

**ANÁLISIS DEL EFECTO DEL GEN DJ-1 FRENTE A C2-CERAMIDA,
6-HIDROXIDOPAMINA Y ROTENONA Y SU RELACIÓN CON LA VÍA PI3K/AKT
EN UN MODELO DE NEURONAS MESENCEFÁLICAS**

JENNY ANDREA JARAMILLO GÓMEZ, BSc



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE MEDICINA
MAESTRÍA EN NEUROCIENCIAS
Bogotá D.C.
2010**

**ANÁLISIS DEL EFECTO DEL GEN DJ-1 FRENTE A C2-CERAMIDA,
6-HIDROXIDOPAMINA Y ROTENONA Y SU RELACIÓN CON LA VÍA PI3K/AKT
EN UN MODELO DE NEURONAS MESENFÁLICAS**

**JENNY ANDREA JARAMILLO GÓMEZ, BSc
CÓDIGO: 05-597907**

Trabajo de grado para optar al título de Maestra en Neurociencias

**DIRIGIDO POR:
GONZALO HUMBERTO ARBOLEDA BUSTOS, MD, MSc, PhD**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE MEDICINA
MAESTRÍA EN NEUROCIENCIAS
Bogotá D.C.
2010**

AGRADECIMIENTOS

- Al Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación. COLCIENCIAS.
- Al Departamento de Investigación de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá.
- A la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá.
- Al Dr. Gonzalo Arboleda Bustos por su colaboración en el desarrollo y dirección de mi trabajo de grado.
- A la Dra. Chikaraishi DM del departamento de Neurobiología del *Duke University Medical Center, Durham, North Carolina*, por la donación de las células CAD.
- Al Dr. Mark Cookson del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos.
- A Ruth Mérida Sánchez Mora, estudiante de Doctorado de La Universidad Nacional de Colombia
- A la Dra. Luisa Matheus de la Universidad del Rosario.
- Al Grupo de Neurociencias de la Universidad Nacional, especialmente al Dr. Humberto Arboleda Granados, al Dr. Juan José Yunis y a Yeldy Milena Rodríguez.
- A mis compañeros y amigos del grupo de Neurociencias de la Universidad Nacional de Colombia, especialmente a María José Contreras, Jenny Ortega, Magda López, Yolanda Cardenas, Luis Carlos Morales, Heberth Marulanda Lozano, Bruno Benítez Viloría, Martín Pilonieta, Nelsón Ramírez, Claudia Guevara, Andrés Duque, Ketty Ordoñez, María Helena Camargo, Helena Hernández, Karen Hurtado, Adrián Sandoval y Alveiro Tupaz.
- A mis padres, Hilda Gómez y Germán Jaramillo; hermanas, Tatiana Jaramillo y Alejandra Jaramillo; sobrinos, David Jaramillo y Andrés Felipe Delgadillo, y especialmente a mi abuelita Lucia Jaramillo (Q.E.P.D.) por su confianza y apoyo incondicional.
- A Dios.

RESUMEN

La enfermedad de Parkinson (EP) es el desorden neurodegenerativo más frecuente después de la enfermedad de Alzheimer (EA), caracterizada por pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas de la sustancia *nigra* (SN) y acumulación de cuerpos de Lewy. Recientemente, varios genes han sido asociados con EP (*α-sinucleína*, *parkin*, *uchl-1*, *dj-1*, *pink1* and *lrrk2*); sin embargo su fisiopatología no es clara y los modelos celulares podrían consolidarse como una herramienta importante para validar la genómica funcional, así como las vías de señalización en las cuales éstos participan y sus efectos en la homeóstasis mitocondrial. La función del gen DJ-1 no es clara, aunque se ha sugerido que tiene un posible efecto neuroprotector frente a la acción de neurotoxinas. Nosotros simulamos en un modelo de neuronas catecolaminérgicas de origen mesencefálico murino (CAD) el efecto fisiológico de la proteína DJ-1 silvestre humana en un contexto neurotóxico e investigamos su relación con la vía de supervivencia neuronal PI3K/AKT. Inicialmente, el efecto de C2-ceramida, 6-hidroxidopamina (6-OHDA) y rotenona en células CAD fue evaluado con pruebas de viabilidad celular (LDH) y actividad mitocondrial (MTT), y su relación con la vía PI3K/AKT fue determinada por western blot (WB) de p-AKT (Ser473) y t-AKT. Demostramos que estas neurotoxinas inducen muerte celular con un efecto dosis-tiempo dependiente y por inhibición de la vía PI3K/AKT. Posteriormente, se transfectaron células CAD de manera transitoria con Lipofectamina® para sobre-expresar la proteína DJ-1 silvestre (DJ-1-WT) humana. Los resultados por WB sugieren que DJ-1 puede potenciar la vía PI3K/AKT porque se evidencia mayor fosforilación de p-AKT (Ser 473) frente a la acción neurotóxica de 6-OHDA (100 µM, 6h) y C2-ceramida (25 µM, 6h) en las células transfectadas con DJ-1-WT en comparación con las células transfectadas con el vector vacío. No se presentaron diferencias cuando las células fueron tratadas con rotenona (500 nM, 24h). En conclusión, DJ-1 podría sugerirse como blanco terapéutico en la EP porque éste es capaz de potenciar la vía PI3K/AKT en neuronas catecolaminérgicas bajo un contexto neurotóxico.

Palabras clave: *Enfermedad de Parkinson, células CAD, DJ-1, C2-ceramida, 6-hidroxidopamina, rotenona, vía PI3K/AKT.*

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is the second most frequent neurodegenerative disorder after the Alzheimer's disease (AD), and is characterized by progressive loss of dopaminergic neurons and accumulation of Lewy bodies. Recently, several genes have been associated with PD (*α-sinuclein*, *parkin*, *uchl-1*, *dj-1*, *pink1* and *lrrk2*); however, their pathophysiology is not clear yet and the cellular models could consolidate as a valuable tool to validate the functional genomic, as well as the intracellular signaling pathways in which they participate and their effects in the mitochondrial homeostasis. DJ-1's function is not clear, although it has been suggested that has a possible neuroprotective effect against the action of neurotoxins. We simulated in a model of catecholaminergic neurons of murine mesencephalic origin (CAD) the physiologic effect of human wild type DJ-1(WT-DJ-1) protein under a neurotoxicity challenge and searched for its relationship with the neuronal survival PI3K/AKT pathway. Initially, the effect of C2-ceramide, 6-hydroxydopamine (6-OHDA) and rotenone in CAD cells was evaluated for cellular viability (LDH) and mitochondrial activity (MTT), and its relationship with the PI3K/AKT pathway was determined by western-blot of p-AKT (Ser473) and t-AKT. We demonstrated that these neurotoxins induce cell death by dose-time dependent effect and PI3K/AKT pathway inhibition. Subsequently, the transient transfection of CAD cells was made with Lipofectamine® to overexpress the human WT-DJ-1 protein. The results by western blot suggest that DJ-1 can enhance the PI3K/AKT pathway because transfected cells with WT-DJ-1 present higher level of p-AKT (Ser473) under a neurotoxic challenge with 6-OHDA (100 μM, 6h) and C2-ceramide (25μM, 6h) respect to transfected cells with empty vector (EV). However, there are no differences between WT-DJ vs. EV in the levels of p-AKT (Ser473) when the cells are treated with rotenone (500 nM, 24h). In conclusion, DJ-1 could be suggested as therapeutic target for PD because it can enhance the PI3K/AKT pathway front to neurotoxic damage in catecholaminergic neurons.

Keywords: *Parkinson's disease, CAD cells, DJ-1, rotenone, 6-hydroxydopamine, C2-ceramide, PI3K/AKT pathway.*

CONTENIDO

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	21
1.1 Introducción.....	21
1.1.1 <i>Enfermedad de Parkinson</i>	23
1.1.2 <i>Muerte neuronal en la enfermedad de Parkinson</i>	26
1.2 Objetivos	27
1.2.1 <i>Objetivo general</i>	27
1.2.2 <i>Objetivos específicos</i>	27
1.3 Materiales y métodos	28
1.3.1 <i>Material biológico</i>	28
1.3.2. <i>Material fungible</i>	28
1.3.3. <i>Reactivos</i>	28
1.3.4 <i>Medios instrumentales y software</i>	29
1.3.5 <i>Métodos</i>	30
1.3.5.1. <i>Cultivo de células CAD</i>	30
1.3.5.2 <i>Determinación de la dosis letal 50 para las neurotoxinas</i>	30
1.3.5.3 <i>Viabilidad celular</i>	30
1.3.5.4 <i>Transformación de bacterias Escherichia coli JM109 y purificación de los plásmidos recombinantes</i>	30
1.3.5.5 <i>Transfección de células CAD</i>	30
1.3.5.6 <i>Western Blot (WB)</i>	31
1.3.5.7 <i>Análisis estadístico</i>	31
CAPÍTULO II. CÉLULAS CAD.....	33
2.1 Células CAD.....	33
2.2 Resultados	36
2.2.1 <i>Diferenciación de las células CAD</i>	36
2.2.2 <i>Transfección de células CAD</i>	36
2.3 Discusión.....	41
CAPÍTULO III. EFECTO DE LA ROTENONA EN CÉLULAS CAD	45
3.1 Rotenona.....	45
3.2 Resultados	51
3.2.1 <i>Efecto dosis-tiempo dependiente de la rotenona en células CAD</i>	51
3.3 Discusión.....	55
CAPITULO IV. EFECTO DE LA 6-HIDROXIDOPAMINA EN CÉLULAS CAD	59
4.1 6-Hidroxidopamina	59

4.2 Resultados	66
4.2.1 Efecto dosis-tiempo dependiente de la 6-OHDA en células CAD.....	66
4.3 Discusión.....	71
CAPÍTULO V. EFECTO DE LAS NEUROTOXINAS, ROTENONA, C2-CERAMIDA Y 6-HIDROXIDOPAMINA EN LA VÍA PI3K/AKT	74
5.1 Vía de supervivencia neuronal PI3K/AKT.....	74
5.2.1 La vía PI3K/AKT en Enfermedad de Parkinson.....	76
5.2 Resultados	76
5.2.1 Efecto de diferentes dosis de rotenona sobre la activación de AKT (Ser 473) por fosforilación en tiempos cortos de exposición.....	77
5.2.2 Efecto de la rotenona en la activación de AKT (Ser 473) por fosforilación a las 24 h.....	77
5.4.3 Efecto de la C2-ceramida en la activación de AKT (Ser 473) por fosforilación.....	81
5.4.4 Efecto de la 6-OHDA sobre la activación de AKT (Ser 473) por fosforilación.....	82
5.3 Discusión.....	85
CAPÍTULO VI. RELACIÓN DE DJ-1 CON LA VÍA PI3K/AKT EN UN CONTEXTO NEUROTÓXICO	90
6.1 DJ-1 (PARK 7).....	90
6.1.1 Genética de DJ-1 y Enfermedad de Parkinson.....	90
6.1.2 Funciones de DJ-1.....	93
6.1.3 DJ-1 y mitocondria.....	93
6.1.4 DJ-1 y la vía de supervivencia neuronal PI3K/AKT	94
6.2. Resultados	95
6.2.1 Expresión endógena de DJ-1 en células CAD.....	95
6.2.2 Sobre-expresión de DJ-1 humana en células CAD	97
6.2.3 Efecto de las neurotoxinas rotenona, 6-OHDA y C2-ceramida en células CAD que sobreexpresan la proteína DJ-1	99
6.2.3.1. Análisis por western blot del efecto de la rotenona 500 nM 24 h sobre la activación de AKT por fosforilación de la Ser 473 en células CAD que sobreexpresan la proteína DJ-1.....	100
6.2.3.2. Análisis por western blot del efecto de 6-OHDA 100 µM- 6 h sobre la activación de AKT por fosforilación de la Ser 473 en células CAD que sobreexpresan la proteína DJ-1.....	102
6.2.3.3. Análisis por western blot del efecto de C2-ceramida 25 µM - 6 h sobre la activación de AKT por fosforilación de la Ser 473 en células CAD que sobreexpresan la proteína DJ-1.....	104
6.3 Discusión.....	106
CAPÍTULO VII. CONCLUSIONES, RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS	110
7.1 Conclusiones.....	110

7.2 Recomendaciones y Perspectivas	111
7.3 Modelo sugerido.....	112
REFERENCIAS	114

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 Microfotografía de la diferenciación morfológica de las células CAD inducida por la privación de proteínas	35
Figura 2.2 Microfotografías de la morfología de células CAD in vitro sin diferenciar y diferenciadas	37
Figura 2.3 Microfotografías de células CAD diferenciadas (4 d) 24 h después de la transfección con Lipofectamine®2000 (L) y el plásmido (P) DEST C-Pink1-GFP	40
Figura 2.4 Eficiencia de transfección del 50 % determinada por microscopia de fluorescencia.....	41
Figura 3.1 Estructura química de la rotenona	46
Figura 3.2 Efecto dosis - tiempo dependiente de rotenona en células CAD diferenciadas.....	52
Figura 3.3 Efecto dosis – tiempo dependiente de la rotenona en células CAD determinado por la actividad MTT.....	53
Figura 3.4 Efecto dosis – tiempo dependiente de rotenona en células CAD determinado por la liberación de LDH.....	54
Figura 4.1 Estructura química de la 6-OHDA y oxidación	60
Figura 4.2 Mecanismo hipotético de la toxicidad de 6-OHDA	62
Figura 4.3 Interferencia de los productos de la auto-oxidación de la 6-OHDA con el MTT	68
Figura 4.4 Pérdida de la interferencia de los productos de la auto-oxidación de la 6-OHDA con el MTT a las 24 h de tratamiento	69
Figura 4.5 Efecto dosis – tiempo dependiente de la 6-OHDA en células CAD determinado por la actividad MTT.....	70
Figura 5.1 Vías de supervivencia neuronal	75
Figura 5.2 Efecto de la rotenona sobre la vía PI3K/AKT en tiempos cortos de exposición.....	78
Figura 5.3 Efecto de la rotenona y C2-ceramida sobre la vía PI3K/AKT.....	79
Figura 5.4 Efecto de la rotenona sobre la vía PI3K/AKT	80

Figura 5.5 Efecto de la C2-ceramida e IGF-1 en las células CAD	81
Figura 5.6 Efecto de la 6-OHDA sobre la vía PI3K/AKT	83
Figura 5.7 Efecto de la 6-OHDA e IGF-1 en las células CAD	84
Figura 6.1 Expresión endógena de la proteína DJ-1 en células CAD diferenciadas (4 d) y sin diferenciar	96
Figura 6.2 La sobreexpresión de DJ-1 se correlaciona con mayor activación de AKT por fosforilación del residuo Ser 473.....	98
Figura 6.3 Sobreexpresión de DJ-1. A. Análisis por WB de la sobreexpresión de DJ-1	99
Figura 6.4 Efecto de la rotenona 500 nM 24 h sobre la vía PI3K/AKT en células CAD transfectadas con DJ-1-WT humano.....	101
Figura 6.5 Efecto de la 6-OHDA sobre la vía PI3K/AKT en células CAD transfectadas con DJ-1 humana silvestre	103
Figura 6.6 Efecto de la C2-ceramida sobre la vía PI3K/AKT en células CAD transfectadas con DJ-1 humana silvestre	105
Figura 7.1 Modelo propuesto de la relación de DJ-1 con la vía de supervivencia neuronal PI3K/AKT en un contexto neurotóxico	112
Figura 7.2 Modelo propuesto en el contexto de neurotoxicidad por C2- ceramida, 6-OHDA y rotenona y sobreexpresión de DJ-1.	113

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.1 Genes asociados a la Enfermedad de Parkinson.....	25
Tabla 3.1 Efecto de la rotenona en modelos neuronales <i>in vitro</i>	48
Tabla 4.1 Efecto de la 6-OHDA en modelos neuronales <i>in vitro</i>	63
Tabla 5.1 Dosis letal 50 de las neurotoxinas (C2-ceramida, 6-OHDA y rotenona) en células CAD.....	76
Tabla 6.1 Mutaciones en DJ-1 asociadas a EP.....	92

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1. CULTIVO DE CÉLULAS CAD	147
1.1 Preparación de soluciones para cultivo celular	148
1.1.1 Medio de cultivo.....	148
1.1.2 Tampón fosfato salino (PBS).....	148
1.1.3 Solución de tripsina 0,25%	148
1.1.4 Solución stock de sodio selenita.....	149
1.1.5 IGF-1.....	149
1.1.6. Cubierta con Poli-D-Lisina (PLD).....	150
1.2 Mantenimiento de las células CAD.....	150
1.2.1 Descongelación	151
1.2.2 Desprendimiento celular	152
1.2.3 Subcultivos celulares de células CAD y montaje de cajas de 96, 24 y 6 pozos	152
1.2.4 Criopreservación de células CAD.....	153
1.2.5 Conteo y viabilidad celular por exclusión de azul tripán.....	154
ANEXO 2. DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL 50 PARA LAS NEUROTOXINAS	156
2.1 Rotenona.....	156
2.1.1 Stock inicial 10 mM rotenona en DMSO	156
2.1.2 Stock de trabajo 1 mM rotenona.....	157
2.1.3 Aplicación de tratamientos de rotenona en cajas de 96.....	157
2.2 6-Hidroxidopamina	160
2.2.1 Stock inicial 10 mM 6-OHDA	160
2.2.2 Stock de trabajo 1 mM 6-OHDA	160
2.2.3 Solución de ácido ascórbico 0,15%	161
2.2.4 Aplicación de tratamientos de 6-OHDA en cajas de 96	161
2.3 C2-ceramida.....	164
2.3.1 Preparación de C2-ceramida para tratamientos	164
ANEXO 3. VIABILIDAD CELULAR	165
3.1 MTT	165
3.1.1 Solución MTT.....	166
3.1.2 Buffer de lisis/solubilización MTT.....	166
3.2 LDH	166
3.2.1 Procedimiento LDH.....	167
3.2.2 Controles para LDH	168
3.2.2.1 Control del medio de cultivo	168
3.2.2.2 Control de lisis total o lisis 100 %.....	168

ANEXO 4. TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS Escherichia coli JM109 Y PURIFICACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS RECOMBINANTES 169

4.1 Transformación de bacterias Escherichia coli JM109 con plásmidos recombinantes.....	169
4.1.1 Medio LB líquido	169
4.1.2 Medio LB sólido	169
4.1.3 Medio LB líquido y sólido con ampicilina 100 µg/mL.....	170
4.1.3.1 Solución stock de ampicilina 50 mg/mL	170
4.1.4 Medio SOC	170
4.1.5 Medio de congelación para bacterias	171
4.1.6 Procedimiento de transformación de células E. coli JM109 con plásmidos recombinantes	171
4.1.7 Toohtpick	174
4.1.7.1 EDTA (10 mM, pH 8.0).....	174
4.1.7.2 Solución NSS	175
4.1.7.3 KCl (4M).....	175
4.1.8 Purificación de plásmidos recombinantes.....	175
4.1.8.1 Lisis celular	175
4.1.8.2 Lavado	176
4.1.8.3 Elución	177
4.1.8.4 Cuantificación del DNA plasmídico	177

ANEXO 5. TRANSFECCIÓN DE LAS CÉLULAS CAD 178

5.1 Protocolo de transfección de células CAD	178
--	-----

ANEXO 6. WESTERN BLOT..... 181

6.1 Soluciones usadas en Western Blot.....	181
6.1.1 Buffer de lisis celular.....	181
6.1.2 Cocktail de inhibición enzimático	182
6.1.3 Buffer de carga	182
6.1.4 Gel de separación.....	183
6.1.5 Gel de concentración.....	183
6.1.5 Buffer de corrido 10X.....	184
6.1.5.1 Buffer de corrido 1X	184
6.1.6 Buffer de transferencia 10X	185
6.1.6.1 Buffer de transferencia 1X.....	185
6.1.7 Buffer de lavado: TRIS Buffer Salino (TBS) 10X	185
6.1.7.1 Buffer de lavado: TRIS Buffer Salino (TBS) 1X.....	185
6.1.8 Buffer de bloqueo	186
6.1.9 Anticuerpo primario.....	186
6.1.10 Anticuerpo secundario	186
6.2 Extracción de proteína.....	187
6.3 Determinación de la concentración de proteína	187
6.4 Electroforesis en geles denaturantes de poliacrilamida	192
6.5 Transferencia a membranas de nitrocelulosa.....	192

6.6. Detección de proteínas.....	192
6.7 Limpieza de membranas luego de western blot para re-análisis.....	193
6.7.1 <i>Buffer de limpieza</i>	194
ANEXO 7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	195
7.1 Rotenona MTT	195
7.2 Rotenona LDH.....	196
7.3 6-OHDA MTT	197
7.4 Efecto de la rotenona sobre % p-AKT (Ser 473)/t-AKT	198
7.5 Sobreexpresión de DJ-1 en células CAD	198

LISTA DE FIGURAS ANEXAS

Figura A. 2.1 Esquema de los experimentos con rotenona	158
Figura A. 2.2 Diseño experimental para tratamientos con rotenona.	159
Figura A. 2.3 Esquema de los experimentos con 6-OHDA	162
Figura A. 2.4 Diseño experimental para tratamientos con 6-OHDA.....	163
Figura A. 4.1 Diseño para la transformación de células E. coli JM109.	173
Figura A. 4.2 Transformación de Escherichia coli JM109 y purificación de plásmidos.....	175
Figura A. 6.1 Esquema de los tratamientos en células CAD para posterior análisis por WB	189

LISTA DE TABLAS ANEXAS

Tabla A. 1.1 Tratamientos con IGF-1	149
Tabla A. 1.2 Especificaciones para la cubierta con Poli-D-Lisina.....	150
Tabla A. 1.3 Referencia para la siembra de células CAD diferenciadas en cajas de 96, 24 y 6 pozos.	153
Tabla A. 2.1 Tratamientos con rotenona.	157
Tabla A. 2.2 Tratamientos con 6-OHDA.....	161
Tabla A. 2.3 Tratamientos con C2-ceramida.....	164
Tabla A. 5.1 Optimización de la transfección de células CAD.....	179
Tabla A. 5.2 Procedimiento de transfección en células CAD diferenciadas ...	180
Tabla A. 6.1 Dilución de anticuerpos primarios	186
Tabla A. 6.2 Dilución de anticuerpos secundarios.....	187
Tabla A. 6.3 Descripción de los tratamientos realizados para el análisis por western blot del efecto de las neurotoxinas rotenona, C2-ceramida y 6-OHDA en células CAD diferenciadas.....	190
Tabla A. 6.4 Descripción de los tratamientos realizados para el análisis por western blot de la relación de DJ-1 con la vía PI3K/AKT en un contexto neurotóxico en células CAD transfectadas con DJ-1-WT humano.	191

LISTA DE ABREVIACIONES

°C:	Grados centígrados
6-OHDA:	6-hidroxi dopamina
AB:	Antibiótico
Ác. Asc.:	Ácido ascórbico 0,15 % en agua destilada estéril, vehículo de la 6-OHDA
AD:	Alzheimer's Disease
ADN:	Ácido desoxirribonucleico
APS:	Persulfato de amonio
BCA:	Ácido bicinconínico
CAD:	Células CATH.a diferenciadas
CAPK:	Cinasas activadas por ceramida
CAPP:	Fosfatasa activada por ceramida
Cer.:	C2-Ceramida (<i>N-Acetyl-D-sphingosine</i>)
Cit-c:	Citocromo c
CL:	Cuerpos de Lewy
d:	Días
DA:	Dopamina
DE:	Desviación estándar
DJ-1-WT:	DJ-1 silvestre humano, pCDNA3.1 DJ-1-WT HIS-V5
D-MEN/F12:	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12</i>
DMSO:	Dimetil sulfóxido
EA:	Enfermedad de Alzheimer
Ej.:	Ejemplo
EP:	Enfermedad de Parkinson
ERO:	Especies reactivas de oxígeno
EV:	Vector vacío, pCDNA 3.1 HIS-V5
FCN:	Factor de crecimiento nervioso
Figura A.:	Figura Anexa
g:	Gramos
GAP-43:	Proteína asociada al crecimiento 43
GFAP:	Proteína ácida fibrilar glial
GFP:	Proteína verde fluorescente
h:	Horas
H₂O:	Agua
H₂O d:	Agua destilada
H₂O dd:	Agua destilada y desionizada
H₂O₂:	Peróxido de hidrógeno
HO·:	Radicales hidroxilo
HO-1:	Hemo oxigenasa – 1, Heme oxygenase-1
IGF-1:	Factor de crecimiento similar a la insulina recombinante
kDa:	Kilodaltons
L:	Litro

LDH:	Lactato deshidrogenasa
L-DOPA:	L-dihidroxifenilalanina, levodopa
MAPKs:	Cinasas activadas por mitógenos (del inglés: <i>mitogen activated protein kinase</i>)
mg:	Miligramo
min:	Minutos
mL:	Mililitro
mm:	Milímetro
mM:	Milimolar
MPTP:	1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
mARN:	Ácido ribonucleico mensajero
MT-III:	Metalotionein III, Metallothionein-III
MTT:	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
ng:	Nanogramo
nM:	Nanomolar
NT-3:	Neurotrofina-3
OMS:	Organización mundial de la salud
p-AKT:	AKT fosforilada
PBS:	Tampón fosfato salino
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
PD:	Parkinson's Disease
PEG:	Polietilenglicol, wt 3.350
pl:	Punto isoeléctrico
PLD:	Poli-D-Lisina
PTEN:	Fosfatasa y homóloga de tensina (<i>Phosphatase and tensin homolog</i>)
PTPm:	Poros de transición de permeabilidad mitocondrial
Rot.:	Rotenona
rpm:	Revoluciones por minuto
SAPK:	Cinasas activadas por estrés
SDS:	Dodecil sulfato de sodio, detergente
sem:	Semanas
SFB:	Suero fetal bovino
SN:	Sustancia <i>nigra</i>
SNAP-25:	Proteína asociada al sinaptosoma 25
SNC:	Sistema nervioso central
SNP:	Sistema nervioso periférico
SNpc:	Sustancia <i>nigra pars compacta</i>
SUP:	Sistema ubiquitina - proteosoma
Tabla A.:	Tabla Anexa
t-AKT:	AKT total
TBS:	TRIS <i>Buffer</i> Salino
TDA:	Transportador de dopamina
TH:	Tirosina hidroxilasa
TrkRs:	Receptores tirosina- quinasa
ufc:	Unidades formadoras de colonias
UV:	Ultravioleta
WB:	Western blot

WT-DJ-1:	Wild Type DJ-1
µg:	Microgramo
µm:	Micrómetro
µM:	Micromolar

CAPÍTULO I.
INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1.1 Introducción

La EP es un desorden neurodegenerativo complejo y crónico que afecta aproximadamente al 1 % de la población mayor de 65 años y al 4 % de la población mayor de 84 años (Moore *et al.*, 2005). Es el segundo desorden neurodegenerativo más común después de la EA (Huerta *et al.*, 2007; Tan y Skipper, 2007). En Colombia afecta a unos 200.000 individuos, aproximadamente. La tendencia demográfica mundial es al aumento de la población anciana, por lo cual se espera que en los próximos 20 años, la EP aumente cuatro veces su prevalencia actual, convirtiéndose en un serio problema de salud pública (Pretel, 2005).

Con base en lo anterior es importante realizar investigación hacia la búsqueda de terapias neuroprotectoras, ya que la EP representa la consecuencia final de un grupo de interacciones complejas a lo largo de la vida de un individuo, en que intervienen la predisposición genética, algunas características propias de la vía nigro-estriatal y la exposición a toxinas ambientales (Olanow y Tatton, 1999). A partir de esto se hace necesario realizar estudios de tipo celular y molecular que conecten o permitan entender la fisiopatología de EP y los modelos *in vitro* se pueden consolidar como una excelente herramienta en esta búsqueda.

La vulnerabilidad selectiva de algunas poblaciones neuronales, que caracteriza a los distintos procesos neurodegenerativos, es uno de los mayores enigmas que ha ocupado la atención de los investigadores desde hace mucho tiempo y que a la fecha sigue sin ser resuelto. En EP el análisis se ha centrado básicamente en los mecanismos selectivos de la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia *nigra pars compacta* (SNpc), ya que la pérdida específica de este grupo neuronal conduce al déficit de dopamina (DA), degeneración de terminales dopaminérgicas y del sistema nigro-estriatal, presencia de cuerpos de Lewy (CL) y disfunción motora, manifestada por temblor en reposo, rigidez, bradiquinesia e inestabilidad postural; lo cual se puede correlacionar con la fisiopatología y la clínica de la EP (Ma *et al.*, 1997; Paulus y Jellinger, 1991; Jellinger, 1999, 2001, 2002).

Las estrategias que se han venido utilizando como herramientas neuroprotectoras, incluso en ensayos clínicos, son la utilización de factores de crecimiento y los implantes de células madre, los cuales generan sólo una protección temporal, y esto puede ser atribuido al desconocimiento de muchos de los eventos celulares y moleculares que subyacen en dichos procesos. Recientemente, se han empezado a esclarecer estos mecanismos, aunque fragmentadamente. La evidencia empieza a converger en vías de señalización

intracelular implicadas en supervivencia celular y función mitocondrial (Parker y Swerdlow, 1998; Dadga *et al.*, 2009), de manera que la comprensión de los procesos de regulación de estas vías podría facilitar la creación de fármacos con el fin de potenciar la viabilidad de una población celular específica.

Una hipótesis reciente para tratar de explicar la etiopatogénesis de la EP se deriva de los hallazgos genéticos y moleculares de los últimos años: mutaciones en α -sinucleína, Parkin, DJ-1, PINK-1, LRRK2, entre otros (Polymeropoulos *et al.*, 1997; Kitada *et al.*, 1998; Greenamyre y Hastings, 2004; Deng *et al.*, 2005; Junn *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2005, 2006; Moore *et al.*, 2005; Paisán-Ruiz *et al.*, 2005; Petit *et al.*, 2005). Aunque en los últimos años, se ha ampliado el conocimiento de la posible función de varios de estos genes en supervivencia neuronal, el papel de las mutaciones en la vulnerabilidad selectiva de neuronas dopaminérgicas aún no es claro. Existen varios resultados que sugieren que hay un punto de convergencia de la función de estos genes en la regulación de cascadas de señalización que controlan la homeóstasis y dinámica mitocondrial, sin embargo, son necesarios más estudios que permitan esclarecer su relación con el estrés oxidativo, la disfunción y dinámica mitocondrial, la degradación de proteínas y la muerte selectiva de neuronas dopaminérgicas en la patogénesis de la EP (Kim *et al.*, 2005; Moore *et al.*, 2005; Petit *et al.*, 2005; Ved *et al.*, 2005).

Además, la evidencia aportada por los modelos genéticos y bioquímicos converge en que los pacientes con EP presentan alteraciones mitocondriales, pero muchos de los mecanismos moleculares que subyacen a la disfunción mitocondrial son aún desconocidos (Olanow y Tatton, 1999). Por lo tanto el análisis *in vitro* de los efectos reguladores corriente arriba y abajo de la mitocondria son fundamentales para ampliar y tratar de establecer sus efectos sobre aspectos de la fisiología neuronal dopaminérgica aún no explorados (Fiskum *et al.*, 2003). También, existen resultados contradictorios y no concluyentes que han abierto más interrogantes que respuestas respecto a la función y los mecanismos fisiopatológicos celulares y moleculares en los cuales están involucrados tales genes (Da Costa *et al.*, 2000; Manning-Bog *et al.*, 2003; Wersinger y Sidhu, 2003).

Estudios previos han sugerido que genes asociados a EP, como es el caso de DJ-1, actúan como elementos neuroprotectores en vías de supervivencia neuronal las cuales se pierden en esta enfermedad. DJ-1 se ha descrito como una proteína con múltiples funciones y a nivel neuronal se ha reportado que tiene función antioxidativa y colocaliza con mayor frecuencia en mitocondrias dañadas como mecanismo de protección (Yokota *et al.*, 2003; Taira *et al.*, 2004; Canet-Avilés *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2005); pero no es clara la función de DJ-1 en mitocondria y tampoco su relación con las vías de señalización y supervivencia neuronal. No obstante, los mecanismos moleculares relacionados con DJ-1 y la vía de supervivencia neuronal PI3K/AKT no se encuentran esclarecidos en su totalidad en el contexto de EP.

La detección temprana de los procesos neurodegenerativos y los riesgos asociados a éstos están íntimamente relacionados con la identificación de

factores neuroprotectores con potencial terapéutico. En tal sentido es importante aclarar la relación de DJ-1 con la vía de supervivencia neuronal PI3K/AKT en un contexto neurotóxico con el propósito de desarrollar terapias dirigidas a componentes específicos de esta vía y sus blancos corriente arriba y/o abajo. Esto podría constituir una de las principales opciones para la regulación de la muerte celular y un blanco terapéutico que favorezca la supervivencia celular de las poblaciones neuronales más susceptibles, como es el caso de las neuronas dopaminérgicas de la SN en la EP.

En este proyecto se analizan potenciales mecanismos moleculares en los cuales podría intervenir DJ-1 y su acción frente a algunas toxinas en un modelo de neuronas catecolaminérgicas de origen mesencefálico murino (células CAD). En el contexto neurotóxico, la rotenona y la 6-OHDA se han usado por muchos años para modelar EP, tanto *in vivo* como *in vitro* (Betarbet *et al.*, 2000; Soto-Otero *et al.*, 2000), sin embargo, aún no son claros muchos aspectos como lo son su relación con la vía de supervivencia neuronal PI3K/AKT y cómo la proteína DJ-1 podría estar regulando este proceso. En relación al uso de la C2-ceramida se busca simular el efecto de la ceramida, un segundo mensajero lipídico involucrado en diversas respuestas celulares frente a estímulos extracelulares, incluyendo apoptosis, de este modo la ceramida se ha propuesto como un camino putativo de muerte neuronal en EP (France-Lanord *et al.*, 1997).

Los resultados obtenidos a partir de este estudio permiten un fortalecimiento de la evidencia que acerca al desarrollo de terapias dirigidas contra componentes específicos, tales como la vía PI3K/AKT y sus blancos corriente abajo y/o arriba, lo cual podría constituir una de las principales opciones para la regulación de la muerte celular y favorecer la supervivencia neuronal de las poblaciones más susceptibles en EP.

1.1.1 Enfermedad de Parkinson

La EP fue descrita por primera vez por James Parkinson en 1.817 (Stien, 2005). En la actualidad es la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente después de la EA, caracterizada por la pérdida selectiva y progresiva de neuronas dopaminérgicas de la SNpc y la acumulación de proteínas intracitoplasmáticas en CL (Tan y Skipper, 2007).

La EP es una enfermedad de tipo complejo, es decir que tiene implícito un componente genético y ambiental, lo cual hace que su diagnóstico y tratamiento sea más complicado. El diagnóstico clínico de la EP requiere la presencia de algunos signos y síntomas motores: temblor de reposo, rigidez en “rueda dentada”, bradiquinesia o aquinesia e inestabilidad postural (Gelb *et al.*, 1999) Neuropatológicamente se caracteriza por degeneración neuronal, gliosis reactiva, muerte selectiva y la presencia de CL y neuritas de Lewy en neuronas dopaminérgicas de la SN y el *Locus coeruleus* (Pollanen *et al.*, 1993). Los CL son inclusiones neuronales, esféricas e intra-citoplasmáticas, formados por

agregados de neurofilamentos, α -sinucleína, ubiquitina, UCH-L1, tirosina hidroxilasa, calbindina y *tau* entre otras (Forno, 1996).

Las células más afectadas en la SN presentan algunas características diferenciales como son: localización en zonas con alta densidad celular, alto contenido de neuromelanina, expresión abundante del transportador de dopamina (TDA), pobre contenido de calbindina y enzimas glucolíticas, y alta arborización en el estriado (Jellinger *et al.*, 2002). Sin embargo, tales particularidades a la fecha no permiten explicar su degeneración.

En la dinámica causal compleja que caracteriza a la EP, la genética y el componente ambiental no son eventos mutuamente excluyentes sino que podrían ser complementarios en el proceso que subyace a esta enfermedad. Algunas toxinas exógenas como el 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) (Langston, 1996), rotenona (Betarbet *et al.*, 2000), 6-OHDA (Soto-Otero *et al.*, 2000), y endógenas como la ceramida (France-Lanord *et al.*, 1997) y procesos como el estrés oxidativo (Jenner, 1998, 2003), alteraciones mitocondriales (Schapira *et al.*, 1998), alteraciones del sistema ubiquitina-proteosoma (SUP) (McNaught y Olanow, 2003), el envejecimiento (Le Couteur *et al.*, 2002), excitotoxicidad, estrés por nitrógeno, inflamación y proteólisis alterada (Jenner y Olanow, 1998, 2006) se han considerado como potenciales contribuyentes al desarrollo de la EP.

Uno de los grandes avances en la investigación biomédica básica en enfermedades neurodegenerativas ha sido el reconocimiento, mapeo y descripción de varios genes en algunas formas heredadas monogénicamente. Hasta el momento, se han establecido varios *loci* para EP y se han denominado en secuencia cronológica (PARK1-PARK16, Tabla 1.1). Se han identificado varios genes responsables de las formas Mendelianas de la EP, algunos para EP autosómica dominante (α -sinucleína, PARK3, UCH-L1, LRRK2, PARK10, OMI/HTRA2 y GIGYF2), EP autosómica recesiva (Parkin, DJ-1, PINK1, ATP13A2, FBXO7) y otros con herencia desconocida (PLA2G6 y PARK16) (Kitada *et al.*, 1998; Bonifati *et al.*, 2003; Hardy y Cookson, 2003; Valente *et al.*, 2004; Rosner *et al.*, 2008; Gregory *et al.*, 2008; Di Fonzo *et al.*, 2009; Simón-Sánchez *et al.*, 2009; Satake *et al.*, 2009; Gao *et al.*, 2009; Satake *et al.*, 2009; Tan *et al.*, 2010). Con esta evidencia se ha sugerido un modelo patogénico de función celular de estas proteínas en el cual la ganancia de función de α -sinucleína y LRRK2 favorecen la disfunción celular promoviendo la agregación de proteínas, mientras que Parkin, DJ-1 y PINK1 actúan como elementos neuroprotectores en vías de supervivencia neuronal las cuales se pierden en la EP (Cookson *et al.*, 2004; Fernagut *et al.*, 2004; Yamada *et al.*, 2005).

LOCUS	LOCALIZACIÓN	GEN	FUNCIÓN	TIPO DE HERENCIA	REFERENCIAS
PARK1,4	4q21	α -sinucleína	Componente de los CL	AD	Polymeropoulos <i>et al.</i> , 1997; Ibanez <i>et al.</i> , 2004; Chartier-Harlin <i>et al.</i> , 2004
PARK2	6q25,2-q27	Parkin	Ubiquitina E3 Ligasa	AR	Kitada <i>et al.</i> , 1998
PARK3	2p13	Desconocido	Desconocida	AD	Gasser <i>et al.</i> , 1998
PARK5	4p14	UCHL1	Hidrolasa C-terminal de ubiquitina	AD	Leroy <i>et al.</i> , 1998
PARK6	1p35-36	PINK	Cinasa mitocondrial	AR	Valente <i>et al.</i> , 2004
PARK7	1p36	DJ-1	Antioxidante	AR	Bonifati <i>et al.</i> , 2003
PARK8	12q12	LRRK2	Cinasa y GTPasa (Dardarina)	AD	Zimprich <i>et al.</i> , 2004
PARK9	1p36	ATP13A2	Probable transportador catiónico ATPasa	AR	Paisán-Ruíz <i>et al.</i> , 2004
PARK10	1p32	Desconocido	Desconocida	AD	Li <i>et al.</i> , 2002
PARK11	2q36-37	GIGYF2	Regulación de la señalización de receptores tirosin quinasa	AD	Lautier <i>et al.</i> , 2008
PARK12	Xq21-25	Desconocido	Desconocida	Cromosoma X	Pankratz <i>et al.</i> , 2002
PARK13	2p13	OMI/HTRA2	Serín Proteasa	AD	Strauss <i>et al.</i> , 2005; Ross <i>et al.</i> , 2008
PARK14	22q13.1	PLA2G6	Fosfolipasa A2	Desconocida	Paisán-Ruíz <i>et al.</i> , 2009
PARK15	22q12-13	FBXO7	Ubiquitina E3 Ligasa	AR	Shojaee <i>et al.</i> , 2008; Di Fonzo <i>et al.</i> , 2009
PARK16	1q32	Desconocido	Desconocida	Desconocida	Satake <i>et al.</i> , 2009

Tabla 1.1 Genes asociados a la Enfermedad de Parkinson. A la fecha se han descrito 16 loci asociados a la enfermedad de Parkinson enumerados de PARK1 a PARK16, según el orden de aparición. CL: Cuerpos de Lewy; AD: Autosómica dominante; AR: Autosómica recesiva.

1.1.2 Muerte neuronal en la enfermedad de Parkinson

La causa de la muerte celular en la EP es aún desconocida y varios mecanismos están actualmente en discusión: la necrosis, la apoptosis y la autofagia (Olanow y Tatton, 1999). Por la escasez de cambios necróticos en la SN, el patrón topográfico y temporalmente específico de la pérdida celular, la apoptosis emerge como el principal mecanismo de muerte neuronal en EP (Honig y Rosenberg, 2000; Mattson, 2000; Yuan y Yankner, 2000). Algunos reportes indican que el 12 % de neuronas dopaminérgicas expresan proteínas pro-apoptóticas, y la activación de caspasas precede la muerte celular (Darios *et al.*, 2003).

Otros reportes resaltan los elevados niveles de proteínas anti-apoptóticas en los ganglios basales y en la SN de pacientes con EP (Marshall *et al.*, 1997), aunque la evidencia es aún controversial. Una correlación positiva entre la pérdida celular, el porcentaje de células de la SN positivas para caspasa 3 y una disminución del 76 % de las neuronas dopaminérgicas en la EP, sugiere que la caspasa 3 es el principal efector de la apoptosis y contribuye a la vulnerabilidad regional observada (Olanow y Tatton; 1999; Honig y Rosenberg, 2000; Mattson, 2000; Yuan y Yankner, 2000).

La apoptosis es una forma de muerte celular programada, morfológica y bioquímicamente bien caracterizada. Es un proceso activo, es decir requiere de ATP y se manifiesta con retracción celular, fragmentación nuclear, preservación de los organelos intracelulares, cambios en la asimetría de los fosfolípidos de la membrana. Además, la apoptosis es un proceso llevado a cabo por una maquinaria intrínseca y específica de “suicidio celular” (Mattson, 2000). Algunos de los eventos que subyacen la cascada molecular en la apoptosis se subdividen en: la vía extrínseca (disparada por los receptores de la superfamilia de CD95L) y la vía intrínseca (gobernada por la mitocondria) (Hengartner, 2000; Vila y Przedborski, 2003).

La vía mitocondrial como vía final común ha sido la más estudiada en eventos de muerte y de supervivencia neuronal y ha sido asociada con un amplio espectro de enfermedades neurodegenerativas (Haerberlein, 2004; Vila y Przedborski, 2003; Perier *et al.*, 2007). En los procesos corriente arriba de la activación mitocondrial participan una multitud de proteínas pro-apoptóticas (Bax, Bad, Bid, Bak, Bcl-xS) y anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-xL) (Hengartner, 2000), algunas de las cuales están localizadas en la superficie citosólica de la membrana externa mitocondrial y se encargan de regular la homeóstasis mitocondrial por diversos mecanismos como: inserción y formación directa de un poro transmembranal, interacción y regulación del canal aniónico dependiente de voltaje y del transportador de nucleótidos de adenosina, convergiendo en la alteración del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTPm), con la consecuente liberación del citocromo c (cit-c), formación del apoptosoma y la activación de caspasas efectoras (Hengartner, 2000; Marsden *et al.*, 2002; Vila y Przedborski, 2003).

Las alteraciones mitocondriales surgen del delicado balance entre los niveles de las proteínas pro y anti-apoptóticas, lo cual a su vez depende de la naturaleza e intensidad del estímulo desencadenante, del estado y del tipo celular, de algunas condiciones del microambiente celular externo (Mattson y Kroemer, 2003) y de manera autónoma por procesos de regulación que modifican las formas activas y/o inactivas de las distintas vías corriente arriba; por ejemplo, AKT es capaz de fosforilar mediadores pro-apoptóticos y de esta manera inactivarlos, como es el caso de Bad (Datta *et al.*, 1997); por otra parte, la de-fosforilación de AKT inducida por ceramidas hace que interactúe con Bcl-2 y Bcl-xL (mediadores anti-apoptóticos) desencadenando la cascada apoptótica (Stoica *et al.*, 2003). De igual forma, la ubiquitinación y subsecuente proteólisis de Bax por el SUP regula el proceso apoptótico (Li y Dou, 2000), y por esto es importante determinar cómo estos procesos de modificación post-traduccionales están implicados en la regulación de la supervivencia neuronal y su potencial importancia en la neurodegeneración (Zhang *et al.*, 2004).

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo general

- Determinar el efecto de DJ-1 frente a la acción de neurotoxinas y su relación con la vía de supervivencia neuronal PI3K/AKT en células CAD.

1.2.2 Objetivos específicos

Determinar el efecto de las neurotoxinas 6-OHDA y rotenona sobre la viabilidad de las células CAD.

- Analizar la relación de las neurotoxinas C2-ceramida, rotenona y 6-OHDA con la vía PI3K/AKT.

- Establecer las condiciones de transfección de las células CAD con el constructo silvestre del gen DJ-1 humano.

- Analizar la contribución de la sobreexpresión de DJ-1 sobre la vía de supervivencia neuronal PI3K/AKT.

- Determinar el efecto de la sobreexpresión de DJ-1 silvestre humano en células CAD en un contexto neurotóxico.

1.3 Materiales y métodos

1.3.1 Material biológico

Para este estudio se utilizó como modelo celular una línea murina de neuronas catecolaminérgicas de origen mesencefálico, las células CAD, donadas por la Dra. Chikaraishi DM del departamento de Neurobiología del *Duke University Medical Center, Durham, North Carolina* al Dr. Gonzalo Arboleda del grupo de Neurociencias de la Universidad Nacional de Colombia.

Se trabajo con plásmidos (DEST C-Pink1-GFP, pCDNA3.1 V5/HIS y pCDNA3.1 V5/HIS DJ-WT) donados por el Dr. Cookson MR del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos.

Células competentes *Escherichia coli* $>10^8$ ufc/ μ g (Promega, L2001).

1.3.2. Material fungible

Se emplearon tubos tipo Falcon de 15 y 50 mL (Nunc); frascos de cultivo cuello inclinado de 25 cm² y 75 cm² (Nunc); criotubos de 1,5 mL (Scientific); cajas de cultivos fondo plano de 96, 24 y 6 pozos (Nunc); membranas de nitrocelulosa (GE Healthcare Hybond™ ECL); películas de revelado (Amersham Hyperfilm ECL); filtros para cultivo (Nalgene 0,22 μ m, 47 mm, Filter-Non-Sterile); Filtros para jeringa (Nalgene 0,2 μ m-25 mm, 190-2520/8-0404-39 493).

1.3.3. Reactivos

D-MEM/F-12 (Dulbecco`s Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (Ham) (1:1) powder, 15 mM HEPES buffer, L-glutamina, bicarbonato de sodio, piridoxina hidrocloreto) (Gibco, 12400-024), solución antibiótico penicilina/estreptomicina (10.000 U/mL de penicilina : 10.000 mg/mL de estreptomicina) (Gibco, 15140), suero fetal bovino (FBS) (Gibco, 16000-044), solución de azul tripán (0,4%) (Sigma, T8154), tripsina-EDTA (Sigma, T4049), albúmina sérica bovina (Sigma, A-4503), MTT (Sigma, M5655), NaHCO₃ (Panreac, 131638), anticuerpo anti total-Akt-rabbit (Cell signaling, 4691), anticuerpo anti phospho-Akt-rabbit (Ser473) (Cell signaling, 4060), anticuerpo anti-rabbit IgG HRP-linked (Cell signaling, 7074), anticuerpo anti-mouse IgG HRP-linked (Cell signaling, 7076), anticuerpo anti- β -actina-mouse (Millipore, Mab 1501), anticuerpo anti-DJ-1-goat (Santa Cruz Biotecnología, sc27006), anticuerpo anti-goat IgG HRP-linked (Santa Cruz Biotecnología, sc2020), PMSF (Sigma, P7626), benzamidina (Research organics, 1003B), aprotinina (Sigma, A1153), Kit de quimioluminiscencia (Amersham, ECL Plus Western Blotting Detection Reagents), BCA Protein assay (Pierce, 23225), Kaleidoscope Prestained Standards (Bio-Rad, 161-0324), mezcla 30%

acrilamida:bisacrilamida 29:1 (Bio-Rad 161-0556), NP 40 (Sigma, N6507), KCl (Merck, 104936), NaCl (Merck, 106404), Na₂HPO₄ (Merck, 106586), KH₂PO₄ (Merck, 104873), EDTA (Sigma, E5134), ortovanadato de sodio Na₃VO₄ (Sigma, S6508), fluoruro de sodio NaF (Sigma, S7920), inhibidor de tripsina (Sigma, T9003), TRIS base (Promega, H5131), SDS (Sigma, L4509), glicina (Sigma, G7126), metanol (J.T Baker, 907003), isopropanol (Mallinckrodt, 67630UN1219), TEMED (Sigma, T9281), persulfato de amonio APS (Bioexpress, M133), azul brillante de Coomassie R-250 (Merck, 112553), urea (Promega, V3175), β-mercaptoetanol (Sigma, M3148), azul de bromofenol (Sigma, B8026), glicerol (Mallinckrodt, 5092), DMSO como disolvente (Sigma, D5879), DMSO para congelar células (Sigma, D2650), Lipofectamine™ 2000 Reagent (Invitrogen, 11668-019), Lipofectamine™ LTX and Plus™ Reagent (Invitrogen, 15338-100), ampicilina (Sigma, 194526), agar (Oxoid, L11), triptona (Oxoid, LP0042), extracto de levadura (Oxoid, LP0021), polietilenglicol wt 3.350 (PEG) (Sigma, P4338), 6-OHDA (Sigma, 162957), rotenona (Sigma, R8875), N-Acetyl-D-sphingosine (C2-ceramida) (Sigma, A9171), factor de crecimiento similar a la insulina recombinante (IGF-1) (BioSource, PHG0074), kit para extracción de plásmidos (Promega, A2495), CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (LDH) (Promega, G1781), Poli-D-Lisina (PDL) (Sigma, P7405), N,N-dimetilformamida 99,8% (Panreac, 161785.1611), etanol absoluto (Sigma, 141086.1212), agarosa (SeaKem®LE Agarose, 50004).

Se emplearon tres tipos de agua: agua destilada H₂O d, agua destilada y desionizada H₂O dd y agua estéril: H₂O dd previamente autoclavada (agua ultrapura).

1.3.4 Medios instrumentales y software

Durante el desarrollo del proyecto se utilizaron los siguientes equipos: balanza analíticas (OHAUS Adventure, AR1140), pH metro (Thomas Scientific, TS625), cabina de seguridad biológica tipo A2 (NUAIRE), incubadora de CO₂ (NUAIRE), bomba de vacío (Vacubrand ME2), microcentrifuga refrigerada para para tubos de 1,5 mL (Thermo Sorvall Legend Micro 17R), centrifuga para cultivo (SIGMA 2-6E), minicentrifuga (Labnet), baño serológico (PSelecta Unitronic, 320-OR), agitadores magnéticos (Lab Line Pyro Magnestic), neveras (Centrales, Whirlpool), congelador -70 °C (Revco), microscopio invertido (Nikon), cámara de Neubauer (Boeco Germany), pipette boy (Accu-jet Brand), autoclave (TW STEAM TRAP, Model A-3N), autoclave eléctrica a vapor olla (All American, 25X), vortex mixer (Labnet, 50200), equipo de revelado (Konica Medical Film Processor SRX-101A), Mini-PROTEAN® 3 Cell (Bio-Rad 165-3302), espectrofotómetro (Thermo Scientific NanoDrop 1000), espectrofotómetro de placas de 96 (Ultramarck), termociclador (Bio-Rad, 170-9703), microscopio invertido y de epifluorescencia (Carl Zeiss, Modelo Axiovert 40 CFL), agitador orbital (MAZQ, 4000), centrifuga de mesa refrigerada multipropósito de ángulo móvil (Eppendorf), maquina de hielo (Scotsman, AFE 400), cámara digital (Powershot), cabina extractora de gases, tanque de nitrógeno líquido (35VHC), fuente de poder CBS (Scientific company INC, EPS – 4000 Series II), sistema

documentador de geles (Genius de syngene), software Genius Tools de Syngene para el análisis densitométrico y para el análisis estadístico y gráficos se usó el software Graph Pad Prism Demo 5.

1.3.5 Métodos

A continuación se menciona de forma general la metodología que se usó para llevar a cabo los objetivos del trabajo. La descripción detallada de los métodos se presenta en los anexos.

1.3.5.1. Cultivo de células CAD

Las condiciones de cultivo, los tiempos de doblaje poblacional y diferenciación celular de la línea celular CAD ya han sido descritos previamente en un trabajo realizado por Rodríguez YM (Tesis de Maestría en Genética Humana, PUJ, 2006). (Anexo 1).

1.3.5.2 Determinación de la dosis letal 50 para las neurotoxinas

Inicialmente, se determinó la cinética (tiempo y concentración) de la toxicidad de la rotenona y la 6-OHDA, con el fin de establecer los protocolos de exposición que generaron alteraciones verificables en la fisiología celular y se definieron las condiciones de base para los posteriores ensayos de exposición de las células CAD a las neurotoxinas (Anexo 2).

1.3.5.3 Viabilidad celular

La viabilidad celular fue evaluada por exclusión de azul de tripán (Anexo 1.2.5), MTT (Anexo 3.1) y LDH (Anexo 3.2).

1.3.5.4 Transformación de bacterias Escherichia coli JM109 y purificación de los plásmidos recombinantes

Inicialmente, se transformaron bacterias de *Escherichia coli* JM109, con los plásmidos DEST C-Pink1-GFP, pCDNA3.1 V5/HIS y pCDNA3.1 V5/HIS DJ-WT, donados por el Dr. Cookson MR del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos para luego llevar a cabo la purificación. Los productos de esta purificación fueron cuantificados y usados para la transfección de las células CAD con el fin de sobreexpresar la proteína DJ-1-WT humana en células CAD (Anexo 4).

1.3.5.5 Transfección de células CAD

La sobreexpresión de la proteína DJ-1-WT humana en células CAD se realizó mediante transfección transitoria por lipofección (Lipofectamine®, Invitrogen), los vectores de expresión usados fueron DEST C-Pink1-GFP y pCDNA3.1 GFP, para estandarización; pCDNA3.1, como control de la transfección y el vector pCDNA3.1 DJ-1-WT para la sobreexpresión de DJ-1-WT humano. En

los casos en los cuales se realizó la transfección con un vector de expresión de GFP, la eficiencia de ésta se determinó por microscopia de fluorescencia y la sobreexpresión de DJ-1-WT se determinó por la técnica de WB anti-DJ-1. Posteriormente, las células que sobreexpresaban la proteína fueron tratadas con las neurotoxinas (6-OHDA, rotenona y C2-ceramida) (Capítulo II y Anexo 5).

1.3.5.6 Western Blot (WB)

El compromiso de la actividad de la vía PI3K/AKT se analizó por medio de ensayos de WB específicos para las formas fosforilada (Ser473) y total de la proteína AKT. Así, como la sobreexpresión de la proteína DJ-1. Como control de carga se uso β -actina. La densitometría se realizó usando el software Genius Tools de Syngene (Anexo 6).

1.3.5.7 Análisis estadístico

El análisis de resultados se realizó mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido por una prueba de *t* de student. Para tales análisis se uso el software Graph Pad Prism Demo 5. Todos los datos se presentan como promedio \pm desviación estándar (DE) (Anexo 7).

**CAPÍTULO II.
CÉLULAS CAD**

CAPÍTULO II. CÉLULAS CAD

2.1 Células CAD

Para este estudio se utilizó como modelo celular una línea murina de neuronas catecolaminérgicas de origen mesencefálico recientemente descrita. Las células CAD son una variante de la línea celular CATH.a y fueron donadas por la Dra. Chikaraishi DM del departamento de Neurobiología del *Duke University Medical Center, Durham, North Carolina* al Dr. Gonzalo Arboleda del grupo de Neurociencias de la Universidad Nacional de Colombia.

Las células CATH.a fueron obtenidas a partir de un tumor mesencefálico de un ratón transgénico, el cual expresaba el antígeno SV40 Tag bajo el control transcripcional del promotor de la tirosina hidroxilasa (TH) de rata. Las células CATH.a inmortalizadas no marcan para marcadores gliales, y son de naturaleza catecolaminérgica, posiblemente derivadas del *Locus coeruleus* y expresan las enzimas β -hidroxilasa dopamina y TH y sintetizan altos niveles de DA y norepinefrina (Suri *et al.*, 1993).

Además, la línea celular CATH.a expresa varios marcadores de neuronas diferenciadas, incluyendo proteínas de neurofilamentos, sinaptofisina (Suri *et al.*, 1993), canales dependientes de voltaje sensibles a corrientes de K^+ (Baraban *et al.*, 1995), Na^+ (sensibles a tetrodotoxina) y Ca^{2+} similares a los reportados en otras neuronas, lo que indica que las células CATH.a poseen una membrana excitable, propiedad característica de las neuronas (Lazaroff *et al.*, 1995 y 1996).

Posteriormente, Bunday y colaboradores (1997) demostraron que estas células presentan señalización funcional frente a varios neuromoduladores, como el factor de liberación de la corticotrofina, el péptido intestinal vasoactivo, la bradiquinina y agonistas del receptor muscarínico de la acetilcolina. También, existen reportes que indican que tanto la DA y el óxido nítrico inducen muerte celular por apoptosis en células CATH.a con un efecto dosis-tiempo dependiente (Masserano *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 1998; Masserano *et al.*, 2000). Sin embargo, estas células son heterogéneas en cultivo, carecen de morfología neuronal y no reportan potenciales de acción espontáneos (Suri *et al.*, 1993; Baraban *et al.*, 1995; Lazaroff *et al.*, 1996; Qi *et al.*, 1997).

En el año de 1997, el grupo de Qi y colaboradores, junto con la Dra. Chikaraishi MD, obtuvieron una variante de las células CATH.a, llamadas CAD, que hace referencia a las células CATH.a diferenciadas. La inducción de la diferenciación neuronal fue iniciada por privación de suero fetal bovino (SFB). Las células CAD cultivadas en medio libre de proteínas y/o suero (células CAD diferenciadas) detienen su proliferación y empiezan a extender largos procesos (500 a 2.000 μm) similares a neuritas con presencia de varicosidades (Figura

2.1), en contraste, las células CATH.a mueren después de la privación de SFB. (Qi *et al.*, 1997).

Las células CAD difieren significativamente de su línea parental CATH.a, la principal diferencia es que las células CAD perdieron el oncogén SV40 Tag espontáneamente y aún son inmortales. Además, las células CAD expresan proteínas específicas de neuronas que las parentales no expresan. Las CAD expresan marcadores neuronales específicos, vesículas sinápticas, TH, canales dependientes de voltaje para corrientes de Na⁺, K⁺ y Ca²⁺, feniletanolamina N-metil transferasa, neuropéptido Y, transportador monoamino vesicular subtipo 2, sinaptofísina, somatostatina, proteína de las vesículas sinápticas 2, la proteína asociada al crecimiento 43 (GAP-43), proteína asociada al sinaptosoma 25 (SNAP-25), receptor de la somatostatina subtipo 2, sinaptotagmina, β-tubulina clase III, sintetizan L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) y no expresan la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (Lazaroff *et al.*, 1998; Qi *et al.*, 1997; Wang y Oxford, 2000; Hashemi *et al.*, 2003).

Adicionalmente, Wang y Oxford (2000), sugieren que el proceso de diferenciación de las células CAD no se trata sólo de un cambio morfológico si no que tal vez involucre cambios en la expresión y distribución de canales. Específicamente, en células CAD no diferenciadas, las corrientes de Na⁺ son bastante grandes y las corrientes de K⁺ son relativamente pequeñas. En contraste, en células CAD diferenciadas, las corrientes de Na⁺ disminuyen drásticamente, mientras que las corrientes de K⁺ presentan un incremento significativo.

Por otra parte, las células CAD son capaces de sobrevivir en ausencia de factores tróficos exógenos porque regulan su sobrevivencia de forma autocrina mediada principalmente por neurotrofina-3 (NT-3) (Horton *et al.*, 2001). En SNC la dependencia para la sobrevivencia de las neuronas a un factor neurotrófico no es tan evidente como en SNP, pero las neuronas del SNC expresan varios tipos de receptores tirosina-quinasa de la familia Trk (TrkRs) y se conoce que éstos se activan por varias fuentes de apoyo trófico y la NT-3 es capaz de activarlos.

Horton y colaboradores (2001) demostraron que las células CAD diferenciadas mueren por apoptosis cuando sus TrkRs son bloqueados, mientras que el bloqueo de estos receptores en las células CAD no diferenciadas no tiene ningún efecto sobre la viabilidad celular. Para demostrar que esto era mediado por NT-3, ellos neutralizaron la NT-3 sin bloquear los receptores y vieron el mismo efecto de apoptosis sólo en las células CAD diferenciadas.

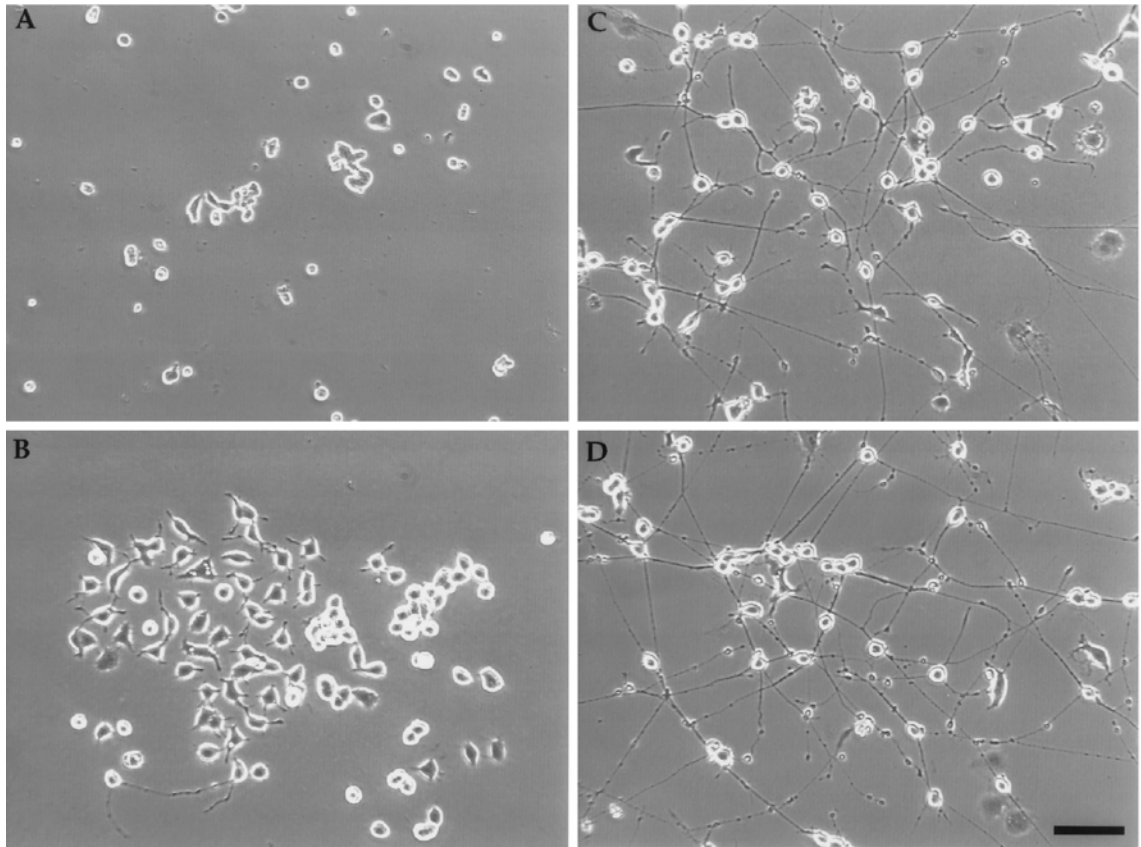


Figura 2.1 Microfotografía de la diferenciación morfológica de las células CAD inducida por la privación de proteínas. **A.** Células CATH.a creciendo en medio con 8 % de SFB. **B.** Células CAD creciendo en medio con 8 % de SFB. **C.** Células CAD en medio D-MEN/F12 sin SFB. **D.** Células CAD en medio libre de proteínas. En **C** y **D** las células tienen 5 días (d) de diferenciación. Nótese las varicosidades en los procesos alargados. Barra: 100 μ m, fotografías tomadas en un microscopio de contraste de fases (Tomada de Qi *et al.*, 1997).

Otra característica importante de las células CAD es que el proceso de diferenciación celular es reversible, lo cual las hace un modelo excelente para estudios de diferenciación neuronal (Qi *et al.*, 1997). La morfología neuronal, la expresión de marcadores neuronales, las propiedades de excitabilidad y los cambios en la función de los canales con la diferenciación de las células CAD hacen de éstas un modelo atractivo para el estudio de neuronas catecolaminérgicas. De tal forma que las CAD representan un modelo de SNC apropiado para el estudio de las funciones normales y patológicas de las neuronas dopaminérgicas que se pierden de forma específica en EP.

2.2 Resultados

Las condiciones de cultivo, los tiempos de doblaje poblacional y diferenciación celular de esta línea celular ya han sido descritos previamente en un trabajo realizado por Rodríguez YM (Tesis de Maestría en Genética Humana, PUJ, 2006). Los procedimientos del cultivo celular de la línea CAD se llevaron a cabo según lo descrito en el Anexo 1.

2.2.1 Diferenciación de las células CAD

Las diferencias entre las células CAD cultivadas con y en ausencia de SFB son evidentes. Se hace referencia a células CAD no diferenciadas cuando son cultivadas en presencia de SFB, y sus características son: somas con morfología poligonal y aplanada, carecen de procesos largos y su distribución en la caja de cultivo se da en islas con un patrón confluyente (Figura 2.2 A y B). Las CAD no diferenciadas creciendo en medio con 10 % de SFB presentan un doblaje poblacional de aproximadamente 18 +/- 2 horas (h) (promedio +/- DE) (Rodríguez, 2006).

Las células CAD diferenciadas o cultivadas en ausencia de SFB y sodio selenita 50 ng/mL detienen su proliferación, los somas exhiben una apariencia esférica y lisa. A los 2 d de cultivo sin SFB se empieza a observar el alargamiento de los procesos (Figura 2.2 C), a los 4 d las células se observan totalmente diferenciadas, es decir somas redondos, procesos alargados similares a neuritas, formación de redes entre ellas y a lo largo de las neuritas se alcanzan a observar unas protuberancias que corresponden a las varicosidades (Figura 2.2 D y E).

Las células CAD diferenciadas se pueden mantener por más de 4 d hasta 7 d, pero es necesaria la adición de medio nuevo libre de SFB para que no se desprendan, porque este medio después de 4 d adquiere pH ácido, es importante no retirar el medio de diferenciación porque las células CAD requieren de éste para su sobrevivencia. Además, se comprobó que la adición de SFB a las células CAD diferenciadas revierte el proceso de diferenciación.

2.2.2 Transfección de células CAD

En este estudio se llevo a cabo la estandarización del proceso de transfección para las células CAD con Lipofectamine®. Inicialmente, se trabajo con el plásmido DEST C-Pink1-GFP que tiene la proteína verde fluorescente (GFP) con el propósito de determinar la eficiencia de la transfección por microscopia de fluorescencia.

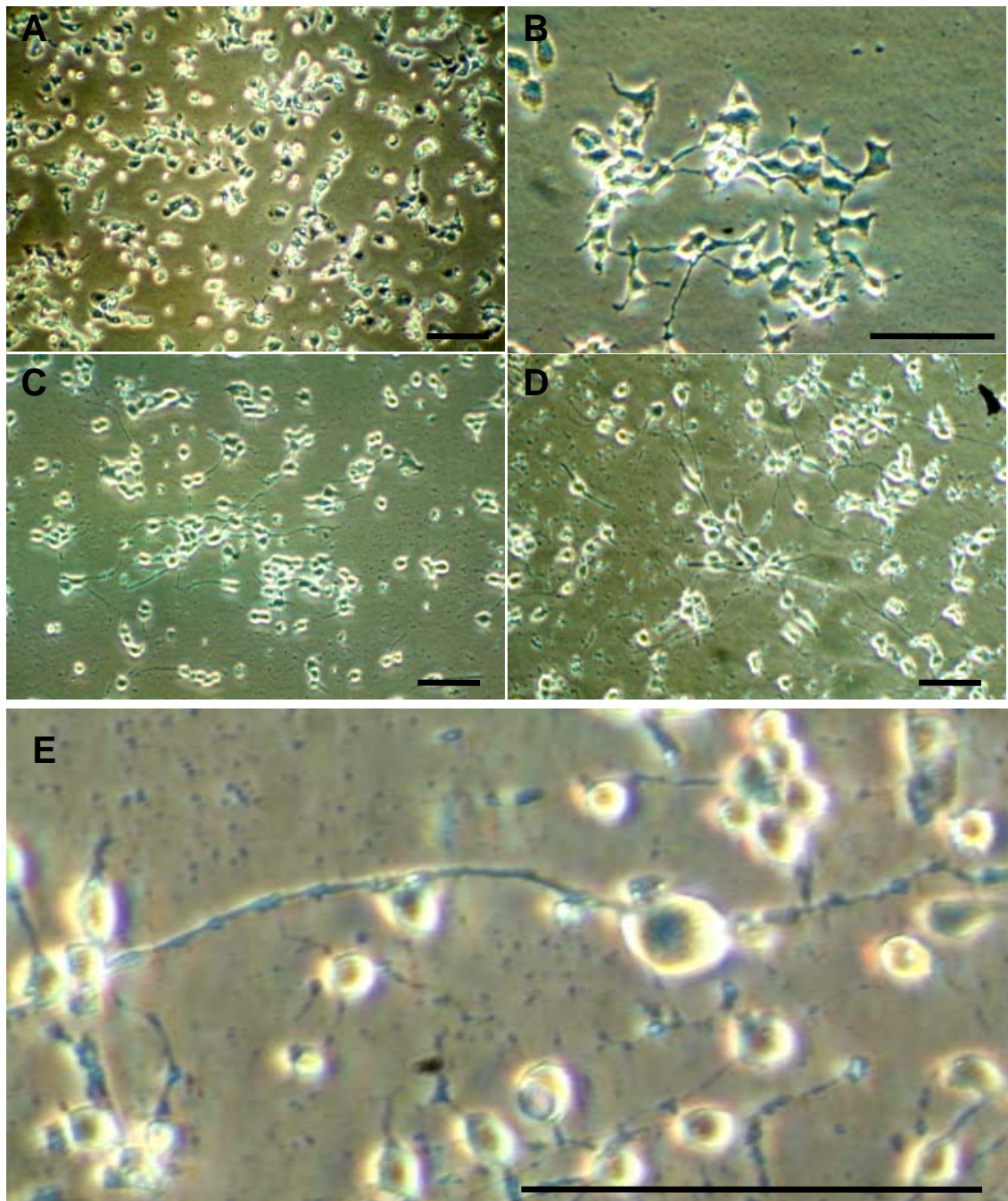


Figura 2.2 Microfotografías de la morfología de células CAD in vitro sin diferenciar y diferenciadas. **A** y **B.** Células CAD sin diferenciar creciendo en medio D-MEN/F12 + 10 % de SFB. **B.** Isla de células CAD en proliferación. **C.** Células CAD en D-MEN/F12 + 50 ng/mL de sodio selenita, 2 d de diferenciación. **D.** Células CAD D-MEN/F12 + 50ng/mL de sodio selenita, 4 d de diferenciación. **E.** Células CAD diferenciadas completamente, se pueden observar los somas redondos y refringentes y las varicosidades (pequeñas protuberancias) a lo largo de las neuritas. Nótese las diferencias morfológicas entre células no diferenciadas (**A** y **B**) y diferenciadas (**C-E**), las células CAD diferenciadas presentan soma redondo y alargamiento de los procesos similares a neuritas, al cuarto día de diferenciación se observa la formación de redes entre ellas (**D**) y las varicosidades en las neuritas (**E**). Barra: 100 μ m; fotografías tomadas en un microscopio de luz invertido de contraste de fases. UNAL, 2008.

Se realizó un primer acercamiento al proceso de transfección en cajas de 24 pozos con 500 μ L de volumen final de medio de diferenciación (D-MEN/F12 + 50 ng/mL y sin antibiótico (AB)) y 65.000 células sembradas por pozo (confluencia del 70%), la transfección se llevó a cabo a los 3 d de diferenciación de las células CAD y se evaluaron varias formas de transfección (Tabla A. 5.2) basados en las recomendaciones del fabricante de la Lipofetamine®2000 y en reportes de transfección de células mamíferas adherentes.

De este primer acercamiento se pudo determinar que el proceso de transfección de células CAD totalmente diferenciadas bajo las condiciones evaluadas de confluencia celular, concentración de plásmido (50 ng y 100 ng por pozo de 24) y lipofectamina (0,5 μ L y 1,5 μ L por pozo en cajas de 24) es poco eficiente (aproximadamente del 15%). Además, se tiene como resultado contundente que las células CAD diferenciadas no permiten un cambio total de medio para el proceso de transfección, lo cual es recomendado en el protocolo de Lipofectamina®2000, Se observó, que reemplazar totalmente con medio nuevo libre de SFB, el medio en el cual las células CAD han llevado a cabo el proceso de diferenciación por varios días, causa muerte rápida de las células y este fenómeno es independiente del proceso de transfección, inclusive al microscopio de luz las células presentan muerte con características apoptóticas (Figura 2.3 K-O).

No se evidenció muerte celular, ni desprendimiento de las células cuando el proceso de transfección se realizó sin cambiar el medio (Figura 2.3 A-J). El protocolo de transfección con Lipofectamina®2000 recomienda cambiar el medio de transfección a las 6 h, ya que en algunos casos la lipofectamina puede ser tóxica para las células, además los complejos de lipofectamina:plásmido son estables sólo por 6 h, de acuerdo a los resultados anteriormente descritos el cambio total del medio de diferenciación causa muerte celular; por consiguiente lo que se hizo fue diluir la lipofectamina cambiando sólo la mitad del medio (Figura 2.3 F-J), pero no se presentaron diferencias respecto a las células transfectadas a las cuales no se les realizó la dilución de la lipofectamina (Figura 2.3 A-E), posiblemente porque la concentración de lipofectamina por pozo es muy baja y esta no representa un evento tóxico para las células.

A partir de estos resultados preliminares se empezaron a optimizar las condiciones de transfección de las células diferenciadas con el propósito de mejorar la eficiencia. Una estrategia aumentar la concentración del plásmido, para esto se probaron varias concentraciones y relaciones de Lipofectamina: Plásmido (Tabla A. 5.1) y se encontró que la relación para cajas de seis pozos correspondía a 4-6 μ L de lipofectamina: 2 μ g de plásmido, de esta forma se pudo aumentar el porcentaje de transfección a un 50%, este porcentaje se mantuvo hasta las 48 h pos-transfección (Figura 2.4). Bajo estas condiciones de transfección el problema que se presentó fue el desprendimiento de las células transfectadas, por tal razón los procesos de transfección se realizaron en cajas tratadas con poli-D-lisina (Anexo 1.1.6 para disminuir el desprendimiento celular, pero esta estrategia no mejoro los resultados.

Finalmente, con el propósito de optimizar el proceso de transfección se decidió sembrar las células con SFB al 2 %, para que estuvieran bien adheridas a la superficie de la caja en el momento de la transfección, bajo estas condiciones se disminuyó en gran medida el desprendimiento de las células transfectadas y la eficiencia se pudo mantener, además, durante el proceso de transfección el porcentaje de suero se diluye en una proporción 2:1 (Anexo 5.1). Adicionalmente, se adquirió el medio OptiMem® y una nueva referencia de Lipofectamina (Lipofectamine™ LTX and Plus™ Reagent), productos recomendados para células muy sensibles al proceso de transfección.

Las células sembradas al 2% de SFB presentan una tasa de proliferación muy baja y si se siembran a una confluencia del 70% a las 24 h la confluencia se mantiene en un rango de 75-80%, y presentan una morfología más cercana a la de células CAD diferenciadas que a células CAD cultivadas al 10% de SFB.

La evaluación de la transfección del constructo pCDNA3.1 DJ-1-WT se realizó por WB de la proteína DJ-1 y de acuerdo a estos resultados se establecieron las condiciones de transfección que permitieron la sobreexpresión de la proteína DJ-1 a un nivel aproximado del doble respecto a las células transfectadas con el vector vacío, además, la sobreexpresión de DJ-1 se mantiene hasta las 48 h posterior al procedimiento de transfección. En el Anexo 5.1 se presenta el protocolo final, con el cual se obtuvo la sobreexpresión de DJ-1 con una alta eficiencia y reproducibilidad (Figura 6.3).

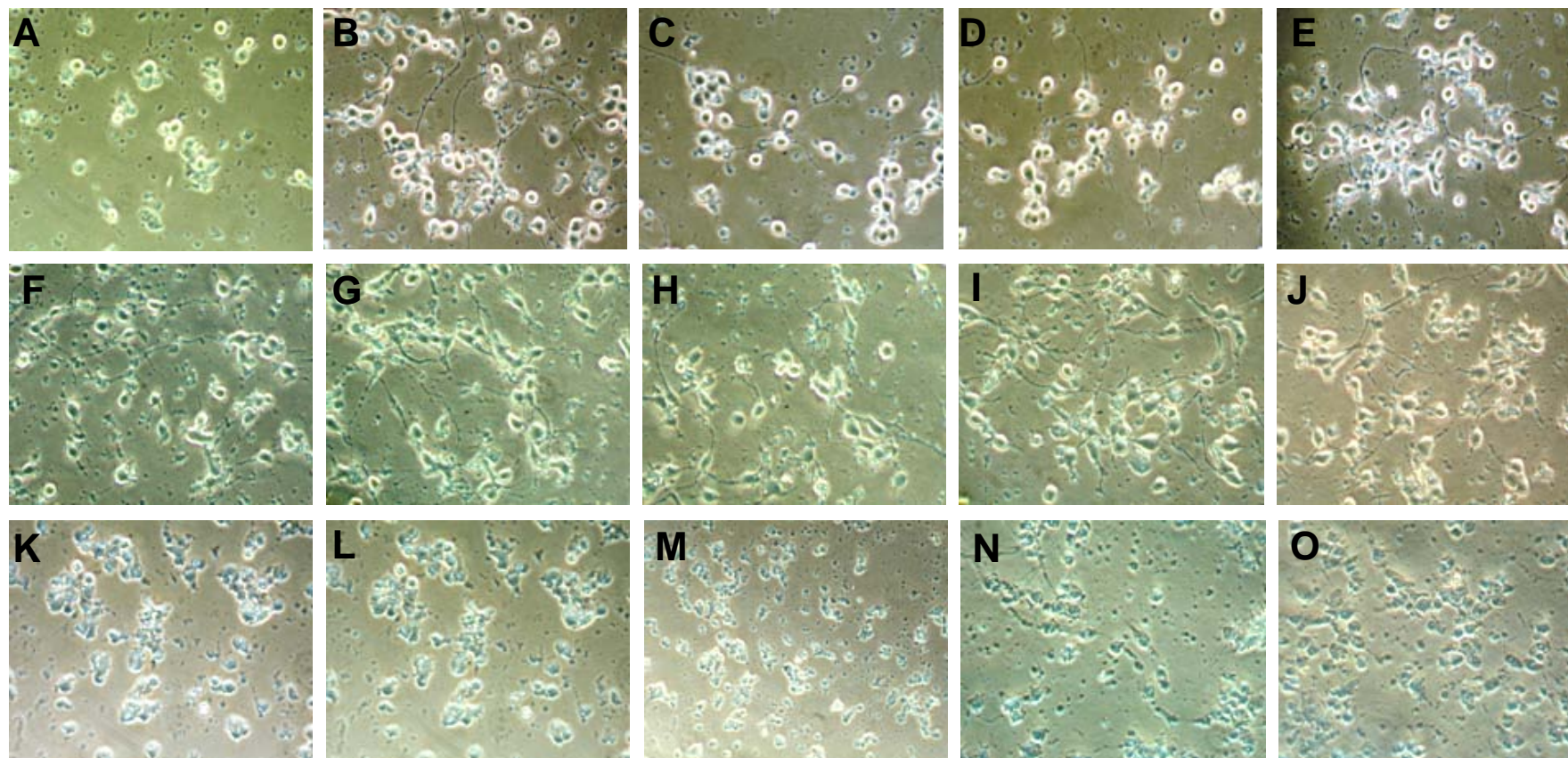


Figura 2.3 Microfotografías de células CAD diferenciadas (4 d) 24 h después de la transfección con Lipofectamine®2000 (L) y el plásmido (P) DEST C-Pink1-GFP. A-E: Tratamiento (Tto) 1: Sin cambio de medio de transfección. **A.** Control; **B y D:** P:100 ng, L:1,5μL; **C y E:** P:50 ng, L:0,5 μL. **F-J:**Tto 2: Cambio de la mitad del medio después de 6 h de transfección. **F.** Control. **G y I:** P:100 ng, L:1,5μL. **H y J:** P:50 ng, L:0,5. **K-O:** Tto 3: Cambio del total del medio de transfección. **K.** Control; **L y N:** P:100 ng, L:1,5 μL; **M y O:** P:50 ng, L:0,5μL A partir de estos resultados se empezaron a determinar las condiciones óptimas de transfección obteniendo los mejores resultados en los tratamientos 1 y 2.

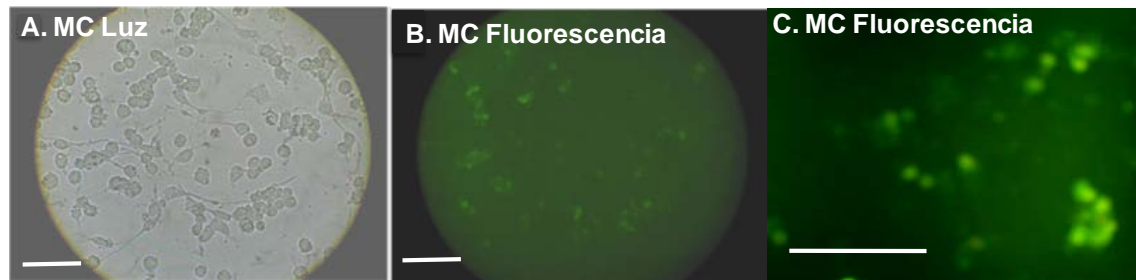


Figura 2.4 Eficiencia de transfección del 50 % determinada por microscopia de fluorescencia. **A.** Fotografía en campo claro de células CAD diferenciadas y transfectadas con pCDNA3.1-GFP. **B.** Fotografía de fluorescencia, aproximadamente el 50 % de las células expresan la proteína GFP. **C.** Imagen a mayor aumento. El porcentaje de transfección se calcula contando las células que expresan la proteína GFP en relación al número total de células que se cuentan en el campo claro. MC: Microscopía. Barra: 100 μ m. UNAL, 2009.

2.3 Discusión

Las células CAD diferenciadas y no diferenciadas presentan la morfología y características descritas por los creadores de la línea celular CAD, Qi y colaboradores (1997). El tiempo de doblaje poblacional reportado por ellos es de 18-22 h, mientras que el reportado para nuestro cultivo por Rodríguez YM (2006) es de 18 \pm 2 h, la diferencia en ese dato puede ser atribuida a las condiciones de cultivo, ya que Qi y colaboradores (1997) mencionan que las células CAD son cultivadas al 8% de SFB y nuestro cultivo se realiza al 10% de SFB.

Acerca del proceso de diferenciación de las células CAD, Qi y colaboradores (1997) mencionan que las células se encuentran totalmente diferenciadas a los 4 d y que desde el segundo día de estar cultivadas en ausencia de SFB se empieza a observar el alargamiento de los procesos, esto mismo lo observamos para nuestro cultivo. Incluso, se pudo observar que células CAD cultivadas al 1% de SFB a los 2 d presentan alargamiento de procesos cuando se siembran a una confluencia del 70%.

Otro aspecto que se observó es que la confluencia juega un papel importante en la morfología de las células CAD durante el proceso de diferenciación. En células CAD cultivadas en ausencia de SFB y con una confluencia del 100 %, no se puede observar el alargamiento de los procesos, quizás sea por la falta de espacio para extender sus procesos, adicionalmente, las células están muy cerca una de la otra, por lo tanto no se hace necesario la extensión de procesos largos para la formación de la red, adicionalmente, no alcanzan a permanecer 4 d en cultivo porque se desprenden por la acidez del medio de cultivo.

Entre tanto, en células CAD cultivadas en ausencia de SFB a baja confluencia (menor del 40%), sí se alcanza a observar el alargamiento de los procesos al segundo día, pero al tercer día éstas empiezan a morir, esto se podría explicar

por la falta de contacto entre las células y porque tal como lo mencionó Horton y colaboradores (2001), la sobrevivencia de las células CAD diferenciadas está regulada de manera autocrina por la liberación de NT-3 al medio de cultivo. Posiblemente, bajo estas condiciones de cultivo la NT-3 se encuentra muy diluida en el medio lo que no podría permitir la sobrevivencia de éstas.

Qi y colaboradores (1997) señalan que las células CAD pueden permanecer diferenciadas hasta por seis semanas, después de este tiempo se empiezan a desprender en monocapas, el desprendimiento celular es quizás una consecuencia de la carencia de un sustrato adecuado y no de un proceso de muerte neuronal, por esto se recomienda tratar las cajas con poli-lisina, colágeno o laminina, aunque la laminina no permite el alargamiento de los procesos. Aunque, nosotros no requerimos para nuestro estudio mantener células CAD diferenciadas por seis semanas, fue difícil mantener las células CAD diferenciadas por más de 5 d, incluso en cajas tratadas con poli D-lisina (Anexo 1.1.6), por tal razón los tratamientos que requerían más de 24 h no se adicionaban al cuarto día de diferenciación sino al tercer día de diferenciación, de tal manera que los controles no estuvieran afectados por las condiciones del cultivo.

La razón por la cual las células CAD mueren cuando se les retira todo el medio en el cual éstas han llevado a cabo su proceso de diferenciación y se les cambia por medio nuevo libre de SFB es explicado por lo evidenciado por Horton y colaboradores (2001). Ellos demostraron que la sobrevivencia de las células CAD diferenciadas estaba regulada de manera autocrina por la liberación de NT-3 al medio de cultivo y que al neutralizar la NT-3 las células mueren por apoptosis. Estos resultados sugieren que para la sobrevivencia de las células CAD diferenciadas es indispensable la NT-3 que ellas han secretado al medio durante su proceso de diferenciación. Aunque, sí a células CAD diferenciadas se les realiza un cambio completo del medio de diferenciación por medio con 8-10% de SFB, éstas no mueren, sólo revierten el proceso de diferenciación, este fenómeno lo observamos y ha sido reportado por Qi y colaboradores (2001).

El proceso de transfección, cuyo objeto es la introducción de un vector al interior de una célula eucariota, permite en gran medida ampliar el conocimiento acerca de una proteína de interés, para este estudio nos interesa comprender la relación de DJ-1 con la vía de supervivencia neuronal PI3K/AKT en un contexto neurotóxico, por tal razón la estrategia que se planteó fue sobreexpresar la proteína DJ-1-WT humana en la línea celular CAD, neuronas catecolaminérgicas y exponerlas a varias neurotoxinas que por mucho tiempo se han relacionado con enfermedades neurodegenerativas, específicamente EP, como es el caso de la rotenona, la 6-OHDA y C2-ceramida.

En la actualidad, se han descrito varios métodos para la transfección de células eucariotas, los cuales pueden ser físicos (electroporación, microinyección) o químicos (lipofección, fosfato cálcico, DEAE dextrano) (Sambrook *et al.*, 1989). En este estudio se llevó a cabo una transfección de tipo transitorio usando el método químico de lipofección con Lipofectamine®. En la transfección de tipo

transitorio, el DNA recombinante es introducido a la línea celular para obtener temporalmente un alto nivel de expresión del gen blanco, que en este caso corresponde al gen DJ-WT humano. El DNA transfectado no se integra al DNA genómico de la línea celular, por tal razón con este tipo de transfección las células sobreexpresan el gen blanco de 1 a 4 días después de la transfección (Sambrook *et al.*, 1989). Nosotros encontramos por análisis de WB que la sobreexpresión de DJ-1 se mantiene a las 48 h después de la transfección (Figura 6.2 y 6.3).

La lipofección usa lípidos catiónicos, Ej. Lipofectamine®, con el propósito de crear liposomas. Un liposoma es una vesícula esférica con una membrana compuesta de un fosfolípido y una bicapa de colesterol. Por definición, los liposomas contienen un núcleo de solución acuosa. El liposoma se une a las moléculas de DNA y forma un complejo estable que se adhiere y se fusiona con la membrana celular cargada negativamente y de esta manera se permite la entrada del DNA recombinante al interior de la célula (Sambrook *et al.*, 1989).

Un gran número de variables afectan la eficiencia de transfección por lipofección. Por tal motivo fue necesario optimizar las condiciones específicas de este proceso para obtener una buena eficiencia, los lípidos no funcionan de igual manera en todas los tipos celulares por eso se hace necesario optimizar la relación lípido: plásmido, cantidad de DNA plasmídico empleado, y la presencia o ausencia de SFB, la estandarización en el proceso de transfección de las células CAD tuvo en cuenta los aspectos mencionados y finalmente se logró establecer un protocolo (Anexo 5.1) para transfectar células CAD con el constructo pCDNA3.1 DJ-WT humano y se determinó por WB que las células transfectadas sobreexpresan la proteína DJ-1 en relación a las células CAD control, aproximadamente tres veces. Desafortunadamente, no fue posible lograr esta eficiencia en células CAD diferenciadas por que estas son muy sensibles a este proceso y se presentaba gran porcentaje de células desprendidas.

CAPÍTULO III.
EFFECTO DE LA ROTENONA EN CÉLULAS CAD

CAPÍTULO III. EFECTO DE LA ROTENONA EN CÉLULAS CAD

3.1 Rotenona

La rotenona es un compuesto natural de estructura isoflavonoide derivado de las raíces de algunas plantas de los géneros *Derris* y *Lonchocarpus*, familia Leguminosae (Figura 3.1). Es un compuesto activo utilizado como pesticida, insecticida y erradicación de poblaciones de peces. Este compuesto es extremadamente hidrofóbico, por esto es capaz de cruzar fácilmente las membranas biológicas independiente de transportadores de membrana (Radad *et al.*, 2008).

Actualmente, la rotenona es ampliamente usada en todo el mundo como pesticida e insecticida. La OMS (organización mundial de la salud) lo ha clasificado como un pesticida Clase II (moderadamente peligroso). Existen algunos reportes que indican que la exposición a rotenona puede causar toxicidad en mamíferos, mientras que en animales de sangre fría, como los insectos y peces, es altamente toxica. La rotenona es usualmente empleada en la agricultura a bajas concentraciones, es rápidamente absorbida por el suelo y el agua y se descompone por la exposición a la luz solar; por lo tanto es buena para el ambiente y segura para los agricultores y otros usuarios (Wiwattanapatapee *et al.*, 2009; Bové *et al.*, 2005). En Estados Unidos las áreas de cultivo tratadas con rotenona están restringidas, y las fechas de tratamiento no deben coincidir con los periodos de riego (Bové *et al.*, 2005).

Se ha propuesto un vínculo entre el uso de la rotenona y otros pesticidas con EP, estudios epidemiológicos han sugerido que la exposición a pesticidas está asociada con un aumento en el riesgo de desarrollar esta enfermedad. Con el propósito de validar un modelo *in vivo* de mayor precisión de EP, Betarbet y colaboradores (2000, 2006) propusieron exponer ratas Sprague-Dawley y Lewis a rotenona de manera crónica, continua y sistémica. Ellos encontraron que la inhibición sistémica del complejo I mitocondrial causa degeneración dopaminérgica nigro-estriatal altamente selectiva, asociada con rigidez e hipoquinesia. Además, las neuronas dopaminérgicas de la SN de ratas tratadas con rotenona presentan inclusiones citoplasmáticas que contienen poli- ubiquitina y α -sinucleína.

En neuronas, la rotenona es específicamente un inhibidor del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, la rotenona es un inhibidor hidrofóbico, tipo B, el cual genera la reducción de oxígeno molecular a especies superóxidos por bloqueo de la transferencia de electrones del clúster Fe-S N-2 a quinona oxidada (Lenaz *et al.*, 2006, Keeney *et al.*, 2006) y por varios años se ha usado con el propósito de entender el mecanismo de neurodegeneración dopaminérgica tanto en modelos *in vitro* e *in vivo* (Przedborski y Ischiropoulos, 2005). La rotenona *in vivo* puede modelar algunas de las características anatómicas, neuroquímicas, neuropatológicas y

comportamentales de EP, con alta reproducibilidad (Betabert *et al.*, 2000, Betabert *et al.*, 2006; Costa *et al.*, 2008; Cannon *et al.*, 2009). Algunas de las limitaciones de este modelo son la variabilidad en el porcentaje de animales que desarrollan la lesión, la magnitud de la lesión y la localización y distribución de la lesión en el estriado (Cannon *et al.*, 2009).

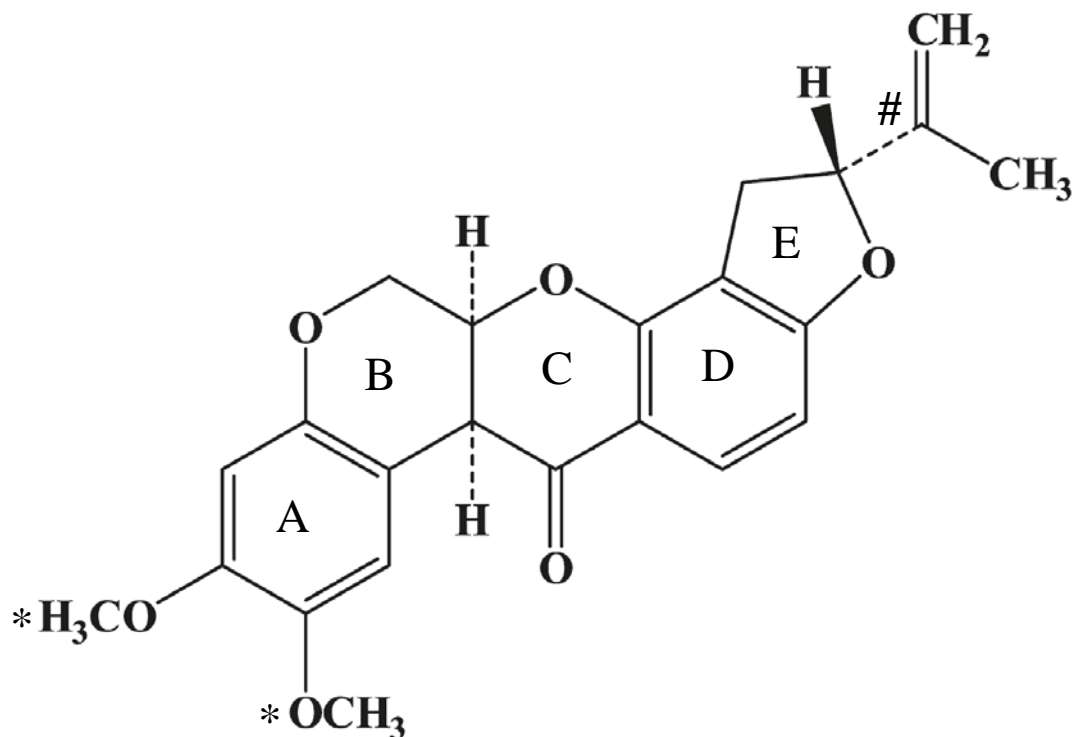


Figura 3.1 Estructura química de la rotenona. La rotenona es un isoflavonoide biológicamente activo, posee un cuerpo integrado por cinco anillos, que correspondan a: dos anillos bencénicos (A y D), un anillo piránico (B), un anillo pirónico (C) y un anillo hidrofuránico (E) el cual lleva una cadena lateral isopropilénica (#). Además, el primer anillo bencénico (A) posee dos grupos metóxilo (*) (La Forge *et al.*, 1932), (Figura tomada y modificada de Wiwattanapatapee *et al.*, 2009).

Sin embargo, los mecanismos precisos de neurodegeneración inducida por rotenona en células mesencefálicas dopaminérgicas aún no son claros. Se ha reportado que la inhibición del complejo I mitocondrial resulta en la apertura del PTPm incrementando masivamente las especies reactivas de oxígeno (ERO), originando así daño oxidativo en lípidos, DNA y proteínas de la célula. Se ha observado que el daño oxidativo es un defecto bioenergético y sólo se puede observar en modelos de rotenona *in vivo* (Radad *et al.*, 2008).

En modelos *in vitro* se ha demostrado que la rotenona tiene un efecto dosis tiempo dependiente y que induce apoptosis selectiva de neuronas dopaminérgicas (Chun *et al.*, 2001; Chung *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2009). Se han realizado varios estudios en modelos neuronales por ejemplo, células SH-5H5Y diferenciadas y no diferenciadas (Borland *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2005), cultivos primarios de neuronas corticales de embriones de ratón (Radad *et al.*, 2006; Radad *et al.*, 2008), células SN4741 (Chun *et al.*, 2001), células SK-N-MC (Richardson *et al.*, 2005) y se ha establecido que la rotenona causa muerte neuronal en dosis bajas y crónicas. La Tabla 3.1 menciona algunos de los estudios *in vitro* realizados con rotenona en modelos neuronales y sus efectos.

MODELO CELULAR	DOSIS DE ROTENONA	TIEMPO	EFEECTO	REFERENCIA
SH-SY5Y diferenciadas, medio neurobasal con 6–10 nM de estaurosporina	50 nM	21 d	60% de muerte neuronal (muerte gradual, bifásica) Acortamiento de neuritas, a los 21 d ausencia completa de neuritas Agregados de α -sinucleína y ubiquitina en las neuritas Inhibición del 50% del complejo I mitocondrial Activación de caspasas Disminución de la velocidad de las mitocondrias Regulación a la baja de genes (Microarreglo de 1.200 genes) No se presentaron inclusiones citoplasmáticas de cuerpos de Lewy. No se presentó pérdida del potencial de membrana mitocondrial	Borland <i>et al.</i> , 2008
SH-SY5Y diferenciadas, 10 μ M de ácido retinoico	10 μ M y 20 μ M	12 h	32%-38% de muerte celular Activación de JNK y p38 y <i>c-jun</i> por fosforilación Activación de caspasas 9 y 3 Disminución de los niveles de p-AKT y Bcl-2	Chen <i>et al.</i> , 2008
Cultivos primarios de neuronas mesencefálicas	10 nM -30 nM	12 h	Condensación y fragmentación del núcleo, indicando un proceso apoptótico en el 60-80% de células positivas para TH	
SH-SY5Y, neuroblastoma humano	1, 5, 10, 20, 25, 50 μ M	24 h	Efecto dosis-tiempo dependiente Pérdida tardía de la integridad de la membrana (LDH) Pérdida de la actividad mitocondrial (MTT) Activación de caspasa 3 Producción intracelular de superóxidos y otras ERO	Chung <i>et al.</i> , 2007

Tabla 3.1 Efecto de la rotenona en modelos neuronales in vitro, Continúa...

MODELO CELULAR	DOSIS DE ROTENONA	TIEMPO	EFEECTO	REFERENCIA
SH-SY5Y, neuroblastoma humano	0,1-20 μ M, WB:10 μ M	24 h	Reducción en la viabilidad celular, efecto dosis tiempo dependiente	Kim <i>et al.</i> , 2009
			Activación de p38 y JNK por fosforilación	
	Muerte por apoptosis condensación de la cromatina y fragmentación de ADN			
	Activación de caspasas 9 y 3			
	Reducción de los niveles de Bcl-2, aumento de BAX			
0-10 μ M	24 h	Promueve la solubilidad de Parkin, formación de inclusiones intracelulares por agregación de Parkin	Wang <i>et al.</i> , 2005	
1, 10, 100 nM y 1 μ M	24 h	Efecto dosis tiempo dependiente		
5-20 nM	5 sem	Reducción del 15-30% de la actividad del complejo I mitocondrial	Sherer <i>et al.</i> , 2001	
		Aumento de ERO		
		Cambios en la señalización por calcio (carbacol)		
Reducción del potencial de membrana mitocondrial				
SK-N-MC, neuroblastoma humano	10 nM	24 h	Inhibición del proteosoma	Wang <i>et al.</i> , 2006
	20 nM	24 h	Disminución del complejo I mitocondrial Daño oxidativo	Richardson <i>et al.</i> , 2005
SN4741, línea celular dopaminérgica derivada de sustancia <i>nigra</i>	1,5 μ M	2 h	Incremento de ERO	Chun <i>et al.</i> , 2001
			Activación de JNK y <i>c-jun</i> por fosforilación	
			Activación de caspasa 3	
			Fragmentación del DNA, escalera en gel de agarosa	

Tabla 3.1 Efecto de la rotenona en modelos neuronales in vitro, Continúa...

MODELO CELULAR	DOSIS DE ROTENONA	TIEMPO	EFEECTO	REFERENCIA
Cultivos primarios de neuronas dopaminérgicas derivadas de mesencéfalo de embriones de ratón	5 nM 20 nM	24 h 48 h	Efecto dosis tiempo dependiente	Radad <i>et al.</i> , 2006
			Muerte selectiva de células TH+	
	Acortamiento y fragmentación de las neuritas			
	Incremento en la producción de ERO			
	Inhibición de la actividad del complejo I mitocondrial			
	Núcleo celular presenta características apoptóticas			
1, 3, 5, 10nM 20nM	6 - 12 d	Las neuronas dopaminérgicas son más sensibles a tratamientos con dosis bajas y tiempos prolongados	Radad <i>et al.</i> , 2008	
		20nM		48 h
	0-1 µM			Efecto dosis tiempo dependiente
PC12, feocromocitoma, derivado de médula adrenal de rata	1 µM	24 h	Disminución del 20% de la viabilidad celular (MTT) respecto al control	Sai <i>et al.</i> , 2008
			Incremento de ERO	
			Disminución de la longitud de las neuritas	
			Aumento de la actividad de la monoamino oxidasa	
			Disminución en la expresión de TH, VMAT2 y aumento de TDA	
			Incremento en los niveles intracelulares de DA, mientras que los niveles extracelulares de DA se mantienen estables	

Tabla 3.1 Efecto de la rotenona en modelos neuronales *in vitro*.

3.2 Resultados

Con el propósito de determinar la dosis letal 50 de rotenona en células CAD diferenciadas, se probaron diferentes dosis y tiempos de exposición. Estos tratamientos se llevaron a cabo en cajas de 96 pozos y las pruebas de viabilidad celular MTT y LDH (Anexo 1, 2 y 3).

3.2.1 Efecto dosis-tiempo dependiente de la rotenona en células CAD

Las células CAD diferenciadas viables se observan al microscopio de luz adheridas, refringentes, presentan procesos alargados (neuritas) y somas con apariencia circular y lisa (Figura 3.2, A). La exposición a rotenona a altas concentraciones, 25 μM , 5 μM , 1 μM , 500 nM y 250 nM, por un tiempo de 24 h causa cambios morfológicos observables al microscopio de luz y sugestivos de muerte celular, las células pierden la adherencia, no se observan refringentes, los somas pierden su apariencia lisa y circular, y no se pueden distinguir células con procesos alargados (Figura 3.2, B-F). Las células tratadas por 24 h con dosis muy bajas, 50 nM y 25 nM, se observan diferentes al control ya que no se ven tan refringentes, pero aun permanecen adheridas, inclusive se pueden observar algunas células con procesos alargados (Figura 3.2, G-H).

Se determinó la cinética de toxicidad de la rotenona en células CAD, para lo cual se evaluaron diferentes dosis de rotenona (50 nM, 250 nM, 500 nM, 1 μM , 5 μM , 25 μM) y diferentes tiempos de exposición (6, 24 y 48 h), medido mediante MTT. Las gráficas de toxicidad muestran que el efecto de la rotenona depende de la dosis y el tiempo del tratamiento. Cuando se trataron las células con 5 μM por 6 h y 500 nM por 24 h, se evidenció una pérdida del 40% de la actividad MTT. Por esta razón estas dosis se utilizaron para los experimentos posteriores (Figura 3.3).

El análisis de muerte celular realizado mediante la liberación de LDH al medio de cultivo señala que la rotenona causa muerte dependiente de la dosis y el tiempo. En la figura 3.4 se puede observar la tendencia al aumento en la liberación de LDH cuando se incrementa la concentración y el tiempo de exposición a rotenona (Figura 3.4).

Las células control, es decir células no tratadas con rotenona, presentan una liberación basal de LDH del 30%, mientras que las células tratadas por 24 h con 500 nM de rotenona presentan un porcentaje de liberación de LDH del 40%, estos resultados indican que la rotenona bajo estas condiciones contribuye a potenciar en un 10 % la liberación de LDH al medio de cultivo. Por otra parte, las células expuestas durante 24 h a 5 μM y 25 μM de rotenona presentan un incremento altamente significativo en la liberación de LDH respecto a las células control indicando un efecto dosis dependiente (Figura 3.4).

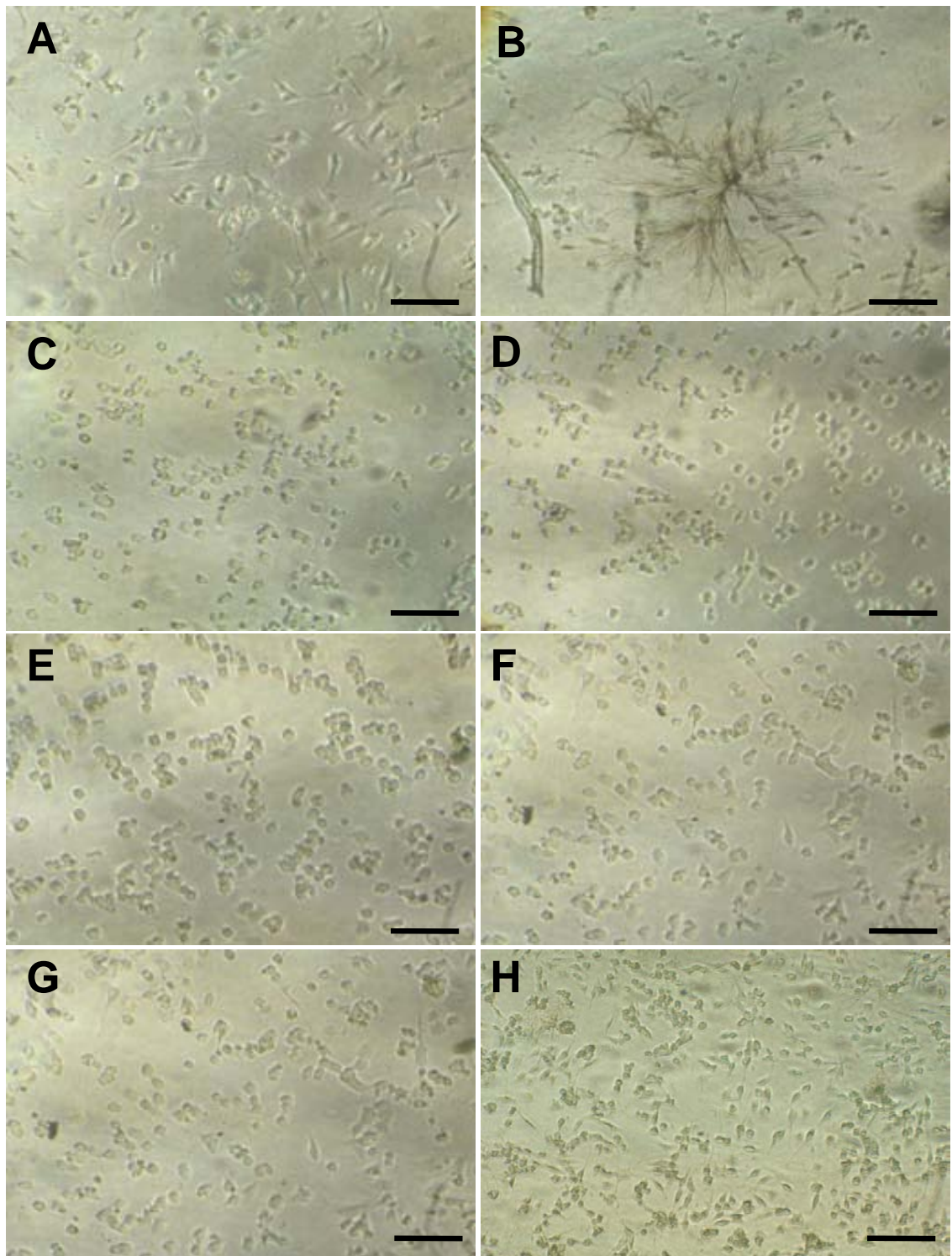


Figura 3.2 Efecto dosis - tiempo dependiente de rotenona en células CAD diferenciadas. Microfotografía de células CAD diferenciadas tratadas a diferentes concentraciones de rotenona por 24 h. **A.** Control (0 μM) **B.** 25 μM ; **C.** 5 μM ; **D.** 1 μM ; **E.** 500 nM; **F.** 250 nM; **G.** 50 nM; **H.** 25 nM. En el panel **B** se observan los cristales que forma la rotenona cuando se aplica a altas concentraciones, estos cristales están suspendidos en el medio y se forman porque la rotenona es una molécula casi insoluble en agua, su solubilidad en agua es de 0,02 mg/L a 20°C. Barra: 100 μm ; fotografías tomadas en un microscopio de luz invertido de contraste de fases. UNAL, 2009.

EFFECTO DE LA ROTENONA EN CÉLULAS CAD

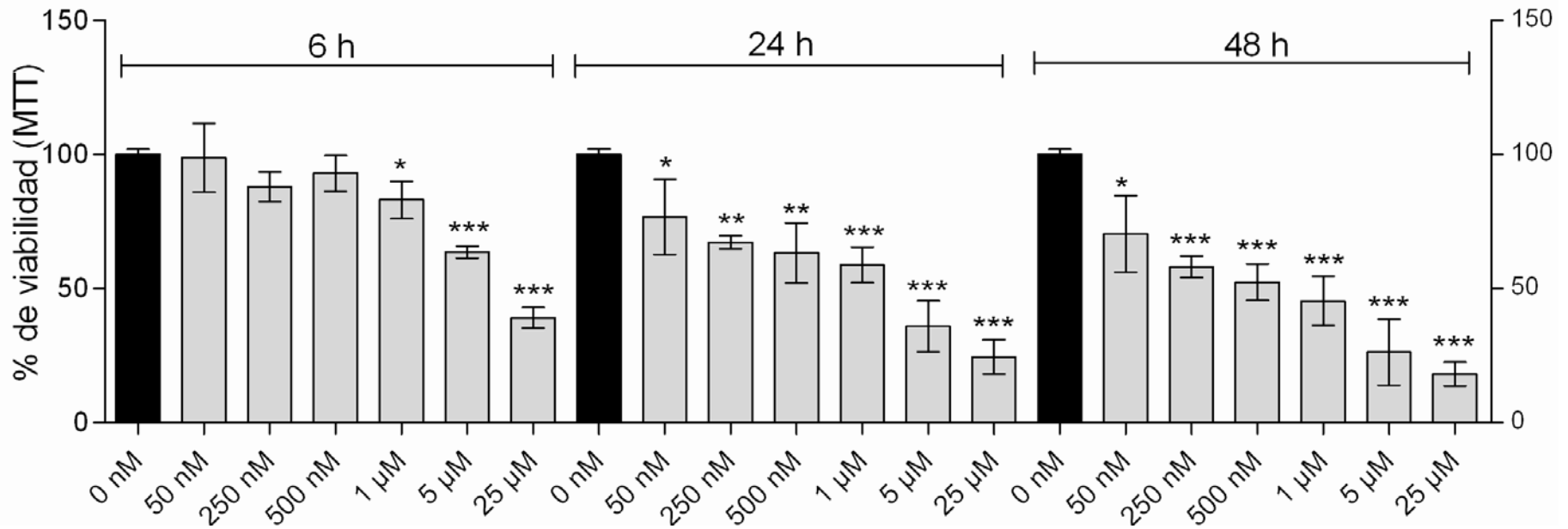


Figura 3.3 Efecto dosis – tiempo dependiente de la rotenona en células CAD determinado por la actividad MTT. El eje Y representa el porcentaje de viabilidad relativo al control cuya absorbancia a 550 nm se normalizó al 100 %. El eje X representa los diferentes tratamientos de rotenona (Control: 0 nM, 50 nM, 250 nM, 500 nM, 1 µM, 5 µM y 25 µM de rotenona) agrupados por el tiempo de tratamiento (6, 24 y 48 h). Nótese, que la exposición a rotenona tiene como efecto disminución del % de viabilidad dependiente de la dosis y el tiempo de tratamiento. Las células tratadas por 6 h a bajas concentraciones no presentan diferencias significativas respecto al control (50 nM, 250 nM y 500 nM), mientras que dosis altas (5 µM y 25 µM) presentan diferencias altamente significativas respecto al control. El efecto de concentraciones bajas como 50 nM es significativamente diferente del control cuando las células se exponen por tiempos largos (24 y 48 h). Los valores representan el promedio +/- DE (desviación estándar) de tres experimentos independientes, cada uno con tres replicas. Prueba *t* de dos colas con intervalo de confianza del 95%. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, comparaciones realizadas respecto a las células control, células no tratadas con rotenona (barra negra).

EFECTO DE LA ROTENONA EN CÉLULAS CAD

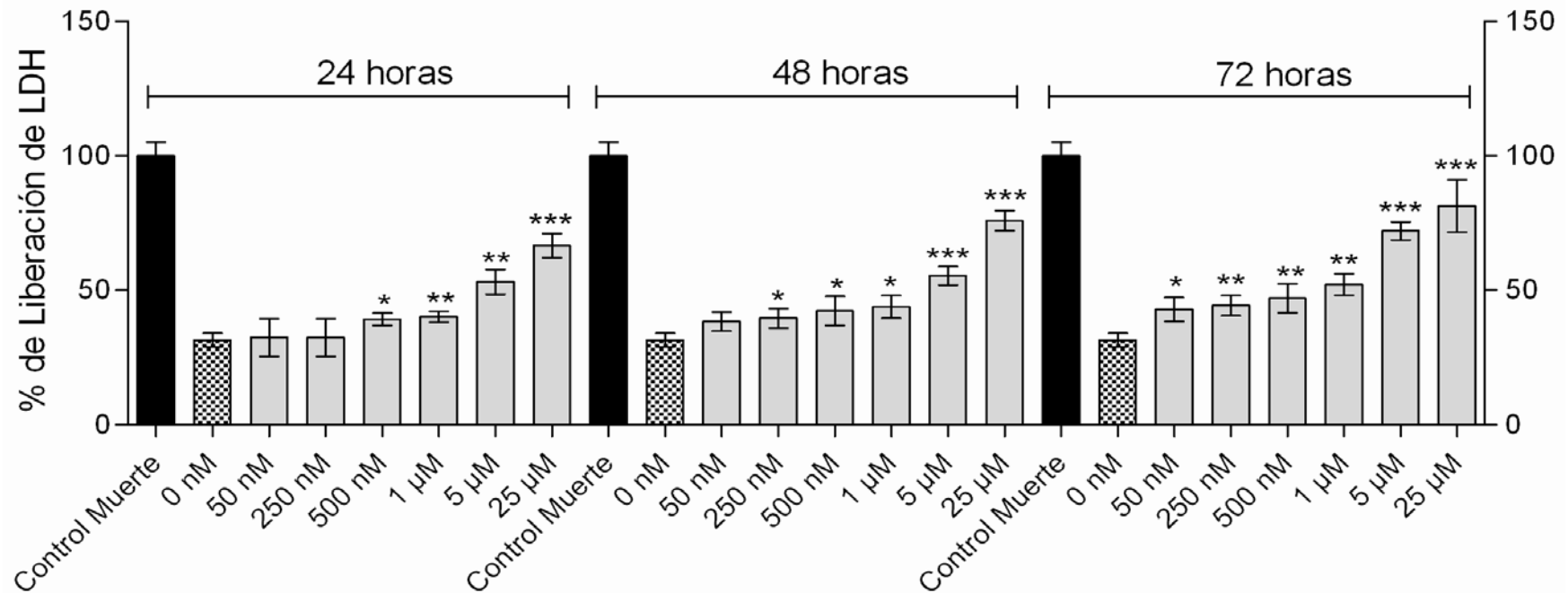


Figura 3.4 Efecto dosis – tiempo dependiente de rotenona en células CAD determinado por la liberación de LDH. El eje Y representa el porcentaje de liberación de la lactato deshidrogenasa (LDH) relativo al control de muerte (barra negra) cuya absorbancia a 490 nm se normalizó al 100 % (células lisadas). El eje X representa los diferentes tratamientos de rotenona (Control: 0 nM, 50 nM, 250 nM, 500 nM, 1 µM, 5 µM y 25 µM de rotenona) agrupados por el tiempo de tratamiento (24, 48 y 72 h). Nótese que la rotenona causa muerte celular con un efecto dosis – tiempo dependiente, ya que se puede observar la tendencia al aumento en la liberación de LDH respecto al control dado por el incremento en la concentración y en el tiempo de exposición a rotenona. A las 24 h de tratamiento con las dosis de 50 nM y 250 nM la liberación de LDH no difiere del control, mientras que a las 72 horas el tratamiento con 50 nM de rotenona presenta un aumento significativo en la liberación de LDH respecto al control. Los valores representan el promedio +/- DE (desviación estándar), n=3. Prueba *t* de dos colas con intervalo de confianza del 95%. **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001, comparaciones realizadas respecto a las células control, células no tratadas con rotenona (barra de cuadros).

3.3 Discusión

Las células expuestas a rotenona presentaron cambios morfológicos evidentes a las 24 h de tratamiento con dosis altas, uno de los cambios mencionados es la pérdida de los procesos alargados o neuritas. Previamente, Radad y colaboradores (2006), encontraron en cultivos primarios de neuronas dopaminérgicas derivadas de mesencéfalo de embriones de ratón, un acortamiento y fragmentación de las neuritas, cuando las células eran tratadas con 5 nM y 20 nM por 24 y 48 h, respectivamente. Posteriormente, Borland y colaboradores (2008) encontraron en células SH-SY5Y diferenciadas tratadas de manera crónica con rotenona 50 nM un acortamiento de las neuritas y la pérdida total de estas a los 21 d de tratamiento. Además, ellos encontraron por estudios de inmunofluorescencia agregados de α -sinucleína y poli-ubiquitina al interior de las neuritas. La disminución en la longitud de las neuritas por efecto de la rotenona también se ha observado en células PC12 tratadas con rotenona 1 μ M por 24 h (Sai *et al.*, 2008).

El acortamiento y fragmentación de las neuritas por efecto de la rotenona es explicado por la unión directa de esta toxina a los microtúbulos, lo cual conduce a la despolimerización de éstos, y en el caso de las neuronas dopaminérgicas ocurre inhibición del transporte de las vesículas que cargan el neurotransmisor DA, presentándose acumulación de éste en el soma y por consecuencia aumento del estrés oxidativo como resultado de su oxidación. Lo anterior podría explicar la susceptibilidad diferencial de las neuronas dopaminérgicas a la rotenona, en relación a neuronas que sintetizan un neurotransmisor no oxidable, como es el caso de las neuronas glutamatérgicas y gabaérgicas (Ren *et al.*, 2005).

Aunque en este estudio no se realizó una prueba específica para determinar el tipo de muerte celular inducida por rotenona, varias observaciones al microscopio de luz de las células CAD diferenciadas tratadas con esta neurotoxina fueron sugestivas de muerte celular por apoptosis, por ejemplo, la apariencia rugosa de la membrana celular y núcleos muy grandes. Existen varios estudios que reportan que la muerte por efecto de la rotenona es de tipo apoptótico y se han descrito las siguientes características: fragmentación del ADN, condensación de la cromatina, activación de caspasas 9 y 3, reducción de los niveles de Bcl-2 y p-AKT, y aumento de Bax (Chun *et al.*, 2001; Radad *et al.*, 2006; Chung *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2009, Avila-Gómez *et al.*, 2010).

Los resultados obtenidos con las técnicas de MTT y LDH acerca de la cinética de toxicidad de la rotenona en células CAD sugieren un efecto dosis – tiempo dependiente. Es evidente que el incremento de la concentración y el tiempo de exposición de la rotenona contribuyen a la disminución de la viabilidad, ya sea como pérdida de la actividad MTT o aumento en la liberación de LDH. Varios grupos han reportado en estudios *in vitro* con modelos neuronales que la rotenona tiene un efecto dosis – tiempo dependiente, por ejemplo Sherer y

colaboradores (2001) y Chung y colaboradores (2007) en células SH-SY5Y, Radad y colaboradores (2006) en cultivos primarios de neuronas derivadas de mesencéfalo de embriones de ratón y Sai y colaboradores (2008) en la línea celular PC12. Inclusive, Borland y colaboradores (2008) mencionan que la rotenona induce el 60 % de muerte en neuronas SH-SY5Y diferenciadas expuestas a una dosis crónica de 50 nM por 21 d, y que la muerte se presenta de forma bifásica.

En general, la rotenona es capaz de inducir muerte en dosis bajas y tiempos largos de exposición. Los estudios realizados *in vitro* reportan tratamientos en el orden de nanomolar y con tiempos de exposición que pueden ir desde 24 h hasta 21 d de tratamiento crónico (Chun *et al.*, 2001; Radad *et al.*, 2006; Chung *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2009). Tal como se menciono anteriormente, la rotenona es una molécula altamente lipofílica, por lo tanto es capaz de atravesar las membranas celulares con gran facilidad, además, su solubilidad en agua es de 0,02 mg/L a 20°C, y al aplicarse a altas concentraciones forma cristales flotantes en el medio de cultivo, tal como se observo al microscopio de luz con la concentración de 25 µM (Figura 3.2, B).

La comparación de los resultados obtenidos por MTT y LDH sugiere que la rotenona causa inicialmente pérdida de la actividad MTT, y tardíamente pérdida de la integridad de la membrana, esto último determinado por la liberación de LDH al medio de cultivo. Por ejemplo, si se compara el porcentaje de viabilidad por actividad MTT con el porcentaje de liberación de LDH del tratamiento 24 h 500 nM, se encuentra que la rotenona contribuye en un 40 % a la disminución de la actividad MTT respecto a las células control (0 nM de rotenona); sin embargo, bajo estas condiciones de tratamiento la rotenona sólo contribuye a potenciar la liberación de LDH en un 10% respecto a la liberación basal de LDH de las células control (30%) (Figuras 3.3 y 3.4). Chung y colaboradores (2007) trabajaron con células SH-SY5Y y determinaron el efecto de la rotenona sobre la viabilidad celular usando las técnicas de MTT y LDH, y al igual que en este estudio, encontraron que la rotenona induce primero la pérdida de la actividad MTT y que la pérdida de la integridad de la membrana es un evento tardío.

Este hallazgo es importante para este estudio ya que la bibliografía referencia que la rotenona es principalmente un inhibidor del complejo I de la cadena respiratoria de la mitocondria (Sherer *et al.*, 2001; Radad *et al.*, 2006; Borland *et al.*, 2008). En lo referente a nuestro grupo de investigación y como hipótesis de trabajo partimos que la muerte de las neuronas dopaminérgicas en la EP se debe a una disfunción mitocondrial, por lo tanto las dosis que se han definido para los experimentos posteriores son basadas en la disminución del 40% de la actividad MTT y corresponden a 50 nM por 24 h y a 5 µM por 6 h. La actividad MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) es un indicador de la actividad o integridad mitocondrial porque determina la reducción del MTT a azul de formazán, proceso llevado a cabo por las enzimas deshidrogenasas que se encuentran en mitocondrias activas e intactas de células vivas (Mosmann, 1983; Buttke *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 1997; Abe y Matsuki, 2000).

Finalmente, la neurotoxina rotenona es un buen modelo para estudios *in vitro* de la EP porque induce muerte neuronal selectiva de dopaminérgicas, inhibe el complejo I mitocondrial y causa muerte celular con un efecto dosis tiempo-dependiente, además los resultados son altamente reproducibles.

CAPITULO IV.
EFFECTO DE LA 6-HIDROXIDOPAMINA EN CÉLULAS CAD

CAPITULO IV. EFECTO DE LA 6-HIDROXIDOPAMINA EN CÉLULAS CAD

4.1 6-Hidroxi-dopamina

La 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) es un análogo hidroxilado del neurotransmisor DA. Fue aislado por primera vez en el año de 1959 por Senoh, y sus efectos biológicos se evidenciaron entre 1963-1965 por el grupo de Porter y colaboradores y el de Stone y colaboradores, quienes demostraron que la 6-OHDA inducía disminución de la noradrenalina en sistema nervioso autónomo de corazón. Posteriormente, entre 1967-1968, Thoenen y colaboradores tras varios estudios demostraron que la 6-OHDA producía daño en las terminaciones nerviosas de neuronas simpáticas (Blum *et al.*, 2001).

En la actualidad, la 6-OHDA es una de las neurotoxinas más comunes en la experimentación en modelos de la EP. Es usada tanto *in vitro* como *in vivo*, y se ha sugerido que ésta induce lesiones a nivel de neuronas dopaminérgicas por la generación de peróxido de hidrógeno, ERO y la inhibición de los complejos I (NADH deshidrogenasa) y IV (citocromo c oxidasa) mitocondriales, siendo el complejo I más sensible a la inhibición por parte de la 6-OHDA (Glinka y Youdim, 1995; Glinka *et al.*, 1996; Glinka *et al.*, 1997; Glinka *et al.*, 1998; Blum *et al.*, 2001; Kääriäinen *et al.*, 2008). Bajo condiciones fisiológicas e independientes de enzimas, la 6-OHDA es rápidamente oxidada por el oxígeno molecular (O₂) para formar peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y *para*-quinona (Figura 4.1). (Graham *et al.*, 1978; Gee and Davison, 1989; Soto-Otero *et al.*, 2000; Bové *et al.*, 2005).

Por otra parte, la alta especificidad dada por la 6-OHDA en modelos degenerativos de neuronas catecolaminérgicas se da porque esta neurotoxina es un análogo sintético noradrenérgico, es decir que tiene una estructura similar a la DA y a la norepinefrina, exhibiendo una alta afinidad por los transportadores catecolaminérgicos de la membrana plasmática, como el TDA y transportadores de norepinefrina. Consecuentemente, la 6-OHDA puede entrar a cualquiera de los dos tipos neuronales tanto dopaminérgico como noradrenérgicos y causa daño en las vías catecolaminérgicas periféricas del SNC. La 6-OHDA destruye estructuras catecolaminérgicas por combinación de efectos de las ERO y quinonas (Blum *et al.*, 2001; Bové *et al.*, 2005).

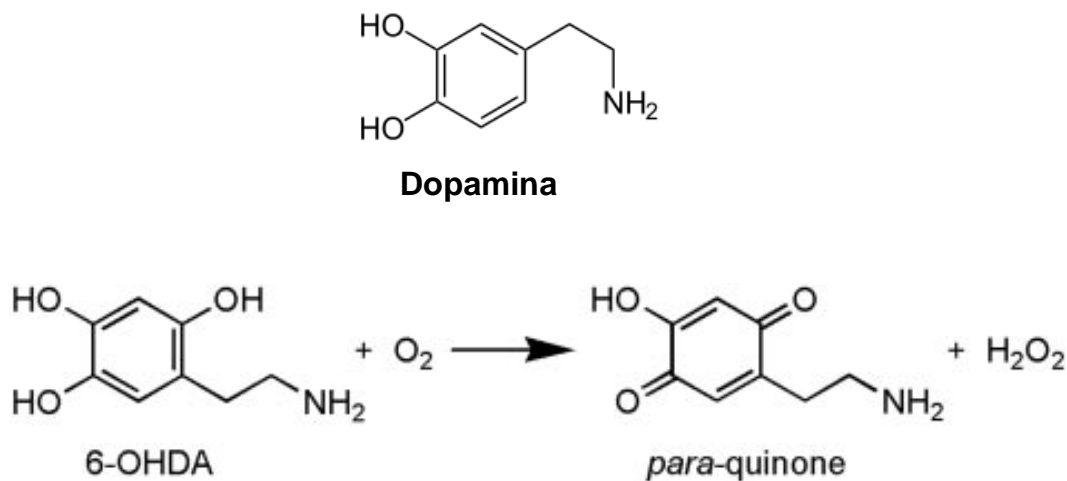


Figura 4.1 Estructura química de la 6-OHDA y oxidación. La 6-hidroxidopamina es un análogo hidroxilado de la DA. La 6-OHDA se oxida y forma peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y *para*-quinona (Tomada y modificada de Bové *et al.*, 2005).

La capacidad neurotóxica de la 6-OHDA se atribuye principalmente a la inhibición de los complejos I y IV mitocondriales, ya que después de su entrada a la célula a través del TDA se acumula en la mitocondria, teniendo como efecto disminución en el ATP intracelular y como consecuencia final la muerte celular (Glinka y Youdim, 1995; Glinka *et al.*, 1997). Este mecanismo tardío de muerte es similar al producido por el MPTP, otra neurotoxina dopaminérgica comúnmente usada para la creación de modelos animales de la EP (Soto-Otero *et al.*, 2000; Grünblatt *et al.*, 2000; Blum *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2008). Sin embargo, a diferencia del MPTP, la 6-OHDA es un compuesto incapaz de atravesar la barrera hematoencefálica, por lo tanto, los modelos animales (ratas, ratones y primates pequeños) de EP generados por 6-OHDA se basan en la inyección directa intracerebral en el estriado y en la SN, lo que causa muerte selectiva de neuronas dopaminérgicas de la SN y disminución del neurotransmisor DA en el estriado, alteraciones biológicas que reproducen una fisiopatología similar a la de la EP (alteraciones en el movimiento) (Blum *et al.*, 2001).

Se ha descrito que la 6-OHDA en neuronas dopaminérgicas genera muerte celular con fenotipo apoptótico, tanto *in vivo* como *in vitro*, caracterizada por encogimiento y condensación de la cromatina, invaginación de la membrana y fragmentación del DNA, y activación de caspasa 3 (Marti *et al.*, 1997; Dodel *et al.*, 1999; Zuch *et al.*, 2000; He *et al.*, 2000; Han *et al.*, 2003; Salinas *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2009). Aunque existen estudios que mencionan que la muerte inducida por 6-OHDA es independiente de caspasas (Galindo *et al.*, 2003). También, existen reportes que la 6-OHA causa muerte celular por necrosis o por una combinación de apoptosis y necrosis dependiendo de la concentración de 6-OHDA y el tipo celular (Woodgate *et al.*, 1999; Ding *et al.*, 2004; Puttonen *et al.*, 2008; Nobre *et al.*, 2010).

Adicionalmente, existe evidencia que permite considerar a la 6-OHDA como una neurotoxina endógena porque se ha descrito su presencia en cerebros de ratas y humanos. Las neuronas dopaminérgicas de la SN contienen altos niveles de DA, de H₂O₂ y de hierro libre, lo cual sugiere que una reacción no enzimática entre estos elementos puede conducir a la formación de 6-OHDA. La oxidación de la DA endógena ocurre a bajas concentraciones, aproximadamente de 50 μM, produciendo además de 6-OHDA, quinonas relacionadas con 6-OHDA y neurotóxicos alcaloides (7-dihydroxy 1,2,3,4 tetrahydroisoquinoline) (Napolitano *et al.*, 1999). La generación *in situ* de 6-OHDA se puede favorecer por factores como la presencia de la neuromelanina (incrementando los niveles de hierro libre), iones de nitrito, H₂O₂, manganeso, entre otros (Palumbo *et al.*, 1999; Garner y Nachtman, 1989).

Aunque, no se tiene claro el mecanismo molecular de citotoxicidad de la 6-OHDA, éste puede estar ligado directamente a la producción de ERO y quinonas. La auto-oxidación de 6-OHDA puede generar H₂O₂, el cual puede ser fácilmente reducido por la presencia del ión ferroso (Fe²⁺), por la reacción Fenton, produciendo radicales hidroxilo (HO·), que se consideran los radicales libres más dañinos para la células. En el caso de las neuronas dopaminérgicas que acumulan neuromelanina y por ende presentan altas concentraciones de hierro, se puede establecer una relación neurotóxica más acentuada entre el Fe²⁺ y la 6-OHDA en comparación con otros tipos celulares. De tal forma que las estrategias anti-oxidativas se constituyen en un mecanismo de neuroprotección, por ejemplo el ácido ascórbico, la glutatión y la catalasa (Figura 4.2) (Soto-Otero *et al.*, 2000, Jia *et al.*, 2008; Chan *et al.*, 2009).

Podemos afirmar que la 6-OHDA es un excelente modelo de muerte celular selectiva para neuronas dopaminérgicas y su fisiopatología compartida con procesos bioquímicos comunes con la EP, la convierten en una interesante herramienta para modelar la degeneración selectiva de neuronas dopaminérgicas (Jenner y Olanow, 1998; Soto-Otero *et al.*, 2000; Redman *et al.*, 2006.). A continuación se presenta una tabla que menciona algunos de los estudios realizados con 6-OHDA *in vitro* en modelos neuronales y sus efectos (Tabla 4.1).

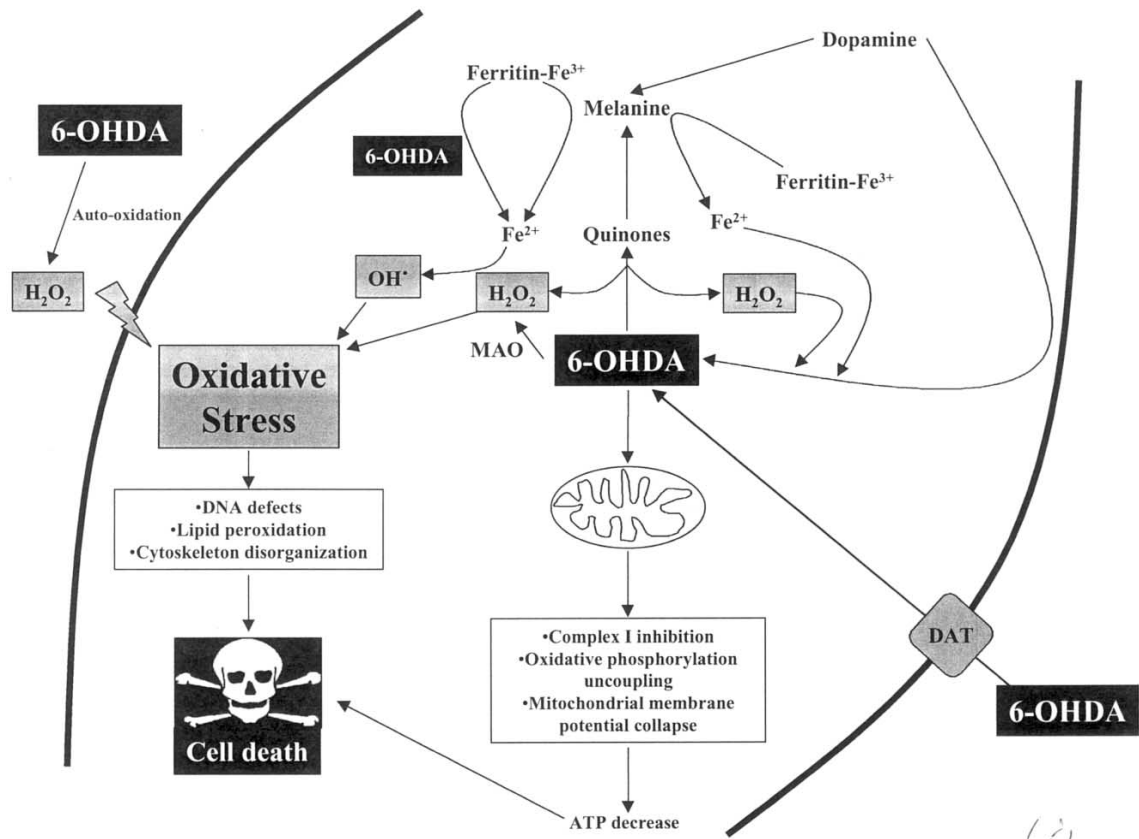


Figura 4.2 Mecanismo hipotético de la toxicidad de 6-OHDA. La 6-OHDA podría inducir toxicidad selectiva en neuronas catecolaminérgicas por tres mecanismos. **1.** Generación de especies reactivas de oxígeno por intra o extracelular auto-oxidación. **2.** Formación de peróxido de hidrógeno inducida por la actividad de MAO (monoamino oxidasa). **3.** Inhibición directa de la cadena respiratoria mitocondrial. Estos eventos conducen a estrés oxidativo, el cual puede ser potenciado por el calcio libre en el citoplasma y la disminución de ATP, finalmente, estos eventos convergen en muerte celular (Tomado de Blum *et al.*, 2001).

MODELO CELULAR	DOSIS 6-OHDA	TIEMPO	EFEECTO	REFERENCIA
Cultivo primario de neuronas mesencefálicas de embriones de ratón	15 µM	24 h	Incremento de ERO	Lotaharius <i>et al.</i> , 1999
			Muerte de neuronas TH ⁺ por apoptosis, externalización de la fosfatidilserina y activación de caspasas	
Cultivo primario de sustancia <i>nigra</i> , ratas neonatales	200 µM	24 h	Disminución del potencial de membrana mitocondrial	Chan <i>et al.</i> , 2009
			También afecta neuronas no dopaminérgicas	
Cultivo primario de neuronas mesencefálicas de rata	10, 20, 30, 40, 50 µM	45 min	Disminución en la viabilidad celular (LDH)	Kramer <i>et al.</i> , 1999
			Disminución en la longitud de las neuritas	
			Muerte selectiva de neuronas dopaminérgicas	
	20 y 100 µM	0 -24 h	Pérdida de viabilidad dosis dependiente	Han <i>et al.</i> , 2003
			Muerte no específica para neuronas dopaminérgicas	
			Acortamiento de las neuritas de neuronas TH ⁺	
			Células expuestas a bajas concentraciones de 6-OHDA son capaces de responder a la acción neurotrófica del GDNF	
			Disminución de la recaptación de DA	
			Pérdida de neuronas TH ⁺	
			Disminución en la recaptación de DA	
100 µM	0 30 min	Liberación de cit-c	Ding <i>et al.</i> , 2004	
40 µM		Activación de caspasa 3		
37,5 Y 75 µM	24 h	Condensación del núcleo	Kotake <i>et al.</i> , 2005	
		Pérdida de neuronas GABA, glía y dopaminérgicas		
40 o 200 µM	24 h	Efecto dosis dependiente	Nobre <i>et al.</i> , 2010	
40 µM		Muerte de neuronas TH ⁺		
200 µM		Muerte neuronal, mayor porcentaje por apoptosis		
			Incremento en los niveles de nitrito	
			Aumento en el porcentaje de micro glía	
			Incremento de la peroxidación de lípidos	

Tabla 4.1 Efecto de la 6-OHDA en modelos neuronales *in vitro*. Continúa...

MODELO CELULAR	DOSIS 6-OHDA	TIEMPO	EFEECTO	REFERENCIA
SH-SY5Y, neuroblastoma humano	5, 10, 25, 50, 100 y 500 μ M	4 y 24 h	Efecto dosis tiempo dependiente	Tirmenstein <i>et al.</i> , 2005
			Disminución de la concentración de ATP (25 y 50 μ M: 24h; 50 y 100 μ M: 4h)	
	30 y 100 μ M	24 h	Disminución del potencial de membrana mitocondrial con dosis de 100 y 500 μ M por 4h	Kääriäinen <i>et al.</i> , 2008
			Disminución de la viabilidad celular (MTT y LDH)	
	25, 50, 75 y 100 μ M		Incremento en la producción de ERO	Jia <i>et al.</i> , 2008
			Efecto dosis dependiente	
100 μ M	0, 6, 15, 24 y 48 h	Disminución de la viabilidad celular	Ossola <i>et al.</i> , 2008	
		Efecto tiempo dependiente		
100 μ M	24 h	Induce muerte celular por disminución de la actividad metabólica (MTT) y pérdida de la integridad de la membrana (LDH)	Liu <i>et al.</i> , 2009	
		Activación de caspasa 3		
		Incremento en la producción de ERO		
SH-SY5Y, neuroblastoma humano; C6 glioma de rata; SMC, musculo rugoso de conejo; CHO, ovario de hámster; CV1P, fibroblastos de mono	30, 100 y 300 μ M	24 h	Disfunción mitocondrial, liberación de cit-c y pérdida del potencial mitocondrial	Puttonen <i>et al.</i> , 2008
			Fragmentación del ADN, condensación del núcleo y clivaje de PARP	
			Mayor sensibilidad de las SH-SY5Y, respecto a las otras líneas celulares evaluadas	
			Induce apoptosis, necrosis o una mezcla de estas, dependiente de la concentración de 6-OHDA y el tipo celular (Apoptosis: concentraciones bajas, Necrosis: concentraciones altas)	

Tabla 4.1 Efecto de la 6-OHDA en modelos neuronales *in vitro*. Continúa...

MODELO CELULAR	DOSIS 6-OHDA	TIEMPO	EFEECTO	REFERENCIA	
PC12, feocromocitoma derivado de médula adrenal de rata	100 µM	24 h	Independiente de caspasas	Galindo <i>et al.</i> , 2003	
			Evidencia morfológica de apoptosis	Blum <i>et al.</i> , 1997	
			Regulación a la alta de p53 y Bax		
			Inducción de apoptosis		
	0 - 200 µM	0,5 - 24 h	Activación de caspasa 3	Blum <i>et al.</i> , 2001	
		0, 4, 8 y 24 h.	Dosis - tiempo dependiente	Woodgate <i>et al.</i> , 1999	
	50 µM	24 h	Necrosis, sólo el 5% presentan muerte por apoptosis, muerte independiente del TDA		
	100 - 400 µM		Efecto dosis dependiente		Takata <i>et al.</i> , 2005
	200 µM		Muerte por apoptosis, fragmentación del ADN		
	10 - 100 µM	24, 48 y 72h	Activación de caspasa 3 e incremento del clivaje de PARP	Lee <i>et al.</i> , 2007	
Disfunción en el sistema lisosomal dada por el incremento en la expresión y secreción de Cistatina C y la disminución de la actividad de la catepsina					
Neuronas dopaminérgicas inmortalizadas (1RB3AN27 o N27)	0-500 µM	24 h	Efecto dosis dependiente	Clarkson <i>et al.</i> , 1999	
	0-750 µM	2 h			
	75 µM no diferenciadas	24 h	Las neuronas diferenciadas son más sensibles a la 6-OHDA que las no diferenciadas (MTT)		
	33 µM diferenciadas	6 h	Mayor porcentaje de muerte celular por apoptosis en las neuronas diferenciadas respecto a las no diferenciadas, fragmentación del ADN.		
Cultivo primario de CGN (cerebellar granule neurons)	0 -60 µM	18 h	Condensación de la cromatina	Dodel <i>et al.</i> , 1999	
			Activación de caspasa 3		
			Fragmentación de ADN		
			Liberación de cit-c		
MN9D, neuronas dopaminérgicas de origen murino			Muerte neuronal por apoptosis	Choi <i>et al.</i> , 1999	
			Incremento de ERO, mediado por la activación de JNK		

Tabla 4.1 Efecto de la 6-OHDA en modelos neuronales *in vitro*.

4.2 Resultados

Con el propósito de determinar la dosis letal 50 de 6-OHDA en células CAD diferenciadas, se probaron diferentes dosis y tiempos de exposición. Estos tratamientos se llevaron a cabo en cajas de 96 pozos y la prueba de viabilidad celular MTT y LDH (Anexo 1, 2 y 3).

4.2.1 Efecto dosis-tiempo dependiente de la 6-OHDA en células CAD

Tras varios ensayos para determinar la dosis letal 50 para la 6-OHDA por el método de MTT, se tuvo como inconveniente que la 6-OHDA es una molécula con alta capacidad de auto-oxidación, y como producto de este proceso forma compuestos denominados *para*-quinonas, que absorben a una longitud de onda de 490 nm y conjugados tiólicos que absorben a una longitud de onda de 350 nm (Soto *et al.*, 2000). Debido a que la prueba de MTT se lee a 550 nm, las lecturas de estos ensayos generaron un ruido por el solapamiento con los derivados de la auto-oxidación de la 6-OHDA, y generaban resultados que no eran coherentes con lo observado al microscopio de luz, en donde era evidente el efecto de muerte dosis-tiempo dependiente por parte de la 6-OHDA (Figura 4.3).

Adicionalmente, estos productos de la auto-oxidación de la 6-OHDA son poco estables, y por lo tanto las lecturas con tratamientos de 24 h disminuyen la interferencia (Figuras 4.4 y 4.5). Así que se usaron varias estrategias para eliminar la interferencia de nuestros datos en el caso del MTT de acuerdo a lo reportado por Clarkson y colaboradores (1999) y Puttonen y colaboradores (2008) a saber: lavar suavemente con PBS las células adheridas antes de disolver los cristales de formazán con el propósito de eliminar del pozo los compuestos causales de la interferencia, se probó lavar las células y disolver los cristales de formazán en diferentes disolventes (DMSO y buffer de lisis MTT). Se realizaron lecturas a diferentes longitudes de onda en el lector de placas de 96, intentando restar el *background* a diferentes longitudes de onda (340 nm, 415 nm, 490 nm, 595 nm).

Sin embargo, la interferencia persistió en los tratamientos de 6 h con 6-OHDA, incluso después de probar cada una de las estrategias anteriormente descritas. En los tratamientos de tiempos largos (24, 48 y 72 h) la interferencia disminuyó notablemente, aunque las dosis altas de 6-OHDA, 100 μ M, 150 μ M y 200 μ M, aún mantienen valores de interferencia, pero se puede observar la tendencia del efecto dosis-tiempo dependiente por parte de la 6-OHDA en células CAD (Figura 4.5). Finalmente, con base en las observaciones microscópicas, la morfología celular, la formación de los cristales de formazán y la bibliografía se determinaron dos dosis para ser usadas en posteriores experimentos, las cuales corresponden a 100 μ M y 50 μ M para 6 y 24 h, respectivamente.

En relación a las características que presentan las células CAD tratadas con dosis altas de 6-OHDA (100, 150 y 200 μM) durante 6 h se puede observar un gran porcentaje de células desprendidas, además, estas células desprendidas pierden refringencia y su apariencia lisa y circular de los somas, en las células que aún permanecen adheridas se puede observar un acortamiento en la longitud de las neuritas.

Los resultados de las pruebas de LDH con 6-OHDA no se presentan porque al parecer las ERO que se producen en el medio interfieren e inhiben la reacción que se da entre la enzima LDH y el sustrato adicionado. Los datos que se obtienen por espectrofotometría a 490 nm de esta prueba son contradictorios, ya que las muestras tratadas con las dosis más altas de 6-OHDA presentan los menores valores de absorbancia, mientras que los tratamientos con dosis bajas presentan las lecturas más altas, por lo tanto se sugiere que la concentración de 6-OHDA es directamente proporcional a la cantidad de ERO, y éstas a su vez inhiben la reacción que se debe dar en el medio entre la LDH liberada y el sustrato adicionado al medio. Nuevamente, con las observaciones al microscopio se puede evidenciar claramente el efecto de muerte dosis-tiempo dependiente que induce la 6-OHDA en las células CAD, el cual no se pudo evidenciar con la técnica LDH ya que las ERO producto de la auto-oxidación de la 6-OHDA posiblemente inhiben la reacción enzimática que se debe dar entre la LDH liberada al medio por las células lisadas y el sustrato adicionado.

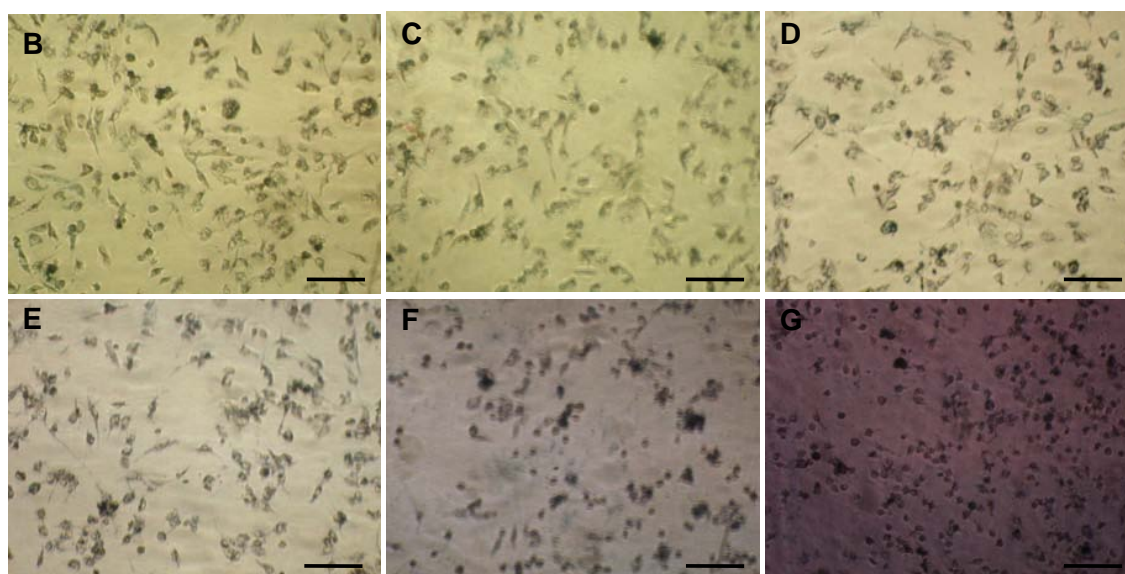
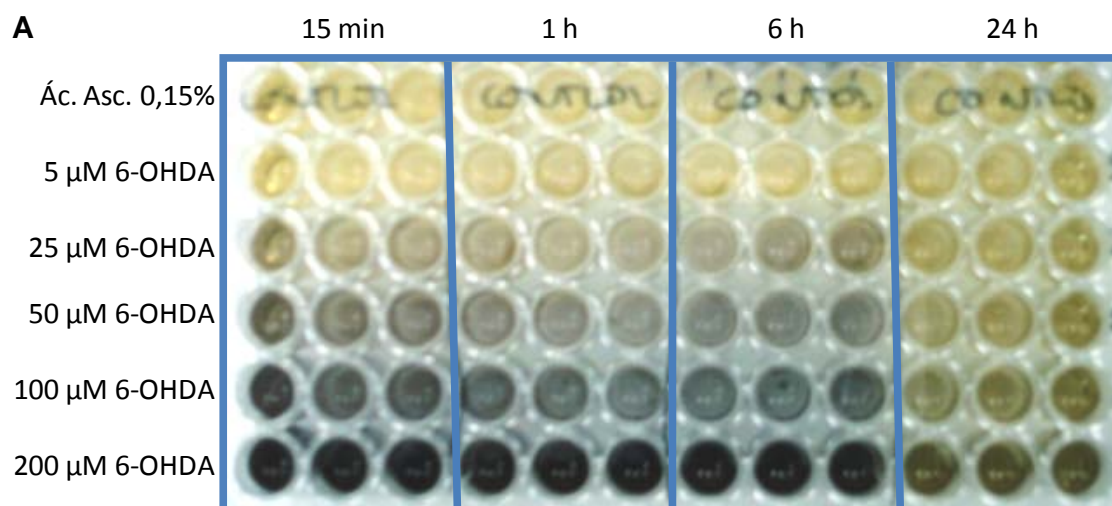


Figura 4.3 Interferencia de los productos de la auto-oxidación de la 6-OHDA con el MTT. **A.** A simple vista se observa la interferencia de los productos de la auto-oxidación de la 6-OHDA a diferentes concentraciones en diferentes tiempos (15 min, 1 h, 6 h y 24 h), nótese que la intensidad del color púrpura incrementa con la concentración de 6-OHDA y disminuye con el tiempo, lo que indica que estos compuestos son poco estables. **B.** Control (40 µL ácido ascórbico 0,15 %). **C.** 5 µM 6-OHDA **D.** 25 µM 6-OHDA, **E.** 50 µM 6-OHDA, **F.** 100 µM 6-OHDA, **G.** 200 µM 6-OHDA. Nótese que los pozos tratados con dosis altas de 6-OHDA junto con el MTT presentan un color cercano al púrpura el cual interfiere con la lectura del MTT, además, es evidente el efecto dosis dependiente de la 6-OHDA a las 6 h de tratamiento, por ejemplo, las células tratadas con la dosis de 200 µM (G) presentan el mayor porcentaje de mortalidad según la morfología celular observada al microscopio, así como la menor cantidad de cristales de formazán, indicadores de la actividad mitocondrial. Barra: 100 µm; fotografías tomadas en un microscopio de luz invertido de contraste de fases. UNAL, 2009.

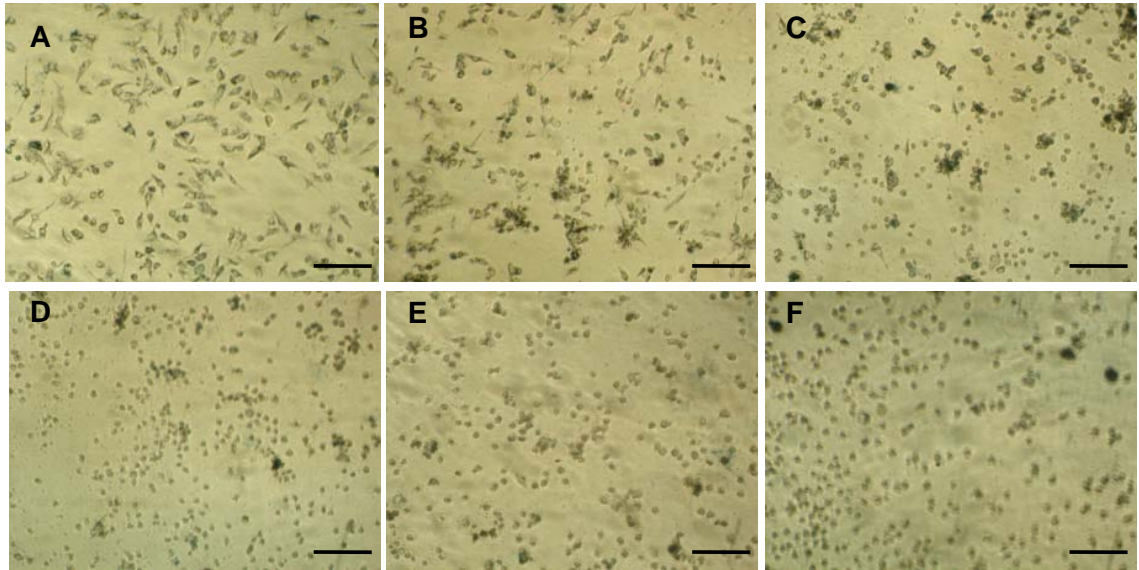


Figura 4.4 Pérdida de la interferencia de los productos de la auto-oxidación de la 6-OHDA con el MTT a las 24 h de tratamiento. **A.** Control (40 µL de ácido ascórbico 0,15 %). **B.** 5 µM 6-OHDA. **C.** 25 µM 6-OHDA, **D.** 50 µM 6-OHDA. **E.** 100 µM 6-OHDA. **F.** 200 µM 6-OHDA. Nótese que las dosis altas de 6-OHDA junto con el MTT a las 24 h de tratamiento ya no presentan el color cercano al púrpura que se observaba a las 6 h de tratamiento con 6-OHDA, además, es evidente el efecto dosis dependiente de la 6-OHDA a las 24 h de tratamiento, por ejemplo, las células tratadas con la dosis de 200 µM (F) presentan el mayor porcentaje de mortalidad según la morfología celular observada al microscopio, así como la menor cantidad de cristales de formazán, indicadores de actividad mitocondrial. A las 24 h de tratamiento a partir de la dosis de 25 µM de 6-OHDA la mayoría de las células están desprendidas y no se observan células con procesos alargados. Barra: 100 µm; fotografías tomadas en un microscopio de luz invertido de contraste de fases. UNAL, 2009.

EFFECTO DE LA 6-HIDROXIDOPAMINA EN CÉLULAS CAD

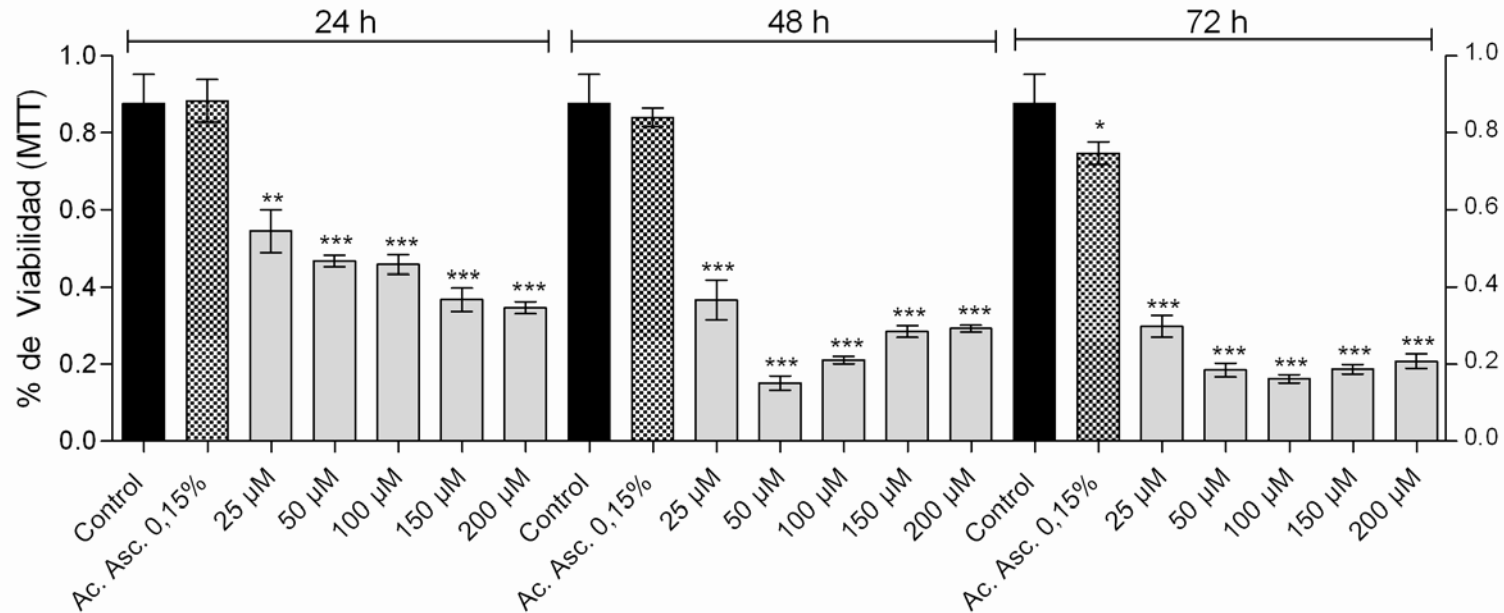


Figura 4.5 Efecto dosis – tiempo dependiente de la 6-OHDA en células CAD determinado por la actividad MTT. El eje Y representa el porcentaje de viabilidad relativo al control (barra negra) cuya absorbancia (550 nm) se normalizó al 100 %. El eje X representa los controles y los diferentes tratamientos con 6-OHDA (Control: Sin 6-OHDA y sin ácido ascórbico; Ác. Ásc. 0,15%: vehículo de la 6-OHDA, 40 µL de ácido ascórbico al 0,15%; 25 µM, 50 µM, 100 µM, 150 µM y 200 µM de 6-OHDA) agrupados por el tiempo de tratamiento (24, 48 y 72 h). Nótese, que la exposición a 6-OHDA tiene como efecto disminución del % de viabilidad dependiente de la dosis y el tiempo. Las dosis altas de 100, 150 y 200 µM de 6-OHDA a las 48 h presentan incremento en la lectura respecto a la dosis de 50µM, debido a la interferencia dada por la los productos de la auto-oxidación de la 6-OHDA, éste fenómeno de interferencia persiste a las 72 h de tratamiento. Las células tratadas con ácido ascórbico 0,15% presentan disminución en el porcentaje de viabilidad respecto a las células control a las 72 horas de tratamiento. Los valores representan el promedio +/- DE (desviación estándar), n=3. Prueba *t* de dos colas con un intervalo de confianza del 95%. *P<0,05; **P<0,01; *** P<0,001; comparaciones realizadas respecto a las células tratadas con el vehículo de la 6-OHDA (barra de cuadros).

4.3 Discusión

Varios autores han descrito el ácido ascórbico como un agente protector de neuronas dopaminérgicas, tanto *in vivo* como *in vitro* (Bagga *et al.*, 2008). Según nuestros resultados, la concentración de 0,15% de ácido ascórbico no tiene ningún efecto en el porcentaje de viabilidad por MTT a las 24 y 48 h respecto a las células control, incluso, a las 72 h de tratamiento se observa disminución de la viabilidad celular por MTT (Figura 4.5). Previamente, se ha descrito que el ácido ascórbico es un antioxidante, por lo tanto se ha usado como vehículo para los tratamientos con 6-OHDA con el propósito de hacer que esta molécula sea más estable frente al proceso de auto-oxidación. Adicionalmente, el uso del ácido ascórbico como vehículo de la 6-OHDA contribuyó a disminuir la interferencia con la lectura del MTT.

De acuerdo a la cinética de la 6-OHDA, ésta es una neurotoxina de efecto rápido, según lo reportado por Clarkson *et al.*, 1999 y Ossola *et al.*, 2008. Las neuronas dopaminérgicas son mucho más sensibles a su efecto. Así mismo, las neuronas diferenciadas son más sensibles respecto a las no diferenciadas, por ejemplo la dosis letal 50 reportada por Ossola *et al.*, 2008 para células SH-SY5Y no diferenciadas es de 100 µM por un tiempo de 24 h, mientras que las células CAD diferenciadas tratadas por 6 h a 100 µM presentan aproximadamente el 50% de muerte y la dosis letal 50 en un tiempo de 24 h es de 50µM (Figura 4.5), la mitad de la concentración que se reporta para células SH-SY5Y no diferenciadas.

Además, en este estudio se determinó una dosis letal 50 de 6 h para los posteriores estudios de tipo molecular, porque estudios previos con 6-OHDA reportan que la exposición a tiempos largos (> 6 h) induce en las células dopaminérgicas un efecto de muerte no específico de la 6-OHDA, sino efecto de las ERO producidas en el medio de cultivo como productos de la oxidación de la 6-OHDA, por ejemplo: H₂O₂ (Ding *et al.*, 2004, Soto-Otero *et al.*, 2000). Ding y colaboradores (2004) encontraron en cultivos primarios de neuronas mesencefálicas de rata tratadas con 6-OHDA por 6 h una inducción de muerte por apoptosis, ya que se evidencia fragmentación y acortamiento de las neuritas, condensación de la cromatina, liberación de cit-c, fragmentación de DNA y activación de caspasa 3, mientras que células expuestas por 48 h a la 6-OHDA presentan características diferentes. Las células CAD tratadas con 6-OHDA a una dosis de 100 µM por 6 h también presentan acortamiento de las neuritas.

El tipo de muerte que induce la 6-OHDA en estudios *in vitro* no es tan evidente como en el caso de la rotenona que se reporta que induce muerte por apoptosis. Según varios reportes la inducción de muerte por parte de la 6-OHDA depende de la concentración, el tiempo y el tipo celular, y puede ser por apoptosis, necrosis o una combinación de los dos procesos (Marti *et al.*, 1997; Dodel *et al.*, 1999; Zuch *et al.*, 2000; He *et al.* 2000, Han *et al.*, 2003; Salinas *et*

al., 2003; Lee *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2009; Woodgate *et al.*, 1999; Ding *et al.*, 2004; Puttonen *et al.*, 2008; Nobre *et al.*, 2010).

Puttonen y colaboradores (2008) estudiaron en varios tipos celulares de tipo neuronal y no neuronal, variando el tiempo y la concentración de 6-OHDA y encontraron que diferentes dosis y tiempos de exposición a la 6-OHDA alteran la proporción de células que mueren por apoptosis y/o necrosis. Ellos encuentran que la 6-OHDA es capaz de inducir muerte por apoptosis a bajas concentraciones y por tiempos de exposición cortos, mientras que concentraciones altas como 300 μM de 6-OHDA inducen un mayor porcentaje de muerte por necrosis en células SH-SY5Y.

Además, es importante que las células expresen el TDA para que la 6-OHDA cause muerte en un tiempo corto de exposición (< 6 h), ya que las células que expresan el TDA son más sensibles al efecto de la 6-OHDA. Woodgate y colaboradores (1999) demostraron que el mecanismo por el cual la 6-OHDA induce muerte esta mediado por el TDA, ellos inhibieron el TDA de células PC12 con *desipranime* y encontraron que se disminuye el porcentaje de células PC12 muertas por apoptosis, pero se sigue presentando muerte de manera independiente al TDA y estas células presentan características de muerte por necrosis.

En este estudio con células CAD no se tiene evidencia contundente del tipo de muerte causado por la 6-OHDA con dosis 100 μM por 6 h, pero según la bibliografía y las características morfológicas que presentan las células CAD expuestas a 6-OHDA se podría considerar que el tipo de muerte es por apoptosis y que estas células expresan el TDA ya que el porcentaje de muerte a las 6 h con 100 μM de 6-OHDA (tiempo corto, dosis baja) es relativamente alto y coincide con la cinética de células que expresan el TDA.

CAPÍTULO V.
**EFFECTO DE LAS NEUROTOXINAS, ROTENONA, C2-CERAMIDA Y
6-HIDROXIDOPAMINA EN LA VÍA PI3K/AKT**

CAPÍTULO V. EFECTO DE LAS NEUROTOXINAS, ROTENONA, C2-CERAMIDA Y 6-HIDROXIDOPAMINA EN LA VÍA PI3K/AKT

5.1 Vía de supervivencia neuronal PI3K/AKT

En neuronas la vía PI3K/AKT es mediadora de señales de supervivencia celular, diferenciación y proliferación neuronal mediante el bloqueo de la apoptosis, al promover la proliferación celular y regulando vías adicionales de señalización celular (Zhou *et al.*, 1998; Huang y Reichardt, 2001). La vía PI3K/AKT puede ser activada por diversos factores de crecimiento y es un punto crucial en el cual convergen diversas señales de supervivencia celular (Kandel y Hay, 1999; Kaplan y Cooper, 2001). La unión de factores de crecimiento a los receptores tirosina quinasa causa autofosforilación de sus residuos tirosina, recluta proteínas adaptadoras como Shc, acoplándose corriente abajo y activando las vías PI3K/AKT y Raf/MEK/ERK (Figura 5.1) (Bibel y Barde, 2000; Chao, 2003; Huang y Reichardt, 2003; Kaplan y Miller, 2000).

PI3K consiste de una subunidad reguladora (85 kDa) y una catalítica (110 kDa) encargada de la fosforilación de lípidos de inositol para generar 3-fosfoinositoles (PI: PI(3)P, PI(3,4)P₂ y PI(3,4,5)P₃) (Hirsch *et al.*, 2007). Estos se unen a un dominio homólogo de plekstrina presente en una variedad de moléculas de señalización, alterando su actividad y localización subcelular (Siskind y Colombini, 2000). La función de supervivencia de PI3K en particular esta mediada por la activación de AKT (Dudek *et al.*, 1997; Franke *et al.*, 1997; Kennedy *et al.*, 1997). Recientemente, se ha demostrado que la activación de AKT requiere su translocación a la membrana plasmática y la fosforilación en los residuos serina 473 (Ser473) y treonina 308 (Tre308) (Alessi *et al.*, 1996; Scheid *et al.*, 2002; Hirsch *et al.*, 2007).

Los blancos corriente abajo de AKT son diversos, y se asocian a repuestas metabólicas y de supervivencia celular (Tanti *et al.*, 1997; Marte y Downward, 1997). En neuronas, se ha demostrado que AKT regula la supervivencia pero no el crecimiento y la diferenciación (Kaplan y Cooper, 2001). Los sustratos de AKT incluyen la inactivación por fosforilación de mediadores pro-apoptóticos (Bad, Bax, caspasa-9, factor de transcripción Forkhead, GSK-3, p53), y activación de proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-xL, IAP y mTOR) (Datta *et al.*, 1997; Dudek *et al.*, 1997; Brunet *et al.*, 2001; Kennedy *et al.*, 1999; Gao *et al.*, 2003; Zheng *et al.*, 2002). Probablemente AKT es mediador de la supervivencia neuronal a diferentes niveles dependiendo del tipo celular, de la disponibilidad de blancos y del requerimiento de eventos transcripcionales o pos-transcripcionales (Rokudai *et al.*, 2000). El desarrollo de terapias dirigidas contra componentes específicos de la vía PI3K/AKT y sus blancos corriente abajo, pueden constituir una de las principales opciones para la regulación de

5.2.1 La vía PI3K/AKT en Enfermedad de Parkinson

Algunos estudios han evaluado el papel de la vía AKT y su relación directa con algunas proteínas implicadas en la EP. Se ha reportado que las α -sinucleínas estabilizan AKT y favorecen su acción promoviendo la supervivencia celular (Hashimoto *et al.*, 2004). Además, su relación con algunas de las toxinas implicadas en la etiopatogénesis de EP (MPTP y 6-OHDA) parecen regular corriente abajo y negativamente la actividad AKT, favoreciendo así el proceso apoptótico de manera selectiva (Halvorsen *et al.*, 2002; Ha *et al.*, 2003; Shimoke y Shiba, 2001).

Por otro lado proteínas implicadas en fenómenos de neuroprotección y neurodegeneración como son la HSP o chaperonas moleculares (Auluck *et al.*, 2002; Warrick *et al.*, 1999, Klucken *et al.*, 2004), se han visto involucradas en la regulación y estabilización de AKT evitando su defosforilación y por ende evitan la apoptosis y promueven la supervivencia celular (Sato *et al.*, 2000; Nakagomi *et al.*, 2003). Además, algunos antagonistas de los receptores dopaminérgicos que han mostrado evidencia en modelos experimentales de neuroprotección, también ejercen su efecto a través de la vía PI3K/AKT (Nair y Sealfon, 2003; Kihara *et al.*, 2002; Brami-Cherrier *et al.*, 2002). La relación de genes recientemente asociados a la EP como PINK-1 y DJ-1 con la vía de señalización PI3K/AKT se han empezado a explorar recientemente. En el caso de DJ-1 se ha descrito como un regulador negativo de PTEN. La regulación a la baja de DJ-1 resulta en la disminución de la fosforilación de AKT, mientras su sobreexpresión resulta en hiperfosforilación de AKT (Kim *et al.*, 2005).

5.2 Resultados

Los resultados que se presentan a continuación fueron obtenidos por análisis de WB de las proteínas AKT total y AKT fosforilada en el residuo Serina 473, esto con el propósito de entender el efecto de las neurotoxinas, rotenona, 6-OHDA y C2 ceramida sobre la vía de supervivencia neuronal PI3K/AKT en un modelo de neuronas catecolaminérgicas, las células CAD. Para llevar a cabo estos experimentos se tuvieron en cuenta los resultados obtenidos descritos en los anteriores capítulos (Tabla 5.1).

DOSIS LETAL 50 EN CÉLULAS CAD		
NEUROTOXINA	DOSIS 6 h	DOSIS 24 h
C2-Ceramida	25 μ M	10 μ M
6-OHDA	100 μ M	50 μ M
Rotenona	5 μ M	500 nM

Tabla 5.1 Dosis letal 50 de las neurotoxinas (C2-ceramida, 6-OHDA y rotenona) en células CAD.

5.2.1 Efecto de diferentes dosis de rotenona sobre la activación de AKT (Ser 473) por fosforilación en tiempos cortos de exposición

Según el análisis por WB de la activación de la proteína AKT por fosforilación en el residuo Ser 473 (Figura 5.2), se puede observar que las células CAD diferenciadas tratadas con rotenona a diferentes dosis (50 nM hasta 25 μ M) durante 6 h no presentan diferencias significativas en los niveles de p-AKT respecto a las células control. Este resultado indica que la pérdida de función mitocondrial de aproximadamente el 40% que se evidencia a las 6 h de tratamiento con las dosis de 25 μ M y 5 μ M de rotenona (Figura 3.3), al parecer es un evento independiente de la inhibición de la vía de supervivencia neuronal PI3K/AKT.

5.2.2 Efecto de la rotenona en la activación de AKT (Ser 473) por fosforilación a las 24 h

Cuando las células se exponen a dosis bajas de rotenona, por ejemplo 500 nM durante 24 h, se presenta una disminución leve en el nivel de p-AKT (Ser 473), pero sí las células previamente al insulto con rotenona se han tratado con IGF-1 (100 ng/mL), el nivel de fosforilación se mantiene, inclusive es más alto respecto a la fosforilación de las células control. Estos resultados indican que células CAD diferenciadas tratadas con rotenona (500 nM, 24 h) evidencian inhibición tardía de la vía de supervivencia neuronal PI3K/AKT (Figura 5.3), esto se podría explicar como un evento secundario a la disfunción mitocondrial temprana que causa la rotenona. La pérdida en la activación de AKT no es un evento que pueda explicar totalmente el efecto de la rotenona en dosis bajas y crónicas, ya que es un evento tardío al cual pueden subyacer otros aspectos como la generación de ERO e inhibición de otras vías paralelas.

En la figura 5.4 el análisis por densitometría, resultado de tres experimentos independientes, muestra que las células tratadas con rotenona 500 nM por 24 h presentan disminución significativa de p-AKT (Ser 473), aproximadamente del 30 % respecto a la fosforilación basal de las células control, mientras que las células tratadas con 5 μ M por 6 h no difieren en su fosforilación respecto a las células control. Además, cuando las células son previamente tratadas por 30 min con IGF-1 (100 ng/mL) y luego expuestas al tratamiento con rotenona (500 nM, 24 h) se mantiene la fosforilación, inclusive el nivel de p-AKT (Ser 473) es mayor al basal.

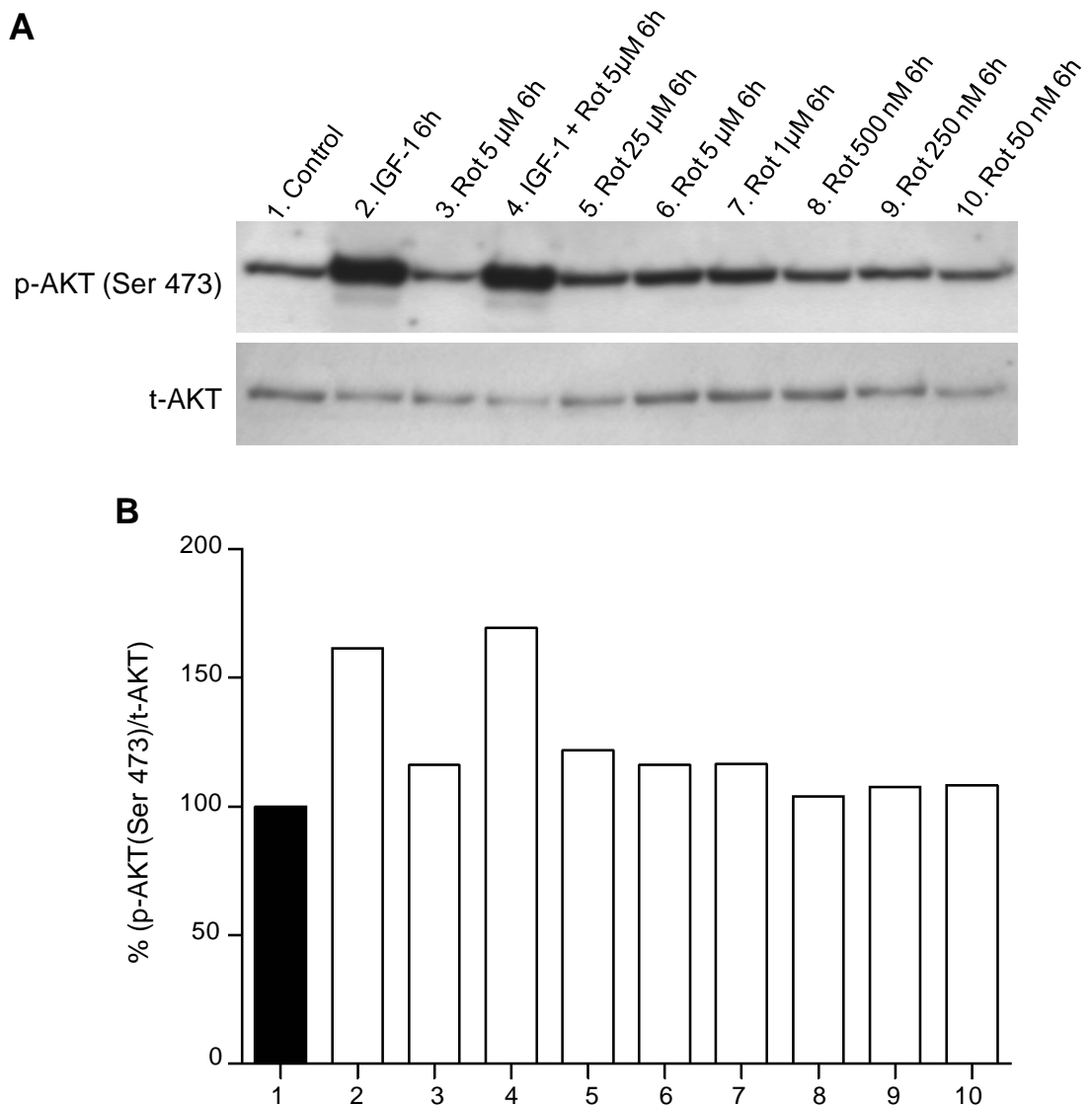


Figura 5.2 Efecto de la rotenona sobre la vía PI3K/AKT en tiempos cortos de exposición. **A.** Análisis por WB de la vía PI3K/AKT en células tratadas con diferentes dosis de rotenona por 6 h. Este WB es representativo de por lo menos tres experimentos independientes. **B.** Análisis por densitometría de la relación p-AKT (Ser 473)/t-AKT en células CAD tratadas con diferentes dosis de rotenona por 6 h, los datos se encuentran normalizados respecto al control (fosforilación basal de las células CAD diferenciadas, barra negra, carril 1). El tratamiento de IGF-1 (100 ng/mL, 6 h) causa activación de p-AKT (Ser 473) (carril 2); las células tratadas con rotenona 5 μ M, 6 h no presentan disminución en el nivel de p-AKT (Ser 473) en relación al control (carril 1), incluso según la densitometría existe un leve aumento no significativo; el tratamiento sinérgico de IGF-1 (100 ng/mL) y rotenona 5 μ M, 6 h (carril 4), presenta un efecto similar a las células tratadas sólo con IGF-1 (carril 2); y células CAD diferenciadas tratadas con diferentes dosis de rotenona por 6 h (25 μ M, 5 μ M, 1 μ M, 500 nM, 250 nM y 50 nM, carriles 5-10) no presentan diferencias en p-AKT (Ser 473), incluso en relación al control (carril 1) se presenta un leve aumento de p-AKT (Ser 473). (La descripción de los tratamientos se encuentra en el Anexo 6, Figura A. 6.1 y Tabla A. 6.3).

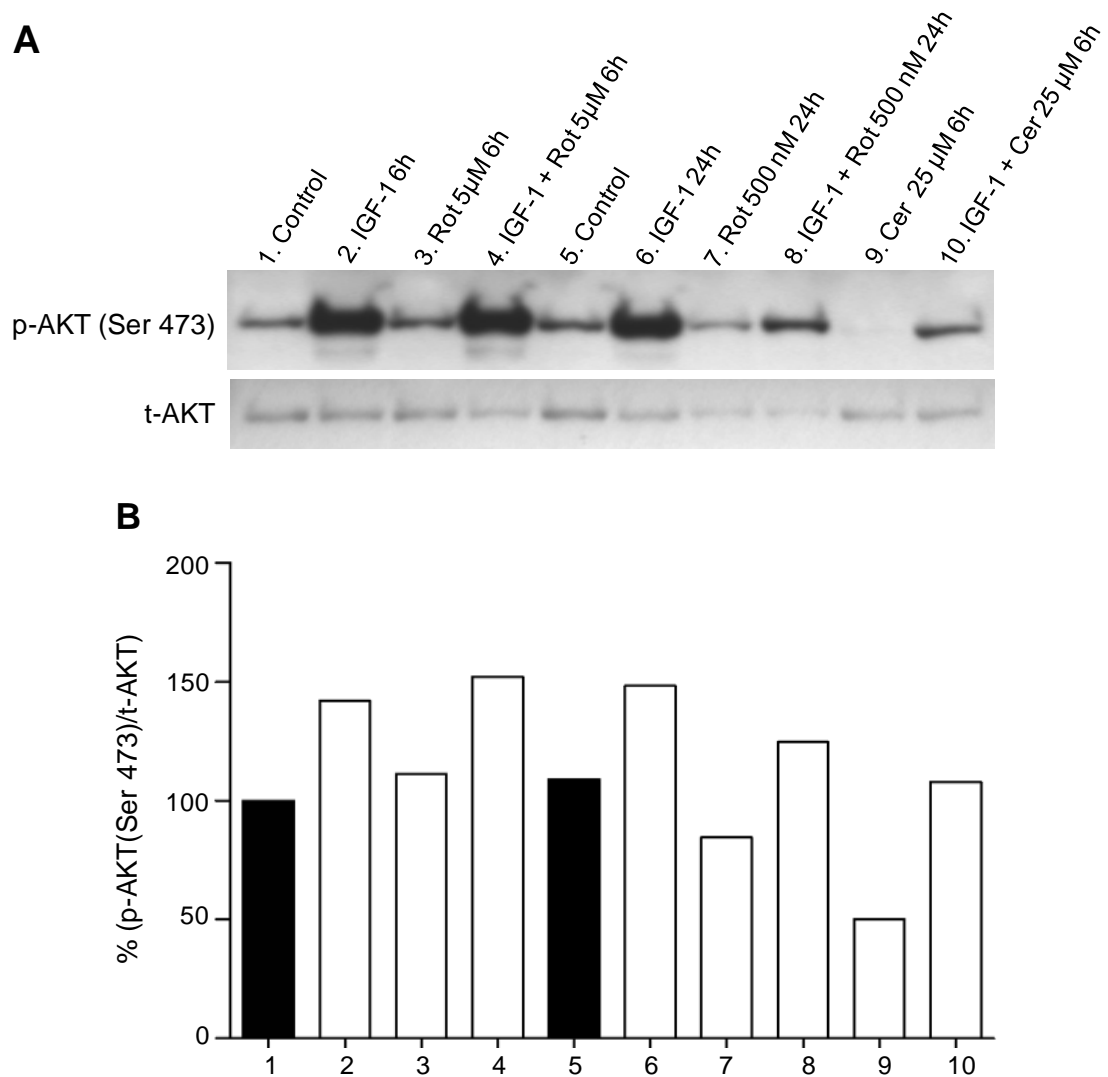


Figura 5.3 Efecto de la rotenona y C2-ceramida sobre la vía PI3K/AKT. A. Análisis por WB de la vía PI3K/AKT en células CAD diferenciadas tratadas con diferentes dosis de rotenona por 6 h y 24 h. En los dos últimos carriles se observa el efecto de la C2-ceramida 25 µM, 6 h. Este WB es representativo de por lo menos tres experimentos independientes. **B.** Análisis por densitometría de la relación p-AKT (Ser 473)/t-AKT en células CAD tratadas con rotenona y C2-ceramida, los datos se encuentran normalizados respecto al control (barra negra, carril 1) (fosforilación basal de las células CAD diferenciadas). Se observa que el tratamiento de IGF-1 (100 ng/mL, 6 h) causa activación de AKT por fosforilación en el residuo Ser 473 (carril 2); el tratamiento con rotenona 5 µM, 6 h no disminuye la fosforilación de AKT, incluso según el análisis por densitometría se observa un aumento muy leve (carril 3) en relación al control (carril 1), el tratamiento sinérgico de IGF-1 y rotenona 5 µM, 6 h (carril 4) presenta un efecto similar al observado en las células tratadas sólo con IGF-1, 6 h (carril 2). IGF-1 (100 ng/mL, 24 h) causa aumento de p-AKT (carril 6) en relación al control (carril 5); rotenona 500 nM, 24 h causa una leve de-fosforilación de AKT (Ser 473) (carril 7) en relación a los dos controles montados (barras negras, carriles 1 y 5), diferencia que no es muy evidente a simple vista; el tratamiento sinérgico de IGF-1 (100 ng/mL, 24 h) y rotenona (500 nM, 24 h) (carril 8) presenta pérdida de p-AKT (Ser 473) en relación a las células tratadas sólo con IGF-1, 24 h (carril 6), sin embargo el nivel de p-AKT (Ser 473) permanece mayor en relación al control (carril 5). Las células tratadas con C2-ceramida 25 µM, 6 h presentan una rápida y drástica pérdida de p-AKT (Ser 473) (carril 9); de-fosforilación que es disminuida cuando las células antes del insulto con la C2-ceramida (25 µM, 6h) son tratadas con IGF-1 (100 ng/L) (carril 10). (La descripción de los tratamientos se encuentra en el Anexo 6, Figura A. 6.1 y Tabla A. 6.3).

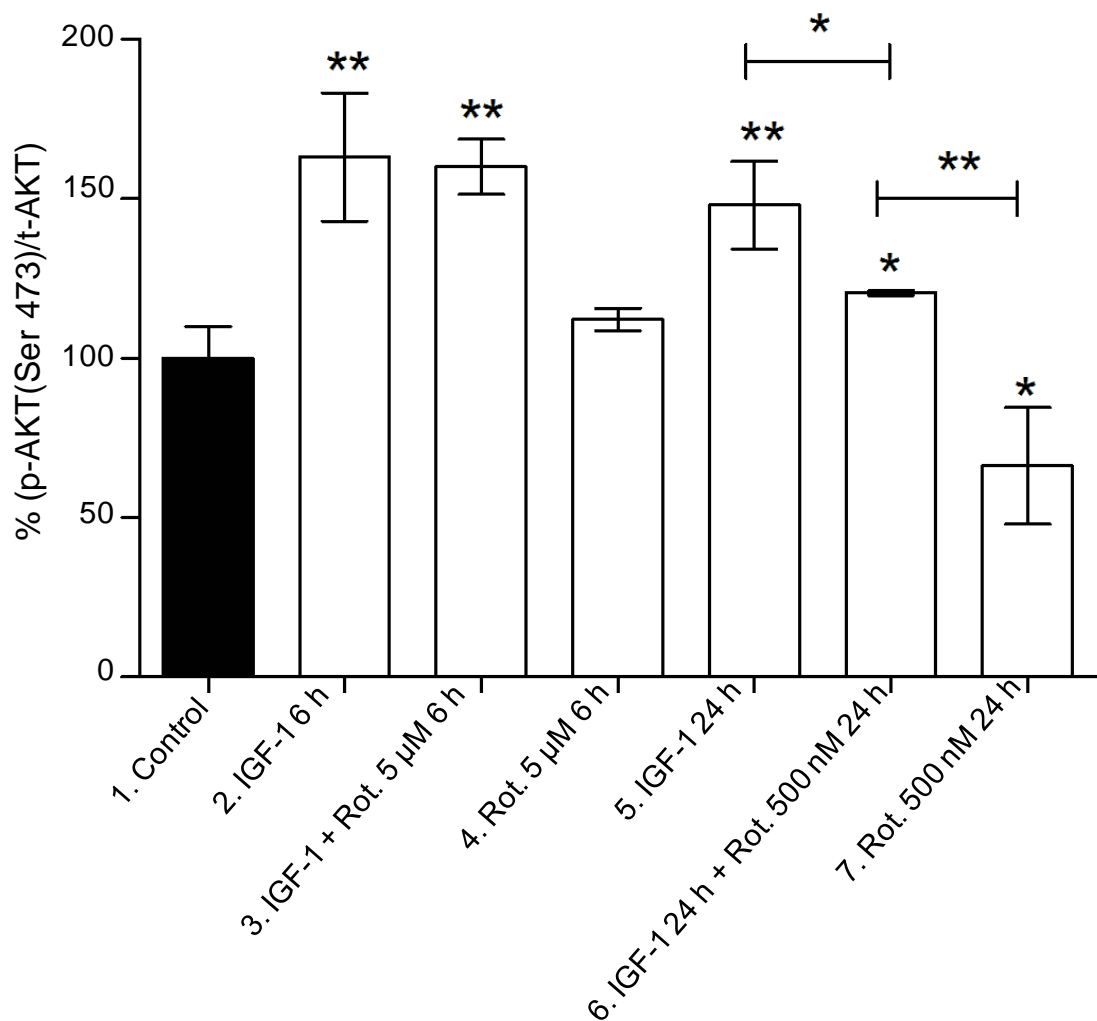


Figura 5.4 Efecto de la rotenona sobre la vía PI3K/AKT. Análisis por densitometría de rotenona sobre la relación p-AKT (Ser 473)/t-AKT. Resultados de tres experimentos independientes, los datos están normalizados respecto a la fosforilación basal del control (barra negra). El IGF-1 (100 ng/mL, 6 y 24 h) activa la vía PI3K/AKT por fosforilación de AKT en el residuo Ser 473 (columna 2 y 5); el tratamiento con rotenona 5 µM por 6 h (columna 4) no presenta diferencias significativas del nivel de p-AKT (Ser 473) respecto al control (columna 1). Mientras, el tratamiento con rotenona 500 nM por 24 h disminuye la fosforilación de AKT, en aproximadamente 30 % respecto al control (columna 1 y 7) y el pre-tratamiento con IGF-1 disminuye la pérdida de p-AKT (Ser 473), esta disminución es de aproximadamente 15 % en relación a la fosforilación de las células tratadas sólo con IGF-1 (100 ng/mL 24 h) (columnas 5 y 6), además, este nivel de p-AKT (Ser 473) es superior al basal en aproximadamente un 20 % (columna 1 y 6). Existen diferencias significativas entre las células tratadas con IGF-1 24 h e IGF-1 + Rot. 500 nM 24 h que indican que la rotenona induce de-fosforilación de p-AKT inclusive cuando la vía esta sobre activada. Prueba *t* de dos colas con intervalo de confianza del 95%. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, comparaciones realizadas respecto a las células control, células no tratadas con rotenona (barra negra). Los resultados mostrados son representativos de por lo menos 3 experimentos independientes. (La descripción de los tratamientos se encuentra en el Anexo 6, Figura A. 6.1 y Tabla A. 6.3).

5.4.3 Efecto de la C2-ceramida en la activación de AKT (Ser 473) por fosforilación

En estudios previos del grupo de Neurociencias de la Universidad Nacional de Colombia, se determinó la dosis letal 50 de C2-ceramida para las células CAD, 25 μM por 6 h y 10 μM por 24 h (Rodríguez, 2006; Arboleda *et al.*, 2005). Según el análisis por WB (Figura 5.3, carriles 9 y 10), la C2-ceramida causa pérdida de la fosforilación de AKT en el residuo Ser 473 de forma rápida y casi total respecto al control. Además, el pre-tratamiento con IGF-1 (100 ng/mL) es capaz de mantener la fosforilación de AKT de forma similar a las células control. De acuerdo a las observaciones microscópicas, las células tratadas con IGF-1 y C2-ceramida presentan un menor número de células desprendidas (Figura 5.5) respecto a las células tratadas con sólo C2-ceramida. Estos resultados indican que la muerte causada por C2-ceramida es en parte dependiente de la inhibición de la vía de supervivencia neuronal PI3K/AKT.

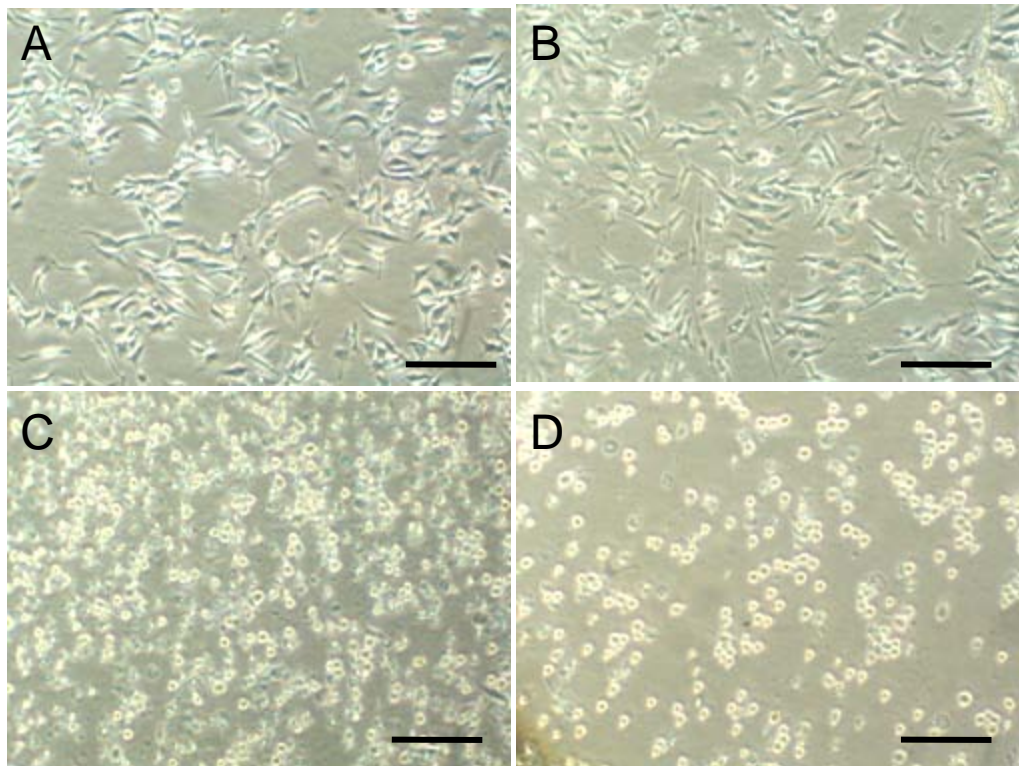


Figura 5.5 Efecto de la C2-ceramida e IGF-1 en las células CAD. A. Control. **B.** IGF-1 (100 ng/mL). **C.** C2-ceramida 25 μM por 6 h de tratamiento. **D.** Pre-tratamiento con IGF-1 (100 ng/mL) y C2-ceramida 25 μM 6 h. Nótese un menor número de células desprendidas en el panel **D**, posible efecto del pre-tratamiento con IGF-1. Barra: 100 μm ; fotografías tomadas en un microscopio de luz invertido de contraste de fases. UNAL, 2009.

5.4.4 Efecto de la 6-OHDA sobre la activación de AKT (Ser 473) por fosforilación

Según nuestros resultados por análisis de WB tanto la 6-OHDA (Figura 5.6 y 5.7) y la C2-ceramida (Figura 5.4) causan pérdida de fosforilación de AKT en el residuo Ser 473 de forma rápida y drástica. Se evaluaron los niveles del % p-AKT (Ser 473)/t-AKT para dos dosis de 6-OHDA por 6 h; la dosis 100 μ M, la cual causa una pérdida total de p-AKT (Ser 473), y disminuye la pérdida de la fosforilación de AKT con el pre-tratamiento IGF-1 (100 ng/mL), menos del 10% (Figura 5.5, carril 3). Mientras que la dosis de 50 μ M en relación al control no presenta diferencias significativas del % p-AKT/t-AKT, y el tratamiento con IGF-1 previo al tratamiento con 6-OHDA 50 μ M aumenta la fosforilación de AKT a un nivel similar al de las células tratadas sólo con IGF-1 6 h (Figura 5.5, carril 4).

Las células etiquetadas como Veh. corresponden a células tratadas con 200 μ l de ácido ascórbico 0,15 %, vehículo de la 6-OHDA (Figura 5,6, carril 1), esto se hizo con el propósito de descartar algún efecto de este compuesto en la vía PI3K/AKT en células CAD; ya que el ácido ascórbico se ha descrito como un agente antioxidante y en los últimos años se ha postulado como agente protector de neuronas dopaminérgicas (Bagga *et al.*, 2008), según nuestros resultados no se encuentran diferencias entre el % p-AKT/t-AKT de células Veh con relación a las células control (Figura 5.6, carril 1 y 8; barra negra y barra gris). Inclusive, el tratamiento sinérgico de IGF-1 y ácido ascórbico 0,15% presenta un nivel de p-AKT (Ser 473) similar al tratamiento IGF-1 6 h.

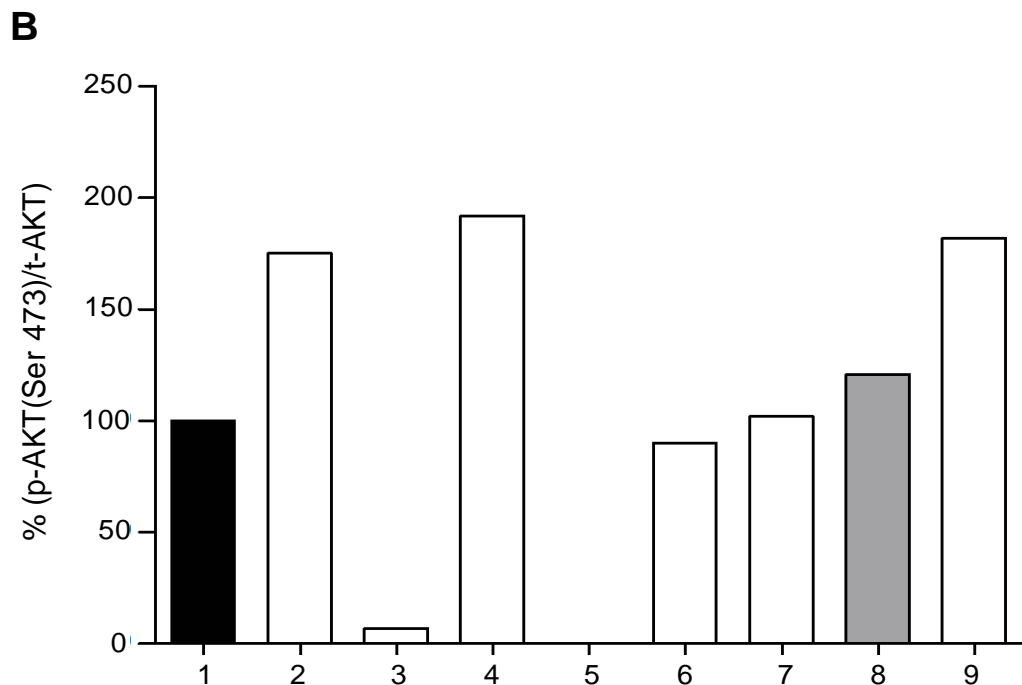
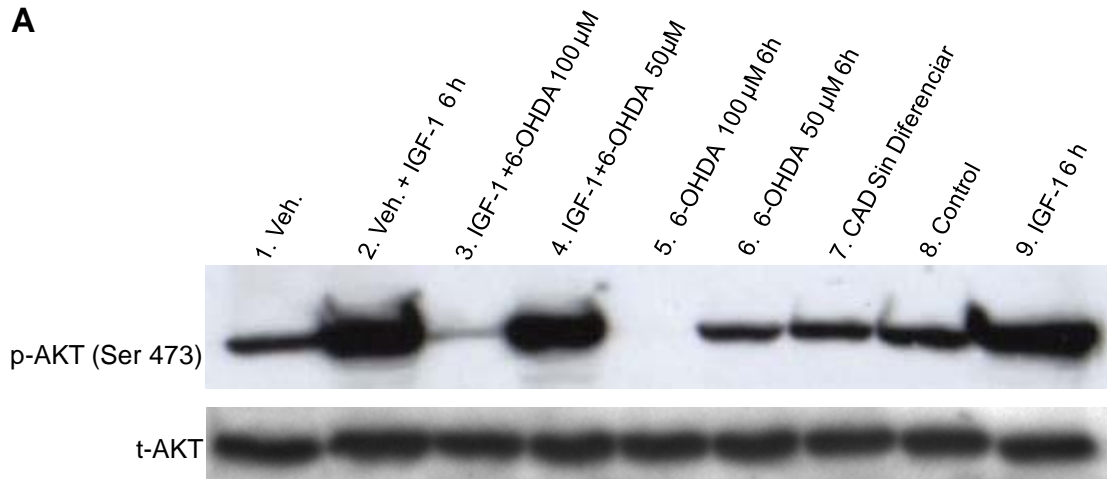


Figura 5.6 Efecto de la 6-OHDA sobre la vía PI3K/AKT. A. Análisis por WB de la vía PI3K/AKT en células tratadas con 6-OHDA por 6 h con dosis de 100 μ M y 50 μ M. Este WB es representativo de por lo menos tres experimentos independientes. **B.** Análisis por densitometría de la relación p-AKT (Ser 473)/t-AKT, los resultados están normalizados respecto al Veh. (barra negra). Veh. corresponde al vehículo en el cual fue disuelta la 6-OHDA (200 μ L de ácido ascórbico al 0,15 %). El tratamiento con IGF-1 (100 ng/mL) aumenta el nivel de p-AKT (Ser 473) (carril 2), las células tratadas con el vehículo (carril 1) presentan una leve disminución de p-AKT (Ser 473) respecto a las células control (barra gris, carril 8). El tratamiento con 6-OHDA 100 μ M por 6 horas induce una rápida y drástica pérdida de p-AKT (ser 473) (carril 5) y el pre-tratamiento con IGF-1 (100 ng/mL) a este insulto permite que se mantenga sólo un 10 % del nivel de p-AKT (Ser 473) (carril 3). Mientras que las células tratadas con 6-OHDA 50 μ M por 6 h (carril 6) disminuyen su nivel de p-AKT (Ser 473) sólo en un 10 % en relación a las células tratadas con el vehículo (carril 1) y el tratamiento sinérgico con IGF-1 (100 ng/mL) mantiene un alto nivel de p-AKT (Ser 473) (carril 4). Los últimos 3 carriles corresponden a controles del experimento. (La descripción de los tratamientos se encuentra en el Anexo 6, Figura A. 6.1 y Tabla A. 6.3).

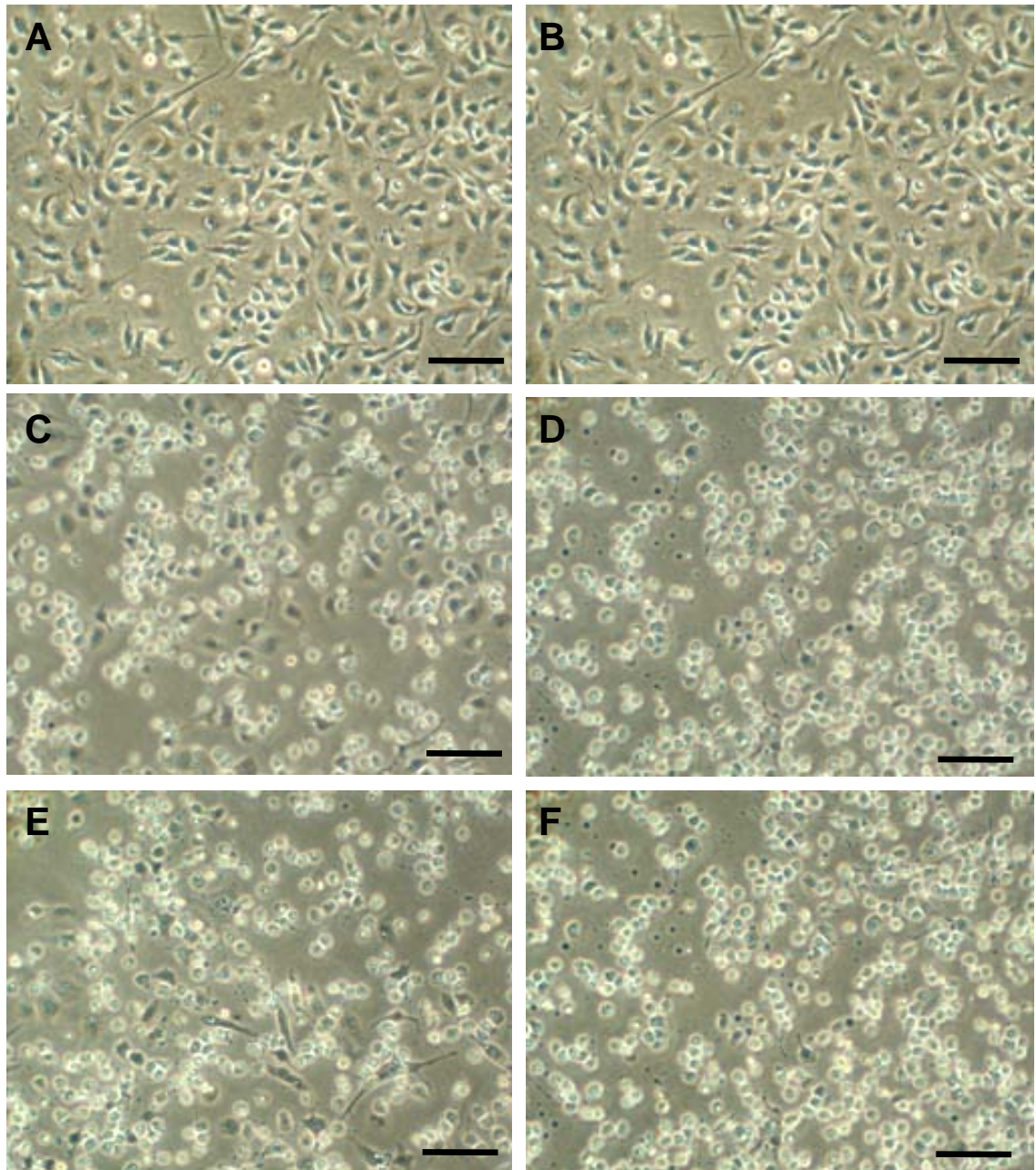


Figura 5.7 Efecto de la 6-OHDA e IGF-1 en las células CAD. A. Células CAD diferenciadas + ácido ascórbico 0,15% (vehículo de la 6-OHDA). B. IGF-1 100 ng/mL + ácido ascórbico 0.15%. C. 6-OHDA 50 μ M. D. 6-OHDA 100 μ M. E. IGF-1 100 ng/mL + 6-OHDA 50 μ M. F. IGF-1 100 ng/mL + 6-OHDA 100 μ M. Barra: 100 μ m; fotografías tomadas en un microscopio de luz invertido de contraste de fases. UNAL, 2009.

5.3 Discusión

El efecto de las neurotoxinas rotenona y 6-OHDA se ha estudiado por varios años para inducir modelos de EP y algunos de sus efectos se han identificado, tales como inhibición del complejo I mitocondrial, producción de ERO y muerte selectiva de neuronas dopaminérgicas (Blum *et al.*, 2001; Salinas *et al.*, 2003; Bové *et al.*, 2005; Radad *et al.*, 2008); lo que aún no es claro y poco entendido son los mecanismos moleculares que subyacen a estos efectos neurotóxicos. Es por esta razón que en este estudio se determinó el efecto de la rotenona y la 6-OHDA en la vía de supervivencia neuronal PI3K/AKT.

La rotenona induce en las células CAD un efecto de muerte dosis-tiempo dependiente (Figura 3.3 y 3.4). Según los resultados de viabilidad las células CAD tratadas con rotenona por 6 h a dosis altas, que corresponden a 5 y 25 μM , presentan marcada disminución en la actividad mitocondrial y viabilidad celular, determinado por MTT y LDH (Figura 3.3 y 3.4). Los resultados por análisis de WB de la vía PI3K/AKT indican que células CAD tratadas por 6 h a diferentes dosis, bajas y altas, no exhiben cambios en el nivel p-AKT (Ser 473) en relación al nivel basal de fosforilación de las células control ($100 \mu\text{M}$ de rotenon a), únicamente se observa una leve disminución del nivel de p-AKT (Ser 473) cuando las células se exponen a 24 h de rotenona incluso a dosis bajas (500 nM) (Figura 5.2, 5.3 y 5.4).

Los resultados anteriormente descritos sugieren que la muerte inducida por rotenona no es un fenómeno que pueda ser totalmente explicado por la inhibición de la vía PI3K/AKT, ya que este efecto es tardío y leve y exclusivamente se evidencia en células tratadas con rotenona por 24 h. Por tal razón, bajo estas condiciones de tratamiento, el efecto tardío de la inhibición de la vía PI3K/AKT puede ser un evento secundario de la activación y/o inhibición de otras vías de señalización celular por parte de la rotenona, por ejemplo, se podría considerar que la rotenona activa la vía de muerte celular de las MAPKs a las 6 h de tratamiento y como consecuencia de esto se observaría la inhibición de la vía PI3K/AKT a las 24 h. Por esta razón se recomienda hacer un análisis de otras vías de supervivencia neuronal que pudieran estar involucradas en la muerte temprana por efecto de dosis altas de rotenona.

El mecanismo molecular por el cual la rotenona es causante de muerte selectiva de neuronas dopaminérgicas es poco conocido y entendido, algunos estudios realizados apuntan a la activación de JNK, p38 y *c-jun* por fosforilación e inhibición de la fosforilación de ERK1/2 (Chun *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2009). Aunque en el estudio realizado por Chen y colaboradores (2008) en células SH-SY5Y diferenciadas se evidencia la disminución de p-AKT (Ser 473) en células tratadas con rotenona 10 μM después de las 12 h de tratamiento, por lo tanto ellos proponen como mecanismo protector frente al efecto de la rotenona aumentar los

niveles de p-AKT. Posteriormente, Avila-Gómez y colaboradores (2010) en un estudio en linfocitos proponen al IGF-1 como un agente protector frente a la acción de la rotenona al potenciar la vía PI3K/AKT. Los resultados obtenidos en este estudio acerca del efecto de la rotenona en la vía PI3K/AKT son relevantes porque constituyen la base molecular para la búsqueda de terapias dirigidas hacia la neuroprotección de poblaciones neuronales específicas.

En relación a la 6-OHDA, en este estudio se evidencia que esta neurotoxina induce en las células CAD muerte con un efecto dosis-tiempo dependiente (Figura 4.5). El análisis por WB de las células tratadas con 6-OHDA 100 μ M por 6 h muestra de modo evidente la inhibición de la vía PI3K/AKT, se puede observar que la 6-OHDA 100 μ M causa de-fosforilación casi total de p-AKT (Ser 473) a las 6 h de tratamiento, lo cual indica que la muerte inducida por 6-OHDA es un evento dependiente de la vía PI3K/AKT.

La inhibición de la vía PI3K/AKT podría contribuir a la explicación del mecanismo molecular por el cual la 6-OHDA induce muerte celular rápida y selectivamente en neuronas dopaminérgicas. Existen pocos estudios *in vitro* que relacionan el efecto de la 6-OHDA con la vía PI3K/AKT, un ejemplo, es el estudio realizado por Chen y colaboradores (2004) en células SH-SY5Y, en el cual encontraron que la 6-OHDA causa de-fosforilación de AKT y como consecuencia activación de proteínas pro-apoptóticas sugiriendo a GSK3 β como mediador de este proceso. Posteriormente, Jiang y Yu (2005) determinaron que la inhibición de la vía PI3K/AKT es capaz de bloquear la resistencia a la 6-OHDA en células SH-SY5Y que interactúan con astrocitos. Además, Jiang y Yu (2005) descartan que la vía de las MAPKs medie el proceso de resistencia frente a la 6-OHDA en células SH-SY5Y que interactúan con astrocitos porque la inhibición de ERK1/2 no afecta la supervivencia celular.

Posteriormente, Chung y colaboradores (2007) comprobaron *in vitro* e *in vivo* que elevar los niveles basales de p-AKT disminuye la muerte selectiva de neuronas dopaminérgicas inducida por 6-OHDA. Estos hallazgos son de gran importancia ya que se puede sugerir como una posible estrategia terapéutica en EP la potenciación de la vía de supervivencia neuronal PI3K/AKT con el propósito de inhibir la muerte selectiva de neuronas dopaminérgicas. De acuerdo a nuestros resultados el IGF-1 un activador de la vía PI3K/AKT aumenta los niveles de p-AKT (Ser 473) y atenúa la disminución de la fosforilación de AKT en el residuo Ser 473 causada por el tratamiento con 6-OHDA (Figura 5.6). Estos resultados sugieren que el IGF-1 podría ser usado como blanco terapéutico, aunque falta por entender varios aspectos moleculares que subyacen a este fenómeno en el contexto completo de EP.

Salinas y colaboradores (2003) determinaron que el factor de crecimiento nervioso (FCN) potencia la vía PI3K/AKT y normaliza los niveles intracelulares de ERO por regulación a la alta de la expresión de una enzima antioxidante denominada hemo oxigenasa-1 (HO-1). Posteriormente, se han seguido publicado estudios que

sugieren que la potenciación de la vía PI3K/AKT protege de la muerte neuronal en modelos de EP, específicamente contra 6-OHDA; existen varias estrategias, por ejemplo, Hwang y colaboradores (2008), proponen que la proteína metalotionein III (MT-III) regula las ERO manteniendo elevado el nivel de la enzima HO-1 en un camino dependiente de la vía PI3K/AKT; Quesada y colaboradores (2008), sugieren la activación de la vía mediada por estrógenos e IGF-1, Li y colaboradores (2008), indican que NT-3 activa la vía PI3K/AKT y esto reduce la apoptosis inducida por 6-OHDA en células PC12. También, Malagelada y colaboradores (2010) proponen como blanco terapéutico mTOR un componente corriente abajo de AKT.

En relación a la ceramida es una toxina de gran interés para el grupo de Neurociencias de la Universidad Nacional, porque a diferencia de la 6-OHDA y la rotenona ésta es una neurotoxina endógena, la ceramida está presente en todas las células, pero se presenta en mayor proporción en las membranas de las células neuronales, por esta razón se simula el efecto de la acción neurotóxica de la ceramida, adicionando C2-ceramida exógenamente a las células. En la actualidad existen varias hipótesis acerca de los mecanismos por los cuales la ceramida causa muerte neuronal. Arboleda y colaboradores (2005, 2007) y Rodríguez (2006) evidenciaron que la C2-ceramida causa muerte celular por apoptosis en las células CAD por inhibición de la vía PI3K/AKT. Los ensayos realizados en este trabajo, igualmente, demuestran que la C2-ceramida a una dosis de 25 μ M por 6 h causa muerte neuronal dependiente de la inhibición de la vía PI3K/AKT de forma rápida y drástica (Figura 5.3).

La C2-ceramida en el contexto de la EP es importante porque la etiología de la muerte neuronal en la mayoría de desordenes neurodegenerativos es desconocido, pero la recopilación de evidencia sugiere que en EA y EP la muerte neuronal se da por un proceso apoptótico (Honig y Rosenberg, 2000; Mattson, 2000; Yuan y Yankner, 2000), y la ceramida es un segundo mensajero lipídico involucrado en diversas respuestas celulares frente a estímulos extracelulares, incluyendo apoptosis (Arboleda *et al.*, 2009). Además, la ceramida se ha propuesto como un camino putativo de muerte neuronal en EP (France-Lanot *et al.*, 1997) y recientemente, Bras y colaboradores (2008) consideran que el metabolismo de la ceramida está involucrado con enfermedades que convergen en CL, así como la EP.

Lo interesante de estos resultados es la convergencia de la 6-OHDA y la C2-ceramida en la inducción de muerte en las células CAD dependiente de la inhibición de la vía PI3K/AKT, además la 6-OHDA, al igual que la C2-ceramida, se ha propuesto como una toxina endógena de neuronas dopaminérgicas (Napolitano *et al.*, 2009). Así mismo, estas dos neurotoxinas actúan inhibiendo la función mitocondrial, la 6-OHDA inhibe los complejos I y IV mitocondriales y adicionalmente, como producto de su auto-oxidación incrementa las ERO al interior de la célula (Glinka y Youdim, 1995; Glinka *et al.*, 1996; Glinka *et al.*, 1997;

Ginkla *et al.*, 1998; Blum *et al.*, 2001; Kääriäinen *et al.*, 2008). En el caso de la ceramida, también se ha demostrado que induce muerte celular por alteración de la función mitocondrial, incluyendo generación de ERO, alteración en la homeóstasis del calcio, colapso del potencial de membrana mitocondrial y liberación de cit-c (Kolesnick y Kronke, 1998; Mathias *et al.*, 1998). La vía en la que la ceramida llega a alterar la mitocondria es poco entendida pero se ha sugerido que es por regulación de proteínas pro-apoptóticas de la familia Bcl-2 (Kim *et al.*, 2001), activación de JNK (Verheij *et al.*, 1996), formación directa de poros sobre la membrana mitocondrial (Siskind *et al.*, 2006; Siskind y Colombini, 2000), e inhibición de los complejos I y III de la cadena respiratoria (Di *et al.*, 2000; Gudz *et al.*, 1997). Y en relación a la inhibición de la vía PI3K/AKT la ceramida es capaz de regular directamente e indirectamente la actividad de varios mediadores de la señalización celular como cinasas activadas por ceramida (CAPK), fosfatasa activada por ceramida (CAPP), MAPKs, PKC ζ , fosfolipasas (cPLA, PLD, PLA2), SAPK/JNK, ciclo-oxigenasa, c-Myc, la proteína Rb, factores de transcripción como NF- κ B y caspasas (Arboleda *et al.*, 2009).

Hasta el momento no es claro el mecanismo molecular y las vías de señalización que intervienen en el proceso de muerte selectiva de neuronas dopaminérgicas en EP y los modelos neurotóxicos son contradictorios en relación a este aspecto, en el caso de la 6-OHDA se postula la vía PI3K/AKT y para rotenona se propone la vía de las MAPKs. Además, en la actualidad no es claro el efecto de estas vías en la función mitocondrial y la hipótesis en EP está dirigida a que la muerte neuronal es un evento secundario a la disfunción mitocondrial. Debido a la complejidad del mecanismo molecular de muerte de las neuronas dopaminérgicas la investigación en este campo ha propuesto una nueva perspectiva mucho más específica y está relacionada con los procesos de fusión – fisión y autofagia mitocondrial, los cuales regulan la función y dinámica mitocondrial y en la actualidad son poco explorados en EP.

CAPÍTULO VI.
RELACIÓN DE DJ-1 CON LA VÍA PI3K/AKT EN UN CONTEXTO
NEUROTÓXICO

CAPÍTULO VI. RELACIÓN DE DJ-1 CON LA VÍA PI3K/AKT EN UN CONTEXTO NEUROTÓXICO

6.1 DJ-1 (PARK 7)

DJ-1 pertenece a la superfamilia de proteínas ThiJ/Pfpl y es una proteína altamente conservada desde humanos hasta bacterias (Tao y Tong, 2003; Bonifati *et al.*, 2003). Este gen está localizado en el cromosoma 1p36 (en el locus PARK7) y codifica para una proteína de 189 aminoácidos de aproximadamente 21 kD. DJ-1 ha sido clonado independientemente por cuatro grupos. Inicialmente, fue caracterizado como un nuevo oncogén capaz de transformar células NIH3T3 en cooperación con *H-Ras* activado, expresado ubicuamente en varios tejidos, incluyendo el cerebro (Nagakubo *et al.*, 1997). Posteriormente, dos grupos clonaron homólogos de DJ-1 en ratas, SP22 ó CAP-1, y fue descrita como una proteína involucrada en procesos de fertilización (Klinefelter *et al.*, 1997; Wagenfeld *et al.*, 1998). Finalmente, DJ-1 se evidenció como una subunidad reguladora del complejo de proteínas que se unen al mRNA para su estabilidad “*RNA-binding protein complex*” (Hod *et al.*, 1999).

En el cerebro humano, la proteína DJ-1 está localizada en neuronas (Rizzu *et al.*, 2004), así como en células no neuronales (Bandopadhyay *et al.*, 2004; 2005), y presenta una amplia expresión en diversas poblaciones neuronales del SNC, por ejemplo, neuronas del putamen, caudado, sustancia *nigra*, hipocampo, amígdala basolateral, núcleo reticular del tálamo, zona incerta, *Locus coeruleus* y corteza motora (Kotaria *et al.*, 2005). Se ha demostrado en varias líneas celulares, que su localización subcelular es tanto citoplasmática como nuclear (Nagakubo *et al.*, 1997) y colocaliza con α -sinucleína en los cuerpos de Lewy (Jin *et al.*, 2005; Meulener *et al.*, 2005). No obstante, Zhang y colaboradores (2005) evidenciaron en tejido de cerebro de ratón y en células SH-SY5Y, que la proteína DJ-1 endógena se encuentra localizada a nivel subcelular en citoplasma, espacio intermembranal de la mitocondria y membrana interna mitocondrial, sugiriendo a DJ-1 endógena como una proteína integral de membrana mitocondrial importante en la regulación de su función.

6.1.1 Genética de DJ-1 y Enfermedad de Parkinson

La EP es principalmente un desorden esporádico y la contribución del factor genético en su patogénesis inicialmente fue muy controversial; pero en la actualidad con los estudios de ligamiento y asociación genética en humanos se ha establecido firmemente esta relación. Recientemente, se han descrito aproximadamente once mutaciones en DJ-1 asociadas con la EP autosómica

recesiva de inicio temprano, las mutaciones en este gen son raras y sólo representan el 1% de la población con EP familiar (Bonifati *et al.*, 2003, 2004; Hague *et al.* 2003; Hedrich *et al.*, 2004; Abou-Sleiman *et al.*, 2004; Pankratz *et al.*, 2006; Heutink, 2006; Klein y Lohmann-Hedrich, 2007). Se han referido mutaciones tanto homocigotas (L166P, M26I, E64D, 14-kb del), como heterocigotas (D149A, A104T, R98Q, IVS6-1 G→C, c.56delC c.57G→A, Ex5-7del, IVS5+2-12del), ver tabla 6.1; sin embargo, poco se conoce acerca del papel de las mutaciones en DJ-1 y como éstas pueden conducir a la muerte selectiva de neuronas dopaminérgicas y posteriormente a la EP. Se ha sugerido que las mutaciones tienen diferentes efectos bioquímicos sobre la proteína DJ-1, que podrían causar inestabilidad de ésta y posterior degradación por el SUP y como consecuencia final disminución de la actividad anti-oxidativa de DJ-1 frente al estrés oxidativo (Wilson *et al.*, 2003; Macedo *et al.*, 2003; Miller *et al.*, 2003; Moore *et al.*, 2003; Hague *et al.*, 2003; Abu-Sleiman *et al.*, 2004; Baulac *et al.*, 2004; Hedrich *et al.*, 2004; Clark *et al.*, 2004; Hering *et al.*, 2004; Görner *et al.*, 2004; Taira *et al.*, 2004; Olzmann *et al.*, 2004; Takahashi-Niki *et al.*, 2004; Pankratz *et al.*, 2006; Hulleman *et al.*, 2007).

Aunque DJ-1 es una proteína expresada ampliamente en la mayoría de los tejidos, aún no es claro como la pérdida de su función, atribuida a mutaciones, afecta de manera específica el sistema dopaminérgico, tal como se demuestra en pacientes con EP. Los ratones *knockout* de DJ-1 tienen número normal de neuronas dopaminérgicas; pero presentan disfunción en la vía nigro-estriatal dopaminérgica, déficit motor e hipersensibilidad al MPTP y al estrés oxidativo, lo que sugiere que la pérdida de función de DJ-1 por mutaciones está ligada a la patogénesis de EP (Goldberg *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2005).

Mutación	Herencia	Efecto	Población	Referencia
L166P	Homocigota	Estabilidad de la proteína	Italiana	Bonifati <i>et al.</i> , 2003
14-kb del	Homocigota	Pérdida del producto	Alemana	Bonifati <i>et al.</i> , 2003
M26I	Homocigota	Desconocida	Judíos askenazí	Abou-Sleiman <i>et al.</i> , 2003
D149A	Heterocigota	Desconocida	Afro-Caribe	Abou-Sleiman <i>et al.</i> , 2003
IVS6-1 G→C	Componente heterocigoto	Transcrito aberrante	Hispana	Hague <i>et al.</i> , 2003
c.56delC				
c.57G→A	Componente heterocigoto	Proteína truncada	Hispana	Hague <i>et al.</i> , 2003
A104T	Heterocigota	Desconocida	Latina	Hague <i>et al.</i> , 2003
Ex5-7del	Heterocigota	Transcrito aberrante	Italiana	Hedrich <i>et al.</i> , 2003
IVS5+2-12del	Heterocigota	Transcrito aberrante	Rusa	Hedrich <i>et al.</i> , 2003
R98Q	Heterocigota	Desconocida		Hedrich <i>et al.</i> , 2004
D64E	Homocigota	Estabilidad de la proteína	Ascendencia turca	Hering <i>et al.</i> , 2004

Tabla 6.1 Mutaciones en DJ-1 asociadas a EP.

6.1.2 Funciones de DJ-1

DJ-1 es una proteína ubicuamente expresada, a la cual se le han definido varias funciones: control del ciclo celular y oncogénesis (Nagakubo *et al.*, 1997), regulación de la estabilidad del mRNA (Hod *et al.*, 1999), regulación positiva del receptor andrógeno (Takahashi *et al.*, 2001; Niki *et al.*, 2003; Taira *et al.*, 2004), fertilización (Wagenfeld *et al.*, 2000; Okada *et al.*, 2002; Yoshida *et al.*, 2003; Honbou *et al.*, 2003), actividad proteasa (Huai *et al.*, 2003; Olzmann *et al.*, 2004), actividad chaperona (Lee *et al.*, 2003; Shendelman *et al.*, 2004), respuesta al estrés celular, siendo esta última la función más consistente en los modelos neuronales evaluados (Mitsumoto *et al.*, 2001; Honbou *et al.*, 2003; Bonifati *et al.*, 2004; Kinumi *et al.*, 2004). Posteriormente, Xu y colaboradores (2005) demostraron que DJ-1 se une con mayor afinidad a proteínas nucleares (p54nrb y PSF) en neuronas dopaminérgicas actuando como co-activador transcripcional y protegiendo contra la apoptosis neuronal. Zhong y colaboradores (2005) proponen que DJ-1 actúa como regulador transcripcional de la TH inhibiendo la sumoilación de PSF. Además, se ha evidenciado como posible mecanismo alternativo de la inhibición de muerte uno mediado por la interacción de DJ-1 con Daxx/ASK1 (Junn *et al.*, 2005). Adicionalmente, se ha encontrado que la proteína DJ-1 colocaliza con α -sinucleína en CL como mecanismo protector solubilizando los agregados de α -sinucleína (Chen *et al.*, 2007; Batelli *et al.*, 2008).

6.1.3 DJ-1 y mitocondria

Las mitocondrias de pacientes y los modelos animales de EP exhiben disminución en la actividad mitocondrial (Sherer *et al.*, 2002; Giasson *et al.*, 2004), que conduce a la producción de ERO en las neuronas afectadas, daño al DNA, lípidos y proteínas y finalmente muerte celular (Sherer *et al.*, 2002; Jenner, 1998; Orth y Schapira, 2002; Bonifati *et al.*, 2003; Jenner y Olanow, 2006). Las neuronas dopaminérgicas son selectivamente más vulnerables al estrés oxidativo porque éstas presentan altos niveles basales de ERO por su metabolismo y auto-oxidación de la DA (Sherer *et al.*, 2002). Existen estudios de células *in vitro* en los que se evidencia que DJ-1 ejerce su función neuroprotectora vía función antioxidativa (Yokota *et al.*, 2003; Taira *et al.*, 2004) y colocaliza en la matriz mitocondrial y espacio intermembranal, por lo que se sugiere que DJ-1 es una proteína integral de mitocondria y podría desempeñar un papel importante en la dinámica mitocondrial (Zhang *et al.*, 2005).

Canet-Avilés y colaboradores (2004) demostraron *in vitro* que la proteína DJ-1 sobre-expresada se localiza en la membrana externa mitocondrial después del proceso de oxidación del residuo C106 a ácido sulfínico, esta modificación post-traduccional de DJ-1 le permite un cambio en su punto isoeléctrico (pI) de 6,2 a

5,8; y posterior a esta modificación DJ-1 se trasloca del citoplasma a la mitocondria. Aunque no es claro como ejerce su función protectora en mitocondria DJ-1 se postula como un sensor de estrés oxidativo. Park y colaboradores (2005) encontraron en *Drosophila* que DJ-1 se localiza principalmente en las mitocondrias que presentan morfología alargada o hinchada por lo que se propone que DJ-1 colocaliza en mitocondrias dañadas como mecanismo de protección contra el estrés oxidativo.

Desde hace varios años en diversos modelos celulares (Neuro2a, SH-SY5Y, N27, neuronas dopaminérgicas primarias) y animales (*Drosophila melanogaster*, ratones, ratas) evaluados, DJ-1 ha mostrado un papel neuroprotector frente a varios estímulos apoptóticos (H₂O₂, 6-OHDA, MPTP) (Park *et al.*, 2005; Yokota *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2005), protección que es disminuida por mutaciones (Zhou *et al.*, 2005). Se ha encontrado que esta función se realiza a través de la regulación de mecanismos anti-estrés y función mitocondrial específicamente (Park *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2005; Dodson y Guo, 2007). No obstante, la función directa de DJ-1 en la función mitocondrial aún no ha sido establecida.

Recientemente, Hayashi y colaboradores (2009) evidenciaron que la proteína DJ-1 se une al complejo I mitocondrial y mantiene su actividad. La colocalización de DJ-1 con el complejo I mitocondrial se da bajo condiciones de no estrés con NDUFA4 y ND1, subunidades del complejo I localizadas en la membrana interna mitocondrial, pero la colocalización de DJ-1 con el complejo I se potencia bajo condiciones de estrés oxidativo. La proteína DJ-1 no presenta una secuencia de señalización de importe a mitocondria, por lo tanto se sugiere que ésta debe ser traslocada al complejo I mitocondrial después de unirse a otra proteína que sí posee la señal de importe mitocondrial. Mediante estudios de colocalización e inmunoprecipitación se sugiere que DJ-1 se une a NDUFA4 en el citoplasma y luego este complejo de proteínas se importa a mitocondria, sin embargo la función exacta de DJ-1 en mitocondria aún no es clara.

6.1.4 DJ-1 y la vía de supervivencia neuronal PI3K/AKT

Con el propósito de entender los procesos celulares que son mediados por DJ-1 y como su disfunción se relaciona con la inducción en muerte celular; tras varios años, se ha buscado entender la relación de DJ-1 con vías de señalización que están involucradas en supervivencia y muerte celular. A continuación se mencionan algunos de los estudios que han encontrado relación entre DJ-1 y la vía de supervivencia neuronal PI3K/AKT.

El grupo de Kim y colaboradores (2005) es el primero en evidenciar en *Drosophila* que DJ-1 trabaja en la vía PI3K/PTEN/AKT como regulador negativo de la función de PTEN (del inglés, *phosphatase and tensin homolog*), un gen supresor tumoral,

y extienden estas observaciones a mamíferos. Además, ellos determinan en muestras de cáncer de seno mayor activación de la vía PI3K/AKT por fosforilación y que esto se correlaciona con un elevado nivel de la expresión de DJ-1; además muestras de cáncer de pulmón con niveles elevados de DJ-1 presentan un pobre pronóstico, por lo tanto Kim y colaboradores (2005) proponen a DJ-1 como marcador de pronóstico y un valioso blanco terapéutico en cáncer.

Igualmente, Yang y colaboradores (2005) encontraron componentes de la vía PI3K/AKT como moduladores del fenotipo de muerte celular inducido por la interferencia de DJ-1 en *Drosophila*. Ellos reportan disminución de la fosforilación de AKT en moscas con interferencia para DJ-1, indicando que DJ-1 es regulador de la vía PI3K/AKT. La hiper-activación de DJ-1 podría ser un factor de riesgo en cáncer, mientras que su deficiencia podría conducir a la neurodegeneración debido a un déficit de la respuesta frente al estrés oxidativo (Yang *et al.*, 2005). Existe evidencia que indica que la vía de señalización mediada por AKT responde al estrés oxidativo (Crossthwaite *et al.*, 2002) y ejerce una función neuroprotectora (Lee *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2010).

Sin embargo, son necesarios estudios adicionales para aclarar los eventos moleculares que conectan la vía PI3K/AKT con DJ-1 y su efecto protector frente al estrés oxidativo (Iwatsubo *et al.*, 2005; Görner *et al.*, 2007; Barksdale y Bijur, 2009; Dagda *et al.*, 2009; Aleyasin *et al.*, 2010). Parte del conocimiento de la función molecular de DJ-1 se ha centrado en su función en cáncer como inhibidor de PTEN mediante su unión directa (Kim *et al.*, 2009).

6.2. Resultados

6.2.1 Expresión endógena de DJ-1 en células CAD

Las células CAD diferenciadas y no diferenciadas expresan de manera endógena la proteína DJ-1 (Figura 6.1), que tiene un peso molecular aproximado de 20 kDa (Nagakubo *et al.*, 1997). Para el análisis por WB se usaron extractos proteicos de la línea celular SH-SY5Y y de cerebro de ratón como controles positivos de expresión de DJ-1 (Taira *et al.*, 2004; Shang *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005; Kotaria *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2007).

Los resultados no muestran diferencias en la expresión de la proteína DJ-1 entre las células CAD diferenciadas y no diferenciadas; sin embargo las células CAD presentan un menor nivel de expresión de la proteína DJ-1 respecto a las muestras de cerebro de ratón y de la línea celular SH-SY5Y (Figura 6.1).

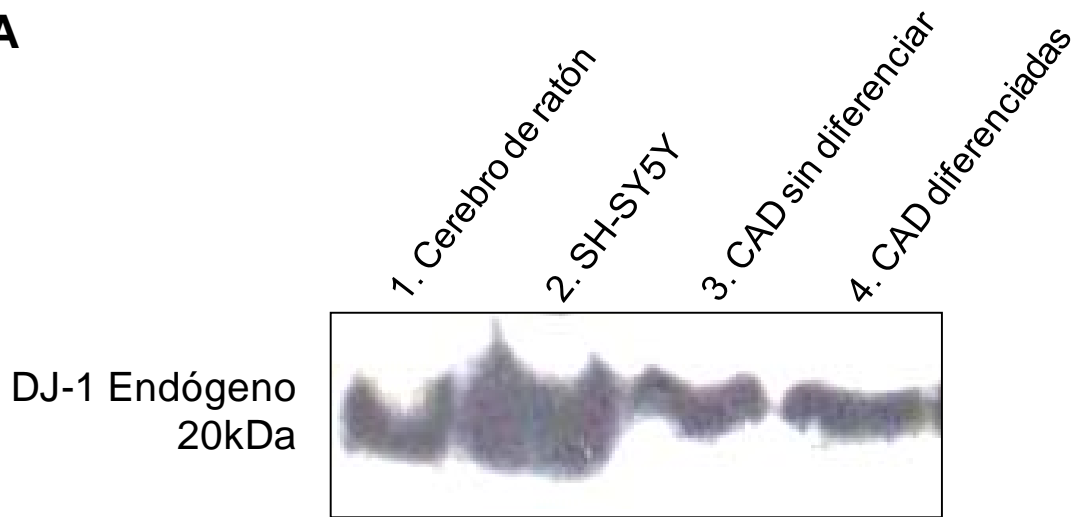
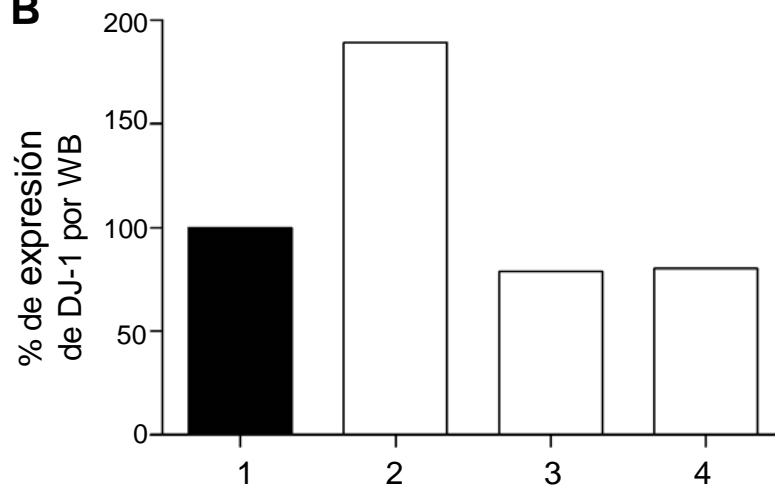
A**B**

Figura 6.1 Expresión endógena de la proteína DJ-1 en células CAD diferenciadas (4 d) y sin diferenciar. **A.** Análisis por WB de la proteína DJ-1 en cerebro de ratón, línea celular de neuroblastoma humana (SH-SY5Y), línea celular CAD sin diferenciar y diferenciadas (células cultivadas en ausencia de SFB por 4 d). En cada uno de los carriles se sembraron 30 μ g de proteína, el control de carga se verificó en el gel de corrido con azul de Comassie. **B.** Análisis por densitometría del % de expresión de la proteína DJ-1 en relación a la muestra de cerebro de ratón. No se presentan diferencias en la expresión de DJ-1 entre las células CAD sin diferenciadas y diferenciadas. Las células SH-SY5Y presentan casi el doble de expresión de DJ-1 respecto a las muestras de cerebro de ratón y células CAD.

6.2.2 Sobre-expresión de DJ-1 humana en células CAD

Las células CAD diferenciadas y no diferenciadas expresan de forma endógena la proteína DJ-1 (Figura 6.1). Debido a que el procedimiento de transfección en células CAD diferenciadas es poco eficiente, el proceso de transfección se llevó a cabo en células no diferenciadas y cultivadas al 2% de SFB (Capítulo II, 2.2.2 y Anexo 5.1), lo que mejoró sensiblemente la eficiencia de transfección, la cual se mantiene hasta por 48 h después de la transfección (Figura 6.2, A).

El procedimiento de transfección con el EV genera aumento del nivel de DJ-1 en relación a las células no transfectadas (Figura 6.2, B), igualmente, la transfección con los dos vectores EV y DJ-1, genera aumento notable de p-AKT comparado con células no transfectadas, Sin embargo, al utilizar como control de la transfección el EV, es notable que la sobreexpresión de DJ-1 incrementa de forma significativa el nivel de p-AKT (Ser 473) (Figura 6.2, C).

En la Figura 6.2 D se presenta el análisis por densitometría de la sobreexpresión de la proteína DJ-1 a partir de cuatro experimentos independientes. El nivel de expresión de la proteína DJ-1 en las células control (no transfectadas) se tomó como el 100 % y todos los valores se normalizaron respecto a éste. Las células CAD transfectadas con el vector DJ-1 expresan la proteína DJ-1 en un rango de 175 a 379 (Anexo 7.5), mientras que el rango para las células transfectadas con el EV es de 95-180 (Anexo 7.5), el análisis por densitometría indica que existen diferencias significativas entre las células control y las células transfectadas con DJ1-1 (Figura 6.2 D). El nivel de expresión de las células transfectadas con el EV no presenta diferencias significativas respecto a las células control y células transfectadas con DJ-1, aunque si es persistente un mayor nivel de expresión de DJ-1 en las células transfectadas con el EV en relación a las células control y en relación a las células transfectadas con DJ-1 es evidente que el nivel de expresión de DJ-1 es el doble respecto a las células transfectadas con el EV.

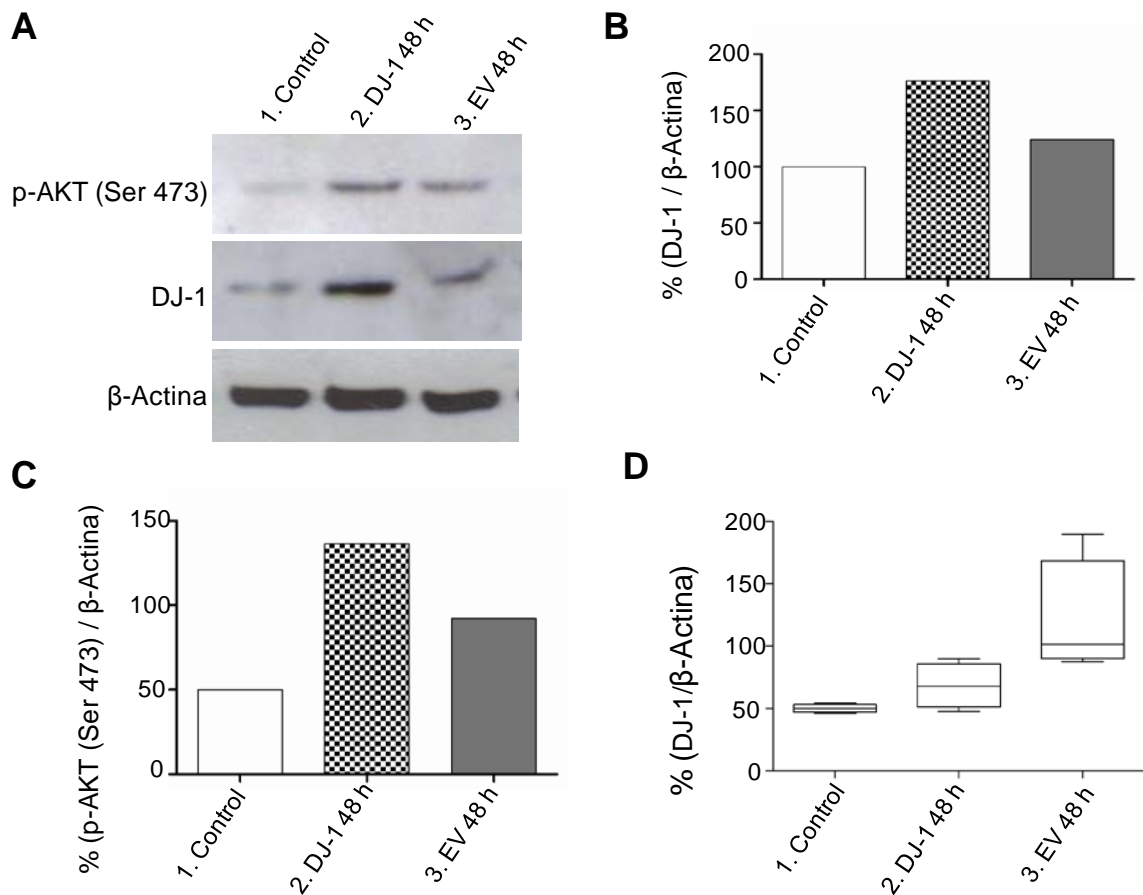


Figura 6.2 La sobreexpresión de DJ-1 se correlaciona con mayor activación de AKT por fosforilación del residuo Ser 473. Análisis por WB de la sobreexpresión de DJ-1 y de p-AKT (Ser 473) en células CAD, la β-actina se uso como control de carga. Este WB es representativo de por lo menos tres experimentos independientes. **A. Las células CAD transfectadas con el constructo pCDNA3.1 DJ-1-WT (DJ-1) sobreexpresan la proteína DJ-1 respecto a las células control (no transfectadas) y a las transfectadas con el vector vacío (EV, control de la transfección).** En células transfectadas con el EV se evidencia un leve aumento del nivel de la proteína DJ-1 respecto a las células control. El procedimiento de transfección por sí sólo causa aumento de la fosforilación de AKT, nótese que las células transfectadas con DJ-1 y EV presentan un nivel mayor de p-AKT (Ser 473) respecto a las células control, pero la sobreexpresión de DJ-1 se puede correlacionar con la potenciación de la activación de AKT por fosforilación en el residuo Ser 473. **B. Análisis por densitometría del porcentaje de expresión de DJ-1** en células control, transfectadas con los vectores DJ-1 y EV, las células transfectadas con el vector DJ-1 presentan el mayor porcentaje de expresión de la proteína DJ-1. **C. Análisis por densitometría del porcentaje de expresión de p-AKT (Ser 473)** en células control, transfectadas con los vectores DJ-1 y EV, las células transfectadas con el vector DJ-1 presentan el mayor porcentaje de p-AKT (Ser 473). **D. Análisis por densitometría del porcentaje de expresión de DJ-1**, con datos de cuatro experimentos independientes; se mantiene la tendencia de la sobreexpresión de la proteína DJ-1 en células transfectadas con el vector DJ-1. (La descripción de los tratamientos se encuentra en el Anexo 6, Figura A. 6.1 y Tabla A. 6.4).

En la figura 6.3 se presentan los resultados de uno de los experimentos de transfección de células CAD siguiendo el protocolo que se especifica en el Anexo 5.1. En este experimento se demuestra que el nivel de DJ-1 en células transfectadas con el vector DJ-1 es el doble en relación al EV y del triple en relación a las células no transfectadas, demostrando una vez más lo que se presenta en la figura 6.4. Posteriormente a la transfección celular las células fueron tratadas con las diferentes neurotoxinas con las dosis determinadas previamente, con el propósito de entender la relación de DJ-1 con la vía PI3K/AKT en un contexto neurotóxico.

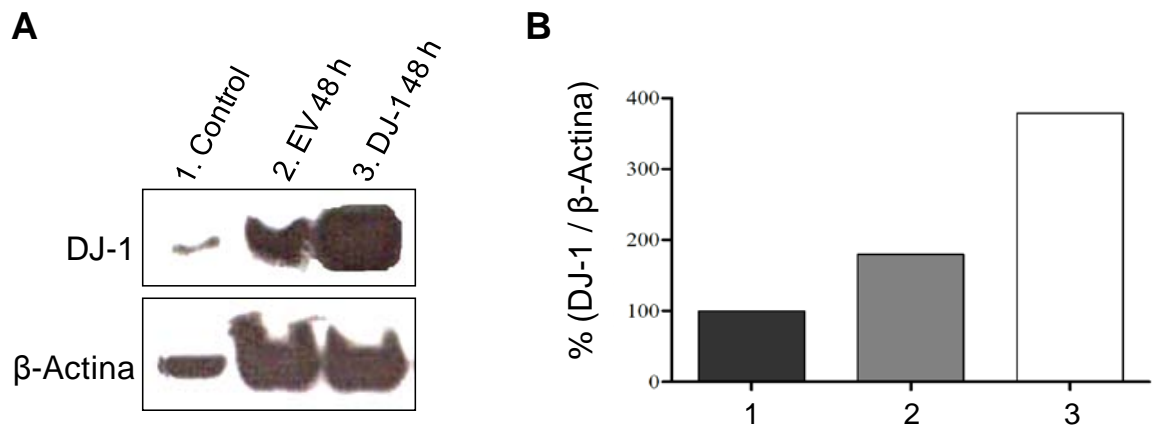


Figura 6.3 Sobreexpresión de DJ-1. A. Análisis por WB de la sobreexpresión de DJ-1. Las células transfectadas con el vector pCDNA3.1 DJ-1-WT (DJ-1) sobreexpresan la proteína DJ-1, y esta sobreexpresión permanece hasta las 48 h. **B. Análisis por densitometría de la sobreexpresión de la proteína DJ-1 en células transfectadas con el vector DJ-1 a las 48 h pos-transfección.** Las células transfectadas con el vector DJ-1 presentan aproximadamente el doble de la expresión de la proteína DJ-1 respecto a las células transfectadas con el EV. El protocolo de transfección por el cual se obtuvieron estos resultados de transfección se encuentra en el Anexo 5.1

6.2.3 Efecto de las neurotoxinas rotenona, 6-OHDA y C2-ceramida en células CAD que sobreexpresan la proteína DJ-1

Los resultados que se presentan a continuación fueron realizados en células transfectadas siguiendo el protocolo indicado en el Anexo 5.1. Bajo estas condiciones de transfección las células transfectadas con el vector DJ-1 presentan el doble de la expresión de DJ-1 respecto a las transfectadas con el EV (Figura 6.3). Además, para el análisis de estos resultados se tienen en cuenta los resultados obtenidos en los anteriores capítulos, por esta razón en esta sesión el análisis básicamente se realiza comparando el efecto de las diferentes neurotoxinas entre células transfectadas que sobreexpresan la proteína DJ-1 (DJ-1) y células transfectadas que no sobreexpresan la proteína DJ-1 (EV).

6.2.3.1. Análisis por western blot del efecto de la rotenona 500 nM 24 h sobre la activación de AKT por fosforilación de la Ser 473 en células CAD que sobreexpresan la proteína DJ-1

El efecto de la rotenona a una dosis de 500 nM por 24 h causa una leve disminución en la activación de AKT por fosforilación del residuo Ser 473 en células CAD control (Figura 5.2, 5.3 y 6.4). Los resultados de la transfección son consistentes con lo anteriormente descrito (6.2.2), el proceso de transfección tiene como efecto el aumento de p-AKT (Ser 473) (Figura 6.4 B, barra roja) y las células transfectadas con DJ-1 respecto a las transfectadas con el EV presentan mayor nivel de p-AKT (Ser 473) en relación a t-AKT (Figura 6.4 B, barra verde).

La exposición de rotenona 500 nM por 24 h en células que sobreexpresan DJ-1 humana silvestre no exhibe diferencias en los niveles de p-AKT (Ser 473) respecto a las células transfectadas con el EV, igualmente, en el análisis por densitometría no existe una diferencia significativa entre estos dos tratamientos (Figura 6.4 A y B). La transfección con DJ-1 incrementa la fosforilación de AKT y el tratamiento con rotenona disminuye este incremento en dicha fosforilación a niveles similares a los de las células transfectadas con el vector vacío (EV).

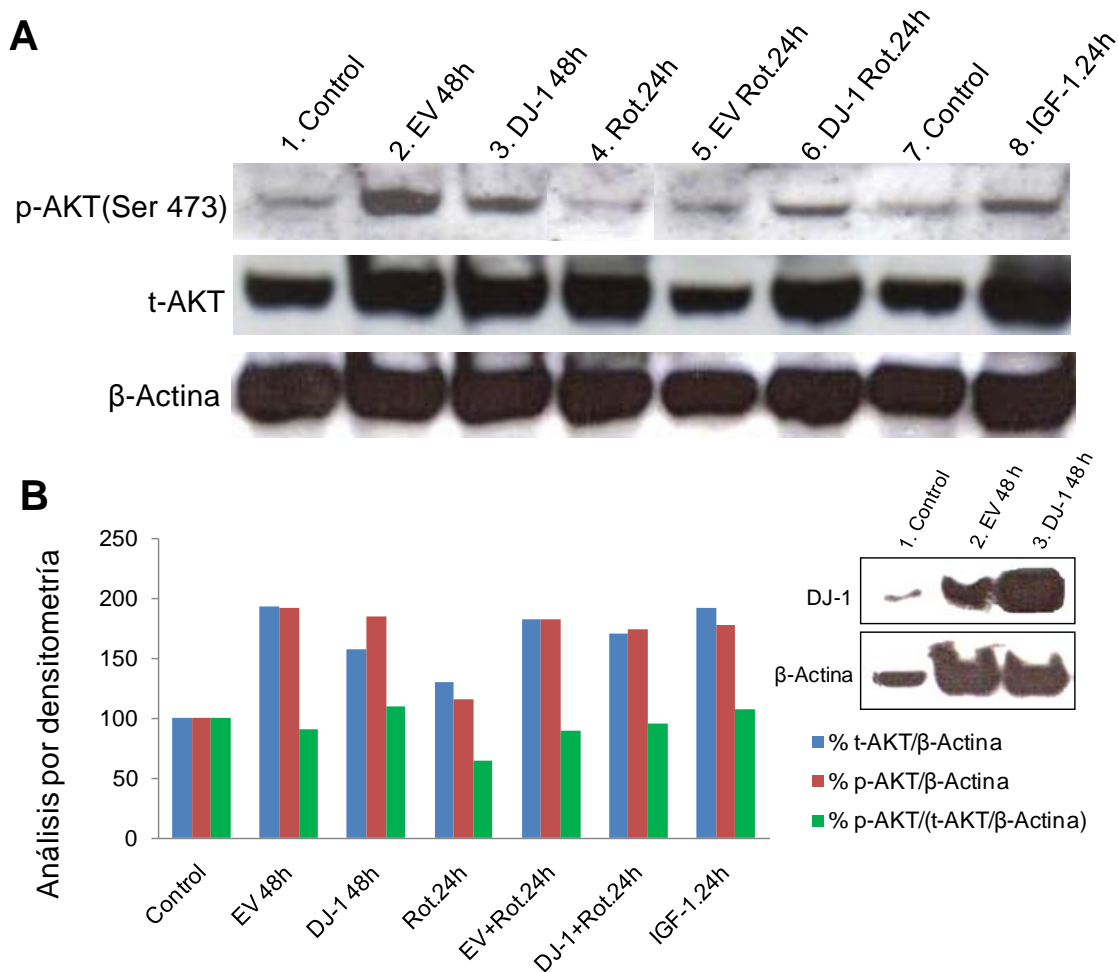


Figura 6.4 Efecto de la rotenona 500 nM 24 h sobre la vía PI3K/AKT en células CAD transfectadas con DJ-1-WT humano. **A.** Análisis por WB del efecto de la rotenona (500 nM 24h) sobre la vía PI3K/AKT en células CAD transfectadas con los vectores DJ 1-WT humano y EV. WB representativo de tres experimentos independientes. **B.** Análisis por densitometría del % p-AKT/t-AKT en células CAD transfectadas con los vectores DJ 1-WT humano y EV y tratadas con rotenona (500 nM 24h), se uso como control de carga β-actina. Este experimento corrobora los resultados encontrados anteriormente, aumento de p-AKT por el proceso de transfección (carriles 1, 2 y 3, barra roja). No se presentan diferencias en los niveles de p-AKT, entre los tratamientos con rotenona 500 nM por 24 h en células transfectadas con DJ-1 en relación a las células transfectadas con el vector vacío (EV). (La descripción de los tratamientos se encuentra en el Anexo 6, Figura A. 6.1 y Tabla A. 6.4).

6.2.3.2. Análisis por western blot del efecto de 6-OHDA 100 μ M- 6 h sobre la activación de AKT por fosforilación de la Ser 473 en células CAD que sobreexpresan la proteína DJ-1

Las células CAD tratadas con 6-OHDA (100 μ M por 6 h) presentan inhibición drástica de la vía PI3K/AKT (Figura 5.5). Las células CAD transfectadas con DJ-1 y EV y tratadas con 6-OHDA igualmente presentan inhibición de esta vía, se evidencia una leve disminución de t-AKT y una drástica disminución de p-AKT (Figura 6.5). Los resultados de células transfectadas con DJ-1 sugieren que la sobreexpresión de DJ-1 evita la de-fosforilación de AKT en el residuo Ser 473, aproximadamente en un 10 %, respecto a las células transfectadas con el vector vacío (Figura 6.5). Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de la proteína DJ-1, la cual aumenta el nivel basal de p-AKT, puede contribuir al mantenimiento de la fosforilación de AKT en el residuo Ser 473 frente al efecto inhibitorio de la 6-OHDA.

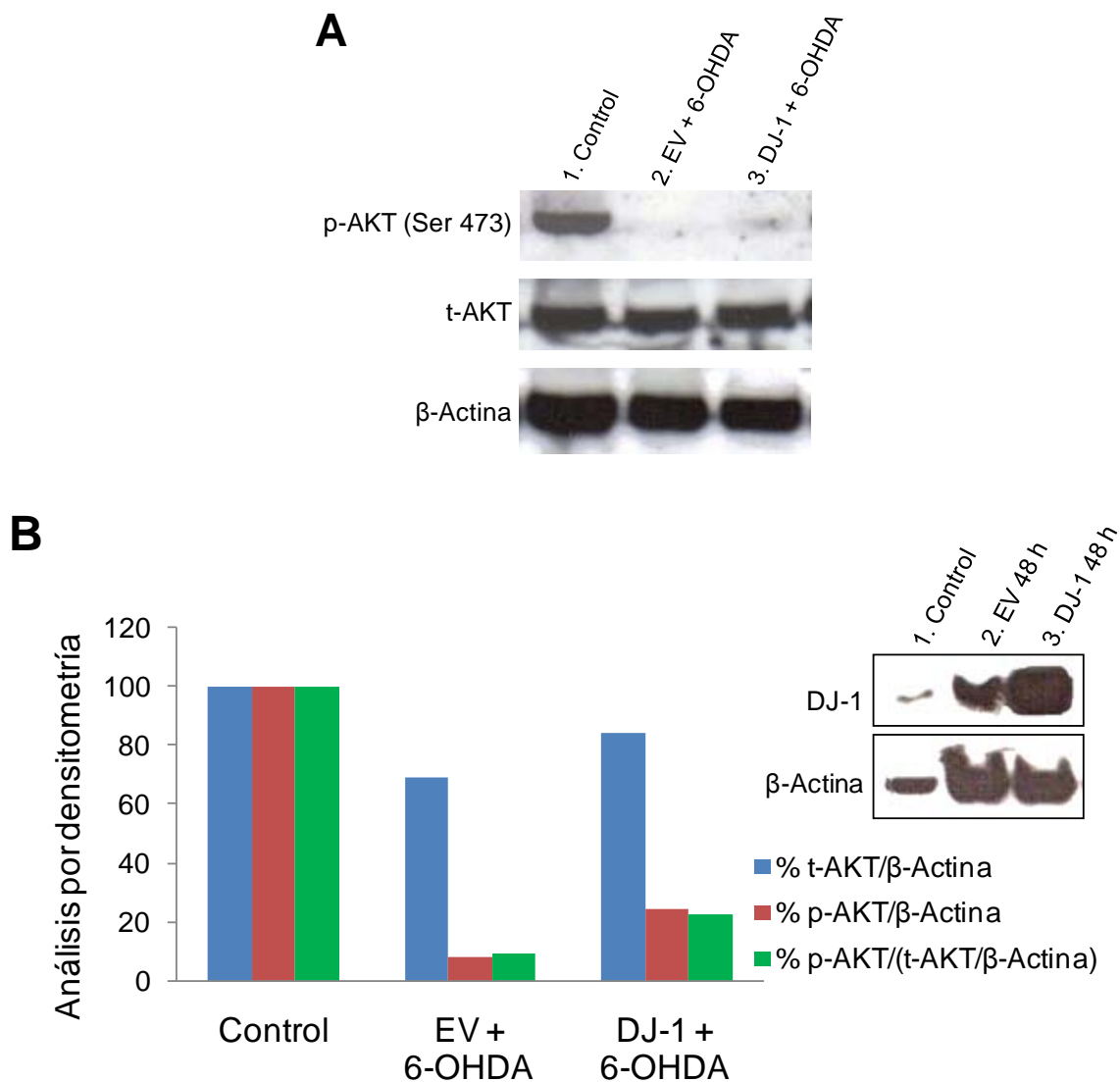


Figura 6.5 Efecto de la 6-OHDA sobre la vía PI3K/AKT en células CAD transfectadas con DJ-1 humana silvestre. **A.** Análisis por WB del efecto de la 6-OHDA (100 μ M, 6 h) sobre la vía PI3K/AKT en células CAD transfectadas con los vectores DJ 1-WT humano y EV. WB representativo de tres experimentos independientes. **B.** Análisis por densitometría de % p-AKT/t-AKT en células transfectadas con los vectores DJ-1-WT y EV y tratadas con 6-OHDA (100 μ M, 6 h), se uso como control de carga β -Actina. Nótese que la 6-OHDA induce inhibición drástica de la fosforilación de AKT (Ser 473) en células transfectadas con DJ-1 y EV en relación al control, igualmente la 6-OHDA induce disminución de t-AKT pero en un nivel casi imperceptible. Sin embargo, la sobreexpresión de la proteína DJ-1 evita en un porcentaje aproximadamente del 10 % la de-fosforilación de AKT en el residuo Ser 473, inducida por el tratamiento con 6-OHDA. (La descripción de los tratamientos se encuentra en el Anexo 6, Figura A. 6.1 y Tabla A. 6.4).

6.2.3.3. Análisis por western blot del efecto de C2-ceramida 25 μ M - 6 h sobre la activación de AKT por fosforilación de la Ser 473 en células CAD que sobreexpresan la proteína DJ-1

La C2-ceramida al igual que la 6-OHDA induce una rápida y drástica inhibición de la vía PI3K/AKT en células CAD (Figura 5.2 y 5.5). El efecto de esta neurotoxina en células transfectadas con el EV es similar, pero en células transfectadas con DJ-1 la disminución de p-AKT no es tan evidente (Figura 6.6).

Las células que sobreexpresan DJ-1 y que conjuntamente son tratadas con C2-ceramida (25 μ M por 6 h) evidencian que DJ-1 favorece el mantenimiento de la fosforilación de AKT en el residuo 473, respecto a las células transfectadas con el EV y tratadas con C2-ceramida. Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de DJ-1 contribuye aproximadamente a un 20 % a evitar la de-fosforilación de AKT causada por la C2-ceramida en células CAD (Figura 6.6). Una observación interesante es que las células que sobreexpresan DJ-1 y son tratadas con C2-ceramida presentan un incremento significativo de los niveles de t-AKT en relación a las células transfectadas con DJ-1 y no tratadas con C2-ceramida (Figura 6.4).

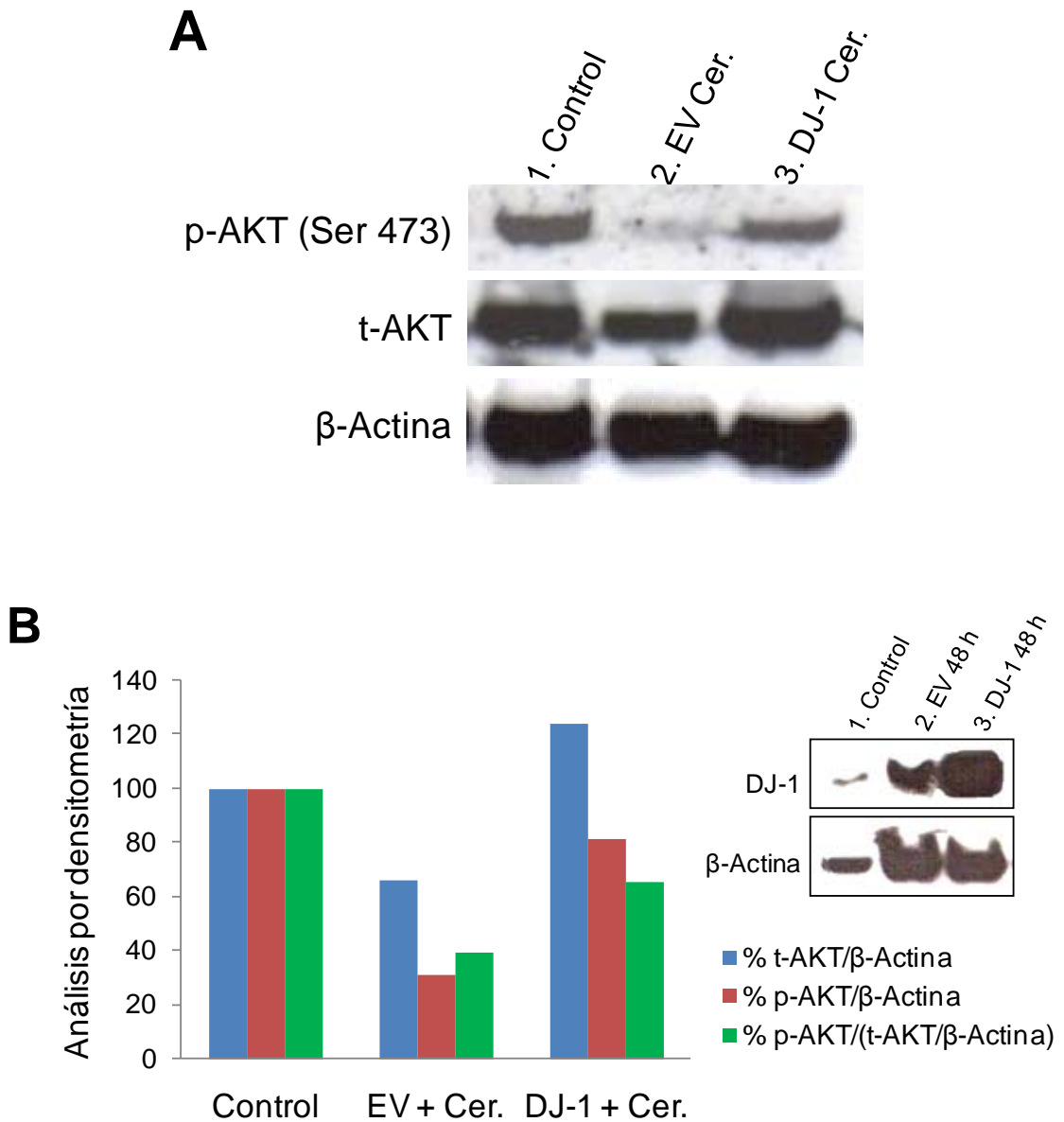


Figura 6.6 Efecto de la C2-ceramida sobre la vía PI3K/AKT en células CAD transfectadas con DJ-1 humana silvestre. **A.** Análisis por WB del efecto de la C2-ceramida (25 μ M, 6 h) sobre la vía PI3K/AKT en células CAD transfectadas con los vectores DJ 1-WT humano y EV. **B.** Análisis por densitometría del % p-AKT/t-AKT en células transfectadas con los vectores DJ-1-WT y EV y tratadas con C2-ceramida (25 μ M, 6 h), se uso como control de carga β -Actina. La C2-ceramida causa de-fosforilación de AKT (Ser 473) de forma drástica en las células transfectadas con el EV, pero la sobreexpresión de DJ-1 evita la de-fosforilación de AKT en el residuo 473, es decir que DJ-1 contribuye a mantener la fosforilación de AKT en el residuo 473 frente a la acción de esta neurotoxina en un porcentaje aproximado del 20% en relación a las células que no sobreexpresan DJ-1 (células transfectadas con el EV). (La descripción de los tratamientos se encuentra en el Anexo 6, Figura A. 6.1 y Tabla A. 6.4).

6.3 Discusión

La proteína DJ-1 es ubicuamente expresada en una variedad de órganos y tiene mínima expresión en tejido adiposo, tiene amplio rango de expresión en cerebro y se encuentra en SN (Shang *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005; Kotaria *et al.*, 2005). Las células CAD son derivadas de mesencéfalo de ratón por tal razón era de esperar que estas expresaran la proteína DJ-1. Según nuestros resultados las células CAD presentan menor nivel de expresión de DJ-1 en comparación con las células SH-5YSY y la muestra de cerebro de ratón y no existe expresión diferencial entre las células CAD diferenciadas y no diferenciadas. La transfección con el vector DJ-1-WT tuvo como efecto la sobreexpresión de la proteína DJ-1, aproximadamente tres veces más que las células CAD sin transfectar.

En nuestros resultados evidenciamos que el proceso de transfección causa aumento del % p-AKT/t-AKT respecto a las células no transfectadas. Se ha descrito que la vía PI3K/AKT es mediadora de varias señales celulares (Zhou *et al.*, 1998; Huang y Reichardt, 2001) y en nuestro caso el proceso de transfección por lipofección induce la activación de esta vía, por esta razón es importante tener un control de la transfección, el cual se realizó con el vector vacío (EV) de tal forma que las comparaciones entre los tratamientos realizados con las diferentes neurotoxinas tienen en cuenta las alteraciones basales por parte del proceso de transfección.

También, encontramos que el nivel de DJ-1 incrementa en las células CAD transfectadas con el EV en relación a las células control (células no transfectadas) (Figura 6.2), esto se puede explicar porque la proteína DJ-1 es anti-oxidante y dependiendo del contexto celular es regulada (Zhong *et al.*, 2005). Además, Lev y colaboradores (2008, 2009) demostraron que DJ-1 es regulado al alta frente al estrés oxidativo y que esta regulación es mediada por la vía de las MAPKs, se postula que la sobreexpresión de DJ-1 incrementa la resistencia celular frente a la producción de ROS. El proceso de transfección celular por lipofección es un insulto celular, es un evento que altera por sí mismo la maquinaria celular independientemente del vector, de tal forma que la transfección fue capaz de inducir cambios en la expresión de DJ-1.

Además, los resultados obtenidos en este estudio corroboran la sobreexpresión de DJ-1 con mayor activación de AKT por fosforilación del residuo serina 473 (Figura 6.2). Estudios previos han demostrado en *D. melanogaster* que la proteína DJ-1 es un regulador positivo de la vía PI3K/AKT al regular negativamente a PTEN (Yang *et al.*, 2005, 2006; Kim *et al.*, 2005). Recientemente, Kim y colaboradores (2009), publicaron que DJ-1 se une directamente a PTEN e inhibe su actividad fosfatasa, esto puede explicar el incremento de p-AKT (Ser 473) en las células CAD que sobreexpresan la proteína DJ-1-WT humana en comparación con las células transfectadas con el EV.

Es por esta razón que el análisis del efecto de la sobreexpresión de DJ-1 en relación a la vía PI3K/AKT frente a rotenona, 6-OHDA y C2-ceramida se realizó comparando las células transfectadas con el EV Vs. células transfectadas con el vector de DJ-1-WT humano.

En el capítulo V se determinó por la técnica de WB el efecto de las neurotoxinas en relación a la vía PI3K/AKT, los resultados obtenidos fueron que la muerte inducida por 6-OHDA (100 μ M, 6 h) y C2-ceramida (25 μ M, 6 h) en células CAD diferenciadas depende de la inhibición de la vía PI3K/AKT. Mientras, que las células tratadas con rotenona a diferentes dosis por 6 h presentan niveles similares de p-AKT (Ser 473) a las células control, y sólo se evidencia una leve disminución de p-AKT cuando las células se exponen por 24 h. Teniendo este conocimiento previo se comprobó el efecto de estas neurotoxinas pero ahora en células CAD que sobreexpresan la proteína DJ-1.

Acerca del efecto de las neurotoxinas en células CAD que sobreexpresan la proteína DJ-1, para el caso de 6-OHDA y C2-ceramida se ha demostrado que su efecto es dependiente de la inhibición de la vía PI3K/AKT (Li *et al.*, 2008; Arboleda *et al.*, 2005, 2007, 2009; Rodríguez, 2006), y según nuestros resultados (Figura 6.4 y 6.5) la sobreexpresión de DJ-1 potencia la vía PI3K/AKT, potenciación que le permite a esta vía que las células adquieran un nivel más alto de p-AKT (Ser 473) y por consecuencia las células que sobreexpresan DJ-1 y conjuntamente son tratadas con 6-OHDA y C2-ceramida presentan menor pérdida de p-AKT (Ser 473). Una de las estrategias sugeridas en neuroprotección es el mantenimiento de un nivel basal más alto de p-AKT como mecanismo protector de muerte y existen varios reportes que soportan esta estrategia de neuroprotección (Zhou y Freed 2005; Xiromerisiou *et al.*, 2008; Dagda *et al.*, 2009).

En el caso de la rotenona no se presentan diferencias en el nivel de p-AKT (Ser 473) entre células que sobreexpresan la proteína DJ-1 y células que no, ya que DJ-1 favorece la vía PI3K/AKT y el efecto de la rotenona no es claro que sea por inhibición de esta vía, sino como anteriormente se menciono existen otras vías que pueden estar interactuando como el caso de las MAPKs.

El estrés oxidativo y la inhibición del complejo I mitocondrial son procesos importantes en EP de tipo esporádico, el cual representa el 95% de los casos de EP, DJ-1 podría jugar un papel interesante frente al efecto de herbicidas, fungicidas e insecticidas, los cuales inhiben el complejo I mitocondrial y contribuyen al desarrollo de EP (Chung *et al.*, 2003), por lo tanto se ha propuesto que la oxidación de DJ-1 promueve su localización en mitocondria (Canet –Avilés *et al.*, 2004; Blackinton *et al.*, 2005) y podría ser usado como blanco terapéutico.

En el caso del IGF-1 se ha propuesto como factor neuroprotector de enfermedades neurodegenerativas. En general los factores de crecimiento son capaces de potenciar la vía de supervivencia PI3K/AKT por medio de receptores

de la familia Trk (Huang y Reichardt, 2003). Las células CAD tratadas con 100 ng/mL de IGF-1 por 24 h presentan un mayor nivel de fosforilación de la proteína AKT en el residuo Ser 473 respecto a las células control (Figura 6.3). Igualmente se observa que aumenta el nivel de expresión de t-AKT, ya que existe evidencia que el IGF-1 puede actuar como regulador de la transcripción de AKT, inhibiendo por fosforilación factores de transcripción de la familia FOXO, un ejemplo es el factor de transcripción FKHL1 (Schwab *et al.*, 2005).

Estos resultados son de gran importancia ya que permiten entender la relación de las neurotoxinas, rotenona, 6-OHDA y C2-ceramida, con la vía PI3K/AKT y como la proteína DJ-1 puede modular esta relación. Con los resultados de este proyecto se podría sugerir la importancia del gen DJ-1 en la supervivencia de poblaciones neuronales específicas, como lo es el caso de las neuronas dopaminérgicas afectadas selectivamente en EP. Un aspecto a favor del uso de DJ-1 como blanco terapéutico es que actúa en dos vías de protección una es en la regulación de la función y dinámica mitocondrial (Zhang *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2005; Dodson y Guo, 2007) y la otra es la potenciación de la vía de supervivencia neuronal PI3K/AKT (Yang *et al.*, 2005, Kim *et al.*, 2005, 2009; Timmons *et al.*, 2009).

Timmons y colaboradores (2009) demostraron que los niveles de t-AKT y p-AKT (Ser 473) se encuentran disminuidos en cerebros de pacientes con EP. Además, demostraron por microscopia de fluorescencia que AKT se expresa en mayor nivel en las neuronas positivas para TH y que en pacientes con EP existe una marcada pérdida de t-AKT y p-AKT (Ser 473) en las neuronas positivas para TH. Timmons y colaboradores (2009) proponen a AKT como posible blanco terapéutico en el tratamiento para EP en estado tardío, ya que aumentar el nivel basal de t-AKT y p-AKT es un mecanismo protector específico en neuronas dopaminérgicas.

Para este estudio es necesario determinar la contribución de la proteína DJ-1 en la actividad mitocondrial y supervivencia de las células CAD frente a la acción neurotóxica y establecer si existe una correlación directa entre la potenciación de p-AKT, la función mitocondrial y la supervivencia neuronal, ya que el propósito de los blancos terapéuticos en EP buscan evitar la muerte progresiva de las neuronas dopaminérgicas y existen varios estudios *in vitro* e *in vivo* que relacionan la potenciación de la vía PI3K/AKT con mecanismos de neuroprotección en neuronas dopaminérgicas (Chen *et al.*, 2008; Lim *et al.*, 2008; Nair *et al.*, 2008; Ries *et al.*, 2006; Sagi *et al.*, 2007; Weinreb *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2008)

Aunque, en la actualidad existen varios aspectos desconocidos acerca de la muerte neuronal que se presenta en EP estos resultados preliminares pueden dar continuidad a la resolución de nuevas preguntas que surgen para poder entender la complejidad de los mecanismos fisiopatológicos que involucran la muerte selectiva de neuronas dopaminérgicas en EP y la búsqueda de blancos terapéuticos.

CAPÍTULO VII.
CONCLUSIONES, RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS

CAPÍTULO VII. CONCLUSIONES, RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS

7.1 Conclusiones

1. La línea neuronal murina CAD, por tratarse de neuronas catecolaminérgicas, constituye un adecuado modelo celular para el entendimiento de las bases moleculares relacionadas con la EP.
2. Las neurotoxinas C2-Ceramida, 6-OHDA y rotenona inducen muerte en las células CAD con un efecto dosis-tiempo dependiente.
3. La dosis letal 50 de rotenona en células CAD es de 5µM y 500 n M por 6 y 24 h, respectivamente y la dosis letal 50 de 6-OHDA en células CAD es de 100 y 50 µM por 6 y 24 h, respectivamente.
4. La disminución de la actividad mitocondrial MTT es un evento temprano al tratamiento con rotenona, mientras que la liberación de LDH por pérdida de la integridad membranal es un evento tardío.
5. La muerte neuronal inducida por rotenona y 6-OHDA en células CAD diferenciadas de acuerdo a nuestras observaciones microscópicas se podría sugerir que es de tipo apoptótico.
6. La muerte neuronal causada por las neurotoxinas, C2-Ceramida, rotenona y 6-OHDA está asociada a la inhibición de la vía de supervivencia neuronal PI3K/AKT.
7. El pre- tratamiento con IGF-1 100 ng/mL aumenta el nivel basal de p-AKT, lo cual tiene como efecto la disminución de la acción de de-fosforilación de AKT en el residuo serina 473 inducido por la C2-ceramida, 6-OHDA y rotenona (500 nM, 24 h) y podría sugerirse como agente neuroprotector en EP.
8. Se establecieron las condiciones de transfección de las células CAD para la sobreexpresión de DJ-1-WT humano con alta eficiencia y replicabilidad.
9. La sobreexpresión de la proteína DJ-1-WT humana en células CAD contribuye a potenciar la vía de supervivencia neuronal PI3K/AKT aumentando los niveles basales de fosforilación de la proteína AKT en el residuo serina 473.
10. La sobreexpresión de la proteína DJ-1-WT humana disminuyó el efecto inhibitorio de la 6-OHDA (100 µM, 6h) y de la C2-Ceramida (25 µM, 6 h) sobre la fosforilación de AKT en el residuo serina 473.

11. La potenciación de la vía de supervivencia neuronal PI3K/AKT y el aumento de los niveles basales de p-AKT, ya sea por pre-tratamiento con IGF-1 o sobreexpresión de DJ-1, pueden ser un adecuado blanco terapéutico en enfermedades neurodegenerativas como en el caso de la EP donde se presenta muerte selectiva de neuronas dopaminérgicas.

7.2 Recomendaciones y Perspectivas

1. Analizar el efecto de la regulación a la baja de la proteína DJ-1 frente a la acción de las neurotoxinas, rotenona, 6-OHDA y C2 ceramida, una posibilidad es trabajar con constructos lentivirales con el propósito de tener células transfectadas de forma permanente.
2. Establecer la relación entre la sobreexpresión o regulación a la baja de la proteína DJ-1 con la viabilidad celular en un contexto neurotóxico.
3. Realizar pruebas de viabilidad celular adicionales que permitan establecer el tipo de muerte celular inducido por las neurotoxinas, por ejemplo citometría de flujo con Anexina V y Ioduro de propidio.
4. Analizar por western blot vías alternas o paralelas a la vía PI3K/AKT en un contexto neurotóxico, por ejemplo la vía de las MAPKs y/o mTOR (autofagia).
5. Determinar la regulación de genes o proteínas pro y/o anti-apoptóticas en células CAD transfectadas con DJ-1-WT humano en un contexto neurotóxico, ya sea por RT-PCR o western blot.
6. Realizar análisis de western blot a partir de extractos de proteínas obtenidos por centrifugación diferencial para poder comparar los niveles de DJ-1 citoplasmático Vs. mitocondrial con el propósito de determinar si los diferentes insultos neurotóxicos (rotenona, 6-OHDA y C2-eramida) pueden regular la localización intracelular de DJ-1. Ya que se ha descrito que DJ-1 es capaz de trascolcarse a mitocondria y ejercer un papel protector.
7. Estudiar la colocalización por microscopia de fluorescencia o confocal de la proteína DJ-1 con mitocondrias sanas y dañadas para establecer su relación en un contexto neurotóxico.
8. Abordar el análisis del efecto neuroprotector del IGF-1 en modelos *in vivo* de EP usando la 6-OHDA o la rotenona para inducir la lesión nigro-estriatal y determinar el posible efecto del IGF-1 como blanco terapéutico en EP.

7.3 Modelo sugerido

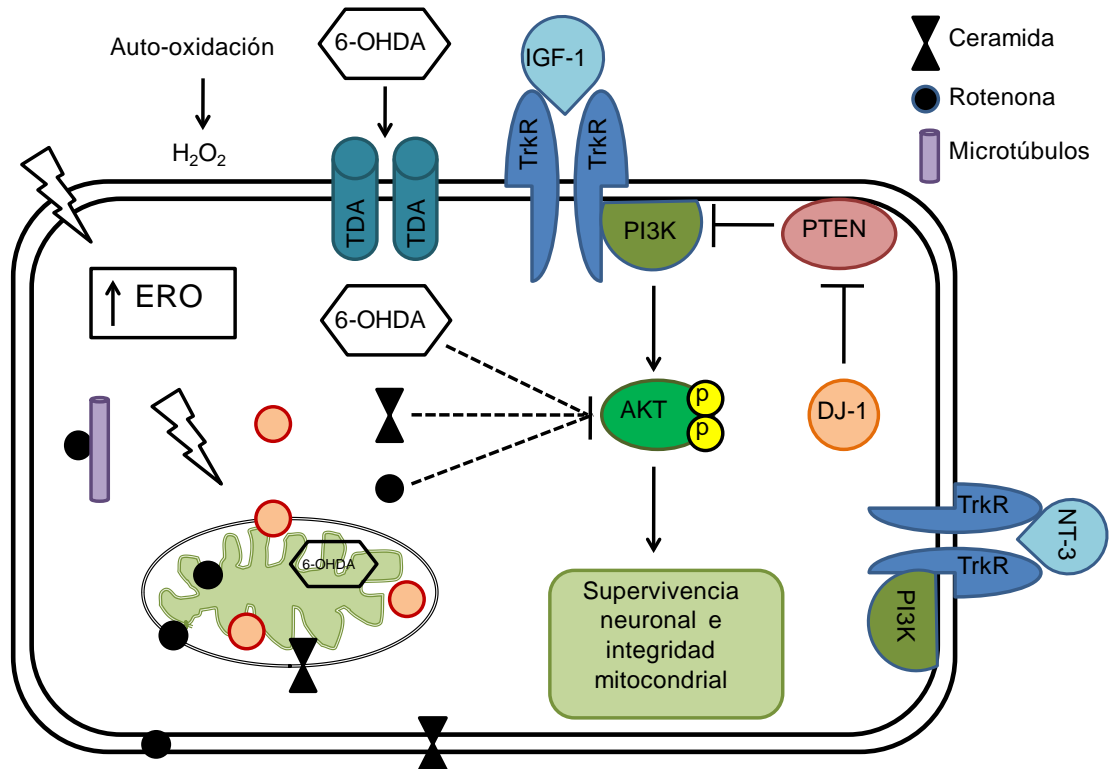
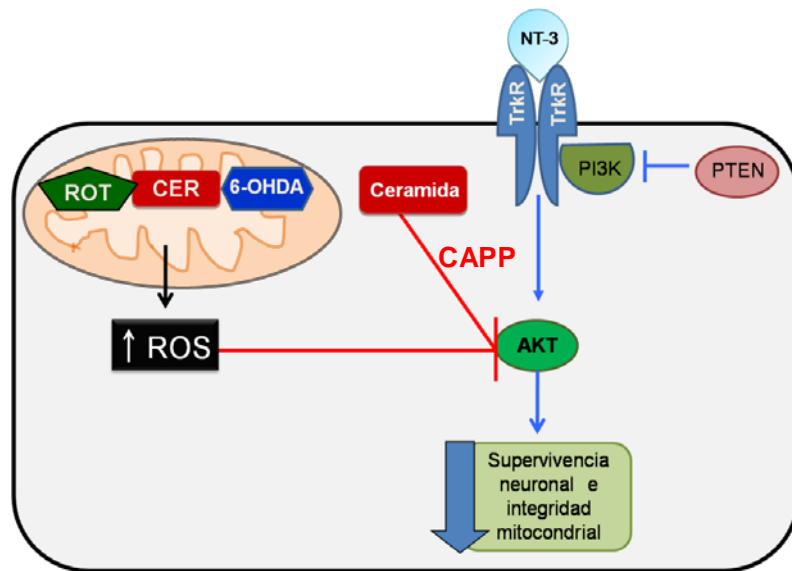


Figura 7.1 Modelo propuesto de la relación de DJ-1 con la vía de supervivencia neuronal PI3K/AKT en un contexto neurotóxico. Las neurotoxinas rotenona, 6-OHDA y C2-ceramida causan muerte celular inhibiendo la actividad mitocondrial y la vía de supervivencia neuronal PI3K/AKT. Por otra parte, la vía PI3K/AKT es potenciada por factores tróficos como la NT-3 y el factor de crecimiento IGF-1. También, la sobreexpresión de la proteína DJ-1 es capaz de potenciar esta vía porque se une a PTEN y no permite su actividad fosfatasa (actividad inhibitoria de PI3K). El modelo propone que la activación de la vía PI3K/AKT contribuye a la supervivencia neuronal e integridad mitocondrial. Mientras que las neurotoxinas inhiben la actividad mitocondrial y la vía PI3K/AKT (aún no se conoce cómo se da esta inhibición). Además, DJ-1 se ha propuesto como una proteína multifuncional y se le ha atribuido su función neuroprotectora por su actividad antioxidativa y relación con mitocondrias dañadas, de tal forma que DJ-1 podría estar contribuyendo a la protección neuronal desde varias rutas: 1. potenciación de la vía PI3K/AKT, 2. actividad antioxidativa y 3. función mitocondrial; pero aun no son claros los mecanismos moleculares que subyacen a estos eventos.

Neurotoxicidad



Efecto de Sobreexpresión de DJ-1

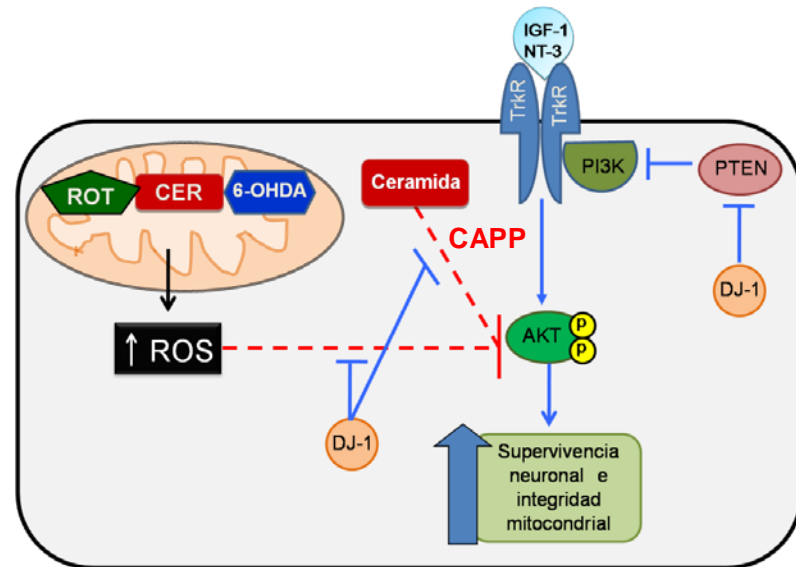


Figura 7.2 Modelo propuesto en el contexto de neurotoxicidad por C2-ceramida, 6-OHDA y rotenona y sobreexpresión de DJ-1.

REFERENCIAS

1. Abe K, Matsuki N. (2000). Measurement of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction activity and lactate dehydrogenase release using MTT. *Neurosci Res.* 38:325-329.
2. Abou-Sleiman PM, Healy DG, Quinn N, Lees AJ, Wood NW. (2003). The role of pathogenic DJ-1 mutations in Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 54:283-286.
3. Abou-Sleiman PM, Healy DG, Wood NW. (2004). Causes of Parkinson's disease: genetics of DJ-1. *Cell Tissue Res.* 318:185-188.
4. Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P, Hemmings BA. (1996). Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J.* 15:6541-6551.
5. Aleyasin H, Rousseaux MW, Marcogliese PC, Hewitt SJ, Irrcher I, Joselin AP, Parsanejad M, Kim RH, Rizzu P, Callaghan SM, Slack RS, Mak TW, Park DS. (2010). DJ-1 protects the nigrostriatal axis from the neurotoxin MPTP by modulation of the AKT pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107:3186-3191.
6. Arboleda G, Huang TJ, Waters C, Verkhatsky A, Fernyhough P, Gibson RM. (2007). Insulin-like growth factor-1-dependent maintenance of neuronal metabolism through the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway is inhibited by C2-ceramide in CAD cells. *Eur J Neurosci.* 25:3030-3038.
7. Arboleda G, Morales LC, Benítez B, Arboleda H. (2009) Regulation of ceramide-induced neuronal death: cell metabolism meets neurodegeneration. *Brain Res Rev.* 59:333-346.
8. Arboleda G, Waters C, Gibson RM. (2005). Metabolic Activity: A Novel Indicator of Neuronal Survival in the Murine Dopaminergic Cell Line CAD. *J Mol Neurosci.* 27:65-78.

9. Auluck PK, Chan HY, Trojanowski JQ, Lee VM, Bonini NM. (2002). Chaperone suppression of alpha-synuclein toxicity in a *Drosophila* model for Parkinson's disease. *Science* 295:865-868.
10. Avila-Gómez IC, Vélez-Pardo C, Jiménez-Del-Río M. (2010). Effects of insulin-like growth factor-1 on rotenone-induced apoptosis in human lymphocyte cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 106:53-61.
11. Bagga V, Dunnett SB, Fricker-Gates RA. (2008). Ascorbic acid increases the number of dopamine neurons in vitro and in transplants to the 6-OHDA-lesioned rat brain. *Cell Transplant.* 17:763-773.
12. Bandopadhyay R, Kingsbury AE, Cookson MR, Reid AR, Evans IM, Hope AD, Pittman AM, Lashley T, Canet-Aviles R, Miller DW, McLendon C, Strand C, Leonard AJ, Abou-Sleiman PM, Healy DG, Ariga H, Wood NW, de Silva R, Revesz T, Hardy JA, Lees AJ. (2004). The expression of DJ-1 (PARK7) in normal human CNS and idiopathic Parkinson's disease. *Brain* 127:420-430.
13. Bandopadhyay R, Miller DW, Kingsbury AE, Jowett TP, Kaleem MM, Pittman AM, de Silva R, Cookson MR, Lees AJ. (2005). Development, characterisation and epitope mapping of novel monoclonal antibodies for DJ-1 (PARK7) protein. *Neurosci Lett.* 383:225-230.
14. Baraban SC, Lothman EW, Lee A, Guyenet PG. (1995). Kappa opioid receptor-mediated suppression of voltage-activated potassium current in a catecholaminergic neuronal cell line. *J Pharmacol Exp Ther.* 273:927-933.
15. Barksdale KA, Bijur GN. (2009). The basal flux of Akt in the mitochondria is mediated by heat shock protein 90. *J Neurochem.* 108:1289-1299.
16. Batelli S, Albani D, Rametta R, Polito L, Prato F, Pesaresi M, Negro A, Forloni G. (2008). DJ-1 modulates alpha-synuclein aggregation state in a cellular model of oxidative stress: relevance for Parkinson's disease and involvement of HSP70. *PLoS One.* 3:e1884.
17. Baulac S, LaVoie MJ, Strahle J, Schlossmacher MG, Xia W. (2004). Dimerization of Parkinson's disease-causing DJ-1 and formation of high molecular weight complexes in human brain. *Mol Cell Neurosci.* 27:236-246.

18. Betarbet R, Canet-Avilés RM, Sherer TB, Mastroberardino PG, McLendon C, Kim JH, Lund S, Na HM, Taylor G, Bence NF, Kopito R, Seo BB, Yagi T, Yagi A, Klinefelter G, Cookson MR, Greenamyre JT. (2006). Intersecting pathways to neurodegeneration in Parkinson's disease: effects of the pesticide rotenone on DJ-1, alpha-synuclein, and the ubiquitin-proteasome system. *Neurobiol Dis.* 22:404-420.
19. Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT. (2000). Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci.* 3:1301-1306.
20. Bibel M, Barde YA. (2000). Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes Dev.* 14:2919-2937.
21. Blackinton J, Ahmad R, Miller DW, van der Brug MP, Canet-Avilés RM, Hague SM, Kaleem M, Cookson MR. (2005). Effects of DJ-1 mutations and polymorphisms on protein stability and subcellular localization. *Brain Res Mol Brain Res.* 134:76-83.
22. Blum D, Torch S, Lambeng N, Nissou M, Benabid AL, Sadoul R, Verna JM. (2001). Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol.* 65:135-172.
23. Blum D, Wu Y, Nissou MF, Arnaud S, Alim-Louis-Benabid, Verna JM. (1997). p53 and Bax activation in 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in PC12 cells. *Brain Res.* 751:139-142.
24. Bonifati V, Oostra BA, Heutink P. (2004). Linking DJ-1 to neurodegeneration offers novel insights for understanding the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Mol Med.* 82:163-174.
25. Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, Schaap O, Breedveld GJ, Krieger E, Dekker MC, Squitieri F, Ibanez P, Joosse M, van Dongen JW, Vanacore N, van Swieten JC, Brice A, Meo G, van Duijn CM, Oostra BA, Heutink P. (2003). Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science* 299:256-259.
26. Borland MK, Trimmer PA, Rubinstein JD, Keeney PM, Mohanakumar K, Liu L, Bennett JP Jr. (2008). Chronic, low-dose rotenone reproduces Lewy neurites found in early stages of Parkinson's disease, reduces mitochondrial

movement and slowly kills differentiated SH-SY5Y neural cells. *Mol Neurodegener.* 29;3:21.

27. Bové J, Prou D, Perier C, Przedborski S. (2005). Toxin-induced models of Parkinson's disease. *NeuroRx.* 2:484-494.
28. Bami-Cherrier K, Valjent E, Garcia M, Pages C, Hipskind RA, Caboche J. (2002). Dopamine induces a PI3-kinase-independent activation of AKT in striatal neurons: a new route to cAMP response element-binding protein phosphorylation. *J Neurosci.* 22:8911-8921.
29. Bras J, Singleton A, Cookson MR, Hardy J. (2008). Emerging pathways in genetic Parkinson's disease: Potential role of ceramide metabolism in Lewy body disease. *FEBS J.* 275:5767-5773.
30. Brunet A, Datta SR, Greenberg ME. (2001). Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-AKT signaling pathway. *Curr Opin Neurobiol.* 11:297-305.
31. Bunday RA, Iredale PA, Kendall DA. (1997). Corticosteroid modulation of signal transduction in the CATH.a cell line. *J Neurochem.* 68:362-369.
32. Buttke TM, McCubrey JA, Owen TC. (1993). Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay to measure viability and proliferation of lymphokine-dependent cell lines. *J Immunol Methods.* 157:233-240.
33. Canet-Avilés RM, Wilson MA, Miller DW, Ahmad R, McLendon C, Bandyopadhyay S, Baptista MJ, Ringe D, Petsko GA, Cookson MR. (2004). The Parkinson's disease protein DJ-1 is neuroprotective due to cysteine-sulfinic acid-driven mitochondrial localization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:9103-108.
34. Cannon JR, Tapias V, Na HM, Honick AS, Drolet RE, Greenamyre JT. (2009). A highly reproducible rotenone model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 34:279-290.
35. Chan WS, Durairajan SS, Lu JH, Wang Y, Xie LX, Kum WF, Koo I, Yung KK, Li M. (2009). Neuroprotective effects of Astragaloside IV in 6-hydroxydopamine-treated primary nigral cell culture. *Neurochem Int.* 55:414-422.

36. Chao MV. (2003). Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci.* 4:299-309.
37. Chartier-Harlin MC, Kachergus J, Roumier C, Mouroux V, Douay X, Lincoln S, Levecque C, Larvor L, Andrieux J, Hulihan M, Waucquier N, Defebvre L, Amouyel P, Farrer M, Destee A. (2004). Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet* 364:1167-1169.
38. Chen G, Bower KA, Ma C, Fang S, Thiele CJ, Luo J. (2004). Glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3beta) mediates 6-hydroxydopamine-induced neuronal death. *FASEB J.* 18:1162-1164.
39. Chen L, Cagniard B, Mathews T, Jones S, Koh HC, Ding Y, Carvey PM, Ling Z, Kang UJ, Zhuang X. (2005). Age-dependent motor deficits and dopaminergic dysfunction in DJ-1 null mice. *J Biol Chem.* 280:21418-21426.
40. Chen L, Jin J, Davis J, Zhou Y, Wang Y, Liu J, Lockhart PJ, Zhang J. (2007). Oligomeric alpha-synuclein inhibits tubulin polymerization. *Biochem Biophys Res Commun.* 356:548-553.
41. Chen S, Zhang X, Yang D, Du Y, Li L, Li X, Ming M, Le W. (2008). D2/D3 receptor agonist ropinirole protects dopaminergic cell line against rotenone-induced apoptosis through inhibition of caspase- and JNK-dependent pathways. *FEBS Lett.* 582:603-610.
42. Choi WS, Yoon SY, Oh TH, Choi EJ, O'Malley KL, Oh YJ. (1999). Two distinct mechanisms are involved in 6-hydroxydopamine- and MPP+-induced dopaminergic neuronal cell death: role of caspases, ROS, and JNK. *J Neurosci Res.* 57:86-94.
43. Chun HS, Gibson GE, DeGiorgio LA, Zhang H, Kidd VJ, Son JH. (2001). Dopaminergic cell death induced by MPP(+), oxidant and specific neurotoxicants shares the common molecular mechanism. *J Neurochem.* 76:1010-1021.
44. Chung KK, Dawson VL, Dawson TM. (2003). New insights into Parkinson's disease. *J Neurol.* 250 Suppl 3:III15-24.
45. Chung WG, Miranda CL, Maier CS. (2007). Epigallocatechin gallate (EGCG) potentiates the cytotoxicity of rotenone in neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Brain Res.* 1176:133-142.

46. Clark LN, Afridi S, Mejia-Santana H, Harris J, Louis ED, Cote LJ, Andrews H, Singleton A, Wavrant De-Vrieze F, Hardy J, Mayeux R, Fahn S, Waters C, Ford B, Frucht S, Ottman R, Marder K. (2004). Analysis of an early-onset Parkinson's disease cohort for DJ-1 mutations. *Mov Disord.* 19:796-800.
47. Clarkson ED, Edwards-Prasad J, Freed CR, Prasad KN. (1999). Immortalized dopamine neurons: A model to study neurotoxicity and neuroprotection. *Proc Soc Exp Biol Med.* 222:157-163.
48. Cookson MR. (2004). Molecules that cause or prevent Parkinson's disease. *PLoS Biol.* 2:e401.
49. Costa C, Belcastro V, Tozzi A, Di Filippo M, Tantucci M, Siliquini S, Autuori A, Picconi B, Spillantini MG, Fedele E, Pittaluga A, Raiteri M, Calabresi P. (2008). Electrophysiology and pharmacology of striatal neuronal dysfunction induced by mitochondrial complex I inhibition. *J Neurosci.* 28:8040-8052.
50. Crossthwaite AJ, Hasan S, Williams RJ. (2002). Hydrogen peroxide-mediated phosphorylation of ERK1/2, Akt/PKB and JNK in cortical neurones: dependence on Ca(2+) and PI3-kinase. *J Neurochem.* 80:24-35.
51. Cully M, You H, Levine AJ, Mak TW. (2006). Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 6:184-192.
52. Da Costa CA, Ancolio K, Checler F. (2000). Wild-type but not Parkinson's disease-related ala-53 --> Thr mutant alpha -synuclein protects neuronal cells from apoptotic stimuli. *J Biol Chem.* 275:24065-24069.
53. Dagda RK, Zhu J, Chu CT. (2009). Mitochondrial kinases in Parkinson's disease: converging insights from neurotoxin and genetic models. *Mitochondrion* 9:289-298.
54. Darios F, Corti O, Lücking CB, Hampe C, Muriel MP, Abbas N, Gu WJ, Hirsch EC, Rooney T, Ruberg M, Brice A. (2003). Parkin prevents mitochondrial swelling and cytochrome c release in mitochondria-dependent cell death. *Hum Mol Genet.* 12:517-526.
55. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME. (1997). AKT phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91:231-241.

56. Decker T, Lohmann-Matthes ML. (1988). A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *J. Immunol. Meth.* 115, 61–69.
57. Deng H, Jankovic J, Guo Y, Xie W, Le W. (2005). Small interfering RNA targeting the PINK1 induces apoptosis in dopaminergic cells SH-SY5Y. *Biochem Biophys Res Commun.* 337:1133-1138.
58. Di Fonzo A, Dekker MC, Montagna P, Baruzzi A, Yonova EH, Correia Guedes L, Szczerbinska A, Zhao T, Dubbel-Hulsman LO, Wouters CH, de Graaff E, Oyen WJ, Simons EJ, Breedveld GJ, Oostra BA, Horstink MW, Bonifati V. (2009). FBXO7 mutations cause autosomal recessive, early-onset parkinsonian-pyramidal syndrome. *Neurology.* 72:240-245.
59. Di PM, Cocco T, Lorusso M. (2000). Ceramide interaction with the respiratory chain of heart mitochondria. *Biochemistry* 39:6660–6668.
60. Ding YM, Jaumotte JD, Signore AP, Zigmond MJ. (2004). Effects of 6-hydroxydopamine on primary cultures of substantia nigra: specific damage to dopamine neurons and the impact of glial cell line-derived neurotrophic factor. *J Neurochem.* 89:776-787.
61. Dodel RC, Du Y, Bales KR, Ling Z, Carvey PM, Paul SM. (1999). Caspase-3-like proteases and 6-hydroxydopamine induced neuronal cell death. *Brain Res Mol Brain Res.* 64:141-148.
62. Dodson MW, Guo M. (2007). Pink1, Parkin, DJ-1 and mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Curr Opin Neurobiol.* 17:331-337.
63. Dudek H, Datta SR, Franke TF, Birnbaum MJ, Yao R, Cooper GM, Segal RA, Kaplan DR, Greenberg ME. (1997). Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase AKT. *Science* 275:661-665.
64. Fernagut PO, Chesselet MF. (2004). Alpha-synuclein and transgenic mouse models. *Neurobiol Dis.* 17:123-130.
65. Fiskum G, Starkov A, Polster BM, Chinopoulos C. (2003). Mitochondrial mechanisms of neural cell death and neuroprotective interventions in Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci.* 991:111-119.

66. Forno LS. Neuropathology of Parkinson's disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 55:259-272.
67. France-Lanord V, Brugg B, Michel PP, Agid Y, Ruberg M. (1997). Mitochondrial free radical signal in ceramide-dependent apoptosis: a putative mechanism for neuronal death in Parkinson's disease. *J Neurochem.* 69:1612-1621.
68. Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC. (1997). PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell* 88:435-437.
69. Galindo MF, Jordán J, González-García C, Ceña V. (2003). Chromaffin cell death induced by 6-hydroxydopamine is independent of mitochondrial swelling and caspase activation. *J Neurochem.* 84:1066-1073.
70. Gao N, Zhang Z, Jiang BH, Shi X. (2003). Role of PI3K/AKT/mTOR signaling in the cell cycle progression of human prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commu.* 310:1124-1132.
71. Gao X, Martin E, Liu Y, Mayhew G, Vance J, Scott W. (2009). Genome-wide linkage screen in familial parkinson disease identifies loci on chromosomes 3 and 18. *The American Journal of Human Genetics* 84:499–504.
72. Garner CD, Nachtman JP. (1989). Manganese catalyzed auto-oxidation of dopamine to 6-hydroxydopamine in vitro. *Chem Biol Interact.* 69:345-351.
73. Gasser T, Müller-Myhsok B, Wszolek ZK, Oehlmann R, Calne DB, Bonifati V, Bereznaï B, Fabrizio E, Vieregge P, Horstmann RD. Gasser T, Müller-Myhsok B, Wszolek ZK, Oehlmann R, Calne DB, Bonifati V, Bereznaï B, Fabrizio E, Vieregge P, Horstmann RD. (1998). A susceptibility locus for Parkinson's disease maps to chromosome 2p13. *Nat Genet.* 18:262-265.
74. Gee P, Davison AJ. (1989). Intermediates in the aerobic autoxidation of 6-hydroxydopamine: relative importance under different reaction conditions. *Free Radic Biol Med.* 6:271-284.
75. Gelb DJ, Oliver E, Gilman S. (1999). Diagnostic criteria for Parkinson disease. *Arch Neurol.* 56:33-39.
76. Giasson BI. (2004). Mitochondrial injury: a hot spot for parkinsonism and Parkinson's disease?. *Sci Aging Knowledge Environ.* 2004:pe42.

77. Glinka Y, Tipton KF, Youdim MB. (1996). Nature of inhibition of mitochondrial respiratory complex I by 6-Hydroxydopamine. *J Neurochem.* 66:2004-2010.
78. Glinka Y, Tipton KF, Youdim MB. (1998). Mechanism of inhibition of mitochondrial respiratory complex I by 6-hydroxydopamine and its prevention by desferrioxamine. *Eur J Pharmacol.* 351:121-129.
79. Glinka YY, Gassen M, Youdim MB. (1997). Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity. *J Neural Transm Suppl.* 50:55-66.
80. Glinka YY, Youdim MB. (1995). Inhibition of mitochondrial complexes I and IV by 6-hydroxydopamine. *Eur J Pharmacol.* 292:329-332.
81. Goldberg MS, Pisani A, Haburcak M, Vortherms TA, Kitada T, Costa C, Tong Y, Martella G, Tschertter A, Martins A, Bernardi G, Roth BL, Pothos EN, Calabresi P, Shen J. (2005). Nigrostriatal dopaminergic deficits and hypokinesia caused by inactivation of the familial Parkinsonism-linked gene DJ-1. *Neuron.* 45:489-496.
82. Görner K, Holtorf E, Odoy S, Nuscher B, Yamamoto A, Regula JT, Beyer K, Haass C, Kahle PJ. (2004). Differential effects of Parkinson's disease-associated mutations on stability and folding of DJ-1. *J Biol Chem.* 279:6943-6951.
83. Graham DG, Tiffany SM, Bell WR Jr, Gutknecht WF. (1978). Autoxidation versus covalent binding of quinones as the mechanism of toxicity of dopamine, 6-hydroxydopamine, and related compounds toward C1300 neuroblastoma cells in vitro. *Mol Pharmacol.* 14:644-653.
84. Greenamyre JT, Hastings TG. (2004). Biomedicine. Parkinson's divergent causes, convergent mechanisms. *Science* 304:1120-1122.
85. Gregory A, Westaway SK, Holm IE, Kotzbauer PT, Hogarth P, Sonek S, Coryell JC, Nguyen TM, Nardocci N, Zorzi G, Rodriguez D, Desguerre I, Bertini E, Simonati A, Levinson B, Dias C, Barbot C, Carrilho I, Santos M, Malik I, Gitschier J, Hayflick SJ. (2008). Neurodegeneration associated with genetic defects in phospholipase A(2). *Neurology.* 71:1402-1409.

86. Grünblatt E, Mandel S, Youdim MB. (2000). Neuroprotective strategies in Parkinson's disease using the models of 6-hydroxydopamine and MPTP. *Ann N Y Acad Sci.* 899:262-273.
87. Gudz TI, Tserng KY, Hoppel CL. (1997). Direct inhibition of mitochondrial respiratory chain complex III by cell-permeable ceramide. *J. Biol. Chem.* 272:24154–24158.
88. Ha KS, Kim KM, Kwon YG, Bai SK, Nam WD, Yoo YM, Kim PK, Chung HT, Billiar TR, Kim YM. (2003). Nitric oxide prevents 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in PC12 cells through cGMP-dependent PI3 kinase/Akt activation. *FASEB J.* 17:1036-1047.
89. Haeberlein SL. (2004). Mitochondrial function in apoptotic neuronal cell death. *Neurochem Res.* 29:521-530.
90. Hague S, Rogaeva E, Hernandez D, Gulick C, Singleton A, Hanson M, Johnson J, Weiser R, Gallardo M, Ravina B, Gwinn-Hardy K, Crawley A, St George-Hyslop PH, Lang AE, Heutink P, Bonifati V, Hardy J, Singleton A. (2003). Early-onset Parkinson's disease caused by a compound heterozygous DJ-1 mutation. *Ann Neurol.* 54:271-274.
91. Halvorsen EM, Dennis J, Keeney P, Sturgill TW, Tuttle JB, Bennett JB, Jr. (2002). Methylpyridinium (MPP(+))- and nerve growth factor-induced changes in pro- and anti-apoptotic signaling pathways in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Brain Res.* 952:98-110.
92. Han BS, Hong HS, Choi WS, Markelonis GJ, Oh TH, Oh YJ. (2003). Caspase-dependent and -independent cell death pathways in primary cultures of mesencephalic dopaminergic neurons after neurotoxin treatment. *J Neurosci.* 23:5069-5078.
93. Hardy J, Cookson MR. (2003). Singleton A. Genes and parkinsonism. *Lancet Neurol.* 2:221-228.
94. Hashemi SH, Li JY, Faigle R, Dahlstrom A. (2003). Adrenergic differentiation and SSR(2(a)) receptor expression in CAD-cells cultured in serum-free medium. *Neurochem Int.* 42:9-17.
95. Hashimoto M, Bar-On P, Ho G, Takenouchi T, Rockenstein E, Crews L, Masliah E. (2004). Beta-synuclein regulates AKT activity in neuronal cells. A

possible mechanism for neuroprotection in Parkinson's disease. *J Biol Chem.* 279:23622-23629.

96. Hayashi T, Ishimori C, Takahashi-Niki K, Taira T, Kim YC, Maita H, Maita C, Ariga H, Iguchi-Ariga SM. (2009). DJ-1 binds to mitochondrial complex I and maintains its activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 390:667-672.
97. He Y, Lee T, Leong SK. (2000). 6-Hydroxydopamine induced apoptosis of dopaminergic cells in the rat substantia nigra. *Brain Res.* 858:163-166.
98. Hedrich K, Djarmati A, Schäfer N, Hering R, Wellenbrock C, Weiss PH, Hilker R, Vieregge P, Ozelius LJ, Heutink P, Bonifati V, Schwinger E, Lang AE, Noth J, Bressman SB, Pramstaller PP, Riess O, Klein C. (2004). DJ-1 (PARK7) mutations are less frequent than Parkin (PARK2) mutations in early-onset Parkinson disease. *Neurology* 62:389-394.
99. Hedrich K, Schäfer N, Hering R, Hagenah J, Lanthaler AJ, Schwinger E, Kramer PL, Ozelius LJ, Bressman SB, Abbruzzese G, Martinelli P, Kostic V, Pramstaller PP, Vieregge P, Riess O, Klein C. (2004). The R98Q variation in DJ-1 represents a rare polymorphism. *Ann Neurol.* 55:145-146.
100. Hengartner MO. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407:770-776.
101. Hering R, Strauss KM, Tao X, Bauer A, Voitalla D, Mietz EM, Petrovic S, Bauer P, Schaible W, Müller T, Schöls L, Klein C, Berg D, Meyer PT, Schulz JB, Wollnik B, Tong L, Krüger R, Riess O. (2004). Novel homozygous p.E64D mutation in DJ-1 in early onset Parkinson disease (PARK7). *Hum Mutat.* 24:321-329.
102. Heutink P. (2006). PINK-1 and DJ-1 new genes for autosomal recessive Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl.* 70:215-219.
103. Hirsch E, Costa C, Ciruolo E. (2007). Phosphoinositide 3-kinases as a common platform for multi-hormone signaling. *J Endocrinol.* 194:243-256.
104. Hod Y, Pentylala SN, Whyard TC, El-Maghrabi MR. (1999). Identification and characterization of a novel protein that regulates RNA-protein interaction. *J Cell Biochem.* 72:435-444.

105. Honbou K, Suzuki NN, Horiuchi M, Niki T, Taira T, Ariga H, Inagaki F. (2003). The crystal structure of DJ-1, a protein related to male fertility and Parkinson's disease. *J Biol Chem.* 278:31380-31384.
106. Honig LS, Rosenberg RN. (2000). Apoptosis and neurologic disease. *Am J. Med.* 108:317–330.
107. Horton CD, Qi Y, Chikaraishi D, Wang JK. (2001). Neurotrophin-3 mediates the autocrine survival of the catecholaminergic CAD CNS neuronal cell line. *J Neurochem.* 76:201-209.
108. Huai Q, Sun Y, Wang H, Chin LS, Li L, Robinson H, Ke H. (2003). Crystal structure of DJ-1/RS and implication on familial Parkinson's disease. *FEBS Lett.* 549:171-175.
109. Huang EJ, Reichardt LF. (2001). Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci.* 24:677-736.
110. Huang EJ, Reichardt LF. (2003). Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 72:609-642.
111. Huerta C, Sánchez-Ferrero E, Coto, E, Blázquez M, Ribacoba R, Guisasola L, Salvador L, Alvarez V. (2007). No association between Parkinson's disease and three polymorphisms in the eNOS, nNOS, and iNOS genes. *Neuroscience letters* 413:202-205.
112. Hulleman JD, Mirzaei H, Guigard E, Taylor KL, Ray SS, Kay CM, Regnier FE, Rochet JC. (2007). Destabilization of DJ-1 by familial substitution and oxidative modifications: implications for Parkinson's disease. *Biochemistry* 46:5776-5789.
113. Hwang YP, Kim HG, Han EH, Jeong HG. (2008). Metallothionein-III protects against 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress by increasing expression of heme oxygenase-1 in a PI3K and ERK/Nrf2-dependent manner. *Toxicol Appl Pharmacol.* 231:318-327.
114. Ibanez P, Bonnet AM, Debarges B, Lohmann E, Tison F, Pollak P, Agid Y, Durr A, Brice A. (2004). Causal relation between alpha-synuclein gene duplication and familial Parkinson's disease. *Lancet* 364:1169-1171.

115. Iwatsubo T, Ito G, Takatori S, Hannno Y, Kuwahara T. (2005). Pathogenesis of Parkinson's disease: implications from familial Parkinson's disease *Rinsho Shinkeigaku*. 45:899-901.
116. Jellinger KA. (1999). Post mortem studies in Parkinson's disease-is it possible to detect brain areas for specific symptoms? *J Neural Transm Suppl* 56:1-29.
117. Jellinger KA. (2001). The pathology of Parkinson's disease. *Adv Neurol*. 86:55-72.
118. Jellinger KA. (2002). Recent developments in the pathology of Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl*. 62:347-376.
119. Jenner P, Olanow CW. (1998). Understanding cell death in Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 44(3 Suppl 1):S72-84.
120. Jenner P, Olanow CW. (2006). The pathogenesis of cell death in Parkinson's disease. *Neurology* 66:S24-S36.
121. Jenner P. (1998). Oxidative mechanisms in nigral cell death in Parkinson's disease. *Mov. Disord. Suppl*. 1:24-34.
122. Jenner P. (2003). Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 53 Suppl 3:S26-36; discussion S36-8.:S26-S36.
123. Jia Z, Zhu H, Misra HP, Li Y. (2008). Potent induction of total cellular GSH and NQO1 as well as mitochondrial GSH by 3H-1,2-dithiole-3-thione in SH-SY5Y neuroblastoma cells and primary human neurons: protection against neurocytotoxicity elicited by dopamine, 6-hydroxydopamine, 4-hydroxy-2-nonenal, or hydrogen peroxide. *Brain Res*. 1197:159-169.
124. Jiang Z, Yu PH. (2005). Involvement of extracellular signal-regulated kinases 1/2 and (phosphoinositide 3-kinase)/Akt signal pathways in acquired resistance against neurotoxin of 6-hydroxydopamine in SH-SY5Y cells following cell-cell interaction with astrocytes. *Neuroscience*. 133:405-411.
125. Jin J, Meredith GE, Chen L, Zhou Y, Xu J, Shie FS, Lockhart P, Zhang J. (2005). Quantitative proteomic analysis of mitochondrial proteins: relevance to Lewy body formation and Parkinson's disease. *Brain Res Mol Brain Res*. 134:119-138.

126. Junn E, Taniguchi H, Jeong BS, Zhao X, Ichijo H, Mouradian MM. (2005). Interaction of DJ-1 with Daxx inhibits apoptosis signal-regulating kinase 1 activity and cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:9691-9696.
127. Kääriäinen TM, Piltonen M, Ossola B, Kekki H, Lehtonen S, Nenonen T, Lecklin A, Raasmaja A, Männistö PT. (2008). Lack of robust protective effect of quercetin in two types of 6-hydroxydopamine-induced parkinsonian models in rats and dopaminergic cell cultures. *Brain Res*. 1203:149-159.
128. Kandel ES, Hay N. (1999). The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase AKT/PKB. *Exp Cell Res*. 253:210-229.
129. Kaplan DR, Cooper E. (2001). PI-3 kinase and IP3: partners in NT3-induced synaptic transmission. *Nat Neurosci*. 4:5-7.
130. Kaplan DR, Miller FD. (2000). Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol*. 10:381-391.
131. Keeney PM, Xie J, Capaldi RA, Bennett JP Jr. (2006). Parkinson's disease brain mitochondrial complex I has oxidatively damaged subunits and is functionally impaired and misassembled. *J Neurosci*. 26:5256-5264.
132. Kennedy SG, Kandel ES, Cross TK, Hay N. (1999). AKT/Protein kinase B inhibits cell death by preventing the release of cytochrome c from mitochondria. *Mol Cell Biol*. 19:5800-5810.
133. Kennedy SG, Wagner AJ, Conzen SD, Jordán J, Bellacosa A, Tsichlis PN, Hay N. (1997). The PI 3-kinase/AKT signaling pathway delivers an anti-apoptotic signal. *Genes Dev*. 11:701-713.
134. Kihara T, Shimohama S, Sawada H, Honda K, Nakamizo T, Kanki R et al. (2002). Protective effect of dopamine D2 agonists in cortical neurons via the phosphatidylinositol 3 kinase cascade. *J Neurosci Res*. 70:274-282.
135. Kim HJ, Mun JY, Chun YJ, Choi KH, Kim MY. (2001). Bax-dependent apoptosis induced by ceramide in HL-60 cells. *FEBS Lett*. 505: 264–268.
136. Kim HJ, Park HJ, Park HK, Chung JH. (2009). Tranexamic acid protects against rotenone-induced apoptosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Toxicology* 262:171-174.

137. Kim JM, Lee KH, Jeon YJ, Oh JH, Jeong SY, Song IS, Kim JM, Lee DS, Kim NS. (2006). Identification of genes related to Parkinson's disease using expressed sequence tags. *DNA Res.* 13:275–286.
138. Kim RH, Peters M, Jang Y, Shi W, Pintilie M, Fletcher GC, DeLuca C, Liepa J, Zhou L, Snow B, Binari RC, Manoukian AS, Bray MR, Liu FF, Tsao MS, Mak TW. (2005). DJ-1, a novel regulator of the tumor suppressor PTEN. *Cancer Cell.* 7:263-273.
139. Kim RH, Smith PD, Aleyasin H, Hayley S, Mount MP, Pownall S, Wakeham A, You-Ten AJ, Kalia SK, Horne P, Westaway D, Lozano AM, Anisman H, Park DS, Mak TW. (2005). Hypersensitivity of DJ-1-deficient mice to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:5215-5220.
140. Kim YC, Kitaura H, Taira T, Iguchi-Ariga SM, Ariga H. (2009). Oxidation of DJ-1-dependent cell transformation through direct binding of DJ-1 to PTEN. *Int J Oncol.* 35:1331-1341
141. Kinumi T, Kimata J, Taira T, Ariga H, Niki E. (2004). Cysteine-106 of DJ-1 is the most sensitive cysteine residue to hydrogen peroxidemediated oxidation in vivo in human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 317:722–778.
142. Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, Yokochi M, Mizuno Y, Shimizu N. (1998). Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 392:605-608.
143. Klein C, Lohmann-Hedrich K. (2007). Impact of recent genetic findings in Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol.* 20:453-464
144. Klinefelter GR, Laskey JW, Ferrell J, Suarez JD, Roberts NL. (1997). Discriminant analysis indicates a single sperm protein (SP22) is predictive of fertility following exposure to epididymal toxicants. *J Androl.* 18:139–150.
145. Klucken J, Shin Y, Masliah E, Hyman BT, McLean PJ. (2004). Hsp70 Reduces alpha-Synuclein Aggregation and Toxicity. *J Biol Chem.* 279:25497-25502.

146. Kolesnick RN, Kronke M. (1998). Regulation of ceramide production and apoptosis. *Annu. Rev. Physiol.* 60:643–665.
147. Korzeniewski C, Callewaert, DM. (1983). An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. *J. Immunol. Meth.* 64, 313–320.
148. Kotake Y, Taguchi R, Okuda K, Sekiya Y, Tasaki Y, Hirobe M, Ohta S. (2005). Neuroprotective effect of 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline on cultured rat mesencephalic neurons in the presence or absence of various neurotoxins. *Brain Res.* 1033:143-150.
149. Kotaria N, Hinz U, Zechel S, von Bohlen Und HO. (2005). Localization of DJ-1 protein in the murine brain. *Cell Tissue Res.* 322:503-507.
150. Kramer BC, Goldman AD, Mytilineou C. (1999). Glial cell line derived neurotrophic factor promotes the recovery of dopamine neurons damaged by 6-hydroxydopamine *in vitro*. *Brain Res.* 851:221-227.
151. La Forge FB, Haller HL, Smith LE. (1932). The determination of the structure of rotenone. *Chemical Reviews* 12:181-213
152. Langston JW. (1996). The etiology of Parkinson's disease with emphasis on the MPTP story. *Neurology* 47:S153-S160.
153. Lautier C, Goldwurm S, Dürr A, Giovannone B, Tsiaras WG, Pezzoli G, Brice A, Smith RJ. (2008). Mutations in the GIGYF2 (TNRC15) gene at the PARK11 locus in familial Parkinson disease. *Am J Hum Genet.* 82:822-833.
154. Lazaroff M, Dunlap K, Chikaraishi DM. (1996). A CNS catecholaminergic cell line expresses voltage-gated currents. *J Membr Biol.* 151:279-291.
155. Lazaroff M, Patankar S, Yoon SO, Chikaraishi DM. (1995). The cyclic AMP response element directs tyrosine hydroxylase expression in catecholaminergic central and peripheral nervous system cell lines from transgenic mice. *J Biol Chem.* 270:21579-21589.

156. Lazaroff M, Qi Y, Chikaraishi DM. (1998). Differentiation of a catecholaminergic CNS cell line modifies tyrosine hydroxylase transcriptional regulation. *J Neurochem.* 71:51-59.
157. Le Couteur DG, Muller M, Yang MC, Mellick GD, McLean AJ. (2002). Age-environment and gene-environment interactions in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Rev Environ Health.* 17:51-64.
158. Lee DC, Womble TA, Mason CW, Jackson IM, Lamango NS, Severs WB, Palm DE. (2007). 6-Hydroxydopamine induces cystatin C-mediated cysteine protease suppression and cathepsin D activation. *Neurochem Int.* 50:607-618.
159. Lee HJ, Kim MK, Kim HJ, Kim SU. (2009). Human neural stem cells genetically modified to overexpress Akt1 provide neuroprotection and functional improvement in mouse stroke model. *PLoS One* 4:e5586.
160. Lee SJ, Kim SJ, Kim IK, Ko J, Jeong CS, Kim GH, Park C, Kang SO, Suh PG, Lee HS, Cha SS. (2003). Crystal structures of human DJ-1 and Escherichia coli Hsp31, which share an evolutionarily conserved domain. *J Biol Chem.* 278:44552-44559.
161. Lenaz G, Fato R, Genova ML, Bergamini C, Bianchi C, Biondi A. (2006). Mitochondrial Complex I: structural and functional aspects. *Biochim Biophys Acta.* 1757:1406-1420.
162. Leroy E, Boyer R, Auburger G, Leube B, Ulm G, Mezey E, Harta G, Brownstein MJ, Jonnalagada S, Chernova T, Dehejia A, Lavedan C, Gasser T, Steinbach PJ, Wilkinson KD, Polymeropoulos MH. (1998). The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature* 395:451-452. Lev N, Ickowicz D, Barhum Y, Lev S, Melamed E, Offen D. (2009). DJ-1 protects against dopamine toxicity. *J Neural Transm.* 116:151-160.
163. Lev N, Ickowicz D, Barhum Y, Lev S, Melamed E, Offen D. (2009). DJ-1 protects against dopamine toxicity. *J Neural Transm.* 116:151-160.
164. Lev N, Ickowicz D, Melamed E, Offen D. (2008). Oxidative insults induce DJ-1 upregulation and redistribution: implications for neuroprotection. *Neurotoxicology* 29:397-405.

165. Li B, Dou QP. (2000). Bax degradation by the ubiquitin/proteasome-dependent pathway: involvement in tumor survival and progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:3850-3855.
166. Li Y, Hou LX, Aktiv A, Dahlström A. (2005). Immunohistochemical characterisation of differentiated CAD cells: expression of peptides and chromogranins. *Histochem Cell Biol*. 124:25-33.
167. Li Y, Hou LX, Aktiv A, Dahlström A. (2007). Studies of the central nervous system-derived CAD cell line, a suitable model for intraneuronal transport studies? *J Neurosci Res*. 85:2601-2609.
168. Li YJ, Scott WK, Hedges DJ, Zhang F, Gaskell PC, Nance MA, Watts RL, Hubble JP, Koller WC, Pahwa R, Stern MB, Hiner BC, Jankovic J, Allen FA Jr, Goetz CG, Mastaglia F, Stajich JM, Gibson RA, Middleton LT, Saunders AM, Scott BL, Small GW, Nicodemus KK, Reed AD, Schmechel DE, Welsh-Bohmer KA, Conneally PM, Roses AD, Gilbert JR, Vance JM, Haines JL, Pericak-Vance MA. (2002). Age at onset in two common neurodegenerative diseases is genetically controlled. *Am J Hum Genet*. 70:985-993.
169. Li Z, Hu Y, Zhu Q, Zhu J. (2008). Neurotrophin-3 reduces apoptosis induced by 6-OHDA in PC12 cells through Akt signaling pathway. *Int J Dev Neurosci*. 26:635-640.
170. Lim JH, Kim KM, Kim SW, Hwang O, Choi HJ (2008). Bromocriptine activates NQO1 via Nrf2-PI3K/Akt signaling: novel cytoprotective mechanism against oxidative damage. *Pharmacol Res*. 57:325-331.
171. Liu X, Shibata T, Hisaka S, Osawa T. (2009). Astaxanthin inhibits reactive oxygen species-mediated cellular toxicity in dopaminergic SH-SY5Y cells via mitochondria-targeted protective mechanism. *Brain Res*. 2009 1254:18-27.
172. Liu Y, Peterson DA, Kimura H, Schubert D. (1997). Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *J Neurochem*. 69:581-593.
173. Lotharius J, Dugan LL, O'Malley KL. (1999). Distinct mechanisms underlie neurotoxin-mediated cell death in cultured dopaminergic neurons. *J Neurosci*. 19:1284-1293.

174. Ma SY, Roytta M, Rinne JO, Collan Y, Rinne UK. (1997). Correlation between neuromorphometry in the substantia nigra and clinical features in Parkinson's disease using disector counts. *J Neurol Sci.* 151:83-87.
175. Macedo MG, Anar B, Bronner IF, Cannella M, Squitieri F, Bonifati V, Hoogeveen A, Heutink P, Rizzu P. (2003). The DJ-1 L166P mutant protein associated with early onset Parkinson's disease is unstable and forms higher-order protein complexes. *Hum Mol Genet.* 12:2807-2816.
176. Malagelada C, Jin ZH, Jackson-Lewis V, Przedborski S, Greene. (2010). Rapamycin protects against neuron death in in vitro and in vivo models of Parkinson's disease. *J Neurosci.* 30:1166-1175.
177. Manning-Bog AB, McCormack AL, Purisai MG, Bolin LM, Di Monte DA. (2003). Alpha-synuclein overexpression protects against paraquat-induced neurodegeneration. *J Neurosci.* 23:3095-3099.
178. Marsden VS, O'Connor L, O'Reilly LA, Silke J, Metcalf D, Ekert PG, Huang DC, Cecconi F, Kuida K, Tomaselli KJ, Roy S, Nicholson DW, Vaux DL, Bouillet P, Adams JM, Strasser A. (2002). Apoptosis initiated by Bcl-2-regulated caspase activation independently of the cytochrome c/Apaf-1/caspase-9 apoptosome. *Nature* 419:634-637.
179. Marshall KA, Daniel SE, Cairns N, Jenner P, Halliwell B. (1997). Upregulation of the anti-apoptotic protein Bcl-2 may be an early event in neurodegeneration: studies on Parkinson's and incidental Lewy body disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 240:84-87.
180. Marte BM. (1997). Downward J. PKB/AKT: connecting phosphoinositide 3-kinase to cell survival and beyond. *Trends Biochem Sci.* 22:355-358.
181. Marti MJ, James CJ, Oo TF, Kelly WJ, Burke RE. (1997). Early developmental destruction of terminals in the striatal target induces apoptosis in dopamine neurons of the substantia nigra. *J Neurosci.* 17:2030-2039.
182. Masserano JM, Baker I, Venable D, Gong L, Zullo SJ, Merrill CR, Wyatt RJ. (2000). Dopamine induces cell death, lipid peroxidation and DNA base damage in a catecholaminergic cell line derived from the central nervous system. *Neurotox Res.* 1:171-179.

183. Masserano JM, Gong L, Kulaga H, Baker I, Wyatt RJ. (1996). Dopamine induces apoptotic cell death of a catecholaminergic cell line derived from the central nervous system. *Mol Pharmacol.* 50:1309-1315.
184. Mathias S, Pena LA, Kolesnick RN. (1998). Signal transduction of stress via ceramide. *Biochem. J.* 335:465–480.
185. Mattson MP, Kroemer G. (2003). Mitochondria in cell death: novel targets for neuroprotection and cardioprotection. *Trends Mol Med.* 9:196-205.
186. Mattson MP. (2000). Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 1:120-129.
187. McNaught KS, Olanow CW. (2003). Proteolytic stress: a unifying concept for the etiopathogenesis of Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 53:S73-S84; discussion S84-S86.
188. Meulener MC, Graves CL, Sampathu DM, Armstrong-Gold CE, Bonini NM, Giasson BI. (2005). DJ-1 is present in a large molecular complex in human brain tissue and interacts with alpha-synuclein. *J Neurochem.* 93:1524-1532.
189. Miller DW, Ahmad R, Hague S, Baptista MJ, Canet-Aviles R, McLendon C, Carter DM, Zhu PP, Stadler J, Chandran J, Klinefelter GR, Blackstone C, Cookson MR. (2003). L166P mutant DJ-1, causative for recessive Parkinson's disease, is degraded through the ubiquitin-proteasome system. *J Biol Chem.* 278:36588-36595.
190. Mitsumoto A, Nakagawa Y, Takeuchi A, Okawa K, Iwamatsu A, Takanezawa Y. (2001). Oxidized forms of peroxiredoxins and DJ-1 on two-dimensional gels increased in response to sublethal levels of paraquat. *Free Radic Res.* 35:301–310.
191. Moore DJ, Zhang L, Dawson TM, Dawson VL. (2003). A missense mutation (L166P) in DJ-1, linked to familial Parkinson's disease, confers reduced protein stability and impairs homo-oligomerization. *J Neurochem.* 87:1558-1567.
192. Moore DJ, Zhang L, Troncoso J, Lee MK, Hattori N, Mizuno Y, Dawson TM, Dawson VL. (2005). Association of DJ-1 and parkin mediated

by pathogenic DJ-1 mutations and oxidative stress. *Hum Mol Genet.* 14:71-84.

193. Mosmann T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 65:55-63.
194. Nachlas, MM, Margulies SI, Goldberg JD, Seligman AM. (1960) the determination of lactic dehydrogenase with a tetrazolium salt. *Anal. Biochem.* 1, 317–26.
195. Nagakubo D, Taira T, Kitaura H, Ikeda M, Tamai K, Iguchi-Ariga SM, Ariga H. (1997). DJ-1, a novel oncogene which transforms mouse NIH3T3 cells in cooperation with *ras*. *Biochem Biophys Res Commun.* 231:509-513.
196. Nair VD, Olanow, CW. (2008). Differential modulation of Akt/glycogen synthase kinase-3 β pathway regulates apoptotic and cytoprotective signaling responses. *J Biol Chem.* 283:15469-15478.
197. Nair VD, Sealfon SC. (2003). Agonist-specific transactivation of phosphoinositide 3-kinase signaling pathway mediated by the dopamine D2 receptor. *J Biol Chem.* 278:47053-47061.
198. Nakagomi S, Suzuki Y, Namikawa K, Kiryu-Seo S, Kiyama H. (2003). Expression of the activating transcription factor 3 prevents c-Jun N-terminal kinase-induced neuronal death by promoting heat shock protein 27 expression and AKT activation. *J Neurosci.* 23:5187-5196.
199. Napolitano A, Pezzella A, Prota G. (1999). New reaction pathways of dopamine under oxidative stress conditions: nonenzymatic iron-assisted conversion to norepinephrine and the neurotoxins 6-hydroxydopamine and 6, 7-dihydroxytetrahydroisoquinoline. *Chem Res Toxicol.* 12:1090-1097.
200. Niki T, Takahashi-Niki K, Taira T, Iguchi-Ariga SM, Ariga H. (2003). DJBP: a novel DJ-1-binding protein, negatively regulates the androgen receptor by recruiting histone deacetylase complex, and DJ-1 antagonizes this inhibition by abrogation of this complex. *Mol Cancer Res.* 1:247-261.
201. Nobre HV Jr, Cunha GM, de Vasconcelos LM, Magalhães HI, Oliveira Neto RN, Maia FD, de Moraes MO, Leal LK, Viana GS. (2010). Caffeine and

CSC, adenosine A2A antagonists, offer neuroprotection against 6-OHDA-induced neurotoxicity in rat mesencephalic cells. *Neurochem Int.* 56:51-58.

202. Okada M, Matsumoto K, Niki T, Taira T, Iguchi-Arigo SM, Arigo H. (2002). DJ-1, a target protein for an endocrine disrupter, participates in the fertilization in mice. *Biol Pharm Bull.* 25:853-856.
203. Olanow CW, Tatton WG. (1999). Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Annu Rev Neurosci.* 22:123-144.
204. Olzmann JA, Brown K, Wilkinson KD, Rees HD, Huai Q, Ke H, Levey AI, Li L, Chin LS. (2004). Familial Parkinson's disease-associated L166P mutation disrupts DJ-1 protein folding and function. *J Biol Chem.* 279:8506-8515.
205. Orth M, Schapira AH. (2001). Mitochondria and degenerative disorders. *Am J Med Genet.* 106:27-36.
206. Ossola B, Kääräinen TM, Raasmaja A, Männistö PT. (2008). Time-dependent protective and harmful effects of quercetin on 6-OHDA-induced toxicity in neuronal SH-SY5Y cells. *Toxicology* 250:1-8.
207. Paisán-Ruíz C, Bhatia KP, Li A, Hernandez D, Davis M, Wood NW, Hardy J, Houlden H, Singleton A, Schneider SA. (2009). Characterization of PLA2G6 as a locus for dystonia-parkinsonism. *Ann Neurol.* 65:19-23.
208. Paisán-Ruíz C, Jain S, Evans EW, Gilks WP, Simón J, van der Brug M, López de Munain A, Aparicio S, Gil AM, Khan N, Johnson J, Martinez JR, Nicholl D, Carrera IM, Pena AS, de Silva R, Lees A, Martí-Massó JF, Pérez-Tur J, Wood NW, Singleton AB. (2004). Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron* 44:595-600.
209. Paisán-Ruíz C, Lang AE, Kawarai T, Sato C, Salehi-Rad S, Fisman GK, Al-Khairallah T, St George-Hyslop P, Singleton A, Rogaeva E. (2005). LRRK2 gene in Parkinson disease: mutation analysis and case control association study. *Neurology* 65:664-665.
210. Palumbo A, Napolitano A, Barone P, d'Ischia M. (1999). Nitrite- and peroxide-dependent oxidation pathways of dopamine: 6-nitrodopamine and 6-hydroxydopamine formation as potential contributory mechanisms of

oxidative stress- and nitric oxide-induced neurotoxicity in neuronal degeneration. *Chem Res Toxicol.* 12:1213-1222.

211. Pankratz N, Nichols WC, Uniacke SK, Halter C, Rudolph A, Shults C, Conneally PM, Foroud T; Parkinson Study Group. (2002). Genome screen to identify susceptibility genes for Parkinson disease in a sample without parkin mutations. *Am J Hum Genet.* 71:124-135.
212. Pankratz N, Pauciulo MW, Elsaesser VE, Marek DK, Halter CA, Wojcieszek J, Rudolph A, Shults CW, Foroud T, Nichols WC; Parkinson Study Group - PROGENI Investigators. (2006). Mutations in DJ-1 are rare in familial Parkinson disease. *Neurosci Lett.* 408:209-13.
213. Park J, Kim SY, Cha GH, Lee SB, Kim S, Chung J. (2005). *Drosophila* DJ-1 mutants show oxidative stress-sensitive locomotive dysfunction. *Gene* 361:133-139.
214. Parker WD Jr., Swerdlow RH. (1998). Mitochondrial dysfunction in idiopathic Parkinson disease. *Am J Hum Genet.* 62:758-762.
215. Paulus W, Jellinger K. (1991). The neuropathologic basis of different clinical subgroups of Parkinson's disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 50:743-755.
216. Perier C, Bové J, Wu DC, Dehay B, Choi DK, Jackson-Lewis V, Rathke-Hartlieb S, Bouillet P, Strasser A, Schulz JB, Przedborski S, Vila M. (2007). Two molecular pathways initiate mitochondria-dependent dopaminergic neurodegeneration in experimental Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:8161-8166.
217. Petit A, Kawarai T, Paitel E, Sanjo N, Maj M, Scheid M, Chen F, Gu Y, Hasegawa H, Salehi-Rad S, Wang L, Rogaeva E, Fraser P, Robinson B, St George-Hyslop P, Tandon A. (2005). Wild-type PINK1 prevents basal and induced neuronal apoptosis, a protective effect abrogated by Parkinson disease-related mutations. *J Biol Chem.* 280:34025-34032.
218. Pollanen MS, Dickson DW, Bergeron C. (1993). Pathology and biology of the Lewy body. *J Neuropathol Exp Neurol.* 52:183-191.
219. Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES,

- Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL. (1997). Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276:2045-2047.
220. Pretel J. (2005). Comunicación oral. Simposio internacional de Parkinson. Bogotá – Colombia.
221. Przedborski S, Ischiropoulos H. (2005). Reactive oxygen and nitrogen species: weapons of neuronal destruction in models of Parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal.* 7:685-693.
222. Puttonen KA, Lehtonen S, Lampela P, Männistö PT, Raasmaja A. (2008). Different viabilities and toxicity types after 6-OHDA and Ara-C exposure evaluated by four assays in five cell lines. *Toxicol In Vitro.* 22:182-189.
223. Qi Y, Wang JK, McMillian M, Chikaraishi DM. (1997). Characterization of a CNS cell line, CAD, in which morphological differentiation is initiated by serum deprivation. *J Neurosci.* 17:1217-1225.
224. Quesada A, Lee BY, Micevych PE. (2008). PI3 kinase/Akt activation mediates estrogen and IGF-1 nigral DA neuronal neuroprotection against a unilateral rat model of Parkinson's disease. *Dev Neurobiol.* 68:632-644.
225. Radad K, Gille G, Rausch WD. (2008). Dopaminergic neurons are preferentially sensitive to long-term rotenone toxicity in primary cell culture. *Toxicol In Vitro.* 22:68-74.
226. Radad K, Rausch WD, Gille G. (2006). Rotenone induces cell death in primary dopaminergic culture by increasing ROS production and inhibiting mitochondrial respiration. *Neurochem Int.* 49:379-386.
227. Redman PT, Jefferson BS, Ziegler CB, Mortensen OV, Torres GE, Levitan ES, Aizenman E. (2006). A vital role for voltage-dependent potassium channels in dopamine transporter-mediated 6-hydroxydopamine neurotoxicity. *Neuroscience.* 143:1-6.
228. Ren Y, Liu W, Jiang H, Jiang Q, Feng J. (2005). Selective vulnerability of dopaminergic neurons to microtubule depolymerization. *J Biol Chem.* 280:34105-34112.

229. Richardson JR, Quan Y, Sherer TB, Greenamyre JT, Miller GW. (2005). Paraquat neurotoxicity is distinct from that of MPTP and rotenone. *Toxicol Sci.* 88:193-201.
230. Ries V, Henchcliffe C, Kareva T, Rzhetskaya M, Bland R, During MJ, Kholodilov N, Burke RE. (2006). Oncoprotein Akt/PKB induces trophic effects in murine models of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:18757-18762.
231. Rizzu P, Hinkle DA, Zhukareva V, Bonifati V, Severijnen LA, Martinez D, Ravid R, Kamphorst W, Eberwine JH, Lee VM, Trojanowski JQ, Heutink P. (2004). DJ-1 colocalizes with tau inclusions: a link between Parkinsonism and dementia. *Ann Neurol.* 55:113–118.
232. Rodríguez YM, (2006). Trabajo de Grado: Protección contra la neurotoxicidad inducida por ceramida: Efecto de factores de crecimiento, inhibidores de proteasas y contribución de la vía PI3K/AKT en un modelo neuronal mesencefálico. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Maestría en Biología. Bogotá. (Julio, 2006); p 23-25.
233. Rokudai S, Fujita N, Hashimoto Y, Tsuruo T. (2000). Cleavage and inactivation of antiapoptotic AKT/PKB by caspases during apoptosis. *J Cell Physiol.* 182:290-296.
234. Rosner S, Giladi N, Orr-Urtreger A. (2008). Advances in the genetics of Parkinson's disease. *Acta Pharmacol Sin.* 29:21-34. *Neurology.* 2008 Oct 28;71(18):1402-9. Epub 2008 Sep 17.
235. Ross OA, Soto AI, Vilariño-Güell C, Heckman MG, Diehl NN, Hulihan MM, Aasly JO, Sando S, Gibson JM, Lynch T, Krygowska-Wajs A, Opala G, Barcikowska M, Czyzewski K, Uitti RJ, Wszolek ZK, Farrer MJ. (2008). Genetic variation of Omi/HtrA2 and Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 14:539-543.
236. Sagi Y, Mandel S, Amit T, Youdim MB, Activation of tyrosine kinase receptor signaling pathway by rasagiline facilitates neurorescue and restoration of nigrostriatal dopamine neurons in post-MPTP-induced parkinsonism. *Neurobiol Dis.* 25:35-44.

237. Sai Y, Wu Q, Le W, Ye F, Li Y, Dong Z. (2008). Rotenone-induced PC12 cell toxicity is caused by oxidative stress resulting from altered dopamine metabolism. *Toxicol In Vitro*. 22:1461-1468.
238. Salinas M, Diaz R, Abraham NG, Ruiz de Galarreta CM, Cuadrado A. (2003). Nerve growth factor protects against 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress by increasing expression of heme oxygenase-1 in a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent manner. *J Biol Chem*. 278:13898-13904.
239. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, Vol. 1, 2, 3. Protocol 6, 1.51.
240. Satake W, Nakabayashi Y, Mizuta I, Hirota Y, Ito C, Kubo M, Kawaguchi T, Tsunoda T, Watanabe M, Takeda A, Tomiyama H, Nakashima K, Hasegawa K, Obata F, Yoshikawa T, Kawakami H, Sakoda S, Yamamoto M, Hattori N, Murata M, Nakamura Y, Toda T. (2009). Genome-wide association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson's disease. *Nat Genet*. 41:1303-1307.
241. Sato S, Fujita N, Tsuruo T. (2000). Modulation of AKT kinase activity by binding to Hsp90. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:10832-10837.
242. Schapira AH, Gu M, Taanman JW, Tabrizi SJ, Seaton T, Cleeter M, Cooper JM. (1998). Mitochondria in the etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 44:S89-S98.
243. Scheid MP, Marignani PA, Woodgett JR. (2002). Multiple phosphoinositide 3-kinase-dependent steps in activation of protein kinase B. *Mol Cell Biol*. 22:6247-6260.
244. Schwab TS, Madison BB, Grauman AR, Feldman EL. (2005). Insulin-like growth factor-I induces the phosphorylation and nuclear exclusion of forkhead transcription factors in human neuroblastoma cells. *Apoptosis*. 10:831-840.
245. Shang H, Lang D, Jean-Marc B, Kaelin-Lang A. (2005). Localization of DJ-1 mRNA in the mouse brain. *Neurosci Lett*. 367:273-277.

246. Shendelman S, Jonason A, Martinat C, Leete T, Abeliovich A. (2004). DJ-1 is a redox-dependent molecular chaperone that inhibits alpha-synuclein aggregate formation. *PLoS Biol.* 2:e362.
247. Sherer TB, Betarbet R, Stout AK, Lund S, Baptista M, Panov AV, Cookson MR, Greenamyre JT. (2002). An in vitro model of Parkinson's disease: linking mitochondrial impairment to altered alpha-synuclein metabolism and oxidative damage. *J Neurosci.* 22:7006-7015.
248. Sherer TB, Trimmer PA, Borland K, Parks JK, Bennett JP Jr, Tuttle JB. (2001). Chronic reduction in complex I function alters calcium signaling in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Brain Res.* 891:94-105.
249. Shimoke K, Chiba H. (2001). Nerve growth factor prevents 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced cell death via the AKT pathway by suppressing caspase-3-like activity using PC12 cells: relevance to therapeutical application for Parkinson's disease. *J Neurosci Res.* 63:402-409.
250. Shojaee S, Sina F, Banihosseini SS, Kazemi MH, Kalhor R, Shahidi GA, Fakhrai-Rad H, Ronaghi M, Elahi E. (2008). Genome-wide linkage analysis of a Parkinsonian-pyramidal syndrome pedigree by 500 K SNP arrays. *Am J Hum Genet.* 82:1375-1384.
251. Simón-Sánchez J, Schulte C, Bras JM, Sharma M, Gibbs JR, Berg D, Paisan-Ruiz C, Lichtner P, Scholz SW, Hernandez DG, Krüger R, Federoff M, Klein C, Goate A, Perlmutter J, Bonin M, Nalls MA, Illig T, Gieger C, Houlden H, Steffens M, Okun MS, Racette BA, Cookson MR, Foote KD, Fernandez HH, Traynor BJ, Schreiber S, Arepalli S, Zonozi R, Gwinn K, van der Brug M, Lopez G, Chanock SJ, Schatzkin A, Park Y, Hollenbeck A, Gao J, Huang X, Wood NW, Lorenz D, Deuschl G, Chen H, Riess O, Hardy JA, Singleton AB, Gasser T. (2009). Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease. *Nat Genet.* 41:1308-1312.
252. Siskind LJ, Colombini M. (2000). The lipids C2- and C16-ceramide form large stable channels. Implications for apoptosis. *J Biol Chem.* 275:38640-38644.
253. Siskind LJ, Kolesnick RN, Colombini M. (2006). Ceramide forms channels in mitochondrial outer membranes at physiologically relevant concentrations. *Mitochondrion* 6: 118–125.

254. Smith CS, Wyatt RJ, Masserano JM. (1998). Nitric oxide induces cell death in a catecholaminergic cell line derived from the central nervous system. *Neurosci Lett.* 241:71-74.
255. Soto-Otero R, Mendez-Alvarez E, Hermida-Ameijeiras A, Munoz-Patino AM, Labandeira-Garcia JL. (2000). Autoxidation and neurotoxicity of 6-hydroxydopamine in the presence of some antioxidants: potential implication in relation to the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neurochem.* 74:1605-1612.
256. Stien R. (2005). Shakespeare on Parkinsonism. (Letter) *Mov. Disord.* 20: 768-769.
257. Stoica BA, Movsesyan VA, Lea PM, Faden AI. (2003). Ceramide-induced neuronal apoptosis is associated with dephosphorylation of AKT, BAD, FKHR, GSK-3beta, and induction of the mitochondrial-dependent intrinsic caspase pathway. *Mol Cell Neurosci.* 22:365-382.
258. Strauss KM, Martins LM, Plun-Favreau H, Marx FP, Kautzmann S, Berg D, Gasser T, Wszolek Z, Müller T, Bornemann A, Wolburg H, Downward J, Riess O, Schulz JB, Krüger R.(2005). Loss of function mutations in the gene encoding Omi/HtrA2 in Parkinson's disease. *Hum Mol Genet.* 14:2099-2111.
259. Sun X, Yao H, Douglas RM, Gu XQ, Wang J, Haddad GG. (2010). Insulin/PI3K signaling protects dentate neurons from oxygen-glucose deprivation in organotypic slice cultures. *J Neurochem.* 112:377-388.
260. Suri C, Fung BP, Tischler AS, Chikaraishi DM. (1993). Catecholaminergic cell lines from the brain and adrenal glands of tyrosine hydroxylase-SV40 T antigen transgenic mice. *J Neurosci.* 13:1280-1291.
261. Taira T, Iguchi-Ariga SM, Ariga H. (2004). Co-localization with DJ-1 is essential for the androgen receptor to exert its transcription activity that has been impaired by androgen antagonists. *Biol Pharm Bull.* 27:574-577
262. Taira T, Saito Y, Niki T, Iguchi-Ariga SMM, Takahashi K, Ariga H. (2004). DJ-1 has a role in antioxidative stress to prevent cell death. *EMBO Rep.* 5: 213–218.

263. Takahashi K, Taira T, Niki T, Seino C, Iguchi-Ariga SM, Ariga H. (2001). DJ-1 positively regulates the androgen receptor by impairing the binding of PIAS α to the receptor. *J Biol Chem.* 276:37556-37563.
264. Takahashi-Niki K, Niki T, Taira T, Iguchi-Ariga SM, Ariga H. (2004). Reduced anti-oxidative stress activities of DJ-1 mutants found in Parkinson's disease patients. *Biochem Biophys Res Commun.* 320:389-397.
265. Takata MK, Yamaguchi F, Nakanose K, Watanabe Y, Hatano N, Tsukamoto I, Nagata M, Izumori K, Tokuda M. (2005). Neuroprotective effect of D-psicose on 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in rat pheochromocytoma (PC12) cells. *J Biosci Bioeng.* 100:511-516.
266. Tan EK, Ho P, Tan L, Prakash KM, Zhao Y. (2010). PLA2G6 mutations and Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 67:148.
267. Tan EK, Skipper LM. (2007). Pathogenic mutations in Parkinson disease. *Hum Mutat.* 28:641-653.
268. Tanti JF, Grillo S, Gremeaux T, Coffier PJ, Van Obberghen E, Marchand-Brustel Y. (1997). Potential role of protein kinase B in glucose transporter 4 translocation in adipocytes. *Endocrinology* 138:2005-2010.
269. Tao X, Tong L. (2003). Crystal structure of human DJ-1, a protein associated with early onset Parkinson's disease. *J Biol Chem.* 278:31372-31379
270. Tatton WG, Olanow CW. (1999). Apoptosis in neurodegenerative diseases: the role of mitochondria. *Biochim Biophys Acta.* 1410:195-213.
271. Timmons S, Coakley MF, Moloney AM, O' Neill C. (2009). Akt signal transduction dysfunction in Parkinson's disease. *Neurosci Lett.* 467:30-35.
272. Tirmenstein MA, Hu CX, Scicchitano MS, Narayanan PK, McFarland DC, Thomas HC, Schwartz LW. (2005). Effects of 6-hydroxydopamine on mitochondrial function and glutathione status in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Toxicol In Vitro.* 19:471-479.
273. Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, Muqit MM, Harvey K, Gispert S, Ali Z, Del Turco D, Bentivoglio AR, Healy DG, Albanese A, Nussbaum R, González-Maldonado R, Deller T, Salvi S, Cortelli P,

- WP, Latchman DS, Harvey RJ, Dallapiccola B, Auburger G, Wood NW. (2004). Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science* 304:1158-1160.
274. Ved R, Saha S, Westlund B, Perier C, Burnam L, Sluder A, Hoener M, Rodrigues CM, Alfonso A, Steer C, Liu L, Przedborski S, Wolozin B. (2005). Similar patterns of mitochondrial vulnerability and rescue induced by genetic modification of alpha-synuclein, parkin, and DJ-1 in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem*. 280:42655-42668.
275. Verheij M, Bose R, Lin XH, Yao B, Jarvis WD, Grant S, Birrer MJ, Szabo E, Zon LI, Kyriakis JM, Haimovitz-Friedman A, Fuks Z, Kolesnick RN. (1996). Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis. *Nature*. 380:75-79.
276. Vila M, Przedborski S. (2003). Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci*. 4:365-375.
277. Wagenfeld A, Gromoll J, Cooper TG. (1998). Molecular cloning and expression of rat contraception associated protein 1 (CAP1), a protein putatively involved in fertilization. *Biochem Biophys Res Commun*. 251:545-549.
278. Wagenfeld A, Yeung CH, Shivaji S, Sundareswaran VR, Ariga H, Cooper TG. (2000). Expression and cellular localization of contraception-associated protein. *J Androl*. 21:954-963.
279. Wang C, Ko HS, Thomas B, Tsang F, Chew KC, Tay SP, Ho MW, Lim TM, Soong TW, Pletnikova O, Troncoso J, Dawson VL, Dawson TM, Lim KL. (2005). Stress-induced alterations in parkin solubility promote parkin aggregation and compromise parkin's protective function. *Hum Mol Genet*. 14:3885-3897.
280. Wang C, Ko HS, Thomas B, Tsang F, Chew KC, Tay SP, Ho MW, Lim TM, Soong TW, Pletnikova O, Troncoso J, Dawson VL, Dawson TM, Lim KL. (2005). Stress-induced alterations in parkin solubility promote parkin aggregation and compromise parkin's protective function. *Hum Mol Genet*. 14:3885-3897.
281. Wang H, Oxford GS. (2000). Voltage-dependent ion channels in CAD cells: A catecholaminergic neuronal line that exhibits inducible differentiation. *J Neurophysiol*. 84:2888-2895.

282. Wang XF, Li S, Chou AP, Bronstein JM. (2006). Inhibitory effects of pesticides on proteasome activity: implication in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 23:198-205.
283. Warrick JM, Chan HY, Gray-Board, Chai Y, Paulson HL, Bonini NM. (1999). Suppression of polyglutamine-mediated neurodegeneration in *Drosophila* by the molecular chaperone HSP70. *Nat Genet.* 23:425-428.
284. Weinreb O, Mandel S, Bar-Am O, Yogev-Falach M, Avramovich-Tirosh, Y, Amit T, Youdim MB. (2009). Multifunctional neuroprotective derivatives of rasagiline as anti-Alzheimer's disease drugs, *Neurotherapeutics* 6:163-174.
285. Wersinger C, Sidhu A. (2003). Differential cytotoxicity of dopamine and H₂O₂ in a human neuroblastoma divided cell line transfected with alpha-synuclein and its familial Parkinson's disease-linked mutants. *Neurosci Lett* 342:124-128.
286. Wilson MA, Collins JL, Hod Y, Ringe D, Petsko GA. (2003). The 1.1-A resolution crystal structure of DJ-1, the protein mutated in autosomal recessive early onset Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:9256-9261.
287. Wiwattanapataptee R, Sae-Yun A, Petcharat J, Ovatlarnporn C, Itharat A. (2009). Development and evaluation of granule and emulsifiable concentrate formulations containing *Derris elliptica* extract for crop pest control. *J Agric Food Chem.* 57:11234-11241.
288. Woodgate A, MacGibbon G, Walton M, Dragunow M. (1999). The toxicity of 6-hydroxydopamine on PC12 and P19 cells. *Brain Res Mol Brain Res.* 69:84-92.
289. Xiromerisiou G, Hadjigeorgiou GM, Papadimitriou A, Katsarogiannis E, Gourbali V, Singleton AB. (2008). Association between AKT1 gene and Parkinson's disease: a protective haplotype. *Neurosci Lett.* 436:232-234.
290. Xu J, Zhong N, Wang H, Elias JE, Kim CY, Woldman I, Pifl C, Gygi SP, Geula C, Yankner BA. (2005). The Parkinson's disease-associated DJ-1 protein is a transcriptional co-activator that protects against neuronal apoptosis. *Hum Mol Genet.* 14:1231-1241.

291. Xu Q, Kanthasamy AG, Reddy MB. (2008). Neuroprotective effect of the natural iron chelator, phytic acid in a cell culture model of Parkinson's disease. *Toxicology*. 245:101-108.
292. Yamada M, Mizuno Y, Mochizuki H. (2005). Parkin gene therapy for alpha-synucleinopathy: a rat model of Parkinson's disease. *Hum Gene Ther*. 16:262-270
293. Yang Y, Gehrke S, Haque ME, Imai Y, Kosek J, Yang L, Beal MF, Nishimura I, Wakamatsu K, Ito S, Takahashi R, Lu B. (2005). Inactivation of *Drosophila* DJ-1 leads to impairments of oxidative stress response and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:13670-13675.
294. Yokota T, Sugawara K, Ito K, Takahashi R, Ariga H, Mizusawa H. (2003). Down regulation of DJ-1 enhances cell death by oxidative stress, ER stress, and proteasome inhibition. *Biochem Biophys Res Commun*. 312:1342-1348.
295. Yoshida K, Sato Y, Yoshiike M, Nozawa S, Ariga H, Iwamoto T. (2003). Immunocytochemical localization of DJ-1 in human male reproductive tissue. *Mol Reprod Dev*.66:391-397.
296. Yu Y, Wang JR, Sun PH, Guo Y, Zhang ZJ, Jin GZ, Zhen X. (2008). Neuroprotective effects of atypical D1 receptor agonist SKF83959 are mediated via D1 receptor-dependent inhibition of glycogen synthase kinase-3 beta and a receptor-independent anti-oxidative action, *J Neurochem*. 104:946-956.
297. Yuan J, Yankner BA. (2000). Apoptosis in the nervous system. *Nature* 407:802–809.
298. Zhang HG, Wang J, Yang X, Hsu HC, Mountz JD. (2004). Regulation of apoptosis proteins in cancer cells by ubiquitin. *Oncogene* 23:2009-2015.
299. Zhang L, Shimoji M, Thomas B, Moore DJ, Yu SW, Marupudi NI, Torp R, Torgner IA, Ottersen OP, Dawson TM, Dawson VL. (2005). Mitochondrial localization of the Parkinson's disease related protein DJ-1: implications for pathogenesis. *Hum Mol Genet*. 14:2063-2073.

300. Zhang X, Xie W, Qu S, Pan T, Wang X, Le W. (2005). Neuroprotection by iron chelator against proteasome inhibitor-induced nigral degeneration. *Biochem Biophys Res Commun.* 333:544-549.
301. Zheng WH, Kar S, Quirion R. (2002). Insulin-like growth factor-1-induced phosphorylation of transcription factor FKHRL1 is mediated by phosphatidylinositol 3-kinase/AKT kinase and role of this pathway in insulin-like growth factor-1-induced survival of cultured hippocampal neurons. *Mol Pharmacol.* 62:225-233.
302. Zhong N, Kim CY, Rizzu P, Geula C, Porter DR, Pothos EN, Squitieri F, Heutink P, Xu J. (2006). DJ-1 transcriptionally up-regulates the human tyrosine hydroxylase by inhibiting the sumoylation of pyrimidine tract-binding protein-associated splicing factor. *J Biol Chem.* 281:20940-2098.
303. Zhou H, Summers SA, Birnbaum MJ, Pittman RN. (1998). Inhibition of AKT kinase by cell-permeable ceramide and its implications for ceramide-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 273:16568-16575.
304. Zhou W, Freed CR. (2005). DJ-1 up-regulates glutathione synthesis during oxidative stress and inhibits A53T alpha-synuclein toxicity. *J Biol Chem.* 280:43150-43158.
305. Zimprich A, Biskup S, Leitner P, Lichtner P, Farrer M, Lincoln S, Kachergus J, Hulihan M, Uitti RJ, Calne DB, Stoessl AJ, Pfeiffer RF, Patenge N, Carbajal IC, Vieregge P, Asmus F, Müller-Myhsok B, Dickson DW, Meitinger T, Strom TM, Wszolek ZK, Gasser T. (2004). Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron* 44:601-607.
306. Zuch CL, Nordstroem VK, Briedrick LA, Hoernig GR, Granholm AC, Bickford PC. (2000). Time course of degenerative alterations in nigral dopaminergic neurons following a 6-hydroxydopamine lesion. *J Comp Neurol.* 427:440-454.

ANEXO 1. CULTIVO DE CÉLULAS CAD

Al trabajar con cultivos celulares es imprescindible mantener condiciones estrictas de esterilidad y es importante hacer un seguimiento de las características observables del cultivo al microscopio de luz invertido, para detectar contaminaciones tempranas (bacterias, hongos y/o levaduras) o cambios espontáneos en el fenotipo de los cultivos.

El cultivo celular se lleva a cabo siempre en cabina de seguridad biológica, antes de cada sesión de trabajo se debe desinfectar la superficie con alcohol etílico al 70% y exponer por 20 min a irradiación ultravioleta (UV), además, se debe encender la cabina, aproximadamente 30 min previos, con el propósito que el aire re-circule y se filtre, la puerta del cuarto de cultivo debe permanecer cerrada. Cada vez que se ingrese al cuarto de cultivo se debe hacer con la vestimenta adecuada, constituida de gorro, tapaboca, guantes y bata exclusiva para cultivo celular, igualmente, sólo se debe ingresar al cuarto de cultivo después de haberse lavado las manos y antebrazos con jabón antiséptico, para luego desinfectarlas con etanol al 70% antes de comenzar a trabajar. La desinfección con alcohol se debe realizar cada vez que se introducen las manos a la cabina.

El material fungible estéril se debe guardar en bolsas bien cerradas para protegerlo de posibles agentes contaminantes y suciedad, se deben abrir y cerrar preferiblemente al interior de la cabina y mantenerlos dentro del cuarto de cultivo. Las botellas de medios y reactivos, y otros materiales se deben limpiar con etanol o isopropanol al 70 % antes de introducirlos en la cabina.

Las botellas con PBS o medios estériles, los tubos Falcon que contengan las alícuotas de SFB, y cualquier otro reactivo estéril debe ser conservado en nevera (4°C) o congelador (-20°C) y se deben abrir y cerrar únicamente al interior de la cabina, y se sellan con papel *parafilm* antes de sacarlos. Toda sustancia o material que tenga que estar en contacto con las células debe estar estéril, por ejemplo pipetas de vidrio, puntas, PBS, tripsina, medio de cultivo, SFB, etc. El aseo del cuarto de cultivo se debe realizar semanalmente para evitar contaminación, y todo el cuarto de cultivo debe ser sometido a radiación UV durante la noche. Las condiciones de incubación son: 37°C, 90% de humedad relativa y 5% de CO₂. Se debe procurar mantener las células el menor tiempo posible fuera de ésta.

1.1 Preparación de soluciones para cultivo celular

1.1.1 Medio de cultivo

La línea celular CAD se mantuvo en el medio de cultivo D-MEM/F12 (GIBCO® *Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12*). La presentación comercial de este medio de cultivo es en polvo, por lo cual se debe reconstituir según las especificaciones del fabricante en agua ultrapura y adicionarle 3,7 g/L de bicarbonato de sodio, ajustar el pH a 7,4 y esterilizarlo por filtración en cabina de seguridad. Una vez filtrado se hacen las pruebas de esterilidad dejando por 72 h una alícuota de 5 mL del medio en una placa de Petri estéril dentro de la incubadora a 37°C, 5% de CO₂; cumplido este tiempo, y de no observarse al microscopio invertido ninguna señal de contaminación se procede a adicionar 10 mL de solución antibiótica para una concentración final de 1% de penicilina/estreptomicina, y se conserva en alícuotas de 250 mL a 4°C, preferiblemente en frascos tapa azul, hasta el momento del uso. Este medio es suplementado con 10% de SFB para el mantenimiento de las células CAD. Este medio también es usado sin SFB y 50 ng/mL de sodio selenita (Anexo 1.1.4) para ser usado como medio de diferenciación. Además, se debe preparar medio sin antibiótico y sin SFB, mas 50 ng/mL de sodio selenita (Anexo 1.1.4) para el procedimiento de transfección.

1.1.2 Tampón fosfato salino (PBS)

Esta solución salina se emplea para el lavado de las monocapas celulares, la preparación de tripsina-EDTA y la solución de MTT.

Cloruro de sodio (NaCl): 0,8 gr/100 mL; cloruro de potasio (KCl): 0,02gr/100 mL; fosfato diácido de potasio (KH₂PO₄): 0,02 gr/100 mL; fosfato monobásico de sodio (NaH₂PO₄). Se ajusta el pH a 7,4 y se esteriliza con calor húmedo en autoclave.

1.1.3 Solución de tripsina 0,25%

Se prepara una solución al 0,25% de tripsina; 0,1% EDTA tetrasódico y 0,2% de antibiótico penicilina/estreptomicina.

Esta solución se prepara en PBS (Anexo 1.1.2), para preparar 100 mL volumen final se requieren 0,25g de tripsina, 0,1g de EDTA y 0,2mL de antibiótico penicilina/estreptomicina. Se agita con magneto, se ajusta el pH a 7,4, después se esteriliza por filtración usando una pirinola de 0,2µm en cabina de seguridad. Esta

solución se guarda en alícuotas de 10 mL en tubos Falcon estériles de 15 mL a -20°C, hasta el momento de su uso, se descongela en un baño termostático a 37°C.

1.1.4 Solución stock de sodio selenita

Se debe preparar una solución *stock* de sodio selenita 250 µg/mL.

Pesar en la balanza analítica 1 mg (0,001 g) de sodio selenita. En cabina, disolver el sodio selenita en 4 mL de medio de cultivo estéril (Anexo 1.1.1), alicuotar en tubos estériles de 1,5 mL (aproximadamente 500 por tubo) y guardar en el congelador a -20°C hasta el momento de su uso. Para preparar 50 mL de medio de diferenciación se deben agregar 10 µL de la solución *stock* 250 µg/mL de sodio selenita para obtener una concentración final de 50 ng/mL.

1.1.5 IGF-1

1. Centrifugar el tubo con el IGF-1 liofilizado (IGF-1, 25 µg).
2. Adicionar 200 µL de H₂O destilada estéril, de tal forma que la solución queda a una concentración de 0,1 mg/mL.
3. Alicuotar el tubos estériles 25 µL por tubo y guardar a -70°C hasta el momento de su uso.
4. El *stock* de trabajo se realiza a 5 µg/mL en D-MEN/F12 y se almacena a -20°C. Por lo tanto, en cabina, a 25 µL de IGF-1 0,1 mg/mL se le adicionan 475 µL de D-MEN/F12 estéril.
5. Las células son tratadas con IGF-1 a una concentración de 100 ng/mL, según las siguientes especificaciones (Tabla A. 1.1):

Caja	Volumen	Stock IGF-1, 5 µg/µL
96 pozos	200 µL	4 µL
24 pozos	500 µL	10 µL
12 pozos	1.000 µL	20 µL
6 pozos	2.000 µL	40 µL

Tabla A. 1.1 Tratamientos con IGF-1

1.1.6. Cubierta con Poli-D-Lisina (PLD)

Este procedimiento debe hacerse bajo condiciones de esterilidad y en cabina:

1. Se prepara la solución *stock* de PDL 1 mg/mL. A una botella de PLD de 50 mg se le agregan 50 mL de H₂O destilada estéril.
2. Se hacen alícuotas de 5 mL en tubos Falcon de 50 mL estériles y se almacenan a -20°C.
3. A una de las alícuotas de 5 mL de PLD 1 mg/mL adicionar 45 mL de H₂O destilada estéril, la concentración final es de 0,1 mg/mL. Con esta solución cubrir cada uno de los pozos del plato de cultivo, según lo indicado en la Tabla A. 1.2.
4. Dejar por 5 min la solución sobre los platos, luego retirar el exceso y dejar secar las cajas destapadas en la cabina encendida.
5. Adicionar a cada pozo la cantidad necesaria de H₂O destilada estéril, según lo indica la Tabla A. 1.2, dejar por 15 min y retirar el exceso. Repetir este procedimiento tres veces.
6. Dejar las cajas destapadas y permitir el secado de estas durante 1 - 2 h en la cabina encendida.
7. Cuando las cajas ya estén secas dejarlas 1-2 h expuestas a luz UV.

Plato de Cultivo	Área (cm ²)	Volumen de PDL (mL)	H ₂ O (mL)
Frasco grande	75	5	10
Frasco pequeño	25	2	5
Plato de 6	9,5	0,8	2
Plato de 24	2	0,2	0,5
Plato de 96	0,32	0,06	0,2

Tabla A. 1.2 Especificaciones para la cubierta con Poli-D-Lisina

1.2 Mantenimiento de las células CAD

La línea celular CAD (Qi *et al.*, 1997) fue donada por la Dra. Chikaraishi del departamento de Neurobiología del *Duke University Medical Center, Durham, North Carolina* al Dr. Gonzalo Arboleda Bustos del grupo de Neurociencias de la Universidad Nacional de Colombia y se mantiene el cultivo de manera estable en

el laboratorio 1 del Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia desde el año 2007.

1.2.1 Descongelación

Las células CAD congeladas se encuentran almacenadas en nitrógeno líquido en criotubos (resistentes a la fase líquida del nitrógeno), éstos se encuentran debidamente marcados con el nombre de la línea celular, el pase, la fecha de congelación y la persona que realiza el procedimiento, además, existe una planilla que identifica cada vial dentro de una canastilla y escalerilla.

El primer paso para descongelar células CAD es preparar el cuarto de cultivo y el material (cajas de cultivo, pipetas estériles, puntas estériles, micropipetas, Falcon estériles, cámara de Neubauer, toallas de papel, frasco de desechos y precalentar el medio de cultivo suplementado con SFB en baño serológico a 37°C), siguiendo las recomendaciones mencionadas anteriormente. En cabina, preparar un tubo Falcon de 15 mL estéril con 8 mL de medio completo (10% SFB). Luego, se identifica el vial en la planilla y se saca del tanque de nitrógeno, rápidamente se pone en un baño serológico a 37°C hasta que se desprenda el bloque de hielo completo de las paredes del vial (esto debe ser muy rápido, el bloque de hielo no se debe dejar descongelar completamente).

Inmediatamente, el bloque de hielo se debe colocar en el Falcon con los 8 mL de medio completo y se resuspende rápidamente, se tapa el tubo, se le pone papel *parafilm* alrededor de la tapa y se centrifuga por 5 min a 1.200 rpm. A continuación, en cabina, el sobrenadante se descarta y el *pellet* de células se resuspende en 1 mL de medio completo para realizar el conteo y determinar el porcentaje de viabilidad por exclusión de azul de tripán (Anexo.1.2.4), se recomienda que el porcentaje de mortalidad no supere el 30%. Conocido el número de células vivas se procede a la siembra en frascos de cultivo cuello inclinado de 25 cm², a una densidad de 7×10^5 células CAD viables por frasco, cada frasco se cultiva con medio completo con un volumen final de 3 mL. Se realiza el monitoreo al microscopio de luz invertido para verificar la confluencia y se ponen a incubar bajo las condiciones estándar de CO₂, humedad y temperatura.

Al día siguiente se observan al microscopio invertido para confirmar que las células se encuentren adheridas y libres de contaminación; posterior a esto, sí se observan muchas células desprendidas se les retira el medio y se adicionan 3 mL de medio completo nuevo o 5 mL dependiendo de la confluencia, sí se desea se puede suplementar con mayor porcentaje de SFB para que el proceso sea más exitoso. El medio de cultivo puede ser reemplazado cada 3 d, esto depende de la

confluencia inicial, hasta obtener una confluencia aproximada del 90% para empezar a realizar subcultivos o pasajes.

1.2.2 Desprendimiento celular

Para desprender las células adheridas a la superficie de la caja de cultivo se usa la solución de tripsina (Anexo 1.1.3). Las cajas con 70-90% de confluencia son las adecuadas para hacer un subcultivo o montar experimento, lo primero que se hace es verificar el estado general de la caja de cultivo al microscopio invertido. Luego, en cabina se retira el medio de cultivo y se lava la monocapa de células con PBS (Anexo 1.1.2). A frascos de cultivo de 25 cm² se le adiciona 1 mL de la solución de tripsina y a frascos de 75 cm² se le adicionan 2 mL, aunque esto puede variar de acuerdo a la confluencia celular, el tipo celular y la temperatura.

Después de adicionar la solución de tripsina, la caja se coloca en la incubadora y cada 30 seg se monitorea al microscopio invertido el porcentaje de células desprendidas para inactivar la tripsina en el momento adecuado (antes que las células presenten daño de la membrana celular), el tiempo que tardan las células en desprenderse depende de la confluencia celular, el tipo celular y la temperatura, las células CAD se desprenden con esta solución a 37°C en menos de 1 minuto, por eso es importante monitorear al microscopio invertido para inactivar la tripsina a tiempo. El proceso de tripsinización se detiene adicionando 8 mL de medio completo, esto también se puede hacer sólo diluyendo la tripsina con medio libre de SFB o PBS, pero esto no es recomendado para las células CAD porque estas células son muy sensibles a la tripsina. Incluso, las células CAD se pueden desprender por medios mecánicos, sin necesidad de usar tripsina, con pipeteo seriado y dando golpes secos en la caja.

Después que las células se encuentran desprendidas se procede a recogerlas en un Falcon estéril de 15 mL, tapar el tubo, cubrir la tapa con papel *parafilm* y centrifugar por 5 min a 1.200 rpm, se obtiene el *pellet*. En cabina, se descarta el medio, las células se resuspenden en 1 mL de medio de cultivo sin SFB y se realiza el conteo celular (Anexo 1.2.4).

1.2.3 Subcultivos celulares de células CAD y montaje de cajas de 96, 24 y 6 pozos

Cuando las células se encuentran a una confluencia del 70-90% se procede a subcultivar para asegurar el crecimiento exponencial de las células. El subcultivo celular permite controlar la densidad del inóculo inicial y trabajar en condiciones de crecimiento óptimas para la línea celular. El número de pases indica cuántas veces se ha subcultivado la línea celular. Es importante trabajar con células con

pocos pases porque las líneas celulares tienden a ser inestables, de manera que algunas características fisiológicas y morfológicas del cultivo pueden cambiar con el tiempo. Este estudio inicio con células CAD pase 15 y a la fecha (después de 3 años) las células se encuentran en pase 25. Los experimentos realizados en este estudio se montaron con células de pases en un rango de 15-20.

El medio de los frascos seleccionados para este procedimiento se retira con pipeta de vidrio estéril y pipeteador eléctrico o por succión por bomba de vacío, se lava 1 vez con 6 mL de PBS (Anexo 1.1.2), y se lleva a cabo el desprendimiento celular enzimático con tripsina (Anexo 1.2.2).

Una vez conocido el número de células vivas (Anexo 1.2.4) se dispone a realizar los cálculos de acuerdo a la referencia de la Tabla A. 1.3 y se siembran las cajas necesarias dependiendo de los experimentos planificados, para el montaje de las diferentes cajas se realiza el cálculo y se suma el 10 % que corresponde al posible error por pipeteo. Cuando el número de células obtenidas, supera el de las requeridas para montar el experimento se procede a criopreservar el excedente, un millón de células por criotubo (Anexo 1.2.4).

Caja de Cultivo	Volumen de por pozo	Número de células por pozo	Volumen total por caja	Número total de células por caja	Volumen total + 10%	Número total de células + 10%
96 pozos	200 µL	7.000	19,2 mL	672.000	21,12 mL	739.200
24 pozos	500 µL	62.500	12 mL	1'500.000	13,2 mL	1'650.000
6 pozos	2000 µL	250.000	12 mL	1'500.000	13,2 mL	1'650.000
* 60 pozos	200 µL	7.000	12 mL	420.000	13,2 mL	462.000

Tabla A. 1.3 Referencia para la siembra de células CAD diferenciadas en cajas de 96, 24 y 6 pozos. Las cajas sembradas de acuerdo a estas referencias presentan una confluencia del 70%. En cajas de 96 pozos los pozos de los bordes no se usan por lo tanto sólo se usan 60 pozos con células.

1.2.4 Criopreservación de células CAD

El proceso de criopreservación es fundamental para el mantenimiento del cultivo ya que permite almacenar gran cantidad de células en diferentes pases que serán usados posteriormente sin límite de tiempo. Además, permite tener un *stock* de células frente a cualquier eventualidad, por eso es necesario que este proceso se lleve a cabo de manera correcta para que el proceso de descongelamiento sea exitoso.

Un aspecto fundamental en el proceso de criopreservación es que las células deben encontrarse en fase exponencial de crecimiento, por esta razón la confluencia ideal para congelar es del 70%. En cabina, se retira el medio, se lavan con PBS estéril (Anexo 1.1.2), se desprenden con tripsina (Anexo 1.2.2), se recogen en un falcón estéril de 15 mL, se tapa el tubo, se cubre la tapa con papel *parafilm*, se centrifugan por 5 min a 1.200 rpm. En cabina, se descarta el medio, el *pellet* de células se resuspende en 1 mL de medio para contar (Anexo 1.2.4), teniendo el número de células se realizan los cálculos para congelar por vial un millón de células. Un millón de células se resuspenden en 900 μ L de SFB en un criotubo y luego se adiciona gota a gota 100 μ L de DMSO grado cultivo celular, se resuspende esta solución y se tapa cada criotubo.

Rápidamente, los criotubos se colocan en la cámara de criopreservación, y ésta se coloca en un congelador a -20°C , la cámara contiene isopropanol lo que permite que la temperatura baje de forma gradual para evitar la formación de cristales. Al día siguiente, la cámara se pasa a la nevera de -70°C , posteriormente, 24 h después, los criotubos se llevan a nitrógeno líquido. Cada criotubo debe ser marcado de manera clara con el nombre de la línea celular, la fecha, el número exacto del pase celular y el nombre de la persona que realiza el procedimiento (los criotubos se deben marcar antes de adicionar las células). El DMSO es anticongelante, que si bien no impide la formación de cristales, si hace que estos sean muy pequeños para no romper la membrana celular y de esta manera es posible mantener la integridad celular bajo condiciones de criopreservación.

1.2.5 Conteo y viabilidad celular por exclusión de azul tripán

Cada vez que sea necesario conocer el número de células viables y valorar la evolución del cultivo se debe seguir el siguiente procedimiento de conteo celular, para lo cual se usa el azul de tripán, un colorante vital que permite diferenciar las células viables (no teñidas) de las no viables (teñidas de azul). La tinción con azul de tripán y la utilización de una cámara de Neubauer permiten hacer medidas de viabilidad y densidad celular (número de células/mL), y así asegurar el número de células necesarias u óptimas antes de congelar o realizar cualquier experimento.

El *pellet* celular obtenido después del proceso de desprendimiento celular (Anexo 1.2.2) se resuspende en 1 mL de medio sin SFB, se agita bien la suspensión y se toma una alícuota de 20 μ L a la cual se le adicionan 20 μ L de azul de tripán, es decir se hace una dilución 1:2, se mezcla bien y se llenan ambos retículos de la cámara de *Neubauer* cada uno con 10 μ L; se deja en reposo aproximadamente 1 minuto para que las células precipiten; transcurrido este tiempo, se observan en el microscopio para verificar que la disposición celular sea homogénea y que el número de células sea el adecuado para realizar el conteo, es decir que no halla

demasiadas células, lo cual imposibilitaba un conteo confiable, si esto ocurre se debe diluir la mezcla de células y volver a montar la cámara.

Se cuentan los cuatro cuadrantes de las esquinas de ambos retículos teniendo en cuenta que las células ubicadas sobre las líneas límites superior y derecha de cada cuadrante se incluyen en el conteo. Esta técnica permite diferenciar las células vivas de las muertas, ya que estas últimas se tiñen de azul debido a que el daño en su membrana permite la inclusión del colorante azul, por eso las células muertas se observan de color azul, mientras que las células vivas se ven refringentes.

Para reportar el número de células vivas por mL se tiene en cuenta el número de cuadrantes contados (8 cuadrantes cada uno con un volumen de 0,1 mm³) y el factor de dilución, con estos datos se aplicaba la siguiente ecuación:

$$\text{células/ml} = \frac{\text{células vivas contadas}}{0,8 \text{ mm}^3} \times \frac{1000 \text{ mm}^3}{1 \text{ ml}} \times \text{Factor de dilución}$$

Otro dato necesario de conocer para evaluar la calidad del procedimiento de congelación-descongelación e incluso del desprendimiento celular con tripsina, es el porcentaje de viabilidad, que está definido como la relación porcentual de células vivas en células totales. Un correcto procedimiento debe arrojar un porcentaje de viabilidad >85 %, de lo contrario es necesario revisar los protocolos, y si fuera el caso modificarlos con el fin de asegurar la mayor viabilidad posible.

ANEXO 2. DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL 50 PARA LAS NEUROTOXINAS

2.1 Rotenona

Descripción:	Toxina mitocondrial, inhibidor competitivo y reversible del complejo I (NADH CoQ Reductasa)
Formula molecular:	$C_{23}H_{22}O_6$
Otros nombres:	Rotenona, Tubatoxin, Paraderil
Peso molecular:	394,41g
Solubilidad:	Cloroformo: 50 mg/mL; DMSO: 50 mg/mL; Etanol: 5 mg/mL; poco soluble en agua 15 mg/L a 100°C y 0,02 mg/L a 20°C.
Densidad:	1,27 g/cm ³ a 20°C
Temp. de Melting:	165-166°C
Pureza:	>=98% por TLC
Referencia:	SIGMA R8875
Almacenamiento:	Temperatura ambiente (20°C), protegido de la luz, después de reconstituir este producto se puede almacenar hasta por tres años a-70°C. Los desechos con rotenona deben ir a la bolsa roja.

1 M: 394,42 g/L

1 M: 0,39442 g/mL

1 mM: 0,39442 mg/mL

2.1.1 Stock inicial 10 mM rotenona en DMSO

En balanza analítica, pesar 5 mg de rotenona (0,005 g) y disolverlo en 1,268 mL de DMSO (previamente filtrado), usar vortex, proteger de la luz, reacción

exotérmica, finalmente la solución toma un color amarillo traslúcido, asegúrese que no queden precipitados. La concentración de esta solución es de 10 mM, en 100 % de DMSO. Este *stock* en 100% de DMSO se puede alicuotar y guardar a -70°C hasta por tres años.

2.1.2 Stock de trabajo 1 mM rotenona

Tomar 100 μ L del *stock* 10 mM de rotenona y adicionar 900 μ L de agua destilada estéril, a partir de este *stock* de trabajo realizar diluciones seriadas 1:10 (rotenona: agua), para obtener las siguientes concentraciones 100 μ M, 10 μ M y 1 μ M. Se debe aplicar vortex y sonicar por 5 min con el propósito de evitar la formación de precipitados al aplicar los tratamientos (este procedimiento se debe realizar protegiendo de la luz).

2.1.3 Aplicación de tratamientos de rotenona en cajas de 96

Con el propósito de determinar la Dosis Letal 50 de la rotenona en células CAD diferenciadas, se probaron diferentes dosis y tiempos de exposición de la neurotoxina rotenona. Las concentraciones evaluadas se presentan en la Tabla A. 2.1, y los tiempos evaluados fueron 6, 24 y 48 h, esto se realiza en cajas de 96 pozos (Anexo 1.2.3), en la Figura A. 2.1 se esquematiza el procedimiento completo con la prueba de MTT (Anexo 3.1) y LDH (Anexo 3.2) y en la Figura A. 2.2 se muestra el diseño experimental. Los datos presentados en los resultados corresponden a tres experimentos independientes, cada uno con tres replicas.

Concentración del tratamiento con rotenona	<i>Stock</i>	96 pozos 200 μ L	6 pozos 2 mL
25 μ M	1 mM	5 μ L	50 μ L
5 μ M	1 mM	1 μ L	10 μ L
1 μ M	10 μ M	20 μ L	200 μ L
500 nM	10 μ M	10 μ L	100 μ L
250 nM	10 μ m	5 μ L	50 μ L
50 nM	100 μ M	10 μ L	10 μ L

Tabla A. 2.1 Tratamientos con rotenona. La tabla relaciona la concentración de rotenona con el *stock* de solución del cual se debe aplicar el tratamiento. Cada una de estas concentraciones se evaluó a diferentes tiempos 6, 24 y 48 h.

1. Retirar cuidadosamente la cantidad de medio según corresponda, de acuerdo a la concentración del tratamiento y el volumen final del pozo, para cajas de 96 pozos tercera columna y para cajas de 6 pozos cuarta columna de la Tabla A. 2.1.
2. Aplicar el volumen de la solución de rotenona teniendo en cuenta la concentración del tratamiento, el *stock* de la solución y el volumen final del pozo (Tabla A. 2.1).
3. Los tratamientos se montaron por triplicado en tres diferentes tiempos 6, 24 y 48 h.
4. Cumplido el tiempo de incubación específico para cada tratamiento aplicar las pruebas de viabilidad celular MTT (Anexo 3.1) y LDH (Anexo 3.1).

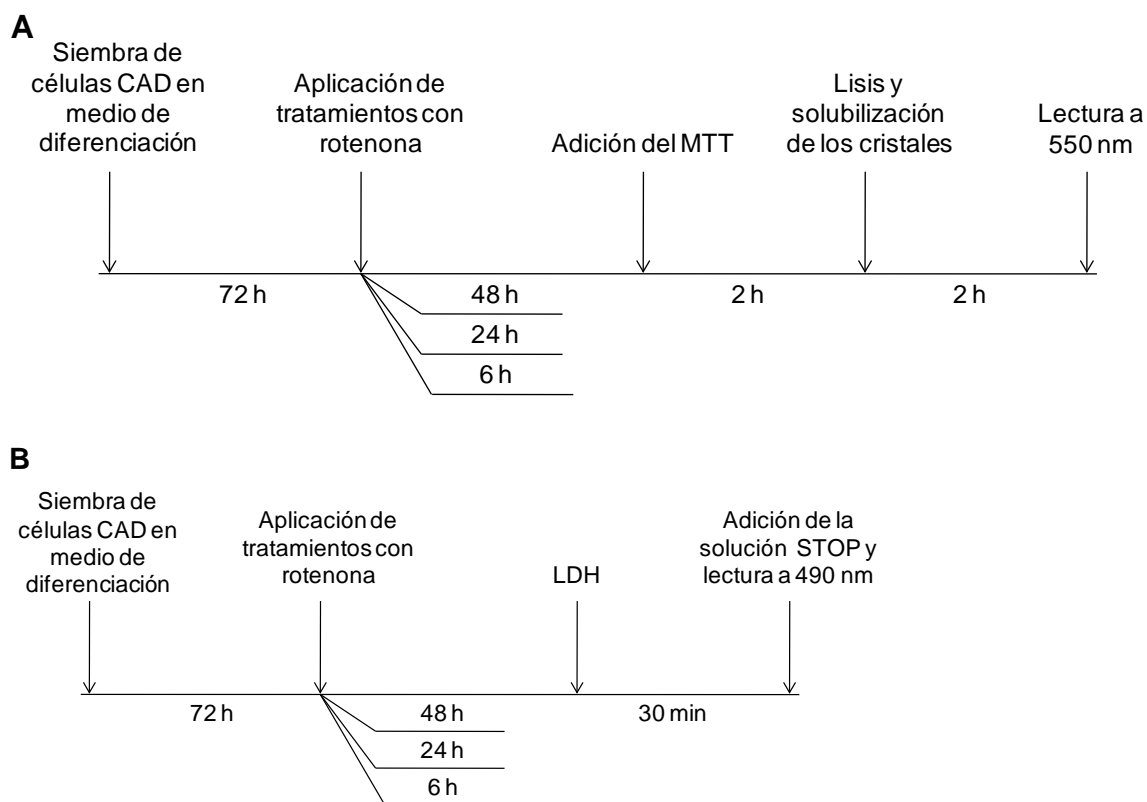


Figura A. 2.1 Esquema de los experimentos con rotenona. Las células CAD se siembran en cajas de 96 pozos, a una densidad de 7.000 células en 200 μ L de medio de diferenciación (sin SFB y 50 ng/mL de sodio selenita), transcurridas 72 h de la diferenciación se adicionan los diferentes tratamientos con rotenona (dosis-tiempo) y transcurrido el tiempo de incubación específico de cada uno se realiza el ensayo de viabilidad celular. **A.** MTT y **B.** LDH.

A

	1	2	3	6 h (3-5)			6	24 h (6-8)		8	9	48 h (9-11)		11	12
A															
B		Control	25 μ M	25 μ M	25 μ M	25 μ M	25 μ M	25 μ M	25 μ M	25 μ M	25 μ M	25 μ M	25 μ M	25 μ M	
C		Control	5 μ M	5 μ M	5 μ M	5 μ M	5 μ M	5 μ M	5 μ M	5 μ M	5 μ M	5 μ M	5 μ M	5 μ M	
D		Control	1 μ M	1 μ M	1 μ M	1 μ M	1 μ M	1 μ M	1 μ M	1 μ M	1 μ M	1 μ M	1 μ M	1 μ M	
E		Control	500 nM	500 nM	500 nM	500 nM	500 nM	500 nM	500 nM	500 nM	500 nM	500 nM	500 nM	500 nM	
F		Control	250 nM	250 nM	250 nM	250 nM	250 nM	250 nM	250 nM	250 nM	250 nM	250 nM	250 nM	250 nM	
G		Control	50 nM	50 nM	50 nM	50 nM	50 nM	50 nM	50 nM	50 nM	50 nM	50 nM	50 nM	50 nM	
H															

B

	1	2	3	6 h (3-5)			6	24 h (6-8)		8	9	48 h (9-11)		11	12
A															
B	C. Medio	Control	25 μ M	25 μ M	25 μ M	25 μ M	25 μ M	25 μ M	25 μ M	25 μ M	25 μ M	25 μ M	25 μ M	25 μ M	
C	C. Medio	Control	5 μ M	5 μ M	5 μ M	5 μ M	5 μ M	5 μ M	5 μ M	5 μ M	5 μ M	5 μ M	5 μ M	5 μ M	
D	C. Medio	Control	1 μ M	1 μ M	1 μ M	1 μ M	1 μ M	1 μ M	1 μ M	1 μ M	1 μ M	1 μ M	1 μ M	1 μ M	
E		C. Lisis	500 nM	500 nM	500 nM	500 nM	500 nM	500 nM	500 nM	500 nM	500 nM	500 nM	500 nM	500 nM	
F		C. Lisis	250 nM	250 nM	250 nM	250 nM	250 nM	250 nM	250 nM	250 nM	250 nM	250 nM	250 nM	250 nM	
G		C. Lisis	50 nM	50 nM	50 nM	50 nM	50 nM	50 nM	50 nM	50 nM	50 nM	50 nM	50 nM	50 nM	
H															

Figura A. 2.2 Diseño experimental para tratamientos con rotenona. Las células CAD se siembran en cajas de 96 pozos, a una densidad de 7.000 células en 200 μ L de medio de diferenciación (si n SFB y 50 ng/mL de sodio selenita), en los pozos de los bordes no se siembran células sólo se colocan 200 μ L de medio de diferenciación. Transcurridas 72 h de la diferenciación se adicionan los diferentes tratamientos de rotenona (dosis-tiempo) y transcurrido el tiempo de incubación específico de cada uno se realiza el ensayo de viabilidad celular. **A.** MTT y **B.** LDH.

2.2 6-Hidroxidopamina

Descripción:	Neurotoxina que destruye terminaciones catecolaminérgicas
Formula molecular:	$(\text{HO})_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2\text{HBr}$
Otros nombres:	2,4,5-Trihydroxyphenethylamine hydrochloride, 2,5-Dihydroxytyramine hydrochloride, 2-(2,4,5-Trihydroxyphenyl) ethylamine hydrochloride, 6-OHDA
Peso molecular:	250,09 g
Solubilidad:	50 mg/mL (5%) H ₂ O
Pureza:	>=95%
Referencia:	SIGMA 162957
Almacenamiento:	Temperatura ambiente (20°C), protegido de la luz, después de reconstituir este producto se oxida muy rápido, se debe almacenar a -70°C y puede permanecer hasta por un mes. Los desechos con 6-OHDA deben ir a la bolsa roja.

2.2.1 Stock inicial 10 mM 6-OHDA

En balanza analítica, pesar 2,5 mg de 6-OHDA (0,0025 g) y disolverlos en 1 mL de una solución de ácido ascórbico al 0,15% (Anexo 2.2.3); libre de oxígeno, esta solución toma un color rosado translúcido, si se oxida presenta color rojo-marrón oscuro, este procedimiento debe realizarse muy rápido, en frío y protegido de la luz, porque la 6-OHDA se oxida muy rápido, por esta razón se prepara en ácido ascórbico un antioxidante, asegúrese que no queden precipitados. Este *stock* se puede alicuotar y guardar a -70°C hasta por un mes, protegido de la luz.

2.2.2 Stock de trabajo 1 mM 6-OHDA

Tomar 100 µL del stock 10 mM de 6-OHDA y adicionar 900 µL de la solución de ácido ascórbico 0,15% (Anexo 2.2.3). Esto igualmente se debe realizar muy rápido, protegido de la luz y en frío.

2.2.3 Solución de ácido ascórbico 0,15%

Pesar 15 mg de ácido ascórbico (0,015 g) y disolverlos en 10 mL de agua destilada estéril en un tubo Falcon estéril de 15 mL. Almacenar a 4°C.

2.2.4 Aplicación de tratamientos de 6-OHDA en cajas de 96

Inicialmente, para encontrar una dosis adecuada para llevar a cabo los posteriores ensayos con 6-OHDA, se realizaron pruebas en cajas de 96 pozos, se sembraban 7.000 células CAD diferenciadas por pozo en un volumen final de 200 μ L (Anexo 1.2.3), con el propósito de evaluar la actividad mitocondrial y la viabilidad celular frente a la acción de la 6-OHDA en dosis-tiempo (Tabla A. 2.2 y Figuras A. 2.3 y A. 2.4).

Concentración del tratamiento con 6-OHDA	Pozos de 200 μ L	Pozos de 500 μ L	Pozos de 2 mL
Ac. Ascórbico 0,15%	40 μ L	100 μ L	400 μ L
25 μ M	5 μ L	12,5 μ L	50 μ L
50 μ M	10 μ L	25 μ L	100 μ L
100 μ M	20 μ L	50 μ L	200 μ L
150 μ M	30 μ L	75 μ L	300 μ L
200 μ M	40 μ L	100 μ L	400 μ L

Tabla A. 2.2 Tratamientos con 6-OHDA. La solución *stock* de 6-OHDA es de 1 mM. Cada una de las concentraciones de la columna 1 se evaluaron a diferentes tiempos 15 min, 30 min, 1 h, 6 h, 18 h, 24 h, 48 h y 72 h en cajas de 96 pozos. El volumen de ácido ascórbico 0,15% que se adiciona como control del vehículo de la 6-OHDA corresponde al volumen de la dosis máxima.

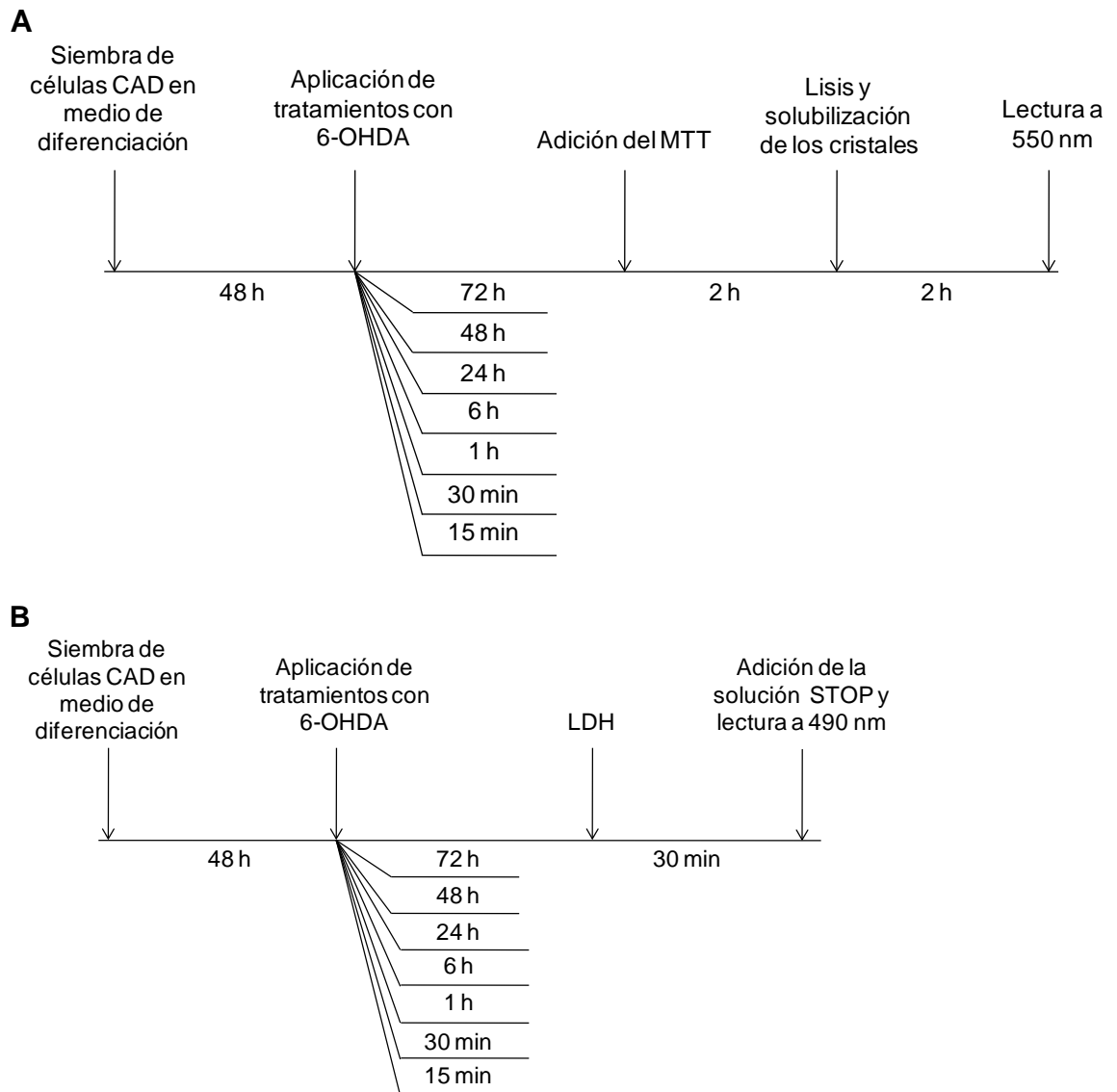


Figura A. 2.3 Esquema de los experimentos con 6-OHDA. Las células CAD se siembran en cajas de 96 pozos, a una densidad de 7.000 células en 200 μ L de medio de diferenciación (sin SFB y 50 ng/mL de sodio selenita), transcurridas 48 h de la diferenciación se adicionan los diferentes tratamientos con rotenona (dosis-tiempo) y transcurrido el tiempo de incubación específico de cada uno se realiza el ensayo de viabilidad celular. **A.** MTT y **B.** LDH.

		24 h (3-5)			48 h (6-8)			72 h (9-11)					
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B		Control	Ác. Asc.	Ác. Asc.	Ác. Asc.	Ác. Asc.	Ác. Asc.	Ác. Asc.	Ác. Asc.	Ác. Asc.	Ác. Asc.	Ác. Asc.	
C		Control	25 µM	25 µM	25 µM	25 µM	25 µM	25 µM	25 µM	25 µM	25 µM	25 µM	
D		Control	50 µM	50 µM	50 µM	50 µM	50 µM	50 µM	50 µM	50 µM	50 µM	50 µM	
E		Control	100 µM	100 µM	100 µM	100 µM	100 µM	100 µM	100 µM	100 µM	100 µM	100 µM	
F		Control	150 µM	150 µM	150 µM	150 µM	150 µM	150 µM	150 µM	150 µM	150 µM	150 µM	
G		Control	200 µM	200 µM	200 µM	200 µM	200 µM	200 µM	200 µM	200 µM	200 µM	200 µM	
H													

		24 h (3-5)			48 h (6-8)			72 h (9-11)					
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	C. Medio	Control	Ác. Asc.	Ác. Asc.	Ác. Asc.	Ác. Asc.	Ác. Asc.	Ác. Asc.	Ác. Asc.	Ác. Asc.	Ác. Asc.	Ác. Asc.	
C	C. Medio	Control	25 µM	25 µM	25 µM	25 µM	25 µM	25 µM	25 µM	25 µM	25 µM	25 µM	
D	C. Medio	Control	50 µM	50 µM	50 µM	50 µM	50 µM	50 µM	50 µM	50 µM	50 µM	50 µM	
E		C. Lisis	100 µM	100 µM	100 µM	100 µM	100 µM	100 µM	100 µM	100 µM	100 µM	100 µM	
F		C. Lisis	150 µM	150 µM	150 µM	150 µM	150 µM	150 µM	150 µM	150 µM	150 µM	150 µM	
G		C. Lisis	200 µM	200 µM	200 µM	200 µM	200 µM	200 µM	200 µM	200 µM	200 µM	200 µM	
H													

Figura A. 2.4 Diseño experimental para tratamientos con 6-OHDA. Las células CAD se siembran en cajas de 96 pozos, a una densidad de 7.000 células en 200 µL de medio de diferenciación (sin SFB y 50 ng/mL de sodio selenita), en los pozos de los bordes no se siembran células sólo se colocan 200 µL de medio de diferenciación. Transcurridas 48 h de la diferenciación se adicionan los diferentes tratamientos de 6-OHDA (dosis-tiempo) y transcurrido el tiempo de incubación específico de cada uno se realiza el ensayo de viabilidad celular. A. MTT y B. LDH.

2.3 C2-ceramida

La dosis letal 50 para la C2-ceramida en células ha sido establecida por estudios previos del grupo de Neurociencias de la Universidad Nacional de Colombia (Arboleda *et al.*, 2005; Rodríguez *et al.*, 2006).

2.3.1 Preparación de C2-ceramida para tratamientos

1. Realizar un *stock* en DMSO de C2-ceramida 50 mM, alicuotar en tubos estériles 10 μ L por tubo y almacenar a -20°C protegidos de la luz
2. Preparar el *stock* de trabajo 1 mM. A 10 μ L de C2-ceremida 50 mM se le adicionan 490 μ L de D-MEM/F12 estéril. Dar vortex hasta que la solución se observe homogénea.
3. Agregar el volumen necesario a las células según lo indica la Tabla A. 2.3. La C2-ceramida se debe adicionar a las células, inmediatamente, después de dar vortex, porque la ésta es un lípido y se precipita muy rápido en la solución 1 mM.

Concentración del tratamiento con C2-ceramida a partir de un <i>stock</i> 1 mM	Pozos de 200 μ l	Pozos de 500 μ L	Pozos de 2 mL
25 μ M – 6 h	5 μ L	12,5 μ L	50 μ L
10 μ M – 24 h	2 μ L	5 μ L	20 μ L

Tabla A. 2.3 Tratamientos con C2-ceramida. La tabla indica el volumen de C2-ceramida que se debe adicionar a partir de un *stock* C2- ceramida 1 mM según la concentración del tratamiento y el volumen de los pozos de cultivo a tratar.

ANEXO 3. VIABILIDAD CELULAR

3.1 MTT

El ensayo del MTT se utilizó para establecer la dosis letal 50 para las neurotoxinas, rotenona y 6-OHDA. El ensayo de MTT también llamado prueba de inhibición de la succinato deshidrogenasa (complejo III de la cadena respiratoria mitocondrial), permite evaluar la viabilidad celular mediante la metabolización de un compuesto cuyo producto resultante es medible colorimétricamente. La metabolización sólo es realizada por parte de las células viables, mientras que las células cuya maquinaria celular se encuentra parada o aquellas que han muerto no consiguen metabolizarlo.

La viabilidad celular se determina midiendo la reducción de la actividad deshidrogenasa mitocondrial a partir de la rotura del anillo de tetrazolio del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5 difenil tetrazolio, reactivo MTT, que genera un producto medible colorimétricamente, denominado sal de formazán (Mosmann, 1983).

Esta sal es un compuesto cromogénico insoluble en medio acuoso, pero soluble en disolventes orgánicos y que se puede utilizar como medida de la viabilidad celular siendo la absorbancia de la cantidad de formazán formado proporcional al número de células viables (metabólicamente activas) (Mosmann, 1983). Dependiendo del disolvente usado, la longitud de onda de máxima absorción de la sal de formazán varía, por ejemplo cuando los cristales se disuelven en DMSO se debe leer a 492 nm, en este estudio los cristales de formazán se disolvieron en el buffer de lisis MTT (Anexo 3.1.2) por lo cual la longitud de onda empleada para medir su absorción fue 550 nm en un espectrofotómetro de placas de 96.

El procedimiento se lleva a cabo en cabina de seguridad biológica y se usan cajas de 96 pozos. Las células se siembran a una densidad de 7.000 células por pozo en un volumen de 200 μ L de medio de diferenciación (sin SFB y 50 ng/mL de sodio selenita) (Anexo 1.2.3) y tratadas tal como se explica en el Anexo 2. Una vez cumplidos los tiempos de incubación específicos para cada uno de los tratamientos se remueven 100 μ L de medio de cada pozo, y se adicionan 20 μ L de la solución de MTT (5mg/mL) (Anexo 3.1.1), y las placas se incuban durante 2 h a 37°C, 5 % de CO₂; luego del periodo de incubación se remueve todo el medio con micropipeta, teniendo la precaución de no retirar los cristales de formazán. En el caso de la 6-OHDA se realiza un lavado suave con PBS antes del siguiente paso.

Posteriormente, a cada pozo se le adicionan 100 μ L del *buffer* de lisis/solubilización MTT (Anexo 3.1.2) para disolver los cristales de formazán, se cubre la placa con papel aluminio y se incuba por 1 h a 37°C, también se puede poner a agitar a temperatura ambiente por 2 h. Antes de realizar la lectura en el espectrofotómetro, las placas se deben visualizar en el microscopio invertido para revisar que los cristales se encuentren totalmente disueltos, luego de comprobar esto se procede a registrar la absorbancia de cada pozo en el lector de placas de 96 a una longitud de onda de 550 nm o 595 nm.

Los resultados de viabilidad se expresan como porcentaje de densidad óptica con respecto a los controles que corresponden a células a las cuales no se les aplica ningún tratamiento considerando que éstos poseen un porcentaje de viabilidad del 100%.

3.1.1 Solución MTT

El reactivo de MTT para los ensayos de viabilidad se disuelve a una concentración de 5 mg/mL en PBS (Anexo 1.1.2). Para esto se pesan 250 mg del MTT sólido y se disuelven en PBS hasta completar un volumen de 50 mL, luego la solución se esteriliza pasándola por un filtro para jeringa con poro de diámetro 0,22 μ m y se conserva en un Falcon estéril de 50 mL, a 4 °C y protegido de la luz con papel aluminio, ya que es sensible a la luz. Todo el procedimiento se debe realizar en cabina.

3.1.2 Buffer de lisis/solubilización MTT

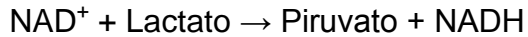
Mezclar 200 mL de dimetilformamida con 150 mL de dH₂O. Llevar a pH 4,7 con ácido acético, adicionar 40 g de SDS y cuando este haya solubilizado ajustar el volumen final a 400 mL con dH₂O. Alicuotar en Falcon de 50 mL y guardar a 4°C, a esta temperatura el buffer se congela, por eso previo a la solubilización de los cristales de formazán se debe pre-calentar el *buffer* a 37°C para que en el momento de su uso esté descongelado.

3.2 LDH

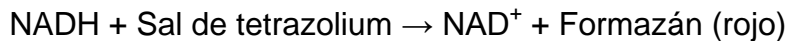
Con el propósito de determinar la viabilidad celular se uso CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega, G1781), esta técnica mide cuantitativamente la liberación de la lactato deshidrogenasa (LDH) por colorimetría. La LDH es una enzima estable en el citoplasma y es liberada de la célula después de su lisis celular. Para determinar cuantitativamente la liberación

de LDH por varios años se han usado métodos con sales de tetrazolium en conjunción con diaforasa u otro aceptor de electrones (Nachlas *et al.*, 1960; Korzeniewski y Callewaert, 1983; Decker y Lohmann-Matthes, 1988). La fórmula general de la reacción de esta técnica es:

LDH



Diaforasa (aceptor de electrones)



La LDH liberada de las células lisadas permanece en el medio de cultivo, se toman 50 μL del medio de cultivo y se incuban con el sustrato de la enzima por 30 min, el proceso que se lleva a cabo es la conversión de la sal de tetrazolium a un producto de formazán rojo. La intensidad del color formado es proporcional al número de células lisadas. Por lo tanto, esta técnica puede ser útil para determinar la citotoxicidad mediada por químicos u otros agentes, así como determinar el número total de células.

3.2.1 Procedimiento LDH

1. Transferir 50 μL del sobrenadante de cada uno de los tratamientos, controles del experimento y los controles específicos para LDH (Anexo 3.2.2) a una caja nueva de 96 pozos.
2. Reconstituir la mezcla de sustrato (Substrate mix) con el *buffer* (Assay buffer), 12 mL de *buffer* por frasco de mezcla de sustrato, seguir las indicaciones del proveedor. Después de reconstituido el sustrato almacenar a $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Se debe procurar mantener frío y protegido de la luz durante la aplicación y no es necesario descongelarlo totalmente en el próximo uso.
3. Adicionar 50 μL del sustrato reconstituido a cada muestra (tratamientos y controles), tapar la caja con papel aluminio para proteger de la luz e incubar a temperatura ambiente por 30 min.
4. Transcurridos los 30 min, inmediatamente, adicionar 50 μL a cada pozo de la solución de parada (Stop solution).
5. Leer la placa de 96 pozos a 490 nm y registrar los datos. El análisis de los datos se realiza teniendo en cuenta los controles (Anexo 3.2.2).

3.2.2 Controles para LDH

Se debe contar con dos controles para llevar a cabo el análisis de los datos de viabilidad por LDH, estos también se deben realizar por triplicado.

3.2.2.1 Control del medio de cultivo

Corresponde al *background* del medio de cultivo dado por el rojo fenol y por la LDH presente en el SFB. El valor de la absorbancia de este control se obtiene a partir de 50 μ L del medio de cultivo (sin células) en el cual se ha llevado a cabo el experimento y es usado para normalizar todos los valores obtenidos de absorbancia de las muestras y del control de lisis total o lisis 100 %.

3.2.2.2 Control de lisis total o lisis 100 %

Corresponde al número total de células lisadas, lo cual indica el 100% de muerte celular. Estos controles se deben preparar con anterioridad, calculando que se tenga el sobrenadante de estos al mismo tiempo que el de las muestras del experimento para realizar el montaje en la placa de 96 de manera adecuada.

- *Cajas de 96 pozos:* Tres pozos de células control se tratan de forma independiente con 10 μ L del *buffer* de lisis (Tritón 0,8%) por cada 100 μ L de medio de cultivo y se incuban por 45 min a 37°C. Después de esto se obtienen los 50 μ L de sobrenadante que se transfieren a la caja nueva de 96 pozos.

- *Cajas de 24 o 6 pozos:* El plato con las células control de lisis se saca de la incubadora y se llevan rápidamente a -70° y se congelan por 45 min. Luego se descongelan y se dejan a temperatura ambiente por otros 30 min. Posterior a esto se recoge todo el medio de cada pozo junto con las células lisadas y se centrifuga a 900 rpm por 4 min. 50 μ L de este sobrenadante se transfieren a la caja nueva de 96 pozos.

ANEXO 4. TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS *Escherichia coli* JM109 Y PURIFICACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS RECOMBINANTES

Inicialmente, se transformaron bacterias *Escherichia coli* JM109, con los plásmidos pcDNA3.1 V5/HIS y pcDNA3.1 V5/HIS DJ-WT, donados por el Dr. Cookson MR del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos para luego llevar a cabo la purificación de los plásmidos (pcDNA3.1 V5/HIS, pcDNA3.1 V5/HIS DJ-WT), los productos de esta purificación fueron cuantificados y usados para la transfección de las células CAD con el fin de sobreexpresar la proteína DJ-1 humana silvestre en células CAD.

4.1 Transformación de bacterias *Escherichia coli* JM109 con plásmidos recombinantes

4.1.1 Medio LB líquido

La preparación del medio LB se realiza por componentes según las siguientes especificaciones:

Para 1 L de medio líquido se pesan 10 g de Bacto® triptona, 5 g de Bacto® extracto de levadura, 5 g de cloruro de sodio (NaCl). Disolver todos los componentes en 800 mL de H₂O dd, cuando la solución esté homogénea se completa a 1 L H₂O dd. Ajustar a pH 7.0 con NaOH. Finalmente, se esteriliza con calor húmedo en autoclave (120 libras de presión, 120°C, 20 min).

4.1.2 Medio LB sólido

Pesar 10 g de Bacto® triptona, 5 g de Bacto® extracto de levadura, 5 g de cloruro de sodio (NaCl) y 15 g de Bacto® agar. Disolver la triptona, el extracto de levadura y el cloruro de sodio en 800 mL de H₂O dd, cuando la solución esté homogénea ajustar a pH 7.0 con NaOH, luego adicionar los 15 g de agar y completar a 1 L con H₂O dd. Finalmente, se esteriliza con calor húmedo en autoclave (120 libras de presión, 120°C, 20 min).

Después de esterilizar se deja enfriar hasta 50°C y bajo condiciones de esterilidad y con mechero se sirve en cajas de Petri estériles, aproximadamente 30 mL para cajas de 85 mm, luego de gelificado el medio las cajas se tapan, se marcan y se

guardan a 4°C hasta el momento de su uso, las cajas pueden permanecer almacenadas a 4°C hasta por un mes y a temperatura ambiente una semana.

4.1.3 Medio LB líquido y sólido con ampicilina 100 µg/mL

El medio LB con antibiótico (ampicilina 100 µg/mL) se usa para seleccionar las bacterias transformadas con los plásmidos, los cuales le confieren a las células *E. coli* resistencia a la ampicilina.

Para preparar 1 L de medio LB con ampicilina 100 µg/mL, bajo condiciones de esterilidad y con mechero a un 1 L de medio LB líquido estéril (Anexo 4.1.1) y a temperatura ambiente, se le adicionan 2 mL de la solución de ampicilina 50 mg/mL (Anexo 4.1.3.1).

Para preparar medio sólido con ampicilina 100 µg/mL, bajo condiciones de esterilidad y con mechero, a 500 mL de medio LB sólido estéril y 50°C de temperatura (Anexo 4.1.2) se le adiciona 1 mL de la solución de ampicilina 50 mg/mL (Anexo 4.1.3.1), se resuspende y se sirve en cajas de Petri estériles, aproximadamente 30 mL para cajas de 85 mm, luego de gelificado el medio las cajas se tapan, se marcan y se guardan a 4°C hasta el momento de su uso, las cajas pueden permanecer almacenadas a 4°C hasta por un mes y a temperatura ambiente una semana.

4.1.3.1 Solución stock de ampicilina 50 mg/mL

En balanza analítica, pesar 250 mg (0,25 g) de ampicilina sólida y en cabina disolver esta cantidad en 5 mL de agua destilada estéril en un Falcon estéril de 15 mL, alicuotar en tubos de 1,5 mL estériles y almacenar en el congelador a -20°C hasta el momento de su uso, la solución se debe almacenar máximo hasta por un mes ya que el antibiótico va perdiendo efectividad con el tiempo después de ser reconstituido. Lo ideal es preparar la cantidad que se va a usar.

4.1.4 Medio SOC

Para preparar 100 mL de medio SOC se requiere:

- 2 g de Bacto® triptona
- 0,5 g de Bacto® extracto de levadura
- 1 mL de 1M de NaCl
- 0,25 mL de 1M de KCl

- 1 mL de 2M Mg²⁺ stock, esterilizada por filtración

o 2M Mg²⁺ stock: 20,33 g MgCl₂ 6H₂O

24,65 g MgSO₄ 7H₂O

Adicionar H₂O dd hasta 100 mL y esterilizar por filtración

- 1 mL de 2M glucosa, esterilizada por filtración

Adicionar la triptona, el extracto de levadura, el cloruro de sodio (NaCl) y el cloruro de potasio (KCl) a 97 mL de H₂O dd, agitar hasta disolver, autoclavar y enfriar hasta temperatura ambiente. En cabina, adicionar la solución stock de 2M Mg²⁺ y la solución de 2M glucosa. Almacenar a 4°C hasta el momento de su uso.

4.1.5 Medio de congelación para bacterias

El medio de congelación de bacterias es medio LB líquido estéril con 30 % de glicerol estéril. Para preparar 10 mL de medio de congelación, bajo condiciones de esterilidad y con mechero, en un Falcon de 15 mL estéril se colocan 7 mL de medio LB estéril y se le adicionan 3 mL de glicerol estéril, se resuspende esta solución y se guarda a 4°C hasta el momento de su uso.

4.1.6 Procedimiento de transformación de células *E. coli* JM109 con plásmidos recombinantes

El proceso de transformación se realiza bajo condiciones de esterilidad y con mechero y todo el material usado en este proceso debe estar estéril.

1. Sacar de la nevera de -70°C las células *E. coli* JM109 que se requieran para el experimento, cada tubo trae 200 µL y se requieren 50 µL plásmido, adicionalmente se usan 50 µL para el control positivo y 50 µL para el control negativo, el tubo o los tubos con las células se colocan en un recipiente con hielo, aproximadamente por 5 min o hasta que descongelen, se pueden resuspender con pipeta y se debe evitar que las células estén a una temperatura superior de 4°C.

2. Después de descongelar las células, mezclarlas suavemente por inversión, y transferir 50 µL a cada tubo de 1,5 mL estéril, previamente marcados (Control 1, Control 2 y los plásmidos). El número de tubos está determinado por el número de plásmidos y los dos controles.

3. Adicionar 1-50 ng de DNA plasmídico (en un volumen no superior a 10 μ L). A los dos tubos controles no se les adiciona nada pero les realiza todo el procedimiento. Resuspender con la pipeta y agitar los tubos rápidamente varias veces (dando un golpe suave con el dedo índice en la parte inferior del tubo). Inmediatamente, poner los tubos en hielo por 10 min.
4. Choque térmico: transferir todos los tubos al baño serológico, el cual debe estar exactamente a 42°C por 45-50 seg. No agitar. Inmediatamente, colocar todos los tubos en hielo por 2 min.
5. Completar cada tubo a 1 mL con medio SOC 4°C (Anexo 4.1.4), según corresponda. Incubar en baño serológico por 60 min a 37°C con agitación constante (aproximadamente 225 rpm). Tapar los tubos con papel *parafilm*.
6. Transcurrido el tiempo de incubación, sacar los tubos y centrifugar por 30 seg a 5.000 rpm. Retirar 800 μ L del sobrenadante con cuidado de no llevarse el *pellet* celular. Resuspender las células en los ~~200~~ 200 de medio restantes y sembrar en cajas de Petri (medio LB sólido con antibiótico o sin antibiótico, según corresponda) (Figura A. 4.1). La siembra se debe realizar de manera masiva con un asa de vidrio triangular, después de la siembra las cajas se incuban a 37 °C hasta por 16 h.
7. Las colonias transformadas por el plásmido (colonias que crecen en medio LB sólido con ampicilina 100 μ g/mL) se deben repicar antes de las 16 h posterior al procedimiento de siembra e incubación de los platos, ya que pueden aparecer colonias satélites que crecen en el medio y no han insertado el plásmido. Para repicar las colonias, primero se deben identificar colonias aisladas, una sola colonia se toma con el asa metálica y se siembra por aislamiento en caja de Petri con medio LB sólido con ampicilina 100 μ g/mL. Incubar a 37°C por 12-14 h. también se deben repicar los controles para probar el estado de los medios, las células *E. coli* JM109 sin transformar no deben crecer en medio LB con ampicilina 100 μ g/mL. Comprobar la inserción del plásmido (Anexo 4.1.7).
8. Colocar una colonia a crecer en medio líquido LB con ampicilina 100 μ g/mL, en un tubo Falcon de 15 mL e incubar a 37°C con agitación. También se deben poner a crecer en medio líquido los controles con el propósito de probar los medios. Las células JM109 sin transformar no deben crecer en medio LB con ampicilina 100 μ g/mL.
9. En Erlenmeyers de 250 mL poner a crecer las bacterias control en 200 mL de medio con y sin antibiótico y las bacterias transformadas en 200 mL de medio líquido con ampicilina 100 μ g/mL, en agitación a 37°C, durante 16 – 21 h (crecer toda la noche), hasta una $DO_{600} = 2-4$.

10. Centrifugar las células *E. coli* JM109 transformadas 6-7 min a 4.600 rpm y resuspender el *pellet* en medio de congelación, el *pellet* obtenido en 200 mL de medio se resuspende en 2 mL de medio de congelación (Anexo 4.1.5). Luego se hacen alícuotas de 200 μ L en criotubos estériles y se almacenan a -70°C , con el propósito de mantener un *stock* de células transformadas.

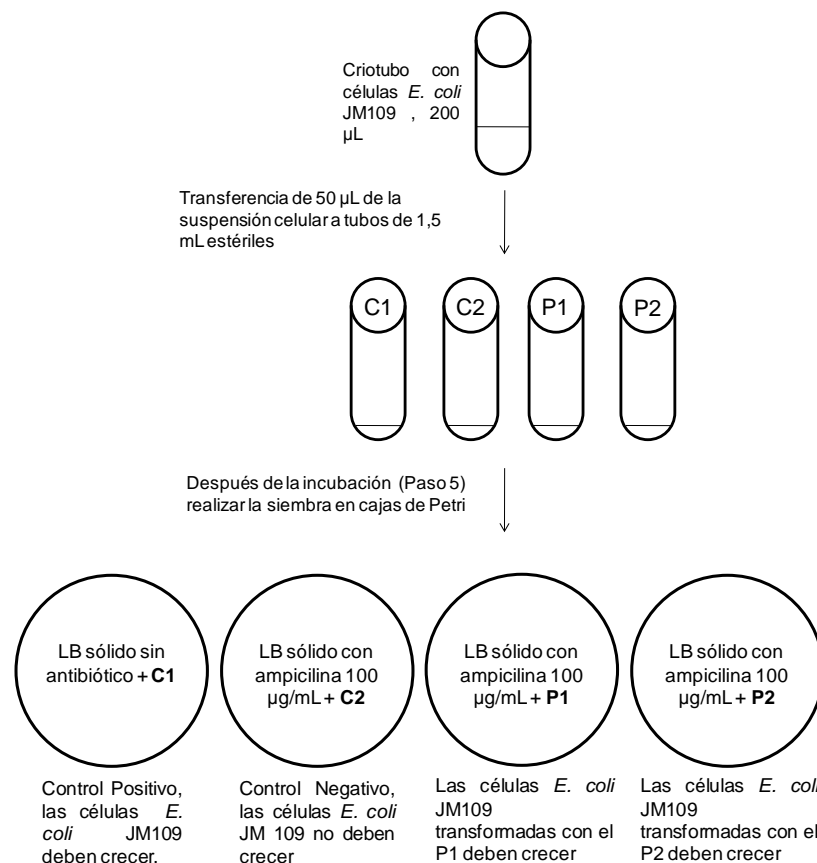


Figura A. 4.1 Diseño para la transformación de células *E. coli* JM109. En esta figura se esquematiza de forma general el diseño que se debe realizar para la transformación de bacterias *E. coli* JM109 con un determinado plásmido o plásmidos. Es importante tener los dos controles de células *E. coli* JM109. El control 1 (C1) se hace con el fin de comprobar que las células están vivas y permanecen viables durante todo el proceso de transformación, es por esta razón que las células se cultivan en medio LB sin antibiótico. El control 2 (C2) se lleva a cabo con el fin de comprobar la efectividad del medio LB con antibiótico y la no resistencia de las células *E. coli* JM109 a la ampicilina, de tal forma que las células originales no deben crecer en medio LB ampicilina 100 $\mu\text{g/mL}$ porque no son resistentes, además, es un indicador de que la concentración de ampicilina si es la adecuada para la selección de las bacterias transformadas. Las bacterias transformadas con el plásmido (P1: pCDNA3.1; P2: pCDNA3.1 DJ-1-WT) (bacterias *E. coli* JM109 que se mezclan con el DNA plasmídico, P1 y P2) deben crecer en medio LB con ampicilina 100 $\mu\text{g/mL}$, ya que estos plásmidos tanto el vector vacío como el DJ-1-WT tienen el gen de resistencia a ampicilina. Si en alguno de los controles no se obtiene el resultado esperado el experimento se debe descartar.

4.1.7 Toohtpick

El *toohtpick* es un método que permite comprobar de manera rápida e inmediata la inserción del plásmido después del procedimiento de transformación. Además permite estimar el tamaño del plásmido insertado en una electroforesis en gel de agarosa y comparar el número de copias de diferentes plásmidos en un mismo hospedero. Existen otras formas de comprobar la inserción del plásmido por ejemplo por PCR o por *southern blot* (Sambrook *et al.*, 1989). En la Figura A. 4.2 se observa un gel de agarosa al 0,7 % teñido con bromuro de etidio de colonias bacterianas transformadas con diferentes plásmidos recombinantes.

1. Se toma con un asa metálica recta estéril una de las colonias bacterianas que hayan crecido en medio LB sólido con ampicilina 100 µg/mL, las bacterias transformadas con el plásmido recombinante (paso 6 del Anexo 1.4.6) y se transfiere a un tubo estéril de 200 µL que contenga 50 µL de una solución estéril 10 mM EDTA, pH 8.0 (Anexo 4.1.7.1). Se debe usar un tubo por cada colonia transferida. También se debe transferir una colonia de *E. coli* JM109 sin transformar como control.
2. A cada tubo con la respectiva colonia adicionar 50 µL de la solución NSS fresca (Anexo 4.1.7.2). tapar el tubo y mezclar con vortex por 30 seg.
3. Transferir los tubos a un baño serológico a 70°C e incubarlos por 5 min y luego enfriarlos a temperatura ambiente.
4. A cada tubo adicionar 1,5 µL de una solución 4 M de KCl (Anexo .4.1.7.3) y dar vortex por 30 seg.
5. Incubar los tubos por 5 min en hielo y luego centrifugar a máxima velocidad por 3 min a 4°C en una microcentrifuga refrigerada.
6. El sobrenadante contiene el DNA genómico y plasmídico de las bacterias *E. coli* JM109, la comprobación se realiza en un gel de agarosa al 0,7 %, teñido con bromuro de etidio, se observa en un transiluminador UV y se realiza el registro fotográfico para el posterior análisis.

4.1.7.1 EDTA (10 mM, pH 8.0)

Para preparar 500 mL de EDTA 10 mM se pesan 1,86 g se EDTA y se disuelven en H₂O dd completando a un volumen final de 500 mL, se ajusta el pH a 8,0 con HCl y/o NaOH y se manda esterilizar con calor húmedo.

4.1.7.2 Solución NSS

Esta solución debe usarse fresca por eso se debe preparar cada vez que se vaya a usar y se mantiene a temperatura ambiente hasta el momento de su uso, se debe descartar la solución NSS no usada. Esta solución consta de: 0,2 N de NaOH; 0,5 % de SDS y 20 % de sucrosa.

4.1.7.3 KCl (4M)

Para preparar 10 mL de KCl (4M), pesar 2,98 g de KCl y disolverlos en H₂O dd completando a un volumen final de 10 mL.

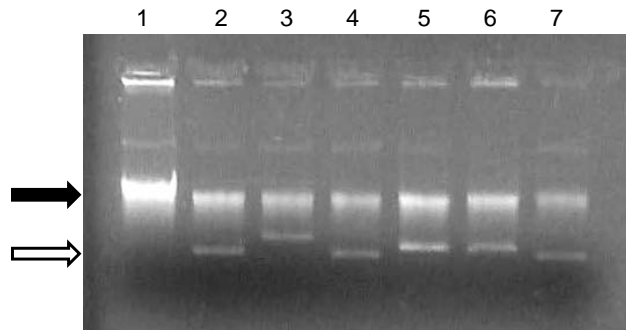


Figura A. 4.2 Transformación de Escherichia coli JM109 y purificación de plásmidos. A. Prueba de la presencia de los plásmidos recombinantes en células *E. coli* JM109 transformadas, La flecha negra indica el DNA genómico de *E. coli*, mientras la flecha blanca indica el DNA plasmídico, en gel de agarosa al 0.7% teñido con bromuro de etidio, en el primer carril se observa solamente la banda de DNA genómico ya que corresponde a las células *E. coli* sin transformar. Los siguientes carriles (2-6) corresponden a bacterias transformadas con los diferentes plásmidos recombinantes, es por esto que se observa una banda inferior que corresponde al DNA plasmídico insertado durante el proceso de transformación por choque térmico. Las diferencias en el tamaño de las bandas del DNA plasmídico se debe a la migración diferencial de los plásmidos de acuerdo a su forma (lineal o circular).

4.1.8 Purificación de plásmidos recombinantes

La purificación de los plásmidos se llevó a cabo con el *kit* de purificación *PureYield™ Plasmid Midiprep System* (Promega, A2495), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

4.1.8.1 Lisis celular

1. Crecer en Erlenmeyers estériles de 250 mL con tapón de algodón con 200 mL de medio LB líquido con ampicilina 100 µg/mL bacterias *E. coli* JM109 transformadas con el plásmido recombinante. Las condiciones optimas de cultivo son 37°C en agitación constante durante toda la noche (16-21 h) hasta una O.D.₆₀₀=2-4.

2. Se obtiene el *pellet* celular centrifugando la suspensión celular a 5.000 rpm por 15 min en tubos Falcon de 50 mL estériles, bien tapados y con la tapa cubierta de papel *parafilm* (llenar los tubos hasta 45 mL, máximo, para evitar que se riegue el medio). Se descarta el sobrenadante de cada tubo en un frasco con hipoclorito de sodio al 5%, se remueve el exceso de medio invirtiendo los tubos sobre una toalla absorbente. El *pellet* de los 200 mL de cultivo se resuspende en un solo Falcon de 50 mL con 6 mL de la solución de resuspensión celular (*Cell Resuspension Solution*).
3. Adicionar 6 mL de la solución de lisis celular (*Cell Lysis Solution*), mezclar suavemente por inversión el tubo, 3 a 5 veces, e incubar 3 min a temperatura ambiente. **Nota:** El SDS de la solución de lisis celular se puede precipitar. Si el precipitado se ha formado la solución se debe incubar en un baño serológico a 37°C con agitación suave.
4. Adicionar 10 mL de la solución de neutralización (*Neutralization Solution*) a las células lisadas y mezclar por inversión el tubo, 5 a 10 veces.
5. Centrifugar el lisado a 5.000 rpm por 30 min.
6. Realizar el montaje de la bomba de vacío, el *manifold* y las columnas. Las columnas de limpieza son azules y las columnas de unión al DNA plasmídico son de color blanco. La columna azul se inserta sobre la columna blanca y la columna blanca se acopla a una de las entradas del *manifold* y éste a su vez va conectado a la bomba de vacío. Cada vez que se requiera pasar una solución a través de las columnas se enciende la bomba de vacío y se abre la llave del *manifold* que corresponda a la columna. El vacío debe ser suave para evitar que la membrana se separe de la columna.
7. Después de tener el montaje el sobrenadante obtenido en el paso 5 se decanta a través de la columna azul. Aplicar vacío y esperar que todo el líquido (lisado) pase a través de las dos columnas. El DNA se une a la membrana de la columna blanca. Cuando haya pasado toda la solución se cierra la llave.

4.1.8.2 Lavado

1. Retirar la columna azul y adicionar 5 mL de la solución de remoción de endotoxinas (*Endotoxin Removal Wash*) a la columna blanco, aplicar vacío hasta que pase toda la solución a través de la columna.
2. Adicionar 20 mL de la solución de lavado (*Column Wash*), aplicar vacío hasta que pase toda la solución.
3. Dejar secar la membrana aplicando vacío por 30 seg a 1 min. La membrana debe estar seca y no tener olor a etanol.

4. Remover la columna blanca del *manifold* e insertarla en un tubo Falcon estéril de 50 mL.

4.1.8.3 Elución

1. En cabina, adicionar 600 μ L de agua estéril, libre de nucleasas, sobre la membrana.

2. Centrifugar a 3.000 rpm por 5 min a 4°C, en una centrifuga de rotor móvil. El tubo no se debe tapar.

3. En cabina, colectar el filtrado del tubo Falcon de 50 mL y transferirlo a un tubo de 1,5 mL estéril.

4. Si se desea se puede realizar una segunda elución adicionando nuevamente 600 μ L de agua libre de nucleasas sobre la membrana, centrifugando y colectando el filtrado, como se indica en los pasos 2 y 3. La primera elución presenta mayor concentración de DNA respecto a la segunda elución.

5. El DNA plasmídico purificado se almacena a en tubos estériles de 1,5 mL a -20°C.

4.1.8.4 Cuantificación del DNA plasmídico

La cuantificación del DNA plasmídico se llevo a cabo en NanoDrop (Thermo) según las especificaciones del equipo, en este espectrofotómetro sólo se requiere 1 μ L, las medidas se realizan por triplicado. La lectura de cada muestra se realiza a 260 nm y 280 nm, se obtiene la relación 260 nm/280 nm, la cual debe estar en el rango de 1,8 – 2. Además, para comprobar el tamaño del plásmido se realizan geles de agarosa al 0,7%.

ANEXO 5. TRANSFECCIÓN DE LAS CÉLULAS CAD

Las condiciones de transfección de las células CAD con Lipofectamine® se estandarizaron tras varios ensayos (Tablas A. 5.1 y 5.2), el protocolo que se presenta en el Anexo 5.1 se estableció como el óptimo porque con éste se presenta el menor número de células desprendidas y la mayor sobreexpresión de la proteína DJ-1, según el análisis por WB, la expresión de DJ-1 en células CAD transfectadas bajo estas condiciones corresponde aproximadamente a tres veces respecto a las células CAD no transfectadas y a dos veces en relación a las células transfectadas con el EV. Los ensayos realizados con las neurotoxinas en células transfectadas y los resultados obtenidos y presentados en este estudio en el Capítulo VI se llevaron a cabo con el siguiente protocolo:

5.1 Protocolo de transfección de células CAD

1. Sembrar 200.000 células CAD por pozo en cajas de 6, en medio D-MEM/F12, sin antibiótico, 50 ng/mL de sodio selenita, suplementado con 2% de SFB (Anexo 1). Con el propósito de permitir que las células estén bien adheridas en el momento de la transfección la siembra se debe realizar el día anterior, preferiblemente en horas de la tarde, para que al día siguiente las células se encuentren bien adheridas y la confluencia se mantenga en un 80 %, aproximadamente.
2. Al día siguiente de la siembra, se realiza el proceso de transfección, para cajas de 6 pozos, se establecieron los siguientes parámetros:
 - a. Retirar 1 mL de medio de cada pozo
 - b. Adicionar 500 µL de medio de transfección y sin antibiótico
 - c. La solución de transfección se realizó de la siguiente forma, la cantidad de plásmido optimizada (Tabla A. 5.1), que corresponde a 2 µg, y 2 µL de Plus Reagent® se diluyeron en OptiMem® con un volumen final de 500 µL. Agitar suavemente por inversión e incubar por 5 min a temperatura ambiente.
 - d. Agregar a la solución anterior 5 µL de Lipofectamina LX y agitar vigorosamente e incubar por 20 min a temperatura ambiente, agitar suavemente cada 5 min.
 - e. Agregar a cada pozo 500 µL de la solución anterior, en estos ensayos se trabajo con dos plásmidos el vector vacío (EV:pCDNA3.1) como control de transfección, y el vector para sobreexpresar la proteína humana DJ-1 (DJ-1:-

pCDNA 3.1 DJ-1-WT). A las células control se les adiciona 500 μ L de OptiMem®, con el propósito que todos los tratamientos se realicen con un volumen final de 2 mL.

OPTIMIZACIÓN DE LA TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS CAD			
24 pozos, 500 μL		6 pozos, 2 mL	
Lipofectamine® (μL)	Plásmido (μg)	Lipofectamine® (μL)	Plásmido (μg)
0,5	0,2	2	0,8
	0,5		2
	0,8		3,2
	1		4
1	0,2	4	0,8
	0,5		2
	0,8		3,2
	1		4
1,5	0,2	6	0,8
	0,5		2
	0,8		3,2
	1		4
2	0,2	8	0,8
	0,5		2
	0,8		3,2
	1		4

Tabla A. 5.1 Optimización de la transfección de células CAD. Con el propósito de optimizar las condiciones de transfección en células CAD se probaron diferentes combinaciones de Lipofectamine®: Plásmido en cajas de 24 pozos. Las proporciones con mayor eficiencia aparecen sombreadas en la tabla. Estos resultados fueron tenidos en cuenta para establecer el protocolo de transfección de las células CAD (Anexo 5.1).

PROCEDIMIENTO DE TRANSFECCIÓN EN CÉLULAS CAD DIFERENCIADAS				RESULTADO	
PASO 1	PASO 2	PASO 3	PASO 4	NEGATIVO	POSITIVO
62.500 células CAD sembradas por pozo en cajas de 24, volumen final 500 µL en medio de diferenciación (D-MEN/F12, sin AB, 50 ng/mL)	Al tercer día de diferenciación, retirar todo el medio de diferenciación	Adicionar 300 µL de medio de diferenciación.	No cambiar el medio de transfección	Muerte celular	
		Realizar la dilución del plásmido y la Lipofectamine® en 200 µL de D-MEN/F12 sin AB y sin SFB y adicionar a las células	Cambiar el medio de transfección a las 6 h con medio nuevo sin SFB		
Adicionar 300 µL de medio al 2 % de SFB. Realizar la dilución del plásmido y la Lipofectamine® en 200 µL de D-MEN/F12 sin AB y sin SFB y adicionar a las células	Cambiar el medio de transfección a las 6 h con medio condicionado				
	No retirar el medio de transfección				
	Retirar sólo 200 µL del medio de diferenciación	Realizar la dilución del plásmido y la Lipofectamine® en 200 µL de D-MEN/F12 sin AB y sin SFB y adicionar a las células	No cambiar el medio de transfección	Baja eficiencia de transfección	No se presento muerte celular y las células no se desprendieron
			Retirar 250 µL del medio y adicionar 250 µL de medio de diferenciación		

Tabla A. 5.2 Procedimiento de transfección en células CAD diferenciadas. Con el propósito de establecer las condiciones de transfección de las células CAD diferenciadas se probaron varias formas teniendo en cuenta las recomendaciones del fabricante de la Lipofectamine®, la optimización se llevo a cabo en cajas de 24 pozos. Desafortunadamente, la eficiencia de transfección en células CAD diferenciadas fue muy baja. Tras varios intentos para mejorar la eficiencia de este proceso en células CAD diferenciadas se aumento la concentración de plásmido junto con la concentración de Lipofectamine®, usando una referencia recomendada para células muy sensibles al proceso de transfección, aunque, sí se presentó un aumento en la eficiencia el problema radicó en el aumento del porcentaje de células desprendidas; por tal razón teniendo en cuenta los resultados obtenidos bajo las diferentes condiciones evaluadas se estableció el protocolo presentado en el Anexo 5.1, el cual se realiza en células CAD sembradas en D-MEM/F12 al 2 % de SFB, sin AB y 50 ng/mL de sodio selenita, de esta manera se logro disminuir el desprendimiento de las células CAD y una mayor eficiencia de transfección.

ANEXO 6. WESTERN BLOT

El compromiso de la actividad de la vía PI3K/AKT se analizó por medio de ensayos de WB específicos para las formas fosforilada (Ser 473) y total de la proteína AKT. Así, como la sobreexpresión de la proteína DJ-1. Como control de carga se usó β -actina. La densitometría se realizó usando el software Genius Tools de Syngene.

6.1 Soluciones usadas en Western Blot

Las soluciones usadas para WB fueron preparadas de acuerdo a protocolos previamente establecidos, con algunas modificaciones específicas para este estudio:

6.1.1 Buffer de lisis celular

La elección del *buffer* de lisis depende de las características de la proteína de interés. En este caso el interés se centra en una proteína fosforilada por lo que se escoge Nonidep 40, que por ser un detergente no iónico, posee un bajo nivel de desnaturalización de las proteínas.

Se preparan 10 mL de buffer lisis 2X a partir de soluciones *stock* de cada uno de los componentes como se especifica a continuación:

	Concentración del Stock	Volumen	Concentración 2X
NP40	100%	0,2 mL	2 %
HEPES	250 mM, pH 8,0	2 mL	50 mM, pH 8,0
KCl	0,8 M	5 mL	0,4 M
EDTA	0,5 M	0,4 mL	20 mM
H ₂ O dd		2,4 mL	
Volumen final:		10 mL	

Los volúmenes específicos se mezclaron en un tubo Falcon de 15 mL, y la mezcla se mantuvo a -20°C hasta el momento de su uso.

6.1.2 Cocktail de inhibición enzimático

El *cocktail* de inhibición enzimático consiste en una mezcla de inhibidores de proteasas e inhibidores de fosfatasas, se prepara inmediatamente antes de su uso, a partir de las soluciones *stock* conservadas a -20°C . Los volúmenes se relacionan a continuación:

Cocktail del inhibición	Concentración del Stock	Vol. para 0,5 mL	Conc. Final 2X
Ortovanadato de sodio (Inhibidor de fosfatasas tipo tirosina)	100 mM	10 μL	2mM
NaF (Inhibidor de fosfatasas tipo serina/treonina)	2,5 M	80 μL	250 mM
EDTA (Inhibidor de metaloproteasas)	0,5 M	2 μL	2 mM
Aprotinina (Inhibidor de proteasas tipo serina)	1 mg/mL	3 μL	5 $\mu\text{g/mL}$
Inhibidor de tripsina	1 mg/mL	25 μL	50 $\mu\text{g/mL}$
Benzamidina (Inhibidor de proteasas tipo serina)	100 mM	25 μL	5 mM
H ₂ O dd		343,5 μL	
PMSF (Inhibidor de proteasas tipo serina)	100 mM	20 μL	4 mM
Volumen final:		500 μL	

El PMSF es el último componente que se debe agregar al *cocktail* de inhibición enzimática.

Luego se realiza una mezcla 1:1 de *buffer* de lisis celular: *cocktail* de inhibición enzimático, que es usado para lisar las células y extraer la proteína

6.1.3 Buffer de carga

- Tris 250 mM
- Glicerol 4%
- SDS 5%
- Azul de bromofenol 0,1%
- β -mercaptoetanol 10%
- Urea 8 M

Los componentes se adicionan en las concentraciones indicadas, para un volumen final de 25 mL, y se almacena en un tubo Falcon de 50 mL, la homogenización de los componentes se hace usando vortex; posteriormente el *buffer* se deja en

reposo hasta que la espuma desaparezca, y se conserva a temperatura ambiente, hasta el momento de su uso.

6.1.4 Gel de separación

Para preparar 2 geles se adiciona en el siguiente orden los volúmenes especificados a continuación:

Gel de separación	10%	12%	15%
Mezcla 30% acrilamida:bisacrilamida	3,3 mL	4 mL	4,95 mL
1,5 M TRIS-HCl/0,4 % SDS pH 8,8 (*)	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL
Solución SDS al 10 % p/v (**)	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL
H ₂ O dd	4 mL	3,3 mL	2,35 mL
Solución de APS (persulfato de amonio) al 10% p/v (***)	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL
TEMED	8 µL	8 µL	8 µL

El APS y el TEMED deben ser los últimos componentes en adicionar, ya que son los encargados de la polimerización. Se mezcla con suavidad, se sirven 3 mL entre los vidrios de soporte, y se espera hasta que polimerice la mezcla, aproximadamente 20 min.

(*) Para 250 mL de la solución 1,5M TRIS-HCl/0.4% SDS pH 8.8: Se pesa 45,42 g de TRIS base, 1 g de SDS, y se disuelven en 200 mL de H₂O dd, se ajusta a pH 8.8 con HCl concentrado y se completa con H₂O dd hasta 250 mL, se conserva a 4°C hasta el momento del uso.

(**) Para 50 mL de SDS al 10% p/v se pesan 5 g de SDS y se diluyen en H₂O dd hasta completar 50 mL de disolución.

(***) Para 500 µL de solución de APS al 10% p/v se pesan 50 mg de APS en un vial de 1 mL y se le adicionan 500 µL de H₂O dd (esta solución debe prepararse en el momento de su uso y se debe proteger de la luz).

6.1.5 Gel de concentración

Para preparar 2 geles se adicionan en el siguiente orden los volúmenes especificados a continuación:

Gel de concentración	Volumen
Mezcla 30% acrilamida:bisacrilamida	830 μ L
0,5 M TRIS-HCl/0,4 % SDS pH 6.8 (*)	630 μ L
Solución SDS al 10 % p/v (**)	50 μ L
H ₂ O dd	3,4 mL
Solución de APS (persulfato de amonio) al 10% p/v (***)	50 μ L
TEMED	10 μ L

El APS y el TEMED deben ser los últimos componentes en adicionar, ya que son los encargados de la polimerización. Se mezcla con suavidad, se sirven sobre el gel de separación ya polimerizado hasta el borde final del vidrio y antes de que polimerice se pone la peinilla. Luego se espera la polimerización, aproximadamente 20 min, para retirar la peinilla y lavar los pozos.

(*) Para 100 mL de la solución 0,5 M TRIS-HCl/0,4% SDS pH 6,8: Se pesan 6,05 g de TRIS base, 0,4 g de SDS, se disuelven en 70 mL de H₂O dd, se ajusta a pH 6,8 con HCl concentrado y se completa con H₂O dd hasta 100 mL y se mantiene a 4°C hasta el momento de su uso.

(**) Para 50 mL de SDS al 10% p/v se pesan 5 g de SDS y se diluyen en H₂O dd hasta completar 50 mL de disolución.

(***) Para 500 μ L de solución de APS al 10% p/v se pesan 50 mg de APS en un vial de 1 mL y se le adicionan 500 μ L de H₂O dd (esta solución debe prepararse en el momento de su uso y se debe proteger de la luz).

6.1.5 Buffer de corrido 10X

Para preparar 1 L de este *buffer* se pesan y disuelven en 800 mL de H₂O dd los siguientes compuestos:

Buffer de corrido	Concentración final 10X
TRIS base	227,7 g 188 mM
Glicina	141,13 g 188 mM
SDS	10 g 0,1 % p/v

Luego se lleva a volumen final 1.000 mL con H₂O dd en un balón aforado y se conserva refrigerado a 4°C.

6.1.5.1 Buffer de corrido 1X

Al momento del uso, la solución 10X (Anexo 6.1.5) se disuelve 1:10 con H₂O dd. 100 mL del *buffer* de corrido 10X se completan con H₂O dd hasta 1.000 mL.

6.1.6 Buffer de transferencia 10X

Para prepara 1 L de este *buffer* se pesan y disuelven en 800 mL de H₂O dd los siguientes compuestos:

Buffer de transferencia		Concentración final 10X
TRIS base	30,3 g	250 mM
Glicina	140,4 g	1,87 M

Luego se lleva a volumen final 1.000 mL con H₂O dd en un balón aforado y se conserva refrigerado a 4°C.

6.1.6.1 Buffer de transferencia 1X

Esta solución se prepara al momento de su uso, para lo cual en una probeta de 1.000 mL se toman 100 mL del *buffer* de transferencia 10X (Anexo 6.1.6) y se le adicionan 200 mL de metanol y 700 mL de H₂O dd.

6.1.7 Buffer de lavado: TRIS Buffer Salino (TBS) 10X

Para preparar 1 L de este *buffer* se pesan y disuelven en 800 mL de H₂O dd los siguientes compuestos:

Buffer de lavado TBS		Concentración final 10X
TRIS base	24,23 g	200 mM
NaCl	80,10 g	1.370 mM

Luego se lleva a volumen final 1.000 mL en un balón aforado, se ajusta el pH a 7,6 con HCl concentrado y se conserva refrigerado a 4°C.

6.1.7.1 Buffer de lavado: TRIS Buffer Salino (TBS) 1X

Para preparar 1 L se toman 100 mL de *TBS* 10X (Anexo 6.1.7), se le adicionan 2 mL de Tween 20 (para una concentración final de 0,2% v/v) y se completa a un volumen de 1.000 mL con H₂O dd en un balón aforado o en una probeta.

6.1.8 Buffer de bloqueo

Al momento del uso se preparan 250 mL de esta solución, para lo cual se pesan 12,5 g de leche descremada (para una concentración final de 5% p/v) o 25 g de leche descremada (para una concentración final de 10% p/v) y se disuelven en 200 mL de *buffer* de lavado 1X y se completa hasta 250 mL.

6.1.9 Anticuerpo primario

Los anticuerpos primarios se diluyen en *buffer* de bloqueo, de acuerdo a la estandarización, la dilución se debe realizar justo antes de su uso en tubos Falcon estériles de 50 mL. Los anticuerpos se deben sacar de la nevera en una caja con hielo, sólo se deben abrir en cabina y se manejan con puntas estériles, para evitar que el anticuerpo se contamine. En la siguiente tabla se presentan de forma resumida las especificaciones para la preparación de cada uno de los anticuerpos primarios usados en este estudio.

Anticuerpo primario	Temp.	Dilución	Buffer de bloqueo	Anticuerpo
Anti-Akt-total-rabbit (Cell signaling, 4691)	-20°C	1:1.000	3 mL, 5 %	3 uL
Anti-fosfo-Akt-rabbit (Ser473) (Cell signaling, 4060)	-20°C	1:1.000	3 mL, 5 %	3 uL
Anti-DJ-1-goat (Santa Cruz Biotecnología, sc27006)	4°C	1:200	3 mL, 10 %	15 uL
Anti- β -actina-mouse (Millipore, Mab 1501),	-20°C	1:2.000	3 mL, 10 %	1,5 uL

Tabla A. 6.1 Dilución de anticuerpos primarios

6.1.10 Anticuerpo secundario

Los anticuerpos secundarios se diluyen en *buffer* de bloqueo, de acuerdo a la estandarización, la dilución se debe realizar justo antes de su uso en tubos Falcon estériles de 50 mL. Los anticuerpos se deben sacar de la nevera en una caja con hielo, sólo se deben abrir en cabina y se manejan con puntas estériles, para evitar que el anticuerpo se contamine. En la siguiente tabla se presentan de forma resumida las especificaciones para la preparación de cada uno de los anticuerpos secundarios usados en este estudio.

Anticuerpo secundario	Temp.	Dilución	Buffer de bloqueo	Anticuerpo
Anti-rabbit IgG HRP-linked (Cell signaling, 7074)	-20°C	1:2.000	3 mL, 5 %	1,5 uL
Anti-mouse IgG HRP-linked (Cell signaling, 7076)	-20°C	1:2.000	3 mL, 10 %	1,5 uL
Anti-goat IgG HRP-linked (Santa Cruz Biotecnología, sc2020)	4°C	1:1.500	3 mL, 10 %	2 uL

Tabla A. 6.2 Dilución de anticuerpos secundarios

6.2 Extracción de proteína

Para la preparación de los extractos celulares para los *western blot*, las células se cultivan en cajas de 6 pozos (Anexo 1, Anexo 5) y se les aplican los diferentes tratamientos (Figura A. 6.1) de acuerdo al diseño experimental (Tabla A. 6.3). Luego de cumplidos los tiempos de tratamiento, las cajas se ponen sobre una superficie con hielo y la monocapa celular se remueve con un “*cell scraper*”, y rápidamente las células se colectan en tubos fríos de 1,5 mL, debidamente marcados, este procedimiento se debe hacer siempre en frío y ágilmente. Los tubos se centrifugan en una microcentrifuga refrigerada a 2 °C, a una velocidad de 13.300 rpm durante 5 min, y luego se descarta el sobrenadante y el *pellet* se mantiene en hielo.

Luego, al *pellet* celular se le adicionan 60 µL de una mezcla 1:1 de *buffer* de lisis y *cocktail* de inhibición enzimático (Anexos 6.1.1 y 6.1.2), se resuspende con la pipeta para disgregar el *pellet*, y se mantienen en hielo durante 20 min, ya que cada 5 min se le debe dar vortex a cada muestra. Transcurrido este tiempo las muestras se centrifugan nuevamente a 13.300 rpm durante 10 min en una microcentrifuga refrigerada a 2 °C. Una vez centrifugados los lisados se toman dos alícuotas de 2 µL del sobrenadante para la cuantificación de las proteínas (Anexo 6.3) y el resto se conserva a -70°C hasta el día siguiente cuando se realiza la electroforesis SDS-PAGE. Lo más importante durante la preparación de los lisados celulares y la extracción de proteína es realizar todo en frío y rápidamente.

6.3 Determinación de la concentración de proteína

La cuantificación de la proteína total de cada muestra de los lisados celulares (Anexo 6.2) se realiza por el método del ácido bicinonínico (BCA) que tiene la ventaja de ser un método muy sensible y que tiene muy pocas interferencias ya que es compatible con la mayoría de detergentes iónicos y no iónicos. El ácido bicinonínico, es un compuesto capaz de formar un complejo púrpura intenso

formado por la quelación de dos moléculas de BCA con un ión cuproso. Los iones cuprosos se originan por la reducción de iones cúpricos por las proteínas en medio alcalino.

El color púrpura puede ser analizado espectrofotométricamente, a una longitud de onda de 562 nm y presenta un incremento lineal de absorbancia proporcional a la concentración de proteínas.

Para este ensayo se empleó la relación reactivo: muestra (20:1) recomendada en el kit, y se realizó una curva de calibración con 6 soluciones patrón de trabajo de distinta concentración de albúmina sérica bovina (BSA), desde 0,20 mg/mL hasta 10 mg/mL. Una vez realizada la mezcla de reactivos de BCA, se sirven 40 μ L de la mezcla y 2 μ L de cada muestra o de los patrones, esto se realiza en tubos para PCR, luego los tubos se incuban a 37°C en una incubadora o termociclador y al cabo de este tiempo se realiza la medida de la absorbancia en el NanoDrop (Thermo). La curva y la muestra se montan por duplicado, lo ideal es realizarlo por triplicado.

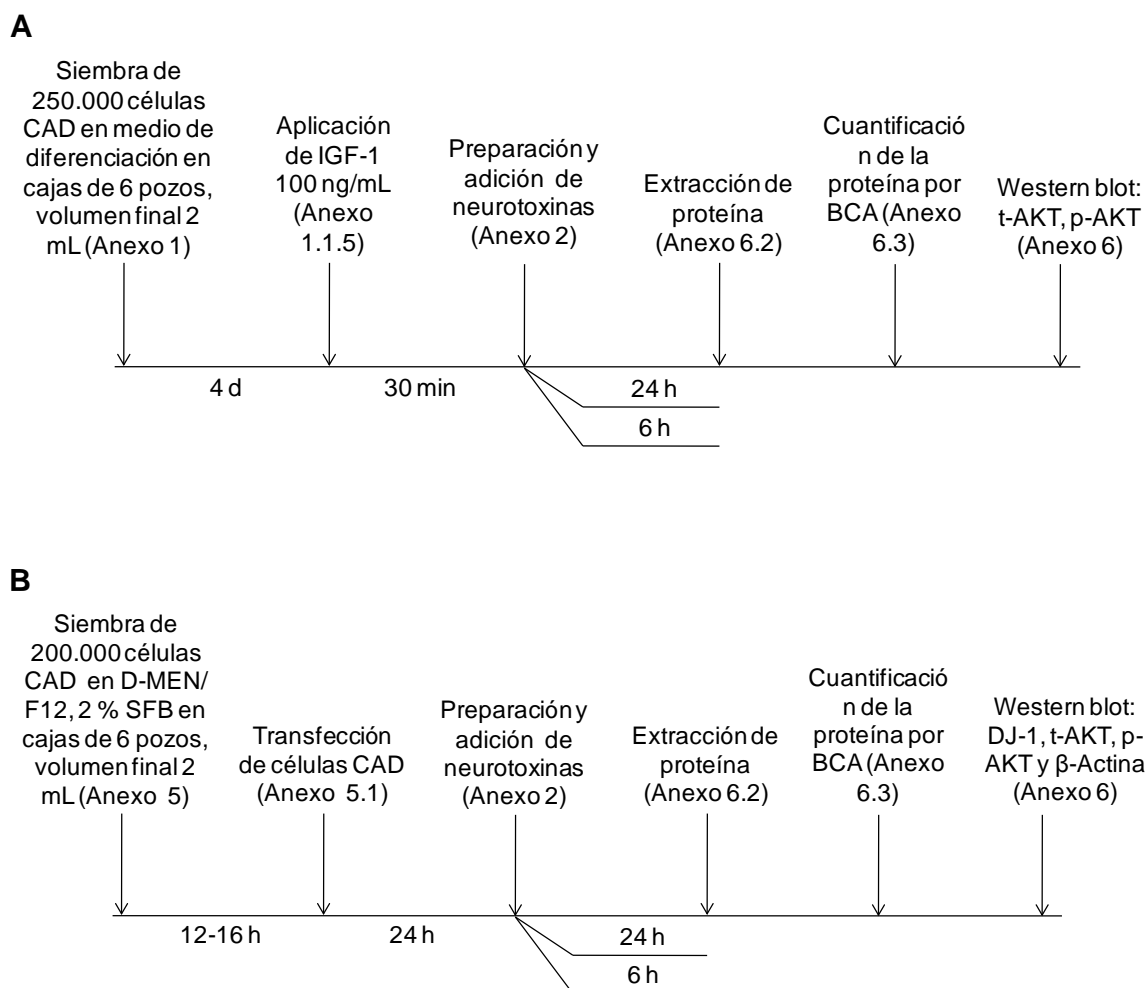


Figura A. 6.1 Esquema de los tratamientos en células CAD para posterior análisis por WB. El esquema señala cada uno de los pasos que se siguieron para los análisis por WB. A. Esquema para el análisis por WB del efecto de las neurotoxinas (rotenona, 6-OHDA y C2-ceramida) y su relación con la vía PI3K/AKT en células CAD diferenciadas, Capítulo V. B. Esquema para el análisis por WB de la relación de DJ-1 con la vía PI3K/AKT frente a neurotoxinas (rotenona, 6-OHDA y C2-ceramida) en células CAD que sobreexpresan la proteína DJ-1 WT humana, Capítulo VI.

**EFFECTO DE LAS NEUROTOXINAS, ROTENONA, C2-CERAMIDA Y 6-OHDA
EN LA VÍA PI3K/AKT**

TRATAMIENTO	DESCRIPCIÓN
Control	Células CAD diferenciadas, 4 d
IGF-1 6 h	Células CAD diferenciadas, 4 d. Tratadas con IGF-1 100 ng/mL por 6 h y 30 min
Rot 5 μ M 6 h	Células CAD diferenciadas, 4 d. Tratadas con rotenona 5 μ M por 6 h
IGF-1 + Rot 5 μ M 6 h	Células CAD diferenciadas, 4 d. Pre-tratamiento con IGF-1 100 ng/mL por 30 min y luego tratadas con rotenona 5 μ M por 6 h
Rot 25 μ M 6 h	Células CAD diferenciadas, 4 d. Tratadas con rotenona 25 μ M por 6 h
Rot 5 μ M 6 h	Células CAD diferenciadas, 4 d. Tratadas con rotenona 5 μ M por 6 h
Rot 1 μ M 6 h	Células CAD diferenciadas, 4 d. Tratadas con rotenona 1 μ M por 6 h
Rot 500 nM 6h	Células CAD diferenciadas, 4 d. Tratadas con rotenona 500 nM por 6 h
Rot 250 nM 6h	Células CAD diferenciadas, 4 d. Tratadas con rotenona 250 nM por 6 h
Rot 50 nM 6h	Células CAD diferenciadas, 4 d. Tratadas con rotenona 50 nM por 6 h
IGF-1 24 h	Células CAD diferenciadas, 4 d. Tratadas con IGF-1 100 ng/mL por 24 h y 30 min
Rot 500 nM 24 h	Células CAD diferenciadas, 4 d. Tratadas con rotenona 500 nM por 24 h
IGF-1 + Rot 500 nM 24 h	Células CAD diferenciadas, 4 d. Pre-tratamiento con IGF-1 100 ng/mL por 30 min y luego tratadas con rotenona 500 nM por 24 h
Cer 25 μ M 6 h	Células CAD diferenciadas, 4 d. Tratadas con C2-ceramida 25 μ M por 6 h
IGF-1 + Cer 25 μ M 6 h	Células CAD diferenciadas, 4 d. Pre-tratamiento con IGF-1 100 ng/mL por 30 min y luego tratadas con C2-ceramida 25 μ M por 6 h
Veh.	Células CAD diferenciadas, 4 d con 40 μ L de Ác. Asc. 0,15% por 6 h (Vehículo de la 6-OHDA)
IGF -1 + Veh.	Células CAD diferenciadas, 4 d. Pre-tratamiento con IGF-1 100 ng/mL por 30 min y luego se les adicionan 40 μ L de Ác. Asc. 0,15 % que es el vehículo de la 6-OHDA
IGF-1 + 6-OHDA 100 μ M 6 h	Células CAD diferenciadas, 4 d. Pre-tratamiento con IGF-1 100 ng/mL por 30 min y luego tratadas con 6-OHDA 100 μ M por 6 h
IGF-1 + 6-OHDA 50 μ M 6 h	Células CAD diferenciadas, 4 d. Pre-tratamiento con IGF-1 100 ng/mL por 30 min y luego tratadas con 6-OHDA 50 μ M por 6 h
6-OHDA 100 μ M 6 h	Células CAD diferenciadas, 4 d. Tratadas con 6-OHDA 100 μ M por 6 h
6-OHDA 50 μ M 6 h	Células CAD diferenciadas, 4 d. Tratadas con 6-OHDA 50 μ M por 6 h
CAD sin diferenciar	Células CAD sin diferenciar, extractos de proteína hechos de células que estaban siendo cultivadas en medio con 10 % de SFB

Tabla A. 6.3 Descripción de los tratamientos realizados para el análisis por western blot del efecto de las neurotoxinas rotenona, C2-ceramida y 6-OHDA en células CAD diferenciadas. Los datos que se presentan en los resultados del capítulo V corresponden a un WB representativo de tres experimentos independientes.

RELACIÓN DE DJ-1 CON LA VÍA PI3/AKT EN UN CONTEXTO NEUROTÓXICO	
Control	Células CAD cultivadas en D-MEN/F12 suplementado con 2 % SFB, sin AB y 50 ng/mL de sodio selenita
DJ-1 48h	Células CAD transfectadas con el vector pCDNA3.1 DJ-1-WT, 48 h después de la transfección
EV 48 h	Células CAD transfectadas con el vector vacío pCDNA3.1, 48 h después de la transfección, control de la transfección
Rot 24 h	Células CAD cultivadas en D-MEN/F12 suplementado con 2 % SFB y tratadas con rotenona 500 nM por 24 h
DJ-1 + Rot 24 h	Células CAD transfectadas con el vector pCDNA3.1 DJ-1-WT, 24 h después de la transfección son tratadas con rotenona 500 nM por 24 h
EV + Rot 24 h	Células CAD transfectadas con el vector vacío pCDNA3.1, 24 h después de la transfección son tratadas con rotenona 500 nM por 24 h
IGF-1 24 h	Células CAD cultivadas en D-MEN/F12 suplementado con 2 % SFB y tratadas con IGF-1 100 ng/mL como control de la activación por fosforilación de la proteína AKT
DJ-1 + 6-OHDA	Células CAD transfectadas con el vector pCDNA3.1 DJ-1-WT, 42 h después de la transfección son tratadas con 6-OHDA 100 μ M por 6 h
EV + 6-OHDA	Células CAD transfectadas con el vector vacío pCDNA3.1, 42 h después de la transfección son tratadas con 6-OHDA 100 μ M por 6 h
DJ-1 + Cer.	Células CAD transfectadas con el vector pCDNA3.1 DJ-1-WT, 42 h después de la transfección son tratadas con C2-ceramida 25 μ M por 6 h
EV + Cer.	Células CAD transfectadas con el vector vacío pCDNA3.1, 42 h después de la transfección son tratadas con C2-ceramida 25 μ M por 6 h

Tabla A. 6.4 Descripción de los tratamientos realizados para el análisis por western blot de la relación de DJ-1 con la vía PI3K/AKT en un contexto neurotóxico en células CAD transfectadas con DJ-1-WT humano. Los datos que se presentan en los resultados del capítulo VI corresponden a un WB representativo de tres experimentos independientes.

6.4 Electroforesis en geles denaturantes de poliacrilamida

Este procedimiento se realiza en un sistema miniprotean3 de *Biorad*. Los lisados (Anexo 6.2) se descongelan y se mantienen en hielo picado. Con los datos de la concentración de proteína de cada muestra, se realizan los cálculos para determinar el volumen de muestra que equivale a 30 µg de proteína, el cual se completaba con buffer de carga (Anexo 6.1.3) hasta un volumen final de 25 µL. La mezcla se realiza en tubos para PCR, y luego se desnaturaliza calentando a 95 °C durante 10 min en un termociclador, cuando el ciclo termina se ponen en hielo.

Posteriormente los tubos que contienen la mezcla se centrifugan por 15 seg en una microcentrífuga, se retornan a la cubeta con hielo y se sirven en los pozos de los geles previamente realizados, el gel de separación se debe realizar al porcentaje adecuado 10 %, 12 % o 15 % de acrilamida/bisacrilamida, según corresponda dependiendo del tamaño de la proteína de interés (Anexo 6.1.4 y 6.1.5). El primer carril corresponde al marcador de peso molecular, (200 – 6,5 kDa), una mezcla de 2,5 µL de *Kaleidoscope Prestained Standard* con 20 µL de *buffer* de carga. Se realiza el montaje de la cámara de electroforesis con *buffer* de corrido 1X (Anexo 6.1.5.1). Las muestras se corren inicialmente en el gel de concentración (Anexo 6.1.5) a 50 voltios durante 45 min y una vez se encuentran alineadas, se aumenta el voltaje hasta 100 voltios y se corren en el gel de separación durante 90 min.

6.5 Transferencia a membranas de nitrocelulosa

Luego de la electroforesis, se desmonta la cámara y se retira el gel de concentración. Los geles de separación junto con los materiales usados en la transferencia (papel de nitrocelulosa, esponjas y papel filtro) se equilibran en *buffer* de transferencia 1X (Anexo 6.1.6.1) durante 30 min.

La transferencia se realiza a 100 voltios, 300 Ma durante 90 min. Dentro de la cámara se coloca un bloque de hielo y un agitador magnético para mantener frío el sistema y asegurar la recirculación del *buffer* de transferencia 1X.

6.6. Detección de proteínas

Para comprobar la eficiencia de la transferencia se observa el patrón de bandas del marcador de peso molecular en la membrana de nitrocelulosa; luego de esto, las membranas se incuban en *buffer* de bloqueo 10 % (Anexo 6.1.8) durante 45 min y se ponen en contacto con el anticuerpo primario (Anexo 6.1.9) incubándolas toda la noche a 4 °C en un rotador de tubos. Al cabo de este tiempo se realizan 3

lavados de 15 min cada uno, en *buffer* de lavado TBS 1X (Anexo 6.1.7.1) y se ponen a incubar con el anticuerpo secundario (Anexo 6.1.10) durante 1 h a temperatura ambiente. Luego las membranas se lavan nuevamente 3 veces con *buffer* de lavado TBS 1X ,y se procede a detectar las proteínas de interés usando el kit de quimioluminiscencia ECL *Amersham* siguiendo las instrucciones del fabricante, para ser expuestas en oscuridad a la película de revelado durante 5 min en el caso de el t-Akt, 15 min para el p-Akt, 5 min para DJ-1 y 30 seg para β -Actina. Una vez cumplido el tiempo de exposición se revelan en un equipo *Konica Medical Film Processor*. El análisis de las bandas se hace con un sistema documentador de geles, *Genius Syngen*. Para capturar las imágenes se usó el software *GeneSnap* y para el análisis densitométrico de las bandas se usó *GeneTools*.

6.7 Limpieza de membranas luego de western blot para re-análisis

1. Asegurarse de que las membranas nunca se sequen.
2. Lavar la membrana dos veces en PBS-Tween 0.2 % (Anexo 1.1.2) o en TBS Tween 2 % (Anexo 6.1.7.1) antes de la limpieza de los anticuerpos.
3. Colocar las membranas en 50 mL de *buffer* de limpieza (Anexo 6.6.1) en un contenedor sellado. El *buffer* siempre debe ser fresco.
4. Sumerja parcialmente el contenedor en baño de agua a 50 °C por 15 min, agitando ocasionalmente.
5. Luego de la limpieza, volver a lavar las membranas 3 o 4 veces con PBS-Tween 0.2 % (Anexo 1.1.2) o en TBS Tween 2 % (Anexo 6.1.7.1).
6. Bloquee en *buffer* de bloqueo 5 % (Anexo 6.1.8) y continúe con el WB normalmente.
7. Tratar de utilizar un anticuerpo secundario diferente la segunda vez que se pruebe.

6.7.1 Buffer de limpieza

Este *buffer* debe ser fresco

Stock	Volumen	Concentración final
10 % SDS	10 mL	2% SDS
1 M TRIS, pH 6,8	3,125 mL	62,5 mM TRIS, pH 6,8
β -mercaptoetanol	0,353 mL	100 mM β -mercaptoetanol
H2O dd	36,5 mL	

ANEXO 7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis de resultados se realizó mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido por una prueba de *t* de student. Para tales análisis se uso el software Graph Pad Prism Demo 5. Todos los datos se presentan como promedio \pm desviación estándar (DE).

7.1 Rotenona MTT

Tratamientos con rotenona MTT. Tres experimentos independientes							
	0 nM	50 nM	250 nM	500 nM	1 μ M	5 μ M	25 μ M
6 h	98,00	101,23	91,13	86,08	76,25	61,23	35,34
	102,00	110,29	91,18	93,14	90,20	65,52	38,73
	100,00	84,84	81,59	99,64	82,58	64,08	43,05
24 h	98,00	60,97	67,06	50,61	51,13	27,57	19,55
	102,00	80,88	64,87	67,65	62,75	33,82	22,06
	100,00	88,09	69,68	71,66	62,45	46,21	31,59
48 h	98,00	63,43	54,24	45,57	35,08	17,61	13,72
	102,00	60,78	57,35	52,45	48,37	20,75	17,97
	100,00	86,82	62,27	59,03	52,53	40,25	22,56

<i>Prueba t de student , 95% intervalo de confianza, dos colas</i>		<i>P value</i>
6 h	0 nM Vs. 50 nM	0,88 ns
	0 nM Vs. 250 nM	0,0238 ns
	0 nM Vs. 500 nM	0,1593 ns
	0 nM Vs. 1 μ M	0,0275 *
	0 nM Vs. 5 μ M	< 0.0001 **
	0 nM Vs. 25 μ M	0,0011 **
24 h	0 nM Vs. 50 nM	0,0463 *
	0 nM Vs. 250 nM	0,0044 **
	0 nM Vs. 500 nM	0,005 **
	0 nM Vs. 1 μ M	0,0005 ***
	0 nM Vs. 5 μ M	< 0.0001 ***
	0 nM Vs. 25 μ M	< 0.0001 ***
48 h	0 nM Vs. 50 nM	0,0238 *
	0 nM Vs. 250 nM	< 0.0001 ***
	0 nM Vs. 500 nM	< 0.0001 ***
	0 nM Vs. 1 μ M	< 0.0001 ***
	0 nM Vs. 5 μ M	< 0.0001 ***
	0 nM Vs. 25 μ M	< 0.0001 ***

7.2 Rotenona LDH

Tratamientos con rotenona LDH. Tres experimentos independientes								
	Control Muerte	0 nM	50 nM	250 nM	500 nM	1 μ M	5 μ M	25 μ M
24 h	94,2	28,92	25,52	25,52	41	42,4	54,24	63,92
	103,6	32	32,24	32,24	36,64	39,56	57,08	64,04
	102,2	33,76	39,56	39,56	40,08	38,64	48,04	71,84
48 h	94,2	28,92	42,24	42,52	43,64	43,04	52,04	79,28
	103,6	32	35,56	35,56	36,36	48,44	55,28	76,36
	102,2	33,76	37,24	40,68	47,08	40,04	58,88	71,76
72 h	94,2	28,92	39,88	40,8	51,84	54,8	75,48	91,84
	103,56	32	48,04	43,96	48,04	54,24	71,92	72,6
	102,24	33,76	40,72	48,2	41,24	47,56	68,72	79,52

<i>Prueba t de student , 95% intervalo de confianza, dos colas</i>				<i>P value</i>	
24 h	0 nM	Vs.	50 nM	0,8476	ns
	0 nM	Vs.	250 nM	0,8476	ns
	0 nM	Vs.	500 nM	0,1593	ns
	0 nM	Vs.	1 μ M	0,0275	*
	0 nM	Vs.	5 μ M	< 0.0001	***
	0 nM	Vs.	25 μ M	< 0.0001	***
48 h	0 nM	Vs.	50 nM	0,0506	ns
	0 nM	Vs.	250 nM	0,0333	**
	0 nM	Vs.	500 nM	0,0355	*
	0 nM	Vs.	1 μ M	0,0123	*
	0 nM	Vs.	5 μ M	0,0006	***
	0 nM	Vs.	25 μ M	0,0077	**
72 h	0 nM	Vs.	50 nM	0,0185	*
	0 nM	Vs.	250 nM	0,0077	**
	0 nM	Vs.	500 nM	0,0105	*
	0 nM	Vs.	1 μ M	0,0016	**
	0 nM	Vs.	5 μ M	< 0.0001	***
	0 nM	Vs.	25 μ M	0,001	**

7.3 6-OHDA MTT

Tratamiento con 6-OHDA MTT. Tres experimentos independientes							
	Control	Ac. Asc. 0,15%	25 µM	50 µM	100 µM	150 µM	200 µM
24 h	0,757	0,88	0,519	0,45	0,439	0,366	0,36
	0,874	0,94	0,608	0,48	0,486	0,338	0,33
	0,954	0,83	0,506	0,47	0,449	0,399	0,35
	0,919						
	0,933						
	0,823						
48 h	0,757	0,864	0,38	0,17	0,205	0,271	0,288
	0,874	0,815	0,41	0,132	0,222	0,301	0,303
	0,954	0,84	0,31	0,151	0,206	0,283	0,287
	0,919						
	0,933						
	0,823						
72 h	0,757	0,743	0,33	0,174	0,165	0,182	0,213
	0,874	0,779	0,293	0,176	0,15	0,178	0,188
	0,954	0,72	0,274	0,206	0,171	0,201	0,224
	0,919						
	0,933						
	0,823						
<i>Prueba t de student , 95% intervalo de confianza, dos colas</i>				<i>P value</i>			
24 h	Control	Vs.	Ac. Asc. 0,15%	0,8965			
	Ac. Asc. 0,15%	Vs.	25 µM	0,0017	**		
	Ac. Asc. 0,15%	Vs.	50 µM	0,0002	***		
	Ac. Asc. 0,15%	Vs.	100 µM	< 0.0001	***		
	Ac. Asc. 0,15%	Vs.	150 µM	< 0.0001	***		
	Ac. Asc. 0,15%	Vs.	200 µM	< 0.0001	***		
48 h	Control	Vs.	Ac. Asc. 0,15%	0,4457			
	Ac. Asc. 0,15%	Vs.	25 µM	0,0001	***		
	Ac. Asc. 0,15%	Vs.	50 µM	< 0.0001	***		
	Ac. Asc. 0,15%	Vs.	100 µM	< 0.0001	***		
	Ac. Asc. 0,15%	Vs.	150 µM	< 0.0001	***		
	Ac. Asc. 0,15%	Vs.	200 µM	< 0.0001	***		

Prueba t de student , 95% intervalo de confianza, dos colas				P value	
72 h	Control	Vs.	Ac. Asc. 0,15%	0,0266	
	Ac. Asc. 0,15%	Vs.	25 µM	< 0.0001	***
	Ac. Asc. 0,15%	Vs.	50 µM	< 0.0001	***
	Ac. Asc. 0,15%	Vs.	100 µM	< 0.0001	***
	Ac. Asc. 0,15%	Vs.	150 µM	< 0.0001	***
	Ac. Asc. 0,15%	Vs.	200 µM	< 0.0001	***

7.4 Efecto de la rotenona sobre % p-AKT (Ser 473)/t-AKT

% (p-AKT (Ser 473) / t-AKT. Tres experimentos independientes						
Control	IGF-1 6 h	IGF-1 + Rot 5µM 6 h	Rot 5 µM 6h	IGF-1 24 h	IGF-1 + Rot 500 nM 24 h	Rot 500 nM 24 h
110	142,1186	152,3267	111,2917	134	120,5253	66,34586
90	165,4076	169,4769	116,1589	148,4337	121,2604	48,11778
100	182	158,3589	109,2963	161,5682	119,7901	84,57393
Prueba t de student, 95% intervalo de confianza, dos colas				P value		
Control		Vs.	IGF-1 6 h		0,0081	**
Control		Vs.	IGF-1 Rot 5 µM 6h		0,0014	**
Control		Vs.	Rot 5 µM 6h		0,116	ns
Control		Vs.	IGF-1 24 h		0,0082	**
Control		Vs.	Rot 500 nM 24 h		0,0486	*
Control		Vs.	IGF-1 + Rot 500 nM 24 h		0,0239	*
IGF-1 24 h		Vs.	IGF-1 + Rot 500 nM 24 h		0,0261	*
IGF-1 + Rot 500 nM 24 h		Vs.	Rot 500 nM 24 h		0,0068	**

7.5 Sobreexpresión de DJ-1 en células CAD

Densitometría de tres experimentos independientes			
	Control	DJ-1 48 h	EV 48 h
% DJ-1/ B-Actina	99,798	175,044	124,070
	92,623	196,151	95,266
	108,155	209,360	147,615
	100,000	379,273	179,653
Prueba t de student , 95% intervalo de confianza, dos colas			P value
Control Vs. DJ-1 48 h			0,025 *
Control Vs. EV 48 h			0,912 ns
DJ-1 48 h Vs. EV 48 h			0,0856 ns