



EFFECTO DE LA MELATONINA, LEPTINA Y ÁCIDOS GRASOS: DOCOSAHEXAENOICO, EICOSAPENTAENOICO Y PALMÍTICO, EN LA MODULACIÓN DE LA INFLAMACIÓN EN CÉLULAS DE GLÍA

Nohora Milena Martínez López

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

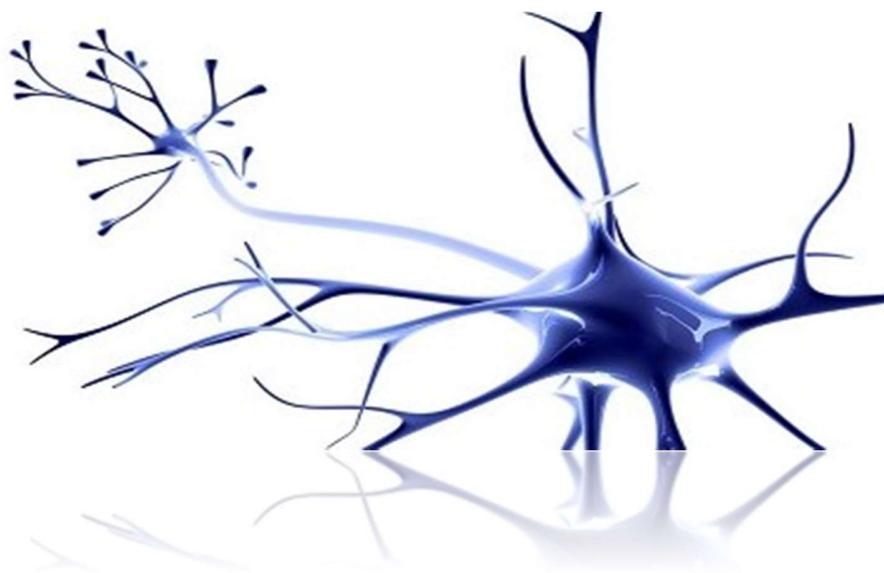
ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



**EFECTO DE LA MELATONINA, LEPTINA Y ÁCIDOS GRASOS:
DOCOSAHEXAENOICO, EICOSAPENTAENOICO Y PALMÍTICO, EN LA
MODULACIÓN DE LA INFLAMACIÓN EN CÉLULAS DE GLÍA.**

Nohora Milena Martínez López



TESIS DOCTORAL

2017

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTO DE LA MELATONINA, LEPTINA Y ÁCIDOS GRASOS: DOCOSAHEXAENOICO, EICOSAPENTAENOICO Y PALMÍTICO,
EN LA MODULACIÓN DE LA INFLAMACIÓN EN CÉLULAS DE GLÍA

Nohora Milena Martínez López

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTO DE LA MELATONINA, LEPTINA Y ÁCIDOS GRASOS: DOCOSAHEXAENOICO, EICOSAPENTAENOICO Y PALMÍTICO,
EN LA MODULACIÓN DE LA INFLAMACIÓN EN CÉLULAS DE GLÍA

Nohora Milena Martínez López

Nohora Milena Martínez López

**EFECTO DE LA MELATONINA, LEPTINA Y ÁCIDOS GRASOS:
DOCOSAHEXAENOICO, EICOSAPENTAENOICO Y PALMÍTICO, EN LA
MODULACIÓN DE LA INFLAMACIÓN EN CÉLULAS DE GLÍA.**

Tesis Doctoral

Dirigida por:

Dr. Jaume Folch López

Departamento de Bioquímica y Biotecnología



**UNIVERSITAT
ROVIRA i VIRGILI**

2017

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTO DE LA MELATONINA, LEPTINA Y ÁCIDOS GRASOS: DOCOSAHEXAENOICO, EICOSAPENTAENOICO Y PALMÍTICO,
EN LA MODULACIÓN DE LA INFLAMACIÓN EN CÉLULAS DE GLÍA

Nohora Milena Martínez López



FAIG CONSTAR que aquest treball, titulat *"Efecte de la melatonina, leptina i àcids grassos: docosahexaenoic, eicosapentaenoic i palmític, en la modulació de la inflamació en cèl·lules de glia"*, que presenta Nohora Milena Martínez López per a l'obtenció del títol de Doctor, ha estat realitzat sota la meva direcció al Departament de Bioquímica y Biotecnología d' aquesta universitat.

HAGO CONSTAR que el presente trabajo, titulado *"Efecto de la melatonina, leptina y ácidos grasos: docosahexaenoico, eicosapentaenoico y palmítico, en la modulación de la inflamación en células de glía"*, que presenta Nohora Milena Martínez López para la obtención del título de Doctor, ha sido realizado bajo mi dirección en el Departamento de Bioquímica y Biotecnología de esta universidad.

I STATE that the present study, entitled *"Effect of melatonin, leptin and fatty acids: docosahexaenoic, eicosapentaenoic and palmitic, in the modulation of inflammation in glial cells"*, presented by Nohora Milena Martínez López for the award of the degree of Doctor, has been carried out under my supervision at the Department of Biochemistry and Biotechnology of this university.

Reus, junio 28 de 2017

El director de la tesi doctoral
El director de la tesis doctoral
Doctoral Thesis Supervisor

Jaume Folch López

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTO DE LA MELATONINA, LEPTINA Y ÁCIDOS GRASOS: DOCOSAHEXAENOICO, EICOSAPENTAENOICO Y PALMÍTICO,
EN LA MODULACIÓN DE LA INFLAMACIÓN EN CÉLULAS DE GLÍA

Nohora Milena Martínez López



Este trabajo ha sido financiado por:

- ***Programa FI de la Agencia de Administración de Becas Universitarias y de Investigación (AGAUR). Comisión de Universidades e Investigación del Departamento de Innovación, Universidades y Empresa del Gobierno de Cataluña; Número de subvención 2013FI_B 00950.***
- ***Facultad de Farmacia y Farmacognosia, Universidad de Barcelona***

Agradecimiento especial al señor Josep Ferrer de la compañía Charles River Laboratories España por su contribución con los ratones C57BL/6J para el desarrollo de la fase experimental.

***A mi familia: Nohora E., Pedro J (Q.E.P.D.), Dennis, Pedro A. y Angelita,
por estar siempre a mi lado por encima del tiempo, la distancia
y las circunstancias.***

A ti Rafa, por tu apoyo y amor incondicional.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTO DE LA MELATONINA, LEPTINA Y ÁCIDOS GRASOS: DOCOSAHEXAENOICO, EICOSAPENTAENOICO Y PALMÍTICO,
EN LA MODULACIÓN DE LA INFLAMACIÓN EN CÉLULAS DE GLÍA

Nohora Milena Martínez López

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTO DE LA MELATONINA, LEPTINA Y ÁCIDOS GRASOS: DOCOSAHEXAENOICO, EICOSAPENTAENOICO Y PALMÍTICO,
EN LA MODULACIÓN DE LA INFLAMACIÓN EN CÉLULAS DE GLÍA

Nohora Milena Martínez López

Resumen

La neurodegeneración ocurre en el sistema nervioso central a través de diferentes mecanismos que se asocian con la pérdida de estructura y función neuronal, reducción de la supervivencia y aumento de la muerte neuronal, dando como resultado alteraciones funcionales y mentales en el individuo. Estudios recientes han demostrado un fuerte vínculo entre la inflamación crónica y la neurodegeneración. Se ha descrito la activación de procesos inflamatorios en diferentes enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, entre otras. Aunque la inflamación puede no representar típicamente un factor desencadenante en la enfermedad neurodegenerativa, hay nuevas evidencias en modelos animales en donde la respuesta inflamatoria sostenida, relacionada con activación glial, contribuye a la progresión de la enfermedad. La activación de las células gliales principalmente refleja un mecanismo fisiológico cuyo objetivo primordial es la neuroprotección. Sin embargo, la pérdida de la comunicación específica entre las neuronas dañadas y las células gliales puede promover una activación excesiva que conlleva a un estado de inflamación persistente, y como consecuencia, inducir y/o exacerbar la neurodegeneración.

La melatonina ha demostrado tener posibles efectos neuroprotectores debido a sus propiedades antioxidantes, sus interacciones con vías de señalización intracelular, la regulación de la supervivencia celular y la función mitocondrial. Por otra parte, la leptina juega un papel central en el control del peso corporal y la homeostasis energética. Se ha demostrado que la leptina es capaz de regular las respuestas inflamatorias y proporcionar neuroprotección. De igual manera, estudios experimentales y humanos han mostrado que la función del cerebro es sensible a los ácidos grasos. Se ha estudiado que una mayor ingesta de grasas saturadas aumenta el riesgo de deterioro de la función cognitiva en las poblaciones de mediana edad o de edad avanzada, así como también se ha descrito en modelos de ratón que dietas altas en grasa saturada pueden favorecer neuropatologías como la enfermedad de

Resumen

Alzheimer. Por otra parte, se ha estudiado que los ácidos grasos omega 3 tienen potencial actividad anti-inflamatoria en una variedad de enfermedades. Sin embargo, los mecanismos por los cuales la melatonina, leptina y ácidos grasos omega 3 pueden tener propiedades anti-inflamatorias son poco comprendidos a nivel del sistema nervioso central.

Por lo anterior, la hipótesis de este estudio es que la melatonina, la leptina y los ácidos grasos DHA, EPA y AP podrían tener efecto sobre la inflamación en células gliales a través de la modulación en la producción de óxido nítrico, la inhibición/producción la expresión de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y la activación de la vía p38 MAPK.

El objetivo planteado en este trabajo fue estudiar el potencial efecto anti-inflamatorio y/o neuroprotector de la melatonina, leptina, ácido docosahexaenoico, ácido eicosapentaenoico y ácido palmítico en cultivos de células de glía de ratón C57Bl/6J.

Para valorar potencial anti-inflamatorio de la melatonina, leptina y ácidos grasos, se trabajó con cultivos primarios de glía provenientes de córtex de ratón C57BL/6J los cuales fueron sometidos a la activación glial con citoquinas pro-inflamatorias IFN γ , IL-1 β Y TNF α . Los cultivos fueron pre-tratados con melatonina, leptina y ácidos grasos (docosahexaenoico, eicosapentaenoico y palmítico) y posteriormente fueron tratados con las citoquinas pro-inflamatorias. Se valoró la viabilidad celular, el aumento o disminución de la producción de óxido nítrico, la expresión de iNOS, así como la activación de la vía p38 MAPK.

Los resultados de este estudio muestran que la exposición de células de glía a citoquinas proinflamatorias aumenta la producción de óxido nítrico, la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y la activación de las vías JNK, p38, c-JUN, ERK 1/2 y JAK/STAT. Por otra parte, se observó que la melatonina, leptina y los ácidos grasos omega 3 (a bajas concentraciones) no afectan la viabilidad celular y

Resumen

disminuyen la producción de óxido nítrico, así como también inhiben la producción de iNOS y la activación de p38 MAPK. La melatonina, leptina, DHA y EPA podrían considerarse como una estrategia terapéutica prometedora en trastornos neuroinflamatorios asociados al cerebro.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTO DE LA MELATONINA, LEPTINA Y ÁCIDOS GRASOS: DOCOSAHEXAENOICO, EICOSAPENTAENOICO Y PALMÍTICO,
EN LA MODULACIÓN DE LA INFLAMACIÓN EN CÉLULAS DE GLÍA

Nohora Milena Martínez López

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTO DE LA MELATONINA, LEPTINA Y ÁCIDOS GRASOS: DOCOSAHEXAENOICO, EICOSAPENTAENOICO Y PALMÍTICO,
EN LA MODULACIÓN DE LA INFLAMACIÓN EN CÉLULAS DE GLÍA

Nohora Milena Martínez López

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTO DE LA MELATONINA, LEPTINA Y ÁCIDOS GRASOS: DOCOSAHEXAENOICO, EICOSAPENTAENOICO Y PALMÍTICO,
EN LA MODULACIÓN DE LA INFLAMACIÓN EN CÉLULAS DE GLÍA

Nohora Milena Martínez López

Abreviaturas

AA:	Ácido Araquidónico
Aβ:	Beta-amiloíde
ADN:	Acido desoxirribonucleico
AG:	Ácido graso
AGMS:	Ácido graso monoinsaturado
AGPI:	Ácido graso poliinsaturado
AGPI n-3:	Ácidos grasos poliinsaturados omega-3
AGPI n-6:	Ácidos grasos poliinsaturados omega-6
AGS:	Ácido graso saturado
ALA:	Ácido linolénico
AMPK:	Adenosina monofosfato quinasa
AP:	Ácido palmítico
AP-1:	Proteína activadora 1
APOE:	Apolipoproteína E
APP:	Proteína precursora amiloidea
ATP:	Adenosina trifosfato
BACE:	Beta-secretasa
BDNF:	Factor neurotrófico derivado del cerebro
BHE:	Barrera hematoencefálica
COX:	Ciclooxigenasa
CK:	Citoquina
DHA:	Ácido docosahexaenoico
EPA:	Ácido eicosapentaenoico
EA:	Enfermedad de Alzheimer
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético
ELA:	Esclerosis lateral amiotrófica
EM:	Esclerosis Múltiple
EP:	Enfermedad de Parkinson
eNOS:	Endotelial óxido nítrico sintasa

Abreviaturas

ERK1/2:	Quinasa regulada por señal extracelular ½
GABA:	Ácido gamma-aminobutírico
GLUT:	Transportadores de glucosa
GMF:	Factor de maduración de glía
GMPc:	Monofosfato de guanosina cíclico
GM-CFS:	Factor estimulante de colonias y macrófagos
GSK3β:	Glucógeno sintasa quinasa 3 beta
H2O2:	Peróxido de hidrogeno
IDE:	Enzima degradadora de insulín
IκB:	Inhibidor de kappa B
IL-1:	Interleuquina-1
IL-1β:	Interleuquina-1beta
IFN:	Interferon
IFNγ:	Interferón gamma
iNOS:	Óxido nítrico sintasa inducible
JNK:	c-Jun amino-terminal quinasa
JAK:	Janus quinasa
LEP:	Leptina
LNA:	Ácido linoleico
LPS:	Lipopolisácarido
MAPK:	Proteína quinasa activada por mitógenos
MAPKK/MAP2K:	MAP quinasa quinasa
MAPKKK/MAP3K:	MAP quinasa quinasa quinasa
MCP-1:	Proteína quimiotáctica de monocitos 1
MMPs:	Metaloproteínas
MT1:	Receptor de melatonina 1
MT2:	Receptor de melatonina 2
MTT:	(bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol)
N2O2:	Dióxido de nitrógeno

Abreviaturas

NADH:	Nicotinamida adenina dinucleótido reducida
NMDA:	N-metil-D-aspartato
NF-κB:	Factor nuclear Kappa de células B activadas
NK:	Natural killer
NOS:	Óxido-nítrico sintasa
nNOS:	Neuronal óxido nítrico sintasa
NPY:	Neuropéptido Y
O₂-•:	Radical superóxido
Ob-R:	Receptor de leptina
OA:	Acido oléico
OH•:	Radical hidroxilo
ON:	Óxido nítrico
ONOO•:	Radical peroxinitrito
PAF:	Factor activador de plaquetas
PPAR:	Receptor del activador de la proliferación de peroxisomas
RAGE:	Receptor para los productos finales de glicación
ROS:	Especies reactivas del oxígeno
RNS:	Especies reactivas de nitrógeno
SNC:	Sistema nervioso central
STAT:	Transductor de señal y activador de la transcripción
Thr:	Treonina
TLRs:	Receptores de tipo toll
TNF-α:	Factor de Necrosis Tumoral-alfa
Tyr:	Tirosina

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTO DE LA MELATONINA, LEPTINA Y ÁCIDOS GRASOS: DOCOSAHEXAENOICO, EICOSAPENTAENOICO Y PALMÍTICO,
EN LA MODULACIÓN DE LA INFLAMACIÓN EN CÉLULAS DE GLÍA

Nohora Milena Martínez López

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTO DE LA MELATONINA, LEPTINA Y ÁCIDOS GRASOS: DOCOSAHEXAENOICO, EICOSAPENTAENOICO Y PALMÍTICO,
EN LA MODULACIÓN DE LA INFLAMACIÓN EN CÉLULAS DE GLÍA

Nohora Milena Martínez López

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTO DE LA MELATONINA, LEPTINA Y ÁCIDOS GRASOS: DOCOSAHEXAENOICO, EICOSAPENTAENOICO Y PALMÍTICO,
EN LA MODULACIÓN DE LA INFLAMACIÓN EN CÉLULAS DE GLÍA

Nohora Milena Martínez López

Tabla de contenido

CAPITULO 1.	- 2 -
INTRODUCCIÓN	- 2 -
1. CÉLULAS GLIALES Y SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	- 4 -
1.1. TIPOS DE CÉLULAS GLIALES	- 5 -
1.1.1. Astrocitos	- 6 -
1.1.2. Oligodendrocitos	- 8 -
1.1.3. Microglía	- 9 -
1.1.4. Glía NG2	- 10 -
1.2. ACTIVACIÓN GLIAL	- 11 -
2. CITOQUINAS.	- 13 -
2.1. CITOQUINAS PROINFLAMATORIAS.	- 14 -
2.1.1. TNF	- 15 -
2.1.2. IL-1	- 15 -
2.1.3. IFN γ	- 16 -
3. PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO E INOS.	- 17 -
4. ÓXIDO NÍTRICO Y ESTRÉS OXIDATIVO.	- 19 -
5. NEURODEGENERACIÓN, NEUROINFLAMACIÓN Y ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS	- 22 -
5.1. INFLAMACIÓN EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	- 26 -
5.2. INFLAMACIÓN EN LA ENFERMEDAD DE PARKINSON	- 27 -
5.3. INFLAMACIÓN EN LA ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA.	- 28 -
5.4. INFLAMACIÓN EN LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE.	- 30 -
6. ÁCIDOS GRASOS	- 31 -
6.1. CLASIFICACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS.	- 31 -
6.1.1. Ácidos grasos saturados	- 32 -
6.1.2. Ácidos grasos insaturados	- 33 -
6.1.2.1. Ácidos grasos monoinsaturados (AGMI)	- 34 -
6.1.2.2. Ácidos grasos poliinsaturados (AGPI)	- 34 -
6.2. ÁCIDOS GRASOS, INFLAMACIÓN Y ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS.	- 39 -
6.2.1. Acido palmítico	- 39 -
6.2.2. Ácidos grasos omega 3: ácido docosahexaenoico y ácido eicosapentaenoico	- 41 -

Tabla de contenido

7. MELATONINA	- 48 -
8. LEPTINA	- 50 -
9. PROTEÍNAS QUINASAS ACTIVADAS POR MITÓGENOS (MAPK)	- 52 -
9.1. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE P38-MAPK	- 53 -
9.1.1. Elementos de la familia p38-MAPK	- 53 -
9.1.2. Localización celular y estructura de p38-MAPK	- 54 -
9.1.3. Regulación de p38 MAPK	- 55 -
9.1.4. Substratos de p38-MAPK	- 58 -
9.1.5. Función de p38 MAPK	- 59 -
<u>CAPÍTULO 2.</u>	- 64 -
<u>PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS</u>	- 64 -
1. PLANTEAMIENTO	- 66 -
2. OBJETIVO GENERAL	- 68 -
3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	- 68 -
<u>CAPÍTULO 3.</u>	- 70 -
<u>MATERIAL Y MÉTODOS</u>	- 70 -
1. MODELO ANIMAL	- 72 -
2. CULTIVO PRIMARIO DE CÉLULAS DE GLÍA	- 72 -
3. TRATAMIENTO DEL CULTIVO	- 75 -
4. CUANTIFICACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR POR MTT	- 78 -
5. TINCIÓN CON HOECHST 33342	- 80 -
6. MEDICIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO	- 81 -
7. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PROTÉICA	- 83 -
8. WESTERN BLOT	- 84 -
9. PLANIFICACIÓN EXPERIMENTAL	- 92 -
9.1. FASE EXPERIMENTAL 1: MODELO INFLAMACIÓN.	- 92 -
9.2. FASE EXPERIMENTAL 2: EFECTO DE ÁCIDOS GRASOS	- 93 -

Tabla de contenido

10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	- 94 -
CAPITULO 4.	- 97 -
RESULTADOS	- 97 -
1. FASE EXPERIMENTAL 1. MODELO INFLAMACIÓN.	- 99 -
1.1. EFECTO DE LAS CITOQUINAS SOBRE LAS CÉLULAS DE GLÍA.	- 99 -
1.2. EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LAS CÉLULAS DE GLÍA.	- 104 -
1.3. EFECTO DE LA LEPTINA SOBRE LAS CÉLULAS DE GLÍA.	- 108 -
2. FASE EXPERIMENTAL 2. ÁCIDOS GRASOS.	- 113 -
2.1. EFECTO DEL ÁCIDO DOCOSAHEXAENOICO (DHA) SOBRE LAS CÉLULAS DE GLÍA.	- 113 -
3. EFECTO DEL ÁCIDO EICOSAPENTAENOICO (EPA) SOBRE LAS CÉLULAS DE GLÍA.	- 121 -
4. EFECTO DEL ÁCIDO PALMÍTICO (AP) SOBRE LAS CÉLULAS DE GLÍA.	- 128 -
CAPITULO 5.	- 135 -
DISCUSIÓN	- 135 -
CAPITULO 6.	- 155 -
CONCLUSIONES	- 155 -
PUBLICACIONES	- 160 -
BIBLIOGRAFIA	- 205 -

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTO DE LA MELATONINA, LEPTINA Y ÁCIDOS GRASOS: DOCOSAHEXAENOICO, EICOSAPENTAENOICO Y PALMÍTICO,
EN LA MODULACIÓN DE LA INFLAMACIÓN EN CÉLULAS DE GLÍA

Nohora Milena Martínez López

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTO DE LA MELATONINA, LEPTINA Y ÁCIDOS GRASOS: DOCOSAHEXAENOICO, EICOSAPENTAENOICO Y PALMÍTICO,
EN LA MODULACIÓN DE LA INFLAMACIÓN EN CÉLULAS DE GLÍA

Nohora Milena Martínez López

CAPITULO 1.

INTRODUCCIÓN

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTO DE LA MELATONINA, LEPTINA Y ÁCIDOS GRASOS: DOCOSAHEXAENOICO, EICOSAPENTAENOICO Y PALMÍTICO,
EN LA MODULACIÓN DE LA INFLAMACIÓN EN CÉLULAS DE GLÍA

Nohora Milena Martínez López

Capítulo 1. Introducción

1. Células gliales y Sistema Nervioso Central

El sistema nervioso central adulto (SNC) consiste en aproximadamente 100 mil millones de neuronas y una cantidad similar de células gliales. El parénquima del SNC se separa del resto del cuerpo por la barrera hematoencefálica (BHE), que está formado predominantemente por uniones estrechas de las células endoteliales con la vasculatura del SNC. La BHE restringe y controla la entrada de nutrientes y células, incluyendo células inmunitarias periféricas, que son casi completamente ausentes en el SNC saludable (Fischer and Maier, 2015a).

Durante mucho tiempo, el estudio del desarrollo del cerebro se ha centrado en gran medida en el desarrollo neuronal. Sin embargo, las neuronas se desarrollan en estrecha colaboración en el tiempo con las células gliales, sugiriendo interacciones importantes y un papel funcional para las células gliales en el desarrollo del cerebro.(Reemst et al., 2016).

Las células gliales fueron identificadas por primera vez por los principales neurocientíficos del siglo IX (Rudolf Virchow, Santiago Ramón y Cajal y Pío del Río Horteiga) quienes sugirieron en ese momento que la glía funcionaba como “Nerven Kitt” (palabra alemana para denominar el pegamento del nervio) o “neuroglia”. De ahí el nombre de “célula glial” que deriva de la antigua palabra griega “glía”, que significa “pegamento”. Aunque se han llevado a cabo diversos estudios para especificar las funciones de la glía, las propiedades completas de las células gliales siguen sin resolverse(García-Martín et al., 2017).

Capítulo 1. Introducción

Las células gliales constituyen (en función de la especie de mamífero) entre 33 y 66% de la masa total del cerebro. Hallazgos recientes han puesto de manifiesto que las células gliales son algo más que el simple “pegamento”. Hay una propiedad unificadora de todas estas células - su función principal es la de mantener la homeostasis cerebral a diferentes niveles: de órgano entero (control de la barrera hematoencefálica y la defensa), celular (neurogénesis, sinaptogénesis y mantenimiento de la sinapsis) y molecular (homeostasis iónica y la homeostasis de neurotransmisores). Por lo tanto las células gliales se pueden definir ampliamente como células homeostáticas del sistema nervioso (Parpura and Verkhratsky, 2012) ya que participan activamente en muchos aspectos del sistema nervioso, tales como la formación, la plasticidad y el mantenimiento de los circuitos neuronales, y son necesarias para la supervivencia y función neuronal (Allen and Barres, 2009).

1.1. Tipos de células gliales

La población total de células gliales se pueden subdividir en cuatro grupos principales: astrocitos, oligodendrocitos, y sus progenitores NG2-glia y microglía (García-Martín et al., 2017). Estas células tienen diferente origen, morfología y función. Las células gliales primarias en el sistema nervioso central son de origen ectodérmico y están representadas por los astrocitos, oligodendrocitos y células NG-2-positivas. La microglía es totalmente diferente, siendo de origen mesodérmico.

Capítulo 1. Introducción

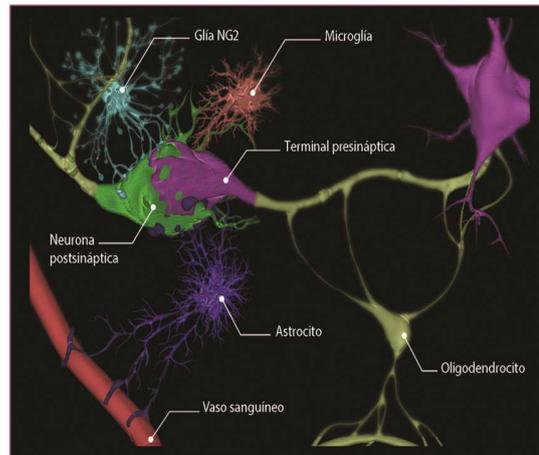


Figura 1. . Las células gliales incluyen principalmente a la microglía, oligodendrocitos, astrocitos y glía NG2. La microglía representa el sistema inmunitario del cerebro. Los oligodendrocitos producen la mielina que envuelve a los axones para permitir una comunicación neuronal eficiente. Los astrocitos contactan a los vasos sanguíneos y las sinapsis detectan la actividad neuronal y liberan gliotransmisores para modular la actividad cerebral. (Reyes-Haro et al.,2014.)

1.1.1. Astrocitos

Representan la población de células gliales más grande del cerebro. Constituyen aproximadamente el 50% del volumen cerebral humano (Chen and Swanson, 2003). Santiago Ramón y Cajal los describió como células de formas estrelladas con un soma circunscrito al núcleo, del cual parten una serie de prolongaciones en sentido más o menos radial. Los astrocitos fueron subclasificados en protoplasmáticos y fibrosos por Rudolf Albert von Kölliker y William Lloyd Andriezen en 1889 y 1893, respectivamente. Los astrocitos fibrosos se ubican principalmente en la sustancia blanca, están asociados a los axones y se caracterizan por tener unas prolongaciones largas, cilíndricas y lisas que en ocasiones se apoyan en las paredes de los vasos. Los astrocitos protoplasmáticos, asociados a los somas neuronales y las sinapsis, están presentes principalmente en la sustancia gris y son más ramificados, con prolongaciones cortas y rugosas (RamírezExpósito y Martínez-Martos, 1998).

Capítulo 1. Introducción

Estudios ultraestructurales han revelado la presencia de numerosos microtúbulos y microfilamentos en el citoplasma, que se han denominado gliofilamentos. Uno de los gliofilamentos más importantes, que se extiende por el soma y las prolongaciones, está constituido por la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), cuya presencia permite la identificación de las células astrogiales con métodos de microscopía electrónica e inmunocitoquímica (Ramírez-Expósito and Martínez-Martos, 1998).

Los astrocitos son determinantes para el desarrollo, funcionamiento y supervivencia de las neuronas debido a que dentro de sus funciones se encuentran el mantenimiento de la homeostasis iónica (se encargan del mantenimiento de los gradientes iónicos dependientes de energía: Ca^{2+} , Na^{+} , K^{+}), intervienen en la modulación de las concentraciones de neurotransmisores en el espacio extracelular (principalmente del glutamato: síntesis, captación y liberación), participan en la eliminación de radicales libres, transporte de agua, producción de citoquinas y óxido nítrico (Chen and Swanson, 2003.), proporcionan el soporte físico a las neuronas vecinas, a las meninges y a los vasos sanguíneos, proveen metabólicamente de manera optimizada los nutrientes a las neuronas, sus dendritas y sinapsis, y mantienen estable el pH extracelular eliminando el CO_2 que las neuronas generan como producto del metabolismo aerobio que desarrollan normalmente. También se les ha implicado en el control de la barrera hematoencefálica (que está formada por uniones estrechas entre las células endoteliales de los capilares) para restringir el paso de moléculas solubles y sustancias tóxicas de la sangre al cerebro. Los astrocitos juegan un papel protector frente a la toxicidad de especies reactivas de oxígeno (ROS), H_2O_2 , metales y xenobióticos, ya que poseen sistemas enzimáticos específicos para su eliminación.

Los astrocitos establecen contacto con los vasos sanguíneos y tienen acceso a la glucosa que se transporta por la circulación sanguínea. La glucosa que se utiliza en el cerebro es captada por los astrocitos, quienes actúan como intermediarios en su

Capítulo 1. Introducción

transporte hasta las neuronas. Además, el astrocito, a diferencia de la neurona, es capaz de almacenar glucógeno como fuente de energía (Ramírez-Expósito and Martínez-Martos, 1998)(Gennadij Raivich et al., 1999)(Chen and Swanson, 2003.).

1.1.2. Oligodendrocitos

Los oligodendrocitos son más pequeños y menos ramificada que los astrocitos, sintetizan y mantienen las vainas de mielina que recubren los axones neuronales facilitando la rapidez de la propagación del impulso nervioso. La mielina es una lipoproteína que envuelve a los axones de las neuronas y hace más eficiente la comunicación neuronal, al acelerar la conducción eléctrica de los impulsos nerviosos, además de contribuir al soporte metabólico necesario para el adecuado funcionamiento axonal (Y. Lee et al., 2012).

Hay dos tipos de oligodendrocitos en la corteza: los oligodendrocitos perineuronales, que se encuentran en la sustancia gris y los oligodendrocitos interfasciculares que se encuentran en la sustancia blanca(Rajkowska and Miguel-Hidalgo, 2007.)

Los oligodendrocitos interfasciculares tienen un tamaño medio (20 μm), presentan un núcleo que ocupa un elevado porcentaje del volumen total de la célula, se disponen en paralelo a lo largo de los axones mielinizados, son los responsables de los procesos de mielinización durante el desarrollo y se encargan de mantener las vainas de mielina en el adulto. Los oligodendrocitos perineuronales son de pequeño tamaño (10 μm), rodean toda la superficie del cuerpo neuronal, lo que sugiere un papel importante en el mantenimiento de la fisiología de las neuronas.

Los oligodendrocitos poseen una capacidad de regeneración muy limitada, por lo que la lesión de unos pocos puede originar un área de desmielinización

Capítulo 1. Introducción

apreciable. Se sabe que son el tipo celular más vulnerable y los primeros elementos nerviosos que degeneran en las enfermedades del sistema nervioso central donde la mielina está afectada (Ramírez-Expósito and Martínez-Martos, 1998). Son susceptibles a lesiones mediadas por estrés oxidativo, aminoácidos excitatorios, privación de factores tróficos y la activación de vías apoptóticas (Ness et al., 2005).

Además de la formación de mielina, los oligodendrocitos también expresan factores de crecimiento, uniones gap y puede suministrar energía en forma de lactato para apoyar la función axonal. Además, expresan receptores de glutamato y, por tanto, son un objetivo de neurotransmisores y excitotoxicidad de glutamato (Elsayed et al., 2015).

1.1.3. Microglía

La microglía representa un 10-20 % del total de la población de células gliales. Son células residentes en el cerebro implicadas en procesos reguladores críticos para el desarrollo, mantenimiento del entorno neuronal, respuesta a una lesión, y su posterior reparación. Detectan eventos patológicos en el sistema nervioso central y sirven como células inmunes del cerebro para orquestar la respuesta inmune innata. Están implicadas en la activación del sistema inmune para promover la protección y supervivencia neuronal (Elsayed et al., 2015). Contribuyen a la proliferación y diferenciación neuronal, la poda de las neuronas que mueren, la remodelación sináptica y eliminación de residuos y proteínas aberrantes. (Harry, 2013.).

Después de una lesión en el sistema nervioso central se produce la activación de la microglía. La activación microglial se caracteriza por una serie de cambios morfológicos, inmunofenotípicos y funcionales, que pueden ir asociados a

Capítulo 1. Introducción

proliferación, migración y fagocitosis. La microglía activada es capaz de liberar muchas sustancias mediadoras, factores de crecimiento, compuestos citotóxicos tales como ROS, óxido nítrico (ON) o proteasas, y citoquinas inflamatorias como IL (interleucina)-1, IFN- γ (interferón γ) y TNF- α (Gennadij Raivich et al., 1999) (Gehrmann et al., 1995), que pueden dañar las neuronas u otras células gliales.

La microglía son las únicas células capaces de activación rápida en respuesta a los cambios patológicos en el sistema nervioso central (Rajkowska and Miguel-Hidalgo, 2007). Una vez activada prolifera y migra al sitio de la lesión cerebral donde se convierte en altamente fagocítica hacia las neuronas dañadas. Además de su función fagocitaria, responde a cualquier desequilibrio en la homeostasis de iones y también participan en la respuesta inmune. Es de destacar que el estrés y los glucocorticoides inducen una respuesta pro-inflamatoria en la microglía.

1.1.4. Glía NG2

La glía NG2 constituye del 5 al 8 % del total de células del sistema nervioso central y es probablemente el tipo glial del que menor información se dispone. El papel que juega la glía NG2 en la fisiología del cerebro es controvertido, por lo que es campo fértil de estudio para la neurobiología (Bergles et al., 2010). Las células NG2 presentan una forma estrellada, pero no expresan GFAP, ni transportadores de glutamato, así como tampoco forman uniones gap. Se encuentran ampliamente distribuidos en la sustancia gris como en la blanca.

La diversidad de papeles funcionales de la glía NG2 aún no están completamente comprendidos y requieren más estudios (Elsayed et al., 2015). Inicialmente se consideraba que las células NG2 eran solamente precursoras de los oligodendrocitos. Sin embargo, estudios posteriores presentaron evidencia de que la

Capítulo 1. Introducción

glía NG2 podría participar en la formación de neuronas y astrocitos (Reyes-Haro et al., 2014.). La glía NG2 son unas de las mayores células proliferativas en la corteza adulta. Sin embargo, no todas las células NG2 están proliferando en reposo. Al parecer un subconjunto de estas células está involucrado en algunos aspectos del procesamiento de la información en asociación con las neuronas. Es claro que estas células se ven influidas por diferentes factores ambientales y farmacológicos, provocando su proliferación. Se ha demostrado que la gliogénesis es influenciada por el estrés, el ejercicio, factores de crecimiento y aspectos farmacológicos (Elsayed et al., 2015). Se ha observado que las células NG2 no solo responden a los transmisores liberados en la sinapsis, sino que además reciben “inputs” presinápticos directos de las neuronas estableciendo lo que se ha denominado sinapsis neuroglia-glía (Wigley et al., 2007).

1.2. Activación glial

La neuroinflamación es un proceso generalmente beneficioso mediado por la activación de células gliales en respuesta a una lesión, enfermedad o infección. Los astrocitos y la microglía liberan mediadores inflamatorios como citoquinas y especies de radicales como el óxido nítrico (ON) y anión superóxido para eliminar el agente nocivo, restos celulares o destruir patógenos y reparar los tejidos dañados (esto es lo que se denomina como “gliosis” reactiva o glía activada”). Desafortunadamente, este proceso a veces pierde el equilibrio (como parece ocurrir en el envejecimiento o cuando la neuroinflamación persiste después de retirar el estímulo desencadenante), generando una neuroinflamación crónica, lo que se convierte en una respuesta perpetua que incluye la sostenida activación glial y liberación de citoquinas inflamatorias, así como la producción de estrés oxidativo y nitroso. La neuroinflamación crónica puede ser extremadamente nociva e inducir

Capítulo 1. Introducción

y/o exacerbar la progresión de enfermedades neurodegenerativas (Herrera-Molina et al., 2012).

La activación glial es una respuesta heterogénea pero presenta procesos básicos como el cambio morfológico, la proliferación, fagocitosis y producción de mediadores pro-inflamatorios y anti-inflamatorios. La respuesta inflamatoria del cerebro está producida por las células gliales, en especial la microglía. La microglía es particularmente sensible a los cambios en su microambiente y puede llegar a ser fácilmente activada en respuesta a la infección o lesión (Bin Liu and Hong, 2003). Tanto los astrocitos como la microglía sufren cambios morfológicos durante la activación glial.

La activación de la microglía se da mediante los receptores TLR (Toll-like Receptors) y NLR (NOD-like Receptors), y también como una respuesta del sistema inmune innato, produciendo citoquinas proinflamatorias: TNF α , las interleucinas IL-1 β y IL-6 y quimiocinas. La estimulación de TNF α incrementa la actividad fagocítica de la microglía, y se han encontrado niveles elevados de esta citoquina en diferentes enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson (Combs et al., 2001). La IL-1 β induce la expresión de TNF α e IL-6 y está implicada en el proceso inflamatorio, tanto en daño traumático cerebral, como en enfermedades neurodegenerativas (ShafteI et al. 2008). Con el fin de regular la respuesta inmune, la microglía también produce citoquinas antiinflamatorias como IL-10 y TGF β (Transforming Growth Factor β). La liberación de citoquinas y otros factores por parte de la microglía, regula la respuesta de los astrocitos, evidenciándose una sincronización entre microglía y astrocitos.

Los astrocitos, al activarse, cambian su estructura y morfología, presentando una hipertrofia acompañada de un aumento de la expresión de GFAP (Glial Fibrillary Acid Protein). Además, estas células liberan citoquinas como TNF α , IL-6, IL-1 β , IFN- γ y quimiocinas (Lieberman et al., 1989) (Van Neerven et al., 2010). La activación

Capítulo 1. Introducción

astroglial (o astrogliosis), al igual que la activación microglial prolongada o muy exagerada puede dejar de ser beneficiosa para pasar a exacerbar la muerte neuronal, generando interacciones entre células gliales y neuronas, que se asocian a un daño celular o a una enfermedad neurodegenerativa (Figura 2) (Morales et al., 2014). Lo anterior, se debe al hecho de que astrocitos y microglía, pueden liberar gran cantidad de compuestos neurotóxicos como el ON, las ROS o el TNF- α , así como otros mediadores que inducen reacciones secundarias en las células que haya infiltrado.

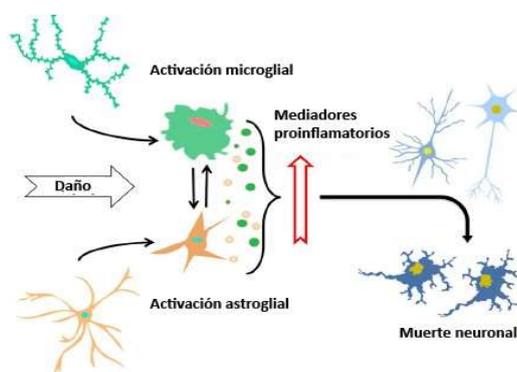


Figura 2. Daño o estímulo citotóxico que activa la microglía y la astrogliar. Estas células sufren cambios morfológicos y secretan factores proinflamatorios. Estos eventos, cuando tienen un carácter crónico, preceden y causan la muerte neuronal (adaptado Morales et al. 2014).

2. Citoquinas.

Las citoquinas son una clase de proteínas pequeñas que actúan como moléculas de señalización en concentraciones picomolares o nanomolares para regular la inflamación y modular las actividades celulares tales como el crecimiento, la supervivencia y diferenciación (Ramesh et al., 2013). Dentro de las citoquinas se incluyen a interleucinas, interferones, factores de necrosis tisular, factores

Capítulo 1. Introducción

estimuladores de colonias, factores de crecimiento y quimiocinas. Las citoquinas generalmente son secretadas, pero también pueden expresarse en la superficie celular. Se sabe que su producción se induce rápidamente después de una lesión tisular, infecciones o inflamación (Allan and Rothwell, 2001).

Dentro de las citoquinas se encuentran varios subgrupos que incluyen: interleuquinas (IL), interferones (IFN), factores de necrosis tumoral (TNF), factores de crecimiento, factores estimuladores de colonias (CFS) y quimiocinas.

Durante la activación glial tanto la microglía como los astrocitos producen gran número de citoquinas. En el sistema nervioso central las citoquinas se han relacionado con los efectos neurotóxicos de la activación glial que se da especialmente cuando persisten altos niveles de estas moléculas durante periodos prolongados de tiempo.

2.1. Citoquinas proinflamatorias.

Las citoquinas juegan un papel clave en la neuroinflamación y el estrés oxidativo. Las principales citoquinas proinflamatorias que son las responsables de la activación de iNOS en las células gliales y que aumentan la producción de óxido nítrico son el TNF α , la IL-1 β y el IFN γ (Bhat et al., 1998; Brown and Neher, 2010; Chen et al., 2009; Fisher and Maler, 2015; Kaminska et al., 2009; Saha et al., 2006; Sáinz et al., 2015; Sastre et al., 2006; Sheng et al., 2011). La producción de ON llega a unos niveles que son dañinos para el organismo e inducen modificaciones en proteínas (nitrosilación y nitración), lo que probablemente es uno de los factores causantes de la pérdida neuronal y de la señalización neuronal (Brown, 2010). Debido a este proceso, la activación de iNOS en las células gliales constituye una etapa crítica en las

Capítulo 1. Introducción

enfermedades neurodegenerativas mediadas por la neuroinflamación, proceso debido a la activación de la microglía (Brown, 2007, 2009; Saha and Pahan, 2006).

2.1.1. TNF

TNF α es producido principalmente por la microglía, macrófagos y células T y presenta un papel central en la activación glial. Actúa mediante la unión a dos receptores: TNFI y TNFRII, lo cual inicia las vías de transducción de señales que incluyen la activación de la cascada de MAPK y las translocación del factor NF-kB al núcleo, lo que dará lugar a la activación de la transcripción de un gran número de genes. El TNF α promueve la fagocitosis por parte de la microglía, induce el reclutamiento de los neutrófilos y monocitos mediante la activación de la producción de diferentes quimiocinas y activa la producción de diferentes metaloproteínas (revisado por (Gosselin and Rivest, 2007).

2.1.2. IL-1

La IL-1 es una citoquina implicada en muchas neuropatologías que presenta dos formas, IL-1 α y IL-1 β . La astrogliá, la microglía y la oligodendroglía son capaces de secretar IL-1. La expresión de IL-1R1 ha sido observada en varias regiones del sistema nervioso central, tanto en neuronas como en glía. A este receptor se unen con igual afinidad la IL-1 α y la IL-1 β en asociación con ciertas proteínas accesorias. La IL-1 ejerce acciones durante el desarrollo del sistema nervioso central sobre la proliferación y la diferenciación, y modula la eficacia sináptica de las poblaciones neuronales, especialmente en el hipocampo. La administración de IL-1ra recombinante en el cerebro o en la periferia de roedores provoca una

Capítulo 1. Introducción

inhibición marcada del daño cerebral causado por la isquemia cerebral, lesiones cerebrales o excitotoxinas. Esto sugiere una contribución directa de la IL-1 a la neurodegeneración inducida experimentalmente. En respuesta al daño cerebral, la IL-1 β es la que más rápidamente se expresa dentro de la familia de la IL-1. Se ha observado experimentalmente que la administración de anticuerpos contra IL-1 β es neuroprotectora. La IL-1 induce la producción de otras moléculas inflamatorias como la colagenasa, la fosfolipasa A2 y las prostaglandinas. También estimula la secreción de otras citoquinas como la IL-6, TNF- α , TFG- β y factores estimuladores de colonias(Allan and Rothwell, 2001) (Hanisch, 2002a).

2.1.3. IFN γ

La presencia del IFN γ se relaciona con la activación de las células T y NK (natural killer). Cuenta con receptores tanto en las células gliales como neuronales, tiene un papel central en la regulación de la actividad inmune, ya que su acción sobre la microglía causa la expresión de genes involucrados en el proceso inflamatorio entre los que encontramos receptores de Fc y del complemento, moléculas de adhesión, producción y secreción de citoquinas (TNF α , IL-1, IL-6) y óxido nítrico(Hanisch, 2002a).

El IFN γ induce la síntesis de moléculas de superficie como el MHC II, ICAM- I y moléculas coestimuladoras, lo cual confiere a la microglía la capacidad presentadora de antígeno. Además de sus efectos como activador de la microglía, IFN γ también puede inducir la apoptosis a través de la regulación positiva simultánea de Fas y FasL (Hanisch, 2002a).

Capítulo 1. Introducción

3. Producción de óxido nítrico e iNOS.

El óxido nítrico (ON) es un gas sin carga que puede cruzar fácilmente las membranas biológicas. Es rápidamente desactivado por oxidación con una vida media biológica de unos pocos segundos, limitando así su extensión espacial en los tejidos biológicos (Terpolilli et al., 2012).

En el cerebro el óxido nítrico puede actuar como una molécula de señalización intracelular que regula una gran variedad de procesos fisiológicos (plasticidad sináptica, flujo sanguíneo y desarrollo) o también puede actuar como una molécula citotóxica tanto para organismos patógenos como para las propias células del organismo durante enfermedades.

A concentraciones fisiológicas el óxido nítrico es relativamente poco reactivo y la mayoría de sus acciones fisiológicas son mediadas por su unión a iones Fe^{2+} en el grupo hemo de la guanilato ciclasa soluble, causando su activación y la producción de monofosfato de guanosina cíclico (GMPC). Sin embargo, el ON puede generar otros derivados mucho más reactivos, que en conjunto se conocen como especies reactivas de nitrógeno tales como NO_2^- , $N_2O_3^-$ y aniones peroxinitrito.

La enzima óxido nítrico sintasa (NOS) es la encargada de su síntesis conjuntamente con la L-citrulina a partir del aminoácido L-arginina. Existen tres isoformas de la NOS: la nNOS, que constitutivamente se expresa en neuronas y es activada por calcio/calmodulina, particularmente después de la estimulación de receptores glutamatérgicos tipo NMDA; la eNOS, expresada constitutivamente en células endoteliales cerebrales y algunos astrocitos, es regulada por calcio/calmodulina y fosforilación/desfosforilación, y la iNOS, que normalmente no se expresa en el cerebro sano pero es inducida en las células gliales y endoteliales por citoquinas proinflamatorias, componentes bacterianos o víricos

Capítulo 1. Introducción

y/o hipoxia. Se requiere la presencia de elevados niveles de varias citoquinas para la inducción de iNOS, lo que sugiere que esta isoforma no desempeña su papel en la fisiología normal del sistema nervioso central.

La inducción de la expresión de iNOS es uno de los cambios característicos de la activación glial que ocurre durante la respuesta inflamatoria. La producción de ON como consecuencia de la inducción de esta isoforma en las células gliales se ha observado en la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas. Una vez que se expresa iNOS se producen niveles elevados de ON continuamente, en mayor proporción que los que puede producir nNOS. Hay cierta controversia sobre qué células gliales expresan iNOS en el cerebro de los roedores. Si bien está aceptada su inducción en la microglía activada, no está tan claro en el caso de los astrocitos. También se ha descrito la inducción de iNOS por varios mediadores inflamatorios en oligodendrocitos de roedores, en células endoteliales cerebrales y en fibroblastos.

La neurodegeneración inflamatoria contribuye a una serie de patologías cerebrales. Los mecanismos mediante los cuales la microglía activada y los astrocitos matan las neuronas han sido identificados en los cultivos celulares. Estos mecanismos incluyen la activación del fagocito NADPH oxidasa en microglía y la expresión de iNOS en células gliales. Esta combinación produce la apoptosis a través de la producción de ONOO⁻. El óxido nítrico derivado de NOS inducible (iNOS) también sinergiza con la hipoxia para inducir la muerte neuronal porque el óxido nítrico inhibe la citocromo oxidasa. Esto puede resultar en la liberación de glutamato y excitotoxicidad (Förstermann and Sessa, 2012).

La toxicidad del óxido nítrico se produce normalmente a través de una interacción directa con los diversos restos de proteínas. La toxicidad también puede resultar de la formación de anión peroxinitrito (ONOO⁻), un oxidante

Capítulo 1. Introducción

fuerte y mediador de la lesión tisular después de su combinación con el anión. El óxido nítrico también puede desencadenar la apoptosis directamente o a través de ONOO⁻.

En el cerebro, ON está formado principalmente por nNOS y eNOS. De acuerdo con ello, sirve como un neurotransmisor y neuromodulador, y entre muchas otras funciones, está relacionado con el mantenimiento del flujo sanguíneo cerebral basal. Específicamente, ON ha sido implicado en la autorregulación cerebral y acoplamiento neurovascular. La evidencia más reciente sugiere un papel del ON en la proliferación y diferenciación neuronal. El ON inhibe la proliferación neuronal y la diferenciación en el cerebro en desarrollo. El óxido nítrico ejerce un efecto dual sobre la neurogénesis: Mientras ON derivado de nNOS disminuye la neurogénesis, ON producido por endotelial o inducible NOS parece estimularlo.(Terpolilli et al., 2012).

4. Óxido nítrico y estrés oxidativo.

El estrés oxidativo es un estado en el que el equilibrio entre el sistema de los antioxidantes y el nivel de radicales libres, capaz de dañar los tejidos, se altera (figura 3). La síntesis de radicales libres se produce durante los procesos fisiológicos de oxidación-reducción. Los radicales libres son los siguientes: formas activas de oxígeno (especies reactivas del oxígeno-ROS), formas activas de nitrógeno (RNitrogenS-RNS), los radicales centrados en carbono y los radicales centrados en azufre. ROS es el sistema más importante de radicales libres, porque muestra el doble papel del oxígeno en el organismo (paradoja del

Capítulo 1. Introducción

oxígeno) – este elemento está involucrado en casi en todos los procesos vitales y al mismo tiempo sus formas activas, que conducen a daño de tejidos, también lo contienen-. El peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical superóxido ($O_2 \cdot^-$) y radical hidróxido ($OH \cdot$) pertenecen a ROS. Factores de oxidación que contienen nitrógeno: óxido nítrico (ON), el peroxinitrito ($ONOO \cdot$) y dióxido de nitrógeno (N_2O_2).

El óxido nítrico es capaz de formar radicales hidroxilo (a expensas del electrón desapareado) y convertirse en dióxido de nitrógeno. Durante el mantenimiento del equilibrio, los radicales libres desempeñan funciones importantes en el organismo: protegen a las células contra agentes infecciosos y extraños, sirven como mediadores secundarios en la regulación de la actividad del sistema cardiovascular, están involucrados en procesos tales como el mantenimiento de nivel intracelular de calcio, la fosforilación/desfosforilación de proteínas y la activación de factores de transcripción. El óxido nítrico posee propiedades tanto pro-oxidantes como antioxidantes. Por lo tanto, es capaz de estimular la peroxidación de los lípidos y mediar reacciones de antioxidantes en las membranas celulares al mismo tiempo. ON es capaz de unirse con los radicales peroxilo, interrumpiendo el circuito del proceso oxidativo. Sin embargo, el óxido nítrico libre se puede unir con el superóxido, formando peroxinitrito altamente tóxico. El desequilibrio de antioxidantes y radicales libres conduce a un daño de las estructuras celulares: proteínas, lípidos, ADN (Terpolilli et al., 2012). ON está implicado en la peroxidación y el estrés oxidativo reactivo (Atochin et al., 2015)(Nasyrova et al., 2015).

Capítulo 1. Introducción

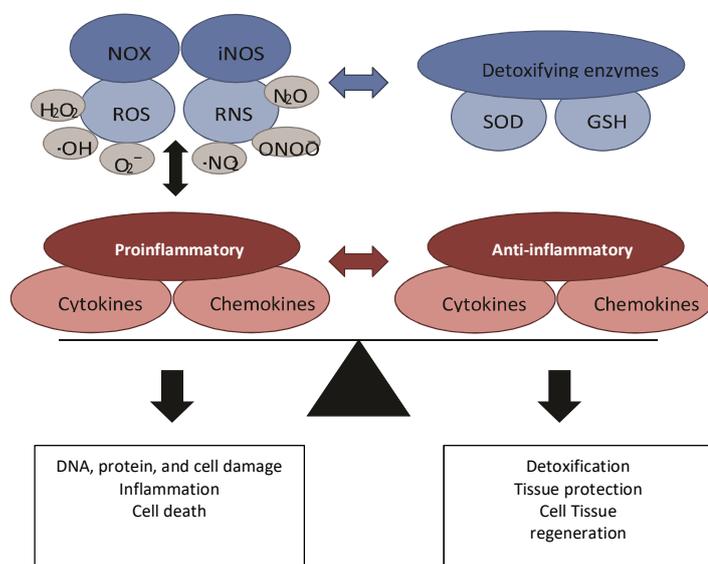


Figura 3. Equilibrio entre mediadores de estrés oxidativo/inflamación y antioxidantes/mediadores antiinflamatorios. En un organismo saludable, mediadores del estrés oxidativo y la inflamación están en equilibrio con el antagonista desintoxicante y moléculas anti-inflamatorias. Durante la enfermedad este equilibrio se desplaza hacia el estrés oxidativo y el sitio pro-inflamatorio, lo que lleva al daño de proteínas y ADN, inflamación, y finalmente la muerte celular (Fischer and Maier, 2015a).

El estrés oxidativo debido a la producción y liberación de ROS después de la lesión mitocondrial y la disfunción excesiva se ha propuesto como un mecanismo patológico general de todas las principales enfermedades neurodegenerativas crónicas incluyendo Alzheimer, Parkinson y esclerosis múltiple, enfermedades inflamatorias predominantes relacionadas con el sistema nervioso central (Fischer and Maier, 2015b).

Capítulo 1. Introducción

5. Neurodegeneración, neuroinflamación y enfermedades neurodegenerativas

La búsqueda de una definición precisa de la neurodegeneración es mucho más ardua de lo que cabría imaginar. Etimológicamente, la palabra se compone del prefijo “neuro” que designa las células nerviosas (es decir, neuronas), y “degeneración”, que se refiere a, en el caso de tejidos u órganos, un proceso de pérdida de estructura o función. Por lo tanto, en el sentido estricto de la palabra, la neurodegeneración corresponde a cualquier condición patológica que afecta principalmente a las neuronas. En la práctica, las enfermedades neurodegenerativas representan un gran grupo de trastornos neurológicos con expresiones clínicas y patológicas heterogéneas que afectan a subconjuntos de neuronas en los sistemas anatómicos funcionales específicos; surge por razones desconocidas y progresa de una manera implacable (Przedborski et al., 2003).

La neurodegeneración es un fenómeno que ocurre en el sistema nervioso central a través de diferentes mecanismos que se asocian con la pérdida de estructura y función neuronal (Chen et al., 2016a), con una reducción de la supervivencia neuronal y el aumento de la muerte neuronal en el SNC (Ransohoff, 2016a), dando como resultado alteraciones funcionales y mentales en el individuo. Todavía no se sabe por qué las neuronas del sistema nervioso central no se regeneran después de los daños. Actualmente, no hay agentes terapéuticos que puedan inducir la regeneración neuronal en las regiones dañadas o afectadas en el cerebro (Kempuraj et al., 2016). Aunque las causas asociadas con la degeneración neuronal siguen siendo poco conocidas, la incidencia de la neurodegeneración aumenta con la edad, en la vida adulta a mediados y finales. Este fenómeno que afecta principalmente a las personas mayores, se produce en enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica (Chen et al., 2016a), entre otras.

Capítulo 1. Introducción

Estudios recientes han demostrado un fuerte vínculo entre la inflamación crónica y la neurodegeneración (Figura 4.). Se ha descrito la activación de procesos inflamatorios en diferentes enfermedades neurodegenerativas como: la enfermedad de Alzheimer, que se caracteriza por la muerte de las células en el hipocampo y la corteza frontal secundaria a la inflamación crónica; la enfermedad de Parkinson en donde la inflamación crónica conduce a la pérdida de receptores dopaminérgicos en la sustancia negra; la esclerosis lateral amiotrófica que es otra condición inflamatoria en la que las neuronas motoras son finalmente destruidas; la esclerosis múltiple que es un trastorno autoinmune en el que las células inflamatorias atacan la vaina de mielina.(Delegge and Smoke, 2016). Aunque la activación de un evento inflamatorio agudo es un mecanismo necesario de autodefensa del sistema nervioso central (SNC) contra antígenos extraños, la activación prolongada de la respuesta inflamatoria puede conducir a inflamación crónica y muerte celular (Campbell, 2004).

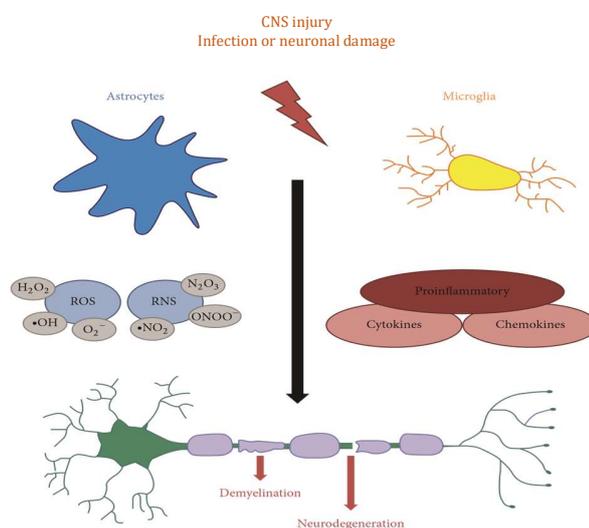


Figura 4. Breve esquema de la neuroinflamación. Esquema de la desmielinización mediada por células del SNC y neurodegeneración. Lesión del SNC, por ejemplo, durante la infección o daño neuronal, se activan los astrocitos y microglía. Esto induce la secreción de ROS, RNS, y citoquinas proinflamatorias y quimiocinas. Estos factores pueden promover la desmielinización y daño axonal, conduciendo finalmente a la neurodegeneración (Fischer and Maier, n.d.)

Capítulo 1. Introducción

La neurodegeneración es modulada por mediadores inflamatorios y neurotóxicos tales como interleucina-1 beta (IL-1 β), IL-6, IL-8, IL-33, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), quimiocinas (CCL2, CCL5), metaloproteinasas (MMPs), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor de maduración de la glía (GMF), sustancia P, especies reactivas de oxígeno (ROS), especies reactivas de nitrógeno (RNS), CD40, CD40L, CD88, elevación de Ca^t intracelular, la activación de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) y factor nuclear kappa-B (NF-kB), entre otros. Microglía, astrocitos, neuronas, células T activadas y mastocitos liberan estos mediadores inflamatorios y modulan la neuroinflamación y la neurodegeneración. Además, las células inmunes e inflamatorias y mediadores inflamatorios de la periferia cruzan la defectuosa barrera hematoencefálica (BHE) aumentando aún más la neuroinflamación.

Factores tales como el proceso normal de envejecimiento, demencia, depresión, trauma, tumores, lesiones cerebrales, hipertensión, diabetes, obesidad, infecciones locales y sistémicas, factores ambientales, toxinas y las drogas pueden iniciar la neuroinflamación en el SNC mediante la activación de la microglía, astrocitos y neuronas en el cerebro. Estos factores también activan células inmunes e inflamatorias tales como células T y mastocitos. La activación de las células gliales y células inflamatorias liberan muchos mediadores proinflamatorios y neurotóxicos y también aumentan la expresión de proteínas receptoras relacionadas con la inflamación en las células cerebrales. Estos mediadores inflamatorios y expresiones de proteínas aumentan aún más la neuroinflamación y la neurodegeneración de una manera viciosa causando enfermedades neurodegenerativas progresivas (Figura 5).

Capítulo 1. Introducción

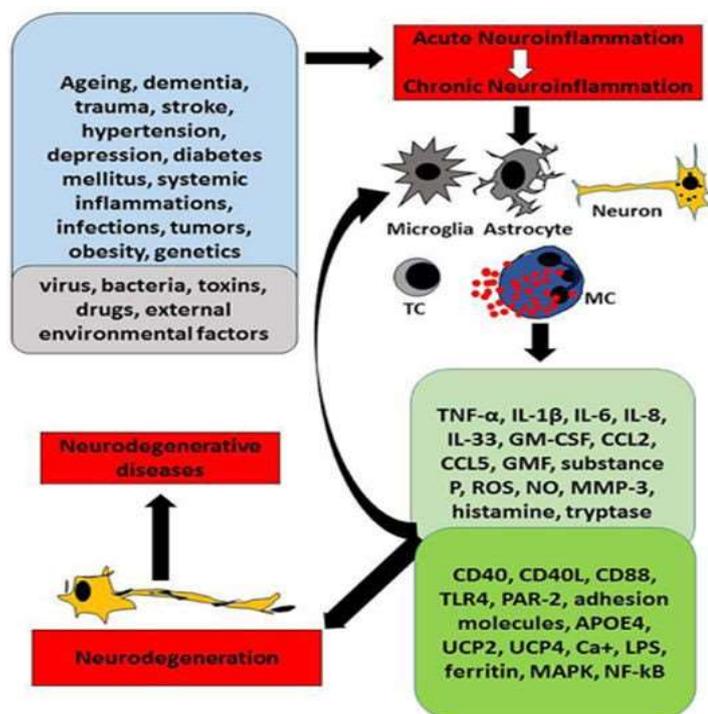


Figura 5. Diagrama esquemático que muestra la neurodegeneración mediada por la neuroinflamación en el cerebro. MC= mastocitos, PAR-2 = proteinasa activadas, Tc = células T, UCPs = receptor de proteínas desacoplantes mitocondriales-2 (Kempuraj et al., 2016)

La neuroinflamación y la disfunción mitocondrial son características comunes de las enfermedades neurodegenerativas crónicas del sistema nervioso central. Ambas condiciones pueden conducir a un aumento del estrés oxidativo por liberación excesiva de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y RNS) que pueden ser nocivas, promover un mayor daño neuronal y la posterior inflamación resultante en un bucle que se autoalimenta y conduce a la neurodegeneración (Fischer and Maier, 2015a).

Capítulo 1. Introducción

5.1. Inflamación en la Enfermedad de Alzheimer

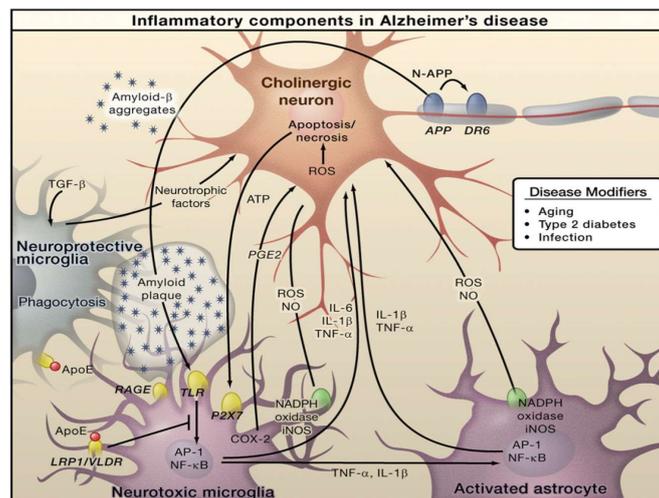


Figura 6. Componentes inflamatorios en la enfermedad de Alzheimer (Glass et al., 2010).

El péptido amiloide- β , producido por la escisión de la proteína precursora amiloide (APP), forma agregados que activan la microglía, en parte mediante la señalización a través de receptores de tipo Toll (TLRs) y RAGE. Estos receptores activan los factores de transcripción NF- κ B y AP-1, que a su vez inducen la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y conducen a la expresión de mediadores inflamatorios tales como citoquinas. Estos factores inflamatorios actúan directamente sobre las neuronas colinérgicas y también estimulan los astrocitos, que amplifican las señales proinflamatorias e inducen efectos neurotóxicos. La apoptosis y la necrosis de las neuronas dan lugar a la liberación de ATP, que activa la microglía a través del receptor P2X7 purinérgico. La microglía también puede desempeñar un papel protector mediando la eliminación de A β a través de mecanismos dependientes de la ApoE y ApoE-independientes. Las neuronas colinérgicas en el cerebro anterior basal, las neuronas que se ven afectados principalmente en enfermedad de Alzheimer, se supone que son objetivos importantes de la toxicidad

Capítulo 1. Introducción

inducida por la inflamación, pero otros tipos de neuronas, tales como glutaminérgicas y neuronas GABAérgicas, también pueden verse afectadas (Glass et al., 2010).

5.2. Inflamación en la enfermedad de Parkinson

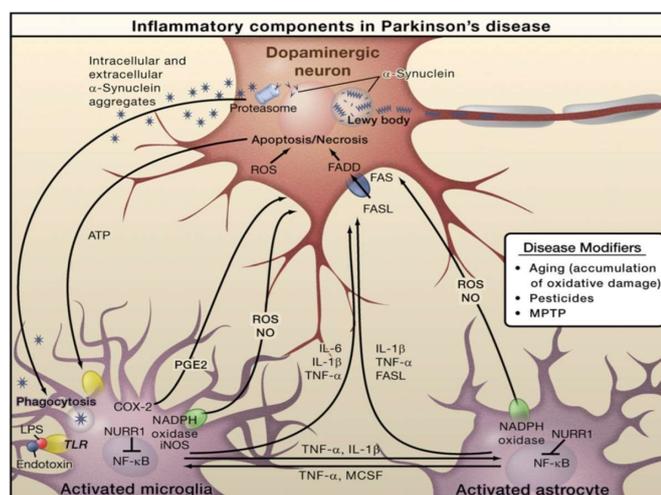


Figura 7. Componentes inflamatorios en la enfermedad de Parkinson (Glass et al., 2010).

Las características neuropatológicas más destacadas de la enfermedad de Parkinson son la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra del mesencéfalo y la presencia de inclusiones intracelulares que contienen agregados de la proteína α -sinucleína, llamados cuerpos de Lewy. Además de formar cuerpos de Lewy, los agregados de α -sinucleína forman oligómeros de estado intermedio que cuando se liberan de las neuronas activan la microglía a través de mecanismos independientes del receptor Toll-like (TLR). Esto conduce a la activación de NF- κ B y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y mediadores proinflamatorios. Estos

Capítulo 1. Introducción

factores actúan directamente sobre las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra, que son las neuronas principales (aunque no las únicas) que mueren en la Enfermedad de Parkinson. Estos factores también activan la microglía, que amplifica la respuesta inflamatoria en un bucle de retroalimentación positiva, lo que conduce a la activación adicional de la microglía. Los productos derivados de microglía y astrocitos actúan de una manera combinada para promover neurotoxicidad. El lipopolisacárido bacteriano (LPS), que actúa principalmente a través de TLR4 expresado por microglía, es suficiente para inducir una respuesta inflamatoria en la sustancia negra que resulta en la pérdida de neuronas dopaminérgicas. El factor de transcripción NURR1 actúa para suprimir las respuestas inflamatorias en microglía y astrocitos mediante la inhibición de genes diana de NF- κ B (Glass et al., 2010).

5.3. Inflamación en la esclerosis lateral amiotrófica.

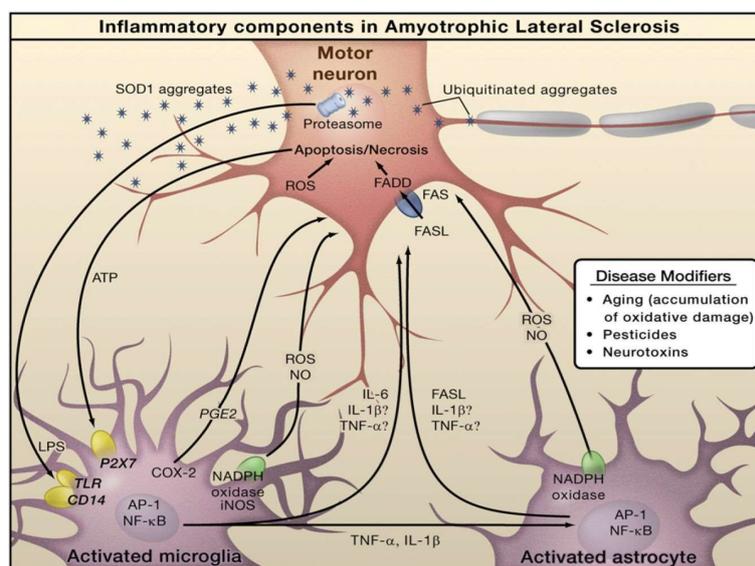


Figura 8. Componentes inflamatorios en la esclerosis lateral amiotrófica (Glass et al., 2010).

Capítulo 1. Introducción

La patología de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) se caracteriza por la degeneración de las neuronas motoras. La esclerosis lateral amiotrófica familiar es causada por mutaciones en el gen SOD1, pero los genes mutados en la ELA esporádica aún no están definidos. La neurodegeneración progresiva de las neuronas motoras en ELA puede resultar de una combinación de vulnerabilidad intrínseca de neuronas motoras a agregados de proteína SOD1 mutante y toxicidad autónoma no celular ejercida por células vecinas. Los agregados tóxicos pueden inducir respuestas inflamatorias por microglía a través del receptor Toll-like 2 (TLR2) y CD14.

La microglía puede inducir la activación de astrocitos mediante la producción de citoquinas. La microglía y astrocitos activados amplifican el daño inicial a las neuronas motoras mediante la activación de AP-1 y NFκB mediante la producción de citoquinas proinflamatorias y moléculas activadoras de apoptosis tales como TNF-α y FASL. TNF-α e IL-1β ejercen efectos neurotóxicos in vitro, pero la delección de los genes individuales no afecta el curso de la enfermedad en un modelo animal. Las neuronas motoras moribundas liberan ATP que puede activar la microglía a través del receptor purinérgico P2X7 expresado por microglía (Glass et al., 2010).

Capítulo 1. Introducción

5.4. Inflamación en la esclerosis múltiple.

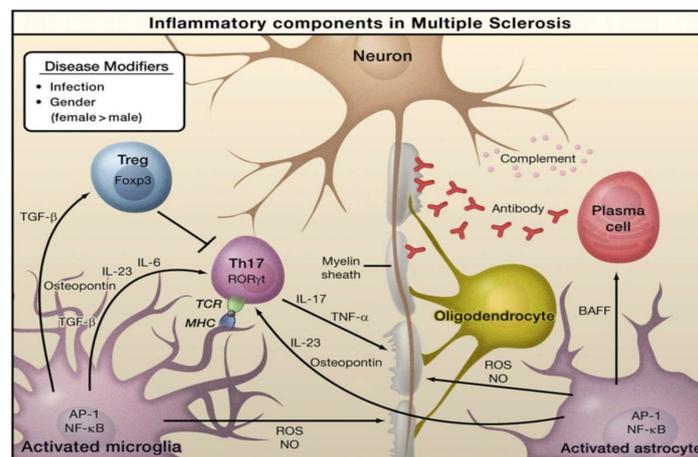


Figura 9. Componentes inflamatorios en la esclerosis múltiple (Glass et al., 2010).

La infección por bacterias o virus u otros estímulos ambientales desencadenan la activación de microglía y astrocitos en la esclerosis múltiple (EM), dando lugar a la producción de citoquinas proinflamatorias mediante la activación de los factores de transcripción NF-κB y AP-1. Las células T vírgenes reconocen el antígeno derivado de la mielina presentado en el contexto de las moléculas de MHC por las células presentadoras de antígeno. En presencia de IL-6 y TGF-β, se induce a las células T vírgenes a expresar el receptor huérfano relacionado con el receptor de ácido retinóico γt (RORγt) y se diferencian en células Th17. La microglía activada y los astrocitos secretan IL-23 y osteopontina, que inducen a las células Th17 a secretar IL-17 y TNF-α, resultando en daño a la vaina de mielina que protege los axones nerviosos. Los astrocitos activados producen BAFF, un factor de supervivencia para las células B autorreactivas, que se diferencian en células plasmáticas y producen anticuerpos anti-mielina. La microglía y astrocitos activados son también fuentes de especies reactivas de oxígeno (ROS) y óxido nítrico (ON), que contribuyen a la destrucción de la vaina de mielina y de las propias neuronas. Las células T

Capítulo 1. Introducción

reguladoras (Treg) que expresan Foxp3 suprimen la actividad de las células Th17 y así ayudan a suprimir la inflamación (Glass et al., 2010).

6. Ácidos Grasos

Un ácido graso es una biomolécula de naturaleza lipídica formada por una cadena hidrocarbonada, de diferente longitud o número de átomos de carbono, en cuyo extremo hay un grupo carboxilo. En general se puede formular un ácido graso genérico como: R-COOH, donde “R” es la cadena hidrocarbonada que identifica el ácido en particular.

Los ácidos grasos forman parte de los fosfolípidos y glucolípidos, moléculas que constituyen la bicapa lipídica de todas las membranas celulares. En el ser humano, la mayoría de los ácidos grasos se encuentran en forma de triglicéridos, que se almacenan en el tejido adiposo.

Los ácidos grasos raras veces aparecen de forma libre en la naturaleza y casi siempre están unidos a otras moléculas por su grupo hidrófilo de la cabeza de ácido carboxílico. Los ácidos grasos aparecen principalmente como cadenas hidrocarbonadas no ramificadas con un número par de átomos de carbono y se clasifican según el número de átomos de carbono, el número de dobles enlaces y la posición de los dobles enlaces en la cadena.

6.1. Clasificación de los ácidos grasos.

Los ácidos grasos de la dieta más comunes se subdividen en tres grupos según el grado de insaturación: los ácidos grasos saturados (AGS) no poseen dobles enlaces,

Capítulo 1. Introducción

los ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) poseen un doble enlace y los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) poseen dos o más dobles enlaces.

Tanto la longitud de la cadena carbonada como la presencia y localización de las insaturaciones caracterizan las propiedades físicas de los AG, como su punto de fusión y su fluidez. Estas propiedades son muy importantes para la fisiología del organismo. Desde un punto de vista bioquímico, la posición de los dobles enlaces respecto al final de la cadena es muy importante por tratarse de una estructura muy conservada en las rutas metabólicas.

Los seres humanos almacenan la grasa principalmente en forma de ácidos grasos saturados: palmítico y esteárico. Las membranas celulares deben ser estables y flexibles y para conseguirlo los fosfolípidos de la membrana contienen un AGS y un ácido graso muy poliinsaturado.

6.1.1. Ácidos grasos saturados

En un ácido graso saturado (AGS), todos los puntos de unión de los átomos de carbono no unidos a otro átomo de carbono están unidos a hidrógeno y, por tanto, están saturados. No hay dobles enlaces entre los átomos de carbono y se clasifican en cuatro subgrupos según la longitud de su cadena: corta, media, larga o muy larga.

- Ácidos grasos de cadena corta: de 3 a 7 átomos de carbono.
- Ácidos grasos de cadena media: de 8 a 13 átomos de carbono.
- Ácidos grasos de cadena larga: de 14 a 20 átomos de carbono.
- Ácidos grasos de cadena muy larga: con 21 o más átomos de carbono.

Capítulo 1. Introducción

En la Tabla 1. Se muestran algunos de los AGS más comunes en la dieta, los cuales proceden principalmente de grasas animales y lácteas. También se han observado niveles considerables de AGS en algunos aceites tropicales, especialmente en los aceites de palma y de coco.

Tabla 1. Ácidos grasos saturados comunes en grasas y aceites de la dieta.

Nombre común	Nombre sistemático	Abreviatura	Fuentes principales
Butírico	butanoico	C4:0	Grasa láctea
Caproico	hexanoico	C6:0	Grasa láctea
Caprílico	octanoico	C8:0	Grasa láctea, aceites de coco y de palma.
Cáprico	decanoico	C10:0	Grasa láctea, aceites de coco y de palma.
Láurico	dodecanoico	C12:0	Aceite de coco, aceite de palma.
Mirístico	tetradecanoico	C14:0	Grasa láctea, aceite de coco, aceite de palma.
Palmítico	hexadecanoico	C16:0	La mayoría de grasas y aceites.
Estéarico	octadecanoico	C18:0	La mayoría de grasas y aceites.
Araquídico	eicosanoico	C20:0	Aceite de cacahuete.
Behénico	docosanoico	C22:0	Aceite de cacahuete.
Lignocérico	tetracosanoico	C24:0	Aceite de cacahuete.

6.1.2. Ácidos grasos insaturados

Estos ácidos también se clasifican en tres subgrupos según la longitud de su cadena: corta, larga o muy larga:

- Ácidos grasos insaturados de cadena corta: con 19 o menos átomos de carbono.
- Ácidos grasos insaturados de cadena larga: de 20 a 24 átomos de carbono.
- Ácidos grasos insaturados de cadena muy larga: con 25 o más átomos de carbono.

Capítulo 1. Introducción

6.1.2.1. Ácidos grasos monoinsaturados (AGMI)

Un ácido graso monoinsaturado (AGMI) contiene un doble enlace en su estructura. En la naturaleza existen más de un centenar de AGMI, pero la mayoría son componentes poco comunes. El ácido oleico (OA) es el AGMI más común y está presente en cantidades considerables en fuentes tanto de origen animal como vegetal. En la Tabla 2 se muestran los AGMI más comunes en la dieta.

Tabla 2. Algunos ácidos grasos monoinsaturados en grasas y aceites

Nombre común	Nombre sistemático	Abreviatura delta	Fuentes principales
Palmitoleico	<i>cis</i> -9-hexadecenoico	16:1 Δ 9c (9c-16:1)	Aceites de origen marino, aceite de macadamia, la mayoría de aceites animales y vegetales.
Oleico	<i>cis</i> -9-octadecenoico	18:1 Δ 9c (9c-18:1) (OA) especialmente	Todos los aceites y grasas, aceite de oliva, el aceite de canola, los aceites de girasol y cártamo ricos en ácido oleico.
<i>cis</i> -Vaccénico	<i>cis</i> -11-octadecenoico	18:1 Δ 11c (11c-18:1)	La mayoría de aceites vegetales.
Gadoleico	<i>cis</i> -9-eicosenoico	20:1 Δ 9c (9c-20:1)	Aceites de origen marino
	<i>cis</i> -11-eicosenoico	20:1 Δ 11c (11c-20:1)	Aceites de origen marino
Erúcido	<i>cis</i> -13-docosenoico	22:1 Δ 13c (13c-22:1)	Aceite de semilla de mostaza, aceite de colza rico en ácido erúcido.
Nervónico	<i>cis</i> -15-tetracosenoico	24:1 Δ 15c (15c-24:1)	Aceites de origen marino

6.1.2.2. Ácidos grasos poliinsaturados (AGPI)

Los ácidos grasos poliinsaturados contienen dos o más dobles enlaces. Los AGPI naturales, con dobles enlaces separados por un metileno y de configuración *cis* pueden dividirse en 12 familias diferentes: pueden comprender entre dobles enlaces situados en la posición n-1 hasta la n-12 (Gunstone, 1999). Las familias más

Capítulo 1. Introducción

importantes, por lo que se refiere al grado de frecuencia y la salud y nutrición humana, son la n-6 y la n-3. En la Tabla 3 y 4 aparecen enumerados los miembros de estas familias.

Tabla 3. AGPI n-6 importantes a nivel nutricional

Nombre común	Nombre sistemático	Abreviatura omega componente en cantidad mínima de tejidos animales	Fuentes principales
Ácido linoleico	ácido <i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12 -octadecadienoico	18:2n-6 (LA)	la mayoría de aceites vegetales
Ácido γ -linolénico	ácido <i>cis</i> -6, <i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12 -octadecatrienoico	18:3n-6 (GLA)	aceites de semillas de onagra, borraja y grosella negra
Ácido dihomo- γ -linolénico	ácido <i>cis</i> -8, <i>cis</i> -11, <i>cis</i> -14 -eicosatrienoico	20:3n-6 (DHGLA)	componente en cantidad mínima de tejidos animales
Ácido araquidónico	ácido <i>cis</i> -5, <i>cis</i> -8, <i>cis</i> -11, <i>cis</i> -14- eicosatetraenoico	20:4n-6 (AA)	grasas animales, hígado, lípidos del huevo, pescado
Ácido docosatetraenoico	ácido <i>cis</i> -7, <i>cis</i> -10, <i>cis</i> -13, <i>cis</i> -16- docosatetraenoico	22:4n-6	componente en cantidad mínima de tejidos animales
Ácido docosapentaenoico	ácido <i>cis</i> -4, <i>cis</i> -7, <i>cis</i> -10, <i>cis</i> -13, <i>cis</i> -16-docosapentaenoico	25:5n-6 (DPA)	componente en cantidad mínima de tejidos animales

Tabla 4. AGPI n-3 Importantes a nivel nutricional

Nombre común	Nombre sistemático	Abreviatura omega	Fuentes principales
Ácido α -linolénico	ácido <i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12- <i>cis</i> -15 -octadecatrienoico	18:3n-3 (ALA)	aceites de lino, perilla, canola y soja
Ácido estearidónico	ácido <i>cis</i> -6, <i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12, <i>cis</i> - 15- octadecatetraenoico	18:4n-3 (SDA)	aceites de pescado, aceite de soja modificado genéticamente, aceite de semilla de grosella negra y aceite de cáñamo
Ácido eicosapentaenoico	ácido <i>cis</i> -5, <i>cis</i> -8, <i>cis</i> -11, <i>cis</i> - 14, <i>cis</i> -17-eicosapentaenoico	20:5n-3 (EPA)	pescado, especialmente el azul (salmón, arenque, anchoa, eperlano y caballa)
Ácido docosapentaenoico	ácido <i>cis</i> -7, <i>cis</i> -10, <i>cis</i> -13, <i>cis</i> -16, <i>cis</i> -19 -docosapentaenoico	22:5n-3 (n-3 DPA)	pescado, especialmente el azul (salmón, arenque, anchoa, eperlano y caballa)
Ácido docosahexaenoico	ácido <i>cis</i> -4, <i>cis</i> -7, <i>cis</i> -10, <i>cis</i> -13, <i>cis</i> -16, <i>cis</i> -19 -docosahexaenoico	22:6n-3 (DHA)	pescado, especialmente el azul (salmón, arenque, anchoa, eperlano y caballa)

Capítulo 1. Introducción

El ácido linoleico (LNA) es el ácido graso esencial primario o generador de la familia n-6. Posee 18 átomos de carbono y dos dobles enlaces. Además, el primer doble enlace se encuentra a 6 átomos de carbono del extremo metilo de la cadena de ácidos grasos, y este es el motivo de que se denomine n-6. El LNA puede ser desaturado y alargado en humanos para formar series de AGPI n-6.

El ácido α -linolénico (ALA) es el ácido graso esencial primario o generador de la familia n-3. Cuenta igualmente con 18 átomos de carbono, pero posee tres dobles enlaces. A diferencia del LNA, el primer doble enlace del ALA se encuentra en el tercer átomo de carbono partiendo del extremo metilo de la cadena de ácidos grasos, y de ahí el nombre de n-3 (Figura 10). Al igual que el LNA, el ALA también puede ser desaturado y alargado para formar series de AGPI n-3.

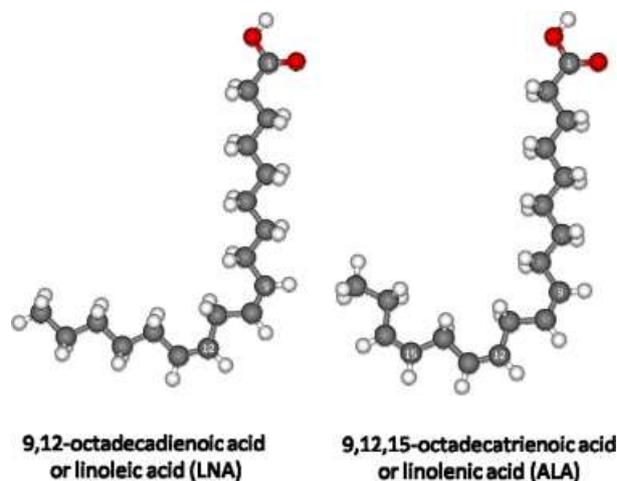


Figura 10. Modelo de la estructura molecular del ácido linoléico y el ácido linolénico (Barceló-Coblijn and Murphy, 2009).

Solo las plantas (incluido el fitoplancton marino) pueden sintetizar ácidos grasos omega-6 y omega-3. Los animales, incluidos los seres humanos, solo pueden colocar

Capítulo 1. Introducción

dobles enlaces en una situación tan baja como el carbono 9 y, por tanto, no pueden sintetizar ácidos grasos omega-6 y omega-3. Pero los seres humanos pueden desaturar y elongar el ácido linoleico (18:2 n-6) para obtener ácido araquidónico (20:4 n-6), y el ácido alfa-linolénico (ALA) (C18:3 omega-3) para obtener ácido eicosapentaenoico (EPA) (C20:5 omega-3) y ácido docosahexaenoico (DHA) (C22:6 omega-3). Por consiguiente, tanto el ácido linoleico (LNA) (18:2 n-6) como el ALA (C18:3 w-3) son esenciales en la dieta. Un ácido graso esencial es cualquiera perteneciente a las familias de los ácidos grasos w-6 y w-3.

Diferentes estudios, tanto in vitro como in vivo, han demostrado que estas dos familias de AGPI no sólo comparten para su síntesis las enzimas que desaturan y elongan, sino que también compiten por ellas (Barceló-Coblijn and Murphy, 2009). Así pues, el equilibrio se puede desplazar hacia un lado o hacia el otro en función de la ingesta de precursores, ácido linoleico (LNA) en el caso de los omega-6 y ALA en el caso de los omega -3.

El ácido linoléico, el ácido araquidónico y el ácido docosahexaenoico son los ácidos grasos predominantes en los fosfolípidos celulares, por esta razón son tan importantes a nivel biológico debido a que determinan la fluidez de las membranas y, por tanto, el comportamiento de las enzimas y receptores de éstas (Jump, 2002). Ambos AG esenciales (LNA y ALA) se metabolizan a otros más insaturados a partir de una serie alternada de reacciones específicas llevadas a cabo por elongasas y desaturasas. Estas enzimas específicas están localizadas en el retículo endoplasmático y en los peroxisomas de las células. Las dos vías metabólicas (Figura 11), la de los AGPI n-3 y la de los AGPI n-6, utilizan los mismos complejos enzimáticos para sus transformaciones; es por esto que existe una competencia entre ellos por las enzimas específicas en cada reacción. La enzima $\Delta 6$ -desaturasa posee mayor afinidad por los AGPI n-3 que por los AGPI n-6. Esta enzima se

Capítulo 1. Introducción

reconoce como la limitante de estas reacciones y algunas evidencias señalan que su actividad decrece con la edad (Rueda et al., 2011).

La mayor afinidad de la enzima $\Delta 6$ -desaturasa por los AGPI n-3 hace que se requieran cantidades mucho mayores de éstos para mantener una velocidad de síntesis adecuada a los requerimientos del organismo.

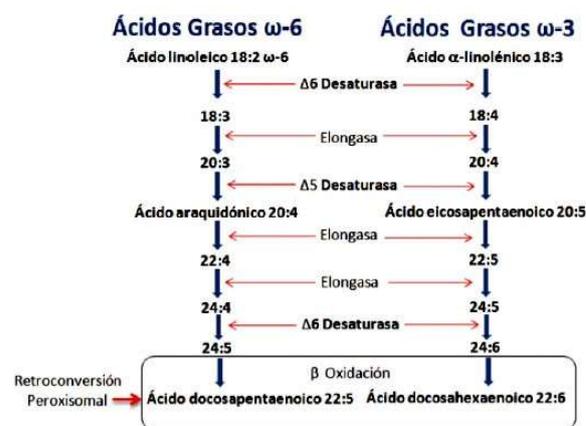


Figura11. Visión general de la elongación y desaturación de los ácidos grasos n -6 y n -3 (Valenzuela B et al., 2011).

El LNA y el ALA se encuentran en todas las grasas de la dieta y presentan mayores proporciones en la mayoría de los aceites vegetales (White, 2007). El ALA se encuentra sobre todo en las plantas y presenta mayores concentraciones en algunas semillas y frutos secos y en algunos aceites vegetales. El ácido araquidónico (AA) es el AGPI n-6 más importante de todos los ácidos grasos n-6 porque es el precursor principal de los eicosanoides derivados de la familia n-6. El AA se encuentra en menor cantidad en carnes, huevos, pescado, algas y otras plantas acuáticas (Wood et al., 2008) (Ackman, 2008).

El ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA) son los ácidos grasos n-3 más importantes de la nutrición humana. El EPA y el DHA son

Capítulo 1. Introducción

componentes de los lípidos marinos. De hecho, la caballa, el salmón, la sardina, el arenque y el eperlano son fuentes muy ricas en EPA y DHA (Ackman, 2008). Los aceites de pescado que contienen un 60 % de EPA y DHA se venden como fuentes de estos importantes ácidos grasos n-3.

En esta tesis nos centraremos en el efecto anti o pro-inflamatorio de un ácido saturado: ácido palmítico (AP) y dos ácidos grasos poliinsaturados: ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA).

6.2. Ácidos grasos, inflamación y enfermedades neurodegenerativas.

6.2.1. Acido palmítico

El ácido palmítico o ácido hexadecanoico, es un ácido graso saturado de cadena larga, formado por dieciséis átomos de carbono. Su fórmula química es $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$.

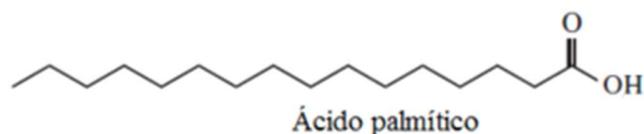


Figura 12. Estructura del ácido palmítico.

El ácido palmítico es el principal ácido graso saturado de la dieta, constituyendo aproximadamente un 60% de los mismos. Es el más abundante en las carnes (detrás del ácido oléico, que es monoinsaturado), grasas lácteas (mantequilla, queso y nata) y en los aceites vegetales como el aceite de coco y el aceite de palma.

Capítulo 1. Introducción

El ácido palmítico puede ser proporcionado en la dieta o sintetizado endógenamente a partir de otros ácidos grasos, hidratos de carbono y algunos aminoácidos. Aunque a menudo se considera como un componente de triglicéridos del tejido adiposo, el ácido palmítico es también abundante en lípidos de membrana (Innis, 2016). A pesar de que a menudo se considera que tiene efectos adversos sobre las enfermedades crónicas en adultos, el ácido palmítico es un componente esencial de las membranas celulares, lípidos secretores y de transporte, con papeles cruciales en palmitoilación de proteínas y moléculas de señal palmitoilada (Agostoni et al., 2016).

Diversos estudios han demostrado que el ácido palmítico está relacionado con la inflamación en diferentes órganos, incluido el cerebro (Gupta et al., 2012a) (Wu et al., 2014) (Wang et al., 2014) (Wong et al., 2014) (Cayla M. Duffy et al., 2015) (Dumas et al., 2016). Induce moléculas inflamatorias, tales como el factor de necrosis tumoral (TNF- α), interleuquina (IL) -1 β , IL-6, proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1), genera la formación de especies reactivas de oxígeno y el factor inhibidor de macrófagos a través del receptor 4 similar a toll (TLR4), y regula la inflamación de diversos órganos a través del reclutamiento de macrófagos. Al parecer el ácido palmítico también está relacionado con la activación de la inflamación a través de la vía AMPK-ROS (Tashiro et al., 2017).

Específicamente en el cerebro se ha demostrado que el ácido palmítico puede desencadenar la inflamación en macrófagos cultivados (Laine et al., 2007a), y modular el procesamiento de amiloide en las neuronas y astrocitos (Patil and Chan, 2005a) (Patil et al., 2006a).

Algunos estudios han demostrado que la exposición a ácido palmítico aumenta la expresión de citoquinas pro-inflamatorias IL-6, TNF- α , y óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), óxido nítrico y especies reactiva de oxígeno en células microgliales (Martins de Lima-Salgado et al., 2011) (Cayla M Duffy et al., 2015a).

Capítulo 1. Introducción

El ácido palmítico estimula la vía TLR4 y activa la fosforilación y translocación nuclear de la subunidad p65 de NF-κB para desencadenar la producción de mediadores pro-inflamatorios que pueden contribuir a la muerte neuronal. (Wang et al., 2012a)(Cayla M. Duffy et al., 2017).

Dosis altas de ácido palmítico (400 M) disminuyen significativamente la conversión de MTT a formazán, lo que sugiere que esta dosis de ácido palmítico induce algún grado de disfunción mitocondrial o citotoxicidad en astrocitos. También se ha observado que el ácido palmítico aumenta la fosforilación de p38 y p42 / p44 MAPK en cultivo de astrocitos (Gupta et al., 2012a) .

En general, en diversos estudios se ha observado que la ingesta moderada o elevada de grasas saturadas como el ácido palmítico incrementa el riesgo de padecer enfermedades neurodegenerativas (Morris and Tangney, 2014). Una dieta rica en ácido graso puede provocar resistencia a la insulina, obesidad, inflamación, pérdida de memoria (Petrov et al., 2015c), conduciendo al desarrollo de estas patologías por diversos mecanismos como la aterosclerosis, el estrés oxidativo o la inflamación, además de existir evidencia de que al parecer los ácidos grasos saturados ingeridos durante la juventud o la mediana edad se asocian con una peor función cognitiva global, alteraciones en la memoria prospectiva y una mayor vulnerabilidad a los déficits relacionados con la edad y las enfermedades neurodegenerativas(Eskelinen et al., 2008)(Solfrizzi et al., 2011)(Tolppanen et al., 2014).

6.2.2. Ácidos grasos omega 3: ácido docosahexaenoico y ácido eicosapentaenoico

El ácido docosahexaenoico y el ácido eicosapentaenoico son ácidos grasos esenciales poliinsaturados de la serie omega 3. El DHA contiene 22 átomos de carbono y 6

Capítulo 1. Introducción

insaturaciones o dobles enlaces (C22:6n-3) y el EPA contiene 20 átomos de carbono y cinco insaturaciones o dobles enlaces (C20:5n-3).

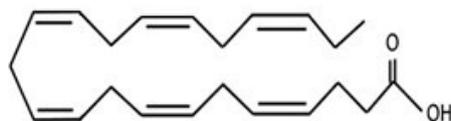


Figura 13. Estructura química del ácido docosahexaenoico DHA.

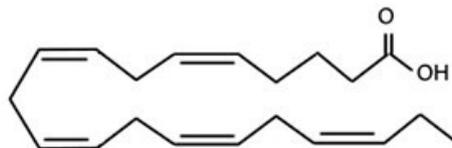


Figura 14. Estructura química del ácido eicosapentaenoico EPA.

El DHA y el EPA se pueden obtener mediante la ingesta alimentaria o la conversión endógena de los precursores LNA y ALA, los cuales requieren las mismas enzimas de conversión (Janssen and Kiliaan, 2014). La ruta biosintética de los seres humanos no parece proporcionar un nivel suficiente de ALA para que éste sustituya al EPA y al DHA de la dieta. Sólo se alcanzan grandes niveles de EPA y DHA en la sangre u otras células cuando éstos son incorporados como tales en la dieta.

Las principales fuentes alimentarias de AGPI omega-3 son el pescado azul y el marisco. En estos productos, los AGPI omega-3 se encuentran de manera natural y las mejores fuentes son el salmón, sardinas, atún, arenque y trucha. Actualmente existe una gran cantidad de alimentos enriquecidos con EPA y / o DHA de cualquiera de las fuentes marinas o algas llamados “*alimentos funcionales*”: los ejemplos incluyen leches de soja y jugos, aceites de cocina, pastas para untar, productos de

Capítulo 1. Introducción

aperitivo e incluso palitos de pescado, en donde el enriquecimiento se encuentra en el empanado. La disponibilidad de alimentos funcionales varía según la región (Mataix Verdu et al., 2009)(Vannice et al., 2014).

A diferencia del resto de grasas alimentarias, los AGPI incorporados mediante la dieta no suelen consumirse de manera oxidativa para la producción de energía, sino que su destino preferente es la incorporación en las membranas celulares, condicionando el papel fisiológico y funcional de ésta en lo que se refiere a la función de reconocimiento celular, transmisión de señales, transporte de nutrientes y metabolitos y diversas actividades enzimáticas. Estas funciones son debidas en gran parte a la modificación de la fluidez de la membrana.

La fluidez de membrana se refiere a la capacidad de movimiento molecular de la membrana, y es una característica propia de la membrana celular que está totalmente condicionada por su composición en ácidos grasos. Dependiendo de la estructura química de los ácidos grasos, estos ácidos ocupan más o menos espacio dentro de la bicapa. Así los AG de tipo saturado se disponen de una manera muy empaquetada con muy poco movimiento, mientras que los AGPI ocupan más espacio y son más móviles, aumentando así la fluidez de la membrana. Cuando se ingiere EPA y DHA, estos ácidos grasos reemplazan a los ácidos grasos omega 6, especialmente el AA, en las membranas celulares.

La mayoría de respuestas inflamatorias normales, siguen un proceso que puede dividirse en tres fases: 1) iniciación, 2) escalado y mantenimiento y 3) resolución. Algunos mediadores químicos normales son responsables de llevar a cabo estas tres fases. Mientras algunos mediadores químicos inician y mantienen la respuesta inflamatoria (leucotrienos, factor activador de plaquetas (PAF), citoquinas), otros deberían revertir y resolver dicha respuesta (resolvinas, docosatrienos y lipoxinas). Cuando esta respuesta inflamatoria está alterada y no se produce la resolución de

Capítulo 1. Introducción

las misma (como es el caso de las enfermedades inflamatorias), la inflamación seguirá indefinidamente convirtiéndose en un proceso crónico.

Los Eicosanoides son mediadores bioactivos y precursores de las prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos. Se consideran sustancias similares a las hormonas, ya que se producen cuando se estimulan, son utilizados y metabolizados rápidamente, y no se almacena en las células. Las prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos están implicados con una gran cantidad de actividades fisiológicas y homeostáticas, incluyendo la modulación de la inflamación, la agregación plaquetaria, el crecimiento celular y la proliferación, contracción del músculo liso, la vasoconstricción y la vasodilatación. Los eicosanoides (prostaglandinas y leucotrienos) derivados del metabolismo del AA, poseen características proinflamatorias mientras que los derivados de ácidos grasos poliinsaturados cadena larga omega-3 (n-3) disminuyen la producción de los mediadores proinflamatorios (Rueda et al., 2011).

Los metabolitos oxigenados derivados del EPA y del DHA, es decir, las 'resolvinas' o 'docosatrienos', juegan un papel significativo ya que poseen una potente actividad antiinflamatoria e inmunoreguladora a concentraciones del rango nanomolar y picomolar. Los compuestos derivados de EPA son designados resolvinas de la serie E, mientras que los que provienen del DHA como precursor, se denominan resolvinas, docosatrienos o protectinas ('neuroprotectinas') de la serie D (Serhan et al., 2002)(Serhan et al., 2004).

Las lipoxinas y epi-lipoxinas derivados del AA y las resolvinas y docosatrienos, derivados de EPA y DHA, aparecen como miembros de los mediadores lipídicos endógenos, que se ponen en marcha en la fase de resolución de la respuesta inflamatoria. Las resolvinas y neuroprotectinas, derivados de EPA y DHA, respectivamente, son una nueva clase de moduladores que parecen tener actividad anti-inflamatoria y neuroprotectora.

Capítulo 1. Introducción

Estudios han demostrado que el DHA y EPA ejercen efectos protectores, incluyendo actividad antiinflamatoria y anti-apoptótica, en diferentes modelos experimentales, al parecer debido a que los ácidos grasos omega-3 compiten con el ácido araquidónico (AA), que es el principal representante de los AGPI de la familia omega-6. AA es el precursor de las prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos, que tienen efectos proinflamatorios, mientras que los omega-3 son precursores de protectinas y resolvinas que tienen efectos antiinflamatorios (Mori et al., 2017).

EPA y DHA también están involucrados con la expresión génica, la actividad de citoquinas, la señalización celular y la modulación inmune. Las prostaglandinas producidas a partir de EPA funcionan como vasodilatadores y anti-agregadores.

El DHA es un componente estructural de las membranas de glóbulos rojos y existe en concentraciones más altas en el tejido de retina, células neuronales, hígado y testículos (Vannice et al., 2014).

En el cerebro el DHA es esencial en tejidos neuronales, especialmente en las membranas neuronales y sinápticas, oligodendrocitos, y también partículas subcelulares tales como la mielina y terminaciones nerviosas (Thomas et al., 2015). Aunque es el mayor representante de los omega-3 en el sistema nervioso, donde compone más del 30% de la cantidad total de fosfolípidos de las membranas neuronales y la retina (Niemoller and Bazan, 2010), no es solo un componente de la estructura de la membrana, sino que también es un modulador de procesos cruciales neuroquímicos, de expresión génica, de plasticidad sináptica, de formación de la memoria y de la concentración de calcio extracelular (Sergeeva et al., 2005)(Crawford, 2006)(McNamara and Carlson, 2006)(Calder, 2009)(Grntal et al., 2009).

Las resolvinas y protectinas provenientes de los AGPI omega-3, a diferencia de las prostaglandinas y las lipoxinas provenientes de los AGPI omega-6, desactivan

Capítulo 1. Introducción

algunos factores de transcripción, entre los que se encuentra NF- κ B (del inglés Nuclear Factor K β).

Cuando el NF- κ B no se activa, se inhibe la expresión de múltiples genes que codifican proteínas relacionadas con la inflamación. La inhibición de este factor de transcripción se traduce en la disminución de algunas citoquinas proinflamatorias y moléculas de adhesión.

Una de las vías que explica la inhibición del NF- κ B es el hecho de que el DHA sea un ligando directo del receptor nuclear PPAR γ (del inglés Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ), el cual, al igual que las resolvinas y protectinas, inactiva NF- κ B (Calder, 2009) (Rueda et al., 2011). DHA y EPA son capaces de suprimir la excesiva respuesta inflamatoria mediada a través de la vía TLR4/NF κ B (Zhang et al., 2015a) (Hwang et al., 2016).

También se ha observado que la neuroprotección que proporcionan los ácidos grasos omega-3 (DHA y EPA) está asociada con reducciones de microglía activada y astrocitos en el cuerpo estriado, y la densidad de las neuronas iNOS-Inmunorreactivas. La incorporación de estos ácidos grasos en las neuronas y células gliales puede conducir a una potente acción antioxidante, neuroprotectora, y efecto antiinflamatorio, lo cual puede ser útil para prevenir o ralentizar la progresión de enfermedades neurodegenerativas (Mori et al., 2017). Los omega 3 (EPA y DHA) aumentan A β -degradación al afectar la enzima degradadora de insulina (IDE), la principal enzima beta-degradante secretada en el espacio extracelular de las células neuronales y microgliales. La identificación de los mecanismos moleculares reveló que EPA aumenta directamente la actividad enzimática de IDE y eleva la expresión de genes de IDE. DHA también estimula directamente la actividad de la enzima IDE y afecta la clasificación de IDE al aumentar la liberación del exosoma de IDE, que resulta en una mayor A β -degradación en el medio extracelular (Grimm et al., 2016). Estudios han demostrado que la regulación de la neuroprotectina D1 (sintetizado a

Capítulo 1. Introducción

partir de DHA) promueve la regulación homeostática de la integridad de los circuitos neuronales (Bazan et al., 2013), es capaz de regular a la baja la señalización inflamatoria a través de la regulación de COX-2, además de disminuir la ruta amiloidogénica (Zhao et al., 2011)(Veszelka et al., 2013a), lo que subraya el potencial de este mediador de lípidos para rescatar células del cerebro humano en las primeras etapas de las neurodegeneraciones.

Aunque una comprensión detallada de los mecanismos implicados en el papel de omega-3 para la salud en el sistema nervioso central (SNC) todavía no se ha dilucidado, un papel tanto para la modulación inflamatoria y un impacto directo en la fluidez de membrana neuronal y la función del receptor, es aparente. Al menos parcialmente a través de estos mecanismos, los bajos niveles de ácidos grasos omega-3 se han asociado con trastornos relacionados con el SNC tales como la mala cognición, depresión, trastornos de ansiedad, un mal control de la ira, trastorno por déficit de atención con hiperactividad (ADHD) y la neurodegeneración (Grant and Guest, 2016).

Los ácidos grasos omega 3 (n-3) son esenciales para un buen envejecimiento y aparecen como potenciadores cognitivos ideales para ser implementados en las intervenciones nutricionales para la promoción del envejecimiento saludable (Cutuli, 2017).

En general, se observa que los ácidos grasos omega-3 tienen efectos anti-oxidantes, anti-inflamatorios, y efectos anti-apoptosis, lo que lleva a la protección de la neurona en el cerebro (Su, 2010). Sin embargo, se requiere más investigación para comprender a fondo las dianas moleculares y celulares sobre las cuales actúan los omega3 (n-3) en el sistema nervioso central.

Capítulo 1. Introducción

7. Melatonina

La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) se produce principalmente por la glándula pineal. Estudios previos han encontrado que la melatonina tiene una diversa actividad farmacológica, que incluyen desde la anti-oxidación, anti-inflamación, hasta efectos anti-apoptóticos. La presencia de receptores de melatonina en numerosos tejidos, y el descubrimiento de las propiedades antioxidantes y anti-inflamatorias la reclasifican, pasando de ser exclusivamente una hormona a la de una molécula de multitarea (Acuña-Castroviejo et al., 2014).

Aunque la glándula pineal es la principal fuente de secreción de esta hormona, estudios la han detectado en una variedad de tejidos y órganos, incluyendo el timo, el bazo, corazón, músculo esquelético, hígado, estómago, intestino, placenta, testículos, ovarios, corteza cerebral y cuerpo estriado (Stefulj et al., 2001)(Sanchez-Hidalgo et al., 2009). La síntesis de melatonina se produce en la glándula pineal y tejidos extra-pineales. En todos los tejidos, la melatonina es producida a partir de triptófano a través de la serotonina(Acuña-Castroviejo et al., 2014).

La melatonina en el cerebro que se libera en los ventrículos cerebrales a partir tanto de la circulación sistémica, como de la glándula pineal (Young et al., 1984)(REPPERT et al., 1979)(Skinner and Malpoux, 1999).

El área del cerebro capaz de sintetizar melatonina aún no está claro. Al parecer las altas concentraciones de melatonina en la corteza cerebral y cerebelo sugieren que al menos estas áreas del cerebro son capaces de la producción de melatonina. Tampoco está claro qué tipo de célula es responsable de la producción de melatonina en el cerebro. La síntesis y la presencia de la melatonina en las neuronas y/o glía indican que la melatonina generada localmente puede ejercer funciones intra-, para-, y auto-crinas en el cerebro, y posiblemente también regula la homeostasis neuronal

Capítulo 1. Introducción

a través del control de la liberación de neurotransmisores y la neurogénesis (Acuña-Castroviejo et al., 2014).

La melatonina también regula el ritmo circadiano de algunas propiedades de la membrana neuronal, incluyendo la actividad de la bomba ATPasa. Adicionalmente, ejerce efectos anti-excitotoxicidad y de protección en el cerebro mediante la reducción de la actividad del glutamato y el aumento de GABA. Todos estos efectos reflejan la capacidad de la melatonina para proteger las membranas celulares neuronales de la hiperexcitabilidad.

La melatonina modula la actividad eléctrica de las neuronas del SNC, actuando principalmente a través de receptores MT2/MT1. Además, las propiedades anti-inflamatorias y antioxidantes de la melatonina son importantes en la protección del daño a las neuronas durante la hipoxia, exposición a toxinas, etc (Esposito and Cuzzocrea, 2010)(Rosales-Corral et al., 2010)(Xiong et al., 2011)(Fu et al., 2011)(Kilic et al., 2012), así como la reducción de deterioro del sistema nervioso central durante el envejecimiento y patologías relacionadas con la edad, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer, etc.(Cardinali et al., 2011)(Rosales-Corral et al., 2012).

Las dosis terapéuticas de melatonina pueden ayudar no sólo en la reducción del daño cerebral, sino también en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y neuropsiquiátricas mediante la reparación de tejido dañado y la promoción de las conexiones sinápticas. La melatonina promueve la neurogénesis cerebral endógena a través de receptores MT2 después de la lesión cerebral en ratones (Chern et al., 2012), mantiene neurogénesis en el hipocampo y las funciones cognitivas después de la irradiación (Manda and Reiter, 2010). Neurogénesis inducida por melatonina también se ha detectado en el hipocampo de ratón (Crupi et al., 2011)(Ramirez-Rodriguez et al., 2011), y el giro dentado (Rennie et al., 2009)(Yoo et al.,

Capítulo 1. Introducción

2012)[122 , 123]. La melatonina y su función en la neurogénesis es un nuevo campo de investigación con resultados prometedores.

8. Leptina

La leptina, es un péptido de 167 aminoácidos, es una hormona pleiotrópica esencial liberada por el tejido adiposo blanco, que tiene efectos importantes en el sistema nervioso central. La circulación de los niveles de leptina señala principalmente al cerebro la cantidad de energía almacenada circulando a niveles proporcionales a la grasa corporal (Chan et al., 2003). La hormona actúa como elemento señalizador liberado por el tejido adiposo blanco con capacidad para regular a nivel cerebral el control de la ingesta y la homeostasis energética. Los niveles plasmáticos de leptina están altamente relacionados con el volumen de grasa corporal, y sería la población femenina la que presentaría unos niveles más altos en cualquier de los diferentes grados de adiposidad corporal.

El cerebro capta la leptina circulante a través del plexo coroideo, el cual la transfiere al medio extra celular del mismo. La amplia expresión del receptor de la leptina en el conjunto del tejido cerebral sugiere que esta molécula debe ejercer otras funciones menos conocidas. La leptina se transporta a través de la barrera hematoencefálica en el cerebro, donde se regula la ingesta de alimentos, la homeostasis de la glucosa, y el gasto energético principalmente a través de los circuitos hipotalámicos. Los receptores de leptina están ampliamente expresados en el sistema nervioso central, comparten rutas de señalización comunes a las del receptor de insulina y se sabe que ambos mecanismos pueden actuar sinérgicamente mediando la evolución de los procesos neurodegenerativos.

Capítulo 1. Introducción

Más allá de sus funciones en el control de la ingesta a nivel hipotalámico, la leptina está implicada en el control de la supervivencia de las células neuronales (Morash et al., 1999). La leptina puede desempeñar un papel en la cognición superior, incluyendo la memoria y el estado de ánimo (Lu et al., 2006)(Ge et al., 2013)(Johnston et al., 2011). Se ha demostrado que el tejido adiposo no es el único capaz de sintetizar leptina, y que ésta también es producida por el cerebro.

La leptina también parece estar implicada en la organización y la maduración del sistema nervioso en el nivel molecular. Por ejemplo, la leptina estimula la proliferación neuroblastoma y previene la muerte apoptótica a través de la regulación de las enzimas apoptóticas, tales como la caspasa-10 y ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF, críticos para el desarrollo cerebral (Russo et al., 2004). La leptina también parece promover la diferenciación de las células gliales en el cerebro durante el desarrollo, ya que los ratones que carecen de leptina tienen un menor número de células gliales funcionales, más adelante en la vida adulta, causada por la falta de adecuada diferenciación durante el desarrollo (Udagawa et al., n.d.). Adicionalmente, en ratones ob/ob que carecen de leptina, la mielinización se ve perjudicada por estar menos presente y ser más delgada (Hashimoto et al., 2013). La leptina parece ser crítica para el crecimiento normal del cerebro, el desarrollo y la maduración.

A pesar de que la leptina se ha estudiado ampliamente en el contexto del comportamiento, el hipotálamo y la alimentación, los receptores de leptina se encuentran en toda la corteza cerebral y los estudios más recientes han encontrado que la leptina tiene efectos sobre la cognición. Hay un gran número de receptores de leptina en el hipocampo (Shanley et al., 2002). De hecho, la leptina parece desempeñar un papel en la plasticidad sináptica de las neuronas del hipocampo, así como la potenciación a largo plazo y la depresión en estas neuronas, funciones que

Capítulo 1. Introducción

son críticas para el aprendizaje y la memoria (Shanley et al., 2001)(Durakoglugil et al., 2005).

Al parecer la leptina puede mediar compensaciones entre el sistema inmunológico y otros sistemas fisiológicos a través de sus acciones sobre las células inmunes y el cerebro. Aunque la barrera hematoencefálica restringe el acceso de las células inmunes y mediadores de la sangre, la activación inmune innata puede ocurrir en todo el cerebro en respuesta a estímulos inflamatorios locales y sistémicos (Folch et al., 2015). La leptina regula los componentes de la inmunidad innata y adaptativa, incluyendo linfocitos T y monocitos (Lam and Lu, 2007). Se sugiere que la leptina está implicada en la regulación de la respuesta inmune y la inflamación (Carlton et al., 2012).

Además de las funciones canónicas descritas de la leptina en el control del metabolismo, esta hormona se ha implicado en el control de la supervivencia neuronal, la actividad de los astrocitos y la neuroprotección en regiones extra-hipotalámica, en particular el hipocampo. Procesos inflamatorios crónicos son comunes en la obesidad, cáncer y enfermedades neurodegenerativas. La inflamación crónica se sabe que causa resistencia a la leptina (Martin et al., 2008)(Borges et al., 2015a). Sin embargo, hasta el momento, existe una falta de información relativa a la evaluación del papel la leptina en el control de la actividad inflamatoria de las células gliales.

9. Proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK)

Las proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK) son una familia de serintreonin quinasas que deciden el destino de procesos celulares tan importantes

Capítulo 1. Introducción

como el crecimiento celular, proliferación, muerte y diferenciación en respuesta a una serie de estímulos (Pearson et al., 2001). Entre los miembros de la familia MAPK, los mitógenos y factores de crecimiento frecuentemente activan la ruta ERK1/2, mientras que el estrés y procesos inflamatorios constituyen el principal desencadenante de la cascada de JNK y p38, algunas veces referidas como “proteínas quinasas activadas por estrés”. Por tanto, median respuestas a choques osmóticos, citoquinas inflamatorias y otras agresiones frecuentemente asociadas con decisiones de supervivencia y apoptosis (Nebreda and Porras, 2000).

Las cascadas de señalización de las MAPKs se organizan en módulos individuales, que se inician por estímulos extracelulares a través de distintos receptores y mediadores. La activación de una MAPK se consigue a través de una cascada lineal de señalización en la cual signalosomas asociados a membrana activan una MAPK quinasa (MAP3K) que fosforilan y activan una MAPK quinasa (MAP2K). Esto se traduce en una fosforilación dual de las MAPKs en un dominio de tres aminoácidos conservado, Thr-X-Tyr, y en un incremento en la actividad catalítica de la MAPK. Las MAPKs fosforilan residuos de Ser/Thr seguidos por una prolina de sustratos nucleares y citosólicos que incluyen importantes factores de transcripción y diferentes efectores. Estos entonces impactan el programa genético celular o el control de decisiones de proliferación como es el caso del módulo ERK, sobre apoptosis o diferenciación como es a menudo el caso de las rutas de JNK y p38, y sobre otras funciones citosólicas que incluyen migración celular, hipertrofia, transducción sensorial, respuestas metabólicas y muchas otras (Shi et al., 2006).

9.1. Estructura y función de p38-MAPK

9.1.1. Elementos de la familia p38-MAPK

Capítulo 1. Introducción

La familia de p38-MAPK está compuesta por 4 isoformas. Las isoformas p38MAPK α (SAPK2A) y p38-MAPK β (SAPK2B) (Han et al., 1994) son los componentes mayoritarios y se expresan en todos los tejidos de una forma ubicua en el caso de modelos murinos. La isoforma p38-MAPK γ (SAPK3/ERK6) (Lechner et al., 1996) (Cuenda and Dorow, 1998a) de expresión preferente en músculo y por último, la isoforma p38-MAPK δ (SAPK4) que se expresa mayoritariamente en pulmón y riñón (Jiang et al., 1997) (Kumar et al., 1997). En el caso de la especie humana, aunque el patrón de expresión de las diferentes isoformas varía dependiendo del tejido en el que se encuentren, la expresión de las isoformas α , β son ubicuas mientras que la expresión de la isoforma γ se da en músculo esquelético (Li et al., 1996)(Court et al., 2002), corazón, pulmón, timo y testículo. Por último la expresión de la isoforma δ se expresa en pulmón, páncreas, intestino delgado, riñón, testículo y epidermis (Kumar et al., 1997)(Dashti et al., 2001).

9.1.2. Localización celular y estructura de p38-MAPK

La localización celular de la proteína p38-MAPK es un tema controvertido ya que en células quiescentes no queda claro lo que ocurre tras ser estimulada. Existen evidencias de que p38-MAPK se transloca al núcleo tras su activación (Raingeaud et al., 1996), aunque hay otra serie de evidencias que demuestran que tras su activación se encuentra tanto en el núcleo como en el citoplasma (Ben-Levy et al., 1998).

El estudio cristalino de las MAP quinasas ha permitido resolver la conformación del sitio catalítico, el cual descansa en un bolsillo entre dos dominios, uno constituido por los residuos del extremo N-terminal más una cadena hacia el extremo C-terminal, lazo 16 (L16) y el otro compuesto por los residuos del extremo C-terminal. Estos dominios están conectados por un eje de cadena única que está centrado alrededor

Capítulo 1. Introducción

de la Gly110 en p38 α (Gly-113 en p38 γ)(Bellon et al., 1999). L16 puede estar contribuyendo al control de la relación entre los dos dominios que son relativamente rígidos. Thr-180 y Tyr-182 están localizados en un “borde de activación” flexible que guarda el sitio activo, una fosforilación dual induce al lazo moverse hacia abajo para que el sustrato tenga mejor acceso y que los dominios N- y C-terminal giren como cuerpos rígidos sobre el eje, lo cual altera la conformación del sitio catalítico hacia un estado más activo (Canagarajah et al., 1997) (Bellon et al., 1999). El dominio ácido común de acoplamiento (CD) está compuesto por tres residuos cercanos de ácido aspártico: Asp-313, Asp315 y Asp316(Tanoue et al., 2001), que se sitúan en el L6 cerca de Tyr323 interacciona con los dominios de acoplamiento (D) de MAPKKs, inhibidores de fosfatasas y proteínas del esqueleto y distintos sustratos que consisten en dos o más residuos básicos.

9.1.3. Regulación de p38 MAPK

- Activación

Cuando los factores de crecimiento se unen a sus receptores específicos se autofosforilan, dejando grupos fosfato accesibles para su reconocimiento por moléculas adaptadoras como pueden ser factores intercambiadores de Guanina, que llevan finalmente a la activación de pequeñas proteínas G con actividad GTPasa. Un ejemplo sería el caso de Ras que activa la ruta de ERK, o el caso de la familia Rho, que activa la ruta de p38-MAPK y JNK (Coso et al., 1995) .

Dentro de las MAPKKK responsables de la activación de p38-MAPK, se puede destacar MTK1, MLK2, MLK3, DLK, ASK1 y TAK1. Cuanto más sube la cascada de transducción de señales menor es la especificidad de la activación.

Capítulo 1. Introducción

Dentro de las MAPKK, la activación de p38-MAPK se da gracias a dos activadores fundamentales que son MKK6 y MKK3 (Dérijard et al., 1995)(Raingeaud et al., 1995). Cabe resaltar que el activador MKK6 es capaz de activar todas las isoformas de p38-MAPK, no así el activador MKK3 que sólo activa la isoforma β (Enslin et al., 1998)(Hale et al., 1999). Estudios in vitro demuestran que aunque MKK4 activa preferentemente a JNK es capaz de contribuir a la activación de p38-MAPK (Dérijard et al., 1995)(Doza et al., 1995)(Lin et al., 1995)(Brancho et al., 2003), al igual que pasa in vivo en algunas células inflamatorias (Moriguchi et al., 1997)(Ono and Han, 2000). Se ha observado que también puede darse una activación de p38MAPK independiente de MKKs, como la que se da en respuesta a ciertos receptores de membrana como en el caso del receptor de TNF (Ge et al., 2002)(Ge et al., 2003). Otras de las activaciones independientes de MKKs descrita, es la mediada por TAB1, la cual provoca una autofosforilación de p38-MAPK capaz de activar a la proteína y con ella activar a sus sustratos (Ge et al., 2002)(Tanno et al., 2003)(Ohkusu-Tsukada et al., 2005).

Otro de los factores importantes a la hora de activar la ruta de p38-MAPK, es la presencia en la célula de moléculas adaptadoras capaces de acercar las proteínas quinasas para favorecer su fosforilación. Cabe destacar las proteínas JIP-2 y JIP-4 encargadas de la unión de MKK3 con varias isoformas de p38-MAPK (Schoorlemmer and Goldfarb, 2001)(Schoorlemmer and Goldfarb, 2002)(Morrison and Davis, 2003).

- Desactivación

Las MAP quinasas fosfatasa (MKP) son un grupo de proteínas capaces de desactivar (retirar los grupos fosfato) las MAPKs, estableciendo el fin de la función que venía

Capítulo 1. Introducción

desempeñando (Keyse, 1995)(Watanabe et al., 2001a). Cabe destacar las fosfatasa específicas de serinas/treoninas como son PP2A y PP2C α (específicas de p38-MAPK)(Takekawa et al., 1998)(Keyse, 2000)(Tamura et al., 2002), así como la fosfatasa PP1MD con una clara implicación en cancer (Bulavin et al., 2002)(Bulavin et al., 2004). Los mecanismos por los que las isoformas de p38 son reguladas de forma diferencial, dependen de los niveles de fosfatasa y también de su especificidad(ZARUBIN and HAN, 2005).

- Inhibidores farmacológicos

Se han descrito varios compuestos químicos capaces de inhibir específicamente la activación de p38-MAPK, como son SB203580, SB203590 o SB220025, SKF86002. Uno de los más caracterizados es el SB203580, compuesto antiinflamatorio pirimidilimidazol, donde se da la interacción entre el grupo fluorofenilo del inhibidor, con la Treonina 106 de p38-MAPK impidiendo con ello que se una el ATP y con ello su activación (Wilson et al., 1997)(Young et al., 1997)(Eyers et al., 1998)(Gum et al., 1998). Este compuesto es capaz de inhibir específicamente a las isoformas α/β de p38-MAPK (Chatterjee et al., 1996)(Cuenda and Dorow, 1998b)(Chen and Tan, 1998)(Gum et al., 1998); pero no a p38 γ ni p38 δ (Chini et al., 1995)(Coroneos et al., 1996)(Choudhury et al., 1997)(Cobb, 1999)(Cole, 1999). SB220025 es otro compuesto pirimidilimidazol que inhibe la fosforilación de p38 α/β siendo diez veces más potente que SB203580 (Cuenda et al., 1997)(Jackson et al., 1998).

Otro de los inhibidores químicos de p38-MAPK, SKF86002, compite por el sitio de unión del ATP y es capaz de inhibir a todas las isoformas de p38-MAPK (Sodhi et al., 2000)(Watanabe et al., 2001b).

La estructura cristalina y el análisis por mutagénesis revelan que una diferencia en un único residuo entre p38 y otras MAPKs como JNK determina la especificidad de

Capítulo 1. Introducción

los compuestos pirimidil imidazol como SB202190 y SB203580 (Garrington and Johnson, 1999)(Glogowski et al., 1999). Estos inhibidores específicos han sido ampliamente utilizados en la investigación de las funciones fisiológicas de p38 (Groom et al., 1996)(Grewal et al., 1999)(Goppelt-Struebe et al., 2000). Aunque igual que PD98059, SB203580 también inhibe la cicloxigenasa-1 y -2, así como la tromboxano sintasa (Tian et al., 2000).

9.1.4. Substratos de p38-MAPK

El primer sustrato de p38 α identificado fue MAPKAP-K2 (MK2), que junto con MAPKAP-K3 (MK3) constituyen una pequeña familia de Serin/treonin quinasas que son fosforiladas por p38 α y/o p38 β pero no por las isoformas p38 δ y p38 γ (Freshney et al., 1994)(Rouse et al., 1994)(Cuenda and Dorow, 1998b). Una vez fosforilada MAPKAP-2 es capaz de fosforilar a las proteínas de choque térmico, HSP27, en diferentes serinas produciéndose tras dicha activación la disociación de las HSP27 en dímeros y monómeros y su redistribución en el citoesqueleto de actina (Huot et al., 1997). Otros sustratos de p38 con actividad MAP quinasa son MNK1/2, PRAK y MSK1/2.

La función de MNK1 y de MNK2 (Map kinase-interacting protein kinases 1, 2) se piensa que está relacionada con una correcta transcripción del ARN a través de la activación del factor de iniciación E1F-4E (Fukunaga and Hunter, 1997)(Waskiewicz et al., 1997). PRAK (p38 regulated/activated quinasa) es una quinasa que es activada por p38 α y/o p38 β y presenta una identidad de secuencia del 20-30% con MK2 por lo que se piensa que regula HSP27 (New et al., 1998). MSK1/2 puede ser también activada directamente por p38 y ERK y de esta forma mediar la activación de CREB, factor de respuesta a AMP cíclico (Deak et al., 1998)(Pierrat et al., 1998)(New et al., 1999). Se ha demostrado que las MSKs están implicadas en la fosforilación de

Capítulo 1. Introducción

componentes relacionados en el remodelamiento de la cromatina (acetilación y fosforilación de histonas) (New et al., 1999).

Se ha descrito que muchos factores de transcripción son fosforilados y consecuentemente activados por p38. AP-1 es un complejo de transcripción formado por dímeros de miembros de la familia de Jun y Fos, donde las SAPKs son las responsables de su reclutamiento, y posterior unión a los dímeros Jun-Jun, Jun-Fos o Jun-ATF fundamentalmente (Kyriakis and Avruch, 1996)(Karin et al., 1997). AP-1 posee un papel importante en los procesos de inflamación y p38 es capaz de fosforilar directamente a diferentes componentes de este complejo de transcripción (Gupta et al., 1995) regulando indirectamente su actividad (Kramer et al., 1996).

9.1.5. Función de p38 MAPK

Con toda la variedad de sustratos capaces de activarse por p38-MAPK no es de extrañar que esta familia esté implicada en diversas funciones celulares.

La participación de p38 en procesos inflamatorios fue una de las primeras funciones atribuidas a esta molécula, gracias a su implicación en la señalización de la activación de TGF- β . Se ha demostrado que en células que median procesos inflamatorios (neutrófilos, monocitos, macrófagos y células T CD4+) la activación de p38 se produce principalmente mediante dos vías: 1) Vía MKK4, en respuesta a Rac/cdc42, aunque no es susceptible de activarse en respuesta a TNF α y 2) Vía MKK6 o MKK3, donde son capaces de activarse en respuesta a TNF α y no son regulados por Rac/cdc42. El papel que desempeña p38 en procesos inflamatorios en respuesta a TNF α y IL-1 β es debido a la activación por dos de sus sustratos: AP-1 y NF- κ B (Eder, 1997). En este sentido, esta MAP quinasa tiene un papel clave durante el proceso de infiltración de los linfocitos hasta el tejido dañado.

La implicación de p38-MAPK en la regulación del ciclo celular es debida a la acción que ejerce esta proteína en los diferentes puntos de control de dicho ciclo. El control

Capítulo 1. Introducción

de la proliferación celular por mitógenos en células normales de mamífero en crecimiento, suele ocurrir en la transición desde el estado quiescente o G0 a la fase G1, y también durante la progresión de esta fase G1 hasta el punto de restricción R, donde las células comienzan a ser independientes de los factores de crecimiento, entrando en la fase S del ciclo celular (Ambrosino and Nebreda, 2001). El tratamiento de las células de mamífero con el inhibidor específico de p38 α/β , SB203580, retrasa la proliferación. En varias publicaciones, p38 se ha visto implicado en la progresión de la fase G1 y G2/M del ciclo celular (Molnár et al., 1997)(Wang et al., 2000)(Yee et al., 2004). La activación de p38 no siempre se asocia a la inducción de la proliferación celular, la parada en G1 de células NIH3T3 causada por microinyección de cdc42 se encontró que era dependiente de p38 α (Wang et al., 2000). También se ha propuesto una relación entre p38 y del control del ciclo celular en G1 a través de la regulación de HBP1 y p21, sustratos de p38 (Yee et al., 2004). HBP1 se piensa que ejerce su función mediante la represión de los genes reguladores del ciclo celular en G1 de una forma similar a la de la proteína del retinoblastoma, mientras que el inhibidor de la quinasa ciclina dependiente p21 se establece como un factor crucial en la progresión de G1 a través del bloqueo de la actividad quinasa dependiente de ciclina (CDK). La participación de p38 en la fase G2/M se ha visto en varios ejemplos; p38 α se activa en células de mamíferos en el arresto en la fase M por rotura del huso tras el uso de nocodazol (Molnár et al., 1997). Además, se ha visto que p38 α y p38 β se requieren en el arresto en fase G2 inducida por UV (Wang et al., 1998).

Una función destacada de p38-MAPK está relacionada con la transmisión de señales como respuesta a diferentes agentes que dañan el ADN, como sería el caso de la utilización de agentes quimioteráuticos tales como el Taxol o la Vincristina (Lee et al., 1998)(Deacon et al., 2003), o la exposición a diversas radiaciones como la ionizante (Verheij et al., 1998), o la ultravioleta (Raingeaud et al., 1995)(Hazzalin et al., 1996)(Brancho et al., 2003). Esta señalización culmina en muchos casos en un proceso de apoptosis, la cual es mediada en la mayoría de los casos por la

Capítulo 1. Introducción

fosforilación de p53 (Duckett et al., 1999; Huang et al., 1999; Sanchez-Prieto et al., 2000). Otra molécula implicada en el proceso apoptótico es p73, capaz de activarse por p38-MAPK en respuesta a diferentes estímulos, tales como cisplatino (SanchezPrieto et al., 2002).

Se ha estudiado mucho este aspecto, y parece claro que la decisión de la entrada en apoptosis en respuesta a diferentes agentes de estrés, va a venir mediada por el balance entre las rutas de ERK y p38-MAPK que será el que determinará que la célula continúe viviendo o muera (Xia et al., 1995; Berra et al., 1997; Berra et al., 1998).

Se ha descrito que la ausencia de NGF o la activación del ligando de Fas, se correlaciona con una activación de p38-MAPK y con un aumento de la apoptosis (Xia et al., 1995; Henkart, 1996; Juo et al., 1997). El uso de inhibidores de caspasas es capaz de revertir la activación de p38 en la apoptosis, sugiriendo su control sobre p38 (Cahill et al., 1996; Fernandes-Alnemri et al., 1996; Henkart, 1996; Huang et al., 1997). Sin embargo, la sobreexpresión del dominante positivo MKK6b puede también inducir la actividad caspasa y la muerte celular infiriendo que p38 puede intervenir en apoptosis tanto regulando actividad caspasa como siendo regulada por caspasas (Ziegler-Heitbrock et al., 1992; Cardone et al., 1997). El papel de p38 es muy diferente dependiendo del tipo celular y del estímulo aplicado. Mientras que la activación de p38 se ha visto que promueve la muerte celular en algunas líneas celulares, en otras aumenta la supervivencia, la proliferación, o la diferenciación (Zarubin y Han, 2005).

La proteína p38 puede fosforilar una amplia variedad de sustratos citoplasmáticos entre los que destaca la proteína Tau en el residuo Ser422 que se encuentra fosforilado cuando Tau forma parte de los ovillos neurofibrilares (Ando et al., 2011), numerosos estudios han relacionado a p38 con la fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer, ya que el estudio de cerebros post mortem ha revelado una intensa inmunoreactividad de p38, además se ha descrito que la respuesta inflamatoria producida por los agregados β amiloide provoca la activación de p38 en astrocitos y

Capítulo 1. Introducción

microglía y genera un efecto apoptótico al activarse en neuronas, igualmente se ha relacionado a p38 con las alteraciones de la plasticidad sináptica aparecidas en la enfermedad de Alzheimer (Munoz and Ammit, 2010).

p38 también está implicada en otras enfermedades neurodegenerativas como es el caso de la enfermedad de Parkinson donde la acumulación de α -Sinucleína provoca la activación de p38 en células microgliales, lo que lleva a la producción de IL-1 β y TNF α como mecanismo proinflamatorio (Kim and Choi, 2010).

La expresión aberrante de p38 en motoneuronas y microglía parece estar implicada en la progresión de la ELA (Tortarolo et al., 2003). Todas estas evidencias apuntan a que p38 puede constituir una diana importante en el estudio de potenciales tratamientos en las enfermedades neurodegenerativas.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTO DE LA MELATONINA, LEPTINA Y ÁCIDOS GRASOS: DOCOSAHEXAENOICO, EICOSAPENTAENOICO Y PALMÍTICO,
EN LA MODULACIÓN DE LA INFLAMACIÓN EN CÉLULAS DE GLÍA

Nohora Milena Martínez López

CAPÍTULO 2.

PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTO DE LA MELATONINA, LEPTINA Y ÁCIDOS GRASOS: DOCOSAHEXAENOICO, EICOSAPENTAENOICO Y PALMÍTICO,
EN LA MODULACIÓN DE LA INFLAMACIÓN EN CÉLULAS DE GLÍA

Nohora Milena Martínez López

Capítulo 2. Planeamiento y objetivos

1. Planteamiento

La inflamación está asociada con muchas enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, y esclerosis múltiple, las cuales se encuentran entre las enfermedades más urgentes de las sociedades desarrolladas con envejecimiento de la población. Aunque la inflamación puede no representar típicamente un factor desencadenante en la enfermedad neurodegenerativa, hay nuevas evidencias en modelos animales en donde la respuesta inflamatoria sostenida, relacionada con activación glial, contribuye a la progresión de la enfermedad. Sin embargo, aún no se sabe si la inhibición de estas respuestas inflamatorias podrá ser un medio seguro y eficaz para invertir o ralentizar la evolución de la enfermedad, lo que genera la necesidad de aprender más acerca de cómo las respuestas inflamatorias son inducidas o inhibidas dentro del sistema nervioso central y cómo esto puede contribuir al desarrollo o mejora respecto a diferentes patologías.

La melatonina ha demostrado ser eficaz en la protección en modelos experimentales de enfermedades neurodegenerativas y de declive cognitivo. Los posibles efectos neuroprotectores de la melatonina pueden deberse a sus propiedades antioxidantes, sus interacciones con vías de señalización intracelular, la regulación de la supervivencia celular y la función mitocondrial. Se ha observado que la melatonina puede disminuir la inflamación y proporcionar neuroprotección. Sin embargo, los mecanismos subyacentes a las propiedades anti-inflamatorias son poco conocidos.

La leptina por otra parte juega un papel central en el control del peso corporal y la homeostasis energética. Se ha demostrado que la leptina es capaz de regular las respuestas inflamatorias y proporcionar neuroprotección. Sin embargo, los

Capítulo 2. Planeamiento y objetivos

mecanismos por los cuales la leptina puede tener propiedades anti-inflamatorias son controvertidos y poco comprendidos.

Estudios experimentales y humanos han mostrado que la función del cerebro es sensible a los ácidos grasos. Se ha estudiado por ejemplo, que una mayor ingesta de grasas saturadas aumenta el riesgo de deterioro de la función cognitiva en las poblaciones de mediana edad o de edad avanzada (Granholm et al., 2008)(Kanoski and Davidson, 2011). También se ha descrito en modelos de ratón que dietas altas en grasa saturada pueden favorecer neuropatologías como la enfermedad de Alzheimer (Ettcheto et al., 2016)(Petrov et al., 2015a). Por otra parte, se ha estudiado que los ácidos grasos omega 3 tienen potencial actividad anti-inflamatoria en una variedad de enfermedades inflamatorias (Hudert et al., 2006)(Kang et al., 2004), pero los mecanismos por los cuales funciona esta actividad antiinflamatoria sigue siendo poco conocidos a nivel del sistema nervioso central.

Por lo anterior, la hipótesis de este estudio es que la melatonina, la leptina y los ácidos grasos DHA, EPA y AP podrían tener un efecto sobre la inflamación en células gliales a través de la modulación en la producción de óxido nítrico y la inhibición/producción de la iNOS.

Capítulo 2. Planeamiento y objetivos

2. Objetivo general

Estudiar el potencial efecto anti-inflamatorio y/o neuroprotector de la melatonina, leptina, ácido docosahexaenoico, ácido eicosapentaenoico y ácido palmítico en cultivos de células de glía de ratón C57Bl/6J.

3. Objetivos específicos

1. Estudiar el efecto de las citoquinas proinflamatorias en la inducción de la producción de óxido nítrico en células de glía, y la activación de vías proinflamatorias.
2. Determinar la viabilidad celular en cultivos de glía sometidos a tratamiento con melatonina, leptina, ácido docosahexaenoico, ácido eicosapentaenoico y ácido palmítico.
3. Caracterizar el potencial efecto proinflamatorio y/o antiinflamatorio o neuroprotector de la melatonina, la leptina, el ácido docosahexaenoico, ácido eicosapentaenoico y ácido palmítico en cultivos de glía.
4. Valorar el papel de la melatonina, la leptina, el ácido docosahexaenoico, ácido eicosapentaenoico y ácido palmítico en la expresión de proteínas relacionadas con neuroinflamación (iNOS) en células de glía.
5. Valorar el papel de la melatonina, la leptina, el ácido docosahexaenoico, ácido eicosapentaenoico y ácido palmítico en la activación de la vía p38 MAPK en cultivos de células de glía.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTO DE LA MELATONINA, LEPTINA Y ÁCIDOS GRASOS: DOCOSAHEXAENOICO, EICOSAPENTAENOICO Y PALMÍTICO,
EN LA MODULACIÓN DE LA INFLAMACIÓN EN CÉLULAS DE GLÍA

Nohora Milena Martínez López

CAPÍTULO 3.

MATERIAL Y MÉTODOS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTO DE LA MELATONINA, LEPTINA Y ÁCIDOS GRASOS: DOCOSAHEXAENOICO, EICOSAPENTAENOICO Y PALMÍTICO,
EN LA MODULACIÓN DE LA INFLAMACIÓN EN CÉLULAS DE GLÍA

Nohora Milena Martínez López

Capítulo 3. Material y métodos

1. Modelo animal

En esta tesis se utilizó la cepa de ratón C57BL/6J donados por Charles River Laboratories España. Se trata de ratones que presentan homogeneidad genética y fenotípica y por lo tanto son una excelente herramienta para la investigación.

Al interior del animalario se procedió a generar una camada para llevar a cabo el presente estudio. El apareamiento se realizó entre hembras y machos de la misma cepa durante una semana, se cruzaron en proporción 1 macho por cada 3 hembras. En los experimentos se utilizaron las crías de 3 días de nacido. El tratamiento de las crías postnatales se llevó a cabo de conformidad con la Directiva 86/609EEC del Consejo de la Unión Europea y el procedimiento establecido por el Departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca de la Generalitat de Catalunya.

2. Cultivo primario de células de glía

Reactivos utilizados:

- Dulbeccos modified eagles medium – high (DMEM) sin glutamina Ref: Sigma D5671, botella de 500 ml a 4°C;
- Heat Inactivated (FBS) - Fetal Bovine Serum Ref: Gibco10500 (FBS) en Falcon de 15 ml, a -20°C
- Tripsina-EDTA 0,25% Gibco: en falcon de 15 ml, -20°C.
- Gentamicin (10mg/ml) Ref: Gibco 15710-049 - 100 ml.
- Deoxyribonuclease I from bovinepancreas (DNasa) Ref: Sigma D4263.
- L- Glutamine Ref: Sigma G8540
- Poly-L-Lysine hydrobromide Ref: P6282

Capítulo 3. Material y métodos

Preparación de Soluciones

Las soluciones se prepararon justo antes de hacer los cultivos, una vez listas, se filtraron en la campana de flujo y se transfirieron a un nuevo tubo estéril empleando un filtro de 0,22 μm .

- **Solución STOP:** DMEM + 10% FBS + DNasa (12 ml).

Se preparó en Falcon de 15 ml no estéril. Se pesó 2 mg de DNasa y se disolvió en 10.8 ml de DMEM. Se filtró (filtro de 0,22) sobre un Falcon estéril y se agregaron 1,2 ml de FBS.

- **Solución FINAL:** DMEM + 20% FBS + Gentamicina (0,1 mg/ml) + Glutamina (40 ml).

Se preparó en Falcon de 15 ml no estéril. Se pesó 4 mg de gentamicina y 23,4 mg de glutamina y se disolvió en 10 ml de DMEM. Se filtró sobre falcon estéril de 50 ml. Se agregó 8 ml de FBS y 22 ml de DMEM.

Preparación de las placas con Poli-L-lisina:

Todo el procedimiento se llevó a cabo en campana de flujo laminar:

- Preparación de la solución 10X de Poli-L-Lisina: se resuspendieron los 5 mg del liofilizado en 50 ml de H₂O autoclavada.

- Se tomó una alícuota de solución 10X y se diluyó diluirla en una botella autoclavada hasta una concentración final de 1X (concentración final de 0,01 mg/ml).

- Utilizando una pipeta estéril se añadió la poli-L-lisina en una cantidad suficiente para cubrir la superficie de crecimiento de las placas.

- Transcurridos 30-45 min se retiró la solución de Poli-L-lisina y se dejó evaporar en la campana de flujo hasta que las placas quedaron completamente secas.

Capítulo 3. Material y métodos

Procedimiento para el cultivo

Los cultivos primarios de células de glía (CGC) se prepararon a partir de crías de ratón, utilizándose indistintamente la corteza cerebral de 3 días de edad de machos o hembras así:

- Antes de empezar el cultivo se distribuyeron en dos placas de 35 mm, 2 ml de tampón fosfato salino (PBS) estéril en cada una.
- Se decapitaron los ratones (de 3 días postnatal) y se rociaron con alcohol al 70%. Se diseccionaron las cortezas cerebrales, y se depositaron en una de las placas con PBS 1X.
- Se limpiaron convenientemente las meninges adheridas al córtex y se pasaron a la otra placa con PBS 1X.
- Se repitió el mismo proceso de disección con todas las crías.
- Se transfirieron los córtex, una vez escurridos, a una superficie dónde sea cómodo manipularlos (como por ejemplo una tapa de una placa de Petri de 100 mm). Se cortan con una hoja de afeitar en dos direcciones perpendiculares entre sí.
- Se transfirieron los tejidos con las pinzas a un tubo falcon de 15 ml con aproximadamente 10ml PBS 1X, se disgregaron y homogeneizaron con una pipeta. Luego se centrifugaron 3 min a 1000 rpm en centrifuga de rotor basculante.
- Se decantó el sobrenadante y al pellet se le añadieron 12 ml de una solución de tripsina-EDTA en PBS (tripsina 0,05% w/v tripsina-EDTA 5mM) y se incubaron en un baño a 37°C durante 25 minutos a 37°C. Se agregó el contenido del tubo con la solución STOP para parar la digestión.
- El tejido fue fragmentado pipeteando de 25 a 30 veces con una pipeta pasteur estéril con algodón. Se centrifugó 7 minutos a 1000 rpm.
- Se decantó el sobrenadante y se resuspendió con 10 ml de solución FINAL con pipeta pasteur y se dejó sedimentar 10 min.

Capítulo 3. Material y métodos

- Se tomó el sobrenadante clump-free y se pasó a Falcón de 15 ml y se ajustó la densidad a 300.000 células/ml con solución final.
- Las células disociadas se sembraron en placas de cultivo a razón de 5ml por placa de 60 mm de diámetro y se dejaron en la incubadora
- El medio fresco se cambió al día siguiente y luego cada 3 días después. Todos los experimentos se realizaron entre el octavo y noveno día después de la siembra.
- Para los cambios de medio, se utilizó la misma solución final que en el cultivo celular pero cambiando el porcentaje del FBS al 10%.

Los cultivos fueron realizados en una estufa termostatzada a 37°C, en una atmósfera humidificada al 5% de CO₂.

3. Tratamiento del cultivo

Reactivos utilizados:

- Melatonina Ref: Sigma 5250
- Leptina Ref: Sigma L3732
- Ácido docosahexaenoico Ref: Sigma D2534
- Ácido eicosapentaenoico Ref: Sigma E2011
- Ácido palmítico Ref: Sigma P5585
- Recombinant Murine IL-1 β (10uG) Ref: PeproTech Inc. 211-11B
- Recombinant Murine TNF- α (20uG) Ref: PeproTech Inc. 315-01A
- Recombinant Murine IFN- γ (20uG) Ref: PeproTech Inc. 315-05

Preparación y almacenamiento de la melatonina

La melatonina se diluyó en etanol en una proporción a 50 mg / ml, se almacenó en un frasco oscuro a -20°C.

Capítulo 3. Material y métodos

Para conseguir las condiciones experimentales, la melatonina se preparó fresca a partir de la solución madre y se diluyó con los volúmenes apropiados en medio de cultivo de acuerdo a cada situación experimental.

Para los cambios de medio, se utilizó la misma solución final que en el cultivo celular pero cambiando el porcentaje del FBS al 2% y adicionando la melatonina tomada de la solución madre, de acuerdo a la concentración requerida para cada uno de los experimentos.

Preparación y almacenamiento de la Leptina

La leptina se diluyó en Tris/HCl a 20 mM estéril, pH 8,0, preparando una solución madre de 1mg/ml. Después de la reconstitución, se almacenó a -20 °C.

Para conseguir las condiciones experimentales, la leptina se preparó fresca a partir de la solución madre y se diluyó con los volúmenes apropiados en medio de cultivo de acuerdo a cada situación experimental.

Para los cambios de medio, se utilizó la misma solución final que en el cultivo celular pero cambiando el porcentaje del FBS al 2% y adicionando leptina tomada de la solución madre, de acuerdo a la concentración requerida para cada uno de los experimentos.

Preparación y almacenamiento de los ácidos grasos

- Los ácidos grasos se disolvieron en etanol al 99% y se almacenaron como soluciones madre (100 mM) bajo atmósfera de nitrógeno a -20°C.

Para conseguir las condiciones experimentales, los ácidos grasos se prepararon frescos a partir de soluciones madre y se diluyeron con los volúmenes apropiados en

Capítulo 3. Material y métodos

medio de cultivo adecuado (Zajdel et al., 2013)(L. Wang et al., 2015a), de acuerdo a cada situación experimental.

Para los cambios de medio, se utilizó la misma solución final que en el cultivo celular pero cambiando el porcentaje del FBS al 2% y adicionando los ácidos grasos tomados de la solución madre, de acuerdo a la concentración requerida para cada uno de los experimentos.

Preparación de las citoquinas.

Se utilizaron las citoquinas pro-inflamatorias para producir la activación glial

- La cantidad de cada una de las citoquinas utilizadas fue la siguiente:

IL 1 β	0,2 ng/ml
IFN γ	0,2 ng/ml
TNF α	0,2 ng/ml

Las citoquinas fueron añadidas directamente al medio de cultivo, utilizando la misma solución final que en el cultivo celular pero cambiando el porcentaje del FBS al 2%.

Procedimiento

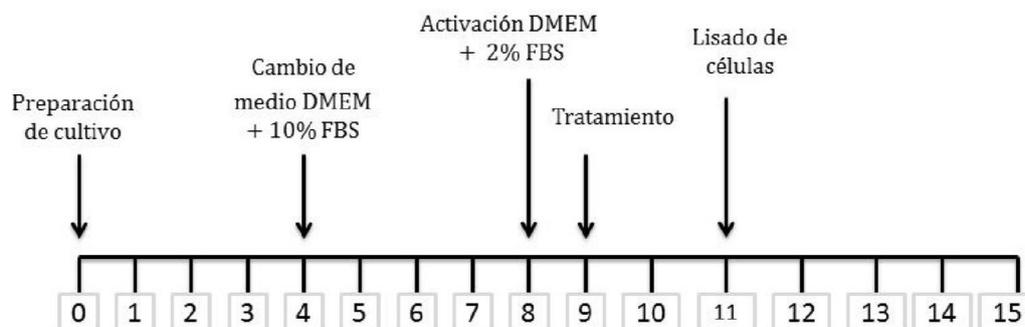
- Un día antes de llevar a cabo el tratamiento con citoquinas y melatonina, leptina y ácidos grasos (según correspondiera en cada experimento), se hizo un cambio de medio utilizando la misma solución final que en el cultivo celular, disminuyendo el porcentaje del FBS al 2%. Igual manejo se realizó con los controles en cada situación experimental.

- El día del tratamiento se retiró el medio de cultivo y se adicionó a la placa el medio de cultivo fresco que contenía la melatonina, leptina o los ácidos grasos (según cada caso: DHA, EPA, AP). Los cultivos fueron incubados a 37°C en una atmósfera

Capítulo 3. Material y métodos

humidificada al 5% de CO₂ durante el tiempo indicado en cada situación experimental.

- Posteriormente se adicionó el medio que contenía las citoquinas, bien sea citoquinas individuales, por parejas o las 3 citoquinas, según cada situación experimental. Los cultivos fueron nuevamente incubados a 37°C en una atmósfera humidificada al 5% de CO₂ durante el tiempo indicado en cada situación experimental.



4. Cuantificación de la viabilidad celular por MTT

Para determinar la viabilidad celular de los cultivos se utilizó el método MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5difeniltetrazol). Este colorante se incorpora a las células vivas y es reducido a nivel mitocondrial en formazán (Hansen et al., 1989), sustancia de color azul oscuro que puede cuantificarse en un espectrofotómetro. A partir de la absorbancia se calcula la viabilidad de las células tratadas respecto al control.

Capítulo 3. Material y métodos

Este ensayo se basa en la relación metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizado por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazán), permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrias de las células tratadas.

Reactivos utilizados

- Thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT), 98% Ref: Sigma M2128
- Sodium dodecyl sulfate (SDS) Ref: Sigma L3771
- Dimethyl sulfoxide, anhydrous (DMSO), >=99.9% Ref: Sigma 276855

Soluciones

- MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5difeniltetrazol): para la preparación de la solución se mantuvo la proporción 2.5 mg MTT/ml de PBS, teniendo en cuenta que el MTT es fotosensible y que por tanto se debe proteger la disolución de la luz.
- Solución distaining (50 ml): se mezclaron 5mg de SDS en 40 ml de DMSO. Se añadió 57.2ml de ácido acético glacial/10ml DMSO. Se completó hasta 50ml con DMSO. Para conservar la solución se utilizó un falcon de 50ml y se almacenó a temperatura ambiente.

Procedimiento

- Se añadieron 50µl de la solución MTT a cada uno de los pozos de la placa de 24 pozos.
- Se dejó la placa en incubación durante una hora a 37°C y 5% de CO₂.

Capítulo 3. Material y métodos

- Pasada la hora, se retiró el medio con cuidado de no aspirar el precipitado formado en el fondo de la placa.
- Se añadió la solución distaining a razón de 500µl por pozo (en placa de 24 pozos), con lo que se consiguió disolver el precipitado formado por las mitocondrias. Se deja la placa 5 minutos a temperatura ambiente y se agita un poco para homogeneizar la solución.
- Se lee la placa en el espectrofotómetro a 550 nm.

5. Tinción con Hoechst 33342

El Hoescht 33342, también denominado de bisbenzimidide H33342 (Sigma-Aldrich), es un colorante específico para regiones del ADN que son ricas en adenina y timina. Se puede utilizar tanto para la detección de ADN en muestras tisulares, como en células en cultivo. Es un fluorocromo permeable a la membrana plasmática que se excita a una longitud de onda de 343 nm (luz ultravioleta) y que emite fluorescencia azul correspondiente a una longitud de onda de 455 nm. Las células apoptóticas pueden distinguirse por la característica condensación de la cromatina nuclear o por la presencia de fragmentación nuclear.

Con la finalidad de ver los cambios conformacionales de los núcleos de la glía, se realizó la tinción con Hoechst 33342 para observar en conjunto la acción de las citoquinas, como del tratamiento con ácidos grasos, comparando con la morfología del control.

Reactivos utilizados

- bisBenzimidide H 33342 trihydrochloride Ref: Sigma 861529 Aldrich

Preparación de la solución

Capítulo 3. Material y métodos

- Solución de Hoechst 33258: se prepara una solución madre de 1 mg/ml en H₂O milli-Q (conservar a 4° C).
- La concentración de trabajo se obtuvo a partir de una dilución 1/800 de la solución madre en H₂O milli-Q.

Procedimiento

- Se lavaron la células con PBS para quitar restos de tratamiento y de esta forma tener mayor permeabilidad en la célula.
- Las células del cultivo se permeabilizaron con paraformaldehído (PFH) al 4% a temperatura ambiente durante 20 minutos.
- Se retiró el PFH y se lavaron las células 3 veces con PBS. Luego se permeabilizaron con metanol frío por 8 minutos.
- Después de unos 15 min las células se lavaron con PBS y se examinaron al microscopio con luz ultravioleta.

6. Medición de la producción de óxido nítrico

Una de las maneras de detectar la formación de NO es evaluando la acumulación de nitrito

(NO₂⁻) en el medio de cultivo. Se trata de un producto estable y no volátil resultado de la reacción del NO con el oxígeno molecular.

El acúmulo de nitrito liberado al medio de cultivo se determinó por colorimetría mediante la reacción de Griess.

Capítulo 3. Material y métodos

Reactivos utilizados

- Sulfanilamida $\geq 99\%$ Ref: Sigma 5925-1,
- N-(1-Naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride Ref: Sigma N9123-10G,
- Ácido fosfórico Ref: Sigma 79617

Preparación de la solución:

- Para la producción de 40 ml del reactivo de Greiss, se utilizaron: 400mg de sulfanilamida, 40mg de N-(1-Naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride, 2 ml de ácido fosfórico y se enrasó con H₂O Milli-Q.
- Para la recta patrón se preparó una solución madre de NaNO₃ al 10mM en H₂O milli-Q. A partir de la solución madre se preparó una curva de patrones con NaNO₃ (0, 2.5, 5, 10, 20, 40, 80 μ M).

Procedimiento:

- A las 24, 48 y 72 horas del tratamiento con citoquinas, en una placa de 96 autoclavada, se tomaron alícuotas de 100 μ l de medio de cultivo de glía y se pusieron por triplicado en placas de 96 pozos.
- Paralelamente se tomaron 100 μ l de la curva de patrones (por triplicado) y se adicionaron a la placa.
- Se tomaron alícuotas de 100 μ l del reactivo de Griess y se añadieron a todos los pozos de la placa de 96 (muestras y patrones). Se esperó un mínimo de 10 min y seguidamente se cuantificó la absorbancia de las muestras a 570 nm de longitud de onda con el lector de placas llevada a cabo en el espectrofotómetro (espectrofotómetro placas Biotech Power Wave x S2). Esta lectura proporcionó

Capítulo 3. Material y métodos

valores en base a la recta patrón hecha con NaNO_3 . La absorbancia nos indicó los nitritos a partir de los cuales se sacó la relación con el óxido nítrico.

7. Determinación de la concentración proteica

Una vez realizados los cultivos y su tratamiento, se procede a obtener el extracto proteico, que se llevó a cabo lavando las placas dos veces con PBS frío y se recogió el extracto proteico utilizando un tampón de lisis que contenía 150 mM de NaCl, 5mM MgCl_2 , 50mM Tris, 1mM EDTA, 1% Tritón X-100, pH 7,2 con inhibidores de proteasas (Complete, Roche Diagnostics, Germany).

Para determinar la concentración proteica de las muestras se emplea la técnica de Bradford, (Bradford MM et al. 1976), se trata de una técnica colorimétrica que se basa en la unión a la proteína del colorante Comassie Brilliant Blue G250, la absorbancia de este colorante se desplaza desde 465 nm hasta 595 nm cuando se encuentra unido a proteína. La absorbancia de la muestra es directamente proporcional a la cantidad de proteína de la misma.

Procedimiento para realizar el Bradford

- Se utilizó una dilución 1:10 o 1:20 de las muestras de proteína en agua destilada (según necesidad). Se colocaron 10 μl de la dilución en cada pozo de la placa de lectura de 96 w, (se realizó por triplicado por cada una de las muestras).
- Se preparó la recta patrón con BSA a diferentes concentraciones de 1 a 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. A partir de una solución madre de 2 mg BSA/ml. Se preparó la recta patrón de concentraciones ascendentes, utilizando agua destilada como blanco, que fue el punto de referencia con una concentración 0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
- Se preparó una dilución 1:5 del colorante de Bradford en H_2O destilada y se añadió 190 μl de esta dilución a cada uno de los pozos con la dilución de proteína, recta patrón y blanco.

Capítulo 3. Material y métodos

- Se dejó incubar la placa a temperatura ambiente durante unos 5 min.
- Se leyó la absorbancia a 595 nm en el espectrofotómetro (Bio Rad, Benchmark plus).
- A partir de las concentraciones media de absorbancia de la recta patrón se extrapolaron los valores de concentraciones a las muestras problema.

8. Western Blot

Esta técnica permite observar los niveles o cambios de estado de una proteína específica. La técnica se basa en las diferencias en la velocidad de migración electroforética en una matriz de acrilamida, al someter a las proteínas a un campo eléctrico, permite separarlas en función de su relación carga/masa. Posteriormente se lleva a cabo la transferencia de las proteínas o blotting, a una membrana sintética, que actuará como soporte para llevar a cabo una detección mediante el uso de anticuerpos específicos contra la proteína.

Tampones y Soluciones

- Tampón de carga

Componente	Volumen (ml)
Tris 2 M pH 6'5	625 µl
SDS 40 %	1 ml
Glicerol	1 ml
β- mercapto	1 ml
Azul bromofenol	1'2 ml
H2O milli-Q	0'175 µl

Capítulo 3. Material y métodos

- Tampón Tris-HCl 1,5 M pH 8,8

Componente	Cantidad
Tris base	18,17 g
H2O destilada	100 ml

Se ajustó pH a 8,8 con HCl 1 M

- Tampón Tris-HCl 1 M pH 6,8

Componente	Cantidad
Tris base	12,1 g
H2O destilada	100 ml

Se ajustó pH a 6,8 con HCl 1 M

- SDS 10 %

Componente	Cantidad
SDS	10 g
H2O destilada	100 ml

- Tampón de migración

Componente	Concentración 1X	Concentración 10X
Glicina	192 mM	144 g
SDS	0.1 %	10 g
H2O destilada	c.s	c.s.p 1 L

Capítulo 3. Material y métodos

- Tampón de transferencia

Componente	Concentración 1X	Concentración 10X
Tris base	25 mM	30,3 g
Glicina	192 mM	144 g
etanol	10 %	-
H2O destilada	c.s	c.s.p 1 L

- Tampón TBS

Componente	Concentración 1X	Concentración 10X
Tris base	50 mM	24,25 g
NaCl	192 mM	80 g
H2O destilada	c.s	c.s.p 1 L

Se ajustó pH a 7,5

-Tampón TBS-Tween® 0,1 %

Componente	Cantidad
Tampón TBS 1X	1 L
Tween®	1 ml

Capítulo 3. Material y métodos

- Preparación de geles de poliacrilamida-SDS

Para la preparación de los geles se utilizó el sistema Mini-Protean III de Bio-Rad. Los geles polimerizan entre dos placas de vidrio específicas que mantienen una separación determinada entre ellas. Los geles están compuestos por dos fases, una superior o gel de concentración que permite que las proteínas lleguen en el mismo momento a la fase siguiente y una inferior o gel de separación que resolverá las proteínas en función de su relación carga/masa. Se emplearon concentraciones diferentes de acrilamida para los geles de separación en función del tamaño de las proteínas a estudiar.

- Geles de separación

Componente	5%	7.5%	10%	12%	15%
Acrilamida-bisacrilamida	5.7ml	2.8	3.8ml	4.5 ml	5.7 ml
Tris-HCL1,5M pH 8.8	3.75 ml	3.75 ml	3.75 ml	3.75 ml	3.75 ml
SDS 10%	170 µl	170 µl	170 µl	170 µl	170 µl
H2O milliQ	9.0 ml	8.15 ml	7.17 ml	6.5 ml	5.3 ml
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
APS*	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl

Para evitar la inclusión de aire en la matriz de acrilamida, el gel se cubrió con agua destilada, que se retiró una vez gelificó la acrilamida. A continuación se preparó y vertió sobre el separador, el gel de concentración.

Capítulo 3. Material y métodos

- Geles de concentración

Componente	5 %	4 %
Acrilamida-bisacrilamida	625 µl	500 µl
Tris- HCL1M pH 6.8	625 µl	625 µl
SDS 10%	50 µl	50 µl
H2O milliQ	3.7 ml	3.8 ml
TEMED	5 µl	5 µl
APS 10%	25 µl	25 µl

Una vez vertido el gel de concentración sobre el espaciador, se coloca el peine que forma los pocillos. Terminada la polimerización, se retira el peine y se lavan los pocillos con tampón de migración.

- Preparación de las muestras

La preparación de las muestras para la electroforesis necesitó una dilución en tampón de carga, o tampón de Laemmli que mantiene las proteínas en su estado desnaturalizado, en la cual se conserva únicamente la estructura primaria de la proteína. La cantidad de proteína debe ajustarse a las necesidades de cada experimento pero esta oscila entre 10 y 40 µg. Una vez mezclada con el tampón estas muestras se colocaron en un baño seco a 100 °C durante 5 min, a continuación se hizo un spin para recuperar todo el volumen.

Capítulo 3. Material y métodos

- Electroforesis

Una vez los geles estuvieron preparados y se cargaron las muestras en el gel de acrilamida.

Además se incluyeron los marcadores estándares de peso molecular (Bio-Rad, Dual Color; 161-0374).

Los geles se colocan dentro de una cubeta de electroforesis que contenía un volumen suficiente de tampón de migración para que ambos extremos del gel queden en contacto con el tampón y permitir de esta manera cerrar el circuito. Se conectó la cubeta a una fuente de alimentación y se inició la separación a 90-100 V el tiempo que sea necesario para que la proteína se separe según su relación carga/masa.

- Transferencia de las proteínas a la membrana

Terminada la migración, las proteínas deben transferirse a un soporte que permita fijarlas y que luego pueda utilizarse para detectarlas y cuantificarlas. El fundamento es similar al de la electroforesis, pero en este caso, se aplicó un campo eléctrico perpendicular al gel que hace que las proteínas migren del gel, hacia la membrana, en este caso se emplearon membranas de polivinilideno (PVDF, Bio-Rad; 162-0177).

La transferencia se consiguió mediante la preparación de un sandwich en un soporte en el cual se colocó sucesivamente una esponja, papel Whatman®, el gel, la membrana, más papel Whatman® y finalmente otra esponja. Se cerró el sandwich y se colocó en su soporte en la cubeta de transferencia que contiene el tampón de transferencia. Se dispone de forma que el gel quede hacia el ánodo (-) y la membrana hacia el cátodo (+). Finalmente se aplicó una corriente constante de 200 mA durante 100 min.

Capítulo 3. Material y métodos

El proceso provoca un fuerte calentamiento de la solución por lo que se recomienda refrigerar el sistema añadiendo un compartimento de hielo en la cubeta. La transferencia se realiza en frío a 4°C. Este punto es de especial importancia ya que la velocidad y eficiencia de la transferencia son inversamente proporcionales a la temperatura.

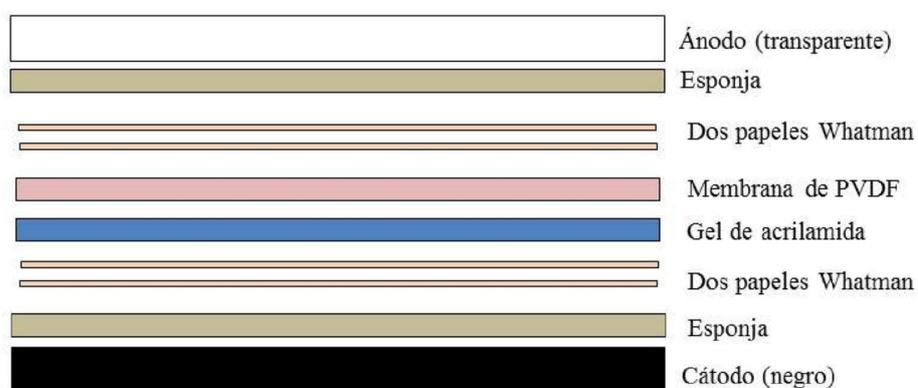


Figura 15. Esquema del orden de colocación de los distintos elementos que componen el sándwich para transferencia.

- Inmunodetección

Una vez terminada la transferencia se lavaron las membranas con TBS-tween® 0,1 % durante 5-10 min para retirar un posible exceso de metanol. A continuación se incubó la membrana en una dilución adecuada de anticuerpo primario en una solución de BSA al 5 % que actúa como bloqueo de los puntos de unión inespecíficos. Las membranas se mantuvieron en incubación durante toda la noche a 4 °C.

Capítulo 3. Material y métodos

A continuación, se realizó el lavado de las membranas con TBS-tween® 0,1 % para retirar el exceso de anticuerpo primario, y se procedió a incubarlas con el anticuerpo secundario adecuado dependiendo de la fuente del anticuerpo primario.

Anticuerpo primario	Anticuerpo Secundario	Casa comercial	Dilución
Fosfo-p38MAPK (Thr180-Tyr182)	A. Mouse	Santa Cruz	1:1000
P38	A. Mouse	Santa Cruz	1:1000
Fosfo- JNK	A. Mouse	Cell signaling	1:1000
Fosfo-ERK1/2	A. Rabbit	Cell signaling	1:1000
Fosfo c-JUN	A. Rabbit	Cell signaling	1:1000
iNOS	A. Rabbit	Cell signaling	1:1000
Monoclonal anti- β -tubulina	A. Mouse	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE.UU.	0,5:1000
monoclonal β -actina	A. Mouse	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE.UU.	0,5:1000

Para la reacción de detección quimioluminiscente se mezclan cantidades iguales de solución 1 y 2 del kit de detección (Amersham ECL Selec TM HARD) y (BioRad Clarity™ Western ECL substrate) en un soporte plano donde se incuba la membrana, con la cara de las proteínas en contacto con el reactivo, durante 1 min. Se elimina el exceso de líquido de la membrana colocándola sobre papel absorbente y se introduce en la máquina para revelar Chemidoc XRS Bio-Rad® situándola sobre la bandeja.

Capítulo 3. Material y métodos

Las imágenes son procesadas mediante el empleo de un software específico para capturar imágenes digitales (ImageLab, Bio-Rad®)

Las mediciones de quimioluminiscencia y los valores de semi-cuantitativos se obtuvieron usando el software correspondiente ImageLab, Quantity one (Bio-Rad) y los resultados se expresaron como un porcentaje con respecto al control. Las correspondientes β -actinas fueron tomadas para cada muestra y así, normalizar las diferencias en carga de gel.

9. Planificación experimental

9.1. Fase experimental 1: Modelo inflamación.

En esta primera fase se definió el modelo de inflamación glial con citoquinas proinflamatorias. En los cultivos de glía se valoró el efecto del tratamiento con IL-1 β , IFN- γ , TNF α solas, en combinación por pares y las tres citoquinas juntas, con el fin de determinar la opción que produjera la mayor producción de óxido nítrico sin afectar la viabilidad celular.

Una vez definido el modelo de inflamación, se procedió a determinar las vías moleculares implicadas en la producción de óxido nítrico activadas por las citoquinas.

Teniendo en cuenta que experiencias previas del grupo de investigación se centraron en el estudio de la actividad anti-proliferativa de la melatonina sobre cultivos de células de neuroblastoma y que de estos primeros estudios se pudo valorar el potencial antiapoptótico de la melatonina en el contexto de un modelo in vitro (Pizarro et al., 2008), así como también se estaba trabajando con leptina (Folch et

Capítulo 3. Material y métodos

al., 2012)(Folch et al., 2013) y los efectos de éstas sobre la cognición y la neuroprotección cerebral, en esta primera fase de estudio se retomó el estudio de las funciones de la melatonina y leptina pero aplicado al cultivo primario de células de glía sometidos a activación glial a través de citoquinas pro-inflamatorias.

Para el desarrollo de esta primera fase de estudio, se hicieron cultivos primarios de células de glía a partir de córtex de ratón de 3 días de nacidos (de acuerdo al protocolo descrito en el apartado 2 de este capítulo). Las células cultivadas fueron sometidas a tratamientos con dosis fisiológicas con melatonina y leptina solos y en combinación con las citoquinas proinflamatorias. Se determinó la viabilidad celular de los tratamientos (de acuerdo al protocolo descrito en el punto 4 de este capítulo), se valoró la producción de óxido nítrico en el medio de cultivo (de acuerdo al protocolo descrito en el punto 6 de este capítulo), se llevó a cabo la determinación de la inducción de iNOS y la activación de la vía p38 MAPK mediante la técnica western blot (la determinación de la concentración protéica y la realización del western blot se desarrollaron como se describe en el punto 7 y 8 de este capítulo).

9.2. Fase experimental 2: Efecto de ácidos grasos

Teniendo en cuenta que, las enfermedades neurodegenerativas tienen un componente inflamatorio (incluida la enfermedad de Alzheimer), que el grupo de investigación estaba trabajando un modelo de experimental de Alzheimer con dieta alta en grasa (principalmente a base de ácido palmítico) valorando el efecto de la dieta alta en grasas sobre la memoria dependiente del hipocampo (Pedrós et al., 2014) (Petrov et al., 2015b) y que en la primera fase de este estudio se había definido un modelo de inflamación con citoquinas pro-inflamatorias, en la segunda fase de este trabajo se llevó a cabo la valoración del efecto de diferentes ácidos grasos sobre el modelo de inflamación definido en la primera fase experimental de esta tesis.

Capítulo 3. Material y métodos

Para el desarrollo de esta segunda fase, se hicieron cultivos primarios de células de glía a partir de córtex de ratón de 3 días de nacidos (de acuerdo al protocolo descrito en el apartado 2 de este capítulo). Las células cultivadas fueron sometidas a tratamientos con dosis de ácidos grasos saturados y poliinsaturados a diferentes dosis y se determinó la viabilidad celular y la producción de óxido nítrico, para determinar las dosis que no afectarían la viabilidad celular y que pudieran tener un efecto anti-inflamatorio. Una vez definidas las dosis fisiológicas, se trataron las células con los ácidos grasos solos y en combinación con las citoquinas proinflamatorias, determinando nuevamente la viabilidad celular del tratamiento y el aumento o disminución en la producción de óxido nítrico. Posteriormente se llevó a cabo la determinación del aumento de la producción de iNOS y la activación de la vía p38 MAPK.

La viabilidad celular de los tratamientos se realizó de acuerdo al protocolo descrito en el punto 4 de este capítulo. La producción de óxido nítrico se midió en el medio de cultivo como se describe en el punto 6. La determinación de la inducción de iNOS y la activación de la vía p38 MAPK se realizó mediante la técnica western blot (la determinación de la concentración protéica y la realización del western blot se desarrollaron como se describe en el punto 7 y 8 de este capítulo).

10. Análisis estadístico

Los resultados se analizaron por ANOVA de un factor, seguido por la prueba post hoc de Bonferroni. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando la versión 15 SPSS (SPSS Sciences, Chicago, Illinois) y GraphPad Prim 5 (GraphPad Prism 5, La Jolla, CA, EE.UU.). La significancia estadística se definió como un valor p menor que

Capítulo 3. Material y métodos

las diferencias con $p < 0,05$ (*); $P < 0,01$ (**) y $p < 0,001$ (***) se consideraron significativos en cada experimento.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTO DE LA MELATONINA, LEPTINA Y ÁCIDOS GRASOS: DOCOSAHEXAENOICO, EICOSAPENTAENOICO Y PALMÍTICO,
EN LA MODULACIÓN DE LA INFLAMACIÓN EN CÉLULAS DE GLÍA

Nohora Milena Martínez López

CAPITULO 4.

RESULTADOS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTO DE LA MELATONINA, LEPTINA Y ÁCIDOS GRASOS: DOCOSAHEXAENOICO, EICOSAPENTAENOICO Y PALMÍTICO,
EN LA MODULACIÓN DE LA INFLAMACIÓN EN CÉLULAS DE GLÍA

Nohora Milena Martínez López

Capítulo 4. Resultados

1. Fase experimental 1. Modelo inflamación.

1.1. Efecto de las citoquinas sobre las células de glía.

Tratamiento con citoquinas induce aumento de la producción de óxido nítrico (ON) en células de glía.

Para determinar si las células gliales tratadas con citoquinas aumentan la producción de óxido nítrico, los cultivos primarios se trataron con diferentes citoquinas proinflamatorias, tales como TNF α , IL 1 β e IFN γ . Los tratamientos se realizaron de forma individual, en combinaciones de dos citoquinas (TNF α – IFN γ , TNF α - IL 1 β , IL 1 β - IFN γ) y con las tres citoquinas (TNF α - IL 1 β - IFN γ). La determinación de la producción de óxido nítrico se llevó a cabo utilizando el reactivo de Griess, que mide el nitrito liberado en el medio de cultivo. Sólo las combinaciones de TNF α – IFN γ ; IL 1 β - IFN γ y TNF α - IL 1 β - IFN γ mostraron una diferencia significativa de producción de óxido nítrico respecto al control. Se obtuvo un incremento más significativo cuando las células se trataron con las tres citoquinas juntas (Gráfica 1).

Se probó la síntesis de óxido nítrico a las 24, 48 y 72 horas en las células tratadas con TNF α - IL 1 β - IFN. Los resultados mostraron un aumento progresivo de los niveles de óxido nítrico dependiente del tiempo. Teniendo en cuenta que la combinación de las tres citoquinas proinflamatorias fue el tratamiento que dio lugar a la mayor inducción de la producción de óxido nítrico, los siguientes experimentos se realizaron con este tratamiento (Gráfica 2).

El cultivo celular se caracterizó utilizando anticuerpos específicos GAF, como marcador de astrocitos; IBA-1, marcador de células microgliales. Tras el tratamiento

Capítulo 4. Resultados

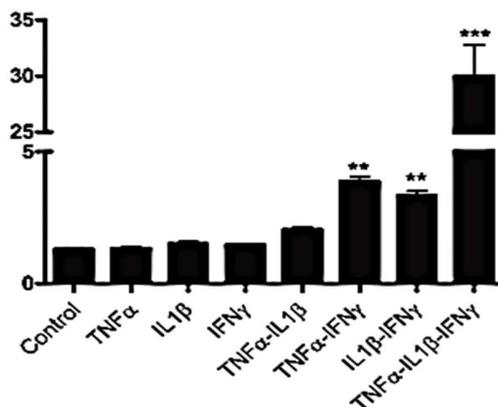
con citoquinas se observó una activación de las células microgliales. También se realizó la tinción de Hoechst (azul) que también se utiliza para ver los núcleos de las células marcadas (Figura 16.).

Vías moleculares implicadas en la producción de óxido nítrico activadas por las citoquinas.

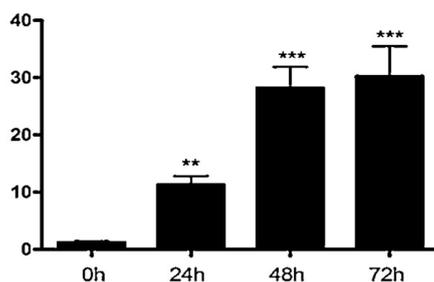
Como ya se dijo anteriormente en la introducción, las MAPKs desempeñan un papel importante en las vías de señalización que inducen las citoquinas proinflamatorias y el aumento de la iNOS en las células de glía. Para determinar qué vías moleculares fueron activadas por la combinación del tratamiento con citoquinas (TNF α - IL 1 β - IFN) en la células de glía, se realizaron análisis de western blot en células que fueron expuestas al tratamiento con las tres citoquinas durante diferentes lapsos de tiempo (figura 17.)

Los análisis de transferencia Western mostraron que la combinación de las tres citoquinas, TNF-IL1 β -IFN, induce la activación de diferentes proteínas MAPK, específicamente JNK y su sustrato c-Jun en Ser73, y p38, en diferentes lapsos de tiempo. Sin embargo, no se observó hiperfosforilación de ERK1/2 en ningún momento, de acuerdo a estas condiciones experimentales específicas (Figura 4). Estas activaciones se produjeron entre 30 minutos y 1 h después del tratamiento. Las vías pro-inflamatorias, tales como STAT-1 y STAT-3, se activaron después de 30 minutos de tratamiento con las citoquinas y también se observó una disminución en los niveles IKB α , lo que podría indicar la activación de NFkB.

Capítulo 4. Resultados



Gráfica 1. Producción de óxido nítrico en cultivos de glía a 48 horas de tratamiento con diferentes citoquinas y sus diferentes combinaciones. Cada punto es la media \pm SEM de tres experimentos independientes. (**, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ con respecto al control)



Capítulo 4. Resultados

Gráfica 2. Producción de óxido nítrico en cultivos de glía en 24, 48 y 72 horas después del tratamiento con TNF-IL1 β -IFN γ . Cada punto es la media \pm SEM de tres experimentos independientes. (**, $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ con respecto al control)

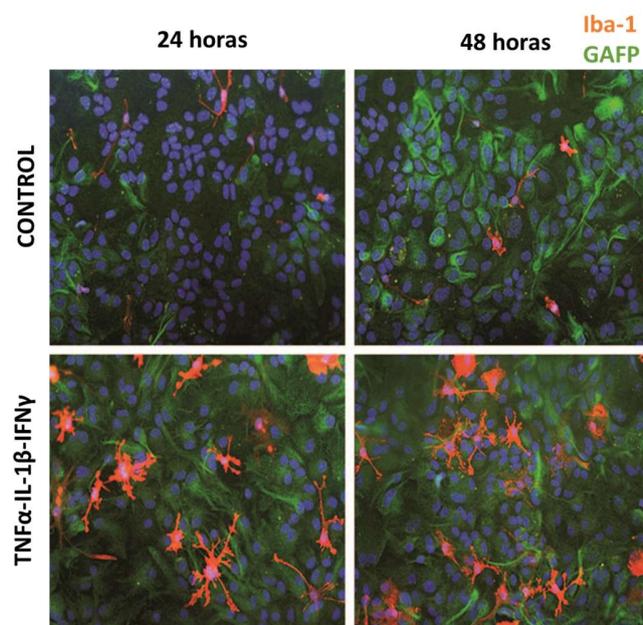


Figura 16. Imagen del cultivo glial caracterizado con dos marcadores gliales específicos: GFAP (astrocitos, verde), Iba 1 (microglía, rojo) y Hoechst (azul), que se utiliza para marcar los núcleos celulares.

Capítulo 4. Resultados

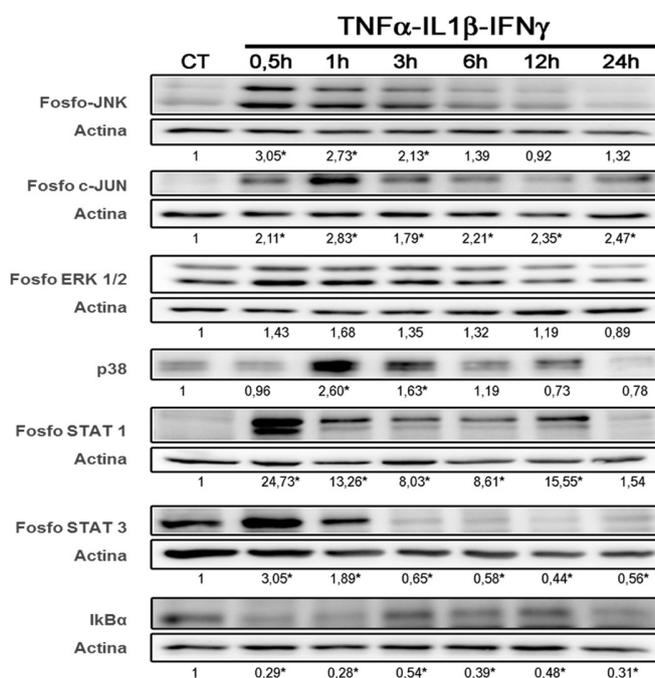


Figura 17. Vías moleculares activadas por las citoquinas (TNF α - IL 1 β - IFN). Transferencias de Western blot contra fosfo-JNK, fosfo c_JUN. Fosfo ERK1/2, fosfo STAT1, fosfo STAT3, fosfo I κ B α y actividad de p38 a diferentes lapsos de tiempos de exposición con el tratamiento con citoquinas. Todas las transferencias se normalizaron con la actina. Para cada punto, se presenta el valor medio de tres experimentos independientes (*, P<0,05 con respecto al control).

Capítulo 4. Resultados

1.2. Efecto de la melatonina sobre las células de glía.

La melatonina disminuye la producción de ON mediada por citoquinas en las células gliales

Cuando las células gliales fueron pre-tratadas con melatonina 1 hora antes del tratamiento con citoquinas proinflamatorias (TNF α - IL 1 β - IFN γ), la producción de ON fue inhibido significativamente (Gráfica 3). La producción del óxido nítrico fue determinado mediante la prueba de Griess.

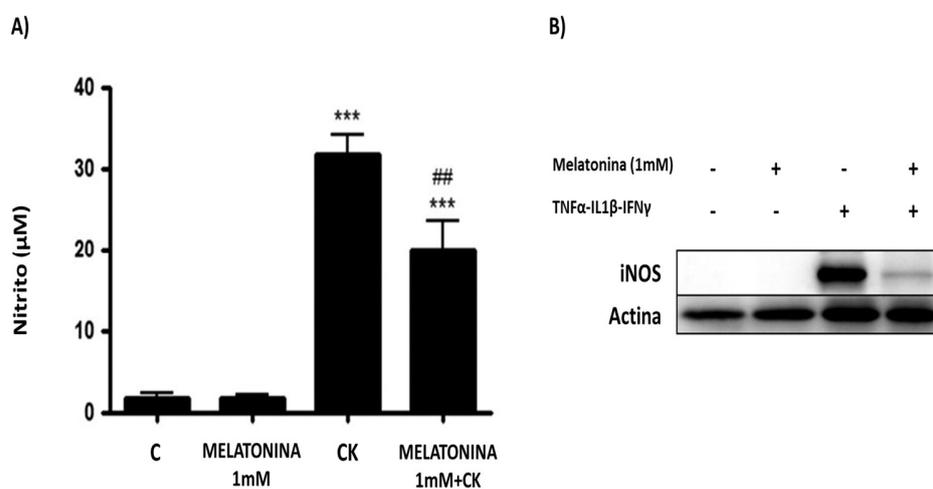
Para determinar si la disminución de la producción de ON en el cultivo de glía tratado con melatonina podría estar relacionado con los niveles de proteína iNOS, se hizo western blot contra iNOS y se observó que los niveles de la proteína estaban significativamente aumentados en el tratamiento con citoquinas y significativamente disminuidos en los que tuvieron un pre-tratamiento con melatonina 1 hora antes de la exposición a citoquinas. En conjunto, los datos actuales muestran que la melatonina inhibe la activación inflamatoria de las células gliales con respecto a la inducción de iNOS y la producción de ON.

Para determinar los posibles efectos citotóxicos de la combinación del tratamiento de melatonina con citoquinas, se realizó la determinación de la viabilidad celular mediante el ensayo MTT para descartar que la disminución en la producción de ON fuera producto de la muerte de las células. (Gráfica 4). Se observa que la reducción de MTT para el pre-tratamiento con melatonina a 1mM, el tratamiento con las tres citoquinas (TNF α - IL 1 β - IFN γ) y la combinación de la melatonina con las citoquinas, no mostraron diferencias significativas respecto al control.

Capítulo 4. Resultados

La melatonina inhibe la ruta de señalización de p38 en las células gliales

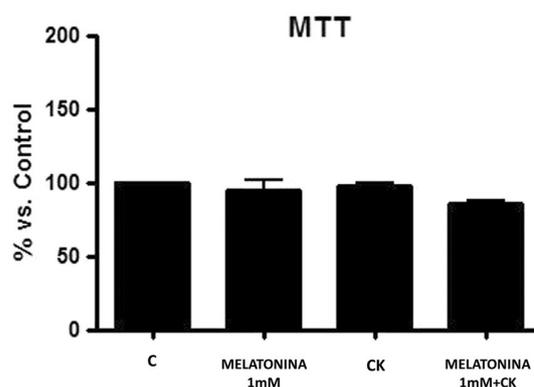
Para investigar si la inhibición de la inducción de iNOS y la disminución en la producción de ON estaba relacionada con las vías activadas por las citoquinas pro-inflamatorias se examinó el efecto de la melatonina sobre JNK, c-Jun, fosfo ERK1 / 2 y actividad de p38 MAPK. El pre-tratamiento con 1mM de melatonina antes de la incubación con citoquinas solamente inhibió la actividad de la p38 MAPK. La fosforilación de JNK, ERK1/2 y c-JUN no se vio afectada (Figura 18). Sorprendentemente, la melatonina sólo inhibe la actividad MAPK p38 en cultivos de células gliales.



Gráfica 3. A) Los niveles de nitrito a las 48 h en medio de cultivo de las células no tratadas (C), células tratadas con melatonina (1 mM), células tratadas con citoquinas (CK) y células tratadas con citoquinas y pretratadas con melatonina

Capítulo 4. Resultados

antes del tratamiento con citoquinas Melatonina 1mM+ CK). La melatonina redujo significativamente los niveles de nitrito. B) Transferencia de Western contra iNOS a las 24 h de los diferentes tratamientos. Cada punto es la media \pm SEM de tres experimentos independientes. (***, $p < 0,001$ con respecto al control del vehículo y ##, $p < 0,01$ para las células pretratadas con melatonina con respecto a las células tratadas solo con citoquina).



Gráfica 4. Tratamiento de cultivos de células gliales con citoquinas TNF α -IL1 β -IFN γ y melatonina no induce muerte celular. Cada punto es la media \pm SEM de tres o cuatro experimentos independientes.

Capítulo 4. Resultados

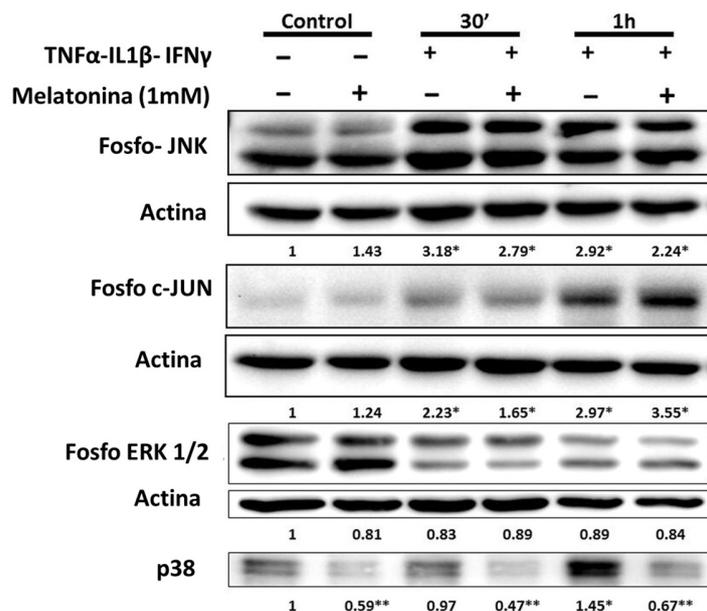


Figura 18. Western blots contra fosfo JNK, fosfo c-Jun, fosfo ERK1 / 2 y actividad de p38 en 30 min y 1 h después del tratamiento con citoquinas con o sin pretratamiento con melatonina. Todas las transferencias de Western se normalizaron con la actina. Para cada punto, se presenta el valor medio de tres experimentos independientes. (*, $P < 0,05$ con respecto al control del vehículo y #, $p < 0,05$ con respecto a las células pretratadas con melatonina).

Capítulo 4. Resultados

1.3. Efecto de la leptina sobre las células de glía.

La leptina disminuye la producción de ON mediada por citoquinas en las células gliales

Cuando las células gliales fueron pre-tratadas con leptina 1 hora antes del tratamiento con citoquinas proinflamatorias (TNF α - IL 1 β - IFN γ), la producción de ON fue inhibido significativamente (Gráfica 5). La exposición de las células a diferentes concentraciones de leptina (50, 100 y 500 nM) durante 1 hora, antes del tratamiento con citoquinas redujo significativamente la producción de ON, siendo más efectiva la dosis de 500 nM en la disminución del ON. La producción del óxido nítrico fue determinado mediante la prueba de Griess.

Para determinar los posibles efectos citotóxicos de la combinación del tratamiento de leptina con citoquinas, se realizó la determinación de la viabilidad celular mediante el ensayo MTT para descartar que la disminución en la producción de ON fuera producto de la muerte de las células. (Gráfica 6). Se observa que la reducción de MTT para el pre-tratamiento con leptina a 1mM, el tratamiento con las tres citoquinas (TNF α - IL 1 β - IFN γ) y la combinación de la leptina con las citoquinas, no mostraron diferencias significativas respecto al control.

Para determinar si la disminución de la producción de ON en el cultivo de glía tratado con leptina podría estar relacionado con los niveles de proteína iNOS, se hizo western blot contra iNOS. Como era de esperar, el tratamiendo con citoquinas indujo un marcado aumento de los niveles de iNOS en las células gliales, que se redujo significativamente mediante el tratamiento con leptina a 500 nM (Gráfica 7). En

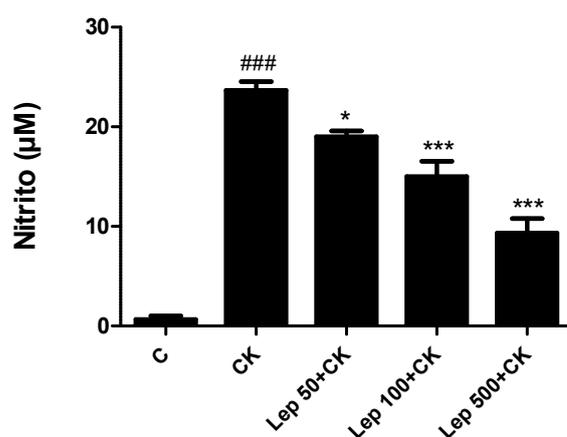
Capítulo 4. Resultados

conjunto, los datos actuales muestran que la leptina inhibe la activación inflamatoria de las células gliales con respecto a la inducción de iNOS y la producción de ON.

La leptina inhibe la ruta de señalización de p38 en las células gliales

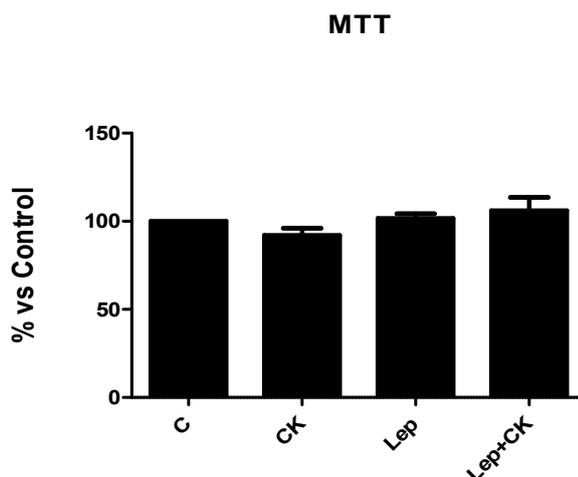
Teniendo en cuenta que los resultados encontrados con melatonina sugirieron que la disminución de ON y de iNOS podría estar relacionada con la vía de p38 MAPK, se valoró el efecto de la leptina en la ruta de p38. Los resultados de la investigación muestran un aumento significativo en el contenido de la forma activa de p38 (fosfo-P38 Thr180 / Tyr182) como resultado de la exposición a citoquinas, que puede ser revertida por el tratamiento previo de las células gliales con leptina (Gráfica 8).

Capítulo 4. Resultados

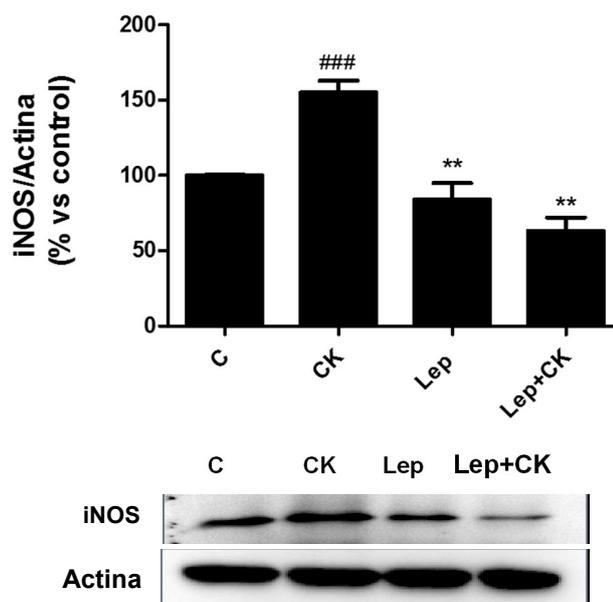


Gráfica 5. Niveles de nitrito. La gráfica muestra un aumento significativo en los niveles de nitrito (μM) medidos por el método de Griess, en las células gliales después del tratamiento con citoquinas. La pre-incubación de los cultivos con Leptina durante 1 h antes de la exposición a citoquinas invierte parcialmente la producción de nitrito. La exposición a concentraciones de Leptina de 50, 100 y 500 nM demostró una protección anti-inflamatoria, efecto dependiente de la dosis. La barra de control se tomó como 100%. Cada punto es la media \pm SEM de tres o cuatro experimentos independientes (### $p < 0,001$ cuando se compara citoquinas (CK) respecto al control; * $P < 0,05$ y *** $p < 0,001$ cuando se comparan Leptina+ citoquina (Lep+CK) [Lep que va desde 50 a 500 nM] con respecto al grupo CK). Cada punto es la media \pm SEM de tres o cuatro experimentos independientes.

Capítulo 4. Resultados



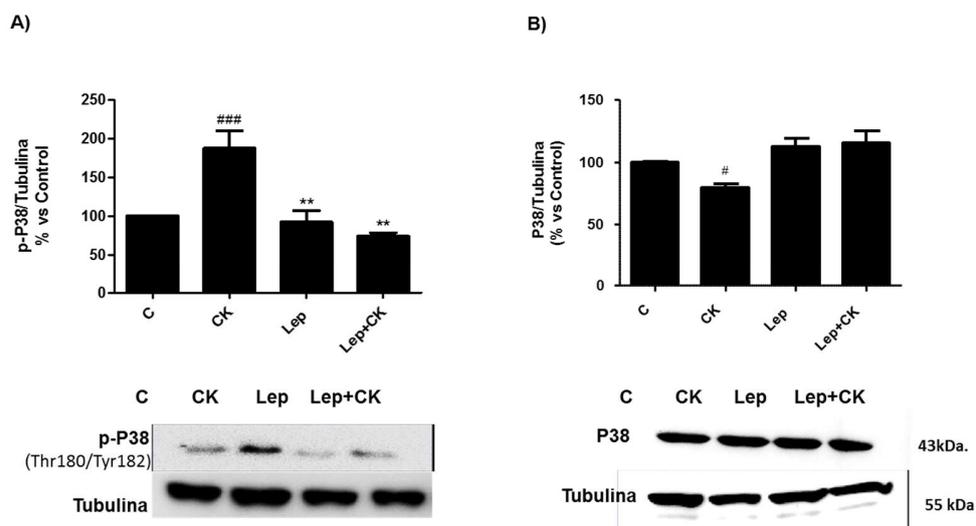
Gráfica 6. Tratamiento de cultivos de células gliales con citoquinas TNF α - IL1 β - IFN γ y leptina no induce muerte celular. Cada punto es la media \pm SEM de tres o cuatro experimentos independientes



Gráfica 7. El contenido de iNOS en las células gliales después el tratamiento con citoquinas se incrementó significativamente. Se observa que el pretratamiento con leptina a 500 nM invierte este efecto. Los western blot fueron normalizados con actina. (### $p < 0,001$ citoquina [CK] comparada con el control; ** $p < 0,01$ cuando se compara Leptina [lep] solo y grupos Leptina+citoquinas [lep+CK] con respecto al

Capítulo 4. Resultados

citoquinas [CK]. Las diferencias estadísticas se analizaron mediante ANOVA de una vía seguido por Bonferroni prueba *post hoc*.



Gráfica 8. Transferencia western blot contra (A) fosfo-P38 (Thr180 / Tyr182) y (B) P38 total después de tratamiento con citoquinas [CK] y Leptina [lep]. Los resultados muestran que la pre-incubación con Leptina provoca una reducción significativa en el contenido de la forma fosfo-P38 activa. Todas las transferencias Western se normalizaron con Tubulina. Cada punto es la media \pm SEM de tres experimentos independientes ($\# p < 0,05$ y $\### p < 0,001$ cuando se comparan grupo Citoquinas [CK] vs. control; $** p < 0,01$ cuando se compara Leptina sola solo y grupos Leptina + citoquina [lep+CK] con respecto a grupo citoquinas [CK]. Las diferencias estadísticas se analizaron mediante ANOVA de una vía seguido por la prueba post hoc de Bonferroni.

Capítulo 4. Resultados

2. Fase experimental 2. Ácidos grasos.

2.1. Efecto del ácido docosahexaenoico (DHA) sobre las células de glía.

Tratamiento con DHA a bajas concentraciones no induce apoptosis en células de glía.

Para determinar los posibles efectos citotóxicos del DHA se trataron los cultivos primarios de células de glía con DHA a diferentes concentraciones micromolares (30 μ M, 60 μ M, 90 μ M, 120 μ M, 150 μ M, 200 μ M, 400 μ M, 600 μ M y 800 μ M). La determinación de la viabilidad celular se realizó mediante el ensayo de MTT. Después de 24 horas de incubación se observa que la reducción de MTT para las concentraciones más bajas de DHA no mostró diferencias significativas respecto al control. Sin embargo, las concentraciones de 600 μ M y 800 μ M mostraron una toxicidad significativa que aumentaba con la dosis, lo cual parece indicar que el DHA a elevadas concentraciones puede producir muerte en las células de glía (Gráfica 9.).

Tratamiento con DHA a altas concentraciones aumenta la producción de ON mediada por citoquinas en células de glía.

Para determinar si las células gliales tratadas con DHA aumentaban la producción de ON y a qué dosis, se trataron los cultivos primarios de células de glía con DHA a diferentes concentraciones micromolares (30 μ M, 60 μ M, 90 μ M, 120 μ M, 150 μ M, 200 μ M, 400 μ M, 600 μ M y 800 μ M). La determinación de la producción de óxido

Capítulo 4. Resultados

nítrico se llevó a cabo utilizando el reactivo de Griess. Las dosis más altas de DHA (600 μ M y 800 μ M) mostraron una diferencia significativa de producción de óxido nítrico respecto al control. Esta producción de ON aumenta al incrementar la dosis de DHA a partir de 600 μ M (Gráfica 10).

Tratamiento con DHA a bajas concentraciones disminuye la producción de ON mediada por citoquinas en células de glía.

Cuando las células gliales fueron pre-tratadas con DHA 4 horas antes del tratamiento con citoquinas proinflamatorias (TNF α - IL 1 β - IFN γ), la producción de ON fue inhibido significativamente (Gráfica 11). La producción del óxido nítrico fue determinado mediante la prueba de Griess.

Para determinar los posibles efectos citotóxicos de la combinación del tratamiento combinado de DHA con citoquinas, se realizó la determinación de la viabilidad celular mediante el ensayo MTT para descartar que la disminución en la producción de ON fuera producto de la muerte de las células. (Gráfica 12). Se observa que la reducción de MTT para el pre-tratamiento con DHA a 60 μ solo, el tratamiento con las tres citoquinas (TNF α - IL 1 β - IFN γ) y la combinación de DHA60 μ M más citoquinas, no mostraron diferencias significativas respecto al control.

Al observar que la viabilidad de las células no se ha alterado, es posible deducir que probablemente la disminución del ON se debe al pre-tratamiento de las células con DHA.

Al realizar la tinción de Hoescht para marcar los núcleos, se observa que las citoquinas producen un aumento significativo de la fracción de células apoptóticas. Sin embargo, en las células tratadas con DHA + citoquinas los núcleos se conservan de una forma más parecida a los núcleos de las células correspondientes al control,

Capítulo 4. Resultados

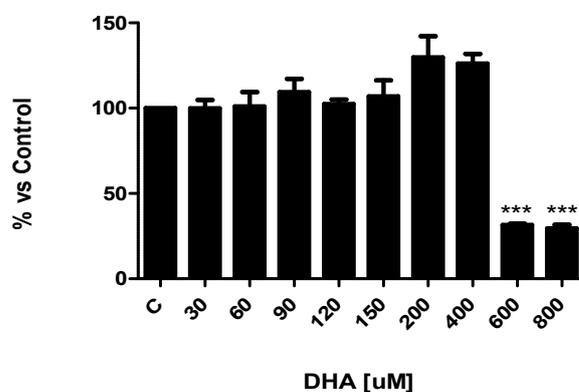
lo que significaría que probablemente el pre-tratamiento con DHA disminuye la formación de núcleos apoptóticos (Figura 19).

Para determinar si la disminución de la producción de ON en el cultivo de glía tratado con DHA podría estar relacionado con los niveles de proteína iNOS, se realizaron western blot contra iNOS y se observó que los niveles de la proteína estaban significativamente aumentados en el tratamiento con citoquinas y se observó una disminución significativa de la proteína en los que tuvieron un pre-tratamiento con DHA antes de la exposición a citoquinas (Gráfica 13). En conjunto, los datos actuales muestran que quizás el DHA inhibe la activación inflamatoria de las células gliales con respecto a la inducción de iNOS y la producción de ON.

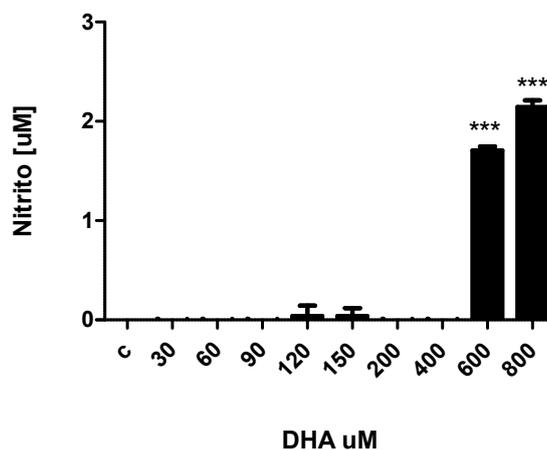
Tratamiento con DHA inhibe la vía de señalización de p38 en las células de glía.

La vía p38 desempeña papeles esenciales en la expresión de moléculas inflamatorias en varios tipos celulares incluyendo la microglía, en respuesta a una variedad de estímulos. Por lo tanto, para determinar si la inhibición en la inducción de iNOS y la producción de ON por DHA podría estar relacionada con la vía p38 MAPK, se examinó el efecto del DHA sobre la fosforilación y actividad inducida por citoquinas sobre p38 MAPK. Se realizó el pretratamiento de las células de glía con DHA a 60µM 4 horas antes de la incubación con citoquinas. De acuerdo con lo observado en las transferencias de western blot se evidencia un aumento significativo del contenido de la forma activa de p38 (fosfo-P38 Thr180 / Tyr182) como resultado de la exposición a citoquinas, que puede ser revertida mediante el pretratamiento de células gliales con DHA (Gráfica 14). Estos resultados muestran que quizás DHA es capaz de inhibir la vía p38 MAPK.

Capítulo 4. Resultados

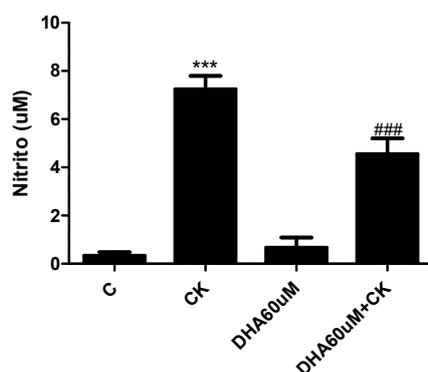


Gráfica 9. Tratamiento de cultivos de células gliales con diferentes concentraciones de DHA no induce muerte celular a bajas concentraciones, sin embargo a altas concentraciones es citotóxico. Cada punto es la media \pm SEM de tres experimentos independientes (** $P < 0.0001$).

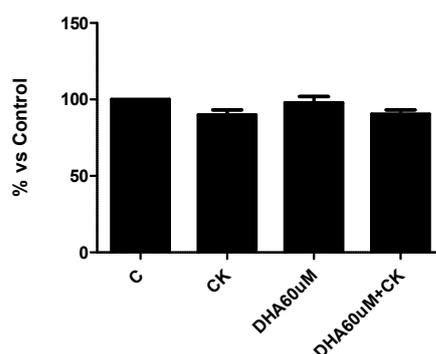


Gráfica 10. Producción de Óxido Nítrico en cultivo de glía tratada con diferentes concentraciones de DHA. Cada punto es la media \pm SEM de tres experimentos independientes (** $P < 0.0001$).

Capítulo 4. Resultados



Gráfica 11. Niveles de nitrito en medio de cultivo de células no tratadas [C], células tratadas solamente con citoquinas [CK], Células tratadas solamente con DHA durante 4 horas [DHA 60 μ M], y tratamiento combinado de DHA y citoquinas [DHA 60 μ M + CK] en cultivo de glía. Cada punto es la media \pm SEM de tres experimentos independientes. (***, $p < 0,0001$ con respecto al control del vehículo y ###, $p < 0,0001$ para las células pretratadas solo con CK con respecto a la células tratadas con 60 μ M +CK).



Gráfica 12. Tratamiento de cultivos de células gliales tratadas con DHA y citoquinas no induce muerte celular. No hay diferencias significativas respecto al control. Cada punto es la media \pm SEM de tres experimentos independientes.

Capítulo 4. Resultados

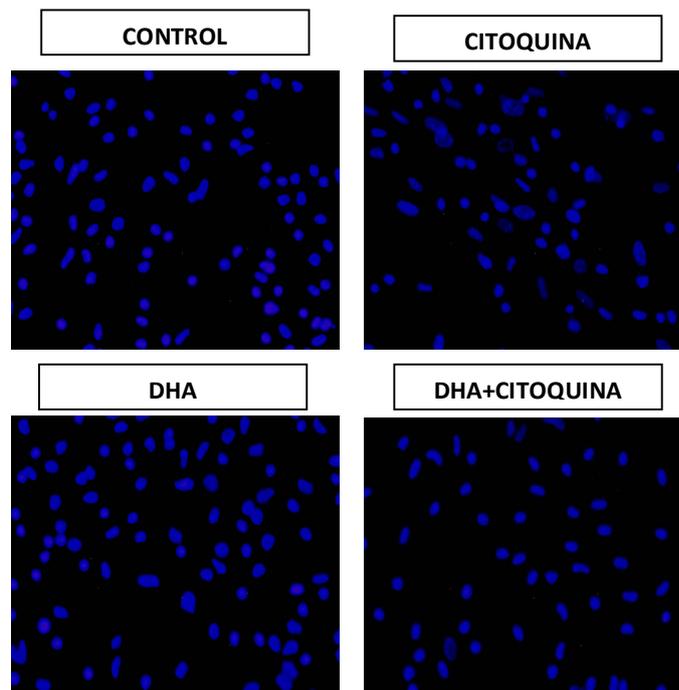
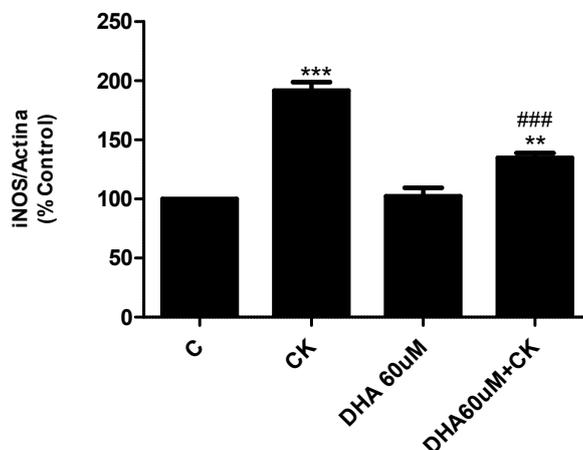
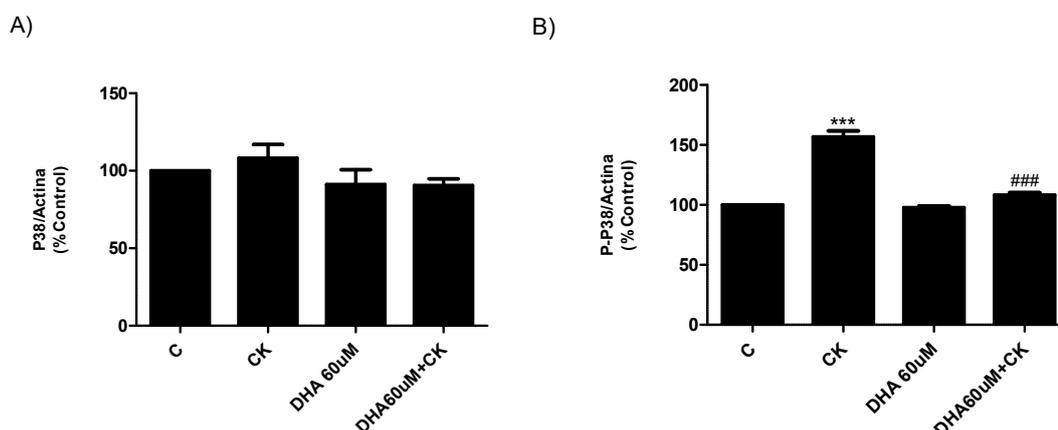


Figura 19. Imagen del cultivo glial caracterizado Hoechst (azul), que se utiliza para marcar los núcleos celulares.

Capítulo 4. Resultados



Gráfica 13. Transferencia de Western blot contra iNOS para los diferentes tratamientos. Todas las transferencias se normalizaron con la actina. Cada punto es la media \pm SEM de tres experimentos independientes. (***, $p < 0,0001$; **, $p < 0,001$ con respecto al control del vehículo y ###, $p < 0,0001$ para las células pretratadas con DHA con respecto a la células tratadas solamente con citoquinas).



Gráfica 14. Western blots contra (A) p38 total (Thr180/Tyr182) y (B) P- p38 después del tratamiento con citoquina y DHA. Los resultados muestran una reducción significativa en el contenido de la forma fosfo-P38 activa como resultado de la preincubación con DHA. Todos los Western blot se normalizaron con actina.

Capítulo 4. Resultados

Cada punto es la media \pm SEM de tres experimentos independientes. (***, $p < 0,0001$ con respecto al control del vehículo y ###, $p < 0,0001$ para las células pretratadas con DHA60 μ M con respecto a la células tratadas solamente con citoquinas.

Capítulo 4. Resultados

3. Efecto del ácido eicosapentaenoico (EPA) sobre las células de glía.

Tratamiento con EPA a bajas concentraciones no induce apoptosis en células de glía

Para determinar los posibles efectos citotóxicos del EPA se trataron los cultivos primarios de células de glía con EPA a diferentes concentraciones micromolares (30 μ M, 60 μ M, 90 μ M, 120 μ M, 150 μ M, 200 μ M, 400 μ M, 600 μ M y 800 μ M). La determinación de la viabilidad celular se realizó mediante el ensayo de MTT. Después de 24 horas de incubación se observa que la reducción de MTT para las concentraciones más bajas de EPA no presentó diferencias significativas respecto al control. Sin embargo, las concentraciones de 400 μ M, 600 μ M y 800 μ M mostraron un aumento significativo de la reducción de MTT que incrementaba con la dosis del ácido graso (Gráfica 15).

Tratamiento con EPA a altas concentraciones aumenta la producción de ON mediada por citoquinas en células de glía.

Para determinar si las células gliales tratadas con EPA aumentaban la producción de ON y a qué dosis, se trataron los cultivos primarios de células de glía con EPA a diferentes concentraciones micromolares (30 μ M, 60 μ M, 90 μ M, 120 μ M, 150 μ M, 200 μ M, 400 μ M, 600 μ M y 800 μ M). La determinación de la producción de óxido nítrico se llevó a cabo utilizando el reactivo de Griess. Las dosis más altas de EPA (200 μ M, 400 μ M, 600 μ M y 800 μ M) mostraron una diferencia significativa de producción de óxido nítrico respecto al control. Esta producción de ON aumenta al incrementar la dosis de EPA a partir de 200 μ M (Gráfica 16).

Capítulo 4. Resultados

Tratamiento con EPA a bajas concentraciones disminuye la producción de ON mediada por citoquinas en células de glía.

Cuando las células gliales fueron pre-tratadas con EPA 60 μ M 4 horas antes del tratamiento con citoquinas, la producción de ON fue inhibido significativamente (Gráfica 17). La producción del óxido nítrico fue determinado mediante la prueba de Griess.

Para determinar los posibles efectos citotóxicos de la combinación del tratamiento de EPA con citoquinas, se realizó la determinación de la viabilidad celular mediante el ensayo MTT para descartar que la disminución en la producción de ON fuera producto de la muerte de las células. (Gráfica 18). Se observa que la reducción de MTT para el pre-tratamiento con solo EPA a 60 μ M, el tratamiento con las tres citoquinas y la combinación de EPA60 μ M más citoquinas, no mostraron diferencias significativas respecto al control.

Al observar que la viabilidad de las células no se ha alterado, es posible deducir que probablemente la disminución del ON se debe al pre-tratamiento de las células con EPA.

Al realizar la tinción de Hoescht para marcar los núcleos, se observa que las citoquinas producen un aumento significativo de la fracción de células apoptóticas. Sin embargo, en las células tratadas con el tratamiento combinado de EPA mas citoquinas, los núcleos se conservan de una forma más parecida a los núcleos de las células correspondientes al control, lo que significaría que probablemente el pre-tratamiento con EPA disminuye la formación de núcleos apoptóticos (Figura 20).

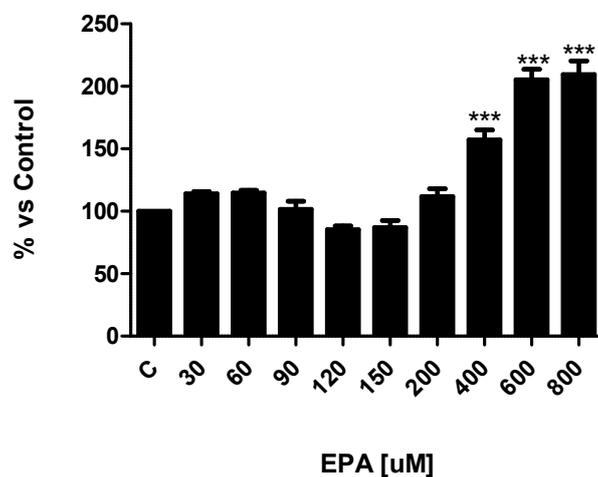
Capítulo 4. Resultados

Para determinar si la disminución de la producción de ON en el cultivo de glía tratado con EPA podría estar relacionado con los niveles de proteína iNOS, se realizaron western blot contra iNOS y se observó que los niveles de la proteína estaban significativamente aumentados en el tratamiento con citoquinas. También se evidenció una disminución significativa de la proteína en los que tuvieron un pretratamiento con EPA antes de la exposición a citoquinas (Gráfica 19). Los datos actuales muestran que quizás el EPA inhibe la activación inflamatoria de las células gliales con respecto a la inducción de iNOS y la producción de ON.

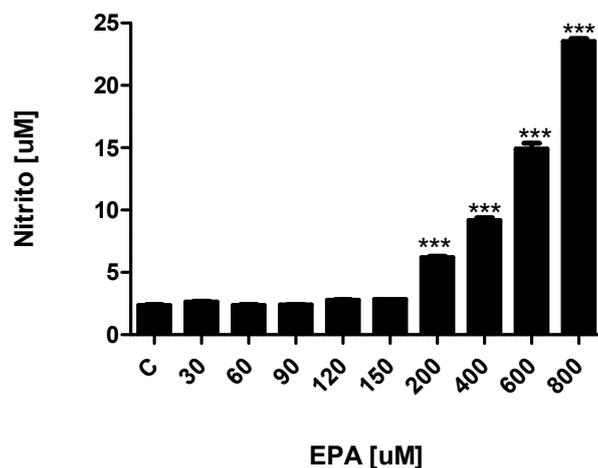
Tratamiento con EPA inhibe la vía de señalización de p38 en las células de glía

Para determinar si la inhibición en la inducción de iNOS y la producción de ON observada en los tratamientos realizados con EPA podría estar relacionada con la vía p38 MAPK, se examinó el efecto del EPA sobre la fosforilación y actividad inducida por citoquinas sobre p38 MAPK. Se realizó el pretratamiento de las células de glía con EPA a 60 μ M 4 horas antes de la incubación con citoquinas. De acuerdo con lo observado en las transferencias de western blot se evidencia un aumento significativo del contenido de la forma activa de p38 (fosfo-P38 Thr180 / Tyr182) como resultado de la exposición a citoquinas, que puede ser revertida mediante el pretratamiento de células gliales con EPA (Gráfica 20). Estos resultados muestran que quizás EPA es capaz de inhibir la vía p38 MAPK.

Capítulo 4. Resultados

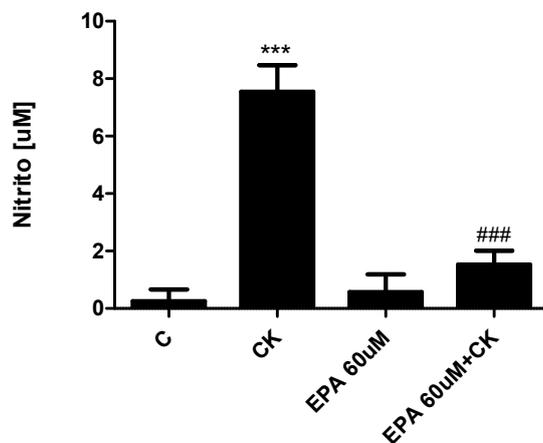


Gráfica 15. Tratamiento de cultivos de células gliales con diferentes concentraciones de EPA no induce muerte celular. Sin embargo, a medida que aumenta la concentración de EPA, aumenta significativamente la reducción de MTT (** $P < 0.0001$). Cada punto es la media \pm SEM de tres experimentos independientes.

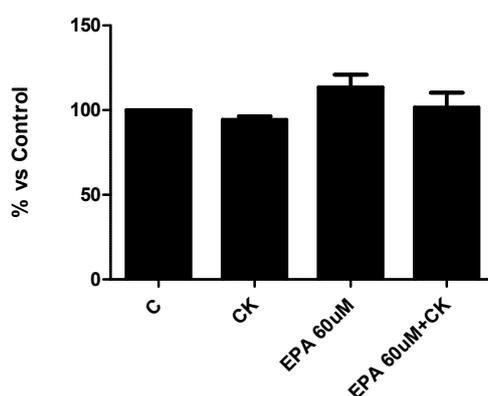


Gráfica 16. Producción de Óxido Nítrico en cultivo de glía tratada con diferentes concentraciones de EPA. Cada punto es la media \pm SEM de tres experimentos independientes (** $P < 0.0001$).

Capítulo 4. Resultados



Gráfica 17. Niveles de nitrito en medio de cultivo de células no tratadas [C], células tratadas solamente con citoquinas [CK], Células tratadas solamente con EPA durante 4 horas [EPA 60µM], y tratamiento combinado de EPA y citoquinas [EPA 60µM + CK] en cultivo de glía. Cada punto es la media \pm SEM de tres experimentos independientes. (***, $p < 0,0001$ con respecto al control del vehículo y ###, $p < 0,0001$ para las células pretratadas solo con CK con respecto a la células tratadas con EPA60µM +CK).



Gráfica 18. Tratamiento de cultivos de células gliales tratadas con EPA60µM y citoquinas no induce muerte celular. No hay diferencias significativas respecto al control. Cada punto es la media \pm SEM de tres experimentos independientes.

Capítulo 4. Resultados

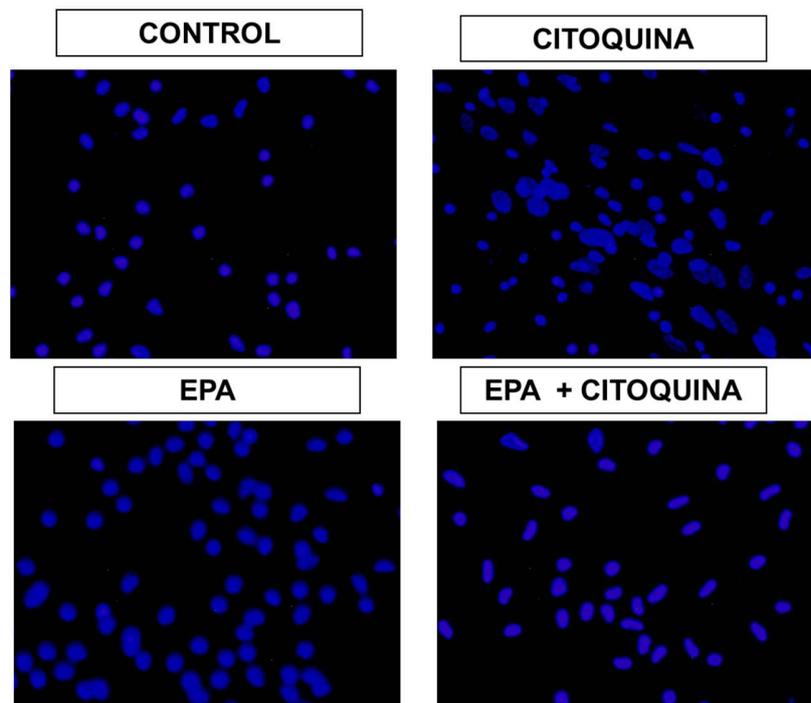
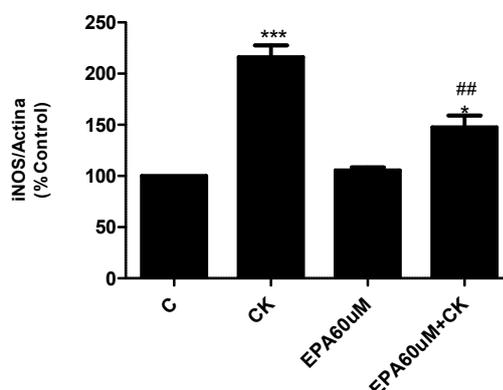
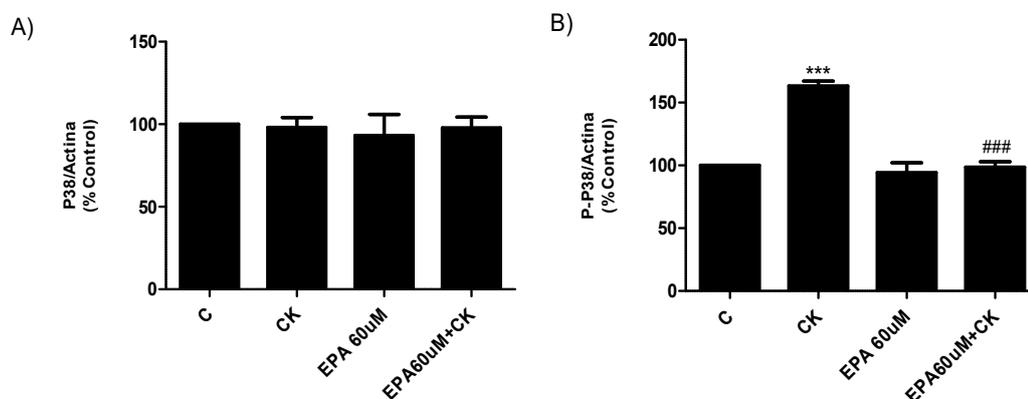


Figura 20. Imagen del cultivo glial caracterizado Hoechst (azul), que se utiliza para marcar los núcleos celulares.

Capítulo 4. Resultados



Gráfica 19. Transferencia de Western blot contra iNOS para los diferentes tratamientos. Todos los Western blot se normalizaron con actina. Cada punto es la media \pm SEM de tres experimentos independientes. (***, $p < 0,0001$; *, $p < 0,05$ con respecto al control del vehículo y ##, $p < 0,0001$ para las células pretratadas con EPA60µM con respecto a la células tratadas solamente con citoquinas).



Gráfica 20. Western blots contra (A) p38 total (Thr180/Tyr182) y (B) P- p38 después del tratamiento con citoquina y EPA. Los resultados muestran una reducción significativa en el contenido de la forma fosfo-P38 activa como resultado de la preincubación con EPA. Todos los Western blot se normalizaron con actina. Cada punto es la media \pm SEM de tres experimentos independientes. (***, $p < 0,0001$ con respecto al control del vehículo y ###, $p < 0,0001$ para las células pretratadas con EPA60µM con respecto a la células tratadas solamente con CK).

Capítulo 4. Resultados

4. Efecto del ácido palmítico (AP) sobre las células de glía.

Tratamiento con AP a bajas concentraciones no induce apoptosis en células de glía

Para determinar los posibles efectos citotóxicos del AP se trataron los cultivos primarios de células de glía con AP a diferentes concentraciones micromolares (30 μ M, 60 μ M, 90 μ M, 120 μ M, 150 μ M, 200 μ M, 400 μ M, 600 μ M y 800 μ M). La determinación de la viabilidad celular se realizó mediante el ensayo de MTT. Después de 24 horas de incubación se observa que la reducción de MTT para las concentraciones más bajas de AP no presentó diferencias significativas respecto al control. Sin embargo, las concentraciones de 600 μ M y 800 μ M mostraron una toxicidad significativa que aumentaba con la dosis, lo cual parece indicar que el AP a elevadas concentraciones puede producir muerte en las células de glía (Gráfica 21).

Tratamiento con AP a altas concentraciones aumenta la producción de ON mediada por citoquinas en células de glía.

Para determinar si las células gliales tratadas con AP aumentaban la producción de ON y a qué dosis, se trataron los cultivos primarios de células de glía con AP a diferentes concentraciones micromolares (30 μ M, 60 μ M, 90 μ M, 120 μ M, 150 μ M, 200 μ M, 400 μ M, 600 μ M y 800 μ M). La determinación de la producción de óxido nítrico se llevó a cabo utilizando el reactivo de Griess. Las dosis más altas de AP (400 μ M, 600 μ M y 800 μ M) mostraron una diferencia significativa de producción de óxido nítrico respecto al control. Esta producción de ON aumenta al incrementar la dosis de AP a partir de 400 μ M (Gráfica 22).

Capítulo 4. Resultados

Tratamiento con AP a bajas concentraciones no tiene efecto sobre la producción de ON mediada por citoquinas en células de glía.

Cuando las células gliales fueron pre-tratadas con AP a 60 μ M 4 horas antes del tratamiento con citoquinas, la producción de ON no fue inhibido por el ácido palmítico y la cantidad de producción de ON entre las citoquinas y el tratamiento combinado entre ácido palmítico más citoquinas no presentaron diferencias significativas. Sin embargo, la producción de ON en las células tratadas con citoquina y el tratamiento combinado entre ácido palmítico y citoquina aumentaron significativamente la producción de ON con respecto al control (Gráfica 23). La producción del óxido nítrico fue determinado mediante la prueba de Griess.

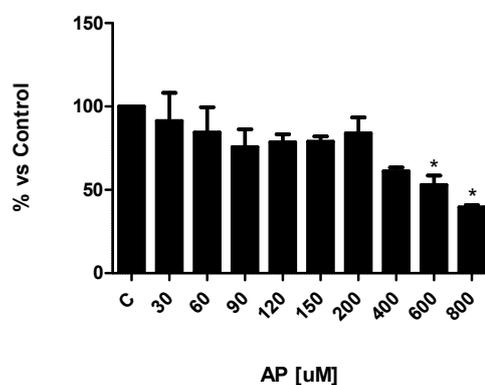
Para determinar los posibles efectos citotóxicos de la combinación del tratamiento de AP con citoquinas, se realizó la determinación de la viabilidad celular mediante el ensayo MTT para determinar si hubo muerte en las células de glía (Gráfica 24). Se observa que la reducción de MTT para el pre-tratamiento con AP a 60 μ M solo, el tratamiento con las tres citoquinas y la combinación de AP60 μ M más citoquinas, no mostraron diferencias significativas respecto al control.

Para determinar si la producción de ON en el cultivo de glía tratado con AP podría estar relacionado con los niveles de proteína iNOS, se realizaron western blot contra iNOS y se observó que los niveles de la proteína estaban significativamente aumentados en las células tratadas solo con citoquinas y en las que tuvieron un pre-tratamiento con AP antes de la exposición a citoquinas (Gráfica 25). Los datos actuales muestran que el AP no inhibe la activación inflamatoria de las células gliales con respecto a la inducción de iNOS y la producción de ON cuando se combina con citoquinas proinflamatorias.

Capítulo 4. Resultados

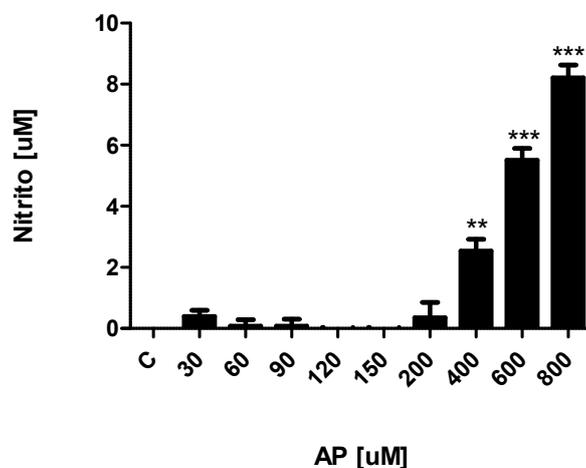
Tratamiento con AP activa la vía de señalización de p38 en las células de glía

Para determinar si la inducción de iNOS y la producción de ON observada en los tratamientos realizados con AP podrían estar relacionada con la vía p38 MAPK, se examinó el efecto del AP sobre la fosforilación y actividad inducida por citoquinas sobre p38 MAPK. Se realizó el pretratamiento de las células de glía con AP a 60µM 4 horas antes de la incubación con citoquinas. De acuerdo con lo observado en las transferencias de western blot se evidencia un aumento significativo del contenido de la forma activa de p38 (fosfo-P38 Thr180 / Tyr182) como resultado de la exposición a citoquinas, sin que sea atenuada o revertida mediante el pretratamiento de células gliales con AP (Gráfica 26). Estos resultados muestran que quizás AP no inhibe la activación de la vía p38 MAPK en presencia de citoquinas, así como tampoco muestra un efecto activador de la vía cuando se exponen las células al AP (60µM) de acuerdo a las condiciones experimentales de este estudio.

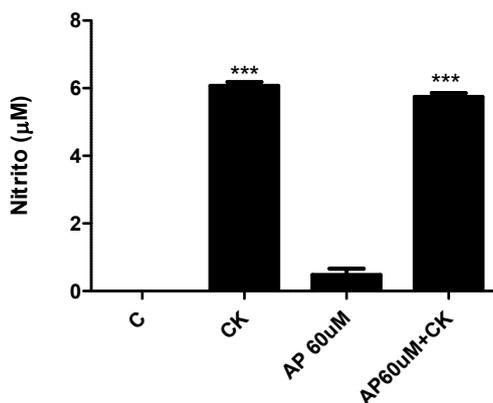


Gráfica 21. Tratamiento de cultivos de células gliales con diferentes concentraciones de AP no induce muerte celular a bajas concentraciones, sin embargo a altas concentraciones es citotóxico (* P<0.05). Cada punto es la media ± SEM de tres experimentos independientes.

Capítulo 4. Resultados

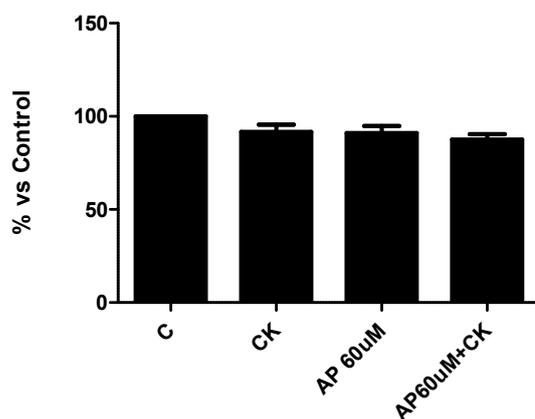


Gráfica 22. Producción de Óxido Nítrico en cultivo de glía tratada con diferentes concentraciones de AP. Cada punto es la media \pm SEM de tres experimentos independientes (**, $P < 0.01$; ***, $P < 0.0001$).

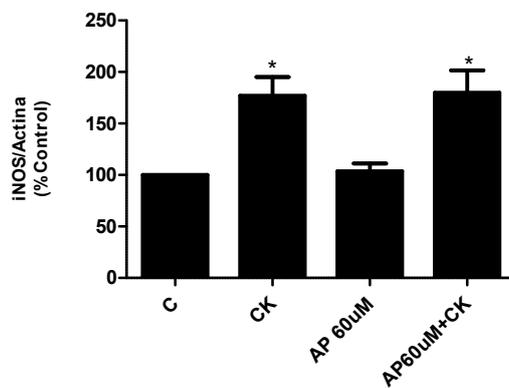


Gráfica 23. Niveles de nitrito en medio de cultivo de células no tratadas [C], células tratadas solamente con citoquinas [CK], Células tratadas solamente con AP durante 4 horas [AP 60 μ M], y tratamiento combinado de AP y citoquinas [AP 60 μ M + CK] en cultivo de glía. Cada punto es la media \pm SEM de tres experimentos independientes. (***, $p < 0,0001$ con respecto al control del vehículo). No hay diferencias significativas entre las células pretratadas solo con CK con respecto a la células tratadas con AP60 μ M +CK.

Capítulo 4. Resultados

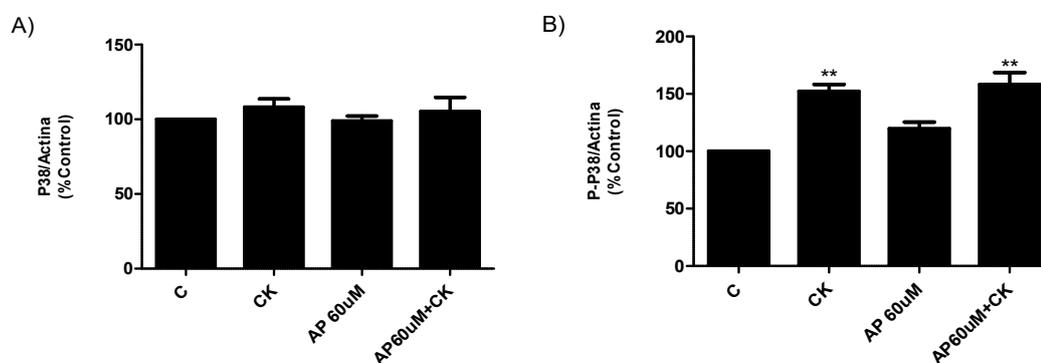


Gráfica 24. Tratamiento de cultivos de células gliales tratadas con AP y citoquinas no induce muerte celular. No hay diferencias significativas respecto al control ($P>0,05$). Cada punto es la media \pm SEM de tres experimentos independientes.



Gráfica 25. Transferencia de Western blot contra iNOS para los diferentes tratamientos. Cada punto es la media \pm SEM de tres experimentos independientes. (*, $p < 0,05$; con respecto al control del vehículo).

Capítulo 4. Resultados



Gráfica 26. Western blots contra (A) p38 total (Thr180/Tyr182) y (B) P- p38 después del tratamiento con citoquina y AP. Los resultados no muestran ninguna reducción en el contenido de la forma activa de P-P38 como resultado de la preincubación con AP. Todos los Western blot se normalizaron con actina. Cada punto es la media \pm SEM de tres experimentos independientes. (**, $p < 0,005$ con respecto al control del vehículo).

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTO DE LA MELATONINA, LEPTINA Y ÁCIDOS GRASOS: DOCOSAHEXAENOICO, EICOSAPENTAENOICO Y PALMÍTICO,
EN LA MODULACIÓN DE LA INFLAMACIÓN EN CÉLULAS DE GLÍA

Nohora Milena Martínez López

CAPITULO 5. DISCUSIÓN

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTO DE LA MELATONINA, LEPTINA Y ÁCIDOS GRASOS: DOCOSAHEXAENOICO, EICOSAPENTAENOICO Y PALMÍTICO,
EN LA MODULACIÓN DE LA INFLAMACIÓN EN CÉLULAS DE GLÍA

Nohora Milena Martínez López

Capítulo 5. Discusión

Efecto de las citoquinas pro-inflamatorias en la producción de óxido nítrico en cultivos de glía.

El cerebro es un órgano importante que controla las funciones de todos los otros órganos en el cuerpo humano a través de la conectividad neuronal y la transmisión de la señal neuronal. Sin embargo, el sistema nervioso central es la estructura más compleja y sigue siendo muy poco conocida. En las enfermedades neuroinflamatorias los circuitos neuronales en el sistema nervioso central y sus funciones se ven afectados (Busche and Konnerth, 2016). Para el funcionamiento normal del cerebro, éste depende de las estrechas interacciones que se establecen entre las neuronas y las células gliales tanto durante el desarrollo, como en el cerebro adulto. La interacción entre estas dos poblaciones celulares es esencial en la respuesta del sistema nervioso central en condiciones patológicas (Polazzi and Contestabile, 2002)(Chen and Swanson, 2003).

La glía es capaz de responder al daño neuronal con cambios morfológicos y funcionales constituyendo lo que se denomina activación glial o glía reactiva. Se ha sugerido que la activación glial contribuye a la disfunción neuronal y a la consecuente muerte neuronal en enfermedades neurodegenerativas (Eddleston and Mucke, 1993)(Kreutzberg, 1996)(González-Scarano and Baltuch, 1999)(B. Liu and Hong, 2003). Se desconoce la naturaleza de las señales que inducen la activación glial en respuesta al daño neuronal y es cuestionado el papel nocivo o beneficioso de la glía reactiva para las neuronas. Se sabe que la glía reactiva es capaz de producir factores de crecimiento, citoquinas, ON y neuropéptidos que pueden tener efectos tanto sobre las neuronas como sobre las propias células gliales y que pueden estar relacionados con procesos de neuroprotección o de neurodegeneración (G Raivich et al., 1999) (Streit et al., 1999).

Capítulo 5. Discusión

Se ha propuesto que en presencia de daño neuronal tanto el contacto directo entre las neuronas y las células gliales, como los factores solubles que secretan las neuronas dañadas, juegan un papel relevante en la respuesta frente a un estímulo (Neumann, 2001). La activación de las células gliales después de una lesión neuronal principalmente refleja un mecanismo de respuesta cuyo objetivo primordial es la neuroprotección. Sin embargo, cuando se pierde la comunicación específica entre las neuronas dañadas y las células gliales se genera una activación excesiva que conlleva a un estado de inflamación persistente, y como consecuencia, induce y/o exacerba la neurodegeneración (Streit, 1996)(Bruce-Keller, 1999)(Streit et al., 1999)(Streit, 2002)(Hanisch, 2002b).

Debido a lo complejo que puede llegar a ser el estudio de los mecanismos moleculares implicados en la activación glial in vivo, se han desarrollado distintos modelos experimentales de activación glial in vitro. Es posible utilizar diferentes tipos de cultivos para estudiar las funciones de las células gliales. Sin embargo, para este estudio se utilizó el cultivo mixto de glía el cual fue sometido a un tratamiento con citoquinas pro-inflamatorias para inducir la activación glial. Se buscó una concentración de citoquinas que fuera capaz de producir cambios reactivos en las células gliales, para lo cual se utilizaron como activadores de la glía las citoquinas TNF α , IL-1 β e IFN- γ , con el fin de inducir una respuesta inflamatoria celular y valorar el efecto de la misma sobre el cultivo de glía, así como estudiar las vías de señalización que activan estas citoquinas proinflamatorias.

Se sabe que la inflamación es un mecanismo de protección en el cuerpo que funciona para la reparación, regeneración y extracción de tejidos y células dañadas o agentes infecciosos, parásitos o toxinas del cuerpo (Kulkarni et al., 2016). Del mismo modo, la neuroinflamación es un mecanismo de protección para restaurar las células gliales dañadas y células neuronales en el sistema nervioso central. Está mediada por la

Capítulo 5. Discusión

microglía, astrocitos, neuronas, células T, neutrófilos, mastocitos, y mediadores inflamatorios liberados a partir de estas células (Shabab et al., 2017). A diferencia de otras células, una vez que las neuronas son dañadas o degeneradas, son incapaces de ser reparadas o regeneradas en el sistema nervioso central (Ransohoff, 2016b).

La neuroinflamación es inicialmente una respuesta protectora en el cerebro, pero el exceso de respuestas inflamatorias son perjudiciales e inhiben la regeneración neuronal (Russo and McGavern, 2016). De hecho, la neuroinflamación crónica juega un papel importante en la aparición y progresión de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y la Esclerosis Múltiple, entre otras (Chen et al., 2016b).

Cuando hay una reacción inflamatoria las células gliales se activan (principalmente microglía y astrocitos) llegando a producir factores neurotóxicos que contribuyen a la lesión neuronal. Dentro de esos factores se encuentran las citoquinas pro-inflamatorias, el óxido nítrico, las especies reactivas de oxígeno y el aumento de glutamato. En ese proceso de activación glial, los niveles excesivos de óxido nítrico se generan a través del aumento de la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), principalmente como resultado de la actividad de la microglía.

Los altos niveles en la expresión de iNOS en glía produce un aumento del óxido nítrico (ON) lo que inhibe la respiración neuronal, dando como resultados una despolarización neuronal y liberación de glutamato, seguida de excitotoxicidad y liberación de glutamato a partir de los astrocitos mediante la liberación vesicular dependiente de calcio. La hipoxia sinergiza fuertemente con la expresión de iNOS para inducir la muerte neuronal porque el ON inhibe la citocromo oxidasa en competencia con oxígeno (Brown, 2007). La elevada cantidad de producción de ON es perjudicial para las neuronas, ya que es un radical libre que inducen modificaciones de la proteína por medio de nitrosilación y nitración (G. C. Brown,

Capítulo 5. Discusión

2010a). Los altos niveles de ON ejercen sus efectos tóxicos a través de múltiples mecanismos, incluyendo la peroxidación lipídica, daño mitocondrial, la nitración de proteínas y la oxidación, el agotamiento de las reservas de antioxidantes, la activación o inhibición de diversas rutas de señalización, y el daño del ADN. Por lo anterior, la activación de la iNOS en las células gliales constituye un evento crítico en los trastornos neurodegenerativos mediados por la inflamación (SAHA and PAHAN, 2006a).

En este estudio los cultivos primarios de glía fueron tratados con citoquinas pro inflamatorias (TNF α , 20ng/ ml; IL1 β , 20ng/ml; IFN γ 20ng/ml) porque como se ha dicho anteriormente, un mediador citotóxico son las citoquinas proinflamatorias, principalmente factor de necrosis tumoral-alfa (TNF α), Interleucina 1-beta (IL-1 β), e interferón-gamma (IFN- γ), que son responsables de la inducción de iNOS en las células gliales y exageran el aumento de la producción de ON, que es probablemente uno de los principales mediadores de la pérdida de células neuronales (Chen et al., 2009)(Saha and Pahan, 2006).

Al medir la producción de ON mediada por las citoquinas proinflamatorias, se demostró que (aunque todas las citoquinas aumentan la producción de ON) es mayor el efecto en la producción de ON cuando se utilizan tratamientos combinados de estas tres citoquinas proinflamatorias y que dicho efecto aumenta a medida que aumenta el tiempo de exposición a las citoquinas. Con la tinción de GAP e Iba-1, se evidenció que estas tres citoquinas son capaces de activar tanto los astrocitos como la microglía, lo que explicaría el aumento en la producción de ON. La liberación de nitrito después de la activación glial por las citoquinas pro-inflamatorias puede ser un potencial evento patológico responsable de la degeneración neuronal en neuronas vecinas (Brown, 2007)(Brown and Neher, 2010a)(Sastre et al., 2006a)(Verkhatsky, 2010).

Capítulo 5. Discusión

En este estudio se investigaron las vías de moleculares implicadas en la generación de ON por las citoquinas pro-inflamatorias en las células gliales, encontrando que las citoquinas desencadenan la activación de varias vías tales como la JNK y p38 quinasa, que son conocidos por estar íntimamente involucrados en el proceso inflamatorio y la apoptosis, además de contribuir a la activación glial (Naruishi et al., 2003)(Pawate and Bhat, 2006). Además, se encontró un aumento significativo en la fosforilación de STAT1 y STAT3. Igualmente los niveles de I κ B α disminuyeron, lo que indica la activación de NF κ B. Es importante tener en cuenta que las proteínas de la familia NF κ B son factores de transcripción que regulan la expresión de genes involucrados en diferentes procesos inmunitarios e inflamatorios, así como procesos relacionados con el crecimiento, desarrollo y regulación de la muerte neuronal. La activación de NF κ B es el resultado de la fosforilación de I κ B por el complejo IKK. Los inductores de la actividad de NF κ B pueden ser especies reactivas de oxígeno (ROS), factores de necrosis tumoral, interleuquina 1-beta, lipopolisacárido bacterial, entre otros. La activación de genes por NF κ B puede desencadenar respuestas inflamatorias o inmunes, respuestas de supervivencia celular o proliferación celular.

Efecto de la melatonina sobre las células de glía.

En diferentes estudios la melatonina ha demostrado ser eficaz en la protección contra casi todos los modelos experimentales de enfermedades neurodegenerativas y el deterioro cognitivo(Feng and Zhang, 2004)(Borah and Mohanakumar, 2009)(Bondy et al., 2010)(Ionov et al., 2011)(Borah and Mohanakumar, 2009). Los posibles efectos neuroprotectores de la melatonina pueden residir en sus funciones fisiológicas que incluyen propiedades antioxidantes, interacciones con las rutas de señalización intracelulares, regulación de la supervivencia celular o genes de apoptosis, y función mitocondrial (Carpentieri et al., 2012)(Jeong et al., 2012). En

Capítulo 5. Discusión

este estudio se evaluó el potencial anti-inflamatorio de la melatonina en cultivos de células gliales tratados con tres citoquinas pro-inflamatorias (TNF α , IL-1 β e IFN- γ) demostrando que la melatonina contrarresta la expresión de iNOS y la producción de ON inducida por las citoquinas pro-inflamatorias. Este efecto inmunomodulador de la melatonina sobre la activación de células gliales podría explicar en parte su papel central en la acción neuroprotectora cerebral. El estudio de los efectos de la melatonina en las células gliales es particularmente importante, teniendo en cuenta la coexistencia de las neuronas y la glía en el cerebro. Las interacciones de los diferentes tipos de células en condiciones perjudiciales tienen un papel importante, ya que pueden favorecer el proceso de muerte celular o neuroprotección.

Varios estudios han descrito previamente que la melatonina puede regular la inducción de iNOS en diversos modelos tales como en la línea celular C6 astrocitoma después del tratamiento con la neurotoxina MPTP parkinsoniana, en los tejidos renales, y en el hígado de SAMP8 (I.-C. Lee et al., 2012) (Niranjan et al., 2010). La melatonina también ha sido utilizada para diseñar y sintetizar nuevas familias de compuestos que actúan como inhibidores de la iNOS y como potenciales fármacos neuroprotectores (Camacho et al., 2012).

Teniendo en cuenta que las citoquinas pro-inflamatorias activan las vías relacionadas con la JNK y p38 quinasa y aumentan los niveles de I κ B α , lo que indica la activación de NF κ B, en el presente estudio, se demostró que la melatonina sólo fue capaz de inhibir la MAPK p38 específicamente, sin afectar a las otras vías. La familia p38 MAPK se compone de proteínas quinasas de serina/treonina dirigida por prolina altamente conservadas que se activan en respuesta a las señales inflamatorias. Es importante tener en cuenta que se está prestando cada vez más atención al papel potencial de la p38 MAPK en la apoptosis neuronal. Se ha demostrado en varios estudios recientes que el aumento de la actividad de p38 MAPK desempeña un papel crucial en la muerte neuronal en respuesta al estímulo de estrés (Li et al., 2015) (W. Wang et al., 2015) (Takeda and Ichijo, 2002)

Capítulo 5. Discusión

Estudios anteriores han demostrado que las MAPKs están implicadas en la inducción de iNOS mediada por citoquinas en astrocitos, oligodendrocitos y células microgliales. También se encontró que la p38 MAPK juega un papel importante en la expresión génica de NOS2 en respuesta a citoquinas y algunos estímulos, tales como Taxol (Bhat et al., 2002a)(Bhat et al., 1999a). Tanto la p38 MAPK y la ruta de la JNK podrían funcionar en paralelo en el proceso de activación glial. Por lo tanto, en el presente estudio, los datos indican que, en las células gliales, múltiples mecanismos pueden contribuir a la expresión de iNOS, incluyendo la activación de MAPKs y NF κ B; sin embargo, la melatonina sólo inhibe específicamente p38.

Este estudio muestra que las citoquinas pro-inflamatorias activan las células gliales incrementando la producción de ON a través de una activación sostenida de las vías MAPK. Sin embargo, tras el tratamiento con citoquinas pro-inflamatorias, la melatonina sólo impide significativamente la activación de MAPK p38 lo suficiente como para reducir la expresión de iNOS y la posterior liberación de nitrito. Los resultados del estudio sugieren que, además de las bien conocidas propiedades como eliminadora de radicales libres, la melatonina posee efectos neuroprotectores que también pueden ser mediados por la inhibición en la liberación de nitrito por células gliales a través de la inhibición de la expresión de iNOS. Por esa razón, se propone que esta hormona puede ser una estrategia terapéutica prometedora en los trastornos asociados a la neuroinflamación.

Efecto de la leptina sobre las células de glía.

La leptina es una adipocina que se sintetiza principalmente en el tejido adiposo. La leptina circulante atraviesa la barrera hematoencefálica (BHE) en el cerebro, donde ejerce funciones clave en la regulación fisiológica de la ingesta de alimentos, la homeostasis de la glucosa y el gasto energético. Estudios anteriores han informado que la leptina también tiene efectos neuroprotectores en la enfermedad de

Capítulo 5. Discusión

Alzheimer a través de la inhibición de BACE1 y GSK3 β y afecta los procesos de memoria (Arnoldussen et al., 2014). La leptina también está implicada en la inflamación sistémica que se asocia con la obesidad (Borges et al., 2015b)(Fernández-Riejos et al., 2010)(Otero et al., 2006). Se ha descrito que la leptina desempeña un papel en la activación del sistema inmunológico y es mediadora de la inflamación. Existe una evidencia creciente de que la leptina está implicada en la patogénesis de enfermedades inflamatorias autoinmunes. En este contexto, la leptina puede ser uno de los mediadores responsables de la inflamación sistémica que puede estar presente en patologías crónicas asociadas al síndrome metabólico como la aterosclerosis, asociada a la obesidad, especialmente obesidad central.

Los resultados de la presente investigación muestran una actividad anti-inflamatoria significativa de la leptina contra tratamientos realizados con citoquinas TNF α , IL1 β y IFN γ , en cultivos de células gliales de crías de ratón C57BL/6J. En el estudio se describe una reducción significativa en la producción de ON, a partir de nitrito medido liberado en el medio de cultivo, usando el reactivo de Griess, y relacionado con la exposición a leptina. Algunos informes evidencian una relación controversial entre la leptina y el estrés oxidativo, pero sugieren una posible interacción de especies reactivas de oxígeno y leptina en la regulación de metabolismo de la energía en la obesidad. Existe una creciente evidencia de que el estado inflamatorio crónico de bajo grado, asociado con la obesidad, podría desempeñar un papel clave en la interrupción de señalización de la leptina (Sáinz et al., 2015)(Sáinz et al., 2015). Los resultados de este estudio sugieren que el efecto inmunomodulador de la leptina en la activación de células gliales través de la inhibición de iNOS podría explicar en parte su papel central en la acción neuroprotectora cerebral. ON producido por iNOS parece ser un mediador clave de la activación glial que induce la muerte neuronal (Bhat et al., 2002b)(Sastre et al., 2006b)(Ji and Suter, 2007). Este estudio ha demostrado que la leptina inhibe la sobreexpresión de iNOS y la producción de NO

Capítulo 5. Discusión

inducida por citoquinas pro-inflamatorias. La inhibición observada es proporcional a la concentración leptina y puede estar relacionado con el efecto de la leptina en la vía de p38 MAPK. Los efectos inhibidores de la leptina sobre la actividad de iNOS podrían ser importantes para prevenir el daño oxidativo en la mitocondria y la activación concomitante de la apoptosis, dando apoyo al potencial antioxidante de este compuesto y a su aplicación potencial en el tratamiento de trastornos neurológicos.

Varios estudios preclínicos sugieren que la leptina tiene acciones neuroprotectoras mediante la inhibición de la muerte celular por apoptosis, la prevención de la citotoxicidad glutamatérgica y la protección contra el estrés oxidativo (Otero et al., 2006).

En general, los datos sugieren que la leptina actúa como un factor anti-inflamatorio y anti-apoptótico en las células gliales expuestas a citoquinas pro-inflamatorias, ejerciendo su función a diferentes niveles: actúa sobre la vía de p38 MAPK y la reducción de su actividad y la producción de ON.

Efecto de los ácidos grasos en células de glía.

- Efecto de los ácidos grasos en la viabilidad celular y producción de óxido nítrico en células de glía.

El cerebro es un órgano muy sensible a los mediadores inflamatorios. Hay datos que indican que las citoquinas específicamente pueden tener efectos adversos clínicamente significativos en la cognición y la homeostasis neuronal (Wilson et al., 2002) (Akiyama et al., 2000.) Citoquinas como TNF, IL-1 β y IL-6 pueden interrumpir rutas implicadas en la cognición y la memoria (Bellinger et al., 1995) (Jankowsky and Patterson, 1999). Los ácidos grasos saturados de cadena larga pueden activar respuestas inmunes inflamatorias e innatas en el cuerpo (Averill and Bornfeldt,

Capítulo 5. Discusión

2009)(Kennedy et al., 2008), se ha demostrado que el ácido palmítico desencadena la inflamación en macrófagos cultivados (Laine et al., 2007b) y puede modular el procesamiento de amiloide en las neuronas y astrocitos (Patil and Chan, 2005b)(Patil et al., 2006b).

Algunos estudios muestran que la exposición a ácido palmítico aumenta la expresión de citoquinas proinflamatorias y óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), óxido nítrico y especies reactivas de oxígeno en células microgliales (Cayla M Duffy et al., 2015b) y puede desencadenar la producción de mediadores pro-inflamatorios que contribuyen a la muerte neuronal(Wang et al., 2012b) (Cayla M Duffy et al., 2017).

Por otra parte, la evidencia acumulada indica que el ácido eicosapentaenoico y el ácido docosahexaenoico (EPA / DHA), que son ácidos grasos poliinsaturados omega 3 (n3), tienen una variedad de actividades biológicas tales como antioxidante y anti-inflamatoria lo que les confiere efectos protectores en diferentes tipos de células. Las actividades antiinflamatorias y antiapoptóticas del DHA y EPA han sido demostradas en resultados de diferentes modelos experimentales (Bousquet et al., 2011)(Vines et al., 2012)(Molinar-Toribio et al., 2015).

Las propiedades anti-inflamatorias del DHA y EPA son ejercidas a través de diversos mecanismos dentro de los que se incluyen las alteraciones en la fluidez de la membrana, la síntesis de eicosanoides y el receptor de peroxisoma proliferador activado (PPAR). Si estos cambios ocurren en las células inflamatorias, esto finalmente resultará en la reducción de la síntesis o detrimento de mediadores inflamatorios tales como el óxido nítrico (ON), factor de necrosis tumoral alfa, α (TNF- α), interleuquina (IL)-1 β , IL-6, prostaglandina-E 2 (PGE 2) y leukotriene-B4 (LTB 4) (CALDER, 2004)

Capítulo 5. Discusión

DHA y EPA son precursores de protectinas y resolvinas que tienen efectos antiinflamatorios (Mori et al., 2017) y estos ácidos grasos son capaces de suprimir la inducción de iNOS y la producción de ON (Araki et al., 2011)(Kondreddy and Kamatham, 2016) .

En este estudio se ha demostrado que el AP, el DHA y el EPA tienen diferentes efectos sobre la viabilidad celular, y la modulación de la producción de óxido nítrico. Los resultados muestran que bajas concentraciones de los tres ácidos grasos no generan muerte de las células gliales. Sin embargo, concentraciones mayores de 600 μ M disminuyen la conversión de MTT a formazán tanto en AP como en DHA, lo que sugiere que estas dosis de los dos ácidos grasos inducen algún grado de disfunción mitocondrial o citotoxicidad, aspecto que se encuentra en consonancia con los resultados encontrados por el estudio realizado por Veszelka et al 2013, en donde dosis de DHA a 300 μ M dió como resultado una disminución significativa en la conversión de MTT células de glía(Veszelka et al., 2013b).

EPA tuvo un comportamiento diferente ya que los resultados muestran que a concentraciones mayores a 400 μ M la conversión de MTT a formazán aumento significativamente y que este aumento fue proporcional al aumento de la dosis de EPA, lo cual plantea la pregunta sobre si es posible que (bajo las condiciones experimentales aplicadas en este estudio) el EPA a elevadas concentraciones promoviera la proliferación celular en cultivos de glía y de ser posible este fenómeno, en cuál de las células gliales se estaría produciendo este cambio?. Lo anterior teniendo en cuenta que nuevas evidencias sugieren una compleja interacción entre los ácidos grasos omega-3 y el sistema inmune en relación con la auto-reparación del cerebro. Sin embargo, aún no se sabe si todos los ácidos grasos provocan efectos sobre la neurogénesis y tampoco se sabe a través de qué interacciones está mediado este efecto.

Capítulo 5. Discusión

Se ha reportado un estudio que ha encontrado que EPA, pero no DHA es capaz de aumentar significativamente la proliferación de células madre neurales, al parecer a través del sistema endocanabinoide (Dyall et al., 2016). Por otra parte, se sabe que las células NG2 son un tipo de célula neurona glial que representa la mayoría de las células en proliferación en el sistema nervioso central. Se sabe muy poco sobre el papel de las NG2 en condiciones patológicas, sin embargo, los estudios en roedores han demostrado cambios robustos en la población de células NG2 en áreas del cerebro que fueron sometidas a una lesión focal. Después de la lesión las células NG2 se activan, un estado caracterizado por morfología alterada, la proliferación mejorada y aumento de la expresión de su superficie característica célula NG2 (Wennström et al., 2014), (Hampton et al., 2004)(Ong and Levine, 1999).

Los resultados con EPA podrían sugerir quizás que las altas concentraciones de EPA pueden generar una situación que promueve la proliferación regulada por este tipo de célula o quizás por otro mecanismo aún desconocido. Se requiere estudiar más a fondo el efecto del EPA sobre cada tipo de célula de glía en concreto.

Por otra parte, no hay una diferencia importante en comportamiento en la producción de óxido nítrico a bajas concentraciones, en las células sometidas a tratamientos con los tres ácidos grasos a diferentes concentraciones. En primer lugar se observa que a bajas concentraciones los tres ácidos grasos no aumentan la producción de ON. Sin embargo, altas concentraciones de AP, DHA y EPA aumenta la producción de ON de manera significativa a partir de 400 μ M para AP, y a partir de 600 μ M para DHA y EPA.

Como se dijo anteriormente, es importante tener en cuenta que el ON es un mediador clave en la activación glial y la muerte neuronal inducida. Es importante tener en cuenta que los altos niveles de ON ejerce efectos neurotóxicos a través de diferentes mecanismos que incluyen el daño mitocondrial, nitración y oxidación de proteínas,

Capítulo 5. Discusión

agotamiento de reservas antioxidantes y daño a ADN(Khandelwal et al., 2011)(Brown and Neher, 2010b)(G. C. Brown, 2010b)(SAHA and PAHAN, 2006b)

Diversos estudios atribuyen efectos anti-inflamatorios a EPA y DHA a bajas concentraciones (Zajdel et al., 2013)(Di Biase et al., 2014) (Chang et al., 2015) (Zhang et al., 2015b)(L. Wang et al., 2015b), sin embargo, se dispone de poca información sobre los efectos de estos dos ácidos grasos a concentraciones mayores a 200µM en células de glía.

Por otra parte, en este estudio las células de glía fueron tratadas con AP, DHA y EPA a 60µM (cada uno), realizando tratamientos de las células con solo el ácido graso (según correspondiera) o el ácido graso en combinación con las citoquinas pro-inflamatorias (TNFα, IL1β, IFNγ,) para determinar si tenían algún efecto sobre la viabilidad celular, el aumento o disminución de iNOS y ON. El resultado demostró que el DHA y el EPA tienen un efecto inmunomodulador en el cultivo de células de glía. Estos dos ácidos grasos contrarrestaron el aumento de los niveles de proteína iNOS y la producción de óxido nítrico. Los rangos de dosis frente a los cuales DHA y EPA tienen efectos positivos en la modulación de la inflamación se encuentran en consonancia con los efectos beneficiosos relacionados a las dosis utilizadas en diferentes estudios realizados en otros tipos de células y cuyos rangos de dosis utilizados son similares a los que se encontraron como “fisiológicos” en el presente trabajo (L. Wang et al., 2015b)(Chang et al., 2015)(Zhang et al., 2015b)(Veszeka et al., 2013b). Adicionalmente, este tratamiento de DHA y EPA a 60µM no tuvo efectos negativos en la viabilidad celular.

Por otra parte, se demostró que el AP tiene un efecto contrario al DHA y el EPA, dado que los resultados no mostraron un efecto inhibitorio en la activación inflamatoria de las células gliales expuestas a las citoquinas proinflamatorias, pues no hubo

Capítulo 5. Discusión

aumento significativo de la producción de iNOS y ON, así como AP tampoco produjo un efecto inhibitor. No se evidenció que el AP a 60 μ M generara un efecto citotóxico en el tratamiento de células de glía (ni solo, ni en combinación con las citoquinas) quizás debido a que esta dosis sigue siendo baja. Lo anterior, teniendo en cuenta que otros estudios que han reportado efectos citotóxicos en glía por ácido palmítico, lo han hecho bajo condiciones experimentales cuya dosis es mayor de 100 μ M (Wang et al., 2012c) (Gupta et al., 2012b).

Estudios previos han descrito que la regulación de la iNOS está implicada en la degeneración neuronal asociada con enfermedades neurodegenerativas (Brown, G, Neher, 2010) (Sastre et al, 2006) (Ionov et al, 2011) (Graeber et al, 2011), por lo tanto, este efecto inmunomodulador de los ácidos grasos DHA y EPA sobre la activación de células gliales podría explicar, en parte, su papel en la acción neuroprotectora cerebral. El estudio de los efectos de los ácidos grasos DHA y EPA en las células gliales es particularmente importante, teniendo en cuenta la coexistencia de las neuronas y la glía en el cerebro. Las interacciones de los diferentes tipos de células en condiciones perjudiciales tienen un papel importante, ya que pueden favorecer el proceso de muerte celular o neuroprotección. Algunos estudios han mostrado que moléculas neurotóxicas como β -amiloide, pueden inducir iNOS en las células gliales (Brown, 2007) (G. Brown, 2010) (Feng et al, 2004). En la esclerosis lateral amiotrófica, por ejemplo, se evidenció la inmunorreactividad de iNOS en astrocitos activados (Barbeito LH, Pehar M, Cassina P, Vargas MR, Peluffo H and Estevez AG, 2004). Todos estos experimentos demuestran la implicación de iNOS en los trastornos neurológicos y de ahí la importancia de entender las vías moleculares relacionadas con esta.

Los efectos inhibidores de los ácidos grasos poliinsaturados (DHA y EPA) sobre la sobreexpresión de iNOS podrían ser importantes para prevenir el daño oxidativo en

Capítulo 5. Discusión

las mitocondrias y la activación de la apoptosis. Varios informes han descrito que el DHA y el EPA pueden regular la producción de ON y la expresión de iNOS (Moon et al., 2007)(Antonietta Ajmone-Cat et al., 2012)(Marion-Letellier et al., 2015). Sin embargo, el mecanismo implicado en la inhibición de iNOS inducido por DHA y EPA en las células gliales mediados por citoquinas pro-inflamatorias no se entiende claramente.

- Efecto de los ácidos grasos en la activación de la vía p38 MAPK.

La p38 MAPK es activada por una variedad de estímulos celulares incluyendo choque osmótico, citoquinas proinflamatorias, lipopolisacárido, luz ultravioleta, y factores de crecimiento. En el presente estudio, se describió el efecto de los ácidos grasos en la activación de la vía p38 MAPK en células de glía activadas por citoquinas pro-inflamatorias y se demostró que el efecto de los ácidos grasos es diferente entre el ácido graso saturado (AP) y los ácidos grasos poliinsaturados (DHA y EPA). Los resultados de este estudio muestran un aumento significativo del contenido de la forma activa de p38 (fosfo-P38 Thr180/Tyr182) como resultado de la exposición a citoquinas, que puede ser revertida por los pre-tratamientos con DHA y EPA.

Diferente sucede con el AP, en donde el resultado muestra que el aumento significativo de la forma activa de p38 como resultado de la exposición a citoquinas, no fue revertido por este ácido graso. Teniendo en cuenta que hay informes que sugieren que el AP es activador de la vía p38 MAPK (Gupta et al., 2012b), se esperaría que al combinar AP con citoquinas aumentara la forma activa de p38 (fosfo-P38 Thr180/Tyr182). En esta situación experimental no hubo un efecto positivo ni negativo de la exposición combinada de AP y citoquinas en las células de glía en lo que se refiere a la activación de la p38 MAPK, lo cual puede deberse a la baja dosis

Capítulo 5. Discusión

de AP utilizado. Es probable que quizás una alta dosis de AP combinada con las citoquinas pro-inflamatorias genere una mayor fosforilación de p38.

La familia p38 MAPK se compone de proteínas quinasas de serina/treonina dirigida por prolina altamente conservadas que se activan en respuesta a las señales inflamatorias (Kaminska et al., 2009). Estudios han demostrado que las MAPKs están implicadas en la inducción de iNOS mediada por citoquinas en astrocitos, oligodendrocitos y células microgliales. También se encontró que la MAPK p38 juega un papel importante en la expresión génica de iNOS en respuesta a citoquinas y otros estímulos (Bhat et al., 2002c) (Bhat et al., 1999b). El presente estudio sugiere que DHA y EPA son capaces de inhibir la vía p38 MAPK y con ello contribuir a la disminución en la producción de NO.

Tanto la MAPK p38 y rutas de la JNK podrían funcionar en paralelo en el proceso de activación glial. Por lo tanto, los datos de este estudio indican que, en las células gliales, múltiples mecanismos pueden contribuir a la expresión de iNOS, incluyendo la activación de MAPK, NFκB, y las vías de JAK-STAT; sin embargo, en esta ocasión sólo se trabajó con la p38 MAPK, por lo cual sería interesante estudiar el efecto de los ácidos grasos en las otras vías que son activadas por las citoquinas pro-inflamatorias, para determinar el efecto de cada ácido graso sobre las mismas y dilucidar los diferentes mecanismos por los cuales los ácidos grasos DHA y EPA son agentes anti-inflamatorios a nivel de sistema nervioso central.

La activación glial de la p38 MAPK se reconoce como una quinasa responsable de la fosforilación excesiva de tau en enfermedad de Alzheimer (Chang et al., 2010). Del mismo modo la cascada de p38 MAPK está implicada en la regulación del proceso de memoria (Dai et al., 2016). La señalización de la vía de p38 MAPK también está relacionada con patologías que incluyen los trastornos neurodegenerativos como

Capítulo 5. Discusión

la enfermedad de Parkinson y la esclerosis lateral amiotrófica pues contribuye a la neuroinflamación mediada por las células gliales incluyendo microglía y astrocitos. (Kim and Choi, 2015). Encontrar resultados sobre el efecto de esta vía por parte de los ácidos grasos DHA y EPA podría considerarse como una estrategia terapéutica prometedora en trastornos neuroinflamatorios asociados al cerebro.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTO DE LA MELATONINA, LEPTINA Y ÁCIDOS GRASOS: DOCOSAHEXAENOICO, EICOSAPENTAENOICO Y PALMÍTICO,
EN LA MODULACIÓN DE LA INFLAMACIÓN EN CÉLULAS DE GLÍA

Nohora Milena Martínez López

CAPITULO 6.

CONCLUSIONES

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTO DE LA MELATONINA, LEPTINA Y ÁCIDOS GRASOS: DOCOSAHEXAENOICO, EICOSAPENTAENOICO Y PALMÍTICO,
EN LA MODULACIÓN DE LA INFLAMACIÓN EN CÉLULAS DE GLÍA

Nohora Milena Martínez López

Capítulo 6. Conclusiones

Del trabajo experimental realizado se derivan las siguientes conclusiones:

1. La exposición de células de glía a citoquinas proinflamatorias aumenta la producción de óxido nítrico, la expresión de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y la activación de las vías JNK, p38, c-JUN, ERK ½ y JAK/STAT.
2. La melatonina y la leptina no afectan la viabilidad celular en células gliales.
3. Los ácidos grasos: docosahexaenoico, eicosapentanóico y palmítico a bajas concentraciones no afectan al viabilidad celular en células gliales.
4. Altas concentraciones de ácidos grasos docosahexaenoico y palmítico sí afectan la viabilidad celular.
5. La melatonina y la leptina disminuyen la producción de óxido nítrico y la producción de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) en cultivos de glía sometidos a tratamiento con citoquinas proinflamatorias.
6. Ácido docosahexaenoico y ácido eicosapentanóico a bajas concentraciones disminuyen la producción de óxido nítrico y la producción de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) en células de glía expuestas a citoquinas pro-inflamatorias.
7. El ácido palmítico a bajas concentraciones no tiene ningún efecto sobre la producción de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), y tampoco tiene un efecto en el aumento o disminución de la producción de óxido nítrico en células de glía.
8. Altas concentraciones de DHA y EPA aumentan la producción de óxido nítrico en células de glía.
9. La melatonina, leptina, DHA y EPA inhiben la activación de la vía p38 MAPK inducida por citoquinas pro-inflamatorias en un modelo in vitro de cultivo primario de células de glía.

Capítulo 6. Conclusiones

10. El ácido palmítico a bajas concentraciones no tiene ningún efecto sobre la activación de la vía p38 MAPK inducida por citoquinas pro-inflamatorias en un modelo in vitro de cultivo primario de células de glía.

Conclusión general: La exposición de melatonina, leptina, DHA y EPA podría considerarse como una estrategia terapéutica prometedora en trastornos neuroinflamatorios asociados al cerebro.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTO DE LA MELATONINA, LEPTINA Y ÁCIDOS GRASOS: DOCOSAHEXAENOICO, EICOSAPENTAENOICO Y PALMÍTICO,
EN LA MODULACIÓN DE LA INFLAMACIÓN EN CÉLULAS DE GLÍA

Nohora Milena Martínez López

PUBLICACIONES

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTO DE LA MELATONINA, LEPTINA Y ÁCIDOS GRASOS: DOCOSAHEXAENOICO, EICOSAPENTAENOICO Y PALMÍTICO,
EN LA MODULACIÓN DE LA INFLAMACIÓN EN CÉLULAS DE GLÍA

Nohora Milena Martínez López



Contents lists available at ScienceDirect

Pharmacological Reports

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



Original article

Anti-inflammatory role of Leptin in glial cells through p38 MAPK pathway inhibition



Iván Patraca^{a,c}, Nohora Martínez^{a,c}, Oriol Busquets^a, Aleix Martí^a, Ignacio Pedrós^{a,b}, Carlos Beas-Zarate^{e,f}, Miguel Marin^g, Miren Ettcheto^{b,c}, Francesc Sureda^{a,c}, Carme Auladell^d, Antoni Camins^{b,c,g,*}, Jaume Folch^{a,c}

^aUnitats de Bioquímica i Farmacologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, Reus, (Tarragona), Spain

^bUnitat de Farmacologia i Farmacognòsia, Institut de Neurociències, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

^cBiomedical Research Networking Center in Neurodegenerative Diseases (CIBERNED), Madrid, Spain

^dDepartament de Biologia Cel·lular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

^eDepartamento de Biología Celular y Molecular, C.U.C.B.A., Universidad de Guadalajara, División de Neurociencias, Guadalajara, Jalisco, Mexico

^fInstituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Centro de Investigación Biomédica de Occidente (CIBO), Guadalajara, Jalisco, Mexico

^gCentro de Biotecnología, Universidad Nacional de Loja, La Argelia, Loja, Ecuador

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 July 2016

Received in revised form 27 October 2016

Accepted 8 December 2016

Available online 9 December 2016

Keywords:

Leptin

Glial cells

iNOS

p38 MAPK

Caspase-3

Cytochrome-c

ABSTRACT

Background: In the present work, we studied the modulatory effect of Leptin (Lep) against pro-inflammatory cytokines, tumour necrosis factor- α (TNF α), interleukin 1- β (IL1 β) and interferon- γ (IFN γ), in primary glial cell cultures.

Methods: Glial cultures were treated with pro-inflammatory cytokines (TNF α , 20 ng/ml; IL1 β , 20 ng/ml; IFN γ 20 ng/ml). Cells were pre-treated with Lep 500 nM, 1 h prior to cytokine treatment. NO released from glial cells was determined using the Griess reaction. Cell viability was determined by the MTT method. Protein expression was determined by western blot.

Results: Pre-treatment with 500 nM Lep produced an inhibitory effect on inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression and nitric oxide (NO) production after glial cells exposure to pro-inflammatory cytokines. Anti-inflammatory effect can be related to a decrease in P38 MAP Kinase (MAPK) pathway activity. Treatment of glial cell cultures with Lep also reduced the intrinsic apoptotic pathway (cytochrome c release and caspase-3 activation).

Conclusions: We suggest that Lep would act as an anti-inflammatory factor in glial cells exposed to pro-inflammatory cytokines, exerting its function on p38 MAPK pathway and reducing NO production.

© 2016 Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences. Published by Elsevier Sp. z o.o. All rights reserved.

Introduction

Preclinical and clinical studies have demonstrated a crucial role of glial cells, mainly the microglia activation in the increased synthesis of pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-1 β , IFN γ and IL-6 associated with brain damage [1,2]. Thereby a neuroinflammatory process may enhance the risk of onset of neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease and Alzheimer's disease [3–6]. In addition, chronic inflammatory

processes are common in obesity and cancer. Moreover, glial cells mainly astrocytes exert important functions in the brain, among them synthesis of neurotrophic factors, ion homeostasis, and regulation of extracellular glutamate concentration [7–10]. Likewise, overactivation of both astrocytes and microglia favor neurotoxic factors as nitric oxide (NO), reactive oxygen species, and glutamate increase [11–15]. The excessive levels of NO are harmful for neurons and induce protein alterations by means of nitrosylation and nitration. This is probably one of the main

Abbreviations: AD, Alzheimer's disease; AMPK, AMP-activated protein kinase; ATF, ATP protein fusion; BBB, brain blood barrier; CNS, central nervous system; CYT, cytokines; Cyt-c, cytochrome c; IFN γ , interferon- γ ; IL1 β , interleukin 1- β ; iNOS, inducible nitric oxide synthase; Lep, leptin; LepR (or ObRb), leptin receptors; MAPK, MAP Kinase; MPTP, 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine; NO, nitric oxide; ObRb, leptin receptor; PPARs, peroxisome proliferator-activated receptors; STAT3, signal transducers and activators of transcription; SOCS3, suppressor of cytokine signalling 3; TNF α , tumor necrosis factor- α .

* Corresponding author.

E-mail address: camins@ub.edu (A. Camins).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.pharep.2016.12.005>

1734-1140/© 2016 Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences. Published by Elsevier Sp. z o.o. All rights reserved.

mediators of neuronal cell loss [12]. Accordingly, activation of iNOS in glial cells constitutes a critical event in inflammatory-mediated neurodegenerative disorders, mainly as a result of microglial activity [11,12,14]. As we discussed above, pro-inflammatory cytokines, will be the main brain responsible mediators for iNOS activation in glial cells [16,19].

The adipokine Lep is synthesized mainly in the adipose tissue and circulating Lep cross the Brain Blood Barrier (BBB) into the brain, where it exerts key functions in the physiological regulation of food intake, glucose homeostasis, and energy expenditure via the hypothalamic circuits regulation [20–22]. However, functional Lep receptors (LepR or ObRb) are located in the hippocampus and cortical regions of the brain [23–25]. Thus, Lep receptors can be related to hippocampal learning and memory, including activity-dependent synaptic plasticity and the trafficking of glutamate receptors to-, and away from- the hippocampal synapses [25,26]. Furthermore, impairments in Lep function could induce apoptosis among hippocampal and it appears that Lep confers protection against hippocampal neurodegeneration observed in AD disease [17]. Previous studies reported that Lep has also neuroprotective actions in AD through the inhibition of BACE1 and GSK3 β and affects memory processes [24]. In addition Lep is involved systemic inflammation which is associated with obesity [21–23]. Besides, it has been reported that chronic inflammation is known to cause Lep resistance that is a status related to type-2 diabetes mellitus and AD [20,21].

So far, it exist a lack of information concerning the evaluation of Lep role in the control of inflammatory activity by glial cells. Thus, the aim of the present work was to assess the anti-inflammatory potential effects of Lep, in mixed glial cell cultures treated simultaneously with three pro-inflammatory cytokines TNF α , IL1 β and IFN γ .

Materials and methods

Animals and in vitro cell culture procedure

Three-day-old pups of C57BL/6 mice (Harlan, IN, USA) were used in this study. All animal care and experimental protocols with post-natal pups were carried out in accordance with the Directive 86/609EEC of the Council of the European Union. Every effort was made to minimize animal suffering and reduce the number of animals used.

Mixed glial cell cultures were prepared from the cerebral cortices from 3-day-old C57BL/6 mice, and according with Deumens et al. [27]. Briefly, cerebral cortices were dissected and meninges removed. The tissues were incubated with trypsin solution (Trypsin 0.05% (w/v) trypsin-EDTA 5 mM) for 15 min at 37 °C. After that, the tissues were fragmented with a fire-polished Pasteur pipette. The dissociated cells were plated into 60 mm diameter culture plates (300,000 cells/ml) and grown in Dulbecco's Modified Eagle's/F-12 medium, supplemented with 10% fetal bovine serum, 2% HEPES, 100 units/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin. Fresh medium was changed the next day and then every 3 days afterwards. All experiments were done 7–9 days after plating.

Cell treatment

Glial cultures were treated with pro-inflammatory cytokines (CYT) (TNF α , 20 ng/ml; IL1 β , 20 ng/ml; IFN γ 20 ng/ml) (PeproTech Inc., Rocky Hill, NJ, USA) or with the same volume of phosphate buffer saline (PBS) as a control. As indicated, cells were pre-treated with Lep (500 nM; Sigma, St. Louis, MO, USA), 1 h prior to CYT treatment, or with Lep alone as a control. In addition, cells were

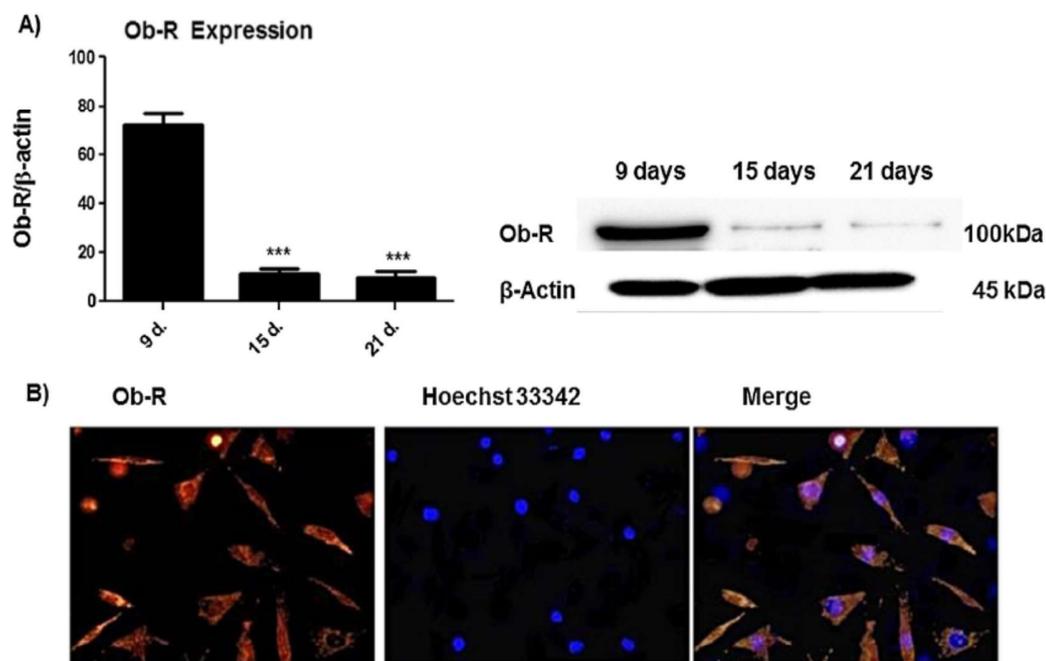


Fig. 1. (A) Western-blot determination of Ob-R expression in cell culture at 9th, 15th and 21th day. The intensity of the bands was determined by densitometric analysis, and the data were normalized using β -actin as an internal control. Results shown a significant decrease in the receptor expression up to 9th day after plating in 60 mm dishes (** $p < 0.001$ when comparing expression at 15th and 21th days with the observed at 9th day). Statistical differences were analyzed by one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test. Data were normalized using β -actin as internal controls. (B) The presence of Lep receptors was determined by immunohistochemistry with anti Ob-R (H-300) sc-8325 antibody (magnification: $\times 200$).

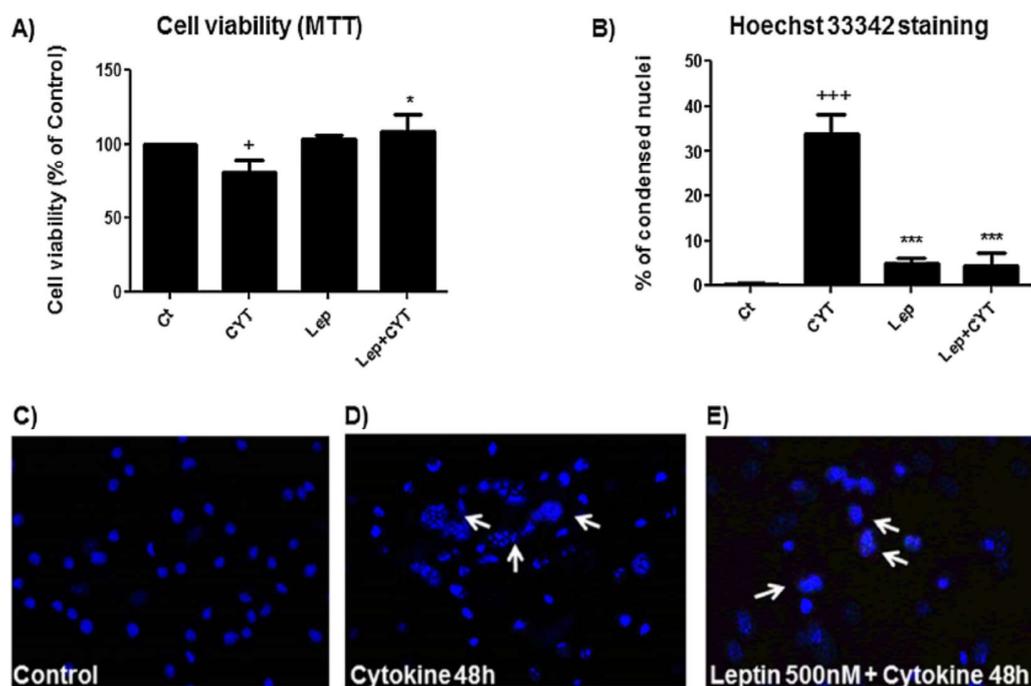


Fig. 2. Cytokine effects on cell viability. (A) Treatment of mixed glial cell cultures with three cytokines TNF α , IL1 β and IFN γ (CYT) for 48 h, significantly reduced cell viability as shown by MTT determination. The increased formazan formation induced by CYT was partially reversed by Lep (500 nM). Control bar was taken as 100%. Each point is the mean \pm SEM of three or four independent experiments (⁺ $p < 0.05$ when comparing CYT group vs. control; ^{*} $p < 0.05$ when comparing Lep alone and Lep + CYT groups with respect to CYT group). (B) The graph illustrates results from Hoechst 33342 staining of nuclei. Images show increased apoptosis in glial cells with chromatin condensation in the nuclei. Measures were performed with a Reader: Ascent Labsystems Flouroskan Ex: 350 nm Em: 463 nm. (⁺⁺⁺ $p < 0.001$ when comparing CYT group vs. control; ^{***} $p < 0.001$ when comparing Lep alone and Lep + CYT groups with respect to CYT group). Images (C to E) show the presence of apoptotic, picnotic, nuclei in cultures exposed to cytokines at 48 h (magnification: $\times 200$). Statistical differences were analyzed by one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test.

pre-treated with either SB203580 kinase inhibitor (Calbiochem, EMD Millipore USA), and CYT at concentrations of 20 ng/ml, and in order to test the specificity of Lep inhibitory effect on p38 MAPK pathway.

Cell viability

Cell viability assays were performed after 48 h of treatment, and were determined using MTT [3-(4, 5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide; Sigma, St. Louis, MO, USA] [28].

Immunofluorescence and hoechst staining

Mixed glial cell culture was characterized using two specific glial markers GFAP (astrocytes) and Iba 1 (microglia) as described in previous papers of our group [28]. The presence of Ob receptor was determined by immunofluorescence with Ob-R (H-300) sc-8325 antibody (Santa Cruz Biotechnology). Slides were allowed to defrost at room temperature and then were rehydrated with Phosphate-buffered saline (PBS) for 5 min. Later, the brain sections were incubated with 0.3% Thioflavin S (Sigma-Aldrich) for 20 min at room temperature in the dark. Subsequently, these were submitted to washes in 3-min series, specifically with 80% ethanol (2 washes), 90% ethanol (1 wash), and 3 washes with PBS. Finally, the slides were mounted using Fluoromount (EMS), allowed to dry overnight at room temperature in the dark, and stored at 4 $^{\circ}$ C.

For nuclei staining, cells were plated onto glass coverslips. After treatments, cells were fixed as described above, incubated for 10 min with Hoechst 33342 (1 μ g/ml, Sigma, St. Louis, MO, USA)

and then washed again. Coverslips were mounted with Fluoromont-G (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA), and conserved at 4 $^{\circ}$ C until observation in the fluorescent microscope (Olympus BX61). All viability results were expressed as percentages with respect to non-treated cells.

NO measurement

NO released from glial cells was converted to nitrite in the culture medium, which can be determined using the Griess reaction [28].

Western-blot

After treating cells with cytokines and Lep, cells were washed twice with ice-cold phosphate-buffered saline and harvested in lysis buffer containing 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 50 mM Tris, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, pH 7.2 with protease inhibitors (Complete, Roche Diagnostics, Germany). Protein concentration was determined using bicinchoninic acid protein assay with the Pierce BCA Protein Assay Kit (Pierce Company, Rockford, IL, USA). An average of 10 μ g of protein was denatured at 95 $^{\circ}$ C, for 5 min, in sample buffer (0.5 M Tris-HCl, pH 6.8, 10% glycerol, 2% SDS, 5% β -mercaptoethanol, 0.05% bromophenol blue) and samples were subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (7.5% Acrylamide: N,N'-methylbisacrylamide, 37.5:1; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and subsequently transferred onto polyvinylidene fluoride membrane (Immun-Blot PVDF Membrane, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Membranes were incubated

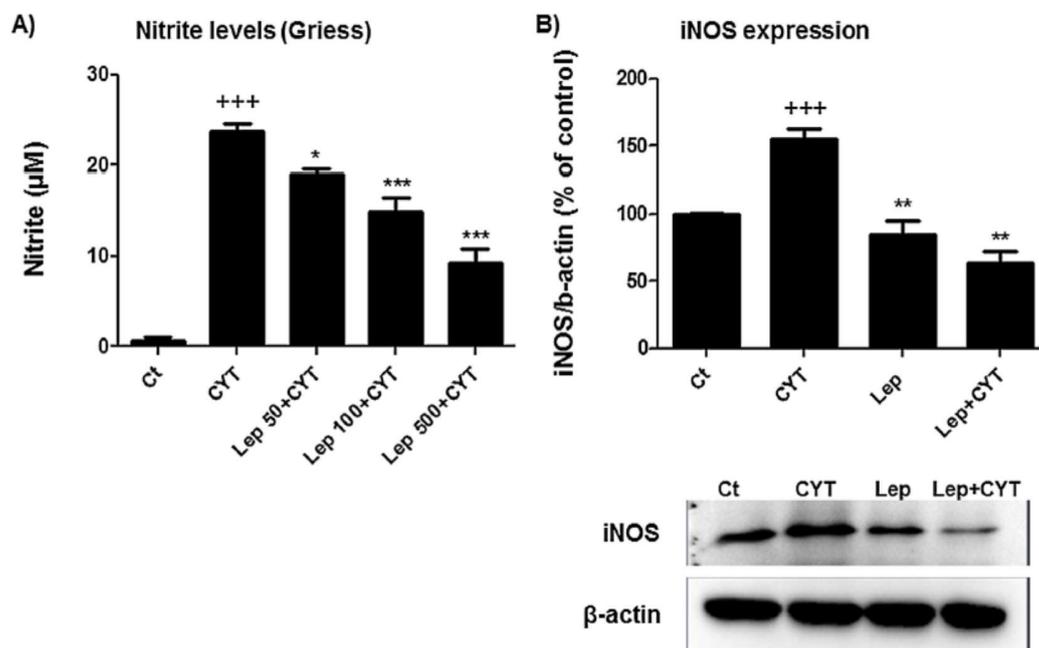


Fig. 3. (A) Figure shows a significant increase in nitrite levels (μM) measured by Griess method, in glial cells after 48 h of treatment with pro-oxidant cytokines. The preincubation of cultures with Lep for 1 h before the exposure to cytokines partially reversed the nitrite production. The exposure to Lep concentrations of 50, 100 and 500 nM demonstrated a protective anti-inflammatory dose-dependent effect. The Control bar was taken as 100%. Each point is the mean \pm SEM of three or four independent experiments (*** $p < 0.001$ when comparing CYT group vs. control; * $p < 0.05$ and ** $p < 0.001$ when comparing Lep+CYT groups [Lep ranging from 50 to 500 nM] with respect to CYT group). (B) The content of iNOS in glial cells 48 h after cytokine treatment was significantly increased, and also pre-treatment with 500 nM Lep reversed this effect. An image from Western-blot, normalized with β -actin, is shown below (*** $p < 0.001$ CYT group compared with control; ** $p < 0.01$ when comparing Lep alone and Lep+CYT groups with respect to CYT group). Statistical differences were analyzed by one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test.

overnight at 4 °C with primary antibodies against iNOS, monoclonal Anti- β -Tubulin and β -actin (1:20000; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), phospho-Stat3-Tyr705 (9131), phospho-p38 MAPK-Thr180/Tyr182 (4511), Cytochrome c Antibody, Cleaved Caspase-3 (Asp175), MnSOD2 (13141), Bcl-2 (50E3) and Bax (2772) antibody (all from Cell signalling) and Ob-R (H-300) sc-8325 (Santa Cruz Biotechnology). The blots were then washed thoroughly in TBS-T and incubated for 2 h with a horseradish peroxidase-conjugated anti-IgG antibody, followed by the enhanced chemiluminescence detection system (Molecular Image Quantity ChemiDoc XRS+ BioRad) according to the supplier's instructions. Chemiluminescence measurements and semi-quantitative values were obtained using the corresponding software Imagelab (Bio-Rad) and the results were expressed as a percentage with respect to control. The corresponding β -actin was taken for each sample to normalize for any differences in gel loading.

Determination of P38 activity

The P38 activity assay was performed using the P38 MAP Kinase Assay Kit (Cell Signalling) following the manufacturer's recommendations. Briefly, P38 was immunoprecipitated from 200 μg protein. After that, the samples were washed and centrifuged twice in lysis buffer and kinase buffer. The supernatants were discarded. The ATP protein fusion (ATF) and kinase buffer, were added to each sample, which was then incubated at 37 °C for 30 min. After that, samples followed the Western-blot protocol described previously. The primary antibody was pATF2 in a 1:1000 dilution. Chemiluminescence measurements and semi-quantitative values were obtained using the corresponding software Imagelab (Bio-Rad) and the results were expressed as a percentage with respect to control.

Statistical analysis

Results were analyzed by one-way ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* test. Statistical analyses were carried out using the version 15 of SPSS (SPSS Sciences, Chicago, Illinois) (GraphPad Prism 5, La Jolla, CA, USA). Statistical significance was defined as a p value less than differences with $p < 0.05$ (*); $p < 0.01$ (**) and $p < 0.001$ (***) were considered significant. In order to simplify the interpretation of results, comparisons were done between CYT bar with respect to control. Further comparisons were performed among CYT bar with respect to Lep and the combination of Lep+CYT groups.

Results

Effect of cytokines on viability of mixed glial cell cultures

Mixed glial cell culture was characterized using two specific glial markers GFAP (astrocytes) and Iba 1 (microglia), as we described in previous studies [28]. The expression of Ob receptor in cell cultures was constant from the first day (data non shown), however our results revealed a significant reduction in ObR content up to 9 days after plating cells, all the experiments were performed within the first 72 h (Fig. 1).

To investigate whether cytokine-treated glial cells show an impaired mitochondrial function, we treated primary glial cells with three pro-inflammatory cytokines TNF α , IL1 β , and IFN γ at concentrations of 20 ng/ml, for 48 h. Likewise, we evaluated the viability of cell culture under each different treatment by MTT and the results evidence a slight impairment in cell viability in cells exposed to cytokines but was not significant (Fig. 2a). However, we

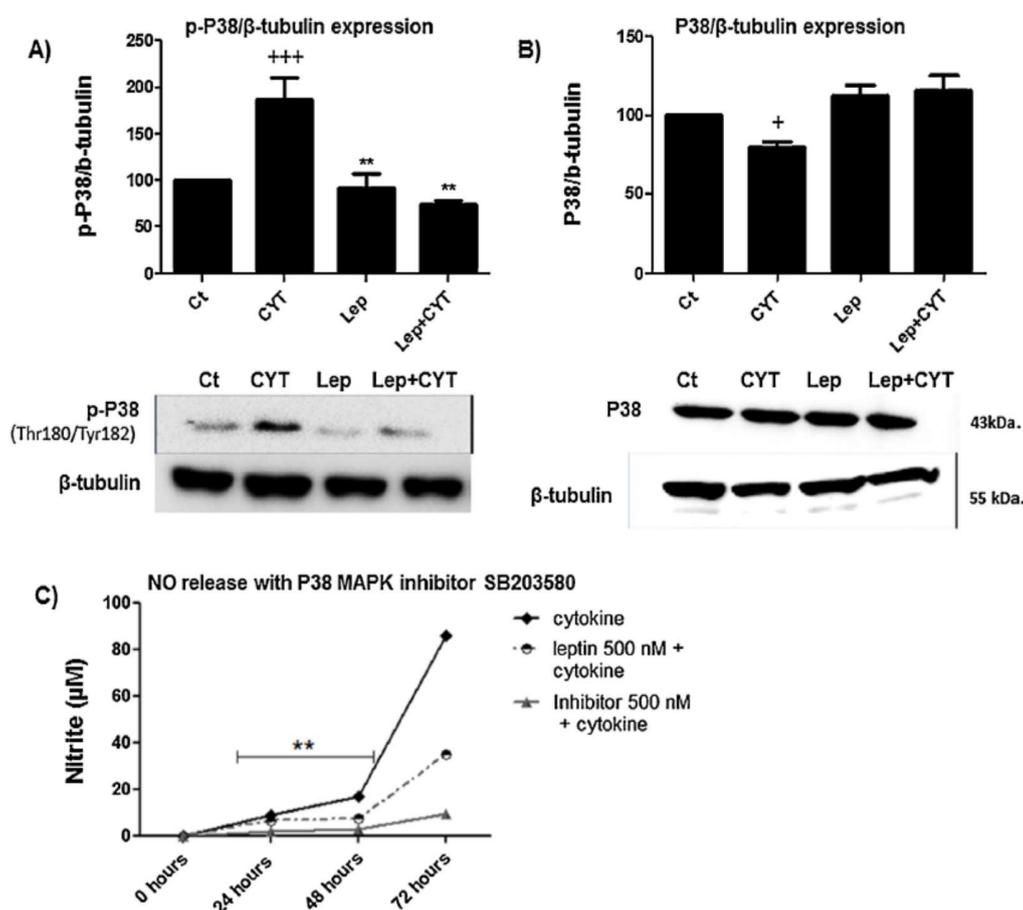


Fig. 4. Western-blots against (A) phospho-P38 (Thr 180/Tyr182) form and (B) total P38 after treatment with CYT and Lep. Results show that pre-incubation with Lep causes a significant reduction in the content of the active phospho-P38 form. All Western-blots were normalized with β -tubulin. Control bar was taken as 100%. Each point is the mean \pm SEM the mean of three independent experiments ($^*p < 0.05$ and $^{***}p < 0.001$ when comparing CYT group vs. control; $^{**}p < 0.01$ when comparing Lep alone and Lep + CYT groups with respect to CYT group). (C) Time-course of NO release at 24, 48 and 72 h, after treatment with cytokines, and measured by Griess method. Graph shows a significant effect of both P38 MAPK inhibitor SB203580 and Lep (both 500 nM) in reducing this effect up to 48 h ($^{**}p < 0.01$ when comparing CYT vs. either Lep + CYT or Inhibitor + CYT groups). Statistical differences were analyzed by one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test.

observed a significantly increased fraction of apoptotic cells when stained with Hoechst 33342 (Fig. 2b, c–e).

Lep decreased NO production mediated by pro-inflammatory cytokines in mixed cultures of glial cells

To determine NO production, we measured nitrite released into the culture medium using the Griess reagent. Then, we proceed in according with this observation and experiments were done with all three cytokines together (TNF α , IL1 β and IFN γ) at concentrations of 20 ng/ml. In fact, a significant increase in NO release was observed in glial cells exposed to cytokines, and when compared with controls (Fig. 3a). Exposure of cells to different concentrations of Lep (50, 100 and 500 nM), for 1 h prior the cytokine treatment, reduced significantly and dose-response the NO production at 48 h, as it is also shown in Fig. 3a.

To support this diminution of NO, we also evaluated whether Lep pre-treatment is able to suppress iNOS content by Western-blot. As expected, cytokine treatment induced a marked increase in iNOS levels in glial cells, which was significantly reduced by pre-treatment with 500 nM Lep (Fig. 3b). Taken together, our current

data prove that Lep inhibits the inflammatory activation of glial cells with respect to iNOS induction and NO production.

Lep decreased NO production is related to P38 MAP kinase pathway in glial cells

Since previous investigations of our group suggest that this observation can be related to P38 MAPK pathway [28] we intended to shown the effect of Lep on P38 pathway. In fact, results from the present investigation show a significant increase on the content of the active form of p38 (phospho-P38 Thr180/Tyr182) as a result of the exposure to cytokines, that can be reversed by pre-treatment of glial cells with Lep (Fig. 4a).

The present results show that Lep is able to inhibit specifically p38 MAPK pathway, as demonstrated by the exposure of cells to P38 specific inhibitor SB203580. Then, we intended to observe the effect of both Lep and p38 specific inhibitor SB203580 over time at 24, 48 and 72 h. Results showed a progressive increase of NO levels at 48 and 72 h after cytokine treatment (Fig. 4c). Pre-treatment of cells with Lep 500 nM reduced significantly the NO production, markedly at 72 h, and the presence of SB203580 resulted in the

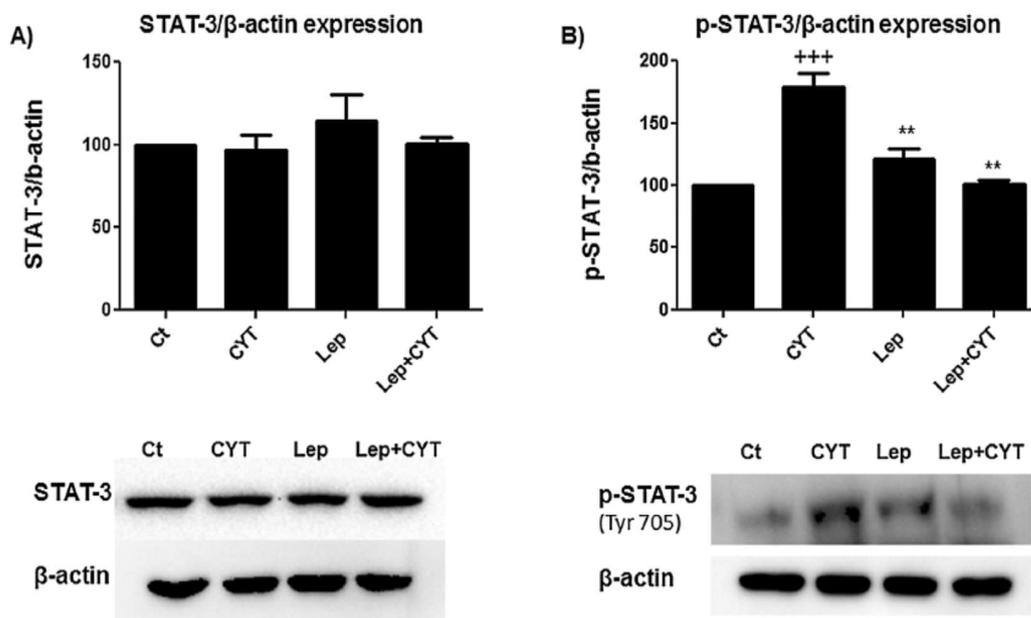


Fig. 5. Results from Western-blot against (A) STAT-3 and (B) phospho-STAT-3 (Tyr 705) 48 h after addition of CYT. Pre-treatment with Lep reduced significantly the content of phospho-STAT-3 induced by the exposure to CYT. Lep itself showed a great variability in its capacity to activate the phosphorylation of STAT-3. The data from three independent experiments are expressed as the mean \pm SEM. Data were normalized using β -actin as internal controls (*** p < 0.001 when comparing CYT group vs. control; ** p < 0.01 when comparing Lep alone and Lep + CYT groups with respect to CYT group). Statistical differences were analyzed by one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test.

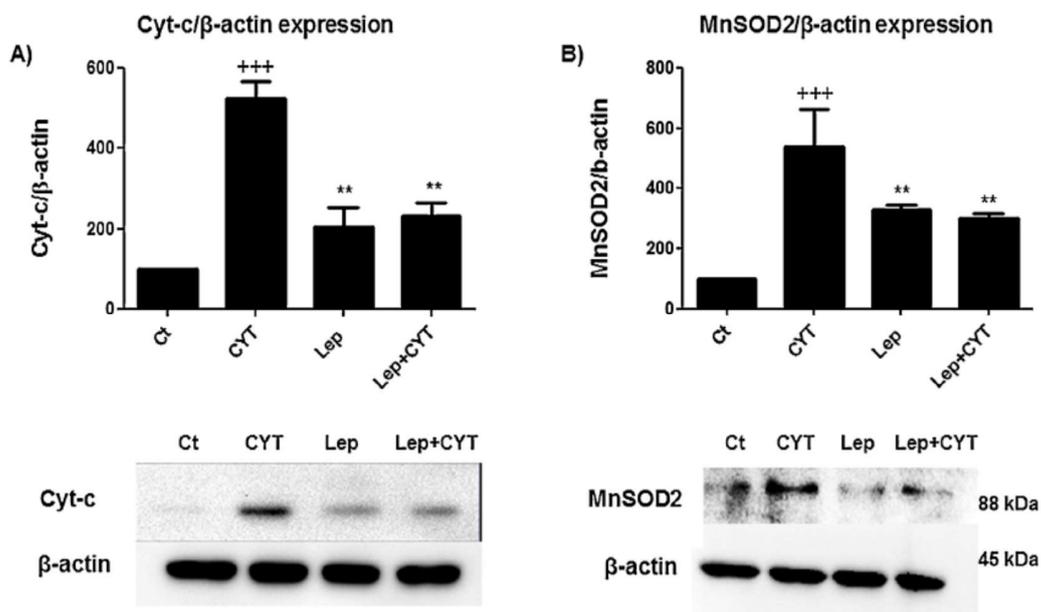


Fig. 6. Effects of Lep in apoptosis. Results from Western-blot against Cyt-c (A) and MnSOD2 (B) indicated significant changes in mitochondrial key enzymes involved in activation of apoptosis. Pre-treatment with Lep (500 nM) 60 min before treatment with CYT, reduced significantly this pro-apoptotic effect. Data were normalized using β -actin as internal control. Control was taken as 100%. Each point is the mean \pm SEM the mean of three independent experiments (*** p < 0.001 when comparing CYT group vs. control; ** p < 0.01 when comparing Lep alone and Lep + CYT groups with respect to CYT group). Statistical differences were analyzed by one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test.

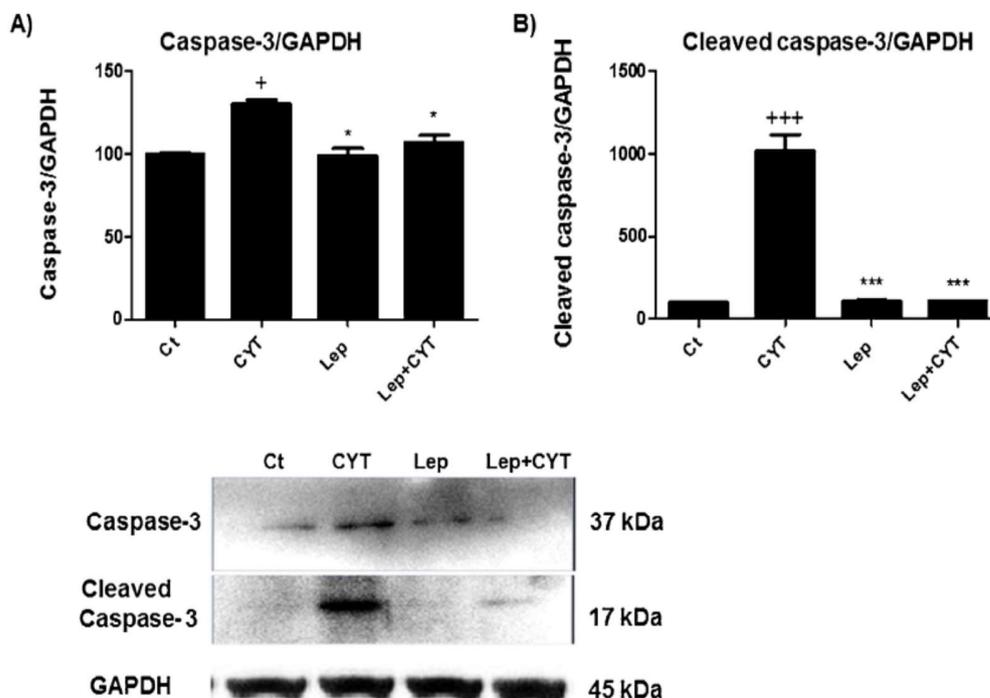


Fig. 7. Effects of Lep pre-treatment on caspase-3 activation (A). Astrocytes were incubated with leptin 500 nM in the absence or presence of cytokines for 48 h. The activation of the cleaved and activated form of caspase-3 was determined by Western blotting (B). The density of the band of cleaved caspase-3 under the indicated treatments was quantified and divided by the value of the density of GAPDH. The percentages of cleaved caspase-3 levels in treated cells are normalized vs. control. Control was taken as 100%. Each point is the mean \pm SEM the mean of three independent experiments (* $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ when comparing CYT group vs. control; * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ Lep alone and Lep+CYT groups with respect to CYT). Statistical differences were analyzed by one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test.

significant inhibition in NO release at the same time, as measured by Griess method (Fig. 4c). Overall, these results demonstrate the involvement of P38 MAPK in NO production induced by cytokines, and a specific inhibitory effect of Lep on this pathway.

Moreover, the present results show a significant activation of STAT-3 in glial cells exposed to cytokines (Fig. 5). Downstream the Lep receptor STAT-3 can be also modulated by Lep signalling, although in the present results we only observed a significant decrease in phospho-STAT-3 in cells exposed to Lep. Results depicted in Fig. 5 show that pre-treatment of glial cells with Lep (500 nM) prevents STAT-3 activation, by phosphorylation at Tyr 705, induced by the exposure to cytokines. Since STAT-3 also has anti-apoptotic effects, it seems controversial that its inactivation by Lep could protect cells from apoptosis.

Lep decreased the apoptosis induced by pro-inflammatory cytokines in glial cells.

Results from our experiments shown the effects of Lep on mitochondrial MnSOD2 content as well as in cytochrome-c (Cyt-c) release (Fig. 6). Pre-treatment of glial cells with 500 nM Lep, before incubation with pro-inflammatory cytokines, significantly reduced both MnSOD2 and Cyt-c content, in agreement with the observed reduction in apoptosis. Furthermore, our results shown that despite the apparently controversial effects of Lep on apoptosis in relation with STAT-3 activity, this adipokine is in fact able to reduce the activity of the effector caspase-3, as shown by western-blot detection of a reduction in the content of the cleaved, and active, form of caspase-3 (Fig. 7).

Finally, Lep is able to decrease the content of the pro-apoptotic Bax (Fig. 8b), whereas increases the content of the anti-apoptotic

molecule Bcl-2 and, then, contributing to the viability of glial cells (Fig. 8a and b).

Discussion

After 20 years of research on Lep, the first reference describing the neuroprotective activity of this adipokine come from the year 2001, on a primary neuronal culture model exposed to NMDA-induced cell death [28,29]. Later on, Erbayat-Altay and colleagues describe that Lep was able to prevent hippocampal neuronal damage, in an experimental model of epilepsy [30]. Despite these initial papers, today persist the controversial about roles of Lep in inflammatory processes in brain.

There is an increasing evidence that leptin is involved in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune processes. Leptin may be considered as a therapeutic target in some clinical situations [22]. By contrast, previous studies have reported that Lep stimulates the secretion of anti- and pro-inflammatory cytokines and it seems widely demonstrated that not only Lep, but also adipokines and circulating food-intake controlling metabolites, are capable of reducing glial activation in models of excitotoxicity, despite the molecular mechanisms are not well understood [31,32].

Results from the present research show a significant anti-inflammatory activity of Lep against treatments performed with cytokines TNF α , IL1 β and IFN γ , in mixed glial cell cultures from C57BL/6 mice pups. We describe a significant reduction in NO production, from measured nitrite released into the culture medium, using the Griess reagent, and related to Lep exposure.

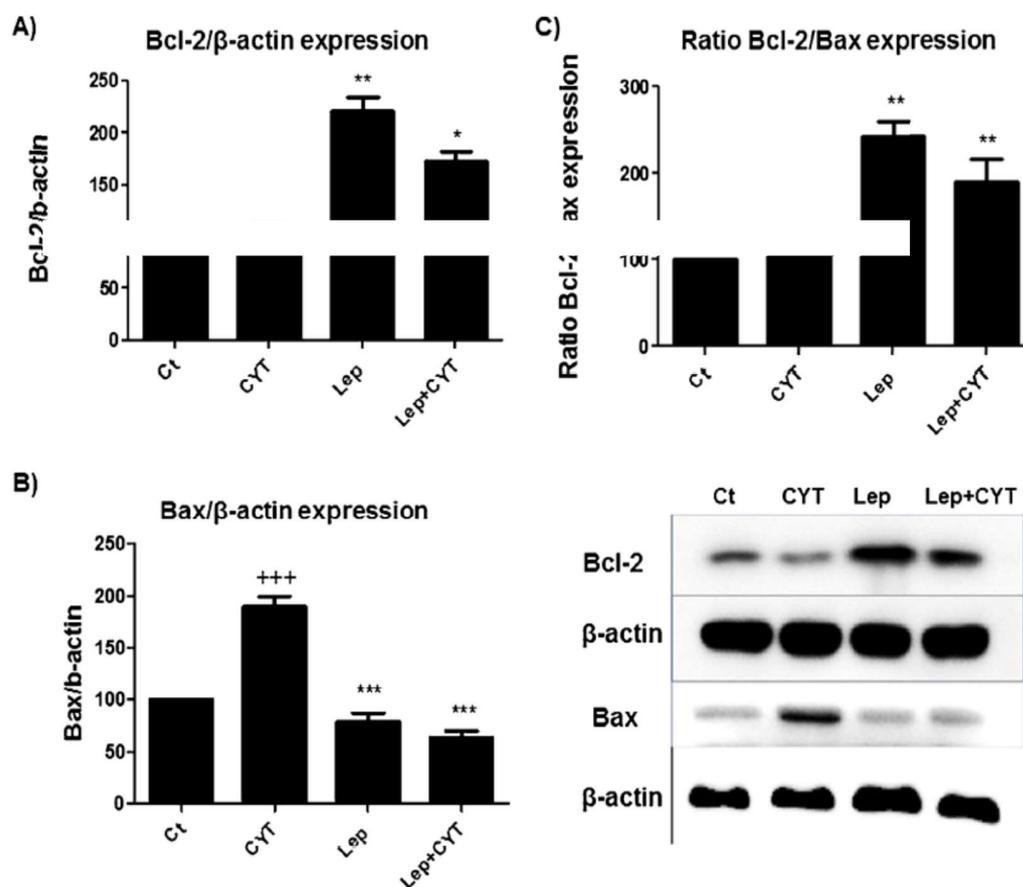


Fig. 8. An inverse relationship in the expression of Bcl-2/Bax was found. (A) Bcl-2 has been considered to be a pro-survival mitochondrial molecule, and resulted stimulated by Lep (500 nM), indicating a protection against inflammation and apoptosis. Control was taken as 100%. Each point is the mean \pm SEM the mean of three independent experiments ($^*p < 0.05$ Lep alone and Lep+CYT groups with respect to CYT). (B) By contrast, the activation of the pro-apoptotic Bax was reversed by the exposure to Lep 500 nM. Each point is the mean \pm SEM the mean of three independent experiments ($^{+++}p < 0.001$ when comparing CYT group vs. control; $^{***}p < 0.001$ when comparing Lep alone and Lep+CYT groups with respect to CYT group). (C) The relative protein expression levels of Bcl-2 and Bax were measured ($^{**}p < 0.01$ when comparing Lep alone and Lep+CYT groups with respect to CYT group). Statistical differences were analyzed by one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test.

Once again, some reports evidence a controversial relationship between Lep and oxidative stress, but suggest a possible interaction of reactive oxygen species and Lep in the regulation of energy metabolism in obesity. There is growing evidence that low-grade chronic inflammatory state, associated with obesity, could play a key role in disrupting Lep signalling [33,34].

Our data suggest that immunomodulatory effect of Lep on glial cell activation through iNOS inhibition might partly explain its central role in brain neuroprotective action. NO produced by iNOS seems to be a key mediator of the glial activation that induces neuronal death [7,18,35–37]. High levels of NO exert their toxic effects through multiple mechanisms, including lipid peroxidation, mitochondrial damage, protein nitration and oxidation, depletion of antioxidant reserves, activation or inhibition of various signalling pathways, and DNA damage [1,11,12,14].

Thus, in the present study we demonstrated that Lep counteracted both the overexpression of iNOS and the production of NO induced by pro-inflammatory cytokines.

The observed inhibition is proportional to Lep concentration and can be related to the effect of Lep on P38 MAPK pathway. It is well known that p38 MAPK is activated by a variety of cellular

stresses including inflammatory cytokines, lipopolysaccharide, UV light and growth factors. In fact, in the present study the exposure of glial cells to both cytokines and SB203580 resulted in a significant reduction in NO production and, then, we can conclude that Lep was able to inhibit P38 MAPK specifically, as can be shown by the exposure of cells to a P38 specific inhibitor SB203580.

This observation can be relevant since experiments with neurotoxic molecules, such as 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine and β -amyloid, have been reported that increase the expression of iNOS in glial cells [11,12,38]. Indeed, in amyotrophic lateral sclerosis, iNOS immunoreactivity is showed in activated astrocytes [39]. Then, the inhibitory effects of Lep on iNOS activity could be important to prevent oxidative damage in mitochondria and the concomitant activation of apoptosis, giving support to the anti-oxidant potential of this compound and to its potential application in the treatment of neurological disorders.

Activation of STAT-3 is evident in glial cells, mainly astrocytes, under certain neuropathological conditions by phosphorylation at Tyr 705, which induces dimerization and nuclear translocation, where favors the transcription of target genes [40–43]. Our data demonstrated that cytokine treatment induces a significant effect

on STAT-3 phosphorylation in glial cells. The inhibitory effects of Lep on p-STAT-3 could contribute to reduce the inflammatory and inhibition of the apoptotic processes [41–44].

Furthermore, it also has been described that Lep could significantly decrease the apoptosis of astrocytes with ischemia/hypoxia injury, related to the increase of bcl-2 expression and the decrease of bax caspase-3 expression levels [44]. The present research shows that Lep prevents mitochondrial Cyt-c release and reduces MnSOD2 content. These data are in agreement with previous findings that have been described on an *in vitro* Type II Alveolar Epithelial Cells model [45]. In fact, several preclinical studies suggest that Lep has neuroprotective actions by inhibiting apoptotic cell death, by preventing glutamatergic cytotoxicity and protecting against oxidative stress [24]. In agreement with these previous data, our results shown that Lep is able to reduce the activity of the effector caspase-3. Lep also seems to act on the equilibrium Bax/Bcl-2 activity. Whereas Lep is able to decrease the content of the proapoptotic Bax, increases the content of the antiapoptotic molecule Bcl-2, although in a slightly significant manner.

Overall, our data suggest that Lep acts as an anti-inflammatory and antiapoptotic factor in glial cells exposed to pro-inflammatory cytokines, exerting its function at different levels: acting on p38 MAPK pathway and reducing its activity and NO production; acting on mitochondrial drivers of apoptosis and reducing their content, like Cyt-c; and reducing the activity of the executioner caspase-3. Then, for all these reasons, we propose that Lep may be a promising therapeutic strategy in neuroinflammatory associated brain disorders.

Disclosure statement

The authors declare no competing financial interests.

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interests.

Acknowledgments

This study was funded by grant 2009/SGR00853 from the Generalitat de Catalunya (autonomous government of Catalonia), by grants SAF2011-23631 from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación. We also would like to express our gratitude to Ms Ana Nieto for revising this manuscript.

References

- [1] Khandelwal PJ, Herman AM, Moussa CE. Inflammation in the early stages of neurodegenerative pathology. *J Neuroimmunol* 2011;238:1–11.
- [2] Smith JA, Das A, Ray SK, Banik NL. Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases. *Brain Res Bull* 2012;87:10–20.
- [3] Azizi G, Mirshafiey A. The potential role of proinflammatory and antiinflammatory cytokines in Alzheimer disease pathogenesis. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2012;34:881–95.
- [4] Farfara D, Lifshitz V, Frenkel D. Neuroprotective and neurotoxic properties of glial cells in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med* 2008;12:762–80.
- [5] Rubio-Perez JM, Morillas-Ruiz JM. A review: inflammatory process in alzheimer's disease, role of cytokines. *Sci World Journal* 2012;75: 63–57.
- [6] Suzumura A, Takeuchi H, Zhang G, Kuno R, Mizuno T. Roles of glia-derived cytokines on neuronal degeneration and regeneration. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1088:219–29.
- [7] Bhat NR, Feinstein DL, Shen Q, Bhat AN. P38 mapk-mediated transcriptional activation of inducible nitric-oxide synthase in glial cells. Roles of nuclear factors, nuclear factor kappa b, camp response element-binding protein, ccaat/enhancer-binding protein-beta, and activating transcription factor-2. *J Biol Chem* 2002;277:29584–92.
- [8] Bhat NR, Zhang P, Bhat AN. Cytokine induction of inducible nitric oxide synthase in an oligodendrocyte cell line: role of p38 mitogen-activated protein kinase activation. *J Neurochem* 1999;72:472–8.
- [9] Verkhatsky A. Physiology of neuronal-glia networking. *Neurochem Int* 2010;57:332–43.
- [10] Verkhatsky A, Kirchoff F. Glutamate-mediated neuronal-glia transmission. *J Anat* 2007;210:651–60.
- [11] Brown GC. Mechanisms of inflammatory neurodegeneration: inos and nadph oxidase. *Biochem Soc Trans* 2007;35:1119–21.
- [12] Brown GC. Nitric oxide and neuronal death. *Nitric Oxide* 2010;23:153–65.
- [13] Chen M, Sun HY, Li SJ, Das M, Kong JM, Gao TM. Nitric oxide as an upstream signal of p38 mediates hypoxia/reoxygenation-induced neuronal death. *Neurosignals* 2009;17:162–8.
- [14] Saha RN, Pahan K. Signals for the induction of nitric oxide synthase in astrocytes. *Neurochem Int* 2006;49:154–63.
- [15] Saha RN, Pahan K. Regulation of inducible nitric oxide synthase gene in glial cells. *Antioxid Redox Signal* 2006;8:929–47.
- [16] Brown GC, Neher JJ. Inflammatory neurodegeneration and mechanisms of microglial killing of neurons. *Mol Neurobiol* 2010;41:242–7.
- [17] Kaminska B, Gozdz A, Zawadzka M, Ellert-Miklaszewska A, Lipko M. Mapk signal transduction underlying brain inflammation and gliosis as therapeutic target. *Anat Rec (Hoboken)* 2009;292:1902–13.
- [18] Sastre M, Klockgether T, Heneka MT. Contribution of inflammatory processes to alzheimer's disease: molecular mechanisms. *Int J Dev Neurosci* 2006;24:167–76.
- [19] Sheng W, Zong Y, Mohammad A, Ajit D, Cui J, Han D, et al. Pro-inflammatory cytokines and lipopolysaccharide induce changes in cell morphology, and upregulation of erk1/2, inos and spl(2)-ia expression in astrocytes and microglia. *J Neuroinflammation* 2011;8:121.
- [20] Martin SS, Qasim A, Reilly MP. Leptin resistance: a possible interface of inflammation and metabolism in obesity-related cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol* 2008;52:1201–10.
- [21] Borges B, Rorato RC, Uchoa ET, Marangon PB, Elias CF, Antunes-Rodrigues J, et al. Protein tyrosine phosphatase-1 B contributes to LPS-induced leptin resistance in male rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2015;308:40–50.
- [22] Fernandez-Riejos P, Najib R, Santos-Alvarez J, Martín-Romero C, Pérez-Pérez A, González-Yanes C, et al. Role of leptin in the activation of immune cells. *Mediators Inflamm* 2010.
- [23] Otero M, Lago R, Gomez R, Dieguez C, Lago F, Gomez-Reino J, et al. Towards a pro-inflammatory and immunomodulatory emerging role of leptin. *Rheumatology* 2006;45:944–50.
- [24] Arnoldussen I, Kiliaan A, Gustafson D. Adipokines interact with the brain. *Eur Neuropsychopharmacol* 2014;24:1982–99.
- [25] Greco SJ, Hamzelou A, Johnston JM, Smith MA, Ashford JW, Tezapsidis N. Leptin boosts cellular metabolism by activating AMPK and the sirtuins to reduce tau phosphorylation and β -amyloid in neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;14:170–4.
- [26] McGregor G, Malekizadeh Y, Harvey J. Minireview food for thought: regulation of synaptic function by metabolic hormones. *Mol Endocrinol* 2015;29:3–13.
- [27] Deumens R, Koopmans GC, Den Bakker CG, Maquet V, Blacher S, Honig WM, et al. Alignment of glial cells stimulates directional neurite growth of CNS neurons *in vitro*. *Neuroscience* 2004;125:591–604.
- [28] Vilar A, de Lemos L, Patraca I, Martínez N, Folch J, Junyent F, et al. Melatonin suppresses nitric oxide production in glial cultures by pro-inflammatory cytokines through p38 MAPK inhibition. *Free Radic Res* 2014;48:119–28.
- [29] Dicou E, Attoub S, Gressens P. Neuroprotective effects of leptin *in vivo* and *in vitro*. *Neuroreport* 2001;12:3947–51.
- [30] Erbayat-Altay E, Fessler AJ, Gallagher M, Attarian HP, Dehdashti Vahle VJ, et al. Correlation of severity of FDG-PET hypometabolism and interictal regional delta slowing in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 2005;46:573–6.
- [31] Loffreda S, Yang SQ, Lin HZ, Karp CL, Brengman ML, Wang DJ, et al. Leptin regulates proinflammatory immune responses. *FASEB J* 1998;12:57–65.
- [32] Beltowski J, Wojcicka G, Marciniak A, Jamroz A. Oxidative stress, nitric oxide production, and renal sodium handling in leptin-induced hypertension. *Life Sci* 2004;74:2987–3000.
- [33] Sáinz N, Barrenetxe J, Moreno-Aliaga MJ, Martínez JA. Leptin resistance and diet-induced obesity: central and peripheral actions of leptin. *Metabolism* 2015;64:35–46.
- [34] Sáinz N, González-Navarro CJ, Martínez JA, Moreno-Aliaga MJ. Leptin signaling as a therapeutic target of obesity. *Expert Opin Ther Targets* 2015;19:893–909.
- [35] Ji RR, Suter MR. P38 mapk, microglial signaling, and neuropathic pain. *Mol Pain* 2007;3:33.
- [36] Graeber MB, Li W, Rodriguez ML. Role of microglia in cns inflammation. *FEBS Lett* 2011;585:3798–805.
- [37] Ionov M, Burchell V, Klajnert B, Bryszewska M, Abramov AY. Mechanism of neuroprotection of melatonin against beta-amyloid neurotoxicity. *Neuroscience* 2011;180:229–37.
- [38] Feng Z, Zhang JT. Protective effect of melatonin on beta-amyloid-induced apoptosis in rat astrogloma c6 cells and its mechanism. *Free Radic Biol Med* 2004;37:1790–801.
- [39] Barbeito LH, Pehar M, Cassina P, Vargas MR, Peluffo H, Viera L, et al. A role for astrocytes in motor neuron loss in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res Brain Res Rev* 2004;47:263–74.
- [40] Pérez-Capote K, Serratosa J, Solà C. Glial activation modulates glutamate neurotoxicity in cerebellar granule cell cultures. *Glia* 2004;45:258–68.
- [41] Kurrimbux D, Gaffan Z, Farrell CL, Martin D, Thomas SA. The involvement of the blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers in the distribution of leptin into and out of the rat brain. *Neuroscience* 2004;123:527–36.

- [42] Folch J, Patraca I, Martínez N, Pedrós I, Petrov D, Ettcheto M, et al. The role of leptin in the sporadic form of Alzheimer's disease Interactions with the adipokines amylin, ghrelin and the pituitary hormone prolactin. *Life Sci* 2015;140:19–28.
- [43] Wang YN, Yang M, Yu LH, Guo J, Chen N, He L. Leptin play the key role in astrogial differentiation of mouse neural stem cells and regulated theSTAT3 signaling through Jak-STAT3 pathway. *Sichuan Da Xue Bao Yi Xue Ban* 2014;45:552–6.
- [44] Si YL, Zhang JY, Hao XH, Deng ZH, Xue H, Yan GT. Effects of leptin on apoptosis of rat cerebral astrocytes with ischemia/hypoxia injury. *Sichuan Da Xue Bao Yi Xue Ban* 2010;41:403–7.
- [45] Chen H, Liang ZW, Wang ZH, Zhang JP, Hu B, Xing XB, et al. Akt activation and inhibition of cytochrome-c release: mechanistic insights into leptin-Promoted survival of type II alveolar epithelial cells. *J Cell Biochem* 2015;116:2313–24.



Contents lists available at ScienceDirect

Life Sciences

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



Minireview

The role of leptin in the sporadic form of Alzheimer's disease. Interactions with the adipokines amylin, ghrelin and the pituitary hormone prolactin



Jaume Folch ^{a,c}, Iván Patraca ^{a,c}, Nohora Martínez ^{a,c}, Ignacio Pedrós ^{a,b}, Dmitry Petrov ^{b,c}, Miren Ettcheto ^{b,c}, Sonia Abad ^{b,c}, Miguel Marin ^f, Carlos Beas-Zarate ^{d,e}, Antoni Camins ^{b,c,f,*}

^a Unitats de Bioquímica i Farmacologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, C/ St. Llorenç 21, 43201 Reus, Tarragona, Spain

^b Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia Facultat de Farmàcia, Institut de Biomedicina (IBUB), Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

^c Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Instituto de Salud Carlos Tercero, Madrid, Spain

^d Departamento de Biología Celular y Molecular, C.U.C.B.A., Universidad de Guadalajara and División de Neurociencias, Centro de Investigación Biomédica de Occidente (CIBO), Mexico

^e Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Sierra Mojada 800, Col. Independencia, Guadalajara, Jalisco 44340, Mexico

^f Centro de Biotecnología, Universidad Nacional de Loja, Av. Pío Jaramillo Alvarado y Reinaldo Espinosa, La Argelia, Loja, Ecuador

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 February 2015

Received in revised form 5 May 2015

Accepted 11 May 2015

Available online 19 May 2015

Keywords:

Leptin
Amylin
Ghrelin
Prolactin
Insulin receptor
High-fat diet
Obesity
Hippocampus
Alzheimer's disease
PGC-1 α
mTOR

ABSTRACT

Leptin (Lep) is emerging as a pivotal molecule involved in both the early events and the terminal phases of Alzheimer's disease (AD). In the canonical pathway, Lep acts as an anorexigenic factor via its effects on hypothalamic nucleus. However, additional functions of Lep in the hippocampus and cortex have been unravelled in recent years. Early events in the sporadic form of AD likely involve cellular level alterations which can have an effect on food intake and metabolism. Thus, AD can be conceivably interpreted as a multiorgan pathology that not only results in a dramatic neuronal loss in brain areas such as the hippocampus and the cortex (ultimately leading to a significant cognitive impairment) but as a disease which also affects body-weight homeostasis. According to this view, body-weight control disruptions are to be expected in both the early- and late-stage AD, concomitant with changes in serum Lep content, alterations in Lep transport across the blood–brain barrier (BBB) and Lep receptor-related signalling abnormalities. Lep is a member of the adipokine family of molecules, while the Lep receptor belongs to the class I cytokine receptors. Since cellular response to adipokine signalling can be either potentiated or diminished as a result of specific ligand–receptor interactions, Lep interactions with other members of the adipokine family including amylin, ghrelin and hormones such as prolactin require further investigation. In this review, we provide a general perspective on the functions of Lep in the brain, with a particular focus on the sporadic AD.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	20
2. Lifestyle and AD	20
3. Obesity, type 2 diabetes mellitus and leptin resistance	20
4. Leptin functions in the hypothalamus	20
5. Leptin, amylin and ghrelin	21
6. Leptin functions in the hippocampus	21
7. Leptin signalling	22
8. Leptin and inflammation	22
9. Synergic effects among adipokines	25
10. Concluding remarks	25
Conflict of interest statement	25
Abbreviations	25
Acknowledgements	26
References	26

* Corresponding author at: Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia, Facultat de Farmàcia Universitat de Barcelona, Avda/Diagonal 643, E-08028 Barcelona, Spain.
E-mail address: camins@ub.edu (A. Camins).

1. Introduction

Alzheimer's disease is one of the most common causes of senile dementia and it is estimated that by 2050, the number of cases will rise to 110 million [1,2]. The vast majority of patients suffer from the sporadic AD, with only a small subset of the population presenting with the familial form as a result of mutations in amyloid precursor protein (APP) Presenilin 1 or Presenilin 2 genes [3,4].

AD progression is associated with the formation of senile β -amyloid ($A\beta$) plaques and accumulations of hyperphosphorylated Tau proteins called neurofibrillary tangles in the brain [5,6]. Clinically, AD is characterized by a progressive loss of cognitive abilities as a result of severe hippocampal neurodegeneration, with the biggest impact on memory and learning faculties [7,8]. $A\beta$ peptides are generated by a specific proteolytic cleavage of the APP. In this amyloidogenic pathway, the β - and γ -Secretases cleave APP at the N- and C-termini of the $A\beta$, respectively. The relationship between the aberrant APP processing and $A\beta$ generation caused the formulation of the widely accepted "amyloid cascade hypothesis". It states that mutations in APP (or other genes) lead to an increase in $A\beta$ which, when accumulated, leads to disease [9,10].

Apart from the $A\beta$ itself, a host of other factors contributing to AD pathology have been identified: oxidative stress and ROS generation, alterations in glucose metabolism, deregulation of Ca^{2+} signalling, deregulation of glial cell activity, alterations in nutritional behaviour, metabolic syndrome and obesity, hypertension and type 2 diabetes mellitus (T2DM) [11–19]. Thus, it is difficult to point out a single pathogenic mechanism leading to the onset and progression of this devastating disease. It has been suspected for many years that AD may in fact be a multifactorial metabolic disorder influenced by several risk factors such as hypertension, diabetes, hypercholesterolaemia, neuroinflammation and hypoxia, among others [13–15].

In the next sections we discuss some of the metabolic aspects of AD, with a special emphasis on adipokines in general, and leptin in particular.

2. Lifestyle and AD

As a means to slow down the onset of disease symptoms, researchers have turned their attention to the relationship between lifestyle and AD [20]. Lifestyle-related diseases are potentially preventable, and their incidence can be decreased with adequate changes in diet, amount of physical activity and modification of the environment. The common feature at the core of most lifestyle diseases is obesity, and accumulating evidence indicates that obesity is an independent risk factor for developing AD. Obesity is a pandemic and a serious global health concern. Obesity is also a risk factor for multiple conditions and contributes to multi-morbidities, resulting in increased healthcare costs and millions of deaths each year [21]. Obesity has been associated with changes in brain structure, cognitive deficits, dementia and AD. In agreement with this, high-fat diet (HFD)-induced obesity also causes a variety of health disorders including cognitive decline in experimental animal models [22]. There is a well-established link between human obesity and cognitive decline [23]. Specific brain functions related to the hippocampus may be particularly vulnerable as evidenced in a large number of studies in rodents linking high-caloric diets with decreased contextual and spatial memory [24–29]. Significantly, it has been demonstrated that obese animals whose diet regimen is reversed from HFD back to standard chow, recover memory function [22].

3. Obesity, type 2 diabetes mellitus and leptin resistance

As mentioned above, obesity significantly increases cognitive decline and AD risk, supporting the notion that AD is a degenerative metabolic disease in which brain glucose uptake and utilization are impaired [30]. Thus, several early biomarkers rely on the definition of AD as a "Cognitive Metabolic Syndrome" or "Type 3 Diabetes" [31].

Biological plausibility for this relationship has been framed within the "Metabolic cognitive syndrome" concept. Even more, it has been proposed that $A\beta$ accumulation can be considered a consequence rather than the real etiologic basis for the disease. A growing body of epidemiological evidence suggests that metabolic syndrome and its components (impaired glucose tolerance, abdominal or central obesity, hypertension, hypertriglyceridemia, and reduced high-density lipoprotein cholesterol) may be important in the development of age-related cognitive decline, mild cognitive impairment, vascular dementia, and AD [32]. Furthermore, results from the "Hysayama Study" indicate that altered expression of genes related to diabetes mellitus in AD brains is a result of AD pathology, which may thereby be exacerbated by peripheral insulin resistance or diabetes mellitus [33].

In fact, adults with newly diagnosed prediabetes, or type 2 diabetes mellitus (T2DM), show insulin resistance associated with reductions in regional cerebral glucose metabolism and subtle cognitive impairments [34]. Furthermore, most obese individuals show increased food intake despite high circulating Lep levels [35]. These findings imply a state of Lep resistance that causes a reduced responsiveness to Lep anorexigenic effect, with a concomitant loss of appetite- and weight gain-suppressing effects [36,37].

4. Leptin functions in the hypothalamus

The peripheral actions of metabolic hormones are well documented. However, the functions of these pleiotropic hormones are not restricted to the periphery, with growing evidence suggesting that both Lep and insulin can readily cross the BBB, producing widespread central effects in brain areas like the hypothalamus. In the periphery, the fat mass participates in the regulation of glucose and insulin metabolism through the release of hormones in a bidirectional feedback loop, a mechanism called the "Adipoinular axis" (Fig. 1) [38,39]. This axis links adipose tissue and pancreatic β -cells via leptin and insulin, respectively. As insulin directly stimulates Lep release by adipose tissue, Lep feeds back to reduce both insulin secretion and insulin gene expression in β -cells by modulation of K^+_{ATP} channels and activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase 3B and subsequent suppression of cAMP levels [40,41]. The suppressive effect of Lep on insulin production is not only mediated by direct actions via Lep receptors (LepR) on β -cells, but also by the autonomic nervous system (ANS). Lep-dependent ANS regulation of body weight is largely achieved via a negative afferent loop involving the hypothalamus [42,43].

It has been shown that hypercaloric diets (HCD) used in a majority of diet-induced obesity studies, typically induce glucose metabolism abnormalities and insulin resistance (including diabetes mellitus) and persistent hyperleptinaemia [44]. In addition, the consumption of Western diets, rich in sugar and saturated fat, stimulates an inflammatory response in the hypothalamus, a contributing factor to the development of central Lep resistance and obesity [36]. In the hypothalamus, specialized groups of neurons are sensitive to signals derived from several organs related to food intake or starvation. Hypothalamic pro-opiomelanocortin (POMC) and neuropeptide Y-Agouti-related peptide (NPY-AgRP) neurons produce anorexigenic and orexigenic neuropeptides and neurotransmitters, and express the long signalling form of the leptin receptor (LRb). The anorexigenic properties and the regulatory functions of Lep in the control of energy and glucose homeostasis are largely dependent on the POMC and NPY-AgRP circuits in the arcuate nucleus of the hypothalamus. POMC and NPY neurons are considered as major Lep effector sites, with the food-intake regulation directly dependent on the LRb/STAT3 (activator of transcription 3) interaction [45,46].

Recent evidence suggests that sirtuin-1 (SIRT1) activation and expression are essential for leptin-induced anorexigenic effects in the hypothalamic POMC neurons [47]. Moreover, results in Lep deficient ob/ob mouse model show a lack of SIRT1 activation in the hypothalamus in response to caloric restriction, compared to age-matched controls [48].

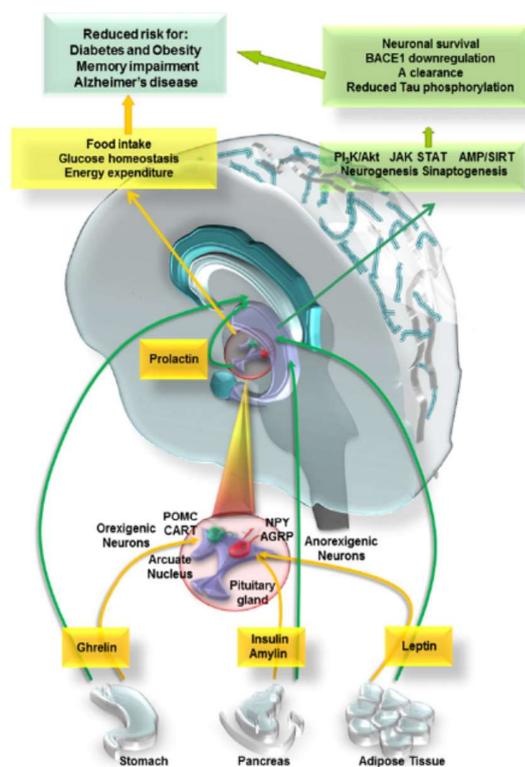


Fig. 1. Leptin, amylin and insulin decrease appetite by inhibiting neurons that produce the molecules NPY and AgRP, while stimulating melanocortin-producing neurons in the arcuate-nucleus region of the hypothalamus, near the third ventricle of the brain. NPY and AgRP stimulate eating, and melanocortins inhibit eating, via other neurons. Activation of NPY/AgRP-expressing neurons inhibits melanocortin-producing neurons. The gastric hormone ghrelin stimulates appetite by activating the NPY/AgRP-expressing neurons. In the hypothalamus, leptin regulates food intake, glucose homeostasis, and energy expenditure. The hippocampus integrates signals from Lep ghrelin, insulin, amylin and prolactin, and contributes to decrease risk of memory impairment related to obesity and T2DM, which are all risk factors for Alzheimer's disease. Adapted from Marwartha and Ghribi [72], and from Schwartz and Morton [132].

The complexity of AD pathology is illustrated by the fact that apart from clear links between AD and obesity, weight loss is another prominent early feature of AD that often precedes cognitive decline and clinical diagnosis. In fact, pathologically low Lep levels and disruptions in orexigenic NPY hypothalamic neuron signalling were described in a mouse model overexpressing A β , suggesting that Lep regulation may be involved [49].

A large body of work has identified inflammatory signalling in the hypothalamus as an essential mediator of the sickness response: anorexia, cachexia, fever, inactivity, lethargy, anhedonia and adipisia are all triggered by systemic inflammatory stimuli and promote negative energy balance [50].

5. Leptin, amylin and ghrelin

Alzheimer's disease and T2DM share many common features including the deposition of amyloidogenic proteins – A β and amylin (islet amyloid polypeptide), respectively [51]. The hormone amylin, discovered in 1987, is the second β -cell hormone described. It is co-secreted with insulin by the pancreatic β -cells in response to nutrient stimuli, in the context of the "Adipoinular axis" (Fig. 1). Dysregulation of the axis may contribute to obesity and the development of hyperinsulinaemia associated with diabetes [39,52]. In addition,

impaired β -cell secretion of amylin in response to a meal had been described in T2DM patients [53,54]. Recent evidence suggests that both A β and amylin may act via the amylin receptor, although the precise mechanisms for this interaction at a cellular level are unknown.

One of the roles of amylin is to slow gastric emptying, thereby delaying the delivery of nutrients to the circulation [55]. A second effect is to decrease food intake, and a third effect is to reduce postprandial hyperglucagonemia, thereby inhibiting hepatic glucose release. Despite the beneficial effects of amylin in the CNS, it has also been shown to induce neurotoxicity in embryonic rat hippocampal primary cultures in vitro [56]. This effect may contribute to the prominent neurite degeneration in AD [57]. Furthermore, centrally administered amylin resulted in impaired memory retention (on a footshock avoidance conditioning in a T maze) in mice given strong training [58].

Besides the involvement of Lep and amylin in energy regulation, an additional adipokine ghrelin may also be implicated in weight loss observed in AD patients. Leptin and insulin stimulate anorexigenic POMC neurons, whereas ghrelin stimulates orexigenic NPY–AgRP neurons. Ghrelin is an endogenous ligand for GH secretagogue receptor type 1 α (GHSR1 α). It is a multifunctional hormone produced and released mainly from the stomach, which assists in the promotion of sensations of hunger [59]. Ghrelin has been associated with the progression of obesity and metabolic syndrome, but has been also linked to neuromodulation, neuroprotection, memory and learning processes [60]. Ghrelin receptors are prominently expressed in different regions of the brain, including the arcuate nucleus, ventromedial nuclei, in CA2 and CA3 regions of the hippocampus, in the *substantia nigra*, in the ventral tegmental area, the dentate gyrus of the hippocampal formation, and the dorsal and median raphe nuclei [61,62].

It has been shown that intracerebroventricular injections of ghrelin increased memory retention in rats [63–65]. In fact, ghrelin administration rescued memory deficits and prevented neuronal and synaptic degeneration in the hippocampi of mice injected with A β [66]. Furthermore, ghrelin also decreased the levels of hyperphosphorylated Tau via the PI3K/Akt–GSK pathway, in hippocampal neurons [67]. These studies suggest that ghrelin plays a vital role not only in metabolic control, but also in regulating cognitive function and memory capacity. Therefore, abnormal ghrelin signalling could be one of the causes and/or consequences of AD symptomatology [64,65,68,69].

Thus, it can be concluded that there is an association between obesity, T2DM and AD, where altered mechanisms of insulin, Lep, ghrelin and amylin signalling lead to a greater susceptibility to neurodegenerative processes. Taken together, these results suggest that peripheral metabolic peptides, in particular Lep and ghrelin, might be considered as potential preventive strategies for ameliorating the hypothalamic alterations in AD [70].

6. Leptin functions in the hippocampus

As mentioned earlier, circulating Lep is transported across the BBB into the brain, where it regulates food intake, glucose homeostasis, and energy expenditure mainly via the hypothalamic circuits. Loss of Lep signalling may increase the likelihood of developing atherosclerosis, obesity and T2DM, all independent risk factors for AD. However, functional Lep receptors (LepR or ObRb) also have been reported to be expressed in the hippocampus and other cortical regions of the brain. The physiological significance of this observation has been explored during recent years. Then, besides the described canonical functions of insulin, Lep, and ghrelin in the control of metabolism, each of these hormones has been implicated in the control of neuronal survival, astrocyte activity and neuroprotection in extrahypothalamic regions, in particular the hippocampus.

It is well known that the hippocampus is an area which is severely affected during the course of AD. The cognitive deficits associated with T2DM have been linked to impaired central insulin modulation in the hippocampus, which is a critical region for memory processing [71].

Furthermore, epidemiological studies have demonstrated that higher circulating Lep levels are associated with lower risk of dementia including AD, whereas lower circulating levels of Lep have been reported in patients with AD [72]. It has been demonstrated that chronic Lep administration has led to memory improvements in the CRND8 transgenic mouse model of AD [73,74]. The hippocampus expresses high levels of both insulin and Lep receptors, as well as key components of their associated signalling cascades. Recent studies indicate that both hormones are potential cognitive enhancers [75]. Indeed, it has been demonstrated that both Lep and insulin markedly influence key cellular events that underlie hippocampal learning and memory, including activity-dependent synaptic plasticity and the trafficking of glutamate receptors to and away from the hippocampal synapses [74,75]. Furthermore, the induction of apoptosis among hippocampal cells can be related to impairments in either Lep or insulin function. Thus, it appears that Lep confers protection against hippocampal-dependent AD neuropathology.

An important question is whether leptin deficiency plays a role in the causation of AD and/or its progression. In fact, Lep deficiency in AD contributes to a neuronal imbalance in handling energy requirements, leading to higher A β and phosphorylated Tau. Additionally, Lep modulates AD pathological pathways in vitro through a mechanism involving the energy sensor, AMP-activated protein kinase (AMPK) [74]. Lep activates the PI $_3$ K/Akt, JAK/STAT, and AMPK/SIRT pathways, promoting neuronal survival, reducing A β production and increasing its clearance, and reducing Tau hyperphosphorylation [72,76].

We can conclude that Lep promotes neurogenesis and synaptogenesis, thus facilitating learning and memory processes in the hippocampus (Fig. 1). Nevertheless, the ability of Lep to regulate hippocampal synaptic function markedly declines with age, and these changes have been linked to neurodegenerative disorders such as AD [77]. In fact, it has been described that individuals with early AD, or mild cognitive impairment, show low plasma Lep levels [78]. Accumulating data suggest that AD patients may benefit from Lep replacement therapy, and it may constitute a very significant application of Lep [79]. Then, Lep deficiency in AD can be restored by replenishing low Lep levels, and this may also be a legitimate strategy for therapy [74].

7. Leptin signalling

As discussed before, several studies have shown that AD and T2DM may share common pathways to pathology. In fact, Lep and insulin signalling pathways may act synergistically with the insulin receptor leading to the development of neurodegenerative processes [80]. Early alterations in glucose, insulin signalling and energy metabolism pathways have been demonstrated in an APP^{swe}/PS1^{dE9} mouse model of familial AD. The observed changes are complex and related to impairment in insulin and adipokine receptors, all along with alterations in cholesterol and fatty acid metabolism [81].

Leptin and insulin receptors are widely expressed in the central nervous system. The human ObRb is a member of the superfamily of cytokine receptor class I (gp130). The best-described signalling pathway activated in response to receptor activation involves the coordinated functions of JAK2/STAT3 (Fig. 2). STAT3 is a transcription factor that, upon phosphorylation, dimerizes and is translocated to the nucleus, where it controls the transcription of target genes. ObRb is negatively regulated by the suppressor of cytokine signalling 3 (SOCS3) and protein tyrosine phosphatase 1 β (PTP1 β). Key downstream effectors of ObRb include AMP-activated protein kinase (AMPK), PGC-1 α (involved in mitochondrial biogenesis), as PPAR, as well as aspartyl protease β -site A β PP-cleaving enzyme (BACE1). Among the targets of the receptor we can also find kinases involved in Tau phosphorylation and microtubule stability, including the mammalian target of rapamycin (mTOR).

Leptin is involved in the activity of kinases like mTOR, which could perhaps explain the significance of Lep resistance to both AD and T2DM. As Orr and colleagues propose, since mTOR hyperactivity is

common to both diabetes and AD, mTOR signalling could be considered a molecular link between these two age-related diseases [82]. Leptin signalling also induces the activation of the ubiquitous and broad spectrum PI3K/Akt/mTOR pathway [83]. Indeed, it has been shown that Lep binding to its long-form receptor can activate four major signal transduction pathways: JAK/STAT pathway; ERK pathway; PI3K/Akt/mTOR pathway as well as the AMPK/SIRT1 signal transduction pathways [72, 76].

The mammalian mTOR plays a key role in maintaining energy homeostasis in the brain and other tissue types [82,84]. As an energy sensor, mTOR regulates numerous cellular pathways including protein translation, cell growth and proliferation. In fact, mTOR mediates the synthesis and aggregation of Tau, resulting in compromised microtubule stability [85]. mTOR has been shown to modulate insulin signalling in a context of high nutrient exposure. mTOR directly phosphorylates the insulin receptor leading to its internalization; this, in turn, results in a decrease of mTOR signalling [82,86]. However, through the same mechanisms, chronic mTOR hyperactivity leads to insulin resistance, a key feature of T2DM [87].

AMPK is a cellular energy sensor highly conserved among eukaryotes. AMPK regulates the activities of a number of key metabolic enzymes through phosphorylation [88]. It protects cells from stresses that cause ATP depletion by switching off ATP-consuming biosynthetic pathways. Furthermore, previous data suggest that AMPK can also phosphorylate substrates like Tau proteins, thereby favouring their aggregation. Phosphorylated Tau becomes soluble and causes microtubule disassembly. In extreme cases, including in AD, hyperphosphorylation of Tau leads to the formation of neurofibrillary tangles.

AMPK can phosphorylate and directly activate PGC-1 α that, in turn, controls major metabolic functions through the co-activation of PPAR γ and other transcription factors [89]. PGC-1 α is a PPAR transcriptional coactivator, and elevated levels of PGC1 α change the composition of peroxisomes, so that they might exhibit decreased insulin degradation and purine metabolism. PPARs are ligand-activated transcription factors of the nuclear receptor superfamily. The levels of PPARs have been reported to decline with age [90]. PPAR γ is highly expressed in adipose tissue and is a major regulator of insulin and glucose metabolism. It can be therefore suggested that the link between energy metabolism and the amyloid cascade hypothesis stems from the fact that PPAR γ regulates the transcription of BACE1, a key enzyme involved in A β generation. The enzyme BACE1 catalyses the rate-limiting step in A β production, a peptide at the nexus of neurodegenerative cascade in AD. Leptin has been shown to reduce A β production by decreasing BACE1 activity and expression levels [72,76]. Leptin increases the expression and activity of SIRT1, which results in decreased NF- κ B-mediated transcription of BACE1.

Furthermore, since PGC-1 α appears to decrease A β generation, therapeutic modulation of PGC-1 α could have real potential as a treatment for AD. Thus, Lep emerges as a general activity modulator of AMPK, PGC-1 α and the molecules downstream of them: PPAR γ and BACE1.

8. Leptin and inflammation

Chronic inflammatory processes are common in obesity, cancer and neurodegenerative diseases like AD. Although the BBB restricts access of immune cells and mediators from the blood, innate immune activation can occur throughout the brain in response to both local and systemic inflammatory stimuli [91]. The apoE4 genotype, lifestyle-induced obesity and dyslipidaemia could be considered as systemic inflammatory stimuli, whereas A β and Tau protein accumulation are considered local stimuli. Chronic inflammation is known to cause Lep resistance that, as previously discussed, is a status related to T2DM and AD [92].

It has been shown that both the accumulation of A β and apoE4 genotype result in a transient enhancement of Lep signalling that might lead to Lep resistance over time [93]. The mechanisms by which A β and apoE4 affect LepR expression are unknown. Both molecules have been

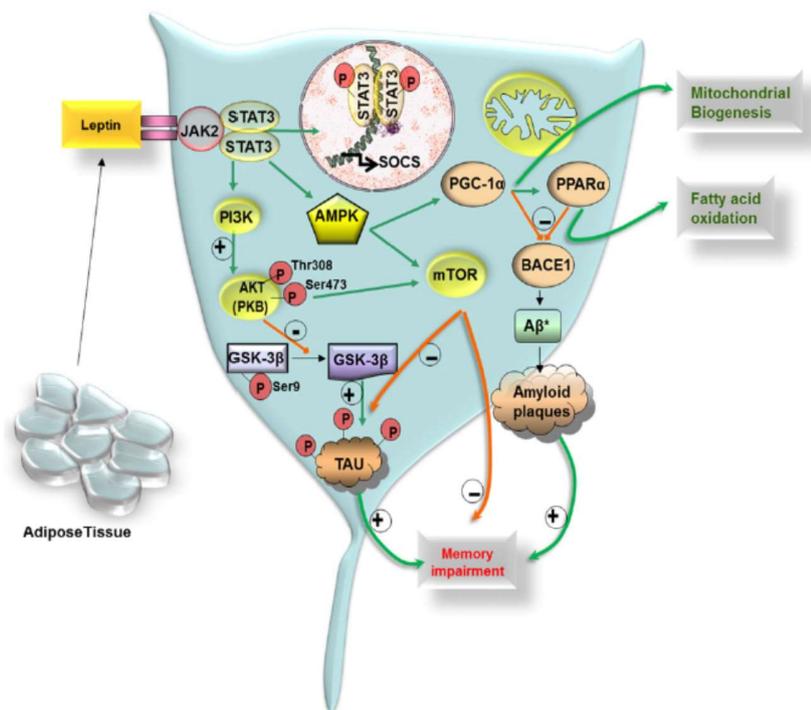


Fig. 2. Leptin signalling. In the hippocampus, Lep activates the PI₃K/Akt, JAK/STAT, and AMPK/SIRT pathways, thus promoting neuronal survival, BACE1 down-regulation, reducing A β production and increasing its clearance, and reducing Tau phosphorylation. Leptin activation of Lep receptor induces STAT-3 phosphorylation activating the transcription of genes from SOCS family, among others. Leptin inhibits the hyperphosphorylation of Tau protein through PI3K and AKT activation that, in turn, promotes the formation of inactive form ser-9 GSK-3 β . Leptin also inhibits GSK-3 β activity acting on AMPK, and reducing the formation of A β deposits. Leptin activates PGC-1 α that, in turn, causes the inhibition of BACE1 and A β accumulation. PGC-1 α activation induces mitochondrial biogenesis and induces PPAR α activity and fatty acid oxidation. Adapted from Greco et al. [74].

shown to cause inflammation, and LepR upregulation has been demonstrated in response to proinflammatory stimuli, such as treatments with LPS and TNF α [94]. In fact, transgenic animal models overexpressing human forms of A β or human apoE4, showed enhanced inflammatory reactions in the brain, including TNF α generation and gliosis [95,96]. Thus, it may be speculated that the initial up-regulation of LepR could result from the pro-inflammatory effects of A β or apoE4.

Current evidence indicates that hypothalamic proinflammatory phenotype could play a key role in central Lep and insulin resistance. Recent studies have shown that diet-induced obesity (DIO), or HFD-induced obesity, accelerates AD progression. Hypothalamic inflammation, induced by HFD feeding, favours increases in body weight [58]. It has been shown that DIO increases amyloid deposition in amyloidogenic transgenic mice [97]. In WT rats, DIO causes Tau phosphorylation, increases glial fibrillary acidic protein (GFAP) expression and astroglial activation in the hippocampus and impairs cognitive function [98–100]. Interestingly, these changes were associated with enhanced astrocytic LepR expression and mild microgliosis, but not A β accumulation. The involvement of microglia and astrocytes in the onset and progress of neurodegeneration in AD is increasingly recognized [101]. Glial cells maintain brain plasticity and protect the brain to ensure functional recovery from injuries. Dysfunction of glial cells may promote neurodegeneration and, eventually, the retraction of neuronal synapses, which leads to cognitive deficits [100,101].

The hippocampus may be particularly vulnerable to the negative consequences of HFD, and it is suspected that the HFD may 'prime' the proinflammatory response in this area, a process which is potentially regulated by fatty acid signalling [22]. Several studies have attempted

to correlate hypothalamic expression of specific cytokines (IL-1 β , TNF α , IL-6 and IL-10) to either DIO or to intraventricular administration of saturated fatty acids [102,103]. Results show that saturated fatty acids can stimulate microglia, leading to upregulation of NF- κ B and pro-inflammatory cytokine expression [103–104].

Proinflammatory cytokines such as Interleukin-1 (IL-1), IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, and IL-18, IFN- γ , TNF α , TGF- β , and several chemokines known to cause glial activation, have been suggested as potential AD biomarkers. These and other related pro- and anti-inflammatory molecules are rapidly overexpressed by glia in adult rodent hippocampus in various models of limbic seizures [104–106]. In addition, it has been demonstrated that in the hippocampus, neuronal injury occurs only when the cytokines are induced in glia, and cytokine synthesis precedes the appearance of degenerating neurons [106]. In this context, neuronal injury is more pronounced when both IL-6 and TNF- α are produced in addition to IL-1 β .

Adipokines and circulating food-intake-controlling metabolites are capable of reducing glial activation in models of excitotoxicity. It has been demonstrated that Lep was able to protect hippocampal neurons against kainate excitotoxicity in an experimental model of epilepsy in Lep deficient ob/ob mice [107]. Likewise, ghrelin prevented kainate-induced activation of microglia and astrocytes, and inhibited the expression of proinflammatory mediator TNF α , IL-1 β , and cyclooxygenase-2 [104,105]. The inhibitory effect of ghrelin appears to be associated with the reduction in matrix metalloproteinase-3 expression in damaged hippocampal neurons [104]. Furthermore, recent findings demonstrate that desacyl-ghrelin, hexarelin and EP-80317 ligands display relevant anticonvulsive properties in models of limbic seizures [108].

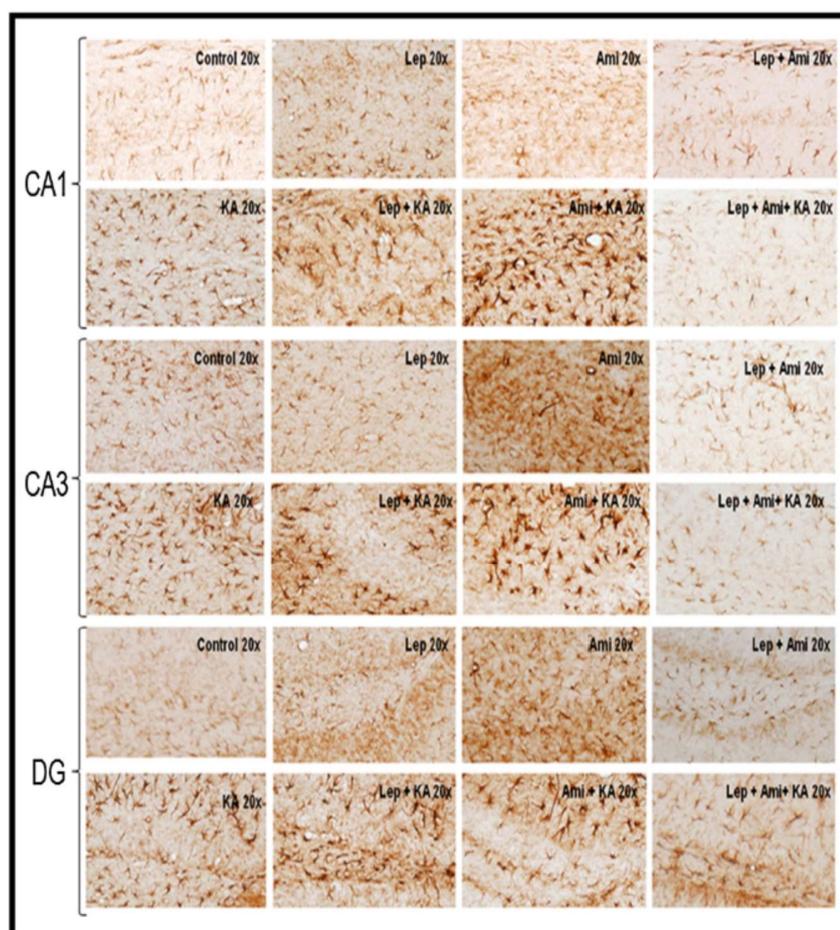


Fig. 3. Effect of Lep and amylin administration on hippocampal gliosis. As it is shown, treatment with KA 24.5 mg/kg, caused a reactive process of gliosis, as revealed from the immunohistochemistry of GFAP. The gliosis was especially intense in both CA1 and DG regions, when compared with the controls. Whereas treatment with amylin and Lep alone did not produce significant differences when compared with the controls, the combined exposure to amylin and Lep was able to decrease the process of reactive gliosis in CA1 and CA2 areas.

Lactation is a natural model for neuroprotection because it effectively prevents acute and chronic cell damage of the hippocampus that can be induced by excitotoxicity. It is becoming apparent that neuroendocrine hormones including oxytocin, progesterone and prolactin (PRL), apart from their roles in lactation, may also have neuroprotective effects on hippocampal neurons [109].

Among the pituitary hormones, PRL is the most versatile in the spectrum and number of functions it regulates. PRL modulates virtually every aspect of vertebrate physiology, including osmoregulation, growth, metabolism, development, reproduction, parental behaviour, and immune function [110]. In mammals, this hormone may act in cooperation with Lep to transfer information to the brain about the caloric state of the animal [111].

It has been shown that PRL prevents the damaging effects of excitotoxicity in the dorsal hippocampus [112]. Trophic actions of PRL in the CNS include mediating development and maturation of dopaminergic tuberoinfundibular neurons [113]. It also regulates neurogenesis and brain cell proliferation [114]. Prolactin also shows mitogenic actions on astroglia and protects hippocampal neurogenesis in the dentate gyrus of chronically stressed mice [115,116]. Prolactin is also involved in immune regulation [117]. In the brain, prolactin receptors (Prl-Rs), which belong to the class I cytokine receptor superfamily, have been

detected in the cortex, hypothalamus and hippocampus, in both astrocytes and glial cells [77]. Neuroprotective properties of PRL have also been demonstrated in a kainic acid-induced rat model of epilepsy, where the administration of PRL to ovariectomised rats significantly reduced seizures and neurotoxicity in the hippocampus [118]. This is noteworthy, as recent data suggest that PRL may be a possible marker for obesity in humans [77].

Finally, recently published results from our group show that PRL gene is down-regulated at early stages of amyloidogenesis, in an APP^{swe}/PS1^{dE9} double transgenic murine model of AD [80,81]. We observed a significant down-regulation of the Prl-Rs and PRL genes in the hippocampus of 3 month-old APP^{swe}/PS1^{dE9} mice, when compared to a wild-type control group. Thus, our results indicate early perturbations in this particular biological route, at early stages of the neurodegenerative process, when both cognitive impairments and A β deposits have yet to develop.

It has been shown that Lep is a powerful stimulator of *in vitro* PRL release and that its actions occur in part through stimulation of ERK1/2 [119]. This observation, once again, demonstrates the existence of a complex net of interactions among different adipokines, and related hormones like PRL, that should be extensively analysed to gain a better understanding of AD aetiology.

9. Synergic effects among adipokines

Besides the compelling evidence concerning the effects of adipokines Lep, amylin and ghrelin, and pituitary-derived hormones like PRL in the brain, there is a relative lack of knowledge in relation to either the synergistic or antagonistic effects of their combinations.

The first evidence of effects from combined actions of these molecules comes from the fact that the high circulating levels of PRL (or placental lactogens) during pregnancy, may directly interfere with Lep receptor signalling, possibly predisposing to Lep resistance [120]. Furthermore, pregnancy is characterized by marked changes in the control of energy balance [121,122]. In addition, Lep is a very potent *in vitro* secretagogue of PRL release in ectotherms [119]. However, the physiological significance of Lep actions in stimulating PRL release, including any similar effects on PRL secretion *in vivo*, remains uncertain.

Another point of interest is the synergic effects of amylin and Lep in reducing body weight and adiposity. Unfortunately, treatment of DIO animals and obese humans with Lep alone, did not demonstrate the dramatic weight-reducing benefits seen in *ob/ob* mice. As De Paoli stated in a recent review, the possibility to potentiate or enable the weight-reducing properties of Lep has led to significant efforts to combine Lep with other interventions or agents known to induce weight loss in order to overcome leptin resistance [123]. It seems that either a resistance to the weight-reducing actions of Lep exists in DIO mice and obese humans, or that Lep is not actively functioning to reduce body weight in the obese state. These observations led to the conclusion that, in the absence of endogenous amylin, Lep signalling is likely diminished. Results from a diet-induced leptin-resistant obese rat model, show that pre-treatment with amylin, for 1 week, restored Lep-induced neuronal activation of phosphorylated STAT3 signalling, within the ventromedial hypothalamus [124–126]. Furthermore, it has been shown that amylin augmented Lep signalling/receptor binding [126]. More recent data show that amylin-induced microglial IL-6 production is the likely mechanism by which amylin treatment interacts with Lep signalling to increase its anorexigenic effects in the hippocampus [127]. Taken together, these data establish a novel role for Lep and amylin in the processes of mouse hippocampal neurogenesis, and provide new insights into the mechanisms of neurogenic regulation [123].

It has been demonstrated that Lep and amylin, alone and in combination, activate signal transducer STAT3, AMPK, Akt, and extracellular signal-regulated kinase signalling pathways in human primary adipocytes, human peripheral blood mononuclear cells, and *ex vivo* in human adipose tissue from male versus female subjects [moon]. However, the authors conclude that in humans Lep and amylin activate overlapping intracellular signalling pathways and have additive, but not synergistic, effects.

Unpublished results from our laboratory suggest synergic effects of the combination of amylin and Lep in reducing kainate-induced neurotoxicity in mouse hippocampus (Fig. 3). In our experiments, a single treatment with KA 24.5 mg/kg caused a reactive gliosis at 72 h, clearly evident with GFAP immunohistochemistry. The gliosis was intense in both CA1 and DG regions, when compared with the respective controls, and treatment with amylin and Lep alone did not result in significant decreases in reactive gliosis. The combined exposure to amylin and Lep, however, produced a significant reduction in gliosis in CA1 and CA2 areas. Further experiments demonstrated that these effects were specifically related to GSK-3 β and Akt activities. In fact, it has been shown that *in vitro* exposure of HEK293 cells to A β 1–42 and human amylin increased cytosolic cAMP and Ca⁽²⁺⁾ levels and triggered multiple pathways involving the signal transduction mediators protein kinase A, MAPK, Akt, and c-Fos [126,127].

The effects of amylin and Lep on AMPK activity are particularly remarkable. AMP-activated protein kinase, a master regulator of cellular energy homeostasis and a central player in glucose and lipid

metabolism, is potentially implicated in the pathogenesis of AD [62]. AMPK activity decreases in AD brain, indicating decreased mitochondrial biogenesis and function. The roles of AMPK in the pathogenesis of AD include A β generation and Tau phosphorylation at Thr-231 and Ser-396/404, and an inhibition of mTOR signalling pathway, thus facilitating autophagy and promoting lysosomal degradation of A β . Then, AMPK emerges as a potential key target in the AD treatment and highlights the potential usefulness of amylin and Lep as neuroprotective agents in the context of AD. In agreement with that, recent translational research findings point to a potential therapeutic approach that incorporates amylin (a beta-cell hormone) and Lep agonism, restoring or enhancing Lep sensitivity [126–132].

10. Concluding remarks

The present review emphasizes the role of adipokines and hormones related to adipoinular axis in the development of AD. Leptin and amylin modulate the activity of key molecules involved in energy regulation, including AMPK, which plays a role in mitochondrial function, neurogenesis and cognition. Similarly, a number of studies suggest a central regulatory role for ghrelin not only in metabolism, but also in modulation of cognitive functions and memory capacity. In addition, these adipokines can regulate the inflammatory response mediated by the glia cells, a very useful property considering that inflammation plays a large role in AD neuropathology. Both ghrelin and Lep have demonstrable capacity to reduce seizures caused by exposure to kainic acid, and also limit the extent of glial inflammatory response. A comprehensive understanding of Lep functions at the cellular level, including elucidating potential interactions with other members of the adipocytokine family, is required for the development of novel pharmacotherapies targeting sporadic AD. This knowledge can contribute to the long-term goal of both AD prevention and treatment.

As a general conclusion, adipokines in general, and Lep in particular, are promising AD targets.

Conflict of interest statement

The authors declare no competing financial interests.

Abbreviations

A β	β -amyloid
AD	Alzheimer's disease
AMPK	AMP-activated protein kinase
ANS	the autonomic nervous system
BACE1	PPAR and aspartyl protease β -site A β PP-cleaving enzyme
BBB	brain blood barrier
CSF	cerebrospinal fluid
DIO	diet-induced obesity
GHSR1 α	GH secretagogue receptor type 1 α
HCD	high calorie diet
HFD	high-fat diet
IGF-1	insulin-like growth factor-1
JAK	janus tyrosine kinase
LepR (or ObRb)	Lep receptors
LRb	long signalling form of the Lep receptor
MAPK	mitogen-activated protein kinase
NPY-AgRP	neuropeptide Y-Agouti-related peptide
ObRb	leptin receptor
PI3k	phosphoinositide 3-kinase
POMC	pro-opiomelanocortin
PRL	prolactin
Prl-Rs	prolactin receptors
PTP1 β	protein tyrosine phosphatase 1 β
SIRT1	sirtuin-1
STAT3	signal transducers and activators of transcription
SOCS3	suppressor of cytokine signalling 3
T2DM	type 2 diabetes mellitus

Acknowledgements

This study was funded by grant 2009/SGR00853 from the Generalitat de Catalunya (autonomous government of Catalonia), by grant SAF2011-23631 from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación, Grant 0177594 from the CONACYT (Mexico), and Project "Prometeo" from SENESCYT (Government of Ecuador). We also would like to express our gratitude to Ms. Ana Nieto for revising this manuscript.

References

- [1] H. Hampel, D. Prvulovic, S. Teipel, F. Jessen, C. Luckhaus, L. Frolich, M.W. Riepe, R. Dodel, T. Leyhe, L. Bertram, W. Hoffmann, F. Faltraco, German Task Force on Alzheimer's Disease. The future of Alzheimer's disease: the next 10 years, *Prog. Neurobiol.* 95 (2011) 718–728, <http://dx.doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.11.008>.
- [2] A. Wimo, L. Jonsson, J. Bond, M. Prince, B. Winblad, Alzheimer Disease International. The worldwide economic impact of dementia 2010, *Alzheimer's Dement. J. Alzheimer's Assoc* 9 (2013) 1–11, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jalz.2012.11.006>.
- [3] C. Qiu, L. Fratiglioni. Epidemiology of dementia, in: P. McNamara (Ed.), *Dementia Treatments and Developments*, ABC-CLIO, California 2011, pp. 1–33.
- [4] C. Reitz, C. Brayne, R. Mayeux. Epidemiology of Alzheimer disease, *Nat. Rev. Neurol.* 7 (2011) 137–152, <http://dx.doi.org/10.1038/nrn2011.2>.
- [5] A. Erol. An integrated and unifying hypothesis for the metabolic basis of sporadic Alzheimer's disease, *J. Alzheimers Dis.* 13 (2008) 241–253.
- [6] S.W. Pimplikar. Reassessing the amyloid cascade hypothesis of Alzheimer's disease, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41 (2009) 1261–1268, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2008.12.015>.
- [7] C. Ballard, S. Gauthier, A. Corbett, C. Brayne, D. Aarsland, E. Jones. Alzheimer's disease, *Lancet* 377 (2011) 1019–1031, [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61349-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61349-9).
- [8] R.J. Castellani, R.K. Rolston, M.A. Smith. Alzheimer disease, *Dis. Mon.* 56 (2010) 484–546.
- [9] J.A. Hardy, G.A. Higgins. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis, *Science* 256 (1992) 184–185, <http://dx.doi.org/10.1126/science.1566067>.
- [10] J.A. Hardy, D.J. Selkoe. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics, *Science* 297 (2002) 353–356, <http://dx.doi.org/10.1126/science.1072994>.
- [11] N. Sato, R. Morishita. Plasma β -amyloid: a possible missing link between Alzheimer disease and diabetes, *Diabetes* 62 (2013) 1005–1006, <http://dx.doi.org/10.2337/db12-1549>.
- [12] W. Zhang, M. Bai, Y. Xi, J. Hao. Multiple inflammatory pathways are involved in the development and progression of cognitive deficits in APPswe/PS1dE9 mice, *Neurobiol. Aging* 33 (2012) 2661–2677, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2011.11.023>.
- [13] M. Garcia-Alloza, E.M. Robbins, S.X. Zhang-Nunes, S.M. Purcell. Characterization of amyloid deposition in the APPswe/PS1dE9 mouse model of Alzheimer disease, *Neurobiol. Dis.* 24 (2009) 516–524, <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2006.08.017>.
- [14] Y. Urano, S. Ochiai, N. Noguchi. Suppression of amyloid- β production by 24S-hydroxycholesterol via inhibition of intracellular amyloid precursor protein trafficking, *FASEB J.* 27 (2013) 4305–4315, <http://dx.doi.org/10.1096/fj.13-231456>.
- [15] B. Reed, S. Villeneuve, W. Mack, C. DeCarli, H.C. Chui, W. Jagust. Associations between serum cholesterol levels and cerebral amyloidosis, *JAMA Neurol* 71 (2014) 195–200.
- [16] E. Barbero-Camps, A. Fernández, L. Martínez, J.C. Fernández-Checa, A. Colell. APP/PS1 mice overexpressing SREBP-2 exhibit combined A β accumulation and tau pathology underlying Alzheimer's disease, *Hum. Mol. Genet.* 22 (2013) 3460–3476, <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddt201>.
- [17] A.S. Buchman, R.S. Wilson, J.L. Bienias, R.C. Shah, D.A. Evans, D.A. Bennett. Change in body mass index and risk of incident Alzheimer disease, *Neurology* 65 (2005) 892–897, <http://dx.doi.org/10.1212/01.wnl.0000176061.33817.90>.
- [18] L. Haataja, T. Gurlo, C.J. Huang, P.C. Butler. Islet amyloid in type 2 diabetes, and the toxic oligomer hypothesis, *Endocr. Rev.* 29 (2008) 303–316, <http://dx.doi.org/10.1210/er.2007-0037>.
- [19] M. Hiltunen, V.K. Khandelwal, N. Yaluri, T. Tiilikainen, M. Tusa, H. Koivisto, M. Krzisch, S. Vepsäläinen, P. Mäkinen, S. Kempainen, P. Miettinen, A. Haapasalo, H. Soininen, M. Laakso, H. Tanila. Contribution of genetic and dietary insulin resistance to Alzheimer phenotype in APP/PS1 transgenic mice, *J. Cell. Mol. Med.* 16 (2012) 1206–1222, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01384.x>.
- [20] S. Koga, A. Kojima, S. Kuwabara, Y. Yoshiyama. Immunohistochemical analysis of tau phosphorylation and astroglial activation with enhanced leptin receptor expression in diet-induced obesity mouse hippocampus, *Neurosci. Lett.* 571 (2014) 11–16, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2014.04.028>.
- [21] I.A. Amoldussen, A.J. Kiliaan, D.R. Gustafson. Obesity and dementia: adipokines interact with the brain, *Eur. Neuropharmacol.* 24 (2014) 1982–1999, <http://dx.doi.org/10.1016/j.europharm.2014.03.002>.
- [22] J.L. Sobesky, R.M. Barrientos, H.S. De May, B.M. Thompson, M.D. Weber, L.R. Watkins, S.F. Maier. High-fat diet consumption disrupts memory and primes elevations in hippocampal IL-1 β , an effect that can be prevented with dietary reversal or IL-1 receptor antagonism, *Brain Behav. Immun.* 42 (2014) 22–32, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2014.06.017>.
- [23] K.S. Sellbom, J. Gunstad. Cognitive function and decline in obesity, *J. Alzheimers Dis.* 30 (Suppl. 2) (2012) S89–S95.
- [24] S.E. Kanoski, T.L. Davidson. Western diet consumption and cognitive impairment: links to hippocampal dysfunction and obesity, *Physiol. Behav.* 103 (2011) 59–68, <http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2010.12.003>.
- [25] G. Winocur, C.E. Greenwood. Studies of the effects of high fat diets on cognitive function in a rat model, *Neurobiol. Aging* 26 (Suppl. 1) (2005) 46–49, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2005.09.003>.
- [26] I. Valladolí-Acebes, P. Stucchi, V. Cano, M.S. Fernandez-Alfonso, B. Merino, M. Gil-Ortega, A.A. Fole, L. Morales, M. Ruiz-Gayo, N. Del Olmo. High-fat diets impair spatial learning in the radial-arm maze in mice, *Neurobiol. Learn. Mem.* 95 (2011) 80–85, <http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2010.11.007>.
- [27] S. Kosari, E. Badoer, J.C. Nguyen, A.S. Killcross, T.A. Jenkins. Effect of western and high fat diets on memory and cholinergic measures in the rat, *Behav. Brain Res.* 235 (2012) 98–103, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2012.07.017>.
- [28] A.P. Ross, E.C. Bruggeman, A.W. Kasumu, J.G. Mielke, M.B. Parent. Nonalcoholic fatty liver disease impairs hippocampal-dependent memory in male rats, *Physiol. Behav.* 106 (2012) 133–141, <http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2012.01.008>.
- [29] N. Yamada-Goto, G. Katsuura, Y. Ochi, K. Ebihara, T. Kusakabe, K. Hosoda, K. Nakao. Impairment of fear-conditioning responses and changes of brain neurotrophic factors in diet-induced obese mice, *J. Neuroendocrinol.* 24 (2012) 1120–1125, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2826.2012.02327.x>.
- [30] S. Hoyer. Glucose metabolism and insulin receptor signal transduction in Alzheimer disease, *Eur. J. Pharmacol.* 490 (2004) 115–125, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.02.049>.
- [31] S. Merlo, S. Spampinato, P.L. Canonico, A. Copani, M.A. Sortino. Alzheimer's disease: brain expression of a metabolic disorder? *Trends Endocrinol. Metab.* 21 (2010) 537–544, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2010.05.005>.
- [32] V. Frisardi, V. Solfrizzi, D. Seripa, C. Capurso, A. Santamato, D. Sancarlo, G. Vendemiale, A. Pilotto, F. Panza. Metabolic-cognitive syndrome: a cross-talk between metabolic syndrome and Alzheimer's disease, *Ageing Res. Rev.* 9 (2010) 399–417, <http://dx.doi.org/10.1016/j.arr.2010.04.007>.
- [33] M. Hokama, S. Oka, J. Leon, T. Ninomiya, H. Honda, K. Sasaki, T. Iwaki, T. Ohara, T. Sasaki, F.M. Laferla, Y. Kiyohara, Y. Nakabeppu. Altered expression of diabetes-related genes in Alzheimer's disease brains: the Hisayama Study, *Cereb. Cortex* 24 (2014) 2476–2488, <http://dx.doi.org/10.1093/cercor/bht101>.
- [34] L.D. Baker, D. Cross, S. Minoshima, D. Belongia, G. Stennis, S. Watson. Insulin resistance and Alzheimer-like reductions in regional cerebral glucose metabolism for cognitively normal adults with prediabetes or early type 2 diabetes, *Arch. Neurol.* 68 (2011) 51–57, <http://dx.doi.org/10.1001/archneurol.2010.225>.
- [35] R.C. Frederich, A. Hamann, S. Anderson, B. Löllmann, B.B. Lowell, J.S. Flier. Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action, *Nat. Med.* 1 (1995) 1311–1314, <http://dx.doi.org/10.1038/nm1295-1311>.
- [36] K.C. de Git, R.A. Adan. Leptin resistance in diet-induced obesity: the role of hypothalamic inflammation, *Obes. Rev.*, 2015, <http://dx.doi.org/10.1111/obr.12243>.
- [37] L. Zhou, C. Yuan, J. Zhang, R. Yu, M. Huang, I.M. Adcock, X. Yao. Circulating leptin concentrations in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review and meta-analysis, *Respiration* 86 (2013) 512–522, <http://dx.doi.org/10.1159/000354191>.
- [38] G.H. Ballantyne, A. Gumbs, I.M. Modlin. Changes in insulin resistance following bariatric surgery and the adipoinular axis: role of the adipocytokines, leptin, adiponectin and resistin, *Obes. Surg.* 15 (2005) 692–699, <http://dx.doi.org/10.1381/0960892053923789>.
- [39] T.J. Kieffer, J.F. Habener. The adipoinular axis: effects of leptin on pancreatic beta-cells, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 278 (2000) E1–E14.
- [40] J.C. Henquin, H.P. Meissner. Opposite effects of tolbutamide and diazoxide on 86Rb⁺ fluxes and membrane potential in pancreatic B cells, *Biochem. Pharmacol.* 31 (1982) 1407–1415, [http://dx.doi.org/10.1016/0006-2952\(82\)90036-3](http://dx.doi.org/10.1016/0006-2952(82)90036-3).
- [41] R. Alemzadeh, K.M. Tushaus. Modulation of adipoinular axis in prediabetic Zucker diabetic fatty rats by diazoxide, *Endocrinology* 145 (2004) 5476–5484, <http://dx.doi.org/10.1210/en.2003-1523>.
- [42] Y. Zhang, R. Proenca, M. Maffei, M. Barone, L. Leopold, J.M. Friedman. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue, *Nature* 372 (1994) 425–432, <http://dx.doi.org/10.1038/372425a0>.
- [43] L. Gautron, J.K. Elmquist. Sixteen years and counting: an update on leptin in energy balance, *J. Clin. Invest.* 121 (2011) 2087–2093, <http://dx.doi.org/10.1172/JCI45888>.
- [44] S. Koga, A. Kojima, C. Ishikawa, S. Kuwabara, K. Arai, Y. Yoshiyama. Effects of diet-induced obesity and voluntary exercise in a taupathy mouse model: implications of persistent hyperleptinemia and enhanced astrocytic leptin receptor expression, *Neurobiol. Dis.* 71 (2014) 180–192, <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2014.08.015>.
- [45] J.M. Zigman, J.K. Elmquist. Minireview: from anorexia to obesity—the yin and yang of body weight control, *Endocrinology* 144 (2003) 3749–3756.
- [46] S.H. Bates, W.H. Stearns, T.A. Dundon, M. Schubert, A.W. Tso, Y. Wang, A.S. Banks, H.J. Lavery, A.K. Haq, E. Maratos-Flier, B.G. Neel, M.W. Schwartz Jr., M.G. Myers. STAT3 signalling is required for leptin regulation of energy balance but not reproduction, *Nature* 421 (2003) 856–859, <http://dx.doi.org/10.1038/nature01388>.
- [47] G. Ramadon, T. Fujikawa, M. Fukuda, J. Anderson, D.A. Morgan, R. Mostoslavsky, R.C. Stuart, M. Perello, C.R. Vianna, E.A. Nilini, K. Rahmouni, R. Coppari, SIRT1 deacetylase in POMC neurons is required for homeostatic defenses against diet-induced obesity, *Cell Metab.* 12 (2010) 78–87, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2010.05.010>.
- [48] G. Ramadon, C.E. Lee, A.L. Bookout, S. Lee, K.W. Williams, J. Anderson, J.K. Elmquist, R. Coppan. Brain SIRT1: anatomical distribution and regulation by energy availability, *J. Neurosci.* 28 (2008) 9989–9996, <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3257-08.2008>.

- [49] M. Ishii, G. Wang, G. Racchumi, J.P. Dyke, C. Iadecola, Transgenic mice overexpressing amyloid precursor protein exhibit early metabolic deficits and a pathologically low leptin state associated with hypothalamic dysfunction in arcuate neuropeptide Y neurons, *J. Neurosci.* 34 (2014) 9096–9106, <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0872-14.2014>.
- [50] J.P. Thaler, S.J. Choi, M.W. Schwartz, B.E. Wisse, Hypothalamic inflammation and energy homeostasis: resolving the paradox, *Front. Neuroendocrinol.* 31 (2010) 79–84, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ynfrne.2009.10.002>.
- [51] W. Fu, A. Ruangkittisakul, D. MacTavish, J.Y. Shi, K. Ballanyi, J.H. Jhamandas, Amyloid β ($A\beta$) peptide directly activates amylin-3 receptor subtype by triggering multiple intracellular signaling pathways, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 18820–18830, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M111.331181>.
- [52] S. Söderberg, B. Åhrén, M. Eliasson, B. Dinesen, T. Olsson, The association between leptin and proinsulin is lost with central obesity, *J. Intern. Med.* 252 (2002) 140–148, <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2796.2002.01018.x>.
- [53] E. Hartter, T. Svoboda, B. Ludvik, M. Schuller, B. Lell, E. Kuenburg, M. Brunnbauer, W. Woloszczuk, R. Prager, Basal and stimulated plasma levels of pancreatic amylin indicate its co-secretion with insulin in humans, *Diabetologia*, 34 (1991) 52–54, <http://dx.doi.org/10.1007/BF00404025>.
- [54] J.E. Koda, M. Fineman, T.J. Rink, G.E. Dailey, D.B. Muchmore, L.G. Linarelli, Amylin concentrations and glucose control, *Lancet* 339 (1992) 1179–1180, [http://dx.doi.org/10.1016/0140-6736\(92\)90785-2](http://dx.doi.org/10.1016/0140-6736(92)90785-2).
- [55] A.A. Young, B. Gedulin, W. Vine, A. Percy, T.J. Rink, Gastric emptying is accelerated in diabetic BB rats and is slowed by subcutaneous injections of amylin, *Diabetologia* 38 (1995) 642–648, <http://dx.doi.org/10.1007/BF00401833>.
- [56] T. Riediger, M. Rauch, H. Schmid, Actions of amylin on subfornical organ neurons and on drinking behaviour in rats, *Am. J. Physiol.* 276 (1999) R514–R521.
- [57] P.C. May, L.N. Boggs, K.S. Fuson, Neurotoxicity of human amylin in rat primary hippocampal cultures: similarity to Alzheimer's disease amyloid-beta neurotoxicity, *J. Neurochem.* 61 (1993) 2330–2333, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.1993.tb07480.x>.
- [58] J.E. Morley, J.F. Hood, S.A. Farr, H.J. Perry, F.E. Kaiser, P.E. Morley, Effects of amylin on appetite regulation and memory, *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 73 (1995) 1042–1046, <http://dx.doi.org/10.1139/y95-147>.
- [59] C. De Vriese, C. Delporte, Influence of ghrelin on food intake and energy homeostasis, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 10 (2007) 615–659, <http://dx.doi.org/10.1097/MCO.0b013e32829b37c>.
- [60] M.D. Gahete, A. Rubio, J. Córdoba-Chacón, F. Gracia-Navarro, R.D. Kineman, J. Avila, R.M. Luque, J.P. Castaño, Expression of the ghrelin and neurotensin systems is altered in the temporal lobe of Alzheimer's disease patients, *J. Alzheimers Dis.* 22 (2010) 819–828.
- [61] X.M. Guan, H. Yu, O.C. Palyha, K.K. McKee, S.D. Feighner, D.J. Sirinathsinghji, R.G. Smith, L.H. Van der Ploeg, A.D.J. Howard, Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues, *Brain Res. Mol. Brain Res.* 48 (1997) 23–29, [http://dx.doi.org/10.1016/S0169-328X\(97\)00071-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0169-328X(97)00071-5).
- [62] M. Nakazato, N. Murakami, Y. Date, M. Kojima, H. Matsuo, K. Kangawa, S. Matsukura, A role for ghrelin in the central regulation of feeding, *Nature* 409 (2001) 194–198, <http://dx.doi.org/10.1038/35051587>.
- [63] V.P. Carlini, M.E. Monzon, M.M. Varas, A.B. Cragnolini, H.B. Sciotho, T.N. Scimone, S.R. Barifoglio, Ghrelin increases anxiety-like behavior and memory retention in rats, *Biochem Biophys Res Commun* 299 (2002) 739–743, [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)02740-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-291X(02)02740-7).
- [64] H. Cai, W.N. Cong, J.I. WN, S. Ji, S. Rothman, S. Maudsley, B. Martin, Metabolic dysfunction in Alzheimer's disease and related neurodegenerative disorders, *Curr. Alzheimer Res.* 9 (2012) 5–17, <http://dx.doi.org/10.2174/156720512799015064>.
- [65] Z. Cai, L.J. Yan, K. Li, S.H. Quazi, B. Zhao, Roles of AMP-activated protein kinase in Alzheimer's disease, *Neuromolecular Med.* 14 (2012) 1–14, <http://dx.doi.org/10.1007/s12017-012-8173-2>.
- [66] M. Moon, J.G. Choi, D.W. Nam, H.S. Hong, Y.J. Choi, M.S. Oh, I. Mook-Jung, Ghrelin ameliorates cognitive dysfunction and neurodegeneration in intrahippocampal amyloid- β 1–42 oligomer-injected mice, *J. Alzheimers Dis.* 23 (2011) 147–159.
- [67] Y. Chen, C.P. Cao, R. Li, W. Wang, D. Zhang, L.L. Han, X.Q. Zhang, A. Kim, S. Kim, G.L. Liu, Ghrelin modulates insulin sensitivity and tau phosphorylation in high glucose-induced hippocampal neurons, *Biol. Pharm. Bull.* 33 (2010) 1165–1169, <http://dx.doi.org/10.1248/bpb.33.1165>.
- [68] V. Giordano, G. Peluso, M. Iannucelli, P. Benatti, M. Calvani, Systemic and brain metabolic dysfunction as a new paradigm for approaching Alzheimer's dementia, *Neurochem. Res.* 32 (2007) 555–567, <http://dx.doi.org/10.1007/s11064-006-9125-8>.
- [69] W.N. Cong, E. Golden, N. Pantaleo, C.M. White, S. Maudsley, B. Martin, Ghrelin receptor signaling: a promising therapeutic target for metabolic syndrome and cognitive dysfunction, *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 9 (2010) 557–563, <http://dx.doi.org/10.2174/187515271079336153>.
- [70] S. Gomes, I. Martins, A.C. Fonseca, R. Oliveira, R. Resende, C.M. Pereira, Protective effect of leptin and ghrelin against toxicity induced by amyloid- β oligomers in a hypothalamic cell line, *J. Neuroendocrinol.* 26 (2014) 176–185, <http://dx.doi.org/10.1111/jne.12138>.
- [71] E.C. McNay, A.K. Recknagel, Brain insulin signaling: a key component of cognitive processes and a potential basis for cognitive impairment in type 2 diabetes, *Neurobiol. Learn. Mem.* 96 (2011) 432–442, <http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2011.08.005>.
- [72] G. Marwarha, O. Ghribi, Leptin signaling and Alzheimer's disease, *Am J Neurodegener Dis* 1 (2012) 245–265.
- [73] S.J. Greco, K.J. Bryan, S. Sarkar, X. Zhu, M.A. Smith, J.W. Ashford, J.M. Johnston, N. Tezapsidis, G. Casadesus, Leptin reduces pathology and improves memory in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease, *J. Alzheimers Dis.* 19 (2010) 1155–1167.
- [74] S.J. Greco, A. Hamzelou, J.M. Johnston, M.A. Smith, J.W. Ashford, N. Tezapsidis, Leptin boosts cellular metabolism by activating AMPK and the sirtuins to reduce tau phosphorylation and β -amyloid in neurons, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 14 (2011) 170–174, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.09.050>.
- [75] G. McGregor, Y. Malekizadeh, J. Harvey, Minireview: food for thought: regulation of synaptic function by metabolic hormones, *Mol. Endocrinol.* 29 (2015) 3–13, <http://dx.doi.org/10.1210/me.2014-1328>.
- [76] G. Marwarha, S. Raza, C. Meiers, O. Ghribi, Leptin attenuates BACE1 expression and amyloid- β genesis via the activation of SIRT1 signaling pathway, *Biochim. Biophys. Acta* 1842 (2014) 1587–1595, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.05.015>.
- [77] A.J. Irving, J. Harvey, Leptin regulation of hippocampal synaptic function in health and disease, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.* 369 (2013) 2013–2055, <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2013.0155>.
- [78] J.M. Johnston, W.T. Hu, D.W. Fardo, S.J. Greco, G. Perry, T.J. Montine, J.Q. Trojanowski, L.M. Shaw, J.W. Ashford, N. Tezapsidis, Low plasma leptin in cognitively impaired ADNI subjects: gender differences and diagnostic and therapeutic potential, *Curr. Alzheimer Res.* 1 (2) (2014) 165–174.
- [79] J.M. Johnston, S.J. Greco, A. Hamzelou, J.W. Ashford, N. Tezapsidis, Repositioning leptin as a therapy for Alzheimer's disease, *Therapy* 8 (5) (2011) 481–490.
- [80] J. Folch, I. Pedrós, I. Patracá, F. Sureda, F. Junyent, C. Beas-Zarate, E. Verdagué, M. Pallàs, C. Auladell, A. Camins, Neuroprotective and anti-ageing role of leptin, *J. Mol. Endocrinol.* 49 (2012) R149–R156, <http://dx.doi.org/10.1530/JME-12-0151>.
- [81] I. Pedrós, D. Petrov, M. Allgaier, F. Sureda, E. Barroso, C. Beas-Zarate, C. Auladell, M. Pallàs, M. Vázquez-Carrera, G. Casadesus, J. Folch, A. Camins, Early alterations in energy metabolism in the hippocampus of APPsw/PS1dE9 mouse model of Alzheimer's disease, *Biochim. Biophys. Acta* 1842 (2014) 1556–1566, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.05.025>.
- [82] M.E. Orr, A. Salinas, R.A. Buffenstein, S. Oddo, Mammalian target of rapamycin hyperactivity mediates the detrimental effects of a high sucrose diet on Alzheimer's disease pathology, *Neurobiol. Aging* 35 (2014) 1233–1242, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.12.006>.
- [83] K. Hegyi, K. Fülöp, K. Kovács, S. Tóth, A. Falus, Leptin-induced signal transduction pathways, *Cell Biol. Int.* 28 (2004) 159–169, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellbi.2003.12.003>.
- [84] M. Manna, S. Kramer, M. Boschmann, M. Gollasch, mTOR and regulation of energy homeostasis in humans, *J. Mol. Med.* 91 (2013) 1167–1175.
- [85] Z. Tang, E. Berezcki, H. Zhang, S. Wang, C. Li, X. Ji, R.M. Branca, J. Lehtio, Z. Guan, P. Filipcik, S. Xu, B. Winblad, J.J. Pei, Mammalian target of rapamycin (mTOR) mediates tau protein dyshomeostasis: implication for Alzheimer disease, *J. Biol. Chem.* 31 (288) (2013) 15556–15570.
- [86] S. Wullschlegel, R. Loewith, M.N. Hall, TOR signaling in growth and metabolism, *Cell* 124 (2006) 471–484, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2006.01.016>.
- [87] A.K. Saha, X.J. Xu, T.W. Balon, A. Brandon, E.W. Kraegen, N.B. Ruderman, Insulin resistance due to nutrient excess: is it a consequence of AMPK downregulation? *Cell Cycle* 10 (2011) 3447–3451, <http://dx.doi.org/10.4161/cc.10.20.17886>.
- [88] N.A. Shirwany, M.H. Zou, AMPK: a cellular metabolic and redox sensor. A minireview, *Front Biosci (Landmark Ed.)*, 19 (2014) 447–474, [10.2741/4218](http://dx.doi.org/10.2741/4218).
- [89] L. Katsouri, C. Parr, N. Bogdanovic, M. Willem, M. Sastre, PPAR γ co-activator-1 α (PGC-1 α) reduces amyloid- β generation through a PPAR γ -dependent mechanism, *J. Alzheimers Dis.* 25 (2011) 151–162.
- [90] A. Louis, A. Bartke, M.M. Mastemak, Effects of growth hormone and thyroxine replacement therapy on insulin signaling in Ames dwarf mice, *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 65 (2010) 344–352, <http://dx.doi.org/10.1093/gerona/gdq018>.
- [91] N. Laflamme, S. Rivest, Toll-like receptor 4: the missing link of the cerebral innate immune response triggered by circulating gram-negative bacterial cell wall components, *FASEB J.* 15 (2001) 155–163, <http://dx.doi.org/10.1096/fj.00-0339com>.
- [92] S.S. Martin, A. Qasim, M.P. Reilly, Leptin resistance: a possible interface of inflammation and metabolism in obesity-related cardiovascular disease, *J. Am. Coll. Cardiol.* 52 (2008) 1201–1210, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2008.05.060>.
- [93] S. Maioli, M. Lodeiro, P. Merino-Serrais, F. Falahati, W. Khan, E. Puerta, A. Codita, R. Rimondini, M.J. Ramirez, A. Simmons, F. Gil-Bea, E. Westman, A. Cedazo-Minguez, The Alzheimer's disease neuroimaging initiative. Alterations in brain leptin signaling in spite of unchanged CSF leptin levels in Alzheimer's disease, *Aging Cell* 14 (2015) 122–129, <http://dx.doi.org/10.1111/acel.12281>.
- [94] H. Hsueh, W. Pan, M.J. Barnes, A.J. Kastin, Leptin receptor mRNA in rat brain astrocytes, *Peptides* 30 (2009) 2275–2280, <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2009.08.023>.
- [95] G. Munch, J. Apelt, J. Rosemarie, E. Kientsch, P. Stahl, H.J. Luth, R. Schliebs, Advanced glycation endproducts and pro-inflammatory cytokines in transgenic Tg2576 mice with amyloid plaque pathology, *J. Neurochem.* 86 (2003) 283–289, <http://dx.doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01837.x>.
- [96] Y. Zhu, E. Nwabuisi-Heath, S.B. Dumanis, L.M. Tai, C. Yu, G.W. Rebeck, M.J. LaDu, APOE genotype alters glial activation and loss of synaptic markers in mice, *Glia* 60 (2012) 559–569, <http://dx.doi.org/10.1002/glia.22289>.
- [97] E. Fuente-Martín, C. García-Cáceres, M. Granado, M.L. de Ceballos, M.A. Sánchez-Garrido, B. Saman, Z.W. Liu, M.O. Dietrich, M. Tena-Sempere, P. Argente-Anzón, F. Díaz, J. Argente, T.L. Horvath, J.A. Chown, Leptin regulates glutamate and glucose transporters in hypothalamic astrocytes, *J. Clin. Invest.* 122 (2012) 3900–3913, <http://dx.doi.org/10.1172/JCI64102>.
- [98] B.T. Jeon, E.A. Jeong, H.J. Shin, Y. Lee, D.H. Lee, H.J. Kim, S.S. Kang, G.J. Cho, W.S. Choi, G.S. Roh, Resveratrol attenuates obesity-associated peripheral and central inflammation and improves memory deficit in mice fed a high-fat diet, *Diabetes* 61 (2012) 1444–1454, <http://dx.doi.org/10.2337/db11-1498>.

- [99] P. Agostinho, R.A. Cunha, C. Oliveira, Neuroinflammation, oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's Disease, *Curr. Pharm. Des.* 16 (2010) 2766–2778, <http://dx.doi.org/10.2174/138161210793176572>.
- [100] D. Farfara, V. Lifshitz, D. Frenkel, Neuroprotective and neurotoxic properties of glial cells in the pathogenesis of Alzheimer's disease, *J. Cell. Mol. Med.* 12 (2008) 762–780, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00314.x>.
- [101] G. Azizi, A. Mirshafiq, The potential role of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in Alzheimer disease pathogenesis, *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 34 (2012) 881–895, <http://dx.doi.org/10.3109/08923973.2012.705292>.
- [102] C.T. De Souza, E.P. Araujo, S. Bordin, R. Ashimine, R.L. Zollner, A.C. Boschero, M.J. Saad, L.A. Velloso, Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus, *Endocrinology* 146 (10) (2005) 4192–4199, <http://dx.doi.org/10.1210/en.2004-1520>.
- [103] M. Milanski, G. Degasperis, A. Coepe, J. Morari, R. Denis, D.E. Cintra, D.M. Tsukumo, G. Anhe, M.E. Amaral, H.K. Takahashi, R. Curi, H.C. Oliveira, J.B. Carnevali, S. Bordin, M.J. Saad, L.A. Velloso, Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity, *J. Neurosci.* 29 (2009) 359–370, <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2760-08.2009>.
- [104] J. Lee, E. Lim, Y. Kim, E. Li, S. Park, Ghrelin attenuates kainic acid-induced neuronal cell death in the mouse hippocampus, *J. Endocrinol.* 205 (2010) 263–270, <http://dx.doi.org/10.1677/JOE-10-0040>.
- [105] M.G. De Simoni, C. Perego, T. Ravizza, D. Moneta, M. Conti, F. Marchesi, A. De Luigi, S. Garattini, A. Vezzani, Inflammatory cytokines and related genes are induced in the rat hippocampus by limbic status epilepticus, *Eur. J. Neurosci.* 12 (2000) 2623–2633, <http://dx.doi.org/10.1046/j.1460-9568.2000.00140.x>.
- [106] T. Ravizza, M. Rizzi, C. Perego, C. Richichi, J. Vefisková, S.L. Moshé, M.G. De Simoni, A. Vezzani, Inflammatory response and glia activation in developing rat hippocampus after status epilepticus, *Epilepsia* 46 (2005) 113–117, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1528-1167.2005.01006.x>.
- [107] E. Erbayat-Altay, A.J. Fessler, M. Gallagher, H.P. Attarian, F. Dehdashti, V.J. Vahle, J. Ojemann, J.L. Dowling, F.G. Gilliam, Correlation of severity of FDG-PET hypometabolism and interictal regional delta slowing in temporal lobe epilepsy, *Epilepsia* 46 (2005) 573–576, <http://dx.doi.org/10.1111/j.0013-9580.2005.08204.x>.
- [108] G. Biagini, A. Torsello, C. Marinelli, F. Gualtieri, R. Vezzali, S. Coco, E. Bresciani, V. Locatelli, Beneficial effects of desacyl-ghrelin, hexarelin and EP-80317 in models of status epilepticus, *Eur. J. Pharmacol.* 670 (2011) 130–136, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.08.020>.
- [109] M.W. Warren, L.S. Hyman, M.F. Weiner, Lipids and adipokines as risk factors for Alzheimer's disease, *J. Alzheimers Dis.* 29 (2012) 151–157.
- [110] M.E. Freeman, S. Kanyicska, A. Lerant, Prolactin: structure, function, and regulation of secretion, *Physiol. Rev.* 80 (2000) 1523–1631.
- [111] V. Popovic, L.H. Duntas, Brain somatic cross-talk: ghrelin, leptin and ultimate challenges of obesity, *Nutr. Neurosci.* 8 (2005) 1–5, <http://dx.doi.org/10.1080/10284150400027107>.
- [112] D. Tejadailla, M. Cerbón, T. Morales, Prolactin reduces the damaging effects of excitotoxicity in the dorsal hippocampus of the female rat independently of ovarian hormones, *Neuroscience* 169 (2010) 1178–1185, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.05.074>.
- [113] C.J. Phelps, M.I. Romero, D.L. Hurlley, Prolactin replacement must be continuous and initiated prior to 21 d of age to maintain hypothalamic dopaminergic neurons in hypopituitary mice, *Endocrine* 20 (2003) 139–148, <http://dx.doi.org/10.1385/ENDO:20:1-2:139>.
- [114] M. Funata, R.S. Bridges, Gestation-induced cell proliferation in the rat brain, *Brain Res. Dev. Brain Res.* 156 (2005) 61–66, <http://dx.doi.org/10.1016/j.devbrainres.2005.01.008>.
- [115] D. Mangoura, C. Pelletiere, S. Leung, N. Sakellariadis, D.X. Wang, Prolactin concurrently activates src-PLD and JAK/Stat signaling pathways to induce proliferation while promoting differentiation in embryonic astrocytes, *Int. J. Dev. Neurosci.* 18 (2000) 693–704, [http://dx.doi.org/10.1016/S0736-5748\(00\)00031-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0736-5748(00)00031-9).
- [116] L. Tomer, S. Karg, A. Blume, M. Kandasamy, H.G. Kuhn, J. Winkler, L. Aigner, I.D. Neumann, Prolactin prevents chronic stress-induced decrease of adult hippocampal neurogenesis and promotes neuronal fate, *J. Neurosci.* 29 (2009) (1826–1833) <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3178-08.2009>.
- [117] V. Goffin, N. Binart, P. Touraine, P.A. Kelly, Prolactin: the new biology of an old hormone, *Annu. Rev. Physiol.* 64 (2002) 47–67, <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.physiol.64.081501.131049>.
- [118] T. Morales, Recent findings on neuroprotection against excitotoxicity in the hippocampus of female rats, *J. Neuroendocrinol.* 23 (2011) 994–1001, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2826.2011.02141.x>.
- [119] C.K. Tipsmark, C.N. Strom, S.T. Bailey, R.J. Borski, Leptin stimulates pituitary prolactin release through an extracellular signal-regulated kinase-dependent pathway, *J. Endocrinol.* 196 (2008) 275–281, <http://dx.doi.org/10.1677/JOE-07-0540>.
- [120] V.S. Nagaishi, L. Cardinali, T.T. Zampieri, I.C. Furigo, M. Metzger, J. Donato Jr., Possible crosstalk between leptin and prolactin during pregnancy, *Neuroscience* 259 (2014) 71–83, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.11.050>.
- [121] R.A. Augustine, D.R. Grattan, Induction of central leptin resistance in hyperphagic pseudopregnant rats by chronic prolactin infusion, *Endocrinology* 149 (2008) 1049–1055, <http://dx.doi.org/10.1210/en.2007-1018>.
- [122] S.R. Ladyman, R.A. Augustine, D.R. Grattan, Hormone interactions regulating energy balance during pregnancy, *J. Neuroendocrinol.* 22 (2010) 805–817, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2826.2010.02017.x>.
- [123] A.M. De Paoli, 20 years of leptin: leptin in common obesity and associated disorders of metabolism, *J. Endocrinol.* 223 (2014) 71–81, <http://dx.doi.org/10.1530/JOE-14-0258>.
- [124] J.D. Roth, B.L. Roland, R.L. Cole, J.L. Trevasakis, C. Weyer, J.E. Koda, C.M. Anderson, D.G. Parkes, A.D. Baron, Leptin responsiveness restored by amylin agonism in diet-induced obesity: evidence from nonclinical and clinical studies, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2008) 7257–7262, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0706473105>.
- [125] J.L. Trevasakis, V.F. Turek, C. Wittmer, P.S. Griffin, J.K. Wilson, J.M. Reynolds, Y. Zhao, C.M. Mack, D.G. Parkes, J.D. Roth, Enhanced amylin-mediated body weight loss in estradiol-deficient diet-induced obese rats, *Endocrinology* 151 (2010) 5657–5668, <http://dx.doi.org/10.1210/en.2010-0590>.
- [126] V.F. Turek, J.L. Trevasakis, B.E. Levin, A.A. Dunn-Meynell, B. Irani, G. Gu, C. Wittmer, P.S. Griffin, C. Vu, D.G. Parkes, J.D. Roth, Mechanisms of amylin/leptin synergy in rodent models, *Endocrinology* 151 (2010) 143–152, <http://dx.doi.org/10.1210/en.2009-0546>.
- [127] C. Le Foll, M.D. Johnson, A. Dunn-Meynell, C.N. Boyle, T.A. Lutz, B.E. Levin, Amylin-induced central IL-6 production enhances ventromedial hypothalamic leptin signaling, *Diabetes* (2014 Nov 19) pii: DB.140645.
- [128] S. Jager, C. Handschin, J. St-Pierre, S.M. Spiegelman, AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 α , *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007) 12017–12022, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0705070104>.
- [129] F.Y. Ma, G.M. Anderson, T.D. Gunn, V. Goffin, D.R. Grattan, S.J. Bunn, Prolactin specifically activates signal transducer and activator of transcription 5b in neuroendocrine dopaminergic neurons, *Endocrinology* 146 (2005) 5112–5119, <http://dx.doi.org/10.1210/en.2005-0770>.
- [130] J.A. Rios, P. Cisternas, M. Arrese, S. Barja, N.C. Inestrosa, Is Alzheimer's disease related to metabolic syndrome? A Wnt signaling conundrum, *Prog. Neurobiol.* 121 (2014) 125–146, <http://dx.doi.org/10.1016/j.pneurobio.2014.07.004>.
- [131] M. Sadowski, J. Pankiewicz, H. Scholtzova, Y. Ji, D. Quartermain, C.H. Jensen, Amyloid-beta deposition is associated with decreased hippocampal glucose metabolism and spatial memory, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 63 (2004) 418–428.
- [132] M.W. Schwartz, G.J. Morton, Obesity: keeping hunger at bay, *Nature* 418 (2002) 595–597, <http://dx.doi.org/10.1038/418595a>.

ORIGINAL ARTICLE

Melatonin suppresses nitric oxide production in glial cultures by pro-inflammatory cytokines through p38 MAPK inhibition

A. Vilar¹, L. de Lemos², I. Patraca³, N. Martínez³, J. Folch³, F. Junyent^{2,3}, E. Verdaguer¹,
M. Pallàs², C. Auladell¹ & A. Camins²

¹Departament de Biologia Cel·lular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain, ²Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia Facultat de Farmàcia, Centros de Investigació Biomèdica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Institut de Biomedicina, Universitat de Barcelona, Nucli Universitari de Pedralbes, Barcelona, Spain, and ³Unitat de Bioquímica, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain

Abstract

Melatonin has been shown to down-regulate inflammatory responses and provide neuroprotection. However, the mechanisms underlying the anti-inflammatory properties of melatonin are poorly understood. In the present work, we studied the modulatory effect of melatonin against pro-inflammatory cytokines in glial cell cultures. Treatment with pro-inflammatory cytokines mainly tumor necrosis factor- α , interleukin 1- β , and interferon- γ induces an increase in inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression and nitric oxide (NO) production. Pre-treatment with melatonin produced an inhibitory effect on iNOS expression and NO production. The biochemical studies revealed that cytokine treatment favors the activation of several pathways, such as mitogen-activated protein kinases (MAPKs), STAT1, and STAT3; however, the anti-inflammatory effect of melatonin was accompanied only by a decrease in p38 MAPK activity. Likewise, SB203580 a p38 kinase inhibitor inhibits NO production. These data indicate that the anti-inflammatory action of melatonin in glial cells after stimulation with pro-inflammatory cytokines may be in part, attributable to p38 inhibition which down-regulates iNOS expression and NO production.

Keywords: melatonin, nitric oxide, glial cells, inflammation

Introduction

It is well established that neuroinflammatory processes contribute to the cascade of events that participate in the progressive process of neuronal loss observed in many neurodegenerative diseases, most notably in Parkinson's disease (PD) and Alzheimer's disease (AD) [1,2]. Thus, drugs which are able to slow the brain inflammatory cascade may be of interest for the treatment of the aforementioned diseases [1,3]. As such, the use of non-steroidal anti-inflammatory drugs has been proposed to delay or even to prevent the onset of such neurodegenerative disorders [3]. However, to date, the main problem is that the majority of current drug treatments are effective only in treating the symptoms of these neurodegenerative disorders rather than in preventing the underlying degeneration of neurons. Consequently it is necessary to develop therapies capable of preventing or delaying the progressive loss of neuronal populations in these diseases.

With neuroinflammatory reaction, the glial cells, mainly microglia and astrocytes, are activated [4,5] and produce neurotoxic factors that contribute to neuronal injury. Of these factors, we can emphasize, nitric oxide

(NO), pro-inflammatory cytokines, reactive oxygen species, and glutamate increase [6–10]. In this glial process of activation, the excessive levels of NO are generated via the increased expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS), mainly as a result of microglial activity [6,7,9]. Likewise, this amount of NO production is harmful for neurons because it is a free radical which induce protein modifications by means of nitrosylation and nitration [7]. Accordingly, activation of iNOS in glial cells constitutes a critical event in inflammatory-mediated neurodegenerative disorders [9]. Thus, pro-inflammatory cytokines, mainly tumor necrosis factor- α (TNF α), interleukin 1- β (IL1 β), and interferon- γ (IFN γ), will be responsible for iNOS induction in glial cells and enhance the increase in NO production, which is probably one of the main mediators of neuronal cell loss [8,10–15]. Moreover, other signaling pathways, such as the mitogen-activated protein kinase (MAPK) and the NF- κ B signaling cascade, are considered canonical pathways involved in inflammatory-mediated neurodegenerative disorders [12–14]. Currently, three major constituents of the MAPK family have been characterized in mammals: extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2), c-Jun N-terminal

Correspondence: Antoni Camins, PhD, Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, and Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Avda/Diagonal 643, E-08028 Barcelona, Spain. Tel: + 34 93 4024531. Fax: + 34 934035982. E-mail: camins@ub.edu

(Received date: 23 July 2013; Accepted date: 12 September 2013; Published online: 9 October 2013)

kinases (JNKs) (JNK1, 2, and 3), and p38 MAPKs consisting of four isoforms (α , β , γ , and δ). When activated, these kinases phosphorylate both cytosolic and nuclear target proteins. Previous studies suggest that these signaling cascades are critical for the control of inflammatory processes in the brain, including the activation of microglia in response to cytokines and the induction of iNOS [13,16–18].

Recently, there has been much interest in the neuroprotective effects of melatonin, which has been shown to be effective in protecting against almost all experimental models of neurodegenerative diseases and age-related cognitive decline, such as in beta-amyloid-treated C6 cells, in neurotoxicity induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and parkinsonian toxins, and in KA-induced cell loss and prion protein-mediated neurotoxicity [19–26]. The potential neuroprotective effects of melatonin may reside in a vast number of physiological functions, including its antioxidant properties, its interactions with intracellular signaling pathways, the regulation of cell survival or apoptotic genes, and mitochondrial function [19,22,26].

Few studies have been done with primary glial cell cultures (mixed cultures of astrocytes and microglia) in order to evaluate the anti-neuroinflammatory properties of melatonin. Although astrocytes and microglia are two distinct types of glial cells in the central nervous system (CNS) with differences in morphology and functional properties, they are regarded as immune active cells, and in some instances, they share common innate immune responses [26–30]. Moreover, astrocytes exert important functions in the brain, among them synthesis of neurotrophic factors, ion homeostasis, and regulation of extracellular glutamate concentration [27–30]. Moreover glial cells play a crucial role in the normal functioning of the CNS [30].

The aim of the present work was to assess the anti-inflammatory potential of melatonin in mixed glial cell cultures treated simultaneously with three pro-inflammatory cytokines, TNF α , IL1 β , and IFN γ , and consequently inducing high production of NO [27,28]. The results obtained supported the conclusion that melatonin has effects on the inhibition of NO production and on iNOS expression after cytokine treatments, giving support to the anti-oxidant potential of this compound and to its potential application in the treatment of neurological disorders.

Materials and methods

Animals and in vitro cell culture procedure

Three-day-old pups of C57BL/6 mice (Harlan, IN, USA) were used in this study. All animal care and experimental protocols with post-natal pups were carried out in accordance with the Directive 86/609EEC of the Council of the European Union and the procedure established by the Departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca of the

Generalitat de Catalunya. Every effort was made to minimize animal suffering and reduce the number of animals used.

Mixed glial cell cultures were prepared from the cerebral cortices of 3-day-old C57BL/6 mice. Briefly, cerebral cortices were dissected and meninges removed. The tissue was incubated with trypsin solution (Trypsin 0.05% (w/v) trypsin-EDTA 5 mM) for 15 min at 37°C. After that, the tissue was fragmented with a fire-polished Pasteur pipette. The dissociated cells were plated into 60-mm diameter culture plates (300,000 cells/ml) and grown in Dulbecco's Modified Eagle's/F-12 medium, supplemented with 10% fetal bovine serum, 2% 4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid, N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid), 100 units/ml penicillin, and 100 μ g/ml streptomycin. Fresh medium was changed the next day and then every 3 days afterwards. All experiments were done 7–9 days after plating.

Cell treatment

Glial cultures were treated with pro-inflammatory cytokines (TNF α , 20 ng/ml; IL1 β , 20 ng/ml; IFN γ , 20 ng/ml) (PeproTech Inc., Rocky Hill, NJ, USA) or with the same volume of phosphate buffer saline (PBS) as the control. As indicated, cells were pre-treated with melatonin (1 mM; Sigma, St. Louis, MO, USA) 1 h prior to cytokine treatments or with melatonin alone as a control. In addition, cells were pre-treated with either SB203580 kinase inhibitor (Calbiochem, EMD Millipore USA) or melatonin, at concentrations ranging from 10 μ M to 1 mM, and in order to test the specificity of melatonin inhibitory effect on p38 pathway.

Cell viability

Cell viability assays were performed after 48 h of treatment and were determined using 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide [MTT; Sigma, St. Louis, MO, USA] assay, crystal violet, and Hoechst staining. MTT was added to the cells at a final concentration of 250 μ M and incubated for 4 h at 37°C allowing the formation of formazan crystals. Then, the media were removed and formazan crystals were dissolved with DMSO. Formazan production was measured by the absorbance at 540 nm using a spectrophotometer (Microplate Spectrophotometer Benchmark Plus Bio-Rad). For crystal violet staining, cells were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 20 min at room temperature (RT). After that, cells were washed twice with PBS, incubated 30 min at RT in a 0.25% crystal violet solution, washed twice again with PBS, and left to dry. Finally a 30% acetic acid solution was added to remove the dye incorporated in the cells and absorbance was read at 590 nm. For nuclei staining, cells were plated onto glass coverslips. After treatments, cells were fixed as described above, incubated for 10 min with Hoechst 33342 (1 μ g/ml, Sigma, St. Louis, MO, USA) and then washed again. Coverslips were mounted with Fluoromont-G (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA,

USA), and conserved at 4°C until observation in the fluorescent microscope (Olympus BX61). All viability results were expressed as percentages with respect to non-treated cells.

Immunofluorescence

Mixed glial cell cultures were plated onto glass coverslips. After treatments, cells were fixed as described above. After washing three times with PBS containing 0.02% Triton X-100 (PBST), nonspecific binding of antibodies was blocked by 5% Bovine Serum Albumin for 30 min at RT. Then cells were washed twice with PBST and incubated with rabbit anti-Iba1 antibody at 4°C overnight (ON) (1:1000, Wako Chemicals, Richmond, VA, USA) to detect microglial cells. After three washes with PBST, cells were incubated for 90 min at RT with goat anti-rabbit AlexaFluor 594 secondary antibody (1:500; Life Technologies). Cells were washed three times with PBST before incubation for 90 min at RT with monoclonal antibody against GFAP (1:500; Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) After that, cells were washed and incubated with goat anti-mouse AlexaFluor 488 secondary antibody (1:500; Life Technologies). Finally, cells were incubated with Hoechst for 10 min and washed twice with PBS. Stained cover-slips were mounted onto microscope slides with Fluoromont-G (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) and immunostaining was observed under the microscope (Olympus BX61).

NO measurement

NO released from glial cells was converted to nitrite in the culture medium, which can be determined using the Griess reaction. Culture medium was collected after 48 h of treatments and an equal volume of Griess reagent was added (sulfanilamide 1%, α -naphthylethylenediamine dihydrochloride 0.1%, and 2.5% phosphoric acid). Absorbance was read in a spectrophotometer at 540 nm and sodium nitrite was used as a standard. From the same dishes, protein concentrations were measured using bicinchoninic acid (Pierce Company, Rockford, IL, USA) in order to normalize the nitrite concentrations.

Western blot

After treating cells with cytokines and melatonin, cells were washed twice with ice-cold phosphate-buffered saline and harvested in lysis buffer containing 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 50 mM Tris, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, and pH 7.2 with protease inhibitors (Complete, Roche Diagnostics, Germany). Protein concentration was determined using bicinchoninic acid protein assay with the Pierce BCA Protein Assay Kit (Pierce Company, Rockford, IL, USA). Ten microgram of protein was denatured at 95°C for 5 min in sample buffer (0.5 M Tris-HCl, pH 6.8, 10% glycerol, 2% sodium dodecyl sulfate (SDS), 5% β -mercaptoethanol, and 0.05% bromophenol blue) and samples were subjected to

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (7.5% Acrylamide: N,N'-methylbisacrylamide, 37,5:1; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and subsequently transferred onto polyvinylidene fluoride membrane (Immun-Blot PVDF Membrane, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Membranes were incubated ON at 4°C with primary antibodies against phospho-JNK (Thr183/Tyr185), phospho-c-Jun (Ser73), phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr203), iNOS, phospho-Stat1 (Tyr701), phospho-Stat3 (Tyr705), IKB α , and β -actin (1:20000; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The blots were then washed thoroughly in TBS-T and incubated for 2 h with a horseradish peroxidase-conjugated anti-IgG antibody, followed by the enhanced chemiluminescence detection system (Molecular Image Quantity ChemiDoc XRS+ BioRad) according to the supplier's instructions. Chemiluminescence measurements and semi-quantitative values were obtained using the corresponding software Imagelab (Bio-Rad) and the results were expressed as a percentage with respect to control. The corresponding β -actin was taken for each sample to normalize for any differences in gel loading.

p38 activity assay

P38 activity assay was performed using the p38 MAP Kinase Assay Kit (Cell signaling) following the manufacturer's recommendations. Briefly, p38 was immunoprecipitated from 200 μ g protein. After that, the samples were washed and centrifuged twice with lysis buffer and kinase buffer discarding supernatants. ATP, protein fusion (ATF), and kinase buffer were added to each sample, which was then incubated at 37°C for 30 min. After that, samples were used to follow the western blot protocol described previously. The primary antibody was pATF2 in a 1:1000 dilution. Chemiluminescence measurements and semi-quantitative values were obtained using the corresponding software Imagelab (Bio-Rad) and the results were expressed as a percentage with respect to control.

RT-PCR

Total RNA was isolated from mixed glial cultures treated with cytokines and melatonin at 6 and 24 h. Briefly, cells were homogenized in the presence of Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) (Sigma-Aldrich, MO, USA). Chloroform was added and the RNA was precipitated from the aqueous phase with isopropanol at 4°C. RNA was reconstituted in RNase-free water. The RNA quality and concentration were evaluated by NanoDrop ND-1000 spectrophotometry (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA).

First-strand cDNA was reverse transcribed from 1 μ g of total RNA using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). The same amounts of cDNA were subsequently used for qRT-PCR and each sample was analyzed in triplicate. The Taqman Gene Expression Assay (Applied

Biosystems) was used for the *nos2* gene and data were obtained with the MiniOpticon Real-Time PCR system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) and normalized to GAPDH using the delta-delta Ct method.

Statistical analysis

Results were analyzed by one-way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparison tests. Differences with $p < 0.05$ were considered significant.

Results

Effect of cytokines on glial viability

Firstly, we evaluated the viability of cell culture under each different treatment by MTT, crystal violet, and Hoechst assays. The results obtained evidence that any treatment (cytokines alone, melatonin, and the combination of melatonin and cytokines) affected cell viability (Figure 1).

Likewise glial cell culture was characterized using specific antibodies (see material and methods) (Figure 2). As shown in the Figure 2, we used two specific antibodies, GAF (marker of astrocytes) and IBA-1 (marker of microglial cells). Following treatment with cytokines an activation of microglial cells was observed.

Cytokine treatment induces an increase in glial NO production

To investigate whether cytokine-treated glial cells increase NO production, we treated primary glial cells with different pro-inflammatory cytokines, such as TNF α , IL1 β , and IFN γ . Treatments were done individually, in combinations of two (TNF α -IFN γ , TNF α -IL1 β , and IL1 β -IFN γ), and with all three cytokines. To determine NO production, we measured nitrite released into the culture medium using the Griess reagent. Only the combinations TNF α -IFN γ , IL1 β -IFN γ , and TNF α -IL1 β -IFN γ showed a significant NO increment respect control (Figure 3A). The most significant increment was obtained when cells were treated with three cytokines together. Then, we tested NO synthesis at 24, 48, and 72 h in cells treated with TNF α , IL1 β , and IFN γ . Results showed a progressive increase of NO levels at 48 and 72 h after cytokine treatment (Figure 3B). Since the combination of the three pro-inflammatory cytokines was the treatment that resulted in the greatest induction of NO production, the following experiments were performed with this treatment.

Melatonin decrease NO production mediated by cytokines in glial cells

When glial cells were pre-treated with melatonin before cytokine treatment, the production of NO was significantly inhibited (Figure 4A). The observed inhibition is proportional to melatonin concentration and can be

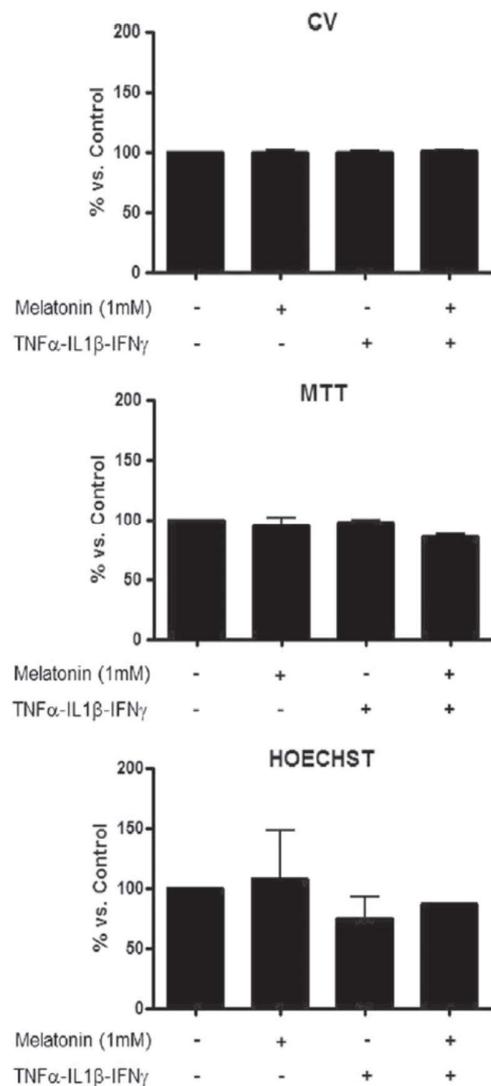


Figure 1. Treatment of glial cell cultures with three TNF α -IL1 β -IFN γ does not induces cell death. After 48 h of cytokine treatment different cell viability assays were performed (see material and methods). Each point is the mean \pm SEM of three or four independent experiments.

related to the effect of melatonin on p38 pathway, as can be seen when glial cells are pre-treated with the kinase inhibitor SB203580 (Figure 4B).

In addition, to support this diminution of NO, we also evaluated whether melatonin suppresses the induction of *nos2* transcription. Thus, from the different treatments of glial cells, the relative amounts of *nos2* mRNA were determined by real-time RT-PCR. As expected, cytokine treatment induced a marked increase in *nos2* mRNA levels in glial cells, which was reduced by pre-treatment with melatonin (Figure 4C). The inhibitory effects of melatonin on cytokine-induced *nos2* mRNA up-regulation were accompanied by a reduction in iNOS protein levels (Figure 4B). Taken together, our current data prove that

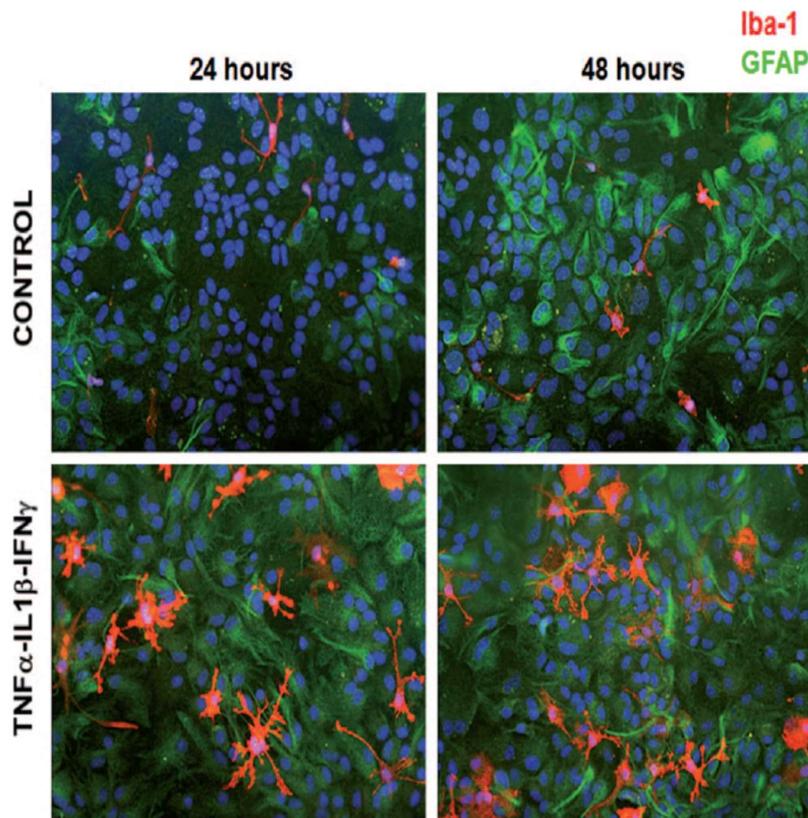


Figure 2. Typical image of glial cultures which have been characterized with two specific glial markers such as GFAP (astrocytes, green) and Iba 1 (microglia, red) at 24 and 48 h. Likewise, Hoechst (blue), it is also used to mark the cell nuclei. For further details see materials and methods.

melatonin inhibits the inflammatory activation of glial cells with respect to *nos2* induction and NO production.

Molecular pathways involved in NO generation by cytokines in glial cells

MAPKs are known to play an important role in the signaling pathways that induce pro-inflammatory cytokines and iNOS increase in glial cells [13,16–18]. Western blot analyses showed that the combination of the three cytokines, TNF α -IL1 β -IFN γ , induced the activation of different MAPK proteins. More specifically, a time-course analysis evidenced the activation of JNK and its substrate c-Jun at ser73, and p38, while no hyperphosphorylation of ERK1/2 was observed at any time under these experimental conditions (Figure 5). These activations occurred between 30 min and 1 h after treatment. Moreover, pro-inflammatory pathways, such as STAT-1 and STAT-3, were activated after 30 min of cytokine treatment, together with a decrease in IKB α levels, indicating the activation of NF κ B (Figure 5).

Melatonin inhibits p38 signaling pathway in glial cells

To investigate whether the inhibition of *nos2* induction and NO production by melatonin is regulated by one of

these pathways, we examined the effects of melatonin on cytokine-induced phosphorylation of JNK, c-Jun, STAT-1, STAT-3, IKB α , and p38 MAPK activity. Pre-treatment with 1-mM melatonin before incubation with cytokines only inhibited the activity of the MAPK p38. The phosphorylation of JNK, ERK, STAT1, STAT3, and IKB α levels was not affected (Figures 6 and 7). Strikingly, melatonin only inhibits the p38 MAPK activity in glial cell cultures.

Discussion

Neuroinflammation is involved in the pathology of neurodegenerative disease through the expression of cytotoxic mediators, especially pro-inflammatory cytokines and free radicals [4,12,14,17,31]. It is well known that inflammatory mediators are able to activate glial cells and trigger the expression of different genes, such as *nos2*.

Likewise, iNOS contributes to NO synthesis, increasing free radical formation and promoting brain damage [4,5,7–10]. High levels of NO exert their toxic effects through multiple mechanisms, including lipid peroxidation, mitochondrial damage, protein nitration and oxidation, depletion of antioxidant reserves, activation or inhibition of various signaling pathways, and DNA

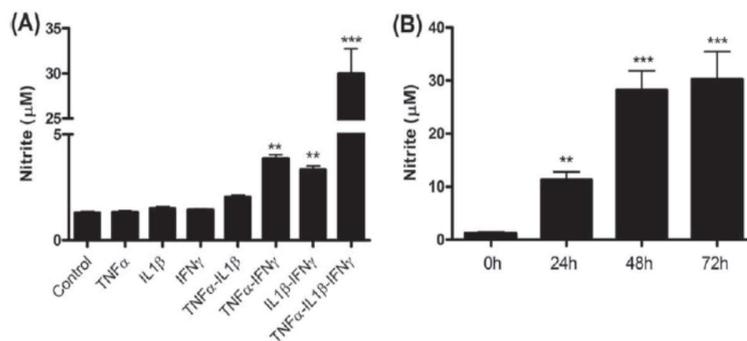


Figure 3. (A) Nitrite levels in medium of glial cells at 48 h of treatment with different cytokines and their combinations. (B) Nitrite levels at 24, 48, and 72 h after treatment with TNFα-IL1β-IFNγ. Each point is the mean ± SEM of three independent experiments. (**, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ with respect to control).

damage [1,6,7,12]. Thus, NO produced by iNOS seems to be a key mediator of such glial activation induced neuronal death [7]. In the present study we demonstrated that melatonin counteracted both the over-expression of *nos2* mRNA and the production of NO induced by pro-inflammatory cytokines. Likewise, nitrite release after glial activation by pro-inflammatory cytokines may be a potential pathological event responsible for neuronal degeneration in neighboring neurons [6,12,14,29]. Inter-

estingly, we demonstrated this immunomodulatory effect of melatonin in primary glial culture. Melatonin inhibits *nos2* expression and, consequently, the increase in iNOS protein levels and NO production. Moreover, previous studies have described that up-regulation of iNOS is involved in neuronal degeneration associated with PD and AD [12,14,25,31]. Therefore, this immunomodulatory effect of melatonin on glial cell activation might partly explain its central role in brain neuroprotective action. The

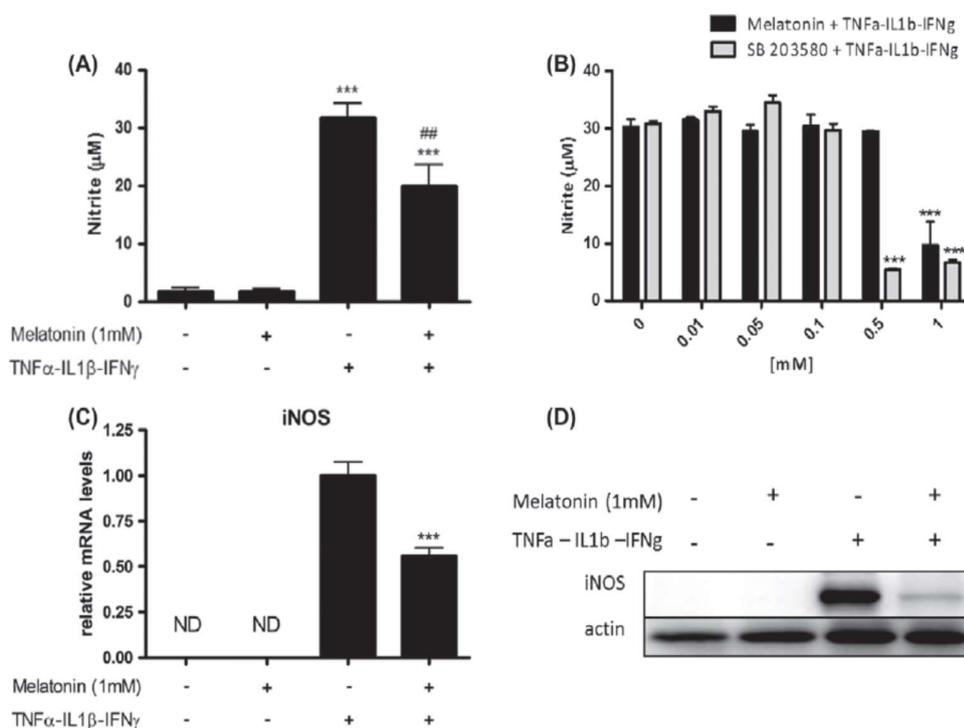


Figure 4. (A) Nitrite levels at 48 h in medium of non-treated cells, melatonin (1 mM)-treated cells, cytokine-treated cells and melatonin pre-treated cells before cytokine treatment. (B) Nitrite levels at 48 h in medium of cytokine-treated cells, pre-treated with concentrations ranging from 10 µM to 1 mM of either melatonin or the specific kinase inhibitor SB203580. Both SB203580 and melatonin reduced significantly nitrite levels at 0.5 mM and 1 mM, respectively. (C) *nos2* mRNA levels at 6 h of different treatments. (D) Western blot against iNOS at 24 h of different treatments. Each point is the mean ± SEM of three independent experiments. (***, $p < 0.001$ with respect to vehicle control and #, $p < 0.01$ for melatonin pre-treated cells with respect to cytokine alone treated cells).

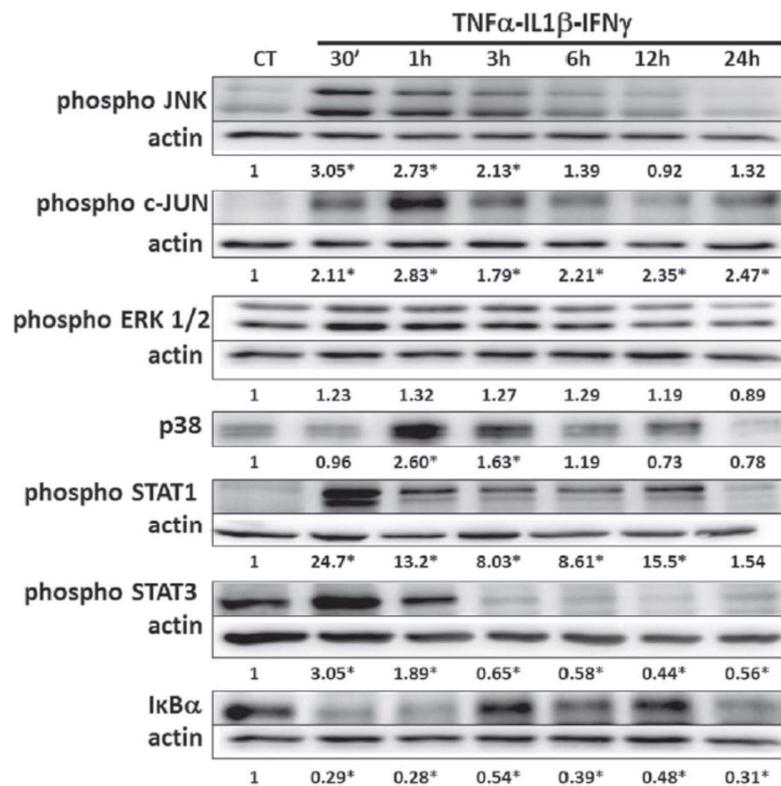


Figure 5. Western blots against phospho JNK, phospho c-Jun, phospho ERK1/2, phospho STAT1, phospho STAT3, IκBα, and p38 activity at different time points after cytokine treatment. All western blots were normalized with actin. For each point, the mean value of three independent experiments is presented. (*, $p < 0.05$ with respect to vehicle control).

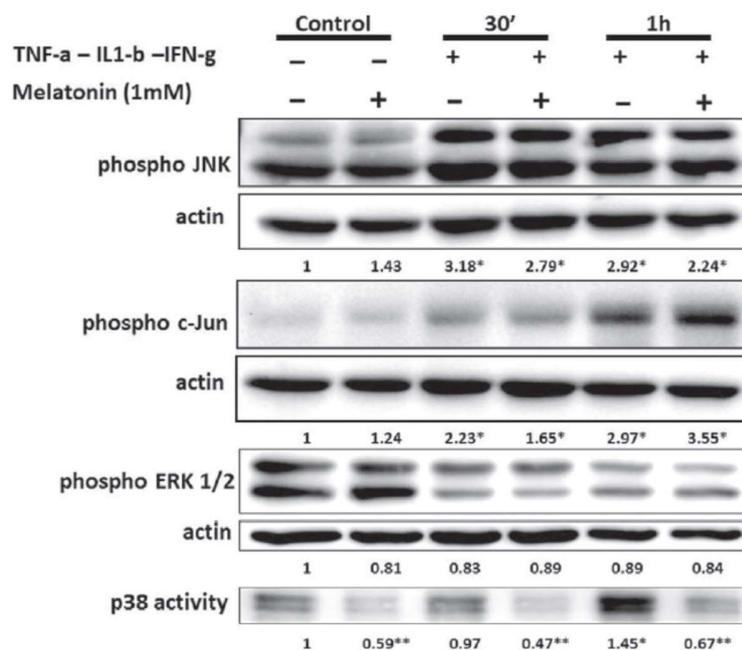


Figure 6. Western blots against phospho JNK, phospho c-Jun, phospho ERK1/2, p38 activity at 30 min and 1 h after cytokine treatment with or without melatonin pre-treatment. All western blots were normalized with actin. For each point, the mean value of three independent experiments is presented. (*, $p < 0.05$ with respect to vehicle control and #, $p < 0.05$ with respect to melatonin pre-treated cells).

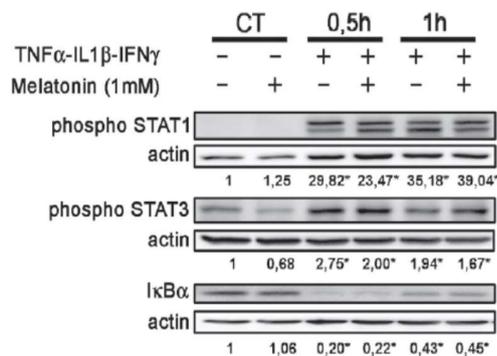


Figure 7. Western blots against phospho STAT1, phospho STAT3, and I κ B α , at 30 min and 1 h after cytokine treatment with or without melatonin pre-treatment. For each point, the mean value of three independent experiments is presented. (*, $p < 0.05$ with respect to vehicle control).

study of melatonin effects on glial cells is particularly important, considering the coexistence of neurons and glia in the brain. The interactions of different cell types under damaging conditions have an important role since they can favor the process of cell death or neuroprotection.

Likewise, neurotoxic molecules, such as MPTP and β -amyloid, may induce iNOS in glial cells [6,7,24]. Indeed, in amyotrophic lateral sclerosis (ALS), iNOS immunoreactivity is showed in activated astrocytes [19]. All these experiments give support to the involvement of iNOS in neurological disorders.

Several reports have previously described that melatonin down-regulated iNOS induction in various models such as in the C6 astrocytoma cell line after treatment with the parkinsonian neurotoxin MPTP, in renal tissues, and in the liver of SAMP8 [32,33]. In addition, melatonin has been used as a model to design and synthesize new families of compounds that act as NOS inhibitors and as potential neuroprotective drugs [34]. However, the mechanism involved in melatonin-induced iNOS inhibition in glial cells mediated by pro-inflammatory cytokines is not clearly understood [27,28,35,36].

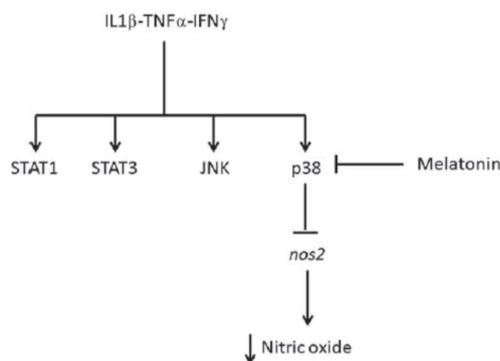


Figure 8. Pro-inflammatory cytokines activate different pathways in glial cells. Cytokines induce an increase of NO through an induction of *nos2* expression. Melatonin inhibits NO production, since it partially inhibits the expression of *nos2*, through the inhibition of p38 MAPK.

For this reason, in the present study we also investigated the signaling pathways involved in pro-inflammatory cytokines. As shown in Figure 3, cytokines trigger the activation of several pathways, such as the JNK and p38 kinase, which are known to be intimately involved in the inflammatory process and apoptosis. In addition, we found a significant increase in STAT1 and STAT3 phosphorylation. Moreover, the levels of I κ B α decreased, indicating the activation of NF κ B. In the present study, we demonstrated that melatonin was only able to inhibit p38 MAPK specifically, without affecting the other pathways, as can be shown by the exposure of cells to a p38 specific inhibitor SB203580. The p38 MAPK family consists of highly conserved proline-directed serine/threonine protein kinases that are activated in response to inflammatory signals [13]. These protein kinases differ in their tissue distribution, regulation of kinase activation, and subsequent phosphorylation of downstream substrates [17,18]. Interestingly, in recent studies on C6 astrocytoma cells, it has been demonstrated that MPTP regulated iNOS activity through p38 activation and was also inhibited by melatonin [33].

Previous studies have shown that MAPKs are involved in cytokine-mediated iNOS induction in astrocytes, oligodendrocytes, and microglial cells. Moreover, the p38 MAPK was found to play an important role in *nos2* gene expression in response to cytokine and some stimuli, such as taxol [27,28]. Likewise, both the p38 MAPK and JNK pathways could function in parallel in the process of glial activation. Thus, in the present study, our data indicate that, in mixed glial cells, multiple mechanisms may contribute to the *nos2* expression, including the activation of MAPK, NF κ B, and JAK-STAT pathways; however, melatonin specifically inhibits only p38.

In addition to glial activation, p38 MAPK is also recognized as a kinase responsible for excessive tau phosphorylation in AD [37]. Likewise the p38 MAPK cascade is involved in the regulation of the memory process mainly, through induction of mGluR-dependent LTD in the hippocampus [38]. Accordingly, all these studies suggest that activation of p38 MAPK accompanies memory deficit in AD. Moreover, in a model of transient focal cerebral ischemia, antisense knockdown of *NOS2* mRNA significantly reduced ischemic brain lesion [39]. On the other hand, in experimental models of PD and inflammation, iNOS inhibition ameliorates all the symptomatology of this neurodegenerative process [34,40,41].

Emphasize that melatonin concentrations used in our study and therefore the immunomodulatory effects are in line with the anti-inflammatory effects of melatonin in other cell lines specifically macrophages and BV2 murine microglial cell line [42,43].

In summary, the present study demonstrates that pro-inflammatory cytokines activate glial cells increasing NO production through a sustained activation of MAPK and STAT pathways. However melatonin significantly only prevents p38 MAPK activation following cytokine treatment, enough to reduce the *nos2* expression and subsequent nitrite release (Figure 8). Our data suggest that,

in addition to the well-known free radical scavenger properties of melatonin, neuroprotective effects may be also mediated by the inhibition of nitrite release by glial cells through the inhibition of *nos2* expression. For that reason, we propose that this hormone may be a promising therapeutic strategy in neuroinflammatory-associated disorders.

Acknowledgments

We thank the Language Advisory Service of the University of Barcelona for revising this manuscript.

Declaration of interest

The authors report no declarations of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

This study was funded by grant 2009/SGR00853 from the Generalitat de Catalunya (autonomous government of Catalonia), by grants BFU2010-19119/BFI, SAF2011-23631 and SAF2012-39852-C02-01 from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación.

References

- [1] Khandelwal PJ, Herman AM, Moussa CE. Inflammation in the early stages of neurodegenerative pathology. *J Neuroimmunol* 2011;238:1–11.
- [2] Smith JA, Das A, Ray SK, Banik NL. Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases. *Brain Res Bull* 2012;87:10–20.
- [3] Di Stefano A, Iannitelli A, Laserra S, Sozio P. Drug delivery strategies for Alzheimer's disease treatment. *Expert Opin Drug Deliv* 2011;8:581–603.
- [4] Rubio-Perez JM, Morillas-Ruiz JM. A review: Inflammatory process in Alzheimer's disease, role of cytokines. *Scientific WorldJournal* 2012;75:63–57.
- [5] Suzumura A, Takeuchi H, Zhang G, Kuno R, Mizuno T. Roles of glia-derived cytokines on neuronal degeneration and regeneration. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1088:219–229.
- [6] Brown GC. Mechanisms of inflammatory neurodegeneration: Inos and naph oxidase. *Biochem Soc Trans* 2007;35:1119–1121.
- [7] Brown GC. Nitric oxide and neuronal death. *Nitric Oxide* 2010;23:153–165.
- [8] Chen M, Sun HY, Li SJ, Das M, Kong JM, Gao TM. Nitric oxide as an upstream signal of p38 mediates hypoxia/reoxygenation-induced neuronal death. *Neurosignals* 2009;17:162–168.
- [9] Saha RN, Pahan K. Signals for the induction of nitric oxide synthase in astrocytes. *Neurochem Int* 2006;49:154–163.
- [10] Saha RN, Pahan K. Regulation of inducible nitric oxide synthase gene in glial cells. *Antioxid Redox Signal* 2006;8:929–947.
- [11] Bhat NR, Zhang P, Lee JC, Hogan EL. Extracellular signal-regulated kinase and p38 subgroups of mitogen-activated protein kinases regulate inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor-alpha gene expression in endotoxin-stimulated primary glial cultures. *J Neurosci* 1998;18:1633–1641.
- [12] Brown GC, Neher JJ. Inflammatory neurodegeneration and mechanisms of microglial killing of neurons. *Mol Neurobiol* 2010;41:242–247.
- [13] Kaminska B, Gozdz A, Zawadzka M, Ellert-Miklaszewska A, Lipko M. Mapk signal transduction underlying brain inflammation and gliosis as therapeutic target. *Anat Rec (Hoboken)* 2009;292:1902–1913.
- [14] Sastre M, Klockgether T, Heneka MT. Contribution of inflammatory processes to Alzheimer's disease: molecular mechanisms. *Int J Dev Neurosci* 2006;24:167–176.
- [15] Sheng W, Zong Y, Mohammad A, Ajit D, Cui J, Han D, et al. Pro-inflammatory cytokines and lipopolysaccharide induce changes in cell morphology, and upregulation of erk1/2, inos and *spla(2)-iia* expression in astrocytes and microglia. *J Neuroinflammation* 2011;8:121.
- [16] Bachstetter AD, Van Eldik LJ. The p38 map kinase family as regulators of proinflammatory cytokine production in degenerative diseases of the CNS. *Aging Dis* 2010;1:199–211.
- [17] Ji RR, Suter MR. P38 mapk, microglial signaling, and neuropathic pain. *Mol Pain* 2007;3:33.
- [18] Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mapk signal transduction pathways activated by stress and inflammation: A 10-year update. *Physiol Rev* 2012;92:689–737.
- [19] Barbeito LH, Pehar M, Cassina P, Vargas MR, Peluffo H, Viera L, et al. A role for astrocytes in motor neuron loss in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res Brain Res Rev* 2004;47:263–274.
- [20] Bondy SC, Li H, Zhou J, Wu M, Bailey JA, Lahiri DK. Melatonin alters age-related changes in transcription factors and kinase activation. *Neurochem Res* 2010;35:2035–2042.
- [21] Borah A, Mohanakumar KP. Melatonin inhibits 6-hydroxydopamine production in the brain to protect against experimental parkinsonism in rodents. *J Pineal Res* 2009;47:293–300.
- [22] Carpentieri A, Diaz de Barboza G, Areco V, Peralta Lopez M, Tolosa de Talamoni N. New perspectives in melatonin uses. *Pharmacol Res* 2012;65:437–444.
- [23] Chung SY, Han SH. Melatonin attenuates kainic acid-induced hippocampal neurodegeneration and oxidative stress through microglial inhibition. *J Pineal Res* 2003;34:95–102.
- [24] Feng Z, Zhang JT. Protective effect of melatonin on beta-amyloid-induced apoptosis in rat astrogloma c6 cells and its mechanism. *Free Radic Biol Med* 2004;37:1790–1801.
- [25] Ionov M, Burchell V, Klajnert B, Bryszewska M, Abramov AY. Mechanism of neuroprotection of melatonin against beta-amyloid neurotoxicity. *Neuroscience* 2011;180:229–237.
- [26] Jeong JK, Moon MH, Lee YJ, Seol JW, Park SY. Melatonin-induced autophagy protects against human prion protein-mediated neurotoxicity. *J Pineal Res* 2012;53:138–146.
- [27] Bhat NR, Feinstein DL, Shen Q, Bhat AN. P38 mapk-mediated transcriptional activation of inducible nitric-oxide synthase in glial cells. Roles of nuclear factors, nuclear factor kappa b, camp response element-binding protein, ccaat/enhancer-binding protein-beta, and activating transcription factor-2. *J Biol Chem* 2002;277:29584–29592.
- [28] Bhat NR, Zhang P, Bhat AN. Cytokine induction of inducible nitric oxide synthase in an oligodendrocyte cell line: Role of p38 mitogen-activated protein kinase activation. *J Neurochem* 1999;72:472–478.
- [29] Verkhratsky A. Physiology of neuronal-glia networking. *Neurochem Int* 2010;57:332–343.
- [30] Verkhratsky A, Kirchhoff F. Glutamate-mediated neuronal-glia transmission. *J Anat* 2007;210:651–660.
- [31] Graeber MB, Li W, Rodriguez ML. Role of microglia in CNS inflammation. *FEBS Lett* 2011;585:3798–3805.
- [32] Lee IC, Kim SH, Lee SM, Baek HS, Moon C, Park SC, et al. Melatonin attenuates gentamicin-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rats. *Arch Toxicol* 2012;86:1527–1536.

- [33] Niranjana R, Nath C, Shukla R. The mechanism of action of MPTP-induced neuroinflammation and its modulation by melatonin in rat astrocytoma cells, c6. *Free Radic Res* 2010; 44:1304–1316.
- [34] Camacho ME, Carrion MD, Lopez-Cara LC, Entrena A, Gallo MA, Espinosa A, et al. Melatonin synthetic analogs as nitric oxide synthase inhibitors. *Mini Rev Med Chem* 2012;12:600–617.
- [35] Bettahi I, Pozo D, Osuna C, Reiter RJ, Acuna-Castroviejo D, Guerrero JM. Melatonin reduces nitric oxide synthase activity in rat hypothalamus. *J Pineal Res* 1996;20:205–210.
- [36] Tocharus J, Chongthammakun S, Govitrapong P. Melatonin inhibits amphetamine-induced nitric oxide synthase mRNA overexpression in microglial cell lines. *Neurosci Lett* 2008; 439:134–137.
- [37] Chang KH, de Pablo Y, Lee HP, Lee HG, Smith MA, Shah K. Cdk5 is a major regulator of p38 cascade: relevance to neurotoxicity in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 2010; 113:1221–1229.
- [38] Ashabi G, Ramin M, Azizi P, Taslimi Z, Alamdary SZ, Haghparast A, et al. Erk and p38 inhibitors attenuate memory deficits and increase creb phosphorylation and pgc-1alpha levels in abeta-injected rats. *Behav Brain Res* 2012;232: 165–173.
- [39] Parmentier-Batteur S, Bohme GA, Lerouet D, Zhou-Ding L, Beray V, Margail I, Plotkine M. Antisense oligodeoxynucleotide to inducible nitric oxide synthase protects against transient focal cerebral ischemia-induced brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001;21:15–21.
- [40] Tapias V, Escames G, Lopez LC, Lopez A, Camacho E, Carrion MD, et al. Melatonin and its brain metabolite n(1)-acetyl-5-methoxykynuramine prevent mitochondrial nitric oxide synthase induction in parkinsonian mice. *J Neurosci Res* 2009;87:3002–3010.
- [41] Niranjana R, Nath C, Shukla R. Melatonin attenuated mediators of neuroinflammation and alpha-7 nicotinic acetylcholine receptor mRNA expression in lipopolysaccharide (LPS) stimulated rat astrocytoma cells, C6. *Free Radic Res* 2012; 46:1167–1177.
- [42] Xia MZ, Liang YL, Wang H, Chen X, Huang YY, Zhang ZH, et al. Melatonin modulates TLR4-mediated inflammatory genes through MyD88- and TRIF-dependent signaling pathways in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells. *J Pineal Res* 2012;53:325–334.
- [43] Min KJ, Jang JH, Kwon TK. Inhibitory effects of melatonin on the lipopolysaccharide-induced CC chemokine expression in BV2 murine microglial cells are mediated by suppression of Akt-induced NF-κB and STAT/GAS activity. *J Pineal Res* 2012;52:296–304.

[Frontiers in Bioscience, Landmark, 21, 8-19, January 1, 2016]

Molecular links between early energy metabolism alterations and Alzheimer's disease

Ignacio Pedros^{1,2}, Ivan Patraca¹, Nohora Martinez¹, Dmitry Petrov³, Francesc X. Sureda²,
Carne Auladell⁴, Carlos Beas-Zarate⁵, Jaume Folch¹

¹Unitats de Bioquímica i, ²Farmacologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Centro de Investigacion Biomedica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Universitat Rovira i Virgili, C./St. Llorenç 21 43201 Reus (Tarragona), Spain, ³Unitat de Farmacologia i Farmacognosia Facultat de Farmacia, Institut de Biomedicina (IBUB), Centros de Investigacion Biomedica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain, ⁴Departament de Biologia Celular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain, ⁵Departamento de Biologia Celular y Molecular, C.U.C.B.A., Universidad de Guadalajara and Division de Neurociencias, Centro de Investigacion Biomedica de Occidente (CIBO), Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Sierra Mojada 800, Col. Independencia, Guadalajara, Jalisco 44340, Mexico

TABLE OF CONTENTS

1. Abstract
2. Introduction
3. Metabolic syndrome, adipokines and AD
 - 3.1. Energy metabolism and AD
 - 3.2. Cholesterol, fatty acids and AD
 - 3.3. Alzheimer's disease or "brain diabetes"
 - 3.4. The "missing link" between T2DM and AD
4. Concluding remarks
5. Acknowledgments
6. References

1. ABSTRACT

Recent studies suggest that the neurobiology of Alzheimer's disease (AD) pathology could not be explained solely by an increase in β -amyloid levels. In fact, success with potential therapeutic drugs that inhibit the generation of beta amyloid has been low. Therefore, due to therapeutic failure in recent years, the scientists are looking for alternative hypotheses to explain the causes of the disease and the cognitive loss. Accordingly, alternative hypothesis propose a link between AD and peripheral metabolic alteration. Then, we review in depth changes related to insulin signalling and energy metabolism in the context of the APPSwe/PS1dE9 (APP/PS1) mice model of AD. We show an integrated view of the changes that occur in the early stages of the amyloidogenic process in the APP/PS1 double transgenic mice model. These early changes affect several key metabolic processes related to glucose uptake and insulin signalling, cellular energy homeostasis, mitochondrial biogenesis and increased Tau phosphorylation by kinase molecules like mTOR and Cdk5.

2. INTRODUCTION

Alzheimer's disease, in the more common sporadic form (SAD), is one of the most common causes of senile dementia and the numbers of new cases of the disease are increasing exponentially. The AD

progression is associated with the formation of senile β -amyloid ($A\beta$) plaques and cognitive decline. In the early 1980s, the biochemical characterization of senile plaques, in patients with Down's syndrome and AD, led to the identification of $A\beta$ peptide as a major component. The $A\beta$ is a product of the $A\beta$ protein precursor (APP), and the relationship between APP and $A\beta$ caused the formulation of the amyloid cascade hypothesis. Then, mutations in APP (or other genes) lead to an increase in $A\beta$ and to disease (1,2).

The majority of AD research is carried out using animal models that have increased $A\beta$ levels compared to controls, and while $A\beta$ pathology is mimicked in these models, many other factors associated with AD pathology are not. The APP/PS1 double transgenic mouse is a genetically modified mouse model that has been generated to try to mimic human AD pathology. In the APP/PS1 line, two strategies are combined to reach elevated $A\beta$ levels: overexpression of the mutant human amyloid precursor protein encoding gene, together with the mutant presenilin-1 gene, which additionally impairs amyloid protein processing leading to elevated $A\beta_{42}$ levels (3-5).

Despite the existence of several mice models for AD, the early onset of pathological changes as the

Energy metabolism in the APP/PS1 mice model

cerebral amyloidosis present at 6–8 weeks old mice, allow to consider APP/PS1 mice a good model to study the familial form of AD. A detailed review concerning differential characteristics of the AD mice strains can be found in Bilkei-Gorzo (5). Among them, Tg2576, APP23, APP/PS1 and the triple transgenic 3xtg AD mice strains express the so called Swedish mutation. It consists in a 695-amino acid isoform of human Alzheimer A β precursor protein containing the substitution of Lys670 by Asn and Met671 by Leu. Whereas APP/PS1 mice is a good model to study the early onset of pathological changes, the Tg2576, APP23, and 3xtg strains express a late onset form of the disease. Loss of both noradrenergic and cholinergic neurons is unique to double transgenic APP/PS1 and 3xtg mice. By contrast, none of these models show massive neuronal loss in cortex and hippocampus. The APP/PS1 strain show amyloid plaques formation along with Tau protein hyperphosphorylation (3). Only in 3xtg mice strain neurofibrillary tangles can be observed (6).

It has been demonstrated that APP/PS1 mice show increased insoluble β -amyloid production accompanied by brain plaque pathology and early memory loss, becoming evident at the age of 6 months (7-9). Recent data demonstrated that cognitive decline occur early before amyloid plaque deposition in APP/PS1 mice and, then, in this experimental model soluble β -amyloid peptide should be involved in early cognitive impairment. Acutely administered soluble A β oligomers have recently been reported to induce impairments in memory function (10,11) possibly by disturbing acetylcholinesterase (ACh) or NMDA receptors signalling systems (12,13). In fact, several studies have demonstrated impaired function of ACh and NMDA receptors signalling systems in multiple transgenic mouse models of Alzheimer's disease like APP/PS1 (11,12). Since PS1/APP mice aggressively generate A β (14), excessive concentrations of soluble A β oligomers may lead to the observed memory deficits by functionally disrupting the ACh and NMDA receptors signalling pathways. Thus APP/PS1 mice are commonly used in AD research for behavioural tests and studying the molecular mechanisms in plaque formation and thus AD progression (8,9,15).

3. METABOLIC SYNDROME, ADIPOKINES AND AD

Despite the genetic and cell biological evidence that supports the amyloid hypothesis, it is becoming clear that AD aetiology is complex and that A β alone is unable to account for all aspects of AD (16,17). For many years, it has been suspected that AD is a generalized metabolic disorder, but little evidence has emerged to confirm this suspicion. Published data have suggested metabolic syndrome as an independent risk factor for AD. Decades of fruitless search for effective therapies have led to the suggestion that the treatment usually starts too late in the

course of the disease to be able to modify it, and can only be detected when pathology is already advanced (18).

There is evidence of a relationship between adipokines and AD. The adipokines, are cytokines secreted by adipose tissue. Among them, leptin, adiponectin, tumour necrosis factor (TNF)-alpha, interleukins (IL-6), and also molecules like Pituitary-derived prolactin (PRL), a well-known regulator of the lactating mammary gland, recently shown to be produced by human adipose tissue (19). Adipokines have come to be recognized for their contribution to the mechanisms by which obesity and related metabolic disorders influence diseases like cancer or AD. It has been observed that AD patients display increased circulating levels of anorexigenic adipokines, related to gender, that may contribute to the metabolic changes observed in AD patients (20).

Among the adipokine genes associated to AD, we can find the obese gene (ob) which is responsible of the synthesis of the adipostatic hormone leptin (Lep). Leptin is a hormone secreted by adipose tissue that acts to suppress appetite and regulate energy expenditure. In humans, recent studies have suggested an association between higher Lep levels and a reduced incidence of dementia and AD (21). In rodents, Lep modulates the production and clearance of A β (22). Mice with Lep receptor disruption show impaired long-term potentiation, synaptic plasticity and spatial learning, whereas treatment with Lep increases A β and tau clearance as well as amelioration of AD-like pathology (23-25). More recently it has been demonstrated that leptin resistance in the hippocampus may play a role in the characteristic changes associated with AD (26). In this study, whereas leptin mRNA was decreased in hippocampus, increased leptin was found and, then, suggesting a discontinuity in the leptin signalling pathway. The lack of leptin signalling within degenerating neurons may represent a novel neuronal leptin resistance in Alzheimer disease.

Similar to the ligand, the prolactin receptor (PRLR) has also been shown to be a member of the larger class of receptors, known as the class 1 cytokine receptor superfamily. Prolactin is secreted by the pituitary, decidua, and lymphoid cells, has been shown to have a regulatory role in reproduction, immune function, and cell growth in mammals. Elevated levels PRL, oxytocin, progesterone and glucocorticoids are characteristics of lactation and the pronounced fluctuation of these hormones occurring in this phase may play a role protecting the hippocampus. Indeed, it has been shown that PRL administration to ovariectomized rats significantly diminishes the deleterious effects of kainic acid (KA) in the dorsal hippocampus and reduces the progression of KA-induced seizures (27). Thus,

Energy metabolism in the APP/PS1 mice model

lactation is a natural model for neuroprotection because it effectively prevents acute and chronic cell damage of the hippocampus induced by excitotoxicity. Furthermore, it has been shown that PRLR affects energy balance and metabolic adaptation in rodents *via* effects on brown adipose tissue differentiation and function (28). In fact, recent findings show that circulating prolactin improves glucose homeostasis by increasing insulin action and secretion (29). It has been demonstrated that PRL loss resulted in learning and memory deficits in the PRL null mice, as indicated by significant deficits in the standard behavioural tests requiring input from the hippocampus (30).

Despite molecules like PRL have not been clearly associated to AD, it seems clear the presence of PRLR in several brain areas like cortex, hypothalamus and hippocampus, and identified in both astrocytes and glial cells (31). Then, changes downstream prolactin receptor involve key molecules related to fatty acid oxidation, mitochondrial biogenesis, inflammation and memory processes. Among them, we can point out the PPAR γ coactivator-1 α (PGC-1 α) a molecular link between metabolic syndrome, A β generation and AD.

3.1. Energy metabolism and AD

Besides the role of adipokines *per se*, it has also been shown that alterations in energy metabolism also promote the development of AD. Mitochondrial structural and functional perturbations in AD have been recognized for some time, and led Swerdlow and Khan to propose the mitochondrial cascade hypothesis (32). This hypothesis proposes that inherited mutations in mtDNA determine the basal functional ability of mitochondria and their ability to respond to and recover from stress signalling. The histopathology of AD develops when the mitochondria lose their functions below a certain point, and includes neuronal apoptosis, β -amyloid deposition, and neurofibrillary tangles (33).

Mitochondrial biogenesis is the process by which cells generate new mitochondria and, if necessary, increase mitochondrial mass. PGC-1 α is a member of a family of transcription co-activators that plays a central role in the regulation of cellular energy metabolism and stimulates mitochondrial biogenesis (34). PGC-1 α participates in the regulation of both carbohydrate and lipid metabolism (35). Although the role of PGC-1 α in peripheral disorders such as obesity and diabetes is well known, the role in neurons is currently a great interest because is a key regulator of energy metabolism (34). In addition, PGC-1 α is also involved in the regulation of genes that protects neuronal cells from oxidative stress such as mitochondrial superoxide dismutase. Finally, PGC-1 α coordinates mitochondrial biogenesis in at least some tissues such as muscle, heart, liver, and pancreas *via* co-activation of various transcription factors (33,34).

It has been recently shown that PGC-1 α mRNA and protein levels are reduced in AD subject brains (36,37). As Selfridge and colleagues suggested (33), even if PGC-1 α changes represent a consequence as opposed to cause of AD pathology, PGC-1 α remains an attractive target for therapeutic intervention. Whether mitochondrial mass changes in AD, it is reasonable to postulate that increasing mitochondrial mass may alleviate bioenergetics-related stress in the AD brain.

PGC-1 α is regulated by several metabolism-responsive elements like AMPK, which is activated by elevated AMP/ATP ratios. AMPK is a cellular energy sensor conserved in all eukaryotic cells. AMPK regulates the activities of a number of key metabolic enzymes through phosphorylation (38). It protects cells from stresses that cause ATP depletion by switching off ATP-consuming biosynthetic pathways. AMPK can phosphorylate and directly activate PGC-1 α (39).

Furthermore, previous data suggest that AMPK, besides the important cellular functions such as cellular energy sensor, can also phosphorylate substrates like Tau protein and, thus, could favour its aggregation. Its phosphorylation makes it soluble and causes microtubule disassembly. In extreme situations as in AD, hyperphosphorylation of Tau leads to the formation of neurofibrillary tangles. It is well established that neurons are elongated cells. To maintain neuronal function they need efficient delivery of cellular organelles (such as mitochondria, endoplasmic reticulum, lysosomes, proteins, and lipids) from soma to axons, dendrites and synapses. Hoover *et al.* (40) investigated the localization of abnormal Tau in dendritic spines using rTgP301L tau mice. They found that early Tau-related deficits develop not from the loss of synapses or neurons, but rather as a result of synaptic abnormalities caused by the accumulation of hyperphosphorylated Tau within intact dendritic spines.

PPARs are ligand-activated transcription factors of the nuclear receptors superfamily. The levels of PPARs have been reported to decline with age (41). PPAR γ is highly expressed in adipose tissue and is a major regulator of insulin and glucose metabolism. PGC-1 α is a PPAR transcriptional co-activator, and elevated levels of PGC1 α change the composition of peroxisomes, so that they might exhibit decreased insulin degradation and purine metabolism. Then, it can be suggested that the link between energy metabolism and the amyloid cascade hypothesis can rely in the fact that PPAR γ regulates the transcription of β -secretase (BACE1), a key enzyme involved in A β generation. In turn PGC-1 α controls major metabolic functions through the co-activation of PPAR γ and other transcription factors (42). In conclusion, since PGC-1 α appears to decrease A β generation, therapeutic modulation of PGC-1 α could have real potential as a treatment for AD.

Energy metabolism in the APP/PS1 mice model

3.2. Cholesterol, fatty acids and AD

Several strategies have proved to be effective in slowing down the pathological process or in improving the health status of the APP/PS1 mice (5) and, among them, can be pointed out the caloric restriction (43). From the 1930s it has been reported that caloric restriction (CR) mitigates neurological damage and, furthermore, rats submitted to CR live almost twice as long as non-restricted rats. Since that time, findings from a diverse range of species support the view that CR exerts beneficial effects on health and longevity, and is also able to reduce amyloid accumulation in middle-aged APP/PS1 mice. Then, excessive consumption of calories, particularly fat, opposes healthy brain aging through mechanisms that remain to be elucidated (43).

Hyperlipidemia, hypercholesterolemia, and obesity are all associated with increased accumulation of amyloid in AD and mouse models that form AD-type amyloid plaques. The brain is rich in cholesterol and substantial *in vitro* and animal evidence indicates that cholesterol levels in the brain affect the synthesis, clearance, and toxicity of A β (44). Then, elevated cerebral A β levels can be associated with cholesterol fractions in a pattern analogous to that found in coronary artery disease. In fact, a large amount of evidence suggests a pathogenic link between cholesterol homeostasis dysregulation and AD, where altered cholesterol metabolism and hypercholesterolemia appear to play fundamental roles in amyloid plaque formation and tau hyperphosphorylation (45). Experiments carried out with the use of low density lipoprotein receptor (LDLR)-deficient mice link hypercholesterolemia with cognitive dysfunction, potentially mediated by increased neuroinflammation and APP processing (46). Furthermore, it has been demonstrated, using an A β 25-35-injected AD-like pathological mouse model, that hypercholesterolemia accelerated A β accumulation and tau pathology, which was accompanied by microglial activation and subsequent aggravation of memory impairment (47).

By contrast, it is unknown if a specific fatty-acid composition influences the development of AD, and published results are controversial. For instance, an study based on the Uppsala Longitudinal Study of Adult Men (ULSAM) cohort show that serum levels of saturated FAs were inversely associated with risk of AD, in sharp contrast to experimental studies (48). By contrast, research carried out in the APP/PS1 mice model show that AD increases susceptibility to body weight gain induced by short-term high-fat diet (HFD) feeding, and to the associated glucose intolerance and insulin resistance (49).

Nevertheless, protective effects of omega-3 fatty acids have been hypothesized (50-52). This can be supported on epidemiologic results and on the evidence

that decreased levels of omega-3 fatty acids have been observed in brain tissue of people with AD, specifically in areas that mediate learning and memory. Thus, these observations reinforce an innovative approach that focuses on the protective action exerted by molecules naturally occurring in food and, at higher content, in dietary supplements (52,53).

Then, recognition of the correlation between AD and dyslipidemia could be an important step forward for our understanding of AD pathogenesis and, possibly, for the development of new therapeutic strategies. However, the underlying mechanisms remain unknown.

3.3. Alzheimer's disease or "brain diabetes"

It has been described that obesity and diabetes significantly increase cognitive decline and AD risk, supporting the notion that molecular mechanisms of cellular energy homeostasis are linked to AD pathogenesis. Furthermore, biological plausibility for this relationship has been framed within the *metabolic cognitive syndrome* concept. Thus, several early biomarkers have been proposed and many of them rely on the definition of AD as a "Cognitive Metabolic Syndrome" or "Diabetes 3" (54). Then, AD would be a degenerative metabolic disease in which brain glucose uptake and utilization are impaired. Furthermore, a growing body of epidemiological evidence suggested that metabolic syndrome and its components (impaired glucose tolerance, abdominal or central obesity, hypertension, hypertriglyceridemia, and reduced high-density lipoprotein cholesterol) may be important in the development of age-related cognitive decline, mild cognitive impairment, vascular dementia, and AD (55). In fact, results from hippocampal gene expression studies in normal mice, show several aging-dependent up-regulated processes and, among them, lipid catabolism, proteolysis, cholesterol transport, and myelinogenesis (56,57). Additionally, a consistent observation is that persons with AD, despite unchanged eating habits, begin to lose weight several years prior to the onset of clinical symptoms, suggesting the link between adipose tissue metabolism and AD (25,58,59).

Epidemiological, clinical, and basic studies have shown a relationship between AD and Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM), and that the main physiological link between both conditions is peripheral and central insulin signalling impairment (60). T2DM triggers a condition of "diabetic encephalopathy" characterized by electrophysiological, structural and neurochemical changes leading to cognitive impairments (61). In fact, results from the so called "Hisayama Study" indicate that altered expression of genes related to diabetes mellitus in AD brains is a result of AD pathology, which may thereby be exacerbated by peripheral insulin resistance or diabetes mellitus (62). These cognitive deficits associated to T2DM have been argued to be due in large part to an impaired central insulin modulation in

Energy metabolism in the APP/PS1 mice model

the hippocampus, which is a critical region for memory processing (63). In fact, adults with newly diagnosed pre-diabetes or T2DM show insulin resistance associated with reductions in regional cerebral glucose metabolism and subtle cognitive impairments (64). Interestingly, the insulin signalling overlaps with pathways that regulate both synaptic plasticity and memory processes (63). Therefore, insulin has effects on memory storage and synaptic physiology (65,66).

Published results indicate that there is a close link between insulin deficient diabetes and cerebral amyloidosis in the pathogenesis of AD (67,70). Despite the active research on this field in recent years, the molecular mechanisms involved in the pathophysiology observed in both diseases remain unclear. It has been shown that β -amyloid peptide and phosphorylated tau accumulation also occur in T2DM rat models that exhibit neurite degeneration and neuronal loss (71). These changes appear to be associated with insulin resistance and hypercholesterolemia, and emphasize the role of energy metabolism control in the etiopathology of the AD. Results from Chua and colleagues have demonstrated an alteration in brain insulin proteins in APP/PS1 females, and the alteration of this pathway is responsible of the increase in brain β 42 level in APP/PS1 mice (72). Thus, authors suggest that the brain insulin signalling impairment is involved in the amyloid accumulation in female APP/PS1 mice. Sadowski and colleagues demonstrated a correlation between the hippocampal levels of amyloid plaques and glucose utilization at 22 months of age (73).

It has been suggested from human brain imaging studies that impaired glucose utilization in AD precedes the onset of cognitive deficits and, thus, it will be the cause of AD. Therefore, brain glucose metabolism defects are strongly associated with memory impairment in AD brain. In agreement with that, early markers related to insulin function, like circulating insulin-like growth factor I (IGF-I) have been recently proposed (18). Furthermore, it has been shown that insulin tolerance tests revealed significant hyperglycaemia in mice overexpressing mutant amyloid precursor protein and presenilin-1 (APdE9), either by cross-breeding them with pancreatic insulin like growth factor 2 (IGF-2) overexpressing mice, or by feeding them with high-fat diet (74). In fact, it has been shown that local and systemic levels of IGF1 are altered in such CNS diseases as Alzheimer. IGF1 has emerged as a crucial factor in the CNS; it is involved in normal cognitive function and successful aging, in addition to development. In this context, insulin binds to the insulin receptor and insulin receptor substrates 1 and 2 (IRS-1 and IRS-2), and is involved in the modulation of hippocampal synaptic plasticity and memory consolidation (75).

Then, it can be concluded that the association between obesity and altered signalling

mechanisms of insulin implies a greater susceptibility to neurodegenerative processes.

3.4. The “missing link” between T2DM and AD

Several studies have shown that AD and T2DM may share another common pathways to pathology, both kinases involved in Tau phosphorylation and microtubule stability: the mammalian target of rapamycin (mTOR) and the cyclin dependent kinase 5 (Cdk5). The kinase mTOR plays a key role in maintaining energy homeostasis in the brain and other tissue types (76,77). As an energy sensor, mTOR regulates numerous cellular pathways including protein translation, cell growth and proliferation. In fact, mTor mediates the synthesis and aggregation of Tau, resulting in compromised microtubule stability (78). Furthermore, the authors describe that changes of mTOR activity cause fluctuation of the level of a battery of Tau kinases such as protein kinase A, v-Akt murine thymoma viral oncogene homolog-1, glycogen synthase kinase 3 β , cyclin-dependent kinase 5, and Tau protein phosphatase 2A. In addition, compelling evidence indicated that the sequential molecular events such as the synthesis and phosphorylation of Tau can be regulated through p70 S6 kinase, the well characterized immediate downstream target of mTOR. A common pattern observed in both post-mortem AD brains and drug-oriented *in vitro* and *in vivo* models, is an aberrant accumulation of mTOR. Recently, rapamycin has been shown to be neuroprotective in models for Alzheimer's disease in an autophagy-dependent manner. Caccamo and colleagues (79) and Spilman and colleagues (80) showed that rapamycin rescued cognitive deficits by suppressing extracellular A β deposition and intracellular Tau accumulation (81). In fact, treatment with rapamycin has proved to reduce A β 42 levels and to improve cognitive function through inhibition of mTOR signalling in two independent mouse models of AD (77,79,80). Finally, it has been shown that rapamycin exerts neuroprotection via a novel mechanism that involves presynaptic activation (82) and rapamycin-treated hippocampal neurons are resistant to the synaptotoxic effect induced by A β oligomers, suggesting that enhancers of presynaptic activity can be therapeutic agents for Alzheimer's disease.

It has been proposed that mTOR modulate insulin signalling in times of high nutrient exposure. mTOR directly phosphorylates the insulin receptor leading to its internalization; this, in turn, results in a decrease of mTOR signalling (83, 77). However, through the same mechanisms, chronic mTOR hyperactivity leads to insulin resistance, a key feature of T2DM (84). Then, as Orr and colleagues propose (77), since mTOR hyperactivity is common to both diabetes and AD, mTOR signalling could be considered a molecular link between these two age-related diseases.

In addition to mTOR, the hyper-activation of Cdk5/p25 can be related to AD and T2DM (85). Cdk5

Energy metabolism in the APP/PS1 mice model

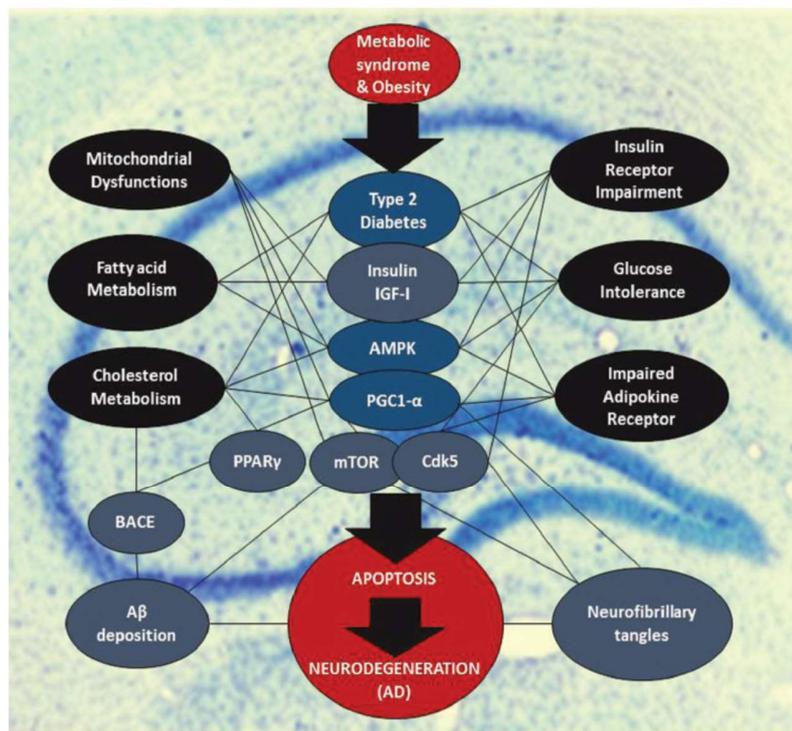


Figure 1. The image shows a complex grid of interactions resulting from the correlations that can be found among metabolic processes and key molecules involved in AD. Results from animal models of AD, like APP^{swE}/PS1^{dE9}, show early down-regulation of glucose and insulin signalling pathways and energy metabolism. The observed changes are complex and are related to insulin and adipokine receptors signalling impairment, all along with alterations in cholesterol and fatty acids metabolism. All together cause changes that affect the activity of key molecules like AMPK and PGC-1 α , involved in mitochondrial biogenesis, PPAR and BACE activity regulation and A β deposition. Since Tau expression is regulated by insulin/IGF-1, and by AMPK, changes in neurofibrillary tangles can be related to energy impairment. Finally, an increased activity of mTOR, Cdk5 and p35 could be responsible of increased Tau phosphorylation and neurofibrillary tangles formation.

is an atypical cyclin-dependent kinase localized in the brain, and its activity is dependent upon binding to p35/p39. In addition, while cdk5 has important physiological functions related to brain development, the breakdown of cdk5/p35 into cdk5/p25 increases its kinase activity and neurotoxicity. Interestingly, in recent years increased cdk5/p25 expression has been demonstrated in the brains of patients with Alzheimer's and Parkinson's diseases. Experimental studies performed in neuronal cell cultures indicate that cdk5/p25 plays a prominent role in apoptosis. In fact, The Cdk5-p25 forms a more stable and hyperactive complex, causing aberrant phosphorylation of cytoskeletal components like Tau and neurofilaments, and induces cell death. It has been shown that cells treated with high glucose concentrations exhibit an induction of p25, the p35-derived truncated fragment which hyperactivates Cdk5 in neurons. Cdk5/p35 has been implicated in cytoskeletal protein phosphorylation in normal brain and in many human neurodegenerative disorders (86). Significant increases in Cdk5 activity and the localization of Cdk5 in neurodegenerative lesions have been demonstrated in several diseases, including AD (87).

Studies illustrate that p35 regulates the subcellular distribution of Cdk5 and cytoskeletal proteins in neurons and that Cdk5 has a hierarchical role in regulating the phosphorylation and function of cytoskeletal proteins. All these data supports the hypothesis that cdk5/p25 acts as a master regulator of neuronal cell death. In addition, cdk5/p25 might also interact with other pathways such as GSK-3 β and c-JUN kinase.

Recent studies have identified P5, a truncated 24-aa peptide derived from the Cdk5 activator p35, later modified as TFP5, so as to penetrate the blood-brain barrier after intraperitoneal injections in AD model mice (84). Since this treatment inhibited abnormal Cdk5 hyperactivity and significantly rescued AD pathology in these mice, the authors suggest that TFP5 peptide may be a novel candidate for type 2 diabetes therapy.

4. CONCLUDING REMARKS

In summary, the reviewed results show early down-regulation of glucose and insulin signalling pathways

Energy metabolism in the APP/PS1 mice model

and energy metabolism in an APP^{swe}/PS1^{dE9} model of Alzheimer disease (Figure 1). These changes affect the activity of key molecules like AMPK and PGC-1 α , involved in mitochondrial biogenesis. It reinforces the hypothesis that the preceding events in the amyloidogenesis are related with both insulin signalling and energy metabolism impairment. Then, initial hypothesis of insoluble A β fibrils as main responsible of AD is currently changing because A β soluble oligomers truly may be the responsible of a synapse failure, neuronal dysfunction and also cognitive deficits. Likewise, experimental data in APP transgenic animal models reinforce this hypothesis because it was demonstrated that cognitive impairment in AD occurs early before amyloid plaque deposition. Since Tau expression is regulated by insulin/IGF-I, and by AMPK, changes in neurofibrillary tangles can be related to energy impairment. Finally, an increased activity of mTOR, Cdk5 and p35 could be responsible of increased Tau phosphorylation and neurofibrillary tangles formation in the APP/PS1 mice model.

5. ACKNOWLEDGMENTS

We are also grateful to the Language Advisory Service of the University of Barcelona for revising this manuscript. This study was funded by grant 2009/SGR00853 from the *Generalitat de Catalunya* (autonomous government of Catalonia), by grants BFU2007-63209/BFI, BFU2010-19119/BFI and SAF2009-13093 from the Spanish *Ministerio de Ciencia e Innovación*, grant PI080400 and PS09/01789 from the Instituto de Salud Carlos III.

6. REFERENCES

1. J Hardy, DJ Selkoe. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297, 353–6 (2002)
DOI: 10.1126/science.1072994
2. JA Hardy, GA Higgins. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256, 184–185 (1992)
DOI: 10.1126/science.1566067
3. MA Kurt, DC Davies, M Kidd, K Duff, SC Rolph, KH Jennings, DR Howlett. Neurodegenerative changes associated with beta-amyloid deposition in the brains of mice carrying mutant amyloid precursor protein and mutant presenilin-1 transgenes. *Exp Neurol* 171, 59–71 (2001)
DOI: 10.1006/exnr.2001.7717
4. R Radde, T Bolmont, SA Kaeser, J Coomaraswamy, D Lindau, L Stoltze, ME Calhoun, F Jäggi, H Wolburg, S Gengler, C Haass, B Ghetti, C Czech, C Hölscher, PM Mathews, M Jucker. Abeta42-driven cerebral amyloidosis in transgenic mice reveals early and robust pathology. *EMBO Rep* 7, 940–6 (2006)
DOI: 10.1038/sj.embor.7400784
5. ABilkei-Gorzo. Genetic mouse models of brain ageing and Alzheimer's disease. *Pharmacol Ther* 142, 244–57 (2014)
DOI: 10.1016/j.pharmthera.2013.12.009
6. S Oddo, A Caccamo, JD Shepherd, MP Murphy, TE Golde, R Kaye, R Metherate, MP Mattson, Y Akbari, FM Laferla. Triple-Transgenic Model of Alzheimer's Disease with Plaques and Tangles: Intracellular A beta and Synaptic Dysfunction. *Neuron* 39, 409–421 (2003)
DOI: 10.1016/S0896-6273(03)00434-3
7. JL Jankowsky, HH Slunt, V Gonzales, NA Jenkins, NG Copeland, DR Borchelt. APP processing and amyloid deposition in mice haplo-insufficient for presenilin 1. *Neurobiol Aging* 25, 885–92 (2004)
DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2003.09.008
8. W Zhang, M Bai, Y Xi, J Hao, L Liu, N Mao, C Su, J Miao, Z Li. Early memory deficits precede plaque deposition in APP^{swe}/PS1^{dE9} mice: involvement of oxidative stress and cholinergic dysfunction. *Free Radic Biol Med* 52, 1443–52 (2012a)
DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.01.023
9. W Zhang, M Bai, Y Xi, J Hao, Z Zhang, C Su, G Lei, J Miao, Z Li. Multiple inflammatory pathways are involved in the development and progression of cognitive deficits in APP^{swe}/PS1^{dE9} mice. *Neurobiol Aging* 33, 2661–77 (2012b)
DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2011.12.023
10. S Lesné, MT Koh, L Kotilinek, R Kaye, CG Glabe, A Yang, M Gallagher, KH Ashe. A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* 440, 352–7 (2006)
DOI: 10.1038/nature04533
11. A Nagakura, Y Shitaka, J Yarimizu, N Matsuoka. Characterization of cognitive deficits in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease and effects of donepezil and memantine. *Eur J Pharmacol* 703, 53–61 (2013)
DOI: 10.1016/j.ejphar.2012.12.023

Energy metabolism in the APP/PS1 mice model

12. I Dewachter, RK Filipkowski, C Priller, L Ris, J Neyton, S Croes, D Terwel, M Gysemans, H Devijver, P Borghgraef, E Godaux, L Kaczmarek, J Herms, F Van Leuven. Deregulation of NMDA-receptor function and down-stream signaling in APP(V717I) transgenic mice. *Neurobiol Aging* 30, 241–56 (2009)
DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2007.06.011
13. Q Liu, Y Huang, F Xue, A Simard, J DeChon, G Li, J Zhang, L Lucero, M Wang, M Sierks, G Hu, Y Chang, RJ Lukas, J Wu. A novel nicotinic acetylcholine receptor subtype in basal forebrain cholinergic neurons with high sensitivity to amyloid peptides. *J Neurosci* 29, 918–29 (2009)
DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3952-08.2009
14. K Noda-Saita, A Yoneyama, Y Shitaka, Y Hirai, K Terai, J Wu, T Takeda, K Hyodo, N Osakabe, T Yamaguchi, M Okada. Quantitative analysis of amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease by phase-contrast X-ray computed tomography. *Neuroscience* 138, 1205–13 (2006)
DOI: 10.1016/j.neuroscience.2005.12.036
15. M Oksman, H Iivonen, E Högges, Z Amtul, B Penke, I Leenders, L Broersen, D Lütjohann, T Hartmann, H Tanila. Impact of different saturated fatty acid, polyunsaturated fatty acid and cholesterol containing diets on beta-amyloid accumulation in APP/PS1 transgenic mice. *Neurobiol Dis* 23, 563–72 (2006)
DOI: 10.1016/j.nbd.2006.04.013
16. SW Pimplikar. Reassessing the amyloid cascade hypothesis of Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol* 41, 1261–8 (2009)
DOI: 10.1016/j.biocel.2008.12.015
17. SW Pimplikar, R Nixon, NK Robakis, J Shen, LH Tsai. Amyloid-independent mechanisms in Alzheimer's disease pathogenesis. *J Neurosci* 30, 14946–54 (2010)
DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4305-10.2010
18. A Trueba-Sáiz, C Cavada, AM Fernandez, T Leon, D González, J Fortea Ormaechea, A Lleó, T Del Ser, A Nuñez, I Torres-Aleman. Loss of serum IGF-I input to the brain as an early biomarker of disease onset in Alzheimer mice. *Transl Psychiatry* 3, e330 (2013)
DOI: 10.1038/tp.2013.102
19. T Brandebourg, E Hugo, N Ben-Jonathan. Adipocyte prolactin: regulation of release and putative functions. *Diabetes Obes Metab* 9, 464–76 (2007)
DOI: 10.1111/j.1463-1326.2006.00671.x
20. AD Intebi, L Garau, I Brusco, M Pagano, RC Gaillard, E Spinedi. Alzheimer's disease patients display gender dimorphism in circulating anorectic adipokines. *Neuroimmunomodulation* 10, 351–358 (2002)
DOI: 10.1159/000071476
21. W Lieb, Beiser, ZS Tan, TB Harris, C Decarli, PA Wolf. Association of Plasma Leptin Levels and MRI Measures of Brain Aging. *JAMA* 302, 2565–2572 (2014)
DOI: 10.1001/jama.2009.1836
22. G Marwarha, B Dasari, JRP Prasanthi, J Schommer, O Ghribi. Leptin reduces the accumulation of Abeta and phosphorylated tau induced by 27-hydroxycholesterol in rabbit organotypic slices. *J Alzheimers Dis* 19, 1007–19 (2010)
23. J Harvey, N Solovyova, A Irving. Leptin and its role in hippocampal synaptic plasticity. *Prog Lipid Res* 45, 369–78 (2006)
DOI: 10.1016/j.plipres.2006.03.001
24. SJ Greco, KJ Bryan, S Sarkar, X Zhu, M Smith, JW Ashford, J Johnston, N Tezapsidis, G Casadesus. Leptin reduces pathology and improves memory in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 19, 1155–67 (2010)
25. MW Warren, LS Hynan, MF Weiner, T Texas. Lipids and Adipokines as Risk Factors for Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 29, 151–157 (2012)
26. DJ Bonda, JG Stone, SL Torres, SL Siedlak, G Perry, R Kryscio, G Jicha, G Casadesus, M Smith, X Zhu, HG Lee. Dysregulation of leptin signaling in Alzheimer disease: evidence for neuronal leptin resistance. *J Neurochem* 128, 162–72 (2014)
DOI: 10.1111/jnc.12380
27. T Morales. Recent findings on neuroprotection against excitotoxicity in the hippocampus of female rats. *J Neuroendocrinol* 23, 994–1001 (2011)
DOI: 10.1111/j.1365-2826.2011.02141.x
28. J Auffret, S Viengchareun, N Carré, RGP Denis, C Magnan, PY Marie, A Muscat, B Fève, M Lombès, N Binart. Beige differentiation of adipose depots in mice lacking prolactin

Energy metabolism in the APP/PS1 mice model

- receptor protects against high-fat-diet-induced obesity. *FASEB J* 26, 3728–37 (2012)
DOI: 10.1096/fj.12-204958
29. S Park, S Kang, HW Lee, BS Ko. Central prolactin modulates insulin sensitivity and insulin secretion in diabetic rats. *Neuroendocrinology* 95, 332–343 (2012)
DOI: 10.1159/000336501
30. TL Walker, J Vukovic, MM Koudijs, DG Blackmore, EW Mackay, AM Sykes, RW Overall, AS Hamlin, PF Bartlett. Prolactin stimulates precursor cells in the adult mouse hippocampus. *PLoS One* 7, e44371 (2012)
DOI: 10.1371/journal.pone.0044371
31. C Bole-Feysot, V Goffin, M Edery, N Binart, PA Kelly. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr Rev* 19, 225–68 (1998)
DOI: 10.1210/edrv.19.3.0334
32. RH Swerdlow, SM Khan. A “mitochondrial cascade hypothesis” for sporadic Alzheimer’s disease. *Med Hypotheses* 63, 8–20 (2004)
DOI: 10.1016/j.mehy.2003.12.045
33. JE Selfridge, J Lu, RH Swerdlow. Role of mitochondrial homeostasis and dynamics in Alzheimer’s disease. *Neurobiol Dis* 51, 3–12 (2013)
DOI: 10.1016/j.nbd.2011.12.057
34. BN Finck, DP Kelly. PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *J Clin Invest* 116, 615–622 (2006)
DOI: 10.1172/JCI27794
35. H Liang, WF Ward. PGC-1alpha: a key regulator of energy metabolism. *Adv Physiol Educ* 30, 145–51 (2006)
DOI: 10.1152/advan.00052.2006
36. B Sheng, X Wang, B Su, H Lee, G Casadesus, G Perry, X Zhu. Impaired mitochondrial biogenesis contributes to mitochondrial dysfunction in Alzheimer’s disease. *J Neurochem* 120, 419–29 (2012)
DOI: 10.1111/j.1471-4159.2011.07581.x
37. RH Swerdlow. Mitochondria and Cell Bioenergetics: Increasingly Recognized Components and a Possible Etiologic Cause of Alzheimer’s Disease. *Antioxid Redox Signal* 16, 1434–1455 (2012)
DOI: 10.1089/ars.2011.4149
38. NA Shirwany, MH Zou. AMPK: A cellular metabolic and redox sensor. A minireview. *Front Biosci (Landmark Ed)* 19, 447–74 (2014)
DOI: 10.2741/4218
39. S Jäger, C Handschin, J St-Pierre, BM Spiegelman. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 12017–22 (2007)
DOI: 10.1073/pnas.0705070104
40. BR Hoover, MN Reed, J Su, RD Penrod, L Kotilinek, MK Grant, R Pitstick, GA Carlson, LM Lanier, LL Yuan, KH Ashe, D Liao. Tau mislocalization to dendritic spines mediates synaptic dysfunction independently of neurodegeneration. *Neuron* 68, 1067–81 (2010)
DOI: 10.1016/j.neuron.2010.11.030
41. A Louis, A Bartke, MM Masternak. Effects of growth hormone and thyroxine replacement therapy on insulin signaling in Ames dwarf mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 65, 344–52 (2010)
DOI: 10.1093/gerona/glq018
42. L Katsouri, C Parr, N Bogdanovic, M Willem, M Sastre. PPAR γ co-activator-1 α (PGC-1 α) reduces amyloid- β generation through a PPAR γ -dependent mechanism. *J Alzheimers Dis* 25, 151–62 (2011)
43. PR Mouton, ME Chachich, C Quigley, E Spangler, DK Ingram. Caloric restriction attenuates amyloid deposition in middle-aged dtg APP/PS1 mice. *Neurosci Lett* 464, 184–7 (2009)
DOI: 10.1016/j.neulet.2009.08.038
44. B Reed, S Villeneuve, W Mack, C DeCarli, HC Chui, W Jagust. Associations between serum cholesterol levels and cerebral amyloidosis. *JAMA Neurol* 71, 195–200 (2014)
DOI: 10.1001/jamaneurol.2013.5390
45. P Gamba, G Testa, B Sottero, S Gargiulo, G Poli, G Leonarduzzi. The link between altered cholesterol metabolism and Alzheimer’s disease. *Ann N Y Acad Sci* 1259, 54–64 (2012)
DOI: 10.1111/j.1749-6632.2012.06513.x
46. L Thirumangalakudi, A Prakasam, R Zhang, H Bimonte-Nelson, K Sambamurti, MS Kindy, NR Bhat. High cholesterol-induced neuroinflammation and amyloid precursor protein processing correlate with loss of

Energy metabolism in the APP/PS1 mice model

- working memory in mice. *J Neurochem* 106, 475–85 (2008)
DOI: 10.1111/j.1471-4159.2008.05415.x
47. SH Park, JH Kim, KH Choi, YJ Jang, SS Bae, BT Choi, HK Shin. Hypercholesterolemia accelerates amyloid β -induced cognitive deficits. *Int J Mol Med* 31, 577–82 (2013)
48. E Rönnekaa, B Zethelius, B Vessby, L Lannfelt, L Byberg, L Kilander. Serum fatty-acid composition and the risk of Alzheimer's disease: a longitudinal population-based study. *Eur J Clin Nutr* 66, 885–90 (2012)
DOI: 10.1038/ejcn.2012.63
49. N Mody, A Agouni, GD McIlroy, B Platt, M Delibegovic. Susceptibility to diet-induced obesity and glucose intolerance in the APP (SWE)/PSEN1 (A246E) mouse model of Alzheimer's disease is associated with increased brain levels of protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) and retinol-binding protein 4 (RBP4), and basal phosphorylation of S6 ribosomal protein. *Diabetologia* 54, 2143–51 (2011)
DOI: 10.1007/s00125-011-2160-2
50. M Söderberg, C Edlund, K Kristensson, G Dallner. Fatty acid composition of brain phospholipids in aging and in Alzheimer's disease. *Lipids* 26, 421–425 (1991)
DOI: 10.1007/BF02536067
51. PA Dacks, DW Shineman, HM Fillit. Current evidence for the clinical use of long-chain polyunsaturated n-3 fatty acids to prevent age-related cognitive decline and Alzheimer's disease. *J Nutr Health Aging* 17, 240–51 (2013)
DOI: 10.1007/s12603-012-0431-3
52. G Vitiello, S Marino, S Di, AMD Ursi, GD Errico. Omega-3 fatty acids regulate the interaction of the Alzheimer's $\alpha\beta(25-35)$ peptide with lipid membranes. *Langmuir* 29, 14239–14245 (2013)
DOI: 10.1021/la403416b
53. JA Luchsinger, JM Noble, N Scarmeas. Diet and Alzheimer's disease. *Curr Neurol Neurosci Rep* 7, 366–372 (2007)
DOI: 10.1007/s11910-007-0057-8
54. S Merlo, S Spampinato, PL Canonico, A Copani, MA Sortino. Alzheimer's disease: brain expression of a metabolic disorder? *Trends Endocrinol Metab* 21, 537–44 (2010)
DOI: 10.1016/j.tem.2010.05.005
55. V Frisardi, V Solfrizzi, D Seripa, C Capurso, A Santamato, D Sancarlo, G Vendemiale, A Pilotto, F Panza. Metabolic-cognitive syndrome: a cross-talk between metabolic syndrome and Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev* 9, 399–417 (2010)
DOI: 10.1016/j.arr.2010.04.007
56. EM Blalock, KC Chen, K Sharrow, JP Herman, NM Porter, TC Foster, PW Landfield. Gene microarrays in hippocampal aging: statistical profiling identifies novel processes correlated with cognitive impairment. *J Neurosci* 23, 3807–19 (2003)
57. EM Blalock, KC Chen, AJ Stromberg, CM Norris, I Kadish, SD Kraner, NM Porter, PW Landfield. Harnessing the power of gene microarrays for the study of brain aging and Alzheimer's disease: statistical reliability and functional correlation. *Ageing Res Rev* 4, 481–512 (2005)
DOI: 10.1016/j.arr.2005.06.006
58. AS Buchman, RS Wilson, JL Bienias, RC Shah, DA Evans, DA Bennett. Change in body mass index and risk of incident Alzheimer disease. *Neurology* 65, 892–897 (2005)
DOI: 10.1212/01.wnl.0000176061.33817.90
59. BB Cronk, DK Johnson, JM Burns. Body mass index and cognitive decline in mild cognitive impairment. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 24, 126–30 (2009)
DOI: 10.1097/WAD.0b013e3181a6bf3f
60. S Hoyer. Glucose metabolism and insulin receptor signal transduction in Alzheimer disease. *Eur J Pharmacol* 490, 115–25 (2004)
DOI: 10.1016/j.ejphar.2004.02.049
61. A Sima. A. Encephalopathies: the emerging diabetic complications. *Acta Diabetol* 47, 279–93 (2010)
DOI: 10.1007/s00592-010-0218-0
62. M Hokama, S Oka, J Leon, T Ninomiya, H Honda, K Sasaki, T Iwaki, T Ohara, Sasaki, FM Laferla, Y Kiyohara, Y Nakabeppu. Altered Expression of Diabetes-Related Genes in Alzheimer's Disease Brains: The Hisayama Study. *Cereb Cortex* 24, 2476–88 (2013)
DOI: 10.1093/cercor/bht101 (2013)
63. EC McNay, AK Recknagel. Brain insulin signaling: a key component of cognitive processes and a potential basis for cognitive impairment in type 2 diabetes. *Neurobiol*

Energy metabolism in the APP/PS1 mice model

- Learn Mem* 96, 432–42 (2011)
DOI: 10.1016/j.nlm.2011.08.005
64. LD Baker, DJ Cross, S Minoshima, D Belongia, GS Watson, S Craft. Insulin resistance and Alzheimer-like reductions in regional cerebral glucose metabolism for cognitively normal adults with prediabetes or early type 2 diabetes. *Arch Neurol* 68, 51–7 (2011)
DOI: 10.1001/archneurol.2010.225
65. EC McNay, CT Ong, RJ McCrimmon, J Cresswell, JS Bogan, RS Sherwin. Hippocampal memory processes are modulated by insulin and high-fat-induced insulin resistance. *Neurobiol Learn Mem* 93, 546–53 (2010)
DOI: 10.1016/j.nlm.2010.02.002
66. DA Costello, M Claret, H Al-Qassab, F Plattner, EE Irvine, Al Choudhury, KP Giese, DJ Withers, P Pedarzani. Brain deletion of insulin receptor substrate 2 disrupts hippocampal synaptic plasticity and metaplasticity. *PLoS One* 7, e31124 (2012)
DOI: 10.1371/journal.pone.0031124
67. SM Gold, I Dziobek, V Sweat, A Tirsi, K Rogers, H Bruehl, W Tsui, S Richardson, E Javier, E., A Convit. Hippocampal damage and memory impairments as possible early brain complications of type 2 diabetes. *Diabetologia* 50, 711–9 (2007)
DOI: 10.1007/s00125-007-0602-7
68. H Bruehl, OT Wolf, V Sweat, A Tirsi, S Richardson, A Convit. Modifiers of cognitive function and brain structure in middle-aged and elderly individuals with type 2 diabetes mellitus. *Brain Res* 1280, 186–94 (2009)
DOI: 10.1016/j.brainres.2009.05.032
69. X Wang, W Zheng, JW Xie, T Wang, SL Wang, WP Teng, ZY Wang. Insulin deficiency exacerbates cerebral amyloidosis and behavioral deficits in an Alzheimer transgenic mouse model. *Mol Neurodegener* 5, 46 (2010)
DOI: 10.1186/1750-1326-5-46
70. R Ravona-Springer, E Moshier, J Schmeidler, J Godbold, J Akrivos, M Rapp, HT Grossman, M Wysocki, JM Silverman, V Haroutunian, MS Beeri. Changes in glycemic control are associated with changes in cognition in non-diabetic elderly. *J Alzheimers Dis* 30, 299–309 (2012)
71. X Li, F Guo, Q Zhang, T Huo, L Liu, H Wei, L, L Xiong, Q Wang. Electroacupuncture decreases cognitive impairment and promotes neurogenesis in the APP/PS1 transgenic mice. *BMC Complement Altern Med* 14, 37 (2014)
DOI: 10.1186/1472-6882-14-37
72. LM Chua, ML Lim, PR Chong, ZP Hu, NS Cheung, BS Wong. Impaired neuronal insulin signaling precedes A β 42 accumulation in female A β PPsw/PS1 Δ E9 mice. *J Alzheimers Dis* 29, 783–91 (2012)
73. M Sadowski, J Pankiewicz, H Scholtzova, Y Ji, D Quartermain, CH Jensen, K Duff, RA Nixon, RJ Gruen, T Wisniewski. Amyloid-beta deposition is associated with decreased hippocampal glucose metabolism and spatial memory impairment in APP/PS1 mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 63, 418–428 (2004)
74. M Hiltunen, VKM Khandelwal, N Yaluri, T Tiilikainen, M Tusa, H Koivisto, M Krzisch, S Vepsäläinen, P Mäkinen, S Kemppainen, P Miettinen, A Haapasalo, H Soininen, M Laakso, H Tanila. Contribution of genetic and dietary insulin resistance to Alzheimer phenotype in APP/PS1 transgenic mice. *J Cell Mol Med* 16, 1206–22 (2012)
DOI: 10.1111/j.1582-4934.2011.01384.x
75. K Talbot, H Wang, H Kazi, L Han, KP Bakshi, A Stucky, RL Fuino, KR Kawaguchi, AJ Samoyedny, RS Wilson, Z Aranitakis, JA Schneider, BA Wolf, DA Bennett, JQ Trojanowski, SE Arnold. Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer's disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline. *J Clin Invest* 122, 1316–1338 (2012)
DOI: 10.1172/JCI59903
76. M Mannaa, S Krämer, M Boschmann, M Gollasch. mTOR and regulation of energy homeostasis in humans. *J Mol Med (Berl)* 91, 1167–75 (2013)
DOI: 10.1007/s00109-013-1057-6
77. ME Orr, A Salinas, R Buffenstein, S Oddo. Mammalian target of rapamycin hyperactivity mediates the detrimental effects of a high sucrose diet on Alzheimer's disease pathology. *Neurobiol Aging* 35, 1233–42 (2014)
DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2013.12.006
78. Z Tang, E Berezcki, H Zhang, S Wang, C Li, X Ji, RM Branca, J Lehtio, Z Guan, P Filipcik, S Xu, B Winblad, JJ Pei. Mammalian

Energy metabolism in the APP/PS1 mice model

- Target of Rapamycin (mTOR) Mediates Tau Protein Dyshomeostasis: Implication for Alzheimer Disease. *J Biol Chem* 288, 15556–15570 (2013)
DOI: 10.1074/jbc.M112.435123
79. A Caccamo, S Majumder, A Richardson, R Strong, S Oddo. Molecular interplay between mammalian target of rapamycin (mTOR), amyloid-beta, and Tau: effects on cognitive impairments. *J Biol Chem* 285, 13107–20 (2010)
DOI: 10.1074/jbc.M110.100420
80. P Spilman, N Podlitskaya, M Hart, J Debnath, O Gorostiza, D Bredesen, A Richardson, R Strong, V Galvan. Inhibition of mTOR by rapamycin abolishes cognitive deficits and reduces amyloid-beta levels in a mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One* 5, e9979 (2010)
DOI: 10.1371/journal.pone.0009979
81. Y Sun, X Ji, X Mao, L Xie, J Jia, V Galvan, DA Greenberg, K Jin. Differential activation of mTOR complex 1 signaling in human brain with mild to severe Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 38, 437–44 (2014)
82. AE Ramírez, CR Pacheco, LG Aguayo, CM Opazo. Rapamycin protects against A β -induced synaptotoxicity by increasing presynaptic activity in hippocampal neurons. *Biochim Biophys Acta* 1842, 1495-501 (2014)
DOI: 10.1016/j.bbadis.2014.04.019
83. S Wullschlegel, R Loewith, MN Hall. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124, 471–84 (2006)
DOI: 10.1016/j.cell.2006.01.016
84. AK Saha, XJ Xu, TW Balon, A Brandon, EW Kraegen, NB Ruderman. Insulin resistance due to nutrient excess: is it a consequence of AMPK downregulation? *Cell Cycle* 10, 3447–3451 (2011)
DOI: 10.4161/cc.10.20.17886
85. BK Binukumar, V Shukla, ND Amin, P Reddy, S Skuntz, P Grant, HC Pant. Topographic regulation of neuronal intermediate filaments by phosphorylation, role of peptidyl-prolyl isomerase 1: significance in neurodegeneration. *Histochem Cell Biol* 140, 23–32 (2013)
DOI: 10.1007/s00418-013-1108-7
86. JL Hallows, K Chen, RA DePinho, I Vincent. Decreased cyclin-dependent kinase 5 (cdk5) activity is accompanied by redistribution of cdk5 and cytoskeletal proteins and increased cytoskeletal protein phosphorylation in p35 null mice. *J Neurosci* 23, 10633–44 (2003)
87. M Takahashi, E Iseki, K Kosaka. Cdk5 and munc-18/p67 co-localization in early stage neurofibrillary tangles-bearing neurons in Alzheimer type dementia brains. *J Neurol Sci* 172, 63–69 (2000)
DOI: 10.1016/S0022-510X(99)00291-9

Abbreviations: AD: Alzheimer's disease; APP/PS1: APPS^{we}/PS1dE9 mice; SAD: Alzheimer's sporadic form; A β : β -amyloid; APP: A β protein precursor; Ach: acetylcholinesterase; PRL: Pituitary-derived prolactin; ob: obese gene; Lep: leptin; PRLR: prolactin receptor; PGC-1 α : PPAR γ coactivator-1 α ; BACE1: β -secretase; CR: caloric restriction; LDLR: low density lipoprotein receptor; ULSAM: Uppsala Longitudinal Study of Adult Men; HFD: short-term high-fat diet; T2DM: Type 2 Diabetes Mellitus; APdE9: overexpressing mutant amyloid precursor protein and presenilin-1 mice; IGF-2: insulin like growth factor 2; IRS-1/2: insulin receptor substrates 1 and 2; mTOR: mammalian target of rapamycin; Cdk5: cyclin dependent kinase 5

Key Words: APP/PS1, Insulin Receptor, Hippocampus, Alzheimer Disease, Leptin, Prolactin, PGC-1 α , mTOR, Cdk5, Review

Send correspondence to: Jaume Folch, Unitat de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili de Tarragona, Spain, C. Sant Llorenç 21. 43201-Reus, Spain, Tel: 34-977759376, Fax: 34-977759322, E-mail: jaume.folch@urv.cat

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTO DE LA MELATONINA, LEPTINA Y ÁCIDOS GRASOS: DOCOSAHEXAENOICO, EICOSAPENTAENOICO Y PALMÍTICO,
EN LA MODULACIÓN DE LA INFLAMACIÓN EN CÉLULAS DE GLÍA

Nohora Milena Martínez López

BIBLIOGRAFIA

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTO DE LA MELATONINA, LEPTINA Y ÁCIDOS GRASOS: DOCOSAHEXAENOICO, EICOSAPENTAENOICO Y PALMÍTICO,
EN LA MODULACIÓN DE LA INFLAMACIÓN EN CÉLULAS DE GLÍA

Nohora Milena Martínez López

Bibliografía

- Acuña-Castroviejo, D., Escames, G., Venegas, C., Díaz-Casado, M.E., Lima-Cabello, E., López, L.C., Rosales-Corral, S., Tan, D.-X., Reiter, R.J., 2014. Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. *Cell. Mol. Life Sci.* 71, 2997–3025. doi:10.1007/s00018-014-1579-2
- Agostoni, C., Moreno, L., Shamir, R., 2016. Palmitic Acid and Health: Introduction. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 56, 1941–1942. doi:10.1080/10408398.2015.1017435
- 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., Strohmeyer, R., Tooyoma, I., Van Muiswinkel, F.L., Veerhuis, R., Walker, D., Webster, S., Wegrzyniak, B., Wenk, G., Wyss-Coray, T., n.d. Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 21, 383–421.
- Allan, S.M., Rothwell, N.J., 2001. Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 734–744. doi:10.1038/35094583
- Allen, N.J., Barres, B.A., 2009. Neuroscience: Glia — more than just brain glue. *Nature*. doi:10.1038/457675a
- Ambrosino, C., Nebreda, A.R., 2001. Cell cycle regulation by p38 MAP kinases. *Biol. Cell* 93, 47–51. doi:10.1016/S0248-4900(01)01124-8
- Ando, K., Uemura, K., Kuzuya, A., Maesako, M., Asada-Utsugi, M., Kubota, M., Aoyagi, N., Yoshioka, K., Okawa, K., Inoue, H., Kawamata, J., Shimohama, S., Arai, T., Takahashi, R., Kinoshita, A., 2011. N-cadherin regulates p38 MAPK signaling via association with JNK-associated leucine zipper protein: implications for neurodegeneration in Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* 286, 7619–28. doi:10.1074/jbc.M110.158477
- Antonietta Ajmone-Cat, M., Lavinia Salvatori, M., De Simone, R., Mancini, M., Biagioni, S., Bernardo, A., Cacci, E., Minghetti, L., 2012. Docosahexaenoic acid modulates inflammatory and antineurogenic functions of activated microglial cells. *J. Neurosci. Res.* 90, 575–587. doi:10.1002/jnr.22783
- Araki, Y., Matsumiya, M., Matsuura, T., Oishi, M., Kaibori, M., Okumura, T., Nishizawa, M., Takada, H., Kwon, A.-H., 2011. Peroxidation of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids Inhibits the Induction of iNOS Gene Expression in Proinflammatory Cytokine-Stimulated Hepatocytes. *J. Nutr. Metab.* 2011, 374542. doi:10.1155/2011/374542
- Arnoldussen, I.A.C., Kiliaan, A.J., Gustafson, D.R., 2014. Obesity and dementia: Adipokines interact with the brain. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 24, 1982–1999. doi:10.1016/j.euroneuro.2014.03.002
- Atochin, D.N., Paolucci, N., Nasyrova, R.F., Bekhterev, V.M., Petersburg, S., Ivashchenko, D. V, Ivanov, M. V, Neznanov, N.G., 2015. Role of nitric oxide and related molecules in schizophrenia pathogenesis: biochemical, genetic and clinical aspects 6. doi:10.3389/fphys.2015.00139
- Averill, M.M., Bornfeldt, K.E., 2009. Lipids versus glucose in inflammation and the pathogenesis of macrovascular disease in diabetes. *Curr. Diab. Rep.* 9, 18–25.

Bibliografía

- Barbeito LH, Pehar M, Cassina P, Vargas MR, Peluffo H, V.L., Estevez AG, B.J., 2004. A role for astrocytes in motor neuron loss in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res Brain Res Rev* 47.
- Barceló-Coblijn, G., Murphy, E.J., 2009. Alpha-linolenic acid and its conversion to longer chain n-3 fatty acids: Benefits for human health and a role in maintaining tissue n-3 fatty acid levels. *Prog. Lipid Res.* 48, 355–374. doi:10.1016/j.plipres.2009.07.002
- Bazan, N.G., Calandria, J.M., Gordon, W.C., 2013. Docosahexaenoic Acid and Its Derivative Neuroprotectin D1 Display Neuroprotective Properties in the Retina, Brain and Central Nervous System, in: *Nestle Nutrition Institute Workshop Series*. pp. 121–131. doi:10.1159/000351395
- Bellinger, F.P., Madamba, S.G., Campbell, I.L., Siggins, G.R., 1995. Reduced long-term potentiation in the dentate gyrus of transgenic mice with cerebral overexpression of interleukin-6. *Neurosci. Lett.* 198, 95–8.
- Bellon, S., Fitzgibbon, M.J., Fox, T., Hsiao, H.M., Wilson, K.P., 1999. The structure of phosphorylated p38gamma is monomeric and reveals a conserved activation-loop conformation. *Structure* 7, 1057–65.
- Ben-Levy, R., Hooper, S., Wilson, R., Paterson, H.F., Marshall, C.J., Grand, R., al., et, 1998. Nuclear export of the stress-activated protein kinase p38 mediated by its substrate MAPKAP kinase-2. *Curr. Biol.* 8, 1049–57. doi:10.1016/S0960-9822(98)70442-7
- Bergles, D.E., Jabs, R., Steinhäuser, C., 2010. Neuron-glia synapses in the brain. *Brain Res. Rev.* 63, 130–7. doi:10.1016/j.brainresrev.2009.12.003
- Bhat, N.R., Feinstein, D.L., Shen, Q., Bhat, A.N., 2002a. p38 MAPK-mediated transcriptional activation of inducible nitric-oxide synthase in glial cells. Roles of nuclear factors, nuclear factor kappa B, cAMP response element-binding protein, CCAAT/enhancer-binding protein-beta, and activating transcription factor-2. *J. Biol. Chem.* 277, 29584–92. doi:10.1074/jbc.M204994200
- Bhat, N.R., Feinstein, D.L., Shen, Q., Bhat, A.N., 2002b. p38 MAPK-mediated transcriptional activation of inducible nitric-oxide synthase in glial cells. Roles of nuclear factors, nuclear factor kappa B, cAMP response element-binding protein, CCAAT/enhancer-binding protein-beta, and activating transcription factor-2. *J. Biol. Chem.* 277, 29584–92. doi:10.1074/jbc.M204994200
- Bhat, N.R., Feinstein, D.L., Shen, Q., Bhat, A.N., 2002c. p38 MAPK-mediated transcriptional activation of inducible nitric-oxide synthase in glial cells. Roles of nuclear factors, nuclear factor kappa B, cAMP response element-binding protein, CCAAT/enhancer-binding protein-beta, and activating transcription factor-2. *J. Biol. Chem.* 277, 29584–92. doi:10.1074/jbc.M204994200
- Bhat, N.R., Zhang, P., Bhat, A.N., 1999a. Cytokine induction of inducible nitric oxide synthase in an oligodendrocyte cell line: role of p38 mitogen-activated protein kinase activation. *J. Neurochem.* 72, 472–8.
- Bhat, N.R., Zhang, P., Bhat, A.N., 1999b. Cytokine induction of inducible nitric oxide synthase in an oligodendrocyte cell line: role of p38 mitogen-activated protein kinase activation. *J. Neurochem.* 72, 472–8.
- Bondy, S.C., Li, H., Zhou, J., Wu, M., Bailey, J.A., Lahiri, D.K., 2010. Melatonin alters age-

Bibliografía

- related changes in transcription factors and kinase activation. *Neurochem. Res.* 35, 2035–42. doi:10.1007/s11064-010-0206-3
- Borah, A., Mohanakumar, K.P., 2009. Melatonin inhibits 6-hydroxydopamine production in the brain to protect against experimental parkinsonism in rodents. *J. Pineal Res.* 47, 293–300. doi:10.1111/j.1600-079X.2009.00713.x
- Borges, B. de C., Rorato, R.C., Uchoa, E.T., Marangon, P.B., Elias, C.F., Antunes-Rodrigues, J., Elias, L.L.K., 2015a. Protein tyrosine phosphatase-1B contributes to LPS-induced leptin resistance in male rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 308, E40-50. doi:10.1152/ajpendo.00094.2014
- Borges, B. de C., Rorato, R.C., Uchoa, E.T., Marangon, P.B., Elias, C.F., Antunes-Rodrigues, J., Elias, L.L.K., 2015b. Protein tyrosine phosphatase-1B contributes to LPS-induced leptin resistance in male rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 308, E40-50. doi:10.1152/ajpendo.00094.2014
- Bousquet, M., Calon, F., Cicchetti, F., 2011. Impact of omega-3 fatty acids in Parkinson's disease. *Ageing Res. Rev.* 10, 453–463. doi:10.1016/j.arr.2011.03.001
- Brancho, D., Tanaka, N., Jaeschke, A., Ventura, J.-J., Kelkar, N., Tanaka, Y., Kyuuma, M., Takeshita, T., Flavell, R.A., Davis, R.J., 2003. Mechanism of p38 MAP kinase activation in vivo. *Genes Dev.* 17, 1969–1978. doi:10.1101/gad.1107303
- Brown, G., Neher, J., 2010. Inflammatory neurodegeneration and mechanisms of microglial killing of neurons. *Mol Neurobiol.*
- Brown, G., 2010. Nitric oxide and neuronal death. *nitric oxide.*
- Brown, G.C., 2010a. Nitric oxide and neuronal death. *Nitric Oxide* 23, 153–165. doi:10.1016/j.niox.2010.06.001
- Brown, G.C., 2010b. Nitric oxide and neuronal death. *Nitric Oxide* 23, 153–165. doi:10.1016/j.niox.2010.06.001
- Brown, G.C., 2007. Mechanisms of inflammatory neurodegeneration: iNOS and NADPH oxidase. *Biochem. Soc. Trans.* 35, 1119–1121. doi:10.1042/BST0351119
- Brown, G.C., Neher, J.J., 2010a. Inflammatory Neurodegeneration and Mechanisms of Microglial Killing of Neurons. *Mol. Neurobiol.* 41, 242–247. doi:10.1007/s12035-010-8105-9
- Brown, G.C., Neher, J.J., 2010b. Inflammatory Neurodegeneration and Mechanisms of Microglial Killing of Neurons. *Mol. Neurobiol.* 41, 242–247. doi:10.1007/s12035-010-8105-9
- Bruce-Keller, A.J., 1999. Microglial-neuronal interactions in synaptic damage and recovery. *J. Neurosci. Res.* 58, 191–201.
- Bulavin, D. V., Amundson, S.A., Fornace, A.J., 2002. p38 and Chk1 kinases: different conductors for the G(2)/M checkpoint symphony. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12, 92–7.
- Bulavin, D. V., Phillips, C., Nannenga, B., Timofeev, O., Donehower, L.A., Anderson, C.W., Appella, E., Fornace, A.J., 2004. Inactivation of the Wip1 phosphatase inhibits mammary tumorigenesis through p38 MAPK-mediated activation of the p16Ink4a-p19Arf pathway. *Nat. Genet.* 36, 343–350. doi:10.1038/ng1317

Bibliografía

- Busche, M.A., Konnerth, A., 2016. Impairments of neural circuit function in Alzheimer's disease. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 371, 20150429. doi:10.1098/rstb.2015.0429
- Calder, P.C., 2009. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: New twists in an old tale. *Biochimie* 91, 791–795. doi:10.1016/j.biochi.2009.01.008
- CALDER, P.C., 2004. *n* 3 Fatty acids and cardiovascular disease: evidence explained and mechanisms explored. *Clin. Sci.* 107, 1–11. doi:10.1042/CS20040119
- Camacho, M.E., Carrion, M.D., Lopez-Cara, L.C., Entrena, A., Gallo, M.A., Espinosa, A., Escames, G., Acuna-Castroviejo, D., 2012. Melatonin synthetic analogs as nitric oxide synthase inhibitors. *Mini Rev. Med. Chem.* 12, 600–17.
- CAMPBELL, A., 2004. Inflammation, Neurodegenerative Diseases, and Environmental Exposures. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1035, 117–132. doi:10.1196/annals.1332.008
- Canagarajah, B.J., Khokhlatchev, A., Cobb, M.H., Goldsmith, E.J., Goldsmith, E.J., McCaffrey, P.G., Chambers, S.P., Su, M.S.-S., Bartleson, C., Graves, D.J., al., et, 1997. Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation. *Cell* 90, 859–69. doi:10.1016/S0092-8674(00)80351-7
- Cardinali, D.P., Furio, A.M., Brusco, L.I., 2011. The use of chronobiotics in the resynchronization of the sleep/wake cycle. Therapeutical application in the early phases of Alzheimer's disease. *Recent Pat. Endocr. Metab. Immune Drug Discov.* 5, 80–90.
- Carlton, E.D., Demas, G.E., French, S.S., 2012. Leptin, a neuroendocrine mediator of immune responses, inflammation, and sickness behaviors. *Horm. Behav.* 62, 272–279. doi:10.1016/j.yhbeh.2012.04.010
- Carpentieri, A., Díaz de Barboza, G., Areco, V., Peralta López, M., Tolosa de Talamoni, N., 2012. New perspectives in melatonin uses. *Pharmacol. Res.* 65, 437–44. doi:10.1016/j.phrs.2012.01.003
- Chan, J.L., Heist, K., DePaoli, A.M., Veldhuis, J.D., Mantzoros, C.S., 2003. The role of falling leptin levels in the neuroendocrine and metabolic adaptation to short-term starvation in healthy men. *J. Clin. Invest.* 111, 1409–21. doi:10.1172/JCI17490
- Chang, K.-H., de Pablo, Y., Lee, H., Lee, H., Smith, M.A., Shah, K., 2010. Cdk5 is a major regulator of p38 cascade: relevance to neurotoxicity in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 113, 1221–9. doi:10.1111/j.1471-4159.2010.06687.x
- Chang, P.K.-Y., Khatchadourian, A., McKinney, R.A., Maysinger, D., 2015. Docosahexaenoic acid (DHA): a modulator of microglia activity and dendritic spine morphology. *J. Neuroinflammation* 12, 34. doi:10.1186/s12974-015-0244-5
- Chatterjee, S., Shi, W.Y., Wilson, P., Mazumdar, A., 1996. Role of lactosylceramide and MAP kinase in the proliferation of proximal tubular cells in human polycystic kidney disease. *J. Lipid Res.* 37, 1334–44.
- Chen, M., Sun, H.-Y., Li, S.-J., Das, M., Kong, J.-M., Gao, T.-M., 2009. Nitric oxide as an upstream signal of p38 mediates hypoxia/reoxygenation-induced neuronal death. *Neurosignals.* 17, 162–8. doi:10.1159/000205525
- Chen, W.-W., Zhang, X., Huang, W.-J., 2016a. Role of neuroinflammation in

Bibliografía

- neurodegenerative diseases (Review). *Mol. Med. Rep.* 13, 3391–6. doi:10.3892/mmr.2016.4948
- Chen, W.-W., Zhang, X., Huang, W.-J., 2016b. Role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases (Review). *Mol. Med. Rep.* 13, 3391–6. doi:10.3892/mmr.2016.4948
- Chen, Y.-R., Tan, T.-H., 1998. Inhibition of the c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling pathway by curcumin. *Oncogene* 17, 173–178. doi:10.1038/sj.onc.1201941
- Chen, Y., Swanson, R.A., 2003. Astrocytes and Brain Injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 23, 137–149. doi:10.1097/01.WCB.0000044631.80210.3C
- Chen, Y., Swanson, R.A., n.d. Astrocytes and Brain Injury. doi:10.1097/01.WCB.0000044631.80210.3C
- Chern, C.-M., Liao, J.-F., Wang, Y.-H., Shen, Y.-C., 2012. Melatonin ameliorates neural function by promoting endogenous neurogenesis through the MT2 melatonin receptor in ischemic-stroke mice. *Free Radic. Biol. Med.* 52, 1634–1647. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.01.030
- Chini, E.N., Choi, E., Grande, J.P., Burnett, J.C., Dousa, T.P., 1995. Adrenomedullin Suppresses Mitogenesis in Rat Mesangial Cells via cAMP Pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 215, 868–873. doi:10.1006/bbrc.1995.2544
- Choudhury, G.G., Karamitsos, C., Hernandez, J., Gentilini, A., Bardgette, J., Abboud, H.E., 1997. PI-3-kinase and MAPK regulate mesangial cell proliferation and migration in response to PDGF. *Am. J. Physiol.* 273, F931-8.
- Cobb, M.H., 1999. MAP kinase pathways. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 71, 479–500.
- Cole, J.A., 1999. Parathyroid Hormone Activates Mitogen-Activated Protein Kinase in Opossum Kidney Cells. *Endocrinology* 140, 5771–5779. doi:10.1210/endo.140.12.7173
- Combs, C.K., Karlo, J.C., Kao, S.C., Landreth, G.E., 2001. beta-Amyloid stimulation of microglia and monocytes results in TNFalpha-dependent expression of inducible nitric oxide synthase and neuronal apoptosis. *J. Neurosci.* 21, 1179–88.
- Coroneos, E., Wang, Y., Panuska, J.R., Templeton, D.J., Kester, M., 1996. Sphingolipid metabolites differentially regulate extracellular signal-regulated kinase and stress-activated protein kinase cascades. *Biochem. J.* 316 (Pt 1), 13–7.
- Coso, O.A., Chiariello, M., Yu, J.C., Teramoto, H., Crespo, P., Xu, N., Miki, T., Gutkind, J.S., 1995. The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. *Cell* 81, 1137–46.
- Court, N.W., dos Remedios, C.G., Cordell, J., Bogoyevitch, M.A., Marshall, C., Goodyear, L., Wang, Y., Huang, S., Han, J., Kass, D., Wang, Y., Molkentin, J., 2002. Cardiac expression and subcellular localization of the p38 mitogen-activated protein kinase member, stress-activated protein kinase-3 (SAPK3). *J. Mol. Cell. Cardiol.* 34, 413–26. doi:10.1006/jmcc.2001.1523
- Crawford, M.A., 2006. Docosahexaenoic Acid in Neural Signaling Systems. *Nutr. Health* 18, 263–276. doi:10.1177/026010600601800309
- Crupi, R., Mazzon, E., Marino, A., La Spada, G., Bramanti, P., Spina, E., Cuzzocrea, S., 2011.

Bibliografía

- Melatonin's stimulatory effect on adult hippocampal neurogenesis in mice persists after ovariectomy. *J. Pineal Res.* 51, 353–360. doi:10.1111/j.1600-079X.2011.00897.x
- Cuenda, A., Cohen, P., Buée-Scherrer, V., Goedert, M., 1997. Activation of stress-activated protein kinase-3 (SAPK3) by cytokines and cellular stresses is mediated via SAPKK3 (MKK6); comparison of the specificities of SAPK3 and SAPK2 (RK/p38). *EMBO J.* 16, 295–305. doi:10.1093/emboj/16.2.295
- Cuenda, A., Dorow, D.S., 1998a. Differential activation of stress-activated protein kinase kinases SKK4/MKK7 and SKK1/MKK4 by the mixed-lineage kinase-2 and mitogen-activated protein kinase kinase (MKK) kinase-1. *Biochem. J.* 333 (Pt 1), 11–5.
- Cuenda, A., Dorow, D.S., 1998b. Differential activation of stress-activated protein kinase kinases SKK4/MKK7 and SKK1/MKK4 by the mixed-lineage kinase-2 and mitogen-activated protein kinase kinase (MKK) kinase-1. *Biochem. J.* 333 (Pt 1), 11–5.
- Cutuli, D., 2017. Functional and Structural Benefits Induced by Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids During Aging. *Curr. Neuropharmacol.* 15, 534–542. doi:10.2174/1570159X14666160614091311
- Dai, H., Hu, W., Jiang, L., Li, L., Gaung, X., Xiao, Z., 2016. p38 MAPK Inhibition Improves Synaptic Plasticity and Memory in Angiotensin II-dependent Hypertensive Mice. *Sci. Rep.* 6, 27600. doi:10.1038/srep27600
- Dashti, S.R., Efimova, T., Eckert, R.L., 2001. MEK7-dependent activation of p38 MAP kinase in keratinocytes. *J. Biol. Chem.* 276, 8059–63. doi:10.1074/jbc.C000862200
- Deacon, K., Mistry, P., Chernoff, J., Blank, J.L., Patel, R., 2003. p38 Mitogen-activated protein kinase mediates cell death and p21-activated kinase mediates cell survival during chemotherapeutic drug-induced mitotic arrest. *Mol. Biol. Cell* 14, 2071–87. doi:10.1091/mbc.E02-10-0653
- Deak, M., Clifton, A.D., Lucocq, L.M., Alessi, D.R., 1998. Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB. *EMBO J.* 17, 4426–4441. doi:10.1093/emboj/17.15.4426
- Delegge, M.H., Smoke, A., 2016. Invited Review Neurodegeneration and Inflammation 35–41.
- Dérjard, B., Raingeaud, J., Barrett, T., Wu, I.H., Han, J., Ulevitch, R.J., Davis, R.J., 1995. Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science* 267, 682–5.
- Di Biase, A., Salvati, S., Di Benedetto, R., Attorri, L., Martinelli, A., Malchiodi, F., 2014. Eicosapentaenoic acid pre-treatment reduces biochemical changes induced in total brain and myelin of weanling Wistar rats by cuprizone feeding. *Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty Acids* 90, 99–104. doi:10.1016/j.plefa.2013.11.004
- Doza, Y.N., Cuenda, A., Thomas, G.M., Cohen, P., Nebreda, A.R., 1995. Activation of the MAP kinase homologue RK requires the phosphorylation of Thr-180 and Tyr-182 and both residues are phosphorylated in chemically stressed KB cells. *FEBS Lett.* 364.
- Duffy, C.M., Xu, H., Nixon, J.P., Bernlohr, D.A., Butterick, T.A., 2017. Identification of a fatty acid binding protein4-UCP2 axis regulating microglial mediated

Bibliografía

- neuroinflammation. *Mol. Cell. Neurosci.* 80, 52–57. doi:10.1016/j.mcn.2017.02.004
- Duffy, C.M., Xu, H., Nixon, J.P., Bernlohr, D.A., Butterick, T.A., 2017. Identification of a fatty acid binding protein4-UCP2 axis regulating microglial mediated neuroinflammation. doi:10.1016/j.mcn.2017.02.004
- Duffy, C.M., Yuan, C., Wisdorf, L.E., Billington, C.J., Kotz, C.M., Nixon, J.P., Butterick, T.A., 2015. Role of orexin A signaling in dietary palmitic acid-activated microglial cells. *Neurosci. Lett.* 606, 140–144. doi:10.1016/j.neulet.2015.08.033
- Duffy, C.M., Yuan, C., Wisdorf, L.E., Billington, C.J., Kotz, C.M., Nixon, J.P., Butterick, T.A., 2015a. Role of orexin A signaling in dietary palmitic acid-activated microglial cells. *Neurosci. Lett.* 606, 140–4. doi:10.1016/j.neulet.2015.08.033
- Duffy, C.M., Yuan, C., Wisdorf, L.E., Billington, C.J., Kotz, C.M., Nixon, J.P., Butterick, T.A., 2015b. Role of orexin A signaling in dietary palmitic acid-activated microglial cells. *Neurosci Lett* 606, 140–144. doi:10.1016/j.neulet.2015.08.033
- Dumas, J.A., Bunn, J.Y., Nickerson, J., Crain, K.I., Ebenstein, D.B., Tarleton, E.K., Makarewicz, J., Poynter, M.E., Kien, C.L., 2016. Dietary saturated fat and monounsaturated fat have reversible effects on brain function and the secretion of pro-inflammatory cytokines in young women ☆ , ☆☆. doi:10.1016/j.metabol.2016.08.003
- Durakogluligil, M., Irving, A.J., Harvey, J., 2005. Leptin induces a novel form of NMDA receptor-dependent long-term depression. *J. Neurochem.* 95, 396–405. doi:10.1111/j.1471-4159.2005.03375.x
- Dyall, S.C., Mandhair, H.K., Fincham, R.E.A., Kerr, D.M., Roche, M., Molina-Holgado, F., 2016. Distinctive effects of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in regulating neural stem cell fate are mediated via endocannabinoid signalling pathways. *Neuropharmacology* 107, 387–395. doi:10.1016/j.neuropharm.2016.03.055
- Eddleston, M., Mucke, L., 1993. Molecular profile of reactive astrocytes--implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience* 54, 15–36.
- Eder, J., 1997. Tumour necrosis factor alpha and interleukin 1 signalling: do MAPKK kinases connect it all? *Trends Pharmacol. Sci.* 18, 319–22.
- Elsayed, M., Magistretti, P.J., Steiner, J., Spittau, B., 2015. A New Outlook on Mental Illnesses: Glial Involvement Beyond the Glue. *Front. Cell. Neurosci* 9. doi:10.3389/fncel.2015.00468
- Enslin, H., Raingeaud, J., Davis, R.J., 1998. Selective activation of p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase isoforms by the MAP kinase kinases MKK3 and MKK6. *J. Biol. Chem.* 273, 1741–8.
- Eskelinen, M.H., Ngandu, T., Helkala, E., Tuomilehto, J., Nissinen, A., Soininen, H., Kivipelto, M., 2008. Fat intake at midlife and cognitive impairment later in life: a population-based CAIDE study. *Int. J. Geriatr. Psychiatry* 23, 741–747. doi:10.1002/gps.1969
- Eposito, E., Cuzzocrea, S., 2010. Antiinflammatory activity of melatonin in central nervous system. *Curr. Neuropharmacol.* 8, 228–42. doi:10.2174/157015910792246155

Bibliografía

- Ettcheto, M., Petrov, D., Pedrós, I., Alva, N., Carbonell, T., Beas-Zarate, C., Pallas, M., Auladell, C., Folch, J., Camins, A., 2016. Evaluation of Neuropathological Effects of a High-Fat Diet in a Presymptomatic Alzheimer's Disease Stage in APP/PS1 Mice. *J. Alzheimer's Dis.* 54, 233–251. doi:10.3233/JAD-160150
- Eyers, P.A., Craxton, M., Morrice, N., Cohen, P., Goedert, M., 1998. Conversion of SB 203580-insensitive MAP kinase family members to drug-sensitive forms by a single amino-acid substitution. *Chem. Biol.* 5, 321–8.
- Feng, Z., Zhang, J., 2004. Protective effect of melatonin on β -amyloid-induced apoptosis in rat astrogloma c6 cells and its mechanism. *Free Radic. Biol. Med.* 37, 1790–1801. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2004.08.023
- Feng et al, 2004. Protective effect of melatonin on beta-amyloid-induced apoptosis in rat astrogloma c6 cells and its mechanism. *Free Radic Biol Med.*
- Fernández-Riejós, P., Najib, S., Santos-Alvarez, J., Martín-Romero, C., Pérez-Pérez, A., González-Yanes, C., Sánchez-Margalet, V., 2010. Role of Leptin in the Activation of Immune Cells. *Mediators Inflamm.* 2010, 1–8. doi:10.1155/2010/568343
- Fischer, R., Maier, O., 2015a. Interrelation of oxidative stress and inflammation in neurodegenerative disease: role of TNF. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2015, 610813. doi:10.1155/2015/610813
- Fischer, R., Maier, O., 2015b. Interrelation of oxidative stress and inflammation in neurodegenerative disease: role of TNF. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2015, 610813. doi:10.1155/2015/610813
- Fischer, R., Maier, O., n.d. Interrelation of Oxidative Stress and Inflammation in Neurodegenerative Disease: Role of TNF. doi:10.1155/2015/610813
- Folch, J., Patraca, I., Martínez, N., Pedrós, I., Petrov, D., Ettcheto, M., Abad, S., Marin, M., Beas-Zarate, C., Camins, A., 2015. The role of leptin in the sporadic form of Alzheimer's disease. Interactions with the adipokines amylin, ghrelin and the pituitary hormone prolactin. *Life Sci.* 140, 19–28. doi:10.1016/j.lfs.2015.05.002
- Folch, J., Pedrós, I., Patraca, I., Martínez, N., Sureda, F., Camins, A., 2013. Metabolic basis of sporadic Alzheimer's disease. role of hormones related to energy metabolism. *Curr. Pharm. Des.* 19, 6739–48.
- Folch, J., Pedros, I., Patraca, I., Sureda, F., Junyent, F., Beas-Zarate, C., Verdaguer, E., Pallas, M., Auladell, C., Camins, A., 2012. Neuroprotective and anti-ageing role of leptin. *J. Mol. Endocrinol.* 49, R149–R156. doi:10.1530/JME-12-0151
- Förstermann, U., Sessa, W.C., 2012. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur. Heart J.* 33, 829–37, 837a–837d. doi:10.1093/eurheartj/ehr304
- Freshney, N.W., Rawlinson, L., Guesdon, F., Jones, E., Cowley, S., Hsuan, J., Saklatvala, J., Woodgett, J.R., Cowley, S., 1994. Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. *Cell* 78, 1039–49. doi:10.1016/0092-8674(94)90278-X
- Fu, J., Zhao, S.-D., Liu, H.-J., Yuan, Q.-H., Liu, S.-M., Zhang, Y.-M., Ling, E.-A., Hao, A.-J., 2011. Melatonin promotes proliferation and differentiation of neural stem cells subjected to hypoxia in vitro. *J. Pineal Res.* 51, 104–112. doi:10.1111/j.1600-079X.2011.00867.x

Bibliografía

- Fukunaga, R., Hunter, T., 1997. MNK1, a new MAP kinase-activated protein kinase, isolated by a novel expression screening method for identifying protein kinase substrates. *EMBO J.* 16, 1921–1933. doi:10.1093/emboj/16.8.1921
- García-Martín, E., Majewska, A.K., Guizzetti, M., Jäkel, S., Dimou, L., 2017. Glial Cells and Their Function in the Adult Brain: A Journey through the History of Their Ablation. doi:10.3389/fncel.2017.00024
- Garrington, T.P., Johnson, G.L., 1999. Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11, 211–8.
- Ge, B., Gram, H., Di Padova, F., Huang, B., New, L., Ulevitch, R.J., Luo, Y., Han, J., 2002. MAPKK-Independent Activation of p38alpha Mediated by TAB1-Dependent Autophosphorylation of p38alpha. *Science* (80-.). 295, 1291–1294. doi:10.1126/science.1067289
- Ge, B., Xiong, X., Jing, Q., Mosley, J.L., Filose, A., Bian, D., Huang, S., Han, J., 2003. TAB1beta (Transforming Growth Factor-beta -activated Protein Kinase 1-binding Protein 1beta), a Novel Splicing Variant of TAB1 That Interacts with p38alpha but Not TAK1. *J. Biol. Chem.* 278, 2286–2293. doi:10.1074/jbc.M210918200
- Ge, J.-F., Qi, C.-C., Zhou, J.-N., 2013. Imbalance of leptin pathway and hypothalamus synaptic plasticity markers are associated with stress-induced depression in rats. *Behav. Brain Res.* 249, 38–43. doi:10.1016/j.bbr.2013.04.020
- Gehrmann, J., Matsumoto, Y., Kreutzberg, G.W., 1995. Microglia: Intrinsic immunoeffector cell of the brain. *Brain Res. Rev.* 20, 269–287. doi:10.1016/0165-0173(94)00015-H
- Glass, C.K., Saijo, K., Winner, B., Marchetto, M.C., Gage, F.H., 2010. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell* 140, 918–34. doi:10.1016/j.cell.2010.02.016
- Glogowski, E.A., Tsiani, E., Zhou, X., Fantus, I.G., Whiteside, C., 1999. High glucose alters the response of mesangial cell protein kinase C isoforms to endothelin-1. *Kidney Int.* 55, 486–499. doi:10.1046/j.1523-1755.1999.00284.x
- González-Scarano, F., Baltuch, G., 1999. MICROGLIA AS MEDIATORS OF INFLAMMATORY AND DEGENERATIVE DISEASES. *Annu. Rev. Neurosci.* 22, 219–240. doi:10.1146/annurev.neuro.22.1.219
- Goppelt-Struebe, M., Fickel, S., Reiser, C.O., 2000. The platelet-derived-growth-factor receptor, not the epidermal-growth-factor receptor, is used by lysophosphatidic acid to activate p42/44 mitogen-activated protein kinase and to induce prostaglandin G/H synthase-2 in mesangial cells. *Biochem. J.* 345 Pt 2, 217–24.
- Gosselin, D., Rivest, S., 2007. Role of IL-1 and TNF in the brain: Twenty years of progress on a Dr. Jekyll/Mr. Hyde duality of the innate immune system. *Brain. Behav. Immun.* 21, 281–289. doi:10.1016/j.bbi.2006.12.004
- Graeber et al, 2011. Role of microglia in cns inflammation. *FEBS Lett.*
- Granholt, A.-C., Bimonte-Nelson, H.A., Moore, A.B., Nelson, M.E., Freeman, L.R., Sambamurti, K., 2008. Effects of a saturated fat and high cholesterol diet on memory and hippocampal morphology in the middle-aged rat. *J. Alzheimers. Dis.* 14, 133–45.

Bibliografía

- Grant, R., Guest, J., 2016. Role of Omega-3 PUFAs in Neurobiological Health, in: *Advances in Neurobiology*. pp. 247–274. doi:10.1007/978-3-319-28383-8_13
- Grewal, J.S., Mukhin, Y. V, Garnovskaya, M.N., Raymond, J.R., Greene, E.L., 1999. Serotonin 5-HT_{2A} receptor induces TGF-β₁ expression in mesangial cells via ERK: proliferative and fibrotic signals. *Am. J. Physiol.* 276, F922-30.
- Grimm, M.O.W., Mett, J., Stahlmann, C.P., Haupenthal, V.J., Blümel, T., Stötzel, H., Grimm, H.S., Hartmann, T., 2016. Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid increase the degradation of amyloid-β by affecting insulin-degrading enzyme ¹. *Biochem. Cell Biol.* 94, 534–542. doi:10.1139/bcb-2015-0149
- Grintal, B., Champeil-Potokar, G., Lavialle, M., Vancassel, S., Breton, S., Denis, I., 2009. Inhibition of astroglial glutamate transport by polyunsaturated fatty acids: Evidence for a signalling role of docosahexaenoic acid. *Neurochem. Int.* 54, 535–543. doi:10.1016/j.neuint.2009.02.018
- Groom, L.A., Sneddon, A.A., Alessi, D.R., Dowd, S., Keyse, S.M., 1996. Differential regulation of the MAP, SAP and RK/p38 kinases by Pyst1, a novel cytosolic dual-specificity phosphatase. *EMBO J.* 15, 3621–32.
- Gum, R.J., McLaughlin, M.M., Kumar, S., Wang, Z., Bower, M.J., Lee, J.C., Adams, J.L., Livi, G.P., Goldsmith, E.J., Young, P.R., 1998. Acquisition of sensitivity of stress-activated protein kinases to the p38 inhibitor, SB 203580, by alteration of one or more amino acids within the ATP binding pocket. *J. Biol. Chem.* 273, 15605–10.
- Gunstone, F.D., 1999. Enzymes as biocatalysts in the modification of natural lipids. *J. Sci. Food Agric.* 79, 1535–1549. doi:10.1002/(SICI)1097-0010(199909)79:12<1535::AID-JSFA430>3.0.CO;2-7
- Gupta, S., Campbell, D., Dérijard, B., Davis, R.J., 1995. Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway. *Science* 267, 389–93.
- Gupta, S., Knight, A.G., Gupta, S., Keller, J.N., Bruce-Keller, A.J., 2012a. Saturated long-chain fatty acids activate inflammatory signaling in astrocytes. *J. Neurochem.* 120, 1060–71. doi:10.1111/j.1471-4159.2012.07660.x
- Gupta, S., Knight, A.G., Gupta, S., Keller, J.N., Bruce-Keller, A.J., 2012b. Saturated long-chain fatty acids activate inflammatory signaling in astrocytes. *J. Neurochem.* 120, 1060–71. doi:10.1111/j.1471-4159.2012.07660.x
- Hale, K.K., Trollinger, D., Rihaneck, M., Manthey, C.L., 1999. Differential expression and activation of p38 mitogen-activated protein kinase alpha, beta, gamma, and delta in inflammatory cell lineages. *J. Immunol.* 162, 4246–52.
- Hampton, D., Rhodes, K., Zhao, C., Franklin, R.J., Fawcett, J., 2004. The responses of oligodendrocyte precursor cells, astrocytes and microglia to a cortical stab injury, in the brain. *Neuroscience* 127, 813–820. doi:10.1016/j.neuroscience.2004.05.028
- Han, J., Lee, J.D., Bibbs, L., Ulevitch, R.J., 1994. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* 265, 808–11.
- Hanisch, U.-K., 2002a. Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* 40, 140–155. doi:10.1002/glia.10161
- Hanisch, U.-K., 2002b. Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* 40, 140–155.

Bibliografía

- doi:10.1002/glia.10161
- Hansen, M.B., Nielsen, S.E., Berg, K., 1989. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J. Immunol. Methods* 119, 203–10.
- Harry, G.J., n.d. Microglia During Development and Aging. doi:10.1016/j.pharmthera.2013.04.013
- Hashimoto, R., Matsumoto, A., Udagawa, J., Hioki, K., Otani, H., 2013. Effect of leptin administration on myelination in ob/ob mouse cerebrum after birth. *Neuroreport* 24, 22–9. doi:10.1097/WNR.0b013e32835ba875
- Hazzalin, C.A., Cano, E., Cuenda, A., Barratt, M.J., Cohen, P., Mahadevan, L.C., 1996. p38/RK is essential for stress-induced nuclear responses: JNK/SAPKs and c-Jun/ATF-2 phosphorylation are insufficient. *Curr. Biol.* 6, 1028–1031. doi:10.1016/S0960-9822(02)00649-8
- Herrera-Molina, R., Flores, B., Orellana, J.A., von Bernhardt, R., 2012. Modulation of interferon- γ -induced glial cell activation by transforming growth factor β 1: a role for STAT1 and MAPK pathways. *J. Neurochem.* 123, 113–23. doi:10.1111/j.1471-4159.2012.07887.x
- Hudert, C.A., Weylandt, K.H., Lu, Y., Wang, J., Hong, S., Dignass, A., Serhan, C.N., Kang, J.X., 2006. Transgenic mice rich in endogenous omega-3 fatty acids are protected from colitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 11276–81. doi:10.1073/pnas.0601280103
- Huot, J., Houle, F., Marceau, F., Landry, J., 1997. Oxidative stress-induced actin reorganization mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase/heat shock protein 27 pathway in vascular endothelial cells. *Circ. Res.* 80, 383–92.
- Hwang, D.H., Kim, J.-A., Lee, J.Y., 2016. Mechanisms for the activation of Toll-like receptor 2/4 by saturated fatty acids and inhibition by docosahexaenoic acid. *Eur. J. Pharmacol.* 785, 24–35. doi:10.1016/j.ejphar.2016.04.024
- Innis, S.M., 2016. Palmitic Acid in Early Human Development. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 56, 1952–1959. doi:10.1080/10408398.2015.1018045
- Ionov, M., Burchell, V., Klajnert, B., Bryszewska, M., Abramov, A.Y., 2011. Mechanism of neuroprotection of melatonin against beta-amyloid neurotoxicity. *Neuroscience* 180, 229–237. doi:10.1016/j.neuroscience.2011.02.045
- Ionov et al, 2011. Mechanism of neuroprotection of melatonin against beta-amyloid neurotoxicity. *Neuroscience*.
- Jackson, J.R., Bolognese, B., Hillegass, L., Kassis, S., Adams, J., Griswold, D.E., Winkler, J.D., 1998. Pharmacological effects of SB 22025, a selective inhibitor of P38 mitogen-activated protein kinase, in angiogenesis and chronic inflammatory disease models. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 284, 687–92.
- Jankowsky, J.L., Patterson, P.H., 1999. Cytokine and Growth Factor Involvement in Long-Term Potentiation. *Mol. Cell. Neurosci.* 14, 273–286. doi:10.1006/mcne.1999.0792
- Janssen, C.I.F., Kiliaan, A.J., 2014. Long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) from genesis to senescence: The influence of LCPUFA on neural development, aging, and

Bibliografía

- neurodegeneration. *Prog. Lipid Res.* 53, 1–17. doi:10.1016/j.plipres.2013.10.002
- Jeong, J.-K., Moon, M.-H., Lee, Y.-J., Seol, J.-W., Park, S.-Y., 2012. Melatonin-induced autophagy protects against human prion protein-mediated neurotoxicity. *J. Pineal Res.* 53, 138–46. doi:10.1111/j.1600-079X.2012.00980.x
- Ji, R.-R., Suter, M.R., 2007. p38 MAPK, Microglial Signaling, and Neuropathic Pain. *Mol. Pain* 3, 1744-8069-3–33. doi:10.1186/1744-8069-3-33
- Jiang, Y., Gram, H., Zhao, M., New, L., Gu, J., Feng, L., Di Padova, F., Ulevitch, R.J., Han, J., 1997. Characterization of the structure and function of the fourth member of p38 group mitogen-activated protein kinases, p38delta. *J. Biol. Chem.* 272, 30122–8. doi:10.1074/JBC.272.48.30122
- Johnston, J.M., Greco, S.J., Hamzelou, A., Ashford, J.W., Tezapsidis, N., 2011. Repositioning leptin as a therapy for Alzheimer's disease. *Ther. (London, Engl. 2004)* 8, 481–490. doi:10.2217/thy.11.57
- Jump, D.B., 2002. The biochemistry of n-3 polyunsaturated fatty acids. *J. Biol. Chem.* 277, 8755–8. doi:10.1074/jbc.R100062200
- Kaminska, B., Gozdz, A., Zawadzka, M., Ellert-Miklaszewska, A., Lipko, M., 2009. MAPK signal transduction underlying brain inflammation and gliosis as therapeutic target. *Anat. Rec. (Hoboken)*. 292, 1902–13. doi:10.1002/ar.21047
- Kang, J.X., Wang, J., Wu, L., Kang, Z.B., 2004. Transgenic mice: Fat-1 mice convert n-6 to n-3 fatty acids. *Nature* 427, 504–504. doi:10.1038/427504a
- Kanoski, S.E., Davidson, T.L., 2011. Western diet consumption and cognitive impairment: Links to hippocampal dysfunction and obesity. *Physiol. Behav.* 103, 59–68. doi:10.1016/j.physbeh.2010.12.003
- Karin, M., Liu, Z. g, Zandi, E., 1997. AP-1 function and regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 240–6.
- Kempuraj, D., Thangavel, R., Natteru, P., Selvakumar, G., Saeed, D., Zahoor, H., Zaheer, S., Iyer, S., Zaheer, A., 2016. Neuroinflammation Induces Neurodegeneration HHS Public Access. *J Neurol Neurosurg Spine* 1.
- Kennedy, A., Martinez, K., Chuang, C.-C., LaPoint, K., McIntosh, M., 2008. Saturated Fatty Acid-Mediated Inflammation and Insulin Resistance in Adipose Tissue: Mechanisms of Action and Implications. *J. Nutr.* 139, 1–4. doi:10.3945/jn.108.098269
- Keyse, S.M., 2000. Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 186–92.
- Keyse, S.M., 1995. An emerging family of dual specificity MAP kinase phosphatases. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1265, 152–160. doi:10.1016/0167-4889(94)00211-V
- Khandelwal, P.J., Herman, A.M., Moussa, C.E.-H., 2011. Inflammation in the early stages of neurodegenerative pathology. *J. Neuroimmunol.* 238, 1–11. doi:10.1016/j.jneuroim.2011.07.002
- Kilic, U., Yilmaz, B., Ugur, M., Y?ksel, A., Reiter, R.J., Hermann, D.M., Kilic, E., 2012. Evidence that membrane-bound G protein-coupled melatonin receptors MT1 and MT2 are not involved in the neuroprotective effects of melatonin in focal cerebral

Bibliografía

- ischemia. *J. Pineal Res.* 52, 228–235. doi:10.1111/j.1600-079X.2011.00932.x
- Kim, E.K., Choi, E.-J., 2015. Compromised MAPK signaling in human diseases: an update. *Arch. Toxicol.* 89, 867–882. doi:10.1007/s00204-015-1472-2
- Kim, E.K., Choi, E.-J., 2010. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1802, 396–405. doi:10.1016/j.bbadis.2009.12.009
- Kondreddy, V.K.R., Kamatham, A.N., 2016. Celecoxib, a COX-2 inhibitor, synergistically potentiates the anti-inflammatory activity of docosahexaenoic acid in macrophage cell line. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 38, 153–161. doi:10.3109/08923973.2016.1147578
- Kramer, R.M., Roberts, E.F., Um, S.L., Börsch-Haubold, A.G., Watson, S.P., Fisher, M.J., Jakubowski, J.A., 1996. p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylates cytosolic phospholipase A2 (cPLA2) in thrombin-stimulated platelets. Evidence that proline-directed phosphorylation is not required for mobilization of arachidonic acid by cPLA2. *J. Biol. Chem.* 271, 27723–9.
- Kreutzberg, G.W., 1996. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.* 19, 312–8.
- Kulkarni, O.P., Lichtnekert, J., Anders, H.-J., Mulay, S.R., 2016. The Immune System in Tissue Environments Regaining Homeostasis after Injury: Is ?Inflammation? Always Inflammation? *Mediators Inflamm.* 2016, 1–9. doi:10.1155/2016/2856213
- Kumar, S., McDonnell, P.C., Gum, R.J., Hand, A.T., Lee, J.C., Young, P.R., 1997. Novel Homologues of CSBP/p38 MAP Kinase: Activation, Substrate Specificity and Sensitivity to Inhibition by Pyridinyl Imidazoles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 235, 533–538. doi:10.1006/bbrc.1997.6849
- Kyriakis, J.M., Avruch, J., 1996. Protein kinase cascades activated by stress and inflammatory cytokines. *BioEssays* 18, 567–577. doi:10.1002/bies.950180708
- Laine, P.S., Schwartz, E.A., Wang, Y., Zhang, W.-Y., Karnik, S.K., Musi, N., Reaven, P.D., 2007a. Palmitic acid induces IP-10 expression in human macrophages via NF- κ B activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 358, 150–155. doi:10.1016/j.bbrc.2007.04.092
- Laine, P.S., Schwartz, E.A., Wang, Y., Zhang, W.-Y., Karnik, S.K., Musi, N., Reaven, P.D., 2007b. Palmitic acid induces IP-10 expression in human macrophages via NF- κ B activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 358, 150–155. doi:10.1016/j.bbrc.2007.04.092
- Lam, Q.L.K., Lu, L., 2007. Role of leptin in immunity. *Cell. Mol. Immunol.* 4, 1–13.
- Lechner, C., Zahalka, M.A., Giot, J.F., Møller, N.P., Ullrich, A., 1996. ERK6, a mitogen-activated protein kinase involved in C2C12 myoblast differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 4355–9.
- Lee, I.-C., Kim, S.-H., Lee, S.-M., Baek, H.-S., Moon, C., Kim, S.-H., Park, S.-C., Kim, H.-C., Kim, J.-C., 2012. Melatonin attenuates gentamicin-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rats. *Arch. Toxicol.* 86, 1527–36. doi:10.1007/s00204-012-0849-8

Bibliografía

- Lee, L.F., Li, G., Templeton, D.J., Ting, J.P., 1998. Paclitaxel (Taxol)-induced gene expression and cell death are both mediated by the activation of c-Jun NH2-terminal kinase (JNK/SAPK). *J. Biol. Chem.* 273, 28253–60.
- Lee, Y., Morrison, B.M., Li, Y., Lengacher, S., Farah, M.H., Hoffman, P.N., Liu, Y., Tsingalia, A., Jin, L., Zhang, P.-W., Pellerin, L., Magistretti, P.J., Rothstein, J.D., 2012. Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration HHS Public Access. *Nature*. July 26, 443–448. doi:10.1038/nature11314
- Li, H., Zhou, S., Wu, L., Liu, K., Zhang, Y., Ma, G., Wang, L., 2015. The role of p38MAPK signal pathway in the neuroprotective mechanism of limb postconditioning against rat cerebral ischemia/reperfusion injury. *J. Neurol. Sci.* 357, 270–275. doi:10.1016/j.jns.2015.08.004
- Li, Z., Jiang, Y., Ulevitch, R.J., Han, J., 1996. The Primary Structure of p38?: A New Member of p38 Group of MAP Kinases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 228, 334–340. doi:10.1006/bbrc.1996.1662
- Lieberman, A.P., Pithatt, P.M., Shint, H.S., Shin, M.L., 1989. Production of tumor necrosis factor and other cytokines by astrocytes stimulated with lipopolysaccharide or a neurotropic virus (interleukin 1/type I interferons/interleukin 6). *Med. Sci.* 86, 6348–6352.
- Lin, A., Minden, A., Martinetto, H., Claret, F.X., Lange-Carter, C., Mercurio, F., Johnson, G.L., Karin, M., 1995. Identification of a dual specificity kinase that activates the Jun kinases and p38-Mpk2. *Science* 268, 286–90.
- Liu, B., Hong, J.-S., 2003. Role of microglia in inflammation-mediated neurodegenerative diseases: mechanisms and strategies for therapeutic intervention. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 304, 1–7. doi:10.1124/jpet.102.035048
- Liu, B., Hong, J.-S., 2003. Role of Microglia in Inflammation-Mediated Neurodegenerative Diseases: Mechanisms and Strategies for Therapeutic Intervention. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 304, 1–7. doi:10.1124/jpet.102.035048
- Lu, X.-Y., Kim, C.S., Frazer, A., Zhang, W., 2006. Leptin: A potential novel antidepressant. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 1593–1598. doi:10.1073/pnas.0508901103
- Manda, K., Reiter, R.J., 2010. Melatonin maintains adult hippocampal neurogenesis and cognitive functions after irradiation. *Prog. Neurobiol.* 90, 60–68. doi:10.1016/j.pneurobio.2009.10.019
- Marion-Letellier, R., Savoye, G., Ghosh, S., 2015. Polyunsaturated fatty acids and inflammation. *IUBMB Life* 67, 659–667. doi:10.1002/iub.1428
- Martin, S.S., Qasim, A., Reilly, M.P., 2008. Leptin resistance: a possible interface of inflammation and metabolism in obesity-related cardiovascular disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* 52, 1201–10. doi:10.1016/j.jacc.2008.05.060
- Martins de Lima-Salgado, T., Coccuzzo Sampaio, S., Fernanda Cury-Boaventura, M., Curi, R., 2011. Modulatory effect of fatty acids on fungicidal activity, respiratory burst and TNF- α and IL-6 production in J774 murine macrophages. *Br. J. Nutr.* 105, 1173–1179. doi:10.1017/S0007114510004873
- Mataix Verdu, J., Serra Majem, L., Sánchez de Medina, F., J., S. i S., M.H.J.Alfredo, Lopez Frías, M., Maldonado Lozano, J., 2009. No Title, 2n ed. ed. Madrid: Ergon.

Bibliografía

- McNamara, R.K., Carlson, S.E., 2006. Role of omega-3 fatty acids in brain development and function: Potential implications for the pathogenesis and prevention of psychopathology. *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fat. Acids* 75, 329–349. doi:10.1016/j.plefa.2006.07.010
- Molinar-Toribio, E., Pérez-Jiménez, J., Ramos-Romero, S., Romeu, M., Giralt, M., Taltavull, N., Muñoz-Cortes, M., Jáuregui, O., Méndez, L., Medina, I., Torres, J.L., 2015. Effect of n-3 PUFA supplementation at different EPA:DHA ratios on the spontaneously hypertensive obese rat model of the metabolic syndrome. *Br. J. Nutr.* 113, 878–887. doi:10.1017/S0007114514004437
- Molnár, A., Theodoras, A.M., Zon, L.I., Kyriakis, J.M., 1997. Cdc42Hs, but not Rac1, inhibits serum-stimulated cell cycle progression at G1/S through a mechanism requiring p38/RK. *J. Biol. Chem.* 272, 13229–35.
- Moon, D.-O., Kim, K.-C., Jin, C.-Y., Han, M.-H., Park, C., Lee, K.-J., Park, Y.-M., Choi, Y.H., Kim, G.-Y., 2007. Inhibitory effects of eicosapentaenoic acid on lipopolysaccharide-induced activation in BV2 microglia. *Int. Immunopharmacol.* 7, 222–9. doi:10.1016/j.intimp.2006.10.001
- Morales, I., Guzmán-Martínez, L., Cerda-Troncoso, C., Farías, G.A., Maccioni, R.B., Weissert, R., 2014. CELLULAR NEUROSCIENCE Neuroinflammation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. A rational framework for the search of novel therapeutic approaches. doi:10.3389/fncel.2014.00112
- Morash, B., Li, A., Murphy, P.R., Wilkinson, M., Ur, E., 1999. Leptin Gene Expression in the Brain and Pituitary Gland. *Endocrinology* 140, 5995–5998. doi:10.1210/endo.140.12.7288
- Mori, M.A., Delattre, A.M., Carabelli, B., Pudell, C., Bortolanza, M., Staziaki, P.V., Visentainer, J.V., Montanher, P.F., Del Bel, E.A., Ferraz, A.C., 2017. Neuroprotective effect of omega-3 polyunsaturated fatty acids in the 6-OHDA model of Parkinson's disease is mediated by a reduction of inducible nitric oxide synthase. *Nutr. Neurosci.* 1–11. doi:10.1080/1028415X.2017.1290928
- Moriguchi, T., Toyoshima, F., Masuyama, N., Hanafusa, H., Gotoh, Y., Nishida, E., 1997. A novel SAPK/JNK kinase, MKK7, stimulated by TNFalpha and cellular stresses. *EMBO J.* 16, 7045–53. doi:10.1093/emboj/16.23.7045
- Morris, M.C., Tangney, C.C., 2014. Dietary fat composition and dementia risk. *Neurobiol. Aging* 35 Suppl 2, S59-64. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2014.03.038
- Morrison, D.K., Davis, R.J., 2003. Regulation of MAP Kinase Signaling Modules by Scaffold Proteins in Mammals. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 19, 91–118. doi:10.1146/annurev.cellbio.19.111401.091942
- Munoz, L., Ammit, A.J., 2010. Targeting p38 MAPK pathway for the treatment of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* 58, 561–568. doi:10.1016/j.neuropharm.2009.11.010
- Naruishi, K., Nishimura, F., Yamada-Naruishi, H., Omori, K., Yamaguchi, M., Takashiba, S., 2003. C-Jun N-terminal kinase (JNK) inhibitor, SP600125, blocks interleukin (IL)6-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) production: cyclosporine A partially mimics this inhibitory effect. *Transplantation* 76, 1380–1382. doi:10.1097/01.TP.0000085661.52980.95

Bibliografía

- Nasyrova, R.F., Ivashchenko, D. V, Ivanov, M. V, Neznanov, N.G., 2015. Role of nitric oxide and related molecules in schizophrenia pathogenesis: biochemical, genetic and clinical aspects. *Front. Physiol.* 6, 139. doi:10.3389/fphys.2015.00139
- Nebreda, A.R., Porras, A., 2000. p38 MAP kinases: beyond the stress response. *Trends Biochem. Sci.* 25, 257–260. doi:10.1016/S0968-0004(00)01595-4
- Ness, J.K., Valentino, M., McIver, S.R., Goldberg, M.P., 2005. Identification of oligodendrocytes in experimental disease models. *Glia* 50, 321–328. doi:10.1002/glia.20206
- Neumann, H., 2001. Control of glial immune function by neurons. *Glia* 36, 191–9.
- New, L., Jiang, Y., Zhao, M., Liu, K., Zhu, W., Flood, L.J., Kato, Y., Parry, G.C., Han, J., 1998. PRAK, a novel protein kinase regulated by the p38 MAP kinase. *EMBO J.* 17, 3372–84. doi:10.1093/emboj/17.12.3372
- New, L., Zhao, M., Li, Y., Bassett, W.W., Feng, Y., Ludwig, S., Padova, F.D., Gram, H., Han, J., 1999. Cloning and characterization of RLPK, a novel RSK-related protein kinase. *J. Biol. Chem.* 274, 1026–32.
- Niemoller, T.D., Bazan, N.G., 2010. Docosahexaenoic acid neurolipidomics. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 91, 85–9. doi:10.1016/j.prostaglandins.2009.09.005
- Niranjan, R., Nath, C., Shukla, R., 2010. The mechanism of action of MPTP-induced neuroinflammation and its modulation by melatonin in rat astrocytoma cells, C6. *Free Radic. Res.* 44, 1304–16. doi:10.3109/10715762.2010.501080
- Ohkusu-Tsukada, K., Tominaga, N., Usono, H., Yui, K., 2005. Regulation of the maintenance of peripheral T-cell anergy by TAB1-1 mediated p38alpha activation. *Mol. Cell. Biol.* 25, 8763. doi:10.1128/mcb.25.19.8763.2005
- Ong, W.Y., Levine, J.M., 1999. A light and electron microscopic study of NG2 chondroitin sulfate proteoglycan-positive oligodendrocyte precursor cells in the normal and kainate-lesioned rat hippocampus. *Neuroscience* 92, 83–95.
- Ono, K., Han, J., 2000. The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell. Signal.* 12, 1–13.
- Otero, M., Lago, R., Gomez, R., Dieguez, C., Lago, F., Gómez-Reino, J., Gualillo, O., 2006. Towards a pro-inflammatory and immunomodulatory emerging role of leptin. *Rheumatology (Oxford)*. 45, 944–50. doi:10.1093/rheumatology/ke1157
- Parpura, V., Verkhratsky, A., n.d. Neuroglia at the crossroads of homeostasis, metabolism and signalling: evolution of the concept. doi:10.1042/AN20120019
- Patil, S., Chan, C., 2005a. Palmitic and stearic fatty acids induce Alzheimer-like hyperphosphorylation of tau in primary rat cortical neurons. *Neurosci. Lett.* 384, 288–293. doi:10.1016/j.neulet.2005.05.003
- Patil, S., Chan, C., 2005b. Palmitic and stearic fatty acids induce Alzheimer-like hyperphosphorylation of tau in primary rat cortical neurons. *Neurosci. Lett.* 384, 288–293. doi:10.1016/j.neulet.2005.05.003
- Patil, S., Sheng, L., Masserang, A., Chan, C., 2006a. Palmitic acid-treated astrocytes induce BACE1 upregulation and accumulation of C-terminal fragment of APP in

Bibliografía

- primary cortical neurons. *Neurosci. Lett.* 406, 55–59.
doi:10.1016/j.neulet.2006.07.015
- Patil, S., Sheng, L., Masserang, A., Chan, C., 2006b. Palmitic acid-treated astrocytes induce BACE1 upregulation and accumulation of C-terminal fragment of APP in primary cortical neurons. *Neurosci. Lett.* 406, 55–59.
doi:10.1016/j.neulet.2006.07.015
- Pawate, S., Bhat, N.R., 2006. C-Jun N-Terminal Kinase (JNK) Regulation of iNOS Expression in Glial Cells: Predominant Role of JNK1 Isoform. *Antioxid. Redox Signal.* 8, 903–909. doi:10.1089/ars.2006.8.903
- Pedrós, I., Petrov, D., Allgaier, M., Sureda, F., Barroso, E., Beas-Zarate, C., Auladell, C., Pallàs, M., Vázquez-Carrera, M., Casades, G., Folch, J., Camins, A., 2014. Early alterations in energy metabolism in the hippocampus of APP^{swE}/PS1^{dE9} mouse model of Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1842, 1556–1566. doi:10.1016/j.bbadis.2014.05.025
- Petrov, D., Pedrós, I., Artiach, G., Sureda, F.X., Barroso, E., Pallàs, M., Casades, G., Beas-Zarate, C., Carro, E., Ferrer, I., Vázquez-Carrera, M., Folch, J., Camins, A., 2015a. High-fat diet-induced deregulation of hippocampal insulin signaling and mitochondrial homeostasis deficiencies contribute to Alzheimer disease pathology in rodents. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1852, 1687–1699. doi:10.1016/j.bbadis.2015.05.004
- Petrov, D., Pedrós, I., Artiach, G., Sureda, F.X., Barroso, E., Pallàs, M., Casades, G., Beas-Zarate, C., Carro, E., Ferrer, I., Vázquez-Carrera, M., Folch, J., Camins, A., 2015b. High-fat diet-induced deregulation of hippocampal insulin signaling and mitochondrial homeostasis deficiencies contribute to Alzheimer disease pathology in rodents. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1852, 1687–1699. doi:10.1016/j.bbadis.2015.05.004
- Petrov, D., Pedrós, I., Artiach, G., Sureda, F.X., Barroso, E., Pallàs, M., Casades, G., Beas-Zarate, C., Carro, E., Ferrer, I., Vázquez-Carrera, M., Folch, J., Camins, A., 2015c. High-fat diet-induced deregulation of hippocampal insulin signaling and mitochondrial homeostasis deficiencies contribute to Alzheimer disease pathology in rodents. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1852, 1687–1699. doi:10.1016/j.bbadis.2015.05.004
- Pierrat, B., Correia, J.S., Mary, J.L., Tomás-Zuber, M., Lesslauer, W., 1998. RSK-B, a novel ribosomal S6 kinase family member, is a CREB kinase under dominant control of p38alpha mitogen-activated protein kinase (p38alphaMAPK). *J. Biol. Chem.* 273, 29661–71.
- Pizarro, J.G., Yeste-Velasco, M., Esparza, J.L., Verdaguer, E., Palls, M., Camins, A., Folch, J., 2008. The antiproliferative activity of melatonin in B65 rat dopaminergic neuroblastoma cells is related to the downregulation of cell cycle-related genes. *J. Pineal Res.* 45, 8–16. doi:10.1111/j.1600-079X.2007.00548.x
- Polazzi, E., Contestabile, A., 2002. Reciprocal interactions between microglia and neurons: from survival to neuropathology. *Rev. Neurosci.* 13, 221–42.
- Przedborski, S., Vila, M., Jackson-Lewis, V., 2003. Neurodegeneration: what is it and where are we? *J. Clin. Invest.* 111, 3–10. doi:10.1172/JCI17522

Bibliografía

- Raingeaud, J., Gupta, S., Rogers, J.S., Dickens, M., Han, J., Ulevitch, R.J., Davis, R.J., 1995. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J. Biol. Chem.* 270, 7420–6.
- Raingeaud, J., Whitmarsh, A.J., Barrett, T., Dérjard, B., Davis, R.J., 1996. MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Mol. Cell. Biol.* 16, 1247–55.
- Raivich, G., Bohatschek, M., Kloss, C.U.A., Werner, A., Jones, L.L., Kreutzberg, G.W., 1999. Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Res. Rev.* 30, 77–105.
- Raivich, G., Bohatschek, M., Kloss, C.U., Werner, A., Jones, L.L., Kreutzberg, G.W., 1999. Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Res. Rev.* 30, 77–105.
- Rajkowska, G., Miguel-Hidalgo, J.J., 2007. Gliogenesis and glial pathology in depression. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 6, 219–33.
- Rajkowska, G., Miguel-Hidalgo, J.J., n.d. Gliogenesis and Glial Pathology in Depression.
- Ramesh, G., Maclean, A.G., Philipp, M.T., 2013. Cytokines and Chemokines at the Crossroads of Neuroinflammation, Neurodegeneration, and Neuropathic Pain. *Mediators Inflamm.* 480739. doi:10.1155/2013/480739
- Ramírez-Expósito, M.J., Martínez-Martos, J.M., 1998. [Structure and functions of the macroglia in the central nervous system. Response to degenerative disorders]. *Rev. Neurol.* 26, 600–11.
- Ramirez-Rodriguez, G., Ortíz-López, L., Domínguez-Alonso, A., Benítez-King, G.A., Kempermann, G., 2011. Chronic treatment with melatonin stimulates dendrite maturation and complexity in adult hippocampal neurogenesis of mice. *J. Pineal Res.* 50, 29–37. doi:10.1111/j.1600-079X.2010.00802.x
- Ransohoff, R.M., 2016a. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. *Science (80-.)*. 353, 777–783. doi:10.1126/science.aag2590
- Ransohoff, R.M., 2016b. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. *Science (80-.)*. 353, 777–783. doi:10.1126/science.aag2590
- Reemst, K., Noctor, S.C., Lucassen, P.J., Hol, E.M., Krishnadas, R., Greater Glasgow, N., Nolan, Y., 2016. The Indispensable Roles of Microglia and Astrocytes during Brain Development. doi:10.3389/fnhum.2016.00566
- Rennie, K., De Butte, M., Pappas, B.A., 2009. Melatonin promotes neurogenesis in dentate gyrus in the pinealectomized rat. *J. Pineal Res.* 47, 313–317. doi:10.1111/j.1600-079X.2009.00716.x
- REPPERT, S.M., PERLOW, M.J., TAMARKIN, L., KLEIN, D.C., 1979. A Diurnal Melatonin Rhythm in Primate Cerebrospinal Fluid*. *Endocrinology* 104, 295–301. doi:10.1210/endo-104-2-295
- Reyes-Haro, D., Bulavina, L., Pivneva, T., n.d. La glía, el pegamento de las ideas.
- Rosales-Corral, S.A., Acuña-Castroviejo, D., Coto-Montes, A., Boga, J.A., Manchester, L.C.,

Bibliografía

- Fuentes-Broto, L., Korkmaz, A., Ma, S., Tan, D.-X., Reiter, R.J., 2012. Alzheimer's disease: pathological mechanisms and the beneficial role of melatonin. *J. Pineal Res.* 52, 167–202. doi:10.1111/j.1600-079X.2011.00937.x
- Rosales-Corral, S., Reiter, R.J., Tan, D.-X., Ortiz, G.G., Lopez-Armas, G., 2010. Functional Aspects of Redox Control During Neuroinflammation. *Antioxid. Redox Signal.* 13, 193–247. doi:10.1089/ars.2009.2629
- Rouse, J., Cohen, P., Trigon, S., Morange, M., Alonso-Llamazares, A., Zamanillo, D., Hunt, T., Nebreda, A.R., 1994. A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell* 78, 1027–37.
- Rueda, F., Domingo, J.C., Mach, N., 2011. Efectos de los ácidos grasos omega 3 y otros suplementos alimenticios en procesos patológicos relacionados con la tercera edad. *Rev. Española Nutr. Humana y Dietética* 15, 20–29. doi:10.1016/S2173-1292(11)70004-7
- Russo, V.C., Metaxas, S., Kobayashi, K., Harris, M., Werther, G.A., 2004. Antiapoptotic Effects of Leptin in Human Neuroblastoma Cells. *Endocrinology* 145, 4103–4112. doi:10.1210/en.2003-1767
- Russo, M. V., McGavern, D.B., 2016. Inflammatory neuroprotection following traumatic brain injury. *Science* (80-.). 353, 783–785. doi:10.1126/science.aaf6260
- Sáinz, N., González-Navarro, C.J., Martínez, J.A., Moreno-Aliaga, M.J., 2015. Leptin signaling as a therapeutic target of obesity. *Expert Opin. Ther. Targets* 19, 893–909. doi:10.1517/14728222.2015.1018824
- SAHA, R., PAHAN, K., 2006a. Signals for the induction of nitric oxide synthase in astrocytes. *Neurochem. Int.* 49, 154–163. doi:10.1016/j.neuint.2006.04.007
- SAHA, R., PAHAN, K., 2006b. Signals for the induction of nitric oxide synthase in astrocytes. *Neurochem. Int.* 49, 154–163. doi:10.1016/j.neuint.2006.04.007
- Saha, R.N., Pahan, K., 2006. Regulation of Inducible Nitric Oxide Synthase Gene in Glial Cells. *Antioxid. Redox Signal.* 8, 929–947. doi:10.1089/ars.2006.8.929
- Sáinz, N., Barrenetxe, J., Moreno-Aliaga, M.J., Martínez, J.A., 2015. Leptin resistance and diet-induced obesity: central and peripheral actions of leptin. *Metabolism.* 64, 35–46. doi:10.1016/j.metabol.2014.10.015
- Sanchez-Hidalgo, M., de la Lastra, C.A., Carrascosa-Salmoral, M.P., Naranjo, M.C., Gomez-Corvera, A., Caballero, B., Guerrero, J.M., 2009. Age-related changes in melatonin synthesis in rat extrapineal tissues. *Exp. Gerontol.* 44, 328–334. doi:10.1016/j.exger.2009.02.002
- Sastre, M., Klockgether, T., Heneka, M.T., 2006a. Contribution of inflammatory processes to Alzheimer's disease: molecular mechanisms. *Int. J. Dev. Neurosci.* 24, 167–176. doi:10.1016/j.ijdevneu.2005.11.014
- Sastre, M., Klockgether, T., Heneka, M.T., 2006b. Contribution of inflammatory processes to Alzheimer's disease: molecular mechanisms. *Int. J. Dev. Neurosci.* 24, 167–176. doi:10.1016/j.ijdevneu.2005.11.014
- Sastre et al, 2006. Contribution of inflammatory processes to alzheimer's disease:

Bibliografía

- Molecular mechanisms. *Int J Dev Neurosci.*
- Schoorlemmer, J., Goldfarb, M., 2002. Fibroblast Growth Factor Homologous Factors and the Islet Brain-2 Scaffold Protein Regulate Activation of a Stress-activated Protein Kinase. *J. Biol. Chem.* 277, 49111–49119. doi:10.1074/jbc.M205520200
- Schoorlemmer, J., Goldfarb, M., 2001. Fibroblast growth factor homologous factors are intracellular signaling proteins. *Curr. Biol.* 11, 793–7.
- Sergeeva, M., Strokin, M., Reiser, G., 2005. Regulation of intracellular calcium levels by polyunsaturated fatty acids, arachidonic acid and docosahexaenoic acid, in astrocytes: possible involvement of phospholipase A2. *Reprod. Nutr. Dev.* 45, 633–646. doi:10.1051/rnd:2005050
- Serhan, C.N., Gotlinger, K., Hong, S., Arita, M., 2004. Resolvins, docosatrienes, and neuroprotectins, novel omega-3-derived mediators, and their aspirin-triggered endogenous epimers: an overview of their protective roles in catabasis. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 73, 155–72.
- Serhan, C.N., Hong, S., Gronert, K., Colgan, S.P., Devchand, P.R., Mirick, G., Moussignac, R.-L., 2002. Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals. *J. Exp. Med.* 196, 1025–37. doi:10.1084/jem.20020760
- Shabab, T., Khanabdali, R., Moghadamtousi, S.Z., Kadir, H.A., Mohan, G., 2017. Neuroinflammation pathways: a general review. *Int. J. Neurosci.* 127, 624–633. doi:10.1080/00207454.2016.1212854
- Shanley, L.J., Irving, A.J., Harvey, J., 2001. Leptin enhances NMDA receptor function and modulates hippocampal synaptic plasticity. *J. Neurosci.* 21, RC186.
- Shanley, L.J., O'Malley, D., Irving, A.J., Ashford, M.L., Harvey, J., 2002. Leptin inhibits epileptiform-like activity in rat hippocampal neurones via PI 3-kinase-driven activation of BK channels. *J. Physiol.* 545, 933–44.
- Shi, Z., Resing, K.A., Ahn, N.G., 2006. Networks for the allosteric control of protein kinases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 16, 686–692. doi:10.1016/j.sbi.2006.10.011
- Skinner, D.C., Malpaux, B., 1999. High Melatonin Concentrations in Third Ventricular Cerebrospinal Fluid Are Not due to Galen Vein Blood Recirculating through the Choroid Plexus¹. *Endocrinology* 140, 4399–4405. doi:10.1210/endo.140.10.7074
- Sodhi, A., Montaner, S., Patel, V., Zohar, M., Bais, C., Mesri, E.A., Gutkind, J.S., 2000. The Kaposi's sarcoma-associated herpes virus G protein-coupled receptor up-regulates vascular endothelial growth factor expression and secretion through mitogen-activated protein kinase and p38 pathways acting on hypoxia-inducible factor 1 α . *Cancer Res.* 60, 4873–80.
- Solfrizzi, V., Panza, F., Frisardi, V., Seripa, D., Logroscino, G., Imbimbo, B.P., Pilotto, A., 2011. Diet and Alzheimer's disease risk factors or prevention: the current evidence. *Expert Rev. Neurother.* 11, 677–708. doi:10.1586/ern.11.56
- Stefulj, J., Hörtnner, M., Ghosh, M., Schauenstein, K., Rinner, I., Wölfler, A., Semmler, J., Liebmann, P.M., 2001. Gene expression of the key enzymes of melatonin synthesis in extrapineal tissues of the rat. *J. Pineal Res.* 30, 243–7.

Bibliografía

- Streit, W.J., 2002. Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia* 40, 133–139. doi:10.1002/glia.10154
- Streit, W.J., n.d. The role of microglia in brain injury. *Neurotoxicology* 17, 671–8.
- Streit, W.J., Walter, S.A., Pennell, N.A., 1999. Reactive microgliosis. *Prog. Neurobiol.* 57, 563–581. doi:10.1016/S0301-0082(98)00069-0
- Su, H.-M., 2010. Mechanisms of n-3 fatty acid-mediated development and maintenance of learning memory performance. *J. Nutr. Biochem.* 21, 364–73. doi:10.1016/j.jnutbio.2009.11.003
- Takeda, K., Ichijo, H., 2002. Neuronal p38 MAPK signalling: an emerging regulator of cell fate and function in the nervous system. *Genes Cells* 7, 1099–111.
- Takekawa, M., Maeda, T., Saito, H., 1998. Protein phosphatase 2 α inhibits the human stress-responsive p38 and JNK MAPK pathways. *EMBO J.* 17, 4744–4752. doi:10.1093/emboj/17.16.4744
- Tamura, S., Hanada, M., Ohnishi, M., Katsura, K., Sasaki, M., Kobayashi, T., 2002. Regulation of stress-activated protein kinase signaling pathways by protein phosphatases. *Eur. J. Biochem.* 269, 1060–1066. doi:10.1046/j.0014-2956.2002.02754.x
- Tanno, M., Bassi, R., Gorog, D.A., Saurin, A.T., Jiang, J., Heads, R.J., Martin, J.L., Davis, R.J., Flavell, R.A., Marber, M.S., 2003. Diverse Mechanisms of Myocardial p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Activation: Evidence for MKK-Independent Activation by a TAB1-Associated Mechanism Contributing to Injury During Myocardial Ischemia. *Circ. Res.* 93, 254–261. doi:10.1161/01.RES.0000083490.43943.85
- Tanoue, T., Maeda, R., Adachi, M., Nishida, E., 2001. Identification of a docking groove on ERK and p38 MAP kinases that regulates the specificity of docking interactions. *EMBO J.* 20, 466–79. doi:10.1093/emboj/20.3.466
- Tashiro, H., Takahashi, K., Sadamatsu, H., Kato, G., Kurata, K., Kimura, S., Sueoka-Aragane, N., 2017. Saturated Fatty Acid Increases Lung Macrophages and Augments House Dust Mite-Induced Airway Inflammation in Mice Fed with High-Fat Diet. *Inflammation* 40, 1072–1086. doi:10.1007/s10753-017-0550-4
- Terpolilli, N.A., Moskowitz, M.A., Plesnila, N., 2012. Nitric oxide: considerations for the treatment of ischemic stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 32(12), 1332–1346. doi:10.1038/jcbfm.2012.12
- Thomas, J., Thomas, C.J., Radcliffe, J., Itsiopoulos, C., 2015. Omega-3 Fatty Acids in Early Prevention of Inflammatory Neurodegenerative Disease: A Focus on Alzheimer's Disease. *Biomed Res. Int.* 2015, 172801. doi:10.1155/2015/172801
- Tian, W., Zhang, Z., Cohen, D.M., 2000. MAPK signaling and the kidney. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 279, F593-604.
- Tolppanen, A.-M., Ngandu, T., Kåreholt, I., Laatikainen, T., Rusanen, M., Soininen, H., Kivipelto, M., 2014. Midlife and late-life body mass index and late-life dementia: results from a prospective population-based cohort. *J. Alzheimers. Dis.* 38, 201–9. doi:10.3233/JAD-130698
- Tortarolo, M., Veglianesi, P., Calvaresi, N., Botturi, A., Rossi, C., Giorgini, A., Migheli, A.,

Bibliografía

- Bendotti, C., 2003. Persistent activation of p38 mitogen-activated protein kinase in a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis correlates with disease progression. *Mol. Cell. Neurosci.* 23, 180–92.
- Udagawa, J., Nimura, M., Otani, H., n.d. Leptin affects oligodendroglial development in the mouse embryonic cerebral cortex. *Neuro Endocrinol. Lett.* 27, 177–82.
- Valenzuela B, R., Tapia O, G., González E, M., Valenzuela B, A., 2011. ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3 (EPA Y DHA) Y SU APLICACIÓN EN DIVERSAS SITUACIONES CLÍNICAS. *Rev. Chil. Nutr.* 38, 356–367. doi:10.4067/S0717-75182011000300011
- Van Neerven, S., Regen, T., Wolf, D., Nemes, A., Johann, S., Beyer, C., Hanisch, U.-K., Mey, J., 2010. Inflammatory chemokine release of astrocytes in vitro is reduced by all-trans retinoic acid. *J. Neurochem.* 114, no-no. doi:10.1111/j.1471-4159.2010.06867.x
- Vannice, G., Rasmussen, H., Bertrais, S., al., et, Lands, W.E., Willett, W.C., 2014. Position of the academy of nutrition and dietetics: dietary fatty acids for healthy adults. *J. Acad. Nutr. Diet.* 114, 136–53. doi:10.1016/j.jand.2013.11.001
- Verheij, M., Ruiter, G.A., Zerp, S.F., van Blitterswijk, W.J., Fuks, Z., Haimovitz-Friedman, A., Bartelink, H., 1998. The role of the stress-activated protein kinase (SAPK/JNK) signaling pathway in radiation-induced apoptosis. *Radiother. Oncol.* 47, 225–232. doi:10.1016/S0167-8140(98)00007-3
- Verkhatsky, A., 2010. Physiology of neuronal-glia networking. *Neurochem. Int.* 57, 332–43. doi:10.1016/j.neuint.2010.02.002
- Veszeka, S., Tóth, A.E., Walter, F.R., Datki, Z., Mózes, E., Fülöp, L., Bozsó, Z., Hellinger, E., Vastag, M., Orsolits, B., Környei, Z., Penke, B., Deli, M.A., 2013a. Docosahexaenoic acid reduces amyloid- β induced toxicity in cells of the neurovascular unit. *J. Alzheimers. Dis.* 36, 487–501. doi:10.3233/JAD-120163
- Veszeka, S., Tóth, A.E., Walter, F.R., Datki, Z., Mózes, E., Fülöp, L., Bozsó, Z., Hellinger, E., Vastag, M., Orsolits, B., Környei, Z., Penke, B., Deli, M.A., 2013b. Docosahexaenoic acid reduces amyloid- β induced toxicity in cells of the neurovascular unit. *J. Alzheimers. Dis.* 36, 487–501. doi:10.3233/JAD-120163
- Vines, A., Delattre, A.M., Lima, M.M.S., Rodrigues, L.S., Suchecki, D., Machado, R.B., Tufik, S., Pereira, S.I.R., Zanata, S.M., Ferraz, A.C., 2012. The role of 5-HT_{1A} receptors in fish oil-mediated increased BDNF expression in the rat hippocampus and cortex: A possible antidepressant mechanism. *Neuropharmacology* 62, 184–191. doi:10.1016/j.neuropharm.2011.06.017
- Wang, L., Chen, K., Liu, K., Zhou, Y., Zhang, T., Wang, B., Mi, M., 2015a. DHA Inhibited AGEs-Induced Retinal Microglia Activation Via Suppression of the PPAR γ /NF κ B Pathway and Reduction of Signal Transducers in the AGEs/RAGE Axis Recruitment into Lipid Rafts. *Neurochem. Res.* 40, 713–722. doi:10.1007/s11064-015-1517-1
- Wang, L., Chen, K., Liu, K., Zhou, Y., Zhang, T., Wang, B., Mi, M., 2015b. DHA inhibited AGEs-induced retinal microglia activation via suppression of the PPAR γ /NF κ B pathway and reduction of signal transducers in the AGEs/RAGE axis recruitment into lipid rafts. *Neurochem. Res.* 40, 713–22. doi:10.1007/s11064-015-1517-1
- Wang, W., Tang, L., Li, Y., Wang, Y., 2015. Biochanin A protects against focal cerebral

Bibliografía

- ischemia/reperfusion in rats via inhibition of p38-mediated inflammatory responses. *J. Neurol. Sci.* 348, 121–125. doi:10.1016/j.jns.2014.11.018
- Wang, X., McGowan, C.H., Zhao, M., He, L., Downey, J.S., Fearn, C., Wang, Y., Huang, S., Han, J., 2000. Involvement of the MKK6-p38gamma cascade in gamma-radiation-induced cell cycle arrest. *Mol. Cell. Biol.* 20, 4543–52.
- Wang, Y., Huang, S., Sah, V.P., Ross, J., Brown, J.H., Han, J., Chien, K.R., 1998. Cardiac muscle cell hypertrophy and apoptosis induced by distinct members of the p38 mitogen-activated protein kinase family. *J. Biol. Chem.* 273, 2161–8.
- Wang, Z., Liu, D., Wang, F., Liu, S., Zhao, S., Ling, E.-A., Hao, A., 2012a. Saturated fatty acids activate microglia via Toll-like receptor 4/NF- κ B signalling. *Br. J. Nutr.* 107, 229–241. doi:10.1017/S0007114511002868
- Wang, Z., Liu, D., Wang, F., Liu, S., Zhao, S., Ling, E.-A., Hao, A., 2012b. Saturated fatty acids activate microglia via Toll-like receptor 4/NF- κ B signalling. *Br. J. Nutr.* 107, 229–241. doi:10.1017/S0007114511002868
- Wang, Z., Liu, D., Wang, J., Liu, S., Gao, M., Ling, E.-A., Hao, A., 2012c. Cytoprotective effects of melatonin on astroglial cells subjected to palmitic acid treatment in vitro. *J. Pineal Res.* 52, 253–64. doi:10.1111/j.1600-079X.2011.00952.x
- Wang, Z., Liu, D., Zhang, Q., Wang, J., Zhan, J., Xian, X., Du, Z., Wang, X., Hao, A., 2014. Palmitic acid affects proliferation and differentiation of neural stem cells in vitro. *J. Neurosci. Res.* 92, 574–586. doi:10.1002/jnr.23342
- Waskiewicz, A.J., Flynn, A., Proud, C.G., Cooper, J.A., 1997. Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. *EMBO J.* 16, 1909–1920. doi:10.1093/emboj/16.8.1909
- Watanabe, H., de Caestecker, M.P., Yamada, Y., 2001a. Transcriptional Cross-talk between Smad, ERK1/2, and p38 Mitogen-activated Protein Kinase Pathways Regulates Transforming Growth Factor- β -induced Aggrecan Gene Expression in Chondrogenic ATDC5 Cells. *J. Biol. Chem.* 276, 14466–14473. doi:10.1074/jbc.M005724200
- Watanabe, H., de Caestecker, M.P., Yamada, Y., 2001b. Transcriptional Cross-talk between Smad, ERK1/2, and p38 Mitogen-activated Protein Kinase Pathways Regulates Transforming Growth Factor- β -induced Aggrecan Gene Expression in Chondrogenic ATDC5 Cells. *J. Biol. Chem.* 276, 14466–14473. doi:10.1074/jbc.M005724200
- Wennström, M., Janelidze, S., Bay-Richter, C., Minthon, L., Brundin, L., 2014. Pro-inflammatory cytokines reduce the proliferation of NG2 cells and increase shedding of NG2 in vivo and in vitro. *PLoS One* 9, e109387. doi:10.1371/journal.pone.0109387
- White, P., 2007. Fatty Acids in Oilseeds (Vegetable Oils). pp. 227–262. doi:10.1201/9781420006902.ch10
- Wigley, R., Hamilton, N., Nishiyama, A., Kirchoff, F., Butt, A.M., 2007. Morphological and physiological interactions of NG2-glia with astrocytes and neurons. *J. Anat* 210, 661–670. doi:10.1111/j.1469-7580.2007.00729.x
- Wilson, C.J., Finch, C.E., Cohen, H.J., 2002. Cytokines and cognition--the case for a head-

Bibliografía

- to-toe inflammatory paradigm. *J. Am. Geriatr. Soc.* 50, 2041–56.
- Wilson, K.P., McCaffrey, P.G., Hsiao, K., Pazhanisamy, S., Galullo, V., Bemis, G.W., Fitzgibbon, M.J., Caron, P.R., Murcko, M.A., Su, M.S., 1997. The structural basis for the specificity of pyridinylimidazole inhibitors of p38 MAP kinase. *Chem. Biol.* 4, 423–31.
- Wong, K.-L., Wu, Y.-R., Cheng, K.-S., Chan, P., Cheung, C.-W., Lu, D.-Y., Su, T.-H., Liu, Z.-M., Leung, Y.-M., 2014. Palmitic acid-induced lipotoxicity and protection by (+)-catechin in rat cortical astrocytes. *Pharmacol. Reports* 66, 1106–1113. doi:10.1016/j.pharep.2014.07.009
- Wood, J.D., Enser, M., Fisher, A.V., Nute, G.R., Sheard, P.R., Richardson, R.I., Hughes, S.I., Whittington, F.M., 2008. Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: A review. *Meat Sci.* 78, 343–358. doi:10.1016/j.meatsci.2007.07.019
- Wu, D., Liu, J., Pang, X., Wang, S., Zhao, J., Zhang, X., Feng, L., 2014. Palmitic acid exerts pro-inflammatory effects on vascular smooth muscle cells by inducing the expression of C-reactive protein, inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor- α . *Int. J. Mol. Med.* 34, 1706–12. doi:10.3892/ijmm.2014.1942
- Xiong, Y.-F., Chen, Q., Chen, J., Zhou, J., Wang, H.-X., 2011. Melatonin reduces the impairment of axonal transport and axonopathy induced by calyculin A. *J. Pineal Res.* 50, 319–327. doi:10.1111/j.1600-079X.2010.00846.x
- Yee, A.S., Paulson, E.K., McDevitt, M.A., Rieger-Christ, K., Summerhayes, I., Berasi, S.P., Kim, J., Huang, C.-Y., Zhang, X., 2004. The HBP1 transcriptional repressor and the p38 MAP kinase: unlikely partners in G1 regulation and tumor suppression. *Gene* 336, 1–13. doi:10.1016/j.gene.2004.04.004
- Yoo, D.Y., Kim, W., Lee, C.H., Shin, B.N., Nam, S.M., Choi, J.H., Won, M.-H., Yoon, Y.S., Hwang, I.K., 2012. Melatonin improves d-galactose-induced aging effects on behavior, neurogenesis, and lipid peroxidation in the mouse dentate gyrus via increasing pCREB expression. *J. Pineal Res.* 52, 21–28. doi:10.1111/j.1600-079X.2011.00912.x
- Young, P.R., McLaughlin, M.M., Kumar, S., Kassis, S., Doyle, M.L., McNulty, D., Gallagher, T.F., Fisher, S., McDonnell, P.C., Carr, S.A., Huddleston, M.J., Seibel, G., Porter, T.G., Livi, G.P., Adams, J.L., Lee, J.C., 1997. Pyridinyl imidazole inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase bind in the ATP site. *J. Biol. Chem.* 272, 12116–21.
- Young, S.N., Gauthier, S., Kiely, M.E., Lal, S., Brown, G.M., 1984. Effect of oral melatonin administration on melatonin, 5-hydroxyindoleacetic acid, indoleacetic acid, and cyclic nucleotides in human cerebrospinal fluid. *Neuroendocrinology* 39, 87–92.
- Zajdel, A., Wilczok, A., Chodurek, E., Gruchlik, A., Dzierzewicz, Z., n.d. Polyunsaturated fatty acids inhibit melanoma cell growth in vitro. *Acta Pol. Pharm.* 70, 365–9.
- Zajdel, A., Wilczok, A., Chodurek, E.W.A., Gruchlik, A., 2013. POLYUNSATURATED FATTY ACIDS INHIBIT MELANOMA CELL GROWTH IN VITRO 70, 365–369.
- ZARUBIN, T., HAN, J., 2005. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res.* 15, 11–18. doi:10.1038/sj.cr.7290257
- Zhang, R., He, G., Wang, Y., Zhou, K., Ma, E., 2015a. Omega-3 polyunsaturated fatty acids inhibit the increase in cytokines and chemotactic factors induced in vitro by lymph

Bibliografía

- fluid from an intestinal ischemia-reperfusion injury model. *Nutrition* 31, 508–14. doi:10.1016/j.nut.2014.10.015
- Zhang, R., He, G., Wang, Y., Zhou, K., Ma, E., 2015b. Omega-3 polyunsaturated fatty acids inhibit the increase in cytokines and chemotactic factors induced in vitro by lymph fluid from an intestinal ischemia-reperfusion injury model. *Nutrition* 31, 508–14. doi:10.1016/j.nut.2014.10.015
- Zhao, Y., Calon, F., Julien, C., Winkler, J.W., Petasis, N.A., Lukiw, W.J., Bazan, N.G., 2011. Docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 induces neuronal survival via secretase- and PPAR γ -mediated mechanisms in Alzheimer's disease models. *PLoS One* 6, e15816. doi:10.1371/journal.pone.0015816

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EFECTO DE LA MELATONINA, LEPTINA Y ÁCIDOS GRASOS: DOCOSAHEXAENOICO, EICOSAPENTAENOICO Y PALMÍTICO,
EN LA MODULACIÓN DE LA INFLAMACIÓN EN CÉLULAS DE GLÍA
Nohora Milena Martínez López



UNIVERSITAT
ROVIRA i VIRGILI