples estudios, juega un papel importante en la neuroinflamación asociada a diversas enfermedades del SNC caracterizadas por una degeneración neuronal (Gerard and Rollins 2001), siendo capaz

también de regular la barrera hematoencefálica (BHE) (Dimitrijevic *et al.* 2006). La expresión de esta quimioquina por células de microglía y astrocitos se ha visto incrementada en encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), en esclerosis múltiple (EM), en isquemia cerebral, en daño cerebral traumático y en EA, así como en otras enfermedades del sistema periférico, como la artritis, la diabetes por resistencia a insulina, tumores, enfermedades cardiovasculares y dolor neuropático. Además, se ha demostrado que es la responsable, por estimulación de  $TNF\alpha$ , de la infiltración de monocitos desde la periferia hasta el cerebro en casos de inflamación de órganos periféricos como el hígado. Por todo ello, su bloqueo ha sido sugerido como una diana en el tratamiento de varias de estas enfermedades (Deshmane *et al.* 2009).

Por otra parte, se ha demostrado que progenitores neuronales expresan un gran número de receptores de quimioquinas, como CCR2, lo cual podría indicar que MCP-1, como otras quimioquinas, actuaría localmente como quimioatrayente para estas células durante la ontogenia de varias estructuras cerebrales (Tran *et al.* 2004). De acuerdo con esto, también se ha encontrado que MCP-1 es capaz de atraer progenitores neuronales a las zonas lesionadas (Widera *et al.* 2004; Belmadani *et al.* 2006). Además MCP-1 activa proteínas antiapoptóticas como Akt y ERK en neuronas y en astrocitos favoreciendo la supervivencia celular (Gosselin *et al.* 2005; Quinones *et al.* 2008; Yao *et al.* 2009).

En cuanto a la regulación de MCP-1, se ha descubierto recientemente que la quimioquina CXCL16, a la que se le han atribuido propiedades protectoras, es capaz de modular su actividad para proteger neuronas frente a la excitotoxicidad celular mediante la vía del receptor de adenosina 3 ( $A_3R$ ) (Rosito *et al.* 2012).

La importancia de esta quimioquina en el SNC también queda reflejada por su implicación en la regulación de la sinapsis neuronal, ya que se ha demostrado que MCP-1 intensifica la excitabilidad neuronal y la transmisión sináptica en neuronas CA1 hipocámpales (Abbadie *et al.* 2003; Zhou *et al.* 2011). Del mismo modo, la función de neuromodulador sináptico se ha visto en estudios de nocicepción en neuronas de la médula espinal, donde MCP-1, expresada de forma constitutiva, vía CCR2, es capaz de bloquear la señal inhibitoria proporcionada por el receptor  $GABA_A$ , influyendo en la actividad neuronal eléctrica, y generando hiperalgesia (Abbadie *et al.* 2003; Malan *et al.* 2002; Tanaka *et al.* 2004). De acuerdo con esta función, se ha visto que muchas quimioquinas, incluyendo la MCP-1, son capaces de generar corrientes de  $Ca^{2+}$  en neuronas del ganglio dorsal, así como de modular los receptores opioides de éstas (Abbadie *et al.* 2003 ; Gosselin *et al.* 2005).

## INTRODUCCIÓN

---

MCP-1, además de como neuromodulador, puede actuar como regulador endocrino. Diversos estudios revelan que esta quimioquina se co-localiza en neuronas con la hormona melatonina (MCH), influyendo en su expresión y modulando la ingesta de alimento en tiempos cortos. Esto podría estar relacionado con su efecto en la diabetes, ya que se ha demostrado que existe una relación entre MCP-1 y la inflamación que se produce en esta enfermedad. También se ha encontrado esta quimioquina en neuronas magnocelulares secretoras de arginina-vasopresina (AVP) en diferentes áreas endocrinas cerebrales, lo que sugiere de igual forma su participación en la regulación de funciones endocrinas (Conductier *et al.* 2010).

Por tanto, como se ha expuesto hasta ahora, además de las propiedades características como quimioatrayente, a MCP-1 se le han asignado otras funciones que podrían involucrarla en procesos importantes en el SNC, llegando a ser en algunos casos neuroprotectora. Así, se ha demostrado que MCP-1 es capaz de proteger neuronas frente a diferentes estímulos perjudiciales, como son la excitotoxicidad producida por el receptor NMDA o la apoptosis mediada por la proteína tat del HIV (*human immunodeficiency virus*) (Bruno *et al.* 2000; Eugenin *et al.* 2003). En el caso de la EA, se ha confirmado la importancia de la vía MCP-1/CCR2, la cual es crucial para el reclutamiento de la microglía hacia las placas amiloides, pudiendo así degradarlas. De hecho, una deficiencia en el receptor CCR2 acelera la progresión de la EA, agravando los daños cognitivos característicos, según se ha observado en modelos animales (El *et al.* 2007; Naert and Rivest 2011). Esto se encuentra apoyado por otros estudios donde se demuestra que una deficiencia en la expresión del receptor CCR2 impide la acumulación microglial, agravando los daños cognitivos y acelerando la progresión de la enfermedad (El *et al.* 2007; Naert and Rivest 2011). Como se ha comentado anteriormente, MCP-1 estimula la migración de los astrocitos y otros tipos celulares hacia las placas seniles. Estas células pueden reducir el daño neuronal, participando en la degradación de las placas (Guenette 2003).

Otro papel que se le ha adjudicado a la quimioquina MCP-1, es el de protector neurovascular en casos de isquemia cerebral por hipoxia, ya que se ha demostrado que su expresión temprana en neuronas es necesaria para que se produzca una tolerancia al daño producido por este tipo de lesión, participando en el preconditionamiento de la misma (Stowe *et al.* 2012). Apoyando esta teoría, se ha demostrado también que el Factor 1 inducible por hipoxia (HIF-1), el cual inicia la neuroprotección tras producirse este daño, genera un incremento en la expresión de las quimioquinas MCP-1 y MCP-5/RANTES en astrocitos (Mojsilovic-Petrovic *et al.* 2007). Respecto a HIF-1, se sabe que reduce la activación de los astrocitos ante el péptido  $\beta$ A característico de la EA. Así, este factor tiene un papel importante en el mantenimiento de la

integridad metabólica de un cerebro enfermo, ya que es capaz de inhibir la activación glial y revertir los cambios glicolíticos en modelos animales de EA. Lo cual sugiere un posible efecto neuroprotector que podría estar mediado, entre otros agentes, por la quimioquina MCP-1 (Schubert *et al.* 2009).

De hecho, recientemente se le ha adjudicado a MCP-1 una función como inmunomodulador de citoquinas en condiciones de neuroinflamación aguda. Así es capaz de inhibir la liberación de ciertos agentes inflamatorios (IL-6, TNF $\alpha$ , CXCL1/KC, CCL5/RANTES, CCL3/MIP-1 $\alpha$ ) tras la estimulación con LPS o IL-1 $\beta$ . También se ha visto que MCP-1 por sí sola no induce la expresión de citoquinas y quimioquinas, y además, en presencia de un estímulo inflamatorio como IL-1 $\beta$ , actúa disminuyendo la expresión de IL-6 en astrocitos (Semple *et al.* 2010a). Junto a esto, estudios estructurales han demostrado que variantes monoméricas de la quimioquina MCP-1 son incapaces de inducir el reclutamiento celular *in vivo*, y además presentan propiedades antiinflamatorias, lo que podría llevar a la utilización de estas quimioquinas con una oligomerización deficiente como nuevas terapias en enfermedades del SNC (Handel and Domaille 1996).

También se le han atribuido acciones neuroprotectoras a MCP-1 frente al daño cognitivo causado por el alcohol en neuronas hipocampales (Bray *et al.* 2013), o frente a la toxicidad del metilmercurio (Godefroy *et al.* 2012). Además, se ha descubierto recientemente que MCP-1 es capaz de promover la regeneración arterial en caso de aneurisma cerebral, mediante la inducción de las quimioquinas inflamatorias MIP-1 $\alpha$  y MIP-2 (Hoh *et al.* 2011).

En el SNP, al igual que en el SNC, se ha descubierto que MCP-1 tiene efectos beneficiosos, por ejemplo, es capaz de proteger frente a la isquemia miocárdica mediante la activación de la vía SAPK/JNK (Martire *et al.* 2003), participando en la respuesta epigenética (Stowe *et al.* 2012), también, presenta efectos protectores frente al glaucoma (Chiu *et al.* 2010), y se ha visto que protege frente al cáncer de próstata, activando la vía de Akt (Roca *et al.* 2008).

Así, aunque existen diferentes estudios que demuestran que la supresión de MCP-1 puede ser beneficiosa en algunas enfermedades disminuyendo la inflamación, también se ha visto que la eliminación total de la quimioquina es perjudicial y afecta a la supervivencia neuronal, de hecho se ha confirmado que esta quimioquina es capaz de generar protección frente a endotoxemia (Zisma *et al.* 1997; Braun *et al.* 2000), lo cual podría estar justificado por las demás funciones que se le atribuyen a parte de su participación en la inflamación.

## INTRODUCCIÓN

Con todo lo expuesto hasta ahora, se puede decir que la vía MCP-1/CCR2, por tanto, presentaría un papel dual, pudiendo actuar en acciones tanto neuroinflamatorias como neuroprotectoras (Semple *et al.* 2010b). En la figura 10 se esquematizan estas posibles funciones.

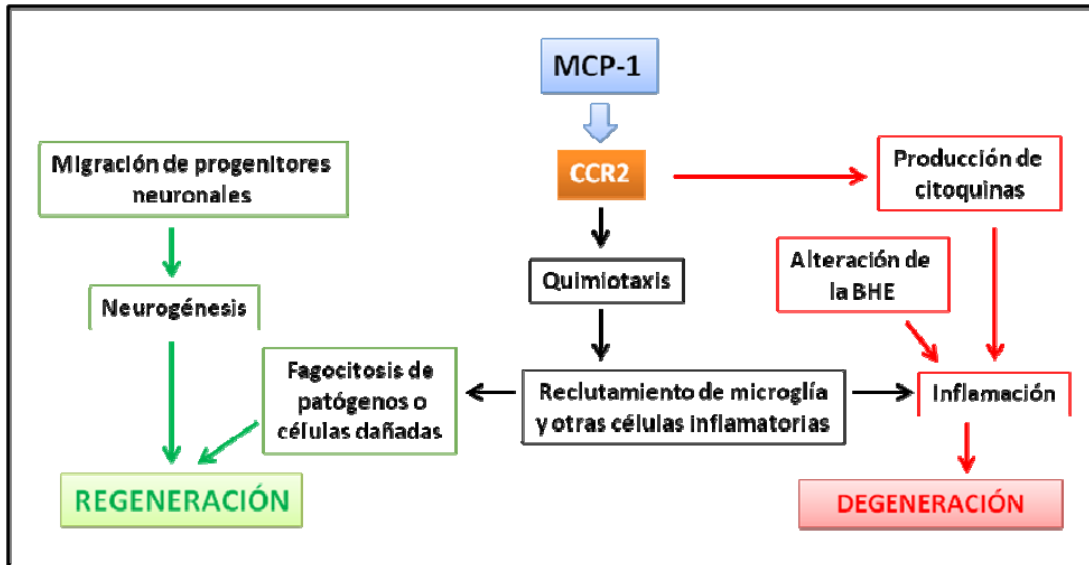


Figura 10: Implicación de MCP-1/CCR2 en diferentes funciones celulares del SNC.

Esquema adaptado de Semple *et al.*, 2010b.

IV. ANTECEDENTES INMEDIATOS,  
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



## IV. ANTECEDENTES INMEDIATOS, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 1. ANTECEDENTES INMEDIATOS

La reducción de los niveles cerebrales de NA es un fenómeno asociado a la progresión de distintas enfermedades neurodegenerativas (Marien *et al.* 2004). Esto parece estar relacionado con los efectos neuroprotectores descritos para la NA. También sabemos que la NA protege frente a la muerte neuronal causada por la activación microglial (Madrigal *et al.* 2005; Madrigal *et al.* 2006), por péptido  $\beta$ A (Madrigal *et al.* 2007), por excitotoxicidad, estrés metabólico (Madrigal *et al.* 2009) o estrés oxidativo (Troadece *et al.* 2002; Traver *et al.* 2005), entre otro tipo de lesiones. Además, se había descrito por el grupo de investigación en el que se ha realizado este estudio que la NA induce en astrocitos la síntesis de la proteína 1 quimioatrayente de monocitos (MCP-1/CCL2) y esto reduce la muerte neuronal causada por excitotoxicidad (Madrigal *et al.* 2009).

MCP-1 es una quimioquina que se conoció inicialmente por sus propiedades quimioatrayentes de leucocitos y otros tipos celulares al lugar de la lesión, y por su participación en la respuesta inflamatoria, aunque hoy en día se le han atribuido otras muchas funciones. De hecho en la última década se ha demostrado que MCP-1 presenta un efecto neuroprotector frente a diferentes lesiones (Madrigal *et al.* 2009; Godefroy D *et al.* 2011; Bray *et al.* 2012; Rosito *et al.* 2012). Además, MCP-1 participa en la regulación de la BHE (Stamotovic *et al.* 2006) y es capaz de atraer progenitores neuronales a zonas lesionadas (Widora *et al.* 2004; Belmadani *et al.* 2006). Todo esto unido a que tanto MCP-1 como su principal receptor CCR2 se expresan de forma constitutiva en diferentes áreas cerebrales (Banisadr *et al.* 2005), indicaría que esta quimioquina participa en numerosos procesos necesarios para el correcto funcionamiento del SNC, lo cual estaría apoyado por estudios que demuestran que, aunque una disminución en su concentración disminuye el daño producido por diversos agentes inflamatorios, una supresión total de MCP-1 tiene consecuencias nocivas para las neuronas (Zisma *et al.* 1997; Braun *et al.* 2000).

### 2. HIPÓTESIS

Basándonos en los antecedentes expuestos anteriormente proponemos la siguiente hipótesis: La inducción de MCP-1 en astrocitos es uno de los mecanismos a través de los cuales la NA ejerce sus efectos neuroprotectores.

### 3. OBJETIVOS

1. Analizar la regulación astrogliar de MCP-1 por NA *in vivo* en corteza cerebral de rata.
2. Determinar el efecto de la activación de receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos sobre la expresión de MCP-1 en astrocitos.
3. Estudiar posibles mecanismos de neuroprotección regulados por MCP-1.
4. Analizar la posible activación microglial por MCP-1 y su potencial neurotóxico.
5. Estudiar la regulación por NA de diferentes quimioquinas estructural y funcionalmente relacionadas con MCP-1

## V.MATERIAL Y MÉTODOS



## V. MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. ANIMALES

Todos los protocolos experimentales se realizaron según la normativa estipulada por el Comité de Experimentación Animal de la Universidad Complutense conforme a la regulación Europea y Española (2003/65/EC).

Al final de este capítulo se adjunta una copia del diploma de la “Acreditación para la utilización de animales en experimentación: categoría B” de la autora de la Tesis.

#### 1.1 Ratas Wistar

Se han utilizado ratas Wistar (Harlan Ibérica) adultas, de entre 3 y 4 meses de edad y con pesos comprendidos entre 225 y 250 g. Para obtener cultivos de neuronas se utilizaron embriones de entre 16 y 18 días de gestación. Para obtener cultivos de glía se utilizaron neonatos de entre 1 y 2 días de edad. Y para los tratamientos *in vivo* fueron usadas ratas adultas macho.

#### 1.2. Tratamientos farmacológicos

1. Clorhidrato de Desipramina. Sigma<sup>®</sup> (St Louis, MN, USA)
2. Corticosterona (C-2505). Sigma<sup>®</sup>
3. Metirapona (2-metil-1,2-di-3-pyridil-1-propanona). Sigma<sup>®</sup>
4. Propranolol. Sigma<sup>®</sup>
5. Noradrenalina. Sigma<sup>®</sup>

### 1.3. Modelo experimental de estrés

Las ratas fueron acomodadas en jaulas individuales bajo condiciones estándar de temperatura y humedad con un ciclo de 12 horas de luz/oscuridad (encendido de luces a las 8:00 am) y con acceso libre a agua y comida. Todos los animales se mantuvieron en condiciones constantes durante los cuatro días previos al inicio del estrés. La inmovilización comenzó a las 9:00 am en la habitación donde estaban alojadas. Para esto se empleó un inmovilizador de plástico para roedores tipo Decapicone<sup>®</sup> (Braintree, MA, USA) con forma de cono truncado que se ajusta al cuerpo de la rata impidiendo el movimiento de sus extremidades y de su cabeza, sin alterar los movimientos respiratorios (Magariños *et al.* 1997; Leza *et al.* 1998). Una vez inmovilizadas, las ratas permanecieron en sus jaulas.

Los animales control, no estresados, fueron alojados en una habitación distinta. Estos animales fueron manipulados a las 9:00 am por el mismo experimentador (sacando al animal de la jaula y volviendo a introducirlo en ella).

#### Justificación del modelo:

Existen varios modelos aceptados de estrés en animales de experimentación. Pueden diferir en factores tales como que el animal pueda huir o no de él (escapable o inescapable), que el animal tenga o no alguna forma de saber cuando se va a producir y de qué tipo va a ser (predecible o impredecible) o que la forma de provocar estrés en el animal sea por medios físicos o psicológicos. El método utilizado en este modelo se puede clasificar como inescapable, predecible y mixto físico-psicológico.

De entre todos los métodos de inducción al estrés, los que suponen un estrés físico inescapable son los más frecuentemente utilizados: exposición a temperaturas extremas, ayuno, natación forzada, ejercicio en rota-rod, choques eléctricos e inmovilización. Siguiendo las recomendaciones del *National Center for the study of Post-Traumatic Stress Disorder* (USA), los estímulos estresantes de tipo inescapable son los más útiles en el estudio del síndrome de estrés post-traumático (PTSD), de la depresión y de procesos neurodegenerativos relacionados en humanos (Tenlner and Singhal, 1984; Brenner *et al.* 1999).

### 1.4. Obtención de muestras de tejido fresco

**Tejido cerebral para análisis proteico y de RNA:** Se sacrificaron los animales mediante dislocación cervical. Se extrajo el cerebro y se diseccionó, tomando la corteza cerebral. De ésta, se seleccionó el hemisferio derecho para análisis de RNA, congelándose a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , en 200  $\mu\text{L}$  de Trizol® (Invitrogen®). El hemisferio izquierdo se dividió en tres partes iguales y se congelaron a la misma temperatura, para su posterior análisis proteico.

**Plasma:** La sangre se extrajo mediante la apertura torácica seguida de punción cardiaca, tras el sacrificio de los animales. La sangre recogida se mezcló inmediatamente con una disolución anticoagulante de citrato sódico (3,15% p/v) en una proporción 9:1. Para obtener la fracción plasmática de la sangre se centrifugó ésta a 1500 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente, y se recogió el plasma sobrenadante, el cual se guardó a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

## 2. CULTIVOS CELULARES

### 2.1. Reactivos

Suero fetal bovino (FCS)(< 10 EU de endotoxina por mL), medio basal Eagle, medio neurobasal (NBM), DMEM, DMEM-F12 y B27 sin suplementos antioxidantes, todos ellos de la casa comercial Life Technologies® (Carlsbad, CA, USA). Como antibiótico se utilizó una mezcla de penicilina 100 UI/mL y estreptomina 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Sigma® (St. Louis, MO, USA) (solución stock 100X). Glutamina de Sigma® (St. Louis, MO, USA) (solución stock 100X).

### 2.2. Cultivo de células gliales

Para obtener cultivos de microglia de rata se utilizaron cortezas cerebrales de ratas Wistar (Harlan Ibérica), de 1 ó 2 días de edad. Estas fueron homogeneizadas mecánicamente, haciéndolas pasar por agujas de 21G, en DMEM al 10% en FCS y con los antibióticos penicilina (100 IU/mL, Sigma®) y estreptomina (100 mg/mL, Sigma®), para preparar cultivos primarios mixtos de células gliales, sembrados en frascos T-75. Se incubaron a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , en atmósfera humidificada que contenía un 5% de  $\text{CO}_2$ . Tras 11-13 días, las células microgliales se separaron de

## MATERIAL Y METODOS

---

la monocapa de astrocitos mediante agitación. Se contaron las células vivas mediante la tinción con Trypan Blue y posteriormente se sembraron a una concentración de  $4 \cdot 10^5$  cel/mL en insertos Transwell® de 6,5 mm (100  $\mu$ L/pocillo), en placas de 96 pocillos, (100  $\mu$ L/pocillo) o en placas de 24 pocillos (500  $\mu$ L/pocillo). En estas condiciones, los cultivos microgliales fueron de entre el 95 y 98% positivos a marcaje con Mac-1, como marcador de microglía. Todos los experimentos fueron llevados a cabo en DMEM-F12 al 10% en FCS.

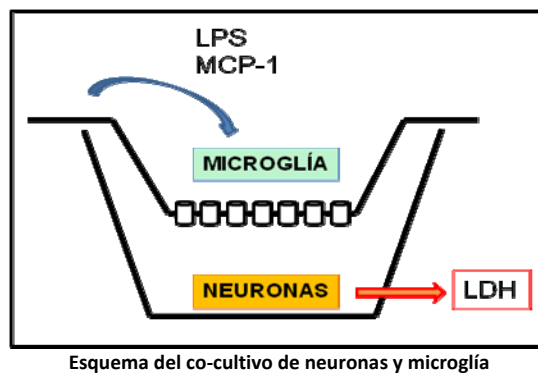
Para la preparación de cultivos de astrocitos, una vez separados de las células de microglía por agitación, tras 11-13 días de incubación de los cultivos mixtos, se llevó a cabo una tripsinización suave con Tryple®, para despegar las células del fondo mediante raspado. Los astrocitos se resuspendieron posteriormente en DMEM al 10% en suero fetal bovino (FCS) y con los antibióticos penicilina (100 IU/mL, Sigma®) y estreptomina (100 mg/mL, Sigma®), y se sembraron a una concentración de  $1 \cdot 10^6$  cel/mL, en diferentes placas, de 96 pocillos (100  $\mu$ L/pocillo) o de 12 pocillos (1 mL/pocillo). La pureza del cultivo de astrocitos, determinada mediante la tinción con GFAP, fue del 98%, con menos del 5% de células microgliales, determinadas mediante el marcador específico Mac-1.

### 2.3. Cultivo de neuronas

Se utilizaron cortezas cerebrales de embriones de 16 días de ratas Wistar. El tejido se disoció mecánicamente en medio basal Eagle, el cual contenía 33 mmol/L de glucosa, 2mmol/L de glutamina, 16 mg/L de gentamicina, 10% de suero de caballo y 10% de suero FCS, y se sembraron a la concentración de  $1 \cdot 10^6$  cells/ml en placas de 12, 24 o 96 pocillos recubiertos previamente con poli-L-Lysina. El medio se cambió tras 24 horas por medio neurobasal (NBM) suplementado con 0,5 mmol/L de glutamina y B27® (Life Science®) para reducir la contaminación glial. Tras 4 días se cambió la mitad del medio por NBM fresco. Para los procedimientos experimentales se emplearon cultivos de 9 días. Los cultivos resultantes presentaron ( $98 \pm 2$ )% células NeuN-positivas.

## 2.4. Co-cultivo de neuronas y microglía

Por un lado, se sembraron células de microglía en DMEM-F12 con 10% de FCS como se ha descrito anteriormente, sobre unos insertos porosos semipermeables, con un tamaño de poro de 0,4  $\mu\text{m}$  (3470 Corning®), por los cuales únicamente pueden pasar pequeñas moléculas, no células. Estos insertos se colocaron sobre los pocillos de placas que contenían cultivos neuronales, obtenidos como se ha explicado anteriormente. Con este sistema se permite la transferencia de material desde un lado a otro de la membrana, evitando el contacto entre los diferentes tipos celulares. Tras 24 horas, se cambió el medio de los insertos que contenían células de microglía por otros medios con diferentes tratamientos. Se incubaron durante 24 horas y a continuación se midió la liberación de LDH del cultivo de neuronas, como medida de viabilidad celular. En la figura que aparece más abajo se esquematiza el proceso.



## 2.5. Tratamientos

Los tratamientos realizados en los cultivos celulares se hicieron disolviendo en el medio de cultivo los siguientes productos:

1. Clorhidrato de Desipramina. Sigma® (St Louis, MN, USA)
2. Noradrenalina. Sigma®
3. Atomoxetina. Sigma®
4. Isoproterenol. Sigma®
5. Yohimbina. Sigma®
6. Corticosterona (C-2505). Sigma®
7. MCP-1 recombinante. Peprtech® (Rocky Hill, NJ, USA)

## MATERIAL Y METODOS

---

8. LPS de Escherichia coli 0111: B4. Sigma<sup>®</sup>
9. Wortmanina (W-1628). Sigma<sup>®</sup>
10. Estaurosporina (S-4400). Sigma<sup>®</sup>

En el caso de compuestos insolubles en agua, se realizó una primera disolución en DMSO, empleándose un volumen equivalente en el tratamiento de los grupos a comparar.

### 3. DETERMINACIONES ANALÍTICAS

#### 3.1. Ensayo de BrdU

Para cuantificar la proliferación celular, se realizó un inmunoensayo con bromodesoxiuridina (BrdU), un análogo de pirimidina que se incorpora en los sitios correspondientes a la timidina en la nueva cadena de DNA sintetizada al producirse proliferación celular. Tras la incubación, se desnaturalizan las cadenas de DNA formadas y se detecta el BrdU liberado. Este ensayo se llevó a cabo mediante el kit comercial Cell Proliferation (Calbiochem<sup>®</sup>, Darmstadt, Germany). Para ello, se adicionó una solución de BrdU a los cultivos celulares en combinación con los diferentes tratamientos y se incubaron durante 24 horas. A continuación se eliminó el medio de cultivo y las células fueron fijadas, permeabilizadas y desnaturalizadas según el protocolo. Posteriormente se les añadió el anticuerpo anti-BrdU seguido del anticuerpo IgG-peroxidasa conjugado. Se adicionó también una solución de tetrametilbenzina (TMB) y se mantuvo en oscuridad para favorecer la aparición de señal. La absorbancia a 450 nm se midió finalmente con un espectrofotómetro (Synergy 2, BioTek<sup>®</sup>).

#### 3.2. Ensayo de LDH

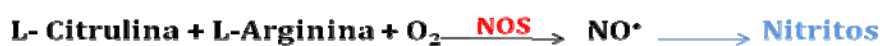
Se analizó la cantidad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) como medida de viabilidad celular, ya que este producto se libera al producirse muerte celular. La LDH cataliza la siguiente reacción:



Así, en este ensayo se analiza la cantidad de  $\text{NAD}^+$  generado la como medida de la actividad de LDH. La cuantificación se realizó mediante el kit comercial Cytotox-96 de Promega® (Madison, WI, USA) de acuerdo con las instrucciones del mismo. La Fluorescencia a 492 nm se midió con un fluorímetro (*Synergy 2*, BioTek®).

### 3.3. Ensayo de Griess

Se analizan los nitritos como medida de la actividad de la enzima oxido nítrico sintasa inducible (NOS-2/iNOS), ya que estos son los metabolitos estables que se forman a partir del óxido nítrico (NO), el cual es bastante inestable. Así, se ha demostrado que la medida de los niveles de nitritos es una técnica fiable para la determinación de la actividad de la enzima NOS-2 en el cerebro (Slater *et al.* 1996). La reacción que cataliza el enzima NOS es la siguiente:



Para realizar este ensayo en cultivos celulares, en primer lugar se centrifuga el medio de cultivo para eliminar las posibles células y se recoge el sobrenadante que contiene los nitritos y nitratos. En una placa de 96 pocillos se pone por duplicado la mezcla de 80  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo sin células y 40  $\mu\text{L}$  del reactivo de Griess (50 $\mu\text{L}$  de N-1-(Naftil) etil-enediamina (Neda) 0,1% y 50 $\mu\text{L}$  de sulfanilamida 1%). Por último se lee en espectrofotómetro a 540nm (*Synergy 2*, Bio Tek). Se determina la cantidad de nitritos respecto a la concentración de proteína total medida mediante el ensayo de Bradford, extrapolando los valores de concentración de nitritos a una curva patrón con concentraciones conocidas de nitrito de sodio.

### 3.4. Ensayo de actividad de caspasa 3/7

Se midió la actividad de caspasa 3 y 7 mediante un ensayo de luminiscencia utilizando el kit comercial Caspase-Glo® Assay de Promega (Madison, WI, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Así, tras atemperar los reactivos incluidos en el kit y las muestras, se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  del reactivo Caspase-Glo®. Se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora y se midió la

## MATERIAL Y METODOS

luminiscencia. Este ensayo está basado en una reacción que catalizan las caspasas, generando un producto que emite entre 499 y 521 nm. La reacción es la siguiente:

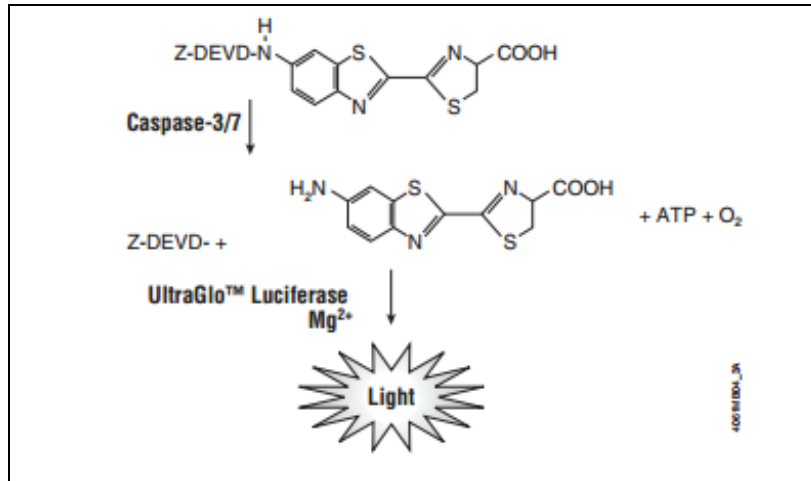
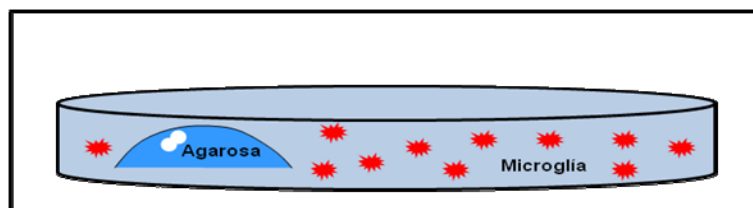


Figura tomada del protocolo de Caspase-Glo® Assay de Promega®

### 3.5. Ensayo de quimiotaxis

Para el ensayo de quimiotaxis se realizó una modificación de un ensayo llevado a cabo por otros autores (El *et al.* 2007; Wiggins and Rappoport, 2010) Se preparó agarosa de punto de fusión bajo (Invitrogen®) al 5% en PBS, donde se disolvió MCP-1 a 50 ng/mL. En un pocillo de una placa de cultivo se colocó una gota de la agarosa preparada, usando agarosa sin MCP-1 como control. Una vez solidificada se añadieron células de microglía y tras 24 horas se observó al microscopio con contraste de fases y se fotografió la interfase entre la agarosa y el medio de cultivo para determinar la movilidad de la microglía. Para ello se ha utilizado un microscopio de contraste de fases Nikon Eclipse Ti-S (Tokio, Japón) equipado con una cámara digital Digital Sight. En la siguiente figura se muestra un esquema del experimento.



Esquema del experimento de quimiotaxis

### **3.6. Inmunocitoquímica**

Para realizar el análisis inmunocitoquímico de cultivos primarios de astrocitos, en primer lugar se sembraron los cultivos a una concentración de 0,1 mill. células/mL y se trataron sobre cubreobjetos de cristal colocados en el fondo de los pocillos de placas de cultivo. Una vez terminado el tratamiento, las células se lavaron con PBS frío y se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron de nuevo con PBS y se bloquearon con suero al 5% en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se incubó con el anticuerpo primario diluido con suero al 1% y con Triton-X al 0,05% en PBS.

Para el Marcaje de MCP-1 se utilizó un anticuerpo anti-MCP-1 de Serotec® (AAR31), diluido (1/3000) y se incubó durante 18 horas a 4 °C. Para Fractalkina, el marcaje se realizó usando un anticuerpo anti-Fractalkina de Abcam® (Ab-25088) diluido (1/1000) e incubando durante 18 horas a 4 °C. Tras la incubación con los anticuerpos primarios, se lavaron las células con PBS tres veces durante 5 minutos y se fijaron de nuevo con paraformaldehído al 4% en PBS. Finalmente se incubaron durante una hora con el correspondiente anticuerpo secundario fluorescente. Para Fractalkina se usó el anticuerpo anti-goat Alexa Fluor 488 de Life Technologies® (A21432) diluido (1/1000) en PBS con un 1% de suero de caballo, para MCP-1 se usó un anticuerpo anti-rabbit unido a Cy-3 de Amersham® (43004) diluido (1/1000) en PBS con un 1% de suero de cabra. Tras esta incubación, se hizo un lavado con PBS y se dejaron secar los cubreobjetos. El montaje sobre el portaobjetos se realizó utilizando el medio de montaje con reactivo ProlongGold Antifade y DAPI (Diamidino-2-fenilindol) de Invitrogen®. La intensidad de señal se cuantificó con el software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MA, USA).

### **3.7. Análisis morfológico**

El estudio morfológico de las células de microglía se analizó mediante un microscopio con contraste de fases Nikon Eclipse Ti-S (Tokio, Japón) equipado con una cámara digital Digital Sight de Nikon.

### 3.8. Cuantificación de PGE<sub>2</sub>

Para la cuantificación de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) se utilizó el kit comercial PGE<sub>2</sub> EIA (enzima-inmunoensayo assay) monoclonal de Cayman Chemical Company<sup>®</sup>, el cual es un ensayo de competencia entre PGE<sub>2</sub> y PGE<sub>2</sub>-AChE por la unión a un anticuerpo monoclonal. Este ensayo presenta un IC<sub>50</sub> de aproximadamente 50 pg/mL, y un límite de detección de aproximadamente 15 pg/mL. La concentración de PGE<sub>2</sub> se determinó por espectrofotometría (*Synergy 2*, Bio Tek) a 405nm.

### 3.9. RT-PCR

Se realiza la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) sobre el cDNA a analizar. Esta técnica se lleva a cabo en tres fases, en un primer paso se extrae el mRNA, bien de tejido o bien de un cultivo celular. A continuación, mediante una transcripción reversa se obtiene el cDNA a partir del mRNA, y finalmente se realiza la PCR.

#### 3.9.1. Extracción de RNA

Para la extracción de mRNA de tejido fresco, en primer lugar, las muestras de corteza se homogenizaron con pipeta en 350µl de Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen<sup>®</sup>), en cada tubo se añadieron 100µl de cloroformo (Sigma<sup>®</sup>) y tras agitarse unos segundos se centrifugaron a 12000 rpm 15 minutos a 4°C. Se recogió la fase superior a la que se le añadió de nuevo Trizol<sup>®</sup> (200µL) y cloroformo (40µL), y se volvió a centrifugar para recuperar de nuevo la fase superior. A la fase acuosa esta vez se le añadieron 300µl de 2-propanol (Sigma<sup>®</sup>) y se agitó en vortex. La mezcla se dejó reposando a 4°C dos horas. A continuación se centrifugó a 12000 rpm, 10 minutos a 4°C de manera que se obtuvo un pellet de RNA. Se eliminó el sobrenadante y se lavó tres veces el pellet con 500µl de etanol al 80% (la dilución se hace con Agua+Diethyl-pirocarbonato (Agua-DEPC) de Invitrogen<sup>®</sup>. Por último, se dejó que se evaporase el exceso de etanol hasta que el precipitado quedó seco. Finalmente, se resuspendió en 50 µL de agua con DEPC y se guardó a -40°C. En todo momento se trabajó con guantes y material estéril.

Para la extracción de mRNA de células obtenidas en cultivo celular, el protocolo es análogo. En primer lugar se eliminó el medio de cultivo, se añadieron 200  $\mu$ L de Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen<sup>®</sup>), se rasparon las células para despegarlas, y se recogieron la mezcla en tubos de 1,5 mL. en cada tubo se añadieron 40 $\mu$ L de cloroformo (Sigma<sup>®</sup>), y tras agitarse unos segundos se centrifugaron a 12.000 rpm durante 15 minutos y 4°C. Se recogió la fase superior y se le añadieron 100  $\mu$ L de 2-propanol (Sigma<sup>®</sup>) y se agitó en vortex. La mezcla se dejó reposando a 4°C dos horas y a continuación se centrifugó de nuevo a 12000 rpm, 10 minutos a 4°C de manera que se obtuvo un precipitado de RNA. Se eliminó el sobrenadante y se lavó tres veces el precipitado con 200 $\mu$ L de etanol al 80% (la dilución se hace con Agua+Diethyl-pirocarbonato (Agua-DEPC), libre de DNAasas y RNAasas, de Invitrogen<sup>®</sup>). Por último, se dejó evaporar el exceso de etanol hasta que el precipitado quedó seco. Finalmente, se resuspendió en 50 $\mu$ L de agua con DEPC y se guardó a -40°C. En todo momento se trabajó con guantes y material estéril.

### 3.9.2. Retrotranscripción

Para la retrotranscripción, en primer lugar, se determinó la cantidad de mRNA y su pureza utilizando el espectrofotómetro NanoDrop<sup>®</sup> 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc). A continuación se realizó la dilución con agua-DEPC necesaria para tener 1 $\mu$ g de mRNA en un volumen final de 10 $\mu$ L. A esta dilución se le añadieron los siguientes reactivos: 5x RT buffer, Ditiotreitól (DTT) 100mM, Deoxinucleótidos trifostato (dNTP) 25mM, Random primers, inhibidor de RNAasa y agua-DEPC. Los reactivos son todos de Invitrogen<sup>®</sup>.

La mezcla se sometió a 1min a 95°, 8min a 70°, 1min a 42°C, utilizando un termociclador My Cycler<sup>TM</sup> (BIO-RAD). A continuación se volvió a añadir 5 $\mu$ L de la mezcla anteriormente descrita, esta vez con Transcriptasa reversa (Invitrogen<sup>®</sup>), y las muestras se mantuvieron una hora a 42°C, produciéndose la retrotranscripción de mRNA a cDNA. Finalmente se añadieron 80 $\mu$ L de agua-DEPC al cDNA obtenido, y este se guardó a -40°C.

### 3.9.3. PCR

Para medir la expresión de los distintos genes se realizó la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR, *real time* PCR), que es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizada para amplificar, y cuantificar simultáneamente, el producto de la amplificación. La cuantificación es posible por la presencia de un fluoróforo que se une inespecíficamente a la doble cadena de DNA, de manera que la emisión de fluorescencia aumenta a medida que se genera DNA. Dicha medición se realiza al final de cada ciclo de amplificación, y por esto se le denomina PCR en tiempo real. En nuestro caso, la técnica es semi-cuantitativa, y relativa a los niveles de mRNA de tubulina. El fluorocromo utilizado fue SYBR Green (Biotools®, España) que se excita mediante luz azul ( $\lambda_{\max} = 488 \text{ nm}$ ) emite luz verde ( $\lambda_{\max} = 522 \text{ nm}$ ). El termociclador posee sensores que le permiten medir la fluorescencia (Corbett®).

Se mezclaron 2  $\mu\text{l}$  de la dilución de DNA con Master mix (Biotools®, España), que contiene todos los componentes necesarios para llevar a cabo la amplificación (DNA polimerasa, dNTPs, los cuatro dNTPs,  $\text{MgCl}_2$ , buffer de reacción y Taq polimerasa) con SYBRGreen (Biotools®, España) diluido en agua-DEPC (1:1) y sus respectivos cebadores, según el gen estudiado.

Los ciclos a los que se sometieron las muestras en la PCR fueron: 2 min. a 95 °C, para romper los puentes de hidrógeno y separar las cadenas de DNA, seguidos de 35 ciclos de 10 seg. a 95 °C, para desnaturalizar, 15 seg. a 66 °C, para que se produzca el alineamiento, la hibridación de los primers específicos, y 45 seg. a 72 °C, para que se produzca la elongación mediante los oligonucleótidos Y finalmente se someten a un ciclo de 20 seg. a 72 °C, para fusionar las cadenas. La temperatura de fusión de los productos obtenidos está comprendida entre 50 y 90 °C.

En la siguiente tabla aparecen los *primers* usados:

Gen	CEBADOR DIRECTO 5'→3' (forward)	CEBADOR INVERSO 5'→3' (reverse)
MIP-1α	CAGAACATTTCCTGCCACCTGCAAA	AGGAATGTGCCCTGAGGTCTTTCA
IL1β	ACCTGCTAGTGTGTGATGTTCCCA	AGGTGGAGAGCTTTCAGCTCACAT
IL6	AACTCCATCTGCCCTTCAGGAACA	AAGGCAGTGGCTGTCAACAACATC
CX3CL1	TGGACCCATTTCTCCTTTGGGTCA	AATCCCAGTGACCTTGCTCATCCA
NOS-2	AGCACATTTGGCAATGGAGACTGC	AGCAAAGGCACAGAAGTGGGGTA
MCP-1	TGCTGTCTCAGCCAGATGCAGTTA	TAC AGC TTC TTT GGG ACA CCT GCT
Ciclina D1	TGCTGCAAATGGAAGTCTTCTGG	AAG GTC TGT GCA TGT TTG CGGATG
CDK4	ACGCCT GTG GAT ATGTGGAGTGT	AGT CGT CTT CTG GAG GCA ATCCAA
PCNA	AGCAAC TTGGAATCCCAGAACAGG	TAA GGT CCC GGC ATA TAC GTGCAA
IGF-1	CCGCTGAAGCCTACAAAGTC	GGA AAT GCC CAT CTC TGA AA
bFGF	GAA CCG GTA CCTCGA GTT TA	CCG TTT TGG ATCCGA GTT TA
CCL6	TGTTCCAGCAGGGCATCTTCTTCT	GCCTCATTTCATGGAGAGCCATT
CCL7	GGACCAATTCATCCACTTGCTGCT	TCTGATGGGCTTCAGCACAGACTT
CCL12	TGAGTCCTCCAGCTCTCATTCCAA	TGAACACTGAATCTGGTCCAGCCA
CXCL16	TGTCGCTGGAAGTTGCTACTGTGA	TCTTGGACTGCAACTGGAACCTGA
COX-2	GCATTCTTTGCCAGCACTTCACT	TTTAAGTCCACTCCATGGCCAGT
INF-γ	AAAGACAACCAGGCCATCAGCAAC	TCTGTGGGTTGTTACCTCGAACT
TNFα	CTGGCCAATGGCATGGATCTCAAA	ATGAAATGGCAAATCGGCTGACGG
mPGES	CAGGCTCAGGGTGAAGCAAATGTT	TTTAGCGGTTGGTCAAAGCCATC
CR1	AAGAAGGCTGGCCCAATAGT	GCTCCTTCTTCTGGGCTTTT
15-PGDH	TGAAAAGCGGTGTGTGAGACTG	TGATGGGTCCAAAATTCCAT
GAPDH	TGC ACC ACC AAC TGC TTA GC	GGC ATG GAC TGT GGT CAT GAG

### 3.10. Ensayo de Bradford

El contenido proteico se determinó siguiendo el método Bradford®, el cual se basa en la capacidad de las proteínas para unirse a determinados colorantes; el azul brillante g-250 coomassie se adhiere a la proteína, el colorante se torna de rojizo a azulado y el máximo de absorción cambia de 465 a 595nm. El valor de la absorbancia a 595nm es proporcional a la concentración de proteína en la muestra. La absorbancia se determina con un espectrofotómetro (*Synergy 2*, Bio Tek). El cálculo de la concentración proteica de las muestras se realiza mediante una curva patrón elaborada a partir de concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina (Sigma®) (6 puntos entre 0 y 1mg/ml), y sus correspondientes densidades ópticas.

En el caso de tejido fresco, en primer lugar se homogeneizaron los trozos de tejido, previamente congelados, por sonicación durante 15 segundos (Digital Sonifier, Branson®) en 350µl de cóctel de homogenización. Este estaba compuesto por PBS pH=7, al que se le añadió una mezcla de inhibidores de proteasas (Complete, Roche®). El homogeneizado se centrifugó a 12.000

## MATERIAL Y METODOS

---

rpm durante 20 minutos a 4°C, recuperando el sobrenadante, al cual se le cuantificó el contenido proteico.

En el caso de cultivos celulares, en primer lugar se vaciaron de medio de cultivo los pocillos, y se lavaron las células con PBS frío. Seguidamente se las trató con medio RIPA que contenía inhibidor de proteasas (150 µL/pocillo) y se rasparon las células en frío para despegarlas del fondo de la placa. Finalmente se sonicaron durante 5 segundos (Digital Sonifier, Branson®) y tras centrifugar a 12.000g durante 10 minutos a 4 °C, se recogió el sobrenadante, en el cual se determinó el contenido proteico y se congeló a -80 °C para su posterior uso (análisis de Bradford, Western Blot o ELISA).

### 3.11. ELISA

Se cuantificaron los niveles de algunas proteínas mediante ELISA (specific enzyme-linked immunosorbent assay), técnica basada en la unión específica antígeno-anticuerpo. Para ello se utilizaron kits comerciales, específicos para cada proteína, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En todos los ensayos se ha normalizado con la concentración de proteína total (determinada mediante el ensayo de Bradford).

Las muestras se trataron de forma diferente según proviniesen de cultivos celulares o de tejido fresco, como se explica en el apartado anterior, para la purificación de proteínas.

**CCL2/MCP-1:** Kit de la casa comercial R&D Systems® que presenta un límite de detección de 31,3-2000 pg/mL. La curva estándar se realizó en cada ensayo, con un rango de concentración de 0 a 4000 pg/mL, usando un estándar de CCL2/MCP-1 proporcionado por el Kit.

**IL-1β:** Kit de la casa comercial R&D Systems® que presenta un límite de detección de 5 pg/mL. La curva estándar se realizó en cada ensayo, con un rango de concentración de 0 a 1000 pg/mL, usando un estándar de IL-1β proporcionado por el Kit.

**IL-6:** Kit de BD Bioscience® que presenta un límite de detección de 5 pg/mL. La curva estándar se realizó en cada ensayo, con un rango de concentración de 78 a 5000 pg/mL, usando un estándar de IL-6 proporcionado por el Kit.

**CX3CL1/Fractalkine:** Kit de la casa comercial R&D Systems® con un rango de concentración de 100 a 100000 pg/mL, usando un estándar de CX3CL1/Fractalkine proporcionado por el Kit.

**Noradrenalina:** Kit de la casa comercial Labor Diagnostika Nord® (Nordhorn, Germany) que presenta un límite de detección de 0,01-45 ng/mL. La curva estándar se realizó en cada ensayo, con un rango de concentración de 0 a 1000 pg/mL, usando un estándar de noradrenalina proporcionado por el Kit.

**Actividad de Akt:** Se utilizó el Kit K-LISA™ Activity Akt (Calbiochem®), un ELISA que se basa en la utilización de un péptido biotinilado como sustrato, el cual es fosforilado por Akt. Así, este sustrato y las muestras que contienen Akt, son incubadas con ATP en una placa de 96 pocillos Streptavidin-Coated, la cual permite la fosforilación y la captura del sustrato en un solo paso. La detección del sustrato fosforilado se realiza mediante un anticuerpo de Fosfoserina (suministrado por el comerciante) seguido de un anticuerpo IgG-peroxidasa conjugado y se emplea también una solución de tetrametilbenzina (TMB) para desarrollar el color. La actividad se cuantificó mediante la lectura de absorbancia a 450/540 nm. El rango de detección del kit es de 1 a 200 ng (580 U/mg).

### 3.12. Determinación de corticosterona plasmática

Las muestras de plasma se almacenaron a -80 °C antes de ser analizadas empleando un Kit de determinación de corticosterona por RIA con corticosterona de rata marcada con <sup>125</sup>I (DPC, los Angeles, CA, USA). Para medir la radioactividad se empleó un contador *gamma* (Perkin Elmer).

### 3.13. Western blot

Los homogeneizados de las distintas muestras, después de ajustar su contenido proteico, se mezclaron con tampón de carga Laemmli® (BIO-RAD) y con β-mercaptoetanol al 5%, hasta doblar el volumen original. Se cargaron entre 10 y 20µg de muestra dependiendo de la proteína a determinar, en un gel de electroforesis de SDS-poliacrilamida en un porcentaje variable según el peso molecular de la proteína estudiada. La electroforesis se realizó a 100 voltios hasta la completa migración de las proteínas. Los geles fueron transferidos a una membrana de

## MATERIAL Y METODOS

---

nitrocelulosa (Millipore®) por transferencia semi-seca a 24mA (Bio-Rad Trans-blot. SD, semi-dry transfer cell), durante 25-50 minutos en función del peso molecular.

Las membranas fueron bloqueadas con leche desnatada o albúmina sérica bovina sólida, al 5% en TBS-Tween durante 90 minutos, a temperatura ambiente y fueron incubadas una noche a 4 °C con los respectivos anticuerpos primarios. Después de tres lavados de 10 minutos cada uno con TBS-Tween, se incubaron con los anticuerpos secundarios específicos.

Las bandas proteicas reconocidas por los anticuerpos se revelaron mediante un kit ECL® de quimioluminiscencia (Amersham) y fueron visualizadas en el detector Odyssey® Fc. (LI-COR). Las exposiciones se hicieron a varios tiempos para asegurar la linealidad de la intensidad de las bandas. Posteriormente se cuantificaron mediante densitometría, utilizando el software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MA, USA). Como control de carga se utilizó la proteína  $\beta$ -actina.

En la siguiente tabla se muestran las condiciones y los anticuerpos utilizados para el análisis de las proteínas estudiadas:

Proteína (KDa)	Anticuerpo 1º/Dilución	Anticuerpo 2º/Dilución
COX-2 (72)	S. Cruz Goat (1:1000) TBS-tween,2,5%leche	Anti-Goat Sigma/(1:10000)
P-Bad (23)	Cell signaling Rabbit/ (1:500) TBS-tween,5%BSA	Anti-rabbit S. Cruz/(1:2000)
P-Akt (60)	Cell signaling Rabbit/ (1:500) TBS-tween,5%BSA	Anti-rabbit S. Cruz/(1:2000)
Akt (60)	Cell signaling Rabbit/ (1:1000) TBS-tween,5%BSA	Anti-rabbit S. Cruz/(1:2000)
Ubiquitina (8,5)	Sigma Rabbit/ (1:30000)TBS-tween	Anti mouse Amersham/(1:3000)
$\beta$ -Actina (42)	Sigma Rabbit/ (1:5000) TBS-tween	Anti-Mouse Amersham/(1:3000)

**3.14. Inmunoprecipitación**

En primer lugar, los homogeneizados de las distintas muestras fueron incubados con agarosa G-plus (Invitrogen®) durante 2 horas a 4 °C. Se centrifugaron a 4000 rpm durante 5 minutos a 4 °C y se separó el sobrenadante. Este se incubó con anticuerpo anti-Akt (Calbiochem® ST1088) durante 18 horas a 4 °C en agitación. Posteriormente se incubaron las proteínas con agarosa G-Plus durante 4 horas a 4 °C, y finalmente se aislaron mediante centrifugación a 4000 rpm durante 5 minutos a 4 °C. El precipitado final obtenido se resuspendió en RIPA.

Las proteínas inmunoprecipitadas y sus proteínas ancladas (ubiquitinas) se determinaron mediante la técnica de Western blot (según explica en el apartado anterior), utilizando un anticuerpo anti-Ubiquitina (Ab-7780, Abcam®). Se obtiene una banda ancha, ya que se encuentran unidas diferentes unidades de ubiquitina, que se van incorporando de manera secuencial a la proteína Akt, lo que altera la masa del conjunto analizado.

**4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Cuando se presentaron más de dos grupos experimentales en el mismo experimento, se analizaron los datos con un Análisis de la Varianza o ANOVA de una vía con un  $p < 0.05$ , y en el caso de haber diferencias entre los grupos, se realizó un post test de comparación múltiple de Newman-Keuls, considerando significativo un valor  $p < 0.05$ .

Cuando se presentaron únicamente dos grupos experimentales en el mismo experimento los datos se analizaron mediante el test de la t de Student de dos colas, considerando significativo un valor  $p < 0.05$ .





LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

expide a

**D<sup>a</sup>. ARA ESCUDERO HINOJOSA**

el presente

**CERTIFICADO DE FORMACIÓN CONTINUA**

por haber superado satisfactoriamente el curso:

**“ACREDITACIÓN PARA LA UTILIZACIÓN DE ANIMALES  
EN EXPERIMENTACIÓN: CATEGORÍA B”**

referenciado como Curso Certificado de Formación Continua, celebrado en  
Madrid, del 4 al 8 de octubre de 2010

**Manuel Rodríguez Sánchez**  
**Vicerrector de Doctorado y**  
**Titulaciones Propias**

TÍTULO DEL CURSO: ACREDITACIÓN PARA LA UTILIZACIÓN DE ANIMALES EN EXPERIMENTACIÓN: CATEGORÍA B

Código: 0289

PROGRAMA:

- 1.- Ética en experimentación animal
- 2.- Legislación: Reglamentaciones vigentes Nacionales e Internacionales
- 3.- El entorno animal y sus condiciones: habitáculos, jaulas, cubetas, lechos.
- 4.- Apreciación de los elementos que se deben tener en cuenta desde la concepción de un procedimiento, incluyendo el refinamiento, la reducción y el reemplazo
- 5.- Cuarentenas y enriquecimiento ambiental
- 6.- Práctica: Entorno animal y sus condiciones: habitáculos, jaulas, cubetas, lechos
- 7.- Métodos alternativos a la Experimentación Animal
- 8.- El ratón: Biología, Fisiología y Reproducción
- 9.- Práctica el ratón: manejo, extracción de muestras, vías de inoculación y eutanasia
- 10.- Práctica el ratón y rata: Disección
- 11.- Diseño experimental con animales
- 12.- Factores Biológicos: repercusión en los resultados experimentales.
- 13.- La rata: Biología, Fisiología y Reproducción
- 14.- Práctica la rata 1: manejo, extracción de muestras, vías de inoculación y eutanasia
- 15.- Anestesia y eutanasia
- 16.- Práctica: Anestesia en roedores
- 17.- Práctica: anestesia en lagomorfos
- 18.- Enfermedades bacterianas y víricas en roedores y lagomorfos
- 19.- El conejo: Biología, Fisiología y Reproducción
- 20.- Enfermedades parasitarias en roedores y lagomorfos
- 21.- Práctica el conejo 1: manejo, extracción de muestras, vías de inoculación y eutanasia
- 22.- Práctica: Enfermedades bacterianas y víricas en roedores y lagomorfos
- 23.- Reconocimiento del dolor, el sufrimiento y la angustia
- 24.- Animales: Gnotobióticos y Agnotobióticos
- 25.- Práctica: Enfermedades parasitarias en roedores y lagomorfos

Número de horas: 40

Créditos de Formación Continua: 4



Dirección General del Medio Ambiente  
CONSEJERÍA DE MEDIO AMBIENTE  
Y ORDENACIÓN DEL TERRITORIO

**Comunidad de Madrid**



REGISTRO DE SALIDA  
Ref:10/098242.9/13 Fecha:13/05/2013 10:36



Cons. Medio Ambiente y Orden. territorio  
Registro Aux.D.G.Medio Ambiente  
Destino: Universidad Complutense de Madrid. Dpto

Universidad Complutense de Madrid

En relación a su solicitud con registro de entrada 10/218361.9/12, de 13 de junio de 2012, para la acreditación de un curso de capacitación en experimentación animal, elaborado por el Departamento de Fisiología (Fisiología Animal) de la Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid y dirigido a formación de personal para la categoría B, que se impartió entre los días 4 al 8 de octubre de 2010 en el Departamento de Fisiología (Fisiología Animal) de la Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, le informo que una vez revisado el contenido del mismo se observa que:

El contenido del curso CUMPLE con los requisitos establecidos en el R.D. 1201/2005, sobre protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, para la formación de personal de categoría B.

Madrid, 06 de mayo de 2013  
LA JEFA DE ÁREA DE PROTECCIÓN ANIMAL



Edo.: Mercedes Perote Mendizábal



## VI.RESULTADOS



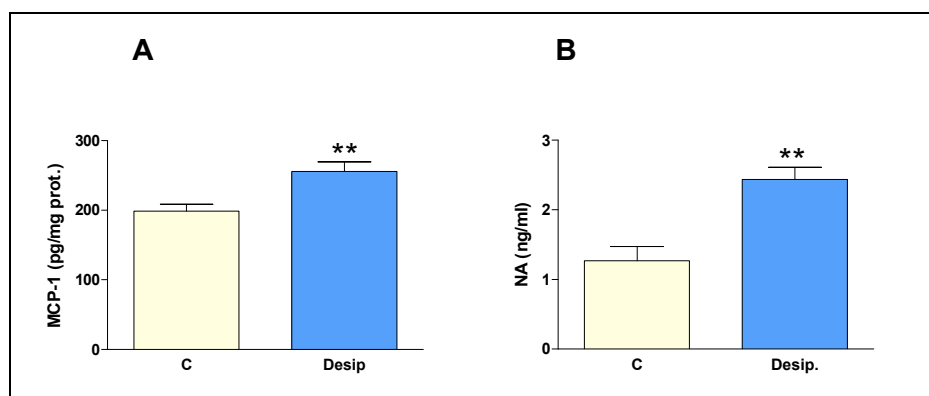
## VI. RESULTADOS

### 1. MODULACIÓN DE MCP-1 POR NORADRENALINA EN ASTROCITOS

Tras haber sido descrito anteriormente que la NA induce la expresión de la quimioquina MCP-1 en cultivos de astrocitos (Madrigal *et al.* 2009), se decidió analizar si este efecto se producía también *in vivo*.

#### 1.1. El tratamiento agudo con desipramina induce MCP-1 en el cerebro *in vivo*

En primer lugar se estudió si un aumento del nivel cerebral de NA induce la producción de MCP-1 en el cerebro. Para ello se trataron ratas Wistar con desipramina, un antagonista de receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos que inhibe la recaptación de NA (Glavin 1985; Zhang *et al.* 2009). Así, se inyectaron intraperitonealmente 10 mg/Kg a cada rata, cantidad a la cual se ha demostrado que se produce un aumento de NA (Berton and Nestler, 2006; Zhang *et al.* 2009). Tras 5 horas se sacrificaron y se les extrajo corteza cerebral y plasma. Mediante la técnica de ELISA se cuantificaron los niveles de MCP-1 en corteza cerebral y se observó un aumento significativo en ratas tratadas con desipramina (Fig. 1A). Además se midieron los niveles de NA en plasma para confirmar que el tratamiento con el antidepresivo había funcionado (Fig. 1B).



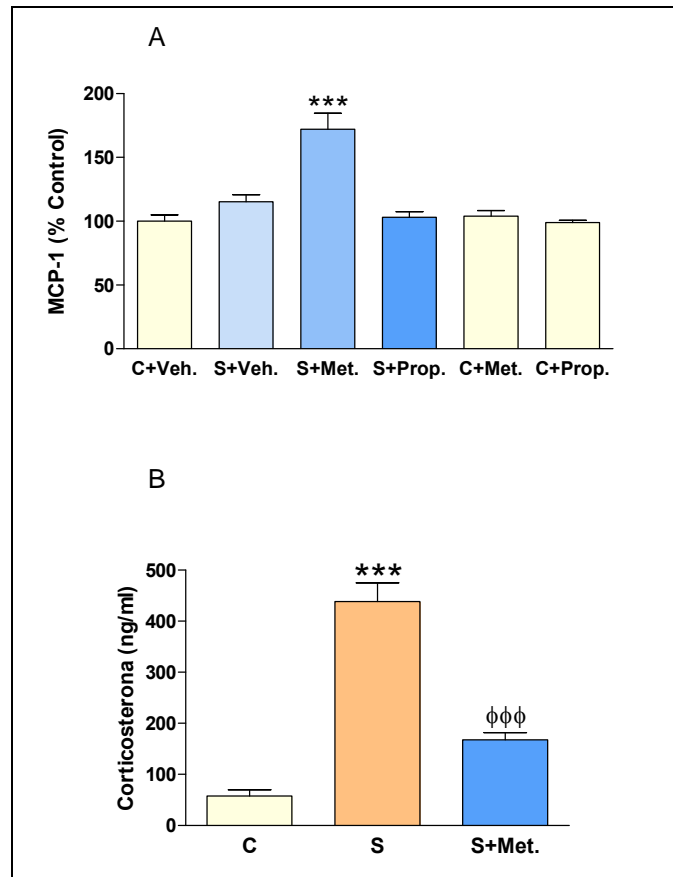
**Figura 1: Desipramina induce MCP-1 en corteza cerebral.** Se trataron ratas Wistar con Desipramina (Desip) 10 mg/Kg i.p. o con salino como control (C) durante 5 h. **A)** Se midieron los niveles de MCP-1 mediante ELISA en homogeneizados de corteza cerebral; \*\* $p < 0.05$  frente a Control. Los datos representan la media  $\pm$  ESM para  $n=12$  por grupo. **B)** Se midió la concentración de NA en plasma; \*\* $p < 0.05$  frente a control. Los datos representan la media  $\pm$  ESM para  $n=12$  por grupo.

### 1.2. Efecto del estrés en la regulación de MCP-1 en corteza cerebral

Con el fin de determinar si un aumento fisiológico de NA en el cerebro podría modificar también la producción de MCP-1, se expusieron ratas a estrés por restricción de movimientos durante 5 horas. A continuación los animales fueron sacrificados y se tomaron muestras de corteza cerebral.

La medida de la concentración de MCP-1 en corteza cerebral muestra un leve, pero no significativo incremento de MCP-1 como resultado de la exposición a estrés por inmovilización (Fig. 2A). En ratas tratadas con metirapona (un inhibidor de la síntesis de glucocorticoides) al comienzo del período de estrés, se detecta un gran incremento en la concentración de MCP-1. El tratamiento con metirapona sola no causó ningún cambio significativo en animales sin estresar. La medida de la cantidad de corticosterona en plasma confirma la estimulación causada por estrés y el bloqueo por metirapona (Fig. 2B). Estos resultados están de acuerdo con la posibilidad de que la liberación de corticosterona que se produce durante la respuesta al estrés, interfiera con la inducción de MCP-1 en el cerebro.

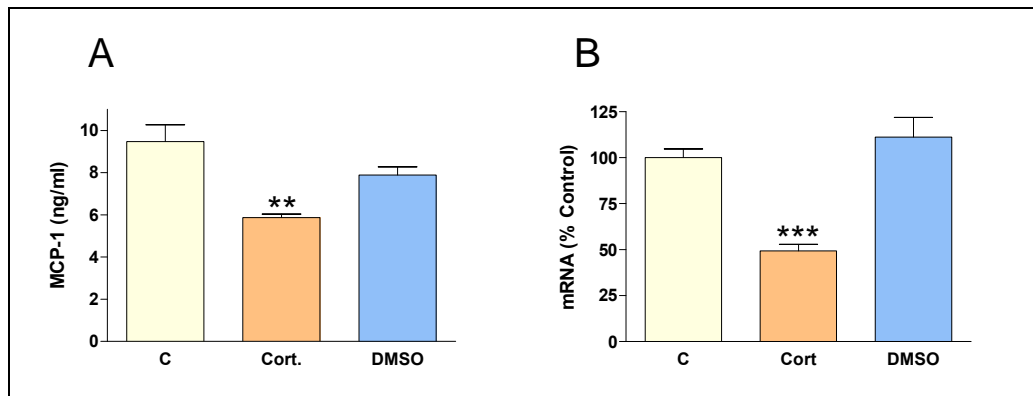
Además, para estudiar el papel de la NA en la inducción de MCP-1 causada por la exposición al estrés, se les administró a las ratas propranolol (un bloqueante de receptores  $\beta$  adrenérgicos). Este tratamiento evitó el incremento de los niveles de MCP-1 causado por la respuesta al estímulo estresante (Fig. 2A), pero no cambió la concentración de MCP-1 en ratas que no fueron expuestas a estrés.



**Figura 2: Regulación de la producción de MCP-1 por estrés. Papel de corticosterona y NA.** Ratas control (C) y ratas estresadas (S) fueron inyectadas con vehículo (Veh), con 100 mg/Kg de metirapona (Met) o con 5 mg/Kg de propranolol (prop) al comienzo del procedimiento. Tras 5 h, las ratas (12 ratas por grupo) se sacrificaron y se les extrajo muestras de corteza cerebral y plasma. **A)** La concentración de MCP-1 se midió en homogeneizados de corteza cerebral por ELISA. \*\*\* $p < 0.001$  frente a control. En el grupo control, 100% MCP-1 equivale a  $149,16 \pm 7,29$  pg/mL de proteína. Los datos representan la media  $\pm$  ESM para  $n=12$  por grupo. **B)** La concentración de corticosterona en plasma se midió mediante RIA. \*\*\* $p < 0.001$  frente a Control. φφφ $p < 0.001$  frente a estrés. Los datos representan la media  $\pm$  ESM para  $n=14$  por grupo.

### 1.3. La corticosterona reduce la expresión de MCP-1 en cultivos de astrocitos

Se sabe que los glucocorticoides pueden inhibir la síntesis de MCP-1 en diferentes tipos celulares. Por lo que después de observar el efecto de los glucocorticoides bloqueando la producción de MCP-1 *in vivo*, se decidió analizar el efecto directo de la corticosterona sobre la expresión de MCP-1 en cultivos de astrocitos. La incubación de cultivos primarios de astrocitos con corticosterona 100 nM durante 24 horas causó una reducción significativa de la concentración de MCP-1 en el medio de cultivo (Fig. 3A). Esta disminución se asoció a una menor cantidad de mRNA determinada mediante RT-PCR (Fig. 3B).

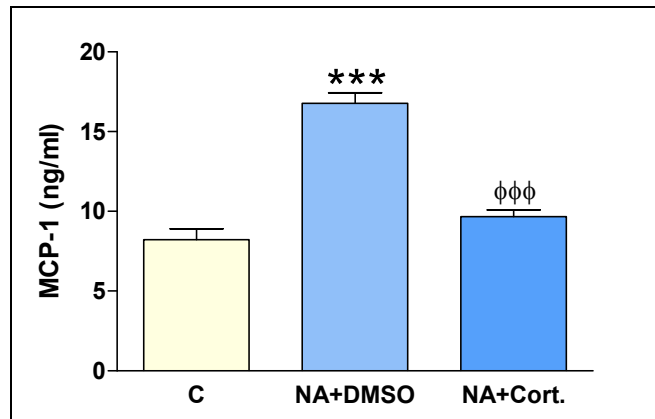


**Figura 3: La corticosterona inhibe la producción de MCP-1 en astrocitos.** Se incubaron cultivos primarios de astrocitos durante 24h en condiciones control (C), con corticosterona (Cort) 100 nM o con el volumen equivalente de vehiculo (DMSO). **A)** Los niveles de MCP-1 se midieron mediante ELISA. \*\*p<0.01 frente a control. Los datos representan la media  $\pm$  ESM para n=8 por grupo. **B)** El RNA se aisló y se midieron los niveles de mRNA mediante RT-PCR. \*\*\*p<0.001 frente a control. Los datos representan la media  $\pm$  ESM para n=8 por grupo.

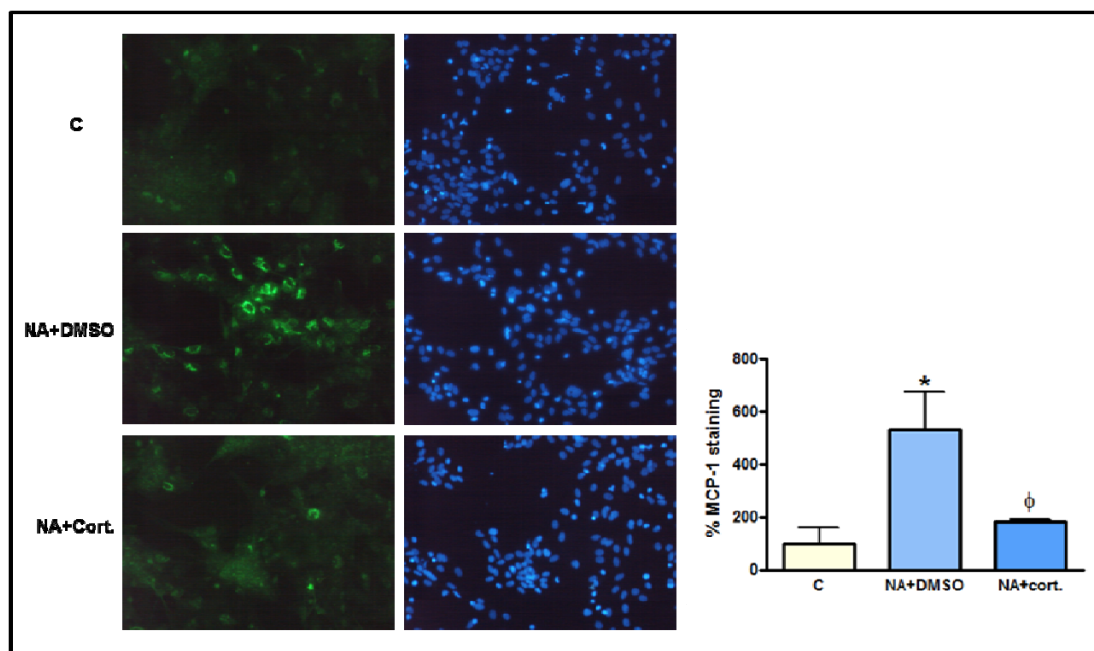
#### 1.4. La corticosterona bloquea la inducción por noradrenalina de MCP-1 en cultivos de astrocitos

Una vez determinada la habilidad de la corticosterona para reducir la síntesis de MCP-1 en astrocitos, se decidió analizar su efecto sobre la inducción de MCP-1 por NA. Para ello se trataron cultivos de astrocitos con NA 10  $\mu$ M en combinación con corticosterona 100 nM o con el volumen equivalente de vehículo (dimetilsulfóxido, DMSO). Tras 24 horas se cuantificaron los niveles de MCP-1 liberados al medio de cultivo mediante ELISA (Fig. 4) y se detectaron niveles elevados de MCP-1 tras el tratamiento con NA y DMSO, mientras que la presencia de corticosterona previno completamente esta inducción.

Estos resultados se confirmaron mediante estudios de inmunotinción, observándose una acumulación de MCP-1 en las células tratadas con NA en ausencia de corticosterona. (Fig. 5). Como se había observado previamente por otros autores, el marcaje de MCP-1 parece estar en el área perinuclear (Dansereau *et al.* 2008; Jung *et al.* 2008). Por el contrario, muy pocas células sintetizan MCP-1 cuando son tratadas con NA y corticosterona, y la cuantificación de intensidad de fluorescencia muestra como la corticosterona provoca una reducción significativa de la producción de MCP-1.



**Figura 4: La corticosterona bloquea la producción de MCP-1 por NA en astrocitos.** Se incubaron cultivos primarios de astrocitos durante 24h con medio sin tratar como control (C) o con NA (10  $\mu$ M) en combinación con corticosterona (Cort) 100 nM o con el volumen equivalente de vehículo (DMSO). Los niveles de MCP-1 se midieron mediante ELISA. \*\*\* $p$ <0.001 frente a control;  $\Phi\Phi\Phi$  $p$ <0.001 frente a NA+DMSO. Los datos representan la media  $\pm$  ESM para  $n=8$  por grupo.

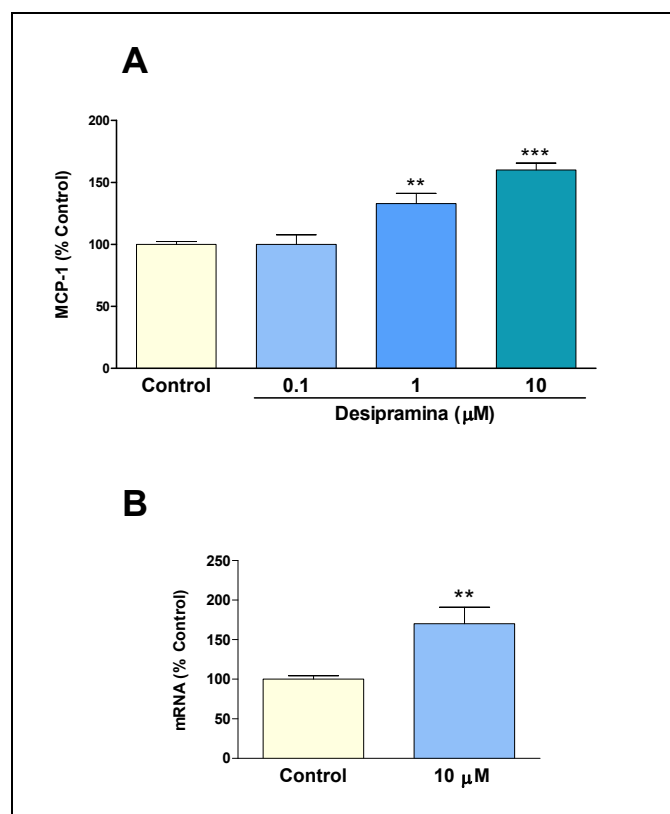


**Figura 5: Inmunotinción de MCP-1.** Imágenes representativas correspondientes a cultivos primarios de astrocitos tratados durante 24h con medio de cultivo (Control), o con NA 10  $\mu$ M en combinación con corticosterona 100 nM (Cort) o con vehículo (DMSO), y teñidos con anticuerpos para MCP-1 y DAPI. Las imágenes representan experimentos realizados en preparaciones separadas de astrocitos. En la gráfica se representa el análisis cuantitativo de células positivas para MCP-1 \* $p$ <0.05 frente a Control,  $\Phi$   $p$ <0.05 frente a NA+DMSO. Los datos representan la media  $\pm$  ESM para  $n=4$  por grupo.

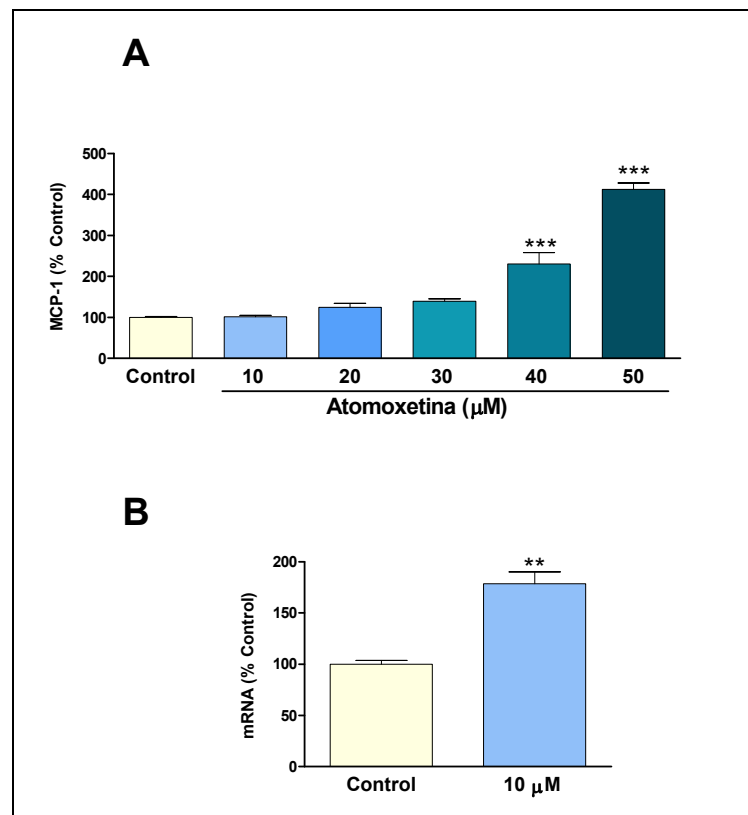
1.5. Desipramina y Atomoxetina inducen la expresión de MCP-1

Puesto que las células gliales expresan distintos tipos de receptores adrenérgicos (Salm and McCarthy, 1989; Marien *et al.* 2004; Juric *et al.* 2008; Hertz *et al.* 2010), no se puede descartar un efecto de la desipramina sobre la producción de MCP-1 independiente de la elevación de los niveles cerebrales de NA.

Para explorar esta posibilidad, se trataron cultivos primarios de astrocitos de corteza cerebral de rata con diferentes concentraciones de desipramina o atomoxetina durante 24 horas y se midieron los niveles de MCP-1 mediante ELISA, observándose un incremento dosis-dependiente en ambos casos (Fig. 6A y Fig. 7A). Además, la desipramina parece ser más efectiva, ya que se necesitan concentraciones menores de ésta para generar un aumento significativo en la síntesis de MCP-1. Este incremento se confirmó mediante la cuantificación del mRNA (Fig. 6B y Fig. 7B).

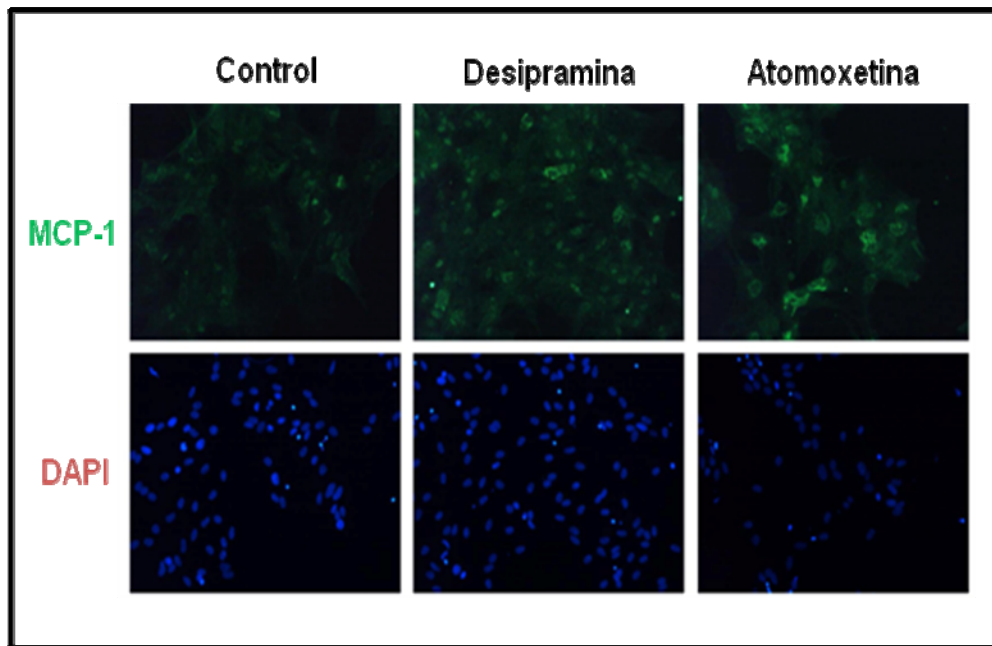


**Figura 6 La Desipramina induce la expresión y síntesis de MCP-1 en astrocitos. A)** Se incubaron cultivos primarios de astrocitos durante 24h con medio de cultivo sin tratamiento (control) o con desipramina a concentraciones de 0.1-10 μM. Los niveles de MCP-1 liberado al medio de cultivo se midieron mediante ELISA. El valor obtenido para el grupo control es de 103,07 ng/mL (100%). **B)** Se aisló el RNA de células tratadas durante 24h con medio de cultivo sin tratamiento (control) o con desipramina (10μM). Los niveles de mRNA de MCP-1 se determinaron mediante RT-PCR. Los resultados están expresados como porcentajes respecto al control (100%); \*\*\*p<0.0001 frente a control, \*\*p<0.001 frente a control. Los datos representan la media ± ESM para n=10 por grupo.



**Figura 7: La Atomoxetina induce la expresión de MCP-1 en astrocitos. A)** Se incubaron cultivos primarios de astrocitos durante 24h con medio de cultivo sin tratar (control) o con atomoxetina a concentraciones de 10-50  $\mu\text{M}$ . Los niveles de MCP-1 liberados al medio de cultivo se midieron mediante ELISA. **B)** Se aisló el RNA de células tratadas durante 24h con medio de cultivo sin tratamiento (control), o con Atomoxetina (10 $\mu\text{M}$ ). Los niveles de mRNA de MCP-1 se determinaron mediante RT-PCR. Los resultados están expresados como porcentajes respecto al control (100%); \*\*\* $p < 0.0001$  versus control, \*\* $p < 0.001$  frente a control. Los datos representan la media  $\pm$  ESM para  $n=10$  por grupo.

Para confirmar estos resultados se realizó también un estudio inmunocitoquímico de MCP-1 con cultivos primarios de astrocitos tratados en las mismas condiciones descritas anteriormente. Así, se observó una acumulación de MCP-1 en las células tratadas con desipramina o atomoxetina (Fig. 8).

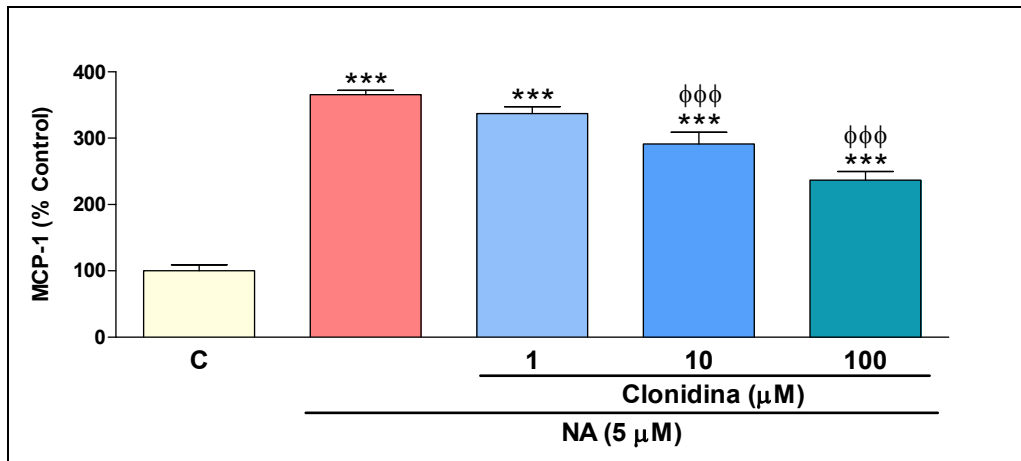


**Figura 8: Inducción de MCP-1 determinada por inmunotinción.** Se trataron cultivos primarios de astrocitos 24 h con medio de cultivo sin tratamiento (control), con desipramina 10  $\mu\text{M}$  o con atomoxetina 10  $\mu\text{M}$ . Tras la incubación se marcaron las células con un anticuerpo específico para MCP-1 (verde) y con DAPI, para marcar los núcleos (azul).

### 1.6. La activación de receptores $\alpha_2$ adrenérgicos inhibe la producción de MCP-1

Tras observar que el tratamiento con desipramina o atomoxetina induce la síntesis de MCP-1 en astrocitos aislados, se dedujo que estos compuestos ejercen un efecto independiente de la regulación de los niveles de NA debido a la ausencia de terminales noradrenérgicos en los cultivos cerebrales usados. Por esto se decidió estudiar las diferentes vías que podrían participar en el proceso.

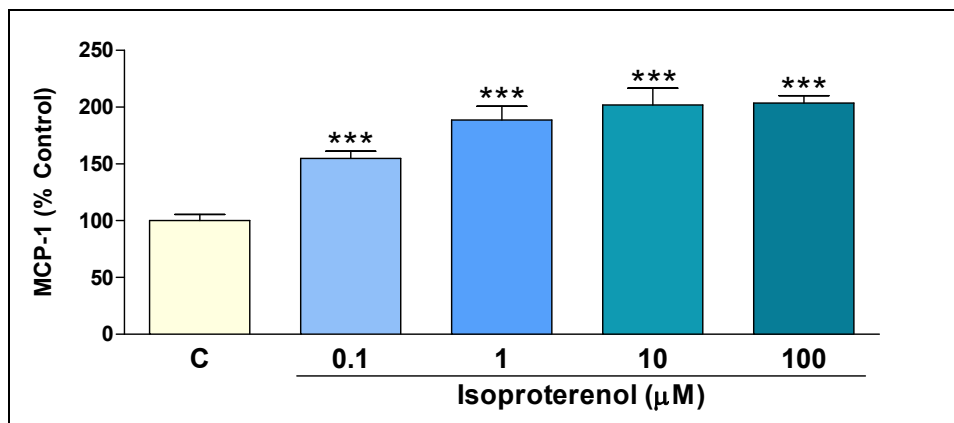
Puesto que los receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos parecen jugar un papel importante en el mecanismo de acción de la desipramina (Zhang *et al.* 2009), se analizó si la modulación de su acción afectaba a la expresión de MCP-1. Para ello, se trataron cultivos primarios de astrocitos con NA y diferentes concentraciones de clonidina, agonista selectivo del receptor  $\alpha_2$  adrenérgico, y se cuantificó la producción de MCP-1 mediante ELISA. El resultado se muestra en la figura 9, donde se observa que el aumento de la concentración de MCP-1, producido por NA, se ve reducido de manera dosis-dependiente por la presencia de clonidina. Lo cual indica que la activación de receptor  $\alpha_2$  adrenérgico inhibe la síntesis de MCP-1.



**Figura 9: La clonidina reduce la expresión del MCP-1 en astrocitos.** Se incubaron cultivos primarios de astrocitos durante 24h con medio de cultivo sin tratar como control, o con noradrenalina 5μM (NA) sola o en presencia de diferentes concentraciones de clonidina (Clon) de 1-100 μM. La concentración de MCP-1 liberado al medio de cultivo se midió mediante ELISA. Los resultados están expresados como porcentajes respecto al control (100%); \*\*\*p<0.0001 frente a control, p<0.0001 frente a NA. Los datos representan la media ± ESM para n=10 por grupo.

### 1.7. El tratamiento con Yohimbina potencia la inducción de MCP-1

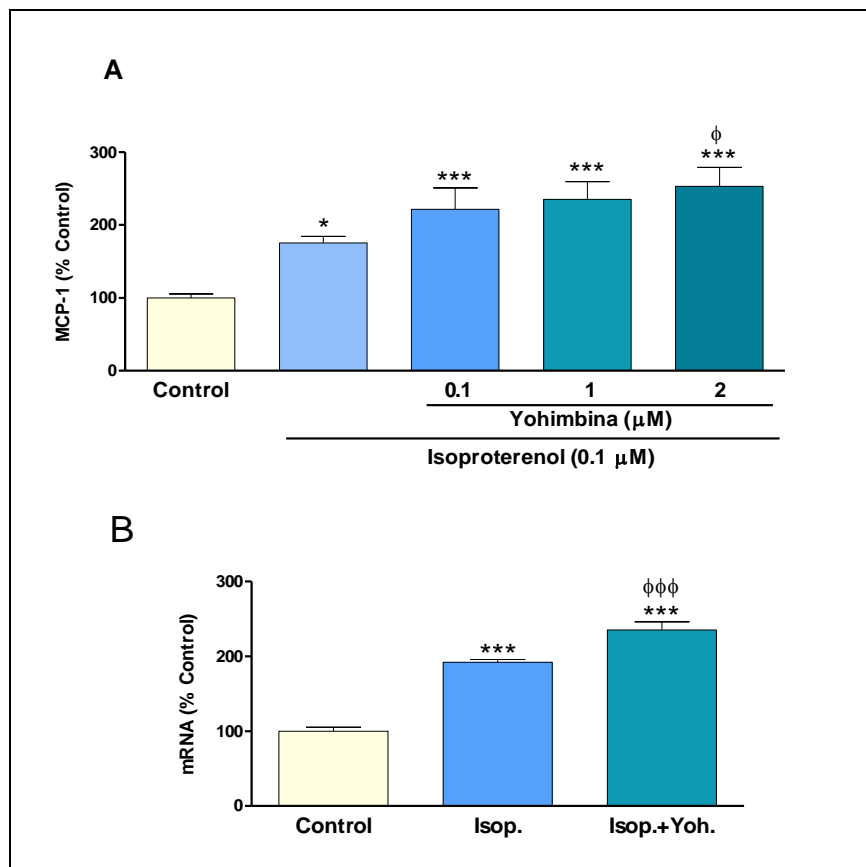
Con el fin de estudiar el mecanismo por el cual se induce la expresión de MCP-1 en astrocitos se empleó isoproterenol, agonista selectivo β adrenérgico, y yohimbina, antagonista selectivo α<sub>2</sub> adrenérgico. Así, en primer lugar, se trataron cultivos primarios de astrocitos con diferentes concentraciones de isoproterenol, y tras 24 horas se midieron los niveles de MCP-1 liberados al medio de cultivo mediante ELISA. El resultado obtenido se muestra en la figura 10, donde se observa un aumento en la concentración de MCP-1 de forma dosis-dependiente con el isoproterenol.



**Figura 10: Isoproterenol induce MCP-1 en astrocitos.** Se incubaron cultivos primarios de astrocitos durante 24h con medio de cultivo sin tratar como control y con distintas concentraciones de isoproterenol (0.1-100 μM). Los niveles de MCP-1 liberados al medio de cultivo se midieron mediante ELISA. \*\*\*p<0.0001 frente a control. Los datos representan la media ± ESM para n=10 por grupo.

## RESULTADOS

Tras haber confirmado que el isoproterenol induce la síntesis de MCP-1, se estudió el efecto de éste en combinación con yohimbina (antagonista  $\alpha_2$ ). Para ello se trataron cultivos primarios de astrocitos durante 24 horas, con diferentes concentraciones de yohimbina en combinación con isoproterenol 0,1  $\mu\text{M}$ , concentración más baja capaz de producir un aumento significativo en la liberación de MCP-1 (Fig. 10). Los niveles de MCP-1 liberado al medio de cultivo se cuantificaron mediante ELISA. En la figura 11A se observa que ambos compuestos actúan sinérgicamente, produciendo un aumento dosis-dependiente en la síntesis de MCP-1. Este resultado se confirmó midiendo el mRNA producido mediante RT-PCR (Fig. 11B). Estos datos confirman que, tanto los receptores  $\beta$  como los  $\alpha_2$  adrenérgicos están implicados en la expresión y síntesis de MCP-1.



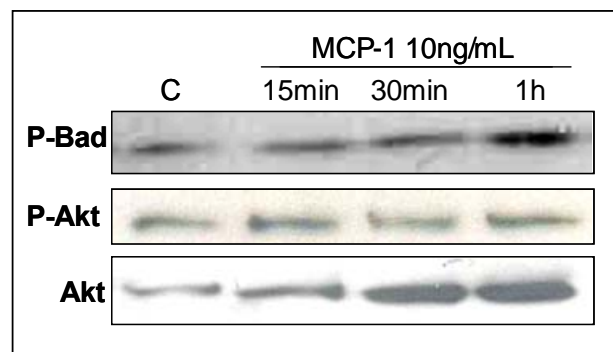
**Figura 11: Yohimbina e Isoproterenol inducen MCP-1 sinérgicamente.** A) Se incubaron cultivos primarios de astrocitos con medio de cultivo sin tratar como control, o con isoproterenol 0,1  $\mu\text{M}$  en combinación con diferentes concentraciones de yohimbina (0-2  $\mu\text{M}$ ). Tras 24 h se midieron los niveles de MCP-1 liberados al medio de cultivo mediante ELISA. B) Se incubaron cultivos primarios de astrocitos con medio de cultivo sin tratar como control o con isoproterenol 0,1  $\mu\text{M}$ , solo o en combinación con yohimbina 1  $\mu\text{M}$ . Se aisló el RNA y se midió la expresión de mRNA de MCP-1 mediante RT-PCR. Los resultados están expresados como porcentajes respecto al control (100%); \*\*\* $p < 0.0001$  frente a control, \* $p < 0.005$  frente a control,  $\phi$   $p < 0.005$  frente a isoproterenol,  $\phi\phi\phi$   $p < 0.0001$  frente a isoproterenol. Los datos representan la media  $\pm$  ESM para  $n=10$  por grupo.

## 2. EFECTO NEUROPROTECTOR DE MCP-1 EN NEURONAS FRENTE A AGENTES PROAPOPTÓTICOS

Como se ha comentado anteriormente, existen diferentes estudios donde se demuestra que MCP-1 protege neuronas frente a distintos estímulos (Bruno *et al.* 2000; Eugenin *et al.* 2003; Madrigal *et al.* 2009; Godefroy *et al.* 2012; Bray *et al.* 2013), por lo que se decidió analizar los posibles mecanismos mediante los cuales MCP-1 ejerce este efecto.

### 2.1. MCP-1 modula la expresión de P-Bad, P-Akt y Akt

En primer lugar se estudió el efecto de MCP-1 en la inducción de las proteínas Akt, P-Akt y P-Bad. Para ello se trataron cultivos primarios de neuronas con MCP-1 10 ng/mL durante 15, 30 y 60 minutos. A continuación se extrajeron las proteínas del medio y se cuantificaron los niveles de Akt, P-Akt y P-Bad mediante la técnica de Western Blot. En la figura 12 se muestran fotografías representativas de los resultados obtenidos. Como puede observarse, MCP-1 produce un aumento en la síntesis de las tres proteínas analizadas. Así, no solo aumenta Akt-P, si no que también hay un incremento de la concentración total de Akt.

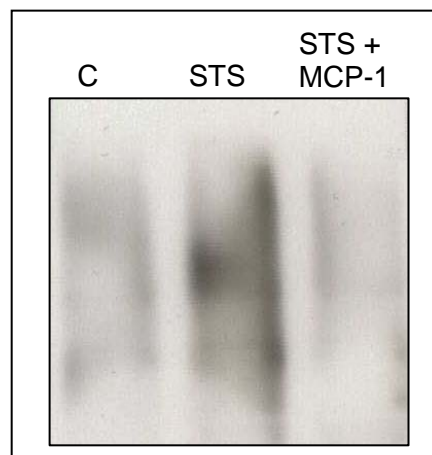


**Figura 12: Efecto de MCP-1 sobre P-Bad, P-Akt y Akt.** Se incubaron cultivos primarios de neuronas con medio de cultivo sin tratar como control y con MCP-1 10 ng/mL durante diferentes tiempos (15min, 30 min y 1h). Se extrajeron las proteínas y se cuantificaron los niveles de P-Bad, P-Akt y Akt mediante la técnica de Western blot. La imagen mostrada es representativa de experimentos realizados en tres preparaciones distintas.

### 2.1.1. MCP-1 regula la ubiquitinación de Akt

Una vez demostrado que MCP-1 aumenta la concentración total de Akt en neuronas, se decidió estudiar el mecanismo por el cual ejercía este efecto. En primer lugar se analizaron las posibles modificaciones de mRNA sin que se observara ningún efecto como resultado del tratamiento con MCP-1.

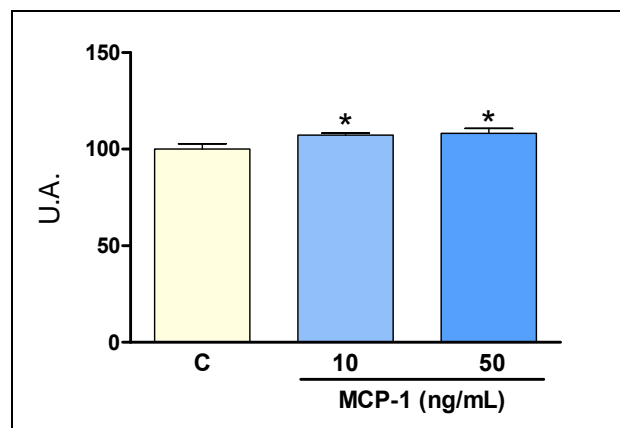
Puesto que la degradación de Akt se produce mediante la acción del proteasoma, previa ubiquitinación (Yan *et al.* 2006), se estudió a continuación el efecto de MCP-1 sobre la ubiquitinación de la proteína Akt. Para ello se trataron cultivos primarios de neuronas con MCP-1 (10 ng/mL), durante 15 minutos, y posteriormente 15 minutos con staurosporina 500  $\mu$ M. Se extrajeron las proteínas, se precipitó Akt con agarosa y se analizó la ubiquitinación de esta proteína mediante western blot. En la figura 13 puede verse que la staurosporina aumenta la ubiquitinación de la proteína Akt, y que el tratamiento con MCP-1 inhibe este efecto.



**Figura 13: Inmunoprecipitación de Akt-Ubiquitina.** Se incubaron cultivos primarios de neuronas durante 15 min. con medio de cultivo sin tratamiento, como control, o con MCP-1 10 ng/mL. Posteriormente se incubaron 15 min. con medio de cultivo sin tratar como control (C) y con staurosporina 500 nM (STS) sola o en combinación con MCP-1 10 ng/mL. Se realizó una inmunoprecipitación de Akt con Agarosa G-Plus. La cantidad de Akt ubiquitinada se determinó mediante WB para ubiquitina.

### 2.1.2. MCP-1 incrementa la actividad de Akt

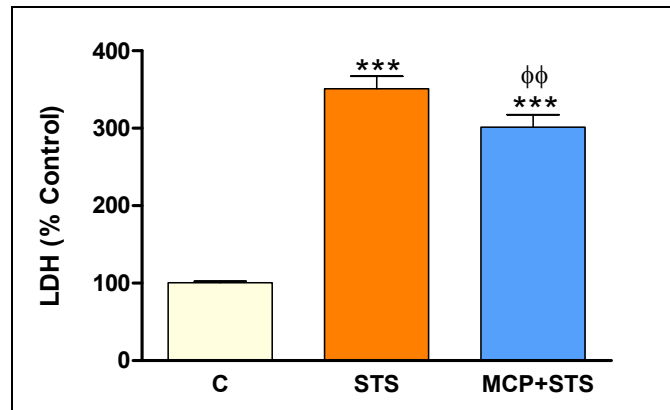
Para confirmar el efecto de MCP-1 sobre Akt, se cuantificó la actividad de esta proteína en cultivos primarios de neuronas tratados durante 1 hora con MCP-1 a las concentraciones de 10 y 50 ng/mL, para ello se empleó el kit comercial K-LISA™ Akt Activity (Calbiochem®). El resultado obtenido se muestra en la figura 14, donde se observa que MCP-1 produce un aumento en la actividad de Akt.



**Figura 14: MCP-1 aumenta la actividad de Akt.** Se incubaron cultivos primarios de neuronas con medio de cultivo sin tratar como control, y con MCP-1 en diferentes concentraciones (10 y 50 ng/mL) durante 1 h. La actividad de Akt se cuantificó mediante un kit comercial. \* $p < 0.005$  frente a control. Los datos representan la media  $\pm$  ESM para  $n=6$  por grupo.

### 2.2. MCP-1 protege neuronas frente a staurosporina

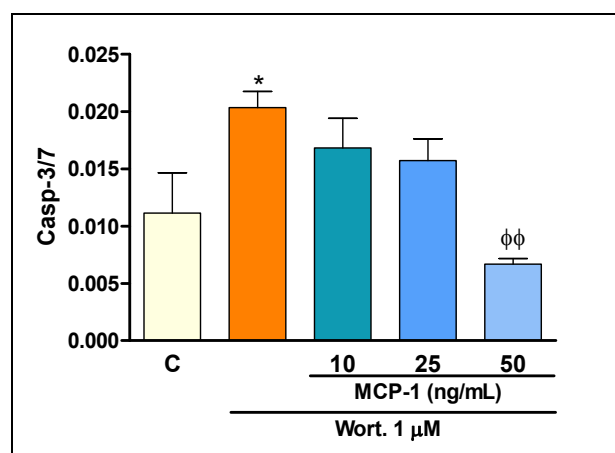
Una vez determinado que MCP-1 actuaba sobre la proteína Akt, se analizó su potencial antiapoptótico frente a staurosporina, inductor de apoptosis. Para ello trataron cultivos primarios de neuronas con MCP-1 10 ng/mL durante 2h y posteriormente se trataron durante 24 horas con staurosporina 1  $\mu$ M sola o en combinación con MCP-1 10 ng/mL. Tras el tratamiento, se cuantificaron los niveles de LDH liberados al medio, como medida de viabilidad celular. En la figura 15, se muestran los resultados obtenidos, donde se observa que MCP-1 es capaz de proteger neuronas frente a staurosporina.



**Figura 15: MCP-1 protege neuronas frente a staurosporina.** Se incubaron cultivos primarios de neuronas durante 2 h con medio de cultivo sin tratamiento o con MCP-1 10 ng/mL, seguido de 24h con medio de cultivo sin tratar como control y con staurosporina (STS) 1  $\mu$ M, sola o en combinación con MCP-1 10 ng/mL. Se determinó la concentración de LDH liberado en el medio de cultivo. Los resultados están expresados como porcentaje respecto al grupo control (se considera al control el 100%); \*\*\*p<0.001 frente a control.  $p$ <0.01 frente a STS. Los datos representan la media  $\pm$  ESM para n=12 por grupo.

### 2.3 MCP-1 inhibe la actividad de caspasa 3/7

Finalmente, se decidió estudiar el efecto de MCP-1 sobre la actividad de caspasa-3/7, estimulada por wortmanina. Para ello se trataron cultivos primarios de neuronas en primer lugar con MCP-1 (10 ng/mL) durante 2 horas, y posteriormente se incubaron durante 24 horas con wortmanina 1 $\mu$ M sola o en combinación con concentraciones crecientes de MCP-1 (10, 25 y 50 ng/mL). A continuación se midió la actividad de caspasa-3/7. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 16, donde puede observarse que MCP-1 inhibe la actividad de caspasa-3/7 estimulada por Wortmanina, de forma dosis dependiente, llegando a inhibirla totalmente a una concentración de 50 ng/mL



**Figura 16: MCP-1. inhibe la actividad de caspasa 3/7.** Se incubaron cultivos primarios de neuronas durante 2 h con medio de cultivo sin tratamiento o con MCP-1 (10 ng/mL), seguido de 24 h con medio de cultivo con DMSO como control o con wortmanina (Wort.) 1 $\mu$ M sola o en combinación con MCP-1 en concentraciones crecientes (10-50 ng/mL). Se cuantificó la actividad de caspasa 3/7 (Casp-3/7): \*p<0.05

frente a control;  $p < 0.01$  frente a Wort.  $1\mu\text{M}$ . Los datos representan la media  $\pm$  ESM para  $n=6$  por grupo.

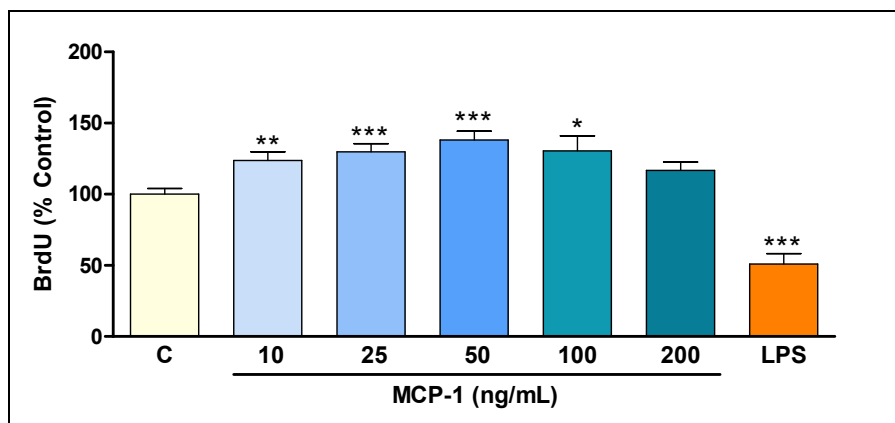
### 3. MODULACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN Y LA ACTIVACIÓN MICROGLIAL POR MCP-1

Tras demostrar que la NA induce la síntesis de la quimioquina MCP-1 en astrocitos, se decidió analizar el posible efecto de MCP-1 sobre la microglia, y determinar si esta quimioquina generaba activación microglial, produciendo un efecto inflamatorio y neurotóxico.

#### 3.1. MCP-1 induce la proliferación microglial

##### 3.1.1. Ensayo de BrdU

En primer lugar se analizó si MCP-1 está implicada en la inducción de la proliferación microglial. Para ello, se realizó un inmunoensayo con Bromodesoxiuridina (BrdU), en el cual se trataron cultivos primarios de microglía con MCP-1 10-200 ng/mL y LPS 0,1  $\mu\text{g/mL}$ , y se incubaron durante 24 horas en presencia de BrdU. Tras el tratamiento, se midió la cantidad de BrdU incorporado a las células de microglia, como indicador de proliferación celular (Fig 17). Se observó que ésta aumenta con el tratamiento de MCP-1 de forma dosis dependiente alcanzando su valor máximo a la concentración de 50 ng/mL. Por otra parte, el LPS produjo una disminución en la proliferación microglial.



**Figura 17: MCP-1 induce proliferación microglial.** Se incubaron cultivos primarios de microglía durante 24 h con medio de cultivo sin tratar como control, con MCP-1 a diferentes concentraciones (10-200 ng/mL), o con LPS 0,1  $\mu\text{g/mL}$  y se realizó un ensayo de proliferación celular con BrdU. Los resultados están expresados como porcentajes respecto al control (100%); \*\*\* $p < 0.0001$  frente a control, \*\* $p < 0.001$  frente a control, \* $p < 0.005$  frente a control. Los datos representan la media  $\pm$  ESM para  $n=12$  por grupo.

3.1.2. Estudio de la regulación de proteínas del ciclo celular

Una vez demostrado que MCP-1 induce la proliferación microglial, se estudió su efecto sobre la expresión de diferentes proteínas implicadas en la modulación del ciclo celular, como Ciclina D1, Ciclina 4 dependiente de kinasa (CDK4) y el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA). Para ello se trataron cultivos de microglia durante 24 horas con medio de cultivo sin tratar como control, con LPS 0,1 µg/mL, con MCP-1 50 ng/mL (concentración a la que se produce el máximo grado de proliferación microglial) y con MCP-1 junto con LPS. Tras la incubación, se aisló el RNA y se cuantificó el mRNA de ciclina D1, de CDK4 y de PCNA. Los resultados se muestran en la figura 18. De acuerdo con lo observado en el ensayo de BrdU, el tratamiento con LPS produce una reducción en los niveles de mRNA de las tres proteínas estudiadas, mientras que MCP-1 aumenta la concentración de mRNA de PCNA y evita la reducción causada por LPS.

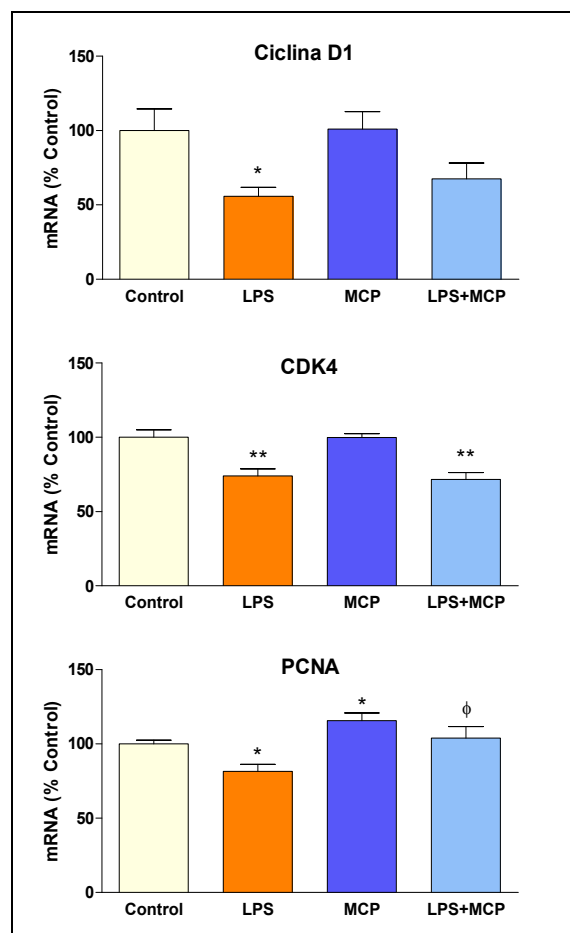


Figura 18: Regulación de proteínas del ciclo celular por MCP-1. Se incubaron cultivos celulares de microglía durante 24 h con medio de cultivo sin tratar como control, con MCP-1 (50 ng/mL) solo o en combinación con LPS (0,1 µg/mL), y con LPS. Se aisló el RNA y se midieron los niveles de mRNA para Ciclina D1 (A), CDK4 (B) y PCNA (C), mediante RT-PCR. Los resultados están expresados en

porcentajes respecto al valor control (100%). \*\*p<0.001 frente a control, \*p<0.005 frente a control; p<0.005 frente a LPS. Los datos representan la media  $\pm$  ESM para n=6 por grupo.

### **3.2. MCP-1 no induce la activación microglial**

Una vez determinado que la quimioquina MCP-1 genera proliferación microglial, se estudió su efecto sobre la activación, puesto que el principal objetivo de este estudio es analizar si la quimioquina MCP-1 es capaz de producir cambios en la microglía que resulten tóxicos para las neuronas.

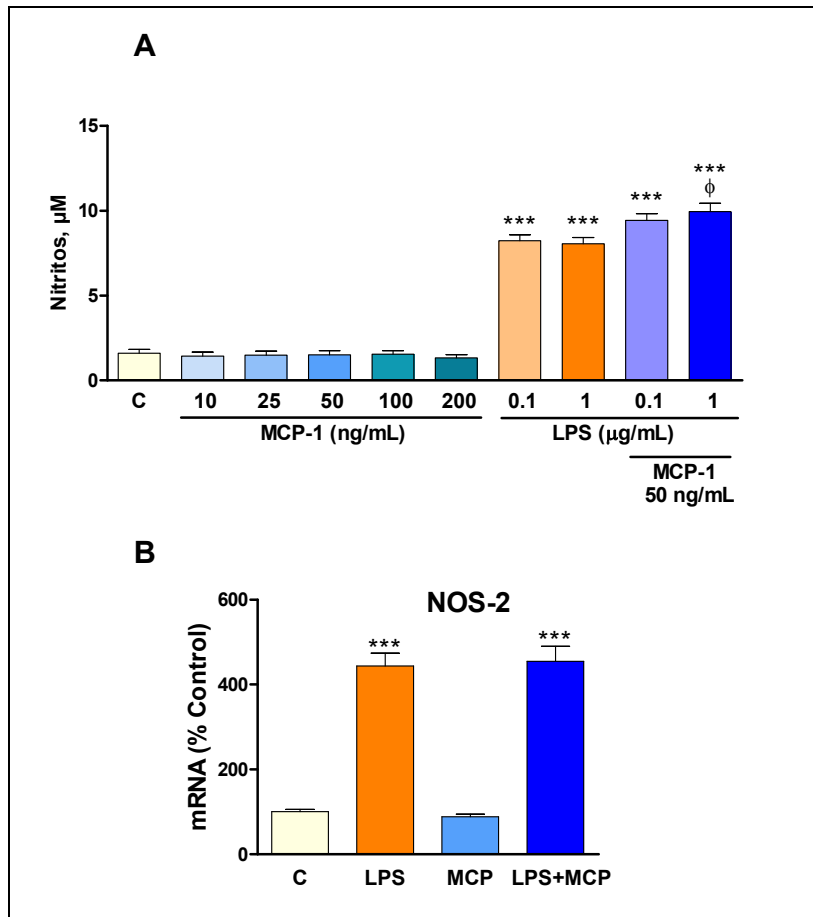
#### **3.2.1. Actividad de NOS-2**

La inducción del enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS/NOS-2) se puede considerar como un marcador de activación microglial y, por consiguiente, de respuesta inflamatoria.

Así, se trataron cultivos primarios de microglia durante 24 horas con MCP-1 a diferentes concentraciones (10-200 ng/mL) y se midió la concentración de nitritos liberados al medio de cultivo, como medida de la actividad de NOS-2 y la consiguiente producción de óxido nítrico. Bajo estas condiciones no se detectaron modificaciones en la concentración de nitritos causadas por MCP-1 (Fig. 19A).

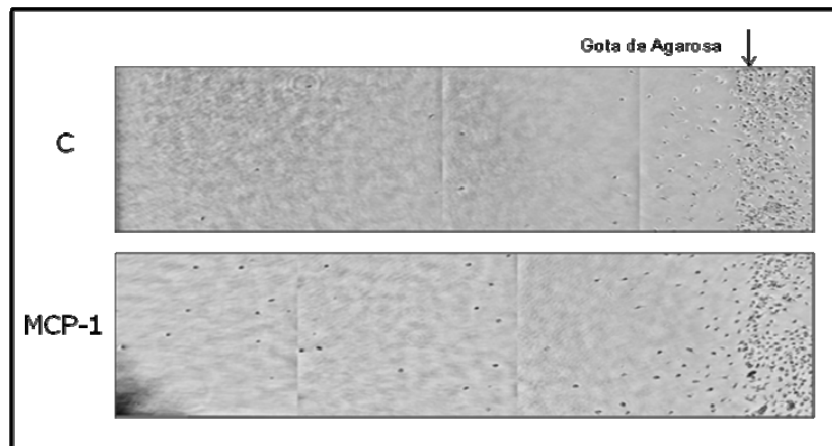
Nos pareció interesante también analizar el posible incremento del efecto de MCP-1 en presencia de un agente activador de microglía diferente. Para ello, se co-incubaron las células con diferentes concentraciones de LPS. Y observamos un incremento pequeño, pero significativo, en la concentración de nitritos cuando MCP-1 se adiciona junto con la mayor concentración de LPS usada, aunque no pudimos detectar diferencias similares en los demás experimentos descritos a continuación.

Para confirmar las diferencias observadas en los nitritos, se cuantificaron los niveles de mRNA de NOS-2 en microglía mediante RT-PCR. Para este experimento elegimos la concentración de MCP-1 con la que habíamos visto que se producía una mayor proliferación microglial (50 ng/mL, 24 h). Bajo estas condiciones, MCP-1 no produjo modificación en la expresión de NOS-2 ni alteró la inducción causada por el tratamiento con LPS (Fig. 19B).



**Figura 19: MCP-1 no induce la actividad ni la expresión de NOS-2.** Se incubaron células de microglía durante 24 h con medio de cultivo sin tratar como control, con MCP-1 a concentraciones de entre 10 y 200 ng/mL, y con LPS 0,1 y 1 µg/mL solo o en combinación con MCP-1 50 ng/mL. **A)** Se cuantificó la concentración de nitritos en medio de cultivo. \*\*\*p<0.0001 frente a control, p<0.005 frente a LPS 1µg/mL. Los datos representan la media ± EEM para n=10 por grupo. **B)** Se aisló el RNA y se cuantificó el mRNA de NOS-2 mediante RT-PCR. Los resultados están expresados como porcentaje del valor control (se considera a control el 100%); \*\*\*p<0.0001 frente a control. Los datos representan la media ± ESM para n=6 por grupo.

Con el fin de confirmar la calidad del MCP-1 empleado, se realizó un análisis de su capacidad quimioatrayente. Este ensayo se realizó según el protocolo descrito en el apartado de material y métodos, y el resultado obtenido se muestra en la figura 20. Como puede verse en las fotografías, MCP-1 ejerce atracción sobre las células de microglía (quimiotaxis).

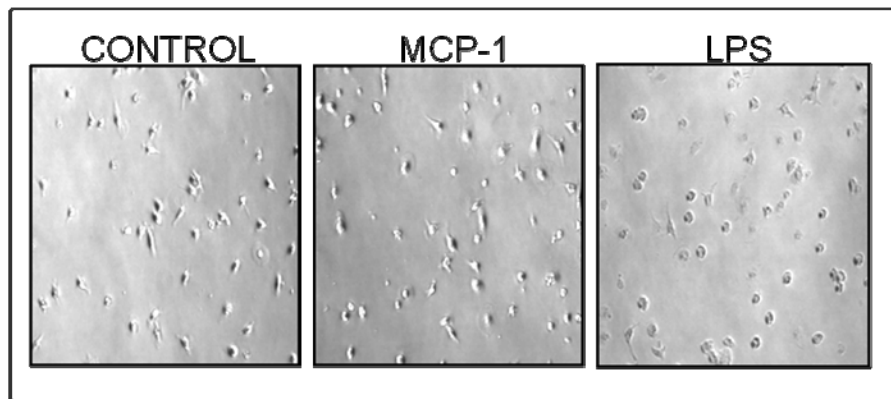


**Figura 20: MCP-1 genera quimiotaxis en la microglía.** Se colocó una gota de agarosa sola como control, o con MCP 50 ng/mL disuelto, en una placa y se cubrió con un cultivo primario de microglía en experimentos separados. Tras 24 h se analizó la penetración de células en la agarosa mediante microscopía con contraste de fases.

### 3.2.2. Estudio morfológico de la microglía

También se analizó la activación microglial mediante el estudio de sus cambios morfológicos. La microglía en estado de “reposo” presenta una forma que se caracteriza por tener un cuerpo celular con un citoplasma escaso y un núcleo oval o triangular, y con ramificaciones cortas e irregulares que salen de él, útil para realizar su labor de vigilancia ante posibles agentes extraños, en cambio cuando se encuentra activada, en presencia de algún agente nocivo como el LPS, su forma se torna esférica o ameboide (Kloss *et al.* 2001).

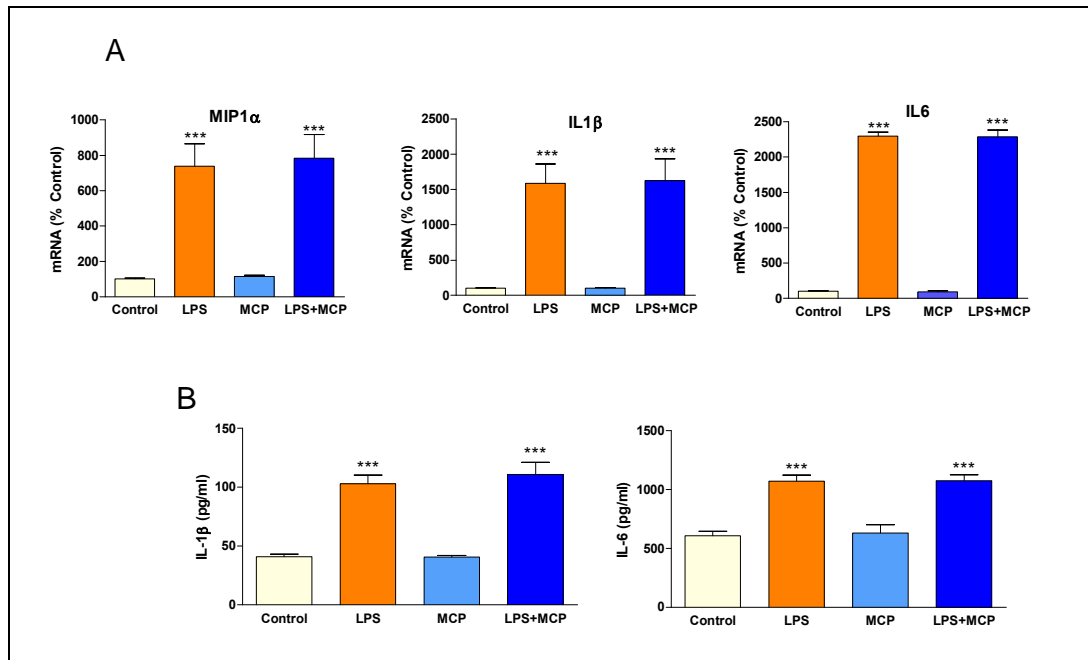
Así, se realizó un experimento donde se trataron cultivos primarios de microglía de forma separada con MCP-1 50 ng/mL, con LPS 1  $\mu$ g/mL o con medio de cultivo sin tratar como control. Tras 24 horas de incubación se analizó la morfología de las células mediante microscopía de contraste de fases y se observó que, mientras que el LPS, como era de esperar, producía un cambio en la microglía, la quimioquina MCP-1 no producía ningún efecto apreciable, manteniendo una forma similar a la del tratamiento control. Estos resultados, mostrados en la figura 21, corroboran los anteriores e indican que MCP-1 por sí solo, en las condiciones analizadas, no produce activación microglial.



**Figura 21: MCP-1 no induce cambios morfológicos en la microglía.** Imágenes representativas de cultivos primarios de microglía incubada durante 24 h con medio de cultivo sin tratar como control, con MCP-1 (50 ng/mL) o con LPS (1 $\mu$ g/mL) en experimentos separados

### 3.2.3. Cuantificación de citoquinas inflamatorias

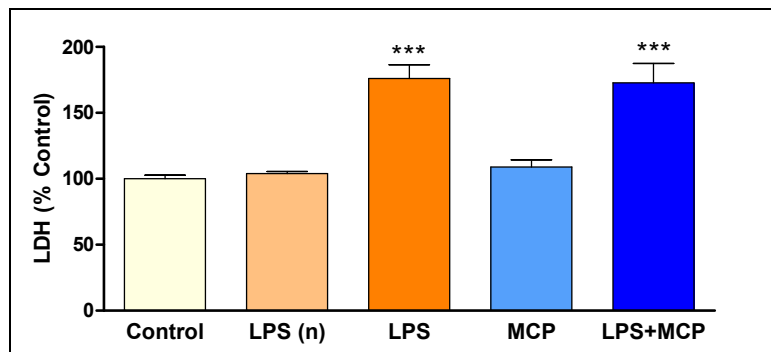
A continuación se estudió la expresión de algunos agentes inflamatorios expresados por microglía activada, como son interleuquina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleuquina 6 (IL-6), y la proteína 1 $\alpha$  quimioatrayente de macrófagos (MIP-1 $\alpha$ ). Para ello se trataron durante 24 horas cultivos celulares de microglía con MCP-1 (50 ng/mL) solo o en combinación con LPS (1 $\mu$ g/mL), y usando LPS como control positivo. Tras el periodo de incubación, se analizaron los niveles de mRNA para IL-1 $\beta$ , IL-6 y MIP-1 $\alpha$ , mediante RT-PCR. Los resultados, mostrados en la figura 22A, indican que MCP-1 no causa cambios significativos en ninguno de los agentes inflamatorios estudiados y tampoco modifica el incremento inducido por LPS. Junto a esto, también se analizó por ELISA la liberación al medio de cultivo de IL-1 $\beta$  e IL-6 (Fig. 22B), confirmándose los resultados obtenidos en el estudio de mRNA.



**Figura 22: MCP-1 no induce la expresión de IL-1 $\beta$ , IL-6 o de MIP-1 $\alpha$  en microglía.** Se incubaron cultivos primarios de microglía durante 24 h con medio de cultivo sin tratar como control, con LPS 1  $\mu$ g/mL y con MCP-1 50 ng/mL solo o en combinación con LPS. **A)** Se cuantificaron los niveles de mRNA mediante RT-PCR. Los resultados están expresados como porcentaje del valor control (se considera al control el 100%); \*\*\*p<0.0001 frente a control. Los datos representan la media  $\pm$  ESM para n=10 por grupo. **B)** Se cuantificaron los niveles de proteína liberada mediante ELISA. \*\*\*p<0.0001 frente a control. Los datos representan la media  $\pm$  ESM para n=10 por grupo.

### 3.2.4. MCP-1 no induce toxicidad neuronal

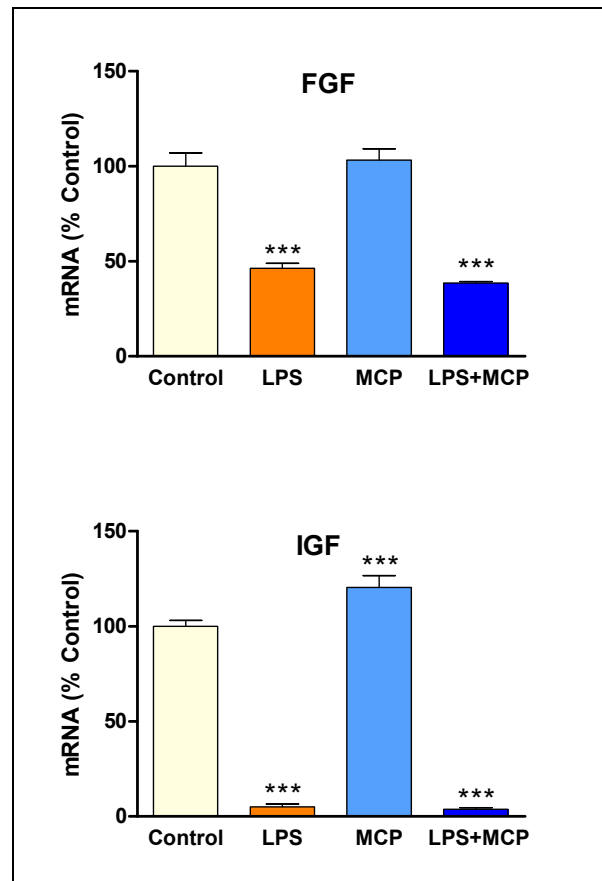
Puesto que no se habían observado modificaciones por MCP-1 de ninguno de los marcadores de activación de microglía evaluados, se decidió analizar el efecto directo de la microglía tratada con MCP-1 sobre las neuronas. Para ello se utilizaron co-cultivos de microglía y neuronas. Se colocaron insertos con microglía sobre cultivos de neuronas de 9 días y se añadió MCP-1 (50 ng/mL) solo o junto con LPS (1  $\mu$ g/mL), a los cultivos de microglía. Además, se trataron neuronas, en ausencia de microglía, con LPS para descartar que fuese este agente por sí solo capaz de generar toxicidad neuronal. Los dos cultivos se encontraban separados por una pared porosa que permite el paso de moléculas pequeñas, pero evita la translocación de células. Así, después de un periodo de incubación de 24 horas, se separaron los cultivos y se midió el nivel de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) liberado por las neuronas, como medida de viabilidad celular, según el protocolo descrito en el apartado de métodos. El resultado obtenido de muestra en la figura 23, donde puede verse que la adición de LPS al cultivo microglial causa muerte neuronal, mientras que MCP-1 no afecta a la viabilidad neuronal por sí solo, ni en combinación con LPS. Este resultado indica que MCP-1 no provoca la liberación microglial de agentes nocivos para las neuronas.



**Figura 23: MCP-1 no induce toxicidad en cultivos de microglía y neuronas.** La microglía en membranas semipermeables transwell® se transfirió a pocillos que contenían cultivos primarios de neuronas. La microglía se trató 24 h con medio de cultivo sin tratar, como control, con LPS 1 µg/mL y con MCP-1 50 ng/mL solo o en combinación con LPS. En un experimento separado se trataron neuronas en las mismas condiciones, pero en ausencia de microglía, con LPS únicamente (LPS<sub>(n)</sub>). Tras 24 h de tratamiento se separaron los insertos y se midió el nivel de LDH liberado. Los resultados están expresados en porcentajes respecto al valor control (100%); \*\*\*p<0.0001 frente a control. Los datos representan la media ± ESM para n=12 por grupo.

### 3.3. MCP-1 modula la expresión de factores tróficos en la microglía

Una vez demostrado que MCP-1 no inducía la expresión de agentes potencialmente neurotóxicos en microglía, se decidió analizar su efecto en la expresión de algunos factores tróficos, ya que el mecanismo nocivo de acción de esta quimioquina podría basarse en una disminución en la expresión de los mismos. Para ello se analizó la expresión del factor de crecimiento básico de fibroblastos (FGF) y del factor de crecimiento dependiente de insulina (IGF) en cultivos celulares de microglía tratados durante 24 h con MCP-1 (50 ng/mL), solo o en combinación con LPS (1 µg/mL). Los resultados obtenidos se muestran en la figura 24, donde se observa que el LPS, solo o en combinación con MCP-1, produce una gran disminución en ambos factores tróficos. La quimioquina MCP-1, en cambio, no modifica la concentración de mRNA de FGF, pero sí genera un aumento en la síntesis de IGF.



**Figura 24: Efecto de MCP-1 en la expresión de factores tróficos en microglía.** Se incubaron células de microglía durante 24 h con medio de cultivo sin tratar, como control, con LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y con MCP-1 (50  $\text{ng}/\text{mL}$ ) solo o en combinación con LPS. Se cuantificaron los niveles de mRNA para FGF y para IGF mediante RT-PCR. Los resultados están expresados como porcentaje del valor control (se considera al control el 100%); \*\*\* $p < 0.0001$  frente a control. Los datos representan la media  $\pm$  ESM para  $n=6$  por grupo.

### 4. EFECTO DUAL DE LA NORADRENALINA SOBRE QUIMIOQUINAS Y MEDIADORES INFLAMATORIOS EN ASTROCITOS

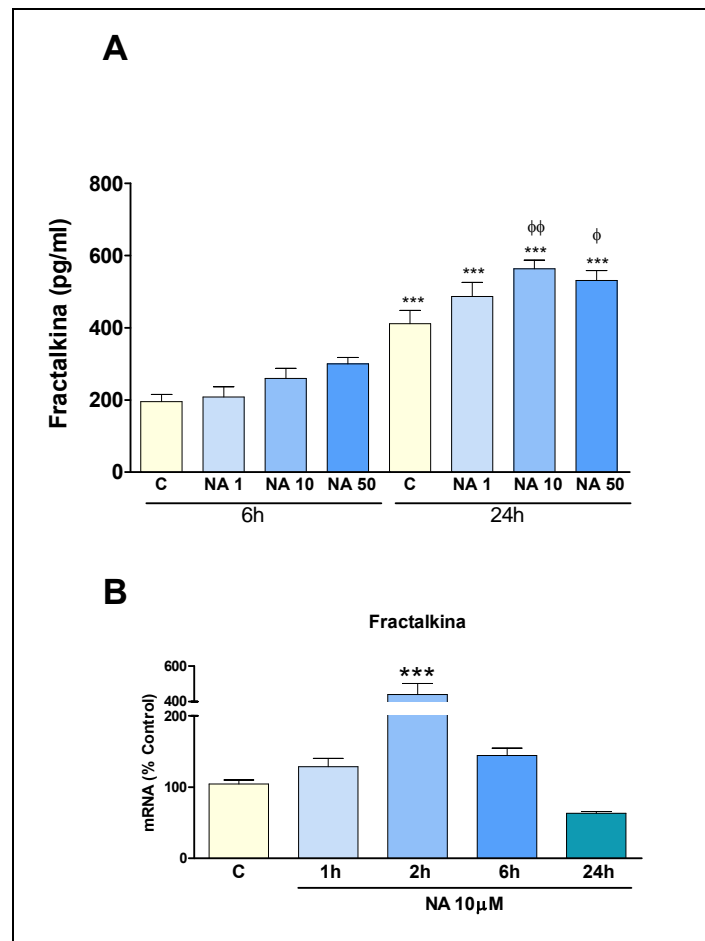
#### 4.1. Efecto de la NA en la producción de Fractalkina

Al igual que MCP-1, la Fractalkina es otra quimioquina que se expresa tanto en astrocitos y microglía, como en neuronas, y a la cual se le han atribuido recientemente, al igual que a MCP-1, propiedades neurotóxicas y propiedades neuroprotectoras (Lauro *et al.* 2010). Además se ha visto en diferentes estudios que ambas quimioquinas, MCP-1 y Fractalkina, se expresan conjuntamente en diferentes situaciones, como es el caso de la neurotransmisión en el dolor neuropático (White *et al.* 2007). Por todo ello se decidió estudiar la regulación de Fractalkina por NA sola y en presencia de un estímulo inflamatorio, como es el LPS.

##### 4.1.1. La NA induce la expresión y síntesis de Fractalkina

Inicialmente se analizó el efecto de la NA sobre la síntesis de Fractalkina en astrocitos. Para ello, se trataron cultivos de astrocitos con diferentes concentraciones de NA de entre 1 y 50  $\mu\text{M}$ , durante 6 y 24 horas y se midieron los niveles de Fractalkina liberados al medio de cultivo mediante ELISA. El resultado obtenido se muestra en la figura 25A, donde puede verse que a las 6 horas de tratamiento no se produce ningún cambio significativo en la síntesis de Fractalkina, aunque sí se observa un crecimiento dosis dependiente. A las 24 horas de tratamiento, las concentraciones de 10 y 50  $\mu\text{M}$  de NA producen un incremento significativo en la liberación de la quimioquina. Además hay que destacar que tras 24 horas de tratamiento todos los grupos, incluido el control, presentaron un aumento significativo respecto al grupo control del tratamiento a 6 horas, lo cual indica que se produce una síntesis constitutiva de Fractalkina en los astrocitos.

Para confirmar este efecto en la inducción de Fractalkina, cuantificamos su expresión por RT-PCR en cultivos de astrocitos tratados durante 24 horas con NA 10  $\mu\text{M}$  (mínima concentración a la cual habíamos observado que se producía un aumento significativo en la síntesis de Fractalkina). El resultado se muestra en la figura 25B, donde puede verse un incremento en la concentración de mRNA a las 2 horas de tratamiento. Posteriormente, la concentración disminuye hasta volver a los niveles del grupo control a las 24 horas de tratamiento.

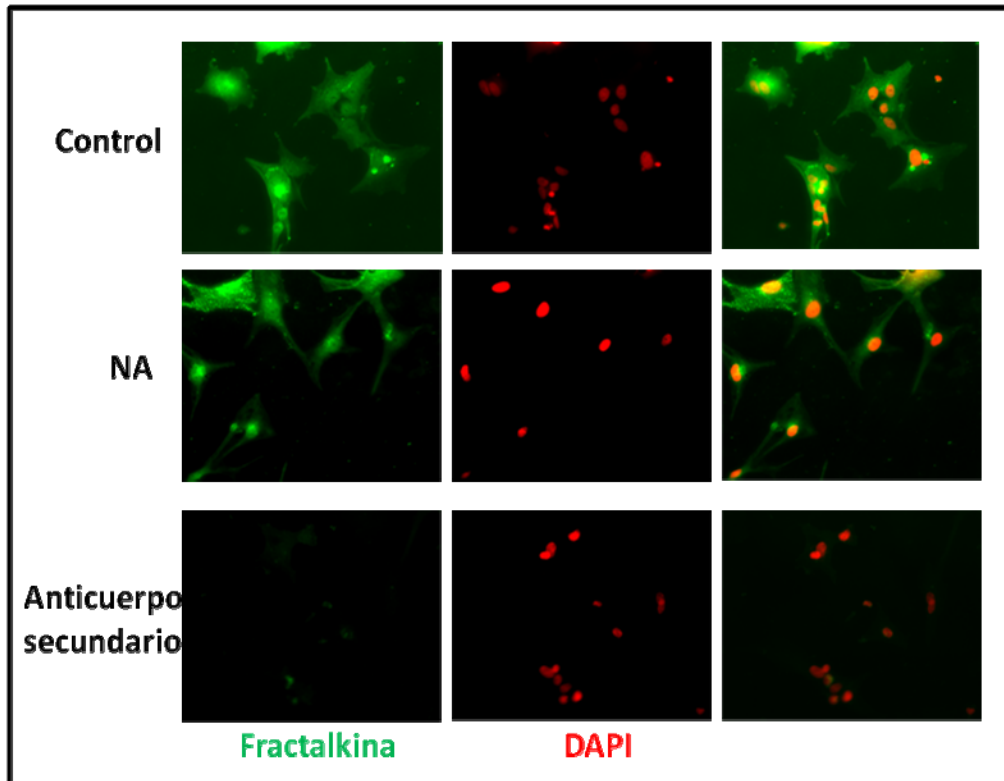


**Figura 25: La NA induce la síntesis y expresión de Fractalkina. A)** Se incubaron cultivos de astrocitos durante 6 y 24 h con NA 10  $\mu$ M y se midieron los niveles de Fractalkina liberados al medio de cultivo mediante ELISA.  $\phi\phi < 0.01$  frente al grupo control a 24h;  $\phi < 0.05$  frente al grupo control a 24h;  $*** < 0.001$  frente a control a 6h. Los datos representan la media  $\pm$  ESM para n=12 por grupo. **B)** Se incubaron cultivos primarios de astrocitos durante diferentes tiempos (1-24h) con NA 10  $\mu$ M y se cuantificaron los niveles de mRNA para Fractalkina mediante RT-PCR. Los resultados están expresados como porcentaje del valor control (se considera al control el 100%);  $*** < 0.001$  frente a control; Los datos representan la media  $\pm$  ESM para n=8 por grupo.

La producción de Fractalkina se confirmó también mediante estudios inmunocitoquímicos. Para ello se tiñeron cultivos de astrocitos sin tratar, como control, y otros tratados 6 horas con NA 10  $\mu$ M, con anticuerpos Anti-Fractalkina y con DAPI para localizar los núcleos. En la figura 26 se muestran las fotografías tomadas con microscopio para ambos cultivos, donde se observa la expresión de Fractalkina (verde) tanto en el control como en el tratamiento con NA, aunque a diferencia de las técnicas anteriores, con ésta no pudimos apreciar el aumento producido en la síntesis de la quimioquina.

## RESULTADOS

Para descartar una posible unión inespecífica del anticuerpo, se realizó un experimento donde las células se incubaron únicamente con el anticuerpo secundario. En la figura 26 se muestra una fotografía de este cultivo en la que se demuestra que no se produce una tinción inespecífica.

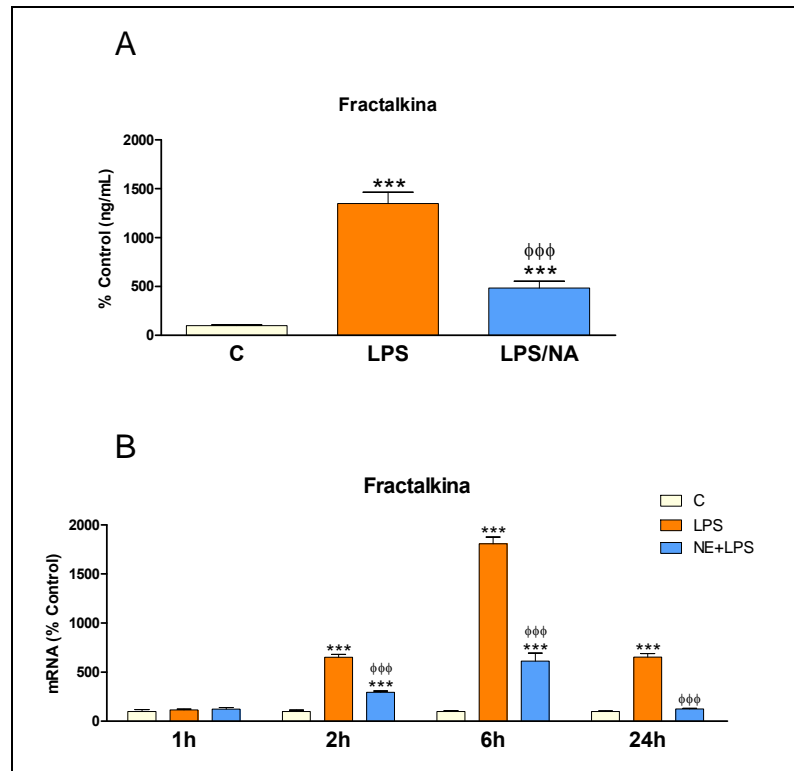


**Figura 26: Inmunotinción de Fractalkina en astrocitos tratados con NA.** Imágenes representativas de cultivos primarios de astrocitos teñidos con anti-CX3CL1 (verde) y con DAPI (rojo) tras la incubación durante 6 h con medio de cultivo, como control, o con NA 10  $\mu$ M. Las imágenes mostradas son representativas de experimentos hechos en cuatro preparaciones de astrocitos distintas.

### 4.1.2. La NA en presencia de LPS inhibe la expresión y síntesis de Fractalkina

Una vez confirmado que la NA por sí sola induce la síntesis y expresión de Fractalkina en astrocitos, se decidió cuantificar la magnitud de este efecto en presencia de un estímulo inflamatorio como es el LPS, el cual se sabe que induce la expresión de Fractalkina en el cerebro (Cerbai *et al.* 2012). Para ello se trataron cultivos de astrocitos durante 24 horas con LPS 0,1  $\mu$ g/mL, solo o en combinación con NA 10  $\mu$ M, y se midieron los niveles de Fractalkina liberados mediante ELISA (Fig. 27A). La incubación con LPS causó un incremento en la concentración de Fractalkina más de 10 veces superior al del grupo control. Esto indica que el incremento en la producción de Fractalkina causada por NA no es muy elevada respecto al potencial de estas células. Así, en el análisis de la posible interacción entre LPS y NA se observó que el efecto de LPS es inhibido por NA (Fig. 27A).

Se encontraron cambios paralelos en la cuantificación de la concentración de mRNA de Fractalkina (Fig. 27B), pues el LPS causó un incremento tras 2 horas de tratamiento que se mantuvo hasta 24 horas. La NA inhibe el efecto del LPS sobre el mRNA de Fractalkina, reduciéndolo hasta niveles control tras 24 horas de co-incubación.



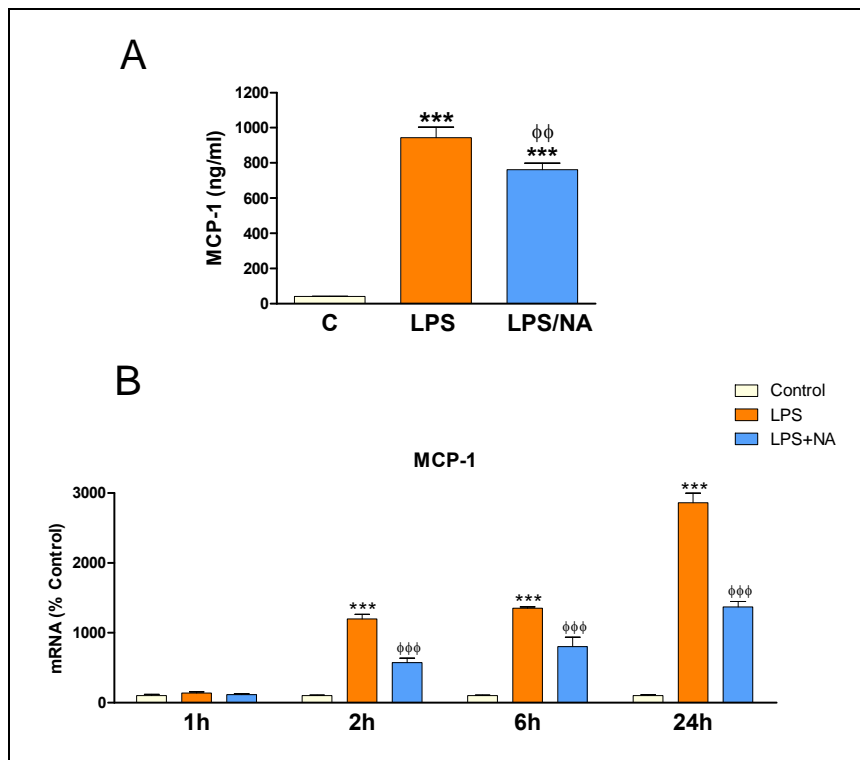
**Figura 27: La NA inhibe la síntesis de Fractalkina en presencia de LPS. A)** Se incubaron cultivos primarios de astrocitos durante 24 h con LPS 0,1 µg/mL, solo y en combinación con NA 10 µM. Se midieron los niveles de Fractalkina liberados mediante ELISA. \*\*\*p<0.001 frente a control, p <0.001 frente a LPS 0,1 µM. Los datos representan la media ± ESM para n=12 por grupo. **B)** Se incubaron cultivos de astrocitos durante diferentes tiempos (1-24h) con LPS 0,1 µg/mL, solo y en combinación con NA 10 µM y se cuantificaron los niveles de mRNA para Fractalkine mediante RT-PCR. Los resultados están expresados como porcentaje del valor control (se considera al control el 100%); \*\*\*p<0.001 frente a control, p <0.001 frente a LPS 0,1µg/mL. Los datos representan la media ± ESM para n=8 por grupo.

#### 4.2. La NA en presencia de LPS inhibe la expresión y síntesis de MCP-1

Tras haber observado este doble efecto de NA en la regulación de Fractalkina, se analizó si existe una regulación similar para MCP-1. Para ello se trataron cultivos de astrocitos durante 24 horas con LPS 0,1 µg/mL, solo o en combinación con NA 10 µM, y se midieron los niveles de MCP-1 liberados al medio de cultivo mediante ELISA (Fig. 28A). Así, se observó el mismo patrón que en el caso de Fractalkina (Fig. 27), el LPS produce un aumento significativo en los niveles de MCP-1 y

## RESULTADOS

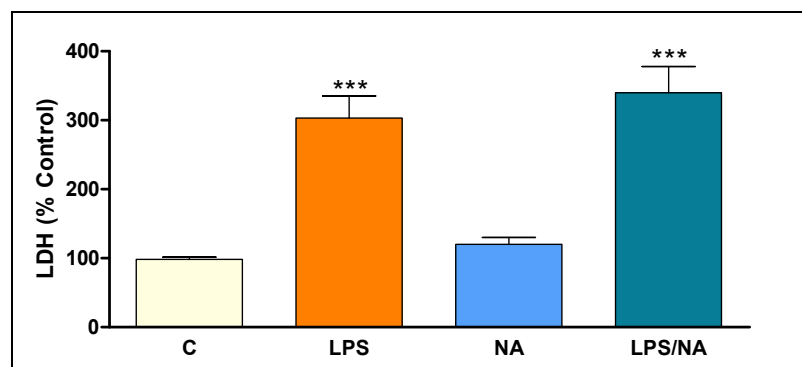
este efecto es inhibido por la presencia de NA. Este doble efecto de la NA en la regulación de MCP-1 se confirmó mediante la cuantificación de la concentración de mRNA expresado para MCP-1 mediante RT-PCR. Para ello se trataron cultivos primarios de astrocitos con LPS 0,1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , solo o en combinación con NA 10  $\mu\text{M}$  durante diferentes tiempos de entre 1 y 24 horas. El resultado, se muestra en la figura 28B. Así, a 2, 6 y 24 horas el LPS induce la expresión de MCP-1 de forma significativa, y en todos los casos la NA actúa inhibiendo este efecto. Además, aparece una inhibición del efecto del LPS menor que la observada en el caso de Fractalkina (Fig. 27).



**Figura 28: La NA inhibe la síntesis de MCP-1 en presencia de LPS. A)** Se incubaron cultivos primarios de astrocitos durante 24 h con medio de cultivo sin tratar como control y con LPS (0,1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) solo o en combinación con NA (10  $\mu\text{M}$ ). Se midieron los niveles de MCP-1 liberado al medio de cultivo mediante ELISA. \*\*\* $p < 0.001$  frente a control,  $p < 0.001$  frente a LPS 0,1  $\mu\text{M}$ . Los datos representan la media  $\pm$  EEM para  $n=12$  por grupo. **B)** Se incubaron cultivos de astrocitos durante diferentes tiempos (1-24 h) con LPS 0,1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , solo y en combinación con NA 10  $\mu\text{M}$  y se cuantificaron los niveles de mRNA para MCP-1 mediante RT-PCR. Los resultados están expresados como porcentaje del valor control (se considera al control el 100%); \*\*\* $p < 0.001$  frente a control,  $p < 0.001$  frente a LPS 0,1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Los datos representan la media  $\pm$  ESM para  $n=8$  por grupo.

### 4.3. Evaluación de la toxicidad de NA y LPS en astrocitos

Se analizó también la posible toxicidad de NA y LPS. Para ello se trataron cultivos de astrocitos durante 24 horas con con NA 10  $\mu$ M y con LPS 0,1  $\mu$ g/mL solo o en combinación con NA 10, y se midió el enzima lactato deshidrogenasa (LDH) liberado al medio de cultivo, como medida de muerte celular. El resultado obtenido se muestra en la figura 29, donde puede verse que el LPS, solo o en combinación con NA produce un aumento significativo de LDH, lo que indica un incremento en la muerte astrocítica. Por otra parte, el tratamiento con NA no parece ser tóxico para los astrocitos, ni tampoco altera la muerte inducida por el LPS. Esto sugiere que el LPS produce lo que se conoce como muerte inducida por activación, un mecanismo de defensa ante una situación de activación prolongada de los astrocitos, donde éstos comienzan a autodestruirse para evitar generar más daño a células vecinas. (Suk *et al.* 2001).



**Figura 29: Evaluación de muerte inducida por activación.** Se incubaron cultivos primarios de astrocitos durante 24h con medio de cultivo sin tratamiento, como control, con LPS 0,1  $\mu$ g/mL, con NA 10  $\mu$ M, o con la combinación de ambos. Se determinó la viabilidad celular mediante la medida de la concentración de LDH liberado al medio. Los resultados están expresados como porcentaje del valor control (se considera al control el 100%); \*\*\* $p$ <0.001 frente a control. Los datos representan la media  $\pm$  ESM para  $n=12$  por grupo

### 4.4. Efecto dual de la NA en la regulación de CCL6, CCL7, CCL12 y CXCL16

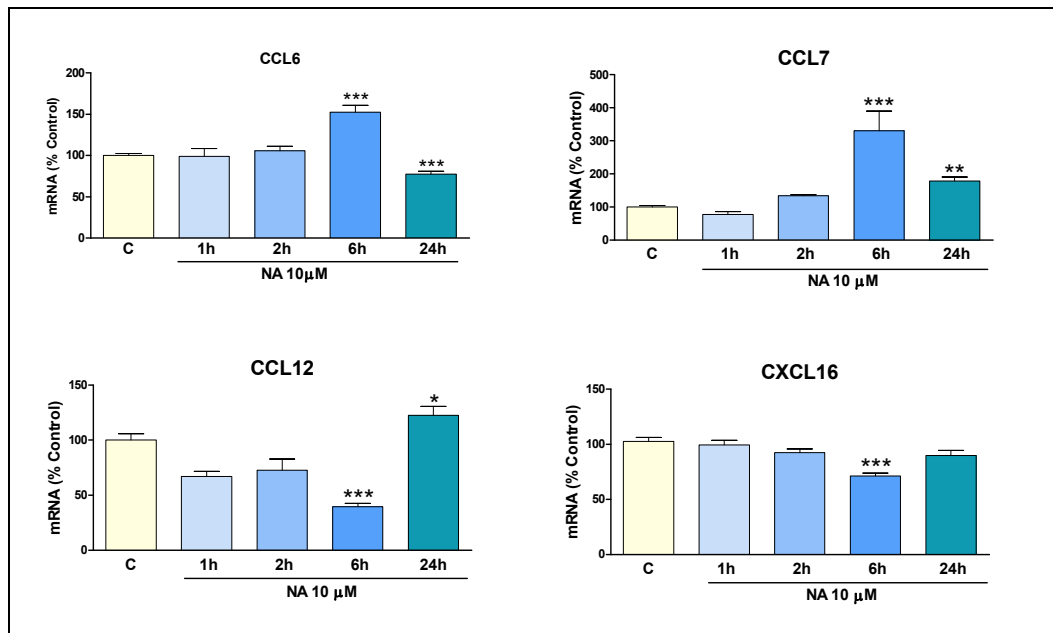
Tras analizar los resultados obtenidos para MCP-1 y Fractalkina, decidimos estudiar si este doble efecto por parte de la NA se daba también en la regulación de otras quimioquinas, ya que aunque cada quimioquina presenta características diferentes, también tienen muchas propiedades en común, pudiendo ser ésta una de ellas.

Para este estudio se eligieron cuatro quimioquinas, CCL6, CCL7 y CCL12, que comparten el receptor CCR2 con MCP-1 (Ambrosini and Aloisi, 2004), y CXCL16 la cual se ha demostrado que

## RESULTADOS

tiene efectos neuroprotectores y además participa en la modulación de MCP-1 (Rosito *et al.* 2012).

En primer lugar se cuantificó la expresión de estas quimioquinas mediante RT-PCR en cultivos primarios de astrocitos tratados con NA 10  $\mu$ M, durante diferentes tiempos de entre 1 y 24 horas. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 30, donde puede observarse que la NA regula de forma diferente las quimioquinas analizadas. La expresión de CCL6 es inducida a las 6 horas e inhibida a las 24 horas y la expresión de CCL7 es inducida tanto a las 6 horas de tratamiento como a las 24 horas, aunque en menor medida. En cambio, las quimioquinas CXCL16 y CCL12 son inhibidas tras las 6 horas de tratamiento, aunque ésta última sufre un incremento en su expresión a las 24 horas.

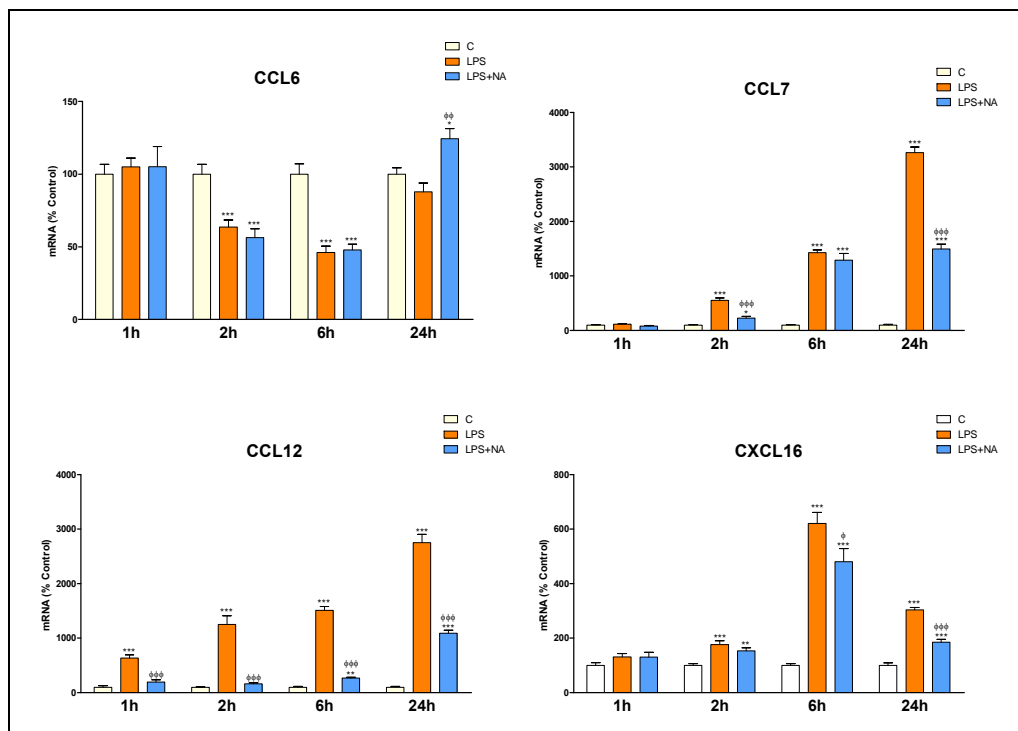


**Figura 30: Regulación de quimioquinas por NA.** Se incubaron cultivos de astrocitos con NA 10  $\mu$ M durante diferentes tiempos (1, 2, 6 y 24 h). Se cuantificaron los niveles de mRNA para las diferentes quimioquinas mediante RT-PCR. Los resultados están expresados como porcentaje del valor control (se considera al control el 100%); \*\*\* $p$ <0.001 frente a control, \*\*<0.01 frente a control, \*<0.05 frente a control. Los datos representan la media  $\pm$  ESM para  $n=8$  por grupo.

A continuación se cuantificó mediante RT-PCR la expresión de estas quimioquinas en cultivos primarios de astrocitos, tratados con LPS 0,1  $\mu$ g/mL, solo o en combinación con NA 10  $\mu$ M, durante diferentes tiempos de entre 1 y 24 horas. El resultado se muestra en la figura 31, donde se observa que para CCL7, CCL12 y CXCL16, el LPS genera un incremento muy significativo en su expresión y este efecto es revertido por la NA. Por el contrario, el tratamiento con LPS redujo los niveles de mRNA de CCL6, alcanzando su concentración más baja tras 6 horas de

incubación. A las 24 horas el tratamiento con NA revirtió el efecto del LPS elevando los niveles de mRNA de CCL6 por encima de los observados para el grupo control.

Así, puede decirse que, aunque la NA y el LPS regulen de forma diferente la expresión de estas cuatro quimioquinas, en todos los casos aparece un elemento común, que es la inhibición del efecto del LPS por parte de la NA.



**Figura 31: La NA inhibe el efecto del LPS en la regulación de quimioquinas.** Se incubaron cultivos de astrocitos durante diferentes tiempos (1, 2, 6 y 24h) con LPS 0,1 µg/mL, solo y en combinación con NA 10 µM y se cuantificaron los niveles de mRNA para las diferentes quimioquinas mediante RT-PCR. Los resultados están expresados como porcentaje del valor control; \*\*\*p<0.001 frente a control, \*\*p<0.001 frente a control, \*p<0.005 frente a control; p<0.001 frente a LPS 0,1µM, p <0.01 frente a LPS 0,1µM, p <0.05 frente a LPS 0,1µM. Los datos representan la media ± ESM para n=8 por grupo.

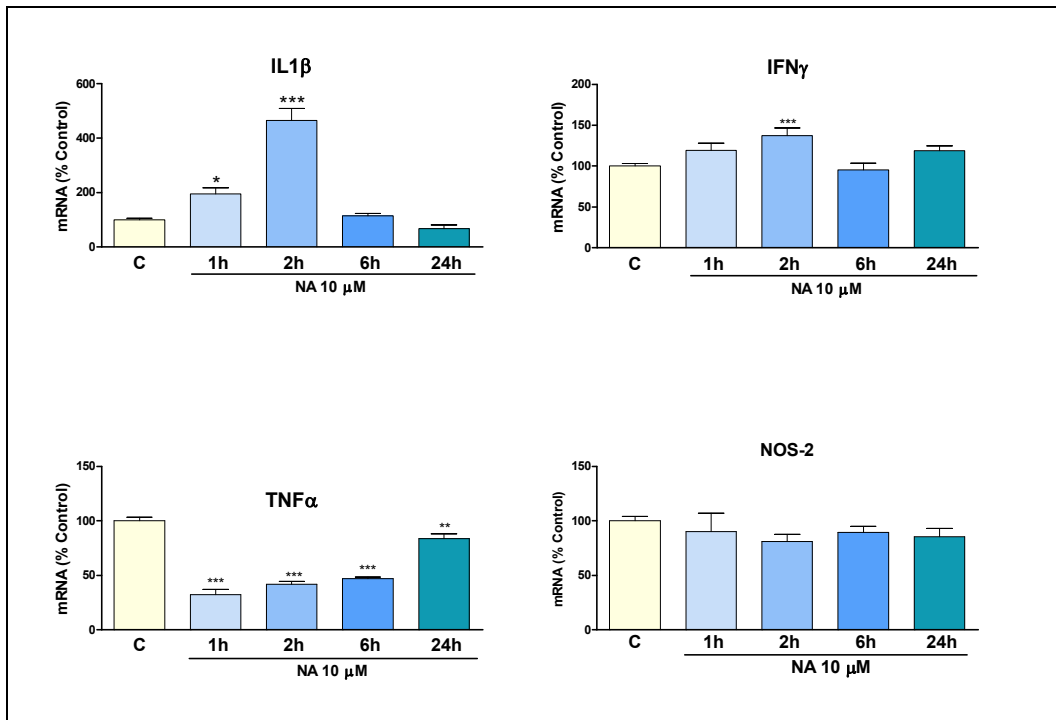
### 4.5. Efecto dual de la NA en la regulación de agentes inflamatorios

De acuerdo con nuestra hipótesis inicial, la NA podría participar en la regulación de los niveles de ciertos mediadores usados por las células cerebrales para la comunicación, manteniendo una producción constitutiva en condiciones basales. Sin embargo, cuando se produce un aumento exagerado en la concentración de los mismos como consecuencia de una lesión, la NA actúa revirtiendo este efecto, lo que ayuda a mantener la homeostasis necesaria para la supervivencia celular. Basándonos en esto, se pensó que sería interesante analizar al efecto de la NA sobre la expresión de algunos mediadores que presentan propiedades proinflamatorias bien conocidas.

Así, para este estudio elegimos, por un lado, las citoquinas  $TNF\alpha$ ,  $IL-1\beta$  e  $INF-\gamma$ , todas ellas expresadas por astrocitos y a las que se le han atribuido tanto acciones neurotóxicas (Mrak and Griffin, 2005; Zindler and Zipp, 2010), como neuroprotectoras (Carlson *et al.* 1999; Baron *et al.* 2008; Figiel 2008; Shaftel *et al.* 2008; Mastrangelo *et al.* 2009) y por otro lado, escogimos las enzimas ciclooxigenasa 2 (COX-2) y óxido nítrico sintasa inducible (NOS-2/iNOS), los cuales se sabe que tienen un papel importante en la respuesta inflamatoria, generando efectos nocivos para las neuronas (Dello *et al.* 2004; Madrigal *et al.* 2006).

#### 4.5.1. Efecto dual de la NA en la regulación de $TNF\alpha$ , $IL-1\beta$ , $INF-\gamma$ , NOS-2 y COX-2

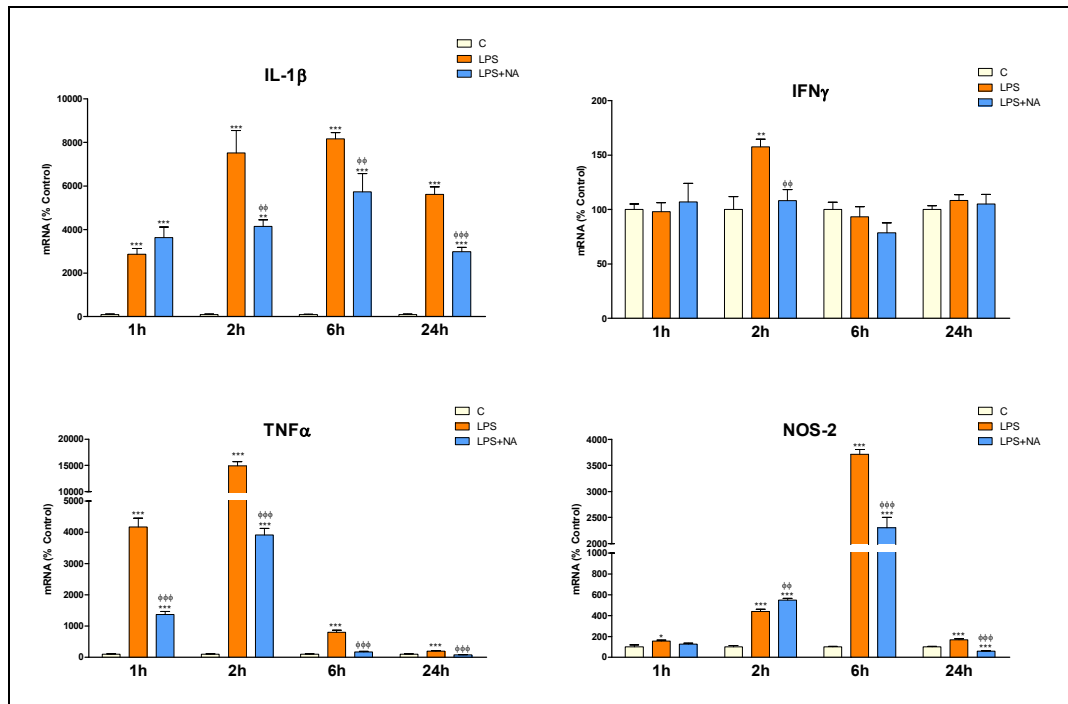
Para este estudio, en una primera parte, se determinó el efecto directo de la NA sobre estos mediadores inflamatorios. Se trataron cultivos de astrocitos con NA 10  $\mu$ M durante diferentes tiempos de entre 1 y 24 horas y se cuantificó la expresión de todos ellos mediante RT-PCR. En la figura 32 se muestran los resultados obtenidos para  $TNF\alpha$ ,  $IL-1\beta$ ,  $INF-\gamma$  y NOS-2. Como puede verse en las gráficas, tanto  $IL-1\beta$  como  $INF-\gamma$  son inducidas por NA, con un máximo a las 2 horas de tratamiento, y disminuyendo posteriormente la expresión hasta alcanzar los niveles basales. En el caso de  $TNF\alpha$ , la NA produce una disminución en su expresión en todos los tiempos analizados. Por otro lado, se muestra que los niveles de mRNA de NOS-2 no se modifican de forma significativa como resultado del tratamiento con NA.



**Figura 32: Efecto de la NA sobre la expresión de IL-1β, IFN-γ, TNFα y NOS-2.** Se incubaron cultivos de astrocitos durante diferentes tiempos (1-24h) con NA 10 μM y se cuantificaron los niveles de mRNA para IL-1β, IFN-γ, TNFα y NOS-2 mediante RT-PCR. Los resultados están expresados como porcentaje del valor control (se considera al control el 100%); \*\*\*p<0.001 frente a control, \*\*p<0.01 frente a control, \*p<0.05 frente a control. Los datos representan la media ± ESM para n=8 por grupo.

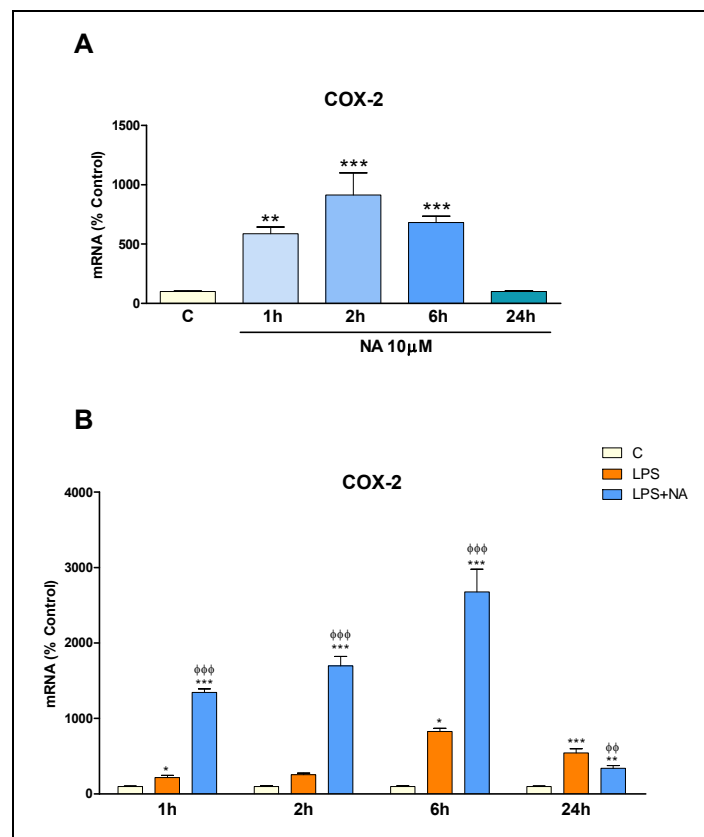
En una segunda parte de este estudio analizamos el efecto de la NA en presencia del LPS. Para ello se trataron cultivos de astrocitos con LPS 0,1 μg/mL, solo o en combinación con NA 10 μM, durante diferentes tiempos de entre 1 y 24 horas, y se analizó, mediante RT-PCR, la expresión del mRNA de estos mediadores. Los resultados obtenidos para IL-1β, IFN-γ, TNFα y NOS-2 se muestran en la figura 33, y como puede verse en todos los casos, la NA actúa inhibiendo el efecto del LPS, al igual que habíamos visto en las quimioquinas estudiadas anteriormente.

## RESULTADOS



**Figura 33: La NA inhibe el efecto de LPS en la regulación de IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$  y NOS-2.** Se incubaron cultivos primarios de astrocitos durante diferentes tiempos (1, 2, 6 y 24h) con LPS 0,1  $\mu$ g/mL, solo y en combinación con NA 10  $\mu$ M y se cuantificaron los niveles de mRNA para las diferentes quimioquinas mediante RT-PCR. Los resultados están expresados como porcentaje del valor control. \*\*\*p<0.001 frente a control, \*\*p<0.01 frente a control, \*p<0.05 frente a control;  $\phi$ p<0.001 frente a LPS 0,1 $\mu$ g/mL,  $\phi$ <0.001 frente a LPS 0,1 $\mu$ M,  $\phi$ p<0.05 frente a LPS 0,1 $\mu$ g/mL. Los datos representan la media  $\pm$  ESM para n=8 por grupo

Al igual que NOS-2, COX-2 es otro enzima que cataliza la producción de distintos productos, alguno de los cuales presentan potencial inflamatorio. Por esto, se analizó también la regulación por NA de la expresión de COX-2 en astrocitos. Así, la NA induce la expresión de COX-2 como se muestra en la figura 34A, siendo ésta máxima a las 2 horas de tratamiento. Pero, a diferencia del patrón visto hasta ahora, la NA potencia el efecto del LPS en vez de inhibirlo (Figura 34B). Así en cultivos primarios de astrocitos tratados con LPS en combinación con NA, a todos los tiempos estudiados se observa un aumento significativo de la expresión de COX-2 respecto al tratamiento con LPS solo.

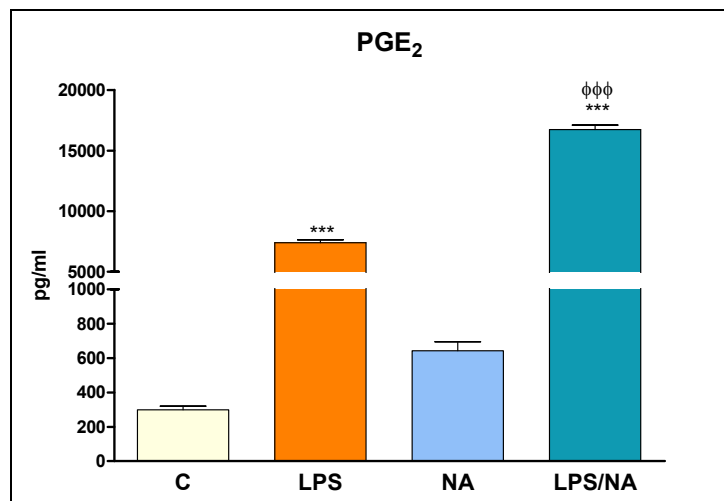


**Figura 34: Regulación de COX-2 por NA.** **A)** Se incubaron cultivos primarios de astrocitos durante diferentes tiempos (1, 2, 6 y 24h) con NA 10 μM y se cuantificó el nivel de mRNA para COX-2 mediante RT-PCR. Los resultados están expresados como porcentaje del valor control (se considera al control el 100%); \*\*\*p<0.001 frente a control, \*\*p<0.01 frente a control. Los datos representan la media ± ESM para n=8 por grupo; **B)** Se incubaron cultivos primarios de astrocitos durante diferentes tiempos (1, 2, 6 y 24h) con LPS 0,1 μg/mL, solo y en combinación con NA 10 μM y se cuantificó el nivel de mRNA para COX-2 mediante RT-PCR. Los resultados están expresados como porcentaje del valor control (se considera al control el 100%); \*\*\*p<0.001 frente a control, \*p<0.05 frente a control; p<0.001 frente a LPS 0,1μg/mL, φφφ p<0.001 frente a LPS 0,1μg/mL. Los datos representan la media ± ESM para n=8 por grupo.

El patrón encontrado en la regulación de COX-2 por NA en presencia de LPS es diferente al observado para las demás proteínas analizadas en este estudio. Por ello se decidió estudiar el efecto de la NA y el LPS en la cascada de señalización del enzima COX-2, concretamente se estudió la vía de la prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>). Se ha demostrado que la enzima COX-2 puede activar tanto vías inflamatorias, como vías antiinflamatorias, siendo la PGE<sub>2</sub> el mediador proinflamatorio mejor caracterizado. Sin embargo, recientemente, a esta prostaglandina se le han atribuido también funciones antiinflamatorias y neuroprotectoras mediadas por su receptor EP2 (Kim *et al.* 2002; Milatovic *et al.* 2011).

## RESULTADOS

Así, en cultivos primarios de astrocitos tratados durante 24 horas con LPS 0,1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , solo o en combinación con NA 10  $\mu\text{M}$ , se midió la liberación de  $\text{PGE}_2$  al medio de cultivo mediante un inmunoensayo enzimático específico, como se explica en el apartado de material y métodos. El resultado obtenido aparece en la figura 35, donde se observan cambios similares a los encontrados para COX-2, pues la NA también potencia el efecto de LPS, haciendo que aumenten los niveles de  $\text{PGE}_2$ .

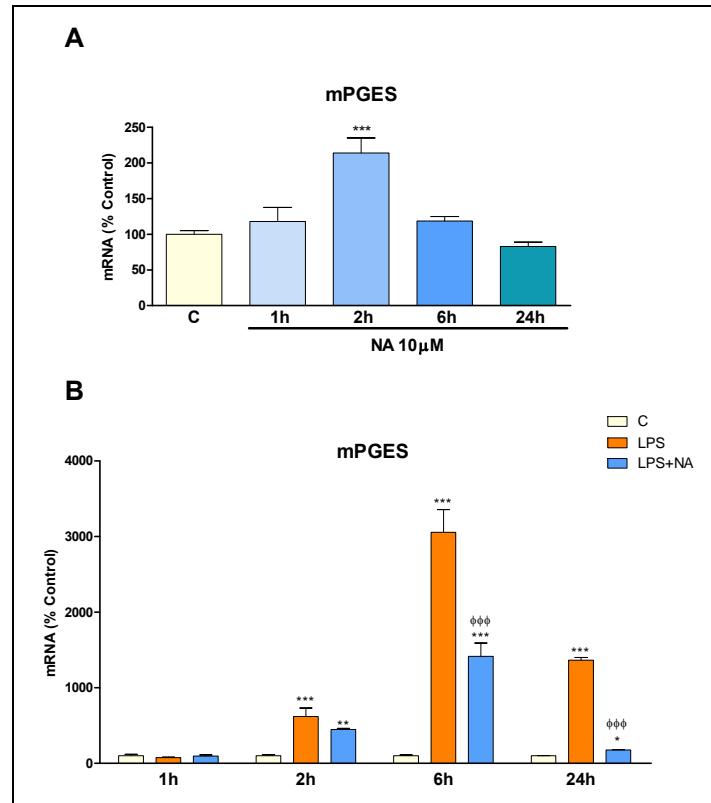


**Figura 35: Cuantificación de  $\text{PGE}_2$  en astrocitos.** Se incubaron cultivos de astrocitos durante 24 h con LPS 0,1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , con NA 10  $\mu\text{M}$  y con la combinación de ambos. Se cuantificaron los niveles de  $\text{PGE}_2$  liberados al medio de cultivo mediante EIA; \*\*\* $p < 0.001$  frente a control;  $p < 0.0001$  frente a LPS 0,1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Los datos representan la media  $\pm$  EEM para  $n=8$  por grupo.

A continuación se analizó la expresión de las distintas formas del PGES, enzimas implicados en la síntesis de  $\text{PGE}_2$  (Milatovic *et al.* 2011). Sólo se encontraron diferencias en la forma inducible PGES1 (mPGE2).

Para el estudio se cuantificó la expresión mPGES mediante RT-PCR en cultivos de astrocitos tratados con NA 10  $\mu\text{M}$  durante diferentes tiempos de entre 1 y 24 horas (Fig. 36A), y en cultivos de astrocitos tratados con LPS 0,1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , solo o en combinación con NA 10  $\mu\text{M}$ , durante diferentes tiempos de entre 1 y 24 horas (Fig. 36B). Los resultados obtenidos son análogos a los observados para los demás agentes inflamatorios estudiados hasta ahora. Por un lado, la NA por sí sola es capaz de inducir la expresión de la sintasa con un máximo a las 2 horas de tratamiento, lo que estaría de acuerdo con el efecto sobre la enzima COX-2 (Fig. 34A). En cambio, el tratamiento combinado de LPS con NA no aumenta la concentración de mRNA de la mPGES (Fig. 36B). La expresión de la sintasa, inducida por el LPS, es inhibida por la presencia de

NA. Este resultado, por tanto, no explica el aumento de PGE<sub>2</sub> observado en el tratamiento combinado de LPS y NA respecto al de LPS solo.

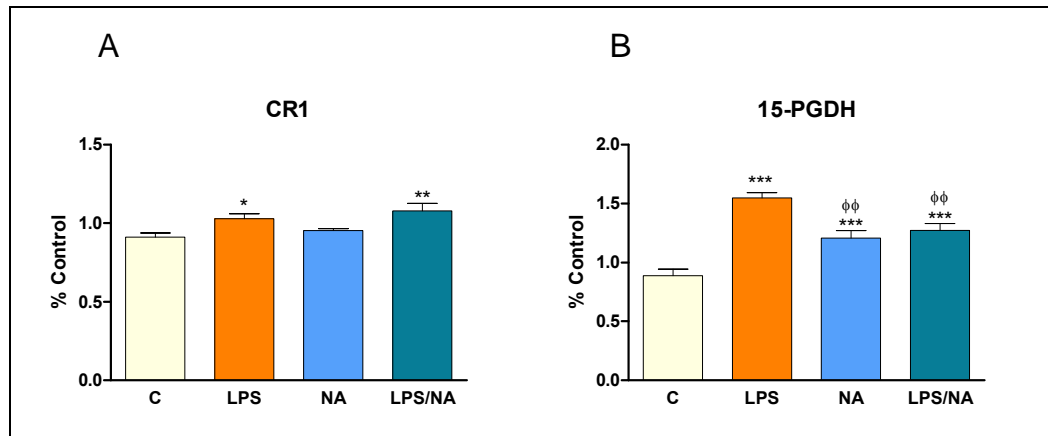


**Figura 36: Regulación de mPGES por NA. A)** Se incubaron cultivos primarios de astrocitos durante diferentes tiempos (1, 2, 6 y 24h) con NA 10 μM y se cuantificó el nivel de mRNA para mPGES mediante RT-PCR. Los resultados están expresados como porcentaje del valor control (se considera al control el 100%); \*\*\*p<0.001 frente a control. Los datos representan la media ± ESM para n=8 por grupo; **B)** Se incubaron cultivos primarios de astrocitos durante diferentes tiempos (1, 2, 6 y 24h) con LPS 0,1 μg/mL, solo y en combinación con NA 10 μM y se cuantificó el nivel de mRNA para mPTGES mediante RT-PCR. Los resultados están expresados como porcentaje del valor control (se considera al control el 100%); \*\*\*p<0.001 frente a control, \*\*p<0.01 frente a control, \*p<0.05 frente a control; p <0.001 frente a LPS 0,1μg/mL, p <0.01 frente a LPS 0,1μg/mL, p <0.05 frente a LPS 0,1μg/mL. Los datos representan la media ± ESM para n=8 por grupo.

Habiendo observado esta discordancia entre la producción de PGE<sub>2</sub> y la modificación de los niveles de mRNA del enzima responsable de su síntesis, se decidió estudiar el efecto de la NA sobre los principales mecanismos de degradación de la PGE<sub>2</sub>, ya que esta podría ser la causa por la cual se producía un incremento en la concentración tanto de la enzima COX-2, como de la prostaglandina. Se analizaron los enzimas CR1 y 15-PGDH, principales agentes responsables de la degradación de PGE<sub>2</sub> (Alix *et al.* 2008 ;Ivanov *et al.* 2003; Wakimoto *et al.* 2008), cuantificando la expresión de su mRNA mediante RT-PCR , en cultivos primarios de astrocitos tratados durante 24

## RESULTADOS

horas con LPS 0,1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , solo o en combinación con NA 10  $\mu\text{M}$ . Los resultados se muestran en la figura 37, donde se observa que la NA es capaz de inhibir la inducción del enzima 15-PGDH causada por LPS. Esto podría explicar el aumento detectado en la expresión de COX-2 y de PGE<sub>2</sub>, tras el co-tratamiento con LPS y NA.



**Figura 37: Regulación de CR1 y 15-PGDH por LPS y NA.** Se incubaron cultivos primarios de astrocitos durante diferentes tiempos (1, 2, 6 y 24h) con medio de cultivo sin tratar como control, con LPS (0,1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), con NA (10  $\mu\text{M}$ ), o con la combinación de ambos. Se cuantificaron los niveles de mRNA mediante RT-PCR para CR1 (A) y para 15-PGDH (B). Los resultados están expresados como porcentaje del valor control (se considera al control el 100%); \*\*\* $p < 0.0001$  frente a control, \*\* $p < 0.01$  frente a control, \* $p < 0.05$  frente a control;  $\phi\phi$   $p < 0.01$  frente a LPS 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Los datos representan la media  $\pm$  ESM para  $n=8$  por grupo.

## VII.DISCUSIÓN



## VII. DISCUSIÓN

La reducción de los niveles cerebrales de NA característica de distintas enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Parkinson (Bondareff *et al.* 1981; Fornai *et al.* 2007), junto con los efectos neuroprotectores de la NA, constituyen la base de nuestro estudio de los mecanismos a través de los cuales la NA evita la progresión de dichas patologías.

Datos previos demuestran que la NA induce la producción de MCP-1 en astrocitos. A esta quimioquina se le han atribuido diferentes funciones neuroprotectoras, de hecho la inducción de MCP-1 en astrocitos por NA demostró proteger cultivos de neuronas frente a excitotoxicidad (Madrigal *et al.* 2009). Basándonos en estos datos, en esta Tesis Doctoral se ha analizado la implicación de receptores adrenérgicos en la inducción de MCP-1 en astrocitos, el efecto directo de esta quimioquina sobre microglía y sobre neuronas así como la regulación de diferentes quimioquinas y ciertos mediadores proinflamatorios por parte de la NA.

### 1. REGULACIÓN POR NORADRENALINA DE MCP-1 EN ASTROCITOS

Anteriormente se había descrito en el grupo de investigación en el que se realizó este estudio que la NA induce la expresión de MCP-1 en cultivos primarios de astrocitos de corteza cerebral (Madrigal *et al.* 2009), y que la protección frente a estímulos excitotóxicos proporcionada por esta quimioquina podría ser uno de los mediadores responsables de la acción neuroprotectora de la NA. Se sabe que la NA previene frente a la degeneración neuronal característica de enfermedades neurodegenerativas como son la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Parkinson (Bondareff *et al.* 1981; Fornai *et al.* 2007), lo que podría sugerir que la inducción de MCP-1 por NA en astrocitos podría proporcionar efectos beneficiosos. Por todo ello, el primer objetivo fue analizar si la alteración de los niveles cerebrales de NA podría modular la producción de MCP-1.

Puesto que la corteza cerebral es una de las áreas más afectadas en la enfermedad de Alzheimer (Wenk, 2006), se decidió centrar el estudio en este área cerebral. Estos estudios se realizaron usando un modelo de estrés por inmovilización en ratas, el cual está bien establecido y caracterizado en estos animales (Morilak *et al.* 2005). El sistema noradrenérgico se activa por un estrés agudo y la exposición de animales de experimentación a este tipo de estímulos constituye

una de las vías más fáciles y fiables para conseguir un aumento de los niveles fisiológicos de NA en el cerebro (Glavin, 1985). Sin embargo, solo se detectó una inducción moderada de MCP-1 en la corteza cerebral de animales estresados, esto sugiere que la activación fisiológica del sistema noradrenérgico no es suficiente para generar un gran incremento en la producción de MCP-1, o que en estas condiciones existe algún otro mecanismo que controla la síntesis de MCP-1. Esta última parece ser una posibilidad más factible, ya que las consecuencias de una inducción incontrolada de un agente quimioatrayente podrían ser perjudiciales. De hecho, una producción exagerada de MCP-1 parece ser una de las causas responsables de la progresión de una enfermedad autoinmune como la esclerosis múltiple (Van *et al.* 1999).

Los glucocorticoides (GC), liberados en grandes cantidades por las glándulas suprarrenales durante la respuesta a estrés, son capaces de atravesar la BHE e interactuar con las células cerebrales (Sapolsky, 2000). Son conocidos por su elevada actividad antiinflamatoria (Schleimer, 1993) y se han descrito como inhibidores específicos de MCP-1 en diferentes tipos celulares como fibroblastos (Kawahara *et al.* 1991), células peritoneales (Mizobe *et al.* 1997) o microglía (Zhou *et al.* 2007). Además, también, se ha observado una reducción en los niveles de MCP-1 y de su principal receptor CCR2 por acción de los glucocorticoides en el hipocampo (Little *et al.* 2006).

De acuerdo con esto, es razonable esperar que una concentración elevada de GC generada tras la respuesta al estrés, produjese un bloqueo en la inducción de MCP-1 causada por NA o por otros agentes activados por los mismos estímulos.

Para comprobar esta hipótesis, se estudió el efecto directo del tratamiento de cultivos primarios de astrocitos con corticosterona, principal glucocorticoide en roedores. Los resultados confirman que esta hormona es capaz de bloquear la producción basal de MCP-1 así como la inducida por NA. A continuación, se estudió este efecto *in vivo*, empleando metirapona para bloquear la síntesis de glucocorticoides en ratas estresadas. El gran aumento en la concentración de MCP-1 detectado en ratas estresadas con la producción de GC bloqueada, junto con los resultados obtenidos *in vitro*, indican que la NA y los GC ejercen efectos opuestos en la síntesis de MCP-1 en corteza cerebral durante la respuesta a estrés. Estos efectos opuestos de NA y GC sugieren la existencia de una regulación compleja de la síntesis de MCP-1, en la cual la alteración de alguno de estos componentes podría conducir una sobreexpresión o una sobreexpresión de MCP-1. Además, la acción inhibitoria de los GC sobre la expresión de las catecolaminas (Kvetnansky *et al.* 1993) podría complementar el efecto directo observado en la regulación de MCP-1 por corticosterona.

El principal escenario clínico en el cual estos dos mediadores están regulados como se ha descrito anteriormente, es la depresión mayor. Así, los pacientes con depresión presentan niveles elevados de GC (Carroll *et al.* 1976) y un déficit en los niveles de NA (Leonard, 1997). Estas condiciones pueden conducir a una regulación incorrecta de ciertos agentes biológicos, y de acuerdo con los resultados expuestos aquí, MCP-1 podría ser uno de ellos. De hecho, se ha demostrado en este estudio que el tratamiento con el antidepresivo desipramina genera un aumento en la concentración de MCP-1 en corteza cerebral, confirmando la capacidad de fármacos que elevan los niveles de NA para producir un aumento de MCP-1 en ausencia de una respuesta a estrés.

Aunque existen numerosos estudios sobre el papel de MCP-1 en la respuesta inflamatoria como quimioatrayente de células inmunes (Charo and Taubman, 2004; Ballantyne and Nambi, 2005), publicaciones recientes describen que este efecto también puede ejercerse sobre progenitores neuronales dirigiéndolos hacia el sitio de neuroinflamación (Belmadani *et al.* 2006), donde estos podrían presentar efectos antiinflamatorios o neurogénicos. Además, MCP-1 ha sido descrito como un agente neuroprotector frente a ciertos agentes como el péptido  $\beta$ A (Bruno *et al.* 2000), tat o NMDA (Eugenin *et al.* 2003). De hecho, estudios llevados a cabo por el grupo de investigación donde se ha realizado esta Tesis Doctoral indican que MCP-1 puede proteger neuronas en condiciones de isquemia, en un modelo de privación de oxígeno y glucosa (Madrugal *et al.* 2009). Todo esto indica que la regulación farmacológica de MCP-1 podría ser beneficiosa en el tratamiento de lesiones neurodegenerativas. Así, la identificación de fármacos o tratamientos que modulen los niveles cerebrales de MCP-1 podría tener implicaciones terapéuticas. Por lo que se propone que, puesto que NA induce la síntesis de MCP-1 en astrocitos, ciertos fármacos u otros tratamientos que modulen los niveles de NA podrían ser usados para alterar la producción de MCP-1 en el cerebro.

La atracción de células inflamatorias causada por la presencia de concentraciones elevadas de MCP-1 en ciertas áreas cerebrales, como las células vasculares de la BHE (Cardona *et al.* 2008), puede ser perjudicial ya que puede producir un daño colateral en células cercanas al lugar de la lesión. También, una exagerada producción de MCP-1 en el cerebro puede tener efectos negativos, como se ha demostrado recientemente (Kiyota *et al.* 2009). Sin embargo, el estudio presentado en esta Tesis Doctoral sugiere que en condiciones normales, la producción constitutiva de MCP-1 podría estar ejerciendo ciertas acciones neuroprotectoras, y su ausencia o reducción podría promover el desarrollo de algunos procesos neurotóxicos como excitotoxicidad o la acumulación de placas amiloides.

Como hemos visto, una de las mayores fuentes de NA en el cerebro son las neuronas del LC y las del segmento ventrolateral. Desde estas áreas se originan varias proyecciones que distribuyen la NA por diferentes regiones del SNC interaccionando con los distintos tipos celulares (Cohen and Almazan 1993; Morin *et al.* 1997; Tanaka *et al.* 2004; Papay *et al.* 2004). De estas células, los astrocitos son la principal fuente de MCP-1 en el SNC (Glabinski *et al.* 1996; Babcock *et al.* 2003) y presentan receptores adrenérgicos tipo  $\alpha$  y  $\beta$  (Salm and McCarthy, 1989; Morin *et al.* 1997; Juric *et al.* 2008; Hertz *et al.* 2010). La existencia de diferentes subtipos de receptores indica que la NA es un importante regulador de la actividad astrocítica. Y este papel regulador podría implicar otras funciones aparte de las ya conocidas como son la movilización de calcio (Salm and McCarthy, 1989) o la participación en el metabolismo energético (Magistretti, 1988).

Los datos presentados aquí demuestran la implicación del receptor  $\alpha_2$  adrenérgico en la regulación de la expresión de MCP-1 en astrocitos aislados. Se ha descrito que desipramina y atomoxetina actúan inhibiendo la recaptación de NA mediante el bloqueo de los transportadores de noradrenalina (NAT) (Javaid *et al.* 1979; Bymaster *et al.* 2002; Zhou *et al.* 2007). Como resultado de esto, la NA se acumula en el espacio extracelular corrigiendo una de los principales desregulaciones responsables del desarrollo de comportamientos depresivos.

Mientras que la depresión y otros trastornos neuropsiquiátricos parecen estar relacionados principalmente con alteraciones en el funcionamiento y la transmisión neuronal, las células gliales parecen estar también involucradas en estas patologías (Gittins and Harrison, 2011). De hecho, en este estudio se describe un efecto directo de fármacos antidepresivos sobre células gliales.

La expresión de los transportadores de NA en astrocitos se ha propuesto como una posible estrategia protectora, la cual inactiva la NA que no es recuperada por los terminales nerviosos (Inazu *et al.* 2003). El bloqueo de estos transportadores en cultivos de astrocitos podría traducirse en una reducción en el transporte de NA presente en el medio de cultivo, la cual podría aumentar sus interacciones con los receptores adrenérgicos. Para descartar esta posibilidad, se realizó un procedimiento similar al de los experimentos, pero sin suero fetal presente en el medio de cultivo; en estas condiciones ambos antidepresivos estudiados indujeron MCP-1 (datos no mostrados), sugiriendo que sus acciones no están mediadas por otros agentes de naturaleza desconocida.

La existencia de múltiples sitios de unión para la desipramina en el cerebro (Backstrom *et al.* 1989), junto con la regulación por el tratamiento con desipramina sobre la expresión de los receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos en la corteza cerebral (Subhash *et al.* 2003) o en el hipocampo (Giaroni *et al.* 2008), y la inhibición del efecto de clonidina en pacientes depresivos (Checkley *et al.* 1981), sugieren la posible implicación del receptor  $\alpha_2$  en el mecanismo de acción de la desipramina. Esto se ha confirmado también por múltiples estudios de comportamiento (Zhang *et al.* 2009) que enfatizan la importancia del receptor  $\alpha_2$  postsináptico en el efecto antidepressivo de la desipramina. En base a esto, habiéndose descrito previamente la inducción de MCP-1 mediante la activación de los receptores  $\beta$  adrenérgicos (Madrigal *et al.* 2009) y considerando el efecto retroinhibitorio que desempeñan los receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos en la neurotransmisión adrenérgica, nos pareció interesante analizar la participación de estos receptores en la regulación de MCP-1.

La reducción por clonidina del efecto de NA observado indica que el receptor  $\alpha_2$  podría actuar conteniendo la excesiva producción de MCP-1. Estos datos también sugieren que en condiciones normales la activación de receptores  $\beta$  adrenérgicos por NA prevalece sobre su efecto sobre los receptores  $\alpha_2$ . El incremento en la producción de MCP-1 causado por antagonistas  $\alpha_2$  (yohimbina) en presencia del agonista  $\beta$  isoproterenol confirma esta hipótesis.

La NA es conocida, entre otras cosas, por estimular la producción de factores tróficos y neuroprotectores en astrocitos (Schwartz and Nishiyama, 1994). Esta acción se lleva a cabo principalmente por la activación de los receptores  $\beta$  adrenérgicos, mientras que la activación de los  $\alpha_2$  no parece participar en estos efectos (Juric *et al.* 2008). Puesto que los receptores  $\alpha_2$  contrarrestan las acciones reguladas por los receptores  $\beta$  en múltiples condiciones, se podría deducir que la interacción de NA con los receptores  $\alpha_2$  también funciona como un mecanismo para restringir la producción de MCP-1 causada por la acción de los receptores tipo  $\beta$ . De acuerdo con ello, nuestros resultados muestran que el bloqueo de receptores  $\alpha_2$  interfiere con este proceso y facilita la expresión de más MCP-1. Todavía no conocemos la naturaleza de los mediadores que participan en este proceso, por lo que su estudio constituiría un nuevo campo de investigación muy interesante.

La inducción de MCP-1 causada por el tratamiento con dibutiril-AMPC (un análogo sintético del AMPC) (Madrigal *et al.* 2009) indica que AMPC podría ser el segundo mensajero responsable de la inducción de MCP-1 en astrocitos. La disminución de AMPC, como consecuencia

de la activación de los receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos en astrocitos (Renauld *et al.* 2004), podría explicar la reducción en la producción de MCP-1 causada por el tratamiento con clonidina.

Como se mencionó anteriormente, mientras que las neuronas y la microglía también producen MCP-1, los astrocitos son la principal fuente en el cerebro (Babcock *et al.* 2003; Glabinski *et al.* 1996). Este hecho le confiere más relevancia al estudio de los mecanismos que controlan la producción de MCP-1 en este tipo de células. La concentración de MCP-1 en el cerebro se encuentra muy elevada tras producirse diferentes tipos de lesiones (Glabinski *et al.* 1996; Ghirnikar *et al.* 1996; Galasso *et al.* 2000; Flugel *et al.* 2001), esto provoca la atracción de células que desarrollan la respuesta inflamatoria. Sin embargo, nuestros datos indican que MCP-1 puede estimular la proliferación microglial sin causar su activación. Además, sabemos que MCP-1 participa en otros procesos que no están relacionados con la inflamación. Uno de los mejor estudiados es su capacidad para atraer progenitores neuronales (Widera *et al.* 2004) y su contribución en la reparación de lesiones cerebrales (Belmadani *et al.* 2006).

La NA o antidepresivos tricíclicos son capaces de regular la neurogénesis (Malberg *et al.* 2000; Santarelli *et al.* 2003; Benekareddy *et al.* 2008). Los resultados presentados aquí confirman la participación de los receptores adrenérgicos en la expresión de MCP-1 en astrocitos y además también se ha demostrado el potencial de los antidepresivos para estimular la producción de MCP-1 en células cerebrales. En resumen, la inducción por NA, o por antidepresivos, de MCP-1 y la participación de estos tres factores en la neurogénesis sugiere que alguna de sus funciones fisiológicas podrían estar dirigidas en la misma dirección o incluso ser cooperativas.

## 2. EFECTO NEUROPROTECTOR DE MCP-1

En este estudio se ha demostrado que MCP-1 a una concentración de 10 ng/mL protege cultivos primarios de neuronas frente a la muerte inducida por un agente proapoptótico como la staurosporina. También se ha demostrado que el tratamiento de neuronas con MCP-1 produce un aumento de las proteínas Akt y P-Bad (Franke *et al.* 2003), lo que podría indicar que este es uno de los mecanismos a través de los cuales MCP-1 ejerce su efecto neuroprotector. Esto está de acuerdo con estudios realizados por otros autores donde se muestra que MCP-1 es capaz de activar proteínas antiapoptóticas como Akt y ERK en neuronas y en astrocitos, favoreciendo la supervivencia celular (Gosselin *et al.* 2005; Quinones *et al.* 2008; Yao *et al.* 2009).

Habiendo observado que el tratamiento con MCP-1 no modifica la concentración de mRNA de Akt, se estudió el efecto de MCP-1 sobre el sistema ubiquitina-proteasoma, el cual se sabe que participa en la regulación de Akt (Keller *et al.* 2002; Yan *et al.* 2006). Este sistema es la principal vía de degradación de proteínas en células eucariotas. La degradación se produce en dos pasos, en primer lugar las proteínas se conjugan con un polipéptido de ubiquitinas y posteriormente estas proteínas conjugadas son reconocidas por el proteasoma que las degrada (Nakayama *et al.* 2001). Además, diferentes estudios han implicado este sistema en la transducción de señales celulares, ya que un gran número de moléculas se degradan mediante el mismo, como son proteínas del ciclo celular (ciclina dependiente de kinasas), reguladores transcripcionales ( $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ , HIF o c-fos) y proteínas implicadas en la apoptosis celular (Akt, p53 y Bax). De hecho, los inhibidores del proteasoma se han utilizado como herramientas biológicas para modular diferentes procesos celulares como la proliferación, la regulación génica o la apoptosis (Lee and Goldberg, 1998; Ciechanover and Schwartz, 1998; Kornitzer and Ciechanover, 2000), y son considerados como fármacos terapéuticos en el tratamiento de ciertos tumores y en enfermedades que cursan con inflamación, ya que inhiben NF- $\kappa$ B (Nakayama *et al.* 2001).

Así, tras analizar el efecto de MCP-1 sobre la actividad del proteasoma y no encontrar diferencias significativas (el resultado no se muestra aquí), se estudió en cultivos primarios de neuronas, el efecto de MCP-1 sobre la ubiquitinación de Akt. Y se ha podido demostrar que esta quimioquina evita la ubiquitinación de Akt inducida por staurosporina. Por tanto, es posible que este mecanismo reduzca la degradación de Akt.

De acuerdo con los resultados expuestos en este estudio, donde se ha demostrado que los efectos neuroprotectores de MCP-1 podrían estar mediados por Akt, recientemente se ha demostrado MCP-1 bloquea la apoptosis constitutiva en neutrófilos sanos a través del receptor CCR2 y que la señalización antiapoptótica de MCP-1 incluye las proteínas PI3K, Akt, ERK y NF- $\kappa$ B (Yang *et al.* 2011a).

Aunque las células gliales (microglía y astrocitos) son la principal fuente de quimioquinas en el cerebro, se ha demostrado recientemente que ciertas quimioquinas se expresan también en neuronas, participando en procesos de neurotransmisión. (Gosselin *et al.* 2005; Mojsilovic *et al.* 2007). Junto a esto han demostrado que MCP-1 presenta una expresión constitutiva en neuronas de la espina dorsal, y que produce la inducción de la proteína Akt mediante la activación de su principal receptor CCR2.

En resumen, en este estudio se ha demostrado que MCP-1 es capaz de proteger neuronas frente a ciertos agentes proapoptóticos como la staurosporina. También se ha demostrado que MCP-1 produce un aumento en las proteínas antiapoptóticas Akt y P-Bad, pudiendo ser este uno de los mecanismos neuroprotectores a través de los cuales actúa MCP-1. Esto indicaría que MCP-1 en condiciones basales presenta ciertas propiedades beneficiosas para la supervivencia neuronal, por lo que sería interesante realizar una investigación más exhaustiva del mecanismo de actuación de esta quimioquina.

### 3. EFECTO DE MCP-1 SOBRE LA MICROGLÍA

Los datos presentados aquí analizan la activación microglial como una consecuencia del tratamiento de MCP-1. Mientras que no se han podido detectar cambios morfológicos o producción de mediadores inflamatorios, sí se ha encontrado que MCP-1 estimula la formación de nueva microglía. Esto sugiere que MCP-1 podría elevar la concentración de microglía mediante la atracción de estas células y también mediante la facilitación de su proliferación, pero esto podría no estar asociado con su activación o la generación de agentes neurotóxicos.

Ya que la actividad de MCP-1 puede ser modificada mediante la acción de plasmina o mediante metaloproteasas (McQuibban *et al.* 2002; Yao and Tsrka, 2010), no se descarta la posibilidad de que este tipo de modificaciones sea un requisito para que MCP-1 ejerza los efectos observados.

Aunque inicialmente MCP-1 fue descubierta por su función como quimioatrayente, en los últimos años se le han atribuido diferentes funciones como mediador en distintos procesos. Algunas de las cuales están relacionadas con su habilidad para atraer células, como es la migración de progenitores neuronales (Belmadani *et al.* 2006), mientras que otras funciones parecen ser independientes de su capacidad quimioatrayente y sugieren que MCP-1 podría también participar como modulador en la comunicación neuronal (Guyon *et al.* 2009; Zhou *et al.* 2011), en la regeneración neuronal (Kalehua *et al.* 2004), en la angiogénesis, en la hematopoyesis (Yoshie *et al.* 2001), o en la inmunorregulación (Omata *et al.* 2002).

Junto a estos diferentes papeles de MCP-1, existen numerosos estudios centrados en su implicación en reacciones neuroinflamatorias (Thompson *et al.* 2008b). Puesto que MCP-1 atrae

células necesarias para el desarrollo de la respuesta inflamatoria, el bloqueo de esta atracción podría reducir la inflamación y todos los cambios asociados a ella. Aún así, la inhibición de MCP-1 o su actividad deben ser cuidadosamente estudiadas como una diana terapéutica, principalmente porque alguna de sus funciones podría ser necesaria para el mantenimiento homeostático o simplemente permanecen aún desconocidas.

En base a esto, se ha intentado elucidar, al menos en parte, si MCP-1 puede causar directamente la activación de las principales células inmunes del cerebro, y si esto podría contribuir a la muerte neuronal.

Mientras que la habilidad de MCP-1 para atraer leucocitos (Deshmane *et al.* 2009) y otros tipos de células como la microglía ha sido caracterizado (El *et al.* 2007), su efecto en la proliferación microglial no ha sido ampliamente investigado. Estudios en cultivos de astrocitos humanos han demostrado también la habilidad de MCP-1 para inducir la proliferación de estas células (Rezaie *et al.* 2002), pero en nuestro conocimiento, este ha sido el primer estudio que describe la inducción directa de la proliferación microglial por MCP-1.

Se ha analizado el efecto de diferentes concentraciones de MCP-1 en la producción de nitritos y no se han observado modificaciones con ninguna de las concentraciones utilizadas. La concentración de 50 ng/mL fue la más baja de las analizadas a la cual que inducía el máximo grado de proliferación detectado. Basándonos en esto elegimos esa concentración para realizar los siguientes experimentos. A una concentración similar se había observado previamente en el grupo de investigación en que se ha realizado esta Tesis Doctoral, que MCP-1 causaba cambios protectores en cultivos de neuronas (Madrigal *et al.*, 2009).

La morfología de las células de microglía, junto con la medida de la expresión de MIP-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 y de la síntesis del enzima NOS-2, indican que MCP-1 en las condiciones estudiadas no induce cambios proinflamatorios en la microglía.

Otros autores han descrito que MCP-1 induce TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  en cultivos microgliales de ratón, así como la muerte neuronal por exposición a microglía activada por MCP-1 (Yang *et al.* 2011). Sin embargo, en el estudio presentado aquí no se han podido observar efectos similares. Esto podría deberse a diferencias entre especies o a algún otro factor no identificado del que no se tiene conocimiento todavía. Experimentaciones futuras podrían ayudar a identificar la causa de estas diferencias encontradas.

También, ciertos estudios *in vivo* han mostrado que MCP-1 activa las células microgliales de la espina dorsal (Thacker *et al.* 2009) y que el bloqueo de MCP-1 podría disminuir la activación microglial (Muessel *et al.* 2002). Pero a causa de la naturaleza de los modelos experimentales usados en esos estudios, donde la microglía no estaba aislada, no se puede concluir que MCP-1 por sí misma cause la activación de la microglía. El uso de cultivos, aparte de todas sus desventajas por encontrarse las células fuera de su entorno habitual, proporciona una vía mejor para analizar el efecto directo de cualquier agente sobre un tipo particular de célula. Este fue precisamente nuestro objetivo, el estudio del efecto directo de MCP-1 sobre la microglía en ausencia de otras células que pudiesen también afectar al comportamiento microglial.

La situación podría ser explicada de una forma simplista, considerando que MCP-1 podría atraer la microglía (y quizás producir su activación), y que podrían ser otros los factores responsables de su activación total. Además la atracción de la microglía podría ayudar a sanar ciertas lesiones mediante la transformación de estas células en otro tipo de células, como neuronas, astrocitos u oligodendrocitos, tal y como sugieren Yokoyama *et al.* (2004).

Fue particularmente interesante el hecho de encontrar que el LPS tenía un efecto opuesto a este de MCP-1, reduciendo la proliferación microglial. Otros grupos han descrito un efecto no proliferativo de LPS o una reducción en la proliferación cuando se encuentra combinado con IFN $\gamma$  (Kauppinen and Swanson 2005; Mander and Brown 2005). Estos cambios se han clasificado por otros autores como análogos a los producidos en la activación crónica de la microglía, los cuales llevan a la degeneración de estas células y a la consecuente pérdida del soporte trófico que ellas proporcionaban a las neuronas, lo que puede conducir eventualmente a la muerte neuronal (Graeber and Streit, 2010). Esto estaría de acuerdo con la reducción en la expresión de factores tróficos, FGF e IGF, que hemos detectado con el tratamiento de LPS.

Se ha demostrado previamente que la microglía es una fuente de FGF (Shimojo *et al.* 1991) y de IGF (Lalancette-Hebert *et al.* 2007). FGF estimula el crecimiento de las neuritas en diferentes tipos de neuronas y facilita su supervivencia (Morrison *et al.* 1986; Walicke *et al.* 1986), mientras IGF también es conocido como protector neuronal y por inducir la proliferación de progenitores neuronales (Aberg *et al.* 2006) así como de células gliales (O'Donnell *et al.* 2002; Perez-Martin *et al.* 2010). En el estudio presentado aquí se ha detectado un incremento del mRNA de IGF en microglía tras el tratamiento con MCP-1. IGF se ha propuesto también como un mediador de la protección de MCP-1 proporcionada en células ganglionares de la retina en un modelo experimental de glaucoma (Chiu *et al.* 2010). En ese estudio (Chiu *et al.* 2010) los autores

muestran que, mientras que concentraciones elevadas de MCP-1 pueden ser neurotóxicas, una menor concentración de esta quimioquina presenta el efecto contrario. Ellos también indican cómo en ausencia de células gliales no se observa la neuroprotección inducida por MCP-1, lo que sugiere que estas células podrían ayudar a MCP-1 en la protección neuronal. De acuerdo con esta idea, la proliferación microglial que se ha descrito aquí por el tratamiento con MCP-1, podría facilitar el potencial neuroprotector de MCP-1. Esto ofrece la posibilidad de explorar este efecto *in vivo*, y así analizar si existe alguna diferencia entre la microglía residente y la derivada de la BHE, ya que MCP-1 puede actuar en estos dos tipos de células (Zhang *et al.* 2007).

En resumen, la hipótesis que se sugiere tras este estudio es que MCP-1, como otros muchos reguladores de funciones celulares en el cerebro, podría tener un papel importante en el mantenimiento del SNC a concentraciones constitutivas, aunque como resultado de ciertas alteraciones su concentración pueda ser modificada causando diferentes cambios, siendo alguno de ellos perjudiciales.

Como se mencionó anteriormente, el modelo de co-cultivo microglía-neuronas ha permitido analizar las posibles consecuencias de la exposición microglial a MCP-1 sobre las neuronas. Este estudio confirmó los resultados obtenidos del análisis de la producción de citoquinas, sugiriendo que MCP-1 no causa por modificaciones microgliales que puedan dañar a las neuronas.

El objetivo de este estudio fue analizar la posible participación de MCP-1 en el daño neuronal observado en ciertas situaciones donde tiene lugar una respuesta inflamatoria, y particularmente, si está mediada por la activación microglial. Los resultados expuestos aquí indican que la incubación directa de cultivos de microglía con MCP-1 estimula la proliferación de estas células, pero no parece causar modificaciones que interfieran con la viabilidad neuronal. De acuerdo con esto, la inhibición de MCP-1 como vía para proteger neuronas en ciertos tipos de patologías debería ser cuidadosamente analizada. Esta quimioquina podría no ser directamente responsable de la muerte neuronal característica en estas situaciones, y el control de su funcionamiento podría interferir con otras vías que ésta regula.

### 4. EFECTO DUAL DE LA NORADRENALINA EN LA REGULACIÓN DE QUIMIOQUINAS Y OTROS MEDIADORES INFLAMATORIOS

En este estudio se ha demostrado que el tratamiento con NA induce la expresión y síntesis de Fractalkina (CX3CL1) en astrocitos. Dadas las acciones neuroprotectoras descritas para Fractalkina (Re and Przedborski, 2006), su regulación por NA podría ayudar a explicar los mecanismos a través de los cuales la NA protege neuronas frente a diferentes estímulos. (Traver *et al.* 2005; Madrigal *et al.* 2005; Kalinin *et al.* 2012). Aunque, junto a sus funciones antiinflamatorias y neuroprotectoras, la Fractalkina en sus formas soluble o anclada a la membrana, también funciona como quimioatrayente siendo capaz de activar células inflamatorias (Bazan *et al.* 1997). De hecho, una respuesta exagerada de esta quimioquina en determinadas lesiones puede conducir a daños neuronales irreversibles (Denes *et al.* 2008; Fuhrmann *et al.* 2010; Lee *et al.* 2010).

Como la Fractalkina, MCP-1 es otra quimioquina conocida por tener ciertas acciones neuroprotectoras en el SNC (Zisman *et al.* 1997; Bruno *et al.* 2000; Eugenin *et al.* 2003; Elhofy *et al.* 2005; Godefroy *et al.* 2011), pero también es capaz de potenciar la respuesta inflamatoria y causar daño celular (Yang *et al.* 2011; Ge *et al.* 2012; Kiyota *et al.* 2013).

Sin embargo, a pesar de los efectos duales de MCP-1 y Fractalkina, se sabe que la NA reduce la inflamación cerebral (Feinstein *et al.* 2002b; O'Sullivan *et al.* 2009) y previene la progresión de patologías con un componente neuroinflamatorio (Gustafson *et al.* 1990; Heneka *et al.* 2006; Polak *et al.* 2011; Delaville *et al.* 2011). Lo cual condujo a plantear la hipótesis de que en condiciones basales la NA podría ayudar al mantenimiento en el SNC de los niveles de diferentes citoquinas y quimioquinas necesarias para la homeostasis celular, pero bajo condiciones inflamatorias la NA prevendría una producción exagerada de alguno de estos mediadores con potencial neurotóxico. De acuerdo con esto, la máxima concentración de Fractalkina obtenida tras el tratamiento de astrocitos con NA fue considerablemente menor que aquella observada tras el tratamiento con LPS.

En base a los resultados obtenidos, la reducción de los niveles cerebrales de NA observada en enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (Weinshenker, 2008) o la enfermedad de Parkinson (Fornai *et al.* 2007), podría ser la razón de la pérdida paralela de los niveles constitutivos de estas quimioquinas. De hecho, se produce una disminución en la producción de Fractalkina en la corteza cerebral y en el hipocampo en modelos animales de la EA

(ratones transgénicos APP), junto con un aumento en la acumulación del péptido  $\beta$ A (Duan *et al.* 2008). Esto podría estar de acuerdo con aquellos estudios donde la reducción de NA por daño en el LC (Kalinin *et al.* 2007) o por alteraciones genéticas (Hammerschmidt *et al.* 2013), aumentan el daño neuronal en modelos de enfermedad de Alzheimer.

La muerte de células gliales como consecuencia de su respuesta ante lesiones o agentes inflamatorios se conoce como muerte celular inducida por activación, y se considera una estrategia protectora que ayuda a reducir la progresión de la inflamación y el daño potencial en células sanas cercanas (Suk *et al.* 2001). Las condiciones usadas en este estudio no obtienen una respuesta semejante para astrocitos tratados con NA pero fue clara después de la incubación con LPS. Esto sugiere que mientras que ambos estímulos podrían generar la producción de ciertas quimioquinas u otros agentes inflamatorios, esto podría únicamente ser un aspecto en común de dos series de reacciones con diferentes fines.

CCL6 es la única proteína analizada cuya expresión fue reducida por LPS. Además, el co-tratamiento con NA, en lugar de seguir reduciendo la concentración del mRNA, como ocurría con otras citoquinas analizadas, produjo un incremento en la concentración del mRNA por encima de los niveles control tras 24 horas. Estos resultados sugieren que en presencia de un estímulo inflamatorio como el LPS, la acción de la NA con respecto a la expresión de ciertas quimioquinas parece estar orientada hacia la reversión de los efectos de LPS, independientemente de los cambios que la NA por sí sola produzca en ellas. Esta posibilidad constituye un nuevo e interesante objeto de investigación, ya que la modificación de las acciones de la NA sobre los astrocitos es probablemente debida a transformaciones causadas por la activación de estas células como respuesta ante una lesión o ante alguna amenaza a la homeostasis celular (Pekny and Nilsson, 2005), y por tanto, la explicación de los cambios responsables de esta alteración en los efectos de la NA podrían ayudar a elucidar el mecanismo a través del cual la NA lleva a cabo sus acciones neuroprotectoras.

La inducción por LPS de las citoquinas IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  es una respuesta ya conocida de los astrocitos (Chung and Benveniste, 1990; Soliman *et al.* 2013), y la inhibición causada por la NA estaría de acuerdo con sus efectos neuroprotectores dada la naturaleza proinflamatoria de estas citoquinas (Basu *et al.* 2004; Montgomery and Bowers 2012). Por otra parte, fue sorprendente detectar una inducción de IL-1 $\beta$  e IFN $\gamma$  por NA. Sin embargo, esto podría estar de acuerdo con la hipótesis mencionada anteriormente, ya que se han descrito propiedades neuroprotectoras para

estas citoquinas frente a diferentes tipos de lesiones (Carlson *et al.* 1999; Lee *et al.* 2006; Baron *et al.* 2008; Shafteel *et al.* 2008; Figiel 2008; Mastrangelo *et al.* 2009).

El efecto de la NA sobre la producción del enzima COX-2 ha sido analizado previamente en microglía por Schlachetzki *et al.* (2010). Ellos también observaron una inducción por NA que fue potenciada por la presencia de LPS. Similarmente a los resultados expuestos aquí para astrocitos, su trabajo también describe la liberación de PGE<sub>2</sub> por parte de la microglia en respuesta a LPS o NA y la intensificación de este efecto por la combinación de ambos tratamientos. Considerando la participación de PGE<sub>2</sub> en el desarrollo de la neuroinflamación (Shi *et al.* 2012), este efecto de la NA parece ser contradictorio con sus acciones neuroprotectoras. Aunque, la PGE<sub>2</sub> es otro mediador al cual se le han descrito propiedades neuroprotectoras (Thery *et al.* 1994; Akaike *et al.* 1994; Cazevielle *et al.* 1994; Kim *et al.* 2002). Mientras que esto podría ayudar a entender los resultados presentados en este estudio, el efecto aditivo de LPS y NA en la expresión de COX-2 y PGE<sub>2</sub> elimina la posibilidad de una explicación simple según la cual la NA revierte los cambios causados por estímulos inflamatorios en astrocitos. Este hecho confirma la naturaleza compleja de los mecanismos de acción de la NA, y en particular revelan la necesidad de estudiar las interacciones entre PGE<sub>2</sub> y neuronas, así como si la presencia de NA también modula la respuesta de PGE<sub>2</sub>.

Mientras que los efectos neuroprotectores de la NA han sido confirmados por diversos estudios, sus mecanismos de acción no se conocen con precisión. La inducción de MCP-1 y Fractalkina podría explicar alguno de los efectos de la NA debido a la capacidad de estas quimioquinas para evitar el daño neuronal en distintas condiciones. Sin embargo, dichos efectos pueden ser invertidos cuando estos y otros mediadores se producen de forma exagerada o descontrolada. Los datos aquí presentados indican que la NA puede ayudar a mantener los niveles de ciertas quimioquinas al mismo tiempo que evita su sobreexpresión y la toxicidad consiguiente. Estudios *in vivo* pueden ayudar a confirmar esta hipótesis, ampliar el conocimiento de la función neuroprotectora de NA y posiblemente facilitar el desarrollo de terapias para enfermedades neurodegenerativas.

## VIII.CONCLUSIONES



## VIII. CONCLUSIONES

1. La elevación de los niveles cerebrales de noradrenalina induce la producción de MCP-1 en astrocitos de corteza cerebral de rata.
2. Los glucocorticoides ejercen un efecto inhibitorio sobre la producción astrogial de MCP-1.
3. El tratamiento de cultivos primarios de neuronas corticales de rata con noradrenalina proporciona protección frente a agentes proapoptóticos. Este efecto podría estar mediado por la elevación de los niveles neuronales de Akt y P-Bad.
4. El tratamiento de cultivos primarios de astrocitos con los inhibidores de transportadores de noradrenalina desipramina y atomoxetina induce la expresión y síntesis de MCP-1.
5. La activación de receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos en astrocitos inhibe la producción de MCP-1 en este tipo celular.
6. La exposición *in vitro* de microglia de rata a MCP-1 estimula su proliferación y quimiotaxis pero no provoca su activación ni la liberación de agentes neurotóxicos.
7. La exposición *in vitro* de microglía de rata a MCP-1 induce la expresión del factor trófico IGF.
8. Noradrenalina induce la expresión y síntesis de la quimioquina CX3CL1/Fractalkina en cultivos primarios de astrocitos de rata.
9. En presencia del estímulo inflamatorio LPS, la noradrenalina inhibe la expresión y síntesis de MCP-1 y Fractalkina en cultivos primarios de astrocitos de rata.



## IX. BIBLIOGRAFÍA



## IX. BIBLIOGRAFÍA

- Abbadie C., Lindia J. A., Cumiskey A. M., Peterson L. B., Mudgett J. S., Bayne E. K., DeMartino J. A., MacIntyre D. E. and Forrest M. J. (2003a) Impaired neuropathic pain responses in mice lacking the chemokine receptor CCR2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 7947-7952.
- Aberg N. D., Brywe K. G. and Isgaard J. (2006) Aspects of growth hormone and insulin-like growth factor-I related to neuroprotection, regeneration, and functional plasticity in the adult brain. *ScientificWorldJournal*. **6**, 53-80.
- Akaike A., Kaneko S., Tamura Y., Nakata N., Shiomi H., Ushikubi F. and Narumiya S. (1994) Prostaglandin E2 protects cultured cortical neurons against N-methyl-D-aspartate receptor-mediated glutamate cytotoxicity. *Brain Res*. **663**, 237-243.
- Akiyama H., Arai T., Kondo H., Tanno E., Haga C. and Ikeda K. (2000a) Cell mediators of inflammation in the Alzheimer disease brain. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord*. **14 Suppl 1**, S47-S53.
- Akiyama H., Barger S., Barnum S., Bradt B., Bauer J., Cole G. M., Cooper N. R., Eikelenboom P., Emmerling M., Fiebich B. L., Finch C. E., Frautschy S., Griffin W. S., Hampel H., Hull M., Landreth G., Lue L., Mrak R., Mackenzie I. R., McGeer P. L., O'Banion M. K., Pachter J., Pasinetti G., Plata-Salaman C., Rogers J., Rydel R., Shen Y., Streit W., Strommeyer R., Tooyoma I., Van Muiswinkel F. L., Veerhuis R., Walker D., Webster S., Wegrzyniak B., Wenk G. and Wyss-Coray T. (2000b) Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **21**, 383-421.
- Alarcon R., Fuenzalida C., Santibanez M. and Von B. R. (2005) Expression of scavenger receptors in glial cells. Comparing the adhesion of astrocytes and microglia from neonatal rats to surface-bound beta-amyloid. *J. Biol. Chem*. **280**, 30406-30415.
- Aloisi F., Care A., Borsellino G., Gallo P., Rosa S., Bassani A., Cabibbo A., Testa U., Levi G. and Peschle C. (1992) Production of hemolymphopoietic cytokines (IL-6, IL-8, colony-stimulating factors) by normal human astrocytes in response to IL-1 beta and tumor necrosis factor-alpha. *J. Immunol*. **149**, 2358-2366.
- Ambrosini E. and Aloisi F. (2004) Chemokines and glial cells: a complex network in the central nervous system. *Neurochem. Res*. **29**, 1017-1038.
- Asensio V. C. and Campbell I. L. (1999) Chemokines in the CNS: plurifunctional mediators in diverse states. *Trends Neurosci*. **22**, 504-512.
- Aston-Jones G., Rajkowski J. and Cohen J. (2000) Locus coeruleus and regulation of behavioral flexibility and attention. *Prog. Brain Res*. **126**, 165-182.
- Aston-Jones G., Shipley M. T., Chouvet G., Ennis M., van B. E., Pieribone V., Shiekhattar R., Akaoka H., Drolet G., Astier B. and . (1991) Afferent regulation of locus coeruleus neurons: anatomy, physiology and pharmacology. *Prog. Brain Res*. **88**, 47-75.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Auld D. S., Kornecook T. J., Bastianetto S. and Quirion R. (2002) Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to beta-amyloid peptides, cognition, and treatment strategies. *Prog. Neurobiol.* **68**, 209-245.
- Babcock A. A., Kuziel W. A., Rivest S. and Owens T. (2003) Chemokine expression by glial cells directs leukocytes to sites of axonal injury in the CNS. *J. Neurosci.* **23**, 7922-7930.
- Backstrom I. T., Ross S. B. and Marcusson J. O. (1989) [3H]desipramine binding to rat brain tissue: binding to both noradrenaline uptake sites and sites not related to noradrenaline neurons. *J. Neurochem.* **52**, 1099-1106.
- Bacon K., Baggolini M., Broxmeyer H., Horuk R., Lindley I., Mantovani A., Maysushima K., Murphy P., Nomiya H., Oppenheim J., Rot A., Schall T., Tsang M., Thorpe R., Van D. J., Wadhwa M., Yoshie O., Zlotnik A. and Zoon K. (2002) Chemokine/chemokine receptor nomenclature. *J. Interferon Cytokine Res.* **22**, 1067-1068.
- Bajetto A., Bonavia R., Barbero S., Florio T. and Schettini G. (2001) Chemokines and their receptors in the central nervous system. *Front Neuroendocrinol.* **22**, 147-184.
- Bajetto A., Bonavia R., Barbero S. and Schettini G. (2002) Characterization of chemokines and their receptors in the central nervous system: physiopathological implications. *J. Neurochem.* **82**, 1311-1329.
- Baker K. G., Tork I., Hornung J. P. and Halasz P. (1989) The human locus coeruleus complex: an immunohistochemical and three dimensional reconstruction study. *Exp. Brain Res.* **77**, 257-270.
- Ballantyne C. M. and Nambi V. (2005) Markers of inflammation and their clinical significance. *Atheroscler. Suppl* **6**, 21-29.
- Banisadr G., Gosselin R. D., Mechighel P., Rostene W., Kitabgi P. and Melik P. S. (2005) Constitutive neuronal expression of CCR2 chemokine receptor and its colocalization with neurotransmitters in normal rat brain: functional effect of MCP-1/CCL2 on calcium mobilization in primary cultured neurons. *J. Comp Neurol.* **492**, 178-192.
- Banisadr G., Queraud-Lesaux F., Boutterin M. C., Pelaprat D., Zalc B., Rostene W., Haour F. and Parsadaniantz S. M. (2002) Distribution, cellular localization and functional role of CCR2 chemokine receptors in adult rat brain. *J. Neurochem.* **81**, 257-269.
- Barja G. (2004) Aging in vertebrates, and the effect of caloric restriction: a mitochondrial free radical production-DNA damage mechanism? *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* **79**, 235-251.
- Baron R., Nemirovsky A., Harpaz I., Cohen H., Owens T. and Monsonego A. (2008) IFN-gamma enhances neurogenesis in wild-type mice and in a mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB J.* **22**, 2843-2852.
- Bartoli C., Civatte M., Pellissier J. F. and Figarella-Branger D. (2001) CCR2A and CCR2B, the two isoforms of the monocyte chemoattractant protein-1 receptor are up-regulated and expressed by different cell subsets in idiopathic inflammatory myopathies. *Acta Neuropathol.* **102**, 385-392.

- Basu A., Krady J. K. and Levison S. W. (2004) Interleukin-1: a master regulator of neuroinflammation. *J. Neurosci. Res.* **78**, 151-156.
- Bazan J. F., Bacon K. B., Hardiman G., Wang W., Soo K., Rossi D., Greaves D. R., Zlotnik A. and Schall T. J. (1997) A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* **385**, 640-644.
- Beckman K. B. and Ames B. N. (1998) Mitochondrial aging: open questions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **854**, 118-127.
- Belmadani A., Tran P. B., Ren D. and Miller R. J. (2006) Chemokines regulate the migration of neural progenitors to sites of neuroinflammation. *J. Neurosci.* **26**, 3182-3191.
- Benarroch E. E. (2005) Neuron-astrocyte interactions: partnership for normal function and disease in the central nervous system. *Mayo Clin. Proc.* **80**, 1326-1338.
- Benekareddy M., Mehrotra P., Kulkarni V. A., Ramakrishnan P., Dias B. G. and Vaidya V. A. (2008) Antidepressant treatments regulate matrix metalloproteinases-2 and -9 (MMP-2/MMP-9) and tissue inhibitors of the metalloproteinases (TIMPs 1-4) in the adult rat hippocampus. *Synapse* **62**, 590-600.
- Berman J. W., Guida M. P., Warren J., Amat J. and Brosnan C. F. (1996) Localization of monocyte chemoattractant peptide-1 expression in the central nervous system in experimental autoimmune encephalomyelitis and trauma in the rat. *J. Immunol.* **156**, 3017-3023.
- Biber K., Zuurman M. W., Dijkstra I. M. and Boddeke H. W. (2002) Chemokines in the brain: neuroimmunology and beyond. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2**, 63-68.
- Bird T. D. (2005) Genetic factors in Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* **352**, 862-864.
- Blanco-Rivero J., Roque F. R., Sastre E., Caracuel L., Couto G. K., Avendano M. S., Paula S. M., Rossoni L. V., Salaices M. and Balfagon G. (2013) Aerobic exercise training increases neuronal nitric oxide release and bioavailability and decreases noradrenaline release in mesenteric artery from spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertens.* **31**, 916-926.
- Blasko I., Marx F., Steiner E., Hartmann T. and Grubeck-Loebenstein B. (1999) TNFalpha plus IFNgamma induce the production of Alzheimer beta-amyloid peptides and decrease the secretion of APPs. *FASEB J.* **13**, 63-68.
- Bodles A. M. and Barger S. W. (2004) Cytokines and the aging brain - what we don't know might help us. *Trends Neurosci.* **27**, 621-626.
- Boehme S. A., Lio F. M., Maciejewski-Lenoir D., Bacon K. B. and Conlon P. J. (2000) The chemokine fractalkine inhibits Fas-mediated cell death of brain microglia. *J. Immunol.* **165**, 397-403.
- Bondareff W., Mountjoy C. Q. and Roth M. (1981) Selective loss of neurones of origin of adrenergic projection to cerebral cortex (nucleus locus coeruleus) in senile dementia. *Lancet* **1**, 783-784.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Braun M. C., Lahey E. and Kelsall B. L. (2000) Selective suppression of IL-12 production by chemoattractants. *J. Immunol.* **164**, 3009-3017.
- Bray J. G., Reyes K. C., Roberts A. J., Ransohoff R. M. and Gruol D. L. (2013) Synaptic plasticity in the hippocampus shows resistance to acute ethanol exposure in transgenic mice with astrocyte-targeted enhanced CCL2 expression. *Neuropharmacology* **67**, 115-125.
- Bremner J. D. (1999) Does stress damage the brain?. *Biol. Psychiatry.* **45**: 797-805.
- Bremner J. D. (2007) Neuroimaging in posttraumatic stress disorder and other stress-related disorder. *Neuroimaging Clin. N. Am.* **17**, 523-528, ix.
- Bruno V., Copani A., Besong G., Scotto G. and Nicoletti F. (2000a) Neuroprotective activity of chemokines against N-methyl-D-aspartate or beta-amyloid-induced toxicity in culture. *Eur. J. Pharmacol.* **399**, 117-121.
- Bymaster F. P., Katner J. S., Nelson D. L., Hemrick-Luecke S. K., Threlkeld P. G., Heiligenstein J. H., Morin S. M., Gehlert D. R. and Perry K. W. (2002) Atomoxetine increases extracellular levels of norepinephrine and dopamine in prefrontal cortex of rat: a potential mechanism for efficacy in attention deficit/hyperactivity disorder. *Neuropsychopharmacology* **27**, 699-711.
- Calvo C. F., Yoshimura T., Gelman M. and Mallat M. (1996) Production of monocyte chemoattractant protein-1 by rat brain macrophages. *Eur. J. Neurosci.* **8**, 1725-1734.
- Canoui-Poitrine F., Luc G., Mallat Z., Machez E., Bingham A., Ferrieres J., Ruidavets J. B., Montaye M., Yarnell J., Haas B., Arveiler D., Morange P., Kee F., Evans A., Amouyel P., Ducimetiere P. and Empana J. P. (2011) Systemic chemokine levels, coronary heart disease, and ischemic stroke events: the PRIME study. *Neurology* **77**, 1165-1173.
- Cardona A. E., Li M., Liu L., Savarin C. and Ransohoff R. M. (2008) Chemokines in and out of the central nervous system: much more than chemotaxis and inflammation. *J. Leukoc. Biol.* **84**, 587-594.
- Carlson N. G., Wieggl W. A., Chen J., Bacchi A., Rogers S. W. and Gahring L. C. (1999) Inflammatory cytokines IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-6, and TNF-alpha impart neuroprotection to an excitotoxin through distinct pathways. *J. Immunol.* **163**, 3963-3968.
- Carro E. and Torres-Aleman I. (2004) The role of insulin and insulin-like growth factor I in the molecular and cellular mechanisms underlying the pathology of Alzheimer's disease. *Eur. J. Pharmacol.* **490**, 127-133.
- Carroll B. J., Curtis G. C. and Mendels J. (1976) Cerebrospinal fluid and plasma free cortisol concentrations in depression. *Psychol. Med.* **6**, 235-244.
- Carson J. A. and Turner A. J. (2002) Beta-amyloid catabolism: roles for neprilysin (NEP) and other metallopeptidases? *J. Neurochem.* **81**, 1-8.

- Cazevielle C., Muller A., Meynier F., Dutrait N. and Bonne C. (1994) Protection by prostaglandins from glutamate toxicity in cortical neurons. *Neurochem. Int.* **24**, 395-398.
- Cerbai F., Lana D., Nosi D., Petkova-Kirova P., Zecchi S., Brothers H. M., Wenk G. L. and Giovannini M. G. (2012) The neuron-astrocyte-microglia triad in normal brain ageing and in a model of neuroinflammation in the rat hippocampus. *PLoS. One.* **7**, e45250.
- Charo I. F., Myers S. J., Herman A., Franci C., Connolly A. J. and Coughlin S. R. (1994) Molecular cloning and functional expression of two monocyte chemoattractant protein 1 receptors reveals alternative splicing of the carboxyl-terminal tails. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**, 2752-2756.
- Charo I. F. and Taubman M. B. (2004) Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. *Circ. Res.* **95**, 858-866.
- Checkley S. A., Slade A. P., Shur E. and Dawling S. (1981) A pilot study of the mechanism of action of desipramine. *Br. J. Psychiatry* **138**, 248-251.
- Chiu K., Yeung S. C., So K. F. and Chang R. C. (2010) Modulation of morphological changes of microglia and neuroprotection by monocyte chemoattractant protein-1 in experimental glaucoma. *Cell Mol. Immunol.* **7**, 61-68.
- Cho C. and Miller R. J. (2002) Chemokine receptors and neural function. *J. Neurovirol.* **8**, 573-584.
- Cho M. L., Yoon B. Y., Ju J. H., Jung Y. O., Jhun J. Y., Park M. K., Park S. H., Cho C. S. and Kim H. Y. (2007) Expression of CCR2A, an isoform of MCP-1 receptor, is increased by MCP-1, CD40 ligand and TGF-beta in fibroblast like synoviocytes of patients with RA. *Exp. Mol. Med.* **39**, 499-507.
- Choi M., Rolle S., Wellner M., Cardoso M. C., Scheidereit C., Luft F. C. and Kettritz R. (2003) Inhibition of NF-kappaB by a TAT-NEMO-binding domain peptide accelerates constitutive apoptosis and abrogates LPS-delayed neutrophil apoptosis. *Blood* **102**, 2259-2267.
- Chung I. Y. and Benveniste E. N. (1990) Tumor necrosis factor-alpha production by astrocytes. Induction by lipopolysaccharide, IFN-gamma, and IL-1 beta. *J. Immunol.* **144**, 2999-3007.
- Ciechanover A. and Schwartz A. L. (1998) The ubiquitin-proteasome pathway: the complexity and myriad functions of proteins death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**, 2727-2730.
- Cinthia Julio, Angela García y Jaime Court (1997) Departamento de Neurología. Escuela de Medicina, Universidad Católica de Chile.
- Clore G. M. and Gronenborn A. M. (1995) Three-dimensional structures of alpha and beta chemokines. *FASEB J.* **9**, 57-62.
- Cohen R. I. and Almazan G. (1993) Norepinephrine-stimulated PI hydrolysis in oligodendrocytes is mediated by alpha 1A-adrenoceptors. *Neuroreport* **4**, 1115-1118.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Conductier G., Blondeau N., Guyon A., Nahon J. L. and Rovere C. (2010) The role of monocyte chemoattractant protein MCP1/CCL2 in neuroinflammatory diseases. *J. Neuroimmunol.*
- Corder E. H., Saunders A. M., Strittmatter W. J., Schmechel D. E., Gaskell P. C., Small G. W., Roses A. D., Haines J. L. and Pericak-Vance M. A. (1993) Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* **261**, 921-923.
- Counts S. E. and Mufson E. J. (2010) Noradrenaline activation of neurotrophic pathways protects against neuronal amyloid toxicity. *J. Neurochem.* **113**, 649-660.
- Crown S. E., Yu Y., Sweeney M. D., Leary J. A. and Handel T. M. (2006) Heterodimerization of CCR2 chemokines and regulation by glycosaminoglycan binding. *J. Biol. Chem.* **281**, 25438-25446.
- Csizmadia V., Raczynski A., Csizmadia E., Fedyk E. R., Rottman J. and Alden C. L. (2008) Effect of an experimental proteasome inhibitor on the cytoskeleton, cytosolic protein turnover, and induction in the neuronal cells in vitro. *Neurotoxicology* **29**, 232-243.
- Dansereau M. A., Gosselin R. D., Pohl M., Pommier B., Mechighel P., Mauborgne A., Rostene W., Kitabgi P., Beaudet N., Sarret P. and Melik-Parsadaniantz S. (2008) Spinal CCL2 pronociceptive action is no longer effective in CCR2 receptor antagonist-treated rats. *J. Neurochem.* **106**, 757-769.
- de S. B., Umans L., van L. F. and Van Den Berghe H. (1993) Study of the synthesis and secretion of normal and artificial mutants of murine amyloid precursor protein (APP): cleavage of APP occurs in a late compartment of the default secretion pathway. *J. Cell Biol.* **121**, 295-304.
- Delaville C., Deurwaerdere P. D. and Benazzouz A. (2011) Noradrenaline and Parkinson's disease. *Front Syst. Neurosci.* **5**, 31.
- Dello R. C., Boullerne A. I., Gavrilyuk V. and Feinstein D. L. (2004) Inhibition of microglial inflammatory responses by norepinephrine: effects on nitric oxide and interleukin-1beta production. *J. Neuroinflammation.* **1**, 9.
- Denes A., Ferenczi S., Halasz J., Kornyei Z. and Kovacs K. J. (2008) Role of CX3CR1 (fractalkine receptor) in brain damage and inflammation induced by focal cerebral ischemia in mouse. *J. Cereb. Blood Flow Metab* **28**, 1707-1721.
- Deshmane S. L., Kremlev S., Amini S. and Sawaya B. E. (2009) Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J. Interferon Cytokine Res.* **29**, 313-326.
- Dimitrijevic O. B., Stamatovic S. M., Keep R. F. and Andjelkovic A. V. (2006) Effects of the chemokine CCL2 on blood-brain barrier permeability during ischemia-reperfusion injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab* **26**, 797-810.
- Dong Y. and Benveniste E. N. (2001) Immune function of astrocytes. *Glia* **36**, 180-190.

- Duan R. S., Yang X., Chen Z. G., Lu M. O., Morris C., Winblad B. and Zhu J. (2008) Decreased fractalkine and increased IP-10 expression in aged brain of APP(swe) transgenic mice. *Neurochem. Res.* **33**, 1085-1089.
- Dunnett S. B. and Bjorklund A. (1999) Prospects for new restorative and neuroprotective treatments in Parkinson's disease. *Nature* **399**, A32-A39.
- Edwards M. R., Bartlett N. W., Clarke D., Birrell M., Belvisi M. and Johnston S. L. (2009) Targeting the NF-kappaB pathway in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacol. Ther.* **121**, 1-13.
- Eisen A. and Calne D. (1992) Amyotrophic lateral sclerosis, Parkinson's disease and Alzheimer's disease: phylogenetic disorders of the human neocortex sharing many characteristics. *Can. J. Neurol. Sci.* **19**, 117-123.
- El K. J., Hickman S. E., Thomas C. A., Cao L., Silverstein S. C. and Loike J. D. (1996) Scavenger receptor-mediated adhesion of microglia to beta-amyloid fibrils. *Nature* **382**, 716-719.
- El K. J. and Luster A. D. (2008) Mechanisms of microglia accumulation in Alzheimer's disease: therapeutic implications. *Trends Pharmacol. Sci.* **29**, 626-632.
- El K. J., Toft M., Hickman S. E., Means T. K., Terada K., Geula C. and Luster A. D. (2007) Ccr2 deficiency impairs microglial accumulation and accelerates progression of Alzheimer-like disease. *Nat. Med.* **13**, 432-438.
- Elhofy A., Wang J., Tani M., Fife B. T., Kennedy K. J., Bennett J., Huang D., Ransohoff R. M. and Karpus W. J. (2005) Transgenic expression of CCL2 in the central nervous system prevents experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Leukoc. Biol.* **77**, 229-237.
- Etminan M., Gill S. and Samii A. (2003) Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on risk of Alzheimer's disease: systematic review and meta-analysis of observational studies. *BMJ* **327**, 128.
- Eugenin E. A., D'Aversa T. G., Lopez L., Calderon T. M. and Berman J. W. (2003a) MCP-1 (CCL2) protects human neurons and astrocytes from NMDA or HIV-tat-induced apoptosis. *J. Neurochem.* **85**, 1299-1311.
- Feinstein D. L., Galea E., Gavrilyuk V., Brosnan C. F., Whitacre C. C., Dumitrescu-Ozimek L., Landreth G. E., Pershadsingh H. A., Weinberg G. and Heneka M. T. (2002a) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists prevent experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann. Neurol.* **51**, 694-702.
- Feinstein D. L., Heneka M. T., Gavrilyuk V., Dello R. C., Weinberg G. and Galea E. (2002b) Noradrenergic regulation of inflammatory gene expression in brain. *Neurochem. Int.* **41**, 357-365.
- Figiel I. (2008) Pro-inflammatory cytokine TNF-alpha as a neuroprotective agent in the brain. *Acta Neurobiol. Exp. (Wars.)* **68**, 526-534.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Fishman P. H. and Finberg J. P. (1987) Effect of the tricyclic antidepressant desipramine on beta-adrenergic receptors in cultured rat glioma C6 cells. *J. Neurochem.* **49**, 282-289.
- Flugel A., Hager G., Horvat A., Spitzer C., Singer G. M., Graeber M. B., Kreutzberg G. W. and Schwaiger F. W. (2001) Neuronal MCP-1 expression in response to remote nerve injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab* **21**, 69-76.
- Fornai F., di Poggio A. B., Pellegrini A., Ruggieri S. and Paparelli A. (2007) Noradrenaline in Parkinson's disease: from disease progression to current therapeutics. *Curr. Med. Chem.* **14**, 2330-2334.
- Forstl H., Levy R., Burns A., Luthert P. and Cairns N. (1994) Disproportionate loss of noradrenergic and cholinergic neurons as cause of depression in Alzheimer's disease--a hypothesis. *Pharmacopsychiatry* **27**, 11-15.
- Franke T. F., Hornik C. P., Segev L., Shostak G. A. and Sugimoto C. (2003) PI3K/Akt and apoptosis: size matters. *Oncogene* **22**, 8983-8998.
- Fuhrmann M., Bittner T., Jung C. K., Burgold S., Page R. M., Mitteregger G., Haass C., LaFerla F. M., Kretschmar H. and Herms J. (2010) Microglial Cx3cr1 knockout prevents neuron loss in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nat. Neurosci.* **13**, 411-413.
- Galasko D., Hansen L. A., Katzman R., Wiederholt W., Masliah E., Terry R., Hill L. R., Lessin P. and Thal L. J. (1994) Clinical-neuropathological correlations in Alzheimer's disease and related dementias. *Arch. Neurol.* **51**, 888-895.
- Galasso J. M., Liu Y., Szaflarski J., Warren J. S. and Silverstein F. S. (2000) Monocyte chemoattractant protein-1 is a mediator of acute excitotoxic injury in neonatal rat brain. *Neuroscience* **101**, 737-744.
- Galea E., Heneka M. T., Dello R. C. and Feinstein D. L. (2003) Intrinsic regulation of brain inflammatory responses. *Cell Mol. Neurobiol.* **23**, 625-635.
- Ganju R. K., Brubaker S. A., Chernock R. D., Avraham S. and Groopman J. E. (2000) Beta-chemokine receptor CCR5 signals through SHP1, SHP2, and Syk. *J. Biol. Chem.* **275**, 17263-17268.
- Gavrilyuk V., Horvath P., Weinberg G. and Feinstein D. L. (2001) A 27-bp region of the inducible nitric oxide synthase promoter regulates expression in glial cells. *J. Neurochem.* **78**, 129-140.
- Ge S., Shrestha B., Paul D., Keating C., Cone R., Guglielmotti A. and Pachter J. S. (2012) The CCL2 synthesis inhibitor bindarit targets cells of the neurovascular unit, and suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroinflammation.* **9**, 171.
- Geddes J. R., Carney S. M., Davies C., Furukawa T. A., Kupfer D. J., Frank E. and Goodwin G. M. (2003) Relapse prevention with antidepressant drug treatment in depressive disorders: a systematic review. *Lancet* **361**, 653-661.
- Gerard C. and Gerard N. P. (2001) Chemokines: back to the future? *Nat. Cell Biol.* **3**, E53-E54.

- Gerard C. and Rollins B. J. (2001) Chemokines and disease. *Nat. Immunol.* **2**, 108-115.
- Ghirnikar R. S., Lee Y. L., He T. R. and Eng L. F. (1996) Chemokine expression in rat stab wound brain injury. *J. Neurosci. Res.* **46**, 727-733.
- Giaroni C., Canciani L., Zanetti E., Giuliani D., Pisani R., Oldrini R., Moro E., Trincherà M., Crema F., Lecchini S. and Frigo G. (2008) Effects of chronic desipramine treatment on alpha2-adrenoceptors and mu-opioid receptors in the guinea pig cortex and hippocampus. *Eur. J. Pharmacol.* **579**, 116-125.
- Gibbs M. E. and Summers R. J. (2002) Role of adrenoceptor subtypes in memory consolidation. *Prog. Neurobiol.* **67**, 345-391.
- Gittins R. A. and Harrison P. J. (2011) A morphometric study of glia and neurons in the anterior cingulate cortex in mood disorder. *J. Affect. Disord.* **133**, 328-332.
- Glabinski A. R., Balasingam V., Tani M., Kunkel S. L., Strieter R. M., Yong V. W. and Ransohoff R. M. (1996) Chemokine monocyte chemoattractant protein-1 is expressed by astrocytes after mechanical injury to the brain. *J. Immunol.* **156**, 4363-4368.
- Glabinski A. R. and Ransohoff R. M. (1999a) Chemokines and chemokine receptors in CNS pathology. *J. Neurovirol.* **5**, 3-12.
- Glavin G. B. (1985) Stress and brain noradrenaline: a review. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **9**, 233-243.
- Godefroy D., Gosselin R. D., Yasutake A., Fujimura M., Combadiere C., Maury-Brachet R., Laclau M., Rakwal R., Melik-Parsadaniantz S., Bourdineaud J. P. and Rostene W. (2011) The chemokine CCL2 protects against methylmercury neurotoxicity. *Toxicol. Sci.*
- Godefroy D., Gosselin R. D., Yasutake A., Fujimura M., Combadiere C., Maury-Brachet R., Laclau M., Rakwal R., Melik-Parsadaniantz S., Bourdineaud J. P. and Rostene W. (2012) The chemokine CCL2 protects against methylmercury neurotoxicity. *Toxicol. Sci.* **125**, 209-218.
- Gosselin R. D., Varela C., Banisadr G., Mechighel P., Rostene W., Kitabgi P. and Melik-Parsadaniantz S. (2005) Constitutive expression of CCR2 chemokine receptor and inhibition by MCP-1/CCL2 of GABA-induced currents in spinal cord neurones. *J. Neurochem.* **95**, 1023-1034.
- Gourmala N. G., Buttini M., Limonta S., Sauter A. and Boddeke H. W. (1997) Differential and time-dependent expression of monocyte chemoattractant protein-1 mRNA by astrocytes and macrophages in rat brain: effects of ischemia and peripheral lipopolysaccharide administration. *J. Neuroimmunol.* **74**, 35-44.
- Grace A. A., Gerfen C. R. and Aston-Jones G. (1998) Catecholamines in the central nervous system. Overview. *Adv. Pharmacol.* **42**, 655-670.
- Graeber M. B. and Streit W. J. (2010) Microglia: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* **119**, 89-105.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Griffin W. S., Sheng J. G., Royston M. C., Gentleman S. M., McKenzie J. E., Graham D. I., Roberts G. W. and Mrak R. E. (1998) Glial-neuronal interactions in Alzheimer's disease: the potential role of a 'cytokine cycle' in disease progression. *Brain Pathol.* **8**, 65-72.
- Grudzien A., Shaw P., Weintraub S., Bigio E., Mash D. C. and Mesulam M. M. (2007) Locus coeruleus neurofibrillary degeneration in aging, mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **28**, 327-335.
- Grundke-Iqbal I., Iqbal K., Tung Y. C., Quinlan M., Wisniewski H. M. and Binder L. I. (1986) Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **83**, 4913-4917.
- Guenette S. Y. (2003) Astrocytes: a cellular player in Abeta clearance and degradation. *Trends Mol. Med.* **9**, 279-280.
- Gustafson I., Westerberg E. and Wieloch T. (1990) Protection against ischemia-induced neuronal damage by the alpha 2-adrenoceptor antagonist idazoxan: influence of time of administration and possible mechanisms of action. *J. Cereb. Blood Flow Metab* **10**, 885-894.
- Gustavsson A., Jonsson L., McShane R., Boada M., Wimo A. and Zbrozek A. S. (2010a) Willingness-to-pay for reductions in care need: estimating the value of informal care in Alzheimer's disease. *Int. J. Geriatr. Psychiatry* **25**, 622-632.
- Gustavsson A., Jonsson L., Rapp T., Reynish E., Ousset P. J., Andrieu S., Cantet C., Winblad B., Vellas B. and Wimo A. (2010b) Differences in resource use and costs of dementia care between European countries: baseline data from the ICTUS study. *J. Nutr. Health Aging* **14**, 648-654.
- Guyon A., Skrzydelski D., De G., I, Rovere C., Conductier G., Trocello J. M., Dauge V., Kitabgi P., Rostene W., Nahon J. L. and Melik P. S. (2009) Long term exposure to the chemokine CCL2 activates the nigrostriatal dopamine system: a novel mechanism for the control of dopamine release. *Neuroscience* **162**, 1072-1080.
- Hammerschmidt T., Kummer M. P., Terwel D., Martinez A., Gorji A., Pape H. C., Rommelfanger K. S., Schroeder J. P., Stoll M., Schultze J., Weinshenker D. and Heneka M. T. (2013b) Selective Loss of Noradrenaline Exacerbates Early Cognitive Dysfunction and Synaptic Deficits in APP/PS1 Mice. *Biol. Psychiatry* **73**, 454-463.
- Handel T. M. and Domaille P. J. (1996) Heteronuclear (1H, 13C, 15N) NMR assignments and solution structure of the monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) dimer. *Biochemistry* **35**, 6569-6584.
- Harman D. (2006) Alzheimer's disease pathogenesis: role of aging. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1067**, 454-460.
- Harro J., Pahkla R., Modiri A.-R., Harro M., Kask A. and Oreland L. (1999) Dose-dependent effects of noradrenergic denervation by DSP-4 treatment on forced swimming and beta-adrenoceptor binding in the rat. *J. Neural Transm.* **106**, 619-629.

- Heneka M. T., Galea E., Gavriluyk V., Dumitrescu-Ozimek L., Daeschner J., O'Banion M. K., Weinberg G., Klockgether T. and Feinstein D. L. (2002) Noradrenergic depletion potentiates beta -amyloid-induced cortical inflammation: implications for Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* **22**, 2434-2442.
- Heneka M. T., Gavriluyk V., Landreth G. E., O'Banion M. K., Weinberg G. and Feinstein D. L. (2003) Noradrenergic depletion increases inflammatory responses in brain: effects on IkappaB and HSP70 expression. *J. Neurochem.* **85**, 387-398.
- Heneka M. T., Nadrigny F., Regen T., Martinez-Hernandez A., Dumitrescu-Ozimek L., Terwel D., Jardanhazi-Kurutz D., Walter J., Kirchhoff F., Hanisch U. K. and Kummer M. P. (2010a) Locus ceruleus controls Alzheimer's disease pathology by modulating microglial functions through norepinephrine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **107**, 6058-6063.
- Heneka M. T., Ramanathan M., Jacobs A. H., Dumitrescu-Ozimek L., Bilkei-Gorzo A., Debeir T., Sastre M., Galldikis N., Zimmer A., Hoehn M., Heiss W. D., Klockgether T. and Staufenbiel M. (2006) Locus ceruleus degeneration promotes Alzheimer pathogenesis in amyloid precursor protein 23 transgenic mice. *J. Neurosci.* **26**, 1343-1354.
- Heneka M. T., Rodriguez J. J. and Verkhratsky A. (2010c) Neuroglia in neurodegeneration. *Brain Res. Rev.* **63**, 189-211.
- Herrmann N., Lanctot K. L. and Khan L. R. (2004) The role of norepinephrine in the behavioral and psychological symptoms of dementia. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* **16**, 261-276.
- Hertz L., Lovatt D., Goldman S. A. and Nedergaard M. (2010) Adrenoceptors in brain: cellular gene expression and effects on astrocytic metabolism and [Ca(2+)]i. *Neurochem. Int.* **57**, 411-420.
- Hoh B. L., Hosaka K., Downes D. P., Nowicki K. W., Fernandez C. E., Batich C. D. and Scott E. W. (2011) Monocyte chemotactic protein-1 promotes inflammatory vascular repair of murine carotid aneurysms via a macrophage inflammatory protein-1alpha and macrophage inflammatory protein-2-dependent pathway. *Circulation* **124**, 2243-2252.
- Hulkower K., Brosnan C. F., Aquino D. A., Cammer W., Kulshrestha S., Guida M. P., Rapoport D. A. and Berman J. W. (1993) Expression of CSF-1, c-fms, and MCP-1 in the central nervous system of rats with experimental allergic encephalomyelitis. *J. Immunol.* **150**, 2525-2533.
- Hyduk S. J., Chan J. R., Duffy S. T., Chen M., Peterson M. D., Waddell T. K., Digby G. C., Szaszi K., Kapus A. and Cybulsky M. I. (2007) Phospholipase C, calcium, and calmodulin are critical for alpha4beta1 integrin affinity up-regulation and monocyte arrest triggered by chemoattractants. *Blood* **109**, 176-184.
- Imbimbo B. P., Solfrizzi V. and Panza F. (2010) Are NSAIDs useful to treat Alzheimer's disease or mild cognitive impairment? *Front Aging Neurosci.* **2**.
- Inazu M., Takeda H. and Matsumiya T. (2003) Functional expression of the norepinephrine transporter in cultured rat astrocytes. *J. Neurochem.* **84**, 136-144.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Iqbal K. and Grundke-Iqbal I. (2005) Pharmacological approaches of neurofibrillary degeneration. *Curr. Alzheimer Res.* **2**, 335-341.
- Ishizuka K., Kimura T., Igata-yi R., Katsuragi S., Takamatsu J. and Miyakawa T. (1997) Identification of monocyte chemoattractant protein-1 in senile plaques and reactive microglia of Alzheimer's disease. *Psychiatry Clin. Neurosci.* **51**, 135-138.
- Ivanov A. I., Scheck A. C. and Romanovsky A. A. (2003) Expression of genes controlling transport and catabolism of prostaglandin E2 in lipopolysaccharide fever. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* **284**, R698-R706.
- Iversen L. L., Rossor M. N., Reynolds G. P., Hills R., Roth M., Mountjoy C. Q., Foote S. L., Morrison J. H. and Bloom F. E. (1983) Loss of pigmented dopamine-beta-hydroxylase positive cells from locus coeruleus in senile dementia of Alzheimer's type. *Neurosci. Lett.* **39**, 95-100.
- Jardanhazi-Kurutz D., Kummer M. P., Terwel D., Vogel K., Thiele A. and Heneka M. T. (2011) Distinct adrenergic system changes and neuroinflammation in response to induced locus ceruleus degeneration in APP/PS1 transgenic mice. *Neuroscience* **176**, 396-407.
- Javadi J. I., Perel J. M. and Davis J. M. (1979) Inhibition of biogenic amines uptake by imipramine, desipramine, 2 OH-imipramine and 2 OH-desipramine in rat brain. *Life Sci.* **24**, 21-28.
- Jobe P. C., Mishra P. K., Browning R. A., Wang C., Adams-Curtis L. E., Ko K. H. and Dailey J. W. (1994) Noradrenergic abnormalities in the genetically epilepsy-prone rat. *Brain Res. Bull.* **35**, 493-504.
- Jung H., Toth P. T., White F. A. and Miller R. J. (2008) Monocyte chemoattractant protein-1 functions as a neuromodulator in dorsal root ganglia neurons. *J. Neurochem.* **104**, 254-263.
- Juric D. M., Loncar D. and Carman-Krzan M. (2008) Noradrenergic stimulation of BDNF synthesis in astrocytes: mediation via alpha1- and beta1/beta2-adrenergic receptors. *Neurochem. Int.* **52**, 297-306.
- Kalehua A. N., Nagel J. E., Whelchel L. M., Gides J. J., Pyle R. S., Smith R. J., Kusiak J. W. and Taub D. D. (2004) Monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage inflammatory protein-2 are involved in both excitotoxin-induced neurodegeneration and regeneration. *Exp. Cell Res.* **297**, 197-211.
- Kalinin S., Gavrilyuk V., Polak P. E., Vasser R., Zhao J., Heneka M. T. and Feinstein D. L. (2007) Noradrenaline deficiency in brain increases beta-amyloid plaque burden in an animal model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **28**, 1206-1214.
- Kalinin S., Polak P. E., Lin S. X., Sakharkar A. J., Pandey S. C. and Feinstein D. L. (2012) The noradrenaline precursor L-DOPS reduces pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **33**, 1651-1663.
- Kalinin S., Polak P. E., Madrigal J. L., Gavrilyuk V., Sharp A., Chauhan N., Marien M., Colpaert F. and Feinstein D. L. (2006) Beta-amyloid-dependent expression of NOS2 in neurons: prevention by an alpha2-adrenergic antagonist. *Antioxid. Redox. Signal.* **8**, 873-883.

- Kauppinen T. M. and Swanson R. A. (2005) Poly(ADP-ribose) polymerase-1 promotes microglial activation, proliferation, and matrix metalloproteinase-9-mediated neuron death. *J. Immunol.* **174**, 2288-2296.
- Kawahara R. S., Deng Z. W. and Deuel T. F. (1991) Glucocorticoids inhibit the transcriptional induction of JE, a platelet-derived growth factor-inducible gene. *J. Biol. Chem.* **266**, 13261-13266.
- Keller J. N., Gee J. and Ding Q. (2002) The proteasome in brain aging. *Ageing Res. Rev.* **1**, 279-293.
- Kim E. J., Kwon K. J., Park J. Y., Lee S. H., Moon C. H. and Baik E. J. (2002a) Neuroprotective effects of prostaglandin E2 or cAMP against microglial and neuronal free radical mediated toxicity associated with inflammation. *J. Neurosci. Res.* **70**, 97-107.
- Kim E. J., Kwon K. J., Park J. Y., Lee S. H., Moon C. H. and Baik E. J. (2002b) Neuroprotective effects of prostaglandin E2 or cAMP against microglial and neuronal free radical mediated toxicity associated with inflammation. *J. Neurosci. Res.* **70**, 97-107.
- Kimelberg H. K. and Nedergaard M. (2010) Functions of astrocytes and their potential as therapeutic targets. *Neurotherapeutics.* **7**, 338-353.
- Kitamoto S. and Egashira K. (2003) Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy for cardiovascular diseases. *Expert. Rev. Cardiovasc. Ther.* **1**, 393-400.
- Kiyota T., Gendelman H. E., Weir R. A., Higgins E. E., Zhang G. and Jain M. (2013) CCL2 affects beta-amyloidosis and progressive neurocognitive dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **34**, 1060-1068.
- Kiyota T., Yamamoto M., Xiong H., Lambert M. P., Klein W. L., Gendelman H. E., Ransohoff R. M. and Ikezu T. (2009) CCL2 accelerates microglia-mediated Abeta oligomer formation and progression of neurocognitive dysfunction. *PLoS. One.* **4**, e6197.
- Kong Y., Ruan L., Qian L., Liu X. and Le Y. (2010a) Norepinephrine promotes microglia to uptake and degrade amyloid beta peptide through upregulation of mouse formyl peptide receptor 2 and induction of insulin-degrading enzyme. *J. Neurosci.* **30**, 11848-11857.
- Kornitzer D. and Ciechanover A. (2000) Modes of regulation of ubiquitin-mediated protein degradation. *J. Cell Physiol* **182**, 1-11.
- Kowalska A. (2004) Genetic aspects of amyloid beta-protein fibrillogenesis in Alzheimer's disease. *Folia Neuropathol.* **42**, 235-237.
- Kvetnansky R., Fukuhara K., Pacak K., Cizza G., Goldstein D. S. and Kopin I. J. (1993) Endogenous glucocorticoids restrain catecholamine synthesis and release at rest and during immobilization stress in rats. *Endocrinology* **133**, 1411-1419.
- Lalancette-Hebert M., Gowing G., Simard A., Weng Y. C. and Kriz J. (2007) Selective ablation of proliferating microglial cells exacerbates ischemic injury in the brain. *J. Neurosci.* **27**, 2596-2605.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Langereis J. D., Raaijmakers H. A., Ulfman L. H. and Koenderman L. (2010) Abrogation of NF-kappaB signaling in human neutrophils induces neutrophil survival through sustained p38-MAPK activation. *J. Leukoc. Biol.* **88**, 655-664.
- Lauro C., Cipriani R., Catalano M., Trettel F., Chece G., Brusadin V., Antonilli L., van R. N., Eusebi F., Fredholm B. B. and Limatola C. (2010) Adenosine A1 receptors and microglial cells mediate CX3CL1-induced protection of hippocampal neurons against Glu-induced death. *Neuropsychopharmacology* **35**, 1550-1559.
- Lee D. H. and Goldberg A. L. (1998) Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell Biol.* **8**, 397-403.
- Lee J., Kim S. J., Son T. G., Chan S. L. and Mattson M. P. (2006) Interferon-gamma is up-regulated in the hippocampus in response to intermittent fasting and protects hippocampal neurons against excitotoxicity. *J. Neurosci. Res.* **83**, 1552-1557.
- Lee S., Varvel N. H., Konerth M. E., Xu G., Cardona A. E., Ransohoff R. M. and Lamb B. T. (2010) CX3CR1 deficiency alters microglial activation and reduces beta-amyloid deposition in two Alzheimer's disease mouse models. *Am. J. Pathol.* **177**, 2549-2562.
- Leonard B. E. (1997) The role of the individual in history and related matters. *J. Psychopharmacol.* **11**, 95-96.
- Leonard E. J. and Yoshimura T. (1990) Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). *Immunol. Today* **11**, 97-101.
- Leza J. C., Salas E., Sawicki G., Russell J. C. and Radomski M. W. (1998) The effects of stress on homeostasis in JCR-LA-cp rats: the role of nitric oxide. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **286**, 1397-1403.
- Libet B. (1992) Introduction to slow synaptic potentials and their neuromodulation by dopamine. *Can. J. Physiol Pharmacol.* **70 Suppl**, S3-11.
- Little A. R., Sriram K. and O'Callaghan J. P. (2006) Corticosterone regulates expression of CCL2 in the intact and chemically injured hippocampus. *Neurosci. Lett.* **399**, 162-166.
- Lubkowski J., Bujacz G., Boque L., Domaille P. J., Handel T. M. and Wlodawer A. (1997) The structure of MCP-1 in two crystal forms provides a rare example of variable quaternary interactions. *Nat. Struct. Biol.* **4**, 64-69.
- Luster A. D., Alon R. and von Andrian U. H. (2005) Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat. Immunol.* **6**, 1182-1190.
- Madrigal J. L., Dello R. C., Gavrilyuk V. and Feinstein D. L. (2006) Effects of noradrenaline on neuronal NOS2 expression and viability. *Antioxid. Redox. Signal.* **8**, 885-892.
- Madrigal J. L., Feinstein D. L. and Dello R. C. (2005) Norepinephrine protects cortical neurons against microglial-induced cell death. *J. Neurosci. Res.* **81**, 390-396.

- Madrigal J. L., Garcia-Bueno B., Hinojosa A. E., Polak P., Feinstein D. L. and Leza J. C. (2010) Regulation of MCP-1 production in brain by stress and noradrenaline-modulating drugs. *J. Neurochem.* **113**, 543-551.
- Madrigal J. L., Kalinin S., Richardson J. C. and Feinstein D. L. (2007a) Neuroprotective actions of noradrenaline: effects on glutathione synthesis and activation of peroxisome proliferator activated receptor delta. *J. Neurochem.* **103**, 2092-2101.
- Madrigal J. L., Leza J. C., Polak P., Kalinin S. and Feinstein D. L. (2009) Astrocyte-derived MCP-1 mediates neuroprotective effects of noradrenaline. *J. Neurosci.* **29**, 263-267.
- Magariños A. M., Verdugo J. M. and McEwen B. S. (1997) Chronic stress alters synaptic terminal structure in hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**, 14002-14008.
- Magistretti P. J. (1988) Regulation of glycogenolysis by neurotransmitters in the central nervous system. *Diabete Metab* **14**, 237-246.
- Malan T. P., Mata H. P. and Porreca F. (2002) Spinal GABA(A) and GABA(B) receptor pharmacology in a rat model of neuropathic pain. *Anesthesiology* **96**, 1161-1167.
- Malberg J. E., Eisch A. J., Nestler E. J. and Duman R. S. (2000) Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J. Neurosci.* **20**, 9104-9110.
- Mander P. and Brown G. C. (2005) Activation of microglial NADPH oxidase is synergistic with glial iNOS expression in inducing neuronal death: a dual-key mechanism of inflammatory neurodegeneration. *J. Neuroinflammation.* **2**, 20.
- Mann D. M., Yates P. O. and Hawkes J. (1983) The pathology of the human locus ceruleus. *Clin. Neuropathol.* **2**, 1-7.
- Mantovani A. (1999) Chemokines. Introduction and overview. *Chem. Immunol.* **72**, 1-6.
- Marien M., Briley M. and Colpaert F. (1993) Noradrenaline depletion exacerbates MPTP-induced striatal dopamine loss in mice. *Eur. J. Pharmacol.* **236**, 487-489.
- Marien M. R., Colpaert F. C. and Rosenquist A. C. (2004) Noradrenergic mechanisms in neurodegenerative diseases: a theory. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **45**, 38-78.
- Martire A., Fernandez B., Buehler A., Strohm C., Schaper J., Zimmermann R., Kolattukudy P. E. and Schaper W. (2003) Cardiac overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in transgenic mice mimics ischemic preconditioning through SAPK/JNK1/2 activation. *Cardiovasc. Res.* **57**, 523-534.
- Mastrangelo M. A., Sudol K. L., Narrow W. C. and Bowers W. J. (2009) Interferon- $\gamma$  differentially affects Alzheimer's disease pathologies and induces neurogenesis in triple transgenic-AD mice. *Am. J. Pathol.* **175**, 2076-2088.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Matthews K. L., Chen C. P., Esiri M. M., Keene J., Minger S. L. and Francis P. T. (2002) Noradrenergic changes, aggressive behavior, and cognition in patients with dementia. *Biol. Psychiatry* **51**, 407-416.
- McQuibban G. A., Gong J. H., Wong J. P., Wallace J. L., Clark-Lewis I. and Overall C. M. (2002) Matrix metalloproteinase processing of monocyte chemoattractant proteins generates CC chemokine receptor antagonists with anti-inflammatory properties in vivo. *Blood* **100**, 1160-1167.
- Mellado M., Rodriguez-Frade J. M., Aragay A., del R. G., Martin A. M., Vila-Coro A. J., Serrano A., Mayor F., Jr. and Martinez A. (1998) The chemokine monocyte chemoattractant protein 1 triggers Janus kinase 2 activation and tyrosine phosphorylation of the CCR2B receptor. *J. Immunol.* **161**, 805-813.
- Memet S. (2006) NF-kappaB functions in the nervous system: from development to disease. *Biochem. Pharmacol.* **72**, 1180-1195.
- Meunier S., Bernassau J. M., Guillemot J. C., Ferrara P. and Darbon H. (1997) Determination of the three-dimensional structure of CC chemokine monocyte chemoattractant protein 3 by 1H two-dimensional NMR spectroscopy. *Biochemistry* **36**, 4412-4422.
- Milatovic D., Montine T. J. and Aschner M. (2011) Prostanoid signaling: dual role for prostaglandin E2 in neurotoxicity. *Neurotoxicology* **32**, 312-319.
- Mizobe K., Kishihara K., Ezz-Din El-Naggar R., Madkour G. A., Kubo C. and Nomoto K. (1997) Restraint stress-induced elevation of endogenous glucocorticoid suppresses migration of granulocytes and macrophages to an inflammatory locus. *J. Neuroimmunol.* **73**, 81-89.
- Mojsilovic-Petrovic J., Callaghan D., Cui H., Dean C., Stanimirovic D. B. and Zhang W. (2007) Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) is involved in the regulation of hypoxia-stimulated expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1/CCL2) and MCP-5 (Ccl12) in astrocytes. *J. Neuroinflammation.* **4**, 12.
- Montgomery S. L. and Bowers W. J. (2012) Tumor necrosis factor-alpha and the roles it plays in homeostatic and degenerative processes within the central nervous system. *J. Neuroimmune. Pharmacol.* **7**, 42-59.
- Mori K., Ozaki E., Zhang B., Yang L., Yokoyama A., Takeda I., Maeda N., Sakanaka M. and Tanaka J. (2002) Effects of norepinephrine on rat cultured microglial cells that express alpha1, alpha2, beta1 and beta2 adrenergic receptors. *Neuropharmacology* **43**, 1026-1034.
- Morin D., Sapena R., Zini R., Onteniente B. and Tillement J. P. (1997) Characterization of beta-adrenergic receptors of freshly isolated astrocytes and neurons from rat brain. *Life Sci.* **60**, 315-324.
- Morrison R. S., Sharma A., de V. J. and Bradshaw R. A. (1986) Basic fibroblast growth factor supports the survival of cerebral cortical neurons in primary culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **83**, 7537-7541.

- Mrak R. E. and Griffin W. S. (2005) Potential inflammatory biomarkers in Alzheimer's disease. *J. Alzheimers. Dis.* **8**, 369-375.
- Mrak R. E., Sheng J. G. and Griffin W. S. (1995) Glial cytokines in Alzheimer's disease: review and pathogenic implications. *Hum. Pathol.* **26**, 816-823.
- Muessel M. J., Klein R. M., Wilson A. M. and Berman N. E. (2002) Ablation of the chemokine monocyte chemoattractant protein-1 delays retrograde neuronal degeneration, attenuates microglial activation, and alters expression of cell death molecules. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **103**, 12-27.
- Murchison C. F., Zhang X. Y., Zhang W. P., Ouyang M., Lee A. and Thomas S. A. (2004) A distinct role for norepinephrine in memory retrieval. *Cell* **117**, 131-143.
- Naert G. and Rivest S. (2011) CC chemokine receptor 2 deficiency aggravates cognitive impairments and amyloid pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* **31**, 6208-6220.
- Nakayama K., Furusu A., Xu Q., Konta T. and Kitamura M. (2001) Unexpected transcriptional induction of monocyte chemoattractant protein 1 by proteasome inhibition: involvement of the c-Jun N-terminal kinase-activator protein 1 pathway. *J. Immunol.* **167**, 1145-1150.
- Ni W., Egashira K., Kitamoto S., Kataoka C., Koyanagi M., Inoue S., Imaizumi K., Akiyama C., Nishida K. I. and Takeshita A. (2001) New anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy attenuates atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation* **103**, 2096-2101.
- O'Donnell S. L., Frederick T. J., Krady J. K., Vannucci S. J. and Wood T. L. (2002) IGF-I and microglia/macrophage proliferation in the ischemic mouse brain. *Glia* **39**, 85-97.
- O'Sullivan J. B., Ryan K. M., Curtin N. M., Harkin A. and Connor T. J. (2009) Noradrenaline reuptake inhibitors limit neuroinflammation in rat cortex following a systemic inflammatory challenge: implications for depression and neurodegeneration. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **12**, 687-699.
- Omata N., Yasutomi M., Yamada A., Iwasaki H., Mayumi M. and Ohshima Y. (2002) Monocyte chemoattractant protein-1 selectively inhibits the acquisition of CD40 ligand-dependent IL-12-producing capacity of monocyte-derived dendritic cells and modulates Th1 immune response. *J. Immunol.* **169**, 4861-4866.
- Ordway G. A., Widdowson P. S., Smith K. S. and Halaris A. (1994) Agonist binding to alpha 2-adrenoceptors is elevated in the locus coeruleus from victims of suicide. *J. Neurochem.* **63**, 617-624.
- Papay R., Gaivin R., McCune D. F., Rorabaugh B. R., Macklin W. B., McGrath J. C. and Perez D. M. (2004) Mouse alpha1B-adrenergic receptor is expressed in neurons and NG2 oligodendrocytes. *J. Comp Neurol.* **478**, 1-10.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Paresce D. M., Ghosh R. N. and Maxfield F. R. (1996) Microglial cells internalize aggregates of the Alzheimer's disease amyloid beta-protein via a scavenger receptor. *Neuron* **17**, 553-565.
- Pekny M. and Nilsson M. (2005) Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia* **50**, 427-434.
- Perez-Martin M., Cifuentes M., Grondona J. M., Lopez-Avalos M. D., Gomez-Pinedo U., Garcia-Verdugo J. M. and Fernandez-Llebrez P. (2010) IGF-I stimulates neurogenesis in the hypothalamus of adult rats. *Eur. J. Neurosci.* **31**, 1533-1548.
- Petersen R. C., Doody R., Kurz A., Mohs R. C., Morris J. C., Rabins P. V., Ritchie K., Rossor M., Thal L. and Winblad B. (2001) Current concepts in mild cognitive impairment. *Arch. Neurol.* **58**, 1985-1992.
- Poirier J., Davignon J., Bouthillier D., Kogan S., Bertrand P. and Gauthier S. (1993) Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease. *Lancet* **342**, 697-699.
- Polak P. E., Kalinin S. and Feinstein D. L. (2011) Locus coeruleus damage and noradrenaline reductions in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain* **134**, 665-677.
- Quinones M. P., Kalkonde Y., Estrada C. A., Jimenez F., Ramirez R., Mahimainathan L., Mummidi S., Choudhury G. G., Martinez H., Adams L., Mack M., Reddick R. L., Maffi S., Haralambous S., Probert L., Ahuja S. K. and Ahuja S. S. (2008) Role of astrocytes and chemokine systems in acute TNFalpha induced demyelinating syndrome: CCR2-dependent signals promote astrocyte activation and survival via NF-kappaB and Akt. *Mol. Cell Neurosci.* **37**, 96-109.
- Ramirez B. G., Blazquez C., Gomez del P. T., Guzman M. and de Ceballos M. L. (2005) Prevention of Alzheimer's disease pathology by cannabinoids: neuroprotection mediated by blockade of microglial activation. *J. Neurosci.* **25**, 1904-1913.
- Ramos B. P. and Arnsten A. F. (2007) Adrenergic pharmacology and cognition: focus on the prefrontal cortex. *Pharmacol. Ther.* **113**, 523-536.
- Ransohoff R. M. (1999) Mechanisms of inflammation in MS tissue: adhesion molecules and chemokines. *J. Neuroimmunol.* **98**, 57-68.
- Ransohoff R. M., Glabinski A. and Tani M. (1996) Chemokines in immune-mediated inflammation of the central nervous system. *Cytokine Growth Factor Rev.* **7**, 35-46.
- Ransohoff R. M., Hamilton T. A., Tani M., Stoler M. H., Shick H. E., Major J. A., Estes M. L., Thomas D. M. and Tuohy V. K. (1993) Astrocyte expression of mRNA encoding cytokines IP-10 and JE/MCP-1 in experimental autoimmune encephalomyelitis. *FASEB J.* **7**, 592-600.
- Re D. B. and Przedborski S. (2006) Fractalkine: moving from chemotaxis to neuroprotection. *Nat. Neurosci.* **9**, 859-861.

- Reid C., Rushe M., Jarpe M., van V. H., Dolinski B., Qian F., Cachero T. G., Cuervo H., Yanachkova M., Nwankwo C., Wang X., Etienne N., Garber E., Bailly V., de F. A. and Boriack-Sjodin P. A. (2006) Structure activity relationships of monocyte chemoattractant proteins in complex with a blocking antibody. *Protein Eng Des Sel* **19**, 317-324.
- Renauld A. E., Ignatowski T. A. and Spengler R. N. (2004) Alpha 2-adrenergic receptor inhibition of cAMP accumulation is transformed to facilitation by tumor necrosis factor-alpha. *Brain Res.* **1004**, 212-216.
- Rezaie P., Trillo-Pazos G., Everall I. P. and Male D. K. (2002) Expression of beta-chemokines and chemokine receptors in human fetal astrocyte and microglial co-cultures: potential role of chemokines in the developing CNS. *Glia* **37**, 64-75.
- Richartz E., Batra A., Simon P., Wormstall H., Bartels M., Buchkremer G. and Schott K. (2005a) Diminished production of proinflammatory cytokines in patients with Alzheimer's disease. *Dement. Geriatr. Cogn Disord.* **19**, 184-188.
- Richartz E., Stransky E., Batra A., Simon P., Lewczuk P., Buchkremer G., Bartels M. and Schott K. (2005b) Decline of immune responsiveness: a pathogenetic factor in Alzheimer's disease? *J. Psychiatr. Res.* **39**, 535-543.
- Roca H., Varsos Z. and Pienta K. J. (2008) CCL2 protects prostate cancer PC3 cells from autophagic death via phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-dependent survivin up-regulation. *J. Biol. Chem.* **283**, 25057-25073.
- Rollins B. J. (1997) Chemokines. *Blood* **90**, 909-928.
- Rollins B. J., Stier P., Ernst T. and Wong G. G. (1989) The human homolog of the JE gene encodes a monocyte secretory protein. *Mol. Cell Biol.* **9**, 4687-4695.
- Rosito M., Deflorio C., Limatola C. and Trettel F. (2012) CXCL16 orchestrates adenosine A3 receptor and MCP-1/CCL2 activity to protect neurons from excitotoxic cell death in the CNS. *J. Neurosci.* **32**, 3154-3163.
- Rossi D. and Zlotnik A. (2000) The biology of chemokines and their receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **18**, 217-242.
- Rostene W., Kitabgi P. and Parsadaniantz S. M. (2007) Chemokines: a new class of neuromodulator? *Nat. Rev. Neurosci.* **8**, 895-903.
- Rot A. and von Andrian U. H. (2004) Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokines grammar for immune cells. *Annu. Rev. Immunol.* **22**, 891-928.
- Salm A. K. and McCarthy K. D. (1989) Expression of beta-adrenergic receptors by astrocytes isolated from adult rat cortex. *Glia* **2**, 346-352.
- Sanders S. K., Crean S. M., Boxer P. A., Kellner D., LaRosa G. J. and Hunt S. W., III (2000) Functional differences between monocyte chemotactic protein-1 receptor A and monocyte chemotactic protein-1 receptor B expressed in a Jurkat T cell. *J. Immunol.* **165**, 4877-4883.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Santarelli L., Saxe M., Gross C., Surget A., Battaglia F., Dulawa S., Weisstaub N., Lee J., Duman R., Arancio O., Belzung C. and Hen R. (2003) Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* **301**, 805-809.
- Sapolsky R. M. (2000) Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders. *Arch. Gen. Psychiatry* **57**, 925-935.
- Sara S. J. (2009) The locus coeruleus and noradrenergic modulation of cognition. *Nat. Rev. Neurosci.* **10**, 211-223.
- Schlachetzki J. C., Fiebich B. L., Haake E., de Oliveira A. C., Candelario-Jalil E., Heneka M. T. and Hull M. (2010) Norepinephrine enhances the LPS-induced expression of COX-2 and secretion of PGE2 in primary rat microglia. *J. Neuroinflammation.* **7**, 2.
- Schleimer R. P. (1993) An overview of glucocorticoid anti-inflammatory actions. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **45 Suppl 1**, S3-S7.
- Schubert D., Soucek T. and Blouw B. (2009) The induction of HIF-1 reduces astrocyte activation by amyloid beta peptide. *Eur. J. Neurosci.* **29**, 1323-1334.
- Schwartz J. P. and Nishiyama N. (1994) Neurotrophic factor gene expression in astrocytes during development and following injury. *Brain Res. Bull.* **35**, 403-407.
- Semple B. D., Frugier T. and Morganti-Kossmann M. C. (2010a) CCL2 modulates cytokine production in cultured mouse astrocytes. *J. Neuroinflammation.* **7**, 67.
- Semple B. D., Kossmann T. and Morganti-Kossmann M. C. (2010b) Role of chemokines in CNS health and pathology: a focus on the CCL2/CCR2 and CXCL8/CXCR2 networks. *J. Cereb. Blood Flow Metab* **30**, 459-473.
- Shaftel S. S., Griffin W. S. and O'Banion M. K. (2008) The role of interleukin-1 in neuroinflammation and Alzheimer disease: an evolving perspective. *J. Neuroinflammation.* **5**, 7.
- Sheng J. G., Mrak R. E. and Griffin W. S. (1995) Microglial interleukin-1 alpha expression in brain regions in Alzheimer's disease: correlation with neuritic plaque distribution. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **21**, 290-301.
- Shi J., Wang Q., Johansson J. U., Liang X., Woodling N. S., Priyam P., Loui T. M., Merchant M., Breyer R. M., Montine T. J. and Andreasson K. (2012) Inflammatory prostaglandin E2 signaling in a mouse model of Alzheimer disease. *Ann. Neurol.* **72**, 788-798.
- Shimojo M., Nakajima K., Takei N., Hamanoue M. and Kohsaka S. (1991) Production of basic fibroblast growth factor in cultured rat brain microglia. *Neurosci. Lett.* **123**, 229-231.
- Shyy Y. J., Li Y. S. and Kolattukudy P. E. (1990) Structure of human monocyte chemotactic protein gene and its regulation by TPA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **169**, 346-351.
- Soliman M. L., Combs C. K. and Rosenberger T. A. (2013) Modulation of Inflammatory Cytokines and Mitogen-activated Protein Kinases by Acetate in Primary Astrocytes. *J. Neuroimmune. Pharmacol.* **8**, 287-300.

- Stewart W. F., Kawas C., Corrada M. and Metter E. J. (1997) Risk of Alzheimer's disease and duration of NSAID use. *Neurology* **48**, 626-632.
- Stowe A. M., Wacker B. K., Cravens P. D., Perfater J. L., Li M. K., Hu R., Freie A. B., Stuve O. and Gidday J. M. (2012) CCL2 upregulation triggers hypoxic preconditioning-induced protection from stroke. *J. Neuroinflammation*. **9**, 33.
- Streit W. J. (2002) Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia* **40**, 133-139.
- Subhash M. N., Nagaraja M. R., Sharada S. and Vinod K. Y. (2003) Cortical alpha-adrenoceptor downregulation by tricyclic antidepressants in the rat brain. *Neurochem. Int.* **43**, 603-609.
- Suk K., Lee J., Hur J., Kim Y. S., Lee M., Cha S., Yeou K. S. and Kim H. (2001) Activation-induced cell death of rat astrocytes. *Brain Res.* **900**, 342-347.
- Szelenyi J. (2001) Cytokines and the central nervous system. *Brain Res. Bull.* **54**, 329-338.
- Szot P., White S. S., Greenup J. L., Leverenz J. B., Peskind E. R. and Raskind M. A. (2005) Alpha1-adrenoreceptor in human hippocampus: binding and receptor subtype mRNA expression. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **139**, 367-371.
- Tanaka K. F., Kashima H., Suzuki H., Ono K. and Sawada M. (2002) Existence of functional beta1- and beta2-adrenergic receptors on microglia. *J. Neurosci. Res.* **70**, 232-237.
- Tanaka T., Minami M., Nakagawa T. and Satoh M. (2004) Enhanced production of monocyte chemoattractant protein-1 in the dorsal root ganglia in a rat model of neuropathic pain: possible involvement in the development of neuropathic pain. *Neurosci. Res.* **48**, 463-469.
- Tanzi R. E., Moir R. D. and Wagner S. L. (2004) Clearance of Alzheimer's Abeta peptide: the many roads to perdition. *Neuron* **43**, 605-608.
- Tellioglu T. and Robertson D. (2001) Genetic or acquired deficits in the norepinephrine transporter: current understanding of clinical implications. *Expert. Rev. Mol. Med.* **2001**, 1-10.
- Telner JI. (1984) Psychiatric progress. The learned helplessness model of depression. *J. Psychiatric Res.* **18**, 207-215.
- Terao A., Apte-Deshpande A., Dousman L., Morairty S., Eynon B. P., Kilduff T. S. and Freund Y. R. (2002) Immune response gene expression increases in the aging murine hippocampus. *J. Neuroimmunol.* **132**, 99-112.
- Thacker M. A., Clark A. K., Bishop T., Grist J., Yip P. K., Moon L. D., Thompson S. W., Marchand F. and McMahon S. B. (2009) CCL2 is a key mediator of microglia activation in neuropathic pain states. *Eur. J. Pain* **13**, 263-272.
- Thelen M. (2001) Dancing to the tune of chemokines. *Nat. Immunol.* **2**, 129-134.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Thery C., Dobbertin A. and Mallat M. (1994) Downregulation of in vitro neurotoxicity of brain macrophages by prostaglandin E2 and a beta-adrenergic agonist. *Glia* **11**, 383-386.
- Thomas S. A. and Palmiter R. D. (1997) Disruption of the dopamine beta-hydroxylase gene in mice suggests roles for norepinephrine in motor function, learning, and memory. *Behav. Neurosci.* **111**, 579-589.
- Thompson S. J., Loftus L. T., Ashley M. D. and Meller R. (2008a) Ubiquitin-proteasome system as a modulator of cell fate. *Curr. Opin. Pharmacol.* **8**, 90-95.
- Thompson W. L., Karpus W. J. and Van Eldik L. J. (2008b) MCP-1-deficient mice show reduced neuroinflammatory responses and increased peripheral inflammatory responses to peripheral endotoxin insult. *J. Neuroinflammation.* **5**, 35.
- Tran P. B., Ren D., Veldhouse T. J. and Miller R. J. (2004) Chemokine receptors are expressed widely by embryonic and adult neural progenitor cells. *J. Neurosci. Res.* **76**, 20-34.
- Traver S., Salthun-Lassalle B., Marien M., Hirsch E. C., Colpaert F. and Michel P. P. (2005) The neurotransmitter noradrenaline rescues septal cholinergic neurons in culture from degeneration caused by low-level oxidative stress. *Mol. Pharmacol.* **67**, 1882-1891.
- Tripathy D., Thirumangalakudi L. and Grammas P. (2010) RANTES upregulation in the Alzheimer's disease brain: a possible neuroprotective role. *Neurobiol. Aging* **31**, 8-16.
- Troadec J. D., Marien M., Darios F., Hartmann A., Ruberg M., Colpaert F. and Michel P. P. (2001) Noradrenaline provides long-term protection to dopaminergic neurons by reducing oxidative stress. *J. Neurochem.* **79**, 200-210.
- Troadec J. D., Marien M., Mourlevat S., Debeir T., Ruberg M., Colpaert F. and Michel P. P. (2002) Activation of the mitogen-activated protein kinase (ERK(1/2)) signaling pathway by cyclic AMP potentiates the neuroprotective effect of the neurotransmitter noradrenaline on dopaminergic neurons. *Mol. Pharmacol.* **62**, 1043-1052.
- Tuppo E. E. and Arias H. R. (2005) The role of inflammation in Alzheimer's disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **37**, 289-305.
- Van Eldik L. J., Koppal T. and Watterson D. M. (2002) Barriers to Alzheimer disease drug discovery and development in academia. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* **16 Suppl 1**, S18-S28.
- van Marum R. J. (2008) Current and future therapy in Alzheimer's disease. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **22**, 265-274.
- Van C. E., Van D. J. and Opendakker G. (1999) The MCP/eotaxin subfamily of CC chemokines. *Cytokine Growth Factor Rev.* **10**, 61-86.
- Van D., V, Tekstra J., Beelen R. H., Tensen C. P., Van D., V and De Groot C. J. (1999) Expression of MCP-1 by reactive astrocytes in demyelinating multiple sclerosis lesions. *Am. J. Pathol.* **154**, 45-51.

- Vanguri P. and Farber J. M. (1994) IFN and virus-inducible expression of an immediate early gene, *crg-2/IP-10*, and a delayed gene, *I-A alpha* in astrocytes and microglia. *J. Immunol.* **152**, 1411-1418.
- Von B. R. (2007) Glial cell dysregulation: a new perspective on Alzheimer disease. *Neurotox. Res.* **12**, 215-232.
- Von B. R. and Eugenin J. (2004) Microglial reactivity to beta-amyloid is modulated by astrocytes and proinflammatory factors. *Brain Res.* **1025**, 186-193.
- Von B. R., Ramirez G., Toro R. and Eugenin J. (2007) Pro-inflammatory conditions promote neuronal damage mediated by Amyloid Precursor Protein and decrease its phagocytosis and degradation by microglial cells in culture. *Neurobiol. Dis.* **26**, 153-164.
- Wakimoto N., Wolf I., Yin D., O'Kelly J., Akagi T., Abramovitz L., Black K. L., Tai H. H. and Koeffler H. P. (2008) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs suppress glioma via 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase. *Cancer Res.* **68**, 6978-6986.
- Walicke P., Cowan W. M., Ueno N., Baird A. and Guillemin R. (1986) Fibroblast growth factor promotes survival of dissociated hippocampal neurons and enhances neurite extension. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **83**, 3012-3016.
- Walsh D. M., Klyubin I., Fadeeva J. V., Rowan M. J. and Selkoe D. J. (2002) Amyloid-beta oligomers: their production, toxicity and therapeutic inhibition. *Biochem. Soc. Trans.* **30**, 552-557.
- Wegiel J. and Wisniewski H. M. (1990) The complex of microglial cells and amyloid star in three-dimensional reconstruction. *Acta Neuropathol.* **81**, 116-124.
- Weinshenker D. (2008) Functional consequences of locus coeruleus degeneration in Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* **5**, 342-345.
- Weiss J. M., Downie S. A., Lyman W. D. and Berman J. W. (1998) Astrocyte-derived monocyte-chemoattractant protein-1 directs the transmigration of leukocytes across a model of the human blood-brain barrier. *J. Immunol.* **161**, 6896-6903.
- Wenk G. L. (2006) Neuropathologic changes in Alzheimer's disease: potential targets for treatment. *J. Clin. Psychiatry* **67 Suppl 3**, 3-7.
- White F. A., Jung H. and Miller R. J. (2007) Chemokines and the pathophysiology of neuropathic pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **104**, 20151-20158.
- Widera D., Holtkamp W., Entschladen F., Niggemann B., Zanker K., Kaltschmidt B. and Kaltschmidt C. (2004) MCP-1 induces migration of adult neural stem cells. *Eur. J. Cell Biol.* **83**, 381-387.
- Wiggins H. and Rappoport J. (2010) An agarose spot assay for chemotactic invasion. *Biotechniques* **48**, 121-124.
- Wilkinson B. L., Cramer P. E., Varvel N. H., Reed-Geaghan E., Jiang Q., Szabo A., Herrup K., Lamb B. T. and Landreth G. E. (2012) Ibuprofen attenuates oxidative damage through NOX2 inhibition in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **33**, 197-32.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Wimo A., Jonsson L., Gustavsson A., McDaid D., Ersek K., Georges J., Gulacsi L., Karpati K., Kenigsberg P. and Valtonen H. (2011) The economic impact of dementia in Europe in 2008-cost estimates from the Eurocode project. *Int. J. Geriatr. Psychiatry* **26**, 825-832.
- Wood J. G., Mirra S. S., Pollock N. J. and Binder L. I. (1986) Neurofibrillary tangles of Alzheimer disease share antigenic determinants with the axonal microtubule-associated protein tau (tau). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **83**, 4040-4043.
- Wyss-Coray T. and Mucke L. (2002) Inflammation in neurodegenerative disease--a double-edged sword. *Neuron* **35**, 419-432.
- Yadav A., Saini V. and Arora S. (2010) MCP-1: chemoattractant with a role beyond immunity: a review. *Clin. Chim. Acta* **411**, 1570-1579.
- Yan D., Guo L. and Wang Y. (2006a) Requirement of dendritic Akt degradation by the ubiquitin-proteasome system for neuronal polarity. *J. Cell Biol.* **174**, 415-424.
- Yang E. J., Lee J. S., Yun C. Y. and Kim I. S. (2011a) The pro-apoptotic effect of hydroquinone in human neutrophils and eosinophils. *Toxicol. In Vitro* **25**, 131-137.
- Yang G., Meng Y., Li W., Yong Y., Fan Z., Ding H., Wei Y., Luo J. and Ke Z. J. (2011b) Neuronal MCP-1 mediates microglia recruitment and neurodegeneration induced by the mild impairment of oxidative metabolism. *Brain Pathol.* **21**, 279-297.
- Yao H., Peng F., Dhillon N., Callen S., Bokhari S., Stehno-Bittel L., Ahmad S. O., Wang J. Q. and Buch S. (2009) Involvement of TRPC channels in CCL2-mediated neuroprotection against tat toxicity. *J. Neurosci.* **29**, 1657-1669.
- Yao Y. and Tsirka S. E. (2010) The C terminus of mouse monocyte chemoattractant protein 1 (MCP1) mediates MCP1 dimerization while blocking its chemotactic potency. *J. Biol. Chem.* **285**, 31509-31516.
- Yao Y. and Tsirka S. E. (2011) Mouse MCP1 C-terminus inhibits human MCP1-induced chemotaxis and BBB compromise. *J. Neurochem.* **118**, 215-223.
- Yokoyama A., Yang L., Itoh S., Mori K. and Tanaka J. (2004) Microglia, a potential source of neurons, astrocytes, and oligodendrocytes. *Glia* **45**, 96-104.
- Yoshie O., Imai T. and Nomiyama H. (2001) Chemokines in immunity. *Adv. Immunol.* **78**, 57-110.
- Zarow C., Lyness S. A., Mortimer J. A. and Chui H. C. (2003) Neuronal loss is greater in the locus coeruleus than nucleus basalis and substantia nigra in Alzheimer and Parkinson diseases. *Arch. Neurol.* **60**, 337-341.
- Zerpa H., Crawford C., Knight G. E., Fordham A. F., Janska S. E., Peppiatt-Wildman C. M., Elliott J., Burnstock G. and Wildman S. S. (2013) Extracellular ATP signaling in equine digital blood vessels. *Eur. J. Pharmacol.* **702**, 242-249.

- Zhang H. T., Whisler L. R., Huang Y., Xiang Y. and O'Donnell J. M. (2009) Postsynaptic alpha-2 adrenergic receptors are critical for the antidepressant-like effects of desipramine on behavior. *Neuropsychopharmacology* **34**, 1067-1077.
- Zhang J., Shi X. Q., Echeverry S., Mogil J. S., De K. Y. and Rivest S. (2007) Expression of CCR2 in both resident and bone marrow-derived microglia plays a critical role in neuropathic pain. *J. Neurosci.* **27**, 12396-12406.
- Zhang Y. and Rollins B. J. (1995) A dominant negative inhibitor indicates that monocyte chemoattractant protein 1 functions as a dimer. *Mol. Cell Biol.* **15**, 4851-4855.
- Zhou Y., Ling E. A. and Dheen S. T. (2007a) Dexamethasone suppresses monocyte chemoattractant protein-1 production via mitogen activated protein kinase phosphatase-1 dependent inhibition of Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase in activated rat microglia. *J. Neurochem.* **102**, 667-678.
- Zhou Y., Tang H., Liu J., Dong J. and Xiong H. (2011) Chemokine CCL2 modulation of neuronal excitability and synaptic transmission in rat hippocampal slices. *J. Neurochem.* **116**, 406-414.
- Zhou Z., Zhen J., Karpowich N. K., Goetz R. M., Law C. J., Reith M. E. and Wang D. N. (2007b) LeuT-desipramine structure reveals how antidepressants block neurotransmitter reuptake. *Science* **317**, 1390-1393.
- Zindler E. and Zipp F. (2010) Neuronal injury in chronic CNS inflammation. *Best. Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.* **24**, 551-562.
- Zisman D. A., Kunkel S. L., Strieter R. M., Tsai W. C., Bucknell K., Wilkowski J. and Standiford T. J. (1997a) MCP-1 protects mice in lethal endotoxemia. *J. Clin. Invest* **99**, 2832-2836.
- Zujovic V., Benavides J., Vige X., Carter C. and Taupin V. (2000) Fractalkine modulates TNF-alpha secretion and neurotoxicity induced by microglial activation. *Glia* **29**, 305-315.



X.PUBLICACIONES DERIVADAS  
DEL ESTUDIO



## Regulation of MCP-1 production in brain by stress and noradrenaline-modulating drugs

Jose L. M. Madrigal,\* Borja Garcia-Bueno,\* Ara E. Hinojosa,\* Paul Polak,† Douglas L. Feinstein† and Juan C. Leza\*

\*Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, and Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM), Spain

†Department of Anaesthesiology, University of Illinois, & Jesse Brown Veteran's Affairs Hospital, Chicago, Illinois, USA

### Abstract

While it is accepted that noradrenaline (NA) reduction in brain contributes to the progression of certain neurodegenerative diseases, the mechanisms through which NA exerts its protective actions are not well known. We previously reported that NA induced production of monocyte chemoattractant protein (MCP-1/CCL2) in cultured astrocytes mediated some of the neuroprotective actions of NA. We have now examined the regulation of MCP-1 production *in vivo*. Treatment of mice with the NA precursor L-threo-3,4-dihydroxyphenylserine induced the production of MCP-1 in astrocytes. In contrast, exposure to stress (a process known to elevate brain NA levels) produced only a moderate increase of MCP-1 because of the inhibitory activity of glucocorticoids released during the

stress response. Similarly, corticosterone treatment of astrocytes caused a reduction of constitutive as well as the NA-induced MCP-1 production. When stressed rats had the production of glucocorticoids blocked by the selective inhibitor metyrapone, a large increase of MCP-1 concentration was observed in cortex, whereas propranolol (a beta adrenergic receptor blocker) avoided modifications of MCP-1 after stress. Desipramine (an inhibitor of NA reuptake) also caused an increase of MCP-1 in cortex. These data suggest that some phenomena caused by the alteration of NA or glucocorticoids could be mediated by MCP-1.

**Keywords:** CCL2, depression, desipramine, MCP-1, noradrenaline, stress.

*J. Neurochem.* (2010) **113**, 543–551.

Several lines of evidence point to a relationship between the reduction of noradrenaline (NA) levels in brain and the progression of multiple neurodegenerative diseases. For example, it is well known that the noradrenergic neurons of the locus coeruleus are significantly lost or damaged in Alzheimer's disease (Bondareff *et al.* 1981) as well as Parkinson's disease (Fornai *et al.* 2007); and that experimental manipulations that reduce locus coeruleus function exacerbate neurological damage in animal models (Heneka *et al.* 2006; Kalinin *et al.* 2007). Although some studies have shown that NA is a potent anti-inflammatory agent (Galea *et al.* 2003) and has direct neuroprotective effects (Galea *et al.* 2003; Kalinin *et al.* 2006), its precise mechanism of action remain to be fully elucidated. Recently (Madrigal *et al.* 2009), we described *in vitro* studies showing that some of the neuroprotective effects of NA are mediated by production of the monocyte chemoattractant protein (MCP-1/CCL2).

The chemokine MCP-1 has been subjected to multiple studies because of its key role in the development of inflammatory responses (Harkness *et al.* 2003). MCP-1 is one of the main agents responsible for the attraction of monocytes and other cells involved in inflammatory/immune actions (Deshmane *et al.* 2009). As these processes may lead to further damage in brain because of the characteristics of this tissue, numerous studies have focused on the suppression of MCP-1 actions as a way to reduce the

Received December 2, 2009; revised manuscript received/accepted January 20, 2010.

Address correspondence and reprint requests to Jose L. M. Madrigal, Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Avda. Complutense s/n, 28040, Madrid, Spain. E-mail: jlmadriral@med.ucm.es

**Abbreviations used:** GFAP, glial fibrillary acidic protein; L-AAAD, L-aromatic amino acid decarboxylase; L-DOPS, L-threo-3,4-dihydroxyphenylserine; MCP-1/CCL2, monocyte chemoattractant protein; NA, noradrenaline; PBS, phosphate buffered saline.

damage characteristic of different neurodegenerative processes, where the immune response is activated (Thompson *et al.* 2008). However, new unexpected actions of MCP-1 have been described in recent publications (Melik-Parsadaniantz and Rostene 2008). In those studies it was shown that MCP-1 can also function as a neurotransmitter or neuro-modulatory agent.

In previous studies, we observed that NA-induced production of MCP-1 in astrocytes was mediated by direct activation of the MCP-1 promoter and increased mRNA levels (Madrigal *et al.* 2009). We therefore hypothesized that noradrenergic stimulation of astrocytes in their natural environment would have effects similar to those observed *in vitro*. In the current study we demonstrate that the administration of NA-elevating drugs results in the induction of MCP-1 production in brain cortex, mainly by astrocytes.

Two treatments known to elevate extracellular NA levels in brain were used. By administering desipramine, the endogenous NA reuptake system is inhibited. Another approach was to administer the synthetic NA precursor L-threo-3,4-dihydroxyphenylserine (L-DOPS) which is converted to NA by L-aromatic amino acid decarboxylase (L-AAAD) (Sato *et al.* 1987; Kikuchi *et al.* 2000). To confine this conversion to the brain, L-DOPS was used in combination with benserazide (an inhibitor of L-AAAD) that does not cross the blood brain barrier.

To analyze if the physiological elevation of NA levels in brain alters MCP-1 expression, we exposed rats to a stressing stimulus, a process known to elevate NA concentration in brain (Bremner *et al.* 1996a,b). But the mere exposure to the stress protocol used did not significantly modify MCP-1 concentration. However, when the synthesis of glucocorticoids was blocked with metyrapone, a large increase in the concentration of MCP-1 was detected.

The stress response is also characterized by the activation of the hypothalamic pituitary adrenal axis which leads to the release of glucocorticoids by the adrenal glands, the main glucocorticoid being cortisol in humans and corticosterone in rodents. Certain *in vitro* studies have described the ability of glucocorticoids to inhibit MCP-1 synthesis in cell types like fibroblasts (Kawahara *et al.* 1991) or microglia (Zhou *et al.* 2007). Accordingly, other *in vivo* studies described similar effects in hippocampus (Little *et al.* 2006) or peritoneal cells (Mizobe *et al.* 1997); this has also been used to explain the anti-inflammatory properties of these hormones. In the current study we were able to confirm the inhibitory effect of corticosterone on MCP-1 production in astrocytes. This is in agreement with the observed increase of brain MCP-1 after stress caused by metyrapone, and suggests that glucocorticoids and noradrenaline have opposite effects on MCP-1 production during the stress response.

## Materials and methods

### Reagents

Cell culture reagents and fetal calf serum (< 10 EU endotoxin per mL) were from GIBCO Life Technologies (Carlsbad, CA, USA). Noradrenaline, propranolol, metyrapone (2-methyl-1,2-di-3-pyridyl-1-propanone), desipramine hydrochloride, L-DOPS and benserazide were from Sigma (St. Louis, MO, USA). Antibody against MCP-1 was from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Secondary antibodies were from Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA, USA). Taq polymerase and cDNA synthesis reagents were from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

### Animals

Adult male Wistar rats weighing 225–250 g and 3-month-old female C57Bl6 mice were used. All experimental protocols adhered to the guidelines of the Animal Welfare Committee of the Universidad Complutense according to EU laws. The rats were housed individually under standard conditions of temperature and humidity and a 12-h light/dark cycle (lights on at 08:00 AM) with free access to food and water. All animals were maintained under constant conditions for 7 days prior to stress.

### Pharmacological treatments

Various groups of rats were i.p. injected with the glucocorticoid synthesis blocker metyrapone (2-methyl-1,2-di-3-pyridyl-1-propanone), at a dose (100 mg/kg) previously shown to be effective in similar experimental settings (Marinelli *et al.* 1996). Other groups of rats were injected with the non-selective  $\beta$ -adrenergic blocker propranolol [1-(isopropylamino)-3-(1-naphthyl-2-hydroxy)propanol hydrochloride], at a dose (5 mg/kg) known to block the stress-induced adrenergic effects (Rauggi *et al.* 2005) or with the antidepressant desipramine at a dose (10 mg/kg) known to elevate brain noradrenergic levels (Quattrone *et al.* 1981). Desipramine was dissolved in saline while metyrapone and propranolol were dissolved in 10% propylenglycol.

The effects of raising CNS NA levels on MCP-1 expression were tested by treating 3-month-old female C57Bl6 mice with the synthetic NA precursor L-DOPS, which is converted by the enzyme L-AAAD to NA (Sato *et al.* 1987; Kikuchi *et al.* 2000). Mice were treated for 10 days with a daily injection of L-DOPS (200 mg/kg i.p.) followed by injection of benserazide (100 mg/kg s.c.), an inhibitor of L-AAAD and which in contrast to L-DOPS does not pass through the blood brain barrier and therefore prevents peripheral conversion of L-DOPS to NA.

All drugs and vehicles were injected at the onset of stress (09:00 AM). Brain and blood samples from the animals exposed to these treatments were obtained as described below.

### Restraint stress

Rats were exposed to stress between 09:00 AM and 02:00 PM in a room adjacent to the animals homeroom. Restraint was performed using a plastic rodent restrainer (Bainbridge Scientific, Bainbridge, MA, USA) that allowed for a close fit to rats.

The animals were separated in groups and treated with vehicle, metyrapone, propranolol or with desipramine in the conditions described above.

Animals were killed by cervical dislocation right after the end of the stress session. Blood for plasma determinations was collected by

cardiac puncture and anti-coagulated in the presence of tri-sodium citrate (3.15% w/v, 1 vol citrate/5 vol blood). After decapitation, brains were removed from the skull and both cortical areas were excised from the brain.

#### Astrocyte cultures

Rat cortical astrocytes were obtained as described previously (Madrigal *et al.* 2006). Briefly, 1-day-old Wistar rats (Harlan) were used to prepare primary mixed glial cultures; microglia were detached by gentle shaking after 11–13 days in culture, astrocytes were prepared by mild trypsinization of the remaining cells, replated at  $5 \times 10^5$  cells per 35 mm plate and consisted of > 95% astrocytes as determined by staining for glial fibrillary acidic protein (GFAP) and < 5% microglial as determined by staining with the specific marker OX-42.

#### mRNA analysis

Total cytoplasmic RNA was prepared from cells using TRIZOL reagent (Invitrogen); aliquots were converted to cDNA using random hexamer primers. Quantitative changes in mRNA levels were estimated by real time PCR(Q-PCR) using the following cycling conditions: 35 cycles of denaturation at 95°C for 10 s, annealing at 58–61°C for 15 s depending on the specific set of primers, and extension at 72°C for 20 s. Reactions were carried out in the presence of SYBR green (1 : 10 000 dilution of stock solution from Molecular Probes, Eugene, OR, USA), carried out in a 20- $\mu$ L reaction in a Corbett Rotor-Gene (Corbett Research, Mortlake, NSW, Australia). The primers used for MCP-1 were: forward: 5'-TGCTGTCTCAGCCAGATGCAGTTA-3' and reverse: 5'-TACAGCTTCTTTGGGACACCTGCT-3'. The primers used for Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase were: forward: 5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3' and reverse: 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3'. Relative mRNA concentrations were calculated from the take-off point of reactions using included software, and Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) levels used to normalize data.

#### MCP-1 measurement

Monocyte chemoattractant protein levels in the culture medium were detected using a specific ELISA for rat MCP-1, according to manufacturer's instructions (R&D systems). The assay detection limits were of 31.3–2000 pg/mL.

To determine tissue levels of MCP-1, brain frontal cortices were removed and homogenised by sonication for 10 s at 4°C in phosphate buffered saline (PBS) containing Complete Protease Inhibitor Mixture (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN, USA). The homogenates were centrifuged (13 000 g, 10 min, 4°C), and supernatants were used for determinations using the same rat ELISA kit used for measurements performed with culture medium. Protein content was determined by Bradford's method using bovine serum albumin as standard.

#### Plasma corticosterone levels

Plasma was obtained within 1 h of obtaining blood samples by centrifuging the sample at 1000 g for 15 min. All plasma samples were stored at –80°C before assay. Determinations were made using a commercially available kit by radioimmunoassay of  $^3\text{H}$ -labeled rat corticosterone (DPC, Los Angeles, CA, USA). A gamma counter was

used to measure radioactivity of the samples. The values obtained in control animals match with the kit manufacturer's expected values in adult male Wistar rats at the time of blood extraction (03:00 PM).

#### Noradrenaline measurement

Plasma concentration of noradrenaline was measured using a commercially available ELISA kit (Labor Diagnostika Nord, Nordhorn, Germany) following the manufacturer's instructions. The assay detection limits were of 0.01–45 ng/mL.

#### MCP-1 immunohistochemistry

After treatment, the mice were killed, brains post-fixed in 4% paraformaldehyde, infused with 10% sucrose, frozen and sagittal serial sections (20  $\mu$ m thick) prepared for immunohistochemical analysis. MCP-1 and GFAP expression were examined by incubating sections with goat anti-MCP-1 diluted 1 : 200 and rat monoclonal antibody anti-GFAP diluted 1 : 300 (a gift of V. Lee) overnight at 4°C, washing, and detection using fluorescently conjugated secondary antibody. Secondary antibodies directed to a specific species and absorbed to prevent cross-species reactivity were conjugated to either rhodamine red X or FITC and used at a concentration of 1 : 200 in PBS at 37°C for 45 min. Sections were washed three times in PBS and then fixed in 4% formaldehyde in PBS for 10 min followed by quenching in 50 mM ammonium chloride in PBS for 15 min. Final washes were done with PBS including 400 ng/mL 4'-6-Diamidino-2-phenylindole in the second of the five washes for 3 min each. Expression was quantified in the secondary motor cortex using Axiovision version 4.0 software (Carl Zeiss International, Thornwood, NY, USA) to determine the number of stained objects per  $\text{mm}^2$  and the total area stained.

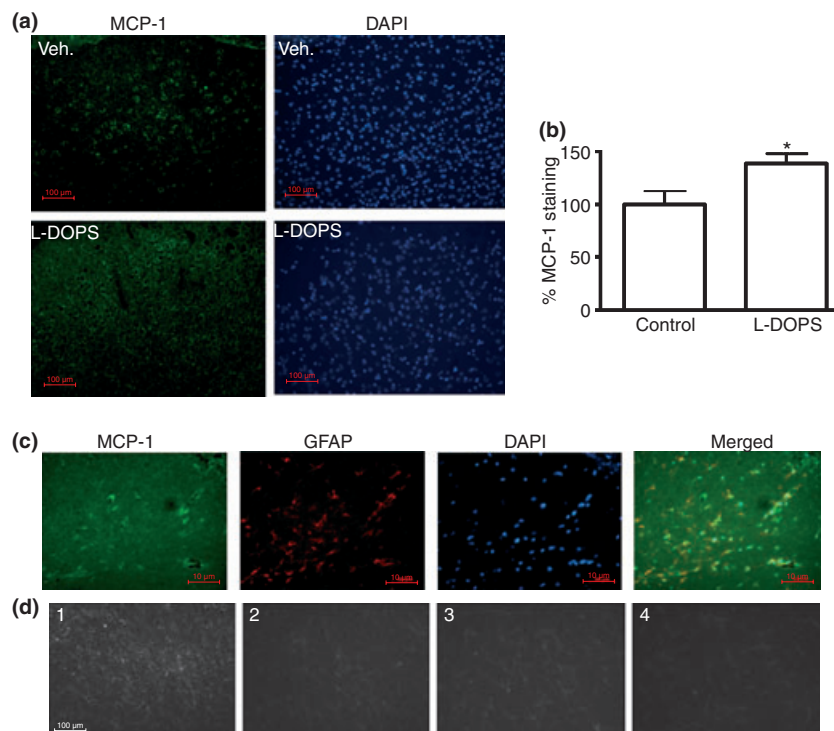
Non-specific staining was evaluated by comparing the fluorescent signal obtained from L-DOPS sections incubated with primary and secondary (1 : 200) antibodies to signals obtained when sections were incubated with either (i) non-immune goat serum plus secondary; (ii) primary antibody that had been pre-treated overnight at 4°C with 67 ng/mL of recombinant MCP-1 and secondary antibody; or (iii) secondary antibody alone.

#### MCP-1 immunocytochemistry

Astrocytes on glass coverslips were rinsed with cold PBS and fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min at 25°C. Slides were washed for 5 min with PBS and blocked with 5% normal goat serum in PBS at 25°C for 30 min. Primary antibodies were diluted in 1% normal goat serum in PBS. Cells were incubated with primary antibodies (rabbit anti-MCP-1, 1 : 1000 dilution) at 37°C for 1 h. After this, the slides were washed three times with PBS and incubated with the correspondent secondary antibody (diluted 1 : 1000 in PBS with 1% normal goat serum) for 1 h at 37°C. Slides were washed three times for 5 min with PBS and post-fixed in 3.7% formaldehyde in PBS for 20 min. Autofluorescence was quenched with 50 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  in PBS for 15 min. ProLong Gold anti-fade reagent with 4'-6-Diamidino-2-phenylindole (Invitrogen) was used as mounting medium. Signal intensities were quantified with ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MA, USA).

#### Data analysis

All experiments were done at least in triplicate. When more than two experimental groups were present in the same experiment, data were



**Fig. 1** Elevation of NA levels in CNS induces MCP-1 production in astrocytes. (a) Representative images of the secondary motor cortex from coronal sections prepared from L-DOPS or saline-treated mice stained for MCP-1 (left) or DAPI (right). Increased MCP-1 staining was found in the L-DOPS (200 mg/kg i.p. daily during 10 days) and benserazide (100 mg/kg s.c. daily during 10 days) treated mice. (b) Quantitative analysis of MCP-1 positive cells. \* $p < 0.05$  vs. control. Data are means  $\pm$  SE of  $n = 4$  mice per group. (c) Triple staining for

MCP-1 (green), GFAP (red) and DAPI (blue) in sections prepared from L-DOPS treated mice. (d) Representative images from the L-DOPS sections used to detect non-specific staining. Sections were incubated with primary and secondary (1 : 200) antibodies (1); 1 : 200 non-immune goat serum then secondary antibody (2); primary antibody pre-treated with an excess of MCP-1 then secondary antibody (3); or with secondary antibody alone (4).

analyzed by one-way ANOVA followed by Newman-Keuls multiple comparison tests and  $p$ -values  $< 0.05$  were considered significant. When two experimental groups were present in the same experiment, data were analyzed by unpaired  $t$ -tests, and  $p$ -values  $< 0.05$  were considered significant.

## Results

### NA regulation of MCP-1 *in vivo*

In an initial study to determine if a NA-elevating treatment regulates MCP-1 production *in vivo*, mice were treated with the synthetic NA precursor L-DOPS. After treatment, the mice were killed and brains analyzed for expression of MCP-1 (Fig. 1a and b). Immuno-staining revealed an increase of MCP-1 production in the L-DOPS treated mice compared to vehicle treated ones. Moreover, co-labeling for the astrocyte marker GFAP showed that MCP-1 was mainly synthesized by astrocytes (Fig. 1c). This is in agreement with previous findings from our group and others (Glabinski *et al.* 1996; Babcock *et al.* 2003) that described astrocytes as the main source of MCP-1 in the brain. However, microglia or

neuronal MCP-1 can not be totally discarded as contributors to the elevation of MCP-1 detected.

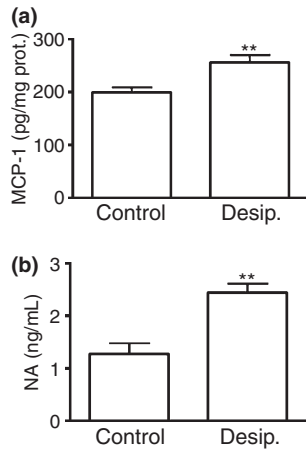
### Acute desipramine treatment induces MCP-1 in brain

Our next goal was to analyze if the elevation of endogenous NA levels could also induce the production of MCP-1. Treatment of rats with the anti-depressant desipramine (10 mg/kg) which increases extracellular NA concentration by blocking its reuptake (Berton and Nestler 2006), resulted in elevated concentrations of MCP-1 in brain cortex when measured 5 h later (Fig. 2a). The activity of desipramine was confirmed by measurements of plasma levels of NA which were significantly increased by desipramine treatment (Fig. 2b).

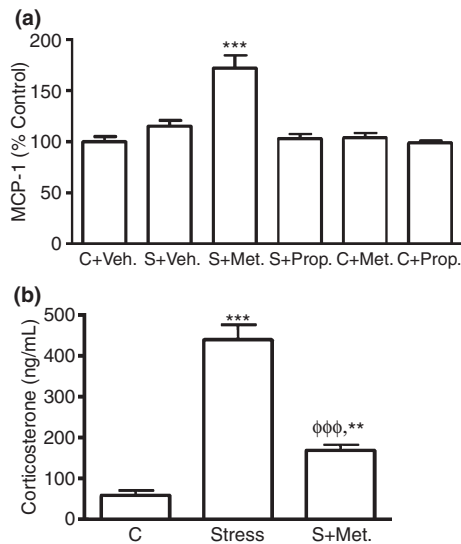
### Effect of stress on cortical MCP-1

In order to ascertain if the physiological elevation of NA in brain could modify MCP-1 production, rats were exposed to a model of stress consisting of 5 h of restrained movements inside a plastic cone. After this, animals were killed and cortical samples obtained. The measurement of MCP-1

concentration in these samples revealed a slight (approximately 15%), but not significant increase of MCP-1 in cortex from stressed animals (Fig. 3a).



**Fig. 2** Desipramine treatment induces MCP-1 production in brain cortex. (a) Cortex samples were obtained 5 h after injection of desipramine 10 mg/kg (desip.) or saline (Control), MCP-1 concentration was measured by ELISA in the homogenates. \*\* $p < 0.005$  vs. Control. In control group, 100% MCP-1 reflected  $198.81 \pm 9.91$  pg/mg prot. (mean  $\pm$  SE). (b) NA concentrations in plasma were measured by ELISA. \*\* $p < 0.005$  vs. C. Data are means  $\pm$  SE of  $n = 12$  replicates.



**Fig. 3** Regulation of MCP-1 production by stress. Role of corticosterone and NA. Control (C) and stressed (S) rats were injected with vehicle (Veh.), with 100 mg/kg metyrapone (Met.) or with 5 mg/kg propranolol (Prop.) at the beginning of the procedure. After 5 h, rats (12 per group) were killed and cortex and plasma samples were taken. (a) MCP-1 was measured by ELISA in homogenates of brain cortex. \*\*\* $p < 0.001$  vs. C. In control group, 100% MCP-1 reflected  $149.16 \pm 7.29$  pg/mg prot. (mean  $\pm$  SE),  $n = 12$  replicates. (b) Corticosterone concentrations in plasma were measured by RIA. \*\*\* $p < 0.001$  vs. C, \*\* $p < 0.01$  vs. C, ΦΦΦ $p < 0.001$  vs. stress. Data are means  $\pm$  SE of  $n = 14$  replicates.

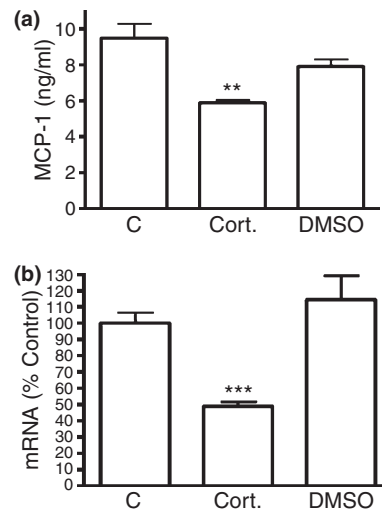
When rats were treated with metyrapone (an inhibitor of glucocorticoids synthesis) at the beginning of the stress period, a large increase of MCP-1 was subsequently detectable (Fig. 3a). Treatment with metyrapone alone did not cause any significant changes in non-stressed animals. The measurements of corticosterone concentrations in plasma confirm the up-regulation caused by stress and the blockade by metyrapone (Fig. 3b). These results are consistent with the possibility that release of corticosterone occurring during the stress response, interferes with MCP-1 induction in the brain.

In order to ascertain the role of NA in the induction of MCP-1 caused by stress exposure, rats were administered propranolol (a beta adrenergic-receptor blocker). This treatment prevented the increase of MCP-1 caused by stress exposure (Fig. 3a), but did not change MCP-1 concentrations in rats that were not exposed to stress.

### Corticosterone reduces MCP-1 expression in astrocyte cultures

It is known that glucocorticoids can inhibit MCP-1 on different cell types. After observing the effect of glucocorticoid blockade on MCP-1 production *in vivo*, we analyzed the direct action of corticosterone on MCP-1 expression by astrocytes.

Incubation of primary rat astrocytes with corticosterone (100 nM for 24 h) caused a significant reduction of MCP-1 concentration in the culture media (Fig. 4a). This decrease



**Fig. 4** Corticosterone inhibits MCP-1 production in astrocytes. (a) Astrocytes were incubated for 24 h with control media (C), with corticosterone 100 nM (Cort.) or with the equivalent volume of vehicle (DMSO) used to dissolve it. MCP-1 levels in the media were assessed by ELISA. \*\* $p < 0.01$  vs. C. Data are means  $\pm$  SE of  $n = 8$  replicates per group. (b) RNA was isolated and MCP-1 mRNA levels determined by RT-PCR. Data are expressed as percentage of control values (set to 100%); \*\*\* $p < 0.001$  vs. C. Data are means  $\pm$  SE of  $n = 8$  replicates per group.

was associated with a lower amount of MCP-1 mRNA, as assessed by quantitative PCR (Fig. 4b).

#### Corticosterone blocks MCP-1 induction by NA in astrocytes

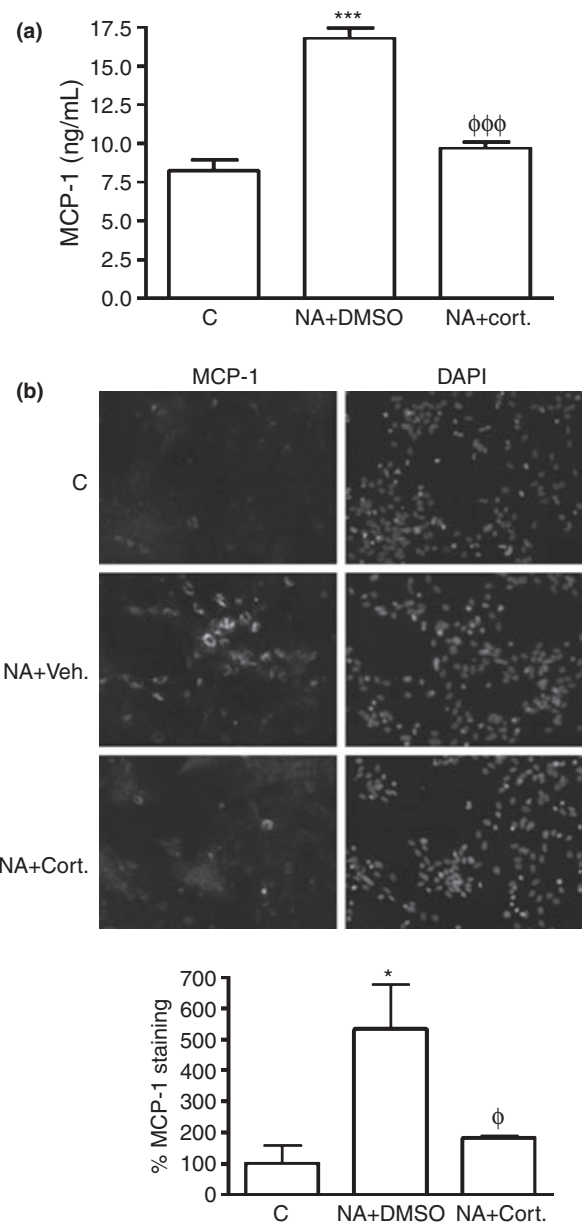
Having established the ability of corticosterone to reduce the synthesis of MCP-1 by astrocytes, we tested its effect on the MCP-1 induction by NA. Rat astrocytes were treated for 24 h with NA (10  $\mu$ M) in combination with corticosterone (100 nM) or the equivalent volume of vehicle [dimethyl sulfoxide (DMSO)]. Compared to the control group, higher levels of MCP-1 were detectable in the supernatant from the astrocytes treated with NA + DMSO, while the presence of corticosterone completely prevented that increase (Fig. 5a). These results demonstrated that corticosterone can not only inhibit constitutive MCP-1 production by astrocytes, but it can also block the induction caused by NA.

The data obtained with the ELISA assay were further supported by immunocytochemistry of astrocyte cultures for MCP-1. Following the same experimental conditions as described above, we observed an accumulation of MCP-1 in cells treated with NA in the absence of corticosterone (Fig. 5b). As previously observed by other authors, MCP-1 staining appeared to be localized in the perinuclear area (Dansereau *et al.* 2008; Jung *et al.* 2008). In contrast, very few cells synthesized MCP-1 when treated with NA and corticosterone, and quantification of fluorescence intensity indicated a significant reduction of MCP-1 production because of corticosterone.

#### Discussion

We describe here how the use of a protocol known to generate a large increase of exogenous NA levels in brain (Kikuchi *et al.* 2000) such as the administration of L-DOPS and bensazepide (as described in the methods section), led to an induction of MCP-1 in brain. We found that astrocytes were the main cell type responsible for MCP-1 synthesis under NA elevating conditions *in vivo*, although we can not rule out the contribution of other cell types to the increase of MCP-1. This complements our previous *in vitro* studies in which it was observed that direct administration of NA to astrocyte cultures causes the expression, synthesis and release of MCP-1 (Madrigal *et al.* 2009). The protection against excitotoxic stimuli, provided by this chemokine, proved to be one of the mediators responsible for the neuroprotective actions of NA. NA is known to prevent the neuronal degeneration characteristic of various neurodegenerative pathologies such as Parkinson's or Alzheimer's diseases (Bondareff *et al.* 1981; Fornai *et al.* 2007), suggesting that NA-dependent MCP-1 production in astrocytes could provide beneficial effects.

Our next goal was to analyze if the physiological alteration of NA levels could also modulate MCP-1 production. As our previous studies had been made in cortical cells and the brain



**Fig. 5** NA induction of MCP-1 in astrocytes is blocked by corticosterone. (a) Astrocytes were incubated for 24 h with control media (C) or with NA (10  $\mu$ M) together with corticosterone 100 nM (cort.) or vehicle (DMSO), and MCP-1 levels in the media were assessed by ELISA. \*\*\* $p$  < 0.001 vs. C,  $\Phi\Phi\Phi p$  < 0.001 vs. NA + DMSO. Data are means  $\pm$  SE of  $n$  = 8 replicates per group. (b) Representative images corresponding to astrocyte cultures stained with MCP-1 or DAPI after incubation with the above described conditions. The images shown are representative of experiments done on four separate astrocyte preparations. Inset: quantitative analysis of MCP-1 positive cells. \* $p$  < 0.05 vs. C,  $\Phi p$  < 0.05 vs. NA + DMSO. Data are means  $\pm$  SE of  $n$  = 4 replicates per group.

cortex is one of the most affected brain areas in Alzheimer's disease (Wenk 2006) or stress-related pathologies (Bremner 2007), we decided to focus first on this particular brain area.

These studies were done in rat as the stress paradigm is well established and best characterized in these animals. The noradrenergic system is activated by acute stress (Morilak *et al.* 2005) and the exposure of experimental animals to this kind of stimulus constitutes one of the easiest and most reliable ways to physiologically increase NA concentration in brain (Glavin 1985). However, we were able to detect only a moderate induction of MCP-1 in the cortex of stressed animals. This suggests that either the physiological activation of the noradrenergic system is not enough to induce a large production of MCP-1, or that in this conditions there are some other mechanisms controlling MCP-1 production. The last seems to be a more feasible possibility, as the consequences of the uncontrolled induction of a chemo-attractant agent could be fatal. In fact, the exaggerated production of MCP-1 seems to be one of the causes responsible for the progression of an autoimmune disease such as multiple sclerosis (Van *et al.* 1999).

Glucocorticoids, which are largely released by adrenal glands during a stress response, can cross the blood-brain-barrier and interact with brain cells (Sapolsky *et al.* 2000). They are well known for their potent anti-inflammatory activity (Schleimer 1993) and have been described as specific inhibitors of MCP-1 in different cell types such as fibroblasts (Kawahara *et al.* 1991), peritoneal cells (Mizobe *et al.* 1997) or microglia (Zhou *et al.* 2007). More interestingly, the production of MCP-1 and its receptor CCR2 have also been shown to be down-regulated by glucocorticoids in the hippocampus (Little *et al.* 2006).

According to this, it is reasonable to expect that the elevated glucocorticoid concentration resultant from the stress exposure could block the induction of MCP-1 caused by NA or other agents activated by the same stimulus.

To test this hypothesis, we analyzed the direct effect of corticosterone, the main glucocorticoid in rodents, on MCP-1 production by cultured astrocytes. The results confirmed that this hormone was able to block basal MCP-1 production as well as the induction of MCP-1 caused by NA. Next, as an *in vivo* approach, we used metyrapone to block glucocorticoid synthesis in stressed rats. The large increase in MCP-1 concentration detected in stressed rats with reduced glucocorticoids, together with the *in vitro* data, suggests that NA and glucocorticoids exert opposite effects on MCP-1 synthesis in brain cortex during the stress response. These opposite effects of glucocorticoids and NA on MCP-1 production suggest the existence of a regulatory complex, in which the alteration of one of these two components could cause the over-expression or over-repression of MCP-1. Moreover, the inhibitory effect of glucocorticoids on catecholamines expression (Kvetnansky *et al.* 1993) would supplement the direct effect observed for corticosterone on MCP-1.

The main clinical scenario in which these mediators are regulated as described is major depression. Depressed

patients are characterized by maintained elevated levels of glucocorticoids (Carroll *et al.* 1976) and a deficient noradrenergic tone (Leonard 1997). These conditions can lead to the incorrect regulation of various biological agents in an organism, and according to our data, MCP-1 could be one of them. The treatment of rats with the anti-depressant desipramine caused an increase of MCP-1 concentration in brain cortex, confirming the ability of noradrenaline-elevating drugs to induce MCP-1 in the absence of a stress response.

This induction of MCP-1 by desipramine could be because of the blockade not only of neuronal noradrenaline transporters; glial noradrenaline transporters could also be involved. As it has been described by Inazu *et al.* (2003), desipramine can inhibit noradrenaline uptake by astrocytic noradrenaline transporters. In fact, the exposure of astrocyte cultures to desipramine causes the induction of MCP-1 (unpublished observations from the authors). However, a direct effect of desipramine, independent of noradrenaline, can not be discarded.

While the most studied effects of MCP-1 are those related to its role in the inflammatory response as an immune cell attractant (Charo and Taubman 2004; Ballantyne and Nambi 2005), recent publications describe that this effect can also be exerted over neural progenitor cells directing them towards sites of neuroinflammation (Belmadani *et al.* 2006) where they could exert anti-inflammatory or neurogenic effects. More interestingly, MCP-1 has also been described as a neuroprotective agent against certain injuries such as beta amyloid peptide (Bruno *et al.* 2000), tat or NMDA (Eugenin *et al.* 2003). Our own studies indicate that MCP-1 can protect neurons under ischemic conditions (Madrigal *et al.* 2009). All this indicates that the pharmacological regulation of MCP-1 could be of benefit in the treatment of neurodegenerative conditions. Identification of drugs or treatments that preferentially avoid the reduction of brain MCP-1 levels could therefore have therapeutic implications. Here we propose that, as NA induces the production of MCP-1 in astrocytes, certain drugs or other treatments that modulate NA levels could be used to alter MCP-1 production in brain.

The attraction of inflammatory cells caused by the presence of elevated MCP-1 in certain locations such as the vascular cells in the blood-brain-barrier (Cardona *et al.* 2008), can be detrimental because of the collateral damage for certain cells in the vicinity of the injury. Also, an exaggerated production of MCP-1 in brain can have detrimental effects, as recent studies have shown (Kiyota *et al.* 2009). However, our studies suggest that in normal conditions, constitutive production of MCP-1 may be exerting some neuroprotective actions, and its absence or reduction could promote the development of certain neurotoxic processes such as excitotoxicity or amyloid plaque accumulation.

## Acknowledgements

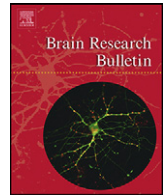
This work was supported by grants from the Spanish Ministries of Education & Science (SAF2007-63138) and Health (CIBERSAM) (JLMM & JCL), Foundation Santander UCM (PR/07-1704, JLMM & GR 58/08). And by a Merit grant from the Department of Veterans' Affairs.

## References

- Babcock A. A., Kuziel W. A., Rivest S. and Owens T. (2003) Chemokine expression by glial cells directs leukocytes to sites of axonal injury in the CNS. *J. Neurosci.* **23**, 7922–7930.
- Ballantyne C. M. and Nambi V. (2005) Markers of inflammation and their clinical significance. *Atheroscler. Suppl.* **6**, 21–29.
- Belmadani A., Tran P. B., Ren D. and Miller R. J. (2006) Chemokines regulate the migration of neural progenitors to sites of neuroinflammation. *J. Neurosci.* **26**, 3182–3191.
- Berton O. and Nestler E. J. (2006) New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. *Nat. Rev. Neurosci.* **7**, 137–151.
- Bondareff W., Mountjoy C. Q. and Roth M. (1981) Selective loss of neurones of origin of adrenergic projection to cerebral cortex (nucleus locus coeruleus) in senile dementia. *Lancet* **1**, 783–784.
- Bremner J. D. (2007) Neuroimaging in posttraumatic stress disorder and other stress-related disorders. *Neuroimaging Clin. N. Am.* **17**, 523–538, ix.
- Bremner J. D., Krystal J. H., Southwick S. M. and Charney D. S. (1996a) Noradrenergic mechanisms in stress and anxiety: I. Preclinical studies. *Synapse* **23**, 28–38.
- Bremner J. D., Krystal J. H., Southwick S. M. and Charney D. S. (1996b) Noradrenergic mechanisms in stress and anxiety: II. Clinical studies. *Synapse* **23**, 39–51.
- Bruno V., Copani A., Besong G., Scoto G. and Nicoletti F. (2000) Neuroprotective activity of chemokines against N-methyl-D-aspartate or beta-amyloid-induced toxicity in culture. *Eur. J. Pharmacol.* **399**, 117–121.
- Cardona A. E., Li M., Liu L., Savarin C. and Ransohoff R. M. (2008) Chemokines in and out of the central nervous system: much more than chemotaxis and inflammation. *J. Leukoc. Biol.* **84**, 587–594.
- Carroll B. J., Curtis G. C. and Mendels J. (1976) Cerebrospinal fluid and plasma free cortisol concentrations in depression. *Psychol. Med.* **6**, 235–244.
- Charo I. F. and Taubman M. B. (2004) Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. *Circ. Res.* **95**, 858–866.
- Dansereau M. A., Gosselin R. D., Pohl M. *et al.* (2008) Spinal CCL2 pronociceptive action is no longer effective in CCR2 receptor antagonist-treated rats. *J. Neurochem.* **106**, 757–769.
- Deshmane S. L., Kremlev S., Amini S. and Sawaya B. E. (2009) Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J. Interferon Cytokine Res.* **29**, 313–326.
- Eugenin E. A., D'Aversa T. G., Lopez L., Calderon T. M. and Berman J. W. (2003) MCP-1 (CCL2) protects human neurons and astrocytes from NMDA or HIV-tat-induced apoptosis. *J. Neurochem.* **85**, 1299–1311.
- Fornai F., di Poggio A. B., Pellegrini A., Ruggieri S. and Paparelli A. (2007) Noradrenaline in Parkinson's disease: from disease progression to current therapeutics. *Curr. Med. Chem.* **14**, 2330–2334.
- Galea E., Heneka M. T., Dello R. C. and Feinstein D. L. (2003) Intrinsic regulation of brain inflammatory responses. *Cell. Mol. Neurobiol.* **23**, 625–635.
- Glabinski A. R., Balasingam V., Tani M., Kunkel S. L., Strieter R. M., Yong V. W. and Ransohoff R. M. (1996) Chemokine monocyte chemoattractant protein-1 is expressed by astrocytes after mechanical injury to the brain. *J. Immunol.* **156**, 4363–4368.
- Glavin G. B. (1985) Stress and brain noradrenaline: a review. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **9**, 233–243.
- Harkness K. A., Sussman J. D., vies-Jones G. A., Greenwood J. and Woodroffe M. N. (2003) Cytokine regulation of MCP-1 expression in brain and retinal microvascular endothelial cells. *J. Neuroimmunol.* **142**, 1–9.
- Heneka M. T., Ramanathan M., Jacobs A. H. *et al.* (2006) Locus ceruleus degeneration promotes Alzheimer pathogenesis in amyloid precursor protein 23 transgenic mice. *J. Neurosci.* **26**, 1343–1354.
- Inazu M., Takeda H. and Matsumiya T. (2003) Functional expression of the norepinephrine transporter in cultured rat astrocytes. *J. Neurochem.* **84**, 136–144.
- Jung H., Toth P. T., White F. A. and Miller R. J. (2008) Monocyte chemoattractant protein-1 functions as a neuromodulator in dorsal root ganglia neurons. *J. Neurochem.* **104**, 254–263.
- Kalinin S., Polak P. E., Madrigal J. L., Gavriluk V., Sharp A., Chauhan N., Marien M., Colpaert F. and Feinstein D. L. (2006) Beta-amyloid-dependent expression of NOS2 in neurons: prevention by an alpha2-adrenergic antagonist. *Antioxid. Redox Signal.* **8**, 873–883.
- Kalinin S., Gavriluk V., Polak P. E., Vasser R., Zhao J., Heneka M. T. and Feinstein D. L. (2007) Noradrenaline deficiency in brain increases beta-amyloid plaque burden in an animal model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **28**, 1206–1214.
- Kawahara R. S., Deng Z. W. and Deuel T. F. (1991) Glucocorticoids inhibit the transcriptional induction of JE, a platelet-derived growth factor-inducible gene. *J. Biol. Chem.* **266**, 13261–13266.
- Kikuchi K., Nishino K. and Ohyu H. (2000) Increasing CNS norepinephrine levels by the precursor L-DOPS facilitates beam-walking recovery after sensorimotor cortex ablation in rats. *Brain Res.* **860**, 130–135.
- Kiyota T., Yamamoto M., Xiong H., Lambert M. P., Klein W. L., Gendelman H. E., Ransohoff R. M. and Ikezu T. (2009) CCL2 accelerates microglia-mediated Abeta oligomer formation and progression of neurocognitive dysfunction. *PLoS ONE* **4**, e6197.
- Kvetnansky R., Fukuhara K., Pacak K., Cizza G., Goldstein D. S. and Kopin I. J. (1993) Endogenous glucocorticoids restrain catecholamine synthesis and release at rest and during immobilization stress in rats. *Endocrinology* **133**, 1411–1419.
- Leonard B. E. (1997) The role of noradrenaline in depression: a review. *J. Psychopharmacol.* **11**, S39–S47.
- Little A. R., Sriram K. and O'Callaghan J. P. (2006) Corticosterone regulates expression of CCL2 in the intact and chemically injured hippocampus. *Neurosci. Lett.* **399**, 162–166.
- Madrigal J. L., Dello R. C., Gavriluk V. and Feinstein D. L. (2006) Effects of noradrenaline on neuronal NOS2 expression and viability. *Antioxid. Redox Signal.* **8**, 885–892.
- Madrigal J. L., Leza J. C., Polak P., Kalinin S. and Feinstein D. L. (2009) Astrocyte-derived MCP-1 mediates neuroprotective effects of noradrenaline. *J. Neurosci.* **29**, 263–267.
- Marinelli M., Le M. M. and Piazza P. V. (1996) Acute pharmacological blockade of corticosterone secretion reverses food restriction-induced sensitization of the locomotor response to cocaine. *Brain Res.* **724**, 251–255.
- Melik-Parsadaniantz S. and Rostene W. (2008) Chemokines and neuromodulation. *J. Neuroimmunol.* **198**, 62–68.
- Mizobe K., Kishihara K., Ezz-Din El-Naggat R., Madkour G. A., Kubo C. and Nomoto K. (1997) Restraint stress-induced elevation of endogenous glucocorticoid suppresses migration of granulocytes and macrophages to an inflammatory locus. *J. Neuroimmunol.* **73**, 81–89.
- Morilak D. A., Barrera G., Echevarria D. J., Garcia A. S., Hernandez A., Ma S. and Petre C. O. (2005) Role of brain norepinephrine in the

- behavioral response to stress. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **29**, 1214–1224.
- Quattrone A., Annunziato L., Aguglia U. and Preziosi P. (1981) Carbamazepine, phenytoin and phenobarbital do not influence brain catecholamine uptake, in vivo, in male rats. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* **252**, 180–185.
- Rauggi R., Cassanelli A., Raone A., Tagliamonte A. and Gambarana C. (2005) Study of mirtazapine antidepressant effects in rats. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **8**, 369–379.
- Sapolsky R. M., Romero L. M. and Munck A. U. (2000) How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr. Rev.* **21**, 55–89.
- Sato E., Irie T. and Katsube J. (1987) Effect of L-threo-3,4-dihydroxyphenylserine (L-DOPS), an immediate precursor of norepinephrine, on the cerebral blood flow in rats. *Jpn. J. Pharmacol.* **43**, 91–93.
- Schleimer R. P. (1993) An overview of glucocorticoid anti-inflammatory actions. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **45**(Suppl 1), S3–S7.
- Thompson W. L., Karpus W. J. and Van Eldik L. J. (2008) MCP-1-deficient mice show reduced neuroinflammatory responses and increased peripheral inflammatory responses to peripheral endotoxin insult. *J. Neuroinflammation* **5**, 35.
- Van D. V., Tekstra J., Beelen R. H., Tensen C. P., Van D. V. and De Groot C. J. (1999) Expression of MCP-1 by reactive astrocytes in demyelinating multiple sclerosis lesions. *Am. J. Pathol.* **154**, 45–51.
- Wenk G. L. (2006) Neuropathologic changes in Alzheimer's disease: potential targets for treatment. *J. Clin. Psychiatry* **67**(Suppl 3), 3–7.
- Zhou Y., Ling E. A. and Dheen S. T. (2007) Dexamethasone suppresses monocyte chemoattractant protein-1 production via mitogen activated protein kinase phosphatase-1 dependent inhibition of Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase in activated rat microglia. *J. Neurochem.* **102**, 667–678.





## Research report

Regulation of CCL2/MCP-1 production in astrocytes by desipramine and atomoxetine: Involvement of  $\alpha_2$  adrenergic receptors

Ara E. Hinojosa, Borja García-Bueno, Juan C. Leza, José L.M. Madrigal\*

Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid and Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM), 28040 Madrid, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 20 July 2011

Received in revised form

12 September 2011

Accepted 19 September 2011

Available online 24 September 2011

## Keywords:

CCL2

MCP-1

Astrocytes

Noradrenaline

Atomoxetine

Desipramine

## ABSTRACT

Having previously observed that noradrenaline activation of  $\beta$  adrenergic receptors induces the synthesis of the chemokine monocyte chemoattractant protein (CCL2/MCP-1) in astrocytes, it is our interest to analyze the mechanisms involved in this process, particularly the possible effect of noradrenaline-modulating drugs.

The treatment of primary rat astrocyte cultures with the noradrenaline transporter inhibitors desipramine or atomoxetine induced the expression and synthesis of CCL2/MCP-1 in these cells. This effect of both drugs in vitro suggests that CCL2/MCP-1 expression could also be modulated by some mechanism independent of the elevation of brain noradrenaline levels. This was confirmed by measuring a reduction in CCL2/MCP-1 production by the treatment with the  $\alpha_2$  adrenergic receptor agonist clonidine. Accordingly, the blockade of  $\alpha_2$  adrenergic receptors with yohimbine potentiated the production of MCP-1 stimulated by the activation of  $\beta$  receptors.

While the activation of  $\beta$  adrenergic receptors and the subsequent elevation of cAMP levels seem to be the main pathway for noradrenaline to induce CCL2/MCP-1 in astrocytes, our data indicate that the  $\alpha_2$  adrenergic receptors also regulate CCL2/MCP-1 expression working as inhibitory mediators.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

## 1. Introduction

The monocyte chemoattractant protein (CCL2/MCP-1) has been well characterized as a key regulator of the attraction of monocytes and other types of cells involved in inflammatory/immune processes [12]. Because of this, it has been linked to the development of inflammation [11,22,51,10] and some studies have shown the possibility to reduce neuronal damage by blocking its action [56,60,32]. However, during the last years, new functions have been attributed to MCP-1 and pointed that there may still be a large number of facts about this chemokine that remain unknown.

The expression of MCP-1 is known to require the translocation of the transcription factors activator protein-1 (AP1) and nuclear factor-kappa B (NFkB) [1,15,33,58]. These factors can be activated by cytokines or other agents of different nature [3,26]. Based on this, the putative modulators of MCP-1 cannot be easily predicted. In fact, our previous finding of astrocytic MCP-1 up-regulation

by noradrenaline was rather unexpected considering the anti-inflammatory profile of noradrenaline in brain [41,14] and the pro-inflammatory potential commonly attributed to MCP-1.

Having observed this, it became a priority for us to elucidate the mechanisms activated by noradrenaline that lead to MCP-1 expression. This way we confirmed that the activation of  $\beta$  adrenergic receptors and the subsequent elevation of cAMP is one of the main pathways through which noradrenaline activates MCP-1 promoter and initiates its expression in astrocytes [37]. Our next goal was to analyze if these phenomena translate from the astrocyte culture to the whole brain. This way, we treated rats with a noradrenaline precursor (L-DOPS) and found that the elevation of brain noradrenaline levels results in the augmented expression of MCP-1 in astrocytes [38], the cell type described as the main producers of MCP-1 [1,21]. Based on the neuroprotective actions of MCP-1 previously described by us [37] and others [6,13,49] it became interesting to explore the potential therapeutic use of noradrenaline-elevating drugs, particularly if these drugs can also modulate brain MCP-1. For this purpose we decided to use desipramine, an antidepressant known to elevate brain noradrenaline levels, and observed that its administration to rats induces the expression of MCP-1 in brain cortex [38].

While this effect could be due to the elevation of brain noradrenaline levels, the existence of other noradrenaline-independent mechanisms cannot be discarded, particularly

*Abbreviations:* CCL2/MCP-1, monocyte chemoattractant protein; PBS, phosphate buffered saline; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; FCS, fetal calf serum; NA, noradrenaline; NAT, noradrenaline transporter.

\* Corresponding author at: Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Avda. Complutense s/n, 28040 Madrid, Spain.  
Tel.: +34 91 3941478; fax: +34 91 3941465.

E-mail address: [jimmadriral@med.ucm.es](mailto:jimmadriral@med.ucm.es) (J.L.M. Madrigal).

considering the presence of  $\alpha$  and  $\beta$  adrenergic receptors in astrocytes [25,30,42,45].

In order to clarify this possibility, in the current study astrocyte cultures have been incubated with desipramine or atomoxetine (another noradrenaline reuptake inhibitor) observing the induction of MCP-1 in both cases. The main uses of these two drugs are related to their ability to elevate the extracellular noradrenaline concentration, but some other effects can be caused by their interaction with certain cell receptors. In fact, it has been proposed that post-synaptic  $\alpha$ 2 receptors play a key role in desipramine effects [61]. In order to analyze this possibility, the control of MCP-1 production by  $\alpha$ 2 modulating drugs was evaluated.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Reagents

Cell culture reagents and fetal calf serum (FCS) (<10 EU endotoxin per ml) were from GIBCO Life Technologies (Carlsbad, CA, USA). Noradrenaline, desipramine hydrochloride, atomoxetine, yohimbine, clonidine and isoproterenol were from Sigma (St. Louis, MO, USA). Antibody against MCP-1 was from R&D Systems Serotec (Minneapolis, MN, USA). Secondary antibodies were from Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA, USA). Taq polymerase and cDNA synthesis reagents were from Biotoools (Madrid, Spain).

### 2.2. Astrocyte cultures

Rat cortical astrocytes were obtained as described previously [36]. All experimental protocols adhered to the guidelines of the Animal Welfare Committee of the Universidad Complutense (permission SAF2010-21984) in accordance with the European Communities (86/609/EEC) Laws for the Care and Use of Laboratory Animals. Briefly, 1-d-old Wistar rats (Harlan) were used to prepare primary mixed glial cultures; microglia were detached by gentle shaking after 11–13 days in culture, astrocytes were prepared by mild trypsinization of the remaining cells, replated at  $1 \times 10^6$  cells/ml onto 96 (0.1 ml) or 12 well (1 ml) plates and consisted of >95% astrocytes as determined by staining for GFAP and <5% microglial as determined by staining with the specific marker OX-42.

### 2.3. mRNA analysis

Total cytoplasmic RNA was prepared from cells using TRIZOL reagent (Invitrogen); aliquots were converted to cDNA using random hexamer primers. Quantitative changes in mRNA levels were estimated by real time PCR (Q-PCR) using the following cycling conditions: 35 cycles of denaturation at 95 °C for 10 s, annealing at 58–61 °C for 15 s depending on the specific set of primers, and extension at 72 °C for 20 s. Reactions were carried out in the presence of SYBR green (1:10,000 dilution of stock solution from Molecular Probes, Eugene, OR, USA), carried out in a 20- $\mu$ L reaction in a Corbett Rotor-Gene (Corbett Research, Mortlake, NSW, Australia). The primers used for MCP-1 were: forward: 5'-TGC TGT CTC AGC CAG ATG CAG TTA-3' and reverse: 5'-TAC AGC TTC TTT GGG ACA CCT GCT-3'. The primers used for IL-10 were: forward: 5'-ATA ACT GCA CCC ACT TCC CAG TCA-3' and reverse: 5'-ACA AGG CTT GGC AAC CCA AGT AAC-3'. The primers used for IL-12p40 were: forward: 5'-ACT CAC ATC TGC TGC TCC ACA AGA-3' and reverse: 5'-TCC GGA GTA GTT TGG TGC TTC ACA-3'. The primers used for GAPDH were: forward: 5'-TGC ACC ACC AAC TGC TTA GC-3 and reverse: 5'-GGC ATG GAC TGT GGT CAT GAG-3'. Relative mRNA concentrations were calculated from the take-off point of reactions using included software, and GAPDH levels used to normalize data.

### 2.4. MCP-1 measurement

MCP-1 levels in the culture medium were detected using a specific ELISA for rat MCP-1, according to manufacturer's instructions (R&D Systems Inc.). The assay detection limits were of 31.3–2000 pg/ml.

### 2.5. MCP-1 immunocytochemistry

Astrocytes on glass coverslips were rinsed with cold PBS and fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min at RT. Slides were washed for 5 min with PBS and blocked with 5% normal goat serum in PBS at room temperature for 30 min. Primary antibodies were diluted in 1% normal goat serum in PBS. Cells were incubated with primary antibodies (rabbit anti-MCP-1, 1:1000 dilution) at 37 °C for 1 h. After this, the slides were washed three times with PBS and incubated with the correspondent secondary antibody (diluted 1:1000 in PBS with 1% normal goat serum) for 1 h at 37 °C. Slides were washed three times for 5 min with PBS and postfixed in 3.7% formaldehyde in PBS for 20 min. Autofluorescence was quenched with 50 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  in PBS for 15 min. ProLong Gold antifade reagent with DAPI (Invitrogen) was used as mounting medium.

### 2.6. Data analysis

All experiments were done at least in triplicate. When more than two experimental groups were present in the same experiment, data were analyzed by one-way ANOVA followed by Newman–Keuls multiple comparison tests and  $p$  values <0.05 were considered significant. When two experimental groups were present in the same experiment, data were analyzed by unpaired  $t$ -tests, and  $p$  values <0.05 were considered significant.

## 3. Results

### 3.1. Desipramine and atomoxetine induce MCP-1 expression in astrocyte cultures

Our previous work demonstrated that the *in vivo* treatment with desipramine elevates the concentration of MCP-1 in rat brain cortex [38]. Since noradrenaline induces MCP-1 in astrocytes [37], this effect of desipramine could be attributed to the elevation of brain noradrenaline levels caused by the inhibition of its reuptake. However, in order to ascertain if other alternative mechanisms are involved, isolated astrocytes were treated with desipramine or with atomoxetine, a structurally different drug also known to inhibit noradrenaline reuptake.

The incubation of primary rat astrocytes with different concentrations of desipramine (Fig. 1a) or atomoxetine (Fig. 2a) for 24 h caused a concentration-dependent elevation of MCP-1 concentration in the culture media.

Desipramine seemed to be more effective since higher concentrations of atomoxetine were necessary to achieve a significant increase in the concentration of MCP-1.

This increase was associated with a higher amount of MCP-1 mRNA, as assessed by quantitative PCR (Figs. 1b and 2b). These observations were further supported by immunocytochemistry studies performed on astrocyte cultures for MCP-1; following the same experimental conditions as described above, we observed an accumulation of MCP-1 in cells treated with desipramine or atomoxetine (Fig. 3).

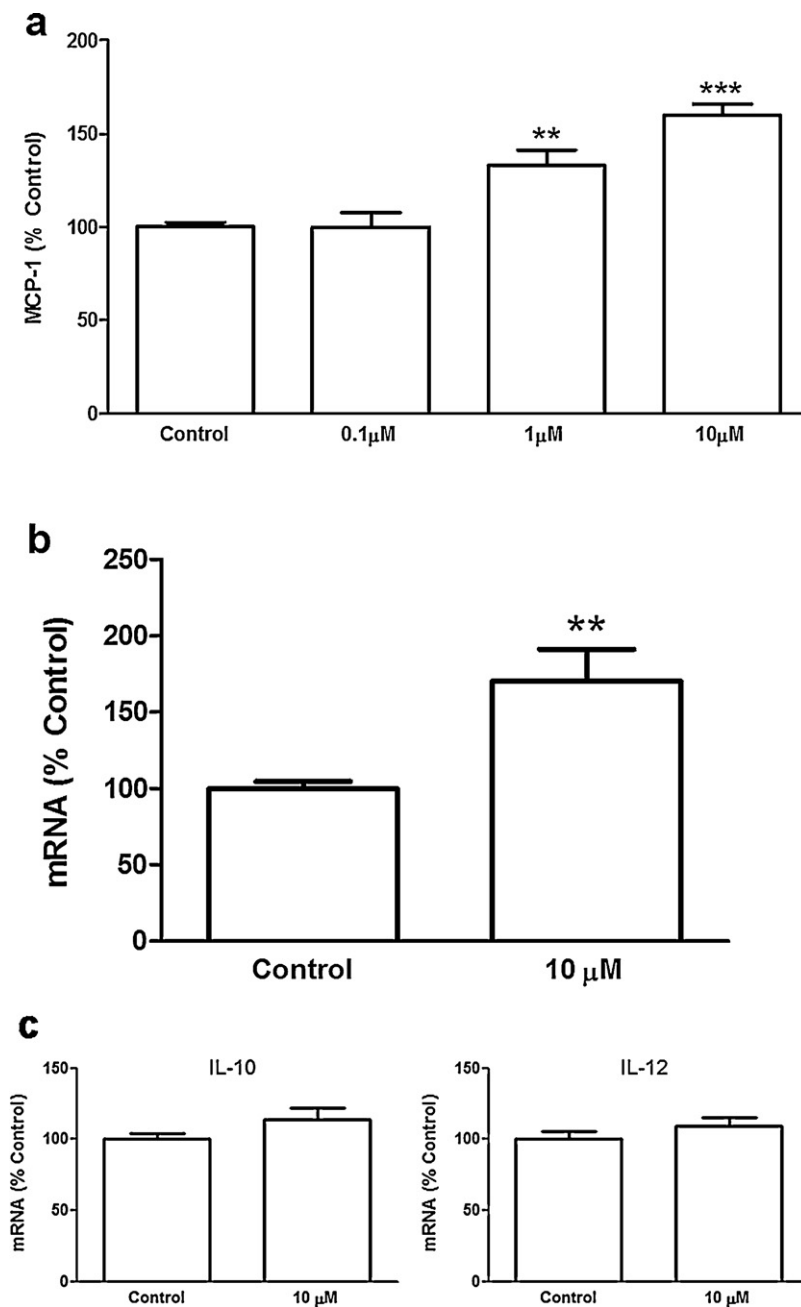
Since desipramine treatment has been shown to elevate the production of IL-10 in mice plasma [48], we also analyzed the expression of this anti-inflammatory cytokine and of the pro-inflammatory one IL-12 in our experimental conditions. The 24 h incubation of astrocytes with 10  $\mu$ M desipramine or atomoxetine did not cause significant changes of IL-10 or IL12p40 mRNA levels (Figs. 1c and 2c).

### 3.2. Activation of $\alpha$ 2 adrenergic receptors inhibits MCP-1 production

Since desipramine and atomoxetine also induce MCP-1 production in isolated astrocytes in the absence of noradrenaline or noradrenergic neurons, we can conclude that this effect is independent of their ability to inhibit noradrenaline uptake. Based on this, we searched for different pathways which could participate in this process. Since the  $\alpha$ 2 type of adrenergic receptors seem to play an important role on the mechanisms of action of desipramine [61], we analyzed if the modulation of its action affects MCP-1 expression. To evaluate this, astrocyte cultures were treated with noradrenaline together with different concentrations of the  $\alpha$ 2 agonist clonidine. The elevation of MCP-1 caused by noradrenaline was reduced in a concentration dependent manner by clonidine (Fig. 4).

### 3.3. Yohimbine treatment potentiates MCP-1 induction

The effect of a  $\beta$  adrenergic receptor agonist such as isoproterenol was assessed, and we could observe its concentration-dependent induction of MCP-1 production in astrocyte cultures (Fig. 5a). Having established this, astrocytes were incubated with



**Fig. 1.** Desipramine induces MCP-1 expression in astrocytes. (a) Astrocytes were incubated for 24 h with control media or with desipramine (0.1–10 μM) and MCP-1 levels in the media were assessed by ELISA. MCP-1 mean value for the control group is 103.07 ng/ml. (b) RNA was isolated from control and desipramine (10 μM) treated cells after 24 h and MCP-1 mRNA levels determined by Q-PCR. (c) RNA was isolated from control and desipramine (10 μM) treated cells after 24 h and IL-10 and IL12p40 mRNA levels determined by Q-PCR. Data are expressed as percentage of control values (set to 100%); \*\*\**p* < 0.0001 versus control, \*\**p* < 0.001 versus control. Data are means ± SE of *n* = 10 replicates per group.

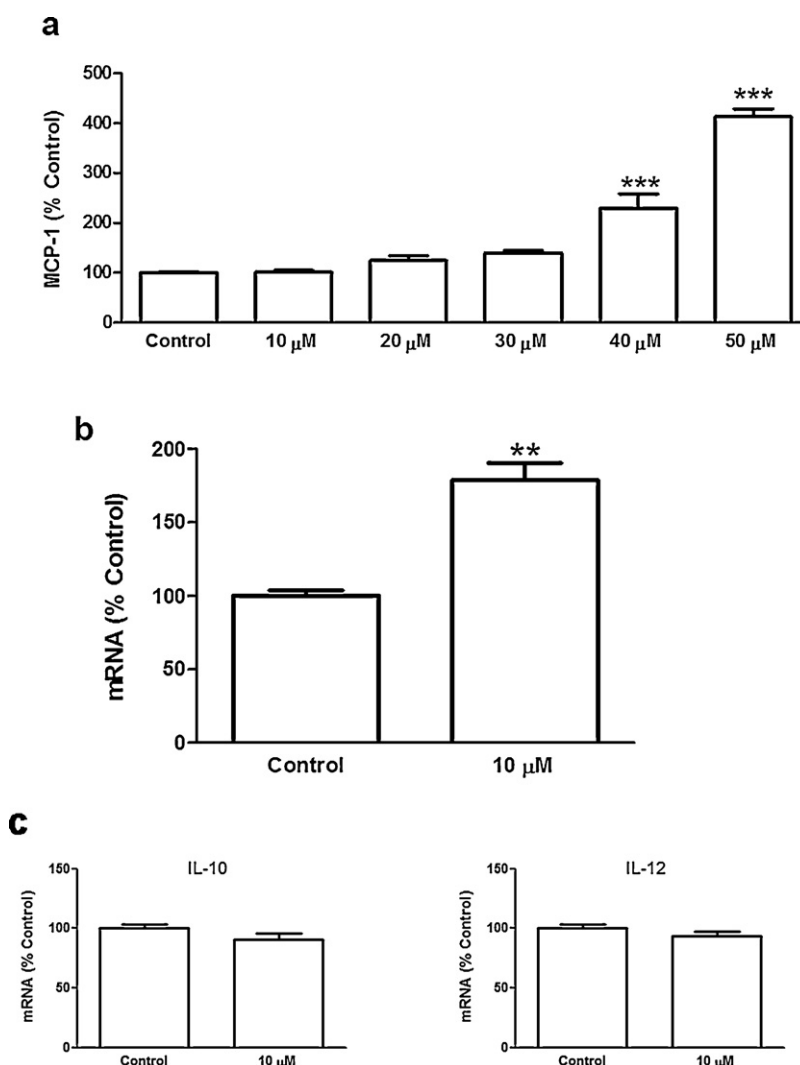
different concentrations of the α<sub>2</sub> antagonist yohimbine for 24 h in combination with the lowest concentration of isoproterenol found capable to elevate MCP-1 release. The combination of both agents demonstrated that yohimbine treatment contributes to elevate the release of more MCP-1 (Fig. 5b). The elevation of MCP-1 mRNA caused by isoproterenol treatment of astrocyte cultures was also further increased by the co-incubation with yohimbine 1 μM (Fig. 5c).

#### 4. Discussion

The data presented here describe the involvement of the α<sub>2</sub> type of adrenergic receptors on the regulation of MCP-1 expression

in isolated astrocytes. The two antidepressant drugs desipramine and atomoxetine are known to inhibit noradrenaline uptake by blocking the noradrenaline transporter (NAT) [7,29,62]. As a result of this, noradrenaline is accumulated in the extracellular space correcting one of the main neurochemical imbalances responsible for the development of depressive behavior.

The main sources of noradrenaline in brain are the neurons from locus coeruleus and the ventral medullary nuclei. From these areas originate various projections that distribute noradrenaline to almost the entire central nervous system. This neurotransmitter interacts with many different cell types in brain [42,9,43,55]. Among these cells, astrocytes are the main source of MCP-1 in brain [1,21] and present α and β adrenergic receptors [25,30,42,45]. The



**Fig. 2.** Atomoxetine induces MCP-1 expression in astrocytes. (a) Astrocytes were incubated for 24 h with control media or with atomoxetine (10–50 μM) and MCP-1 levels in the media were assessed by ELISA. MCP-1 mean value for the control group is 103.07 ng/ml. (b) RNA was isolated from control and atomoxetine (10 μM) treated cells after 24 h and MCP-1 mRNA levels determined by Q-PCR. (c) RNA was isolated from control and atomoxetine (10 μM) treated cells after 24 h and IL-10 and IL12p40 mRNA levels determined by Q-PCR. Data are expressed as percentage of control values (set to 100%); \*\*\* $p < 0.0001$  versus control, \*\* $p < 0.001$  versus control. Data are means  $\pm$  SE of  $n = 10$  replicates per group.

existence of different subtypes of receptors indicates that noradrenaline is an important modulator of astrocytes activity. And this modulator role could extend to other functions besides those well known such as the energy metabolism [39] or calcium mobilization [45].

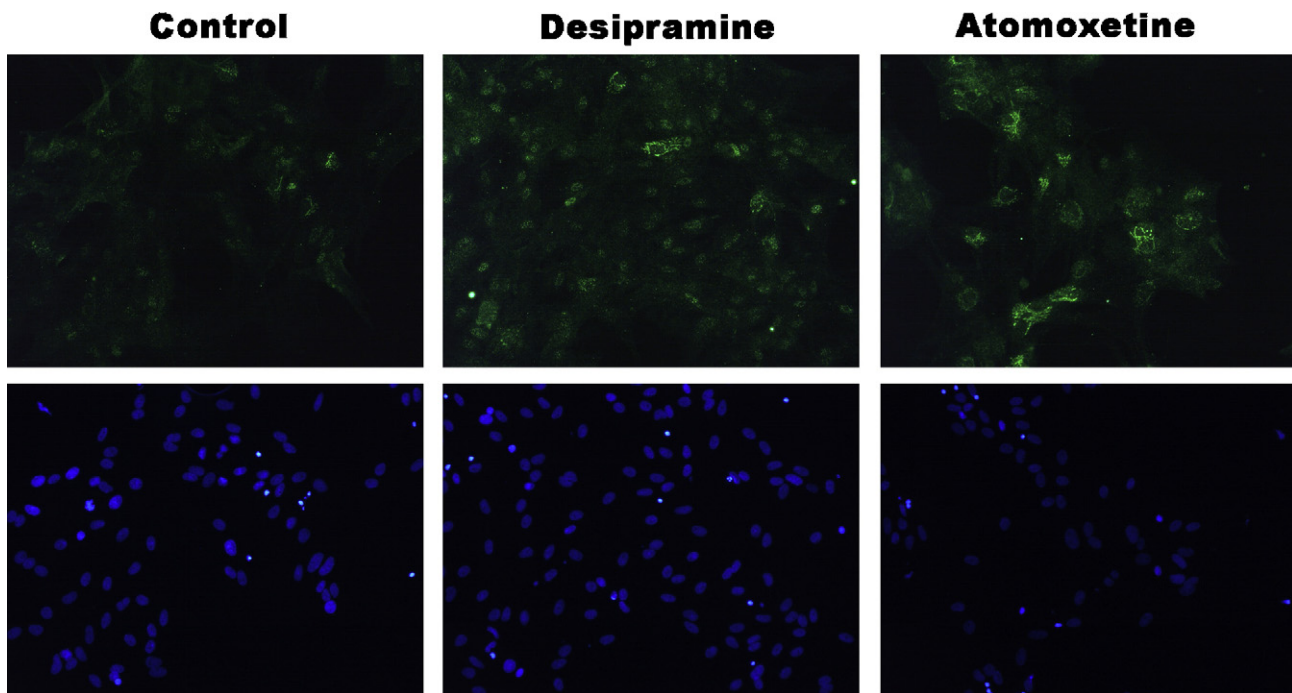
Having previously observed the induction of MCP-1 in cultured astrocytes by noradrenaline [37], it became interesting to analyze the possible occurrence of a similar effect in the living brain. This interest is reinforced on one side by the potential neuroprotective actions of MCP-1 observed by us and others [37,6,13,49] and on the other side by the existence of many noradrenaline modulating drugs available and approved to be used as therapeutic agents. This way we were able to observe that the elevation of brain noradrenaline levels increases the production of MCP-1 in astrocytes [38].

While depression and other mood disorders are related to alterations affecting neuronal functioning and transmission, glial cells also seem to be involved in these pathologies [20]. In fact, we describe here a direct effect of antidepressants on glial cells.

Astrocytes expression of noradrenaline transporters has been proposed as a protective strategy which inactivates the

noradrenaline that is not recovered by the neuronal terminals [28]. The blockade of NAT in cultured astrocytes could translate into a reduced transport of noradrenaline present in the culture media which would then be able to increase its interaction with adrenergic receptors. In an attempt to rule out this possibility, similar procedures were performed with no serum present in the culture media; in these conditions both antidepressants induced the production of MCP-1 (data not shown), suggesting that their actions are not mediated by other agents of unknown nature.

The existence of multiple binding sites for desipramine in brain [2], together with the regulation desipramine treatment exerts on  $\alpha_2$  receptors expression in cortex [53] or hippocampus [19] and the inhibition of clonidine effects in depressed patients [8], suggest the possible involvement of  $\alpha_2$  receptors on desipramine actions. This has also been confirmed by behavioral studies [61] that emphasise the importance of postsynaptic  $\alpha_2$  receptors for the antidepressant effects of desipramine. Based on this, having previously described the induction of MCP-1 caused by  $\beta$  adrenergic receptors activation [37], and considering the inhibitory feedback role  $\alpha_2$  receptors play for noradrenergic



**Fig. 3.** MCP-1 induction evaluation by immunostaining. Astrocytes were incubated with control media, desipramine (10  $\mu$ M) or atomoxetine (10  $\mu$ M). After 24 h the cells were immunostained for MCP-1 (green) and with DAPI (blue). Representative images of experiments done on three separate astrocyte preparations are shown.

neurotransmission [57], it became interesting for us to analyze the involvement of  $\alpha$ 2 adrenergic receptors on MCP-1 regulation.

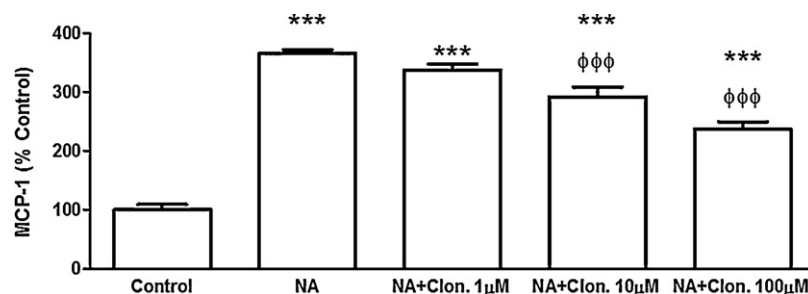
The reduction of noradrenaline effect by clonidine observed here indicates that  $\alpha$ 2 receptors could work containing excessive production of MCP-1. These data also suggest that in normal conditions the  $\beta$  activation by noradrenaline prevails over its  $\alpha$ 2 effect. The increased production of MCP-1 caused by the  $\alpha$ 2 antagonism in the presence of the  $\beta$  agonist isoproterenol further confirms this hypothesis.

Noradrenaline is known to stimulate the production of trophic and neuroprotective factors by astrocytes. These actions are mainly exerted through the activation of  $\beta$  receptors [47], while the activation of  $\alpha$ 2 receptors does not seem to participate in these effects [30]. Since  $\alpha$ 2 receptors counteract the actions regulated by the  $\beta$  type in multiple conditions, it could be inferred that the interaction of noradrenaline with the  $\alpha$ 2 receptor also functions as a way to restrict the induction of MCP-1 caused by its interaction with the  $\beta$  type of receptors. Accordingly, our results show that the blockade of  $\alpha$ 2 receptors interferes with this process and facilitates the expression of more MCP-1. The nature of the

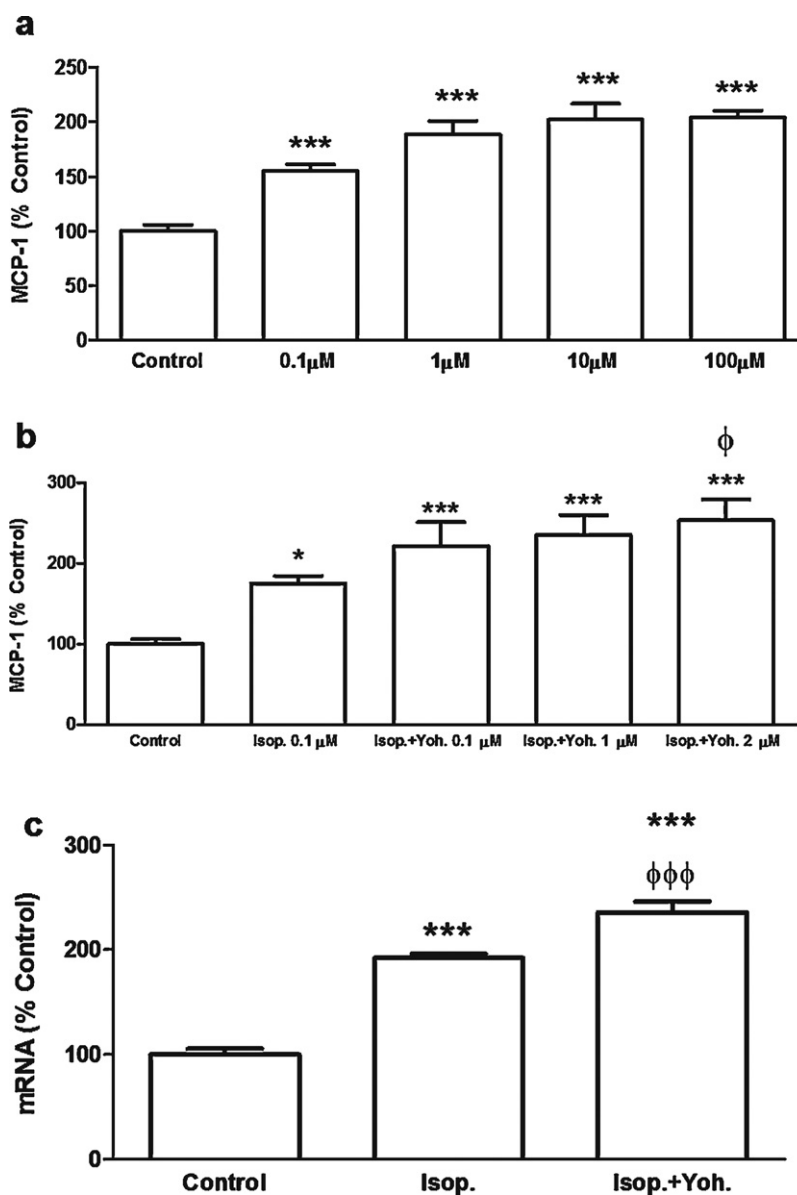
mediators participating in this process remains unknown to us and constitutes an interesting new research field.

The cytokine IL-10 is an anti-inflammatory mediator with neuroprotective potential [50,52] whose expression has been described to be regulated by both types of adrenergic receptors in a way similar to the one we present here for MCP-1; IL-10 is upregulated in mice plasma as a response to the systemic activation of  $\beta$  receptors and an opposite effect is observed when  $\alpha$  agonists are administered [54]. Accordingly, desipramine treatment also elevates plasma levels of IL-10 [48]. However, the conditions we used here to detect the induction of MCP-1 by desipramine or atomoxetine in astrocytes did not allow us to detect modifications of IL-10 mRNA. This suggests that while similar mechanisms could regulate the expression of IL-10 and MCP-1, different conditions may be necessary to attain this in isolated astrocytes.

The induction of MCP-1 caused by dibutyryl-cAMP treatment [37] indicates that cAMP could be the second messenger responsible for the induction of MCP-1 in astrocytes. The downregulation of cAMP resulting of  $\alpha$ 2 receptors activation in astrocytes [44] could explain the reduced production of MCP-1 caused by clonidine treatment.



**Fig. 4.** The  $\alpha$ 2 receptor agonist clonidine reduces MCP-1 expression. Astrocytes were incubated with control media or with noradrenaline (NA) 5  $\mu$ M alone or in combination with different concentrations of clonidine (1–100  $\mu$ M). MCP-1 levels in the media were assessed after 24 h by ELISA. MCP-1 mean value for the control group is 103.07 ng/ml. Data are expressed as percentage of control values (set to 100%); \*\*\* $p$  < 0.0001 versus control,  $\phi\phi\phi$  $p$  < 0.0001 versus NA. Data are means  $\pm$  SE of  $n$  = 10 replicates per group.



**Fig. 5.** Yohimbine and isoproterenol synergistically induce MCP-1. (a) Astrocytes were incubated with control media or with isoproterenol (0.1–100  $\mu$ M). MCP-1 levels in the media were assessed after 24 h by ELISA. MCP-1 mean value for the control group is 103.07 ng/ml. (b) Isoproterenol (0.1  $\mu$ M) was added to the culture media alone or in combination with different concentrations of yohimbine (0.1–2  $\mu$ M) and MCP-1 concentration in the media was assessed after 24 h by ELISA. MCP-1 mean value for the control group is 103.07 ng/ml. (c) Astrocytes were incubated for 24 h in control media or with isoproterenol 0.1  $\mu$ M alone or in combination with yohimbine 1  $\mu$ M. RNA was isolated and MCP-1 mRNA levels determined by Q-PCR. Data are expressed as percentage of control values (set to 100%); \*\*\* $p$  < 0.0001 versus control, \* $p$  < 0.005 versus control,  $\phi$   $p$  < 0.005 versus isoproterenol,  $\phi\phi\phi$   $p$  < 0.0001 versus isoproterenol. Data are means  $\pm$  SE of  $n$  = 10 replicates per group.

As mentioned above, while neurons and microglia also produce MCP-1, astrocytes seem to be the main source of this cytokine in the brain [1,21]. This fact gives more relevance to the study of the mechanisms controlling the production of MCP-1 in this cell type. The concentration of MCP-1 in brain is largely elevated after different kinds of injuries [21,16–18], and then it attracts cells that develop the inflammatory response. However, our previous studies suggest that it can stimulate microglial proliferation without activating them [27]. In addition to this, MCP-1 is known to participate in other processes not so related to inflammation. One of the best studied ones is the attraction of neuronal progenitors [59] and the contribution to the repair of brain lesions [4]. Noradrenaline by itself [34] or tricyclic antidepressants [40,46] are known to regulate neurogenesis. The present data confirm the participation of adrenergic receptors on MCP-1 expression in astrocytes; in addition, it also show the potential of

antidepressants to stimulate MCP-1 production in brain cells. Altogether, the induction by noradrenaline/antidepressants of MCP-1 and the involvement of all three in neurogenesis, suggest that some of their physiological tasks could be directed in the same direction if not directly cooperative.

Our interest on noradrenaline effects is based on the neuroprotective actions of this neurotransmitter. Previous studies from us and others describe the anti-inflammatory effects of noradrenaline in vivo [23,24,31] and vitro [36,35]. This work confirms that the degradation of neurons from locus ceruleus characteristic of Alzheimer's disease [5] and the resulting reduction of brain noradrenaline levels facilitate the progression of inflammation in brain and, ultimately, the loss of neurons. In parallel with these anti-inflammatory/neuroprotective actions, when interacting with astrocytes, noradrenaline stimulates the release of neurotrophic factors by acting on different adrenergic receptors [30,47].

Altogether, the data available allow us to expect that the modifications caused by noradrenaline in astrocytes would result in neuro-protective changes, and one of them could be the release of MCP-1, even though it cannot be strictly classified as a neuro-protective agent due to its involvement in both protective and pro-inflammatory processes. However, this should be taken into account when considering the possible mechanisms responsible for some of the effects observed for certain antidepressants.

## Acknowledgements

This work was supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation (SAF2010-21948) and Centro de Investigación en Red de Salud Mental (CIBERSAM). AEH is a predoctoral fellow from the Cátedra Externa del Dolor Fundación Grunenthal Universidad de Cádiz.

## References

- [1] A.A. Babcock, W.A. Kuziel, S. Rivest, T. Owens, Chemokine expression by glial cells directs leukocytes to sites of axonal injury in the CNS, *J. Neurosci.* 23 (2003) 7922–7930.
- [2] I.T. Backstrom, S.B. Ross, J.O. Marcusson, [3H]desipramine binding to rat brain tissue: binding to both noradrenaline uptake sites and sites not related to noradrenaline neurons, *J. Neurochem.* 52 (1989) 1099–1106.
- [3] A.S. Baldwin Jr., The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights, *Annu. Rev. Immunol.* 14 (1996) 649–683.
- [4] A. Belmadani, P.B. Tran, D. Ren, R.J. Miller, Chemokines regulate the migration of neural progenitors to sites of neuroinflammation, *J. Neurosci.* 26 (2006) 3182–3191.
- [5] W. Bondareff, C.Q. Mountjoy, M. Roth, Selective loss of neurones of origin of adrenergic projection to cerebral cortex (nucleus locus coeruleus) in senile dementia, *Lancet* 1 (1981) 783–784.
- [6] V. Bruno, A. Copani, G. Besong, G. Scoto, F. Nicoletti, Neuroprotective activity of chemokines against N-methyl-D-aspartate or beta-amyloid-induced toxicity in culture, *Eur. J. Pharmacol.* 399 (2000) 117–121.
- [7] F.P. Bymaster, J.S. Katner, D.L. Nelson, S.K. Hemrick-Luecke, P.G. Threlkeld, J.H. Heiligenstein, S.M. Morin, D.R. Gehlert, K.W. Perry, Atomoxetine increases extracellular levels of norepinephrine and dopamine in prefrontal cortex of rat: a potential mechanism for efficacy in attention deficit/hyperactivity disorder, *Neuropsychopharmacology* 27 (2002) 699–711.
- [8] S.A. Checkley, A.P. Slade, E. Shur, S. Dawling, A pilot study of the mechanism of action of desipramine, *Br. J. Psychiatry* 138 (1981) 248–251.
- [9] R.I. Cohen, G. Almazan, Norepinephrine-stimulated PI hydrolysis in oligodendrocytes is mediated by alpha 1A-adrenoceptors, *Neuroreport* 4 (1993) 1115–1118.
- [10] G. Conductier, N. Blondeau, A. Guyon, J.L. Nahon, C. Rovere, The role of monocyte chemoattractant protein MCP1/CCL2 in neuroinflammatory diseases, *J. Neuroimmunol.* 224 (2010) 93–100.
- [11] C. Daly, B.J. Rollins, Monocyte chemoattractant protein-1 (CCL2) in inflammatory disease and adaptive immunity: therapeutic opportunities and controversies, *Microcirculation* 10 (2003) 247–257.
- [12] S.L. Deshmane, S. Kremlev, S. Amini, B.E. Sawaya, Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview, *J. Interferon Cytokine Res.* 29 (2009) 313–326.
- [13] E.A. Eugenini, T.G. D'Aversa, L. Lopez, T.M. Calderon, J.W. Berman, MCP-1 (CCL2) protects human neurons and astrocytes from NMDA or HIV-tat-induced apoptosis, *J. Neurochem.* 85 (2003) 1299–1311.
- [14] D.L. Feinstein, M.T. Heneka, V. Gavriluyk, R.C. Dello, G. Weinberg, E. Galea, Noradrenergic regulation of inflammatory gene expression in brain, *Neurochem. Int.* 41 (2002) 357–365.
- [15] P. Finzer, U. Soto, H. Delius, A. Patzelt, J.F. Coy, A. Poustka, H.H. zur, F. Rosl, Differential transcriptional regulation of the monocyte-chemoattractant protein-1 (MCP-1) gene in tumorigenic and non-tumorigenic HPV 18 positive cells: the role of the chromatin structure and AP-1 composition, *Oncogene* 19 (2000) 3235–3244.
- [16] A. Flugel, G. Hager, A. Horvat, C. Spitzer, G.M. Singer, M.B. Graeber, G.W. Kreutzberg, F.W. Schwaiger, Neuronal MCP-1 expression in response to remote nerve injury, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 21 (2001) 69–76.
- [17] J.M. Galasso, Y. Liu, J. Szaflarski, J.S. Warren, F.S. Silverstein, Monocyte chemoattractant protein-1 is a mediator of acute excitotoxic injury in neonatal rat brain, *Neuroscience* 101 (2000) 737–744.
- [18] R.S. Ghirnikar, Y.L. Lee, T.R. He, L.F. Eng, Chemokine expression in rat stab wound brain injury, *J. Neurosci. Res.* 46 (1996) 727–733.
- [19] C. Giaroni, L. Canciani, E. Zanetti, D. Giuliani, R. Pisani, R. Oldrini, E. Moro, M. Trincherà, F. Crema, S. Lecchini, G. Frigo, Effects of chronic desipramine treatment on alpha2-adrenoceptors and mu-opioid receptors in the guinea pig cortex and hippocampus, *Eur. J. Pharmacol.* 579 (2008) 116–125.
- [20] R.A. Gittins, P.J. Harrison, A morphometric study of glia and neurons in the anterior cingulate cortex in mood disorder, *J. Affect. Disord.* (2011).
- [21] A.R. Glabinski, V. Balasingam, M. Tani, S.L. Kunkel, R.M. Strieter, V.W. Yong, R.M. Ransohoff, Chemokine monocyte chemoattractant protein-1 is expressed by astrocytes after mechanical injury to the brain, *J. Immunol.* 156 (1996) 4363–4368.
- [22] K.A. Harkness, J.D. Sussman, G.A. vies-Jones, J. Greenwood, M.N. Woodroffe, Cytokine regulation of MCP-1 expression in brain and retinal microvascular endothelial cells, *J. Neuroimmunol.* 142 (2003) 1–9.
- [23] M.T. Heneka, E. Galea, V. Gavriluyk, L. Dumitrescu-Ozimek, J. Daeschner, M.K. O'Banion, G. Weinberg, T. Klockgether, D.L. Feinstein, Noradrenergic depletion potentiates beta-amyloid-induced cortical inflammation: implications for Alzheimer's disease, *J. Neurosci.* 22 (2002) 2434–2442.
- [24] M.T. Heneka, V. Gavriluyk, G.E. Landreth, M.K. O'Banion, G. Weinberg, D.L. Feinstein, Noradrenergic depletion increases inflammatory responses in brain: effects on I kappa B and HSP70 expression, *J. Neurochem.* 85 (2003) 387–398.
- [25] L. Hertz, D. Lovatt, S.A. Goldman, M. Nedergaard, Adrenoceptors in brain: cellular gene expression and effects on astrocytic metabolism and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, *Neurochem. Int.* 57 (2010) 411–420.
- [26] J. Hess, P. Angel, M. Schorpp-Kistner, AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings, *J. Cell Sci.* 117 (2004) 5965–5973.
- [27] A.E. Hinojosa, B. Garcia-Bueno, J.C. Leza, J.L. Madrigal, CCL2/MCP-1 modulation of microglial activation and proliferation, *J. Neuroinflammation* 8 (2011) 77.
- [28] M. Inazu, H. Takeda, T. Matsumiya, Functional expression of the norepinephrine transporter in cultured rat astrocytes, *J. Neurochem.* 84 (2003) 136–144.
- [29] J.I. Javaid, J.M. Perel, J.M. Davis, Inhibition of biogenic amines uptake by imipramine, desipramine, 2 OH-imipramine and 2 OH-desipramine in rat brain, *Life Sci.* 24 (1979) 21–28.
- [30] D.M. Juric, D. Loncar, M. Carman-Krzian, Noradrenergic stimulation of BDNF synthesis in astrocytes: mediation via alpha1- and beta1/beta2-adrenergic receptors, *Neurochem. Int.* 52 (2008) 297–306.
- [31] S. Kalinin, V. Gavriluyk, P.E. Polak, R. Vasser, J. Zhao, M.T. Heneka, D.L. Feinstein, Noradrenaline deficiency in brain increases beta-amyloid plaque burden in an animal model of Alzheimer's disease, *Neurobiol. Aging* 28 (2007) 1206–1214.
- [32] W.J. Karpus, K.J. Kennedy, MIP-1alpha and MCP-1 differentially regulate acute and relapsing autoimmune encephalomyelitis as well as Th1/Th2 lymphocyte differentiation, *J. Leukoc. Biol.* 62 (1997) 681–687.
- [33] R. Khorroshii, A.A. Babcock, T. Owens, NF-kappaB-driven STAT2 and CCL2 expression in astrocytes in response to brain injury, *J. Immunol.* 181 (2008) 7284–7291.
- [34] V.A. Kulkarni, S. Jha, V.A. Vaidya, Depletion of norepinephrine decreases the proliferation, but does not influence the survival and differentiation, of granule cell progenitors in the adult rat hippocampus, *Eur. J. Neurosci.* 16 (2002) 2008–2012.
- [35] J.L. Madrigal, D.L. Feinstein, R.C. Dello, Norepinephrine protects cortical neurons against microglial-induced cell death, *J. Neurosci. Res.* 81 (2005) 390–396.
- [36] J.L. Madrigal, R.C. Dello, V. Gavriluyk, D.L. Feinstein, Effects of noradrenaline on neuronal NOS2 expression and viability, *Antioxid. Redox Signal.* 8 (2006) 885–892.
- [37] J.L. Madrigal, J.C. Leza, P. Polak, S. Kalinin, D.L. Feinstein, Astrocyte-derived MCP-1 mediates neuroprotective effects of noradrenaline, *J. Neurosci.* 29 (2009) 263–267.
- [38] J.L. Madrigal, B. Garcia-Bueno, A.E. Hinojosa, P. Polak, D.L. Feinstein, J.C. Leza, Regulation of MCP-1 production in brain by stress and noradrenaline-modulating drugs, *J. Neurochem.* 113 (2010) 543–551.
- [39] P.J. Magistretti, Regulation of glycogenolysis by neurotransmitters in the central nervous system, *Diabetes Metab.* 14 (1988) 237–246.
- [40] J.E. Malberg, A.J. Eisch, E.J. Nestler, R.S. Duman, Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus, *J. Neurosci.* 20 (2000) 9104–9110.
- [41] M.R. Marien, F.C. Colpaert, A.C. Rosenquist, Noradrenergic mechanisms in neurodegenerative diseases: a theory, *Brain Res. Brain Res. Rev.* 45 (2004) 38–78.
- [42] D. Morin, R. Sapena, R. Zini, B. Onteniente, J.P. Tillement, Characterization of beta-adrenergic receptors of freshly isolated astrocytes and neurons from rat brain, *Life Sci.* 60 (1997) 315–324.
- [43] R. Papay, R. Gaivin, D.F. McCune, B.R. Rorabaugh, W.B. Macklin, J.C. McGrath, D.M. Perez, Mouse alpha1B-adrenergic receptor is expressed in neurons and NG2 oligodendrocytes, *J. Comp. Neurol.* 478 (2004) 1–10.
- [44] A.E. Renaud, T.A. Ignatowski, R.N. Spengler, Alpha 2-adrenergic receptor inhibition of cAMP accumulation is transformed to facilitation by tumor necrosis factor-alpha, *Brain Res.* 1004 (2004) 212–216.
- [45] A.K. Salm, K.D. McCarthy, Expression of beta-adrenergic receptors by astrocytes isolated from adult rat cortex, *Glia* 2 (1989) 346–352.
- [46] L. Santarelli, M. Saxe, C. Gross, A. Surget, F. Battaglia, S. Dulawa, N. Weisstaub, J. Lee, R. Duman, O. Arancio, C. Belzung, R. Hen, Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants, *Science* 301 (2003) 805–809.
- [47] J.P. Schwartz, N. Nishiyama, Neurotrophic factor gene expression in astrocytes during development and following injury, *Brain Res. Bull.* 35 (1994) 403–407.
- [48] Z. Selmečzy, J. Szelenyi, E.S. Vizi, Intact noradrenaline transporter is needed for the sympathetic fine-tuning of cytokine balance, *Eur. J. Pharmacol.* 469 (2003) 175–181.
- [49] B.D. Semple, T. Frugier, M.C. Morganti-Kossmann, CCL2 modulates cytokine production in cultured mouse astrocytes, *J. Neuroinflammation* 7 (2010) 67.
- [50] S. Sharma, B. Yang, X. Xi, J.C. Grotta, J. Aronowski, S.I. Savitz, IL-10 directly protects cortical neurons by activating PI-3 kinase and STAT-3 pathways, *Brain Res.* 1373 (2011) 189–194.

- [51] A. Sokolova, M.D. Hill, F. Rahimi, L.A. Warden, G.M. Halliday, C.E. Shepherd, Monocyte chemoattractant protein-1 plays a dominant role in the chronic inflammation observed in Alzheimer's disease, *Brain Pathol.* 19 (2009) 392–398.
- [52] G. Stoll, S. Jander, M. Schroeter, Cytokines in CNS disorders: neurotoxicity versus neuroprotection, *J. Neural Transm. Suppl.* 59 (2000) 81–89.
- [53] M.N. Subhash, M.R. Nagaraja, S. Sharada, K.Y. Vinod, Cortical alpha-adrenoceptor downregulation by tricyclic antidepressants in the rat brain, *Neurochem. Int.* 43 (2003) 603–609.
- [54] J. Szelenyi, J.P. Kiss, E. Puskas, Z. Selmezy, M. Szelenyi, E.S. Vizi, Opposite role of alpha2- and beta-adrenoceptors in the modulation of interleukin-10 production in endotoxaemic mice, *Neuroreport* 11 (2000) 3565–3568.
- [55] K.F. Tanaka, H. Kashima, H. Suzuki, K. Ono, M. Sawada, Existence of functional beta1- and beta2-adrenergic receptors on microglia, *J. Neurosci. Res.* 70 (2002) 232–237.
- [56] W.L. Thompson, W.J. Karpus, L.J. Van Eldik, MCP-1-deficient mice show reduced neuroinflammatory responses and increased peripheral inflammatory responses to peripheral endotoxin insult, *J. Neuroinflammation.* 5 (2008) 35.
- [57] O.A. Tjurmina, D.S. Goldstein, M. Palkovits, I.J. Kopin, Alpha2-adrenoceptor-mediated restraint of norepinephrine synthesis, release, and turnover during immobilization in rats, *Brain Res.* 826 (1999) 243–252.
- [58] A. Ueda, Y. Ishigatsubo, T. Okubo, T. Yoshimura, Transcriptional regulation of the human monocyte chemoattractant protein-1 gene. Cooperation of two NF-kappaB sites and NF-kappaB/Rel subunit specificity, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 31092–31099.
- [59] D. Widera, W. Holtkamp, F. Entschladen, B. Niggemann, K. Zanker, B. Kaltschmidt, C. Kaltschmidt, MCP-1 induces migration of adult neural stem cells, *Eur. J. Cell Biol.* 83 (2004) 381–387.
- [60] G. Yang, Y. Meng, W. Li, Y. Yong, Z. Fan, H. Ding, Y. Wei, J. Luo, Z.J. Ke, Neuronal MCP-1 mediates microglia recruitment and neurodegeneration induced by the mild impairment of oxidative metabolism, *Brain Pathol.* (2010).
- [61] H.T. Zhang, L.R. Whisler, Y. Huang, Y. Xiang, J.M. O'Donnell, Postsynaptic alpha-2 adrenergic receptors are critical for the antidepressant-like effects of desipramine on behavior, *Neuropsychopharmacology* 34 (2009) 1067–1077.
- [62] Z. Zhou, J. Zhen, N.K. Karpowich, R.M. Goetz, C.J. Law, M.E. Reith, D.N. Wang, LeuT-desipramine structure reveals how antidepressants block neurotransmitter reuptake, *Science* 317 (2007) 1390–1393.

RESEARCH

Open Access

# CCL2/MCP-1 modulation of microglial activation and proliferation

Ara E Hinojosa<sup>1,2</sup>, Borja Garcia-Bueno<sup>1,2</sup>, Juan C Leza<sup>1,2</sup> and Jose LM Madrigal<sup>1,2\*</sup>

## Abstract

**Background:** Monocyte chemoattractant protein (CCL2/MCP-1) is a chemokine that attracts cells involved in the immune/inflammatory response. As microglia are one of the main cell types sustaining inflammation in brain, we proposed here to analyze the direct effects of MCP-1 on cultured primary microglia.

**Methods:** Primary microglia and neuronal cultures were obtained from neonatal and embryonic Wistar rats, respectively. Microglia were incubated with different concentrations of recombinant MCP-1 and LPS. Cell proliferation was quantified by measuring incorporation of bromodeoxyuridine (BrdU). Nitrite accumulation was measured using the Griess assay. The expression and synthesis of different proteins was measured by RT-PCR and ELISA. Cell death was quantified by measuring release of LDH into the culture medium.

**Results:** MCP-1 treatment (50 ng/ml, 24 h) did not induce morphological changes in microglial cultures. Protein and mRNA levels of different cytokines were measured, showing that MCP-1 was not able to induce proinflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , IL6, MIP-1 $\alpha$ ), either by itself or in combination with LPS. A similar lack of effect was observed when measuring inducible nitric oxide synthase (NOS2) expression or accumulation of nitrites in the culture media as a different indicator of microglial activation. MCP-1 was also unable to alter the expression of different trophic factors that were reduced by LPS treatment. In order to explore the possible release of other products by microglia and their potential neurotoxicity, neurons were co-cultured with microglia: no death of neurons could be detected when treated with MCP-1. However, the presence of MCP-1 induced proliferation of microglia, an effect opposite to that observed with LPS.

**Conclusion:** These data indicate that, while causing migration and proliferation of microglia, MCP-1 does not appear to directly activate an inflammatory response in this cell type, and therefore, other factors may be necessary to cause the changes that result in the neuronal damage commonly observed in situations where MCP-1 levels are elevated.

## Background

One of the first steps necessary for the development of an inflammatory response is the attraction of certain types of cells to the site of inflammation [1]. Multiple factors are involved in this process; among them, chemokines constitute some of the main agents since they are responsible for the creation of the concentration gradient towards which leukocytes and other cells migrate [2]. In agreement with this, the suppression of chemokines, or of their activity, results in a concomitant suspension of the inflammatory response [3].

An exaggerated inflammatory response can cause damage to cells that are necessary for the correct functioning of the tissue/organ they are part of. This is particularly important in brain, where damage to or loss of constitutive cells can have worse consequences than in different tissues with higher regenerative capacities. The main immune cells in brain are microglia [4]; they continuously inspect their environment and react to changes that could threaten homeostasis [5]. This reaction can be detected mainly by changes in their morphology as well as by their expression of different genes or release of certain cytokines. The principal purpose of this reaction appears to be protection of neurons and their synapses [6,7]. However, neurons in the proximity of activated microglia can be damaged by an

\* Correspondence: [jlmadriral@med.ucm.es](mailto:jlmadriral@med.ucm.es)

<sup>1</sup>Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Av. Complutense s/n, 28040 Madrid, Spain  
Full list of author information is available at the end of the article

exaggerated inflammatory response. Microglia can also receive some signals that make them attack healthy neurons as is the case in neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease, HIV-associated dementia or multiple sclerosis, among others [8].

As a consequence of these facts, it becomes interesting to elucidate the precise mechanisms regulating microglial changes and to distinguish between those that have potentially deleterious consequences and those that result in protection against injuries. As surveillance agents, microglia need to travel to the places where they are needed, and chemokines regulate these movements [9]. As the monocyte chemoattractant protein (CCL2/MCP-1) is one of the main chemokines regulating microglial movement, it was our goal to study here some of the effects MCP-1 has on isolated microglia, and to determine if the responses it provokes in microglia may be responsible for the neuronal damage observed in situations where microglia are attracted to sites of inflammation by this chemokine. Different studies have shown that suppression of MCP-1 or of its effects can be protective against different injuries or diseases [10], and have suggested that this could be considered as a therapeutic strategy.

However, an alternative role of MCP-1 depicts a different scenario: MCP-1 has also been proven to protect neurons against different stimuli [11-13], and recent studies have indicated that it could also have other functions besides those that characterize it as a chemoattractant [14-17].

Our experiments show that MCP-1 induces proliferation of isolated microglia, but we could not detect changes in the production of proinflammatory cytokines in microglia treated with similar concentrations of MCP-1. Accordingly, MCP-1 did not induce morphological changes in microglia nor did it induce expression of the proinflammatory enzyme NOS2 or the accumulation of nitrites, an indicator of the production of nitric oxide caused by NOS2. Lipopolysaccharide (LPS) was used as a positive control to cause those changes characteristic of microglia that lead to the production of neurotoxic factors. While LPS also reduced the expression of various neurotrophic factors, MCP-1 did not modify them. All these data suggest that MCP-1 has some effects on microglia which do not appear to be directly toxic to neurons, at least at the concentrations analyzed. However, microglia could be stimulated by MCP-1 to generate certain factors which we did not analyze or which we simply may not know about. In order to further explore this possibility, microglia were treated with MCP-1 while co-cultured with primary neurons, and no neuronal damage was observed under these conditions, further suggesting a lack of a change in microglia that can be toxic to neurons.

The results presented here indicate that the changes caused by MCP-1 in microglia may not be responsible for the neuronal damage observed in certain situations where MCP-1 expression is elevated, and support the hypothesis which proposes a neuroprotective role for MCP-1.

## Methods

### Reagents

Fetal calf serum (< 10 EU endotoxin per mL), basal medium Eagle, neurobasal medium (NBM), DMEM, DMEM-F12 and the B27 without antioxidants supplements for cell cultures were from GIBCO Life Technologies (Carlsbad, CA, USA). LPS from *Escherichia coli* 0111:B4 for cell treatments and glutamine, gentamicin, penicillin and streptomycin for cell cultures were from Sigma (St. Louis, MO, USA). Recombinant rat MCP-1 for cell treatments was from Peprotech (Rocky Hill, NJ, USA). Trizol<sup>®</sup> for RNA isolation, Taq polymerase for cDNA synthesis and cDNA synthesis reagents were from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

### Microglial cultures

All experimental protocols followed the guidelines of the Animal Welfare Committee of the Universidad Complutense according to European legislation (2003/65/EC).

Rat cortical microglial cells were obtained as described previously [18]. Briefly, 1-day-old Wistar rats (Harlan Iberica) were used. Enriched cultures of microglia were prepared from primary mixed cultures of rat cortical glial cells, plated in T-75-cm<sup>2</sup> flasks in DMEM containing 10% FCS and antibiotics (100 IU/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin; Sigma), and incubated at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. Briefly, microglial cells were detached from the astrocyte monolayer by gentle shaking 11-13 days after the dissection. The cells were plated at 4·10<sup>5</sup> cells/ml in 6.5 mm Transwell<sup>®</sup> inserts (100 µl/well), 24 (500 µl/well) or 96 (100 µl/well)-well plates. Under these conditions, the cultures were 95-98% Mac-1 positive. All experiments were carried out in 10% FCS/DMEM-F12.

### Neuronal cultures

Primary cultures of cortical neurons were prepared as described [19], with some modifications. Brains were removed from fetal Wistar rats (Harlan Iberica) at embryonic day 16, and the cortical area was dissected. Neurons were mechanically dissociated in 80% basal medium Eagle containing 33 mmol/L glucose, 2 mmol/L glutamine, 16 mg/L gentamicin, 10% horse serum, and 10% fetal calf serum and plated at 1·10<sup>6</sup> cells/ml in poly-L-lysine-precoated, 12, 24 or 96-multiwell plates. The medium was replaced 24 h later with serum-free NBM supplemented with 0.5 mmol/L glutamine and

complete B27 without antioxidants to reduce glial contamination and after 4 days 50% of the medium was replaced with fresh NBM. Cultures consisted of  $98 \pm 2\%$  NeuN-positive cells. After 9 days in vitro, inserts (0.4  $\mu\text{m}$  pore size) containing microglia in 10% FCS/DMEM-F12 were placed over the neurons (this system allowed for the transfer of material from one side of the membrane to the other while preventing direct contact of both cell cultures). 24 h later, the media in the inserts were replaced by new ones containing different treatments. After 24 h cell viability was assessed by LDH measurements.

#### Nitrites Measurement

NO production was measured indirectly by nitrite measurement in the cell culture media. An aliquot of the cell culture media (80  $\mu\text{l}$ ) was mixed with 40  $\mu\text{l}$  of Griess reagent and the absorbance was measured at 550 nm.

#### Cell viability

Cell viability was assessed by measurement of released lactate dehydrogenase (LDH), using the CytoTox-96 kit from Promega (Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions.

#### IL-1 $\beta$ Measurement

IL-1 $\beta$  levels in the incubation medium were detected using a specific enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for rat IL-1 $\beta$ , carried out according to the manufacturer's instructions (R&D Systems, Inc.). Briefly, the medium was collected from the microglial cells and stored at  $-80^\circ\text{C}$  until the day of the assay (avoiding repeated freeze-thaw cycles). A standard curve was generated during each assay in the concentration range 0-1,000 pg/ml using the rat IL-1 $\beta$  standard provided in the kit. The minimum detectable dose of IL-1 $\beta$  was 5 pg/ml.

#### IL-6 Measurement

IL-6 levels in the incubation medium were detected using a specific enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for rat IL-6, carried out according to the manufacturer's instructions (BD Biosciences). Briefly, the medium was collected from the microglial cells and stored at  $-80^\circ\text{C}$  until the day of the assay (avoiding repeated freeze-thaw cycles). A standard curve was generated during each assay in the concentration range 0-5,000 pg/ml using the rat IL-6 standard provided in the kit. The assay detection limits were of 78-5000 pg/mL.

#### BrdU Incorporation Assay

DNA synthesis was measured using a bromodeoxyuridine (BrdU) Cell Proliferation Kit (Calbiochem,

Darmstadt, Germany). BrdU labeling solution was added to the cells in combination with the different treatments and incubated for 24 h. After removal of the culture medium, the cells were fixed, permeabilized and the DNA denatured. Anti-BrdU antibody was then added before the addition of the mouse IgG-peroxidase conjugate. The signal was developed with tetramethylbenzidine solution in darkness. Absorbance in each well was measured using a spectrophotometric plate reader at 450 nm with a reference wavelength at 595 nm.

#### mRNA analysis

Total cytoplasmic RNA was prepared from cells using TRIZOL<sup>®</sup> reagent (Invitrogen); aliquots were converted to cDNA using random hexamer primers. Quantitative changes in mRNA levels were estimated by real time PCR(Q-PCR) using the following cycling conditions: 35 cycles of denaturation at  $95^\circ\text{C}$  for 10 s, annealing at  $58-61^\circ\text{C}$  for 15 s depending on the specific set of primers, and extension at  $72^\circ\text{C}$  for 20 s. Reactions were carried out in the presence of SYBR green (1:10000 dilution of stock solution from Molecular Probes, Eugene, OR, USA), carried out in a 20-  $\mu\text{L}$  reaction in a Corbett Rotor-Gene (Corbett Research, Mortlake, NSW, Australia). The primers used for NOS2 were: forward: 5'-AGCA ACA TTT GGC AAT GGAGAC TGC-3' and reverse: 5'-AGC AAA GGC ACA GAA CTG AGG GTA-3'. The primers used for MIP1 $\alpha$  were: forward: 5'-CAG AAC ATT CCT GCC ACC TGC AAA-3' and reverse: 5'-AGG AAT GTG CCC TGA GGT CTT TCA-3'. The primers used for Cyclin D1 were: forward: 5'-TGC TGC AAA TGG AAC TGC TTC TGG-3' and reverse: 5'-AAG GTC TGT GCA TGT TTG CGG ATG-3'. The primers used for CDK4 were: forward: 5'-ACG CCT GTG GAT ATG TGG AGT GTT-3' and reverse: 5'-AGT CGT CTT CTG GAG GCA ATC CAA-3'. The primers used for PCNA were: forward: 5'-AGC AAC TTG GAA TCC CAG AAC AGG-3' and reverse: 5'-TAA GGT CCC GGC ATA TAC GTG CAA-3'. The primers used for IL1 $\beta$  were: forward: 5'-ACC TGC TAG TGT GTG ATG TTC CCA-3' and reverse: 5'-AGG TGG AGA GCT TTC AGC TCA CAT-3'. The primers used for IGF-1 were: forward: 5'-CCG CTG AAG CCT ACA AAG TC-3' and reverse: 5'-GGA AAT GCC CAT CTC TGA AA-3'. The primers used for bFGF were: forward: 5'-GAA CCG GTA CCT GGC TAT GA-3' and reverse: 5'-CCG TTT TGG ATC CGA GTT TA-3'. The primers used for IL6 were: forward: 5'-AAC TCC ATC TGC CCT TCA GGA ACA-3' and reverse: 5'-AAG GCA GTG GCT GTC AAC AAC ATC-3'. The primers used for GAPDH were: forward: 5'-TGC ACC ACC AAC TGC TTA GC-3 and reverse: 5'-GGC ATG GAC TGT GGT CAT GAG-3'. Relative mRNA concentrations were calculated from the take-off

point of reactions using included software, and GAPDH levels were used to normalize data.

### Cell morphology

Microglia morphology was analyzed by phase contrast microscopy. Images were obtained on a Nikon Eclipse Ti-S (Tokyo, Japan) microscope equipped with a Digital Sight digital camera and NIS-Elements imaging software.

### Statistical analysis

All experiments were done at least in triplicate. When more than two experimental groups were present in the same experiment, data were analyzed by one-way ANOVA followed by Newman-Keuls multiple comparison tests and  $p$  values  $< 0.05$  were considered significant. When two experimental groups were present in the same experiment, data were analyzed by unpaired  $t$  tests, and  $p$  values  $< 0.05$  were considered significant.

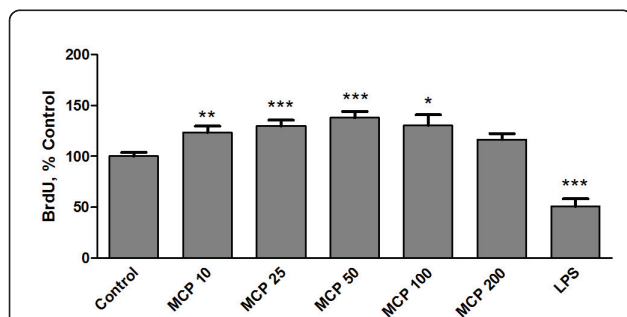
## Results

### MCP-1 induces microglia proliferation

A BrdU immunoassay was used to evaluate the proliferation of microglia in response to MCP-1. Different concentrations of MCP-1 (10-200 ng/ml) or LPS (0.1  $\mu$ g/ml) were added to the culture medium and the cells were incubated for 24 h in the presence of BrdU. After this treatment, we could detect a higher degree of BrdU incorporation in the microglia treated with MCP-1. The changes were concentration-dependent up to the concentration of 50 ng/ml. On the other hand, LPS treatment reduced microglia proliferation. (Figure 1)

### Quantification of cell cycle-dependent transcripts

After observing MCP-1 alteration of microglia proliferation it became interesting to study if the expression of

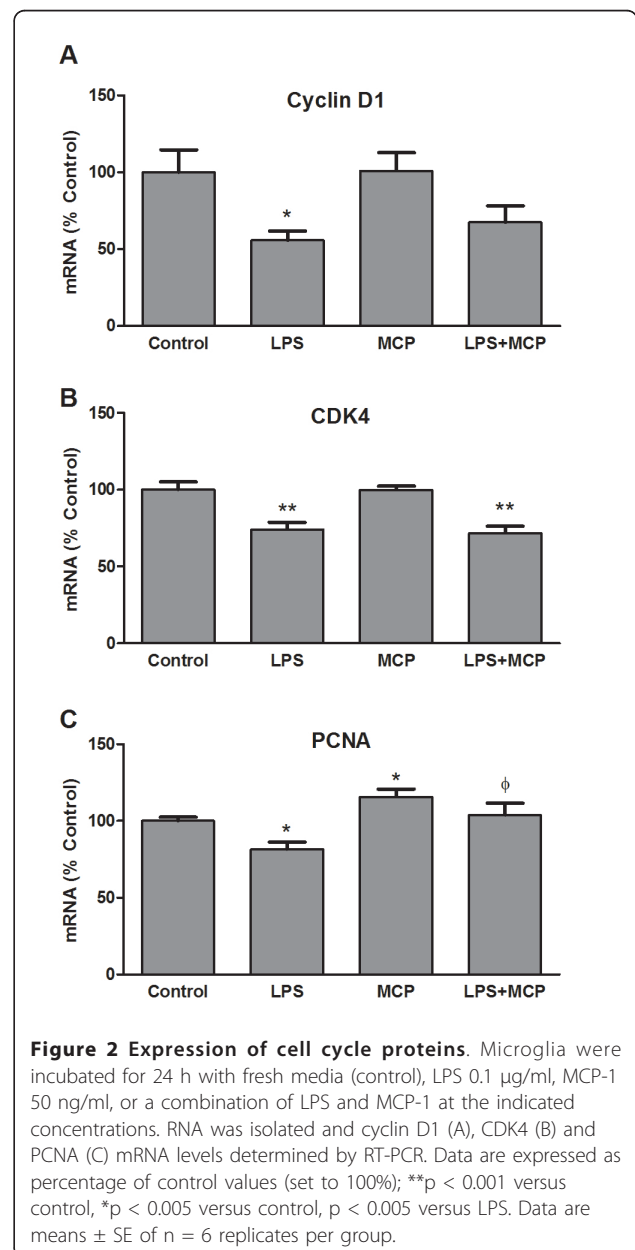


**Figure 1 MCP-1 induces microglia proliferation.** Microglia were incubated for 24 h with fresh media (control), MCP-1 (10-200 ng/ml) or LPS 0.1  $\mu$ g/ml. Cell proliferation was assayed using a BrdU kit as described in the Methods section. Data are expressed as percentage of control values (set to 100%); \*\*\* $p$   $< 0.0001$  versus control, \*\* $p$   $< 0.001$  versus control, \* $p$   $< 0.005$  versus control. Data are means  $\pm$  SE of  $n = 12$  replicates per group.

different proteins involved in the regulation of the cell cycle was also modulated by MCP-1. In accordingly with what we observed in BrdU studies, LPS treatment caused a reduction in mRNA levels of cyclin D1, cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) and proliferating cell nuclear antigen (PCNA). On the other hand, MCP-1 elevated PCNA mRNA indicating that this treatment induces microglia proliferation. However, no modifications could be detected by MCP-1 treatment of cyclin D1 or CDK4 (Figure 2).

### Microglia activation

The induction of the enzyme NOS2 is considered to be a marker of those microglial modifications that lead to



**Figure 2 Expression of cell cycle proteins.** Microglia were incubated for 24 h with fresh media (control), LPS 0.1  $\mu$ g/ml, MCP-1 50 ng/ml, or a combination of LPS and MCP-1 at the indicated concentrations. RNA was isolated and cyclin D1 (A), CDK4 (B) and PCNA (C) mRNA levels determined by RT-PCR. Data are expressed as percentage of control values (set to 100%); \*\*\* $p$   $< 0.001$  versus control, \* $p$   $< 0.005$  versus control,  $\phi$   $p$   $< 0.005$  versus LPS. Data are means  $\pm$  SE of  $n = 6$  replicates per group.

an inflammatory response. To study this possibility, we treated microglia cultures with MCP-1 and measured the concentration of nitrites present in the culture media, as an indirect way to detect modifications of NOS2 activity and the subsequent release of nitric oxide. Under these conditions we could not detect modifications of nitrite concentration by MCP-1 treatment (Figure 3A).

It was also interesting for us to analyze the possible exacerbating effect of MCP-1 in the presence of a different microglia-activating agent. An approach to this was made by co-incubating the cells with different concentrations of LPS. We observed a small but significant increase when MCP-1 was added to the higher concentration of LPS used (Figure 3A); however we could not detect similar differences in the other experiments described below.

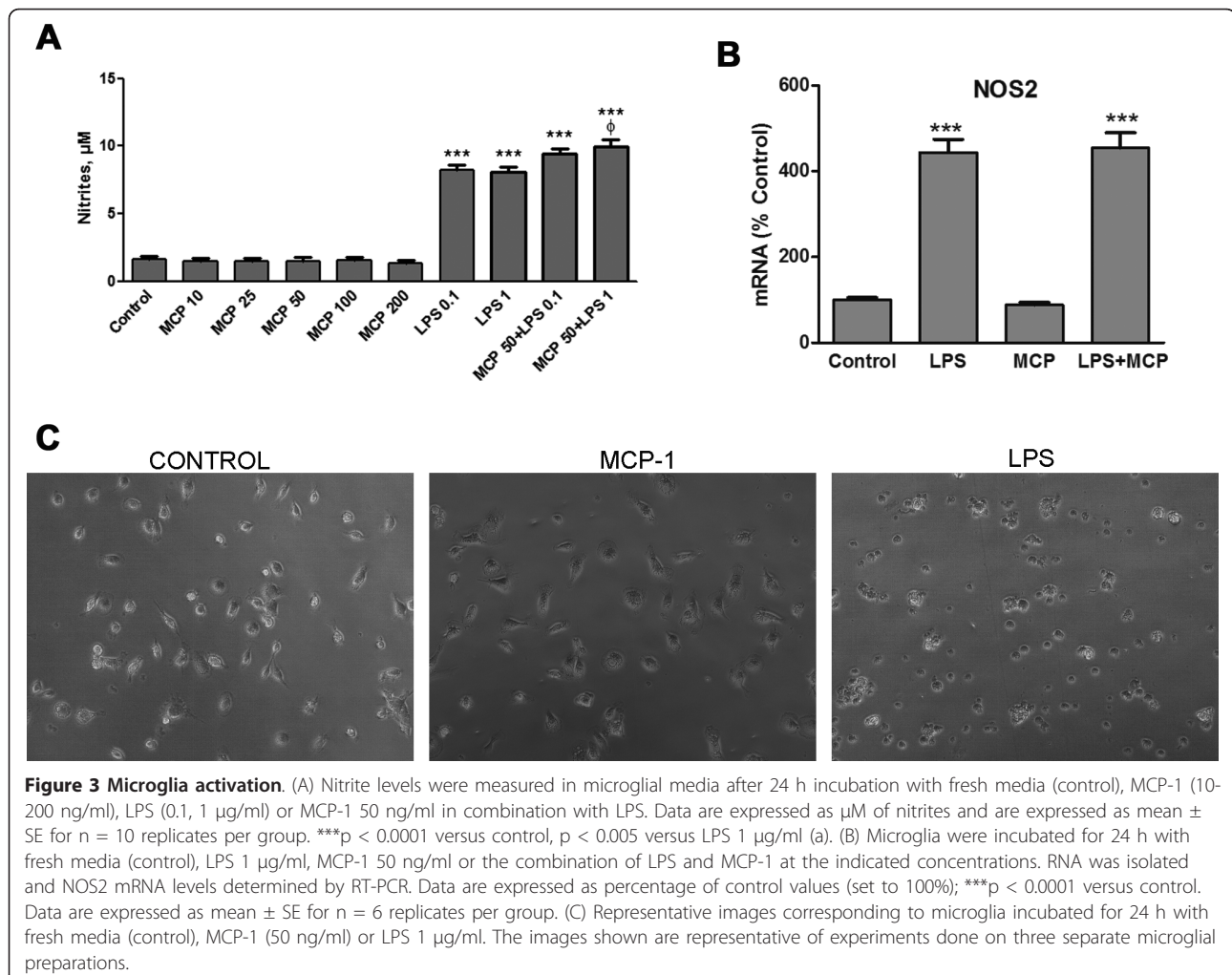
As a confirmation of the nitrite differences, mRNA levels of NOS2 in microglia were measured by RT-PCR. For this we chose the concentration of MCP-1 with the

highest proliferative effect. Under the conditions used (50 ng/ml, 24 h), MCP-1 did not modify the expression of NOS2, nor did it alter the induction caused by LPS treatment (Figure 3B).

Morphological alterations of microglia are also a good way to evaluate the effect of different agents on this type of cell. Enlargement of the microglial cell body and loss of ramifications, developing an amoeboid shape, are commonly caused by LPS or other toxins [20]. While those changes could be easily detected in LPS-treated cells, no modifications in the appearance of MCP-1-treated cells could be appreciated (Figure 3C).

#### Expression of inflammatory cytokines

Our main goal was to analyze if MCP-1 can provoke some change in microglia that results in toxicity to neurons. For this purpose we measured the expression and synthesis of some pro-inflammatory cytokines such as interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) or interleukin 6 (IL-6) as well as the chemokine macrophage inflammatory



protein 1 alpha (MIP-1 $\alpha$ ). MCP-1 alone or in combination with LPS was added to microglia cultures and the cells were incubated for 24 h. After this, mRNA was isolated and analyzed by RT-PCR. MCP-1 caused no significant changes in any of the cytokines studied, nor did it alter the elevations caused by LPS (Figure 4A). Release of IL-1 $\beta$  and IL-6 into the culture media was also measured by ELISA and no modification could be detected as a result of MCP-1 treatment (Figure 4B).

### Neuronal toxicity

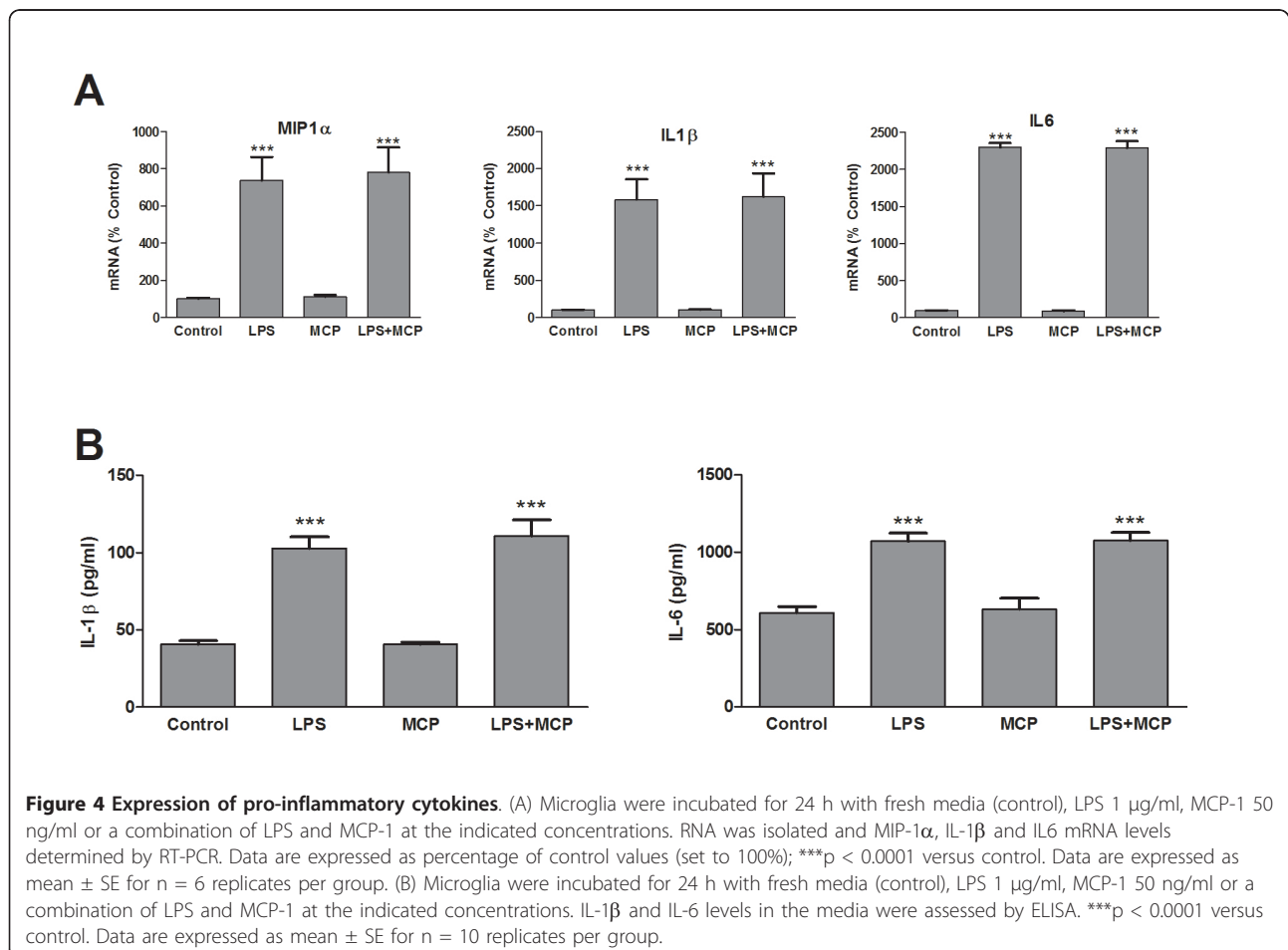
Since we could not observe modification by MCP-1 of any of the characteristic activation markers evaluated, we decided to analyze the direct effect of MCP-1-treated microglia on neurons. Primary cortical neurons were cultured for 9 days. At this point, microglia inserts were placed over the neurons. As previously described, MCP-1 was added to microglial cultures alone or in combination with LPS, and 24 h later LDH levels were measured in the neuronal culture media. While the addition of

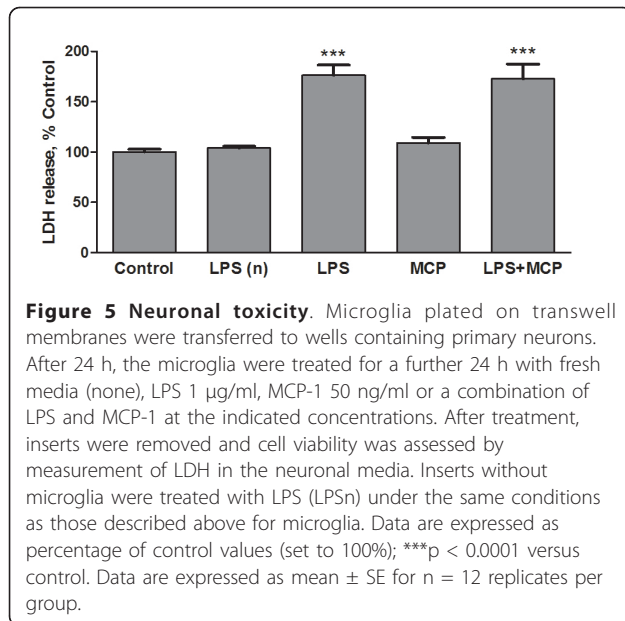
LPS to microglial cultures caused neuronal death, MCP-1 did not affect the viability of the neurons nor did it alter LPS effects (Figure 5).

The direct effect of LPS on neurons was evaluated by treating inserts without microglia in the same conditions as those containing microglia. This procedure did not result in significant alterations of neuronal LDH.

### Production of trophic factors

Since MCP-1 does not appear to induce production of potentially neurotoxic agents such as nitric oxide or proinflammatory cytokines, it could cause harmful effects by reducing the production of trophic factors. mRNA levels for basic fibroblast growth factor (FGF) and insulin-like growth factor 1 (IGF) were measured by RT-PCR in microglia treated with MCP-1 alone or in combination with LPS for 24 h. Under these conditions, LPS treatment caused a great reduction in the production of both proteins' mRNAs while MCP-1 did not cause any modification for FGF (Figure 6A) and caused an increase for IGF (Figure 6B).





## Discussion

The data presented here analyze microglial activation as a consequence of MCP-1 treatment. While no morphological changes or production of inflammatory mediators could be detected, we found that MCP-1 stimulates the formation of new microglia. This suggests that MCP-1 could elevate microglia concentrations by attracting these cells and also by facilitating their proliferation, but it would not be associated with their activation or with the generation of neurotoxic agents.

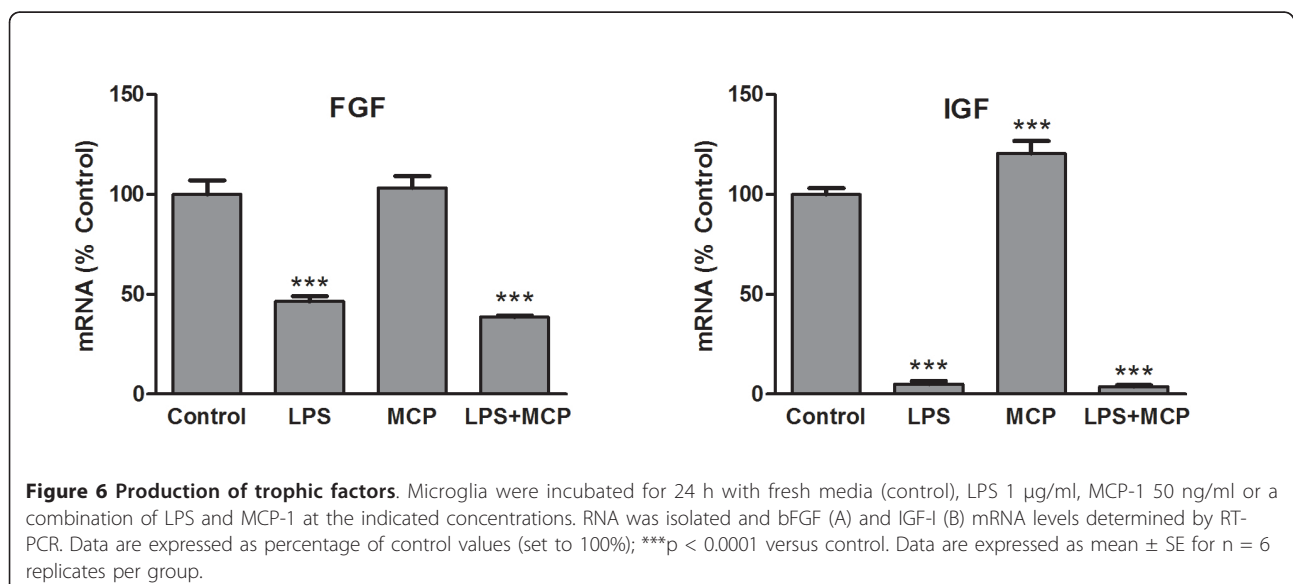
Since MCP-1 activity can be modified by plasmin or matrix metalloproteinases [21,22], we cannot discard the

possibility that such modification is a requirement for MCP-1 to exert the effects observed.

After its discovery as a chemokine, and particularly over the last few years, MCP-1 has proven to be a key mediator in different processes. Some of them are related to its ability to attract cells, such as directing the migration of neural progenitors [23], while others seem to be independent of its chemoattractant abilities and suggest that MCP-1 may also participate as a modulator of neuronal communication [14,24], neuronal regeneration [15], angiogenesis, hematopoiesis [25] or immunoregulation [16].

Besides these different roles of MCP-1, there are several studies focused on its involvement in neuro-inflammatory reactions [26]. Since MCP-1 attracts those cells necessary for the development of an inflammatory response, the blockade of this attraction would reduce inflammation and all the changes associated to it. However, inhibition of MCP-1 production or of its activity should be carefully considered as a therapeutic target, mainly because some of its actions could be necessary for homeostasis maintenance or simply remain yet unknown. Based on this, we sought here to elucidate, at least in part, if MCP-1 can directly cause activation of the main immune cells in brain, and if this could contribute to the death of neurons.

While MCP-1's ability to attract leukocytes [27] and other types of cells such as microglia [12] is well known, its proliferative effect on microglia has not been so intensely investigated. Studies performed on human astrocyte cultures have also shown the ability of MCP-1 to induce proliferation of these cells [28], but to our knowledge this is the first study to describe the induction of microglia proliferation by MCP-1.



We tested the effects of different concentrations of MCP-1 on nitrite production and no modification was observed for any concentration. A concentration of 50 ng/ml was the lowest one of those tested to induce the maximal degree of proliferation detected. Based on this we chose that concentration for further experiments. At similar concentrations we had previously observed MCP-1 to cause protective changes in neuronal cultures [29].

The morphology of the cells, together with the measurements of MIP-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and NOS2 expressions and synthesis indicates that MCP-1 under the conditions used does not induce pro-inflammatory changes in microglia.

Other authors have reported that MCP-1 induces production of IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$  in mice microglial cultures as well as death of neurons exposed to MCP-1-activated microglia [30]. However, we could not observe similar effects in our cultures. This may be due to inter-species differences or to some other unidentified factors we are not yet aware of. Further experimentation may help us to identify the source of this dissimilarity.

Also, certain *in vivo* studies have shown that MCP-1 activates spinal microglial cells [31] and that MCP-1 blockade may reduce microglial activation [32]. But due to the nature of the experimental models used in these studies, where microglia are not isolated, we cannot conclude that MCP-1 by itself causes activation of microglia. The use of cultures, despite all its disadvantages (i.e. isolation of cells from their natural environment) provides a better way to analyze the direct effect of any agent on a particular type of cell. This was precisely our goal: to study the direct effect of MCP-1 on microglia in the absence of other cells that might also affect microglial behaviour.

The situation could be explained in a simplistic way by considering that MCP-1 may attract microglia (and maybe induce their proliferation), but other factors could be responsible for their activation. Furthermore, the attraction of microglia could help healing injuries through transformation of these cells into other cell types [33].

It was of particular interest for us to find that LPS had an effect opposite to that of MCP-1, reducing the proliferation of microglia. Other groups have described no proliferative effect of LPS or a reduction of proliferation when combined with IFN $\gamma$  [34,35]. These changes have been classified by some authors as a resemblance of a chronic activation of microglia [36] which leads to the degeneration of these cells and a subsequent loss of the support they provide for neurons that will also eventually result in neuronal death.

This is in agreement with the reduction in expression of the trophic factors FGF and IGF that we could

detect as a result of LPS treatment of microglia. Microglia have previously been shown to be a source of FGF [37] and IGF [38]. FGF stimulates neurite outgrowth of different types of neurons and supports their survival [39,40] while IGF also is known to protect neurons and to promote proliferation of neuronal progenitors [41] as well as glial cells [42,43]. Interestingly, we detected an increase of IGF mRNA after treating microglia with MCP-1. IGF has also been proposed as a mediator of the protection MCP-1 provides for retinal ganglion cells in an experimental glaucoma model [44]. In this study [44], the authors showed that while elevated concentrations of MCP-1 can be neurotoxic, lower ones have the opposite effect. They also indicated how, in the absence of glial cells, neuroprotective actions of MCP-1 are not observed, suggesting that these cells may help MCP-1 to protect neurons. In accordance with this idea, the proliferation of microglia that we describe here would facilitate MCP-1's neuroprotective potential. This offers the possibility to explore this event *in vivo*, and to analyze if there are any differences between resident and bone marrow-derived microglia, since MCP-1 acts on both of these types of cells [45].

Altogether, we can hypothesise that MCP-1, like many other regulators of brain cell function, may exert a maintenance role in the CNS at constitutive concentrations; however, as a result of certain disturbances, its production can be altered leading to different changes, some of which could have deleterious consequences.

As mentioned above, our co-culture model allowed us to test the possible consequences of microglial exposure to MCP-1 on neurons. This study confirmed the information obtained from the cytokine measurements, suggesting that MCP-1 does not appear to cause microglial modifications that can damage neurons.

Our previous studies have demonstrated induction of MCP-1 in astrocytes by the neurotransmitter noradrenaline (NA) [29]. Our interest on NA is based on its anti-inflammatory effects, which have been confirmed by both *in vivo* [46,47] and *in vitro* [19,48] studies. These effects help protect neurons against different injuries, and reduction of NA levels in brain seems to facilitate the progression of certain neurodegenerative diseases such as Alzheimer's [49] and Parkinson's diseases [50]. Recently, a role for NA in the progression of multiple sclerosis has also been described [51].

After finding that NA causes a large production of MCP-1 in astrocytes, it seemed reasonable to consider MCP-1 as a mediator of some noradrenergic effects. In fact we could demonstrate that noradrenaline induction of MCP-1 in astrocytes can protect neurons against excitotoxic damage [29]. Other authors have also described MCP-1 as a neuroprotective agent against

excitotoxicity [11,13] or in neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease [12].

## Conclusions

In summary, the goal of this study was to analyze the possible involvement of MCP-1 in the neuronal damage observed in certain situations where an inflammatory response takes place, and particularly, if this is mediated by the activation of microglia. Our results indicate that direct incubation of MCP-1 with cultured microglia stimulates microglial proliferation but it does not appear to cause modifications that interfere with neuronal viability. According to this, inhibition of MCP-1 as a way to protect neurons in certain pathologies should be carefully considered. This chemokine may not be directly responsible for the neuronal damage characteristic of those situations, and control of its function may interfere with other pathways it regulates.

## Acknowledgements

This work was supported by the Spanish Ministry of Research & Science (SAF2010-21948) and Centro de Investigación en Red de Salud Mental (CIBERSAM). AEH is currently supported by a predoctoral fellowship from the Cátedra Externa del Dolor Fundación Grunenthal Universidad de Cádiz.

## Author details

<sup>1</sup>Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Av. Complutense s/n, 28040 Madrid, Spain. <sup>2</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM), and Instituto de Investigación Sanitaria Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain.

## Authors' contributions

AEH carried out the cell assays, RT-PCR, data acquisition and helped to draft the manuscript. BG and JCL contributed to analysis and interpretation of data, drafting the manuscript and revising it critically. JLMM performed cell cultures and treatments, conceived the study and participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 13 April 2011 Accepted: 5 July 2011 Published: 5 July 2011

## References

- Luster AD, Alon R, von Andrian UH: Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat Immunol* 2005, **6**:1182-1190.
- Rot A, von Andrian UH: Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokine grammar for immune cells. *Annu Rev Immunol* 2004, **22**:891-928.
- Gerard C, Rollins BJ: Chemokines and disease. *Nat Immunol* 2001, **2**:108-115.
- Amor S, Puentes F, Baker D, van d V: Inflammation in neurodegenerative diseases. *Immunology* 2010, **129**:154-169.
- Ransohoff RM, Perry VH: Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu Rev Immunol* 2009, **27**:119-145.
- Streit WJ, Xue QS: Life and death of microglia. *J Neuroimmune Pharmacol* 2009, **4**:371-379.
- Wake H, Moorhouse AJ, Jinno S, Kohsaka S, Nabekura J: Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *J Neurosci* 2009, **29**:3974-3980.
- Block ML, Hong JS: Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. *Prog Neurobiol* 2005, **76**:77-98.
- Ambrosini E, Aloisi F: Chemokines and glial cells: a complex network in the central nervous system. *Neurochem Res* 2004, **29**:1017-1038.
- Yadav A, Saini V, Arora S: MCP-1: chemoattractant with a role beyond immunity: a review. *Clin Chim Acta* 2010, **411**:1570-1579.
- Bruno V, Copani A, Besong G, Scoto G, Nicoletti F: Neuroprotective activity of chemokines against N-methyl-D-aspartate or beta-amyloid-induced toxicity in culture. *Eur J Pharmacol* 2000, **399**:117-121.
- El KJ, Toft M, Hickman SE, Means TK, Terada K, Geula C, et al: Ccr2 deficiency impairs microglial accumulation and accelerates progression of Alzheimer-like disease. *Nat Med* 2007, **13**:432-438.
- Eugenin EA, D'Aversa TG, Lopez L, Calderon TM, Berman JW: MCP-1 (CCL2) protects human neurons and astrocytes from NMDA or HIV-tat-induced apoptosis. *J Neurochem* 2003, **85**:1299-1311.
- Guyon A, Skrzydelski D, De G, Rovere C, Conductier G, Troceno JM, et al: Long term exposure to the chemokine CCL2 activates the nigrostriatal dopamine system: a novel mechanism for the control of dopamine release. *Neuroscience* 2009, **162**:1072-1080.
- Kalehua AN, Nagel JE, Whelchel LM, Gides JJ, Pyle RS, Smith RJ, et al: Monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage inflammatory protein-2 are involved in both excitotoxin-induced neurodegeneration and regeneration. *Exp Cell Res* 2004, **297**:197-211.
- Omata N, Yasutomi M, Yamada A, Iwasaki H, Mayumi M, Ohshima Y: Monocyte chemoattractant protein-1 selectively inhibits the acquisition of CD40 ligand-dependent IL-12-producing capacity of monocyte-derived dendritic cells and modulates Th1 immune response. *J Immunol* 2002, **169**:4861-4866.
- Melik-Parsadaniantz S, Rostene W: Chemokines and neuromodulation. *J Neuroimmunol* 2008, **198**:62-68.
- Vairano M, Dello RC, Pozzoli G, Battaglia A, Scambia G, Tringali G, et al: Erythropoietin exerts anti-apoptotic effects on rat microglial cells in vitro. *Eur J Neurosci* 2002, **16**:584-592.
- Madrigal JL, Feinstein DL, Dello RC: Norepinephrine protects cortical neurons against microglial-induced cell death. *J Neurosci Res* 2005, **81**:390-396.
- Kloss CU, Bohatschek M, Kreutzberg GW, Raivich G: Effect of lipopolysaccharide on the morphology and integrin immunoreactivity of ramified microglia in the mouse brain and in cell culture. *Exp Neurol* 2001, **168**:32-46.
- McQuibban GA, Gong JH, Wong JP, Wallace JL, Clark-Lewis I, Overall CM: Matrix metalloproteinase processing of monocyte chemoattractant proteins generates CC chemokine receptor antagonists with anti-inflammatory properties in vivo. *Blood* 2002, **100**:1160-1167.
- Yao Y, Tsirka SE: The C terminus of mouse monocyte chemoattractant protein 1 (MCP1) mediates MCP1 dimerization while blocking its chemotactic potency. *J Biol Chem* 2010, **285**:31509-31516.
- Belmadani A, Tran PB, Ren D, Miller RJ: Chemokines regulate the migration of neural progenitors to sites of neuroinflammation. *J Neurosci* 2006, **26**:3182-3191.
- Zhou Y, Tang H, Liu J, Xiong H: Chemokine CCL2 modulation of neuronal excitability and synaptic transmission in rat hippocampal slices. *J Neurochem* 2011, **116**:406-414.
- Yoshie O, Imai T, Nomiya H: Chemokines in immunity. *Adv Immunol* 2001, **78**:57-110.
- Thompson WL, Karpus WJ, Van Eldik LJ: MCP-1-deficient mice show reduced neuroinflammatory responses and increased peripheral inflammatory responses to peripheral endotoxin insult. *J Neuroinflammation* 2008, **5**:35.
- Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE: Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res* 2009, **29**:313-326.
- Rezaie P, Trillo-Pazos G, Everall IP, Male DK: Expression of beta-chemokines and chemokine receptors in human fetal astrocyte and microglial co-cultures: potential role of chemokines in the developing CNS. *Glia* 2002, **37**:64-75.
- Madrigal JL, Leza JC, Polak P, Kalinin S, Feinstein DL: Astrocyte-derived MCP-1 mediates neuroprotective effects of noradrenaline. *J Neurosci* 2009, **29**:263-267.

30. Yang G, Meng Y, Li W, Yong Y, Fan Z, Ding H, et al: **Neuronal MCP-1 Mediates Microglia Recruitment and Neurodegeneration Induced by the Mild Impairment of Oxidative Metabolism.** *Brain Pathol* 2010.
31. Thacker MA, Clark AK, Bishop T, Grist J, Yip PK, Moon LD, et al: **CCL2 is a key mediator of microglia activation in neuropathic pain states.** *Eur J Pain* 2009, **13**:263-272.
32. Muessel MJ, Klein RM, Wilson AM, Berman NE: **Ablation of the chemokine monocyte chemoattractant protein-1 delays retrograde neuronal degeneration, attenuates microglial activation, and alters expression of cell death molecules.** *Brain Res Mol Brain Res* 2002, **103**:12-27.
33. Yokoyama A, Yang L, Itoh S, Mori K, Tanaka J: **Microglia, a potential source of neurons, astrocytes, and oligodendrocytes.** *Glia* 2004, **45**:96-104.
34. Kauppinen TM, Swanson RA: **Poly(ADP-ribose) polymerase-1 promotes microglial activation, proliferation, and matrix metalloproteinase-9-mediated neuron death.** *J Immunol* 2005, **174**:2288-2296.
35. Mander P, Brown GC: **Activation of microglial NADPH oxidase is synergistic with glial iNOS expression in inducing neuronal death: a dual-key mechanism of inflammatory neurodegeneration.** *J Neuroinflammation* 2005, **2**:20.
36. Graeber MB, Streit WJ: **Microglia: biology and pathology.** *Acta Neuropathol* 2010, **119**:89-105.
37. Shimojo M, Nakajima K, Takei N, Hamanoue M, Kohsaka S: **Production of basic fibroblast growth factor in cultured rat brain microglia.** *Neurosci Lett* 1991, **123**:229-231.
38. Lalancette-Hebert M, Gowing G, Simard A, Weng YC, Kriz J: **Selective ablation of proliferating microglial cells exacerbates ischemic injury in the brain.** *J Neurosci* 2007, **27**:2596-2605.
39. Morrison RS, Sharma A, de VJ, Bradshaw RA: **Basic fibroblast growth factor supports the survival of cerebral cortical neurons in primary culture.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1986, **83**:7537-7541.
40. Walicke P, Cowan WM, Ueno N, Baird A, Guillemin R: **Fibroblast growth factor promotes survival of dissociated hippocampal neurons and enhances neurite extension.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1986, **83**:3012-3016.
41. Aberg ND, Brywe KG, Isgaard J: **Aspects of growth hormone and insulin-like growth factor-I related to neuroprotection, regeneration, and functional plasticity in the adult brain.** *ScientificWorldJournal* 2006, **6**:53-80.
42. O'Donnell SL, Frederick TJ, Krady JK, Vannucci SJ, Wood TL: **IGF-I and microglia/macrophage proliferation in the ischemic mouse brain.** *Glia* 2002, **39**:85-97.
43. Perez-Martin M, Cifuentes M, Grondona JM, Lopez-Avalos MD, Gomez-Pinedo U, Garcia-Verdugo JM, et al: **IGF-I stimulates neurogenesis in the hypothalamus of adult rats.** *Eur J Neurosci* 2010, **31**:1533-1548.
44. Chiu K, Yeung SC, So KF, Chang RC: **Modulation of morphological changes of microglia and neuroprotection by monocyte chemoattractant protein-1 in experimental glaucoma.** *Cell Mol Immunol* 2010, **7**:61-68.
45. Zhang J, Shi XQ, Echeverry S, Mogil JS, De KY, Rivest S: **Expression of CCR2 in both resident and bone marrow-derived microglia plays a critical role in neuropathic pain.** *J Neurosci* 2007, **27**:12396-12406.
46. Kalinin S, Gavriljuk V, Polak PE, Vasser R, Zhao J, Heneka MT, et al: **Noradrenaline deficiency in brain increases beta-amyloid plaque burden in an animal model of Alzheimer's disease.** *Neurobiol Aging* 2007, **28**:1206-1214.
47. Heneka MT, Ramanathan M, Jacobs AH, Dumitrescu-Ozimek L, Bilkei-Gorzo A, Debeir T, et al: **Locus ceruleus degeneration promotes Alzheimer pathogenesis in amyloid precursor protein 23 transgenic mice.** *J Neurosci* 2006, **26**:1343-1354.
48. Madrigal JL, Dello RC, Gavriljuk V, Feinstein DL: **Effects of noradrenaline on neuronal NOS2 expression and viability.** *Antioxid Redox Signal* 2006, **8**:885-892.
49. Bondareff W, Mountjoy CQ, Roth M: **Selective loss of neurones of origin of adrenergic projection to cerebral cortex (nucleus locus coeruleus) in senile dementia.** *Lancet* 1981, **1**:783-784.
50. Fornai F, di Poggio AB, Pellegrini A, Ruggieri S, Paparelli A: **Noradrenaline in Parkinson's disease: from disease progression to current therapeutics.** *Curr Med Chem* 2007, **14**:2330-2334.
51. Polak PE, Kalinin S, Feinstein DL: **Locus coeruleus damage and noradrenaline reductions in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis.** *Brain* 2011, **134**:665-677.

doi:10.1186/1742-2094-8-77

Cite this article as: Hinojosa et al.: CCL2/MCP-1 modulation of microglial activation and proliferation. *Journal of Neuroinflammation* 2011 **8**:77.

**Submit your next manuscript to BioMed Central  
and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
www.biomedcentral.com/submit



RESEARCH

Open Access

# Dual effects of noradrenaline on astroglial production of chemokines and pro-inflammatory mediators

Ara E Hinojosa<sup>1</sup>, Javier R Caso<sup>2</sup>, Borja García-Bueno<sup>1</sup>, Juan C Leza<sup>1</sup> and José LM Madrigal<sup>1\*</sup>

## Abstract

**Background:** Noradrenaline (NA) is known to limit neuroinflammation. However, the previously described induction by NA of a chemokine involved in the progression of immune/inflammatory processes, such as chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2)/monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), apparently contradicts NA anti-inflammatory actions. In the current study we analyzed NA regulation of astroglial chemokine (C-X3-C motif) ligand 1 (CX3CL1), also known as fractalkine, another chemokine to which both neuroprotective and neurodegenerative actions have been attributed. In addition, NA effects on other chemokines and pro-inflammatory mediators were also analyzed.

**Methods:** Primary astrocyte-enriched cultures were obtained from neonatal Wistar rats. These cells were incubated for different time durations with combinations of NA and lipopolysaccharide (LPS). The expression and synthesis of different proteins was measured by RT-PCR and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) or enzyme immunoassays. Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Newman-Keuls multiple comparison tests.

**Results:** The data presented here show that in control conditions, NA induces the production of CX3CL1 in rat cultured astrocytes, but in the presence of an inflammatory stimulus, such as LPS, NA has the opposite effect inhibiting CX3CL1 production. This inversion of NA effect was also observed for MCP-1. Based on the observation of this dual action, NA regulation of different chemokines and pro-inflammatory cytokines was also analyzed, observing that in most cases NA exerts an inhibitory effect in the presence of LPS. One characteristic exception was the induction of cyclooxygenase-2 (COX-2), where a summative effect was detected for both LPS and NA.

**Conclusion:** These data suggest that NA effects on astrocytes can adapt to the presence of an inflammatory agent reducing the production of certain cytokines, while in basal conditions NA may have the opposite effect and help to maintain moderate levels of these cytokines.

**Keywords:** Fractalkine, CX3CL1, MCP-1, CCL2, Astrocytes, Inflammation

## Background

Noradrenaline (NA) is recognized as a key modulator in the regulation of multiple central nervous system (CNS) activities, such as mood changes [1], memory formation [2], stress response [3] and cellular energy metabolism [4], among others. However, in relation to the study of mechanisms involved in the development of diseases with a neurological component, the main attribute of

NA is its ability to reduce the neuroinflammatory processes associated to them [5]. The degeneration of the main noradrenergic area in the brain, the locus coeruleus, seems to be one of the stages preceding the subsequent development of neuronal death observed in Alzheimer's disease [6]. In fact, diverse experimental settings indicate that NA interactions with different types of brain cells lead to the regulation of inflammatory pathways and mediators [5].

Based on this, a sound hypothesis proposes that the loss of NA constitutive levels can create a 'permissive' environment for the development of inflammation and subsequent neurodegeneration [7].

\* Correspondence: jlmadriral@med.ucm.es

<sup>1</sup>Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid (UCM), Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM), Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre (Imas12), Instituto de Investigación en Neuroquímica UCM, Avenida Complutense s/n, Madrid 28040, Spain

Full list of author information is available at the end of the article

Among other roles, astrocytes are in charge of the surveillance of the CNS status, providing alarm signals when threat is detected and helping to maintain CNS homeostasis [8]. Thus, we have focused our work on the analysis of NA interaction with astrocytes, to help elucidate the means through which NA protects neurons against different types of injuries.

We previously observed that NA, through the activation of  $\beta$ 2-adrenergic receptors and the elevation of cAMP, induces the production of the chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2)/monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) and protects neurons against excitotoxicity [9]. This fact, while contradictory with the well-known actions of CCL2 as a chemoattractant that facilitate the progression of the immune and inflammatory responses (which can have fatal consequences for nearby cells) [10], is in agreement with several studies which describe neuroprotective actions of CCL2 against multiple types of injuries [11]. This observation led us to the analysis of NA regulation of different chemokines on astrocytes.

As their name suggests, all chemokines can attract those cells expressing the specific receptors. This explains their involvement in very disparate processes where cell migration is present, such as cell adhesion/trafficking [12], angiogenesis [13] or progenitor cell migration [14]. In addition, as mentioned, chemokines by themselves may also cause some changes in cell functioning by direct interaction with such cells. In fact, new actions unrelated to the regulation of cell migration have been recently discovered for chemokines, highlighting the potential relevance of this family of proteins, particularly in the field of neuroinflammation [11].

One of the chemokines that has proven to play a significant role in the regulation of brain physiology is chemokine (C-X<sub>3</sub>-C motif) ligand 1 (CX3CL1), also known as fractalkine or neurotactin. CX3CL1 is expressed by neurons, astrocytes and microglia, and its specific receptor CX3CR1 is also expressed by all these cell types [15]. However, since the main production of CX3CL1 is observed in neurons and the receptor seems to be more abundant in glial cells, it has been proposed that CX3CL1 serves as an intermediary used by neurons to communicate with glial cells. While several studies have shown that CX3CL1 can modulate neuronal activity and survival, others indicate that the restraint of CX3CL1 activity can also prevent neuronal damage in certain pathologies [16-18]. This potential dual role of CX3CL1 has been proposed to be dependent on the different stages of certain neurodegenerative diseases where microglia activation may be beneficial (by their ability to remove apoptotic cells and toxic debris) or detrimental for neurons (by the elimination of healthy cells) [19].

The present study describes the induction of CX3CL1 expression and synthesis by NA in astrocytes. The

results obtained also indicate that in the presence of a pro-inflammatory stimulus, such as lipopolysaccharide (LPS) from gram-negative bacteria, which causes a large production of CX3CL1 by astrocytes, NA has the opposite effect inhibiting CX3CL1 production. This observation led us to analyze if this also applies to CCL2 and other related chemokines, as well as different pro-inflammatory mediators. The data show that while each one of the proteins evaluated has a different regulation by NA, in most cases where NA induced their expression in control conditions, the presence of LPS switched NA effect towards inhibition. This suggests that, in the brain, NA may be responsible for the maintenance of the constitutive levels of certain factors, while it can repress the overproduction in inflammatory situations.

## Methods

### Reagents

Fetal calf serum (<10 EU/ml) and Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) were obtained from Gibco Life Technologies (Carlsbad, CA, USA). LPS from *Escherichia coli* O111:B4 and NA for cell treatments, and glutamine, penicillin and streptomycin for cell cultures, were obtained from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). TRIzol, *Taq* polymerase and cDNA synthesis reagents were obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

### Astrocyte cultures

All experimental protocols adhered to the guidelines of the Animal Welfare Committee of the Universidad Complutense of Madrid, Spain, and according to European Union laws. Rat cortical astrocytes were obtained as previously described [20]. Briefly, 1-day-old Wistar rats (Harlan, Indianapolis, IN, USA) were used to prepare primary mixed glial cultures. Microglia were detached by gentle shaking after 11 to 13 days in culture. Astrocytes were prepared by mild trypsinization of the remaining cells, replated at  $6 \times 10^5$  cells/ml, and consisted of 95% astrocytes as determined by staining for glial fibrillary acidic protein (GFAP) and <5% microglial as determined by staining with the specific marker OX-42.

### mRNA analysis

Total cytoplasmic RNA was prepared from cells using TRIzol reagent and aliquots were converted to cDNA using random hexamer primers. Quantitative changes in mRNA levels were estimated by real-time PCR (qPCR) using the following cycling conditions: 35 cycles of denaturation at 95°C for 10 seconds, annealing at 58 to 61°C for 15 seconds, depending on the specific set of primers, and extension at 72°C for 20 seconds. Reactions were carried out in the presence of SYBR green (1:10,000 dilution of stock solution from Molecular Probes, Eugene, OR, USA) and in a 20  $\mu$ l reaction in Rotor-Gene (Corbett

**Table 1 Primers used for RT-PCR**

Gene name	Forward primer	Reverse primer
CX3CL1	5'-AATCCACAGTGACCTTGTCTCATCCA	5'-TGGACCCATTCTCCTTTGGGTCA
CCL2	5'-TGCTGTCTCAGCCAGATGCAGTTA	5'-TACAGCTTCTTTGGACACCTGCT
CCL6	5'-TGTTCCAGCAGGGCATCTTCTTCT	5'-GCCTCATTGCTGAGAGCCATT
CCL7	5'-GGACCAATTCATCCACTGTCTGCT	5'-TCTGATGGGCTTCAGCACAGACTT
CCL12	5'-TGAGTCTCCAGCTCTCATTCCAA	5'-TGAACACTGAATCTGGTCCAGCCA
CXCL16	5'-TGTCGCTGGAAGTTGCTACTGTGA	5'-TCTTGGACTGCAACTGGAACCTGA
IL-1 $\beta$	5'-ACCTGCTAGTGTGTGATGTTCCCA	5'-AGGTGGAGAGCTTTCAGCTCACAT
TNF $\alpha$	5'-CTGGCCAATGGCATGGATCTCAA	5'-AGCCTTGCCCTTGAAGAGAACCT
IFN $\gamma$	5'-AAAGACAACCAGGCCATCAGCAAC	5'-TCTGTGGGTTGTCACCTCGAACT
COX-2	5'-GCATTCTTTGCCAGCACTTCACT	5'-TTTAAGTCCAATCCATGGCCCACT
GAPDH	5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC	5'-GGCATGGACTGTGGTCTATGAG

*CCL12* chemokine (C-C motif) ligand 12, *CCL2* chemokine (C-C motif) ligand 2, *CCL6* chemokine (C-C motif) ligand 6, *CCL7* chemokine (C-C motif) ligand 7, *COX-2* cyclooxygenase-2, *CX3CL1* chemokine (C-X3-C motif) ligand 1, *CXCL16* chemokine (C-X-C motif) ligand 16, *GAPDH* glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, *IFN $\gamma$*  interferon gamma, *IL-1 $\beta$*  interleukin-1 beta, *TNF $\alpha$*  tumor necrosis factor alpha.

Research, Mortlake, Australia). Primers for the genes of interest were designed based on the rat sequences deposited in GenBank (Table 1). Relative mRNA concentrations were calculated from the take-off point of reactions using included software, and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) levels used to normalize data.

#### CCL2, CX3CL1, CCL6 and TNF $\alpha$ measurement

Protein levels in the incubation medium were detected using specific enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), carried out according to the manufacturer's instructions: R&D Systems Inc (Minneapolis, MN, USA) for CX3CL1; BD Biosciences (San Jose, CA, USA) for CCL2; CUSABIO (Wuhan, China) for chemokine (C-C motif) ligand 6 (CCL6); and RayBiotech (Atlanta, GA, USA) for tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ). Briefly, the medium was collected from the astrocyte cultures

and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until the day of the assay (avoiding repeated freeze-thaw cycles). A standard curve was generated using the standards provided in the kits. The assay detection limits were: 31.3 to 2,000 pg/ml for CCL2; 195 to 12,500 pg/ml for CX3CL1; 0.156 to 10 ng/ml for CCL6; and 25 to 20,000 pg/ml for TNF $\alpha$ .

#### PGE $_2$ measurement

Prostaglandin E $_2$  (PGE $_2$ ) levels in the incubation medium were measured using a specific enzyme immunoassay (EIA), carried out according to the manufacturer's instructions (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA). Briefly, the medium was collected from the astrocyte cultures and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until the day of the assay (avoiding repeated freeze-thaw cycles). A standard curve was generated using the rat PGE $_2$  standard provided in the kit. The assay detection limit was 15 pg/ml.

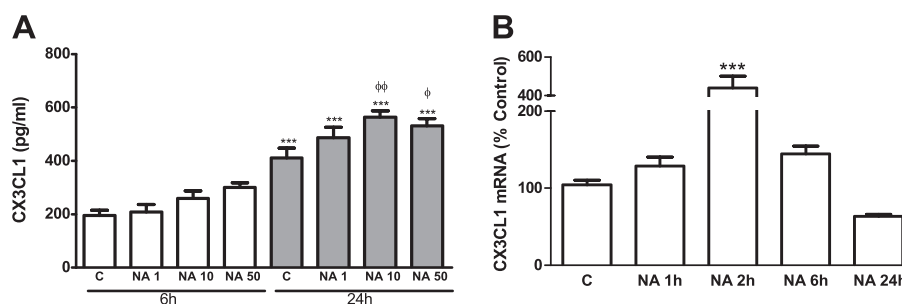
#### Data analysis

All experiments were undertaken at least in triplicate. Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Newman-Keuls multiple comparison tests. *P* values <0.05 were considered significant.

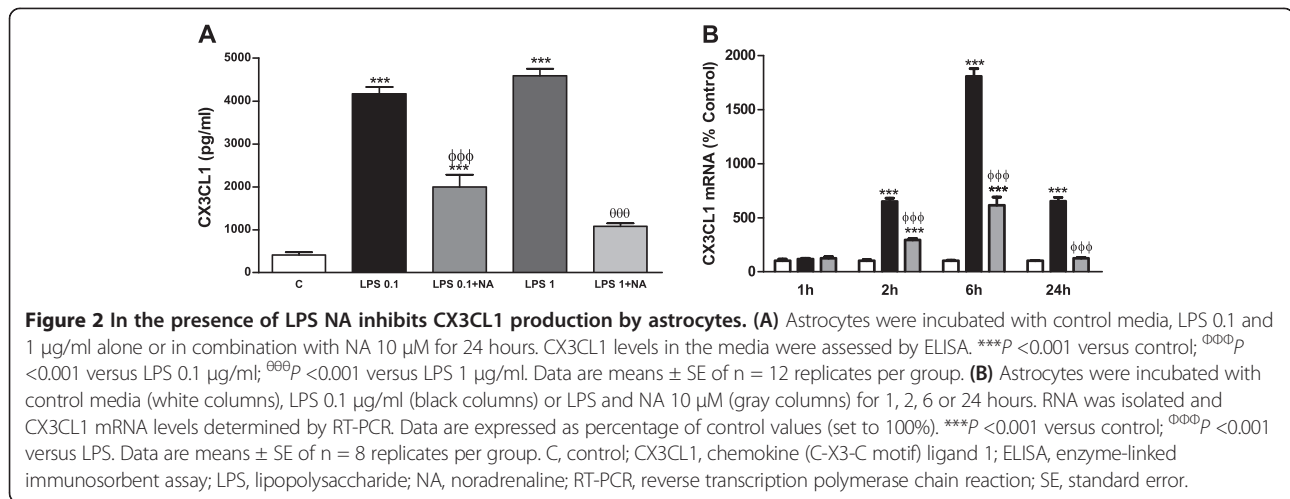
#### Results

##### NA induces CX3CL1 synthesis and release in astrocytes

An ELISA assay was used to evaluate the production of CX3CL1 and its release from cultured astrocytes. Different concentrations of NA (1 to 50  $\mu\text{M}$ ) were added to the culture medium and the cells were incubated for 6 or 24 hours. Six hours of treatment did not yield significant changes in the concentration of CX3CL1. However, when the incubation period was extended to 24 hours, NA treatment caused an increase with significant differences with respect to the 24-hour control group for concentrations above 10  $\mu\text{M}$ . The concentration of 50  $\mu\text{M}$  did not cause a production of CX3CL1 larger than that observed for 10



**Figure 1 NA induces CX3CL1 production by astrocytes. (A)** Astrocytes were incubated with control media or NA (1, 10 or 50  $\mu\text{M}$ ) for 6 or 24 hours. CX3CL1 levels in the media were assessed by ELISA. \*\*\**P* <0.001 versus 6-hour control;  $\phi$ *P* <0.05 versus 24-hour control. Data are means  $\pm$  SE of *n* = 12 replicates per group. **(B)** Astrocytes were incubated with control media or NA 10  $\mu\text{M}$  for 1, 2, 6 or 24 hours. RNA was isolated and CX3CL1 mRNA levels determined by RT-PCR. Data are expressed as percentage of control values (set to 100%). \*\*\**P* <0.001 versus control. Data are means  $\pm$  SE of *n* = 8 replicates per group. C, control; CX3CL1, chemokine (C-X3-C motif) ligand 1; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; NA, noradrenaline; RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction; SE, standard error.



$\mu\text{M}$ , suggesting that the amount measured represents NA maximal effect. Interestingly, the control values detected after 24 hours were higher than those detected after 6 hours (Figure 1A), confirming that CX3CL1 is constitutively released by astrocytes at considerable amounts.

Having found that 10  $\mu\text{M}$  is the lowest concentration of NA able to induce a significant induction of CX3CL1, we treated astrocytes for 1 to 24 hours with this amount of NA and used real-time RT-PCR (qRT-PCR) to assess mRNA levels of CX3CL1. This allowed us to observe an elevation that was maximal after 2 hours of incubation. Twenty-four hours after the onset of this treatment, the mRNA levels were lower than in the control group (Figure 1B).

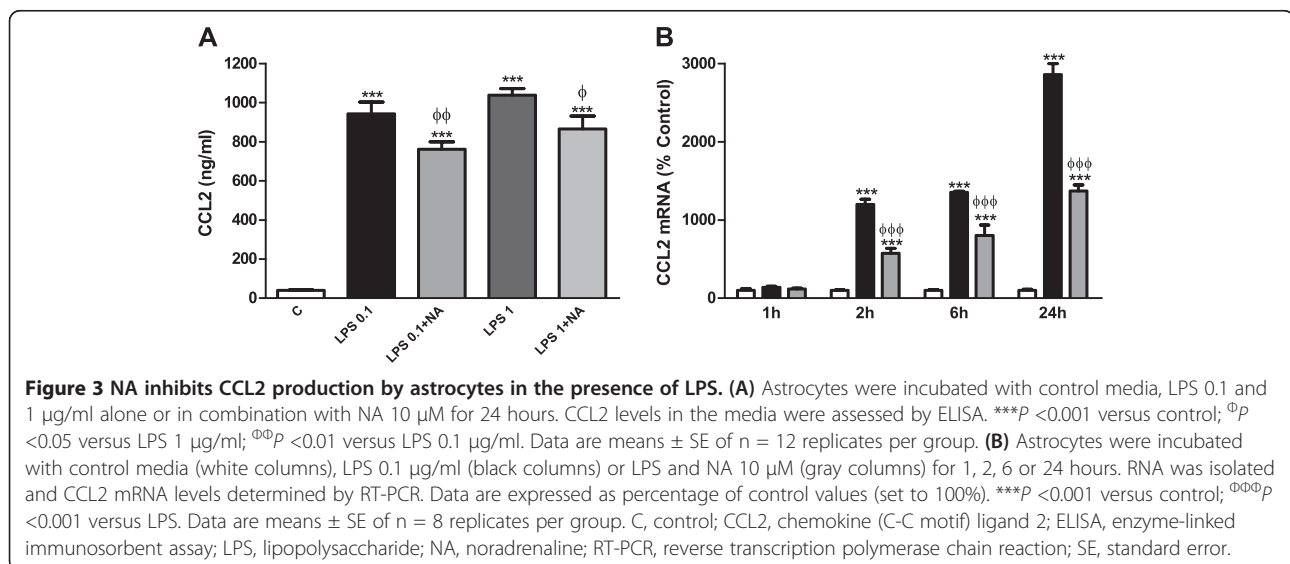
### NA inhibits CX3CL1 production in the presence of LPS in astrocytes

In order to evaluate the magnitude of NA effect, astrocytes were treated with an inflammatory stimulus known

to induce CX3CL1 expression in the brain, such as LPS [21]. The incubation with LPS 0.1  $\mu\text{g/ml}$  for 24 hours caused a greater than tenfold elevation of CX3CL1 levels in the culture media as assessed by ELISA (Figure 2A). This indicates that the elevation of CX3CL1 production caused by NA is only minor in relation to the full potential of these cells.

Having previously found the ability of NA to induce CX3CL1 by itself, we decided to analyze its possible interaction with LPS. We observed that it reduces the production of CX3CL1 caused by LPS (Figure 2A) even when a tenfold higher concentration of this endotoxin is used.

Parallel changes were found for CX3CL1 mRNA where LPS caused a large increase that was maximal after 6 hours of treatment and still remained elevated after 24 hours, and NA inhibited LPS effect on CX3CL1 mRNA reducing it to control levels after 24 hours of co-incubation (Figure 2B).



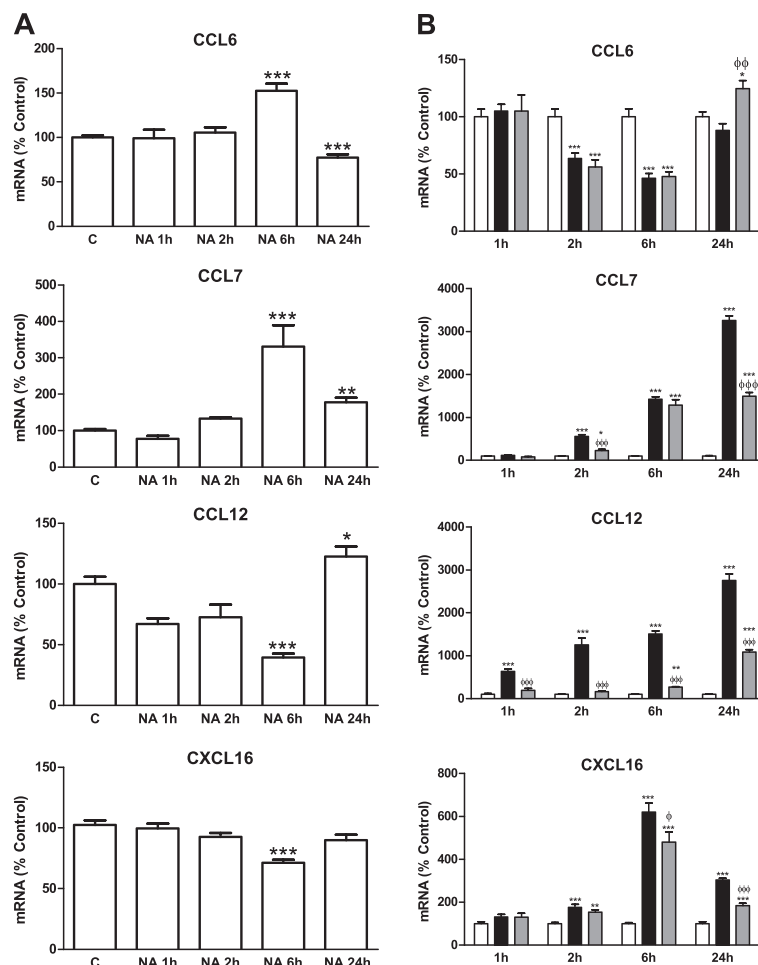
### NA inhibits CCL2 production in the presence of LPS in astrocytes

Since NA presented this double effect for CX3CL1 expression, we tested if it would also have a similar effect for CCL2, another chemokine we previously found that can be induced by NA in astrocytes [9]. ELISA and qRT-PCR studies allowed us to detect a similar pattern of regulation, where LPS caused a large induction of CCL2 that was in part prevented by the co-treatment with NA (Figure 3).

### Alterations in NA regulation of different chemokines

While each chemokine has particular features that differentiate it from the rest, they all have other features in common, and the dual regulation by NA could be one of

the characteristics that apply to all of them. Due to the large number of chemokines known to date, a preliminary approach was made by analyzing mRNA regulation in three chemokines with effects similar to those of CCL2 and that share the C-C chemokine receptor type 2 (CCR2) with CCL2, such as CCL6/C10, chemokine (C-C motif) ligand 7 (CCL7)/monocyte chemoattractant protein-3 (MCP-3) and chemokine (C-C motif) ligand 12 (CCL12)/monocyte chemoattractant protein-5 (MCP-5) [22]. Chemokine (C-X-C motif) ligand 16 (CXCL16)/small inducible cytokine subfamily B member 16 (SCYB16) was also studied because it has also been characterized as a neuroprotective agent that modulates astroglial production of CCL2 [23].



**Figure 4 NA effects on different chemokines. (A)** Astrocytes were incubated with control media or NA 10  $\mu$ M for 1, 2, 6 or 24 hours. RNA was isolated and mRNA levels of CCL6, CCL7, CCL12 and CXCL16 were determined by RT-PCR. Data are expressed as percentage of control values (set to 100%). \* $P$  < 0.05 versus control; \*\* $P$  < 0.01 versus control; \*\*\* $P$  < 0.001 versus control. Data are means  $\pm$  SE of  $n$  = 8 replicates per group. **(B)** Astrocytes were incubated with control media (white columns), LPS 0.1  $\mu$ g/ml (black columns) or LPS and NA 10  $\mu$ M (gray columns) for 1, 2, 6 or 24 hours. RNA was isolated and mRNA levels of CCL6, CCL7, CCL12 and CXCL16 were determined by RT-PCR. Data are expressed as percentage of control values (set to 100%). \* $P$  < 0.05 versus control; \*\* $P$  < 0.01 versus control; \*\*\* $P$  < 0.001 versus control;  $\phi$  $P$  < 0.05 versus LPS;  $\phi\phi$  $P$  < 0.01 versus LPS;  $\phi\phi\phi$  $P$  < 0.001 versus LPS. Data are means  $\pm$  SE of  $n$  = 8 replicates per group. C, control; CCL6, chemokine (C-C motif) ligand 6; CCL7, chemokine (C-C motif) ligand 7; CCL12, chemokine (C-C motif) ligand 12; CXCL16, chemokine (C-X-C motif) ligand 16; LPS, lipopolysaccharide; NA, noradrenaline; RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction; SE, standard error.

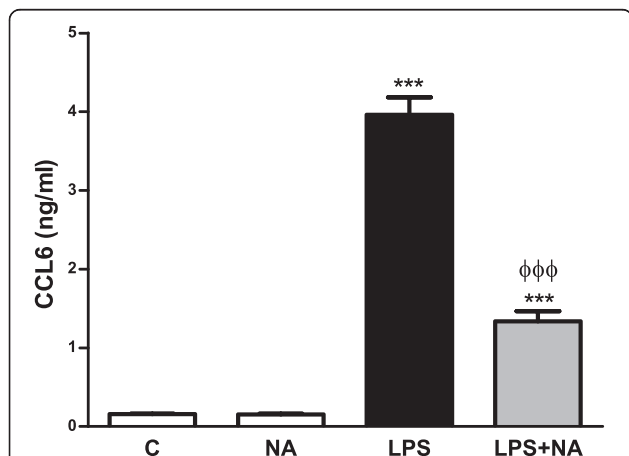
RT-PCR measurements showed that while 6 hours of incubation with NA elevated CCL6 and CCL7 mRNA concentrations, the opposite effect happened for the other two chemokines analyzed (Figure 4A).

LPS caused an induction of CCL7 larger than the one caused by NA. It also induced CCL12 and CXCL16. For these three chemokines, NA showed an inhibitory effect in the presence of LPS similar to the one observed for CCL2 and CX3CL1 (Figure 4B).

In order to further analyze our results, ELISA studies were performed for these four chemokines; however, detectable amounts were only found for CCL6. LPS treatment caused an increase in the accumulation of CCL6 that was prevented by NA, while no modifications were caused by NA alone (Figure 5).

#### Dual effect of NA on pro-inflammatory mediators

According to our hypothesis, NA may participate in regulating the levels of certain mediators used by brain cells to communicate, maintaining constitutive production in basal conditions. However, when an exaggerated production of some of these mediators is induced as a result of an injury, NA effect is reversed helping to maintain homeostasis. Based on this, we analyzed NA effect on the expression of some well-known pro-inflammatory mediators, namely, inflammatory cytokines. Due to the large number of existing pro-inflammatory cytokines, a selection was made as in the case of the chemokines. Interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ) and TNF $\alpha$  were selected, since these cytokines are known to be produced by astrocytes, and have toxic and trophic actions on neurons [24-26]. As



**Figure 5 In the presence of LPS NA inhibits CCL6 production by astrocytes.** Astrocytes were incubated with control media, NA 10  $\mu$ M or LPS 0.1  $\mu$ g/ml alone or in combination with NA 10  $\mu$ M for 24 hours. CCL6 levels in the media were assessed by ELISA. \*\*\* $p$  < 0.001 versus control;  $\phi\phi\phi p$  < 0.001 versus LPS. Data are means  $\pm$  SE of  $n = 12$  replicates per group. C, control; CCL6, chemokine (C-C motif) ligand 6; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; LPS, lipopolysaccharide; NA, noradrenaline; SE, standard error.

shown in Figure 6, IL-1 $\beta$  mRNA levels were elevated as a result of the incubation of astrocytes with NA, reaching their maximal after 2 hours and decreasing afterwards to control levels. On the other hand, TNF $\alpha$  expression was reduced by NA. However, in the presence of LPS, NA effect was inhibitory for both cytokines (Figure 6B). This effect was also observed when measuring the concentration of TNF $\alpha$  released to the culture medium (Figure 6C).

Together with chemokines and cytokines, certain enzymes are key regulators of the inflammatory response. Nitric oxide synthase 2, inducible (NOS2) is known to be inhibited by NA, contributing to the anti-inflammatory and neuroprotective actions of NA [20,27]. Another enzyme which catalyzes the production of multiple products, many of which have inflammatory potential, is cyclooxygenase-2 (COX-2). As shown in Figure 7, NA treatment elevated COX-2 mRNA and in the presence of LPS its effect was amplified (Figure 7B).

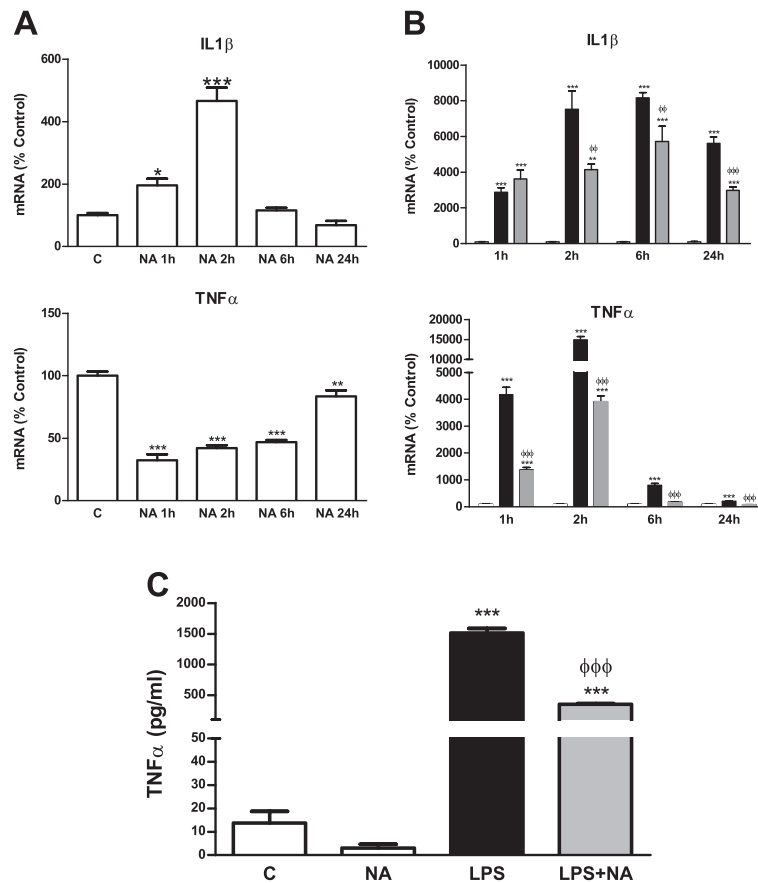
The pattern found for COX-2 production is different from those found for all the other proteins analyzed. This may be related to the differences in regulatory mechanisms. Based on the data, we decided to examine the effects of LPS and NA on COX-2 pathways further, particularly PGE<sub>2</sub>. To this end, PGE<sub>2</sub> concentration in the culture media was measured by EIA and allowed us to observe modifications similar to those found for COX-2 (Figure 7C).

#### Discussion

The present study demonstrates the induction of CX3CL1 by NA in astrocytes. Given the neuroprotective actions described for CX3CL1 [28], its regulation by NA could help to explain the mechanisms through which NA protects neurons against different stimuli [29-31]. However, besides its anti-inflammatory and neuroprotective roles, CX3CL1, in its membrane anchored and soluble forms, also functions as a chemoattractant able to activate inflammatory cells [32]. In fact, an exaggerated response of CX3CL1 to certain injuries can lead to irreversible neuronal damage [16-18].

Like CX3CL1, CCL2 is another chemokine known to have certain protective actions in the CNS [33-37], but is also able to potentiate the inflammatory response and cause cell damage [38-40]. Similarly to CX3CL1, we had previously described CCL2 induction by NA in astrocyte cultures [9], as well as in mouse brain cortex astrocytes [41] and its complex regulation by different adrenergic receptors [42]. Both cytokines are expressed by cultured astrocytes and seem to be independently regulated by certain stimuli [43].

However, despite these dual effects of CCL2 and CX3CL1, NA is known to reduce brain inflammation [5,44] and prevent the progression of pathologies with a neuroinflammatory component [45-48]. This led us to hypothesize that in basal conditions, NA may help to



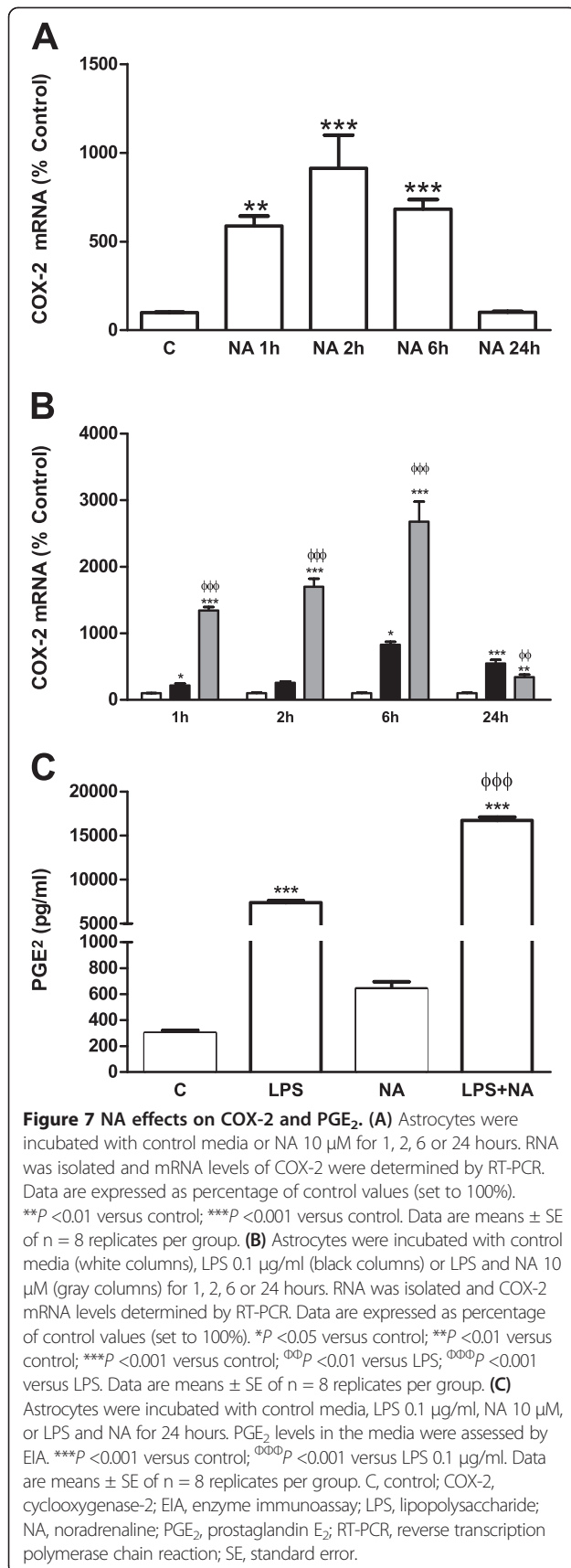
**Figure 6 NA effects on different cytokines.** (A) Astrocytes were incubated with control media or NA 10  $\mu$ M for 1, 2, 6 or 24 hours. RNA was isolated and mRNA levels of IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  and IFN $\gamma$  were determined by RT-PCR. Data are expressed as percentage of control values (set to 100%). \* $P$  < 0.05 versus control; \*\* $P$  < 0.01 versus control; \*\*\* $P$  < 0.001 versus control. Data are means  $\pm$  SE of  $n$  = 8 replicates per group. (B) Astrocytes were incubated with control media (white columns), LPS 0.1  $\mu$ g/ml (black columns) or LPS and NA 10  $\mu$ M (gray columns) for 1, 2, 6 or 24 hours. RNA was isolated and mRNA levels of IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  and IFN $\gamma$  were determined by RT-PCR. Data are expressed as percentage of control values (set to 100%). \*\* $P$  < 0.01 versus control; \*\*\* $P$  < 0.001 versus control;  $\Phi$  $\Phi$  $\Phi$  $P$  < 0.01 versus LPS;  $\Phi$  $\Phi$  $\Phi$  $P$  < 0.001 versus LPS. Data are means  $\pm$  SE of  $n$  = 8 replicates per group. (C) Astrocytes were incubated with control media, NA 10  $\mu$ M, LPS 0.1  $\mu$ g/ml alone or in combination with NA 10  $\mu$ M for 24 hours. TNF $\alpha$  levels in the media were assessed by ELISA. \*\*\* $P$  < 0.001 versus control,  $\Phi$  $\Phi$  $\Phi$  $P$  < 0.001 versus LPS. Data are means  $\pm$  SE of  $n$  = 12 replicates per group. C, control; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; IFN $\gamma$ , interferon gamma; IL-1 $\beta$ , interleukin-1 beta; LPS, lipopolysaccharide; NA, noradrenaline; RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction; SE, standard error; TNF $\alpha$ , tumor necrosis factor alpha.

maintain CNS levels of different cytokines and chemokines necessary for homeostasis, but under inflammatory conditions, NA prevents an exaggerated production of some of these mediators with neurotoxic potential. In agreement with this, the maximal concentration of CX3CL1 production reached after NA treatment was considerably lower than that observed when LPS was used instead.

Based on our data, the reduction of brain NA levels observed in certain neurodegenerative pathologies, such as Alzheimer's [6] and Parkinson's [49] diseases, could be the reason for the parallel loss of the constitutive production of these chemokines. In fact, there is a decreased production of CX3CL1 in the cortex and hippocampus of transgenic amyloid precursor protein

(APP) mice together with an elevated accumulation of amyloid beta (A $\beta$ ) [50]. This could be in agreement with those studies where the reduction of NA production either by depletion of locus coeruleus neurons [51] or by genetic alterations [52] aggravated the neurological damage in models of Alzheimer's disease.

While NA effects on chemokines production seem to be mediated through its interaction with adrenergic receptors [9,42], the presence of major histocompatibility complex class II molecules or cluster of differentiation 14 (CD14) proteins detected on the surface of stimulated astrocytes [53,54], suggests that the promoter requirements and pathways leading to the production of the different chemokines and cytokines analyzed may be different for both types of stimuli.



The PCR analysis of CCL7, CCL12 and CXCL16 reveals an inhibitory effect of NA in the presence of LPS for all of them, independently of NA effect in the absence of other stimulus. A similar pattern is observed for CCL6 concentration in the culture medium, while its mRNA levels are reduced by LPS. This indicates that in this case some post-transcriptional alterations are involved, resulting in a regulation similar to that observed for the other cytokines and chemokines analyzed.

Our results suggest that in the presence of an inflammatory stimulus, such as LPS, the actions of NA with respect to the expression of certain cytokines seem to be oriented towards the reversion of LPS alterations, independently of the changes NA may produce in the absence of other stimuli. This possibility constitutes an interesting new research subject, since the modification of NA actions on astrocytes are probably due to transformations caused by the activation of these cells as a response to an injury or any threat to homeostasis [55].

The induction by LPS of IL-1β and TNFα is a well-known response of astrocytes [56,57], and the inhibition caused by NA is in agreement with its neuroprotective effects due to the pro-inflammatory nature of these cytokines [58,59]. On the other hand, it was more surprising to detect the induction of IL-1β by NA. Nevertheless, this could be in agreement with the above mentioned hypothesis, since this cytokine has been described to help protect neurons against certain types of injuries [24,26].

NA effects on COX-2 production have been previously analyzed in microglia by Schlachetzki *et al.* [60]. They also observed an induction by NA that was potentiated by LPS. Similarly to what we found for astrocytes, their work also describes the release of PGE<sub>2</sub> by microglia in response to LPS or NA and the boosting of this effect by the combination of both treatments. Considering the involvement of PGE<sub>2</sub> in the development of neuroinflammation [61], this effect of NA seems contradictory with its neuroprotective actions. However, PGE<sub>2</sub> is another mediator for whom neuroprotective actions have also been discovered [62-65]. While this could help to explain our results, the additive actions of LPS and NA on COX-2 and PGE<sub>2</sub> expression, eliminate the possibility of a simplistic explanation according to which NA reverses the changes caused by an inflammatory stimulus on astrocytes. This confirms the complex nature of NA mechanisms of action and, in particular, reveals the need to study PGE<sub>2</sub> interactions with neurons and if the presence of NA also modulates the response to PGE<sub>2</sub>.

## Conclusions

While NA neuroprotective actions are largely confirmed by different studies, its mechanisms of action are not well-known. MCP-1 and CX3CL1 induction could help to explain some of NA effects due to their ability to

prevent neuronal damage under diverse conditions. However, such effect could be reversed when these and other mediators are produced in an exaggerated/uncontrolled manner. The data presented here indicate that NA may help to maintain the production of certain chemokines, while preventing their overproduction and subsequent toxicity. Further investigations of *in vivo* models may help confirm this hypothesis, extend the understanding of NA neuroprotective role and hopefully facilitate the development of NA-based therapies for neurodegenerative diseases.

#### Abbreviations

ANOVA: Analysis of variance; APP: Amyloid precursor protein; A $\beta$ : Amyloid beta; CCL12: Chemokine (C-C motif) ligand 12; CCL2: Chemokine (C-C motif) ligand 2; CCL6: Chemokine (C-C motif) ligand 6; CCL7: Chemokine (C-C motif) ligand 7; CCR2: C-C chemokine receptor type 2; CD14: Cluster of differentiation 14; CNS: Central nervous system; COX-2: Cyclooxygenase-2; CX3CL1: Chemokine (C-X3-C motif) ligand 1; CXCL16: Chemokine (C-X-C motif) ligand 16; DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium; EIA: Enzyme immunoassay; ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay; EU: Endotoxin units; GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; GFAP: Glial fibrillary acidic protein; IFN $\gamma$ : Interferon gamma; IL-1 $\beta$ : Interleukin-1 beta; LPS: Lipopolysaccharide; MCP-1: Monocyte chemoattractant protein-1; MCP-3: Monocyte chemoattractant protein-3; MCP-5: Monocyte chemoattractant protein-5; NA: Noradrenaline; NOS2: Nitric oxide synthase 2 inducible; PCR: Polymerase chain reaction; PGE $_2$ : Prostaglandin E $_2$ ; qPCR: Real-time polymerase chain reaction; qRT-PCR: Real-time reverse transcription polymerase chain reaction; RT-PCR: Reverse transcription polymerase chain reaction; SCYB16: Small inducible cytokine subfamily B member 16; SE: Standard error; TNF $\alpha$ : Tumor necrosis factor alpha.

#### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

#### Authors' contributions

AH carried out the cell assays, RT-PCR, data acquisition and helped to draft the manuscript. JC, BG and JL contributed to analysis and interpretation of data, and drafted and critically revised the manuscript. JM performed cell cultures and treatments, conceived the study, participated in its design and coordination, and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

#### Acknowledgements

This work was supported by a grant from the Spanish Ministry of Science and Innovation (SAF2010-21948) to JM. AH is a fellow of Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM), Madrid, Spain. JC and BB are (Juan de la Cierva) and (Ramón y Cajal) fellows (Ministerio de Economía y Competitividad), respectively.

#### Author details

<sup>1</sup>Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid (UCM), Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM), Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre (Imas12), Instituto de Investigación en Neuroquímica UCM, Avenida Complutense s/n, Madrid 28040, Spain. <sup>2</sup>Departamento de Psiquiatría, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid (UCM), Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM), Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre (Imas12), Instituto de Investigación en Neuroquímica UCM, Avenida Complutense s/n, Madrid 28040, Spain.

Received: 7 May 2013 Accepted: 29 June 2013

Published: 9 July 2013

#### References

1. Brunello N, Blier P, Judd LL, Mendlewicz J, Nelson CJ, Souery D, Zohar J, Racagni G: **Noradrenaline in mood and anxiety disorders: basic and clinical studies.** *Int Clin Psychopharmacol* 2003, **18**:191–202.

2. McIntyre CK, McLaughlin JL, Williams CL: **Interacting brain systems modulate memory consolidation.** *Neurosci Biobehav Rev* 2012, **36**:1750–1762.
3. Morilak DA, Barrera G, Echevarria DJ, Garcia AS, Hernandez A, Ma S, Petre CO: **Role of brain norepinephrine in the behavioral response to stress.** *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2005, **29**:1214–1224.
4. O'Donnell J, Zeppenfeld D, McConnell E, Pena S, Nedergaard M: **Norepinephrine: a neuromodulator that boosts the function of multiple cell types to optimize CNS performance.** *Neurochem Res* 2012, **37**:2496–2512.
5. Feinstein DL, Heneka MT, Gavriluk V, Dello RC, Weinberg G, Galea E: **Noradrenergic regulation of inflammatory gene expression in brain.** *Neurochem Int* 2002, **41**:357–365.
6. Weinschenker D: **Functional consequences of locus coeruleus degeneration in Alzheimer's disease.** *Curr Alzheimer Res* 2008, **5**:342–345.
7. Marien MR, Colpaert FC, Rosenquist AC: **Noradrenergic mechanisms in neurodegenerative diseases: a theory.** *Brain Res Brain Res Rev* 2004, **45**:38–78.
8. Gee JR, Keller JN: **Astrocytes: regulation of brain homeostasis via apolipoprotein E.** *Int J Biochem Cell Biol* 2005, **37**:1145–1150.
9. Madrigal JL, Leza JC, Polak P, Kalinin S, Feinstein DL: **Astrocyte-derived MCP-1 mediates neuroprotective effects of noradrenaline.** *J Neurosci* 2009, **29**:263–267.
10. Conductier G, Blondeau N, Guyon A, Nahon JL, Rovere C: **The role of monocyte chemoattractant protein MCP1/CCL2 in neuroinflammatory diseases.** *J Neuroimmunol* 2010, **224**:93–100.
11. Semple BD, Kossmann T, Morganti-Kossmann MC: **Role of chemokines in CNS health and pathology: a focus on the CCL2/CCR2 and CXCL8/CXCR2 networks.** *J Cereb Blood Flow Metab* 2010, **30**:459–473.
12. Ono SJ, Nakamura T, Miyazaki D, Ohbayashi M, Dawson M, Toda M: **Chemokines: roles in leukocyte development, trafficking, and effector function.** *J Allergy Clin Immunol* 2003, **111**:1185–1199.
13. Mehrad B, Keane MP, Strieter RM: **Chemokines as mediators of angiogenesis.** *Thromb Haemost* 2007, **97**:755–762.
14. Belmadani A, Tran PB, Ren D, Miller RJ: **Chemokines regulate the migration of neural progenitors to sites of neuroinflammation.** *J Neurosci* 2006, **26**:3182–3191.
15. Meucci O, Fatatis A, Simen AA, Miller RJ: **Expression of CX3CR1 chemokine receptors on neurons and their role in neuronal survival.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**:8075–8080.
16. Denes A, Ferenczi S, Halasz J, Kornyei Z, Kovacs KJ: **Role of CX3CR1 (fractalkine receptor) in brain damage and inflammation induced by focal cerebral ischemia in mouse.** *J Cereb Blood Flow Metab* 2008, **28**:1707–1721.
17. Fuhrmann M, Bittner T, Jung CK, Burgold S, Page RM, Mitteregger G, Haass C, LaFerla FM, Kretschmar H, Herms J: **Microglial Cx3cr1 knockout prevents neuron loss in a mouse model of Alzheimer's disease.** *Nat Neurosci* 2010, **13**:411–413.
18. Lee S, Varvel NH, Konecny ME, Xu G, Cardona AE, Ransohoff RM, Lamb BT: **CX3CR1 deficiency alters microglial activation and reduces beta-amyloid deposition in two Alzheimer's disease mouse models.** *Am J Pathol* 2010, **177**:2549–2562.
19. Desfordes NM, Hebrion ML, Algarzae NK, Lonskaya I, Moussa CE: **Fractalkine mediates communication between pathogenic proteins and microglia: implications of anti-inflammatory treatments in different stages of neurodegenerative diseases.** *Int J Alzheimers Dis* 2012, **20**(2):345472.
20. Madrigal JL, Dello RC, Gavriluk V, Feinstein DL: **Effects of noradrenaline on neuronal NOS2 expression and viability.** *Antioxid Redox Signal* 2006, **8**:885–892.
21. Cerbai F, Lana D, Nosi D, Petkova-Kirova P, Zecchi S, Brothers HM, Wenk GL, Giovannini MG: **The neuron-astrocyte-microglia triad in normal brain ageing and in a model of neuroinflammation in the rat hippocampus.** *PLoS One* 2012, **7**:e45250.
22. Zlotnik A, Yoshie O: **Chemokines: a new classification system and their role in immunity.** *Immunity* 2000, **12**:121–127.
23. Rosito M, DeFlorio C, Limatola C, Trettel F: **CXCL16 orchestrates adenosine A3 receptor and MCP-1/CCL2 activity to protect neurons from excitotoxic cell death in the CNS.** *J Neurosci* 2012, **32**:3154–3163.
24. Carlson NG, Wiegand WA, Chen J, Bacchi A, Rogers SW, Gahring LC: **Inflammatory cytokines IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-6, and TNF-alpha impart neuroprotection to an excitotoxin through distinct pathways.** *J Immunol* 1999, **163**:3963–3968.
25. Figiel I: **Pro-inflammatory cytokine TNF-alpha as a neuroprotective agent in the brain.** *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 2008, **68**:526–534.

26. Shafiq SS, Griffin WS, O'Banion MK: **The role of interleukin-1 in neuroinflammation and Alzheimer disease: an evolving perspective.** *J Neuroinflammation* 2008, **5**:7.
27. Dello RC, Boullenger AI, Gavriluk V, Feinstein DL: **Inhibition of microglial inflammatory responses by norepinephrine: effects on nitric oxide and interleukin-1beta production.** *J Neuroinflammation* 2004, **1**:9.
28. Re DB, Przedborski S: **Fractalkine: moving from chemotaxis to neuroprotection.** *Nat Neurosci* 2006, **9**:859–861.
29. Kalinin S, Polak PE, Lin SX, Sakharkar AJ, Pandey SC, Feinstein DL: **The noradrenaline precursor L-DOPS reduces pathology in a mouse model of Alzheimer's disease.** *Neurobiol Aging* 2012, **33**:1651–1663.
30. Traver S, Salthun-Lassalle B, Marien M, Hirsch EC, Colpaert F, Michel PP: **The neurotransmitter noradrenaline rescues septal cholinergic neurons in culture from degeneration caused by low-level oxidative stress.** *Mol Pharmacol* 2005, **67**:1882–1891.
31. Madrigal JL, Feinstein DL, Dello RC: **Norepinephrine protects cortical neurons against microglial-induced cell death.** *J Neurosci Res* 2005, **81**:390–396.
32. Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Rossi D, Greaves DR, Zlotnik A, Schall TJ: **A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif.** *Nature* 1997, **385**:640–644.
33. Bruno V, Copani A, Besong G, Scoto G, Nicoletti F: **Neuroprotective activity of chemokines against N-methyl-D-aspartate or beta-amyloid-induced toxicity in culture.** *Eur J Pharmacol* 2000, **399**:117–121.
34. Elhofy A, Wang J, Tani M, Fife BT, Kennedy KJ, Bennett J, Huang D, Ransohoff RM, Karpus WJ: **Transgenic expression of CCL2 in the central nervous system prevents experimental autoimmune encephalomyelitis.** *J Leukoc Biol* 2005, **77**:229–237.
35. Eugenin EA, D'Aversa TG, Lopez L, Calderon TM, Berman JW: **MCP-1 (CCL2) protects human neurons and astrocytes from NMDA or HIV-tat-induced apoptosis.** *J Neurochem* 2003, **85**:1299–1311.
36. Godefroy D, Gosselin RD, Yasutake A, Fujimura M, Combadiere C, Maury-Brachet R, Laclau M, Rakwal R, Melik-Parsadaniantz S, Bourdinaud JP, Rostène W: **The chemokine CCL2 protects against methylmercury neurotoxicity.** *Toxicol Sci* 2012, **125**:209–218.
37. Zisman DA, Kunkel SL, Strieter RM, Tsai WC, Bucknell K, Wilkowsky J, Standiford TJ: **MCP-1 protects mice in lethal endotoxemia.** *J Clin Invest* 1997, **99**:2832–2836.
38. Kiyota T, Gendelman HE, Weir RA, Higgins EE, Zhang G, Jain M: **CCL2 affects beta-amyloidosis and progressive neurocognitive dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease.** *Neurobiol Aging* 2013, **34**:1060–1068.
39. Ge S, Shrestha B, Paul D, Keating C, Cone R, Guglielmotti A, Pachter JS: **The CCL2 synthesis inhibitor bindarit targets cells of the neurovascular unit, and suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis.** *J Neuroinflammation* 2012, **9**:171.
40. Yang G, Meng Y, Li W, Yong Y, Fan Z, Ding H, Wei Y, Luo J, Ke ZJ: **Neuronal MCP-1 mediates microglia recruitment and neurodegeneration induced by the mild impairment of oxidative metabolism.** *Brain Pathol* 2011, **21**:279–297.
41. Madrigal JL, Garcia-Bueno B, Hinojosa AE, Polak P, Feinstein DL, Leza JC: **Regulation of MCP-1 production in brain by stress and noradrenaline-modulating drugs.** *J Neurochem* 2010, **113**:543–551.
42. Hinojosa AE, Garcia-Bueno B, Leza JC, Madrigal JL: **Regulation of CCL2/MCP-1 production in astrocytes by desipramine and atomoxetine: involvement of alpha2 adrenergic receptors.** *Brain Res Bull* 2011, **86**:326–333.
43. Koyama Y, Kotani M, Sawamura T, Kuribayashi M, Konishi R, Michinaga S: **Different actions of endothelin-1 on chemokine production in rat cultured astrocytes: reduction of CX3CL1/fractalkine and an increase in CCL2/MCP-1 and CXCL1/CINC-1.** *J Neuroinflammation* 2013, **10**:51.
44. O'Sullivan JB, Ryan KM, Curtin NM, Harkin A, Connor TJ: **Noradrenaline reuptake inhibitors limit neuroinflammation in rat cortex following a systemic inflammatory challenge: implications for depression and neurodegeneration.** *Int J Neuropsychopharmacol* 2009, **12**:687–699.
45. Delaville C, Deunwaerdere PD, Benazzouz A: **Noradrenaline and Parkinson's disease.** *Front Syst Neurosci* 2011, **5**:31.
46. Gustafson I, Westerberg E, Wieloch T: **Protection against ischemia-induced neuronal damage by the alpha 2-adrenoceptor antagonist idazoxan: influence of time of administration and possible mechanisms of action.** *J Cereb Blood Flow Metab* 1990, **10**:885–894.
47. Polak PE, Kalinin S, Feinstein DL: **Locus coeruleus damage and noradrenaline reductions in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis.** *Brain* 2011, **134**:665–677.
48. Heneka MT, Ramanathan M, Jacobs AH, Dumitrescu-Ozimek L, Bilkei-Gorzo A, Debeir T, Sastre M, Galldiks N, Zimmer A, Hoehn M, Heiss WD, Klockgether T, Staufenbiel M: **Locus ceruleus degeneration promotes Alzheimer pathogenesis in amyloid precursor protein 23 transgenic mice.** *J Neurosci* 2006, **26**:1343–1354.
49. Fornai F, di Poggio AB, Pellegrini A, Ruggieri S, Paparelli A: **Noradrenaline in Parkinson's disease: from disease progression to current therapeutics.** *Curr Med Chem* 2007, **14**:2330–2334.
50. Duan RS, Yang X, Chen ZG, Lu MO, Morris C, Winblad B, Zhu J: **Decreased fractalkine and increased IP-10 expression in aged brain of APP(swe) transgenic mice.** *Neurochem Res* 2008, **33**:1085–1089.
51. Kalinin S, Gavriluk V, Polak PE, Vasser R, Zhao J, Heneka MT, Feinstein DL: **Noradrenaline deficiency in brain increases beta-amyloid plaque burden in an animal model of Alzheimer's disease.** *Neurobiol Aging* 2007, **28**:1206–1214.
52. Hammerschmidt T, Kummer MP, Terwel D, Martinez A, Gorji A, Pape HC, Rommelfanger KS, Schroeder JP, Stoll M, Schultze J, Weinschenker D, Heneka MT: **Selective loss of noradrenaline exacerbates early cognitive dysfunction and synaptic deficits in APP/PS1 mice.** *Biol Psychiatry* 2013, **73**:454–463.
53. Galea E, Reis DJ, Fox ES, Xu H, Feinstein DL: **CD14 mediate endotoxin induction of nitric oxide synthase in cultured brain glial cells.** *J Neuroimmunol* 1996, **64**:19–28.
54. Guillemin G, Boussin FD, Croitoru J, Franck-Duchenne M, Le GR, Lazarini F, Dormont D: **Obtention and characterization of primary astrocyte and microglial cultures from adult monkey brains.** *J Neurosci Res* 1997, **49**:576–591.
55. Pekny M, Nilsson M: **Astrocyte activation and reactive gliosis.** *Glia* 2005, **50**:427–434.
56. Chung IY, Benveniste EN: **Tumor necrosis factor-alpha production by astrocytes. Induction by lipopolysaccharide, IFN-gamma, and IL-1 beta.** *J Immunol* 1990, **144**:2999–3007.
57. Soliman ML, Combs CK, Rosenberger TA: **Modulation of inflammatory cytokines and mitogen-activated protein kinases by acetate in primary astrocytes.** *J Neuroimmune Pharmacol* 2013, **8**:287–300.
58. Basu A, Krady JK, Levison SW: **Interleukin-1: a master regulator of neuroinflammation.** *J Neurosci Res* 2004, **78**:151–156.
59. Montgomery SL, Bowers WJ: **Tumor necrosis factor-alpha and the roles it plays in homeostatic and degenerative processes within the central nervous system.** *J Neuroimmune Pharmacol* 2012, **7**:42–59.
60. Schlachetzki JC, Fiebich BL, Haake E, de Oliveira AC, Candelario-Jalil E, Heneka MT, Hüll M: **Norepinephrine enhances the LPS-induced expression of COX-2 and secretion of PGE2 in primary rat microglia.** *J Neuroinflammation* 2010, **7**:2.
61. Shi J, Wang Q, Johansson JU, Liang X, Woodling NS, Priyam P, Loui TM, Merchant M, Breyer RM, Montine TJ, Andreasson K: **Inflammatory prostaglandin E2 signaling in a mouse model of Alzheimer disease.** *Ann Neurol* 2012, **72**:788–798.
62. Thery C, Dobbertin A, Mallat M: **Downregulation of in vitro neurotoxicity of brain macrophages by prostaglandin E2 and a beta-adrenergic agonist.** *Glia* 1994, **11**:383–386.
63. Kim EJ, Kwon KJ, Park JY, Lee SH, Moon CH, Baik EJ: **Neuroprotective effects of prostaglandin E2 or cAMP against microglial and neuronal free radical mediated toxicity associated with inflammation.** *J Neurosci Res* 2002, **70**:97–107.
64. Akaike A, Kaneko S, Tamura Y, Nakata N, Shiomi H, Ushikubi F, Narumiya S: **Prostaglandin E2 protects cultured cortical neurons against N-methyl-D-aspartate receptor-mediated glutamate cytotoxicity.** *Brain Res* 1994, **663**:237–243.
65. Cazevielle C, Muller A, Meynier F, Dutrait N, Bonne C: **Protection by prostaglandins from glutamate toxicity in cortical neurons.** *Neurochem Int* 1994, **24**:395–398.

doi:10.1186/1742-2094-10-81

**Cite this article as:** Hinojosa et al.: Dual effects of noradrenaline on astroglial production of chemokines and pro-inflammatory mediators. *Journal of Neuroinflammation* 2013 **10**:81.



