

LA INFLAMACIÓN GASTROINTESTINAL EXACERBA LA INFLAMACIÓN Y LA MUERTE NEURONAL EN EL PARKINSONISMO

A. L. Gil-Martínez¹, J.A. Cano¹, M. Valiente¹, C. Estrada¹, A. González-Cuello¹, E. Fernández¹, F. Fernández-Gómez¹, M.T. Herrero-Ezquerro¹

¹ Grupo de Neurociencia Clínica y Experimental (NiCE). Facultad de Medicina. Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria (IMIB). Instituto Universitario de Investigación en Envejecimiento (IUIE) Universidad de Murcia. Murcia, España. E-mail: analuisa.gil@um.es.

La Enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda enfermedad degenerativa más común después de la Enfermedad de Alzheimer, según los últimos datos que ha recogido la Federación Española de Parkinson se calcula que esta enfermedad podría estar afectando a 6.3 millones de personas en todo el mundo.

La EP es un síndrome sistémico generalizado cuyos síntomas motores son la tétrada: rigidez, bradicinesia, temblor en reposo e inestabilidad postural (1). A parte de la sintomatología motora, existen signos prodrómicos y premotores como la disfunción del sistema autónomo, alteraciones olfativas, depresión, alteración del sueño y trastornos cognitivos o alteraciones neuropsiquiátricas, que afectan de forma muy significativa a la calidad de vida de los pacientes con EP.

La inflamación, tanto cerebral como sistémica, juega un papel fundamental en el desarrollo y la progresión de enfermedades neurodegenerativas como la EP. Se ha sugerido que la inducción de inflamación sistémica, específica o generalizada, puede aumentar los procesos involucrados en la muerte neuronal dopaminérgica debido a un incremento en la presencia de microglia activa de fenotipo M1 o pro-inflamatoria sobre el fenotipo M2 o anti-inflamatorio (2). La activación de la microglia M1 está caracterizada por la liberación de mediadores pro-inflamatorios entre los que se incluyen el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interferón gamma (IFN- γ), interleuquina-1 beta (IL-1 β), IL-6, IL-12, CD4, CD11B, CD64 y otras moléculas citotóxicas, tales como superóxido, NO y especies reactivas de oxígeno (ROS) contribuyendo a la amplificación no controlada de la respuesta inflamatoria en el cerebro (3–5).

El objetivo del presente estudio es investigar el efecto de procesos inflamatorios sistémicos sobre la muerte neuronal dopaminérgica en ratones parkinsonianos mediante un tratamiento sistémico con 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) combinado con inflamación intestinal aguda y local producida por la administración por vía oral de sulfato de sodio dextrano (DSS).

Se utilizaron 48 ratones adultos jóvenes (C57BL/6) divididos en 4 grupos: a) grupo control (n=10): consumieron agua y comida *ad libitum* durante todo el experimento; b) grupo DSS (n=10): se trataron con DSS al 2-2.5% (peso molecular 50kDA, MP Biomedicals, Illkirck, Francia) diluido en agua de bebida para su administración *ad libitum* durante todo el tratamiento; c) grupo MPTP (n=14): el cuarto día del tratamiento recibieron 2 inyecciones i.p. de MPTP (Sigma-Aldrich) (30 mg/Kg, disuelto en salino 0.9%) en intervalos de dos

horas (con comida y bebida estándar); d) grupo MPTP+DSS (n=14): recibieron la combinación de los tratamientos de los grupos de DSS y MPTP.

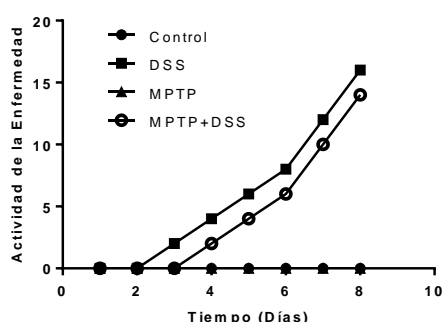
Grupos	Días							
	1	2	3	4	5	6	7	8
CONTROL (n=10)								
DSS (n=10)								
MPTP (n=14)								
MPTP + DSS (n=14)								
Agua	DSS 2.5%			DSS 2%		MPTP		

Figura 1. Diseño experimental seguido para el tratamiento de ratones adultos jóvenes C57BL/6.

Durante los 8 días de tratamiento los animales fueron evaluados diariamente del avance de la inflamación digestiva inducida por DSS. Se utilizó el “índice de actividad de la enfermedad” (IAE) basado en un sistema de puntuación (6), evaluando los parámetros de: consistencia de las heces, sangrado y pérdida de peso en comparación con el peso inicial.

La puntuación del IAE de los grupos a los que se les administró DSS era significativamente mayor respecto a los demás grupos (Figura 1A). Respecto a la pérdida de peso (Figura 1B) los grupos control y MPTP no presentaron diferencias significativas, sino que mantuvieron un peso estable a lo largo de los ocho días. En los grupos con colitis aguda inducida por DSS se dio una significativa pérdida de peso a partir del sexto día de tratamiento por el agravamiento de los síntomas de la colitis (deshidratación por diarrea, menos apetito por la enfermedad, malabsorción de nutrientes y sangre en heces).

A



Consistencia Fecal	
0	Normal
2	Heces sueltas/ligeras
4	Diarrea
Sangrado	
0	No hay sangre en heces
2	Sangre visible en heces
4	Sangrado grave, sangre alrededor del ano

B

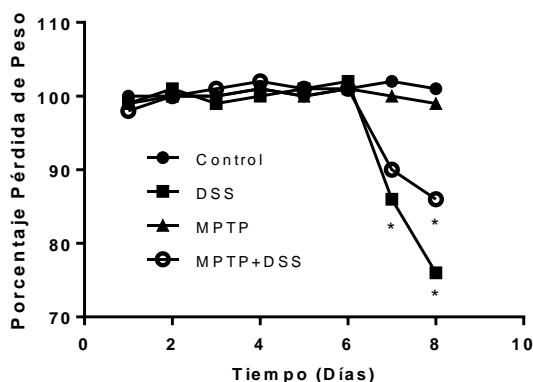


Figura 2. Evaluación de los síntomas clínicos de la colitis ulcerosa inducida por DSS. (A) Índice Acumulado de la Actividad de la Enfermedad; el grado de colitis se evaluó en base a la consistencia fecal y sangrado. **(B)** Porcentaje de la pérdida de peso durante los días de tratamiento (*P-valor < 0.05).

Las pruebas motoras se realizaron 48h después de la intoxicación con MPTP. El test de Rotarod evalúa el equilibrio y la coordinación motora ya que es una prueba de rendimiento basado en la rotación acelerada de una varilla donde se coloca el animal y se miden los tiempos de latencia (7). Los animales parkinsonianos, por inyecciones de MPTP, mostraban tiempos de latencia significativamente menores respecto a los grupos controles (sin MPTP) (Figura 3).

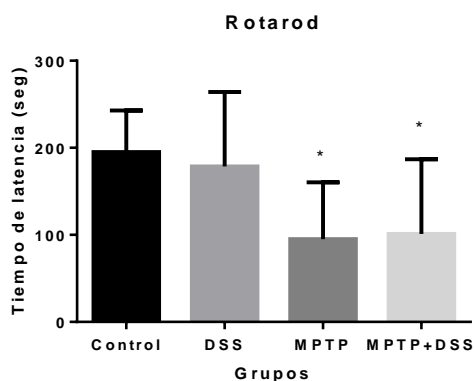


Figura 3. Representación del tiempo de latencia (seg) de los distintos grupos tratados en el Test de Rotarod. Los grupos MPTP y MPTP+DSS poseen unos tiempos de latencia significativamente menores respecto al grupo control. (*P-valor < 0.05).

Los animales fueron sacrificados 3 días después de la intoxicación con MPTP y tras 8 días de tratamiento con DSS. Se extrajeron tubo digestivo, bazo y cerebro. Los intestinos gruesos de todos los ratones se incluyeron en parafina para su posterior análisis histológico por tinción con hematoxilina y eosina, se observaron cambios en la superficie del epitelio con pérdida celular y destrucción de las microvellosidades intestinales respecto al grupo control y MPTP.

Los cerebros fueron diseccionados en dos mitades (transversalmente, a nivel de los cuerpos mamilares) e incluidos en bloques de parafina para la realización de inmunohistoquímica sobre las secciones a nivel de la SNpc y del estriado. En la SNpc se

analizaron las neuronas dopaminérgicas y las células gliales. En el estriado se evaluó la innervación dopaminérgica. Los anticuerpos utilizados fueron: Tirosina Hidroxilasa (TH) enzima citosólica que cataliza la hidroxilación de la L-tirosina a L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), limitante en la síntesis de dopamina; e Iba-1 para la cuantificación de inflamación en la SNpc.

Se halló una disminución significativa de neuronas dopaminérgicas en la SNpc en los dos grupos tratados con MPTP siendo mayor en el grupo MPTP+DSS, en el cual la inflamación también era significativamente mayor.

Estos resultados sugieren que los procesos de inflamación sistémica (incluso limitada a un órgano como el tubo digestivo) es capaz de acelerar el proceso neurodegenerativo central en el Parkinsonismo, reforzando la hipótesis de la interacción deletérea del eje intestino-cerebro en la EP.

Referencias

1. Samii A, Nutt JG, Ransom BR. Parkinson's disease. *Lancet*. 2004;363(9423):1783–93.
2. Villaran RF, Espinosa-Oliva AM, Sarmiento M, De Pablos RM, Arguelles S, Delgado-Cortes MJ, et al. Ulcerative colitis exacerbates lipopolysaccharide-induced damage to the nigral dopaminergic system: potential risk factor in Parkinson's disease. *J Neurochem*. 2010;114(6):1687–700.
3. Wang Q, Liu Y, Zhou J. Neuroinflammation in Parkinson's disease and its potential as therapeutic target. *Transl Neurodegener*. 2015;4(1):19.
4. Pisanu A, Lecca D, Mulas G, Wardas J, Simbula G, Spiga S, et al. Dynamic changes in pro- and anti-inflammatory cytokines in microglia after PPAR-gamma agonist neuroprotective treatment in the MPTPp mouse model of progressive Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*. 2014;71:280–91.
5. Supriady H, Noor M, Kamarudin A, Chan CK, Goh BH, Kadir HA. SMEAF attenuates the production of pro-inflammatory mediators through the inactivation of Akt-dependent NF- κ B, p38 and ERK1/2 pathways in LPS-stimulated BV-2 microglial cells. *J Funct Foods*. 2015;17:434–48.
6. Laroui H, Ingersoll SA, Liu HC, Baker MT, Ayyadurai S, Charania MA, et al. Dextran Sodium Sulfate (DSS) Induces Colitis in Mice by Forming Nano-Lipocomplexes with Medium-Chain-Length Fatty Acids in the Colon. *PLoS One*. 2012;7(3):e32084.
7. Wang S, Jing H, Yang H, Liu Z, Guo H, Chai L, et al. Tanshinone I selectively suppresses pro-inflammatory genes expression in activated microglia and prevents nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease. *J Ethnopharmacol*. 2015;164:247–55.