

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACEUTICAS**



**“Mecanismo de protección de la  
enzima glutatión-S-transferasa M2-2  
de astrocitos frente a los efectos  
tóxicos de aminocromo sobre un  
modelo neuronal dopaminérgico”**

Tesis presentada a la Universidad de Chile  
para optar al Grado de Doctor en Bioquímica por:

**CARLOS ALBERTO CUEVAS LIZANA**

Director de Tesis

**Dr. Juan Segura-Aguilar**

**SANTIAGO- CHILE  
2016**

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN  
TESIS DE DOCTORADO**

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato:

**CARLOS ALBERTO CUEVAS LIZANA**

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al grado de Doctora en Bioquímica, en el examen de defensa de Tesis rendida el día \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2016.

**Director de Tesis:**

Dr. Juan Segura-Aguilar

\_\_\_\_\_

**Comisión Informante de Tesis:**

Dra. Jenny L. Fiedler T. (Presidente)

\_\_\_\_\_

Dra. María Estela Andres C.

\_\_\_\_\_

Dr. Paola Morales R.

\_\_\_\_\_

Dr. Guillermo Díaz A.

\_\_\_\_\_

*“Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado.  
Un esfuerzo total es una victoria completa”*  
Mahatma Gandhi

Cuando estaba estudiando Bioquímica, nació mi hija Ignacia.  
Cuando estaba iniciando el doctorado, nació mi hijo Marcelo.  
Terminando el doctorado, nació mi hija Camila.  
Esta tesis es dedicada a ellos.

**Financiamiento:**

Esta tesis de doctorado se realizó en el Laboratorio de Neurofarmacología Celular y Molecular, Programa de Farmacología Molecular y Clínica, ICBM, Facultad de Medicina, U. de Chile y contó con el financiamiento de los siguientes proyectos y becas:

**Proyecto FONDECYT 1100165**

Investigador responsable: Dr. Juan Segura-Aguilar.

**Beca CONICYT de estudios de Doctorado y Apoyo a la realización de tesis doctoral N° 24121453**

Investigador responsable: Carlos Cuevas Lizana.

## **Publicaciones y presentaciones a congresos:**

**Cuevas C**, Huenchuguala S, Muñoz P, Villa M, Paris I, Mannervik B, Segura-Aguilar. Glutathione transferase-M2-2 secreted from glioblastoma cell protects SH-SY5Y cells from aminochrome neurotoxicity. *J. Neurotox Res.* 2015 Apr;27(3):217-28

Huenchuguala S, **Cuevas C**, Muñoz P, Zavala P, Villa M, Ahumada U, Graumann R, Nore BF, Couve E, Mannervik B, Paris I, Segura-Aguilar J. Glutathione transferase mu 2 protects glioblastoma cells against aminochrome toxicity by preventing autophagy and lysosome dysfunction. *Autophagy.* 2014 Apr;10(4):618-30.

## **Presentaciones a congresos nacionales:**

**Cuevas C**, Paris I, Segura-Aguilar J. Complejo Fe-Dopamina induce citotoxicidad tras la inhibición de DT-Diaforasa. Primer simposio de radicales libres y antioxidantes. Valparaíso, Chile. 3 de Diciembre 2010.

**Cuevas C.**, Huenchuguala S., Muñoz P., Villa M., Herrera A., Ahumada U., Stuardo C., Cortes K., Paris I., Segura-Aguilar J. Programa de Farmacología Molecular y Clínica, ICBM, Facultad de Medicina, U. de Chile. ENZIMA GLUTATION-S-TRANSFERASA M2-2 PROTEGE ASTROCITOS DE LA TOXICIDAD DE AMINOCROMO: POSIBLE EFECTO NEUROPROTECTOR. Segundo Congreso Ciencia Joven 2012. ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

**Cuevas C**, Huenchuguala S., Muñoz P., Villa M., Herrera A., Ahumada U., Garrido G., Paris I., Segura-Aguilar J. Enzyme GSTM2-2 confers protection to U373MG cells against aminochrome toxicity: Possible neuroprotective effect. VI NEUROTOXICITY SOCIETY MEETING, 21 al 24 de Marzo de 2013, Valdivia, Chile.

## **Presentaciones a congresos internacionales:**

**Cuevas C**, Paris I, Segura-Aguilar J. Fe-Dopamine complex induces citotoxicity under DT-Diaphorase inhibition. V NEUROTOXICITY SOCIETY MEETING, 7 al 10 de abril de 2011, Uspallata, Argentina

## **Agradecimientos:**

Quisiera agradecer a mi director de tesis, Dr. Juan Segura-Aguilar por sus consejos para sacar adelante este proyecto. A la Dra. Jenny Fiedler por aquellas conversaciones de pasillo, sus palabras de apoyo y sus valiosos comentarios, también a la Dra. Paola Morales por su gran disposición a responder preguntas y sus revisiones y comentarios. A los miembros de la comisión, pues sin sus comentarios y sugerencias, todo habría sido aun más difícil. Agradezco a todas aquellas personas del laboratorio que aportaron con algo: Ulises, Andrea H., Andrea B., Victor y la señora Vero, y especialmente a mis compañeros de laboratorio Sandro, Paty y Mónica, es con ellos en donde las ideas van tomando forma y los experimentos dan resultados (esperados o inesperados).

Agradezco a toda mi familia por su apoyo, mis padres Amanda y Carlos, y hermana Macarena, que siempre estuvieron preocupados de mis avances y celebraban cada pequeño éxito, y agradezco infinitamente a mi esposa Paula por su apoyo, siempre en las buenas y en las malas, sobre todo en estas últimas, cuando las cosas no iban bien en el laboratorio siempre tenía una palabra reconfortante. Agradezco a mis hijos Ignacia, Marcelo y Camila, porque ellos me entregan las ganas y fuerzas para poder seguir adelante.

## Tabla de Contenidos:

Tabla de Contenidos: .....	v
Índice de Figuras. ....	ix
Abreviaturas.....	x
Resumen. ....	xii
Summary.....	xiv
I. Introducción. ....	1
1. Enfermedad de Parkinson .....	1
2. Neurodegeneración en la enfermedad de Parkinson.....	1
2.1. Factores ambientales .....	1
2.2. Factores Genéticos .....	2
2.3. Factores Celulares que predisponen a neurodegeneración.....	2
2.3.1. Daño mitocondrial .....	2
2.3.2. Inflamación .....	3
2.3.3. Estrés oxidativo.....	4
2.3.4. Estrés proteolítico .....	5
2.3.5. Relación entre factores celulares .....	5
3. Aminocromo como factor de neurodegeneración.....	6
3.1. Oxidación de la dopamina .....	7
3.2. Oxidación de la dopamina relacionada a factores celulares de neurodegeneración.....	8
3.3. Mecanismos de protección ante la oxidación de la dopamina.....	12
4. Glutación-S-Transferasa.....	15
5. Astrocitos .....	16
6. Astrocitos y Glutación transferasa.....	17
II. Hipótesis.....	19
III. Objetivo general. ....	19
IV. Objetivos específicos. ....	19
V. Materiales y Métodos.....	20
VI. Resultados .....	27
1. Incorporación de aminocromo en células U373MG .....	27
2. Aumento de la expresión de la enzima GST M2-2.....	29

4.	Liberación de GSTM2-2 desde las células U373MG.....	35
5.	Efecto de medio condicionado de U373MG sobre células SH-SY5Y .....	37
6.	Efectos de siRNA dirigido al mRNA de GSTM2-2 .....	40
7.	Efectos de la enzima recombinante GSTM2-2 .....	41
8.	Incorporación de <sup>14</sup> C-GSTM2-2 a células SH-SY5Y .....	43
VII.	Discusión.....	47
1.	Rol protector de GSTM2-2 .....	47
2.	Astroцитos protegen a neuronas dopaminérgicas .....	48
3.	Oxidación de la dopamina .....	52
VIII.	Conclusión. ....	55
IX.	Bibliografía. ....	57



## Índice de Figuras.

Figura 1, Oxidación de la dopamina a aminocromo.....	7
Figura 2, Reducción de Aminocromo con un electrón.....	10
Figura 3, Conjugación con glutatión de dopamina-o-quinona y aminocromo.....	14
Figura 4, Incorporación de aminocromo a células U373MG.....	28
Figura 5, Aumento de GST M2-2 en células U373MGs. ....	30
Figura 6, Caracterización de las células U373GST. ....	33
Figura 7, Efectos del aminocromo en la muerte celular de células U373MG y U373GST. ....	34
Figura 8, Liberación de GST M2-2 desde células U373MG a medios de cultivo .....	36
Figura 9, Efectos del medio condicionado de células U373MG sobre la muerte de células SH-SY5Y inducida por aminocromo. ....	39
Figura 10, Protección de GST M2-2 contra la muerte de células SH-SY5Y inducida por aminocromo. ....	42
Figura 11, Incorporación de <sup>14</sup> C-GSTM2-2 en células SH-SY5Y.....	44
Figura 12, Fluorescencia intracelular de GTSM2-2 en células SH-SY5Y.....	46
Figura 13, Mecanismo propuesto mediante el cual aminocromo provoca el aumento de GSTM2-2 en astrocitos. ....	56

## **Abreviaturas.**

EP: Enfermedad de Parkinson.

L-DOPA: 3,4-dihidroxifenilalanina

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

SNCA: Gen de alfa sinucleína [synuclein, alpha (*non A4 component of amyloid precursor*)].

LRRK2: Gen de Dardarina (*leucine-rich repeat kinase 2*).

*PINK1* : PTEN (*phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10*)-induced  
*putative kinase protein 1* )

PARK7: Gen de DJ1 (*parkinson protein 7*)

6-OHDA: 6-hidroxidopamina

LPS: Lipopolisacárido

IL: Interleuquina

(TNF)- $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral  $\alpha$

iNOS: Oxido nítrico sintasa inducible (Inducible nitric oxide synthase)

COX: ciclooxigenasa (cyclo-oxygenase-1)

NF- $\kappa$ B: Factor nuclear  $\kappa$ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las  
células B activadas)

ROS: Especies reactivas de oxígeno

NRS: Especies reactivas de nitrógeno

SOD: Enzima superóxido dismutasa

GSH: glutatión

AM: Aminocromo

GPx: Glutatión peroxidasa

MPP<sup>+</sup>: Ion 1-metil-4-fenilpiridinio, producto de la metabolización de MPTP

Cu/Zn-SOD: Enzima superóxido dismutasa con cobre y zinc

PC12: Línea celular catecolaminérgica de feocromocitoma

SH-SY5Y: Línea celular dopaminérgica de neuroblastoma

MG-132: Inhibidor del proteosoma

mPTP: Poro de transición de permeabilidad mitocondrial

VMAT-2: Transportador de monoaminas 2

MAO-B: Monoamino oxidasa B

DOPAC: ácido dihidroxifenilacético

NADH: Dinucleótido de nicotinamida y adenina

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido

NSAIDs: Antiinflamatorios no esteroideos

NQO1: NAD(P)H: DT-diaforasa, quinona oxidoreductasa

CMA: Autofagia mediada por chaperonas

GST: Glutación-S-transferasa

GSTM2-2: Glutación-S-transferasa de clase Mu 2-2

DMF: Dimetil fumarato

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de hidrógeno

GABA: ácido gamma-aminobutírico

GDNF: Factor neurotrófico derivado de células gliales

FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos

Nrf2: Factor de transcripción Nrf2 (*NF-E2-related factor 2*)

ARE: Elemento de respuesta antioxidante (Antioxidant Response Element)

DAT: Transportador de dopamina

U373MG: Línea celular de astrocitos derivada de astrocitoma

## **Resumen.**

Los astrocitos colaboran con las neuronas en el normal desarrollo de sus actividades metabólicas, y más aún son capaces de participar activamente en su protección frente a estímulos potencialmente dañinos. Se ha demostrado, que la enzima glutatión-S-transferasa M2-2 (GSTM2-2) de astrocitos es capaz de conjugar glutatión con aminocromo, un producto de oxidación de la dopamina, y por ello es que se propone como hipótesis que la enzima Glutathion-S-transferasa M2-2 producida por astrocitos les confiere protección, y protege neuronas tipo dopaminérgicas de los efectos tóxicos de aminocromo. Para validar esta hipótesis es que en primera instancia se determinó la capacidad de los astrocitos humanos U373MG (glioblastoma) de captar aminocromo mediante utilización de aminocromo tritiado, observándose una incorporación máxima a los 40 minutos, la que es parcialmente inhibida por tratamientos con exceso de dopamina, imipramina y nomifensina. Mediante western blot se determinó que la presencia del aminocromo en los cultivos celulares provoca un aumento en la cantidad proteína, además de detectarse aumento en la actividad enzimática, ambos cambios de manera dependiente de la concentración, en donde 100  $\mu$ M de aminocromo aumenta 2,1 veces la cantidad de la enzima en 3 horas. Se detectó mediante western blot la presencia de la proteína GSTM2-2 en los medios condicionados de células U373MG, aumentando 2,7 veces al exponer las células a aminocromo 50  $\mu$ M por 3 horas en relación al control sin aminocromo. La línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y es susceptible a toxicidad inducida por aminocromo, determinada por citometría de flujo, por lo que se probaron los medios condicionados de las células U373MG que contenían la enzima GSTM2-2 sobre cultivos de SH-SY5Y, evidenciándose la capacidad de proteger a células SH-SY5Y de la muerte inducida por exposición a 10  $\mu$ M de aminocromo, y dicha protección frente a la muerte celular es dependiente de la

internalización de la proteína GSTM2-2 por parte de las células SH-SY5Y, tal como se demostró (i) por captación de  $^{14}\text{C}$ -GSTM2-2 liberado por células U373MG, proceso inhibido por un antisuero contra GSTM2-2, (ii) muerte celular de SH-SY5Y tratadas con aminocromo, en presencia de medios condicionados de U373MG tratados con antisuero contra GSTM2-2, (iii) muerte celular de SH-SY5Y tratadas con aminocromo, en presencia de medios condicionados de células U373MGsiGST6, que expresan un siRNA contra GSTM2-2. En conclusión, nuestros resultados demuestran que las células U373MG protegen las células SH-SY5Y contra la toxicidad inducida por aminocromo, por un mecanismo que involucraría la liberación de GSTM2-2 al medio condicionado y la subsecuente internalización de esta enzima por parte de las células SH-SY5Y. Estos resultados sugieren un nuevo mecanismo de protección de neuronas dopaminérgicas mediado por astrocitos.

## Summary

Astrocytes collaborate with neurons in the normal development of their metabolic activities, and to a greater extent, they are able to actively participate in their protection from potentially harmful stimuli. It has been shown that the enzyme glutathione S-transferase M2-2 (GSTM2-2) from astrocytes is able to conjugate glutathione to aminochrome, an oxidation product of dopamine. Therefore the hypothesis proposed is that the enzyme glutathione S-transferase M2-2 produced by astrocytes protect them, and also protects dopaminergic neurons from the toxic effects of aminochrome. To validate this hypothesis, we assessed the ability of human astrocytes U373MG (glioblastoma) to capture aminochrome by using tritiated aminochrome, reaching an incorporation peak at 40 minutes, which is partially inhibited by treatment with excess dopamine, imipramine and nomifensine. Using western blot, we determined that the presence of aminochrome in cell cultures causes an increase in the protein amount, besides the increasing enzymatic activity, both changes depending on the aminochrome concentration, with 100  $\mu$ M aminochrome increasing 2.1 times the amount of the enzyme in 3 hours. The presence of protein GSTM2-2 was detected by western blot in conditioned media from U373MG cells, increasing 2.7 times after the exposure to 50  $\mu$ M aminochrome for 3 hours compared to the control without aminochrome. The neuroblastoma cell line SH-SY5Y is susceptible to aminochrome-induced toxicity, determined by flow cytometry, then U373MG cells conditioned media containing the enzyme GSTM2-2 cultures were tested on SH-SY5Y, demonstrating the ability to protect SH-SY5Y against aminochrome-induced cells death, and that protection against cell death is dependent on internalization of the GSTM2-2 protein by SH-SY5Y cells. This internalization was demonstrated by (i) uptake of  $^{14}$ C-GSTM2-2 released by U373MG cells, process inhibited by an antiserum against GSTM2-2,

(ii) cell death of SH-SY5Y treated with aminochrome, in the presence of conditioned media from U373MG treated with antiserum against GSTM2-2, (iii) cell death of SH-SY5Y treated with aminochrome, in the presence of conditioned media of U373MGsiGST6 cells expressing siRNA against GSTM2-2. In conclusion, our results demonstrate that U373MG cells protect SH-SY5Y cells against aminochrome-induced toxicity, by a mechanism which would involve the release of GSTM2-2 to the conditioned medium and subsequent internalization of this enzyme by SH-SY5Y cells. These results suggest a novel mechanism of protection of dopaminergic neurons mediated by astrocytes.

# **I. Introducción.**

## **1. Enfermedad de Parkinson**

La enfermedad de Parkinson (EP) es el desorden neurodegenerativo más común después del Alzheimer, caracterizado por ser un padecimiento crónico y de lento progreso que afecta entre el 1% y 2% de la población mayor de 65 años (Nussbaum & Ellis 2003). La característica patológica de esta enfermedad es la degeneración selectiva de neuronas dopaminérgicas que contienen neuromelanina, en la pars compacta de la sustancia nigra, sin embargo también existe pérdida de células en el locus coeruleus, núcleo del raphe, y otras estructuras catecolaminérgicas (Damier et al 1999). Esta pérdida de células nerviosas es acompañada por agregados proteicos conocidos como cuerpos de Lewy, cuyo componente principal es la proteína presináptica  $\alpha$ -sinucleína (Wakabayashi et al 2007). En la actualidad no existe un tratamiento que efectivamente pueda detener el progreso de esta enfermedad, aunque la suplementación de 3,4 dihidroxifenilalanina (L-dopa) se utiliza como alternativa para reemplazar la capacidad disminuida de las neuronas de producirla, aunque solo se reducen los síntomas sobre la función motora, y su efectividad declina a medida que la enfermedad sigue su curso.

## **2. Neurodegeneración en la enfermedad de Parkinson**

### **2.1. Factores ambientales**

Aunque en más del 85% de los casos la enfermedad de Parkinson se presenta como una patología idiopática, cuyo principal factor de riesgo es la edad, se han encontrado algunos factores ambientales que podrían estar relacionados con la enfermedad (Dick et al 2007). Se ha reportado una asociación con la exposición a ciertos herbicidas e insecticidas



(paraquat, rotenona, organofosfatos) (Elbaz & Tranchant 2007). También se ha reportado que la exposición a toxinas ambientales como 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), cianuro y tolueno, producen un cuadro clínico de Parkinsonismo atípico (Tanner & Aston 2000).

## 2.2. Factores Genéticos

Dentro de los casos de Parkinson, no más del 10% están relacionados a causas genéticas, siendo la mutación de  $\alpha$ -sinucleína la primera en asociarse a esta patología. Además del gen de *SNCA* ( $\alpha$ -sinucleína), del que se conocen tres mutaciones de la proteína  $\alpha$ -sinucleína asociadas a formas familiares de instalación temprana de la enfermedad de Parkinson (Kruger et al 1998; Polymeropoulos et al 1997; Zarranz et al 2004), existen diez genes que presentan mutaciones asociadas a formas hereditarias de Parkinson [para revisión se sugiere (Corti et al 2011)], dentro de los cuales destacan, *LRRK2* (leucine-rich repeat kinase 2, Dardarina) (Funayama et al 2002) que corresponde a la mutación de mayor prevalencia presente en pacientes con aparición tardía (Gilks et al 2005); *Parkina* (Kitada et al 1998), la de mayor frecuencia en la aparición de parkinsonismo temprano (Periquet et al 2003); *PINK1* [PTEN (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10)-induced putative kinase protein 1] (Valente et al 2004) y *PARK7* (Bonifati et al 2003) correspondiente a mutaciones menos frecuentes en parkinsonismo de aparición temprana autosómico recesivo.

## 2.3. Factores Celulares que predisponen a neurodegeneración

### 2.3.1. Daño mitocondrial

Un factor importante asociado a la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la patogénesis del Parkinson son los cambios ocurridos en la mitocondria, particularmente el

complejo I (Papa & De Rasmio ; 2012), idea que se refuerza al considerar que las toxinas MPTP y rotenona actúan como inhibidores del complejo I mitocondrial (Betarbet et al 2000; Mizuno et al 1987), al igual que lo hace la 6-hidroxidopamina (6-OHDA), comúnmente utilizada para modelos *in vivo* e *in vitro* de Parkinson (Dabbeni-Sala et al 2001; Glinka & Youdim 1995). Esta evidencia es apoyada por los antecedentes existentes de que PINK1 se localiza en la mitocondria (Jin et al 2010) y es esencial, junto a Parkina, en el proceso de mitofagia (Kazlauskaitė & Muqit ; 2014; Okatsu et al ; 2012). En pacientes con Parkinson esporádico se encuentra reducida la actividad del complejo III mitocondrial en el cuerpo estriado y del complejo I en la sustancia nigra (Bindoff et al 1989; Schapira et al 1990).

### 2.3.2. Inflamación

La inflamación también es un factor que se ha involucrado en la neurodegeneración en la patología del Parkinson, puesto que tras la inyección de lipopolisacárido (LPS) en el cuerpo estriado de ratas se induce la expresión de citoquinas proinflamatorias, como interleuquina (IL)-1 $\beta$ , IL-6 y factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$ , entre otras (Stern et al 2000), y además se produce la degeneración de neuronas dopaminérgicas con acumulación de microglías (Castano et al 1998; Gao et al 2002). En animales tratados con MPTP, las células astrogliales y microglías se activan en la sustancia nigra, asociado a muerte de neuronas dopaminérgicas, lo que sugiere un mecanismo inflamatorio en el daño producido por MPTP (Kurkowska-Jastrzebska et al 1999), tal como se ha observado también en el cuerpo estriado y sustancia nigra de animales tratados con rotenona (Sherer et al 2003). En la sustancia nigra de pacientes con Parkinson se acumulan microglías activadas que expresan iNOS y COX-1 y 2 (Knott et al 2000; McGeer et al 1988), además de aumentar

los niveles de citoquinas proinflamatorias y NF- $\kappa$ B, en el estriado y fluido cerebroespinal (Hunot et al 1997; Nagatsu et al 2000).

### 2.3.3. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo, mediado por la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) o especies reactivas de nitrógeno (NRS), se estima que también participa en la patogénesis y progreso degenerativo en la enfermedad de Parkinson. En la disfunción mitocondrial se produce el escape de ion superóxido al citoplasma, especialmente al inhibir la actividad de las enzimas respiratorias por efecto de MPTP, 6-OHDA y rotenona (Seaton et al 1997). En la inflamación, el ion superóxido es generado enzimáticamente por las microglías activadas (Sankarapandi et al 1998). El ión superóxido es convertido en peróxido de hidrógeno por acción de la superóxido dismutasa (SOD), y además reacciona con el óxido nítrico generando peroxinitrito; especie reactiva involucrada en la nitración de residuos de tirosina. Existe evidencia que indica la nitrosilación de estos aminoácidos en proteínas, en los cuerpos de Lewy presentes en neuronas dopaminérgicas de pacientes con Parkinson (Good et al 1998). El peróxido de hidrógeno es tomado por las neuronas y reducido por antioxidantes como el glutatión (GSH), la glutatión peroxidasa (GPx) o la catalasa; sin embargo en aquellos lugares en donde abundan metales como el hierro, el peróxido de hidrógeno reacciona dando origen al radical hidroxilo. La generación de ROS y el aumento de enzimas de naturaleza antioxidante como SOD, GPx y catalasa se ha reportado en ganglios basales de animales tratados con MPTP y cultivos celulares expuestos a MPP<sup>+</sup> (Cassarino et al 1997). La 6-OHDA en las neuronas dopaminérgicas produce ROS como superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo (Cohen &

Heikkila 1974), y tras su inyección intracerebroventricular en ratones se produce un aumento de la actividad de Cu/Zn-SOD en el cuerpo estriado (Ogawa et al 1994).

#### 2.3.4. Estrés proteolítico

El mal funcionamiento del sistema ubiquitin-proteosoma que genera estrés de retículo endoplásmico, en respuesta a proteínas mal plegadas citosólicas y la consecuente acumulación de proteínas citotóxicas están involucradas en la patogénesis de Parkinson [se sugiere revisión de (McNaught et al 2001)], hecho apoyado por la evidencia de que la Parkina es una ubiquitin ligasa (Shimura et al 2000). Se sabe que la acumulación de  $\alpha$ -sinucleína es componente de los cuerpos de Lewy (Polymeropoulos et al 1997), y células PC12 diferenciadas que expresan  $\alpha$ -sinucleína mutante presentan actividad disminuida del proteosoma (Tanaka et al 2001). 6-OHDA, MPP<sup>+</sup> y rotenona inducen estrés de retículo y respuesta a proteínas mal plegadas en células catecolaminérgicas PC12 (Ryu et al 2002). En células de neuroblastoma dopaminérgicas SH-SY5Y y catecolaminérgicas PC12, la 6-OHDA aumenta los niveles de ubiquitina libre y proteínas ubiquitinadas, y la inhibición del proteosoma por MG-132, potencia la toxicidad de 6-OHDA (Elkon et al 2001).

#### 2.3.5. Relación entre factores celulares

El peróxido de hidrógeno generado en la célula activa el factor de transcripción NF- $\kappa$ B, relacionado a la inflamación, promoviendo la transcripción de iNOS, COX, citoquinas proinflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) y moléculas proapoptóticas como Bcl-Xs y Bax (Meyer et al 1993; O'Neill & Kaltschmidt 1997), además tanto el peróxido de hidrógeno como el superóxido pueden abrir el poro de transición de permeabilidad

mitocondrial (mPTP), directa o indirectamente, a través de la activación de NF- $\kappa$ B y proteínas Bax (Zoratti & Szabo 1995) promoviendo la liberación de citocromo c y la posterior muerte celular. El óxido nítrico es capaz de inhibir el complejo IV mitocondrial, generándose una mayor cantidad de anión superóxido (Lizasoain et al 1996).

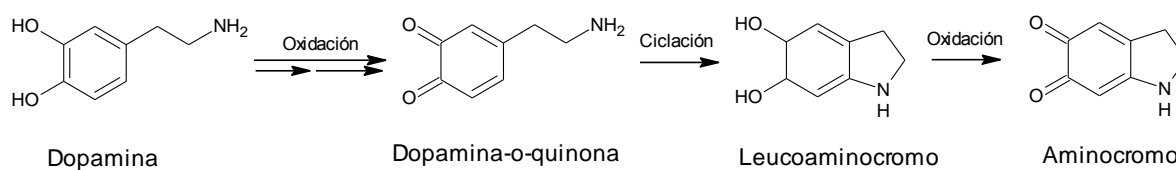
La actividad del proteosoma en cultivos primarios de células dopaminérgicas tratadas con 6-OHDA aumenta, mientras que en cultivos expuestos a rotenona y MPP<sup>+</sup> la actividad proteosomal disminuye, sin embargo ambos cambios ocurren acompañados de un aumento de ROS (Hoglinger et al 2003). Los inhibidores del proteosoma reducen la actividad de los complejos I y II de la mitocondria, en células SH-SY5Y (Sullivan et al 2004), y aumentan la COX-2 y sus conjugados ubiquitinados (Rockwell et al 2000). Al tratar células PC12 con lactacistina, un inhibidor del proteosoma, se observan inclusiones de  $\alpha$ -sinucleína ubiquitinada (Rideout et al 2001) y en casos de inyección estereotáxica de lactacistina en la sustancia nigra de ratas, se observa degeneración selectiva de neuronas dopaminérgicas y acumulación de  $\alpha$ -sinucleína (McNaught et al 2002).

### 3. Aminocromo como factor de neurodegeneración

Las hipótesis presentadas anteriormente explican mecanismos de toxicidad inducidos por 6-OHDA y MPTP y parte de la patogénesis de Parkinson esporádico y familiar; sin embargo, no clarifican la pérdida específica de neuronas dopaminérgicas en la patología del Parkinson ni tampoco en animales tratados con rotenona, en donde además de la pérdida selectiva de células dopaminérgicas nigroestriatales, se observa degeneración con inclusiones citoplasmáticas (Betarbet et al 2000). La depleción de dopamina atenúa la neurotoxicidad inducida por rotenona (Sakka et al 2003), sugiriendo que la presencia de la dopamina endógena está involucrada en la pérdida selectiva de neuronas.

### 3.1. Oxidación de la dopamina

La dopamina es sintetizada *de novo* en las neuronas dopaminérgicas, y la que ha sido liberada en la neurotransmisión es recaptada por las terminales nerviosas. Así la dopamina intracelular es incorporada en vesículas sinápticas a través del transportador de monoaminas 2 (VMAT-2) para su almacenamiento, permitiendo una concentración baja de dopamina en el citosol. La dopamina libre en el citoplasma es metabolizada por la monoamino oxidasa B (MAO-B), generando peróxido de hidrógeno y ácido dihidroxifenilacético (DOPAC). Por otra parte la dopamina, en el citosol, se puede oxidar en presencia de oxígeno a dopamina-*o*-quinona (Linert 1996), que se cicla en varios pasos a aminocromo (Paris et al 2009). La generación de dopamina *o*-quinonas puede ocurrir también por oxidación enzimática de la dopamina por la prostaglandina H sintasa, lipoxigenasa, tirosinasa y xantina oxidasa (Foppoli et al 1997; Hastings 1995; Korytowski et al 1987; Rosei et al 1994) (Figura 1).



**Figura 1, Oxidación de la dopamina a aminocromo.** La dopamina se oxida en el citosol a dopamina-*o*-quinona en presencia de oxígeno o por acción enzimática. La inestabilidad de la dopamina-*o*-quinona a pH fisiológico permite su ciclación para originar leucoaminocromo, que al oxidarse origina el aminocromo.

La citotoxicidad de la dopamina *o*-quinona se ha descrito predominantemente en neuronas dopaminérgicas (Sulzer et al 2000). La toxicidad es provocada por interacción de las *o*-quinonas con los aminoácidos de las proteínas, como residuos de cisteína, de manera de producir 5-cisteinil-dopamina, inhibiendo o alterando irreversiblemente la molécula, y produciendo citotoxicidad tal como se ha corroborado en cultivos de neuronas dopaminérgicas SH-SY5Y tratadas con L-DOPA, evidenciando la aparición de *o*-quinonas, 5-cisteinil-DOPA y muerte celular (Lai & Yu 1997). Es de particular interés que la enzima tirosina hidroxilasa, la enzima limitante en la biosíntesis de catecolaminas, es una proteína blanco del aminocromo generado en la oxidación de la dopamina (Xu et al 1998), provocando su inactivación y producción de una quinoproteína (quinotirosina hidroxilasa) que contribuye al estrés oxidativo en las neuronas (Kuhn et al 1999). Por otra parte, la dopamina-*o*-quinona, el precursor de aminocromo, forma aductos con Parkina, provocando su inactivación y pérdida de función (LaVoie et al 2005).

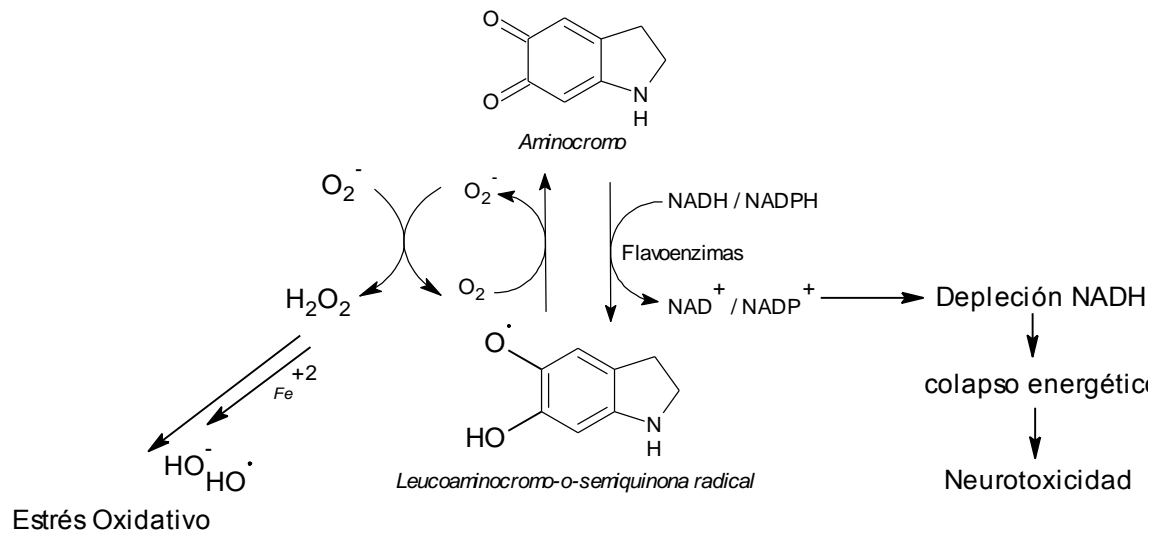
En cultivos de células humanas de neuroblastoma SH-SY5Y, dopamina y L-DOPA producen la formación de radicales semiquinonas, induciendo toxicidad (Emdadul Haque et al 2003), incluso se ha demostrado la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra tras una inyección esterotáxica en ratas de aminocromo unilateralmente. (Díaz-Véliz et al 2002).

### 3.2.Oxidación de la dopamina relacionada a factores celulares de neurodegeneración

Uno de los blancos de la dopamina *o*-quinonas corresponde a la proteína  $\alpha$ -sinucleína, componente de los cuerpos de Lewy (Conway et al 2001). Alfa-sinucleína puede contribuir a la patogenia de la enfermedad de Parkinson a través de varias vías, pero

generalmente se propone que las protofibras que corresponden a conformaciones oligoméricas solubles, son las especies tóxicas que alteran la homeostasis y promueven la muerte neuronal, a través de varios blancos intracelulares propuestos, como interfiriendo con la dinámica del citoesqueleto o con los sistemas de degradación de proteínas, disminuyendo la actividad de los complejos mitocondriales, entre otros (Stefanis 2012). La  $\alpha$ -sinucleína mutante (A30P), relacionada a Parkinson familiar autosómico dominante, aumenta la velocidad de formación de protofibras tóxicas (Conway et al 2000), que provoca la permeabilización de vesículas sinápticas (Volles et al 2001). Los productos de oxidación de la dopamina reaccionan con  $\alpha$ -sinucleína para formar aductos, provocándose la estabilización de las protofibras (Conway et al 2001), en donde el aminocromo es el responsable directo de esta estabilización (Norris et al 2005). Una reacción altamente tóxica ocurre cuando el aminocromo es reducido con un electrón por flavoenzimas que utilizan NADH o NADPH, en donde se forma leucoaminocromo-o-semiquinona, radical altamente reactivo con oxígeno. Este radical entra en un ciclo de óxido-reducción dando origen al consumo del NADH y NADPH, provocando la disminución en la síntesis de ATP, la merma de la capacidad antioxidante del glutatión, disminución de la cantidad de  $O_2$  y formación de radicales superóxido, produciendo un colapso energético que es altamente neurotóxico y un desbalance antioxidante (Segura-Aguilar et al 2001) (Figura 2).





**Figura 2, Reducción de Aminocrom con un electrón**, es catalizada por flavoenzimas que utilizan NADH/NADPH como donador de electrones, generando el radical leucoaminocromo-o-semiquinona. Este radical es extremadamente reactivo con oxígeno, reduciéndolo a radical superóxido, en un ciclo redox que induce estrés oxidativo y depleta el NADH requerido para la generación de ATP en la mitocondria. La depleción del NADPH trae como consecuencia el aumento de glutatión oxidado (GSSG).

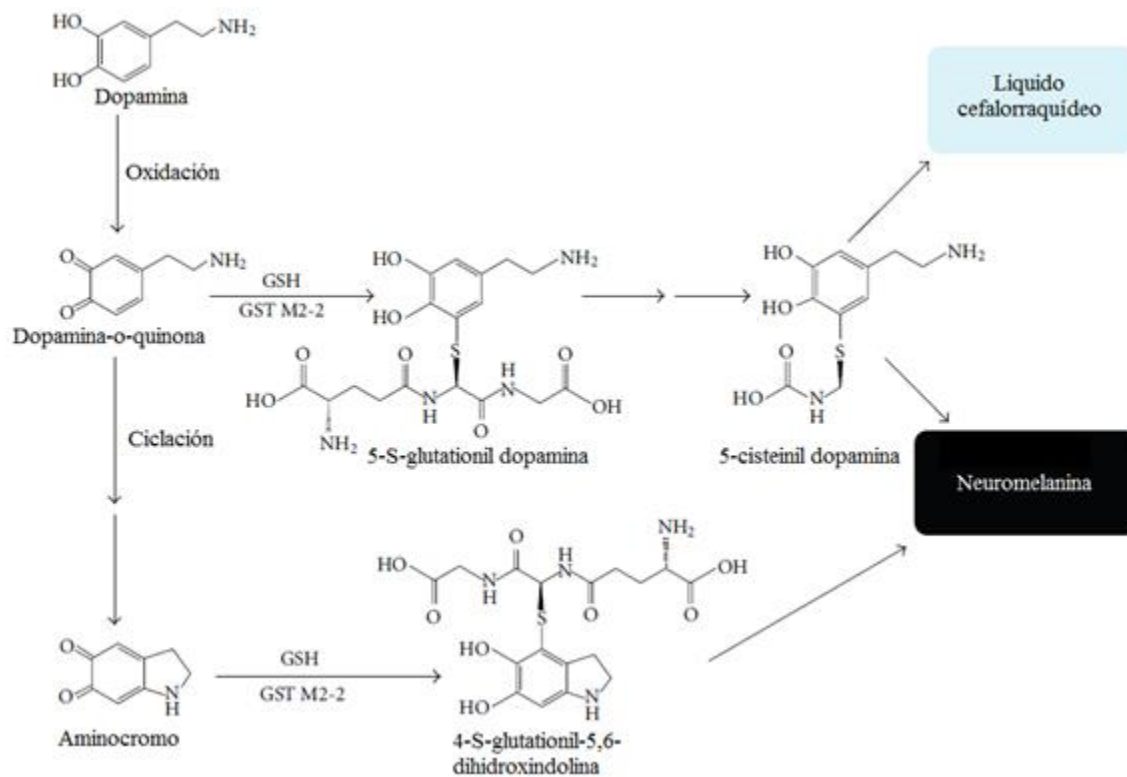
La citotoxicidad de la formación de *o*-quinonas derivadas de la oxidación de la dopamina no está solamente relacionada al estrés oxidativo, sino también a la disfunción mitocondrial, mal función del sistema proteosomal y a procesos relacionados a la inflamación. La formación de *o*-quinonas reduce la función de las mitocondrias y provoca la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial, tal como se ha demostrado en mitocondrias neuronales de tejido cerebral de ratas (Berman & Hastings 1999). Antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs) son capaces de proteger contra la pérdida de células dopaminérgicas en animales tratados con MPTP, MPP+ y 6-OHDA (Aubin et al 1998; Ferger et al 1999; Mohanakumar et al 2000; Teismann & Ferger 2001). Los niveles de la prostaglandina E2, producida por la prostaglandina H sintasa, esta aumentada en la sustancia nigra obtenida postmortem de pacientes con Parkinson. Mas aún, se ha demostrado que su inhibición en tejido cerebral de pacientes postmortem, utilizando indometacina y aspirina, previenen la oxidación enzimática de la dopamina y la generación de *o*-quinonas (Mattammal et al 1995). El uso de NSAIDs bloquea la inducción de citoquinas proinflamatorias y de moléculas proapoptóticas al suprimir la activación de NF- $\kappa$ B y la expresión de iNOS (Asanuma et al 2004). Al reducir la dopamina endógena se inhibe la apoptosis y la muerte de células dopaminérgicas con formación de inclusiones de  $\alpha$ -sinucleína producida por la inhibición del proteosoma (Fornai et al 2003). El aumento en la concentración endógena de dopamina provoca la inhibición del proteosoma en células PC12, previo a la muerte de las células, toxicidad que aumenta al suministrar además inhibidores del proteosoma. Esta inhibición proteosomal y toxicidad se atenúa con glutatión (GSH) o la inhibición de la recaptura de dopamina con nomifensina (Keller et al 2000), sugiriendo un rol a los altos niveles de dopamina y sus quinonas en la toxicidad provocada por la inhibición del proteosoma. La formación de protofibras de  $\alpha$ -sinucleína inhibe la

autofagia mediada por chaperonas (CMA) (Martinez-Vicente et al 2008) y aminocromo es capaz de formar aductos con  $\alpha$ -sinucleína estabilizando las protofibras (Conway et al 2001), de manera que aminocromo esta involucrado en la inhibición de la CMA. Aminocromo forma aductos con UCH-L1 (Van Laar et al 2009), afectando su normal funcionamiento, condiciones en las que se observa una inhibición de la autofagia (Kabuta et al 2008). El aminocromo forma aductos con  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina (Paris et al 2010), proteína fundamentales en la formación del autofagosoma y fusión de este con el lisosoma, provocando la acumulación de autofagosomas en el citosol, incrementándose en condiciones donde la enzima NQO1 es inhibida (Paris et al 2011).

### 3.3.Mecanismos de protección ante la oxidación de la dopamina

Varias aproximaciones acerca de la neuroprotección frente a la toxicidad de las *o*-quinonas derivadas de la oxidación de la dopamina se conocen. El daño celular *in vitro* e *in vivo* provocado por la aparición de las *o*-quinonas, se previene por tratamiento con superóxido dismutasa (SOD), GSH, N-acetilcisteína o ditiotreitól, pero no con catalasa (Haque et al 2003; Lai & Yu 1997; LaVoie & Hastings 1999; Offen et al 1996). Frente a la toxicidad del aminocromo se conoce la actividad protectora de las enzimas NAD(P)H: quinona oxidoreductasa (NQO1) conocida como DT-diaforasa, y la enzima glutatión-S-transferasa M2-2 (GSTM2-2). DT-diaforasa, enzima presente en neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra (Schultzberg et al 1988), cataliza la reacción de reducción con dos electrones, lo que previene que el aminocromo forme aductos con  $\alpha$ -sinucleína y que se convierta en el radical leucoaminocromo-*o*-semiquinona (Baez et al 1995; Paris et al 2001; Segura-Aguilar & Lind 1989). El tratamiento con dimetil fumarato (DMF) o tert-

butilhidroquinona, que aumenta la actividad de DT-diaforasa, protege contra la muerte celular inducida por oxidación de dopamina (Hara et al 2003; Munday et al 1998). GSTM2-2 es capaz de conjugarse al aminocromo al glutatión, generando un producto que es resistente a agentes oxidantes como oxígeno, peróxido de hidrógeno y anión superóxido (Baez et al 1997; Segura-Aguilar et al 1997), además GSTM2-2 previene la formación de aminocromo al conjugarse el precursor dopamina-o-quinona, para formar 5-glutationil dopamina, que se degrada formando 5-cisteinil dopamina (Segura-Aguilar et al 1997), metabolito que ha sido detectado en el líquido cefalorraquídeo y en la neuromelanina humana (Cheng et al 1996) (Figura 3). DMF no solo induce la actividad de DT-diaforasa, sino también aumenta el GSH intracelular total y la actividad de GST y GSH reductasa (Duffy et al 1998). El aminocromo polimeriza para formar parte de la neuromelanina, en una reacción dependiente de la concentración, fenómeno natural que se acumula con el tiempo, siendo observable en individuos sanos postmortem (Zecca et al 2002). La neuromelanina posee propiedades antioxidantes asociadas a su capacidad de inhibir la peroxidación de lípidos, de atrapar radicales libres, y previniendo la toxicidad inducida por metales al actuar como quelante (Zecca et al 2003). Esta formación de neuromelanina puede ser una importante reacción de neuroprotección, situación apoyada por el hecho de que al inhibir la tirosinasa, enzima limitante en la síntesis de melanina, se reduce la viabilidad de neuronas dopaminérgicas, aumentando el contenido intracelular de dopamina (Higashi et al 2000).



**Figura 3, Conjugación con glutatión de dopamina-o-quinona y aminocromo catalizada por la enzima GSTM2-2, generando como producto 5-S-glutathionil dopamina y 4-S-glutathionil-5,6-dihidroindolina, respectivamente. 5-S-glutathionil dopamina se degrada a 5-cisteinil dopamina, que ha sido detectado en el líquido ceforraquídeo y la neuromelanina [tomado de (Munoz et al 2012a)]**

#### 4. Glutación-S-Transferasa

Las glutación-S-transferasa (EC 2.5.1.18) (GST), son enzimas que catalizan el ataque nucleofílico del glutación reducido (GSH) sobre compuestos que contienen carbonos electrofílicos, nitrógeno o átomos de azufre. Los sustratos de estas enzimas incluyen halogenonitrobenzenos, arenos, óxidos, quinonas y carbonilos  $\alpha,\beta$  insaturados (Armstrong 1997; Keen & Jakoby 1978; Sheehan et al 2001) y su expresión aumenta por exposición a pro oxidantes en diferentes organismos (Allocati et al 2003; Kobayashi et al 2002; Veal et al 2002). Se conocen tres familias de GST, las citosólicas, las mitocondriales y las microsomales, dentro de las cuales, la citosólica es la familia más grande (Sheehan et al 2001). Las enzimas citosólicas son dímeros con subunidades de 199-244 aminoácidos, y de acuerdo a sus secuencias se reconocen siete clases en mamíferos, designadas Alpha, Mu, Pi, Sigma, Theta, Omega y Zeta (Armstrong 1997; Hayes & McLellan 1999; Sheehan et al 2001).

En el cerebro, en donde hay un gran consumo de oxígeno, se producen ROS como  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  y radical hidroxilo, los que son eliminados por la actividad catalítica de enzimas como la superóxido dismutasa, catalasa y glutación peroxidasa o de manera no enzimática por el GSH, ácido ascórbico o  $\alpha$ -tocoferol. Estas especies reactivas pueden dañar directamente lípidos de membrana, DNA, proteínas y carbohidratos (Marnett et al 2003) o pueden generar metabolitos secundarios reactivos que favorecen el estrés oxidativo, metabolitos que son sustrato de enzimas como la glutación peroxidasa o la GST. En la oxidación de la dopamina se genera aminocromo, quinona que puede ser conjugada a GSH por la actividad de GST. Experimentalmente se ha determinado que la mayor capacidad para conjugar GSH a aminocromo la posee la enzima GST M2-2 humana (Baez et al 1997), aunque experimentalmente la enzima rGST M3-3 (GST 6) de rata ha mostrado una buena

eficiencia catalítica, tanto con aminocromo (datos no publicados S. Baez, M. Widersten, J. Segura-Aguilar, & B. Mannervik), como con DCNB (Abramovitz et al 1988). Resulta interesante que tanto GSTM2-2 como rGST M3-3 presentan una estructura similar, que posiblemente contribuye a su capacidad catalítica (Hansson et al 1999).

En tejido cerebral se ha encontrado que la actividad de GST es superior a la actividad de la glutatión peroxidasa (Carmagnol et al 1983).

##### 5. Astrocitos

Los astrocitos comprenden entre el 20% y 50% del volumen celular del cerebro. Son células caracterizadas por sus proyecciones, utilizadas para hacer contacto con el soma, las dendritas y las terminales neuronales (Ventura & Harris 1999), además de células endoteliales (Abbott et al 2006). Los astrocitos ejercen funciones esenciales que aseguran la homeostasis neuronal, actuando como tampón del contenido iónico del medio extracelular cerebral. Poseen acuaporina 4 (AQP4), transportadores de K<sup>+</sup> (Simard & Nedergaard 2004), además de intercambiadores Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> y transportadores de bicarbonato entre otros (Obara et al 2008). También participan en la regulación de los niveles de neurotransmisores, puesto que expresan algunos transportadores de neurotransmisores, como glutamato, GABA y glicina y DA (Minelli et al 1996; Sattler & Rothstein 2006; Verleysdonk et al 1999). Participan en la mantención de la función neuronal produciendo citoquinas que actúan como coordinadoras de la comunicación neurona-glia (Choi et al 2014). Existe evidencia de que los astrocitos se involucran también en la transmisión sináptica, mediante la liberación regulada de moléculas activas como glutamato, purinas (ATP y adenosina), GABA y D-serina (Halassa et al 2007; Perea et al 2009) ante cambios en la actividad sináptica, y además tienen el potencial de ejercer influencias a largo plazo

mediante liberación de factores de crecimiento, como factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) o factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) (Ito et al 2005). Se ha observado disfuncionalidad de los astrocitos en varios desórdenes neurodegenerativos (Seifert et al 2006), frecuentemente se observa una hipertrofia y un aumento en el número de astrocitos, lo que se conoce como astrogliosis (Stromberg et al 1986). La astrogliosis aparece en los cerebros de pacientes con Parkinson, analizados post-mortem (Teismann & Schulz 2004), también se ha descrito en modelo de Parkinson inducido por MPTP (Dervan et al 2004) y en la sustancia nigra de ratones tratados con 6-OHDA (Stromberg et al 1986). La función protectora de los astrocitos se sustenta en hechos como que las especies reactivas de oxígeno que dañan neuronas, disminuyen cuando se cocultivan neuronas y astrocitos (Drukarch et al 1998). La cantidad de GSH en neuronas aumenta, al igual que su viabilidad frente a rotenona y paraquat, al cocultivarlas con astrocitos (Rathinam et al 2012), la concentración de glutatión es más alta en astrocitos que en la neurona (Dringen et al 2000), y existe una mayor activación de la vía Nrf2/ARE (Sun et al 2005), responsable de la regulación transcripcional de enzimas detoxificantes de fase II, como DT-Diaforasa y glutatión transferasa (Lee et al 2003).

#### 6. Astrocitos y Glutatión transferasa

Los astrocitos pueden captar dopamina, ya que también expresan el transportador de dopamina (DAT) (Karakaya et al 2007) y el transportador de norepinefrina que también ingresa dopamina eficientemente (Takeda et al 2002) Por tanto también se puede formar aminocromo en estas células, sin embargo, los astrocitos expresan la glutatión transferasa M2-2 (GSTM2-2), enzima que tiene la mayor actividad de conjugación reductiva del aminocromo con glutatión (Baez et al 1997; Segura-Aguilar et al 1997). Un antecedente



interesante es el hallazgo de una mutación nula de la enzima GST M1 en la población chilena con Parkinson idiopático, que sustenta la idea de que esta enzima protege contra el metabolismo oxidativo tóxico de la dopamina previniendo la reducción de aminocromo con un electrón (Perez-Pastene et al 2007).

Carder, el año 1990, reportó la presencia de GST Alpha y Pi en células gliales (Carder et al 1990), además se sabe de la presencia de GST Pi en oligodendrocitos (Tansey & Cammer 1991) y GST mu en astrocitos de rata (Cammer et al 1989). En astrocitos humanos se ha detectado la presencia específica de la enzima GST M2-2 (Rowe et al 1997).

## **II. Hipótesis.**

La hipótesis propuesta para este trabajo fue: “La enzima Glutation-S-transferasa M2-2 producida por astrocitos les confiere protección, y protege neuronas tipo dopaminérgicas de los efectos tóxicos de aminocromo”.

## **III. Objetivo general.**

El objetivo general de este trabajo es estudiar la capacidad protectora de la enzima GSTM2-2 en los astrocitos y neuronas dopaminérgicas de los efectos neurotóxicos de aminocromo usando como modelo de astrocitos las células de glioblastoma humano U373MG y de neuronas dopaminérgicas las células humanas SH-SY5Y diferenciadas.

## **IV. Objetivos específicos.**

- I. Medir la incorporación de aminocromo en células de glioblastoma U373MG.
- II. Estudiar la capacidad de aminocromo de inducir la expresión de GST M2-2 en células de glioblastoma U373MG.
- III. Establecer una línea celular que sobreexpresen GSTM 2-2, para demostrar que la enzima confiere protección ante la toxicidad inducida por aminocromo.
- IV. Evaluar si el medio condicionado de células de glioblastoma U373MG tratadas con aminocromo, confiere protección a células SH-SY5Y, expuestas a aminocromo.

## V. Materiales y Métodos.

**Síntesis y purificación de Aminocromo:** La síntesis de aminocromo fue realizada oxidando 5 mM de dopamina (Sigma Aldrich, Cat. # H8502-10G) con 25 µg/ml de tirosinasa (Sigma Aldrich, Cat. # T3824-50KU) en 25 mM tampón fosfato de potasio pH 6.0 por 15-30 minutos a temperatura ambiente. El Aminocromo fue separado de la dopamina no oxidada y de la tirosinasa utilizando una columna CM-Sephadex C50-100 (8 x 0.8 cm) equilibrada con 25 mM de fosfato de potasio pH 6.0., eluyendo la columna con el mismo tampón. Se determinó la absorbancia de aminocromo a 478 nm, y se determinó su concentración usando el coeficiente de extinción molar 3058 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>.

PCR semicuantitativo de GSTM2-2: Para amplificar GSTM2-2 a partir del cDNA obtenido de células U373MG o células U373GST, se utilizan los partidores sentido 5'-GCTCTAGACATGCCCATGACACTGGGG-3' y antisentido 5'-ATATCCGGATTGTTGCCCCAGACAGCC-3'. La reacción de PCR contiene a concentración final 1,5nM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 nM de dNTP, 1X PCR Buffer, partidores sentido y antisentido 0,5 µM cada uno, 5U DNA polimerasa y 50ng de cDNA, el programa comprende 5 minutos de denaturación inicial a 95°C, seguido de 28 ciclos de: 30 seg. a 95°C, 40 seg. a 56°C como temperatura de alineamiento, 1 minuto de extensión a 72°C.

**Cultivo células U373MG:** Según experiencias previas en nuestro laboratorio, las células U373MG se cultivan en medio RPMI 1640 (HyClone Cat. # SH30011.04) suplementado con 10% de suero fetal bovino, con antibióticos Penicilina G Sodio (10U/ml) y antimicótico estreptomycin sulfato (10U/ml), 1% de aminoácidos no esenciales, 1% de piruvato de sodio, 1% de HEPES en estufa de cultivo con 5% de CO<sub>2</sub> y a 37° C. Las células se crecen en placas de Petri de vidrio y son sub-cultivadas un máximo de nueve veces. Los ensayos de transfección con plásmidos llevando el cDNA de GSTM2-2 se realizan con células en fase proliferativa, después de dos o tres sub-cultivos consecutivos.

**Cultivo de células SH-SY5Y:** Las células SH-SY5Y son cultivadas en DMEM/F12 10% suero fetal bovino, 2 mM L-glutamina y con antibióticos Penicilina G Sodio (10U/ml) y

antimicótico estreptomicina sulfato (10U/ml),. Las células SH-SY5Y son diferenciadas incubando con 10  $\mu$ M de ácido retinoico y TPA 80nM, por 8 días.

**Viabilidad celular por citometría de flujo:** Las células son mantenidas en cultivo el tiempo que corresponda a una concentración determinada de aminocromo, y posteriormente se lavan y se tratan con tripsina 0,1% hasta soltarlas. Se lavan 3 veces con PBS 1X y el concentrado celular se resuspende en 200  $\mu$ L de buffer de citometría y se incuban 45 minutos con 0,5  $\mu$ M de Calceína AM (FL1, verde) (Invitrogen, Cat. # L3224). y 5  $\mu$ M de etídio homodímero (FL3, rojo) (LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit, Molecular Probes). De cada muestra se adquieren 5000 eventos en citómetro de flujo (FACSCalibur; BD Biosciences, San Jose, CA, USA) y los datos son analizados con el software WinMDI 2.9 (TSRI Flow Cytometry Core Facility, La Jolla, CA, USA). En gráfico tamaño v/s granularidad (FSC/SCC) se selecciona la población celular (R1) y posteriormente de esta población se seleccionan las células que resultan positivas para FL1 o FL3, determinándose el porcentaje de cada una.

**Extracción de proteínas:** Las células se cultivaron en placas de 10 cm y crecieron hasta una confluencia de 70-80%. Las células se lavaron con 2 ml de PBS 1X para luego retirar el PBS. Se tripsinizaron agregando 2 ml de tripsina 0.3%, y dejándolas 5 minutos a 37°C. Se agregaron 5 ml de medio de cultivo o PBS para inactivar la tripsina. Se recolectaron las células con pipeta esteril y se depositó la suspensión celular en tubos falcon de 15 ml. Se centrifugaron 5 minutos a 1500-2000 rpm. Y se eliminó el sobrenadante. Se agregó 100  $\mu$ l de buffer RIPA al pellet de células, mezclando bien con pipeta. Se dejó el pellet celular con RIPA en hielo por 30 minutos para luego centrifugar el pellet de células por 30 minutos a 14.000 rpm. hasta obtener el sobrenadante.

**Electroforesis:** A 50  $\mu$ g de proteínas del extracto celular se adicionó buffer de carga y se llevó a 95°C por 5 minutos para denaturar las proteínas, y luego se cargó en los pocillos de gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) al 12%. Las proteínas se resolvieron a 120 volt por 1 hora 30 minutos. Posteriormente se transfirió a membrana de nitrocelulosa a 300

mA por 1 hora 30 minutos. Se comprobó el éxito de la transferencia tiñendo con rojo ponceau.

**Western Blot:** Para bloquear la membrana se utilizó 5% de leche descremada en TBS-T por 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Se trató la membrana con el anticuerpo primario anti-GST M2-2 (policlonal “rabbit” dilución 1:100), anti-actina policlonal “rabbit” (dilución 1:1000, Sigma Aldrich, Cat. # A2668-2ML) a 4° C “over night” con agitación. Se lavó la membrana 3 veces con TBS-T, cinco minutos cada vez en agitación. Se aplicó el anticuerpo secundario anti-rabbit IgG-HRP (dilución 1:2000; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Cat. # sc-2034), acoplado a peroxidasa, por 1 hora 30 minutos a temperatura ambiente en agitación. Se lavó la membrana 3 veces con TBS-T, cinco minutos cada vez en agitación y al término de la incubación, se detectó GSTM2-2 y actina mediante quimioluminiscencia. En todos los casos la reacción de quimioluminiscencia se realizó utilizando el kit ECL. Las intensidades de las bandas resultantes se cuantificaron por densitometría utilizando el software ImageJ. Los resultados se expresaron como la razón de los pixeles detectados de proteína GSTM2-2/actina.

**Medición de Actividad enzimática:** Para medir actividad enzimática de las GST se realizó un ensayo utilizando aminocromo como sustrato, donde se registra la conjugación de GSH a aminocromo catalizada por GST, monitoreando la disminución de la absorbancia a 475nm. Para los cálculos de actividad se utiliza un coeficiente de extinción de  $3058 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Las reacciones de medición de actividad se llevaron a cabo en tampón fosfato 0,1M pH 6.5, con una concentración de GSH 1mM y CDNB 1mM o aminocromo 100  $\mu\text{M}$ . La reacción se inició por la adición de 50  $\mu\text{g}$  de proteína del extracto celular.

**Actividad enzimática de los medios condicionados:** Se recolectaron alrededor de 8 ml de medio desde la placa de cultivo, se centrifugó para remover restos celulares, y la totalidad del volumen recogido se adicionó a un tubo Falcon 25ml conteniendo 1ml de resina agarosa-GSH, para someterla a un proceso de purificación según la metodología descrita por el fabricante. El volumen final recogido, que ya contiene GSH, es de 1ml y se utilizaron

50 µl para el ensayo de actividad enzimática con aminocromo 100 µM. La reacción se efectuó en tampón fosfato 0,1M pH 6,5.

**Síntesis de aminocromo radiactivo:** Se utiliza [2,5,6-<sup>3</sup>H]-Dopamina (TRK284, actividad específica 8.5 Ci/mmol, Amersham Biosciences Limited, UK) a una concentración final 50nM y Dopamina fría a concentración final 5mM, para generar aminocromo tritiado (<sup>3</sup>H-AM) según la metodología establecida (Arriagada et al 2004).

**Captación de <sup>3</sup>H-AM:** Las células U373MG mantenidas en cultivo en medio RPMI-1640 suplementado, se tripsinizaron, se lavaron con PBS y se resuspendieron en 500µl de Buffer Hank a 37°C (10 mM HEPES, 130 mM NaCl, 1.3 mM KCl, 2.2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.2 mM H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10mM glucosa, pH 7.4) conteniendo una concentración final de <sup>3</sup>H-AM de 50µM. Bajo estas condiciones, las células son mantenidas por periodos de entre 5-120 minutos a 37°C. Transcurrido el tiempo correspondiente, las células se centrifugaron 5 minutos a 3000 x g, y se lavaron con 1 ml de buffer Hank frio. La suspensión de células se centrifugó y lavó 3 veces para asegurar la remoción del <sup>3</sup>H-AM extracelular. Se estimuló la lisis de las células con 0.5 ml de 1% Tritón X-100, y luego de 15 minutos de incubación, 400 µl se removieron para análisis en contador de centelleo y 100µl se utilizaron para determinación de proteínas. Como control se utilizan muestras a 0°C, valor que se resta de la captación. Las desintegraciones por minuto (dpm) se convierten en pmol/mg utilizando la actividad específica 8.5 Ci/mmol y considerando 1 mCi = 2.22 x 10<sup>9</sup> dpm y los mg de proteína presentes en la reacción.

**Eflujo de especies radiactivas:** Las células U373MG se incubaron en Buffer con <sup>3</sup>H-AM durante 40 minutos a 37°C, y luego se lavaron cinco veces con buffer Hank frio para remover la mayor cantidad de radiactividad extracelular. Posterior a los cinco lavados, el sobrenadante obtenido de las células se resuspendió en 500µl de Buffer Hank y se centrifugó 5 minutos a 3000 x g, considerándose este ensayo como el tiempo cero. Para los experimentos de eflujo a 20 minutos y 40 minutos, luego de los cinco lavados, se resuspendió el sobrenadante en 500µl de Buffer Hank y se mantuvo a 37°C, luego de transcurrido el tiempo deseado, las células se centrifugan 5 minutos a 3000 x g, y el

sobrenadante se utilizó para evaluación de radiactividad en centelleo líquido y el pellet celular se utilizó para la determinación de proteínas totales. Para los experimentos de inhibición de la captación, se utilizó 2µM de nomifensina o 100µM de Imipramina en el Buffer que tiene <sup>3</sup>H-AM. En los experimentos donde se usa Dopamina fría para inhibir, el pellet celular se incubó durante 5 minutos en 1 ml de solución 2mM de Dopamina, luego las células se lavaron, se centrifugaron y finalmente se agregó el Buffer que contiene <sup>3</sup>H-AM.

**Determinación de GSTM2-2 en medios de cultivo:** Se cultivaron células U373MG o células U373GST, durante 3 horas, en medio RPMI-1640 (HyClone Cat. # SH30011.04) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 1% de aminoácidos no esenciales, 1% de piruvato de sodio, 1% de HEPES y con antibióticos Penicilina G Sodio (10U/ml) y antimicótico estreptomina sulfato (10U/ml), en estufa de cultivo con 5% de CO<sub>2</sub> y a 37° C, en presencia o ausencia de aminocromo 50 µM, en placas de vidrio de 10cm. Luego de las 3 horas, las células son lavadas con PBS y se agrega medio nuevo RPMI-1640 y se mantienen en estufa a 5% CO<sub>2</sub> a 37°C por 24 horas. Transcurridas las 24 horas, se recoge la totalidad del medio condicionado y se filtra a través de filtro 0.2 µm, obteniéndose aproximadamente 8 ml. La totalidad de medio condicionado se purifica utilizando esferas de agarosa-glutación Thermo Scientific (Pierce Chemical Company, Rockford, IL, USA, Cat. #16100), según las recomendaciones del fabricante, con la finalidad de obtener una fracción rica en proteínas GST.

**Obtención de concentrado rico en GST:** Se centrifugó un ml de resina de agarosa-glutación en un tubo Falcon de 15ml a 700 x g durante 2 minutos a temperatura ambiente para descartar el buffer de almacenamiento. Las esferas obtenidas se resuspendieron en 10 volúmenes de buffer de Equilibrio/lavado (BEL) (50mM Tris, 150mM NaCl, pH 8.0) y se mezcló hasta obtener una suspensión homogénea, luego se centrifugó 2 minutos a 700 x g. Para obtener un concentrado rico en proteína GST, 8 ml de medio condicionado (de células U373MG o U373GST) se incubaron junto a las esferas de agarosa-glutación obtenidas del paso anterior, mas 1 ml de BEL 10X, para obtener 10 ml totales. El tubo con la mezcla se deja en agitación suave durante 2 horas a temperatura ambiente, transcurrido el tiempo se

centrifuga 2 minutos a 700 x g y se descarta el sobrenadante. Para lavarlas se les agregó 5 volúmenes de BEL y posteriormente se centrifugó 2 minutos a 700 x g, procedimiento que se repite 3 veces. Para eluir las proteínas GST de las esferas, se resuspendió en un volumen (1 ml) de buffer de elución (50mM Tris, 150mM NaCl, pH 8.0 que contiene 10mM glutatión reducido) mezclando suavemente por un par de minutos, luego se centrifugó 2 minutos a 700 x g. El sobrenadante obtenido (1 ml) es rico en proteínas GST, y de él se utilizan 25 µl para ensayos de western blot.

**Incorporación de  $^{14}\text{C}$ -GSTM2 en células SH-SY5Y:** Células U373MG se cultivaron en medio habitual conteniendo 2 µCi de L-leucina marcada con  $^{14}\text{C}$ , durante 1 hora. Las células se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con medio normal con 50 µM de Aminocromo por 3 horas. Posteriormente se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con medio normal por 24 horas. Células SH-SY5Y se incubaron con 1 ml del medio condicionado proveniente de las células U373MG y 1 ml de medio de células SH-SY5Y normal por 5 horas. Las células se lavaron 3 veces con PBS y se centrifugaron a 2000 rpm. A una parte del extracto celular se le adicionó la solución de centelleo, y la radiactividad se determinó en contador de centelleo líquido. Un antisuero anti\_GSTM2-2 se agregó al cultivo de 24 horas para bloquear la incorporación de  $^{14}\text{C}$ -GSTM2-2 en células SH-SY5Y.

**Medios condicionados de células U373MG (MC):** Células U373MG, luego de ser tratadas 3 horas con 50 µM de aminocromo, se lavaron con PBS y se cultivaron 24 horas con RPMI 1640 fresco completo. Este medio se recoge y es el que se utiliza para los experimentos de protección. Para medir la actividad enzimática y la cantidad de proteínas, los medios de cultivo y medios condicionados de U373MG y U373GST, tratados o no tratados con aminocromo, se purifican en contacto con agarosa-GSH, según las recomendaciones del fabricante (Pierce® Glutathione Agarose, Thermo), obteniéndose un volumen final concentrado de 800 µL. Para Western Blot se utilizan 20 µL y se corrige por



la cantidad de actina del lisado celular correspondiente, y para actividad enzimática se utilizan 50  $\mu\text{L}$ , y se corrige de la misma manera.

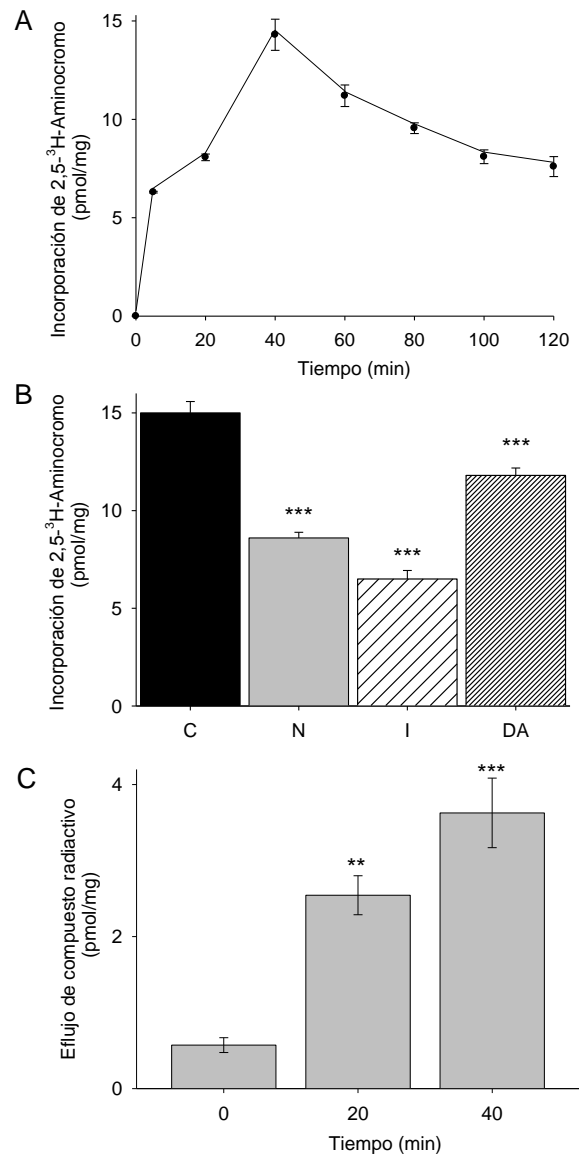
**Protección de SHSY5Y con MC:** Células SHSY5Y se cultivaron en placas de 24 pocillos y se incubaron con 250  $\mu\text{L}$  de DMEM/F-12 y 250  $\mu\text{L}$  del medio condicionado de astrocitos, en presencia de una concentración 10 $\mu\text{M}$  de Aminocromo.

**Marcaje fluorescente de GSTM2-2:** Se disuelve proteína recombinante GSTM2-2 a una concentración 5mg/mL en buffer bicarbonato de sodio 0.1M pH 9.0. Se preparó una solución de Oregon Green (OG) (Life Technologies CN:O-6147) en DMSO (concentración 10mg/mL en volumen final 0.5 mL) y se agregó 100 $\mu\text{L}$  de esta solución de OG a la solución de proteína recombinante en agitación, se incubó 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Posteriormente la mezcla se pasó por una columna Sephadex G-25 para eliminar el colorante libre. Como control se utilizó el mismo procedimiento utilizando la proteína Albumina (BSA). Se adicionó a cultivos de células SH-SY5Y proteínas marcadas a una concentración 200 ng y se incubó por 3 horas en estufa a 37° y 5%  $\text{CO}_2$ .

## VI. Resultados

### 1. Incorporación de aminocromo en células U373MG

Las células de glioblastoma U373MG expresan constitutivamente la enzima GSTM2-2 y captan dopamina (Huenchuguala et al 2014). La incorporación de aminocromo en células U373MG se determinó incubando estas células con 50  $\mu\text{M}$  2,5- $^3\text{H}$ -aminocromo durante diferentes periodos de tiempo. La incorporación de 2,5- $^3\text{H}$ -aminocromo alcanza un máximo a los 40 minutos del experimento ( $14.3 \pm 0.8$  pmol / mg), para disminuir a partir de los 60 minutos, aunque luego de 120 minutos, la incorporación de aminocromo ( $7.6 \pm 0.5$  pmol / mg) es aún mayor que a los 5 minutos ( $6.3 \pm 0.4$  pmol/mg; Fig 4A). La incorporación de 2,5- $^3\text{H}$ -aminocromo a los 40 minutos ( $14.0 \pm 0.6$  pmol / mg) es inhibida un 39% al incubar con 2  $\mu\text{M}$  nomifensina ( $8.6 \pm 0.3$  pmol /mg;  $P < 0.001$ ), al igual que con 100  $\mu\text{M}$  imipramina, en donde se inhibe un 54% ( $6.5 \pm 0.4$  pmol/ mg;  $P < 0.001$ ) y con 2 mM dopamina, en donde se consigue una inhibición de 16% ( $11.8 \pm 0.4$  pmol / mg;  $P < 0.001$ ; Fig.4B). Considerando que compuestos conjugados a GSH son exportados al exterior de las células como mecanismo de excreción (Ballatori et al 2005; Hoffmann & Kroemer 2004), esperamos que luego de la incorporación de 2,5- $^3\text{H}$ -aminocromo se genere un conjugado  $^3\text{H}$ -aminocromo-GSH o algún derivado del Aminocromo conjugado a GSH que podría ser detectado en el extracelular, por ello se midió el eflujo de radiactividad en células U373MG tratadas por 40 minutos con 2,5- $^3\text{H}$ -aminocromo. Se registra una radiactividad basal equivalente a  $0.57 \pm 0.09$  pmol / mg de proteína, la que aumenta significativamente luego de 20 minutos a  $2.54 \pm 0.3$  pmol / mg ( $P < 0.0$ ) y a los 40 minutos es  $3.6 \pm 0.5$  pmol/ mg; ( $P < 0.001$ ; Fig. 4C). La naturaleza exacta del compuesto radiactivo generado no se ha determinado.

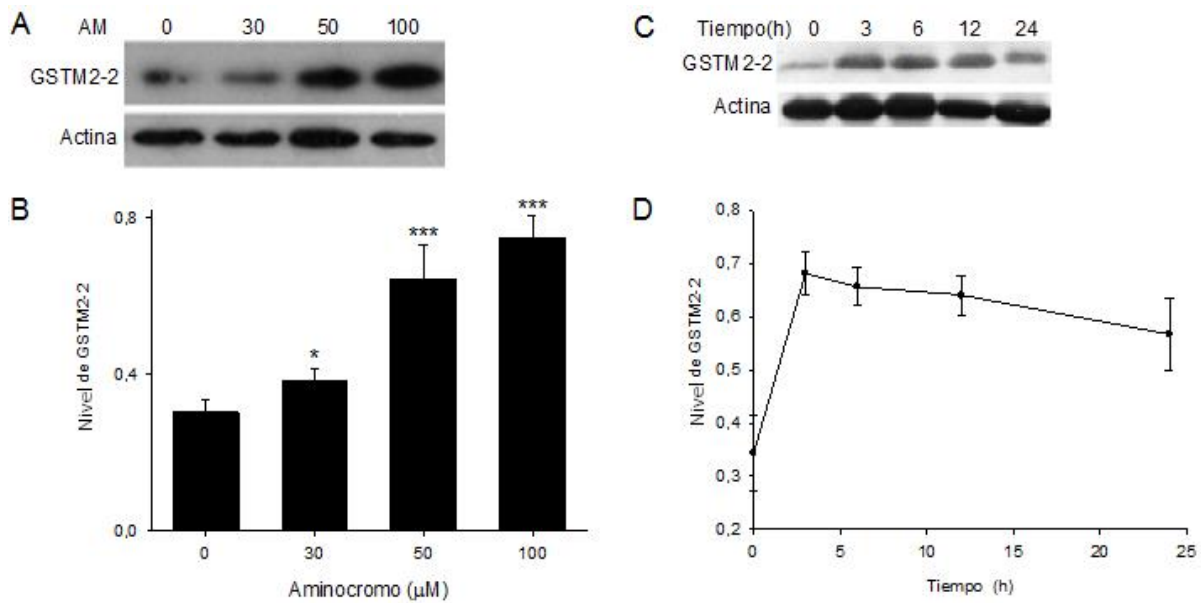


**Figura 4, Incorporación de aminocromo a células U373MG,** (A) La incorporación de 2,5-<sup>3</sup>H-aminocromo a las células U373MG aumenta durante los primeros 40 minutos del experimento, seguido por una disminución paulatina. (B) La incorporación de aminocromo a las células U373MG es inhibida por 2 μM nomifensina (N), 100 μM imipramina (I) y 2 mM dopamina (DA). (C) El eflujo o liberación de un compuesto radiactivo desde las células U373MG aumenta en el tiempo, (Los valores son promedios ± SD (n= 3), \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001)

## 2. Aumento de la expresión de la enzima GST M2-2

La expresión de GST M2-2 en células U373MG puede ser aumentada por tratamiento con aminocromo de manera dependiente de la concentración. La incubación de células U373MG con concentraciones crecientes de aminocromo (0, 30, 50 y 100  $\mu\text{M}$ ) aumentó la cantidad de proteína GST M2-2 2.1 veces el nivel basal luego del tratamiento con una concentración de 100  $\mu\text{M}$  aminocromo por 3 horas ( $P < 0.001$ ; Fig 5A y B), determinado tras el análisis de Western blot.

El aumento en la expresión de la enzima GST M2-2 es transitorio, como se observa a tiempos 0, 3, 6, 12 y 24 horas, a una concentración de aminocromo de 50  $\mu\text{M}$  (Fig. 5C), mostrando una inducción evidente a las 3 horas, seguida de una disminución progresiva; sin embargo permanecen elevados en relación a la cantidad basal de GST M2-2 (Fig. 5D). Cabe señalar que utilizando una concentración de 100  $\mu\text{M}$  de aminocromo por más de 6 horas, se observa una baja en la expresión de la proteína, atribuible a la pérdida de viabilidad celular.

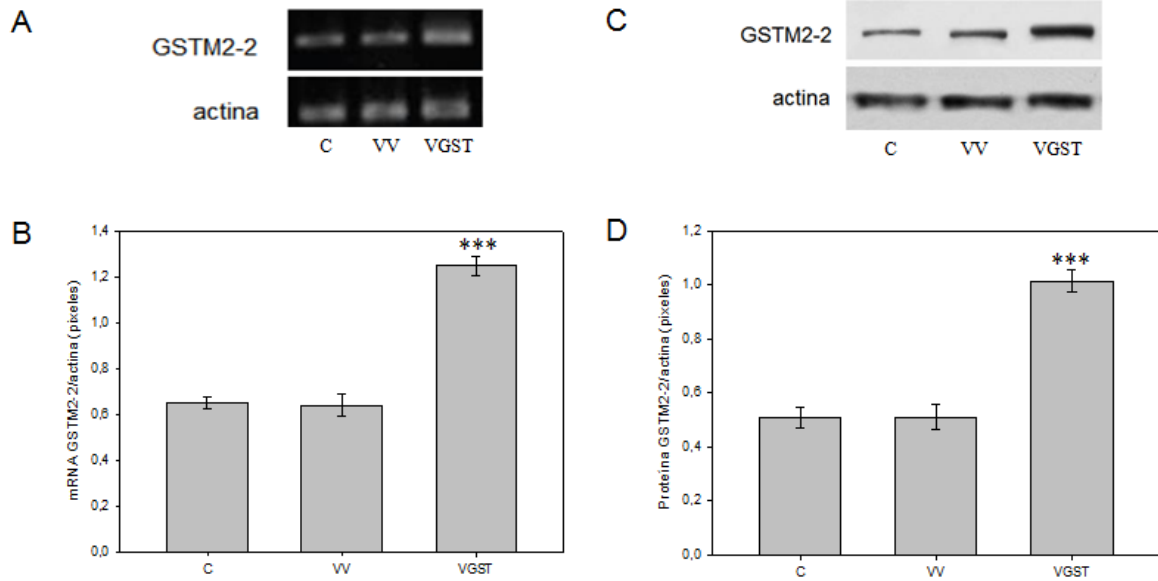


**Figura 5, Aumento de GST M2-2 en células U373MGs,** (A) Aminocromo produce el aumento en la expresión de la enzima GST M2-2 en células U373MG de manera dependiente de la concentración. La expresión se determinó utilizando Western blot y la cuantificación de pixeles se grafica en (B) expresada en pixeles de GST M2-2 / actina. La inducción de GST M2-2 se midió a los tiempos 0, 3, 6, 12 y 24 h (C). La cuantificación de los western blot se grafica en (D). El análisis estadístico se realizó utilizando análisis de varianza (ANOVA) para múltiples comparaciones, (Los valores son promedios  $\pm$  SD (n= 5, \*P<0,05; \*\*\*P<0,001).

### 3. Protección de células U373MG por la enzima GSTM2-2

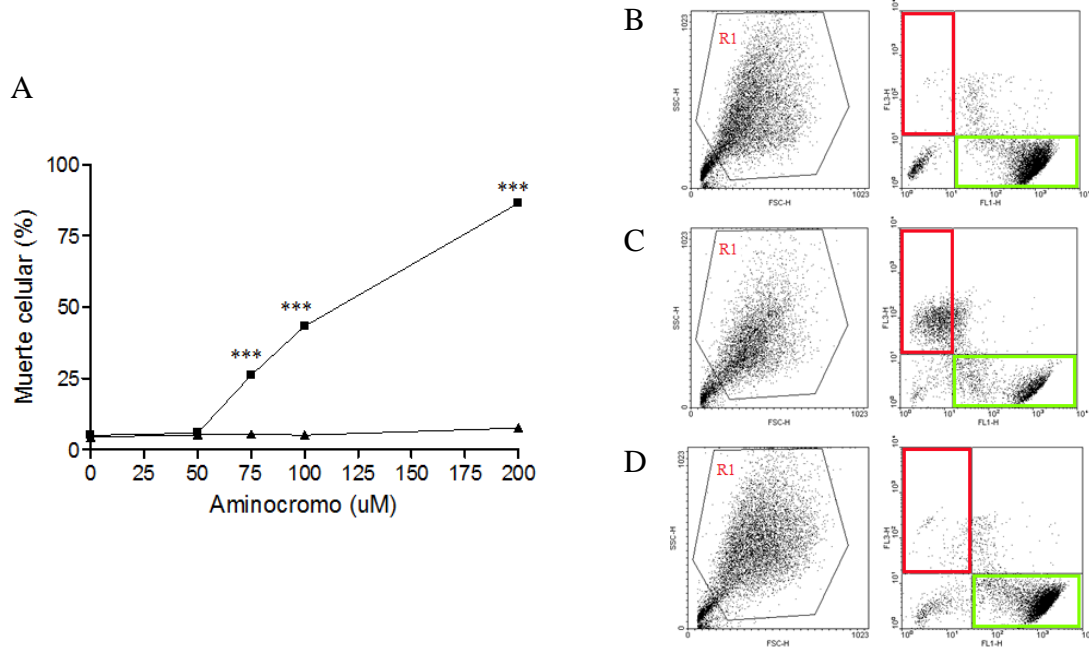
Si bien hemos comprobado que las células U373MG poseen expresión constitutiva de la enzima GSTM2-2 y que esta expresión se incrementa por la exposición de las células a diferentes concentraciones de aminocromo o durante periodos de tiempo diferentes, es de particular interés estudiar que la expresión de la enzima confiere a las células U373MG protección ante la toxina aminocromo. Con el objetivo de observar, en células, que la enzima GSTM2-2 es capaz de detoxificar de la toxina aminocromo, se ha establecido una línea celular que sobreexpresa la enzima GSTM2-2 humana (U373GST), a partir de células U373MG de astrocitoma humano. En la figura 6 se muestra que las células U373GST presentan  $92.5 \pm 6.47$  % más cantidad de RNA que las células U373MG o las transducidas con el vector vacío (Fig. 6A y 6B), así mismo, la expresión de la proteína GSTM2-2 alcanza cerca de un  $96.4 \pm 6.93$  % más de expresión, en relación al control con el vector vacío y la línea celular sin intervenir (Fig. 6C y 6D). Las células U373MG y U373GST son expuestas a concentraciones crecientes de aminocromo durante 24 horas, y mediante citometría de flujo se midió la muerte celular inducida por esta toxina. Como se puede observar en la figura 7, las células U373MG son resistentes en cultivo hasta una concentración de  $50\mu\text{M}$  de aminocromo mientras que a concentraciones superiores de aminocromo se observa un aumento en la muerte celular. En la citometría, se puede observar que las células sin tratamiento (Fig. 7B) se ubican en la zona FL1 correspondiente a las células vivas, mientras que tras el tratamiento con  $100\mu\text{M}$  de Aminocromo parte de la población se ubica en la zona FL3 correspondiente a células muertas (Fig. 7C). Las células U373GST no presentan diferencia significativa en la viabilidad en todas las concentraciones de aminocromo usadas en el experimento, y en la citometria se observa

que estas células tratadas con 100  $\mu\text{M}$  de Aminocromo presentan prácticamente una población en FL1 equivalente al control (Fig. 7D) y a 200  $\mu\text{M}$  la muerte alcanza el  $7.62 \pm 1.29 \%$ , demostrando que la enzima GSTM2-2 es capaz de proteger a las células incluso a concentración elevadas de aminocromo.



**Figura 6, Caracterización de las células U373GST.** A) La cantidad de mRNA aumenta en las células que poseen el vector que lleva el cDNA de la enzima GSTM2-2 (VGST), en relación a las células normales U373MG (C) y células transducidas con un vector vacío (VV), la cuantificación de los geles de agarosa se muestra en B) como pixeles de GST M2-2 / actina. C) muestra western blot representativo en donde se observa aumento de proteína GSTM2-2 en células U373GST, cuya cuantificación promedio se muestra en D). Los valores son promedios  $\pm$  SD (n= 5) y la significancia estadística fue determinada por T student, (\*\*\*) $P < 0,001$ ).

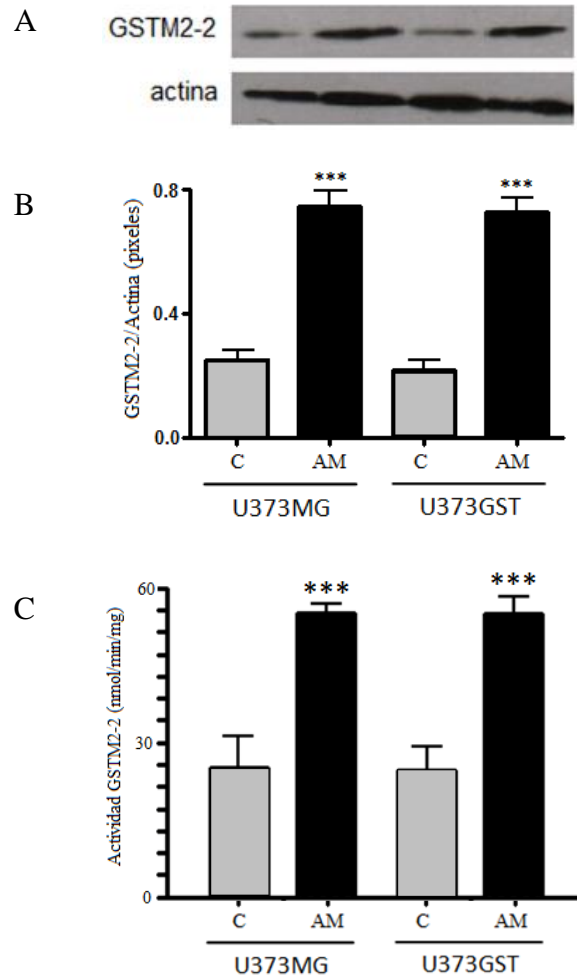




**Figura 7, Efectos del aminocromo en la muerte celular de células U373MG y U373GST.** Las células que sobreexpresan la enzima (U373GST) son resistentes a la toxicidad inducida por aminocromo a las concentraciones de 75, 100 y 200  $\mu\text{M}$  ( $P < 0.001$ ), durante 24 horas de exposición, y no se observa muerte celular significativa ( $\blacktriangle$ ) en comparación a la muerte celular de las células U373MG ( $\blacksquare$ ) (A). Grafico de citometria representativo para células U373MG controles sin tratamiento (B), células U373MG tratadas con 100  $\mu\text{M}$  de Aminocromo (C) y células U373GST tratadas con 100  $\mu\text{M}$  de Aminocromo (D), indicándose como R1 la población seleccionada. Los valores indican el promedio  $\pm$  SD ( $n = 6$ ) y la significancia estadística se determinó usando análisis de varianza (ANOVA) para múltiples comparaciones, (\*\*\*) $P < 0,001$ .

#### 4. Liberación de GSTM2-2 desde las células U373MG

Se ha reportado que los astrocitos de ratón secretan al medio de cultivo una gran cantidad de proteínas (Choi et al 2014; Dowell et al 2009), incluyendo superóxido dismutasa y tioredoxina peroxidasa (Lafon-Cazal et al 2003) estableciéndose la posibilidad de si las células U373MG podían liberar GST M2-2 al medio de cultivo. Se evaluó la cantidad de enzima GST M2-2 en medios de cultivo de células U373MG, los que se concentraron haciendolos pasar por una columna de afinidad agarosa-GSH. Toda proteína GST adsorbida se eluyó con GSH y analizó utilizando western blot, con anticuerpo específico para GST M2-2. El análisis de Western blot reveló la presencia de GST M2-2 en el medio condicionado de células U373MG, que aumentaba de manera significativa cuando las células eran pre tratadas con una concentración 50  $\mu$ M de aminocromo por 3 horas (Fig. 8A). Medimos la actividad enzimática glutatión transferasa en el medio condicionado utilizando aminocromo como sustrato, ya que la actividad de esta enzima con aminocromo excede en varios órdenes de magnitud la actividad de otras GST humanas (Baez et al 1997; Segura-Aguilar et al 1997). El análisis del medio condicionado de células U373MG mantenidas en cultivo durante 24 horas mostró una actividad enzimática de  $25 \pm 4$  nmol /min/mg de proteína, la que aumenta significativamente a  $56 \pm 2$  nmol /min / mg de proteína ( $P < 0.001$ ) en los medios de células U373MG pre tratadas durante 3 horas con aminocromo 50  $\mu$ M (Fig. 8C). También se midió la cantidad de proteína y actividad enzimática GSTM2-2 en los medios condicionados de células U373GST, en presencia o ausencia de aminocromo, pero no se observaron diferencias significativas con respecto a los resultados obtenidos con las células U373MG (Figura 8).

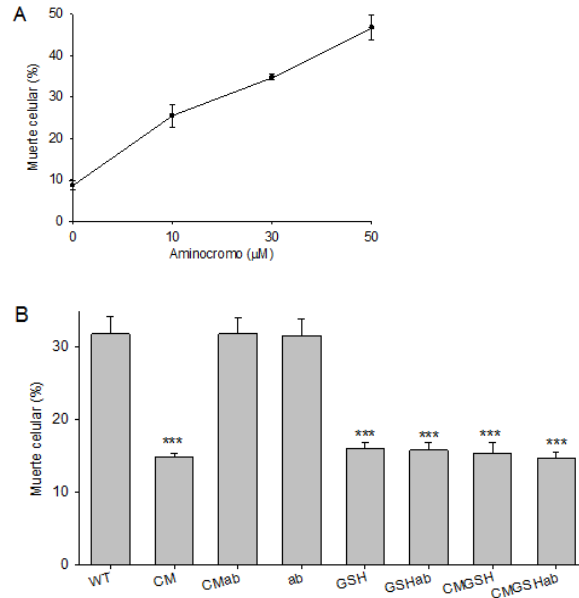


**Figura 8, Liberación de GST M2-2 desde células U373MG a medios de cultivo** A) La liberación de GST M2-2 desde células U373MG fue medida en ausencia (C) y presencia de aminocromo 50  $\mu$ M (AM) durante 3 horas, y la cuantificación del western blot es graficada en B como pixeles de GST M2-2 / actina, C) Un incremento significativo en la actividad enzimática de GST M2-2 se observó en células U373MG tratadas con aminocromo 50  $\mu$ M por 3 horas (AM) en comparación a las células no tratadas (C), la actividad de GST M2-2 se midió utilizando aminocromo 100  $\mu$ M como sustrato en fosfato de sodio 0,1M pH 6,5 a 30 °C como se describe en materiales y métodos. Los valores son promedios  $\pm$  SD (n= 3) y la significancia estadística fue determinada por T student, (\*\*\*)P<0,001).

##### 5. Efecto de medio condicionado de U373MG sobre células SH-SY5Y

Para evaluar el posible rol protector de los medios condicionados de células U373MG sobre células SH-SY5Y, primero determinamos los efectos tóxicos de aminocromo sobre las células SH-SY5Y incubándolas con concentraciones variables de aminocromo. La muerte celular en SH-SY5Y aumenta con la concentración de aminocromo (Fig. 9A). Incubamos células SH-SY5Y con medios condicionados de células U373MG, para determinar el efecto protector de la enzima GST M2-2 secretada al medio condicionado frente a la toxicidad inducida por el aminocromo. Con el fin de aumentar el nivel de enzima GST M2-2 secretada al medio condicionado es que se pre incubaron células U373MG con una concentración de 50  $\mu\text{M}$  de aminocromo por 3 horas antes de cambiar el medio de cultivo e incubar las células por 24 horas. Las células SH-SY5Y incubadas con una concentración de 10  $\mu\text{M}$  de aminocromo por 24 horas mostraron  $31.6 \pm 2.1$  % de muerte celular (Fig. 9B). Sorprendentemente la adición del medio condicionado de las células U373MG a las células SH-SY5Y incubadas con 10  $\mu\text{M}$  de aminocromo, disminuyó la muerte celular de manera significativa hasta  $14.5 \pm 1$  % ( $P < 0.001$ ). Este resultado abre la pregunta de si la protección observada al utilizar el medio condicionado de las células U373MG depende de la enzima GST M2-2 u otro componente del medio, para despejar esta duda se incubaron células SH-SY5Y con 10  $\mu\text{M}$  de aminocromo, medio condicionado de células U373MG y la presencia de un antisuero en contra de GST M2-2, de lo que se esperaba observar que la presencia de anticuerpos contrarrestara los efectos de la GST M2-2 presente en el medio condicionado. En presencia del antisuero, el efecto protector del medio condicionado de células U373MG sobre células SH-SY5Y desapareció, observándose una muerte celular de  $30.3 \pm 2.4$ %, similar a lo observado en ausencia del medio condicionado. Como control se incubaron células SH-SY5Y con 10  $\mu\text{M}$  de aminocromo en presencia de antisuero contra GST M2-2;

1mM GSH; 1 mM GSH y antisuero contra GST M2-2; 1 mM GSH y medio condicionado de células U373MG; o 1 mM GSH, antisuero contra GST M2-2 y medio condicionado de células U373MG. Bajo todas las condiciones la protección fue similar a la observada al utilizar medio condicionado (Fig. 9B).



**Figura 9, Efectos del medio condicionado de células U373MG sobre la muerte de células SH-SY5Y inducida por aminocromo, (A) Aminocromo induce muerte celular dependiente de la concentración sobre células SH-SY5Y. Para 10  $\mu\text{M}$  de concentración, la muerte promedio es de  $26 \pm 3\%$  ( $P < 0.001$ ), para 30  $\mu\text{M}$ , la muerte promedio es  $35 \pm 0.6\%$  ( $P < 0.001$ ), mientras que para 50  $\mu\text{M}$ , la muerte promedio es  $47 \pm 3\%$  ( $P < 0.001$ ). , (B) Una disminución significativa en la muerte de células SH-SY5Y tratadas con 10  $\mu\text{M}$  de aminocromo se observa cuando estas células se incuban en presencia de medio condicionado de células U373MG (CM) pre tratadas con 50  $\mu\text{M}$  de aminocromo por 3 horas, efecto que desaparece en presencia de un antisero contra GST M2-2 (ab), La posible participación de 1 mM GSH (GSH) se determinó incubando junto con el antisero contra GST M2-2 (GSHab); GSH en presencia del medio condicionado de células U373MG (CMGSH) y medio condicionado de U373MG con GSH y antisero contra GST M2-2 (CMGSHab), los valores indican el promedio  $\pm$  SD ( $n = 3$ ) y la significancia estadística se determinó usando análisis de varianza (ANOVA) para múltiples comparaciones, (\*\*\*) $P < 0,001$ ).**

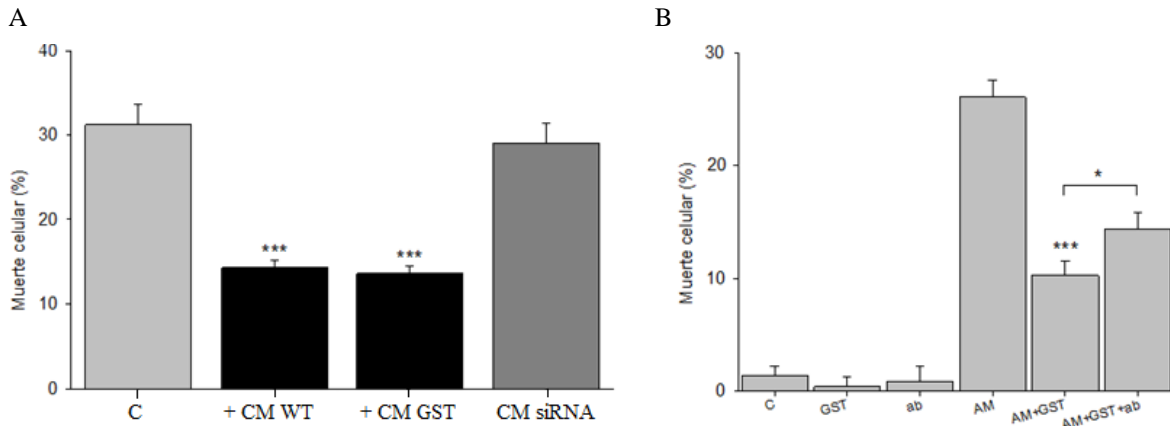
## 6. Efectos de siRNA dirigido al mRNA de GSTM2-2

El resultado anterior muestra el hallazgo de que la enzima GST M2-2 secretada por las células U373MG al medio condicionado, protege células SH-SY5Y de la toxicidad inducida por aminocromo. Para confirmarlo, quisimos probar si el medio condicionado de células U373MGsiGST6, las que expresan siRNA contra el mRNA de GST M2-2 (Huenchuguala et al 2014) también confiere protección a las células SH-SY5Y. El incubar células SH-SY5Y con 10  $\mu\text{M}$  de aminocromo induce  $31 \pm 2$  % de muerte celular, mientras que las células SH-SY5Y incubadas con el medio condicionado de células U373MG pre incubadas con 50  $\mu\text{M}$  de aminocromo durante 3 horas provoca una reducción significativa de la muerte celular hasta un  $14.3 \pm 1$  % ( $P < 0.001$ ). Por el contrario, la incubación de células SH-SY5Y con medio condicionado de células U373MGsiGST6 pre incubadas con 50  $\mu\text{M}$  de aminocromo durante 3 horas no protege de manera significativa a las células SH-SY5Y de la toxicidad inducida por aminocromo (muerte celular  $29 \pm 2$  %; Fig. 10A), presumiblemente debido a que las células U373MGsiGST6 muestran solo 26 % de la expresión normal de GST M2-2, comparadas con células U373MG wild type (Huenchuguala et al 2014). De la misma manera, se determinó la muerte celular utilizando los medios condicionados de las células U373GST, observándose que la protección no es superior a la observada utilizando las células U373MG (Figura 10A)

### 7. Efectos de la enzima recombinante GSTM2-2

El resultado del experimento utilizando medio condicionado de células U373MGsiGST6 confirma la interpretación de que GSTM2-2 liberada al medio por las células U373MG protege a las células SH-SY5Y de la toxicidad inducida por aminocromo. Por consiguiente, esperamos que la incubación de las células SH-SY5Y con GSTM2-2 recombinante pura previniera los efectos tóxicos del aminocromo. La incubación de células SH-SY5Y con 200 ng de GST M2-2 pura protege estas células de la toxicidad inducida por 10  $\mu$ M de aminocromo, puesto que esta toxicidad disminuye de  $26 \pm 1.5\%$  hasta un  $10 \pm 1\%$  del total ( $P < 0.001$ ). Este efecto protector es parcialmente contrarrestado al incluir antisuero contra GST M2-2 al incubar células SH-SY5Y junto a los 200 ng de GST M2-2 pura y 10  $\mu$ M de aminocromo, observándose un aumento significativo en la muerte celular ( $14.4 \pm 1.5\%$ ) con respecto a lo observado en ausencia del antisuero ( $10 \pm 1\%$ ;  $P < 0.05$ ; Fig. 10B).

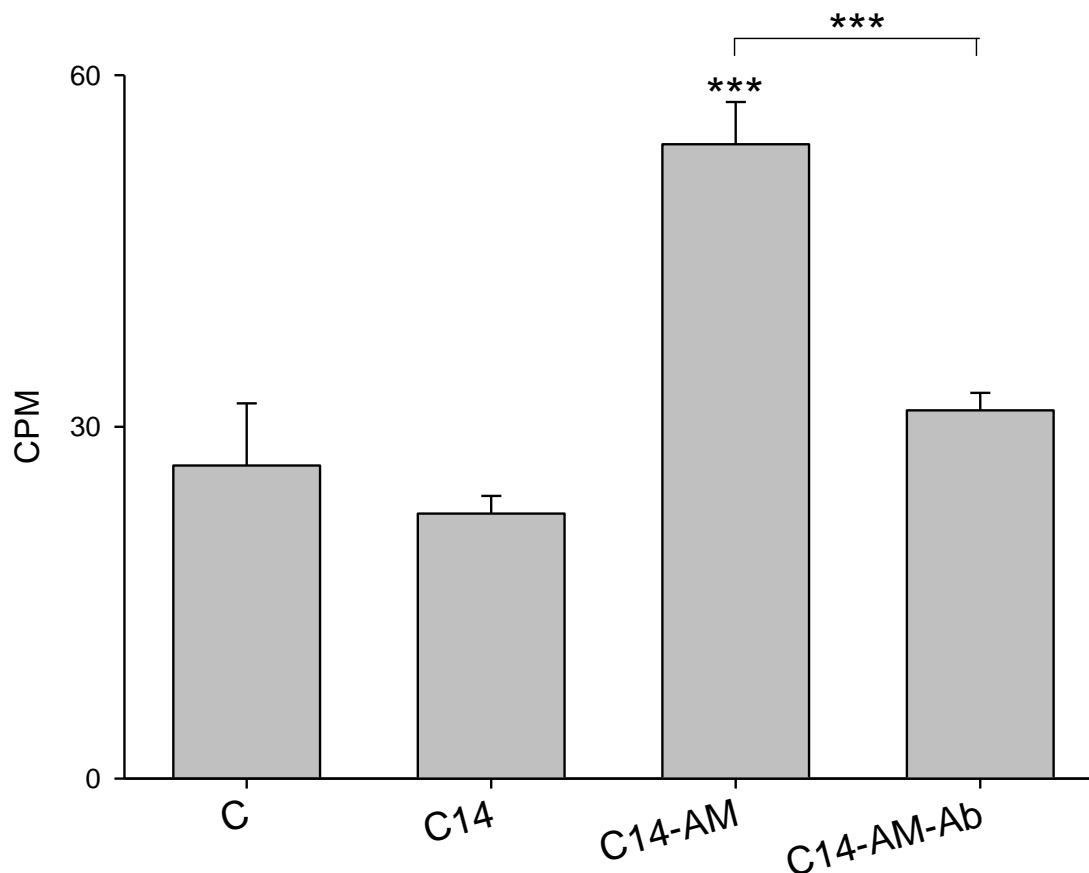




**Figura 10, Protección de GST M2-2 contra la muerte de células SH-SY5Y inducida por aminocromo** (A) Una disminución significativa en la muerte de células SH-SY5Y incubadas con 10  $\mu$ M de aminocromo se observa cuando el medio condicionado de células U373MG (+ CM WT) o U373GST (+ CM GST) se agrega al cultivo, sin embargo, el medio condicionado de células U373MGsiGST6 en las que la expresión de GST M2-2 está fuertemente disminuida, no confiere protección, (B) La incubación de células SH-SY5Y con GST M2-2 recombinante pura disminuye de manera significativa la muerte celular inducida por aminocromo y el antisero contra GST M2-2 disminuye el efecto protector de GSTM2-2 recombinante, los valores indican promedio  $\pm$  SD (n= 3) y la significancia estadística se determinó usando análisis de varianza (ANOVA) para múltiples comparaciones, (\*\*\*) $P < 0,001$ ; \*) $P < 0,05$ ).

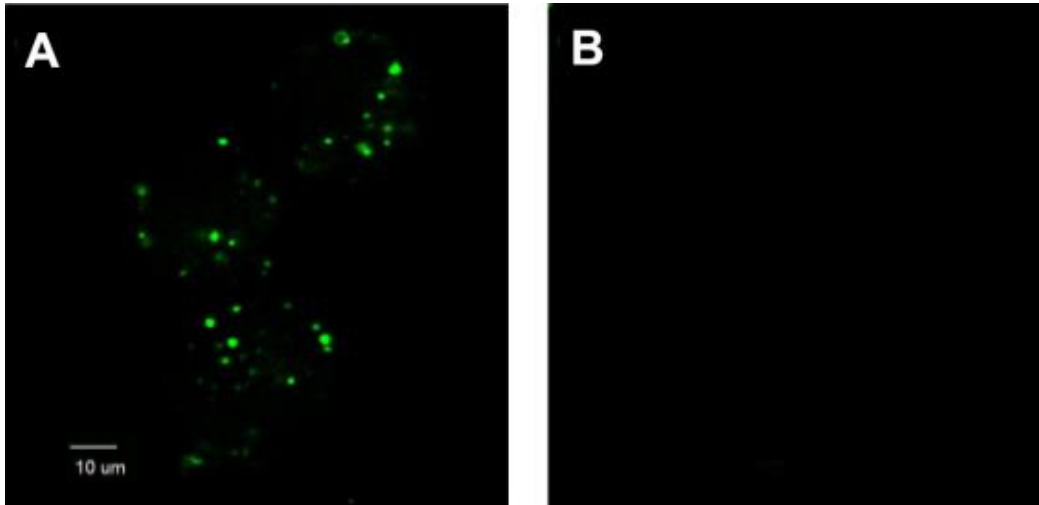
#### 8. Incorporación de $^{14}\text{C}$ -GSTM2-2 a células SH-SY5Y

Para inducir la síntesis de enzima marcada  $^{14}\text{C}$ -GSTM2-2 las células fueron tratadas con 50  $\mu\text{M}$  de aminocromo por 3 horas en presencia de 2  $\mu\text{Ci}$  de  $^{14}\text{C}$ -leucina, aminoácido que constituye aproximadamente al 14% de la proteína. La expresión de GSTM2-2 continuó por 24 horas en ausencia de aminocromo, pero aun con  $^{14}\text{C}$ -leucina para obtener  $^{14}\text{C}$ -GSTM2-2 en el medio condicionado. Las células SH-SY5Y fueron incubadas utilizando iguales volúmenes de medio de cultivo normal y medio condicionado de células U373MG conteniendo  $^{14}\text{C}$ -GSTM2-2 con la finalidad de determinar si GSTM2-2 era internalizada por las células SH-SY5Y. Un aumento significativo en la radiactividad se observó en células SH-SY5Y incubadas con medio condicionado de células U373MG tratadas con  $^{14}\text{C}$ -leucina y 50  $\mu\text{M}$  de aminocromo ( $54.1 \pm 3.6$  cpm;  $P < 0.001$ ), comparado a las células SH-SY5Y incubadas con medio condicionado de células U373MG sin exponer a aminocromo ( $26.7 \pm 5$  cpm) o células SH-SY5Y expuestas al medio condicionado de células U373MG tratadas solo con  $^{14}\text{C}$ -leucina ( $22.6 \pm 1.5$  cpm). Para determinar si la radiactividad incorporada por las células SH-SY5Y era derivada de GSTM2-2, se incubaron células SH-SY5Y con medio condicionado de células U373MG que contenía  $^{14}\text{C}$ -GSTM2-2 y antisuero contra GSTM2-2. Una disminución significativa en la radiactividad ( $31.4 \pm 1.5$  cpm;  $P < 0.001$ ) se observó en las células SH-SY5Y incubadas en presencia de antisuero contra GSTM2-2 (Fig. 11).



**Figura 11, Incorporación de  $^{14}\text{C}$ -GSTM2-2 en células SH-SY5Y.** La incorporación de  $^{14}\text{C}$ -GSTM2-2 en células SH-SY5Y se determinó incubando las células SH-SY5Y con (C) medio condicionado de células U373MG; (C14) medio condicionado de células U373MG incubadas con  $2\ \mu\text{Ci}$   $^{14}\text{C}$ -leucina; (C14-AM) medio condicionado de células U373MG incubadas con  $2\ \mu\text{Ci}$   $^{14}\text{C}$ -leucina y  $50\ \mu\text{M}$  de aminocromo; y (C14-Am-Ab) medio condicionado de células U373MG incubadas con  $2\ \mu\text{Ci}$   $^{14}\text{C}$ -leucina y  $50\ \mu\text{M}$  aminocromo además de antisuero contra GSTM2-2. Los valores son promedio  $\pm$  SD ( $n=3$ ) y la significancia estadística se determinó usando análisis de varianza (ANOVA) para múltiples comparaciones, (\*\*\*) $P < 0,001$ .

Para comprobar que la enzima GSTM2-2 efectivamente ingresa a las células SH-SY5Y, la enzima recombinante GSTM2-2 se incubó con el colorante Oregon Green, para formar un complejo fluorescente (GST-OG), el que se purificó en una columna Sephadex G-25 para eliminar el colorante libre. GST-OG se adicionó a células SH-SY5Y, y se mantuvo en cultivo durante 3 horas para luego detectar la fluorescencia intracelular producto de la incorporación de la proteína, por microscopia. Las células SH-SY5Y tratadas con GST-OG muestran una fluorescencia intracelular que no se observa en las células SH-SY5Y tratadas con un complejo Albumina-Oregon green (A-OG) utilizado como control (Fig. 12), demostrando que la fluorescencia observada es producto de la captación de la proteína GSTM2-2.



**Figura 12, Fluorescencia intracelular de GTSM2-2 en células SH-SY5Y.** Células SH-SY5Y incubadas durante 3 horas con 200 ng de GST-OG, (A) o incubadas durante 3 horas con A-OG (B), lavadas y luego analizadas por microscopia de fluorescencia aumento 10X.

## VII. Discusión.

### 1. Rol protector de GSTM2-2

Hemos propuesto anteriormente que GSTM2-2 tiene un rol protector basándonos en el hecho de que el producto generado al conjugarse GSH con aminocromo, 4-S-glutationil-5,6-dihidroxiindolina, es estable en presencia de agentes oxidantes como el oxígeno, radical superóxido y peróxido de hidrógeno (Segura-Aguilar et al 1997). Además, la 5-glutationil dopamina, producto de la conjugación de GSH con dopamina-o-quinona (Dagnino-Subiabre et al 2000) es el precursor del 5-cisteinil dopamina (Shen et al 1996), producto que ha sido detectado en fluido cefalorraquídeo de pacientes con la enfermedad de Parkinson, así como formando parte de la neuromelanina (Carstam et al 1991; Cheng et al 1996; Rosengren et al 1985). Aminocromo es uno de los mejores sustratos para la enzima GSTM2-2, y esta isoforma es por lejos la isoenzima más activa en la conjugación del aminocromo dentro de la familia de la glutatión-S-transferasa, por ejemplo, GSTM2 es 4774 veces más activa que GST A2-2 y 194 veces más activa que GST M1-1 (Segura-Aguilar et al 1997). Un mecanismo por el cual las células se protegen del daño oxidativo, es por el aumento de la expresión de genes citoprotectores. Bajo condiciones de estrés oxidativo, el factor de transcripción Nrf2 se une al elemento de respuesta antioxidante (ARE) induciendo la expresión de enzimas antioxidantes y de detoxificación de fase II (Calkins et al 2009). Algunos genes que contienen ARE son NQO1 (Wang & Williamson 1994) y GST (Rushmore & Pickett 1990), al igual que enzimas que participan en la síntesis de GSH (Galloway et al 1999). Si bien no hemos comprobado que el tratamiento con Aminocromo aumente Nrf2 nuclear en estas células, creemos que es un mecanismo probable, puesto que existe evidencia que tras el tratamiento con dopamina este factor de

transcripción activa cascadas neuroprotectoras (Shih et al 2007), Existe evidencia *in vivo* e *in vitro*, de que la falta del factor Nrf2 provoca mayor susceptibilidad a la toxicidad inducida por 6-OHDA y MPTP (Jakel et al 2005; Jakel et al 2007). Chen y colaboradores demostraron el 2009 que la activación del factor de transcripción Nrf2 en astrocitos era suficiente para proteger neuronas dopaminérgicas de la toxicidad provocada por inyección de MPTP en ratones (Chen et al 2009). Recientemente se ha propuesto un rol protector para GSTM2-2 en astrocitos, dado que la enzima previene la toxicidad inducida por aminocromo mediada por autofagia y disfunción lisosomal en células U373MG (Huenchuguala et al 2014).

## 2. Astrocitos protegen a neuronas dopaminérgicas

En la presente investigación utilizamos células U373MG como modelo celular de astrocitos, derivadas de un astrocitoma maligno debido a que (i) no fue posible usar cultivos primarios de astrocitos de animales, puesto que GSTM2-2 se expresa solo en células humanas, tampoco fue posible utilizar cultivos primarios derivados de humanos debido a su dificultad de obtención, cultivo y manejo, además la dificultad ética de la obtención de tejido humano necesario; (ii) Las células U373MG poseen una expresión constitutiva de GSTM2-2, tal como se comprobó en cuanto a cantidad de proteína y actividad enzimática (Fig 2 y 3) y como se había reportado recientemente (Huenchuguala et al 2014); (iii) Las células U373MG tienen transportadores de dopamina (Huenchuguala et al 2014), (iv) poseen expresión constitutiva de proteína ácida fibrilar glial (GFAP), que es un marcador de células gliales (Koh et al 2009), (iv) en el laboratorio contábamos con células U373MGsiGST6 que expresan un siRNA contra GSTM2-2 que solo posee el 26%

de la expresión de la enzima comparado con las células normales, y además las células U373GST que sobreexpresan la enzima producen cerca de dos veces de la cantidad normal. Utilizamos células SH-SY5Y diferenciadas como modelo de neuronas dopaminérgicas puesto que poseen propiedades funcionales y bioquímicas de este tipo de neuronas, expresan tirosina hidroxilasa y dopamina- $\beta$ -hidroxilasa, expresan transportador de dopamina (DAT) (Takahashi et al 1994).

Existe abundante evidencia de que los astrocitos poseen la habilidad de proteger neuronas: Astrocitos producen enzimáticamente cisteinil-glicina (CysGly) gracias a su ectoenzima  $\gamma$ -glutamyl transpeptidasa ( $\gamma$ GT) (Taniguchi & Ikeda 1998) y este dipéptido (CysGly) es utilizado eficientemente por neuronas como precursor para la síntesis de GSH (Dringen et al 1999). Tanto en astrocitos de ratón (Dowell et al 2009; Lafon-Cazal et al 2003) como en astrocitos humanos (Choi et al 2014) se han detectado un centenar de proteínas secretadas (secretoma), incluyendo enzimas de naturaleza antioxidante como superóxido dismutasa, peroxiredoxina -1 y -2, además de una enzima GST de clase mu (GST1) (Lafon-Cazal et al 2003). Nuestro resultado con las células U373MG sugiere un rol protector sobre las células dopaminérgicas, debido a que la liberación de GSTM2-2 al medio condicionado por parte de las células U373MG protege de la toxicidad inducida por el aminocromo a las células de tipo neuronal que están en contacto con el medio condicionado. Resulta interesante que la protección entregada por GSTM2-2 secretada por las células U373MG sobre las células SH-SY5Y contra la toxicidad de aminocromo era dependiente de la incorporación de la enzima GSTM2-2 a las células SH-SY5Y. La incorporación de GSTs en células ha sido reportada previamente, como la GST26 de *Schistosoma japonicum* que es eficientemente internalizada en células COS7, HeLa, NIH3T3 y PC12 mediante un mecanismo dependiente de energía que involucra endocitosis (Namiki et al 2003), específicamente



mediante la captación de exosomas, mecanismo que se ha identificado en transporte transcelular de otras proteínas (Bourdonnay et al 2015; Jaworski et al 2014) Proteínas que comparten el plegamiento estructural de GST son internalizadas por diferentes líneas celulares, demostrándose que el dominio C-terminal de las proteínas es responsable de esta internalización, lo que fue demostrado utilizando la GSTM2-2 humana (Morris et al 2011). La posibilidad de que la protección conferida por el medio condicionado de células U373MG sobre las células SH-SY5Y pudiera deberse únicamente a la liberación de GSH se descartó producto de que al incluir el antisuero contra GSTM2-2 se elimina totalmente el efecto protector conseguido por el medio condicionado de U373MG, además el nivel de protección contra la toxicidad de aminocromo en células SH-SY5Y mantiene el mismo nivel al exponerse a medio condicionado de células U373MG en presencia o ausencia de GSH. La presencia de una concentración exógena de 1mM de GSH es suficiente para alcanzar una máxima protección en el experimento. En condiciones en las que no se agrega GSH exógeno la protección por el medio condicionado de U373MG también alcanza un máximo, posiblemente debido a que los astrocitos pueden liberar 2 nmol/hora de GSH al medio de cultivo para otorgar protección a neuronas (Dringen et al 1997), concentración que disminuye en el tiempo. El rol protector de la GSTM2-2 liberada por las células U373MG al medio condicionado sobre las células SH-SY5Y tratadas con aminocromo también es reafirmado por el hecho de que el medio condicionado de células U373MGsiGST6 que expresan un siRNA contra GSTM2-2 no otorga protección significativa a las células SH-SY5Y contra la toxicidad del aminocromo. Resulta llamativo que los medios condicionados de células U373GST que sobreexpresan la enzima no aumenten el grado de protección sobre las células SH-SY5Y (resultado no mostrado), posiblemente por saturación del sistema utilizado para su secreción, mecanismo que

permanece como una incógnita, aunque podría corresponder a una secreción vía exosomas (Denzer et al 2000), mecanismo ya descrito en astrocitos como una vía de intercambio de DNA mitocondrial (Guescini et al ; 2010), y que en los últimos años ha recibido gran atención por ser un mecanismo relacionado a la comunicación glia-neurona (Fruhbeis et al 2012). Por otra parte, la enzima <sup>14</sup>C-GSTM2-2 sintetizada por las células U373MG y posteriormente secretada al medio condicionado fue internalizada por las células SH-SY5Y, confirmando que la protección conferida por los medios condicionados depende de la presencia de GSTM2-2 y la subsecuente internalización de la enzima por parte de las células SH-SY5Y. Este resultado neuroprotector se reprodujo al incluir en los cultivos de células SH-SY5Y la proteína recombinante GSTM2-2 en ausencia de GSH, efecto que era revertido al agregar antisuero contra GSTM2-2, confirmando la importancia de la secreción de la enzima al medio de cultivo como factor neuroprotector.

El proceso de degeneración en la enfermedad de Parkinson se inicia mucho tiempo antes de la pérdida significativa de neuronas dopaminérgicas que contienen neuromelanina, que provocan los síntomas motores (Braak et al 2004), y parece plausible que la pérdida de astrocitos es un evento que puede preceder la degeneración de neuronas dopaminérgicas, puesto que los astrocitos confieren protección a las neuronas liberando diferentes moléculas, incluyendo glutamina y glutamato, sustratos para la síntesis de neurotransmisores, proporcionan energía y precursores para sintetizar GSH (Dringen & Hirrlinger 2003; McKenna 2007; Schousboe et al 2007; Yang et al 2008). La liberación de GSTM2-2 desde las células U373MG al espacio intersináptico, y la captación de la enzima por parte de las células SH-SY5Y, sugieren que GSTM2-2 puede ser liberada por astrocitos para proteger neuronas dopaminérgicas contra la toxicidad inducida por aminocromo, mecanismo que podría ser de gran importancia fisiológica, puesto que proporciona

protección tanto a astrocitos como a neuronas frente a la toxicidad del aminocromo, previniendo la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la enfermedad de Parkinson.

### 3. Oxidación de la dopamina

La dopamina liberada por neuronas dopaminérgicas durante la neurotransmisión al espacio sináptico es reincorporada a la célula por transportadores de dopamina presentes en las neuronas. Sin embargo, células como los astrocitos son capaces de recaptar la dopamina, capturándola del espacio sináptico mediante transportador de dopamina (DAT) (Miyazaki et al 2011), o por otros transportadores expresados en estas células (Huenchuguala et al 2014), lo que significa que esta dopamina eventualmente podría oxidarse al interior de los astrocitos para formar aminocromo, lo que induciría toxicidad. Para caracterizar la captación del Aminocromo por parte de las células, es que se utilizaron bloqueadores de algunos transportadores (DAT, SERT) ya utilizados anteriormente en el laboratorio (Huenchuguala et al 2014), reduciéndose pero no evitándose la incorporación de aminocromo en las células, efecto similar conseguido con un exceso de dopamina, lo que da cuenta de la existencia de varios mecanismos de transporte.

Se ha demostrado que aminocromo es tóxico para las neuronas dopaminérgicas (Arriagada et al 2004; Lozano et al 2010; Munoz et al 2012b; Paris et al 2011; Paris et al 2010) y también para los astrocitos (Huenchuguala et al 2014), aunque resulta evidente que los astrocitos son más resistentes a la toxicidad inducida por aminocromo, puesto que a concentraciones tan altas como 50  $\mu\text{M}$  la muerte observada en los astrocitos no es significativa (Figura 7), mientras que en neuronas la misma concentración provoca la muerte del 50% de las células (Figura 9). La resistencia a la toxicidad radicaría en la presencia de la enzima GSTM2-2, y asociada a esta actividad, la capacidad de eliminar

hacia el medio extracelular los conjugados a GST, puesto que es conocido que astrocitos poseen proteínas MRP1 que participan en la eliminación de este tipo de conjugados (Hirrlinger et al 2001), aunque la naturaleza exacta del conjugado que rastreamos con marcaje radiactivo, se desconoce, pudiendo ser el conjugado aminocromo-glutation o un metabolito derivado de este. La toxicidad inducida por aminocromo en células puede deberse a que: (i) induce y estabiliza la formación de protofibras tóxicas de alfa sinucleína, formando aductos con esta proteína en el motivo 125YEMPS129 (Conway et al 2001; Dibenedetto et al 2013; Munoz et al 2015; Norris et al 2005). Recientemente, se ha reportado que los oligómeros generados por formación de aductos con alfa sinucleína son neurotóxicos cuando se inhibe la enzima DT-diaforasa (Munoz et al 2015); (ii) induciendo disfunción de la degradación de proteínas, interfiriendo el sistema de degradación proteosomal (Zafar et al 2006; Zhou & Lim 2009); y el sistema lisosomal/autofagia (Huenchuguala et al 2014; Munoz et al 2012a); (iii) interfiriendo con la cadena transportadora de electrones, por inhibición del complejo I (Aguirre et al 2012); (iv) inducción de estrés oxidativo durante su reducción con un electrón a radical leucoaminocromo-*o*-semiquinona, especie extremadamente reactiva con oxígeno, lo que genera un ciclo redox aminocromo-leucoaminocromo cuando las flavoenzimas que transfieren un electrón catalizan esta reacción. Este ciclo redox depleta a la célula del NADH necesario para producir ATP en la mitocondria, depleta el NADPH utilizado en reacciones de biosíntesis y depleta de oxígeno, requerido para la producción de ATP, con la formación concomitante de radical superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo (Arriagada et al 2004; Segura-Aguilar & Lind 1989; Segura-Aguilar et al 1998). El aminocromo también afecta el transporte axonal anterógrado de las mitocondrias, al formar aductos con las proteínas  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina, generando agregados anormales que previene la

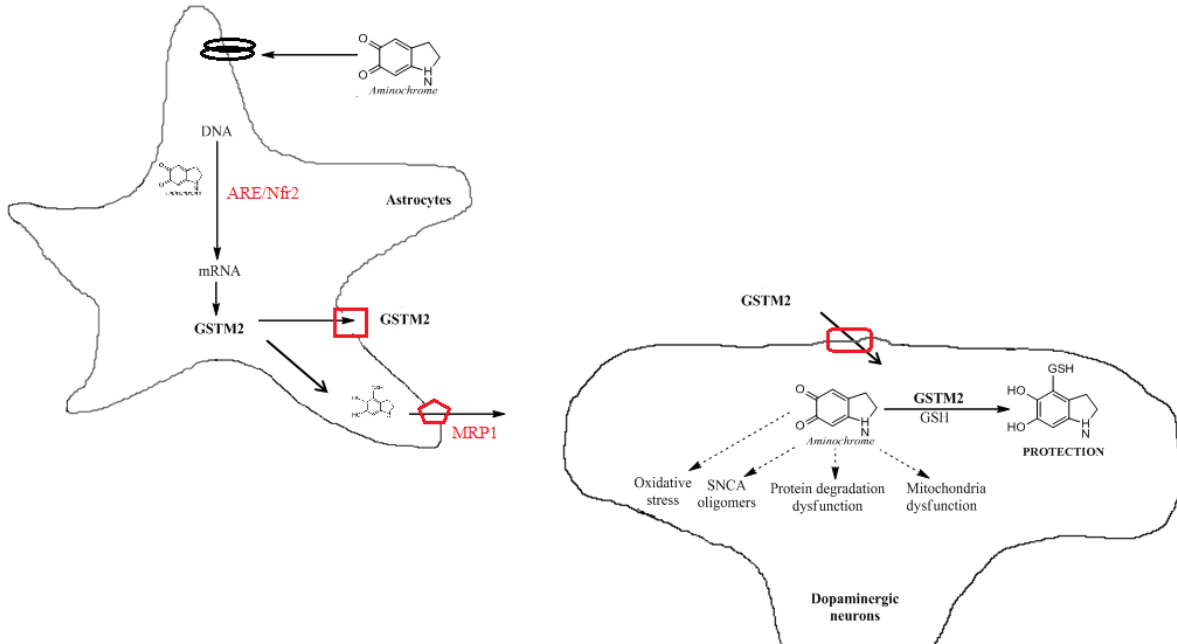
formación de microtúbulos necesarios para el transporte en el axón (Paris et al 2010). La oxidación de la dopamina origina tres *o*-quinonas de manera secuencial, donde a pH fisiológico la dopamina-*o*-quinona sufre una ciclación intramolecular para formar el aminocromo, con una constante de velocidad de  $0.15\text{s}^{-1}$  (Tse et al 1976). El aminocromo se reordena a 5,6-indol quinona con una constante de velocidad de  $0.06\text{ min}^{-1}$  (Bisaglia et al 2007) sugiriendo que es aminocromo la quinona mas estable. Varios reportes indican que la dopamina-*o*-quinona es capaz de formar aductos con proteínas (Van Laar et al 2009), como con los complejos I, III y V de la cadena transportadora de electrones de la mitocondria; con DJ-1, una proteína que protege a las mitocondrias del estrés oxidativo; con UCHL-1, involucrada en el sistema de degradación de proteínas vía proteosoma, ya que hidroliza en enlace péptido-ubiquitina, reciclando monómeros de ubiquitina (Blackinton et al 2009; Canet-Aviles et al 2004; Trempe & Fon 2013; Van Laar et al 2009), además los productos de la oxidación de la dopamina inactivan a Parkina, una E3 ubiquitin ligasa, componente del sistema de degradación de proteínas vía proteosoma (LaVoie et al 2005). La pregunta es si los aductos con las proteínas son formados por la dopamina-*o*-quinona o por aminocromo, debido a la corta vida media de la *o*-quinona.

En neuronas dopaminérgicas la toxicidad inducida por aminocromo puede ser prevenida por la reducción con dos electrones para originar leucoaminocromo (Segura-Aguilar & Lind 1989), evitándose su participación en reacciones que puedan originar neurotoxicidad (Arriagada et al 2004; Huenchuguala et al 2014; Lozano et al 2010; Munoz et al 2015; Paris et al 2011; Paris et al 2010). La formación de leucoaminocromo estabiliza la forma monomérica de alfa sinucleína previniendo la formación de fibras, desde una estructura alfa a una estructura beta (Muñoz et al., 2015). Mientras que en astrocitos, aminocromo y su precursor dopamina-*o*-quinona pueden ser conjugados con GSH por la actividad de

GSTM2-2, para originar 4-S-glutationil-5,6-dihidroxiindolina y 5-glutationil dopamina, evitando los efectos tóxicos de las *o*-quinonas (Baez et al 1997; Segura-Aguilar et al 1997).

### **VIII. Conclusión.**

Los resultados demuestran que la presencia de GSTM2-2 en astrocitos les confiere protección frente a los efectos tóxicos del aminocromo, en un amplio rango de concentraciones. La expresión de GSTM2-2 en astrocitos aumenta en presencia de aminocromo, de una manera dependiente de la concentración y el tiempo de exposición. Queda claro que esta enzima, expresada en células U373MG, puede ser secretada a los medios condicionados, y participar en la protección de células SH-SY5Y contra la toxicidad del aminocromo, gracias a su internalización en las células SH-SY5Y. Este resultado propone un nuevo mecanismo por el que los astrocitos pueden conferir protección a las células dopaminérgicas, pudiendo ser la secreción de la enzima al espacio sináptico y la posterior internalización de la proteína en células neuronales, la manera por la cual puede prevenir la toxicidad inducida por aminocromo. Con estos antecedentes podemos proponer un modelo (Figura 13), en donde aminocromo estimularía el aumento de la GSTM2-2 posiblemente via factor de transcripción Nrf2; su secreción al medio extracelular por mecanismo desconocido (cuadrado en figura), desde donde las células dopaminérgicas podrían captarla por un mecanismo desconocido (rectángulo en figura), de manera de que la enzima ejerza su actividad dentro de estas células.



**Figura 13, Mecanismo propuesto mediante el cual aminocromo provoca el aumento de GSTM2-2 en astrocitos.** Aminocromo provoca el aumento de GSTM2-2 en astrocitos, su secreción al medio extracelular para la posterior internalización en células dopaminérgicas.

## IX. Bibliografía.

- Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E. 2006. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 7:41-53
- Abramovitz M, Ishigaki S, Felix AM, Listowsky I. 1988. Expression of an enzymatically active Yb3 glutathione S-transferase in Escherichia coli and identification of its natural form in rat brain. *J Biol Chem* 263:17627-31
- Aguirre P, Urrutia P, Tapia V, Villa M, Paris I, et al. 2012. The dopamine metabolite aminochrome inhibits mitochondrial complex I and modifies the expression of iron transporters DMT1 and FPN1. *Biometals* 25:795-803
- Allocati N, Favaloro B, Masulli M, Alexeyev MF, Di Ilio C. 2003. Proteus mirabilis glutathione S-transferase B1-1 is involved in protective mechanisms against oxidative and chemical stresses. *Biochem J* 373:305-11
- Armstrong RN. 1997. Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chem Res Toxicol* 10:2-18
- Arriagada C, Paris I, Sanchez de las Matas MJ, Martinez-Alvarado P, Cardenas S, et al. 2004. On the neurotoxicity mechanism of leucoaminochrome o-semiquinone radical derived from dopamine oxidation: mitochondria damage, necrosis, and hydroxyl radical formation. *Neurobiol Dis* 16:468-77
- Asanuma M, Miyazaki I, Ogawa N. 2004. Neuroprotective effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on neurodegenerative diseases. *Curr Pharm Des* 10:695-700
- Aubin N, Curet O, Deffois A, Carter C. 1998. Aspirin and salicylate protect against MPTP-induced dopamine depletion in mice. *J Neurochem* 71:1635-42
- Baez S, Linderson Y, Segura-Aguilar J. 1995. Superoxide dismutase and catalase enhance autoxidation during one-electron reduction of aminochrome by NADPH-cytochrome P-450 reductase. *Biochem Mol Med* 54:12-8
- Baez S, Segura-Aguilar J, Widersten M, Johansson AS, Mannervik B. 1997. Glutathione transferases catalyse the detoxication of oxidized metabolites (o-quinones) of catecholamines and may serve as an antioxidant system preventing degenerative cellular processes. *Biochem J* 324 ( Pt 1):25-8
- Ballatori N, Hammond CL, Cunningham JB, Krance SM, Marchan R. 2005. Molecular mechanisms of reduced glutathione transport: role of the MRP/CFTR/ABCC and OATP/SLC21A families of membrane proteins. *Toxicol Appl Pharmacol* 204:238-55
- Berman SB, Hastings TG. 1999. Dopamine oxidation alters mitochondrial respiration and induces permeability transition in brain mitochondria: implications for Parkinson's disease. *J Neurochem* 73:1127-37
- Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT. 2000. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci* 3:1301-6
- Bindoff LA, Birch-Machin M, Cartledge NE, Parker WD, Jr., Turnbull DM. 1989. Mitochondrial function in Parkinson's disease. *Lancet* 2:49



- Bisaglia M, Mammi S, Bubacco L. 2007. Kinetic and structural analysis of the early oxidation products of dopamine: analysis of the interactions with alpha-synuclein. *J Biol Chem* 282:15597-605
- Blackinton J, Lakshminarasimhan M, Thomas KJ, Ahmad R, Greggio E, et al. 2009. Formation of a stabilized cysteine sulfinic acid is critical for the mitochondrial function of the parkinsonism protein DJ-1. *J Biol Chem* 284:6476-85
- Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, Schaap O, Breedveld GJ, et al. 2003. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science* 299:256-9
- Bourdonnay E, Zaslona Z, Penke LR, Speth JM, Schneider DJ, et al. 2015. Transcellular delivery of vesicular SOCS proteins from macrophages to epithelial cells blunts inflammatory signaling. *J Exp Med* 212:729-42
- Braak H, Ghebremedhin E, Rub U, Bratzke H, Del Tredici K. 2004. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res* 318:121-34
- Calkins MJ, Johnson DA, Townsend JA, Vargas MR, Dowell JA, et al. 2009. The Nrf2/ARE pathway as a potential therapeutic target in neurodegenerative disease. *Antioxid Redox Signal* 11:497-508
- Cammer W, Tansey F, Abramovitz M, Ishigaki S, Listowsky I. 1989. Differential localization of glutathione-S-transferase Yp and Yb subunits in oligodendrocytes and astrocytes of rat brain. *J Neurochem* 52:876-83
- Canet-Aviles RM, Wilson MA, Miller DW, Ahmad R, McLendon C, et al. 2004. The Parkinson's disease protein DJ-1 is neuroprotective due to cysteine-sulfinic acid-driven mitochondrial localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:9103-8
- Carder PJ, Hume R, Fryer AA, Strange RC, Lauder J, Bell JE. 1990. Glutathione S-transferase in human brain. *Neuropathol Appl Neurobiol* 16:293-303
- Carmagnol F, Sinet PM, Jerome H. 1983. Selenium-dependent and non-selenium-dependent glutathione peroxidases in human tissue extracts. *Biochim Biophys Acta* 759:49-57
- Carstam R, Brinck C, Hindemith-Augustsson A, Rorsman H, Rosengren E. 1991. The neuromelanin of the human substantia nigra. *Biochim Biophys Acta* 1097:152-60
- Cassarino DS, Fall CP, Swerdlow RH, Smith TS, Halvorsen EM, et al. 1997. Elevated reactive oxygen species and antioxidant enzyme activities in animal and cellular models of Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta* 1362:77-86
- Castano A, Herrera AJ, Cano J, Machado A. 1998. Lipopolysaccharide intranigral injection induces inflammatory reaction and damage in nigrostriatal dopaminergic system. *J Neurochem* 70:1584-92
- Cohen G, Heikkila RE. 1974. The generation of hydrogen peroxide, superoxide radical, and hydroxyl radical by 6-hydroxydopamine, dialuric acid, and related cytotoxic agents. *J Biol Chem* 249:2447-52
- Conway KA, Lee SJ, Rochet JC, Ding TT, Williamson RE, Lansbury PT, Jr. 2000. Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both alpha-synuclein mutations linked to early-onset Parkinson's disease: implications for pathogenesis and therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:571-6
- Conway KA, Rochet JC, Bieganski RM, Lansbury PT, Jr. 2001. Kinetic stabilization of the alpha-synuclein protofibril by a dopamine-alpha-synuclein adduct. *Science* 294:1346-9

- Corti O, Lesage S, Brice A. 2011. What genetics tells us about the causes and mechanisms of Parkinson's disease. *Physiol Rev* 91:1161-218
- Chen PC, Vargas MR, Pani AK, Smeyne RJ, Johnson DA, et al. 2009. Nrf2-mediated neuroprotection in the MPTP mouse model of Parkinson's disease: Critical role for the astrocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:2933-8
- Cheng FC, Kuo JS, Chia LG, Dryhurst G. 1996. Elevated 5-S-cysteinyldopamine/homovanillic acid ratio and reduced homovanillic acid in cerebrospinal fluid: possible markers for and potential insights into the pathoetiology of Parkinson's disease. *J Neural Transm* 103:433-46
- Choi SS, Lee HJ, Lim I, Satoh J, Kim SU. 2014. Human astrocytes: secretome profiles of cytokines and chemokines. *PLoS One* 9:e92325
- Dabbeni-Sala F, Di Santo S, Franceschini D, Skaper SD, Giusti P. 2001. Melatonin protects against 6-OHDA-induced neurotoxicity in rats: a role for mitochondrial complex I activity. *FASEB J* 15:164-70
- Dagnino-Subiabre A, Cassels BK, Baez S, Johansson AS, Mannervik B, Segura-Aguilar J. 2000. Glutathione transferase M2-2 catalyzes conjugation of dopamine and dopa o-quinones. *Biochem Biophys Res Commun* 274:32-6
- Damier P, Hirsch EC, Agid Y, Graybiel AM. 1999. The substantia nigra of the human brain. II. Patterns of loss of dopamine-containing neurons in Parkinson's disease. *Brain* 122 ( Pt 8):1437-48
- Denzer K, Kleijmeer MJ, Heijnen HF, Stoorvogel W, Geuze HJ. 2000. Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. *J Cell Sci* 113 Pt 19:3365-74
- Dervan AG, Meshul CK, Beales M, McBean GJ, Moore C, et al. 2004. Astroglial plasticity and glutamate function in a chronic mouse model of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 190:145-56
- Diaz-Veliz G, Mora S, Dossi MT, Gomez P, Arriagada C, et al. 2002. Behavioral effects of aminochrome and dopachrome injected in the rat substantia nigra. *Pharmacol Biochem Behav* 73:843-50
- Dibenedetto D, Rossetti G, Caliandro R, Carloni P. 2013. A molecular dynamics simulation-based interpretation of nuclear magnetic resonance multidimensional heteronuclear spectra of alpha-synuclein.dopamine adducts. *Biochemistry* 52:6672-83
- Dick FD, De Palma G, Ahmadi A, Scott NW, Prescott GJ, et al. 2007. Environmental risk factors for Parkinson's disease and parkinsonism: the Geoparkinson study. *Occup Environ Med* 64:666-72
- Dowell JA, Johnson JA, Li L. 2009. Identification of astrocyte secreted proteins with a combination of shotgun proteomics and bioinformatics. *J Proteome Res* 8:4135-43
- Dringen R, Gutterer JM, Hirrlinger J. 2000. Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *Eur J Biochem* 267:4912-6
- Dringen R, Hirrlinger J. 2003. Glutathione pathways in the brain. *Biol Chem* 384:505-16
- Dringen R, Kranich O, Hamprecht B. 1997. The gamma-glutamyl transpeptidase inhibitor acivicin preserves glutathione released by astroglial cells in culture. *Neurochem Res* 22:727-33

- Dringen R, Pfeiffer B, Hamprecht B. 1999. Synthesis of the antioxidant glutathione in neurons: supply by astrocytes of CysGly as precursor for neuronal glutathione. *J Neurosci* 19:562-9
- Drukarch B, Schepens E, Stoof JC, Langeveld CH, Van Muiswinkel FL. 1998. Astrocyte-enhanced neuronal survival is mediated by scavenging of extracellular reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 25:217-20
- Duffy S, So A, Murphy TH. 1998. Activation of endogenous antioxidant defenses in neuronal cells prevents free radical-mediated damage. *J Neurochem* 71:69-77
- Elbaz A, Tranchant C. 2007. Epidemiologic studies of environmental exposures in Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 262:37-44
- Elkon H, Melamed E, Offen D. 2001. 6-Hydroxydopamine increases ubiquitin-conjugates and protein degradation: implications for the pathogenesis of Parkinson's disease. *Cell Mol Neurobiol* 21:771-81
- Emdadul Haque M, Asanuma M, Higashi Y, Miyazaki I, Tanaka K, Ogawa N. 2003. Apoptosis-inducing neurotoxicity of dopamine and its metabolites via reactive quinone generation in neuroblastoma cells. *Biochim Biophys Acta* 1619:39-52
- Ferger B, Teismann P, Earl CD, Kuschinsky K, Oertel WH. 1999. Salicylate protects against MPTP-induced impairments in dopaminergic neurotransmission at the striatal and nigral level in mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 360:256-61
- Foppoli C, Coccia R, Cini C, Rosei MA. 1997. Catecholamines oxidation by xanthine oxidase. *Biochim Biophys Acta* 1334:200-6
- Fornai F, Lenzi P, Gesi M, Ferrucci M, Lazzeri G, et al. 2003. Fine structure and biochemical mechanisms underlying nigrostriatal inclusions and cell death after proteasome inhibition. *J Neurosci* 23:8955-66
- Fruhbeis C, Frohlich D, Kramer-Albers EM. 2012. Emerging roles of exosomes in neuron-glia communication. *Front Physiol* 3:119
- Funayama M, Hasegawa K, Kowa H, Saito M, Tsuji S, Obata F. 2002. A new locus for Parkinson's disease (PARK8) maps to chromosome 12p11.2-q13.1. *Ann Neurol* 51:296-301
- Galloway DC, Blake DG, McLellan LI. 1999. Regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase regulatory subunit (GLCLR) gene expression: identification of the major transcriptional start site in HT29 cells. *Biochim Biophys Acta* 1446:47-56
- Gao HM, Jiang J, Wilson B, Zhang W, Hong JS, Liu B. 2002. Microglial activation-mediated delayed and progressive degeneration of rat nigral dopaminergic neurons: relevance to Parkinson's disease. *J Neurochem* 81:1285-97
- Gilks WP, Abou-Sleiman PM, Gandhi S, Jain S, Singleton A, et al. 2005. A common LRRK2 mutation in idiopathic Parkinson's disease. *Lancet* 365:415-6
- Glinka YY, Youdim MB. 1995. Inhibition of mitochondrial complexes I and IV by 6-hydroxydopamine. *Eur J Pharmacol* 292:329-32
- Good PF, Hsu A, Werner P, Perl DP, Olanow CW. 1998. Protein nitration in Parkinson's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 57:338-42
- Guescini M, Genedani S, Stocchi V, Agnati LF. Astrocytes and Glioblastoma cells release exosomes carrying mtDNA. *J Neural Transm* 117:1-4
- Guescini M, Genedani S, Stocchi V, Agnati LF. 2010. Astrocytes and Glioblastoma cells release exosomes carrying mtDNA. *J Neural Transm* 117:1-4

- Halassa MM, Fellin T, Haydon PG. 2007. The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. *Trends Mol Med* 13:54-63
- Hansson LO, Bolton-Grob R, Widersten M, Mannervik B. 1999. Structural determinants in domain II of human glutathione transferase M2-2 govern the characteristic activities with aminochrome, 2-cyano-1,3-dimethyl-1-nitrosoguanidine, and 1,2-dichloro-4-nitrobenzene. *Protein Sci* 8:2742-50
- Haque ME, Asanuma M, Higashi Y, Miyazaki I, Tanaka K, Ogawa N. 2003. Overexpression of Cu-Zn superoxide dismutase protects neuroblastoma cells against dopamine cytotoxicity accompanied by increase in their glutathione level. *Neurosci Res* 47:31-7
- Hara H, Ohta M, Ohta K, Kuno S, Adachi T. 2003. Increase of antioxidative potential by tert-butylhydroquinone protects against cell death associated with 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress in neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Brain Res Mol Brain Res* 119:125-31
- Hastings TG. 1995. Enzymatic oxidation of dopamine: the role of prostaglandin H synthase. *J Neurochem* 64:919-24
- Hayes JD, McLellan LI. 1999. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic Res* 31:273-300
- Higashi Y, Asanuma M, Miyazaki I, Ogawa N. 2000. Inhibition of tyrosinase reduces cell viability in catecholaminergic neuronal cells. *J Neurochem* 75:1771-4
- Hirrlinger J, König J, Keppler D, Lindenau J, Schulz JB, Dringen R. 2001. The multidrug resistance protein MRP1 mediates the release of glutathione disulfide from rat astrocytes during oxidative stress. *J Neurochem* 76:627-36
- Hoffmann U, Kroemer HK. 2004. The ABC transporters MDR1 and MRP2: multiple functions in disposition of xenobiotics and drug resistance. *Drug Metab Rev* 36:669-701
- Hoglinger GU, Carrard G, Michel PP, Medja F, Lombes A, et al. 2003. Dysfunction of mitochondrial complex I and the proteasome: interactions between two biochemical deficits in a cellular model of Parkinson's disease. *J Neurochem* 86:1297-307
- Huenchuguala S, Munoz P, Zavala P, Villa M, Cuevas C, et al. 2014. Glutathione transferase mu 2 protects glioblastoma cells against aminochrome toxicity by preventing autophagy and lysosome dysfunction. *Autophagy* 10:618-30
- Hunot S, Brugg B, Ricard D, Michel PP, Muriel MP, et al. 1997. Nuclear translocation of NF-kappaB is increased in dopaminergic neurons of patients with parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:7531-6
- Ito J, Nagayasu Y, Lu R, Kheirollah A, Hayashi M, Yokoyama S. 2005. Astrocytes produce and secrete FGF-1, which promotes the production of apoE-HDL in a manner of autocrine action. *J Lipid Res* 46:679-86
- Jakel RJ, Kern JT, Johnson DA, Johnson JA. 2005. Induction of the protective antioxidant response element pathway by 6-hydroxydopamine in vivo and in vitro. *Toxicol Sci* 87:176-86
- Jakel RJ, Townsend JA, Kraft AD, Johnson JA. 2007. Nrf2-mediated protection against 6-hydroxydopamine. *Brain Res* 1144:192-201
- Jaworski E, Narayanan A, Van Duyne R, Shabbeer-Meyering S, Iordanskiy S, et al. 2014. Human T-lymphotropic virus type 1-infected cells secrete exosomes that contain Tax protein. *J Biol Chem* 289:22284-305

- Jin SM, Lazarou M, Wang C, Kane LA, Narendra DP, Youle RJ. 2010. Mitochondrial membrane potential regulates PINK1 import and proteolytic destabilization by PARL. *J Cell Biol* 191:933-42
- Kabuta T, Furuta A, Aoki S, Furuta K, Wada K. 2008. Aberrant interaction between Parkinson disease-associated mutant UCH-L1 and the lysosomal receptor for chaperone-mediated autophagy. *J Biol Chem* 283:23731-8
- Karakaya S, Kipp M, Beyer C. 2007. Oestrogen regulates the expression and function of dopamine transporters in astrocytes of the nigrostriatal system. *J Neuroendocrinol* 19:682-90
- Kazlauskaite A, Muqit MM. PINK1 and Parkin - mitochondrial interplay between phosphorylation and ubiquitylation in Parkinson's disease. *FEBS J*
- Kazlauskaite A, Muqit MM. 2014. PINK1 and Parkin - mitochondrial interplay between phosphorylation and ubiquitylation in Parkinson's disease. *FEBS J* 282:215-23
- Keen JH, Jakoby WB. 1978. Glutathione transferases. Catalysis of nucleophilic reactions of glutathione. *J Biol Chem* 253:5654-7
- Keller JN, Huang FF, Dimayuga ER, Maragos WF. 2000. Dopamine induces proteasome inhibition in neural PC12 cell line. *Free Radic Biol Med* 29:1037-42
- Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, et al. 1998. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 392:605-8
- Knott C, Stern G, Wilkin GP. 2000. Inflammatory regulators in Parkinson's disease: iNOS, lipocortin-1, and cyclooxygenases-1 and -2. *Mol Cell Neurosci* 16:724-39
- Kobayashi M, Itoh K, Suzuki T, Osanai H, Nishikawa K, et al. 2002. Identification of the interactive interface and phylogenic conservation of the Nrf2-Keap1 system. *Genes Cells* 7:807-20
- Koh K, Lee K, Ahn JH, Kim S. 2009. Human cytomegalovirus infection downregulates the expression of glial fibrillary acidic protein in human glioblastoma U373MG cells: identification of viral genes and protein domains involved. *J Gen Virol* 90:954-62
- Korytowski W, Sarna T, Kalyanaraman B, Sealy RC. 1987. Tyrosinase-catalyzed oxidation of dopa and related catechol(amine)s: a kinetic electron spin resonance investigation using spin-stabilization and spin label oximetry. *Biochim Biophys Acta* 924:383-92
- Kruger R, Kuhn W, Muller T, Woitalla D, Graeber M, et al. 1998. Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet* 18:106-8
- Kuhn DM, Arthur RE, Jr., Thomas DM, Elferink LA. 1999. Tyrosine hydroxylase is inactivated by catechol-quinones and converted to a redox-cycling quinoprotein: possible relevance to Parkinson's disease. *J Neurochem* 73:1309-17
- Kurkowska-Jastrzebska I, Wronska A, Kohutnicka M, Czlonkowski A, Czlonkowska A. 1999. The inflammatory reaction following 1-methyl-4-phenyl-1,2,3, 6-tetrahydropyridine intoxication in mouse. *Exp Neurol* 156:50-61
- Lafon-Cazal M, Adjali O, Galeotti N, Poncet J, Jouin P, et al. 2003. Proteomic analysis of astrocytic secretion in the mouse. Comparison with the cerebrospinal fluid proteome. *J Biol Chem* 278:24438-48
- Lai CT, Yu PH. 1997. Dopamine- and L-beta-3,4-dihydroxyphenylalanine hydrochloride (L-Dopa)-induced cytotoxicity towards catecholaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells. Effects of oxidative stress and antioxidative factors. *Biochem Pharmacol* 53:363-72
- LaVoie MJ, Hastings TG. 1999. Peroxynitrite- and nitrite-induced oxidation of dopamine: implications for nitric oxide in dopaminergic cell loss. *J Neurochem* 73:2546-54

- LaVoie MJ, Ostaszewski BL, Weihofen A, Schlossmacher MG, Selkoe DJ. 2005. Dopamine covalently modifies and functionally inactivates parkin. *Nat Med* 11:1214-21
- Lee JM, Anderson PC, Padgitt JK, Hanson JM, Waters CM, Johnson JA. 2003. Nrf2, not the estrogen receptor, mediates catechol estrogen-induced activation of the antioxidant responsive element. *Biochim Biophys Acta* 1629:92-101
- Lizasoain I, Moro MA, Knowles RG, Darley-Usmar V, Moncada S. 1996. Nitric oxide and peroxynitrite exert distinct effects on mitochondrial respiration which are differentially blocked by glutathione or glucose. *Biochem J* 314 ( Pt 3):877-80
- Lozano J, Munoz P, Nore BF, Ledoux S, Segura-Aguilar J. 2010. Stable expression of short interfering RNA for DT-diaphorase induces neurotoxicity. *Chem Res Toxicol* 23:1492-6
- Marnett LJ, Riggins JN, West JD. 2003. Endogenous generation of reactive oxidants and electrophiles and their reactions with DNA and protein. *J Clin Invest* 111:583-93
- Martinez-Vicente M, Talloczy Z, Kaushik S, Massey AC, Mazzulli J, et al. 2008. Dopamine-modified alpha-synuclein blocks chaperone-mediated autophagy. *J Clin Invest* 118:777-88
- Mattammal MB, Strong R, Lakshmi VM, Chung HD, Stephenson AH. 1995. Prostaglandin H synthetase-mediated metabolism of dopamine: implication for Parkinson's disease. *J Neurochem* 64:1645-54
- McGeer PL, Itagaki S, Boyes BE, McGeer EG. 1988. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology* 38:1285-91
- McKenna MC. 2007. The glutamate-glutamine cycle is not stoichiometric: fates of glutamate in brain. *J Neurosci Res* 85:3347-58
- McNaught KS, Bjorklund LM, Belizaire R, Isacson O, Jenner P, Olanow CW. 2002. Proteasome inhibition causes nigral degeneration with inclusion bodies in rats. *Neuroreport* 13:1437-41
- McNaught KS, Olanow CW, Halliwell B, Isacson O, Jenner P. 2001. Failure of the ubiquitin-proteasome system in Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci* 2:589-94
- Meyer M, Schreck R, Baeuerle PA. 1993. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and antioxidants have opposite effects on activation of NF-kappa B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor. *EMBO J* 12:2005-15
- Minelli A, DeBiasi S, Brecha NC, Zuccarello LV, Conti F. 1996. GAT-3, a high-affinity GABA plasma membrane transporter, is localized to astrocytic processes, and it is not confined to the vicinity of GABAergic synapses in the cerebral cortex. *J Neurosci* 16:6255-64
- Miyazaki I, Asanuma M, Kikkawa Y, Takeshima M, Murakami S, et al. 2011. Astrocyte-derived metallothionein protects dopaminergic neurons from dopamine quinone toxicity. *Glia* 59:435-51
- Mizuno Y, Sone N, Saitoh T. 1987. Effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and 1-methyl-4-phenylpyridinium ion on activities of the enzymes in the electron transport system in mouse brain. *J Neurochem* 48:1787-93
- Mohanakumar KP, Muralikrishnan D, Thomas B. 2000. Neuroprotection by sodium salicylate against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3, 6-tetrahydropyridine-induced neurotoxicity. *Brain Res* 864:281-90

- Morris MJ, Liu D, Weaver LM, Board PG, Casarotto MG. 2011. A structural basis for cellular uptake of GST-fold proteins. *PLoS One* 6:e17864
- Munday R, Smith BL, Munday CM. 1998. Effects of butylated hydroxyanisole and dicoumarol on the toxicity of menadione to rats. *Chem Biol Interact* 108:155-70
- Munoz P, Cardenas S, Huenchuguala S, Couve E, Paris I, Segura-Aguilar J. 2015. DT-Diaphorase prevents aminochrome-induced alpha-synuclein oligomer formation and neurotoxicity. *Toxicol Sci* 2012:in press.
- Munoz P, Huenchuguala S, Paris I, Segura-Aguilar J. 2012a. Dopamine oxidation and autophagy. *Parkinsons Dis* 2012:920953
- Munoz P, Paris I, Sanders LH, Greenamyre JT, Segura-Aguilar J. 2012b. Overexpression of VMAT-2 and DT-diaphorase protects substantia nigra-derived cells against aminochrome neurotoxicity. *Biochim Biophys Acta* 1822:1125-36
- Nagatsu T, Mogi M, Ichinose H, Togari A. 2000. Changes in cytokines and neurotrophins in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl*:277-90
- Namiki S, Tomida T, Tanabe M, Iino M, Hirose K. 2003. Intracellular delivery of glutathione S-transferase into mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 305:592-7
- Norris EH, Giasson BI, Hodara R, Xu S, Trojanowski JQ, et al. 2005. Reversible inhibition of alpha-synuclein fibrillization by dopaminochrome-mediated conformational alterations. *J Biol Chem* 280:21212-9
- Nussbaum RL, Ellis CE. 2003. Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *N Engl J Med* 348:1356-64
- O'Neill LA, Kaltschmidt C. 1997. NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends Neurosci* 20:252-8
- Obara M, Szeliga M, Albrecht J. 2008. Regulation of pH in the mammalian central nervous system under normal and pathological conditions: facts and hypotheses. *Neurochem Int* 52:905-19
- Offen D, Ziv I, Sternin H, Melamed E, Hochman A. 1996. Prevention of dopamine-induced cell death by thiol antioxidants: possible implications for treatment of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 141:32-9
- Ogawa N, Asanuma M, Kondo Y, Hirata H, Nishibayashi S, Mori A. 1994. Changes in lipid peroxidation, Cu/Zn-superoxide dismutase and its mRNA following an intracerebroventricular injection of 6-hydroxydopamine in mice. *Brain Res* 646:337-40
- Okatsu K, Oka T, Iguchi M, Imamura K, Kosako H, et al. PINK1 autophosphorylation upon membrane potential dissipation is essential for Parkin recruitment to damaged mitochondria. *Nat Commun* 3:1016
- Okatsu K, Oka T, Iguchi M, Imamura K, Kosako H, et al. 2012. PINK1 autophosphorylation upon membrane potential dissipation is essential for Parkin recruitment to damaged mitochondria. *Nat Commun* 3:1016
- Papa S, De Rasmio D. Complex I deficiencies in neurological disorders. *Trends Mol Med* 19:61-9
- Papa S, De Rasmio D. 2012. Complex I deficiencies in neurological disorders. *Trends Mol Med* 19:61-9
- Paris I, Dagnino-Subiabre A, Marcelain K, Bennett LB, Caviedes P, et al. 2001. Copper neurotoxicity is dependent on dopamine-mediated copper uptake and one-electron

- reduction of aminochrome in a rat substantia nigra neuronal cell line. *J Neurochem* 77:519-29
- Paris I, Lozano J, Perez-Pastene C, Munoz P, Segura-Aguilar J. 2009. Molecular and neurochemical mechanisms in PD pathogenesis. *Neurotox Res* 16:271-9
- Paris I, Munoz P, Huenchuguala S, Couve E, Sanders LH, et al. 2011. Autophagy protects against aminochrome-induced cell death in substantia nigra-derived cell line. *Toxicol Sci* 121:376-88
- Paris I, Perez-Pastene C, Cardenas S, Iturriaga-Vasquez P, Munoz P, et al. 2010. Aminochrome induces disruption of actin, alpha-, and beta-tubulin cytoskeleton networks in substantia-nigra-derived cell line. *Neurotox Res* 18:82-92
- Perea G, Navarrete M, Araque A. 2009. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci* 32:421-31
- Perez-Pastene C, Graumann R, Diaz-Grez F, Miranda M, Venegas P, et al. 2007. Association of GST M1 null polymorphism with Parkinson's disease in a Chilean population with a strong Amerindian genetic component. *Neurosci Lett* 418:181-5
- Periquet M, Latouche M, Lohmann E, Rawal N, De Michele G, et al. 2003. Parkinson mutations are frequent in patients with isolated early-onset parkinsonism. *Brain* 126:1271-8
- Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, et al. 1997. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276:2045-7
- Rathinam ML, Watts LT, Narasimhan M, Riar AK, Mahimainathan L, Henderson GI. 2012. Astrocyte mediated protection of fetal cerebral cortical neurons from rotenone and paraquat. *Environ Toxicol Pharmacol* 33:353-60
- Rideout HJ, Larsen KE, Sulzer D, Stefanis L. 2001. Proteasomal inhibition leads to formation of ubiquitin/alpha-synuclein-immunoreactive inclusions in PC12 cells. *J Neurochem* 78:899-908
- Rockwell P, Yuan H, Magnusson R, Figueiredo-Pereira ME. 2000. Proteasome inhibition in neuronal cells induces a proinflammatory response manifested by upregulation of cyclooxygenase-2, its accumulation as ubiquitin conjugates, and production of the prostaglandin PGE(2). *Arch Biochem Biophys* 374:325-33
- Rosei MA, Blarmino C, Foppoli C, Mosca L, Coccia R. 1994. Lipoxygenase-catalyzed oxidation of catecholamines. *Biochem Biophys Res Commun* 200:344-50
- Rosengren E, Linder-Eliasson E, Carlsson A. 1985. Detection of 5-S-cysteinyldopamine in human brain. *J Neural Transm* 63:247-53
- Rowe JD, Nieves E, Listowsky I. 1997. Subunit diversity and tissue distribution of human glutathione S-transferases: interpretations based on electrospray ionization-MS and peptide sequence-specific antisera. *Biochem J* 325 ( Pt 2):481-6
- Rushmore TH, Pickett CB. 1990. Transcriptional regulation of the rat glutathione S-transferase Ya subunit gene. Characterization of a xenobiotic-responsive element controlling inducible expression by phenolic antioxidants. *J Biol Chem* 265:14648-53
- Ryu EJ, Harding HP, Angelastro JM, Vitolo OV, Ron D, Greene LA. 2002. Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in cellular models of Parkinson's disease. *J Neurosci* 22:10690-8
- Sakka N, Sawada H, Izumi Y, Kume T, Katsuki H, et al. 2003. Dopamine is involved in selectivity of dopaminergic neuronal death by rotenone. *Neuroreport* 14:2425-8



- Sankarapandi S, Zweier JL, Mukherjee G, Quinn MT, Huso DL. 1998. Measurement and characterization of superoxide generation in microglial cells: evidence for an NADPH oxidase-dependent pathway. *Arch Biochem Biophys* 353:312-21
- Sattler R, Rothstein JD. 2006. Regulation and dysregulation of glutamate transporters. *Handb Exp Pharmacol*:277-303
- Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Clark JB, Jenner P, Marsden CD. 1990. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem* 54:823-7
- Schousboe A, Bak LK, Sickmann HM, Sonnewald U, Waagepetersen HS. 2007. Energy substrates to support glutamatergic and GABAergic synaptic function: role of glycogen, glucose and lactate. *Neurotox Res* 12:263-8
- Schultzberg M, Segura-Aguilar J, Lind C. 1988. Distribution of DT diaphorase in the rat brain: biochemical and immunohistochemical studies. *Neuroscience* 27:763-76
- Seaton TA, Cooper JM, Schapira AH. 1997. Free radical scavengers protect dopaminergic cell lines from apoptosis induced by complex I inhibitors. *Brain Res* 777:110-8
- Segura-Aguilar J, Baez S, Widersten M, Welch CJ, Mannervik B. 1997. Human class Mu glutathione transferases, in particular isoenzyme M2-2, catalyze detoxication of the dopamine metabolite aminochrome. *J Biol Chem* 272:5727-31
- Segura-Aguilar J, Lind C. 1989. On the mechanism of the Mn<sup>3+</sup>-induced neurotoxicity of dopamine: prevention of quinone-derived oxygen toxicity by DT diaphorase and superoxide dismutase. *Chem Biol Interact* 72:309-24
- Segura-Aguilar J, Metodiewa D, Baez S. 2001. The possible role of one-electron reduction of aminochrome in the neurodegenerative process of the dopaminergic system. *Neurotox Res* 3:157-65
- Segura-Aguilar J, Metodiewa D, Welch CJ. 1998. Metabolic activation of dopamine o-quinones to o-semiquinones by NADPH cytochrome P450 reductase may play an important role in oxidative stress and apoptotic effects. *Biochim Biophys Acta* 1381:1-6
- Seifert G, Schilling K, Steinhauser C. 2006. Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective. *Nat Rev Neurosci* 7:194-206
- Sheehan D, Meade G, Foley VM, Dowd CA. 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem J* 360:1-16
- Shen XM, Xia B, Wrona MZ, Dryhurst G. 1996. Synthesis, redox properties, in vivo formation, and neurobehavioral effects of N-acetylcysteinyl conjugates of dopamine: possible metabolites of relevance to Parkinson's disease. *Chem Res Toxicol* 9:1117-26
- Sherer TB, Betarbet R, Kim JH, Greenamyre JT. 2003. Selective microglial activation in the rat rotenone model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 341:87-90
- Shih AY, Erb H, Murphy TH. 2007. Dopamine activates Nrf2-regulated neuroprotective pathways in astrocytes and meningeal cells. *J Neurochem* 101:109-19
- Shimura H, Hattori N, Kubo S, Mizuno Y, Asakawa S, et al. 2000. Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet* 25:302-5
- Simard M, Nedergaard M. 2004. The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. *Neuroscience* 129:877-96
- Stefanis L. 2012. alpha-Synuclein in Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2:a009399

- Stern EL, Quan N, Proescholdt MG, Herkenham M. 2000. Spatiotemporal induction patterns of cytokine and related immune signal molecule mRNAs in response to intrastriatal injection of lipopolysaccharide. *J Neuroimmunol* 109:245-60
- Stromberg I, Bjorklund H, Dahl D, Jonsson G, Sundstrom E, Olson L. 1986. Astrocyte responses to dopaminergic denervations by 6-hydroxydopamine and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine as evidenced by glial fibrillary acidic protein immunohistochemistry. *Brain Res Bull* 17:225-36
- Sulzer D, Bogulavsky J, Larsen KE, Behr G, Karatekin E, et al. 2000. Neuromelanin biosynthesis is driven by excess cytosolic catecholamines not accumulated by synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:11869-74
- Sullivan PG, Dragicevic NB, Deng JH, Bai Y, Dimayuga E, et al. 2004. Proteasome inhibition alters neural mitochondrial homeostasis and mitochondria turnover. *J Biol Chem* 279:20699-707
- Sun X, Erb H, Murphy TH. 2005. Coordinate regulation of glutathione metabolism in astrocytes by Nrf2. *Biochem Biophys Res Commun* 326:371-7
- Takahashi T, Deng Y, Maruyama W, Dostert P, Kawai M, Naoi M. 1994. Uptake of a neurotoxin-candidate, (R)-1,2-dimethyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline into human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells by dopamine transport system. *J Neural Transm Gen Sect* 98:107-18
- Takeda H, Inazu M, Matsumiya T. 2002. Astroglial dopamine transport is mediated by norepinephrine transporter. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 366:620-3
- Tanaka Y, Engelender S, Igarashi S, Rao RK, Wanner T, et al. 2001. Inducible expression of mutant alpha-synuclein decreases proteasome activity and increases sensitivity to mitochondria-dependent apoptosis. *Hum Mol Genet* 10:919-26
- Taniguchi N, Ikeda Y. 1998. gamma-Glutamyl transpeptidase: catalytic mechanism and gene expression. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 72:239-78
- Tanner CM, Aston DA. 2000. Epidemiology of Parkinson's disease and akinetic syndromes. *Curr Opin Neurol* 13:427-30
- Tansey FA, Cammer W. 1991. A pi form of glutathione-S-transferase is a myelin- and oligodendrocyte-associated enzyme in mouse brain. *J Neurochem* 57:95-102
- Teismann P, Feger B. 2001. Inhibition of the cyclooxygenase isoenzymes COX-1 and COX-2 provide neuroprotection in the MPTP-mouse model of Parkinson's disease. *Synapse* 39:167-74
- Teismann P, Schulz JB. 2004. Cellular pathology of Parkinson's disease: astrocytes, microglia and inflammation. *Cell Tissue Res* 318:149-61
- Trempe JF, Fon EA. 2013. Structure and Function of Parkin, PINK1, and DJ-1, the Three Musketeers of Neuroprotection. *Front Neurol* 4:38
- Tse DC, McCreery RL, Adams RN. 1976. Potential oxidative pathways of brain catecholamines. *J Med Chem* 19:37-40
- Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, Muqit MM, Harvey K, et al. 2004. Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science* 304:1158-60
- Van Laar VS, Mishizen AJ, Cascio M, Hastings TG. 2009. Proteomic identification of dopamine-conjugated proteins from isolated rat brain mitochondria and SH-SY5Y cells. *Neurobiol Dis* 34:487-500

- Veal EA, Toone WM, Jones N, Morgan BA. 2002. Distinct roles for glutathione S-transferases in the oxidative stress response in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* 277:35523-31
- Ventura R, Harris KM. 1999. Three-dimensional relationships between hippocampal synapses and astrocytes. *J Neurosci* 19:6897-906
- Verleysdonk S, Martin H, Willker W, Leibfritz D, Hamprecht B. 1999. Rapid uptake and degradation of glycine by astroglial cells in culture: synthesis and release of serine and lactate. *Glia* 27:239-48
- Volles MJ, Lee SJ, Rochet JC, Shtilerman MD, Ding TT, et al. 2001. Vesicle permeabilization by protofibrillar alpha-synuclein: implications for the pathogenesis and treatment of Parkinson's disease. *Biochemistry* 40:7812-9
- Wakabayashi K, Tanji K, Mori F, Takahashi H. 2007. The Lewy body in Parkinson's disease: molecules implicated in the formation and degradation of alpha-synuclein aggregates. *Neuropathology* 27:494-506
- Wang B, Williamson G. 1994. Detection of a nuclear protein which binds specifically to the antioxidant responsive element (ARE) of the human NAD(P) H:quinone oxidoreductase gene. *Biochim Biophys Acta* 1219:645-52
- Xu Y, Stokes AH, Roskoski R, Jr., Vrana KE. 1998. Dopamine, in the presence of tyrosinase, covalently modifies and inactivates tyrosine hydroxylase. *J Neurosci Res* 54:691-7
- Yang CZ, Zhao R, Dong Y, Chen XQ, Yu AC. 2008. Astrocyte and neuron intone through glutamate. *Neurochem Res* 33:2480-6
- Zafar KS, Siegel D, Ross D. 2006. A potential role for cyclized quinones derived from dopamine, DOPA, and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid in proteasomal inhibition. *Mol Pharmacol* 70:1079-86
- Zarranz JJ, Alegre J, Gomez-Esteban JC, Lezcano E, Ros R, et al. 2004. The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann Neurol* 55:164-73
- Zecca L, Fariello R, Riederer P, Sulzer D, Gatti A, Tampellini D. 2002. The absolute concentration of nigral neuromelanin, assayed by a new sensitive method, increases throughout the life and is dramatically decreased in Parkinson's disease. *FEBS Lett* 510:216-20
- Zecca L, Zucca FA, Wilms H, Sulzer D. 2003. Neuromelanin of the substantia nigra: a neuronal black hole with protective and toxic characteristics. *Trends Neurosci* 26:578-80
- Zhou ZD, Lim TM. 2009. Dopamine (DA) induced irreversible proteasome inhibition via DA derived quinones. *Free Radic Res* 43:417-30
- Zoratti M, Szabo I. 1995. The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta* 1241:139-76