

LRRK2 como nueva diana terapéutica en retinosis pigmentaria.

Eduardo de la Usada Molinero¹, Josefa Zaldívar Díez de Bonilla², Loreto Martínez González², Ana Martínez Gil^{2, a}

1. Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biología de Sistemas, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España. 2. Grupo de Química Médica y Biológica traslacional, Departamento de Biología Físico-Química, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, 28040 Madrid, Madrid, España.

a. ana.martinez@csic.es

Palabras clave: retinosis pigmentaria; LRRK2; neurogénesis; microglía; retina neural

Resumen

La retinosis pigmentaria (RP) es un grupo heterogéneo de distrofias retinianas causado por mutaciones en múltiples genes. La RP cursa con disfunción y muerte progresiva de fotorreceptores, lo que causa una pérdida de visión cada vez mayor que termina con ceguera la mayoría de los casos. La enzima leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) está implicada en procesos tanto inflamatorios como de muerte celular asociados a diferentes patologías neurodegenerativas, y por ello sus inhibidores son una buena estrategia terapéutica para el tratamiento de las mismas, sobre todo para la enfermedad de Parkinson. Dado que la retina neural puede considerarse la parte más externa del sistema nervioso central, en este trabajo se recogen los primeros datos que muestran la presencia de LRRK2 en un modelo de RP por qPCR, pudiendo ser considerada como una nueva diana terapéutica para el tratamiento de esta patología. Con el fin de buscar potenciales agentes terapéuticos para RP, hemos realizado estudios in vivo con un inhibidor de LRRK2. Este compuesto se administró sistemáticamente mediante inyección intraperitoneal a ratones rd10, modelo de RP, a partir del día postnatal 15 y durante diez días consecutivos para estudiar su potencial efecto neuroprotector, sobre la estructura e integridad de la retina, y su efecto antiinflamatorio analizando la localización de la microglía mediante inmunohistoquímica de criosecciones de retina de estos animales. La administración del compuesto parece atenuar la pérdida de fotorreceptores y la migración de la microglía, lo que podría preservar la capacidad visual y disminuir la inflamación que acompañan a la patología en ratones rd10. Nuestros resultados parecen mostrar un efecto neuroprotector de los fármacos inhibidores de LRRK2 en RP e indican el importante papel que puede tener este grupo de compuestos, y en especial SGP1.4, un derivado de isatina utilizado en este estudio, en un futuro tratamiento para esta patología.

Cita: de la Usada Molinero, Eduardo; Zaldívar Díez de Bonilla, Josefa; Martínez González, Loreto; Martínez Gil, Ana (2016) LRRK2 como nueva diana terapéutica en retinosis pigmentaria. *Dianas* 5 (2): e20160902. ISSN 1886-8746 (electronic) journal.dianas.e20160902 <http://www3.uah.es/dianas?e20160902>. URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>

Copyright: © de-la-Usada-Molinero E, Zaldívar-Diez-de-Bonilla J, Martínez-González L, Martínez-Gil A. Algunos derechos reservados. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>



Introducción

Durante el desarrollo embrionario, la muerte celular programada es un proceso normal y fisiológico que en el sistema nervioso central (SNC) afecta a precursores neurales y a neuronas diferenciadas [1]. Sin embargo, su desregulación está asociada a muchas enfermedades neurodegenerativas [2]. La retina neural, como parte del SNC, también está sujeta a estos procesos y, del mismo modo, la desregulación de éstos desemboca en distrofias retinianas de carácter neurodegenerativo [3]. Por otro lado, el estudio de las distrofias retinianas de tipo neurodegenerativo representa un campo interesante ya que se trata de patologías para las que mayoritariamente no existe en la actualidad un tratamiento efectivo, lo que conlleva un altísimo coste a nivel médico y social que se prolonga durante la larga y, por lo demás, saludable vida del paciente. En este trabajo nos centramos en el estudio del efecto neuroprotector de inhibidores de LRRK2 en la retinosis pigmentaria (RP), una de estas distrofias retinianas que cursa con la muerte programada de fotorreceptores, utilizando como sistema modelo el ratón rd10 (Pde6brd10).

Retina neural: una parte muy especializada del SNC

La retina de los vertebrados está formada por la retina neural, que contiene seis tipos de neuronas, por la glía de Müller (GM) y por el epitelio pigmentario retinal (EPR), que está formado por células no neurales que contienen gránulos de melanina [3]. Las células de la retina neural se distribuyen en tres capas nucleares separadas por dos capas plexiformes. Los somas de los fotorreceptores constituyen la capa

nuclear externa (CNE); los somas de neuronas horizontales, amacrinas, bipolares y los de la GM forman la capa nuclear interna (CNI); los somas de las células ganglionares se encuentran en la capa más interna, denominada capa de células ganglionares (CCG), donde además se localiza un grupo de células amacrinas desplazadas. Sobre la CCG se sitúa el otro tipo de célula glial, los astrocitos. La capa plexiforme externa (CPE) es el lugar de conexión sináptica entre fotorreceptores y células bipolares mientras que la capa plexiforme interna (CPI) es el punto de contacto entre células bipolares y amacrinas y dendritas de ganglionares (Fig. 1). Además de estos tipos celulares, también se pueden encontrar células de microglía de origen extra-retiniano.

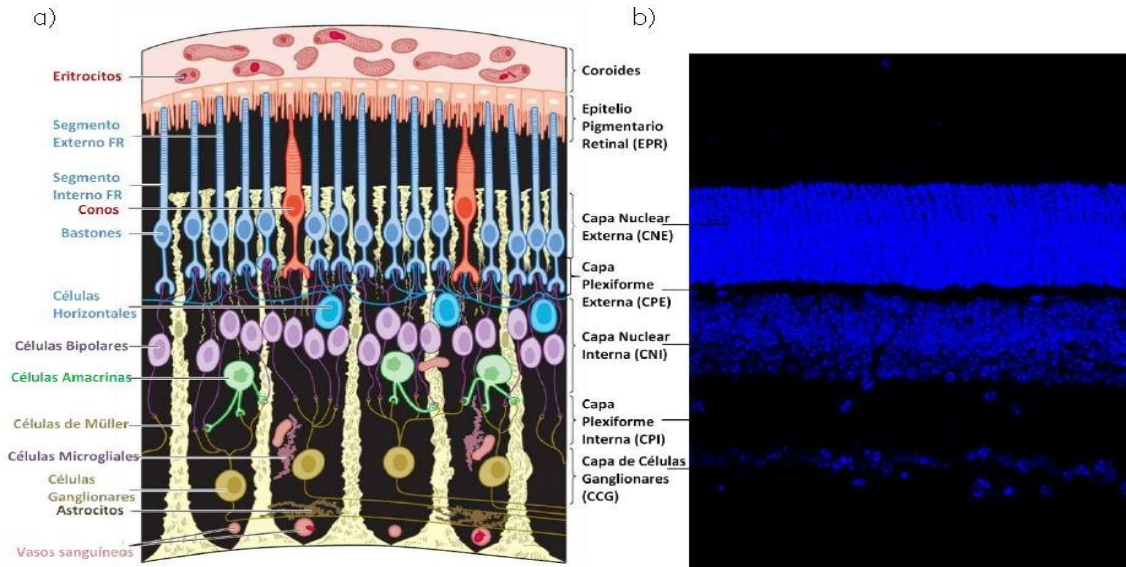


Figura 1.- a) Representación esquemática de la retina de mamíferos [4]. b) Marcaje de DAPI en criosección de retina de ratón C57BL/6 a la edad postnatal de 21 días [5]. Se muestran los diferentes tipos celulares presentes en la neurorretina como fotorreceptores, microglía y células ganglionares.

La capa de fotorreceptores está formada por conos, responsables de la visión a alta intensidad lumínica (visión fotópica), y bastones, encargados de ella a baja intensidad lumínica (visión escotópica) [6]. Los fotorreceptores convierten la señal lumínica en bioquímica mediante la cascada de fototransducción (Fig. 2) [4]. Las células bipolares contactan con los fotorreceptores y con las células ganglionares, transfiriendo la información de una capa a la otra. Las células horizontales, que contactan con los fotorreceptores en la CPE, y las células amacrinas, que contactan con las ganglionares en la CPI, integran y precisan la salida visual de la retina. Las células horizontales están involucradas en la mejora del contraste, mientras que las amacrinas recogen los estímulos visuales a través de la retroalimentación entre ganglionares y células bipolares. Las células ganglionares son las únicas neuronas de proyección de la retina que emiten sus axones fuera del ojo, formando el nervio óptico que conecta con el cerebro. La GM desempeña un papel de soporte y es la encargada del mantenimiento de la homeostasis de la retina [3].

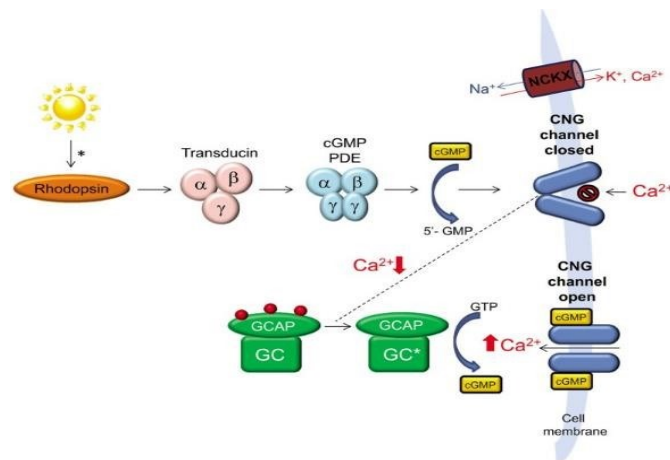


Figura 2.- Mecanismo de la fototransducción [7]. La rodopsina de los segmentos externos de los fotorreceptores absorbe un fotón, lo que la activa provocando un cambio de conformación. Ésta estimula el intercambio de GDP por GTP de la transducina, la cual activa a la PDE6. Como consecuencia de esta activación se estimula la hidrólisis de GMPC a GMP, disminuyendo los niveles del primero y ocasionando el cierre de los canales de Na⁺ y Ca²⁺ dando lugar a una hiperpolarización de la membrana.

Retinosis pigmentaria como enfermedad neurodegenerativa

La RP engloba un grupo de enfermedades degenerativas de la retina caracterizado por la degeneración secuencial de bastones y conos [8]. El fenotipo clínico de esta enfermedad conlleva acumulación de pigmento, ceguera nocturna progresiva y visión en túnel que progresa hasta la pérdida completa de visión [9] (Fig. 3). Esta enfermedad afecta a 1 de cada 3.500 personas [10], siendo considerada una enfermedad rara y por tanto destinando pocos recursos a su investigación. Entre los más de 250 genes asociados a la enfermedad están las subunidades Pde6a y Pde6b de la holoenzima PDE6, que dan lugar a formas recesivas de la enfermedad [11]. La PDE6 hidroliza el GMPc a 5'-GMP en la fototransducción (Fig.2). Por ello, se ha postulado que mutaciones en esta enzima darían lugar a una acumulación de GMPc [12]. Esto se traduciría en un aumento de la conductancia a través de los canales de cationes dependientes de este nucleótido, aumentando la entrada masiva de Na⁺ y Ca²⁺ produciéndose una sobrecarga metabólica y una elevada toxicidad [9], posible causa de la muerte de los fotorreceptores.

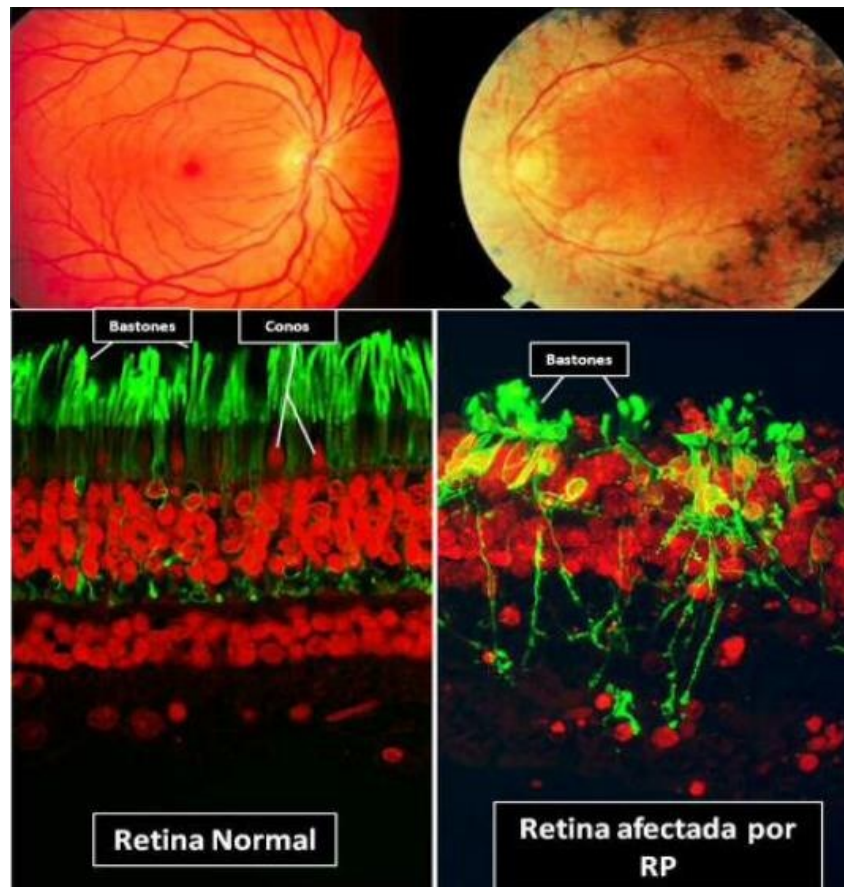


Figura 3.- Comparación de retina normal y retina afectada por RP [5]. Se muestra la acumulación de pigmento en la retina afectada por RP, en la parte superior, así como la desorganización estructural que se produce como consecuencia de la enfermedad con la progresiva pérdida de fotorreceptores, en la parte inferior.

Activación de la microglía en distrofias retinianas

En la retina, además de los dos tipos de glía (astrocitos y GM), hay células de la microglía, los macrófagos del SNC (Fig. 1). La glía, además de ser fundamental en la conservación de la función y la estructura de la retina, está implicada en el diversas patologías retinianas [13]. En varias de estas distrofias y lesiones tiene lugar una activación de la GM que se confirma por un aumento en la expresión de GFAP (glial fibrillary acidic protein), marcador principal de la gliosis reactiva. Incluso se ha llegado a postular que la activación de la GM contribuye a la muerte de fotorreceptores [14].

La función típica de la microglía es fagocitar células muertas. También se le atribuye un papel patológico por la liberación de factores neurotóxicos tales como TNF α (Tumor Necrosis Factor alfa) e IL-1 β (Interleucina 1 beta) [15]. De hecho, se considera que la microglía tiene un papel ambivalente dependiendo de su estado de activación: uno en el que tiene capacidad fagocítica y produce citoquinas proinflamatorias y otro en el que produce citoquinas antiinflamatorias [16].

Estructura, regulación y función de LRRK2

La quinasa rica en repeticiones de Leu LRRK2 (Leucine-rich repeat kinase 2) es una proteína de 280 KDa, codificada en el cromosoma 12 (q12) por el gen LRRK2 de 51 exones, que pertenece a la familia de

proteínas ROCO, caracterizada por la presencia de un dominio ROC (Ras of complex proteins), con actividad GTPasa, y un dominio COR (C-terminal of ROC) [17]. La enzima posee dos centros catalíticos: uno es el dominio con actividad Ser/Thr quinasa y otro es el dominio con actividad GTPasa. Este último actúa como interruptor molecular para una gran variedad de vías de señalización celular. Flanqueando los centros catalíticos se encuentran varios dominios de interacción proteína-proteína destacando los dominios N-terminales de ankirina y de repeticiones ricas en Leu y el dominio C-terminal WD40 (Fig. 7).



Figura 4.- Estructura esquemática de LRRK2 mostrando la disposición de los diferentes dominios [18].

Parece ser que existen diferentes niveles de regulación de la enzima. En primer lugar, la actividad quinasa sólo es posible cuando LRRK2 dimeriza gracias a los dominios COR y WD40. Además, requiere de una fosforilación en el dominio ROC para adquirir la actividad GTPasa y esta modificación es llevada a cabo por su propio dominio quinasa [19].

La enzima se expresa principalmente en SNC, concretamente en corteza frontal, sustancia nigra pars compacta y estriado [20]. A nivel celular, algunas de las funciones de LRRK2 son la estabilización de los microtúbulos, la regulación de la función mitocondrial y de la autofagia y del transporte vesicular [19]. Esta enzima adquiere un papel relevante como diana terapéutica cuando en 2008 se descubre que mutaciones que provocan un aumento de su actividad quinasa suponen la primera causa genética en la Enfermedad de Parkinson (EP), representando un 4% de los casos familiares y un 1% de los casos esporádicos [21]. La búsqueda de inhibidores de LRRK2 es actualmente una de las áreas de investigación más activas para la terapia de la EP.

Otro aspecto interesante de la fisiología de LRRK2 es el papel que juega como proteína de andamiaje en la vía de Wnt [22]. Gracias a los diversos dominios de interacción entre proteínas que posee, LRRK2 es capaz de unirse y reclutar tanto al complejo de destrucción de β -catenina como al complejo de proteínas Dvl (Fig. 8). Este punto es importante pues se ha visto que la activación de la vía de Wnt en la GM protege los fotorreceptores de la degeneración [23] y tiene potencial neurogénico [22].

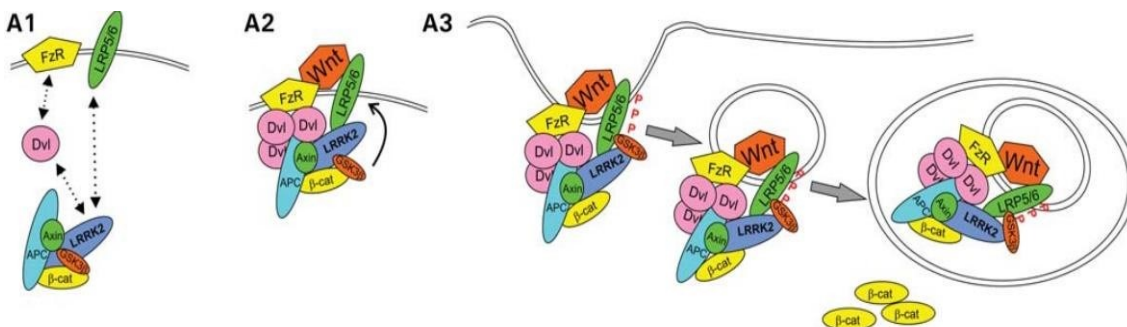


Figura 5.- Representación esquemática de las interacciones de LRRK2 en la vía Wnt [22]. (A1) En estado basal, LRRK2 se asocia con el complejo de destrucción de β -catenina. La localización del complejo entre la membrana y el citosol está en equilibrio dinámico dependiendo de las interacciones del receptor FzR con las proteínas Dvl, de éstas con LRRK2 y del correceptor LRP5/6 con LRRK2. (A2) Ante la activación de FzR, las proteínas Dvl polimerizan secuestrando al complejo de destrucción en la membrana mediante la interacción con LRRK2 y otras proteínas de dicho complejo. LRRK2 también interacciona con LRP5/6 facilitando su fosforilación por GSK3 β . (A3) La fosforilación del correceptor media la internalización del signalosoma impidiéndose la degradación de β -catenina.

Como se ha explicado anteriormente, LRRK2 es una diana muy prometedora en el tratamiento de la EP, pero la hipótesis que nos planteamos es que también podría ser una diana interesante para la RP. Basamos esta hipótesis en tres argumentos. Por un lado, en el grupo de la Dra. Ana Martínez, en el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB), se han generado resultados muy favorables al utilizar inhibidores de GSK3 β en el modelo rd10 de RP [5]. GSK3 β y LRRK2 están estrechamente relacionadas ya que LRRK2 fosforila a GSK3 β y aumenta la actividad quinasa de ésta [24]. En segundo lugar, ha sido descrito que LRRK2 se expresa en células de microglía y que actúa como un modulador positivo de la inflamación aumentando la liberación de citoquinas proinflamatorias e induciendo estrés oxidativo a través de la vía de Wnt [25]. Por lo tanto, la inhibición de LRRK2 podría frenar la neuroinflamación que ocurre durante la RP. Finalmente, experimentos llevados en paralelo muestran que la inhibición de LRRK2 parece tener actividad neurogénica y dicha actividad neurogénica podría explicarse debido a la implicación de LRRK2 en la ruta de Wnt que ya es sabido que activar esta ruta genera un efecto neuroprotector en retina [23]. De este modo, y en base a estos tres argumentos, resulta interesante comprobar la existencia de LRRK2 en retina y, si procede, emplear inhibidores de esta quinasa en el modelo murino rd10 de RP.

SGP1.4 como fármaco innovador para la modulación de LRRK2

El grupo de Química Médica y Biológica traslacional del CIB-CSIC, ha desarrollado diversos inhibidores de LRRK2, algunos probados en modelos celulares de EP [26]. En el presente trabajo hemos planteado la hipótesis de que el inhibidor de LRRK2, SGP1.4, puede prevenir o retrasar la muerte de fotorreceptores que cursa en la RP, y así preservar la función visual.

SGP1.4 ((E,Z)-5-Bromo-3-(2,2-difenilhidrazono)indolin-2-ona) [27] fue diseñado con una estrategia de Síntesis orientada a la Biología (BIOS) y pertenece a la familia de las isatinas, unos oxoindoles de origen natural (Fig. 9).

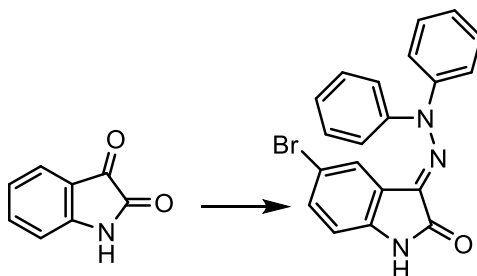


Figura 6.- Estructura de la isatina (izquierda) y estructura de SGP1.4 (derecha). El inhibidor es una isatina derivatizada con Br en posición 5 e hidrazina en posición 3.

Además, presenta excelentes valores de concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) para LRRK2 silvestre y con la mutación G2019S, presente en la EP (Tab. 1). Además, SGP1.4 es un compuesto capaz de cruzar la barrera hematoencefálica [27], por lo que es el candidato ideal para llevar a cabo el estudio.

SGP1.4	LRRK2 (WT)	LRRK2 (G2019S)
Inh% - 10μM	91 %	93 %
IC ₅₀ (nM)	23,7 nM	26,2 nM

Tabla 1.- Valores de SGP1.4 de porcentaje de inhibición a una concentración de 10 μM y de IC₅₀ tanto para la forma normal del enzima como para la mutación más habitual, G2019S.

Materiales y métodos

Animales de experimentación

Los ratones rd10 con una mutación en el gen Pde6b están en fondo genético C57BL/6. Los ratones fueron mantenidos y utilizados según la normativa del comité ético del CIB y de la Unión Europea. Los animales fueron sometidos a eutanasia por dislocación cervical previa a la extracción de las retinas. Un grupo de tres ratones se inyectaron intraperitonealmente con SGP1.4 a partir de una solución de 1 mg/ml de SGP1.4 en suero salino con 10% DMSO (Sigma, Steinheim, Alemania) y 5% Tocrisol (Tocris, Bristol, Reino Unido), ajustando el peso a razón de 10μl/g ratón. Como control se empleó otro grupo de tres ratones inyectados con la misma fórmula sin añadir SGP1.4.

Extracción de ARN, retrotranscripción (RT) y PCR cuantitativa (qPCR)

Las retinas se homogeneizaron con 800 μl de Trizol (Invitrogen, NY, Estados Unidos) mediante pases por una jeringuilla de 1 ml, empezando con una aguja 23G y seguidamente con una aguja 25G. La extracción de ARN se continuó siguiendo las instrucciones del fabricante. La integridad del ARN fue comprobada por electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (p/v) y su concentración fue medida por absorbancia a 260 nm en el NanoDrop 1000 Spectrophotometer (NanoDrop, Delaware, Estados Unidos). El ARN fue almacenado a -80°C hasta su uso.

Se emplearon 2 μg del ARN extraído, se trataron con DNasa I (Desoxirribonucleasa I) (Invitrogen) y se sometieron a RT utilizando la enzima Superscript III y Random Primers (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

La qPCR se llevó a cabo con ensayos TaqMan (Invitrogen), con 2,5 μl de RT en un volumen final de 10,5 μl (5 μl Mix PCR + 2,5 μl agua + 0,5 μl sonda). Las muestras se analizaron por duplicado. La qPCR se realizó en el 7900 HT-Fast real time PCR system (Invitrogen) con la colaboración de la Dra. Catalina Hernández.

Crioprotección, criosecciones e inmunohistoquímica

Los globos oculares, tras un corte en la córnea, se fijaron durante 1 hora en PFA 4% a temperatura ambiente y se les extrajo el cristalino. Seguidamente se pasaron por un gradiente de sacarosa, (7,5%,

15%, 22,5%, 30%, 40% y 50%) y se embebieron en OCT (Sakura Finetek, Torrance, Estados Unidos).

Los bloques se formaron sobre una tapa de tubo Eppendorf de 1,5 ml, se orientaron respecto a la salida del nervio óptico y se congelaron mediante inmersión en isopropanol-hielo seco. Se realizaron secciones de 12 µm en el criostato (Leica Microsystems GmbH) que fueron recogidas en portaobjetos tratados (Thermo Scientific, Massachusetts, Estados Unidos) y guardadas a -20°C.

Las secciones se sacaron de -20°C y se dejaron secar a 65°C durante 10 minutos. Se fijaron otra vez en acetona (10 minutos a -20°C) y se secaron de nuevo a 65°C durante 10 minutos. Después se hicieron tres lavados de 10 minutos con PBS a temperatura ambiente y en agitación. Las secciones se permeabilizaron con Tritón X-100 al 1% (p/v) en PBS (4 lavados de 20 minutos). Luego se hicieron 3 lavados con PBS y se incubaron durante 1 hora con solución de bloqueo BGT (Bovine fetal serum 5% + glicina 1 M + Tritón X-100 1%) en cámara húmeda y a temperatura ambiente. Se aplicó el anticuerpo primario anti-IBA-1 (policlonal de conejo) (Abcam, Cambridge, Reino Unido) diluido 1:1000 en BGT y se incubó toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Se realizaron 3 lavados de 10 minutos en PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejoAlexa488 (policlonal de cabra) diluido 1:200 (Abcam) y DAPI diluido

1:1000 en BGT durante 1 hora en cámara húmeda y oscuridad. Finalmente, se realizaron 3 lavados de 10 minutos con PBS en agitación, a temperatura ambiente y en oscuridad. Las secciones se montaron con Fluoromont y se analizaron en el microscopio confocal Leica TCS-SP5-A0BS.

Estadística y procesamiento de imágenes

Las imágenes se obtuvieron con el programa LAS AF Lite (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania). Las imágenes de retina completa para comprobar la integridad de ésta y proceder a los estudios más detallados se obtuvieron con el objetivo de 2,5x. De cada criosección se seleccionaron y fotografiaron ocho campos, cuatro a cada lado del nervio óptico, con el objetivo de 40x. Para el conteo de la microglía se cubrió la totalidad de la criosección con el objetivo de 20x.

El programa ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, MD, Estados Unidos) fue utilizado para el conteo de la microglía infiltrada en la CNE y para medir el grosor de ésta. Para la medida del grosor se tomaron tres medidas en cada campo.

El programa GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.) se empleó para realizar la media del grosor en cada campo. Finalmente se realizó la media de las medias para cada campo de cada ratón. Los datos se representaron en un diagrama de araña y se llevó a cabo un ANOVA de dos vías para observar diferencias de grosor entre animales control y animales tratados apreciándose diferencias significativas cuando el valor del estadístico fue menor a 0,05.

Con el mismo programa se realizó el análisis de los datos recogidos en el conteo de la microglía. Con él se realizó la media para cada ratón, la correspondiente media para cada grupo de ratones y una comparación de medias (t de Student) entre ambos grupos, además de la correspondiente representación gráfica. Se aprecian diferencias significativas cuando el valor del estadístico fue menor a 0,05.

Resultados y discusión

Caracterización de LRRK2 en retina

Hasta el momento hay datos experimentales que demuestren la presencia de esta enzima ni su función fisiológica en la retina. Con el fin de caracterizar mejor nuestro sistema y poder caracterizar mejor el efecto de SGP1.4, nos decidimos a cuantificar los niveles de LRRK2 en ratones sanos y rd10. Para ello, llevamos a cabo una qPCR que nos permitió seguir la progresión de los niveles de ARNm de LRRK2. Se observó que ratones silvestres presentan niveles basales de LRRK2 que se mantienen constantes. A diferencia de éstos, los ratones rd10 presentan concentraciones similares de LRRK2 que a partir del día postnatal 16 (p16), cuando se manifiesta la degeneración del tejido, se incrementan hasta doblar los niveles respecto de ratones salvajes (Fig. 10), indicando una posible relación directa entre LRRK2 y la severidad de la RP.

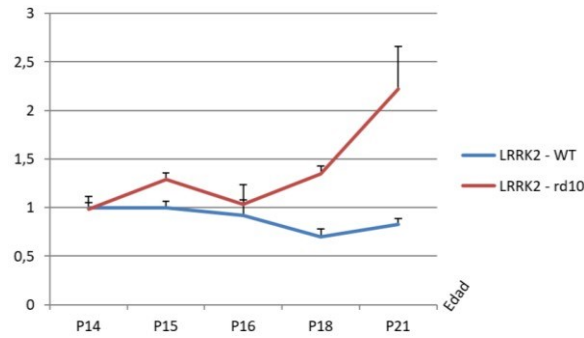


Figura 7.- Concentración de LRRK2 en retina a distintos tiempos postnatales. En azul, ratones con fenotipo sano; en rojo, ratones rd10 con fenotipo de retinosis pigmentaria.

Determinación del efecto de SGP1.4 sobre la supervivencia de fotorreceptores

La hipótesis general del presente trabajo es que LRRK2 es una diana farmacológica para el tratamiento de la RP. En base a las tres hipótesis mencionadas anteriormente, iniciamos un estudio in vivo inyectando ratones rd10 intraperitonealmente y a diario con SGP1.4, desde p15, edad previa a la degeneración, hasta p24, cuando ya hay una pérdida significativa de fotorreceptores. Los ratones se sacrificaron a p25 y los ojos se procesaron para análisis inmunohistológico.

El análisis inmunohistoquímico de las retinas mostró que los animales tratados con SGP1.4 presentaban un número mayor de capas de fotorreceptores que los tratados con vehículo y, por tanto, una CNE más gruesa (Fig. 11). Estos primeros datos muestran que el inhibidor de LRRK2 tiene un efecto protector en la retina.

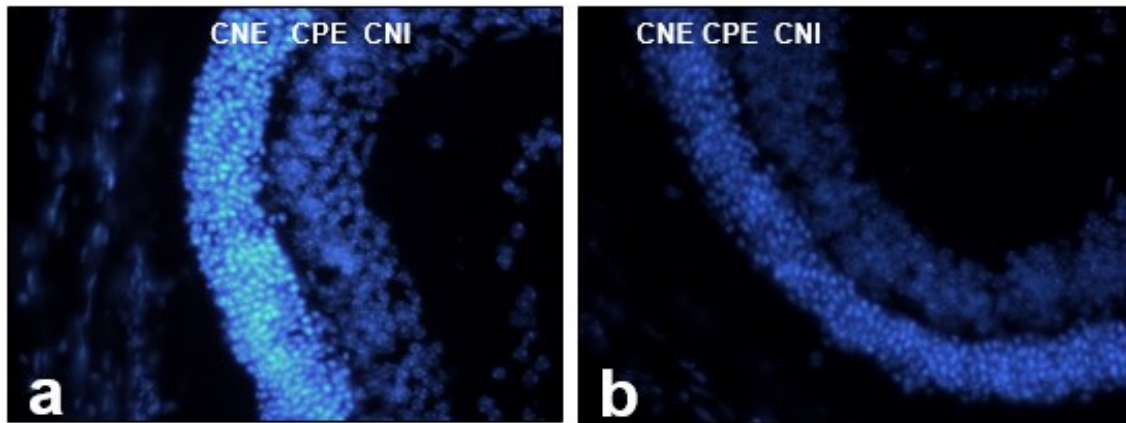


Figura 8.- Inmunohistoquímica de criosecciones de retinas de ratones rd10 tratados in vivo con SGP1.4 (a) o vehículo (b) de p15 a p24. Marcaje nuclear con DAPI. CNE, Capa nuclear externa; CPE, Capa plexiforme externa; CNI, Capa nuclear interna.

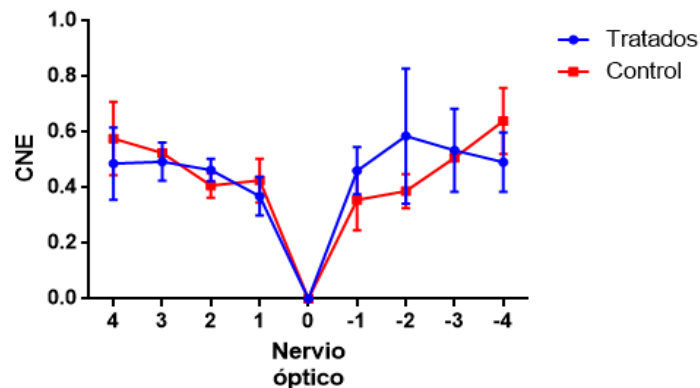


Figura 9.- Diagrama de araña que representa la relación de grosor entre las capas nucleares de animales tratados (azul) y animales inyectados con vehículo (rojo). Los valores arbitrarios del eje X muestran los ocho campos de cada criosección a diferentes y equivalentes distancias del nervio óptico, donde comienza la degeneración.

El análisis de grosor de la CNE, que degenera con la enfermedad, muestra un valor mayor en animales tratados con SGP1.4 que en animales inyectados con vehículo (Fig. 12). Si bien no se observan diferencias significativas, sí que se observa una tendencia de recuperación en el grosor de la CNE,

principalmente en la zona central de la retina, mucho más castigada por la enfermedad, ya que la degeneración de ésta sigue un eje central-periférico. Esta falta de significación en los resultados podría explicarse por el bajo número de animales empleado en el experimento o por ciertos problemas en la solubilidad del compuesto, lo que podría disminuir su biodisponibilidad y, por tanto, el efecto sobre la diana

Determinación del efecto de SGP1.4 sobre la migración de la microglía

Durante la degeneración progresiva de la RP, asociado al proceso de pérdida de fotorreceptores, se produce una activación de células de la microglía que se pone de manifiesto por la migración de estas células desde las capas plexiformes hacia la CNE. La microglía, en los ratones inyectados con SGP1.4 se localizó preferentemente en las capas plexiformes y en la CNI mientras que en los animales inyectados con vehículo la microglía había infiltrado la CNE (Fig. 13).

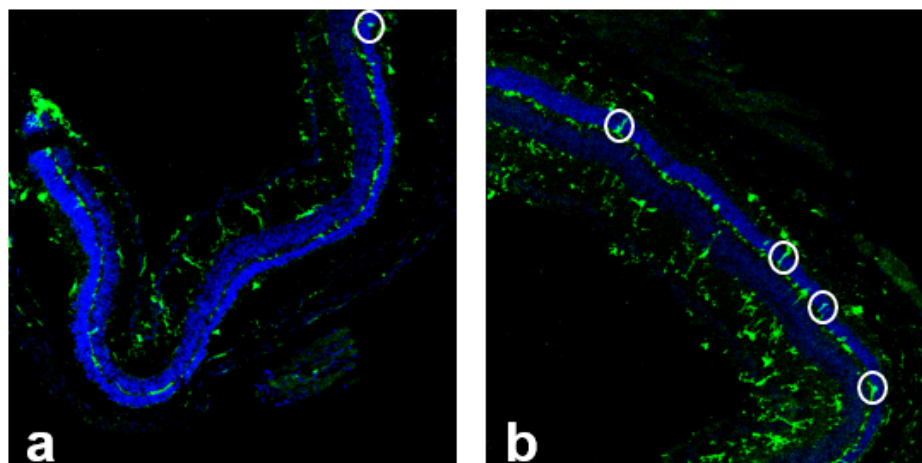


Figura 10.- Inmunohistoquímica de criosecciones de retinas de ratones rd10 tratados in vivo con SGP1.4 (a) o vehículo (b) de p15 a p24. Marcaje anti-IBA1, un marcador de microglía. Los círculos blancos señalan la microglía infiltrada en la CNE.

El análisis estadístico de la cantidad de microglía presente en la CNE, que ha migrado desde capas inferiores muestra diferencias significativas entre ambos grupos de ratones. En el caso de los ratones tratados con SGP1.4 disminuye enormemente la cantidad de microglía infiltrada en la CNE (Fig. 14). La presencia de la microglía en las capas plexiformes conlleva una menor inflamación y, por tanto, una menor muerte de fotorreceptores.

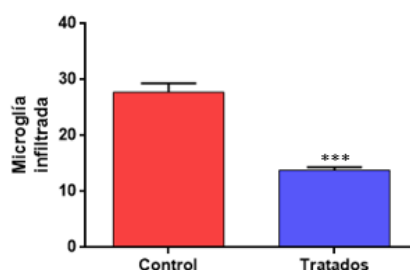


Figura 11.- Estudio de la microglía infiltrada en la CNE en retinas de ratones rd10 inyectados con vehículo o con SGP1.4. *** $p < 0,005$.

Conclusiones

En este trabajo se ha podido demostrar por primera vez que LRRK2 puede ser una diana terapéutica para el tratamiento de la RP, demostrándose que la expresión de esta enzima está aumentada a medida que aumenta la degeneración retinal en dicho modelo.

Asimismo, de manera preliminar puede concluirse que los inhibidores de LRRK2 constituyen una potencial estrategia terapéutica para la RP. En el estudio, la administración de SGP1.4 parece disminuir la muerte de los fotorreceptores, lo cual es fundamental para mantener la cascada de fototransducción y por ende la función visual [28].

Además, en este trabajo hemos demostrado que en la retina de ratones rd10 se produce la infiltración de microglía desde las capas plexiformes hacia la CNE. El tratamiento con el inhibidor de LRRK2, SGP1.4, hace que la microglía se sitúe principalmente en las capas plexiformes, como es de esperar en una retina sana [29].

En próximos estudios emplearemos nuevos inhibidores de LRRK2 de diferente naturaleza química para validar esta enzima como una diana terapéutica excelente y enormemente innovadora en el tratamiento de la RP. Además, trabajaremos para entender mejor el papel neurogénico de LRRK2 y su función en la retina, así como se evaluará la función visual de los animales mediante electroretinografía tras el tratamiento con los inhibidores. De este modo, la tendencia que puede extraerse de los datos de nuestro trabajo se convertirá en una base sólida que ayudará a entender mejor el papel que desempeña la enzima en esta enfermedad y abrirá la puerta a llevar a fases clínicas los inhibidores de LRRK2 en el tratamiento para la retinosis pigmentaria.

Bibliografía

1. Valenciano, A.I., Boya, P. and de la Rosa, E.J. 2009. Early neural cell death: numbers and cues from the developing neuroretina. *Int J Dev Biol.* 53(8-10):1515-28.
2. Varela-Nieto, I., de la Rosa, E.J., Valenciano, A.I. and León, Y. 2003. Cell death in the nervous system: lessons from insulin and insulin-like growth factors. *Mol Neurobiol.* 28(1):23-50.
3. Centanin, L. and Wittbrodt, J. 2014. Retinal neurogenesis. *Development.* 141(2):241-4.
4. Bramall, A.N., Wright, A.F., Jacobson, S.G. and McInnes, R.R. 2010. The genomic, biochemical and cellular responses of the retina in inherited photoreceptor degenerations and prospects for the treatment of these disorders. *Annu Rev Neurosci.* 33:441-72.
5. Villarejo, B., Díaz, M. and Hernández, C. 2015. Neuroprotección en un modelo murino de retinosis pigmentaria por modulación de GSK3 β . Trabajo de fin de máster. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.
6. Delyfer, M.N., Léveillard, T., Mohand-Saïd, S., Hicks, D., Picaud, S. and Sahel, J.A. 2004. Inherited retinal degenerations: therapeutic prospects. *Biol Cell.* 96(4):261-9.
7. Boye, S.E. 2014. Insights gained from gene therapy in animal models of retGC1 deficiency. *FrontMol Neurosci.* 7:43.
8. Mendes, H.F., van der Spuy, J., Chapple, J.P. and Cheetham, M.E. 2005. Mechanisms of cell death in rhodopsin retinitis pigmentosa: implications for therapy. *Trends Mol Med.* 11(4):177-85.
9. Travis, G.H. Mechanisms of cell death in the inherited retinal degenerations. 1998. *Am J Hum Genet.* 62(3):503-8.
10. Phillips, M.J., Otteson, D.C. and Sherry, D.M. 2010. Progression of neuronal and synaptic remodeling in the rd10 mouse model of retinitis pigmentosa. *J Comp Neurol.* 518(11):2071-89.
11. Dvir, L., Srour, G., Abu-Ras, R., Miller, B., Shalev, S.A. and Ben-Yosef, T. 2010. Autosomal-recessive early-onset retinitis pigmentosa caused by a mutation in PDE6G, the gene encoding the gamma subunit of rod cGMP phosphodiesterase. *Am J Hum Genet.* 87(2):258-64.
12. Han, J., Dinculescu, A., Dai, X., Du, W., Smith, W.C. and Pang, J. 2013. Review: the history and role of naturally occurring mouse models with Pde6b mutations. *Mol Vis.* 19:2579-89.
13. Kubrusly, R.C., Panizzutti, R., Gardino, P.F., Stutz, B., Reis, R.A., Ventura, A.L., de Mello, M.C. and de Mello, F.G. 2008. Expression of functional dopaminergic phenotype in purified cultured Müller cells from vertebrate retina. *Neurochem Int.* 53(3-4):63-70.
14. Nakazawa, T., Takeda, M., Lewis, G.P., Cho, K.S., Jiao, J., Wilhelmsson, U., Fisher, S.K., Pekny, M., Chen, D.F. and Miller, J.W. 2007. Attenuated glial reactions and photoreceptor degeneration after retinal detachment in mice deficient in glial fibrillary acidic protein and vimentin. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 48(6):2760-8.
15. Ni, M.M., Luo, Y., Liu, J., Liao, D.Q. and Tang, Y.D. 2008. FMRFamide modulates outward potassium currents in mouse olfactory sensory neurons. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 35(5-6):563-7.
16. Wang, K., Xiao, J., Peng, B., Xing, F., So, K.F., Tipoe, G.L. and Lin, B. 2014. Retinal structure and function preservation by polysaccharides of wolfberry in a mouse model of retinal degeneration. *Sci Rep.* 4:7601.
17. Cohenn, M.A. 2003. The Hedgehog signaling network. *Am J Med Genet A.* 123A:5-28.
18. Rudenko, I.N., Chia, R. and Cookson, M.R. 2012. Is inhibition of kinase activity the only therapeutic strategy for LRRK2-associated Parkinson's disease?. *BMC Medicine.* 10:20.
19. Esteves, A.R. and Cardoso, S.M. 2016. LRRK2 at the crossroad between autophagy and microtubule trafficking: insights into Parkinson's Disease. *The Neuroscientist.* 1-11.

20. Higashi, S., Biskup, S., West, A.B., Trinkaus, D., Dawson, V.L., Faull, R.L.M., Waldvogel, H.J., Arai, H., Dawson, T.M., Moore, D.J. and Emson, P.C. 2007. Localization of Parkinson's disease-associated LRRK2 in normal and pathological human brain. *Brain Research*. 1155:208-19.
21. Healy, D.G., Falchi, M., O'Sullivan, S.S., Bonifati, V., Durr, A., Bressman, S., Brice, A., Aasly, J., Zabetian, C.P., Goldwurm, S., Ferreira, J.J., Tolosa, E., Kay, D.M., Klein, C., Williams, D.R., Marras, C., Lang, A.E., Wszolek, Z.K., Berciano, J., Schapira, A.H., Lynch, T., Bathia, K.P., Gasser, T., Lees, A.J. and Wood, N.W. 2008. International, L. C., phenotype, genotype and worldwide genetic penetrance of LRRK2-associated Parkinson's disease: a case-control study. *Lancet Neurol*. 7:583-90.
22. Berwick, D.C. and Harvey, K. 2012. LRRK2 functions as a Wnt signaling scaffold, bridging cytosolic proteins and membrane-localized LRP6. *Human Molecular Genetics*. 21(22):4966-79.
23. Patel, A.K., Surapaneni, K., Yi, H., Nakamura R.E.I., Karli, S.Z., Syeda, S.S, Lee, T. and Hackam, A.S. 2015. Activation of Wnt/ β -catenin signaling in Muller glia protects photoreceptors in a mouse model of inherited retinal degeneration. *Neuropharmacology*. 91:1-12.
24. Kawakami, F., Shimada, N., Ohta, E., Kagiya, G., Kawashima, R., Maekawa, T., Maruyama, H. and Ichikawa, T. 2014. Leucine-rich repeat kinase 2 regulates tau phosphorylation through direct activation of glucose synthase kinase-3 β . *FEBS J*. 281(1):3-13.
25. Kim, B., Yang, M.S., Choi, D., Kim, J.H., Kim, H.S., Seol, W., Choi, S., Jou, I., Kim, E.Y. and Joe, E.H. 2012. Impaired inflammatory responses in murine *Lrrk2*-knockdown brain microglia. *PLoS One*. 7(4): e34693.
26. García, M.I. 2014. Nuevos inhibidores de proteínas quinasas como tratamiento innovador para enfermedades neurodegenerativas. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.
27. González, S. 2014. Nuevos derivados de oxoindol con actividad inhibitoria frente a LRRK2. Trabajo de fin de máster. Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España.
28. Park, P.S. 2014. Constitutively active rhodopsin and retinal disease. *Adv Pharmacol*. 70:1-36.
29. Humphrey, M.F. and Moore, S.R. 1996. Microglial responses to focal lesions of the rabbit retina: correlation with neural and macroglial reactions. *Glia*. 16(4):325-41.