



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Análisis del efecto neuroprotector de agonistas de receptores nucleares en modelo farmacológico de Parkinson en neuronas dopaminérgicas

Angela María Rodríguez Muñoz

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina, Maestría de Neurociencias
Bogotá, Colombia

2019

Análisis del efecto neuroprotector de agonistas de receptores nucleares en modelo farmacológico de Parkinson en neuronas dopaminérgicas

Angela María Rodríguez Muñoz

Tesis presentada como requisito para optar al título de:
Magister en Neurociencias

Director:

Gonzalo Humberto Arboleda Bustos MD, MSc, PhD

Codirector

Adrián Gabriel Sandoval Hernández MSc, PhD

Línea de Investigación:

Enfermedades Neurodegenerativa

Grupo de Investigación:

Muerte Celular, Universidad Nacional de Colombia

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina, Maestría de Neurociencias

Bogotá, Colombia

2019

A mi familia.

A *Ramphastidae*, la luz que me guía.

“Eres mi rodopsina”

Agradecimientos

Quiero empezar agradeciendo al Doctor Gonzalo Humberto Arboleda por la oportunidad de unirme a su grupo de investigación, por su tiempo y dedicación no solo al desarrollo de este trabajo sino a la formación constante que realiza, quiero agradecerle el contagiarme su pasión por la investigación.

Del mismo modo quiero agradecerle a mi codirector Adrián Sandoval por su apoyo en la formación por sus consejos y enseñanzas que permitieron adquirir las habilidades necesarias para el desarrollo de esta tesis.

Le agradezco a la Universidad Nacional y al Instituto de Genética Humana por poner a mi disposición todos los recursos físicos, técnicos y humanos para el desarrollo de este trabajo. Le doy las gracias a todo el personal administrativo, muy especialmente a Magda por su paciencia y por el acompañamiento que realizo desde el mismo momento tuve la intención de iniciar el programa de Maestría.

Así mismo, agradezco al profesor Belfran por su tiempo, sus consejos invaluable, por el apoyo en los momentos de duda, su generosidad y amabilidad.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio en especial a los del grupo de Muerte Celular: Gonzalo Aguilar, Jennifer Caicedo, Tatiana Báez, Estefanía Valencia, todos en algún punto en el desarrollo de este trabajo se involucraron y fueron un gran apoyo, les estoy infinitamente agradecida

También quiero agradecerles a las personas que no están en el laboratorio, pero que me han apoyado con su tiempo, son mis compañeros de trabajo en Hospital Cardiovascular de Cundinamarca y a mis amigos que se han convertido en parte de mi familia, que han sido incondicionales: Laura Quiroga, Néstor Castro, Norma González mis mejores amigos, soy afortunada de contar personas como ellos.

Resumen

La enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda patología neurodegenerativa más prevalente a nivel mundial se caracteriza por la muerte sistemática de las neuronas de la SNpc, la cual se ha vinculado al estrés oxidativo y la difusión mitocondrial. Diferentes estudios han demostrado que la deficiencia de PINK1, una quinasa tipo serina/treonina que fosforila a AKT, causa una mayor susceptibilidad a estímulos nocivos acelerando el proceso de muerte celular. Los agonistas de receptores nucleares LXR y RXR tienen efectos neuroprotectores en modelos *in vitro/ in vivo* de Parkinson, sin embargo, el mecanismo por el cual ejerce dicha protección no es claro. Estudios previos han encontrado que un agonista de receptor nuclear, el GW3965, promueve un aumento en la expresión de PINK1, lo cual abre la posibilidad que este agonista de RN pueda tener un rol importante en la supervivencia neuronal, limitando el daño asociado a diversas neurotoxinas. Al mismo tiempo ha cobrado relevancia la actividad agonista de algunos extractos vegetales, como *Zanthoxylum rigidum* y *Beilschmiedia costarricense*, sobre el LXR y su posible acción neuroprotectora. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto neuroprotector de agonistas de receptores nucleares, incluido los extractos vegetales, en un modelo farmacológico de Parkinson inducido con MPP+ en neuronas dopaminérgicas (CAD-SHSY5Y).

Se observó un incremento significativo ($p < 0,001$) en la supervivencia celular luego de realizar un pretratamiento con agonistas de LXR y RXR, dicha neuroprotección se asoció al incremento en p-AKT y PINK1. Al realizar el silenciamiento de PINK1 la protección previamente presentada se anula lo que demuestra la relevancia de PINK1 en la protección encontrada por el uso de agonistas de LXR y RXR. Frente al uso de extractos vegetales se encontraron resultados similares a los obtenidos con los agonistas sintéticos, sin embargo, en el caso *Beilschmiedia costarricense* el incremento en la expresión de PINK1 y p-AKT fue mayor a los agonistas sintéticos. Esto permite concluir que la función protectora de los agonistas de los receptores nucleares LXR y RXR puede estar asociada al incremento de PINK1 y a su vez en el aumento en la activación de la vía AKT.

Palabras clave: Enfermedad de Parkinson, receptores nucleares, LXR, RXR, PINK1

Abstract

Parkinson's disease (PD) is the second most prevalent neurodegenerative pathology in the world characterized by the systematic death of SNpc neurons, which has been linked to oxidative stress and mitochondrial difusión. Different studies have shown that the deficiency of PINK1, a serine / threonine kinase that phosphorylates AKT, causes greater susceptibility to harmful stimuli by accelerating the process of cell death. The LXR and RXR nuclear receptor agonists have neuroprotective effects in Parkinson's *in vitro* / *in vivo* models, however, the mechanism by which it exerts such protection is unclear. Previous studies have found that a nuclear receptor agonist, the GW3965, promotes an increase in the expression of PINK1, which opens the possibility that this RN agonist may have an important role in neuronal survival, limiting the damage associated with various neurotoxins. At the same time, the agonist activity of some plant extracts, such as *Zanthoxylum rigidum* and *Beilschmiedia costarricense*, on the LXR and its possible neuroprotective action has become relevant. The objective of this work was to evaluate the neuroprotective effect of nuclear receptor agonists, including plant extracts, in a pharmacological model of Parkinson's induced with MPP + in dopaminergic neurons (CAD-SHSY5Y).

A significant increase ($p < 0.001$) in cell survival was observed after pretreatment with LXR and RXR agonists, this suggest that neuroprotection was associated with the increase in p-AKT and PINK1. When the PINK1 is silenced, the previously presented protection is annulled, which demonstrates the relevance of PINK1 in the protection found by the use of LXR and RXR agonists. Compared to the use of plant extracts, results similar to those obtained with synthetic agonists were found, however, in the case of *Beilschmiedia costarricense*, the increase in the expression of PINK1 and p-AKT was greater than synthetic agonists. This allows concluding that the protective function of the agonists of the nuclear receptors LXR and RXR may be associated with the increase in PINK1 and turn in the increase in the activation of the AKT pathway.

Keywords: Parkinson disease, nuclear receptor, LXR, RXR, PINK1

Contenido

Pág.

Tabla de contenido

1.1	OBJETIVOS.....	3
1.1.1	Objetivo General:	3
1.1.2	Objetivos Específicos:	3
2.	CAPITULO: ESTADO DEL ARTE.....	5
2.1	ENFERMEDAD DE PARKINSON:	5
2.2	AKT EN EL CONTEXTO DE LA EP:.....	7
2.3	QUINASA INDUCIDA POR PTEN 1 (PINK1). Función protectora:	7
2.4	RECEPTORES NUCLEARES	10
2.2.1.	Receptores Nucleares en la Enfermedad de Parkinson.....	11
2.5	EXTRACTOS VEGETALES.....	13
2.6	TOXINAS.....	15
2.6.1	MPTP.....	15
2.6.2.	Paraquat	15
3.	CAPITULO: METODOLOGÍA.....	17
3.1	Líneas celulares.....	17
3.1.1	Células CAD.....	17
3.1.2	Células SHSY5Y	17
3.2	Extractos Vegetales:.....	18
3.1.3	Todos los extractos vegetales fueron donados por el laboratorio de productos naturales del profesor MSc PhD Luis Enrique Cuca del departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia.	18
3.3.	Ensayo de proliferación celular MTT.....	19
3.4.	Ensayo colorimétrico de citotoxicidad LDH.....	21
3.5.	Western blot	21
3.6.	Transfección de células con Lipofectamina 3000.....	23
4.	CAPITULO: RESULTADOS.....	25
4.1.	NEUROPROTECCIÓN.....	25
4.1.1	Ensayos de Viabilidad: <i>Tamizaje de extractos vegetales</i>	25
4.1.1.1	Evaluación: <i>Neuroprotección de extractos vegetales frente a la toxina PQ en línea SH HY5Y y CAD</i>	32
4.1.2	Resultados neuroprotección de agonistas farmacológicos y extractos vegetales.	40
4.1.2.1	NEUROPROTECCIÓN DE AGONISTAS DE RECEPTORES NUCLEARES RXR Y LXR FRENTE A LAS TOXINAS MPP+ Y PQ.	41
4.1.2.2	NEUROPROTECCIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES FRENTE A LAS TOXINAS MPP+ Y PQ.....	44

4.2. Resultados de la activación de AKT	48
4.2.1 Cuantificación: <i>Activación de AKT mediada por los agonistas farmacológicos.</i> 48	
4.2.2 Cuantificación: <i>Activación de AKT mediada por los extractos vegetales.</i>	49
4.3. Objetivo Específico: Expresión de PINK1 y su función protectora	51
4.3.1 Cuantificación: <i>Expresión de PINK1 mediada por los agonistas farmacológicos.</i> 51	
4.3.2 Cuantificación: <i>Expresión de PINK1 mediada por los extractos vegetales.</i>	52
4.3.3. Silenciamiento de PINK1	53
Figura 4.34.	54
Figura 4.35 Resultado de MTT: Efecto	55
4.1.3 4.3.4. Efectos del silenciamiento de PINK1 sobre la Viabilidad celular	55
5. CAPITULO. DISCUSIÓN	59
6. CAPÍTULO. ANEXOS	62
6.1 Anexo A. Evaluación dosis de respuesta a diferentes tiempos (1-6-12-24).	62
A B.....	67
C D.....	67
C D.....	68
E F.....	68
6.2 Anexo D. Ensayo de LDH neuroprotección realizada con agonistas farmacológicos y extractos vegetales en las líneas celulares CAD y SHSH5Y	71
6.3 Anexo B. Materiales	73
7. Conclusiones y recomendaciones.....	79
7.1 Conclusiones.....	79
7.2 Recomendaciones.....	79
8. REFERENCIA BIBLIOGRAFICAS.....	81

Índice de Figuras

Figura 1-1: Mecanismos moleculares clave que contribuyen al proceso de neurodegeneración de las neuronas dopaminérgicas en la enfermedad de Parkinson.

Figura 1-2. Esquema que representa los dominios estructurales de la proteína PINK1.

Figura 1-3. Representación de las vías de señalización involucradas en la disfunción mitocondrial en la EP.

Figura 1-4: Dominios de un receptor nuclear.

Figura 1-1: Neuroprotección dada por GW3965 en las líneas celulares CAD y SH-SY5Y frente al PQ.

Figura 4-2: Neuroprotección dada por GW3965 en las líneas celulares CAD y SH-SY5Y frente al MPP+.

Figura 4.3 Neuroprotección dada por Bexaroteno en las líneas celulares CAD y SH-SY5Y frente al PQ.

Figura 4.4. Neuroprotección dada por Bexaroteno en las líneas celulares CAD y SH-SY5Y frente al MPP+.

Figura 4.5 Neuroprotección dada por *Zanthoxylum rigidium* (hojas) en las líneas celulares CAD y SH-SY5Y frente al PQ.

Figura 4.6 Neuroprotección dada por *Zanthoxylum rigidium* (hojas) en las líneas celulares CAD y SH-SY5Y frente al MPP+.

Figura 4.7. Neuroprotección dada por *Beilschmiedia costarricense* en las líneas celulares CAD y SH-SY5Y frente al PQ.

Figura 4.8 Neuroprotección dada por *Beilschmiedia costarricense* en las líneas celulares CAD y SH-SY5Y frente al MPP+.

Figura 4.9 Expresión de AKT en la línea CAD extractos vegetales.

Figura 4.10 Expresión de AKT en la línea SH SY5Y extractos vegetales.

Figura 4.11 Expresión de AKT en línea CAD con agonistas farmacológicos.

Figura 4.12 Expresión de AKT en línea SH SY5Y con agonistas farmacológicos.

Figura 4.13 Expresión de PINK1 en la línea CAD con extractos vegetales.

Figura 4.14. Expresión de PINK1 en la línea SH SY5Y con extractos vegetales.

Figura 4.15. Expresión de PINK1 en la línea CAD con agonistas farmacológicos.

Figura 4.16. Expresión de PINK1 en la línea SH SY5Y con agonistas farmacológicos.

Figura 4.17. Cuantificación del silenciamiento de PINK1.

Figura 4.18 Efecto de la toxina MPP+ sobre la viabilidad en CAD sh Control vs shPINK1 en el contexto del silenciamiento de PINK1.

Figura 4.19 Neuroprotección de agonistas farmacológicos y extractos vegetales frente al MPP+.

Figura A1.A Extractos de la Familia Lauraceae probados en la línea celular CAD.

Figura A1.B Extractos de la Familia Myristicaceae (A, B) y Piperaceae (C) probados en la línea celular CAD.

Figura A1.C Extractos de la Familia Rutaceae probados en la línea celular CAD.

Figura A2.A Extractos de la Familia Lauraceae probados en la línea celular SH SY 5Y.

Figura A2.B Extractos de la Familia Myristicaceae (A, B) y Piperaceae (C).

Figura A2.C Extractos de la Familia Rutaceae probados en la línea celular SH SY 5Y.

Figura B.1 Ensayo de Neuroprotección del extracto Ocotea discobar a dos concentraciones 10 ug/mL y 50 ug/mL realizado en líneas celulares SH SY 5Y y CAD.

Figura B.2 Ensayo de Neuroprotección del extracto Nectandra membranacea dos concentraciones 10 ug/mL y 50 ug/mL realizado en líneas celulares SH SY 5Y y CAD

Figura B.3 Ensayo de Neuroprotección del extracto Beilschmedia costarricense dos concentraciones 10 ug/mL y 50 ug/mL realizado en líneas celulares SH SY 5Y y CAD.

Figura B.4 Ensayo de Neuroprotección del extracto Ocotea longifolia dos concentraciones 5 ug/mL y 25 ug/mL realizado en líneas celulares SH SY 5Y y CAD.

Figura B.5 Ensayo de Neuroprotección del extracto Virola sp #3 dos concentraciones 5 ug/mL y 25 ug/mL realizado en líneas celulares SH SY 5Y y CAD.

Figura B.6 Ensayo de Neuroprotección del extracto Virola sp #1 dos concentraciones 5 ug/mL y 25 ug/mL realizado en líneas celulares SH SY 5Y y CAD.

Figura B.7 Ensayo de Neuroprotección del extracto Piper Cumanese dos concentraciones 5 ug/mL y 25 ug/mL realizado en líneas celulares SH SY 5Y y CAD.

Figura B.8 Ensayo de Neuroprotección del extracto Zanthoxylum Scheberi dos concentraciones 10 ug/mL y 50 ug/mL realizado en líneas celulares SH SY 5Y y CAD

Figura B .9 Ensayo de Neuroprotección del extracto Zanthoxylum V fracción de hojas en dos concentraciones 10 ug/mL y 50 ug/mL realizado en líneas celulares SH SY 5Y y CAD

Figura B.10 Ensayo de Neuroprotección del extracto Zanthoxylum Caribaeum fracción hojas en dos concentraciones 10 ug/mL y 50 ug/mL realizado en líneas celulares SH SY 5Y y CAD

Figura B.11 Ensayo de Neuroprotección del extracto Zanthoxylum Rigidium fracción de hojas en dos concentraciones 10 ug/mL y 50 ug/mL realizado en líneas celulares SH SY 5Y y CAD

Figura B.12 Ensayo de Neuroprotección del extracto Zanthoxylum # 23 en dos concentraciones 10 ug/mL y 50 ug/mL realizado en líneas celulares SH SY 5Y y CAD.

Figura B.13 Ensayo de Neuroprotección del extracto Zanthoxylum Rigidum de raíz en dos concentraciones 10 ug/mL y 50 ug/mL realizado en líneas celulares SH SY 5Y y CAD

Figura B.14 Ensayo de Neuroprotección del extracto Zanthoxylum # 23 de raíz en dos concentraciones 10 ug/mL y 50 ug/mL realizado en líneas celulares SH SY 5Y y CAD.

Figura B.14 Ensayo de Neuroprotección del extracto Zanthoxylum V de raíz en dos concentraciones 10 ug/mL y 50 ug/mL realizado en líneas celulares SH SY 5Y y CAD.

Figura C.1 Evaluación de viabilidad en respuesta a dosis incremental del agonista del LXR GW3965.

Figura C.2 Evaluación de viabilidad en respuesta a dosis incremental del agonista del RXR BEXAROTENO.

Figura C.3 Evaluación de viabilidad en respuesta a dosis incremental del extracto Beilschmiedia costarricense (Lauraceae).

Figura C.4 Evaluación de viabilidad en respuesta a dosis incremental del extracto Zanthoxylum Rigidum (Rutaceae).

Figura C.5 Evaluación de viabilidad en respuesta a dosis incremental de la toxina MPP+.

Figura C.6 Evaluación de viabilidad en respuesta a dosis incremental de la toxina PQ.

Figura D.1 Evaluación de liberación de LDH con agonistas farmacológicos.

Figura D.2 Evaluación de liberación de LDH con extractos vegetales.

Índice de Tablas

Tabla 2-1: Efecto de extractos vegetales frente a la exposición de toxinas.

Tabla 3-1: Listado de extractos vegetales usados en el estudio

Tabla 3-2: Mezcla para la transfección

Tabla 6.1.1. Materiales fungibles

Tabla 6.1.2. Equipos

Tabla 6.1.3.1 Reactivos utilizados para cultivo celular.

Tabla 6.1.3.2. Reactivos para Western blotting

Tabla 6.1.3.2.1 Buffer Western blotting

Tabla 6.1.3.3. Reactivos para transfección

Tabla 6.1.4. Anticuerpos utilizados

Tabla 6.1.5 Plásmidos utilizados

Lista de Símbolos y Abreviaturas.

EP Enfermedad de Parkinson

% porcentaje

NINDS National Institute of Neurological Disorders and Stroke

NET-PD Neuroprotección Exploratory Trial of Parkinson`s Disease

RN Receptor Nuclear

RXR Receptor X Retinoide

PPAR Receptores Activados por Proliferadores Peroxisomales

LXR Receptor Hepático X

Nurr1 Proteína Relacionada con el Receptor Nuclear-1

PINK1 Kinasa inducida por PTEN

AKT Proteína Kinasa A

IC intervalo de confianza

ND neuronas dopaminérgicas

SNpc Sustancia Nigra compacta

GWAS *Genome Wide Association Studies*

PI3K Fosfoinositol 3 quinasa

MTORC2 Mammalian target of rapamycin complexes 2

PDK1 Kinasa dependiente de Fosfoinositol 1

BAD Bcl-2-Associated Death promoter

FOXO Forkhead box protein

GSK3B glycogen synthase kinase 3 beta

TOM20 Mitochondrial import receptor subunit 20

TIM23 Mitochondrial import inner membrane translocase subunit 23

PARL1 poly(ADP-ribose) polymerase 1

Miro Mitochondrial Rho GTPase

NdurfA 10 Ubiquinone oxidoreductase subunit A10

MCU Calcium uniporter protein, mitochondrial

MPTP 1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina

6OHDA 6 hidroxidipamina

PKA Protein Kinasa A

Milton Trafficking kinesin-binding protein milt

ADN Ácido Desoxirribonucleico

AF1 Activador Funcional de la transcripción

ER Elementos de Respuesta

NF- κ B Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

TNF α Factor de Necrosis Tumoral Alfa

SNC Sistema Nervioso Central

PQ Paraquat

MAO β Monoamino Oxidasa B

DAT Transportador de dopamina

NT-3 Neurotoxina 3

μ M Micromolar

DMEM-F12 Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12

μ L Microlitro

nm Nanómetros

INT Iodototetrazolium

μ g Microgramos

mL Mililitros

Introducción

La enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda patología neurodegenerativa más prevalente a nivel mundial, se estima que el 0,3% de la población en países industrializados la padece¹. Se caracteriza por la pérdida sistemática de neuronas dopaminérgicas (ND) de la Sustancia Nigra pars compacta (SNpc) alterando la respuesta moduladora del estriado dorsal, lo que genera rigidez, temblores y bradicinesia².

Los estudios epidemiológicos sobre la EP estiman que el costo económico anual causado por esta enfermedad en los Estados Unidos es de 24 billones de dólares^{2,3}. Desde el año 2000 una de las políticas de salud pública en E.E.U.U. ha sido la exploración de estrategias neuroprotectoras para la EP, esta estrategia ha sido liderada por Instituto Nacional de Enfermedades Neurológicas y Accidentes Neurovasculares (NINDS, por sus siglas en inglés) consignadas en el proyecto "Neuroprotection Exploratory Trials of Parkinson's Disease (NET-PD)"^{4,5}, las cuales se basan en las recomendaciones de expertos en la EP y farmacéuticas.

Dentro de los fármacos sugeridos por el grupo de expertos del NET-PD, se encuentran los agonistas sintéticos de los receptores nucleares (RN)⁵. Los RN son proteínas capaces de regular la expresión génica en función de cambios en el ambiente intra o extracelular^{6,7}. Durante la última década se han estudiado los efectos terapéuticos que pueden tener los agonistas sintéticos de los RN inicialmente en enfermedades metabólicas y subsecuentemente su efecto en enfermedades neurodegenerativas⁸⁻¹⁰.

El Receptor X Retinoide (RXR) es un factor de transcripción^{11,12}. McFarland y colaboradores han estudiado el efecto del Bexaroteno (BEX), un agonista RXR, en la EP, encontrando efectos positivos al lograr la activación por heterodimerización con (Receptor Nuclear Asociado 1) Nurr1, el cual aumenta la expresión de genes vinculados directamente con la diferenciación y la supervivencia de la neuronas dopaminérgicas¹³. Adicionalmente, GW3965 (GW) un agonista del (Receptor X del Hígado) LXR que regula directamente el metabolismo del colesterol, ha demostrado tener efectos neuroprotectores en modelos de

EP, asociado a la función mitocondrial, reafirmando la relación entre las alteraciones en el metabolismo de lípidos y la disfunción mitocondrial¹⁴⁻¹⁶.

La actividad de LXR ha sido objeto de especial interés por su impacto en el metabolismo de colesterol, este RN puede ser regulado de forma endógena por oxisteroles, que son derivados del colesterol, estos oxisteroles también pueden ser consumidos en la dieta. Los productos naturales son interesantes por la actividad agonistas sobre el LXR, al interior del grupo de Muerte Celular y Neurociencias de la Universidad Nacional se ha investigado la actividad de extractos de plantas colombianas con el objetivo de encontrar extractos que tengan actividad sobre el LXR.

Adicional a lo anterior el grupo recientemente ha demostrado que GW induce un incremento en la expresión de PINK1, lo cual abre la posibilidad que este RN pueda tener un rol importante en la supervivencia neuronal, limitando el daño asociado a diversas neurotoxinas¹⁷. Adicionalmente, se ha encontrado que la sobreexpresión de PINK1 puede regular la activación de AKT^{17,18,19}

En la actualidad es poco lo que se sabe sobre los efectos que los RN pueden tener sobre las enfermedades neurodegenerativas⁸. De tal forma que para definir el uso de los RNs como estrategias de tratamiento en EP, se hace indispensable entender los mecanismos moleculares que subyacen a su funcionamiento, en particular en neuronas dopaminérgicas para de esta forma postularlos como estrategias terapéuticas que puedan modificar el curso de la enfermedad. En este contexto se plantea la siguiente hipótesis:

HIPÓTESIS

El efecto neuroprotector de agonistas de los receptores nucleares RXR y LXR puede estar mediado por un aumento en la expresión de PINK1 y una modulación de la vía de supervivencia neuronal PI3K/AKT.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo General:

Evaluar el efecto neuroprotector de agonistas de receptores nucleares en un modelo farmacológico de Parkinson inducido con MPP+ en neuronas dopaminérgicas (CAD-SHSY5Y).

1.1.2 Objetivos Específicos:

- 1) Determinar el efecto de (15) extractos vegetales sobre la viabilidad celular en las líneas CAD y SHSY5Y.
- 2) Evaluar el posible efecto neuroprotector de (15) extractos vegetales ante la toxicidad de PQ.
- 3) Establecer el efecto neuroprotector de los agonistas sintéticos de receptores nucleares LXR (GW3569) y RXR (Bexaroteno) sobre la neurotoxicidad inducida por MPP+ y PQ
- 4) Determinar la posible activación de la vía de supervivencia asociada a PI3K/AKT mediada por el efecto neuroprotector de GW3569 y Bexaroteno y extractos vegetales sobre la neurotoxicidad inducida por MPP+.
- 5) Comprobar la contribución de PINK1 asociado al efecto neuroprotector de los agonistas sintéticos y extractos vegetales sobre la neurotoxicidad inducida por MPP+.

2.CAPITULO: ESTADO DEL ARTE

2.1 ENFERMEDAD DE PARKINSON:

La enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda patología neurodegenerativa más prevalente a nivel mundial. Se estima que 0,3% de la población en países industrializados la padece^{1,20,21}. La EP se caracteriza por la pérdida sistemática de neuronas dopaminérgicas (ND) de la Sustancia Nigra pars compacta (SNpc) que alteran la respuesta moduladora del estriado dorsal y se asocia a signos clínicos motores característicos como rigidez, temblor, bradicinesia e inestabilidad postural^{22,23}.

Adicionalmente, la EP se asocia también a signos clínicos no-motores, p.e. alteraciones cognitivas, que evidencian la complejidad de la patología y su impacto en otras redes neuronales, lo que hace su abordaje terapéutico complejo y muchas veces inefectivo en particular en estadios avanzados²⁴⁻²⁶. En cuanto a la caracterización patológica, además de la pérdida de neuronas de la SNpc, también se evidencian inclusiones intracelulares eosinófilas denominadas cuerpos de Lewy, en el análisis post-mortem de tejido nervioso^{27,28}. Las causas de la EP han sido ampliamente estudiadas, pero en general sigue siendo desconocida²⁹. Aproximadamente en el 10% de los casos la causa corresponde a mutaciones genéticas³⁰. A pesar de las múltiples mutaciones reportadas en diversos genes en la EP, existe una homogeneidad en el cuadro clínico de la enfermedad, lo que ha permitido que se desarrollen modelos animales farmacológicos de la EP que simulan algunas características de la condición clínica en los humanos y han permitido algunas aproximaciones para el estudio de la enfermedad³¹⁻³³.

Por otro lado, el 90% de los casos restantes corresponde a casos de origen multifactorial, el cual se vincula en gran parte a la interacción de factores ambientales y genéticos²¹. Los estudios de GWAS (por sus siglas en inglés, *Genome Wide Association Studies*), han permitido la identificación de variables genéticas que se han catalogado como factores de

bajo riesgo³⁴. Sin embargo, en conjunto la alteración del balance redox asociado a la disfunción mitocondrial y la exposición a factores ambientales (p.e. pesticidas) continúa siendo una de las hipótesis más importantes³⁴⁻³⁷.

En los últimos cincuenta años el conocimiento acerca de las bases moleculares de esta enfermedad ha contribuido en la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas, las causas genéticas han abarcado gran parte de este desarrollo, permitiendo la construcción de mapas que trazan rutas metabólicas que se ven afectadas durante la enfermedad (ver figura 1.1)

Figura 1-1: Mecanismos moleculares clave que contribuyen al proceso de neurodegeneración de las neuronas dopaminérgicas en la enfermedad de Parkinson.

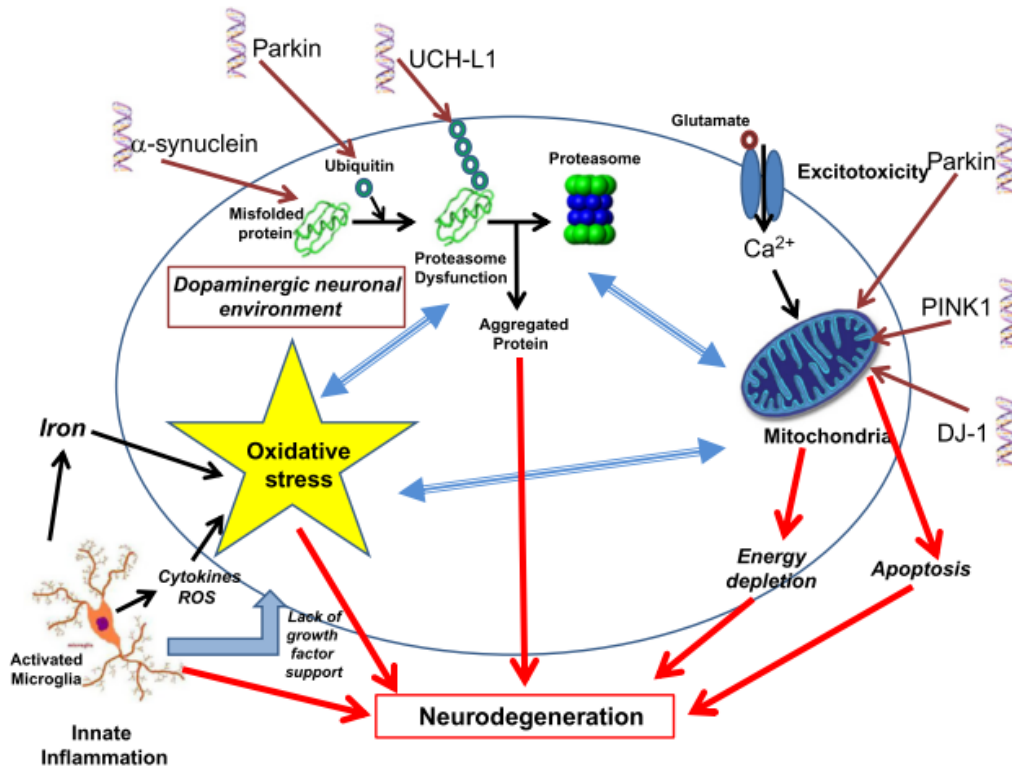


Imagen tomada de la publicación D.T. Dexter, P. Jenner ³⁸

2.2 AKT EN EL CONTEXTO DE LA EP:

Las neuronas son células especializadas y la unidad funcional del sistema nervioso, conforme transcurre el desarrollo estas células maduran y forman redes, durante este proceso las células ingresan en un estado pos-mitótico en el cual son incapaces de dividirse³⁹. Esta característica hace que las vías de supervivencia tengan una relevancia fundamental para el mantenimiento de la maquinaria molecular que le permite a la neurona desarrollar sus funciones.⁴⁰

La vía PI3K/AKT se ha estudiado como un blanco terapéutico en las enfermedades neurodegenerativas, en la PD se han realizado estudios sobre esta proteína, encontrado una regulación a la baja en la fosforilación en pacientes frente a casos controles⁴¹. AKT es una serina/treonina activada directamente por PI3K (fosfoinositol 3-quinasa) en respuesta a la insulina, factores de crecimiento, citoquinas y al estrés celular⁴². Recibe su primera fosforilación al ser exportada del retículo endoplasmático en la Treonina 450 del dominio regulador, esta fosforilación es necesaria para evitar la degradación de la proteína, para estar activada requiere ser fosforilada en la treonina 308 del dominio catalítico por la quinasa dependiente de fosfoinositol 1 (PDK1) y en la serina 473 de la región reguladora en el C-terminal por mTORC2, estas dos fosforilaciones son necesarias para completar su activación^{41,42}. La regulación negativa de la vía la realiza PTEN una fosfolipasa que realiza la defosforilación de AKT.

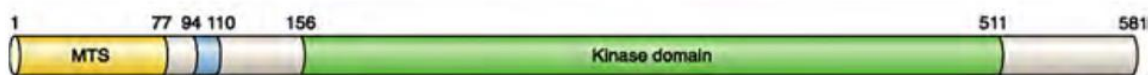
La vía PI3K/AKT es una importante señal de supervivencia en la célula, su fosforilación inhibe varias proteínas proapoptóticas tales como Bad y Foxo⁴³, al mismo tiempo activa la vía mTOR pro-supervivencia, finalmente esta serina también puede regular el metabolismo de glucosa fosforilando e inactivando a GSK3B⁴⁴

2.3 QUINASA INDUCIDA POR PTEN 1 (PINK1). Función protectora:

PINK1 es una proteína de 581 aminoácidos tipo serina/treonina, en su estructura se reconocen dos dominios principales en el N-terminal una señal de reconocimiento mitocondrial MTD y un dominio quinasa⁴⁵. Su gen se localiza en el cromosoma 1 (1p35-36) se asocia a la EP de tipo autosómica recesiva⁴⁶. Esta proteína es sintetizada en el

núcleo y exportada al citoplasma donde luego es importada al interior de la mitocondria a través del complejo TOM20/TIM23 a la membrana mitocondrial interna^{47,48}.

Figura 1-2. Esquema que representa los dominios estructurales de la proteína PINK1. Dominio mitocondrial (MTS, residuos 1-77), dominio transmembranal (TM, residuos 94-110), dominio quinasa Serina/Treonina (residues 156-511) y dominio C-terminal regulatorio (residuos 511-581)¹¹⁹.



Posterior al importe PINK1 es procesada por PARL1 (Presenilin-associated rhomboid-like protease), una proteasa que se encuentra en el espacio intermembranal, eliminando la secuencia de reconocimiento facilitando la exposición del dominio quinasa al citoplasma⁴⁹. Los primeros estudios sobre la función de esta proteína se realizaron en el contexto de la disfunción mitocondria y su rol principal en la mitofagia, un mecanismo protector fundamental para evitar la liberación de factores proapoptóticos^{50,51}.

Paralelo a lo anterior en modelos knockout de PINK1 se encontró una disminución en la activación del complejo I en la subunidad NdufA 10, la cual es importante para la reducción de ubiquinona, esta subunidad se localiza en la membrana interna algunos autores sugieren que PINK1 es la encargada fosforilar el complejo I en respuesta a un aumento en la demanda metabólica, cuando se presenta ausencia o mutación de la proteína la mitocondria entraría en déficit energético más rápidamente⁵⁴.

La alteración del potencial mitocondrial se incrementa en modelos donde se realiza el silenciamiento de PINK1, debido a la regulación que esta proteína ejerce sobre la complejo uniporter Na/Ca MCU (Mitochondrial Calcium Uniporter). Estas alteraciones aumenta la susceptibilidad a toxinas como MPTP, C2- ceramida, 6-hidroxi dopamina, por aumento de

la carga oxidativa⁵⁵⁻⁵⁷, estas aproximaciones resaltan la importancia de PINK1 al estar relacionada en la vías moleculares asociada a la disfunción mitocondrial (ver figura 1.3) .

Figura 1-3. Representación de las vías de señalización involucradas en la disfunción mitocondrial en la EP y la participación de PINK1 en dichas vías.

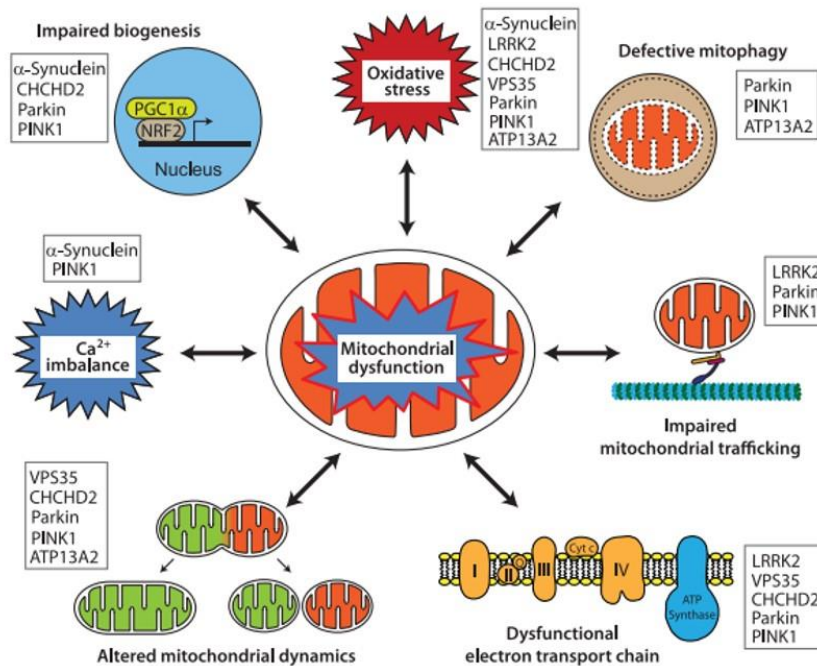


Imagen tomada de Park, Davis y Sue 2018⁶⁵.

Por otro lado autores como Haque y col observaron una posible protección de PINK1 no asociada a su función mitocondrial sino a la presencia de la proteína en el citoplasma, como activador de una señal neurotrófica intrínseca¹⁸. Las neuronas son células post-mitóticas en la que los factores neurotróficos son clave para la estimulación de cascadas de señalización asociadas con la supervivencia, la diferenciación y la función sináptica⁵⁸. Todas estas cascadas son activadas habitualmente por proteínas extracelulares que se unen a receptores en la membrana celular activando la maquinaria intracelular.

La sobreexpresión de PINK1 genera un aumento de su concentración citoplasmática y una consecuente fosforilación de la vía AKT/ Mtorc2, así mismo un aumentó en la señalización nuclear de PKA^{59,60,61}. Otro de los sustratos citosólicos que se encontró al sobreexpresar PINK1 fue Miro y Milton, en los que su fosforilación aumenta el transporte mitocondrial^{53,62}; como se mencionó anteriormente la vía PINK1/Parkin ubiquitina Miro frena el transporte mitocondrial; de forma antagónica el aumento de PINK1 citoplasmático aumenta la densidad mitocondrial en las dendritas, facilitando los procesos de plasticidad⁶³.

Recientemente se ha observado que PINK1 citoplasmático promueve la diferenciación neuronal⁶⁴. Esto ha generado la hipótesis de reconocer a esta proteína no solo como una quinasa mitocondrial sino también como un factor trófico. Todas estas “nuevas funciones” de PINK1 se discuten partiendo de la hipótesis de un procesamiento diferencial el cual no se encuentra completamente dilucidado, pero que permite identificarlo como un blanco terapéutico con funciones mitocondriales y citosólicas.

2.4 RECEPTORES NUCLEARES

Los receptores nucleares son proteínas que se unen al ADN y modifican funciones como el crecimiento, el metabolismo y la diferenciación⁶⁶. La actividad de estas proteínas es regulada por un ligando, que pueden ser compuestos heterocíclicos como el colesterol o agonistas sintéticos que le permiten liberar al receptor nuclear de sus co-represores y migrar del citoplasma al núcleo para unirse al ADN y regular la expresión génica de esa célula en particular^{8,11}.

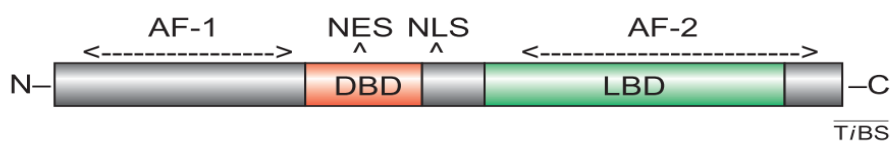
Las investigaciones sobre los mecanismos de acción de las hormonas esteroideas fueron los precursores para el descubrimiento de diversos factores de transcripción, conocidos como receptores nucleares (RN)⁶. Los primeros receptores nucleares en ser aislados y clonados fueron el Receptor X de Ácido Retinoico (RXR) y el Receptor de Ácido Retinoico^{6,12}.

Los factores de transcripción tienen una estructura altamente conservada (ver figura. 1.4): el extremo amino terminal tiene un dominio Activador Funcional de la transcripción AF1; poseen un dominio de interacción con el DNA, el cual interactúa a través de los Elementos de Respuesta (ER); poseen un dominio de unión al ligando; y por último el extremo C-

terminal posee el Activador Funcional de Transcripción 2 el cual depende directamente de la unión al ligando^{6,67,7}.

La unión de los ligandos y los co-factores tiene como resultado la remodelación de la cromatina. Dependiendo de si los cofactores son activadores o represores, la respuesta puede ser de activación de genes, generando la fosforilación de histonas; si la respuesta es de represión se genera acetilación o metilación de histonas^{68,11}. Existe un mecanismo de acción alternativo, la transrepresión el cual ocurre por la sumoilación de los factores de transcripción, esta respuesta es capaz de modular la respuesta inflamatoria, al unirse a NF- κ B evitando su translocación inhibiendo la expresión de genes proinflamatorios⁶⁹.

Figura 1-4: Dominios de un receptor nuclear desde el N-Terminar se presentan AF1 Dominio activador (es independiente del ligando); DBD Dominio de unión a ADN; LBD Dominio de unión al ligando; NES Señal de exportación nuclear; NLS Señal de localización nuclear⁷.



2.2.1. Receptores Nucleares en la Enfermedad de Parkinson

Los estudios sobre el efecto de RN en enfermedades neurodegenerativas han demostrado tener efectos neuroprotectores y anti-inflamatorios en modelos de enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson.

2.2.1.1. RXR: Es el principal factor de transcripción de la familia de receptores nucleares, capaz de dimerizar con un tercio de RN. Se han identificado tres isoformas: α presente en la piel; β ubicuo en todos los tejidos y γ se encuentra en los músculos y el cerebro⁷⁰. Sin embargo en cuanto a su función las investigaciones muestran un solapamiento entre las isoformas

La característica principal de este RN es su capacidad de heterodimerizar con otros RN, esta puede clasificarse en dos tipos dependiendo del rol que tenga RXR. En un primer escenario RXR puede realizar una dimerización permisiva en la cual RXR unido a un RN puede activarse por unión de un agonista de propio o del RN a quien está unido, activación puede desencadenar una respuesta biológica aditiva o sinérgica⁷¹. Por otro lado en el segundo caso la heterodimerización es no permisiva y la activación solo se da por unión del ligando del RN que acompaña a RXR, quien en este caso se encuentra silenciado o subordinado, esta dimerización particular ocurre cuando RXR se encuentra unido a RAR o VDR^{12,71}.

El Bexaroteno (Bex) es un agonista sintético reportado por Boehm y col para el tratamiento de linfoma cutáneo de células T, encontrando inhibición de la proliferación en células T e inducción de apoptosis activando el gen CV-1⁷². En 2013 McFarland y col encontraron que RXR interactuaba de forma permisiva con Nurr1 un factor de transcripción fundamental para la diferenciación y la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas, este grupo reportó mejoras a nivel comportamental en el modelo inducido con 6OHDA en ratas¹³. Otra vía de acción es aquella en la cual RXR se une a p85, regulando la respuesta de PI3K ante TNF, activando esta vía de supervivencia⁷³.

2.2.1.2. LXR: Es un receptor nuclear de la familia de los factores de transcripción activado por ligando, presenta dos isoformas α y β también conocidos como NR1H3 y NR1H2 respectivamente, la isoforma α se expresa en: intestino, riñón, macrófagos y tejido adiposo por otro lado la isoforma β está presente en el SNC incluyendo neuronas, astrocitos microglía y células mielinizantes⁷⁴.

Este RN es un sensor intrínseco de colesterol, su ligando son los oxisteroles^{75,76}. El colesterol es transportado por las lipoproteínas, sin embargo este no es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica así que debe sintetizarse in situ en SNC, este lípido es esencial para el funcionamiento del cerebro, tanto de las funciones de células como para la estructura de la membrana de neuronas y glía⁷⁷.

La homeostasis del colesterol es crucial para el funcionamiento del cerebro de hecho Lund y col generaron un modelo animal un ratón knockout para CYP46a1 una enzima que hidroxila el colesterol aumentando su polaridad y permitiendo que sea excretado a través de

la barrera hematoencefálica, este enzima genera específicamente 24(s)-hidroxiesterol, estos animales evidenciaban deterioros severos de memoria espacial y aprendizaje motor así mismo un significativa reducción para potenciación a largo plazo en el hipocampo⁷⁸.

En el contexto de la EP los primeros estudios sobre la relación entre el LXR demostraron que este RN es esencial para el mantenimiento de la neuronas motoras de la medula espinal y para la SNpc⁷⁹. En modelos animales inducidos con MPTP y posteriormente tratados con GW3965 un agonista sintético específico para LXR se observó una reducción significativa de la respuesta inflamatoria, así como una reducción en la pérdida de neuronas dopaminérgicas¹⁴.

Recientemente Becerra y col, demostraron los efectos deletéreos de péptido A β sobre la maduración de las espinas dendritas en un modelo de cultivo primario de neuronas hipocampales, los cuales fueron revertido con el pretratamiento de GW3965, uno de los hallazgo relevante de este estudio fue el incremento en la expresión de PINK1, la mutación en el gen de PINK1 es la más frecuente de tipo autosómica recesiva en la EP, adicionalmente se ha encontrado en varios paciente de etiología idiopática⁶³.

2.5 EXTRACTOS VEGETALES

El tratamiento farmacológico de la EP han sido objeto de cuestionamientos por los efectos deletéreos que su uso continuo genera, lo anterior a promovido la búsqueda de estrategias innovadoras, la investigación de extractos vegetales ha generado gran interés puesto que muchos de estos compuestos han demostrado tener efectos protectores frente a toxinas como MPP+, 6OHDA y Rotenona, en torno a este tema algunas revisiones sistemáticas concluyen que es necesario realizar más ensayos clínicos debido a la poca eficacia sobre la eficacia y la seguridad que los extractos de plantas puedan ofrecer para el tratamiento de la EP^{80,81}

Entre los beneficios encontrados se encuentran de las propiedades antioxidantes, quelantes así mismo se ha estudiado el efecto sobre la vía MAPK, PKC y ERK con la finalidad de evaluar la activación de las vías de supervivencia y la modulación de genes. Algunos investigadores soportan la evidencia de los extractos en la gran cantidad de compuestos que pueden interactuar con múltiples vías que favorezcan la supervivencia de

Análisis del efecto neuroprotector de agonistas de receptores nucleares en modelo farmacológico de Parkinson en neuronas dopaminérgicas

las ND, otros resaltan la necesidad de trabajar con compuestos activos que simulen o superen la eficiencia de fármacos^{80,82,83}.

Tabla 2-1: Efecto de extractos vegetales frente a la exposición de toxinas.

EXTRACTO VEGETAL	LINEA CELULAR	TOXINA	EFEECTO BIOLÓGICO	REFERENCIA
<i>Alpinia oxyphylla</i>	PC12	6OHDA	Antioxidante, antiinflamatorio AKT	Zhang et al. (2011c)
<i>Alpinia oxyphylla</i>	PC12	MPP+	Antioxidante, anti-apoptosis, protección mitocondrial	An et al. (2006)- Guan et al. (2006)
<i>Chrysanthemum morifolium</i> (Ramat.) Tzvel.	SH-SY5Y	MPP+	Antioxidante, anti-apoptosis	Kim et al (2009)
<i>Curcuma longa</i> L.	SH-SY5Y	6 OHDA	Antiapoptosis, p53. NF-Kb	Jaisin et al (2011); Wang et al (2009)
<i>Cyperus rotundus</i> L.	PC12	6 OHDA	Antioxidante, anti-apoptosis	Lee et al (2010)
Orchidaceae	SH-SY5Y	6 OHDA	Antioxidante, anti-apoptosis	Song et al (2010)
Oleaceae	SH-SY5Y	Rotenona	Antioxidante	Molina-Jimenez et al (2005)
<i>Ginkgo Biloba</i>	PC12	6 OHDA	Antiapoptosis, Inhibidor de Ca	Meng et al (2007)
<i>Pueraria thomsonii</i> Benth	PC12	6 OHDA	Protección disminución de la pérdida DAT	Liu et al (2008)

Tomado y modificado de Song y col (2012)

2.6 TOXINAS

Conforme se ha investigado la etiología de la EP, se han desarrollado modelos que permiten el estudio de ciertas características de la enfermedad, para el contexto específico de este trabajo los modelos desarrollados *in-vitro* fueron inducidos con la toxina MPP+ y con el pesticida Paraquat (PQ). Los mismos se han estudiado ampliamente debido a la selectividad del daño a neuronas dopaminérgicas en el caso de la toxina MPP+ y a la alta incidencia de esta enfermedad en personas expuestas de forma crónica al pesticida (PQ).

2.6.1 MPTP

La 1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina MPTP es una neurotóxina identificada y reportada por el grupo del M.D Langston en 1983 quienes estudiaron pacientes jóvenes que presentaban síntomas de Parkinsonismo avanzado, con respuesta a la Levodopa⁸⁴. Una vez se encuentra en torrente sanguíneo requiere del transportador de L-valina para cruzar la barrera hematoencefálica; sin embargo, hasta este punto la toxina no tiene ningún efecto y requiere ser metabolizada por los astrocitos específicamente por la Monoamino oxidasa β (MAO β)⁸⁵, el producto de esta reacción es MPP+ el cual se une específicamente al transportador de dopamina (DAT).

Pese a que las neuronas del área ventral tegmental (VTA) expresan DA algunos investigadores afirman que las presencias de proteínas como la Calbindina y las diferencias en cuanto al equilibrio redox entre estas neuronas hace que las neuronas de la Sustancia Nigra (SNpc) sea más susceptible al daño producto del MPP+. Dentro de la ND la toxina (MPP+) es direccionada hacia la mitocondria guiada por el potencial mitocondria⁸⁶, donde se une e inhibe de forma irreversible al complejo I NADH: ubiquinona oxidoreductasa específicamente a la subunidad Ndufs4⁸⁷, lo que conlleva a una pérdida del potencial de membrana mitocondrial, incremento en la generación de radicales libres y muerte celular⁸⁸.

2.6.2. Paraquat

El dicloruro de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilo también conocido como Paraquat es un herbicida que interfiere con la fotosíntesis ampliamente utilizado a nivel mundial. Varios estudios epidemiológicos han encontrado una asociación entre la exposición crónica a este herbicida y la incidencia de EP⁸⁹.

Análisis del efecto neuroprotector de agonistas de receptores nucleares en modelo farmacológico de Parkinson en neuronas dopaminérgicas

El mecanismo de acción de esta molécula se asocia los cambios de oxido-reducción al pasar de un estado divalente PQ⁺⁺ a uno monovalente producto de la interacción entre la NADPH oxidasa y a la oxido nítrica sintasa esto resulta en la formación de este catión monovalente se genera un ciclo auto-regenerativo de oxidación y reducción que permite la formación de radicales libre⁹⁰.

En cuanto a la validez como modelo de EP, algunos autores reportan que si bien no afecta el complejo 1 mitocondrial, al bloquear la función del DAT se reduce significativamente la pérdida de neuronas en SNpc; en otras investigaciones se ha demostrado que Oct3 es capaz de transportar cationes monovalentes entre ellos el PQ y en ratones knockout Oct3^{-/-} la pérdida de ND fue mayor⁹¹.

3.CAPITULO: METODOLOGÍA

3.1 Líneas celulares

Los experimentos realizados se desarrollaron sobre dos líneas celulares, la línea CAD y la línea SH SY 5Y ambas modelos de neuronas dopaminérgicos usados ampliamente, la primera de origen murino y las segundas derivadas de una neuroblastoma humano^{92,93,94}.

3.1.1 Células CAD

Esta línea catecolaminérgica murina, fue establecida por Qi y col en 1997 a partir de la línea CATH provenientes de un tumor mesencefálico de ratón transgénico⁹⁵, este ratón expresaba el antígeno SV40 Tag bajo el control transcripcional del promotor transcripcional de la tirosin hidroxilasa (TH), expresa marcadores de neuronas diferenciadas como sinaptofisina y canales voltaje dependientes de Na⁺ y K⁺ lo que hacen que su fisiología sea característica de una neurona⁹⁶.

La línea CAD establecida de 1997 denominadas inicialmente CATH.a que hace referencia a las células diferenciadas, la inducción de esta diferenciación se inicia al ser cultivadas en deprivación de suero fetal bovino, en estas condiciones son capaces de sobrevivir a diferencia de su línea precursora, esto debido a su capacidad de secretar de forma autocrina Neurotrofina -3 (NT-3). Otra diferencia radica en que las células CAD perdieron el oncogén SV40 Tag de forma espontánea, aunque siguen siendo inmortales^{94,97}.

La diferenciación se induce cultivando las células en ausencia de suero fetal bovino y con adición de sodio selenita 50 ng/mL esto detiene su proliferación, a los 4 días presentan una diferenciación completa que se evidencia por una morfología caracterizada por somas redondos y con procesos alargados similar a neuritas⁹⁵.

3.1.2 Células SHSY5Y

La línea comercializada por ATCC, tiene su origen en la subclonación de la línea SK-N-SH,

posterior a las mismas en 1970 fue depositado en el ATCC por June L. Biedler⁹⁸. Estas células se reconocen por tres características principales: primero, tiene la capacidad de tener fenotipos adherentes así como flotantes; otra características importantes es la expresión de marcadores positivos para tirosina hidroxilasa cualidad que las hace que estas neuronas sea un modelo de neuronas dopaminérgicas, y por ultimo esta línea celular puede diferenciarse en un fenotipo de neuronas madura, estas características las hacen ideales para modelos de neuronas humanas de pacientes con EP^{99,100}

En cuanto a la diferenciación de la línea celular el método más utilizado es la adición de ácido retinoico en medio celular, las condiciones de cultivo son similares a todas las líneas celular de origen mamífero, la diferenciación causa cambios en el fenotipo de la célula como la expansión y formación de procesos neuróticos, el aumento de la excitabilidad eléctrica así como la formación de sinapsis funcionales¹⁰¹. El ácido retinoico se administra en una concentración de 10 uM durante mínimo 3 a 4 días en medio libre de suero, este método promueve la diferenciación vía PI3K/AKT y la regulación positiva de la proteína Bcl2¹⁰²

3.2 Extractos Vegetales:

3.1.3 Todos los extractos vegetales fueron donados por el laboratorio de productos naturales del profesor MSc PhD Luis Enrique Cuca del departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia.

Para la obtención de los extractos se separaron los diferentes órganos vegetales se secaron a temperatura ambiente durante 10 días, a partir del material seco se realizó la extracción por la maceración en frío con etanol, los extractos se filtraron y secaron a presión reducida en la cabina de flujo.

Con los extractos secos se preparó una solución stock de 50mg/mL en DMSO a partir de la cual se realizaron diluciones seriadas en DMEM-F12 desde 500ug/mL hasta 1 ug/mL. Los extractos utilizados se presentan en la tabla 3-1.

Tabla 3-1: Listado de extractos vegetales usados en el estudio.

FAMILIA	ESPECIE	ORGANO
Lauraceae	<i>Ocotea Discobar</i>	Corteza
Lauraceae	<i>Nectandra membranacea</i>	Hojas
Lauraceae	<i>Beilschmiedia costarricense</i>	Hojas
Lauraceae	<i>Ocotea Longifolia</i>	Hojas
Myristicaceae	<i>Virola sp #3</i>	Corteza
Myristicaceae	<i>Virola sp #1</i>	Hojas
Piperaceae	<i>Piper Cumanese</i>	Hojas
Rutaceae	<i>Zanthoxylum Scheberi</i>	Corteza
Rutaceae	<i>Zanthoxylum V</i>	Hojas
Rutaceae	<i>Zanthoxylum Caribaeum</i>	Hojas
Rutaceae	<i>Zanthoxylum Rigidum</i>	Hojas
Rutaceae	<i>Zanthoxylum # 23</i>	Hojas
Rutaceae	<i>Zanthoxylum Rigidum</i>	Raíz
Rutaceae	<i>Zanthoxylum # 23</i>	Raíz
Rutaceae	<i>Zanthoxylum v</i>	Raíz

3.3. Ensayo de proliferación celular MTT

El ensayo de reducción de tetrazolium, evaluó la actividad mitocondrial al medir la reducción de la succinato deshidrogenasa a partir de la ruptura del anillo de tetrazolium (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio) principal componente del MTT, al finalizar el tiempo de protocolo experimental las células se incubaron con el MTT¹⁰³.

Aquellas células que dejan de ser viables pierden la capacidad de realizar el metabolismo de este compuesto, por lo cual permite inferir de forma indirecta la viabilidad celular. El metabolismo del MTT genera unos cristales de sal de Formazan los cuales no son solubles en medio acuoso por lo cual requieren de un disolvente orgánico, en este caso se utilizó un buffer de lisis¹⁰⁴.

Solución de Buffer lisis

- Preparar 40% (vol/vol) de dimetil formamida (DMF) 2% (vol/vol) ácido acético glacial
- Añadir 16% (peso/ vol) de dodecil sulfato de sodio (SDS) y disolver
- Completar volumen con H₂O dd
- Ajustar pH=4,7
- Para usar calentar a 37°

Para realizar el ensayo, las células fueron sembrada en placas de 96 pozos en una confluencia de 10×10^3 cel/pozo, trascurrido el tiempo de diferenciación se realizaron los protocolos para la determinación de la LD50 o Neuroprotección al finalizar el mismo se realizó el siguiente protocolo:

Se pesó el MTT liofilizado necesario para una solución a una concentración de 5mg/ml se realiza la dilución del compuesto en PBS estéril a continuación se realizó el filtrado de la solución con un filtro de 0,22 μ M y se protegió de la luz.

En un volumen de 100 μ L se adicionó 10 μ L de MTT se dejó incubar a 37° por 2 h. Tres pozos se utilizaron por cada caja para determinar el blanco, el cual consistía en pozos con células sin ningún tipo de tratamiento a los cuales no se les agregó MTT, a todos los pozos se les retira el medio y se les agrega el buffer de lisis para la posterior lectura.

Una vez finalizado el tiempo de incubación se retiró el medio con cuidado de no retirar los cristales y se realizó el lisado de los mismo adicionando 100 μ L de buffer de lisis, se dejó en agitación a 90 rpm por 10 min, Finalmente se realizó la lectura en un lector de placas a una longitud de onda de 570nm.

3.4. Ensayo colorimétrico de citotoxicidad LDH

Este ensayo tiene por objetivo medir la cantidad de Lactato deshidrogenada, una enzima que se encuentra al interior del matiz mitocondrial y es liberada cuando las membranas celulares pierden su integridad. La presencia de LDH en el medio se usa como un marcador de muerte celular.

En este ensayo utiliza como sustrato el iodonitrotetrazolium (INT), una sal de tetrazolium que al interactuar con LDH forma Formazan de color rojo, en esta reacción el NAD⁺ se reduce a NADH y H⁺ por oxidación de lactato a piruvato, el H⁺ se une a INT y forma la sal de Formazan la cantidad de color se mide a 490 nm en un lector de placas.

Una vez terminado el protocolo evaluado en una caja de 96 se extrajo 50 µL de medio y se almaceno en una caja de 96 pozo teniendo en cuenta que cada muestra debía evaluarse por triplicado. Luego se realizó la reconstitución del sustrato en 11.4 mL en H₂O ultra pura, esta solución debía protegerse de la luz

Posteriormente, se adiciono a los 50 µL de medio el sustrato reconstituido, se debe cubrir la placa de 96 para proteger de la luz, e incubar 20 min a 37°C. Finalmente, se adicionó 50 µL de la solución de parada y realizar la lectura a 490nm.

3.5. Western blot

Con los ensayos de neuroprotección se eligieron las dosis a evaluar para realizar el análisis de las proteínas: AKT, AKTp y PINK1. Las células fueron sembradas en cajas de 6 pozos con cada línea celular una vez terminado el tiempo de tratamiento se prosiguió de la siguiente forma:

Se realiza el lavado de la monocapa con PBS a continuación se colocó la caja sobre hielo se adicionó RIPA que contenía 1X de inhibidor de proteínas y 1X de inhibidor de fosfatasas. Luego con un scalpell estéril se realizó el raspado de la monocapa, el sobrenadante de células y buffer RIPA se recolecto en tubos ependorf previamente rotulados con la información de la línea celular y tratamiento correspondiente.

A continuación, se procedió a centrifugar en una microcentrifuga a 13,300 rpm y a 2°C por 15 min. Seguido de esto los tubos fueron sonicados con los extractos siguiendo un protocolo de 3 pulsos de 3seg a una amplitud de 20%. De nuevo se centrifugaron las muestras como el paso anterior y una vez finalizado se colectó el sobrenadante. La proteína extraída se cuantificó por el método de BCA y fue almacenada a -70 °C hasta su uso.

Se llevo a cabo una electroforesis en geles de poliacrilamida usando una concentración de 12% y 8%. Por pozo se sembraron entre 30 a 60 ug de proteína en cada carril, previamente la proteína fue desnaturalizada a 95°C durante 10 min usando *buffer laemmli*. Las muestras se sembraron junto con el marcador de peso molecular *PageRule Plus Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific) y se usó el Mini Trans-Blot® (Bio-Rad).

Las condiciones a las cuales se realizó la electroforesis fueron las siguientes: Los geles fueron introducidos en la cámara de electroforesis y se les adicionó el *Running buffer* con un voltaje inicial de 60V con un aumento paulatino hasta llegar a 100V. Se observó la separación de las proteínas vigilando el marcador de peso molecular este proceso duró aproximadamente 150 min.

Antes de finalizar la electroforesis (30 minutos aproximadamente) se prepararon el caset, las esponjas y los papeles de filtro, los cuales fueron sumergidos en *Towbin buffer* para equilibrar el pH, paralelo a esto se activó la membrana de PVDF sumergiéndola en metanol durante 30 segundos luego se lavó durante 5 minutos en agua destilada y se reservó en *Towbin buffer*.

Una vez finalizada la electroforesis se procedió a iniciar la transferencia, se extrajo el gel y se realizó el montaje del caset en el siguiente orden: sobre la cara negra se colocó la esponja, papel de filtro, el gel, la membrana, papel de filtro, esponja y se cierra el caset. El caset armado se introdujo junto con una pila de hielo y el agitador en la cámara de transferencia este proceso se realizó durante 60 min a 200 mA una vez finalizado, la membrana fue teñida con rojo ponceau para verificar la presencia de proteínas en la membrana y el gel fue teñido con azul de comasie para verificar la transferencia de las proteínas.

Luego se realizó el bloqueo de la membrana con solución de bloqueo (leche descremada 5%, TTBS 1X) durante 1 hora. Posterior a eso, la membrana se incubó durante toda la noche en anticuerpo primario a 4°C: AKT (1:1000) Cell Signaling; AKTp (1:1000) SantaCruz, y PINK1 (1:500) abcam. A continuación, se realizaron 3 lavados de 5 min con TTBS 1X y se procedió a incubar dos horas en anticuerpo secundario a temperatura ambiente.

Al finalizar el tiempo de incubación se realizó el lavado con TTBS 1X, 3 veces durante 5 min y se procedió a revelar con el kit de quimioluminiscencia (invitrogen) y la lectura en el fotodocumentador.

3.6. Transfección de células con Lipofectamina 3000

Este método utiliza lípidos capaces de formar liposomas para encapsular material genético que luego al estar en contacto la membrana plasmática es liberado al interior de la célula, se siguió el protocolo de la casa comercial.

Las células fueron sembradas en cajas de 6 pozos a una densidad de 100.000 células/pozo. A las 24 horas se preparó la mezcla para la transfección según la siguiente tabla:

Tabla 3-1: Mezcla para la transfección

PLÁSMIDO	µg DNA	Lipofectamina	Células	Volumen Optimen	Origen
PINK1 shRNA	2 µg	7 uL	100.000	700 uL	<i>Donado por el Dr. Mark Cookson</i>
Control PINK1 sh RNA	2 µg	7uL	100.000	700 uL	

Se prepararon 2 soluciones: la solución A que contenía la mitad del ADN plasmático y la mitad del volumen de optimen. La solución B lipofectamina en el volumen restante de optimen. Se dejó 5 minutos a temperatura ambiente, a continuación, se mezcló B en A y se incubó durante 20 minutos a 37°C en espera de la formación de los liposomas. Una vez se cumplido el tiempo la capa se lavó con 200 µL de optimen precalentado a 37°C

Se adicionó gota a gota la mezcla para la transfección, se dejaron las células en la incubadora toda la noche, al día siguiente se completó el medio con DMEM – F12 libre de suero al 1% penicilina estreptomina.

A las 24 horas se realizó el cambio de medio a DMEM-12 de diferenciación o DMEM según la línea celular para realizar experimento.

Análisis del efecto neuroprotector de agonistas de receptores nucleares en modelo farmacológico de Parkinson en neuronas dopaminérgicas

Para el caso del silenciamiento de PINK1 se agregó al medio 6 µg/mL de blasticidina al medio para realizar la selección de las células silenciadas, la verificación del silenciamiento posterior a 10 días por medio de WESTERN BLOT.

4. CAPITULO: RESULTADOS

4.1. NEUROPROTECCIÓN

4.1.1 Ensayos de Viabilidad: *Tamizaje de extractos vegetales.*

En la primera etapa de este trabajo se procedió a identificar extractos con posibles efectos protectores sobre la viabilidad celular en las dos líneas: SH-SY5Y y CAD. Se realizó una evaluación preliminar de 15 extractos de las familias *Lauraceae*, *Myristicaceae* *Piperaceae* y *Rutaceae*, mediante ensayos de MTT. Se probaron concentraciones decrecientes desde 200µg/mL hasta 1 µg/mL.

Cada línea celular fue diferenciada con el objetivo de generar un modelo de neurona madura según el protocolo mencionado en el apartado de metodología con sodio selenita y ácido retinoico respectivamente para las células CAD y SH-SY5Y. Los resultados permitieron identificar las concentraciones apropiadas para desarrollar los ensayos de neuroprotección.

Familia Lauraceae

En la línea celular CAD las concentraciones menores a 25 µg/mL generan un aumento del porcentaje de viabilidad con respecto al control; a 100µg/mL se observa una disminución de este parámetro en 50% y a 200 µg/mL la reducción es de 80% en esta línea el extracto *Ocotea discobar* a partir de una concentración 2 µg/mL presenta una reducción del 50% la viabilidad que aumentó conforme aumento la concentración del extracto. (Ver Figura 4.1.A) En la línea SH-SY5Y todos los extractos incrementaron la viabilidad celular incluso a concentraciones altas, salvo en el caso del *Ocotea longifolia* que a 200 ug/mL disminuyó la viabilidad al 50% respecto al control. (Figura 4.1.B).

Figura 4.1.A Extractos de la Familia Lauraceae probados en la línea celular CAD

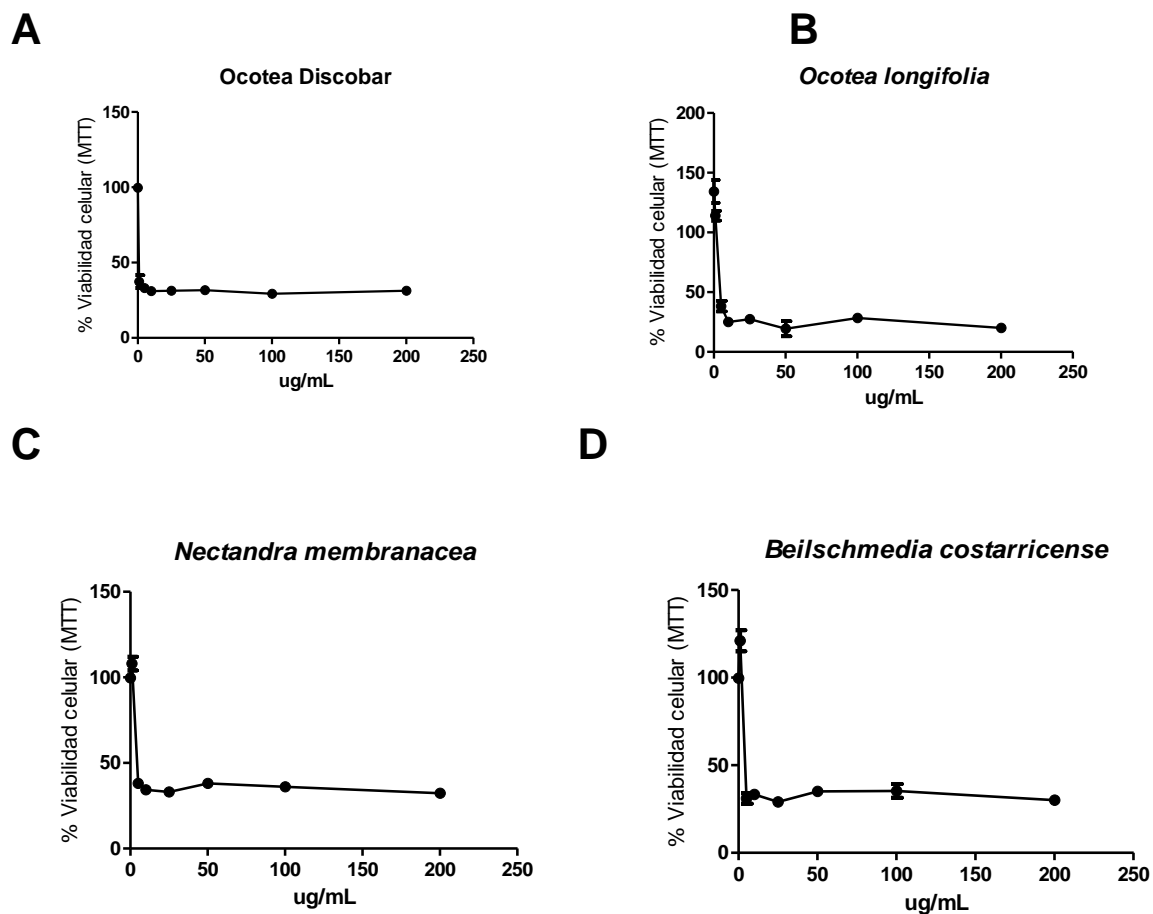


Figura 4.1.A Extractos de la Familia Lauraceae probados en la línea celular CAD. El extracto A proviene de la corteza, el resto de los extractos fueron obtenidos a partir de las hojas. Los ensayos fueron preparados en diluciones seriadas desde 200 ug/mL hasta en control solo DMEM-F12, las barras de error que se observan corresponden a la SD del triplicado experimental realizado con cada dosis.

Figura 4.1.B Extractos de la Familia Lauraceae probados en la línea celular SH SY 5Y

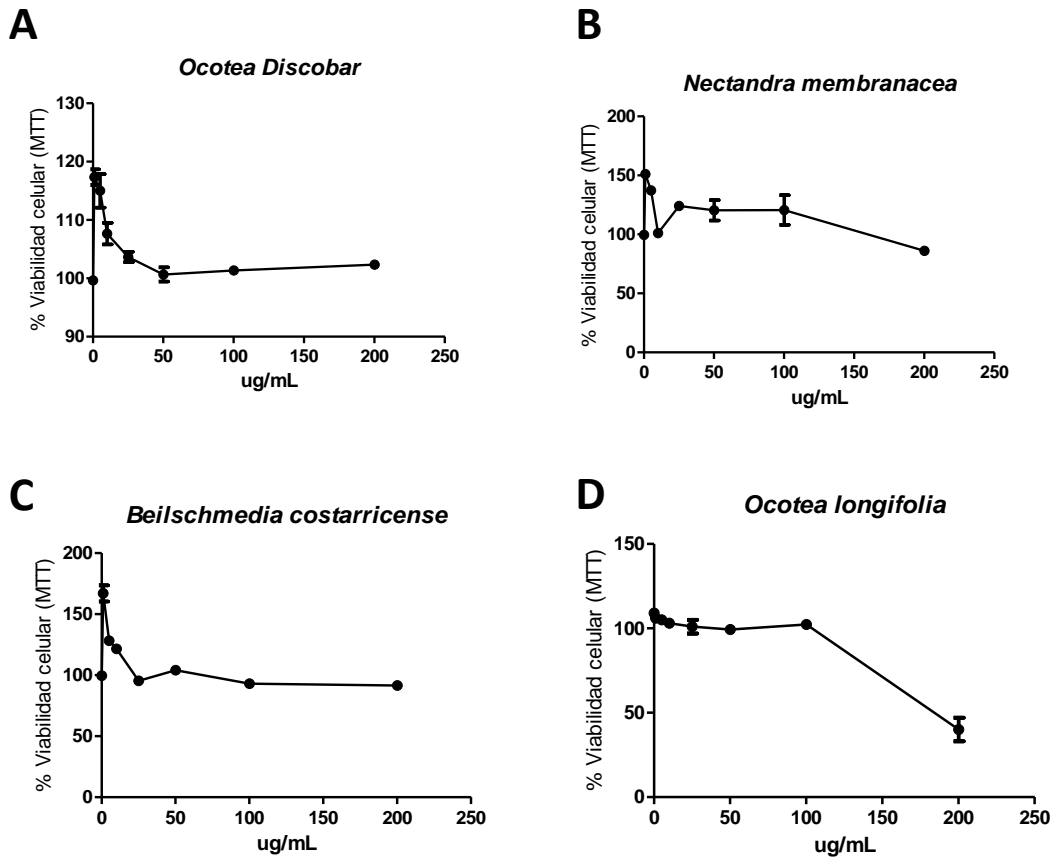


Figura 4.1.B. Extractos de la Familia Lauraceae probados en la línea celular SH SY 5Y. El extracto A proviene de la corteza el resto de los extractos fueron obtenidos a partir de las hojas. Los ensayos fueron preparados en diluciones seriadas desde 200 ug/mL hasta en control solo DMEM-F12, las barras de error que se observan corresponden a la desviación estándar del triplicado experimental realizado con cada dosis.

Familia Myristicaeae

Los extractos de la familia Myristicaeae presentaron una alta toxicidad en las dos líneas celulares. La línea CAD tuvo una reducción de la viabilidad de hasta el 50% a concentraciones superiores de 2 $\mu\text{g/mL}$.(Ver Figura 4.2.A), en la línea SH SY5Y esta reducción se presentó a partir de 50 $\mu\text{g/mL}$ (Ver figura 4.2.B).

Familia Piperacea

La *Piper cumanese*, en la línea CAD presentó una reducción superior al 70% a partir de 25 $\mu\text{g/mL}$, para la línea SH SY5Y la reducción fue del 80% a la misma concentración. (Ver Figuras 4.2.A – 4.2.B).

Figura 4.2.A. Extractos de la Familia Myristicaceae (A, B) y Piperacea (C) probados en la línea celular CAD

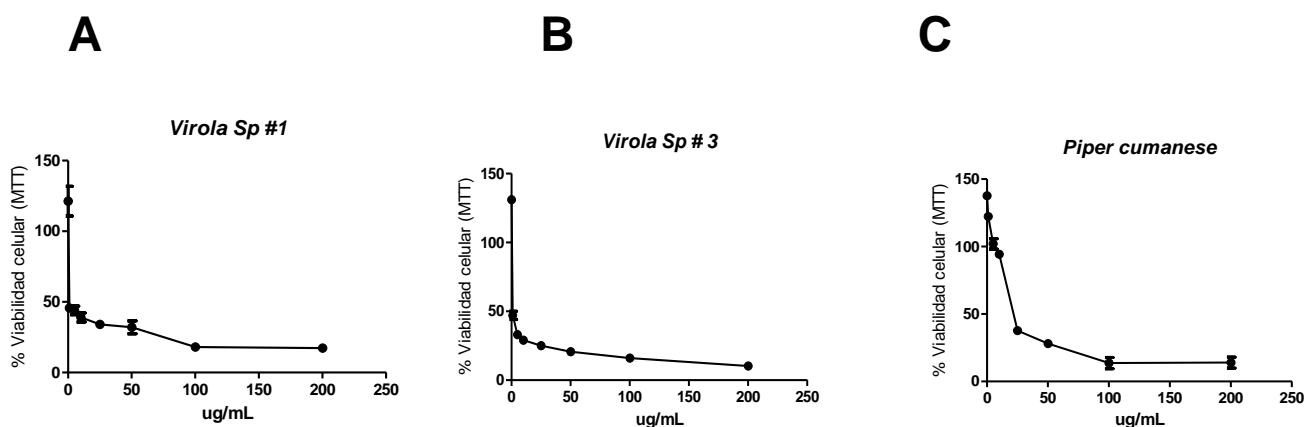


Figura 4.2 Extractos de la Familia Myristicaceae (A, B) y Piperacea (C) probados en la línea celular CAD. El extracto B proviene de la corteza el resto de los extractos fueron obtenidos a partir de las hojas. Los ensayos fueron preparados en diluciones seriadas desde 200 $\mu\text{g/mL}$ hasta en control solo DMEM-F12, las barras de error que se observan corresponden a la SD del triplicado experimental realizado con cada dosis.

Figura 4.2.B. Extractos de la Familia Myristicaceae (A, B) y Piperacea (C) probados en línea celular SHSY-5Y

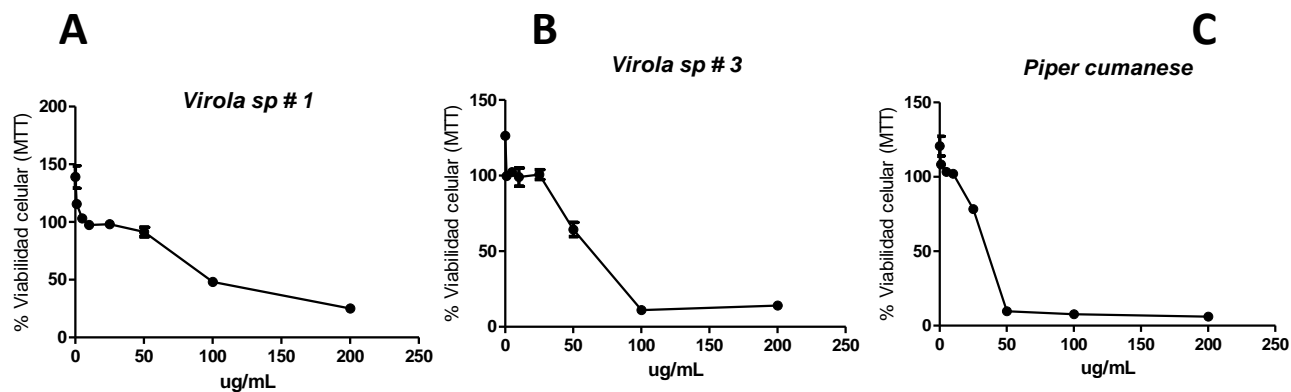


Figura 4.2.B Extractos de la Familia Myristicaceae (A, B) y Piperaceae (C) probados en la línea celular SHSY-5Y. El extracto B proviene de la corteza el resto de los extractos fueron obtenidos a partir de las hojas. Los ensayos fueron preparados en diluciones seriadas desde 200 $\mu\text{g/mL}$ hasta en control solo DMEM-F12, las barras de error que se observan corresponden a la desviación estándar del triplicado experimental realizado con cada dosis.

Familia Rutaceae

En cuanto a lo observado para la Familia Rutaceae, para ambas líneas los extractos provenientes de hojas incrementaron la viabilidad, en el caso de la línea CAD a 100 $\mu\text{g/mL}$ se observa una reducción paulatina hasta un 50% con respecto al control. (Ver figura 4.1.A) En estos extractos de hojas en la línea de SH SY5Y la viabilidad se incrementó hasta un 50% y cuando la concentración fue superior a 100 $\mu\text{g/mL}$ la viabilidad no presentó cambios con respecto al control. (Ver figura 4.3.B.)

En contraste los extractos de esta familia de raíz y corteza afectaron la viabilidad proporcionalmente a la concentración con una reducción del 50% a 10 $\mu\text{g/mL}$ en la línea CAD, La línea SHSY5Y la reducción de la viabilidad se limitó al extracto de raíz *Zanthoxylum* V.

Análisis del efecto neuroprotector de agonistas de receptores nucleares en modelo farmacológico de Parkinson en neuronas dopaminérgicas

Figura 4.3.A Extractos de la Familia Rutaceae probados en la línea celular CAD.

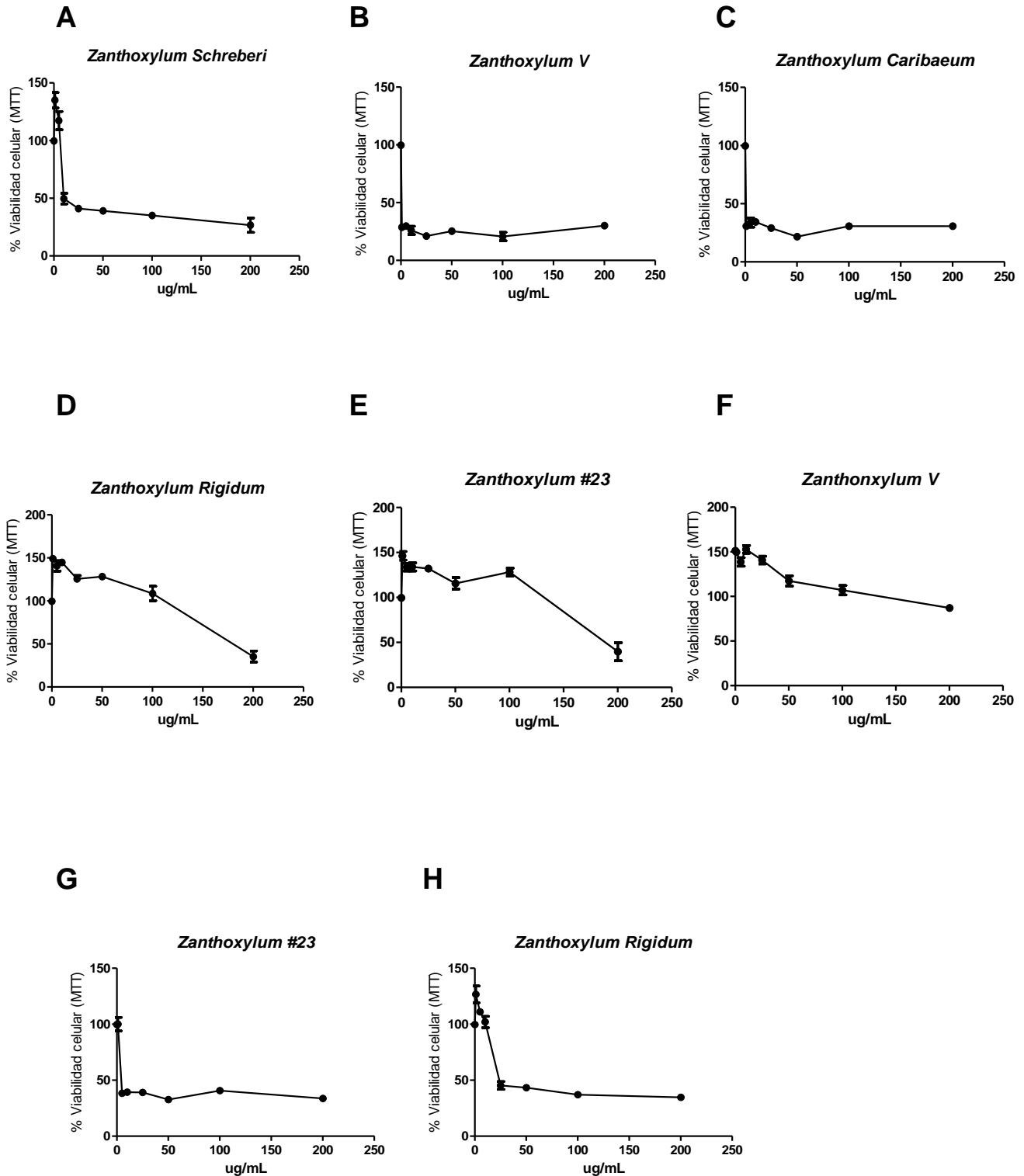


Figura 4.3.A Extractos de la Familia Rutaceae probados en la línea celular CAD. El extracto A proviene de la corteza, los extractos B – E se generaron a partir de hojas. Los extractos F - H fueron obtenidos a partir de la raíz. Las barras de error que se observan corresponden a la desviación estándar del triplicado experimental realizado con cada dosis. Los ensayos fueron preparados en diluciones seriadas desde 200 ug/mL hasta 0 ug/mL o control solo DMEM-F12.

Figura 4.3.B Extractos de la Familia Rutaceae probados en la línea celular SHSY5Y.

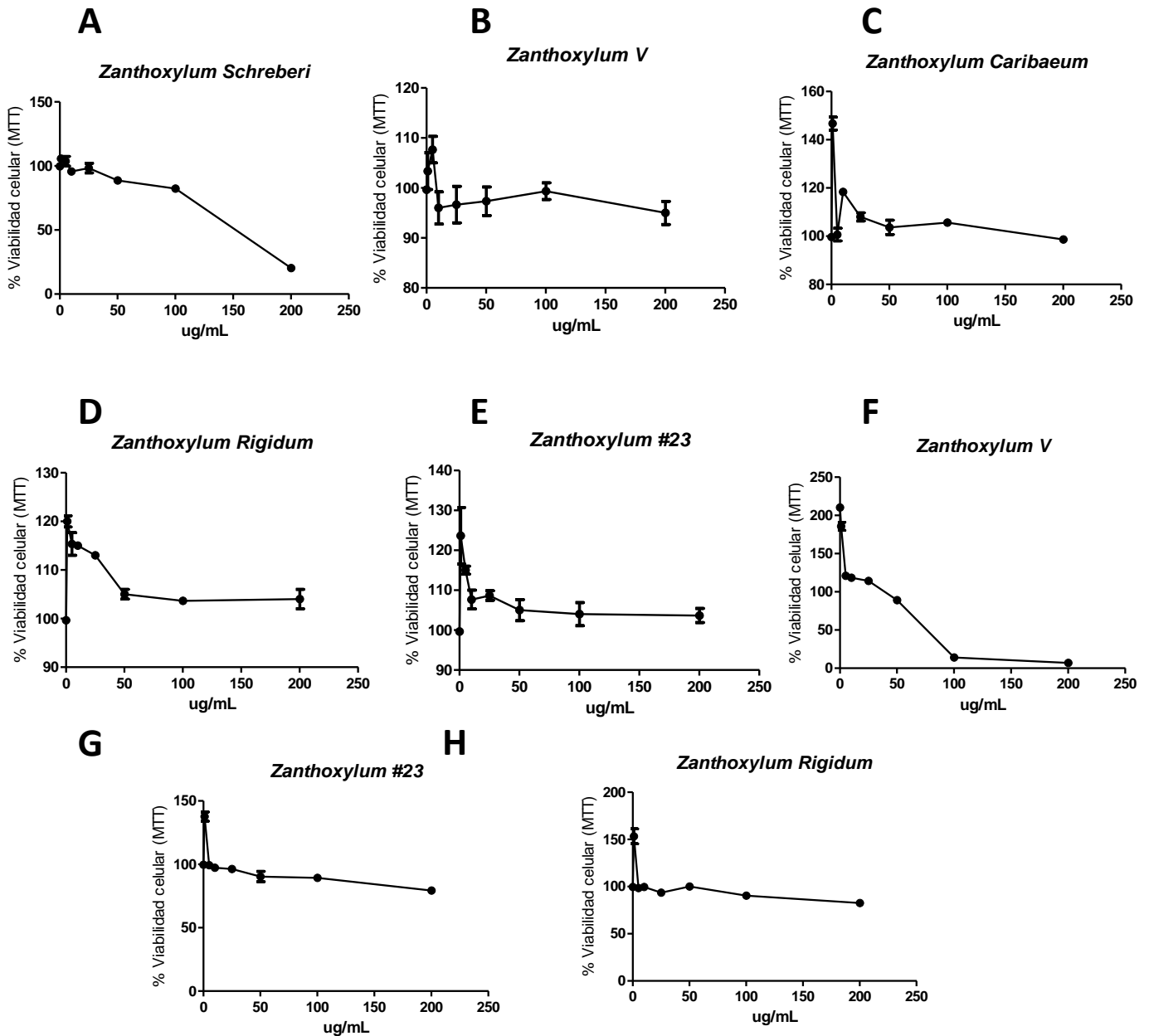


Figura 4.3.B Extractos de la Familia Rutaceae probados en la línea celular SH SY 5Y. El extracto A proviene de la corteza, los extractos B – E se generaron a partir de hojas. Los extractos F - H fueron obtenidos a partir de la raíz., las barras de error que se observan corresponden a la desviación estándar del triplicado experimental realizado con cada dosis

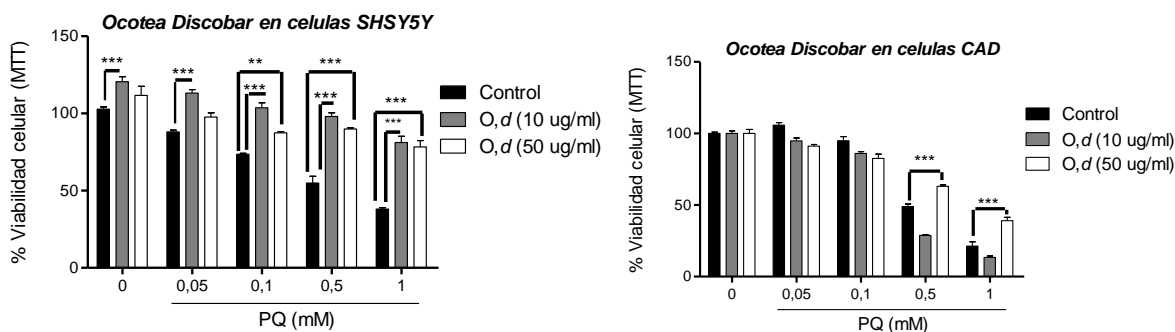
4.1.1.1 Evaluación: Neuroprotección de extractos vegetales frente a la toxina PQ en línea SH HY5Y y CAD.

Posterior a la evaluación de los extractos, estos fueron probados mediante ensayos de neuroprotección, los cuales consistían en una exposición previa del extracto a dos concentraciones definidas según los ensayos de viabilidad, posterior a una hora de exposición con el extracto se adicionó medio DMEM-F12 con extracto y PQ.

Familia Lauraceae

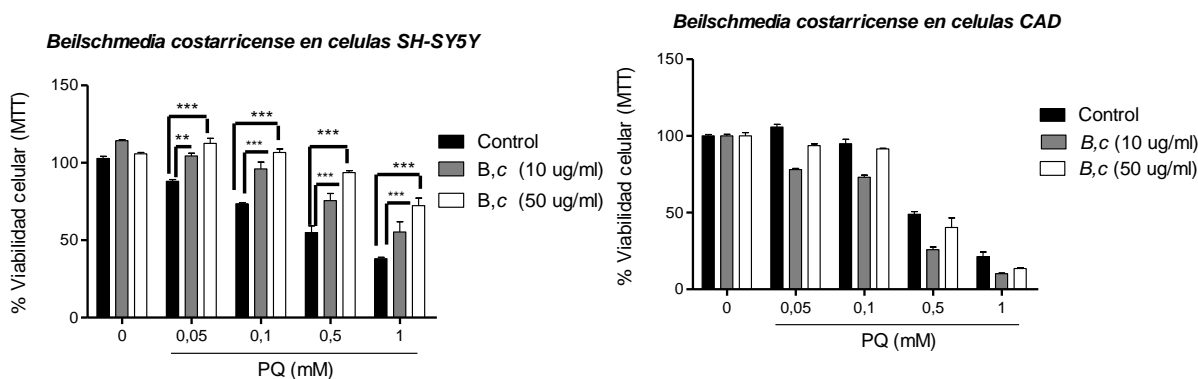
Las concentraciones empleadas para los ensayos fueron 10 µg/mL y 50 µg/mL salvo en el extracto *Ocotea longifolia* (5 µg/mL y 25 µg/mL) en este último no se encontró protección, los extractos restantes muestran protección en la línea SH SY5Y en ambas concentraciones las cuales fueron significativas (Figura 4.4). El extracto *Beilschmiedia costarricense* evidencio una protección que fue significativa en las dos concentraciones usadas y la protección efectuada fue mayor cuando se utilizó la concentración más alta del extracto, por el contrario en la línea CAD ninguno de los extractos de esta familia presento diferencias significativas (Figura 4.5).

Figura 4.4. Ensayo de Neuroprotección del extracto *Ocotea discobar* a dos concentraciones 10 ug/mL y 50 ug/mL realizado en líneas celulares SH SY 5Y y CAD



Ensayo de Neuroprotección del extracto *Ocotea discobar* a dos concentraciones 10 ug/mL y 50 ug/mL realizado en líneas celulares SH SY 5Y y CAD. Las células fueron pretratadas durante 1 hora y posterior se adiciono al medio la toxina a concentraciones seriadas de 0,05 mM hasta 1 mM. Los resultados presentados exponen la media y la SEM (n=3) *** p < 0.001 ** p < 0.01 (control vs tratamiento).

Figura 4.5. Ensayo de Neuroprotección del extracto *Beilschmedia costarricense* dos concentraciones 10 ug/mL y 50 ug/mL realizado en líneas celulares SH SY 5Y y CAD.



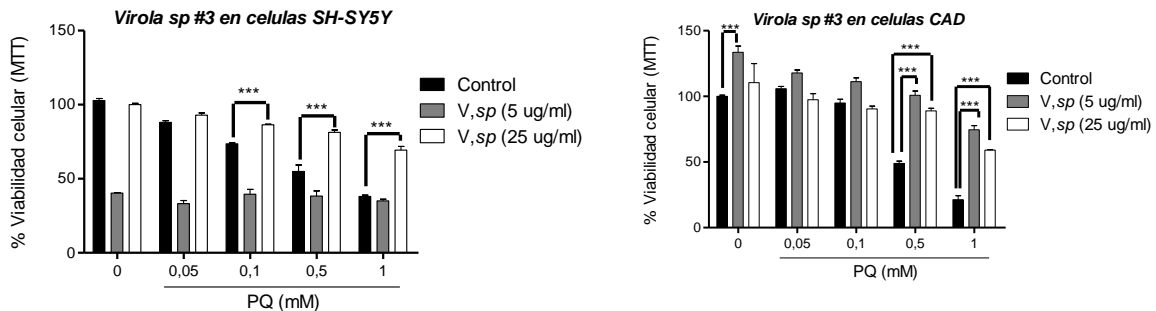
Ensayo de Neuroprotección del extracto *Beilschmedia costarricense* dos concentraciones 10 ug/mL y 50 ug/mL realizado en líneas celulares SH SY 5Y y CAD. Las células fueron pretratadas durante 1 hora y posterior se adiciono al medio la toxina a concentraciones seriadas de 0,05 mM hasta 1 mM para completar 24 horas. Los resultados presentados exponen la media y la SEM (n=3) *** p < 0.001 ** p < 0.01 (control vs tratamiento).

Familia Myristicaceae y Piperaceae

Análisis del efecto neuroprotector de agonistas de receptores nucleares en modelo farmacológico de Parkinson en neuronas dopaminérgicas

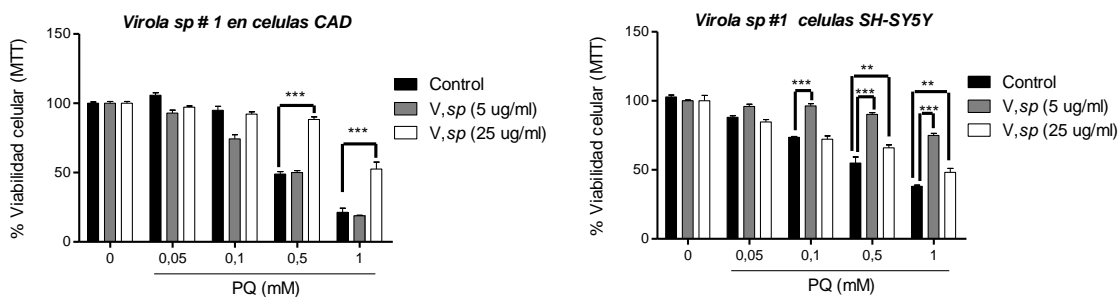
Todos los extractos fueron probados a 5 µg/mL y 25 µg/mL encontrando protección con la menor concentración en ambas líneas. En el caso de *Virola sp3* la protección se observó a la menor concentración, esta respuesta se mantuvo para ambas líneas celulares (Ver Figuras 4.6 - 4.8).

Figura 4.6 Ensayo de Neuroprotección del extracto *Virola sp #3* dos concentraciones 5 ug/mL y 25 ug/mL realizado en líneas celulares SH SY 5Y y CAD



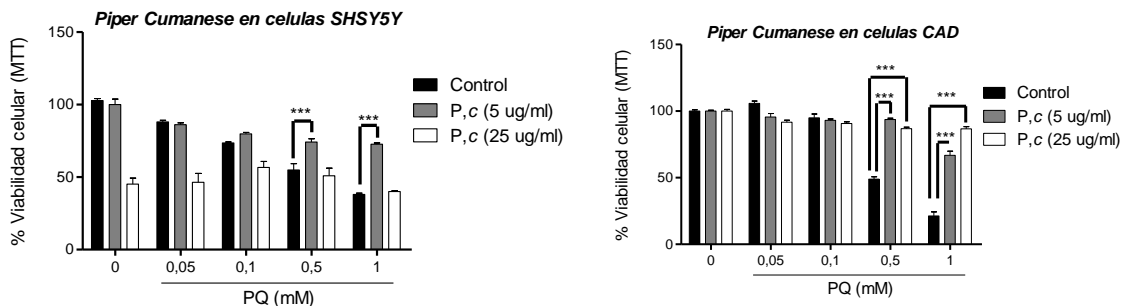
Ensayo de Neuroprotección del extracto *Virola sp #3* dos concentraciones 5 ug/mL y 25 ug/mL realizado en líneas celulares SH SY 5Y y CAD. Las células fueron pretratadas durante 1 hora y posterior se adicióno al medio la toxina a concentraciones seriadas de 0,05 mM hasta 1 mM para completar 24 horas- Los resultados presentados exponen la media y la SEM (n=3) *** p < 0.001 ** p < 0.01 (control vs tratamiento).

Figura 4.7 Ensayo de Neuroprotección del extracto *Virola sp #1* dos concentraciones 5 ug/mL y 25 ug/mL realizado en líneas celulares SH SY 5Y y CAD



Ensayo de Neuroprotección del extracto *Virola sp #1* dos concentraciones 5 ug/mL y 25 ug/mL realizado en líneas celulares SH SY 5Y y CAD. Las células fueron pretratadas durante 1 hora y posterior se adicióno al medio la toxina a concentraciones seriadas de 0,05 mM hasta 1 mM para completar 24 horas. Los resultados presentados exponen la media y la SEM (n=3) *** p < 0.001 ** p < 0.01 (control vs tratamiento).

Figura 4.8. Ensayo de Neuroprotección del extracto *Piper Cumanese dos* concentraciones 5 ug/mL y 25 ug/mL realizado en líneas celulares SH SY 5Y y CAD.



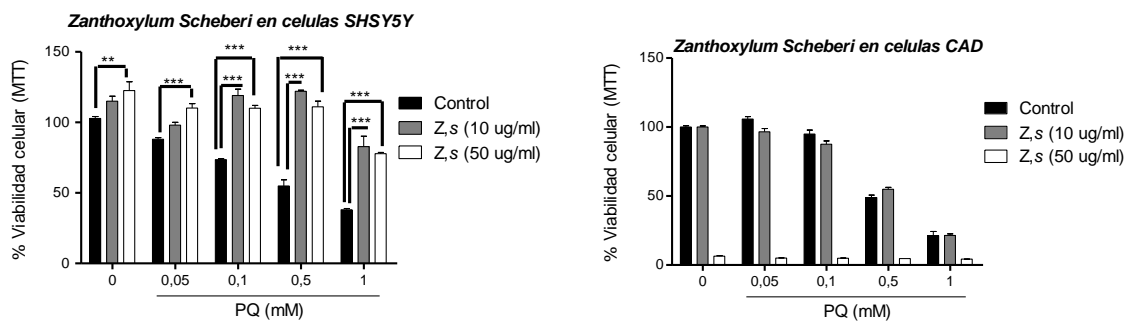
Ensayo de Neuroprotección del extracto *Piper Cumanese dos* concentraciones 5 ug/mL y 25 ug/mL realizado en líneas celulares SH SY 5Y y CAD. Las células fueron pretratadas durante 1 hora y posterior se adicióno al medio la toxina a concentraciones seriadas de 0,05 mM hasta 1 mM para completar 24 horas- Los resultados presentados exponen la media y la SEM (n=3) *** p < 0.001 ** p < 0.01 (control vs tratamiento).

Familia Rutácea

Todos los extractos fueron probados a 10 µg/mL y 50 µg/mL. En la línea SHSY5Y los extractos de corteza y hojas presentaron una protección la cual fue significativa frente a todas las concentraciones de toxina probadas. En el caso de *Zanthoxylum Rigidium* fracción de hojas se incremento la viabilidad celular incluso en presencia del PQ. Los extractos de las fracciones de raíz presentaron protección frente a concentraciones altas de PQ excepto para *Zanthoxylum V de raíz* (Ver figuras 4.9).

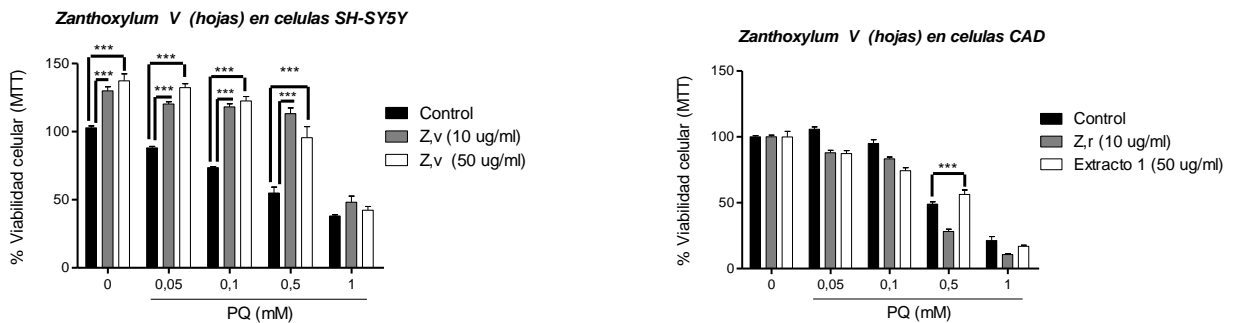
En contraste, para la línea CAD la protección se observó solo bajo condiciones de estrés frente a concentraciones superiores a 0,5 mM PQ, excepto en *Zanthoxylum scheberi*, *Zanthoxylum caribaeum* fracción hojas y *Zanthoxylum V de raíz* (Ver Anexo B figura B.8- figura B.14).

Figura 4.9 Ensayo de Neuroprotección del extracto *Zanthoxylum Scheberi* dos concentraciones 10 ug/mL y 50 ug/mL realizado en líneas celulares SH SY 5Y y CAD.



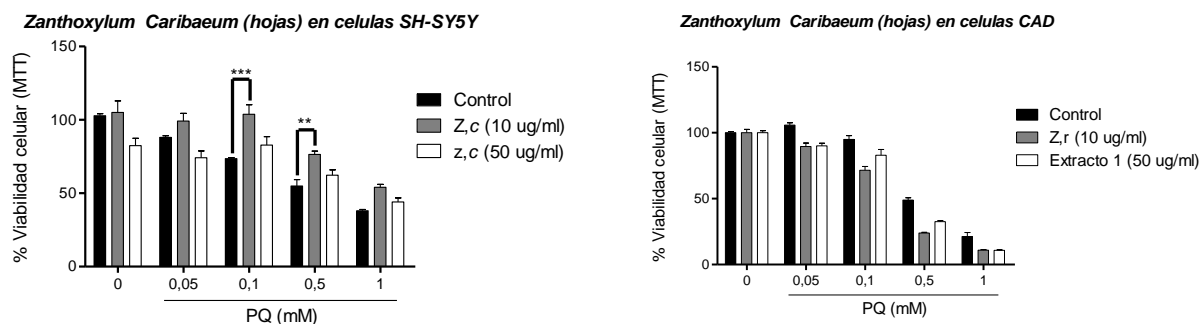
Ensayo de Neuroprotección del extracto *Zanthoxylum Scheberi* dos concentraciones 10 ug/mL y 50 ug/mL realizado en líneas celulares SH SY 5Y y CAD. Las células fueron pretratadas durante 1 hora y posterior se adicióno al medio la toxina a concentraciones seriadas de 0,05 mM hasta 1 mM para completar 24 horas- Los resultados presentados exponen la media y la SD (n=3) *** p < 0.001 ** p < 0.01 (control vs tratamiento).

Figura 4.10 Ensayo de Neuroprotección del extracto *Zanthoxylum V fracción de hojas* en dos concentraciones 10 ug/mL y 50 ug/mL realizado en líneas celulares SH SY 5Y y CAD.



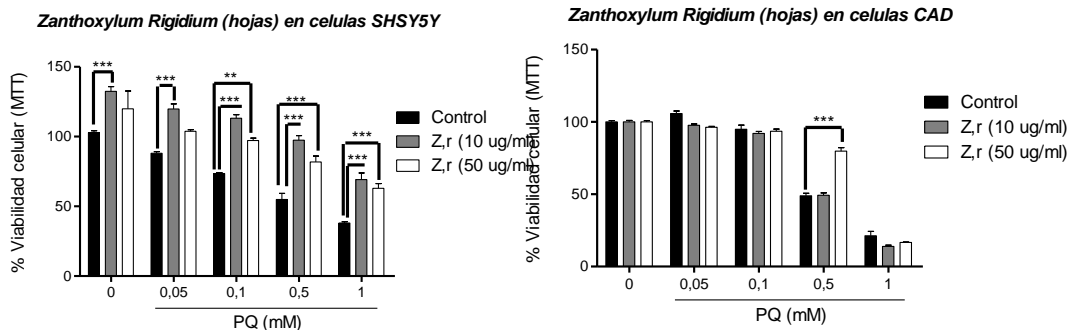
Ensayo de Neuroprotección del extracto *Zanthoxylum V fracción de hojas* en dos concentraciones 10 ug/mL y 50 ug/mL realizado en líneas celulares SH SY 5Y y CAD. Las células fueron pretratadas durante 1 hora y posterior se adicióno al medio la toxina a concentraciones seriadas de 0,05 mM hasta 1 mM para completar 24 horas. Los resultados presentados exponen la media y la SEM (n=3) *** p < 0.001 ** p < 0.01 (control vs tratamiento).

Figura 4.11 Ensayo de Neuroprotección del *extracto Zanthoxylum Caribaeum fracción hojas en dos concentraciones 10 ug/mL y 50 ug/mL* realizado en líneas celulares SH SY 5Y y CAD.



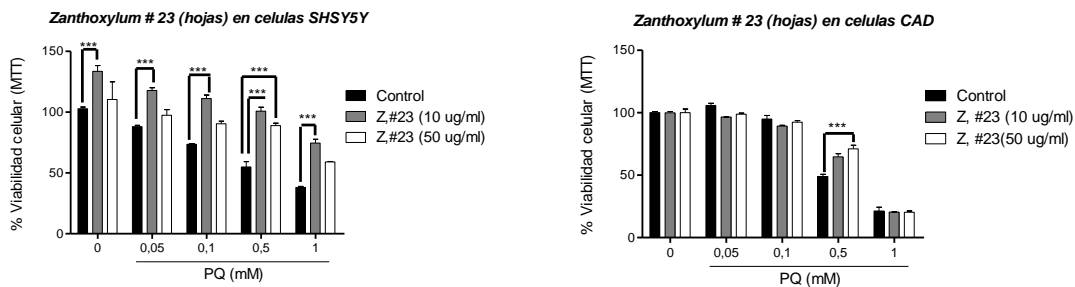
Ensayo de Neuroprotección del *extracto Zanthoxylum Caribaeum fracción hojas en dos concentraciones 10 ug/mL y 50 ug/mL* realizado en líneas celulares SH SY 5Y y CAD. Las células fueron pretratadas durante 1 hora y posterior se adiciono al medio la toxina a concentraciones seriadas de 0,05 mM hasta 1 mM para completar 24 horas. Los resultados presentados exponen la media y la SEM (n=3) *** p < 0.001 ** p < 0.01 (control vs tratamiento).

Figura 4.12 Ensayo de Neuroprotección del *extracto Zanthoxylum Rigidium fracción de hojas en dos concentraciones 10 ug/mL y 50 ug/mL* realizado en líneas celulares SH SY 5Y y CAD



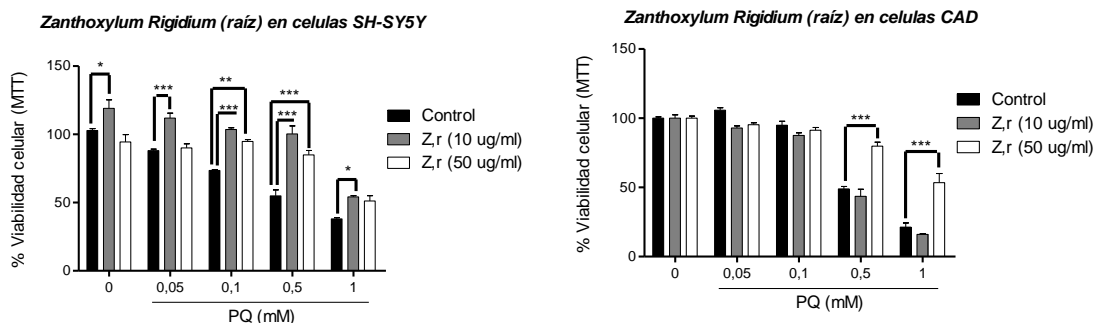
Ensayo de Neuroprotección del *extracto Zanthoxylum Rigidium fracción de hojas en dos concentraciones 10 ug/mL y 50 ug/mL* realizado en líneas celulares SH SY 5Y y CAD. Las células fueron pretratadas durante 1 hora y posterior se adiciono al medio la toxina a concentraciones seriadas de 0,05 mM hasta 1 mM para completar 24 horas. Los resultados presentados exponen la media y la SEM (n=3) *** p < 0.001 ** p < 0.01 (control vs tratamiento).

Figura 4.13 Ensayo de Neuroprotección del *extracto Zanthoxylum # 23 en dos concentraciones 10 ug/mL y 50 ug/mL* realizado en líneas celulares SH SY 5Y y CAD.



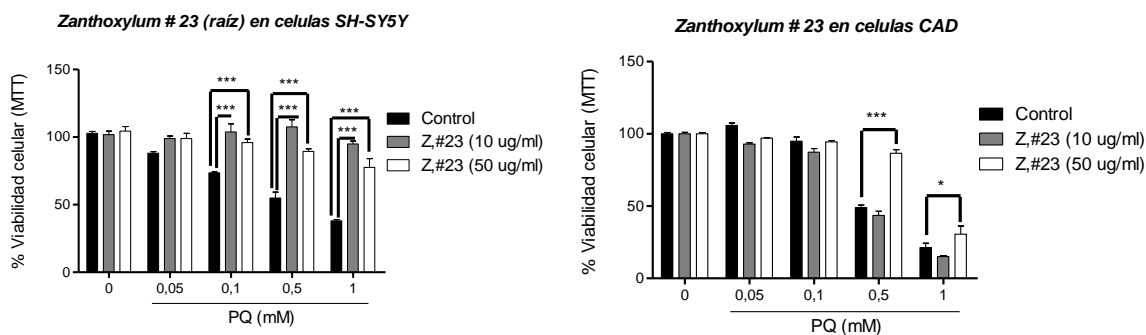
Ensayo de Neuroprotección del *extracto Zanthoxylum # 23 en dos* concentraciones 10 ug/mL y 50 ug/mL realizado en líneas celulares SH SY 5Y y CAD. Las células fueron pretratadas durante 1 hora y posterior se adiciono al medio la toxina a concentraciones seriadas de 0,05 mM hasta 1 mM para completar 24 horas- Los resultados presentados exponen la media y la SEM (n=3) *** p < 0.001 ** p < 0.01 (control vs tratamiento).

Figura 4.14 Ensayo de Neuroprotección del *extracto Zanthoxylum Rigidum de raíz en dos* concentraciones 10 ug/mL y 50 ug/mL realizado en líneas celulares SH SY 5Y y CAD.



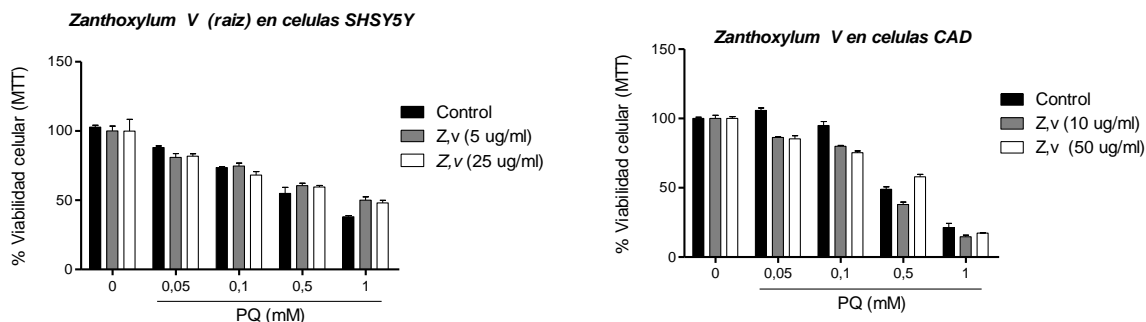
Ensayo de Neuroprotección del *extracto Zanthoxylum Rigidum de raíz en dos* concentraciones 10 ug/mL y 50 ug/mL realizado en líneas celulares SH SY 5Y y CAD. Las células fueron pretratadas durante 1 hora y posterior se adiciono al medio la toxina a concentraciones seriadas de 0,05 mM hasta 1 mM para completar 24 horas- Los resultados presentados exponen la media y la SEM (n=3) *** p < 0.001 ** p < 0.01 p < 0,05 (control vs tratamiento).

Figura 4.15 Ensayo de Neuroprotección del *extracto Zanthoxylum # 23 de raíz en dos* concentraciones 10 ug/mL y 50 ug/mL realizado en líneas celulares SH SY 5Y y CAD



Ensayo de Neuroprotección del *extracto Zanthoxylum # 23 de raíz en dos* concentraciones 10 ug/mL y 50 ug/mL realizado en líneas celulares SH SY 5Y y CAD. Las células fueron pretratadas durante 1 hora y posterior se adiciono al medio la toxina a concentraciones seriadas de 0,05 mM hasta 1 mM para completar 24 horas- Los resultados presentados exponen la media y la SEM (n=3) *** p < 0.001 ** p < 0.01 p < 0,05 (control vs tratamiento).

Figura 4.16 Ensayo de Neuroprotección del *extracto Zanthoxylum V de raíz* en dos concentraciones 10 ug/mL y 50 ug/mL realizado en líneas celulares SH SY 5Y y CAD.



Ensayo de Neuroprotección del *extracto Zanthoxylum V de raíz* en dos concentraciones 10 ug/mL y 50 ug/mL realizado en líneas celulares SH SY 5Y y CAD. Las células fueron pretratadas durante 1 hora y posterior se adiciono al medio la toxina a concentraciones seriadas de 0,05 mM hasta 1 mM para completar 24 horas- Los resultados presentados exponen la media y la SEM (n=3) No se encuentran diferencias estadísticas respecto al control.

4.1.2 Resultados neuroprotección de agonistas farmacológicos y extractos vegetales.

Los resultados preliminares realizados por integrantes del grupo de muerte celular han encontrado mediante ensayos de transactivación del LXR que algunos extractos vegetales pueden inducir una respuesta de activación del LXR incluso superior al agonista sintético GW3965 (resultados en proceso de publicación). Se tomó la decisión de elegir *Zanthoxylum rigidum* y *Beilschmiedia costarricense* por su actividad neuroprotectora y por presentar una actividad agonista del LXR.

Además a lo anterior se adicionó la evaluación de la neuroprotección ante la toxina MPP+ con el objetivo de simular parte de las características patológicas que desencadenan la muerte celular del núcleo dopaminérgico, tales como la inhibición del complejo I, la pérdida de potencial mitocondrial y posterior muerte por apoptosis⁸⁸.

Antes de realizar el protocolo de neuroprotección se realizó una evaluación de viabilidad tanto de los compuestos a evaluar su actividad neuroprotectora como de las toxinas, probando concentraciones crecientes a tiempo diferentes tiempos (1, 6, 12, 24 horas). En el caso de los agonistas de LXR y RXR la concentración inicial fue de 0,25µM hasta un

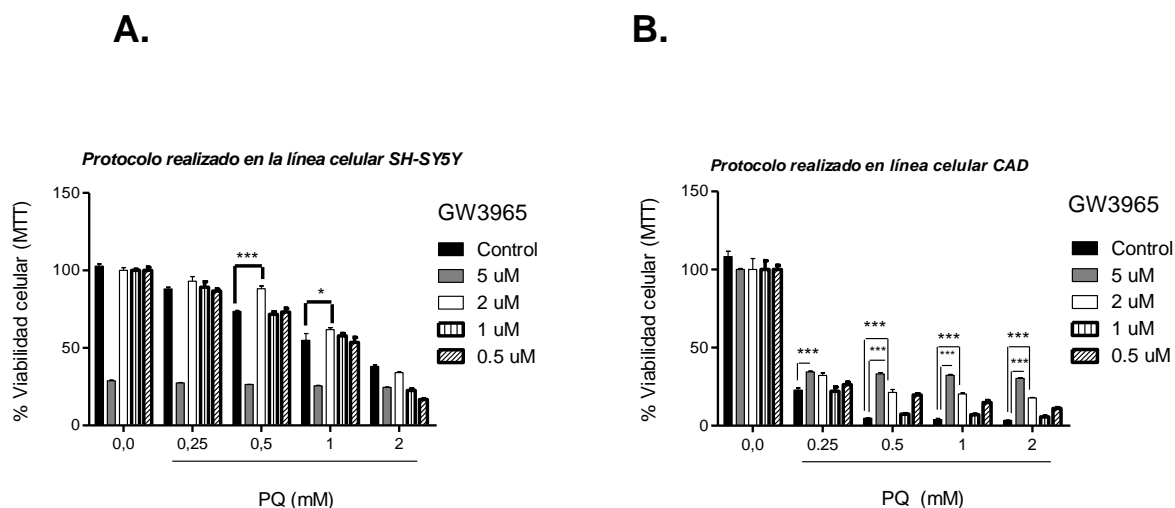
máximo de 50 μM (Ver Anexos A Figura A1 – Figura A.2). Los extractos *Zanthoxylum rigidum* y *Beilschmiedia costarricense* partieron de 2,5 $\mu\text{g/mL}$ hasta 200 $\mu\text{g/mL}$ (Ver Anexos A Figura A3 – Figura A4) por último las toxinas MPP+ y PQ evaluando en ambos casos una concentración mínima de 0,05 mM hasta 5 mM.

Como resultado de este tamizaje se decidió realizar los ensayos de neuroprotección con una exposición previa del compuesto protector durante 6 horas, seguido de un periodo de 18 horas con la toxina, para un tiempo de tratamiento total de 24 horas, las concentraciones de la toxina que se eligieron para evaluar la neuroprotección fueron de: 0,25 - 0,5 - 1 y 2 mM).

4.1.2.1 NEUROPROTECCIÓN DE AGONISTAS DE RECEPTORES NUCLEARES RXR Y LXR FRENTE A LAS TOXINAS MPP+ Y PQ.

Los resultados de viabilidad permitieron determinar la concentración máxima para evaluar la protección de los agonistas de RN la cual fue de 5 μM hasta un mínimo de 0,5 μM . La neuroprotección con el GW3965 frente a PQ en la línea SHSY5Y (Figura 4.17 A.) se encontró con una concentración de 2 μM contra 0,5 y 1 mM de la toxina. En el caso de la línea CAD la protección fue significativa a 5 μM y 2 μM frente a todas las concentraciones de PQ 0.25 - 0,5 - 1 - 2 mM (Figura 4.17 B).

Figura 4-17. Células CAD y SH-SY5Y pretratadas con GW3965 y posteriormente expuestas a Paraquat. Se observa en la línea SH-HY-5Y GW3965 (2 μM) protege contra Paraquat (0,5 y 1 mM), en la línea CAD se encontró que GW3965 (5 μM y 2 μM) protege contra Paraquat (0.25 - 0,5 - 1 – 2 mM).

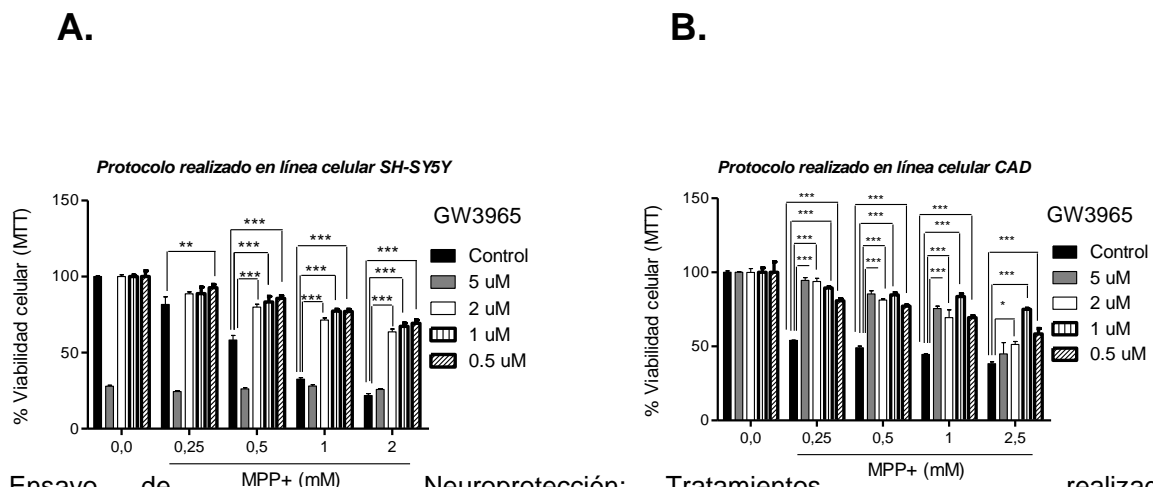


Análisis del efecto neuroprotector de agonistas de receptores nucleares en modelo farmacológico de Parkinson en neuronas dopaminérgicas

Ensayo de Neuroprotección: Tratamientos realizados con exposición de GW 3965 (GW) durante 6 horas, a continuación, se adicionó la toxina Paraquat (PQ) por un periodo de 18 horas. Todos los datos fueron normalizados respecto a las células SHSY5Y y CAD tratadas con vehículo y representan medias \pm SEM de 4 experimentos independientes. Se realizó un Anova de dos vías y para comparaciones múltiples se aplicó la prueba de contrastes *T* de Bonferroni * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$. (control vs tratamiento).

Los ensayos de neuroprotección del GW frente al MPP+ muestran una mayor protección. En el caso de la línea SHSY5Y la concentración de 0,5 - 1- 2 μ M del agonista de LXR protege contra MPP+ cuando las células fueron expuestas a concentración de 0,5 – 1 y 2 mM de la toxina (Figura 4.18 A). En la línea CAD la protección se asoció a todas las concentraciones de agonista frente al MPP+ en todas las concentraciones usadas de la toxina. (Figura 4.18 B).

Figura 4-18: Células CAD y SH-SY5Y pretratadas con GW3965 y posteriormente expuestas a MPP+. Se observa en la línea SH-HY-5Y GW3965 (0,5 - 1- 2 μ M) protege contra MPP+ de forma más representativa en (0,5 – 1 y 2 mM), en la línea CAD se encontró GW3965 en todas las probadas protegen frente al MPP+ en todas las concentraciones probadas.

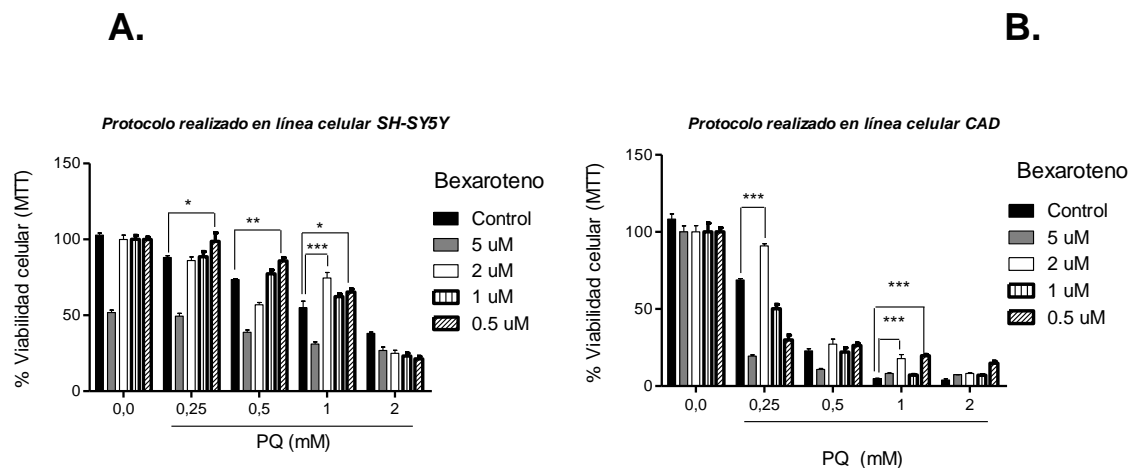


Ensayo de Neuroprotección: Tratamientos realizados con exposición de GW 3965 (GW) durante 6 horas, a continuación, se adicionó la toxina MPP+ por un periodo de 18 horas. Todos los datos fueron normalizados respecto a las células SHSY5Y y CAD tratadas con vehículo y representan medias \pm SEM de 4 experimentos independientes. Se realizó

Anova de dos vías y para comparaciones múltiples se aplicó la prueba de contrastes *T* de Bonferroni * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$. (control vs tratamiento).

A continuación, se realizó la evaluación con el agonista de RXR probando las mismas concentraciones (5 - 2 - 1 - 0,5 μM) encontrando menor protección con PQ para el caso de la línea SHSY5Y. Bexaroteno protegió en 2 - 0,5 μM contra PQ en 0,25 - 1 mM (Figura 4.19 A), en la línea CAD la protección de Bexaroteno se observó en 0,5 y 2 μM contra Paraquat en 0.25 y 1 mM (Figura 4.19 B).

Figura 4.19 Células CAD y SH-SY5Y pretratadas con Bexaroteno y posteriormente expuestas a Paraquat. Se observa en la línea SH-HY-5Y Bexaroteno (2 - 0,5 μM) protege contra Paraquat (0,25 - 1 mM), en la línea CAD se encontró que Bexaroteno (0,5 y 2 μM) protege contra Paraquat (0.25 y 1 mM).

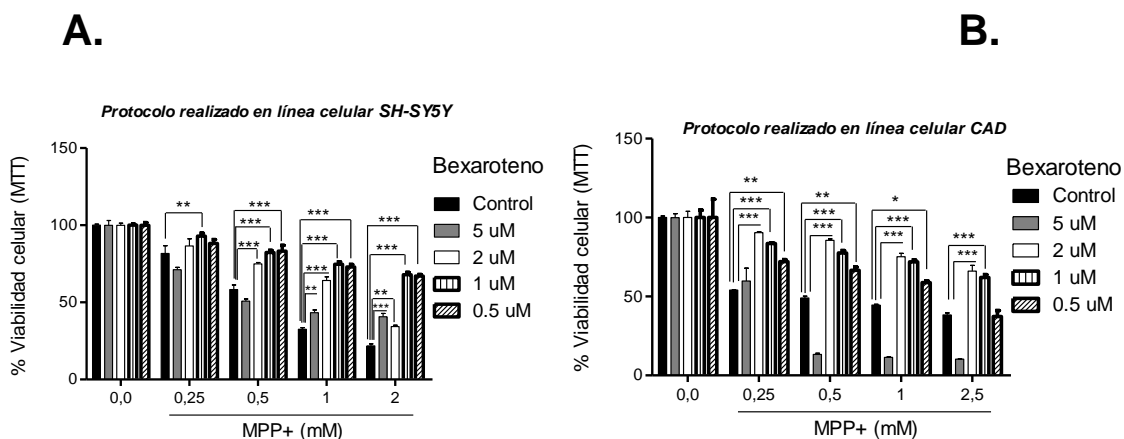


Ensayo de Neuroprotección: Tratamientos realizados con exposición de Bexaroteno (BEX) durante 6 horas, a continuación, se adicionó la toxina Paraquat (PQ) por un periodo de 18 horas. Todos los datos fueron normalizados respecto a las células SHSY5Y y CAD tratadas con vehículo y representan medias \pm SEM de 4 experimentos independientes. Se realizó Anova de dos vías y para comparaciones múltiples se aplicó la prueba de contrastes *T* de Bonferroni * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$. (control vs tratamiento).

Por último, se evaluó la protección de Bexaroteno frente a MPP+ encontrando que en la línea SHSY5Y, la protección se asoció a todas las concentraciones del agonista frente a 2 - 1 y 0,5 mM de MPP+ (Figura 4.20 A). En la línea CAD se presentó una protección significativa en todas las concentraciones de agonistas frente a todas las concentraciones de toxina expuestas (Figura 4.20 B).

Figura 4.20. Células CAD y SH-SY5Y pretratadas con Bexaroteno y posteriormente expuestas a MPP+. Se observa en la línea SH-HY-5Y Bexaroteno en todas las

concentraciones protege contra MPP+ (0,5 – 1 y 2 mM), en la línea CAD se encontró que Bexaroteno protegen en todas concentraciones frente al MPP+ en todas las concentraciones probadas.



Ensayo de Neuroprotección: Tratamientos realizados con exposición de Bexaroteno (BEX) durante 6 horas, a continuación, se adicionó la toxina MPP+ por un periodo de 18 horas. Todos los datos fueron normalizados respecto a las células SHSY5Y y CAD tratadas con vehículo y representan medias \pm SEM de 4 experimentos independientes. Se realizó Anova de dos vías y para comparaciones múltiples se aplicó la prueba de contrastes *T* de Bonferroni * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$. (control vs tratamiento).

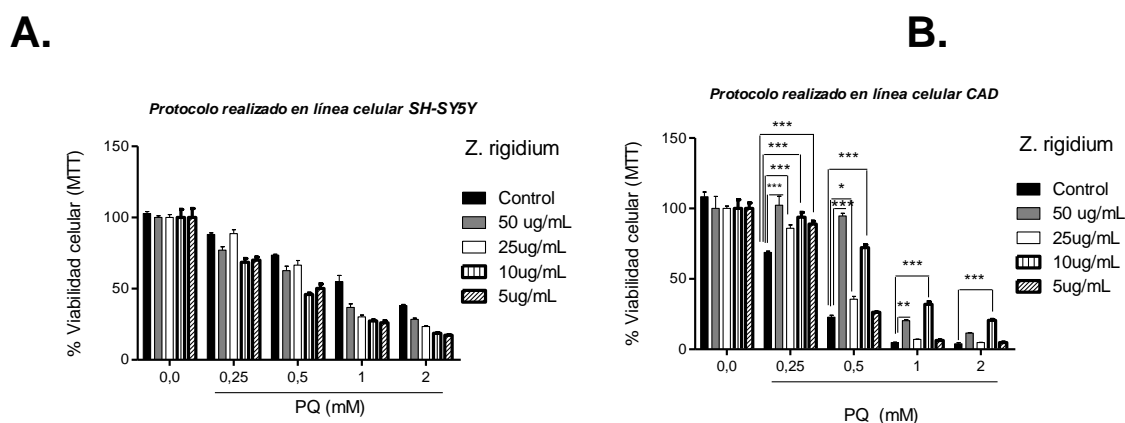
4.1.2.2 NEUROPROTECCIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES FRENTE A LAS TOXINAS MPP+ Y PQ

Para determinar la concentración a la cual era posible encontrar una protección mediada por los extractos vegetales al igual que con los agonistas sintéticos, se realizó una evaluación dosis-tiempo (Ver Anexos A Figura A3 – Figura A4) en los que se delimitaron cuatro concentraciones (50 - 25 -10 y 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para realizar los ensayos de neuroprotección.

Los resultados para el extracto *Zanthoxylum rigidium* fracción de hojas frente al PQ no presentaron protección en la línea celular SHSY5Y (Ver Figura 4.21 A), por el contrario en la línea CAD se encontró que *Z. rig* a concentraciones de 50 –25 –10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ protegieron contra PQ en todas las concentraciones con mayor relevancia en las concentraciones menores de toxina; frente a la concentración mas alta de PQ 2 mM *Z. rig* a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$

mantuvo una protección significativa en esta línea celular (Ver Figura 4.21 B). Este extracto en las mismas concentraciones, pero evaluado frente a MPP+ presentó protección en las dos líneas celulares (Ver figura 4.22 A - B), es de resaltar que en la línea CAD la mayor protección fue generada por la concentración mas alta de extracto 50 µg/mL esta tendencia se mantuvo frente a todas las concentraciones de toxina.

Figura 4.21 Células CAD y SH-SY5Y pretratadas con Zanthoxylum rigidium (hojas) y posteriormente expuestas a Paraquat. En la línea SHSY5Y no se observa protección, en la línea CAD se encontró que Zanthoxylum rigidium en concentraciones (50 –25 –10µg/mL) protege contra Paraquat en todas las concentraciones probadas.

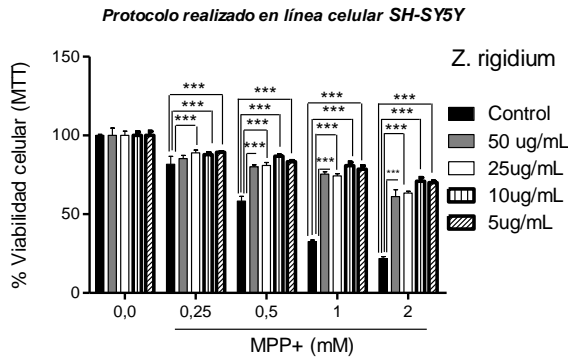


Ensayo de Neuroprotección: Tratamientos realizados con exposición de *Zanthoxylum rigidium* (hojas) durante 6 horas, a continuación, se adicionó la toxina PQ por un periodo de 18 horas. Todos los datos fueron normalizados respecto a las células SHSY5Y y CAD tratadas con vehículo y representan medias \pm SEM de 4 experimentos independientes. Se realizó Anova de dos vías y para comparaciones múltiples se aplicó la prueba de contrastes *T* de Bonferroni * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$. (control vs tratamiento).

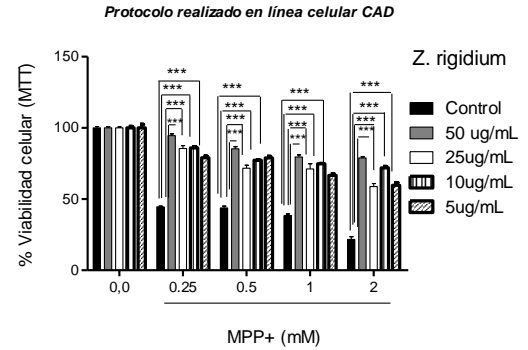
Figura 4.22 Células CAD y SH-SY5Y pretratadas con Zanthoxylum rigidium (hojas) y posteriormente expuestas a MPP+. En la línea SHSY5Y y en la línea CAD se encontró que Zanthoxylum rigidium ejerce protección en toda la concentración frente a todas las concentraciones de MPP+

Análisis del efecto neuroprotector de agonistas de receptores nucleares en modelo farmacológico de Parkinson en neuronas dopaminérgicas

A.



B.

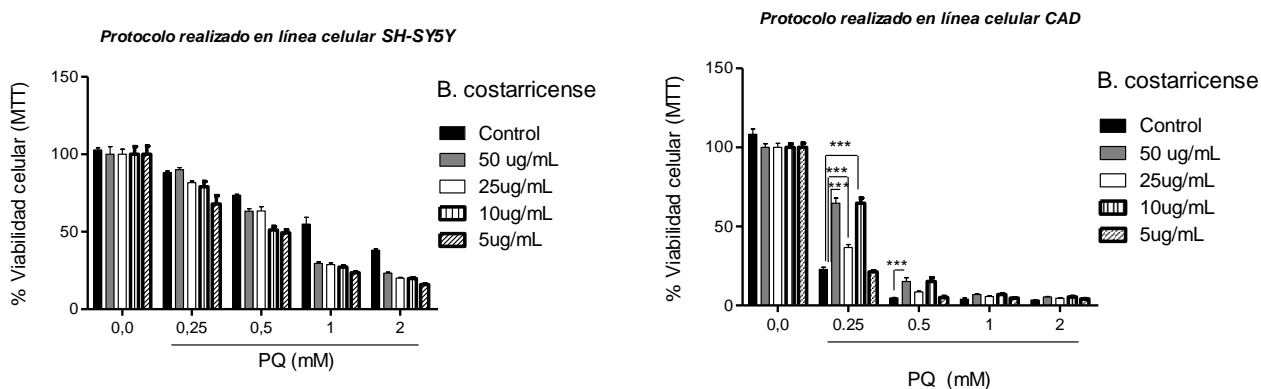


Ensayo de Neuroprotección: Tratamientos realizados con exposición de *Zanthoxylum rigidum* (hojas) durante 6 horas, a continuación, se adicionó la toxina MPP+ por un periodo de 18 horas. Todos los datos fueron normalizados respecto a las células SHSY5Y y CAD tratadas con vehículo y representan medias \pm SEM de 4 experimentos independientes. Se realizó Anova de dos vías y para comparaciones múltiples se aplicó la prueba de contrastes *T* de Bonferroni * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$. (control vs tratamiento).

Los resultados de los experimentos realizados con el extracto *Beilschmiedia costarricense* frente al PQ en la línea SHSY5Y, no mostraron protección. En la línea CAD se observó la protección con las concentraciones 50-25 y 10 $\mu\text{g/mL}$, frente a la menor concentración de PQ (Ver figura 4.23 A – B). En contraste cuando se evaluó la protección de este extracto frente a MPP+ los resultados evidencian protección frente a todas las concentraciones de la toxina. Es de resaltar que no se presentan diferencias significativas entre la protección brindada por la concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$ y 5 $\mu\text{g/mL}$, en la línea SHSY5Y la protección no fue significativa a 0,25 mM (Ver Figura 4.24 A – B). **Figura 4.23. Células CAD y SH-SY5Y pretratadas con *Beilschmiedia costarricense* y posteriormente expuestas a Paraquat.** En la línea SHSY5Y no se observa protección, en la línea CAD se encontró que *Beilschmiedia costarricense* en concentraciones (50 –25 –10 $\mu\text{g/mL}$) protege contra Paraquat (0,12 – 0,25 – 0,5 mM).

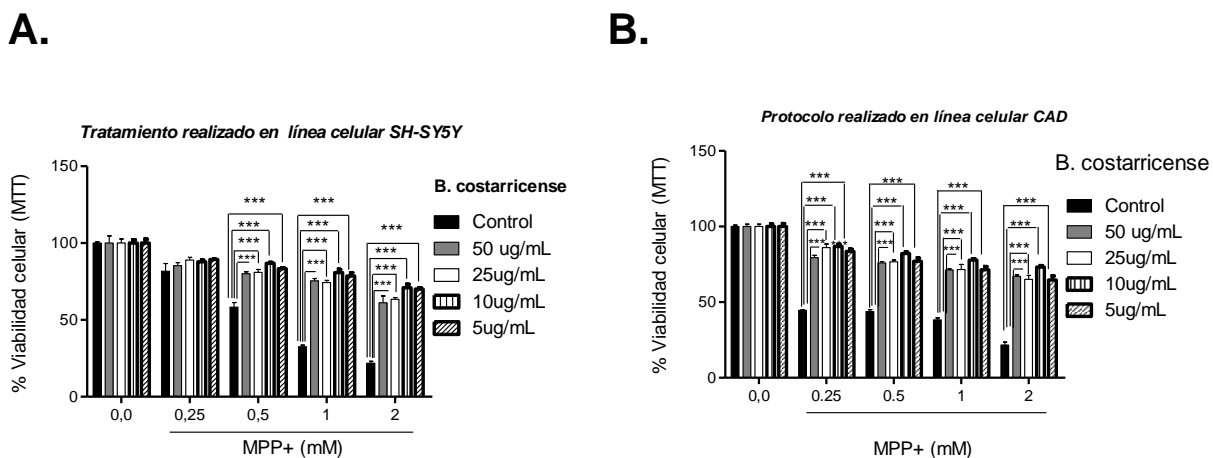
A.

B.



Ensayo de Neuroprotección: Tratamientos realizados con exposición de *Beilschmiedia costarricense* durante 6 horas, a continuación, se adicionó la toxina PQ por un periodo de 18 horas. Los resultados presentados exponen la media y la SD (n=3) *** p < 0,001 ** p < 0,01 * p < 0,05 (control vs tratamiento). Todos los datos fueron normalizados respecto a las células SHSY5Y y CAD tratadas con vehículo y representan medias ± SEM de 4 experimentos independientes. Se realizó Anova de dos vías y para comparaciones múltiples se aplicó la prueba de contrastes T de Bonferroni * p<0,05; ** p<0,01 y *** p<0,001. (control vs tratamiento).

Figura 4.24 Células CAD y SH-SY5Y pretratadas con *Beilschmiedia costarricense* y posteriormente expuestas a MPP+. En la línea SHSY5Y en todas las concentraciones protege contra MPP+ (0,5 – 1 y 2 mM), en la línea CAD se encontró que *Beilschmiedia costarricense* protegen en todas concentraciones frente al MPP+ en todas las concentraciones probadas.



Tratamientos realizados con explosión de *Beilschmiedia costarricense* durante 6 horas, a continuación, se adicionó la toxina MPP+ por un periodo de 18 horas. Todos los datos fueron normalizados respecto a las células SHSY5Y y CAD tratadas con vehículo y representan medias ± SEM de 4 experimentos independientes. Se realizó Anova de dos

vías y para comparaciones múltiples se aplicó la prueba de contrastes *T* de Bonferroni * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$. (control vs tratamiento).

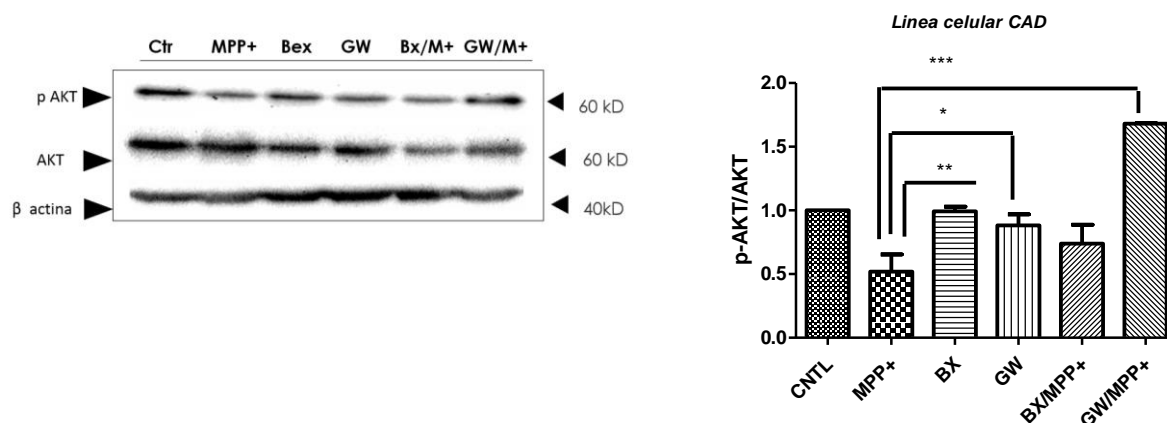
4.2. Resultados de la activación de AKT

4.2.1 Cuantificación: Activación de AKT mediada por los agonistas farmacológicos.

Para el análisis de la vía AKT se realizó el protocolo de neuroprotección en las dos líneas celulares con una misma concentración de MPP+ (0,5 mM) la cual no afectaba los niveles de AKT total, para los agonistas de RXR y LXR se utilizó la concentración de 1 μ M. La normalización de los datos se llevó a cabo calculando la razón de los valores de densitometría (p AKT/AKT total) y luego se normalizó con los valores para β -actina.

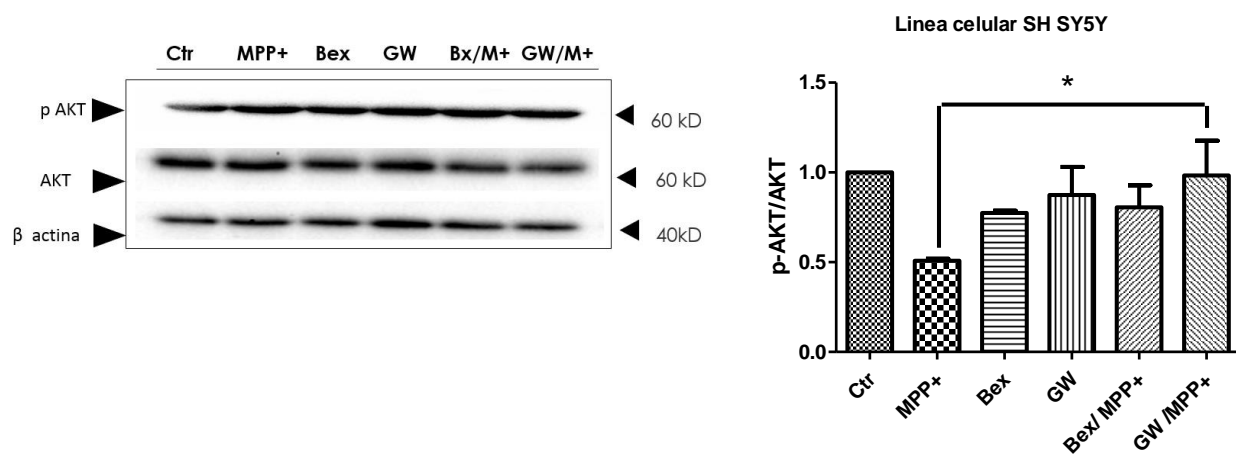
Los resultados de la activación de AKT por fosforilación de la S473 en la línea CAD presentan un incremento significativo $p < 0,001$ asociado a GW cuando se realiza la exposición en conjunto con MPP+ (Ver Figura 26). Los resultados en la línea SHSY5Y son similares con una significancia menor $p < 0,05$ con una activación de AKT mediada por GW y MPP+ (Ver Figura 4.27).

Figura 4.26 Western blot del efecto neuroprotector mediado por el pretratamiento de agonistas farmacológicos de RN (6 h) con posterior adición de la toxina MPP+ (18 h) en la línea celular CAD. Se observa un incremento significativo de GW/MPP+ en la relación p-AKT/AKT



Análisis comparativo de los cambios en la fosforilación de AKT con solo los agonistas farmacológicos de RN (RXR y LXR) y MPP+. Todos los datos fueron normalizados respecto a las células CAD tratadas con vehículo. Se realizó Anova de una vía y para comparaciones múltiples se aplicó la prueba de contrastes *T* de Bonferroni * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$.

Figura 4.27. Western blot del efecto neuroprotector mediado por el pretratamiento de agonistas farmacológicos de RN (6 h) con posterior adición de la toxina MPP+ (18 h) en la línea celular SHSY5Y. No se presentan cambios significativos asociados al aumento de p-AKT.



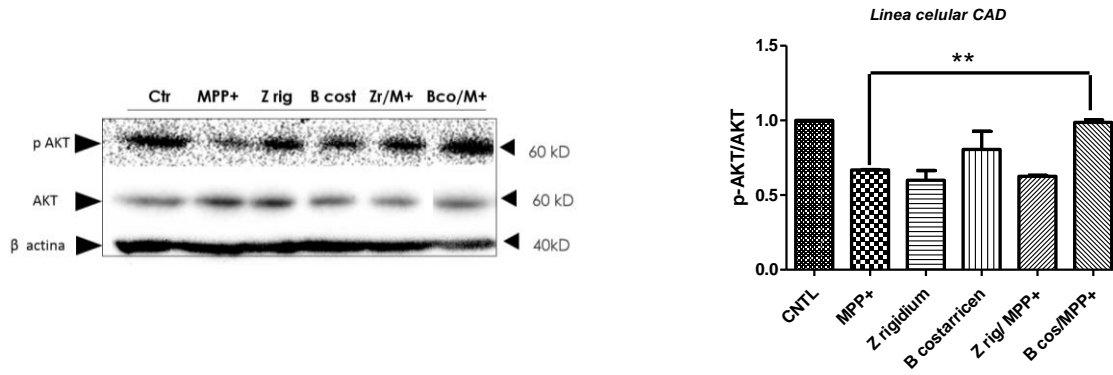
Análisis comparativo de los cambios en la fosforilación de AKT con solo los agonistas farmacológicos de RN (RXR y LXR) y MPP+. Todos los datos fueron normalizados respecto a las células SHSY5Y tratadas con vehículo. Se realizó Anova de una vía y para comparaciones múltiples se aplicó la prueba de contrastes *T* de Bonferroni * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$.

4.2.2 Cuantificación: Activación de AKT mediada por los extractos vegetales

En el caso de los extractos vegetales se probó la mayor concentración (50 $\mu\text{g/mL}$) con la misma concentración de la toxina MPP+ (0,5 mM). Los resultados de activación de AKT mediada por los extractos muestran que *Beilschmedia costarricense* en presencia de MPP+ genera un aumento de la fosforilación con una significancia $p < 0,01$ (Ver Figura 4.28). En la línea SHSY5Y los resultados son similares, presentando una activación significativa de AKT en presencia de este extracto y MPP+ con $p < 0,001$ (Ver Figura 4.29.)

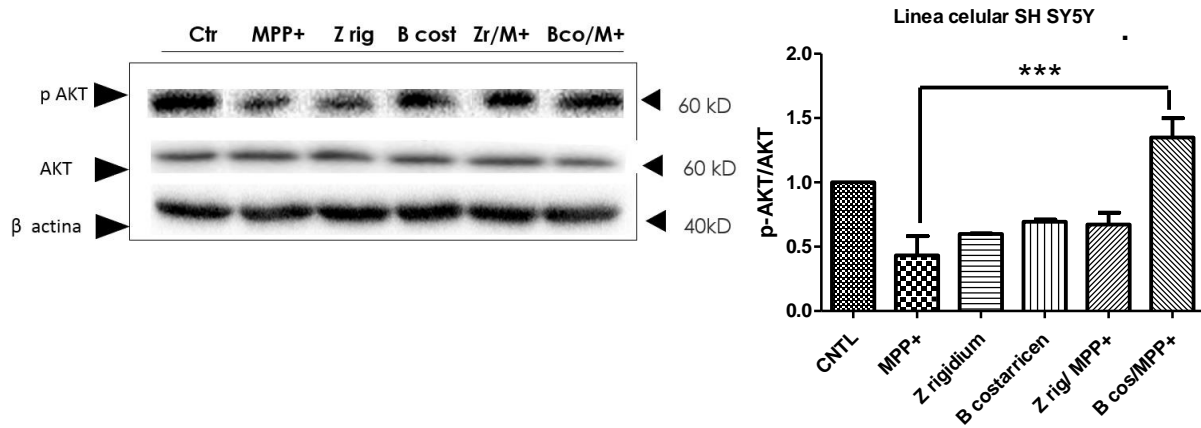
Análisis del efecto neuroprotector de agonistas de receptores nucleares en modelo farmacológico de Parkinson en neuronas dopaminérgicas

Figura 4.28 Western blot del efecto neuroprotector mediado por el pretratamiento de extractos vegetales (6 h) con posterior adición de la toxina MPP+ (18 h) en la línea celular CAD. Se observa una reducción de la p-AKT en las células expuestas a los extractos y MPP+



Análisis comparativo de los cambios en la fosforilación de AKT con solo los extractos vegetales y MPP+. Todos los datos fueron normalizados respecto a las células CAD tratadas con vehículo. Se realizó Anova de una vía y para comparaciones múltiples se aplicó la prueba de contrastes *T* de Bonferroni * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$.

Figura 4.29 Western blot del efecto neuroprotector mediado por el pretratamiento de extractos vegetales (6 h) con posterior adición de la toxina MPP+ (18 h) en la línea celular SH SY5Y. Se presentó un incremento en la relación p-AKT/AKT con la exposición B.cos/MPP+



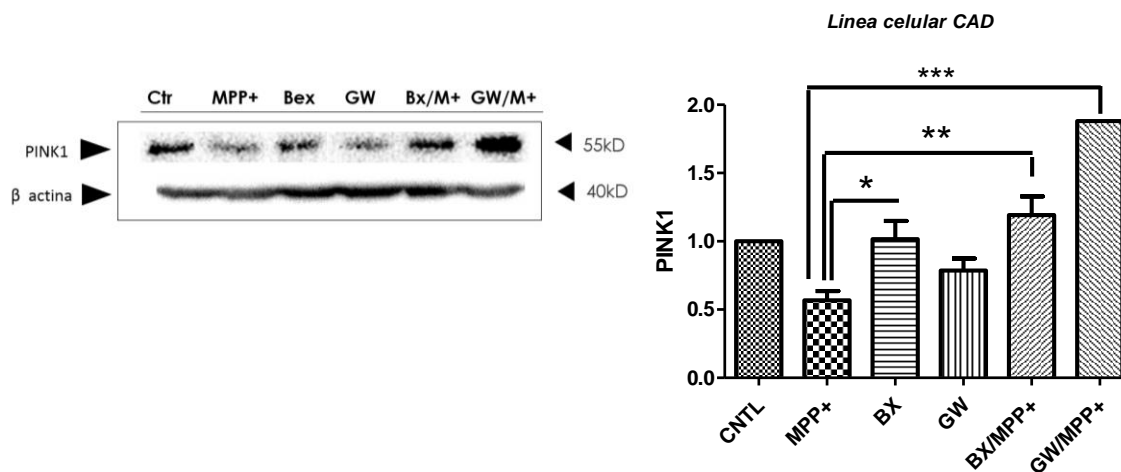
Análisis comparativo de los cambios en la fosforilación de AKT con solo los extractos vegetales y MPP+. Todos los datos fueron normalizados respecto a las células SHSY5Y tratadas con vehículo. Se realizó Anova de una vía y para comparaciones múltiples se aplicó la prueba de contrastes *T* de Bonferroni * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$.

4.3. Objetivo Específico: Expresión de PINK1 y su función protectora

4.3.1 Cuantificación: *Expresión de PINK1 mediada por los agonistas farmacológicos.*

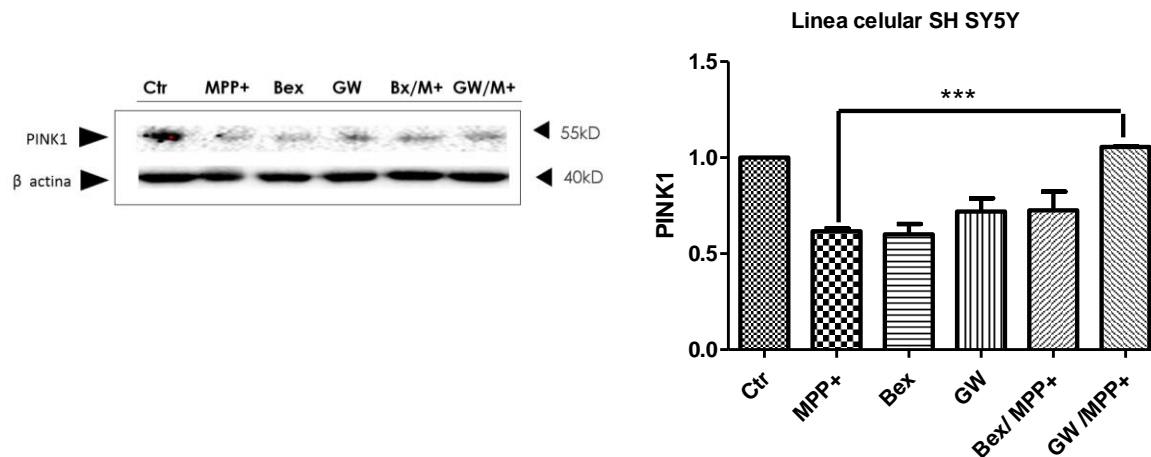
Los resultados de la cuantificación de PINK presentan cambios significativos mediados por el tratamiento de los agonistas sintéticos en la línea CAD y muestran un incremento significativo cuando las células estaban sometidas a estrés. En el caso de GW se observó un incremento significativo ($p < 0,001$) cuando se adiciono MPP+. Por otro lado, BX presento un comportamiento similar pero con una significancia de $p < 0,01$ (Ver Figura 4.30). En la línea SHSY5Y el tratamiento con GW/MPP+ fue el único que incremento significativamente la expresión de PINK1 $p < 0,001$ (Ver Figura 4.31).

Figura 4.30 Western blot de los cambios de PINK1 en la línea CAD. mediados por agonistas sintéticos



Cuantificación del cambio generado en la expresión de la proteína por el pretratamiento de agonistas farmacológicos de RN (6 h) con posterior adición de la toxina MPP+ (18 h) en la línea celular CAD. Todos los datos fueron normalizados respecto a las células CAD tratadas con vehículo. Se realizó Anova de una vía y para comparaciones múltiples se aplicó la prueba de contrastes *T* de Bonferroni * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$.

Figura 4.31. Western blot de los cambios de PINK1 en la línea SH SY5Y mediados por agonistas sintéticos

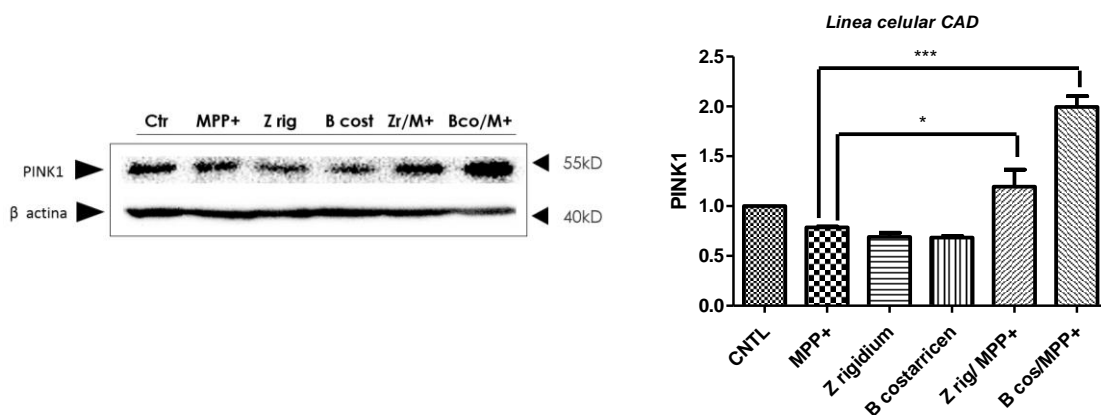


Cuantificación del cambio generado en la expresión de la proteína por el pretratamiento de agonistas farmacológicos de RN (6 h) con posterior adición de la toxina MPP+ (18 h) en la línea celular SH SY5Y. Todos los datos fueron normalizados respecto a las células SHSY5Y tratadas con vehículo. Se realizó Anova de una vía y para comparaciones múltiples se aplicó la prueba de contrastes *T* de Bonferroni * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$.

4.3.2 Cuantificación: *Expresión de PINK1 mediada por los extractos vegetales*

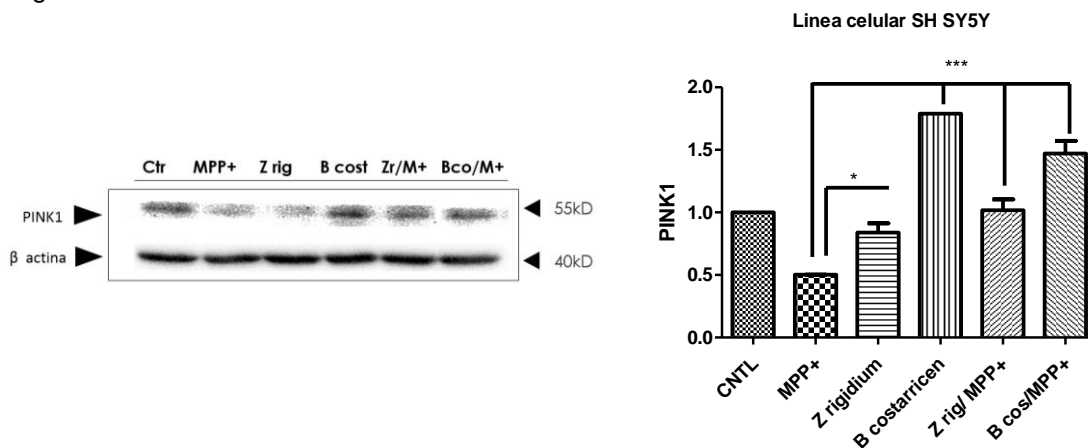
Respecto al efecto que los extractos vegetales pueden tener sobre la expresión de PINK1 los resultados de la cuantificación de WB presentan resultados significativos en ambas líneas celulares. En el caso de la línea CAD el extracto *B.cos* muestra una $p < 0,001$ cuando se adiciona MPP+ al tratamiento y para *Z.rig* la significancia fue de $p < 0,05$ con MPP+ (Ver Figura 4.32). Para el caso de la línea SHSY5Y los resultados fueron significativos incluso sin la adición de MPP+ para *Z.rig* con $p < 0,05$ y *B.cos* $p < 0,001$. Con ambos extractos cuando se adiciono MPP+ el incremento fue significativo. (Ver Figura 4.33)

Figura 4.32 Western blot de los cambios de PINK1 en la línea CAD mediados por extractos vegetales



Cuantificación del cambio generado en la expresión de la proteína por el pretratamiento de extractos vegetales (6 h) con posterior adición de la toxina MPP+ (18 h) en la línea celular CAD. Todos los datos fueron normalizados respecto a las células CAD tratadas con vehículo. Se realizó Anova de una vía y para comparaciones múltiples se aplicó la prueba de contrastes *T* de Bonferroni * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$.

Figura 4.33. Western blot de los cambios de PINK1 en la línea SH SY5Y mediados por extractos vegetales



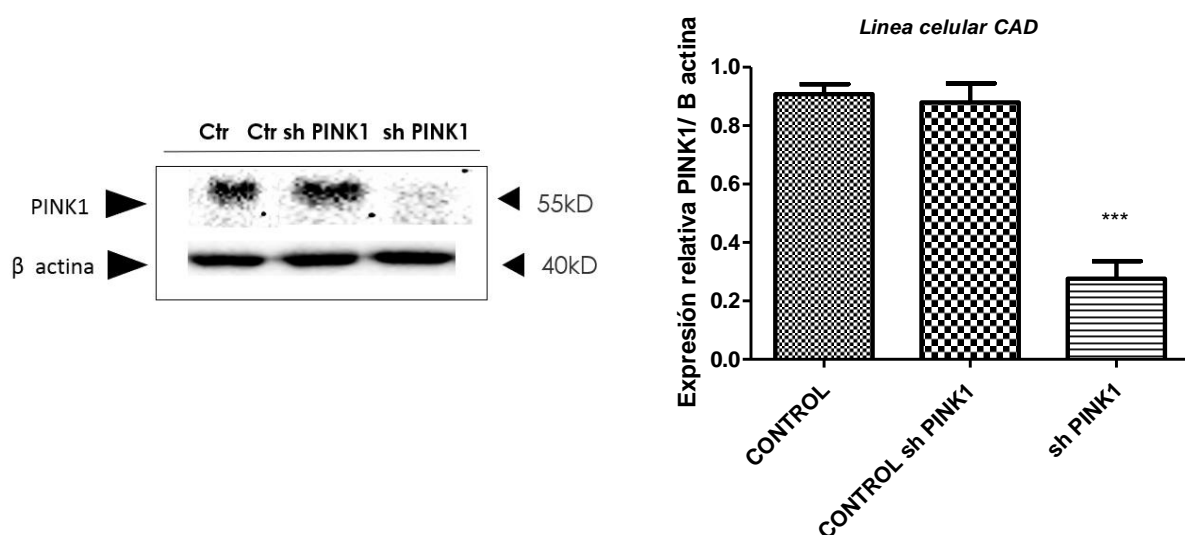
Cuantificación del cambio generado en la expresión de la proteína por el pretratamiento de extractos vegetales (6 h) con posterior adición de la toxina MPP+ (18 h) en la línea celular SH SY5Y. Todos los datos fueron normalizados respecto a las células SHSY5Y tratadas con vehículo. Se realizó Anova de una vía y para comparaciones múltiples se aplicó la prueba de contrastes *T* de Bonferroni * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$.

4.3.3. Silenciamiento de PINK1

Se realizó el silenciamiento de la proteína PINK en la línea CAD mediante la transfección de las células, este silenciamiento se verificó mediante el WB encontrado una reducción

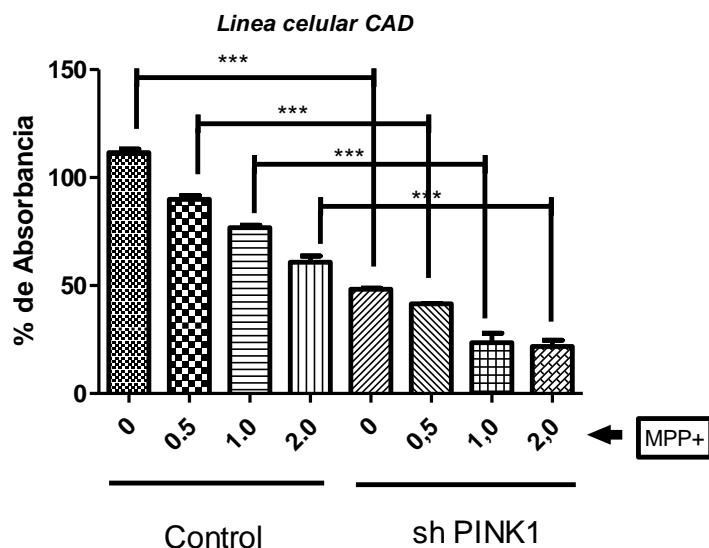
significativa ($p < 0,001$) respecto al control de silenciamiento y a las CAD silvestres (Ver Figura 4.34). A continuación, se realizó un ensayo de MTT en el cual se verificó la reducción en la viabilidad celular solo con el silenciamiento y con la toxina MPP+. Los resultados presentan una reducción significativa ($p < 0,001$) la viabilidad de las células silenciada sin ningún tratamiento y cuando se exponen las células Control vs sh PINK1 a MPP+ la viabilidad se reduce significativamente (Ver Figura 4.35).

Figura 4.34. Western blot del silenciamiento de PINK1 en la línea CAD. En la cuantificación se analizó la expresión en células CAD silvestres, CAD transfectadas con scramble vs CAD sh PINK1.



Cuantificación de la expresión de PINK1 en células CAD transfectadas. Todos los datos fueron normalizados respecto a las células CAD silvestre, y representan medias \pm SEM de 3 experimentos independientes. Se realizó Anova de una vía y para comparaciones múltiples se aplicó la prueba de contrastes *T* de Bonferroni * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$.

Figura 4.35 Resultado de MTT: Efecto de la toxina MPP+ sobre la viabilidad en CAD shControl vs shPINK1 en el contexto del silenciamiento de PINK1.



Tratamientos realizados con explosión de MPP+ por un periodo de 24 horas en la línea celular CAD Todos los datos fueron normalizados respecto a las células CAD silvestre, y representan medias \pm SEM de 3 experimentos independientes. Se realizó Anova de dos vías y para comparaciones múltiples se aplicó la prueba de contrastes *T* de Bonferroni * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$. (sh Control y sh PINK1).

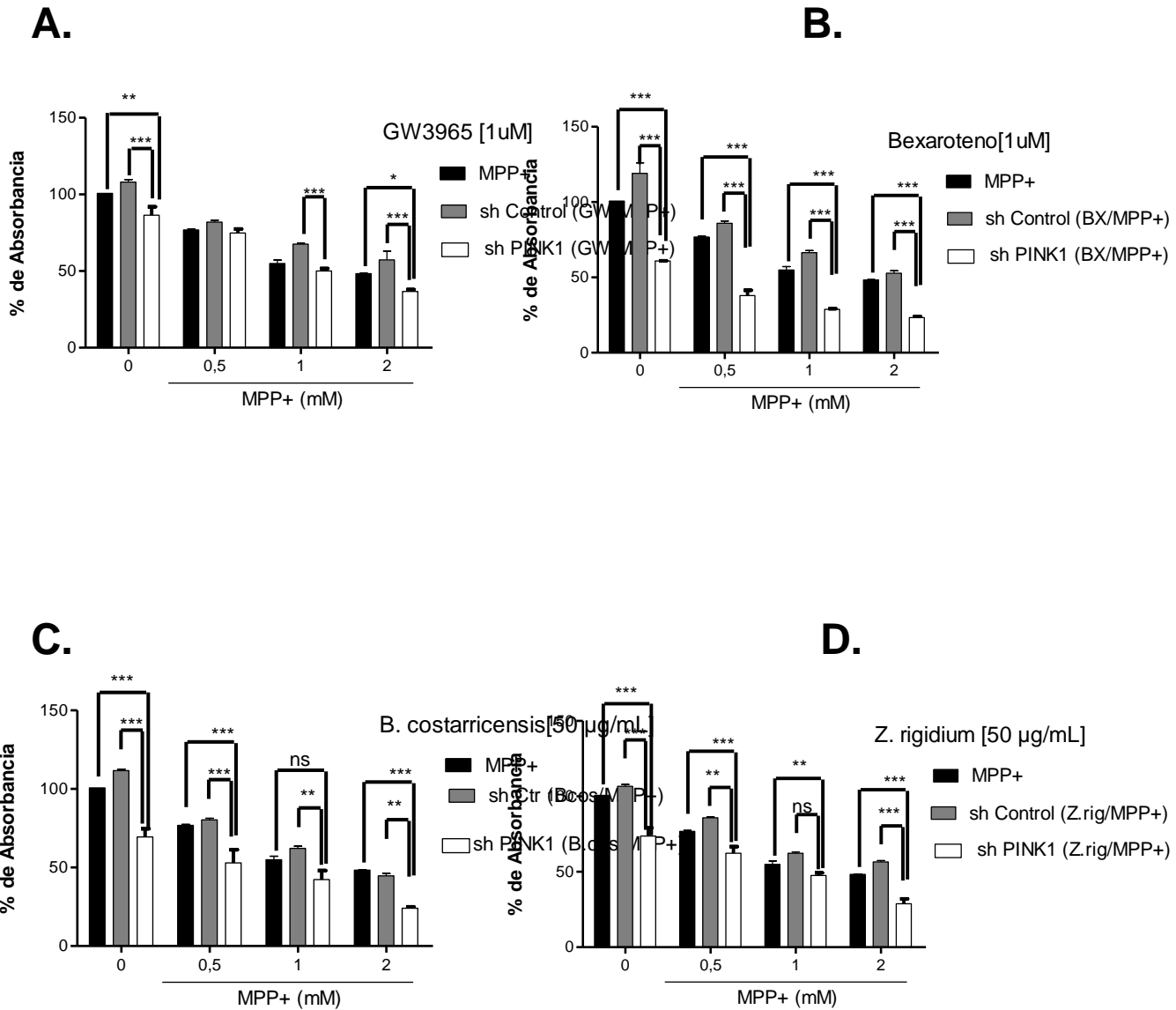
4.1.3 4.3.4. Efectos del silenciamiento de PINK1 sobre la Viabilidad celular

Los ensayos de MTT se realizaron con el objetivo de comparar el efecto del silenciamiento de PINK1 sobre la actividad neuroprotectora de los agonistas y los extractos vegetales en respuesta al efecto deletéreo de MPP+. La Figura 4.36.A presenta los resultados de GW (1 μ M) donde se evidencia que bajo condiciones basales el silenciamiento reduce la viabilidad celular con una pérdida significativa respecto al shControl, respecto a la neuroprotección encontrada con los ensayos previos, el silenciamiento redujo significativamente cuando las células son sometidas a altos niveles de estrés, presentando una reducción significativa al exponerla a 2 mM de MPP+ , esta reducción de la viabilidad fue menor incluso con respecto a MPP+ (Ver Figura 4.36 A)

Con respecto al BEX (1 μ M) el silenciamiento generó una reducción significativamente de la viabilidad en condiciones basal, al realizar el protocolo de neuroprotección en las células sh PINK1 la protección asociada se perdió e incluso el metabolismo se mitocondrial se redujo a niveles inferiores a las células tratadas MPP+ (Ver Figura 4.367 B)

Los extractos vegetales B.cos y Z.rig fueron evaluados a una concentración de 50 μ g/mL encontrando una drástica pérdida de la viabilidad en las células, también se observó la pérdida del efecto neuroprotector observado en experimentos previos, esta reducción fue significativa frente a shControl y frente a MPP+ (Figura 4.36 C. D.)

Figura 4.36 Resultados MTT ensayo de neuroprotección en células CAD sh Control y CAD sh PINK1. Sobre el efecto neuroprotección de agonistas farmacológicos y extractos vegetales frente al MPP+.



Experimentos realizados en células transfectadas con scramble, células silenciadas para PINK1 y células CAD silvestres tratadas con MPP+. **Figura A.** Las células transfectadas fueron pretratadas con GW (1 μ M) durante 6 horas y posteriormente expuestas a MPP+ (0,5 – 1 – 2 mM) durante 18 horas; los resultados muestran diferencias significativas entre (CAD control vs CAD shPINK1) y (MPP+ vs shPINK1), la reducción de la viabilidad se presentó en condiciones basales y frente a la exposición 2mM de MPP+. **Figura B** Células pretratadas con BX (1 μ M) por 6 horas y posteriormente expuestas a MPP+ (0,5 – 1 – 2 mM) durante 18 horas; los resultados muestran una reducción significativa de la viabilidad entre (CAD control vs CAD shPINK1) y (MPP+ vs shPINK1) la reducción fue significativa en condiciones basales y frente a todas las concentraciones de MPP+. **Figura C** Células pretratadas con B.cos(50 μ g/mL) por 6 horas y posteriormente expuestas a MPP+ (0,5 – 1 – 2 mM) durante 18 horas; los resultados muestran una reducción significativa de la viabilidad entre (CAD control vs CAD shPINK1) y (MPP+ vs shPINK1) la reducción fue significativa en condiciones basales y frente a todas las concentraciones de MPP+. **Figura D** Células pretratadas con Z. rig (50 μ g/mL) por 6 horas y posteriormente expuestas a MPP+ (0,5 – 1 – 2 mM) durante 18 horas; los resultados muestran una reducción significativa de la viabilidad entre (CAD control vs CAD shPINK1) y (MPP+ vs shPINK1) la reducción fue significativa en condiciones basales y frente a todas las concentraciones de MPP+. Se realizó Anova de dos vías y para comparaciones múltiples se aplicó la prueba de contrastes *T* de Bonferroni * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$. (sh Control y sh PINK1).

5. CAPITULO. DISCUSIÓN

En la actualidad las intervenciones farmacológicas en la EP se han limitado al manejo de los síntomas motores, la dificultad de este abordaje es la degeneración progresiva del núcleo dopaminérgico de SNpc, que facilita la tolerancia a estos fármacos aumentando la probabilidad de aparición de efectos secundarios indeseables que suelen generar mayores niveles de discapacidad en los pacientes con EP^{33,109,110}.

Las estrategias farmacológicas alternativas, como los agonistas de RN y extractos vegetales son considerados como una opción viable que puede actuar en etapas tempranas e incluso pueden tener efectos neuroprotectores que repercuten en la historia natural de la enfermedad^{80,81,83}.

En este trabajo se hizo uso de la toxina MPP+ por ser una toxina que no solo es específica para ND por requerir del uso del DAT, sino también por la amplia descripción que se ha realizado sobre su inhibición del complejo 1 y la cascada de eventos asociadas al proceso de muerte por apoptosis en ND^{88,114}. Por otro lado el estudio de algunas formas genéticas ha permitido identificar genes que tiene una función protectora, es el caso de PINK1 también llamado "*el guardián mitocondrial*"^{18,115}. Esta quinasa no solo está relacionada con la dinámica mitocondrial controlando la mitofagia, sino también se relaciona con el tráfico mitocondrial, la plasticidad sináptica y el balance de Ca⁺ intracelular. Esto ha generado gran interés en la búsqueda de estrategias que incrementen sus niveles y promuevan la supervivencia de la ND^{18,61,116}.

En este contexto de disfunción mitocondrial asociado al daño del complejo I y con el antecedente del incremento en la expresión de PINK1 secundario al uso de GW3965^{17,63}, se planteó la hipótesis que el tratamiento con agonistas de RN y extractos vegetales podrían ser capaces de activar RN como estrategia terapéutica para proteger un modelo de ND (líneas CAD y SH SY5Y) expuestas a MPP+.

La hipótesis planteada en este trabajo se relaciona con una acción genómica mediante la cual estos agonistas de RN puedan generar un incremento en la expresión de PINK1 y de esta forma promover una posible acción neuroprotectora intrínseca. Se ha observado en algunos estudios que el aumento en la expresión PINK1 se ha relacionado con una consecuente fosforilación de la vía AKT/mTORC2, así como un aumento en la señalización nuclear de PKA^{59,60,61}.

Los resultados de neuroprotección realizados entre los agonistas y los extractos vegetales muestran neuroprotección visto desde los MTT, al evaluar los cambios en la p-AKT GW en la línea CAD muestra un incremento en la fosforilación cuando se encuentran con la toxina MPP+, al analizar los cambios en la expresión de PINK1 se presenta el mismo incremento con GW y MPP+ lo que en parte conduce a explorar si existe una relación dependiente entre p-AKT y PINK1, para probarla se realizó el silenciamiento de PINK1 el cual fue comprobado mediante WB (ver figura 4.17).

La forma que se usó para evaluar si la protección encontrada cambia debido al silenciamiento PINK1 fue mediante ensayos de MTT, comparando el control (células CAD transfectadas con un scramble) y células silenciadas para PINK1, los tratamientos evaluados de agonistas y extractos vegetales con MPP+ siguieron el mismo protocolo de neuroprotección de exposición de 6 horas del compuesto protector a continuación se adicionó MPP+ (0,5 -1 – 2 mM) (Ver Figura 4.19).

Los resultados de los ensayos de neuroprotección en el contexto del silenciamiento de PINK1 presentan una pérdida significativa de la protección mediada por BX, B.cos y Z rig. En el caso de GW se observan cambios en la protección fueron menos marcado pero se observa una dependencia parcial, por lo menos frente a niveles de estrés altos 2 mM de MPP+. Esto sugiere preliminarmente que la protección depende de PINK1 en el contexto de BX, B.cos y Z rig. en GW esta protección se hace evidente durante la pérdida del potencial

Si bien la protección parece en principio estar asociada a PINK1, se hace necesario cuantificar los cambios en la fosforilación de AKT, así como por medio de bioinformática encontrar una secuencia de reconocimiento de RXR en el promotor de PINK1 que se asocie la protección encontrada. En el caso de los extractos vegetales se requiere realizar

un fraccionamiento a fin de encontrar la molécula activa y asociar este compuesto a una actividad, debido a que la mezcla de compuesto es difícil determinar un solo mecanismo de acción.

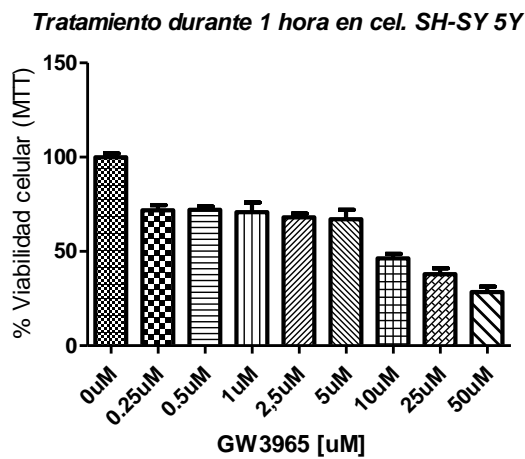
En este estudio preliminar se determinó la función protectora de forma preliminar puede esta mediada por PINK1, Esto abre nuevas alternativas de investigación sobre otras vías asociada a la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas y el papel de los RN. De igual forma llama la atención la protección encontrada con los extractos vegetales, dado la relevancia que estos han tenido en los últimos años y que se ha visto como la nueva frontera para el desarrollo de terapias alternativas para el manejo no solo de la EP también de otras enfermedades neurodegenerativas.

6. CAPÍTULO. ANEXOS

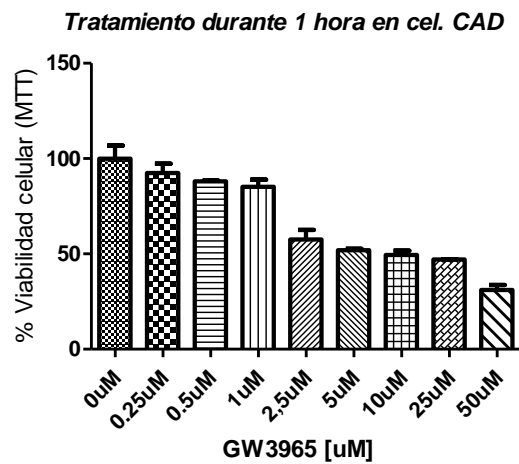
6.1 Anexo A. Evaluación dosis de respuesta a diferentes tiempos (1-6-12-24).

A.3. Evaluación del agonista LXR GW3965 en las líneas SH SY5Y y CAD

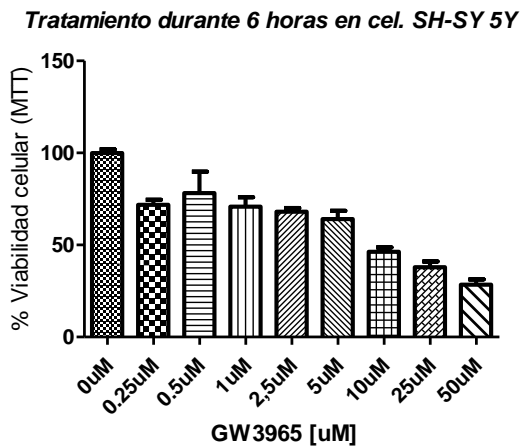
A



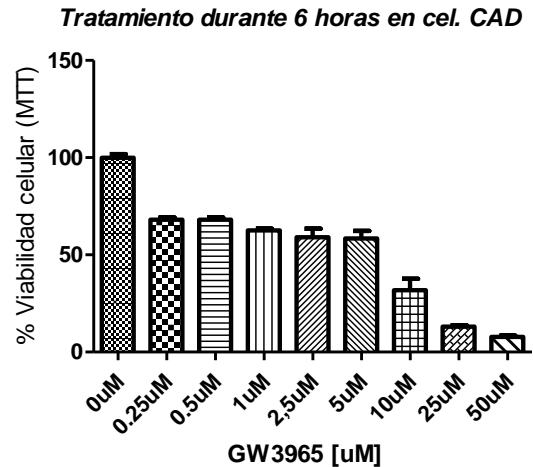
B



C



D



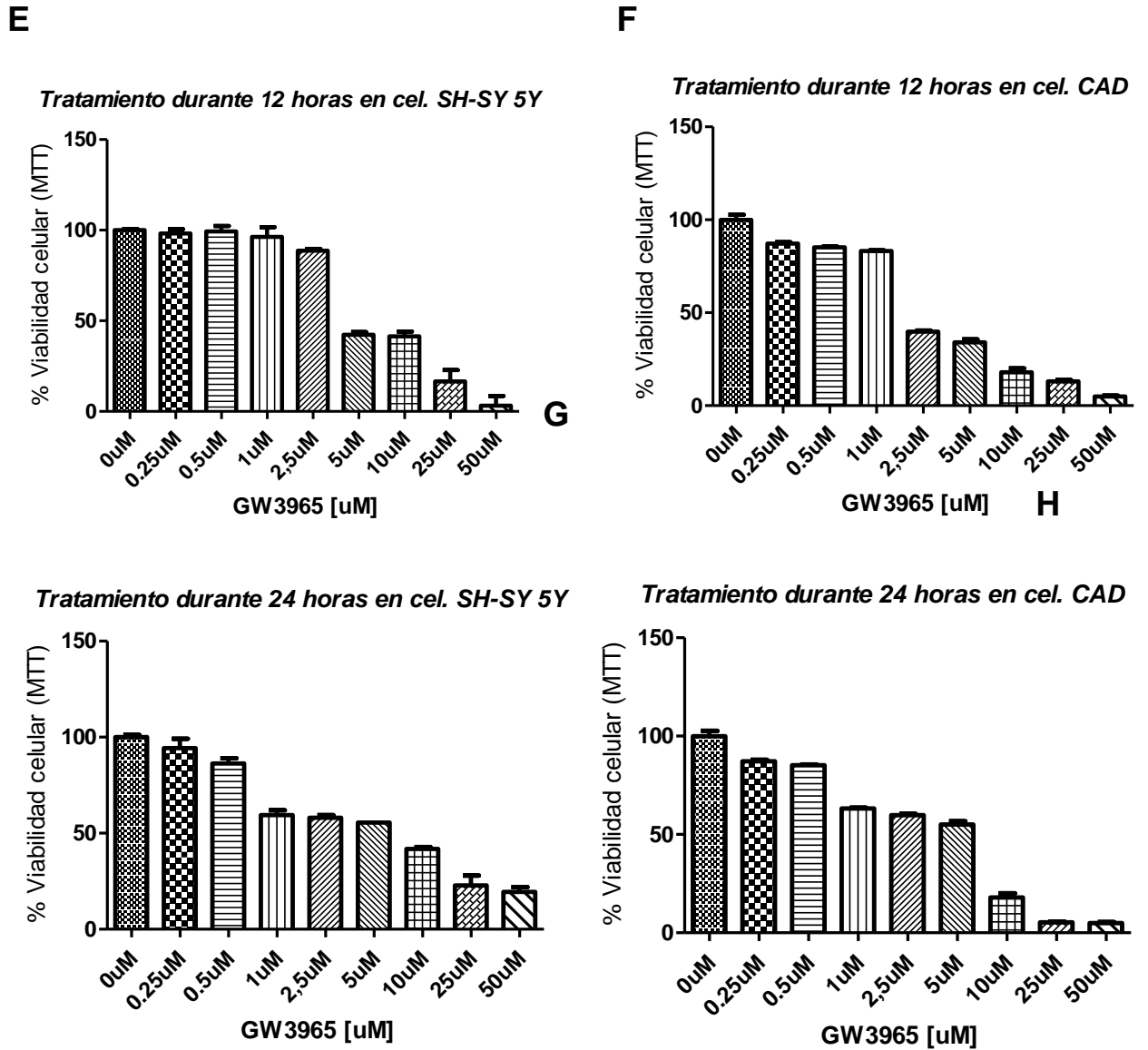
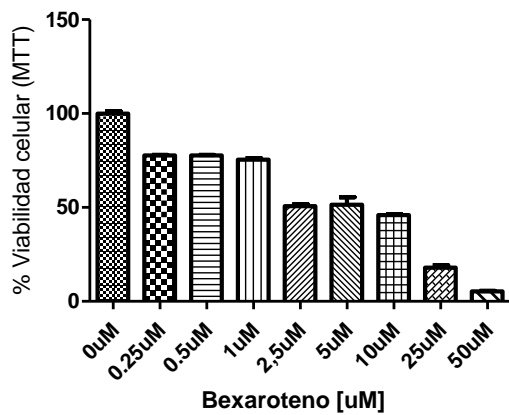


Figura C.1 Evaluación de viabilidad en respuesta a dosis incremental del agonista del LXR GW3965. La dosis mínima fue 0,25 uM hasta una dosis máxima 50 Um. Los resultados presentados exponen la media y la SEM (n=3).

EVALUACION DEL AGONISTA RXR BEXAROTENO EN LAS LINEAS SH SY 5Y Y CAD

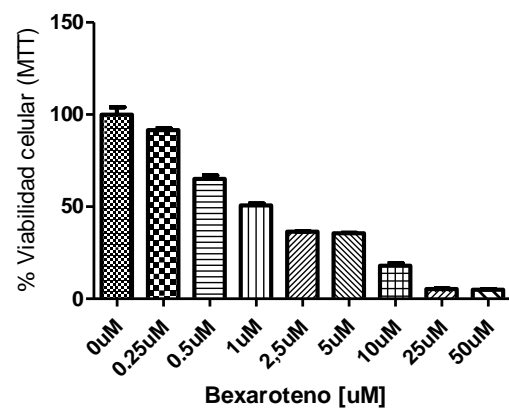
A

Tratamiento durante 1 hora en cel. SH-SY 5Y



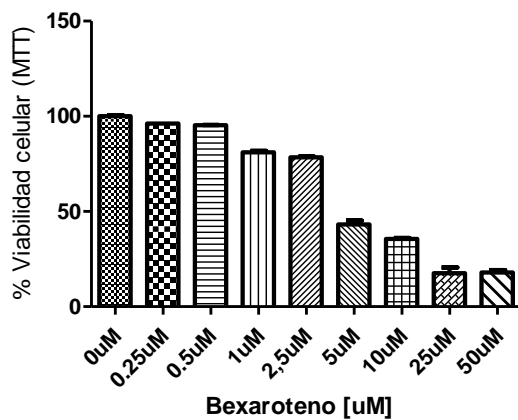
B

Tratamiento durante 1 hora en cel. CAD



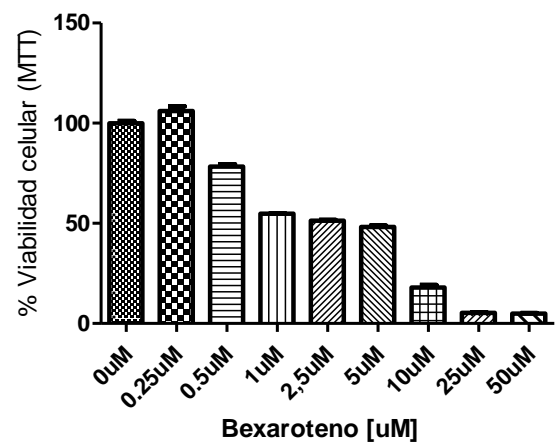
C

Tratamiento durante 6 horas en cel. SH-SY 5Y



D

Tratamiento durante 6 horas en cel. CAD



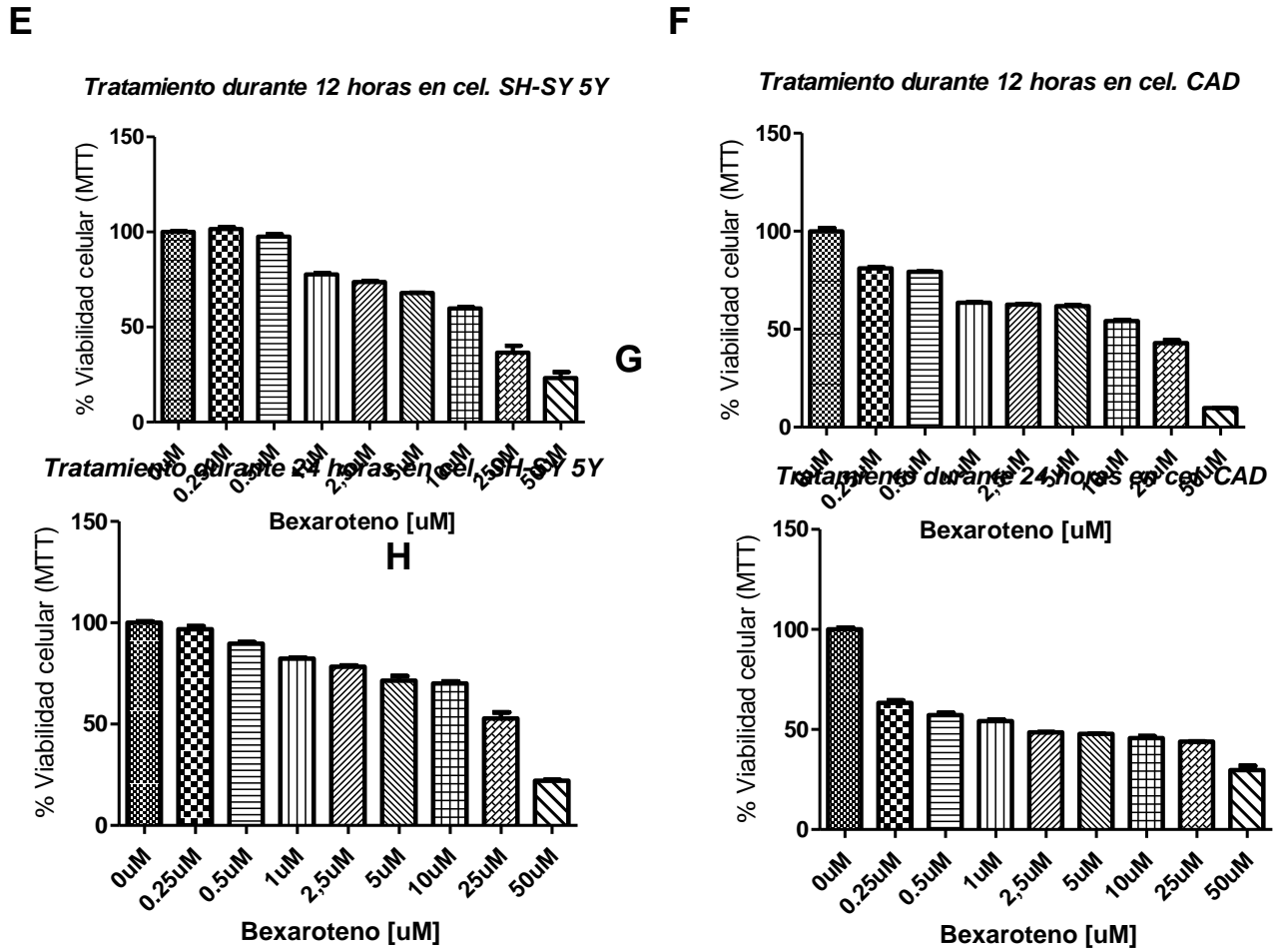


Figura C.2 Evaluación de viabilidad en respuesta a dosis incremental del agonista del RXR BEXAROTENO. La dosis mínima fue 0,25 uM hasta una dosis máxima 50 uM. Los resultados presentados exponen la media y la SEM (n=3)

EVALUACIÓN DEL EXTRACTO BEILSCHMIEDIA COSTARRICENSE (LAURACEAE) EN LA LINEA CAD

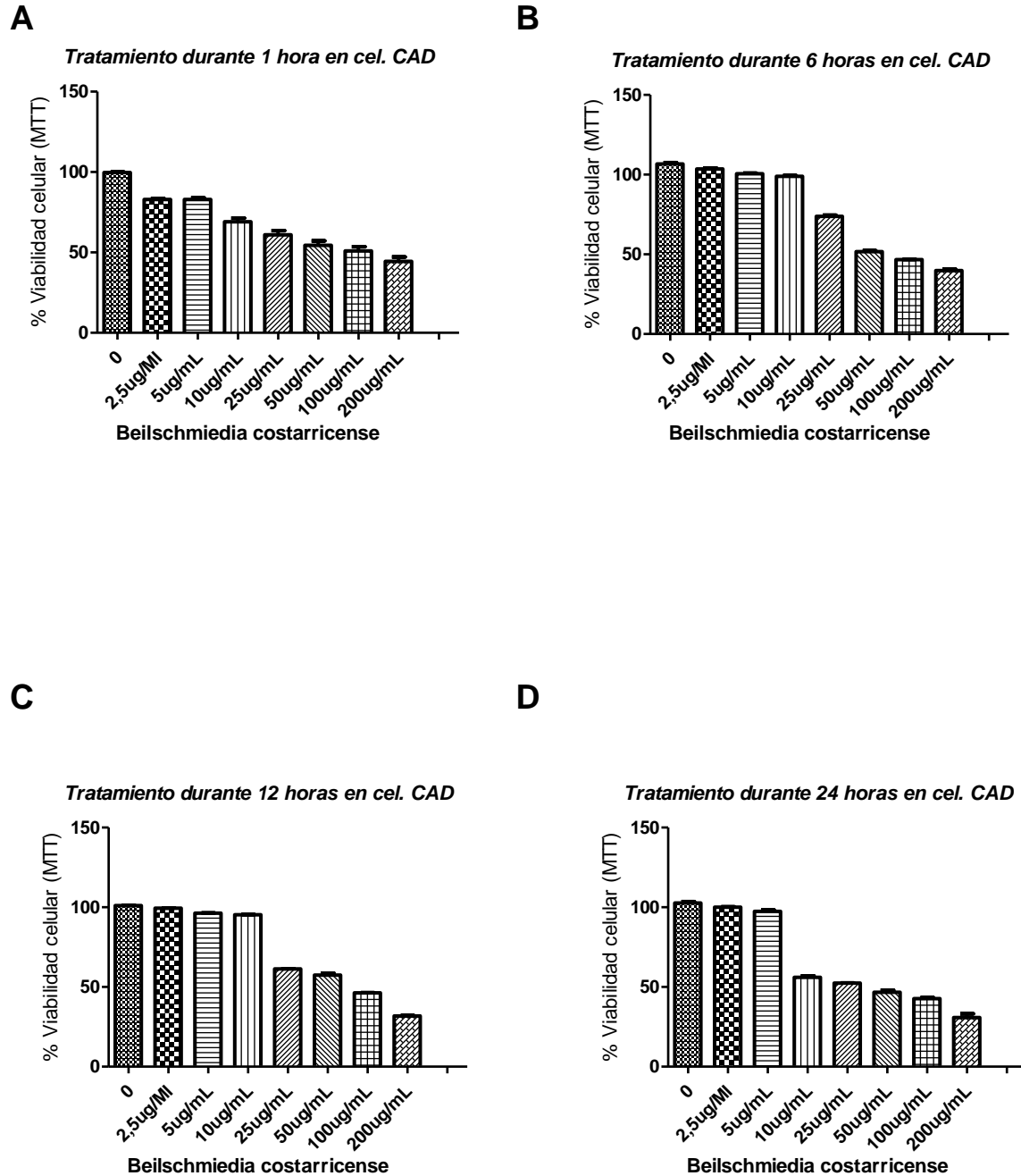
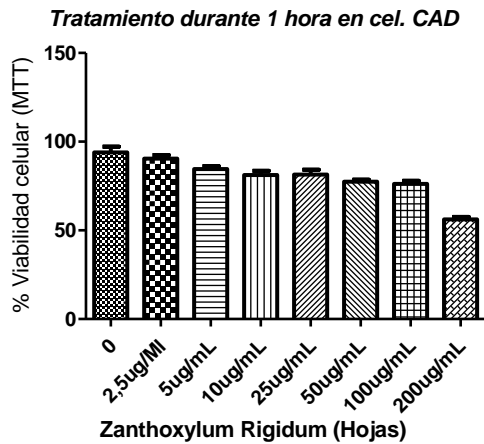


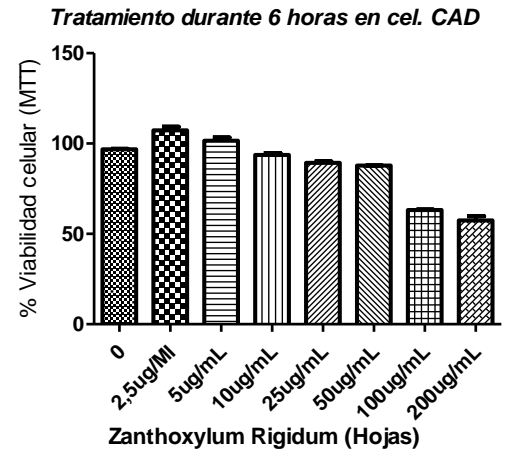
Figura C.3 Evaluación de viabilidad en respuesta a dosis incremental del extracto *Beilschmiedia costarricense* (Lauraceae). La concentración mínima fue 2,5 µg/mL hasta una máxima de 200 µg/mL. Los resultados presentados exponen la media y la SD (n=3).

EVALUACIÓN DEL EXTRACTO ZANTHOXYLUM RIGIDIUM EN LA LINEA CAD

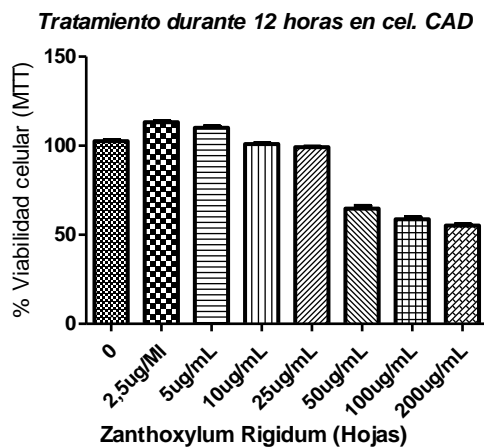
A



B



C



D

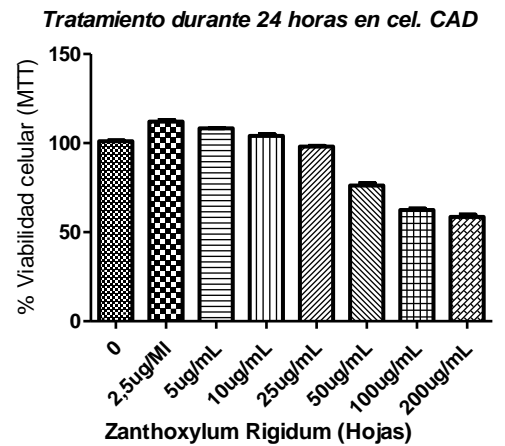
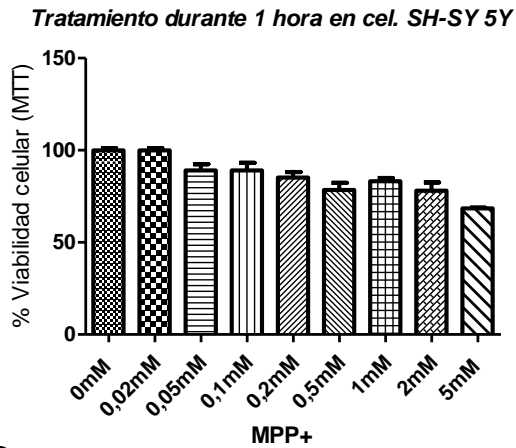


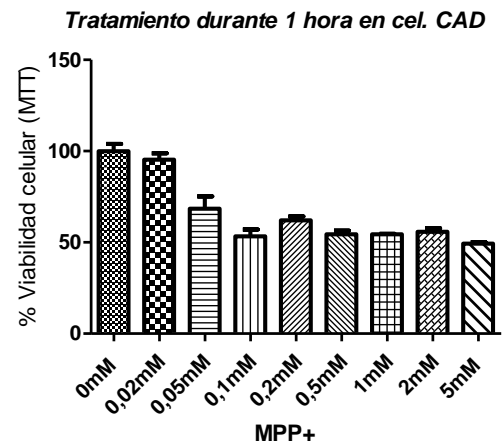
Figura C.4 Evaluación de viabilidad en respuesta a dosis incremental del extracto *Zanthoxylum Rigidum* (Rutaceae). La dosis mínima fue 2,5 µg/mL hasta una dosis máxima 200 µg/mL Los resultados presentados exponen la media y la SEM (n=3).

EVALUACIÓN DE LA TOXINA MPP+ EN LAS LINEAS CELULAS SH-SY5Y Y CAD

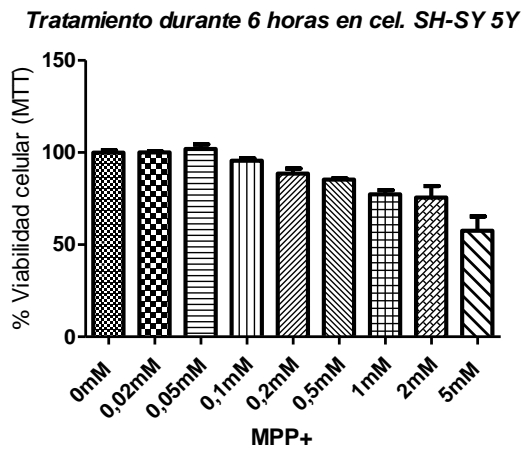
A



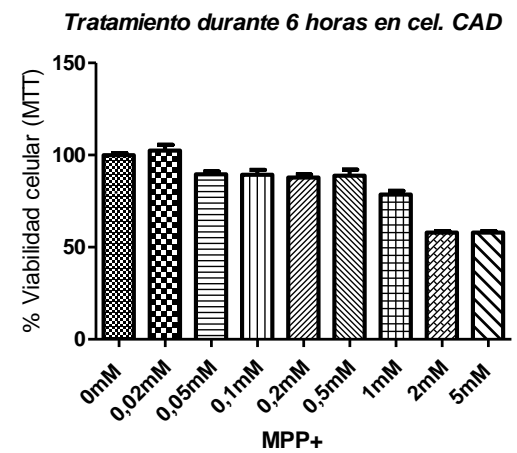
B



C



D



E

F

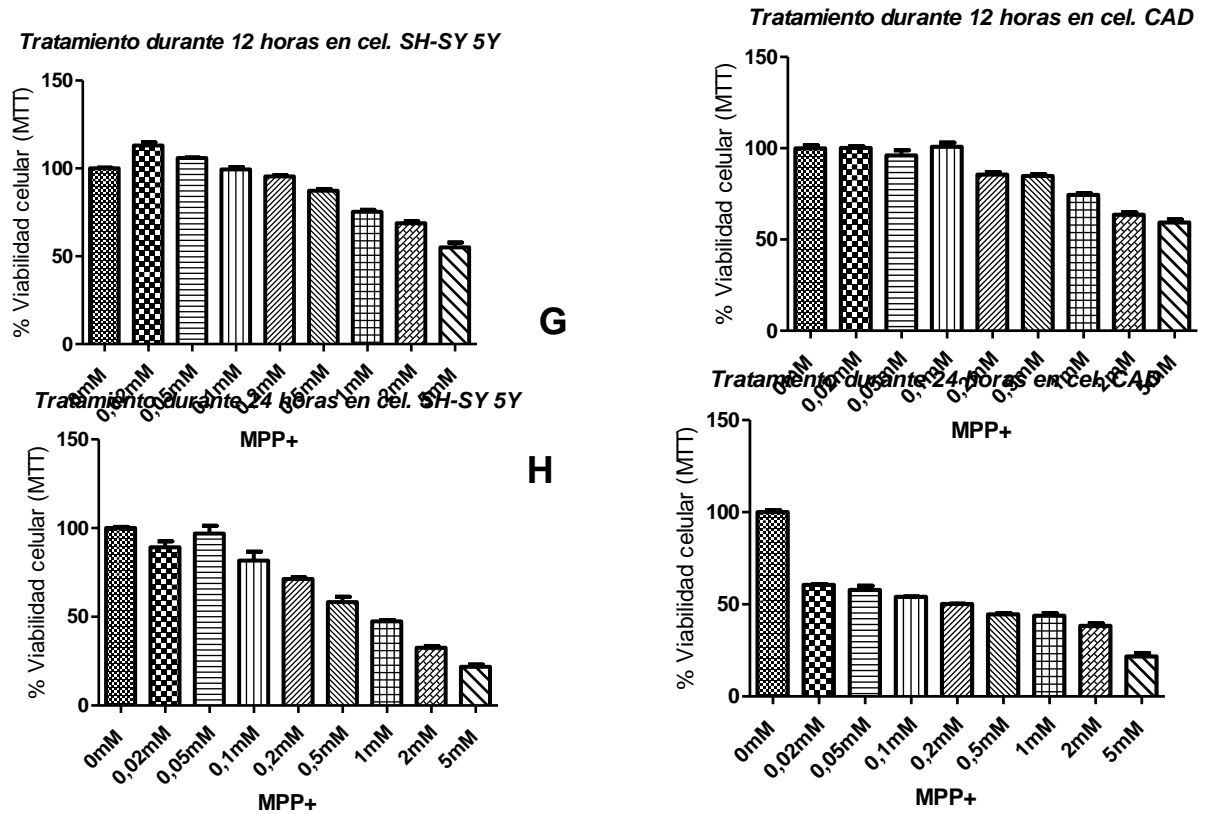


Figura C.5 Evaluación de viabilidad en respuesta a dosis incremental de la toxina MPP+. La dosis mínima fue 0.02mM hasta una dosis máxima 5mM. Los resultados presentados exponen la media y la SEM (n=3)

EVALUACIÓN DE LA TOXINA PQ EN LA LINEA CELULAR CAD

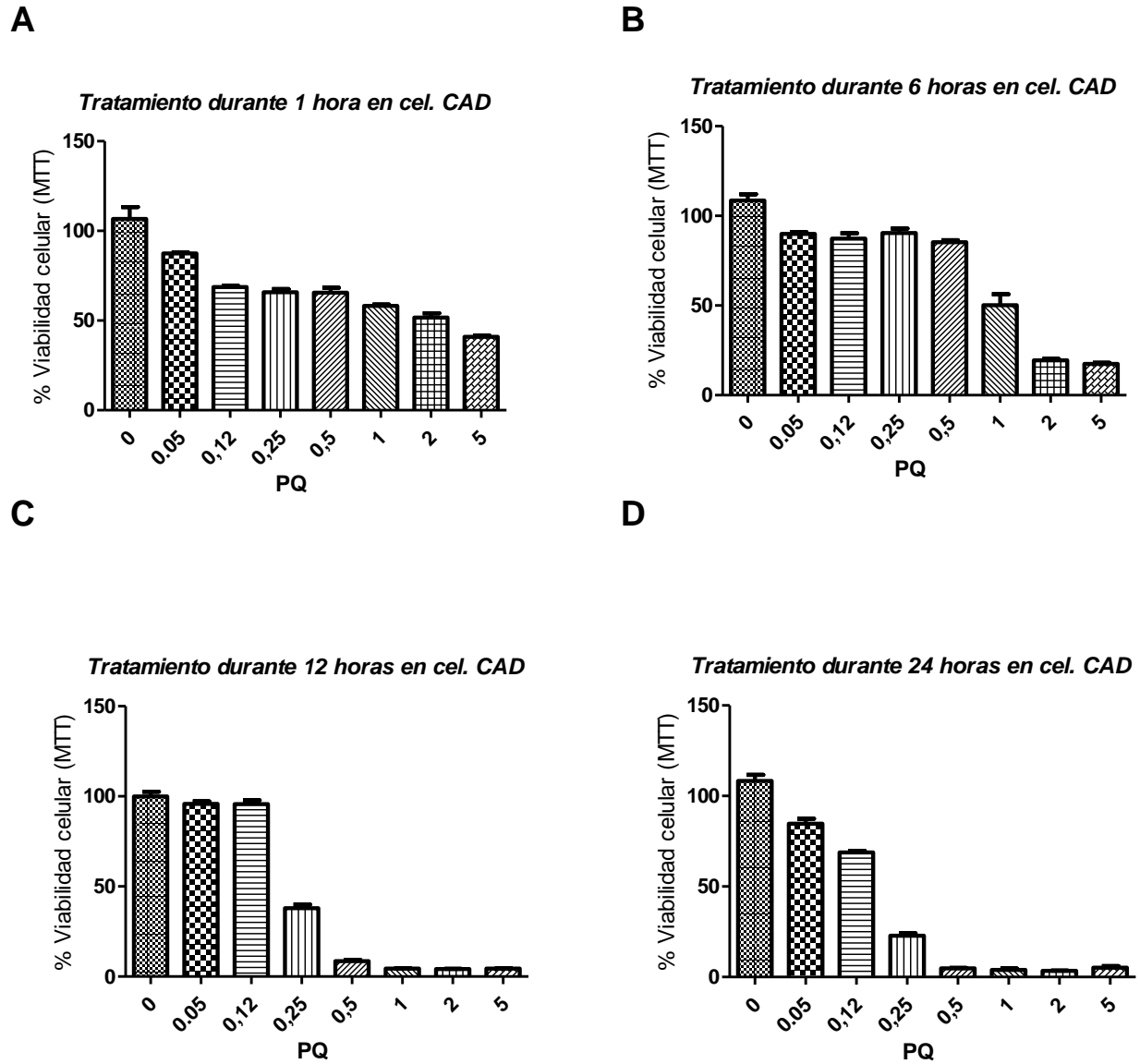


Figura C.6 Evaluación de viabilidad en respuesta a dosis incremental de la toxina PQ. La dosis mínima fue 0.05mM hasta una dosis máxima 5mM. Los resultados presentados exponen la media y la SEM (n=3)

6.2 Anexo D. Ensayo de LDH neuroprotección realizada con agonistas farmacológicos y extractos vegetales en las líneas celulares CAD y SHSH5Y

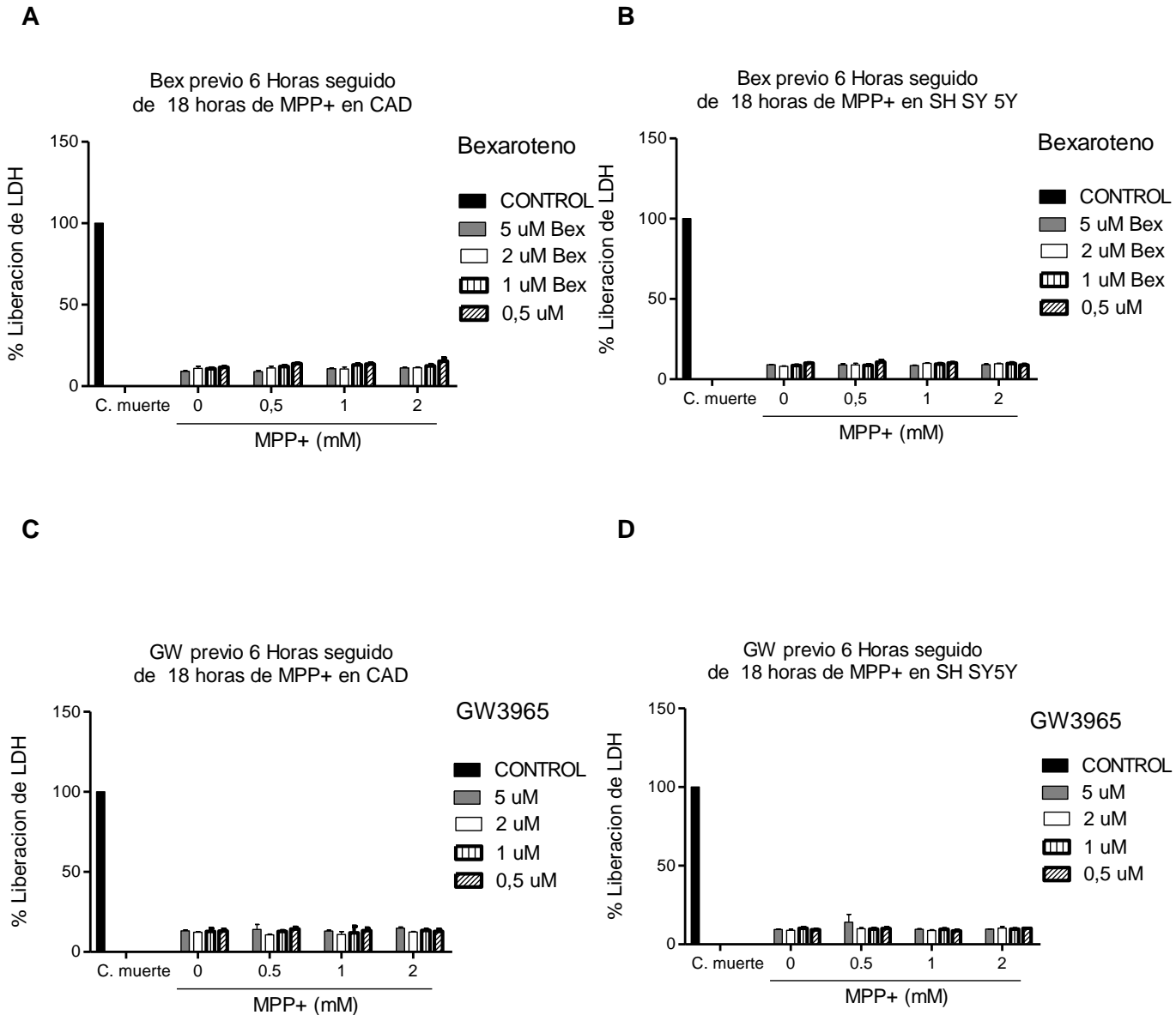


Figura D.1 Evaluación de liberación de LDH con agonistas farmacológicos. Tratamientos realizados con exposición de los agonistas de RXR **A, B** y LXR **C, D** durante 6 horas, a continuación, se adicionó la toxina MPP+ por un periodo de 18 horas. Los resultados presentados exponen la media y la SEM (n=3) (control vs tratamiento)

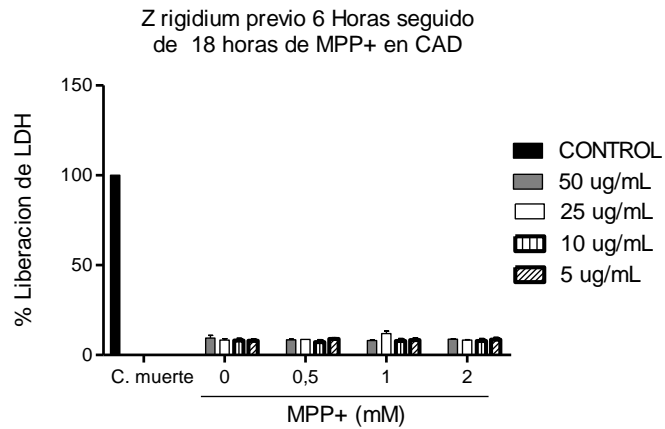
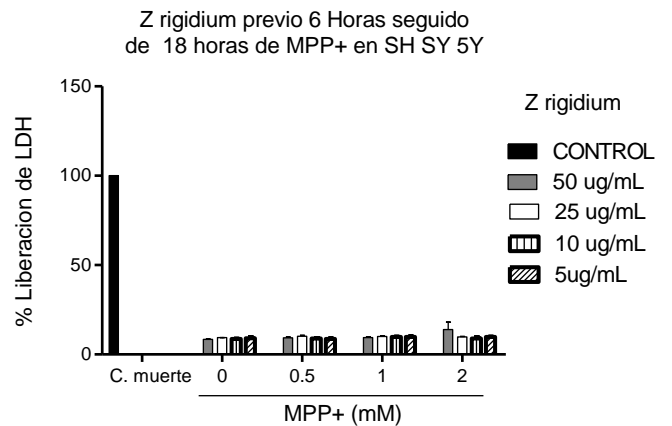
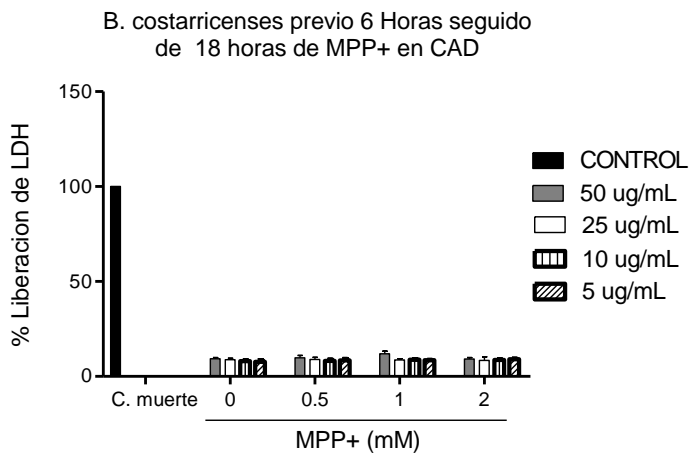
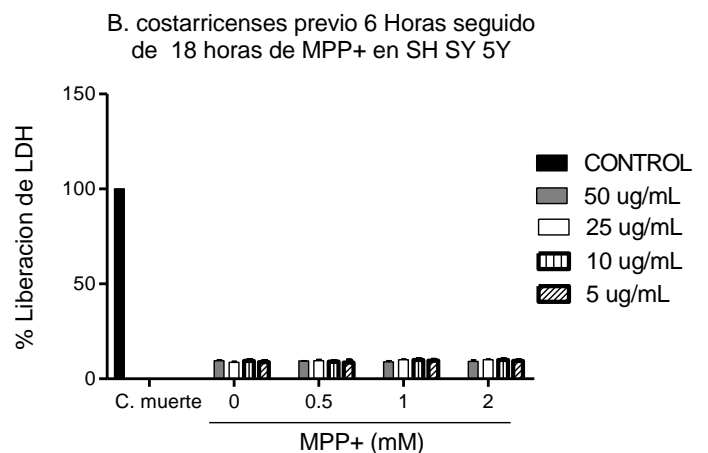
A**B****C****D**

Figura D.2 Evaluación de liberación de LDH con extractos vegetales. Tratamientos realizados con exposición del extracto *Zanthoxylum Rigidum* (Rutaceae) de **A, B** y *Beilschmiedia costarricense* (Lauraceae) **C, D** durante 6 horas, a continuación, se adicionó la toxina MPP+ por un periodo de 18 horas. Los resultados presentados exponen la media y la SEM (n=3) (control vs tratamiento)

6.3 Anexo B. Materiales

F.1.1 Materiales de Laboratorio y desechables

Tabla 6.1.1. Materiales fungibles

Puntas de pipetas 100-1000ult Eclipse
Puntas de pipetas 0,5-250 ult Eclipse
Puntas de pipetas 0,1-20ult Eclipse
Placa de 96 pozos fondo plano estéril
Placa de 6 pozos fondo plano estéril
Frasco de 25 cm cuadrados, PS, Tapa con filtro estéril.
Pipeta Serológica desechable de 10 ml estéril con filtro
Pipeta Serológica desechable de 25 ml estéril con filtro
Frasco de 75 cm cuadrados, PS, Tapa con filtro estéril.
Tubo cónico PLUG SEAL PP 15 ML
Tubos microcentrífuga (EPPENDOR) 1,5 ML BIOLOGIX
CRIOVIAL 2 ML
Jeringa de 5 ml VITAL MEDIC

Tabla 6.1.2. Equipos

Cabina de seguridad biológica clase II tipo a	Labgard ES Energy Saver Class II, Type A2 Laminar Flow Biological Safety Cabinet Models NU-425-300 NUAIRE
-----------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------

Cámara de electroforesis	Mini-Protean-III Cell, Bio-Rad Laboratories
Incubadora de CO2	AutoFlow NU-8500 Water Jacket CO2 Incubator
Lector de microplacas	Sunrise™ Absorbance Reader. Tecan Software: Magellan
Microscopio Live Cell Spining Disk	Microscopio: Axiovert 200M, Zeiss Unidad: Spinning Disk CSU22 Objetivo: Plan Apo 63X / 1,4 Ph3 Oil immersion Láser: Colbot Calypso CW 491nm, Cobolt Jive 561nm Filtros de emision: ET 525/50 (green), ET 620/60 (red), Chroma Technology Cámara: EM-CCD C9100-02 Software: Volocity, Perkin Elmer
Sistema de documentación de imágenes	ChemiDoc™MMP System Bio-Rad Laboratories Laboratories Software: Image Lab Bio-Rad Laboratorie
Sonicador	Qsonica 500 Watt Sonicator

6.1.3. Reactivos

Tabla 6.1.3.1 Reactivos utilizados para cultivo celular.

Cultivo celular		
DMEM con glucosa y glutamina	Lonza	Cultivo de líneas celulares
DMEM- F12	Gibco	Cultivo de líneas celulares
Suero Fetal Bovino Certificado	Gibco	Suplementación del medio de cultivo
Penicilina/Estreptomicina	Gibco	Cultivo de células
L-Glutamina	Sigma-Aldrich	Suplemento de líneas celulares
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT)	GOLDBIO	Ensayos de viabilidad celular
Cytoscan-LDH	G-Biosciences	Ensayo de citotoxicidad
Tripsina	Gibco	Desprendimiento células adherentes
Trypan Blue	Sigma-Aldrich	Marcaje de células muertas
Ácido Acético glacial	Mallinckrodt	Buffer Lisis

N,N Dimetilformamida (DMF)	Panreac	Buffer Lisis
dodecil sulfato de sodio (SDS)	Merk	Buffer Lisis

Tabla 6.1.3.2. Reactivos para Western blotting

Reactivos	Fabricante
PBS X1	Lonza
PhosStop Cockail tablets	Roche
Complete Mini Cockail	Roche
Buffer Ripa	Sigma-Aldrich
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermoscientific
Tris base	Promega
Glicina	J.T Baker
Cloruro de Sodio	Cloruro de Sodio
Cloruro de Potasio	Merk
Metanol	Panreac
Tween 20	BioBasic Inc
Solucion de 30% acrilamida-Bisacrilamida	Bio Rad
dodecil sulfato de sodio (SDS)	Merk
β mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Persulfato de Amonio	Amresco
Buffer Laemmli 2X	Bio Rad
Marcador de peso molecular	Thermoscientific
Azul de Coomassie	Bio Rad
Rojo Ponceau	Sigma-Aldrich
Membranas de PDVF	GE Healthcare Life Sciences Hybond™ ECL
Leche en polvo descremada baja en grasa	Colanta
Kit quimioluminiscencia	invitrogen

Tabla 6.1.3.2.1 Buffer Western blotting

Buffer	Reactivo	Peso	Volumen	pH
Running 10X	TRIS base	30,0 g	1000 mL H2O agua destilada	8,3
	Glicina	144,0 g		

Análisis del efecto neuroprotector de agonistas de receptores nucleares en modelo farmacológico de Parkinson en neuronas dopaminérgicas

	SDS	10 g		
Towbin 10X	TRIS base	30,0 g	1000 mL H ₂ O agua destilada	8,3
	Glicina	144,0 g		
TRIS-buffered saline 10X	TRIS base	24,23 g	1000 mL H ₂ O agua destilada	7,6
	NaCl	80,10 g		

Para el Running buffer 1X tomar 100 mL del buffer 10X y llevarlo a 1000mL con H₂O destilada

Para el Towbin Buffer 1X tomar 100 mL del buffer 10X agregar 200 mL de metanol y completar a 1000mL con H₂O destilada

Para el TRIS-buffered saline buffer 1X tomar 100 mL del buffer 10X agregar 2 mL de Tween 20 y completar a 1000mL con H₂O destilada

Tabla 6.1.3.3. Reactivos para transfección

Reactivos empleados en la transfección		
OptiMEM	Gibco	Medio para la transfección de las células
Lipofectamina 3000	Thermoscientific	Formación de liposomas
Zyppy Plasmid Miniprep Kit	Zymo Research	Purificación de plasmídico
Ampicilina	Sigma-Aldrich	Selección de Bacterias
Blasticidina	InvivoGen	Selección de células eucariotas
Kit Luciferasa	Thermoscientific	Ensayo de transactivación
Medio LB líquido	Para 1 litro: 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl. Disolver en 800 ml de H ₂ O dd, ajustar a pH 7.0 con NaOH, completar a 1 l con H ₂ O dd. Esterilizar con calor húmedo en autoclave. La adición del antibiótico se debe hacer, luego de esterilizada la solución y a una temperatura inferior a 50°C	

Tabla 6.1.4. Anticuerpos utilizados

Anticuerpos			
AKT-TOTAL	Conejo	Cell Signaling	WB: 1:1000 / leche 5% en TTBS 1X
P-AKT	Conejo	Santa Cruz	WB: 1:1000 / leche 5% en TTBS 1X
PINK1	Conejo	Abcam	WB: 1:500 / leche 5% en TTBS 1X
β-Actin- peroxidasa	Raton	Sigma	WB: 1:25 000 / leche 5% en TTBS 1X

Anti Rabbit	Conejo	Cell Signaling	WB: 1:1000 / leche 5% en TTBS 1X
Anti-Mouse		Cell Signaling	WB: 1:1000 / leche 5% en TTBS 1X

3.1.5. Plásmidos

Tabla 6.1.5 Plásmidos utilizados

Nombre	Producto de expresion	Resistencia	Referencia
pLenti6 PINK1 ShRNA ©	Secuencia de shRNA específica para bloquear la expresión de PINK1 humano (GCTGGAGGAGTATCTGATAGG) empezando desde el nt 1411	Ampicilina Blasticidina	El plásmido fue donado por el Dr Mark Cookson
pLenti6 Control shRNA	Secuencia de shRNA scrambled	Ampicilina Blasticidina	El plásmido fue donado por el Dr Mark Cookson

7. Conclusiones y recomendaciones

7.1 Conclusiones

Las conclusiones constituyen un capítulo independiente y presentan, en forma lógica, los resultados del trabajo. Las conclusiones deben ser la respuesta a los objetivos o propósitos planteados. Se deben titular con la palabra conclusiones en el mismo formato de los títulos de los capítulos anteriores (Títulos primer nivel), precedida por el numeral correspondiente (según la presente plantilla).

Las conclusiones deben contemplar las perspectivas de la investigación, las cuales son sugerencias, proyecciones o alternativas que se presentan para modificar, cambiar o incidir sobre una situación específica o una problemática encontrada. Pueden presentarse como un texto con características argumentativas, resultado de una reflexión acerca del trabajo de investigación.

7.2 Recomendaciones

Se presentan como una serie de aspectos que se podrían realizar en un futuro para emprender investigaciones similares o fortalecer la investigación realizada.

8.REFERENCIA BIBLIOGRAFICAS

1. Kalia, L. V & Lang, A. E. Parkinson's disease. *Lancet* **386**, 896–912 (2015).
2. Wirdefeldt, K., Adami, H., Cole, P., Trichopoulos, D. & Mandel, J. Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. *Eur. J. Epidemiol. suppl. Suppl.* **26**, S1-58 (2011).
3. Pringsheim, T., Jette, N., Frolkis, A. & Steeves, T. D. L. The prevalence of Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. *Mov. Disord.* **29**, 1583–1590 (2014).
4. NINDS; & Investigators, E. T. in P. D. (NET-P. F.-Z. Pioglitazone in early Parkinson's disease: a phase 2, multicentre, double-blind, randomised trial. *Lancet. Neurol.* **14**, 795–803 (2015).
5. Suchowersky, O. *et al.* Practice Parameter : Neuroprotective strategies and alternative therapies for Parkinson disease (an evidence-based review) Report of the Quality Standards Subcommittee of the. (2006).
6. Evans, R. M. & Mangelsdorf, D. J. Nuclear Receptors, RXR, and the Big Bang. *Cell* **157**, 255–66 (2014).
7. Nagy, L. & Schwabe, J. W. R. Mechanism of the nuclear receptor molecular switch. *Trends Biochem. Sci.* **29**, 317–324 (2004).
8. Makishima, M. Nuclear Receptor Regulation. 43–59 (2017). doi:10.1007/978-4-431-56062-3
9. Distefano, M. D. Nuclear Receptors in Neurodegenerative Diseases. 213–223 (2015). doi:10.1007/978-1-62703-673-3
10. Sandoval-Hernández, A. G., Buitrago, L., Moreno, H., Cardona-Gómez, G. P. & Arboleda, G. Role of Liver X receptor in AD pathophysiology. *PLoS One* **10**, 1–24 (2015).
11. Gronemeyer, H., Gustafsson, J.-A. & Laudet, V. Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat. Rev. Drug Discov.* **3**, 950–64 (2004).
12. Pérez, E., Bourguet, W., Gronemeyer, H. & Lera, A. R. De. *Biochimica et Biophysica Acta* Modulation of RXR function through ligand design. *BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* **1821**, 57–69 (2012).
13. McFarland, K. *et al.* Low dose bexarotene treatment rescues dopamine neurons and restores behavioral function in models of Parkinson's disease. *ACS Chem. Neurosci.* **4**, 1430–8 (2013).
14. Dai, Y.-B., Tan, X.-J., Wu, W.-F., Warner, M. & Gustafsson, J.-Å. Liver X receptor β protects dopaminergic neurons in a mouse model of Parkinson disease. doi:10.1073/pnas.1210833109

15. Hong, C. & Tontonoz, P. Liver X receptors in lipid metabolism: opportunities for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **13**, 433–444 (2014).
16. Wang, L. *et al.* Liver X receptors in the central nervous system: from lipid homeostasis to neuronal degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 13878–13883 (2002).
17. Hernández, C. J., Báez-Becerra, C., Contreras-Zárate, M. J., Arboleda, H. & Arboleda, G. PINK1 Silencing Modifies Dendritic Spine Dynamics of Mouse Hippocampal Neurons. *J. Mol. Neurosci.* (2019). doi:10.1007/s12031-019-01385-x
18. Haque, M. E. *et al.* Cytoplasmic Pink1 activity protects neurons from dopaminergic neurotoxin MPTP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 1716–21 (2008).
19. Báez-Becerra, C., Filipello, F., Sandoval-Hernández, A., Arboleda, H. & Arboleda, G. Liver X Receptor Agonist GW3965 Regulates Synaptic Function upon Amyloid Beta Exposure in Hippocampal Neurons. *Neurotox. Res.* **1**, (2018).
20. Kalia, L. V & Lang, A. E. Parkinson disease in 2015: Evolving basic, pathological and clinical concepts in PD. *Nat. Rev. Neurol.* **12**, 65–6 (2016).
21. Bellou, V., Belbasis, L., Tzoulaki, I., Evangelou, E. & Ioannidis, J. P. A. Environmental risk factors and Parkinson's disease: An umbrella review of meta-analyses. *Parkinsonism Relat. Disord.* **23**, 1–9 (2015).
22. Schapira, A. H. & Jenner, P. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Mov. Disord.* **26**, 1049–55 (2011).
23. Middleton, F. A. & Strick, P. L. Basal ganglia and cerebellar loops: Motor and cognitive circuits. *Brain Res. Rev.* **31**, 236–250 (2000).
24. Schapira, A. H. V., Chaudhuri, K. R. & Jenner, P. Non-motor features of Parkinson disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **18**, 435–450 (2017).
25. Postuma, R. B. *et al.* Identifying prodromal Parkinson's disease: pre-motor disorders in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* **27**, 617–26 (2012).
26. Todorova, A., Jenner, P. & Ray Chaudhuri, K. Non-motor Parkinson's: integral to motor Parkinson's, yet often neglected. *Pract. Neurol.* **14**, 310–22 (2014).
27. Ruipérez, V., Darios, F. & Davletov, B. Alpha-synuclein, lipids and Parkinson's disease. *Prog. Lipid Res.* **49**, 420–428 (2010).
28. Goedert, M., Spillantini, M. G., Del Tredici, K. & Braak, H. 100 years of Lewy pathology. *Nat. Rev. Neurol.* **9**, 13–24 (2013).
29. Przedborski, S. The two-century journey of Parkinson disease research. *Nat. Rev. Neurosci.* **18**, 251–259 (2017).
30. Trinh, J. & Farrer, M. Advances in the genetics of Parkinson disease. *Nat. Rev. Neurol.* **9**, 445–454 (2013).
31. Surmeier, D. J., Guzman, J. N., Sanchez, J. & Schumacker, P. T. Physiological Phenotype and Vulnerability in Parkinson's Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2**, a009290–a009290 (2012).

32. Subramaniam, S. R., Chesselet, M.-F., Savitt, J. M., Dawson, V. L. & Dawson, T. M. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol.* **106–107**, 17–32 (2013).
33. Ramanan, V. K. & Saykin, A. J. Pathways to neurodegeneration: mechanistic insights from GWAS in Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and related disorders. *Am J Neurodegener Dis* **2**, 145–175 (2013).
34. Edwards, T. L. *et al.* Genome-Wide association study confirms SNPs in SNCA and the MAPT region as common risk factors for parkinson disease. *Ann. Hum. Genet.* **74**, 97–109 (2010).
35. Schapira, A. H. V *et al.* Mitochondrial Complex I Deficiency in Parkinson's Disease. *J. Neurochem.* **54**, 823–827 (1990).
36. Dagda, R. K., Zhu, J. & Chu, C. T. Mitochondrial kinases in Parkinson's disease: Converging insights from neurotoxin and genetic models. *Mitochondrion* **9**, 289–298 (2009).
37. Plun-Favreau, H. *et al.* The mitochondrial protease HtrA2 is regulated by Parkinson's disease-associated kinase PINK1. *Nat. Cell Biol.* **9**, 1243–1252 (2007).
38. Dexter, D. T. & Jenner, P. Parkinson disease: From pathology to molecular disease mechanisms. *Free Radical Biology and Medicine* (2013). doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.01.018
39. Pfisterer, U. & Khodosevich, K. Neuronal survival in the brain : neuron type-specific mechanisms. **8**, e2643-14 (2017).
40. Dibble, C. C. & Cantley, L. C. Regulation of mTORC1 by PI3K signaling. *Trends Cell Biol.* **25**, 545–555 (2015).
41. Timmons, S., Coakley, M. F., Moloney, A. M. & Neill, C. Akt signal transduction dysfunction in Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* **467**, 30–35 (2009).
42. Toker, A. & Marmiroli, S. Signaling specificity in the Akt pathway in biology and disease. *Adv. Biol. Regul.* **55**, 28–38 (2014).
43. Soutar, M. P. M. *et al.* AKT signalling selectively regulates PINK1 mitophagy in SHSY5Y cells and human iPSC-derived neurons. *Sci. Rep.* **8**, 1–11 (2018).
44. Dudek, H. *et al.* Regulation of Neuronal Survival by the Serine-Threonine Protein Kinase Akt. *Science* (80-.). **275**, 661–665 (1997).
45. Kawajiri, S., Saiki, S., Sato, S. & Hattori, N. Genetic mutations and functions of PINK1. *Trends Pharmacol. Sci.* **32**, 573–580 (2011).
46. Lin, W. & Kang, U. J. Structural determinants of PINK1 topology and dual subcellular distribution. *BMC Cell Biol.* **11**, 90 (2010).
47. Aerts, L., Craessaerts, K., De Strooper, B. & Morais, V. A. PINK1 kinase catalytic activity is regulated by phosphorylation on serines 228 and 402. *J. Biol. Chem.* **290**, 2798–2811 (2015).
48. Sim, C. H., Gabriel, K., Mills, R. D., Culvenor, J. G. & Cheng, H. C. Analysis of the regulatory and catalytic domains of PTEN-induced kinase-1 (PINK1). *Hum. Mutat.* **33**, 1408–1422 (2012).
49. Meissner, C., Lorenz, H., Weihofen, A., Selkoe, D. J. & Lemberg, M. K. The mitochondrial

- intramembrane protease PARL cleaves human Pink1 to regulate Pink1 trafficking. *J. Neurochem.* **117**, 856–867 (2011).
50. Bose, Anindita; Beal, M. F. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* **14**, 1261–1266 (2016).
 51. Ryan, B. J., Hoek, S., Fon, E. A. & Wade-Martins, R. Mitochondrial dysfunction and mitophagy in Parkinson's: From familial to sporadic disease. *Trends Biochem. Sci.* **40**, 200–210 (2015).
 52. Matsuda, N. *et al.* PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. *J. Cell Biol.* **189**, 211–221 (2010).
 53. Liu, S. *et al.* Parkinson's disease-associated kinase PINK1 regulates miro protein level and axonal transport of mitochondria. *PLoS Genet.* **8**, 15–17 (2012).
 54. Morais, V. A. *et al.* Parkinson's disease mutations in PINK1 result in decreased Complex I activity and deficient synaptic function. *EMBO Mol. Med.* (2009). doi:10.1002/emmm.200900006
 55. Wang, G., Pan, J. & Chen, S.-D. Kinases and kinase signaling pathways: potential therapeutic targets in Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol.* **98**, 207–21 (2012).
 56. Deas, E., Wood, N. W. & Plun-Favreau, H. Mitophagy and Parkinson's disease: The PINK1-parkin link. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* (2011). doi:10.1016/j.bbamcr.2010.08.007
 57. Schapira, A. H. V. Mitochondria in the aetiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Lancet. Neurol.* **7**, 97–109 (2008).
 58. Cohen, S. & Greenberg, M. E. Communication Between the Synapse and the Nucleus in Neuronal Development, Plasticity, and Disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **24**, 183–209 (2008).
 59. Murata, H. *et al.* A new cytosolic pathway from a Parkinson disease-associated kinase, BRPK/PINK1: Activation of AKT via MTORC2. *J. Biol. Chem.* **286**, 7182–7189 (2011).
 60. Akabane, S. *et al.* PKA Regulates PINK1 Stability and Parkin Recruitment to Damaged Mitochondria through Phosphorylation of MIC60. *Mol. Cell* **62**, 371–384 (2016).
 61. Dagda, R. K. *et al.* Beyond the mitochondrion: Cytosolic PINK1 remodels dendrites through Protein Kinase A. *J. Neurochem.* **128**, 864–877 (2014).
 62. Weihofen, A., Thomas, K. J., Ostaszewski, B. L., Cookson, M. R. & Selkoe, D. J. Pink1 forms a multiprotein complex with miro and milton, linking Pink1 function to mitochondrial trafficking. *Biochemistry* **48**, 2045–2052 (2009).
 63. Báez-Becerra, C., Filipello, F., Sandoval-Hernández, A., Arboleda, H. & Arboleda, G. Liver X Receptor Agonist GW3965 Regulates Synaptic Function upon Amyloid Beta Exposure in Hippocampal Neurons. *Neurotox. Res.* (2018). doi:10.1007/s12640-017-9845-3
 64. Choi, I. *et al.* PINK1 expression increases during brain development and stem cell differentiation, and affects the development of GFAP-positive astrocytes. *Mol. Brain* **9**, 1–12 (2016).
 65. Park, J. S., Davis, R. L. & Sue, C. M. Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease: New Mechanistic Insights and Therapeutic Perspectives. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* **18**, (2018).

66. Santos, G. M., Fairall, L. & Schwabe, J. W. R. Negative regulation by nuclear receptors: a plethora of mechanisms. *Trends Endocrinol. Metab.* **22**, 87–93 (2011).
67. Mangelsdorf, D. J. *et al.* The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* **83**, 835–839 (1995).
68. Huang, P., Chandra, V. & Rastinejad, F. Structural overview of the nuclear receptor superfamily: insights into physiology and therapeutics. *Annu. Rev. Physiol.* **72**, 247–72 (2010).
69. Pascual, G. *et al.* A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR- γ . *Nature* **437**, 759–63 (2005).
70. Mangelsdorf, D. J. *et al.* Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis retinoic acid. *Genes Dev.* **6**, 329–344 (1992).
71. Castillo, A. I. *et al.* A Permissive Retinoid X Receptor/Thyroid Hormone Receptor Heterodimer Allows Stimulation of Prolactin Gene Transcription by Thyroid Hormone and 9-cis-Retinoic Acid. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 502–513 (2003).
72. Lund, E. G. *et al.* Knockout of the Cholesterol 24-Hydroxylase Gene in Mice Reveals a Brain-specific Mechanism of Cholesterol Turnover. *J. Biol. Chem.* **278**, 22980–22988 (2003).
73. Zhang, X. *et al.* Regulation of the nongenomic actions of retinoid X receptor- α by targeting the coregulator-binding sites. *Acta Pharmacol. Sin.* **36**, 102–12 (2015).
74. Gilardi, F. *et al.* Expression of sterol 27-hydroxylase in glial cells and its regulation by liver X receptor signaling. *Neuroscience* **164**, 530–540 (2009).
75. Janowski, B. A., Willy, P. J., Devi, T. R., Falck, J. R. & Mangelsdorf, D. J. An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR α . *Nature* **383**, 728–731 (1996).
76. Sacchetti, P. *et al.* Liver X Receptors and Oxysterols Promote Ventral Midbrain Neurogenesis In Vivo and in Human Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell* **5**, 409–419 (2009).
77. Dietschy, J. M. & Turley, S. D. Cholesterol metabolism in the brain. *Curr. Opin. Lipidol.* **12**, 105–12 (2001).
78. Lund, E. G. *et al.* Knockout of the Cholesterol 24-Hydroxylase Gene in Mice Reveals a Brain-specific Mechanism of Cholesterol Turnover. *J. Biol. Chem.* **278**, 22980–22988 (2003).
79. Andersson, S. *et al.* Inactivation of liver X receptor leads to adult-onset motor neuron degeneration in male mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 3857–3862 (2005).
80. Song, J. X. *et al.* Anti-Parkinsonian drug discovery from herbal medicines: What have we got from neurotoxic models? *J. Ethnopharmacol.* **139**, 698–711 (2012).
81. Rabiei, Z., Solati, K. & Amini-Khoei, H. Phytotherapy in treatment of Parkinson's disease: a review. *Pharm. Biol.* **57**, 355–362 (2019).
82. Yang, J., Wen, L., Jiang, Y. & Yang, B. Natural Estrogen Receptor Modulators and Their Heterologous Biosynthesis. *Trends Endocrinol. Metab.* **30**, 66–76 (2019).
83. Javed, H. *et al.* Plant Extracts and Phytochemicals Targeting α -Synuclein Aggregation in Parkinson's Disease Models. *Front. Pharmacol.* **9**, 1–27 (2019).

84. Langston, J. W. The MPTP story. *J. Parkinsons. Dis.* **7**, S11–S19 (2017).
85. Heikkila, R. E., Manzino, L., Cabbat, F. S. & Duvoisin, R. C. Protection against the dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2, 5,6-tetrahydropyridine by monoamine oxidase inhibitors. *Nature* **311**, 467–469 (1984).
86. Ramsay, R. R., Dadgar, J., Trevor, A. & Singer, T. P. Energy-driven uptake of N-methyl-4-phenylpyridine by brain mitochondria mediates the neurotoxicity of MPTP. *Life Sci.* **39**, 581–588 (1986).
87. Ramsay, R. R., Kowal, A. T., Johnson, M. K., Salach, J. I. & Singer, T. P. The Inhibition Site of MPP⁺, the Neurotoxic Bioactivation Product of 1-Methyl-4-phenyl- The inhibition of NADH dehydrogenase by 1-methyl-4-phenylpyridinium leading to ATP depletion has been proposed to explain cell death in the expression of the magnet. **259**, 645–649 (1987).
88. Fall, C. P. & Bennett, J. P. *Characterization and Time Course of MPP-Induced Apoptosis in Human SH-SY5Y Neuroblastoma Cells.*
89. Berry, C., La Vecchia, C. & Nicotera, P. Paraquat and parkinson's disease. *Cell Death and Differentiation* (2010). doi:10.1038/cdd.2009.217
90. Franco, R., Li, S., Rodriguez-Rocha, H., Burns, M. & Panayiotidis, M. I. Molecular mechanisms of pesticide-induced neurotoxicity: Relevance to Parkinson's disease. *Chemico-Biological Interactions* (2010). doi:10.1016/j.cbi.2010.06.003
91. Rappold, P. M. *et al.* Paraquat neurotoxicity is mediated by the dopamine transporter and organic cation transporter-3. **108**, 2–7 (2011).
92. Xicoy, H., Wieringa, B. & Martens, G. J. M. The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review. *Molecular Neurodegeneration* (2017). doi:10.1186/s13024-017-0149-0
93. Qi, Y., Wang, J. K., McMillian, M. & Chikaraishi, D. M. Characterization of a CNS cell line, CAD, in which morphological differentiation is initiated by serum deprivation. *J. Neurosci.* **17**, 1217–1225 (1997).
94. Horton, C. D., Qi, Y., Chikaraishi, D. & Wang, J. K. T. Neurotrophin-3 mediates the autocrine survival of the catecholaminergic CAD CNS neuronal cell line. 201–209 (2001).
95. Qi, Y., Wang, J. K., McMillian, M. & Chikaraishi, D. M. Characterization of a CNS cell line, CAD, in which morphological differentiation is initiated by serum deprivation. *J. Neurosci.* **17**, 1217–25 (1997).
96. Fung, P. & Tischler, S. Catecholaminergic Cell Lines from the Brain and Adrenal Tyrosine Hydroxylase-SV40 T Antigen Transgenic Mice Glands of. **73**, (1993).
97. Qi, Y., Wang, J. K. T., Mcmillian, M. & Chikaraishi, D. M. *Characterization of a CNS Cell Line, CAD, in which Morphological Differentiation Is Initiated by Serum Deprivation.* (1997).
98. Biedler, J. L., Roffler-Tarlov, S., Schachner, M. & Freedman, L. S. *Multiple Neurotransmitter Synthesis by Human Neuroblastoma Cell Lines and Clones.* (1978).
99. Joshi, S., Guleria, R., Pan, J., DiPette, D. & Singh, U. S. Retinoic acid receptors and tissue-transglutaminase mediate short-term effect of retinoic acid on migration and invasion of neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Oncogene* (2006). doi:10.1038/sj.onc.1209027

100. Singh, J. & Kaur, G. Transcriptional regulation of polysialylated neural cell adhesion molecule expression by NMDA receptor activation in retinoic acid-differentiated SH-SY5Y neuroblastoma cultures. **4**, 8–21 (2007).
101. Forster, J. I. *et al.* Characterization of Differentiated SH-SY5Y as Neuronal Screening Model Reveals Increased Oxidative Vulnerability. (2016). doi:10.1177/10870571115625190
102. López-Carballo, G., Moreno, L., Masiá, S., Pérez, P. & Baretino, D. Activation of the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Signaling Pathway by Retinoic Acid Is Required for Neural Differentiation of SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 25297–25304 (2002).
103. Meerloo, J. Van, Kaspers, G. J. L. & Cloos, J. Cancer Cell Culture: Cell sensitivity assays: The MTT assay. **731**, 237–245 (2011).
104. Riss, T. L. *et al.* Cell Viability Assays. *Assay Guid. Man.* 1–25 (2004).
105. Wang, Q., Shen, B., Qin, X., Liu, S. & Feng, J. Akt/mTOR and AMPK signaling pathways are responsible for liver X receptor agonist GW3965-enhanced gefitinib sensitivity in non-small cell lung cancer cell lines. *Transl. Cancer Res.* **8**, 66–76 (2019).
106. Rodríguez-Blanco, J. *et al.* Cooperative action of JNK and AKT/mTOR in 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced autophagy of neuronal PC12 cells. *J. Neurosci. Res.* **90**, 1850–1860 (2012).
107. Haque, M. E. *et al.* Cytoplasmic Pink1 activity protects neurons from dopaminergic neurotoxin MPTP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 1716–1721 (2008).
108. Kitagishi, Y. *et al.* PINK1 signaling in mitochondrial homeostasis and in aging (Review). *Int. J. Mol. Med.* **39**, 3–8 (2017).
109. Kaur, R., Mehan, S. & Singh, S. Understanding multifactorial architecture of Parkinson's disease: pathophysiology to management. doi:10.1007/s10072-018-3585-x
110. Jenner, P. Molecular mechanisms of L-DOPA-induced dyskinesia. *Nat. Rev. Neurosci.* **9**, 665–677 (2008).
111. Schapira, A. H. V. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Cell Death Differ.* **14**, 1261–1266 (2007).
112. Barja, G. & Herrero, A. Localization at complex I and mechanism of the higher free radical production of brain nonsynaptic mitochondria in the short-lived rat than in the longevous pigeon. *J. Bioenerg. Biomembr.* **30**, 235–243 (1998).
113. Fato, R. *et al.* Differential effects of mitochondrial Complex I inhibitors on production of reactive oxygen species. *Biochim. Biophys. Acta* **1787**, 384–92 (2009).
114. Yasuda, Y. *et al.* The effects of MPTP on the activation of microglia/astrocytes and cytokine/chemokine levels in different mice strains. *J. Neuroimmunol.* **204**, 43–51 (2008).
115. Hattori, N., Saiki, S. & Imai, Y. Regulation by mitophagy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **53**, 147–150 (2014).
116. Rojas-Charry, L., Cookson, M. R., Niño, A., Arboleda, H. & Arboleda, G. Downregulation of

Pink1 influences mitochondrial fusion-fission machinery and sensitizes to neurotoxins in dopaminergic cells. *Neurotoxicology* **44**, 140–148 (2014).

117. Contreras-Zárate, M. J., Niño, A., Rojas, L., Arboleda, H. & Arboleda, G. Silencing of PINK1 Inhibits Insulin-Like Growth Factor-1-Mediated Receptor Activation and Neuronal Survival. *J. Mol. Neurosci.* **56**, 188–197 (2015).
118. Mei, Y. *et al.* FOXO3a-dependent regulation of Pink1 (Park6) mediates survival signaling in response to cytokine deprivation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 5153–5158 (2009).
119. HERNANDEZ MARTINEZ, C. J. Efecto del silenciamiento de PINK1 sobre la dinamica de espinas dendriticas en un cultivo primario de neuronas hipocampales.