

UCH-FC  
MAG-B  
C 352  
C. 1



FACULTAD DE CIENCIAS-UNIVERSIDAD DE CHILE

**EFFECTO TERAPEUTICO DE LA INHIBICIÓN FARMACOLÓGICA  
DE LA VÍA DE ESTRÉS DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO  
MEDIADA POR PERK/ATF4 EN UN MODELO TOXICOLÓGICO  
DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON**

Tesis entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial  
de los requisitos para optar al grado de Magister en Ciencias  
Biológicas.

**VALENTINA FERNANDA CASTILLO SALGADO**

Director de Tesis: Dr. Claudio Hetz

Co-directora de Tesis: Dra. Gabriela Mercado

Mayo, 2016

Santiago – Chile

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE



## INFORME DE APROBACIÓN-TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister presentada por la candidata

**Valentina Fernanda Castillo Salgado**

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 4 de mayo de 2016.

**Director de Tesis:**

Dr. Claudio Hetz

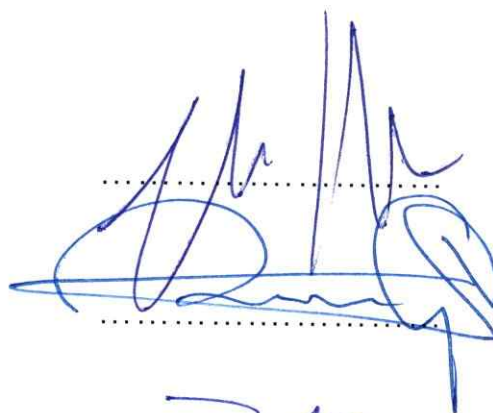

**Co-directora de Tesis:**

Dra. Gabriela Mercado

**Comisión de Evaluación de la Tesis**

Dr. Tulio Nuñez

Dr. Alvaro Glavic

Handwritten signature in blue ink, consisting of several tall, vertical strokes and a large loop at the bottom, positioned above a dotted line.Handwritten signature in blue ink, featuring a large, circular loop and a long, sweeping stroke at the bottom, positioned above a dotted line.

**Dedicado a mi querida Madre...**

## RESUMEN BIBLIOGRÁFICO

Los cimientos de mi crianza forjaron desde pequeña una niña que siempre buscaba dar lo mejor de sí misma en todas las disciplinas. Fue así como en la escuela nunca me destaque particularmente en algún ramo, todos me parecían realmente interesantes. Me fascinaba innovar, descubrir cosas nuevas, inventar, ingeniármelas, eso me abría un mundo de posibilidades donde escoger para mis estudios superiores. Recuerdo que un día cuando estaba en segundo año medio una ex alumna de mi liceo dio una charla sobre su carrera y el campo en que se desempeñaba. Me pareció increíble, una carrera para innovar, descubrir, desentrañar los misterios de la materia viva, un desafío que me mantendría ocupada por mucho tiempo pensé. Desde ese momento supe que quería estudiar Ingeniería en Biotecnología Molecular, y fue así como me propuse entrar a la Universidad de Chile, que mejor lugar para aprender ciencia que el campus JGM. Cuando me titulé decidí que hacer un postgrado sería conveniente para tener más experiencia práctica en investigación científica, es por ello que entre al programa de Magister en Ciencias Biológicas de la Universidad de Chile. No niego que ha sido un camino difícil, pero a su vez lleno de aprendizaje, de crecimiento profesional, intelectual y personal.



## AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos especiales a Claudio Hetz, mi tutor de tesis, que ha guiado mi formación científica durante estos últimos años, muchas gracias por permitirme ser parte de este equipo de trabajo, inculcarme pensamiento crítico y estimular mi pro-actividad y crecimiento personal como científica. Quiero agradecer también a una persona fundamental en el desarrollo de mi tesis de Magíster, mi co-tutora, Gabriela Mercado, gracias Gaby por guiarme y transmitirme tu rigurosidad científica, gracias por tu calidad humana. Además quisiera agradecer a mi amiga y compañera de trabajo, mi mano derecha, Paulina Soto, gracias por ser una persona tan agradable, comprometida y disciplinada, acompañándome y ayudándome en este proceso de formación.

Agradecimientos afectuosos a todo el Hetz lab, en especial a los estudiantes de doctorado y los técnicos, gracias por la buena onda, y por aportar con la chispa de humor en el trabajo. Agradecimientos especiales a personas más cercanas; Leslie y Pablo, grandes amigos, Huguito, Denice, Osito, Hery, niña Paula por sus consejos científicos y personales en los momentos oportunos, por su calidad humana y apoyo moral.

## LISTA DE MATERIAS

LISTA DE TABLAS .....	vi
LISTA DE FIGURAS .....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS .....	ix
1. RESUMEN .....	1
1. ABSTRACT.....	3
2. INTRODUCCIÓN.....	5
2.1. La enfermedad de Parkinson.....	5
2.2. El estrés de RE y la EP. ....	14
2.3. Manipulación de componentes de la UPR en modelos animales de la EP. ....	18
2.4. Rol de PERK en enfermedades neurodegenerativas. ....	21
3. HIPÓTESIS.....	25
4. OBJETIVOS.....	25
4.1 Objetivo general: .....	25
4.2 Objetivos específicos. ....	25
5. MATERIALES Y MÉTODOS .....	26
5.1. Modelo de 6-OHDA.....	26
5.1.1. Inyecciones estereotáxicas de 6-OHDA. ....	26
5.1.2. Inmunohistoquímica anti-Tirosina Hidroxilasa.....	27
5.1.3. Cuantificación de somas TH positivos de la SNpc y terminales axonales dopaminérgicos del cuerpo estriado.....	28
5.2. Tratamiento con ISRIB o GSK.....	29
5.2.1. Preparación de ISRIB o GSK.....	31
5.2.2. Controles con tunicamicina.....	31
5.2.3. Tratamiento con ISRIB o GSK en el modelo de 6-OHDA. ....	32
5.3. Análisis bioquímico. ....	32

5.3.1. Extracción de ARN, RT-PCR y PCR en tiempo real. ....	32
5.4. Análisis histológico. ....	34
5.4.1. Inmunohistoquímica anti-CHOP. ....	34
5.4.2. Inmunohistoquímica anti-pelF2 $\alpha$ . ....	34
5.5. Monitoreo de animales y pruebas motoras. ....	35
5.5.1. Mediciones de peso corporal. ....	35
5.5.2. Prueba motora del cilindro. ....	35
5.5.3. Prueba motora del "hanging". ....	36
5.5.4. Prueba motora del "rotarod". ....	36
5.5.5. Prueba motora del "pole". ....	37
5.6. Expresión de resultados y análisis estadístico. ....	38
6. RESULTADOS .....	39
6.1. Análisis de la actividad de ISRIB en la SN. ....	39
6.2. Efecto del tratamiento con ISRIB en un modelo toxicológico de la EP. ....	44
6.3. Análisis de la actividad de GSK en la SN. ....	55
6.4. Efecto del tratamiento de GSK en un modelo toxicológico de la EP. ....	57
7. DISCUSIÓN .....	70
8. CONCLUSIONES .....	76
9. BIBLIOGRAFÍA.....	77

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1</b>	<b>Partidores para PCR en tiempo real de los genes blancos de ATF4 seleccionados para evaluar el efecto de estrés de RE y las moléculas ISRIB y GSK en la SN de cerebros de ratón.</b>	<b>40</b>
----------------	--	-----------



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Esquema representativo del circuito nigro-estriatal que se encuentra afectado en la enfermedad de parkinson.	7
<b>Figura 2</b>	Respuesta a proteínas mal plegadas (UPR).	13
<b>Figura 3</b>	Estrés de RE y activación de la UPR en tejido <i>post mortem</i> y en modelos animales de la EP.	16
<b>Figura 4</b>	Manipulación de la UPR en modelos de la EP.	19
<b>Figura 5</b>	Modelo de la EP utilizando 6-hidroxidopamina.	30
<b>Figura 6</b>	Validación de la eficacia de ISRIB <i>in vivo</i> en la substantia nigra.	41
<b>Figura 7</b>	Validación de la actividad de ISRIB <i>in vivo</i> en la substantia nigra a nivel de regulación de proteínas.	43
<b>Figura 8</b>	Administración de ISRIB en un modelo toxicológico de la EP (tratamiento corto).	46
<b>Figura 9</b>	Efecto de la administración de ISRIB en la neurodegeneración inducida por 6-OHDA (tratamiento corto).	48
<b>Figura 10</b>	Administración de ISRIB en un modelo toxicológico de la EP en ratón (tratamiento largo).	50
<b>Figura 11</b>	Efecto de la administración de ISRIB a nivel motor en un modelo toxicológico de la EP en ratón (tratamiento largo).	52
<b>Figura 12</b>	Efecto de la administración de ISRIB en la neurodegeneración inducida por 6-OHDA (tratamiento largo).	54
<b>Figura 13</b>	Validación de la eficacia de GSK <i>in vivo</i> en la substantia nigra (dosis alta).	56
<b>Figura 14</b>	Administración de GSK en un modelo toxicológico de la EP en ratón (tratamiento corto).	58
<b>Figura 15</b>	Efecto de la administración de GSK en la neurodegeneración inducida por 6-OHDA (tratamiento corto).	60
<b>Figura 16</b>	Validación de la eficacia de GSK <i>in vivo</i> en la substantia nigra.(dosis baja).	62
<b>Figura 17</b>	Administración de GSK en un modelo toxicológico de la EP en ratón (tratamiento largo).	64
<b>Figura 18</b>	Efecto de la administración de GSK a nivel motor en un modelo toxicológico de la EP en ratón (tratamiento largo).	65

**Figura 19** Efecto de la administración de GSK en la neurodegeneración inducida por 6-OHDA (tratamiento largo).

**68**

## LISTA DE ABREVIATURAS

6-OHDA: 6-hidroxidopamina

$\alpha$ -sin: alfa-sinucleína

AAV: virus adeno-asociado, del inglés *adeno-associated virus*

A53T: mutación puntual que reemplaza una Alanina por una Treonina

A30P: mutación puntual que reemplaza una Alanina por una Prolina

AP: coordenada estereotóxica en el eje antero-posterior según el atlas del cerebro de ratón de Franklin y Paxinos

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

ATF4: *activating transcription factor 4*

ATF6: *activating transcription factor 6*

ATP13A2: *ATPase type 13A2*

BCL2: *B-cell lymphoma 2 protein*

BiP: *binding immunoglobulin protein*

BIM: *Bcl-2 Interacting Protein*

bps: bits por segundo

BSA: *bovine serum albumin*

Chop: *C/EBP homologous protein*

cm: centímetros

DMSO: dimetilsulfóxido

DV: coordenada estereotóxica en el eje dorso-ventral según el atlas del cerebro de ratón de Franklin y Paxinos

DJ-1: *protein deglycase*, también conocida como *PARK7*, del inglés *parkinson disease protein 7*.

E46K: mutación puntual que reemplaza un ácido glutámico por una Lisina

EA: enfermedad de Alzheimer

EGFP: *enhanced green fluorescent protein*

EH: enfermedad de Huntington

eIF2 $\alpha$ : *eukariotic initiation factor 2 alpha*

pelF2 $\alpha$ : *eukariotic initiation factor 2 alpha phosphorylated*

ELA: esclerosis lateral amiotrónica

EP: enfermedad de Parkinson

ERAD: *endoplasmic-reticulum-associated protein degradation*

ERp57: *endoplasmic reticulum protein 57/Grp58*

GAAD34: *growth arrest and DNA damage protein-34*

GCN2: *general control nonderepressible 2 serine/threonine-protein kinase*

GSK: GSK2606414, inhibidor de PERK

h: horas

Herp: *homocysteine-induced endoplasmic reticulum protein*

HPMC: *hydroxypropyl methyl cellulose*

HRI: *heme-regulated eIF2 $\alpha$  kinase*

IHC: inmunohistoquímica

i.p.: intraperitoneal

iPS: *induced pluripotent stem cells*

Ire1 $\alpha$ : *inositol requiring protein-1 alpha*.

ISR: *integrated stress response*

ISRIB: *integrated stress response inhibitor*

LRRK2: *leucine-rich repeat kinase 2*

L-LTP: *late long term potentiation*

min: minutos

ML: coordinada estereotáctica en el eje lateral según el atlas del cerebro de ratón de Franklin y Paxinos.

MPP<sup>+</sup>: forma activa del compuesto MPTP

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

OCT: *optimal cutting temperature medium*

ON: *over night*

*p*: *p-value*

PBS: solución tampón de fosfato, del inglés *phosphate-buffered saline*

PCR: reacción en cadena de la polimerasa, del inglés *polymerase chain reaction*

PDI: proteína disulfuro isomerasa

PDip: proteína disulfuro isomerasa de páncreas

PEG: polietilenglicol

PERK: *protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase*.

PFA: paraformaldehído

PKR: *protein kinase RNA-activated*

PMDs: *protein misfolding disorders*

qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa, del inglés *quantitative PCR*

RE: retículo endoplasmático

ROS: especies reactivas del oxígeno

RPM: revoluciones por minuto

s: segundos

shARN: ARN pequeño tipo horquilla, del inglés *short-hairpin*

SN: substantia nigra

SNCA: *synuclein, alpha non A4 component of amyloid precursor*

SNpc: substantia nigra pars compacta

SOD1: *superoxide dismutase*

Tm: tunicamicina

TH: tirosina hidroxilasa

T<sub>LA</sub>: tiempo de latencia

UPR: respuesta a proteínas mal plegadas, del inglés *unfolded protein response*

VPS35: *vacuolar protein sorting 35 homolog*

VTA: *ventral tegmental area*

XBP1: *X-box binding protein-1*

XBP1s: forma procesada de la proteína XBP1

XBP1u: forma no procesada de la proteína XBP1

## 1. RESUMEN

La enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común en la población anciana y se caracteriza por un conjunto de síntomas motores que son el resultado de la pérdida progresiva de las neuronas dopaminérgicas de la substantia nigra pars compacta (SNpc). A pesar de los últimos avances en el estudio de la etiología de esta enfermedad, aun no se ha podido determinar cuáles son los mecanismos moleculares que desencadenan la pérdida selectiva de las neuronas dopaminérgicas de la de SNpc, ni tampoco existe un tratamiento eficaz que detenga el proceso neurodegenerativo. Nueva evidencia en el estudio de la etiología de la EP sugiere que el estrés de retículo endoplasmático (RE) sería una característica patológica importante en el desarrollo de esta enfermedad. El estrés de RE desencadena una respuesta adaptativa conocida como la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR, del inglés "*unfolded protein response*"), que permite restablecer la homeostasis proteica, conduciendo a la adaptación y supervivencia celular. Sin embargo, cuando las condiciones de estrés son crónicas o irreversibles esta misma respuesta celular conduce a la muerte celular eliminando a las células dañadas. Se han observado marcadores de estrés de RE, tanto en modelos celulares de la EP, como en modelos animales, más importante aún en tejido *post-mortem* de pacientes. Sin embargo, aún no se conoce bien cuál es la contribución exacta de la UPR en la progresión de la EP. Estudios recientes han logrado identificar dos compuestos que inhiben la vía de señalización de la UPR mediada por PERK/ATF4 en diferentes puntos. En un estudio farmacológico de moléculas inhibitoras del dominio quinasa de PERK, se logró identificar un compuesto

conocido como GSK2606414 (GSK). Este inhibidor ha mostrado proporcionar una protección global contra la patogénesis del Prion. En este modelo la fosforilación sostenida de eIF2 $\alpha$ , como consecuencia de la activación de esta vía de la UPR, estaría inhibiendo la síntesis de proteínas sinápticas, proceso que la molécula GSK revierte con un efecto terapéutico significativo contra los efectos patogénicos de la proteína de Prion. Otra molécula, denominada ISRIB, fue identificada recientemente en un estudio *in vitro* en búsqueda de compuestos que bloquearan la expresión de ATF4. ISRIB no reduce los niveles de fosforilación eIF2 $\alpha$  sino que inhibe sus efectos río abajo. Ha sido demostrado que ISRIB mejora las funciones cognitivas en ratones y ratas, además previene la represión traduccional inducida por Priones, proporcionando protección tanto a nivel conductual como histopatológico.

Tomando en cuenta estos antecedentes el objetivo de este trabajo fue definir los posibles beneficios terapéuticos de manipular farmacológicamente la vía de señalización PERK/ATF4 con los compuestos GSK e ISRIB en el desarrollo de la EP usando un modelo pre-clínico de la enfermedad. Para modelar la EP se utilizó el modelo toxicológico de 6-hidroxipamina (6-OHDA) en ratones, en el cual se induce la pérdida selectiva de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc. Nuestros resultados muestran que la inhibición farmacológica de la vía PERK con los compuestos ISRIB y GSK no indujo cambios significativos en la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas en nuestro modelo de 6-OHDA en ratones, sin embargo, el tratamiento con el compuesto ISRIB generó una mejora en el rendimiento de los animales en algunas pruebas motoras. Este estudio representa una contribución a la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos y en la identificación de nuevos compuestos que permitan el alivio de los síntomas motores de los paciente afectados por la EP.



## 1. ABSTRACT

Parkinson disease (PD) is the second most common neurodegenerative disease in the older population and is characterized by a set of motor symptoms as a result of extensive dopaminergic neuron loss in the substantia nigra pars compacta (SNpc). Despite recent advances in the study of etiology of this disease, still has not been determined which are the molecular mechanisms that trigger selective loss dopaminergic neurons of SNpc and there is no effective treatment to stop the neurodegenerative process. New evidence in the study of the etiology of PD suggests that endoplasmic reticulum (ER) stress is a salient feature of this disease. ER stress triggers an adaptive reaction known as the unfolded protein response (UPR) that aims to reestablish protein folding homeostasis at the ER, leading to cell adaptation and survival. However, if ER stress is chronic or irreversible the same cell response leads to programmed death, in order to remove damaged cells. Signs of ER stress are observed in cellular and animal models of PD and more importantly in post-mortem tissue from patients. However, the exact contribution of the UPR in the progression of PD is not well understood. Recent drug discovery efforts identified two potent compounds that target the PERK/ATF4 branch of the UPR. One drug screening identified a potent and specific inhibitor of PERK kinase domain known as GSK2606414 (GSK). This inhibitor was shown to provide global protection against Prion pathogenesis. In this model sustained eIF2 $\alpha$  phosphorylation, as consequence of UPR activation, was proposed to inhibit the synthesis of synaptic proteins, a process that can be reversed by GSK, with significant therapeutic effect against the pathogenic effects of the Prion protein. Another

compound, termed ISRIB, was recently identified on a cell-based screening for compounds that block ATF4 expression. ISRIB does not reduce eIF2 $\alpha$  phosphorylation levels but instead reverses its effects. ISRIB was shown to enhance cognitive functions in both mice and rats and also it has been shown to prevent translational repression induced by Prions, providing protection in both behavioral and histopathological levels.

Given this evidence the aim of this work was to define the possible therapeutic benefits of targeting PERK/ATF4 signaling, using GSK and ISRIB compounds, in the development of PD using a pre-clinical model of the disease. To model PD we used a toxicological animal model of PD in which is triggered dopaminergic neuron loss in SNpc by the striatal injection of the neurotoxin 6-hydroxydopamine (6-OHDA). Our results show that pharmacological inhibition of PERK pathway by ISRIB or GSK compounds did not induce significant changes in dopaminergic neuron survival in our model of 6-OHDA in mice, however the treatment with ISRIB compound improved motor performance of animals in some motor tests. This study results a contribution to defining novel therapeutic targets and identification of compounds able to improve motor symptoms and cognitive damage in PD patients.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. La enfermedad de Parkinson.

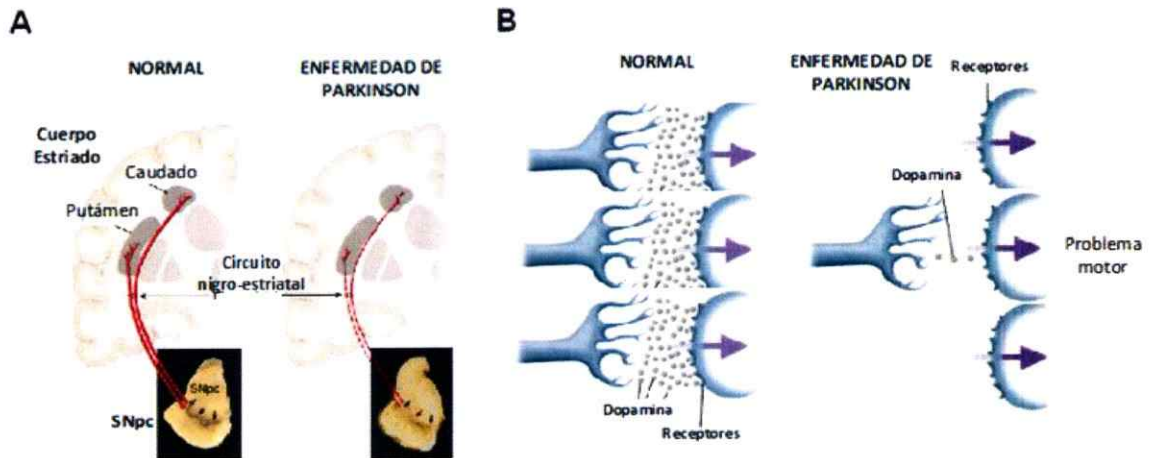
La enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común relacionada con el envejecimiento después de la enfermedad de Alzheimer (EA), manifestándose en el 1-2% de los individuos mayores de 60 años, porcentaje que incrementa con la edad, por lo que se ha propuesto que el mayor factor de riesgo para esta patología es el envejecimiento (revisado en de Lau y Breteler 2006).

La EP es una patología progresiva e irreversible cuyas características clínicas se asocian con la pérdida de control sobre los movimientos voluntarios, acompañada de temblores en estado de reposo, rigidez, inestabilidad postural y lentitud en la realización de los movimientos (bradiquinesia). Aproximadamente un 95% de los casos de la EP son esporádicos, sin causa conocida, mientras que el 5% restante corresponden a casos de Parkinson familiar que están vinculados a mutaciones genéticas hereditarias (revisado en Martin y col. 2011). Si bien el Parkinson familiar corresponde a un pequeño porcentaje de los casos, la identificación de los genes que se encuentran alterados en dichos casos ha resultado de gran importancia para el entendimiento de los mecanismos moleculares asociados a esta patología. Entre las mutaciones que se heredan de forma autosómica-dominante se han descrito alteraciones en los genes *LRRK2* (del inglés "leucine-rich repeat serine/threonine kinase 2") y *SNCA* (del inglés "synuclein, alpha non A4 component of amyloid precursor), que codifica para la proteína alpha-sinucleína ( $\alpha$ -sin), siendo la primera la

causa más común, correspondiente a un 2% del total de casos de la EP. Las alteraciones identificadas en el gen *SNCA* se han asociado a mutaciones puntuales (A53T, A30P y E46K), duplicaciones o triplicaciones del gen (revisado en Martin y col. 2011).

Dentro de las características histopatológicas comunes que se asocian a los síntomas clínicos de la EP se encuentran; (i) la muerte selectiva de las neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra pars compacta* (SNpc), que tiene como consecuencia una disminución en los niveles de dopamina, y (ii) la formación de agregados proteicos citoplasmáticos denominados cuerpos de Lewy, principalmente conformados por agregados de tipo amiloide de la proteína  $\alpha$ -sin Spillantini y col. 1997.

Las neuronas dopaminérgicas de la SNpc forman parte del denominado circuito nigro-estriatal, compuesto por la SNpc y el cuerpo estriado Bach y col. 2014. Las neuronas dopaminérgicas de este circuito presentan sus somas en la zona de la SNpc y desde allí proyectan sus axones hacia la zona del cuerpo estriado, donde ocurre la liberación del neurotransmisor dopamina (**Figura 1**), permitiendo el control de los movimientos voluntarios (revisado en Dauer y Przedborski 2003). El cuerpo estriado es uno de los componentes de los ganglios basales que en conjunto con el cerebelo, contribuyen a la modulación de la iniciación, coordinación y finalización perfecta de los movimientos voluntarios (Zuleta y col. 2007).



**Figura 1. Esquema representativo del circuito nigro-estriatal que se encuentra afectado en la EP. (A)** Los somas neuronales dopaminérgicos localizados en la *substantia nigra pars compacta* (SNpc) proyectan sus axones (en rojo) hacia la zona del cuerpo estriado (en humanos compuesto por el Caudado y el Putamen) donde se produce la liberación de dopamina. En individuos que padecen la EP se produce una disrupción en este circuito a causa de la muerte selectiva de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc. **(B)** Bajo condiciones fisiológicas el neurotransmisor dopamina es liberado desde los terminales de las neuronas dopaminérgicas posibilitando el control de los movimientos voluntarios. Bajo condiciones patológicas, debido a la muerte masiva de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc disminuye significativamente la cantidad neta de dopamina en la zona del cuerpo estriado. Esta reducción en los niveles de dopamina se traduce en una alteración de la ejecución y el control de los movimientos voluntarios, característica clínica clásica de esta patología. Figura adaptada de la revisión "Parkinson's Disease: Mechanisms and Models" Dauer y Przedborski 2003.

En pacientes con la EP, el circuito nigro-estriatal se encuentra alterado, específicamente en las neuronas que inervan la zona del putamen del cuerpo estriado. La neurodegeneración de este circuito conduce a un descenso en los niveles de dopamina lo que tiene como consecuencia final una reducción global en los movimientos (hipoquinesia) (Figura 1B). La magnitud de la pérdida neuronal va incrementando con la edad, como consecuencia de la neurodegeneración progresiva. Los síntomas de la EP se manifiestan cuando los niveles de dopamina en la zona del putamen del cuerpo estriado se han reducido en un 80% lo que se corresponde con un 60% de pérdida de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc (revisado en Dauer y Przedborski 2003).

Los tratamientos actuales contra la EP contemplan el uso de fármacos que permiten disminuir los síntomas motores, efecto que es temporal y con periodos refractarios. Desde hace casi 50 años, la levodopa, un precursor metabólico de la dopamina, es el fármaco más utilizado para el tratamiento de la EP, por su eficacia en disminuir los síntomas motores (revisado en Poewe y col. 2012). La levodopa actúa aumentando los niveles globales del neurotransmisor dopamina, sin embargo, su uso prolongado está asociado a problemas motores como movimientos involuntarios (disquinesia) y fluctuaciones motoras dentro de las cuales encontramos el fenómeno "on-off", que consiste en periodos de funcionamiento normal que se alternan bruscamente con periodos de aquinesia (pérdida de movimiento) y aumento imprevisible del temblor (revisado en Poewe y col. 2012). Otros efectos secundarios no motores incluyen alucinaciones, problemas digestivos y cardíacos, entre otros (revisado en Poewe y col. 2012).

Actualmente no existen terapias que sean efectivas en detener la progresión de la enfermedad y todas las utilizadas son de tipo paliativas, otorgando un alivio temporal de los síntomas de la enfermedad mediante medicación y un tratamiento multidisciplinario (revisado en Poewe y col. 2012). Este hecho está asociado a la falta de conocimiento acerca de la etiología de la EP. Es por ello que resulta de gran interés dilucidar los mecanismos moleculares vinculados con la degeneración selectiva de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc.

La capacidad de modelar patologías humanas en animales es esencial para entender la etiología de esta enfermedad y para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. Los modelos celulares de la EP han demostrado ser útiles para dilucidar mecanismos moleculares individuales de manera robusta, sin embargo esta aproximación consiste en una mirada simplista de la patología. En el cerebro las neuronas dopaminérgicas presentan interacciones muy complejas, cruciales para el control motor, las cuales no son reproducibles en cultivos celulares. A pesar de que el desarrollo y uso de modelos animales de la EP en ratones y ratas resulta mucho más complejo, éste es esencial para llevar a cabo ensayos pre-clínicos de nuevas aproximaciones terapéuticas. Históricamente, los modelos animales de la EP se han basado en el uso de neurotoxinas que recapitulan generalmente la muerte selectiva de las neuronas dopaminérgicas y en algunos casos la inducción de la EP en humanos por factores ambientales, incluyendo pesticidas o drogas entre las cuales encontramos: (i) MPP<sup>+</sup>, un inhibidor del complejo I mitocondrial, que es el metabolito activo de la toxina MPTP (del inglés, "1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine") (ii) rotenona, un pesticida, y (iii) 6-hidroxidopamina (6-OHDA), un metabolito de la dopamina que

induce estrés oxidativo. Todos estos compuestos desencadenan la degeneración selectiva de las neuronas dopaminérgicas de manera similar a lo que ocurre en la EP.

Los modelos genéticos expresan mutaciones en genes que han sido identificados como alterados en casos de Parkinson familiar. Estos modelos están basados típicamente en la sobreexpresión de genes autosómicos dominantes, como el que codifica para la proteína  $\alpha$ -sin, cuya disfunción se encuentra relacionada con ambos tipos de Parkinson, tanto familiar como esporádico. El mecanismo de acción mediante el cual la proteína  $\alpha$ -sin contribuye a la progresión de la EP aún no ha sido dilucidado. Es por ello que se han generado diversos modelos animales y celulares que sobreexpresan la proteína  $\alpha$ -sin, ya sea en sus formas silvestre o mutante. Recientemente, se ha demostrado que la inyección estereotáxica de vectores virales directamente en la SNpc es una herramienta efectiva para sobreexpresar la proteína  $\alpha$ -sin en el sistema nigro-estriatal de animales adultos, conduciendo a la degeneración progresiva y selectiva de las neuronas dopaminérgicas (Ulusoy y col. 2010).

Se han propuesto diferentes vías de estrés que podrían contribuir con el proceso patológico que induce la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc, tales como el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial, la desregulación en la homeostasis del calcio, alteraciones en el tráfico de proteínas entre el retículo endoplasmático (RE) y el aparato de Golgi (revisado en Dauer y Przedborski 2003) y más recientemente, la disfunción de la red de homeostasis de proteínas (proteostasis). Dentro del contexto de la proteostasis la EP pertenece a un grupo de enfermedades humanas definidas como PMDs (del inglés "*protein misfolding disorders*") entre las cuales se incluyen varias enfermedades neurodegenerativas tales como la EA, la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), la patología de Priones y la enfermedad de

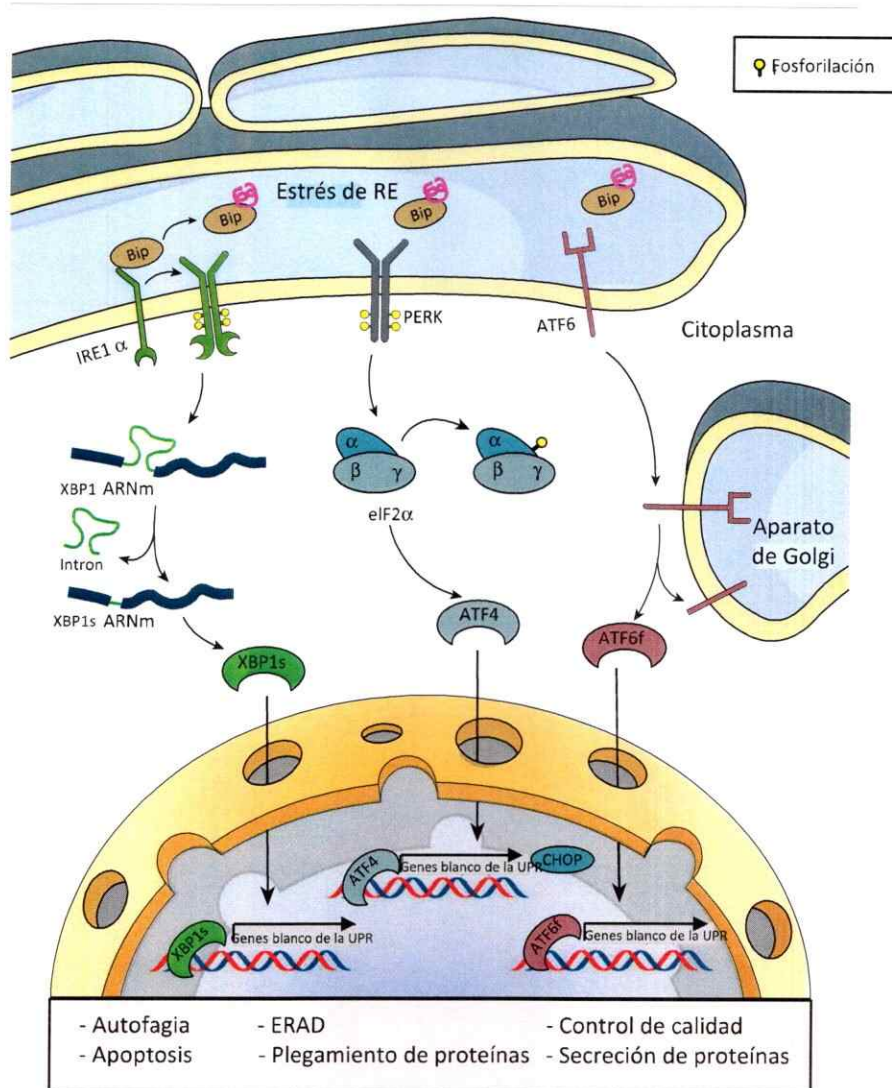


Huntington (EH) (revisado en Hetz y Soto 2003; Matus y col. 2011). La característica distintiva de estas PMDs es la presencia agregados de proteínas mal plegadas en el cerebro (revisado en Soto 2003; Morales y col. 2010). A pesar de que las proteínas implicadas en cada una de estas patologías así como también las manifestaciones clínicas de estas enfermedades son muy distintas, el mecanismo molecular subyacente al mal plegamiento de proteínas parece ser similar y el mecanismo mediante el cual este mal plegamiento induce el mal funcionamiento y muerte neuronal también (revisado en Matus y col. 2011). Varios estudios han demostrado que este fenómeno es acompañado por una condición denominada estrés de RE (revisado en Matus y col. 2011). De este mismo modo, existe numerosa evidencia que sugiere que uno de los eventos patológicos principales en la EP es la desregulación en la homeostasis proteica a nivel del RE (revisado en Mercado y col. 2013).

El RE tiene funciones claves en el plegamiento, maduración y secreción de proteínas, proporcionando un eficiente sistema de chaperonas y mecanismos de control de calidad que permiten asistir el plegamiento y prevenir la agregación anormal de proteínas. Algunos factores pueden interferir con estas funciones, conduciendo a una condición denominada "estrés de RE" (Walter y Ron 2011; Hetz 2012). En condiciones de estrés de RE se activa una compleja red de señalización celular denominada respuesta a proteínas mal plegadas (UPR, del inglés "*unfolded protein response*") que contribuye a restablecer la homeostasis proteica. Sin embargo, si el estrés de RE resulta crónico o irreversible se desencadena la muerte celular por apoptosis (Tabas y Ron 2011; Urra y col. 2013). Se ha observado que perturbaciones en las funciones del RE podrían contribuir a la disfunción neuronal observada en varias enfermedades humanas (revisado en Roussel y col. 2013; Hetz y Mollereau 2014).

Tres sensores que se encuentran en la membrana del RE, IRE1 $\alpha$  (del inglés "*inositol-requiring kinase 1 $\alpha$* "), ATF6 (del inglés "*activating transcription factor 6*") y PERK (del inglés "*double-stranded RNA-activated protein kinase-like ER kinase*") inician la UPR mediante diferentes efectores (revisado en Hetz y col. 2015) (Figura 2). PERK es una quinasa que se activa por un proceso de dimerización y autofosforilación Bertolotti y col. 2000. En su estado activado es capaz de fosforilar el factor iniciador de la traducción eIF2 $\alpha$  (del inglés "*eukariotic initiation factor 2 $\alpha$* "), inhibiendo la síntesis general de proteínas. Este evento reduce rápidamente la carga de proteínas en el lumen del RE, lo cual tiene un efecto pro-sobrevida en la célula Harding y col. 2000. La fosforilación de eIF2 $\alpha$  también promueve la traducción específica de ARNs mensajeros (mARNs) que contienen marcos abiertos de lectura de regiones 5' no traducible, dentro de los cuales se incluye el Factor Activador de la Transcripción 4 (ATF4, del inglés "*activating transcription factor 4*"). ATF4 controla la expresión de genes involucrados en el metabolismo redox, el metabolismo de aminoácidos, junto con la expresión de chaperonas y foldasas del RE (Harding y col. 2000; Lange y col. 2008).

Bajo condiciones de estrés de RE prolongado o crónico ATF4 también puede regular la expresión de genes pro-apoptóticos, entre los cuales encontramos los factores de transcripción CHOP (del inglés "*CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein*") y GADD34 (del inglés "*growth arrest and DNA damage-inducible protein*") (Rutkowski y col. 2006; Tabas y Ron 2011). GADD34 participa a su vez en un circuito de retroalimentación negativa, desfosforilando a eIF2 $\alpha$  (Novoa y col. 2001; Tsaytler y Bertolotti 2013).



**Figura 2. Respuesta a proteínas mal plegadas (UPR).** Cuando se produce una acumulación de proteínas mal plegadas en el lumen del RE se desencadena la activación de los sensores IRE1 $\alpha$ , PERK y ATF6 por la liberación de la proteína represora BiP. Una vez activo IRE1 $\alpha$  dimeriza y se autotransfosforila activando su dominio ARNasa a partir del cual se produce el procesamiento del ARNm de *xbp1*, dando como resultado el factor transcripcional (XBP1s) que regula la expresión genes blanco de la UPR. Por su parte la activación de PERK inhibe la traducción global de proteínas a partir de la fosforilación del factor iniciador de la traducción eIF2 $\alpha$ . pelf2 $\alpha$  permite la traducción del ARNm del factor transcripcional ATF4, promoviendo la expresión de genes relacionados con el plegamiento de proteínas, el estado redox celular y la apoptosis, entre otros. En condiciones de estrés de RE, ATF6 sufre un procesamiento en el aparato de Golgi, liberando su dominio citoplasmático que corresponde a un factor transcripcional activo que transloca al núcleo y regula de manera positiva la expresión de chaperonas del RE y genes involucrados en la degradación de proteínas asociada al RE (ERAD). Figura adaptada de "An ERcentric view of Parkinson's disease" Mercado y col. 2013.

En resumen, la señalización mediada por el sensor PERK tiene dos posibles efectos, pro-sobrevivida o pro-apoptótico, dependiendo de la intensidad y la duración del estrés de RE, operando como un regulador de la homeostasis proteica y el destino celular. En la próxima sección haremos un resumen de la evidencia actual que vincula el estrés de RE con la fisiopatología de la EP.

## **2.2. El estrés de RE y la EP.**

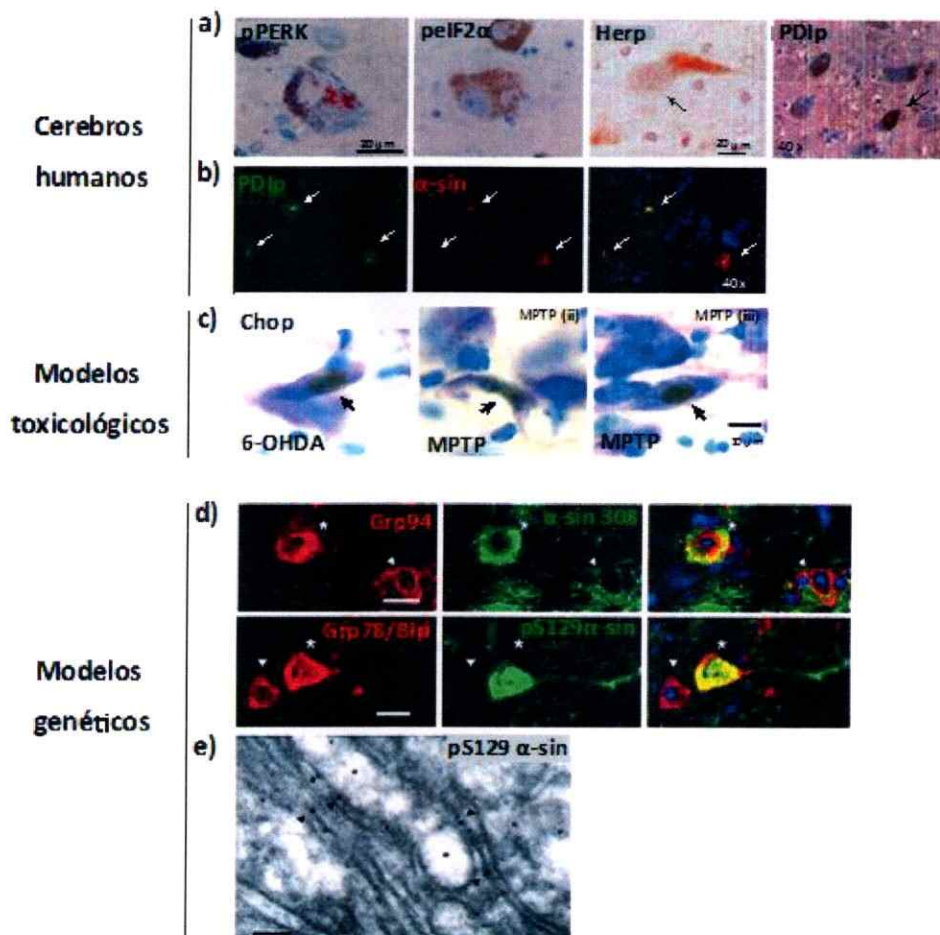
A pesar de que se desconoce la secuencia exacta de eventos moleculares que conducen a la muerte selectiva de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc y la formación de cuerpos de Lewy observadas en la EP, reportes recientes provenientes de distintos laboratorios indican que el estrés de RE tendría una contribución importante en esta enfermedad (revisado en Mercado y col. 2013).

Un estudio genómico en levaduras reveló que uno de los principales blancos de interacción de la proteína  $\alpha$ -sin sería la proteína Rab1, un componente esencial en la maquinaria de tráfico entre el RE y el aparato de Golgi (Cooper y col. 2006; Gitler y col. 2008). Así, la sobreexpresión de Rab1 en modelos animales de la EP reduce los niveles de estrés y protege las neuronas dopaminérgicas contra la degeneración inducida por la proteína  $\alpha$ -sin (Coune y col. 2011).

Por otro lado, estudios realizados a partir de células madres pluripotentes inducidas (iPSc, del inglés "*induced pluripotent stem cells*") derivadas de pacientes con la EP indican que el estrés de RE es un marcador característico de la enfermedad (Chung y col. 2013). Se ha descrito que la sobre-expresión de  $\alpha$ -sin mutante es capaz desencadenar un estrés de RE crónico e inducir apoptosis *in vitro*, posiblemente debido a un bloqueo en el tráfico vesicular entre el RE y el aparato de Golgi. El estrés de RE

inducido por  $\alpha$ -sin se observa antes que cualquier otro signo detectable de disfunción mitocondrial (revisado en Mercado y col. 2013). Estudios *in vivo* demuestran que existe una asociación molecular entre los agregados de  $\alpha$ -sin y la chaperona del RE, BiP (del inglés "*binding immunoglobulin protein*"), lo que sugiere un impacto directo sobre la función del RE y su respuesta a condiciones de estrés (**Figura 3d**) (Colla y col. 2012a; Colla y col. 2012b). Es más, la sobreexpresión de BiP protege frente a la degeneración mediada por  $\alpha$ -sin, reduciendo los niveles de estrés de RE (Gorbatyuk y col. 2012; Salganik y col. 2015). Adicionalmente, un estudio reciente utilizando un modelo celular de la EP en conjunto con ensayos de reconstitución bioquímica demostró que  $\alpha$ -sin inhibe el procesamiento de ATF6 lo que perjudica la señalización mediada por este sensor. Esta condición es acompañada por una disminución de la función de ERAD y un incremento en la vía pro-apoptótica, lo que sugiere que esta vía se encontraría alterada en esta patología (Credle y col. 2015).

Existen varios trabajos que vinculan alteraciones de la vía secretora con otros genes asociados a la EP, como por ejemplo; LRRK2, Parkina, Pael-R, DJ-1, ATP13A2 (revisado en Mercado y col. 2013) y VPS35 (Zimprich y col. 2011). Estos reportes sugieren que disfunciones a nivel de la vía secretora son características de la EP, las cuales pueden converger en niveles de estrés de RE patológicos, contribuyendo a la etiología de la enfermedad.



**Figura 3. Estrés de RE y activación de la UPR en tejido *post mortem* y en modelos animales de la EP.** **a)** Inmunohistoquímica contra pPERK, pEIF2α, Herp y PDIp en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc de pacientes con la EP. Las flechas indican neuronas positivas para el marcador analizado. **b)** Co-localización (amarillo) de las proteínas α-sin (rojo) y PDIp (verde) en cuerpos de Lewy (flechas) presentes en la SNpc de tejido *post mortem* proveniente de individuos con la EP. **c)** Inmunohistoquímica contra CHOP en la SNpc de ratones silvestres adultos inyectados con la neurotoxina 6-OHDA o MPTP. **d)** Inmunofluorescencia de las chaperonas Grp94 o Grp78/Bip (ambas en rojo) en neuronas que presentan depósitos de α-sin (verde) provenientes de la corteza de ratones transgénicos para α-sin A53T. Se observa la codistribución (amarillo) de Grp94 o Grp78 con pS129/α-sin o α-sin 308 según se indica. Los núcleos fueron marcados con la sonda fluorescente DAPI. **e)** Microscopía electrónica que muestra la detección de pS129/α-sin mediante una inmuno-oro de cortes de médula espinal de ratones transgénicos que expresan la forma mutante A53T de α-sin. Figura adaptada de la revisión "An ERcentric view of Parkinson's disease" Mercado y col. 2013.

Por otra parte, en modelos toxicológicos que intentan recapitular los marcadores histopatológicos de la EP se ha visto una clara activación de la UPR y se sugiere que CHOP y ATF6 tienen un papel funcional en el control de la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas *in vivo* (Silva y col. 2005; Egawa y col. 2011; Hashida y col. 2012). Más importante aún, en tejidos *post mortem* derivados de pacientes con la EP se ha descrito inmunoreactividad positiva para algunos marcadores de la UPR tales como PERK y eIF2 $\alpha$  fosforilados en neuronas dopaminérgicas de la SNpc (Figura 3a), junto con agregados de la proteína  $\alpha$ -sin (Hoozemans y col. 2007), lo que sugiere la activación de la UPR en neuronas dopaminérgicas que presentan inclusiones de  $\alpha$ -sin.

Otros estudios en tejido *post mortem* de pacientes con la EP dan cuenta de la inducción de proteínas que participan en la UPR en la SNpc de pacientes, como PDIp (del inglés "pancreatic protein disulfide isomerase"), Herp (del inglés "homocysteine-induced endoplasmic reticulum protein") y BiP (Figura 3a). Estas proteínas además co-localizan con los cuerpos de Lewy presentes en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc de pacientes con la EP (Conn y col. 2004; Slodzinski y col. 2009; Selvaraj y col. 2012) lo cual representa otra evidencia que sugiere que las neuronas vulnerables de esta patología presentarían signos de estrés de RE. En conjunto estos hallazgos sugieren que el estrés de RE es una característica común en casos esporádicos y genéticos de la EP, lo cual abre camino a posibles aplicaciones terapéuticas basadas en la modulación de la UPR.

La mayoría de la evidencia que relaciona el estrés de RE con la EP proviene de estudios *in vitro*, es por ello que se requieren estudios en modelos genéticos o farmacológicos de la EP para definir el impacto de la manipulación de los componentes

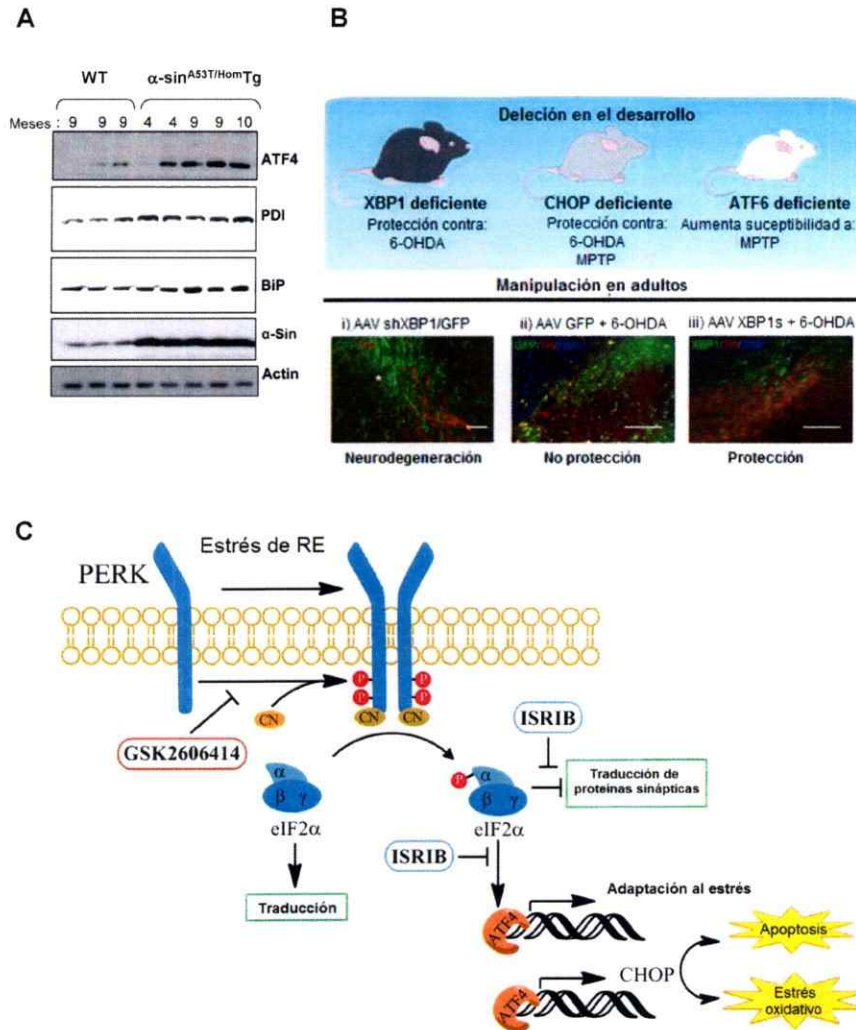
de la UPR en esta enfermedad *in vivo*. Para evaluar la posible contribución de la UPR en la EP en nuestro laboratorio se han monitoreado los niveles de estrés de RE en tejido cerebral de ratones transgénicos  $\alpha$ -sin<sup>A53T</sup>. En estas muestras se observa la inducción de los marcadores de estrés de RE, ATF4, PDI y BiP (**Figura 4A, datos no publicados**). En la siguiente sección se detallan otros estudios en los cuales se ha evaluado la manipulación de componentes de la UPR en modelos de la EP.

### **2.3. Manipulación de componentes de la UPR en modelos animales de la EP.**

En el contexto de la EP, sólo existen unos pocos estudios en los cuales se ha manipulado genéticamente componentes claves de la UPR. Por ejemplo animales nulos para ATF6 $\alpha$  muestran un incremento en la acumulación de inclusiones positivas para ubiquitina así como también una pérdida exacerbada de neuronas dopaminérgicas inducida por la neurotoxina parkinsoniana MPTP (**Figura 4B, arriba**) (Egawa y col. 2011).

A pesar de que ATF6 no es esencial para el desarrollo y la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas en ratones, este sensor de estrés controla los niveles de la chaperona BiP y componentes del ERAD (del inglés "*endoplasmic-reticulum-associated protein degradation*") en condiciones basales (Egawa y col. 2011). Interesantemente, un estudio reciente determinó que ATF6 es un blanco directo de la proteína  $\alpha$ -sin. En este trabajo se muestra que la expresión de  $\alpha$ -sin inhibe el procesamiento de ATF6 a través de una interacción física directa, alterando la regulación de genes de la ERAD, lo cual aumenta la susceptibilidad celular a la apoptosis (Credle y col. 2015).





**Figura 4. Manipulación de la UPR en modelos de la EP. (A)** Western blot que muestra los niveles de expresión de BiP, PDI, ATF4, α-sinucleína (α-Sin) y actina en ratones transgénicos α-sin<sup>A53T</sup> en etapa pre-sintomática (4 meses) y sintomática (9 meses). **(B, arriba)** Manipulación de la UPR en el desarrollo; animales deficientes para XBP1, CHOP y ATF6 fueron evaluados en modelos toxicológicos de la EP. **(B, abajo)** Manipulación de la UPR en adultos: ratones silvestres inyectados en la SNpc con (i) AAV que expresa un shRNA contra XBP1 (shXBP1/GFP), (ii) sólo EGFP o (iii) AAV que sobreexpresa XBP1s. Un mes después de la inyección, se indujo Parkinson experimental usando el modelo de 6-OHDA para monitorear la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la SNpc. En verde: células transducidas con AAV expresando GFP. En rojo: neuronas dopaminérgicas marcadas con anti-tirosina hidroxilasa (TH). Barra de escala: 200 μm. Imagen modificada de Mercado y col. 2015. **(C)** Representación esquemática de la vía de señalización de PERK y los puntos de inhibición de las moléculas GSK e ISRIB.

Adicionalmente, se ha visto que la delección del factor proapoptótico CHOP protege las neuronas dopaminérgicas contra la toxicidad inducida por 6-OHDA y MPTP en ratones (**Figura 4B, arriba**) (Silva y col. 2005).

Nuestro laboratorio ha contribuido en gran medida a definir el impacto del estrés RE en diversas enfermedades neurodegenerativas utilizando modelos de ratón y la manipulación genética de esta vía, incluyendo la ELA, la enfermedad de priones, la EH, y el daño de la médula espinal (Torres y col. 2012; Valenzuela y col. 2012; Vidal y col. 2012; Zuleta y col. 2012; Matus y col. 2013a; Valdes y col. 2014). Recientemente hemos reportado una serie de estudios *in vivo* con el fin de dilucidar la importancia de la proteína XBP1 (del inglés "*X-box binding protein 1*"), un factor transcripcional de la UPR, en el control de la sobrevivencia de las neuronas dopaminérgicas (Valdes y col. 2014). En este estudio se encontró que la delección de *Xbp1* en el sistema nervioso de ratones durante el desarrollo protege las neuronas dopaminérgicas, contra la neurotoxina parkinsoniana 6-OHDA (**Figura 4B, arriba**). Este aumento en la sobrevivencia fue asociado a un efecto de pre-acondicionamiento como resultado de la inducción de una respuesta adaptativa de estrés de RE en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc y no en otras regiones del cerebro. En contraste, el silenciamiento de XBP1 en animales adultos indujo un estrés de RE crónico y degeneración espontánea de las neuronas dopaminérgicas. Acorde a estos hallazgos se observó que una estrategia de terapia génica en la cual se sobreexpresa la forma activa XBP1 (XBP1s) directamente en la SNpc mediante el uso de vectores virales adeno-asociados (AAVs, del inglés "*adeno-associated virus*") proporciona neuroprotección y reduce la denervación estriatal en animales adultos inyectados con 6-OHDA (Valdes y col. 2014) (**Figura 4B, abajo**). De manera similar, reportes previos también indican que la sobreexpresión de *Xbp1s*

también protege las neuronas dopaminérgicas contra los efectos de la toxina parkinsoniana MPTP (Sado y col. 2009). Estos resultados destacan la importancia de XBP1 en la mantención funcional y viabilidad de las neuronas dopaminérgicas, reforzando el concepto de que el estrés de RE es un factor determinante en la vulnerabilidad neuronal diferencial característica de la EP.

#### **2.4. Rol de PERK en enfermedades neurodegenerativas.**

Adicionalmente a la información proporcionada anteriormente que postula la manipulación de UPR como posible blanco terapéutico para la EP, actualmente se ha abierto una nueva ventana terapéutica basada en la modulación de la vía de la UPR mediada por el sensor PERK. De este modo se encuentran disponibles numerosas estrategias para modular la señalización de esta rama de la UPR en el contexto de diferentes enfermedades neurodegenerativas, incluyendo inhibidores de la actividad de PERK, inhibidores de las fosfatasa de eIF2 $\alpha$  e inhibidores de ATF4 (revisado en Hetz y col. 2013). Por ejemplo, se ha observado que salubrinal, un compuesto que inhibe a la fosfatasa de eIF2 $\alpha$  (Boyce y col. 2005), es capaz de retardar el inicio de la enfermedad y atenuar los problemas motores en un modelo de genético de la EP que sobreexpresa la proteína  $\alpha$ -sin en la SNpc de ratas (Colla y col. 2012a). Inesperadamente, a pesar de que el tratamiento con salubrinal atenúa los síntomas de la enfermedad su administración no protege las neuronas dopaminérgicas de la degeneración inducida en este modelo (Colla y col. 2012a).

En los últimos 2 años nuevos estudios postulan que la rama de señalización PERK/ATF4 sería un blanco interesante para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas (Halliday y col. 2014). Por ejemplo, se ha visto que en la ELA, la

activación de PERK tiene consecuencias duales en la enfermedad (Matus y col. 2013b; Matus, Valenzuela y col. 2013). Por una parte se ha descrito que la deficiencia de ATF4 reduce la tasa de nacimiento en el modelo de ratón transgénico SOD1<sup>G86R</sup> (un modelo clásico de la ELA) y por otro lado protege contra la progresión de la patología en aquellos animales que logran nacer, posiblemente debido a un incremento en la supervivencia de las motoneuronas (Matus y col. 2013a).

En este escenario se encuentran disponibles nuevas herramientas para evaluar los efectos de la inhibición de la vía de PERK a distintos niveles en modelos de la EP. Recientemente se han publicado varios estudios que muestran que es posible manipular la actividad de PERK mediante la utilización de drogas que inhiben algún componente de esta vía de señalización de la UPR y que esta manipulación farmacológica tiene efectos neuroprotectores en diferentes modelos experimentales. Una de estas drogas, GSK2606414 (GSK), se identificó como una molécula que inhibe la fosforilación de PERK (Axtén y col. 2012) (Figura 4C). Esta molécula resultó ser activa oralmente Moreno y col. 2013 y efectiva en modelos de cáncer (ver detalles de su farmacocinética y descripción completa en (Axtén y col. 2012; Atkins y col. 2013). Adicionalmente, se ha demostrado que la presencia de Priones patogénicos es capaz de inducir la fosforilación de eIF2 $\alpha$  de manera sostenida, reprimiendo la traducción de proteínas sinápticas que se sintetizan a través de la vía secretora ER/Golgi (Moreno y col. 2012). Y se ha postulado que posiblemente este evento sería responsable del deterioro neurológico y conductual que se observa en la enfermedad de Prion (Moreno y col. 2012). En concordancia con estos hallazgos, se ha observado que la administración oral de GSK previene esta represión traduccional,

proporcionando protección contra Priones tanto a nivel conductual como histopatológico (Moreno y col. 2013).

Otro estudio reciente, en el cual se utilizó un reportero ATF4-luciferasa, se identificó una molécula que inhibe los efectos de la fosforilación de eIF2 $\alpha$ , sin afectar directamente su fosforilación (Sidrauski y col. 2013). A este compuesto se le denominó ISRIB (del inglés "*integrated stress response inhibitor*") y ha demostrado ser inocuo en ratones, presentando propiedades farmacocinéticas favorables (ver descripción detallada en Sidrauski y col. 2013). Se ha descrito que cuando eIF2 $\alpha$  es fosforilado se convierte en un inhibidor competitivo del intercambiador de nucleótidos eIF2B, inhibiendo la actividad de este complejo y con ello la síntesis proteica general. ISRIB revierte este efecto de la fosforilación de eIF2 $\alpha$ , inhibiendo la interacción efectiva entre eIF2B y p-eIF2 $\alpha$ , lo que tiene como consecuencia la restauración de la síntesis general de proteínas y la inhibición de la traducción de ATF4, sin afectar la activación de PERK (Sidrauski y col. 2013; Sekine y col. 2015) (Figura 4C). Basado en reportes previos que indican que la fosforilación de eIF2 $\alpha$  y la expresión de ATF4 de manera sostenida tendrían un efecto negativo en el aprendizaje (Costa-Mattioli y col. 2009), en este estudio se probó que ISRIB produce una mejora en el aprendizaje y la memoria de ratones. Este resultado concuerda con un estudio reciente en el cual se demostró que la deficiencia de PERK en el cerebro en un modelo genético de la EA en ratones protege contra el deterioro de la memoria (Ma y col. 2013). Adicionalmente, se encontró que el tratamiento ISRIB previene la represión traduccional inducida por Priones (Halliday y col. 2015), proporcionando protección tanto a nivel conductual como histopatológico, sin los efectos secundarios tóxicos en

páncreas que se observa con el tratamiento con GSK (Moreno y col. 2013). No obstante, estas moléculas aún no han sido probadas en modelos de la EP.

La evidencia presentada sugiere que la inhibición de la señalización de PERK tendría potenciales aplicaciones terapéuticas para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como la EP. Por las razones antes mencionadas resulta muy interesante evaluar el efecto de la inhibición farmacológica de la vía de PERK en un modelo pre-clínico de la EP. En este trabajo se evaluó el efecto de la regulación de la vía de señalización de PERK en el desarrollo de la EP experimental. Para esto se utilizó un modelo farmacológico de la EP basado en la inyección de la neurotóxina 6-OHDA, seguida por la inhibición farmacológica la vía de PERK a distintos niveles utilizando los compuestos GSK e ISRIB, para luego analizar su efecto a nivel histopatológico y motor. El objetivo de esta tesis fue evaluar la posible contribución terapéutica de la inhibición de la vía de PERK en la EP *in vivo*.

### 3. HIPÓTESIS.

La inhibición de la vía de señalización de la UPR mediada por PERK protege frente a la degeneración inducida por la neurotoxina 6-OHDA en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc.

### 4. OBJETIVOS.

**4.1 Objetivo general:** Definir el posible efecto terapéutico de bloquear la vía de señalización de PERK en el desarrollo de la EP usando el modelo toxicológico de 6-OHDA.

#### 4.2 Objetivos específicos.

**Objetivo específico 1:** Definir el impacto terapéutico de inhibir los efectos de la fosforilación de eIF2 $\alpha$  con el compuesto ISRIB en un modelo toxicológico de la EP.

**Objetivo específico 2:** Evaluar los posibles efectos terapéuticos de inhibir la actividad de PERK con el compuesto GSK en un modelo toxicológico de la EP.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Modelo de 6-OHDA.

#### 5.1.1. Inyecciones estereotáxicas de 6-OHDA.

Previo a la inyección estereotáxica, ratones C57BL/6 de 90 días de edad se anestesiaron con una mezcla de ketamina/xilacina (ketamina: 100 mg/Kg, xilacina: 10 mg/Kg, Vetcom, Chile) mediante inyección intraperitoneal. Transcurridos 5-10 min post anestesia o en su defecto, hasta que el animal estuviera completamente insensibilizado, se posicionó al animal en el aparato de estereotaxis para ratones (David Kopf Instruments, USA). Se realizaron inyecciones estereotáxicas unilaterales en el cuerpo estriado derecho utilizando una jeringa Hamilton (Hamilton, USA) de 5  $\mu$ l, según el atlas de cerebro de ratón de Franklin y Paxinos (segunda edición, 2001), de acuerdo a las siguientes coordenadas: AP: +0,07 cm, ML: -0,17 cm y DV: -0,31 cm. La inyección consistió en 8  $\mu$ g de 6-OHDA (Sigma-Aldrich, USA) a una concentración de 4  $\mu$ g/ $\mu$ l en ácido ascórbico al 0,02% (Sigma-Aldrich, USA).

Para llegar a la coordenada DV: -0,31 cm se introdujo la jeringa a una velocidad de 0,05 cm/min. Una vez posicionada la aguja en las coordenadas, se inyectaron 2  $\mu$ l de esta disolución, protegida de la luz y preparada el día de la inyección, en un punto único del cuerpo estriado a una velocidad de 0,5  $\mu$ l/min. Después de vaciar el volumen establecido la aguja se retuvo en el sitio durante 5 min con el fin de evitar el retorno del líquido inyectado. Finalmente, la aguja se retiró a una velocidad de 0,1 cm/min. Los



ratones se eutanasiaron 7 o 21 días post inyección para el análisis histológico o bioquímico.

### **5.1.2. Inmunohistoquímica anti-Tirosina Hidroxilasa.**

Siete o 21 días post-inyección, los ratones se anestesiaron tal y como se describió previamente y luego se perfundieron con cloruro de sodio 0,9% y PFA al 4% utilizando una bomba peristáltica. Se removió el cerebro y se incubó en PFA al 4% por 12 h a 4 °C. Posteriormente éste se deshidrató en sacarosa al 30% 0,02% azida de sodio durante 48 h a 4 °C, cambiando por solución fresca a las 24 h.

Los cerebros se incluyeron en medio de congelamiento OCT (del inglés, "*optimal cutting temperature compound*", Tissue-Tek, USA) y utilizando un criostato (Leica, Alemania) se realizaron cortes coronales seriados, de 25 µm de espesor que comprendieron tanto la zona del cuerpo estriado como de la SNpc. Se colectaron los cortes en PBS con azida de sodio al 0,02% en placas de 48 pocillos.

A continuación se realizó una inmunohistoquímica (IHQ) para el marcador dopaminérgico tirosina hidroxilasa (TH), en cortes flotantes seleccionados cada 100 µm para abarcar completamente desde anterior a posterior tanto la SNpc como el cuerpo estriado. Primero se realizaron 3 lavados de 5 min en PBS para remover la azida de sodio y luego los cortes se incubaron con la solución inactivadora de la peroxidasa endógena (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,03% en PBS) durante 30 min a temperatura ambiente y en agitación. Luego los cortes se incubaron con una solución de bloqueo (BSA al 5% y Tritón X-100 al 0,2% en PBS) durante 1 h a temperatura ambiente y agitación. Finalmente los cortes se incubaron con el anticuerpo anti-TH (1:2500 para el cuerpo estriado y 1:5000 para la SNpc, Calbiochem, USA) durante 16 h a 4 °C en agitación. Al

día siguiente los cortes se lavaron en PBS 3 veces por 5 min e incubados con el anticuerpo secundario biotinilado (IgG-biotina 1:500, Vector Laboratories, USA) durante 2 h a temperatura ambiente en agitación. A continuación se realizaron 3 lavados de 5 min y se incubaron los cortes con el complejo avidina-biotina conjugado a peroxidasa (1:1000, Vector Laboratories, USA) por 1 h a temperatura ambiente y en agitación. Luego de 3 lavados de 5 min se reveló utilizando el compuesto 3,3-diaminobenzidina (Sigma-Aldrich, USA). Para el caso de la SNpc los cortes se incubaron con este reactivo por un tiempo aproximado de 1-2 min y para el cuerpo estriado por alrededor de 3 min. Los cortes obtenidos se montaron en porta objetos y se sellaron utilizando el medio de montaje Entellan (Sigma-Aldrich, USA).

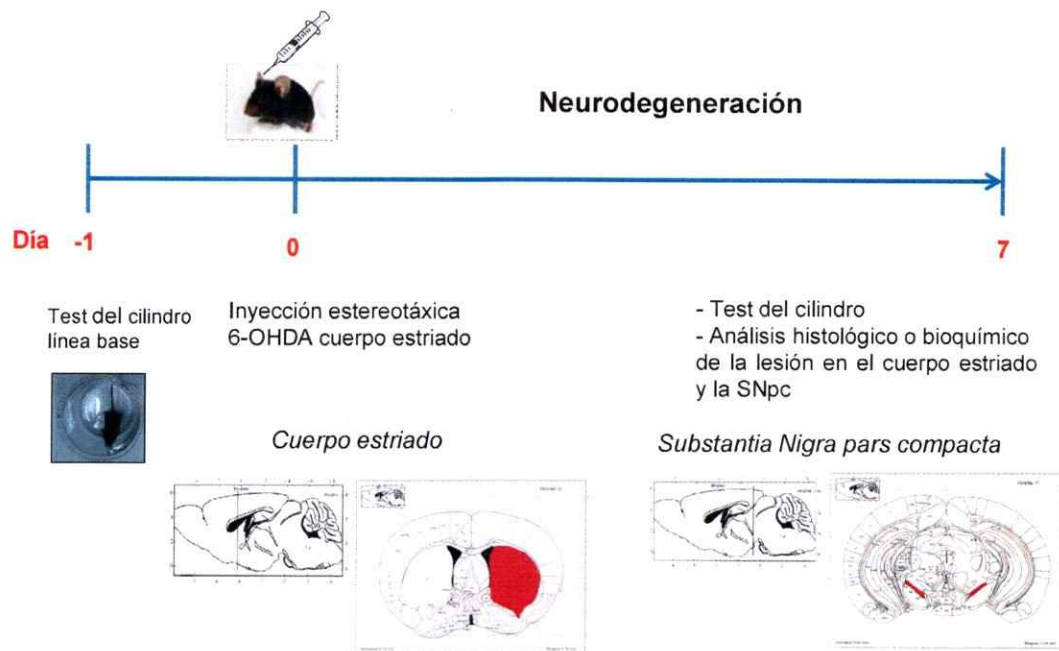
#### **5.1.3. Cuantificación de somas TH positivos de la SNpc y terminales axonales dopaminérgicos del cuerpo estriado.**

Para la zona del cerebro medio, en la cual se encuentra ubicada la SNpc, se seleccionaron 12 cortes seriados de 25  $\mu\text{m}$  de espesor y separados cada 100  $\mu\text{m}$  para cada animal. Luego de la IHQ anti-TH los cortes se analizaron bajo un microscopio usando un ocular micrométrico graduado. El conteo de somas TH positivos ( $\text{TH}^+$ ) en la SNpc se llevó a cabo de manera manual para cada corte de la serie tanto en el hemisferio inyectado como en el no inyectado, diferenciándose este último del anterior por una marca realizada con una aguja al momento del corte en el criostato. En las cuantificaciones se consideró sólo el área de la SNpc, descartándose los somas  $\text{TH}^+$  de la SN pars reticulata y de la zona del VTA (del inglés "*ventral tegmental area*"). Todas las cuantificaciones se realizaron a ciegas. Los resultados se graficaron como el porcentaje de pérdida promedio de somas  $\text{TH}^+$  en la SNpc en el lado inyectado con respecto al lado no inyectado.

Para la cuantificación de los terminales axonales dopaminérgicos en el cuerpo estriado de los ratones inyectados con 6-OHDA, luego de la IHQ anti-TH los cortes seriados se escanearon en el escáner Epson Stylus CX5600, en escala de grises, formato TIF y con una resolución de 2400 bps. A continuación las imágenes fueron analizadas con el programa computacional ImageJ (NIH software, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) y fue calculada la densidad integrada del área del cuerpo estriado, determinada por la marca TH, tanto para el lado no inyectado como para el lado inyectado de cada corte por animal. La tinción inespecífica fue restada, considerando el área específica del cuerpo estriado por cada corte. Posteriormente fue realizada la sumatoria de las densidades integradas por lado de todos los cortes para cada animal y fue calculada la pérdida de los terminales axonales TH<sup>+</sup> por animal en el lado inyectado con respecto al lado control no inyectado. Los resultados fueron graficados como el promedio del porcentaje de pérdida de los terminales axonales TH<sup>+</sup> con respecto al lado no inyectado. Un resumen general del procedimiento completo de este modelo se muestra en la **Figura 5**.

## **5.2. Tratamiento con ISRIB o GSK.**

Los compuestos ISRIB y GSK fueron proporcionados por nuestros colaboradores; Dr. Peter Walter (UCSF, USA) y Dr. Jeffrey Axten (GlaxoSmithKline, USA), respectivamente.



**Figura 5. Modelo de la EP de 6-hidroxidopamina.** La línea temporal se basa en la inyección de la neurotoxina 6-OHDA (día 0), la cual se realizó en ratones C57BL/6 adultos de 90 días. Previo a la inyección estereotáxica de 6-OHDA en el cuerpo estriado, se realizó el test de comportamiento del cilindro (Día -1) en estos mismos animales con el fin de cuantificar asimetrías motoras basales, este análisis se asignó como línea base. Transcurridos 7 días después de la inyección estereotáxica de 6-OHDA en el cuerpo estriado el test del cilindro se realizó nuevamente en estos animales y a continuación se procedió con el análisis histológico o bioquímico según fuera el caso.



### 5.2.1. Preparación de ISRIB o GSK.

El compuesto ISRIB se disolvió en DMSO y luego se mezcló con polietilenglicol (PEG) 400 (1:1). El compuesto se inyectó intraperitonealmente (i.p.) 2,5  $\mu$ L por g de peso para una concentración final de [2,5 mg/Kg] o [5 mg/Kg] según correspondiera.

El compuesto GSK se disolvió en el vehículo (HPMC 0,5% + Tween-80 0,1% en agua, pH 4,0) a una concentración de [15 mg/ml] o [5 mg/ml]. El compuesto se administró por "gavage" oral en un volumen de 10  $\mu$ L/g de peso para una concentración final de [150 mg/kg] o [50 mg/kg] según correspondiese. Se resuspendió la droga en el vehículo adicionando gradualmente la cantidad deseada y agitando constantemente a temperatura ambiente por al menos 2 h. Se preparó suficiente para 7 días. Se almacenó a temperatura ambiente para evitar su precipitación hasta su uso.

### 5.2.2. Controles con tunicamicina.

Con el fin de determinar la actividad de los compuestos ISRIB o GSK *in vivo* en la substantia nigra, se realizaron controles con el estresor de RE tunicamicina (Tm), el cual inhibe la glicosilación de proteínas induciendo la UPR. Para esto se hizo un pretratamiento con ISRIB o GSK. En el caso de ISRIB se realizaron inyecciones i.p. día por medio durante una semana hasta el día de la inyección estereotáxica de Tm (10  $\mu$ g) directamente en la SNpc. En el caso de GSK, se hizo un pretratamiento administrando el compuesto de manera oral dos veces al día, 1 día antes de la inyección de Tm y el mismo día de la inyección estereotáxica de Tm (10  $\mu$ g) directamente en la SNpc. Para ambos casos los animales se eutanasiaron 24 h después de la inyección de Tm para su análisis.

### **5.2.3. Tratamiento con ISRIB o GSK en el modelo de 6-OHDA.**

Ratones C57BL/6 de aproximadamente 90 días de edad se inyectaron mediante estereotaxis en el cuerpo estriado con 6-OHDA tal y como se describió en el modelo de 6-OHDA. A partir del mismo día de la inyección de 6-OHDA se realizó el tratamiento con ISRIB o GSK. En el caso de ISRIB el tratamiento consistió en inyecciones i.p. a una concentración de [5 mg/Kg] día por medio a partir del día de la inyección de 6-OHDA como se muestra en la **Figura 8A**. El tratamiento con GSK se llevó a cabo mediante "gavage" oral 10  $\mu$ L/g de ratón a una concentración [150 mg/kg] o [50 mg/kg] según correspondiese, dos veces al día todos los días a partir del día de la inyección de 6-OHDA como se muestra en la **Figura 14A**. Los animales se eutanasiaron 7 o 21 días después de la inyección de 6-OHDA para el análisis histológico tal y como se describió en el modelo de 6-OHDA.

### **5.3. Análisis bioquímico.**

#### **5.3.1. Extracción de ARN, RT-PCR y PCR en tiempo real.**

Transcurridas 24 h post inyección estereotóxica de Tm en la SNpc, los animales fueron eutanasiados mediante inhalación de CO<sub>2</sub> para la extracción de tejido de distintas áreas del cerebro. Se hicieron disecciones de las áreas de la corteza, cerebro medio ventral (que incluye a la SNpc) y cuerpo estriado, haciendo distinción entre lado inyectado y lado no inyectado en estos dos últimos tejidos. Se extrajo como control tejido de hígado. Los tejidos fueron congelados a -80 °C hasta su procesamiento. Para su homogenización estos tejidos fueron disgregados en 100  $\mu$ l de PBS frío suplementado con un cóctel de inhibidores de proteasas (Roche, Switzerland) con la ayuda de homogeneizadores mecánicos. A continuación 40  $\mu$ l del homogenizado

fueron destinados a la extracción de ARN por lo que se les adicionó 1ml del reactivo TRIzol® (Invitrogen, USA). Luego de su extracción, las muestras de ARN fueron cuantificadas y 2 µg de ARN total fue utilizado para la síntesis del ADNc a partir del kit iScript cDNA Syntesis (BioRad, USA), Buffer RT 10X, dNTPs 1 mM cada uno, partidores random p(dN)6 (Roche,Switzerland) y 1 µL de transcriptasa reversa en un volumen final de 20 µL.

El PCR en tiempo real (qPCR, del inglés "*quantitative PCR*") fue llevado a cabo empleando EvaGreen™ Dye (Biotium, USA) en una mezcla que contenía 4 µL de una dilución 1:20 del cDNA, 0,5 µL de partidores 10 µM, 10 µL de Mix 2x y 7,5 µL de agua libre de nucleasas en un volumen final de 20 µL.

Las secuencias de los partidores fueron diseñadas con el programa Primer Express (Applied Biosystems, USA) o bien obtenidas desde el Primer Data Bank (<http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/index.html>).

El programa de qPCR usado fue: 10 min a 95 °C (ciclo de denaturación), 35 ciclos de 15 s a 95 °C, 15 s a 57 °C (*annealing*), 15 s a 72 °C y 1 ciclo de 10 s a 95 °C, 5 s a 25 °C, 1 s a 70 °C y 1 s a 95 °C en el equipo ABI PRISM7700 system (Applied Biosystems).

Los niveles relativos de ARNm para cada gen de interés fueron obtenidos a partir del ciclo umbral y normalizados con los niveles de actina. El ciclo umbral de actina fue utilizado como control de amplificación.

## **5.4. Análisis histológico.**

### **5.4.1. Inmunohistoquímica anti-CHOP.**

Un día después de la inyección de Tm, los ratones se anestesiaron como se describió previamente y luego de su perfusión los cerebros se fijaron y deshidrataron.

Para analizar la expresión de la proteína CHOP, cortes coronales de 25  $\mu\text{m}$  que contenían la zona de la SNpc se incubaron en  $\text{H}_2\text{O}_2$  3%, metanol 10% en PBS por 30 min a temperatura ambiente para bloquear la peroxidasa endógena, seguido de una exposición de epítopes usando buffer citrato pH 6,0 (DAKO) por 20 min a 95 °C. Después de la incubación con la solución de bloqueo (*Goat serum* 10%, BSA 4%, Tritón X-100 0,1% en PBS) por 1,5 h a temperatura ambiente, los cortes se incubaron con el anticuerpo anti-CHOP *rabbit* (1:100, Santa Cruz) ON a 4 °C, seguido de la incubación con el anticuerpo secundario anti-*rabbit* conjugado a HRP (1:1000, Invitrogen) por 1 h a temperatura ambiente. La inmunoreactividad se reveló usando el kit DAB sustrato HRP (Vector Laboratories) usando las instrucciones del fabricante. La tinción del tejido se visualizó bajo un microscopio invertido (Olympus IX71).

### **5.4.2. Inmunohistoquímica anti-pelF2 $\alpha$ .**

Para analizar la expresión de la proteína pelF2 $\alpha$ , cortes coronales de 25  $\mu\text{m}$  que contenían la zona de la SNpc se incubaron en  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,3% en PBS por 30 min a temperatura ambiente para bloquear la peroxidasa endógena. Después de la incubación con la solución de bloqueo (BSA 1%, en PBS 0,1 M) por 2 h a temperatura ambiente, los cortes fueron incubados con el anticuerpo anti-pelF2 $\alpha$  *rabbit* (1:200, Invitrogen) ON a 4 °C en una solución que contenía BSA 1%, Tritón X-100 0,2% en PBS, seguido de la incubación con el anticuerpo secundario anti-*rabbit* conjugado a



HRP (1:500, Invitrogen) por 1 h a temperatura ambiente. La inmunoreactividad se reveló usando el kit DAB sustrato HRP (Vector Laboratories) usando las instrucciones del fabricante. La tinción del tejido se visualizó bajo un microscopio invertido (Olympus IX71).

## **5.5. Monitoreo de animales y pruebas motoras.**

### **5.5.1. Mediciones de peso corporal.**

Con el fin de monitorear la condición física de los animales a lo largo de los tratamientos con las drogas, se realizaron mediciones de peso corporal de manera regular tanto en los animales tratados con ISRIB como con GSK y sus respectivos vehículos.

### **5.5.2. Prueba motora del cilindro.**

Esta prueba se realizó previo a la inyección de 6-OHDA (línea base) y luego 1 vez a la semana hasta el día de la eutanasia. La prueba se utilizó para evidenciar, de manera espontánea, posibles daños motores asociados a la inyección de 6-OHDA. Esta prueba consistió en introducir al ratón en un cilindro de acrílico translúcido de 10 cm de diámetro y 20 cm de alto. A continuación se registró el movimiento del animal mediante una cámara filmadora durante 5 min. Posteriormente se cuantificó el número de toques realizado con cada pata delantera del animal en los 5 min de duración del video. Los análisis se realizaron a ciegas. Los resultados se graficaron como porcentaje de toques con la pata izquierda (contralateral al sitio de la inyección) respecto al número total de toques con ambas patas.

### **5.5.3. Prueba motora del “*hanging*”.**

La prueba del *hanging* nos permitió evaluar desempeño motor del animal, a nivel de balance, coordinación y fuerza muscular. Esta prueba se llevó a cabo previo a la inyección de 6-OHDA (línea base) y luego 1 vez a la semana hasta el día de su eutanasia. Los ratones se ubicaron de forma individual con sus patas delanteras sobre una barra horizontal con un largo de 39 cm y a una altura de 35 cm. Se observó en un período de 30 s grabando con una cámara de video la reacción del ratón y su posición corporal.

Esta prueba se realizó tres veces para cada ratón, durante un tiempo máximo de 30 s. Cada video se analizó para asignarle un puntaje, y se promediaron las tres mediciones por ratón. El criterio de puntuación utilizado fue: 0 cuando el ratón no pudo sostenerse en la barra por más de 10 s, 1 cuando el ratón sólo pudo mantenerse en la barra con las patas delanteras, 2 cuando el ratón pudo mantenerse con las patas delanteras y trató de usar las traseras para llegar a la barra pero sin éxito, 3 cuando utilizó las patas delanteras y pudo usar una o las dos patas traseras, 4 cuando utilizó las cuatro patas y además la cola, 5 cuando escapó activamente de la barra horizontal, hasta llegar a la barra vertical y 6 por bajar la barra vertical en un tiempo menor a 30 s.

### **5.5.4. Prueba motora del “*rotarod*”.**

La prueba motora del *rotarod* es una prueba de desempeño en la cual se utiliza una rueda giratoria con aceleración para forzar la actividad motora del roedor. En esta prueba el roedor es posicionado en una rueda giratoria orientada horizontalmente y suspendida por encima del suelo a una altura adecuada para evitar lesiones e inducir la evasión de la caída por el animal. La velocidad de rotación puede ser ajustada

manualmente y puede ser mantenido en modo constante o acelerado. Los animales tratan naturalmente de mantenerse en la rueda rotatoria para evitar la caída. La duración del tiempo en que el animal permanece en rueda sin caer es una medida de su balance, coordinación y condición física.

La prueba motora del *rotarod* (Modelo LE8500, Panlab SL) se realizó previo a la inyección de 6-OHDA (línea base) y luego 1 vez por semana la semana hasta el día de su eutanasia. Antes de hacer las mediciones de la línea base los animales se entrenaron por 4 días consecutivos con un protocolo a velocidad constante comenzando desde 4 RPM, luego 10 RPM y finalmente 15 RPM con el fin de promover su aprendizaje y equilibrio. Para las mediciones experimentales se utilizó la modalidad acelerada, donde la velocidad de la rueda giratoria se aumentó desde 4 a 40 RPM en un periodo de 2 min.

#### **5.5.5. Prueba motora del "pole".**

La prueba del *pole* permite evaluar desordenes motores en ratones que han sido dañados corticalmente. El ratón es posicionado en la cima de la barra orientada de manera vertical con la cabeza hacia arriba. El tiempo de deslizamiento por la barra es un indicativo de su condición motora. Mientras más tiempo demore en bajar por la barra hasta la superficie horizontal más daño motor. La prueba motora de *pole* se realizó previo a la inyección de 6-OHDA (línea base) y luego 1 vez por semana la semana hasta el día de su eutanasia. El parámetro que se considera es el tiempo que tarda el animal en bajar desde que se voltea hasta que toca la superficie horizontal inferior, a este tiempo se le denominó tiempo de latencia ( $T_{LA}$ ).

## **5.6. Expresión de resultados y análisis estadístico.**

Para el análisis estadístico fue utilizado el programa GraphPad Prism®. Los resultados se expresaron como el promedio por tratamiento  $\pm$  error estándar (SEM). Se utilizó la prueba t de Student, el test no paramétrico Mann-Whitney o bien un ANOVA de dos vías seguida de un post test de Bonferroni. Se consideró como límite superior de significancia estadística valores de  $p < 0,05$ .

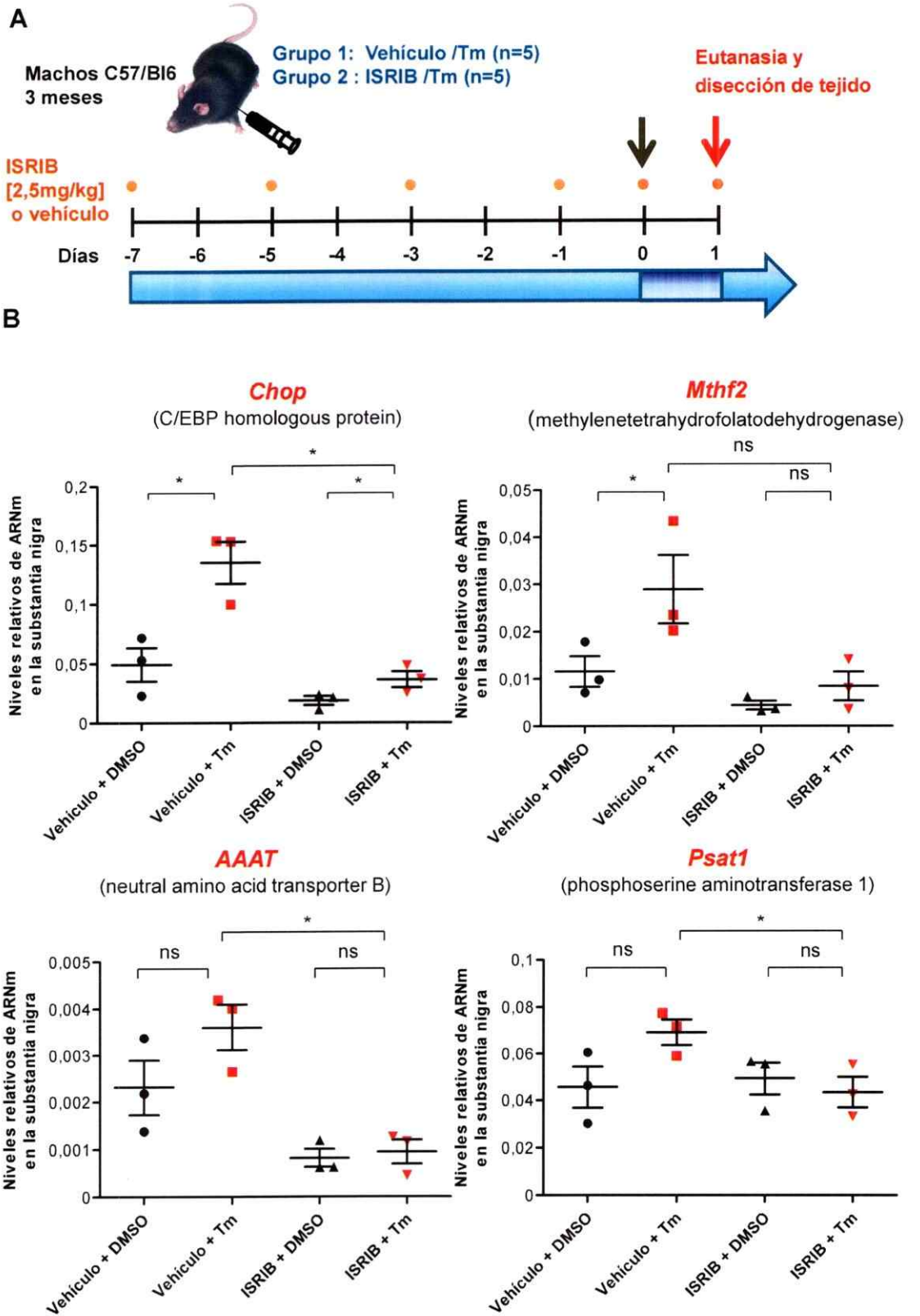
## 6. RESULTADOS

### 6.1. Análisis de la actividad de ISRIB en la SN.

Antes de evaluar el posible efecto terapéutico del compuesto ISRIB en el modelo murino de la EP, se determinó la actividad de éste en la zona de la SN. Puesto que no hay reportes de genes blancos de ATF4 que se expresen específicamente en la SNpc, se seleccionó un grupo de genes blancos del factor de transcripción ATF4 (Tabla 1) a partir de estudios previos de análisis de perfiles de expresión génica diferencial en sistemas celulares silvestres o deficientes para ATF4 (Harding y col. 2003; Lange y col.2008). Se generaron partidores para 12 de estos genes (Tabla 1) y se evaluó mediante qPCR el efecto de la administración de ISRIB cuando se indujo la UPR utilizando el estresor de RE Tm en la SNpc. En la **Figura 6A** se muestra un esquema del sistema de administración utilizado, éste consistió en la inyección intraperitoneal del compuesto ISRIB a una concentración de [2,5 mg/kg] o su vehículo día por medio durante una semana, luego de la cual se realizó una cirugía estereotáxica para inyectar la Tm directamente en la SNpc del hemisferio derecho y su vehículo DMSO SNpc del hemisferio izquierdo. Los animales se eutanasiaron 24 h después de las cirugías estereotáxicas, y se realizó una disección de la zona del cerebro medio ventral que abarca a la SNpc a partir de ambos hemisferios. En la **Figura 6B** se muestran los resultados del análisis de qPCR para los blancos que mostraron una mayor inducción en condiciones de estrés de RE y en los cuales la

**Tabla 1.** Partidores para PCR en tiempo real de los genes blancos de ATF4 seleccionados para evaluar el efecto de las moléculas ISRIB y GSK en la SN de cerebros de ratón en condiciones de estrés de RE.

Nombre	Orientación	Secuencia
<b>EIF4EBP1</b>	Sentido	GGG GAC TAC AGC ACC ACT C CTC
	Antisentido	ATC GCT GGT AGG GCT A
<b>AAAT</b>	Sentido	CAT CAA CGA CTC TGT TGT AGA CC
	Antisentido	CTG GAT ACA GGA TTG CGG TAT TT
<b>Slc3a2</b>	Sentido	TGA TGA ATG CAC CCT TGT ACT
	Antisentido	TGGCT CCC CAG TGA AAG TGG A
<b>Cpo</b>	Sentido	ACG GGC GTG TGT TTG AAA AG CAC
	Antisentido	AGA ACT TAC ACC CAT AGC AG
<b>Herp</b>	Sentido	GCA GTT GGA GTG TGA GTC G TCT
	Antisentido	GTG GAT TCA GCA CCC TTT
<b>GADD34</b>	Sentido	GAGGGACGCCCACTTC
	Antisentido	TTACCAGAGACAGGGGTAGGT
<b>Atf3</b>	Sentido	GAGGATTTTGCTAACCTGACACC
	Antisentido	TTGACGGTAACTGACTCCAGC
<b>Trb3</b>	Sentido	CCA GAG ATA CTC AGC TCC CG
	Antisentido	GAG GAG ACA GCG GAT CAG AC
<b>Psta1</b>	Sentido	AAG CCA CCA AGC AAG TGG TTA
	Antisentido	GAT GCC GAG TCC TCT GTA GTC
<b>Mthf2</b>	Sentido	AGT GCG AAA TGA AGC CGT TG
	Antisentido	GAC TGG CGG GAT TGT CAC C'
<b>Nupr1</b>	Sentido	CCC TTC CCA GCA ACC TCT AAA TCT
	Antisentido	TGG TCC GAC CTT TCC GA
<b>Chop</b>	Sentido	TGG AGA GCG AGG GCT TTG
	Antisentido	CCG CTC GTT CTC CTG CTC



**Figura 6. Validación de la eficacia de ISRIB *in vivo* en la substantia nigra.** (A) Representación esquemática del pretratamiento con ISRIB en un modelo clásico de estrés de RE inducido por tunicamicina (Tm). Ratonés silvestres C57BL/6 se sometieron a un pretratamiento con ISRIB administrado intraperitonealmente día por medio por una semana seguido de la inyección de 10  $\mu$ m de Tm directamente en la SN del hemisferio derecho y DMSO en el hemisferio izquierdo del cerebro del animal. Veinticuatro horas más tarde los animales fueron eutanasiados para la disección de tejido de cerebro medio, separando el lado inyectado del lado no inyectado con Tm. (B) Los niveles de expresión de genes blancos de ATF4, *Chop*, *Mthf2*, *AAAT* y *Psta1*, se determinaron en tejido de cerebro medio de animales tratados con ISRIB o el vehículo utilizando qPCR (n = 3 por grupo). Los resultados se presentan como el promedio y su error estándar. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney \*:  $p < 0,05$ ; ns: no significativo.

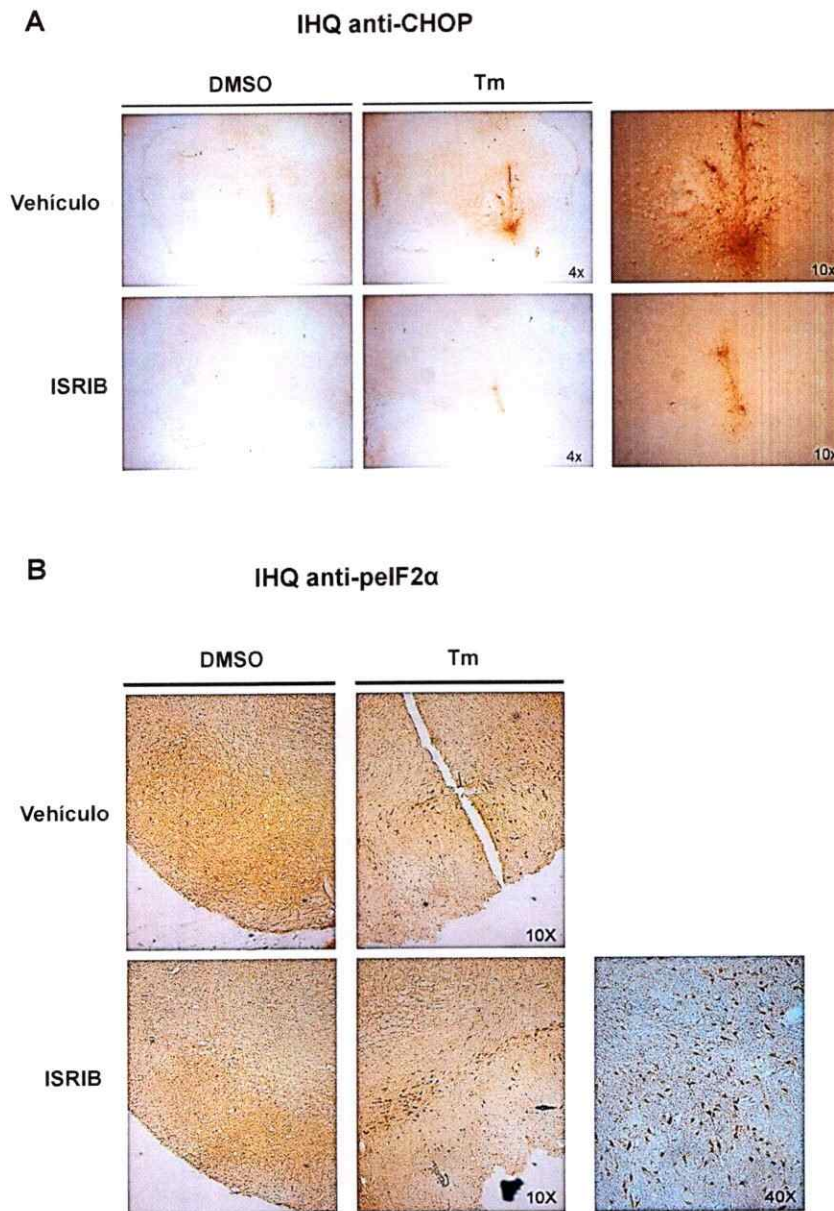
acción de la molécula ISRIB resultó significativa. Los resultados de estos análisis muestran que la administración i.p. de ISRIB a [2,5 mg/kg] inhibe la regulación transcripcional de los genes blancos de ATF4, *Chop* y *Mthf2*, bajo condiciones de estrés de RE (Figura 6B, arriba).

En cuanto a los blancos de ATF4, *AAAT* y *Psta1*, se observó un incremento no significativo en sus niveles en condiciones de estrés de RE. Sin embargo, al compararlos con el grupo tratado con ISRIB, es posible constatar niveles significativamente menores de mensajero para estos blancos (Figura 6B, abajo).

Con el propósito de hacer un análisis cualitativo de los niveles proteicos de CHOP en los animales pretratados con ISRIB o vehículo y posteriormente inyectados con Tm en la SN, se realizó una IHQ con un anticuerpo anti-CHOP en cortes de tejido de cerebro medio de estos animales que contienen la zona de la SN. La inyección de Tm produce un aumento en la inmunoreactividad del anticuerpo anti-CHOP en la SN, efecto que se observa disminuido en los animales tratados con ISRIB (Figura 7).

Para comprobar que ISRIB no afecta la fosforilación de eIF2 $\alpha$  en la SN, se realizó una análisis IHQ con un anticuerpo que reconoce la forma fosforilada de pEIF2 $\alpha$





**Figura 7. Validación de la actividad de ISRIB *in vivo* en la sustancia nigra a nivel de regulación de proteínas.** Análisis histológico de animales sometidos pretratamiento con ISRIB en un modelo clásico de estrés de RE inducido por la inyección de tunicamicina (Tm). Ratones silvestres C57BL/6 se sometieron a un pretratamiento con ISRIB administrado intraperitonealmente día por medio por una semana seguido de la inyección de 10  $\mu$ m de Tm directamente en la SN del hemisferio derecho del cerebro del animal. Veinticuatro horas más tarde se fijaron los animales para el análisis inmunohistoquímico (IHQ) utilizando anticuerpos **(A)** anti-CHOP y **(B)** contra la forma fosforilada de eIF2 $\alpha$  (p-eIF2 $\alpha$ ) en cortes de cerebro medio de ratón que contienen a la SNpc.

en cortes de cerebro medio. Como se observa en la **Figura 7B**, la inyección de Tm indujo un incremento en los niveles de la forma fosforilada de la proteína eIF2 $\alpha$  en la SN en animales tratados con el vehículo y este aumento se mantiene en aquellos tratados con ISRIB. En conjunto estos resultados nos indican que ISRIB no inhibe la fosforilación de la proteína eIF2 $\alpha$ .

Según lo descrito previamente en la literatura, el compuesto ISRIB logró inhibir los efectos de la fosforilación de eIF2 $\alpha$  sin afectar directamente su fosforilación (Sidrauski y col. 2013). Estos resultados, provenientes de un análisis sistemático y laborioso, confirman que la ruta de administración mediante inyecciones i.p. y el régimen de administración (día por medio a una concentración de 2,5 mg/kg) del compuesto ISRIB inhibe blancos de ATF4 en condiciones de estrés de RE en el cerebro, y específicamente en la SNpc, que es el área cerebral de interés para nuestro estudios posteriores.

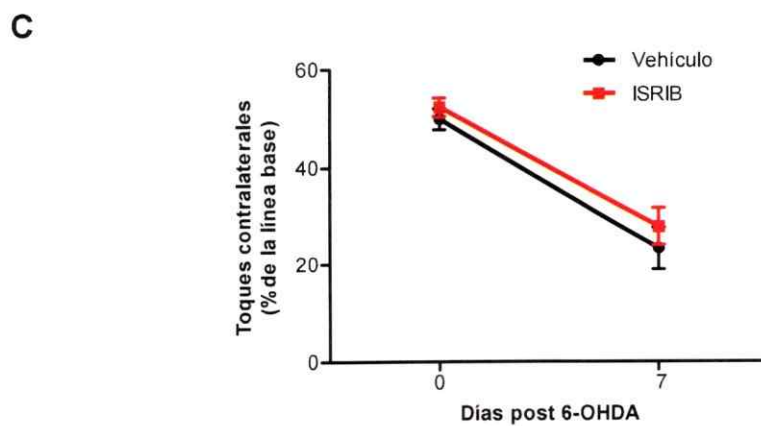
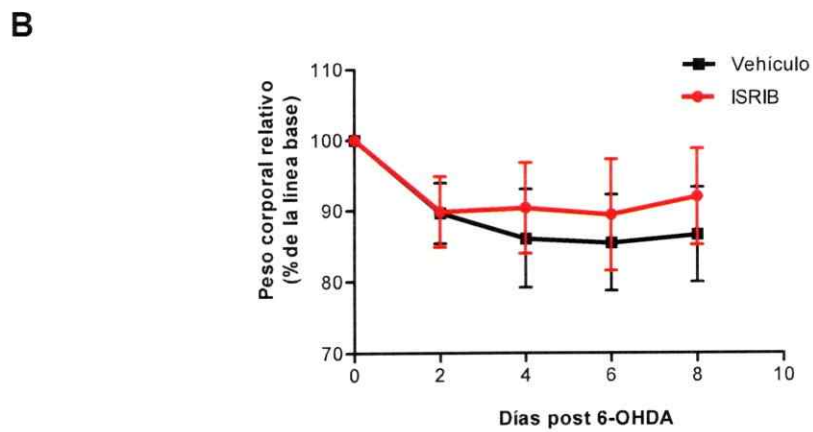
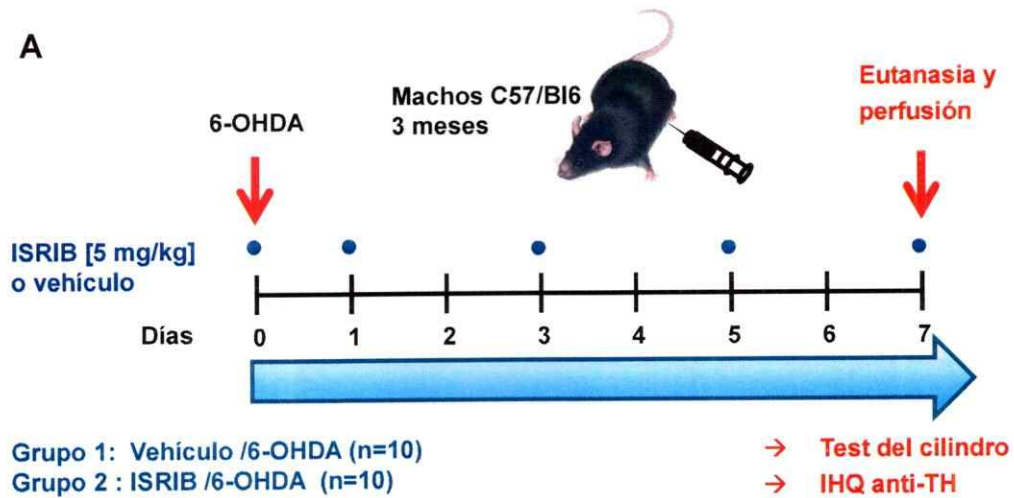
## **6.2. Efecto del tratamiento con ISRIB en un modelo toxicológico de la EP.**

Con el fin de evaluar el posible efecto terapéutico del tratamiento con el compuesto ISRIB en un modelo experimental de la EP, se realizaron inyecciones estereotáxicas de la neurotóxina 6-OHDA en el cuerpo estriado de ratones C57BL/6 machos de aproximadamente 90 días. Los animales se trataron día por medio con ISRIB [2,5 mg/kg] o su vehículo i.p. a partir del día de la inyección y se eutanasiaron 7 días después de la inyección de 6-OHDA. Puesto que con esta dosis de ISRIB [2,5 mg/kg], correspondiente a la misma dosis empleada para los experimentos controles con Tm, no fue posible observar ninguna diferencia a nivel de protección de neuronas dopaminérgicas, ni comportamiento motor (resultados no mostrados), se decidió

aumentar la dosis de ISRIB al doble [5 mg/kg] utilizando el mismo régimen de administración (**Figura 8A**). Durante el periodo de tratamiento se realizó un monitoreo diario de los animales con el fin de identificar cualquier tipo de cambio fenotípico asociado al tratamiento. El peso corporal de los animales se midió día por medio durante toda la semana de tratamiento con ISRIB o vehículo (**Figura 8B**). En las curvas de peso corporal obtenidas se observa que la inyección de 6-OHDA en el cuerpo estriado induce una pérdida significativa de peso corporal, similar en animales tratados con ISRIB o su vehículo. Del mismo modo la recuperación de peso luego de la cirugía resulta similar en ambos grupos, observándose una tendencia (no significativa) de recuperación más rápida de peso en el grupo tratado con ISRIB en comparación con el grupo tratado con vehículo.

Para evaluar el posible efecto terapéutico de ISRIB a nivel del desempeño motor en este modelo toxicológico, se utilizó la prueba del cilindro, que permite cuantificar los defectos motores hemilaterales espontáneos ocasionados por la inyección de 6-OHDA.

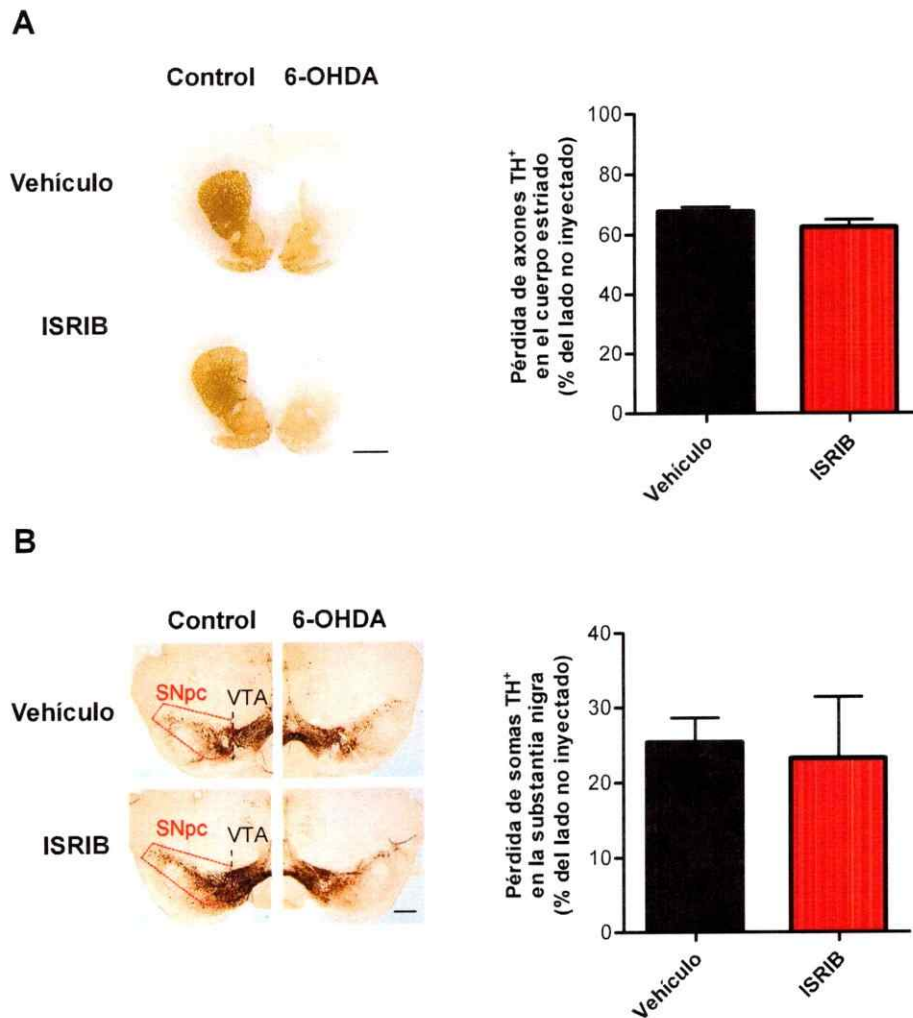
En esta prueba el animal se posiciona en un cilindro de acrílico translúcido y se cuantifica el número de veces que éste toca las paredes del cilindro con cada pata delantera (ver detalles en la sección 5.5.2. de Materiales y métodos). Un animal hemilesionado disminuye el número de toques con la pata contralateral al lado de la inyección. Como se observa en la **Figura 8C** el porcentaje de toques contralaterales disminuye desde ~50% (línea base) hasta ~25% una semana después de la inyección de la 6-OHDA, esta disminución resulta de igual magnitud en ambos grupos, el tratado con ISRIB y el con vehículo.



**Figura 8. Administración de ISRIB en un modelo toxicológico de la EP (tratamiento corto).** (A) Representación esquemática de las condiciones experimentales utilizadas para evaluar el potencial terapéutico de ISRIB contra la neurotoxina parkinsoniana 6-OHDA. Se inyectaron ratones silvestres C57BL/6 con 8  $\mu$ g de 6-OHDA en el cuerpo estriado derecho y posteriormente se trataron con ISRIB [5 mg/kg] o su vehículo día por medio durante 7 días. (B) El peso corporal se midió durante el periodo de tratamiento y en el gráfico muestra el peso corporal relativo como porcentaje del peso inicial. (C) Las asimetrías motoras espontáneas se evaluaron con la prueba del cilindro. Se cuantificó el número de toques con cada pata delantera en las paredes del cilindro. Los datos se expresan como porcentaje de toques con la pata izquierda (contralateral al sitio de inyección con la neurotoxina) respecto al número total toques con ambas patas delanteras. Los gráficos representan el promedio y error estándar por grupo ( $n=10$  por grupo). El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el test ANOVA de dos vías seguido de un post-test de Bonferroni. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos para ninguno de los tiempos analizados ( $p > 0,05$ ).

Para evaluar el efecto del tratamiento con ISRIB a nivel de la pérdida de neuronas dopaminérgicas de la SNpc se realizó un análisis IHQ con un anticuerpo anti-TH en cortes seriados de 25  $\mu$ m de espesor, cada 100  $\mu$ m abarcando la zona del cuerpo estriado y del cerebro medio. Para determinar si el tratamiento de ISRIB tiene algún efecto sobre la magnitud de la lesión provocada por la toxina 6-OHDA en los terminales axonales de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc, se cuantificó la inmunoreactividad del anticuerpo anti-TH en la zona del cuerpo estriado. Se determinó la densidad integrada asociada a TH en cortes seriados que abarcan toda la zona del cuerpo estriado en animales inyectados con 6-OHDA y tratados con ISRIB o vehículo. La inyección de la neurotoxina indujo una pérdida promedio de aproximadamente un 70% del marcador dopaminérgico TH en el hemisferio inyectado luego de 7 días, siendo esta pérdida similar para ambos grupos, tratados con ISRIB o controles tratados con el vehículo (Figura 9A). Los resultados demuestran que el tratamiento con la dosis utilizada de ISRIB no produce diferencias significativas a nivel de inervación estriatal bajo estas condiciones experimentales.

Para evaluar el efecto del tratamiento con ISRIB directamente en el número de neuronas dopaminérgicas se cuantificó el número de somas TH<sup>+</sup> a lo largo de toda la

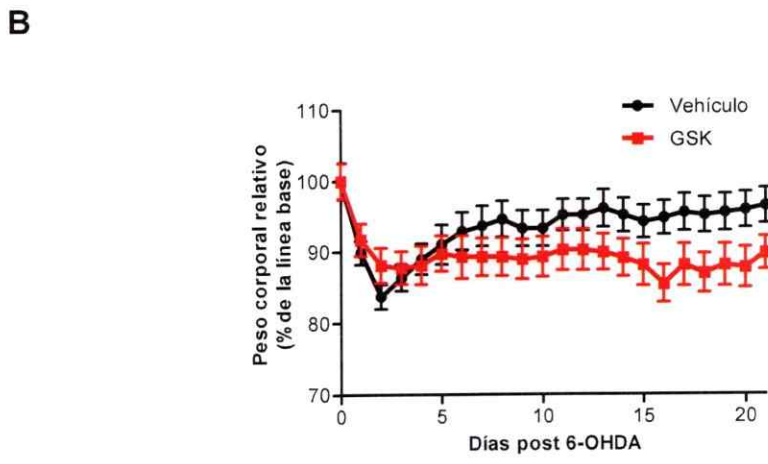
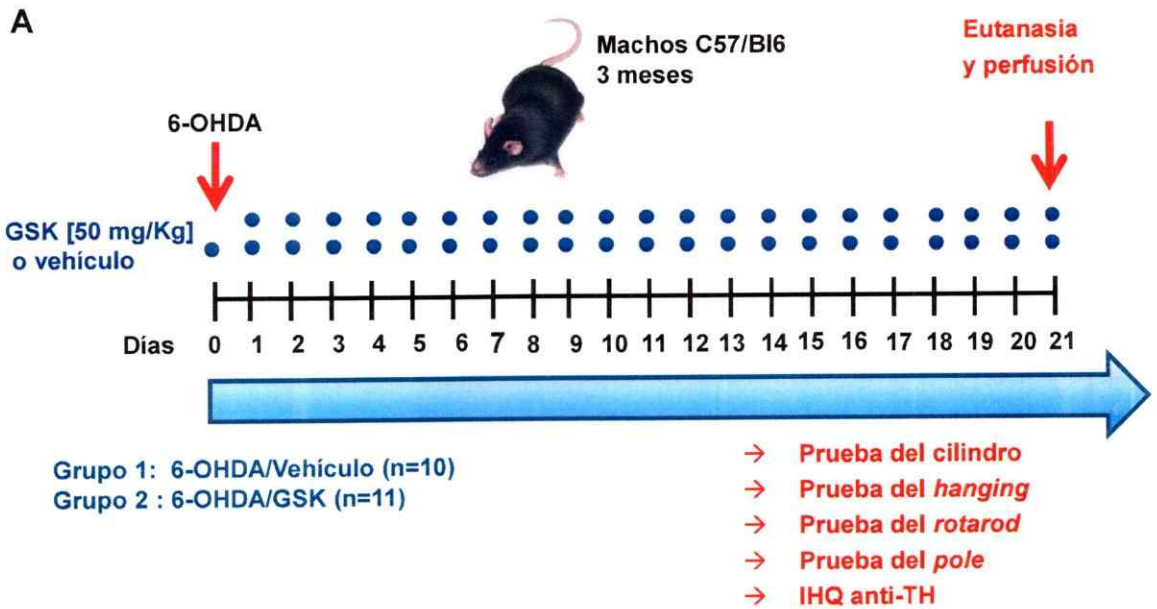


**Figura 9. Efecto de la administración de ISRIB en la neurodegeneración inducida por 6-OHDA (tratamiento corto).** (A) La denervación estriatal inducida por 6-OHDA se midió como densidad integrada de la intensidad de píxeles calculada a partir de imágenes de IHQ con un anticuerpo contra el marcador dopaminérgico tirosina hidroxilasa (TH) abarcando toda la zona del cuerpo estriado. Los resultados se expresan como porcentaje de pérdida relativo al lado control no inyectado. Los resultados se presentan como los promedios por grupo y sus errores estándar ( $n=10$  por grupo). Imágenes representativas se muestra en el panel izquierdo. Barra de tamaño 1mm. (B) Las neuronas dopaminérgicas de la SNpc fueron cuantificadas mediante IHQ anti-TH en cortes de cerebro medio de  $25\ \mu\text{m}$  de espesor espaciadas cada  $100\ \mu\text{m}$  y abarcando toda la zona de la SNpc. Los resultados se expresan como porcentaje de pérdida de somas TH-positivos (TH<sup>+</sup>) relativo al lado control no inyectado y se presentan como los promedios por grupo y sus errores estándar por grupo ( $n=10$  por grupo). Imágenes representativas se muestra en el panel izquierdo. Barra de tamaño  $100\ \mu\text{m}$  El análisis estadístico fue realizado utilizando la prueba t de student, no se observaron diferencias significativas ( $p>0,05$ ).

SNpc, observándose que tanto el grupo de animales tratados con ISRIB como con el vehículo presentan porcentajes de pérdida de somas TH<sup>+</sup> similares y cercanos al 25% en ambos casos (Figura 9B). De este resultado se puede concluir que el tratamiento de ISRIB no genera protección frente a la 6-OHDA en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc bajo estas condiciones experimentales.

Los resultados obtenidos con el tratamiento de ISRIB en el modelo toxicológico de la enfermedad no evidencian ningún cambio significativo inducido por esta molécula, sin embargo la inspección visual de los animales durante el periodo de tratamiento evidenciaban para un ojo entrenado que los animales tratados con ISRIB se encontraban en mejores condiciones que el grupo tratado con el vehículo, debido a esto se decidió extender el periodo de tratamiento a 21 días para poder complementar estos estudios con más pruebas motoras (Figura 10A).

El peso corporal se midió día por medio durante todo el periodo de tratamiento con ISRIB o vehículo (Figura 10B). De estas mediciones se desprende que luego de la inyección de 6-OHDA en el cuerpo estriado hay una pérdida significativa de peso corporal y que ésta es similar en ambos grupos de animales, aquellos tratados con ISRIB o con el vehículo. Por otro lado, la recuperación de peso corporal luego de la inyección de 6-OHDA resultó ser similar en ambos grupos, observándose una recuperación significativamente mayor de peso en aquellos animales tratados con el vehículo al final del tratamiento en comparación con sus controles tratados con ISRIB (Figura 10B).



**Figura 10. Administración de ISRIB en un modelo toxicológico de la EP en ratón (tratamiento largo).** (A) Representación esquemática de las condiciones experimentales utilizadas para evaluar el potencial terapéutico de ISRIB contra la neurotoxina parkinsoniana 6-OHDA. Se inyectaron ratones silvestres C57BL/6 con 8  $\mu$ g de 6-OHDA en el cuerpo estriado derecho y posteriormente se trataron con ISRIB [5 mg/kg] o su vehículo día por medio durante 21 días. (B) Se midió el peso corporal durante el tiempo de tratamiento y en el gráfico se muestra representado como porcentaje del peso inicial. Los resultados se expresan como porcentaje promedio con respecto a la línea base para ambos grupos y su respectivo error estándar (n=10 por grupo). El análisis estadístico se realizó mediante un test de ANOVA de dos vías seguido de un post-test de Bonferroni. \*:  $p < 0,05$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ .

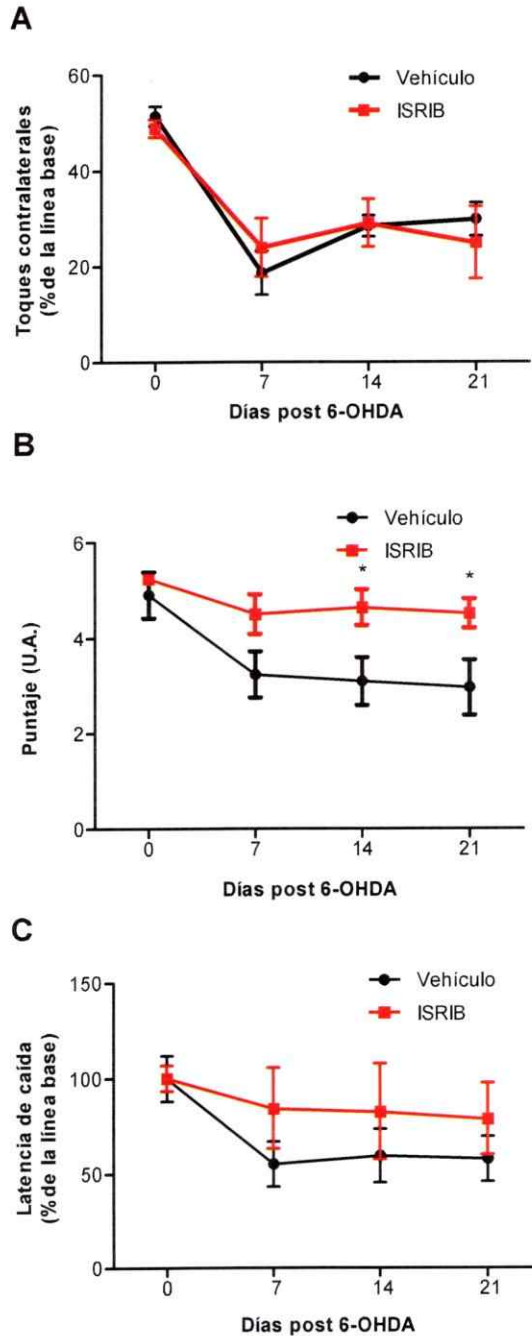


La prueba del cilindro se realizó una vez a la semana comenzando una semana después de la inyección de 6-OHDA. El porcentaje de toques contralaterales disminuyó desde ~50% (línea base) hasta ~25% 7 días después de la inyección de 6-OHDA, manteniéndose cercano a este valor a los 14 y 21 días post-inyección (**Figura 11A**). La disminución del porcentaje de toques contralaterales a los 7 días es de igual magnitud en animales tratados con ISRIB o con el vehículo, así como también la curva de recuperación en el tiempo.

Con el objetivo de evaluar el desempeño motor del animal, a nivel de balance, coordinación y fuerza muscular se realizó la prueba del *hanging* 7, 14 y 21 días después de la inyección de 6-OHDA. Como se describió previamente en la sección materiales y métodos 5.5.3, los animales se posicionaron en una barra horizontal con sus patas delanteras y fue asignada una puntuación de acuerdo al desempeño del animal. En la **Figura 11B** se muestra la puntuación obtenida en esta prueba para cada semana de tratamiento tanto en los animales tratados con ISRIB como en los animales tratados con el vehículo.

Sorprendentemente, se observaron mejoras significativas en los animales tratados con ISRIB a los 14 y 21 días de tratamiento, lo que indica que ISRIB mejora la recuperación motora bajo estas condiciones experimentales.

Se realizó la prueba del *rotarod* para evaluar la capacidad física, el balance y la coordinación física de los animales 7, 14 y 21 días después de la inyección de 6-OHDA tanto en animales tratados con ISRIB como en animales tratados con vehículo.

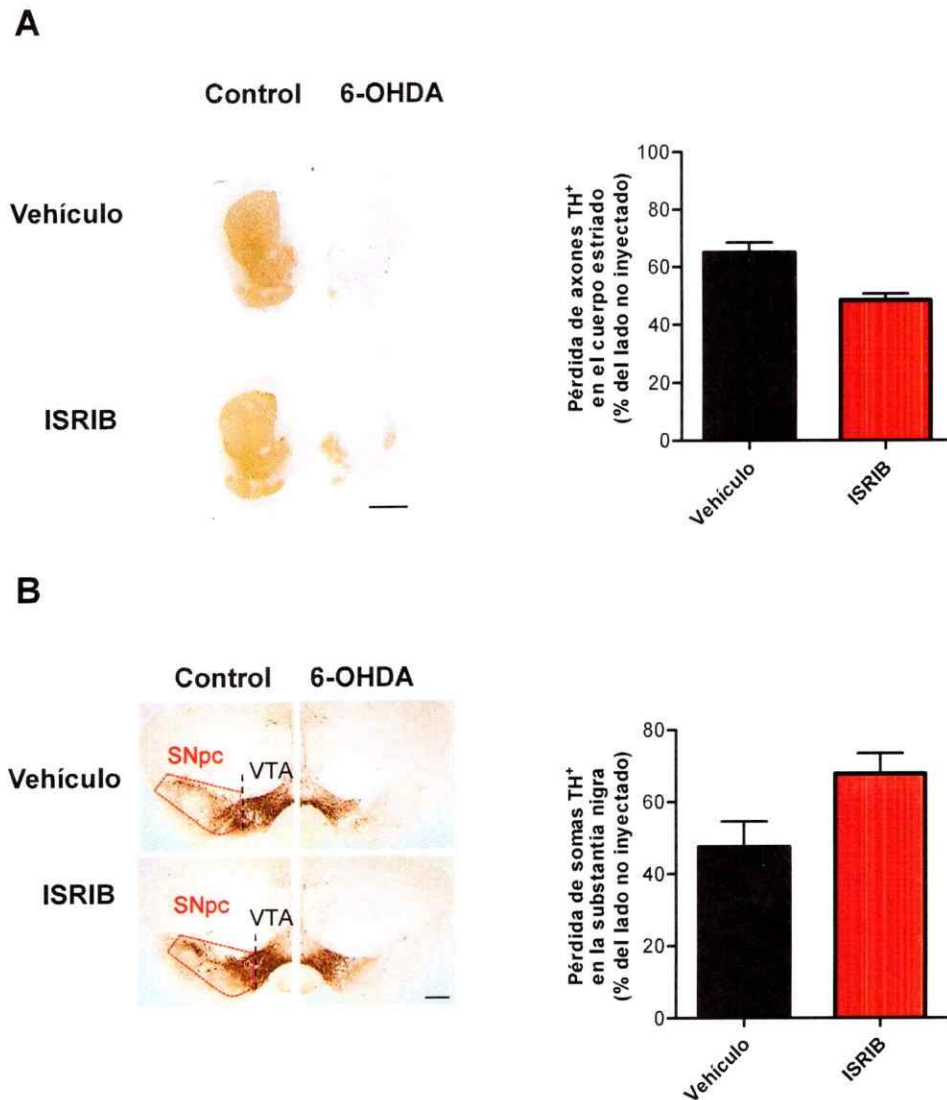


**Figura 11. Efecto de la administración de ISRIB a nivel motor en un modelo toxicológico de la EP en ratón (tratamiento largo).** (A) Las asimetrías motoras espontáneas se evaluaron con la prueba del cilindro. El número de toques con cada pata delantera en las paredes del cilindro fue cuantificado. Los datos se expresan como porcentaje de toques con la pata

izquierda (contralateral) respecto al número total toques con ambas patas delanteras. En el gráfico se presentan el promedio y error estándar por grupo (n=10 por grupo). (B) El desempeño motor funcional se cuantificó usando la prueba de *hanging*. Los ratones se posicionaron en una barra horizontal con las dos patas delanteras y se les asignó un puntaje desde 0 a 5 en unidades arbitrarias (U.A.) según su desplazamiento desde esta posición. La prueba tuvo una extensión total de 90 segundos (s) por animal. Se evaluó cada animal tres veces en intervalos de 30 s. Los datos se expresan como puntaje promedio por grupo y su error estándar respectivo (n=10 por grupo). (C) La coordinación motora se evaluó utilizando la prueba de *rotarod*. El equipo de *rotarod* se configuro para comenzar a una velocidad de 4 rpm, con una tasa de aceleración de 20 rpm/min y se registró el tiempo de latencia por animal. Los resultados corresponden al promedio de 3 intentos por animal y se expresan como porcentaje promedio con respecto al rendimiento de la línea base para ambos grupos y su respectivo error estándar (n=10 por grupo). El análisis estadístico se realizó mediante un test de ANOVA de dos vías seguido de un post-test de Bonferroni. \*:  $p < 0,05$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ .

Como se mencionó en la sección materiales y métodos, los animales fueron posicionados en una rueda giratoria y se midió el tiempo (latencia) que demora el animal en caer desde ésta, siendo un mayor tiempo de latencia indicativo de una mejor capacidad motora. En esta prueba motora se observó una tendencia a mejorar la recuperación motora luego de la inyección de 6-OHDA en los animales tratados con ISRIB al compararlos con los controles, sin embargo esta diferencia no fue estadísticamente significativa (Figura 11C).

Al evaluar el efecto de ISRIB en la inervación estriatal y sobrevida de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc se observó que 21 días después de la inyección de 6-OHDA, el hemisferio inyectado con la neurotoxina muestra una gran pérdida del marcador dopaminérgico TH en el cuerpo estriado (Figura 12A), alcanzando un ~65% en el grupo de animales tratados con el vehículo y un ~50% para animales tratados con ISRIB, sin embargo esta diferencia no resultó ser estadísticamente significativa. La cuantificación de la pérdida de somas TH<sup>+</sup> en la zona de la SNpc mostró una tendencia inversa a lo obtenido para el cuerpo estriado, esto es; mayor pérdida de somas TH<sup>+</sup> en animales tratados con ISRIB (~65%) que en aquellos tratados con el vehículo (~50%), sin embargo esta tendencia no es estadísticamente significativa (Figura 12B).



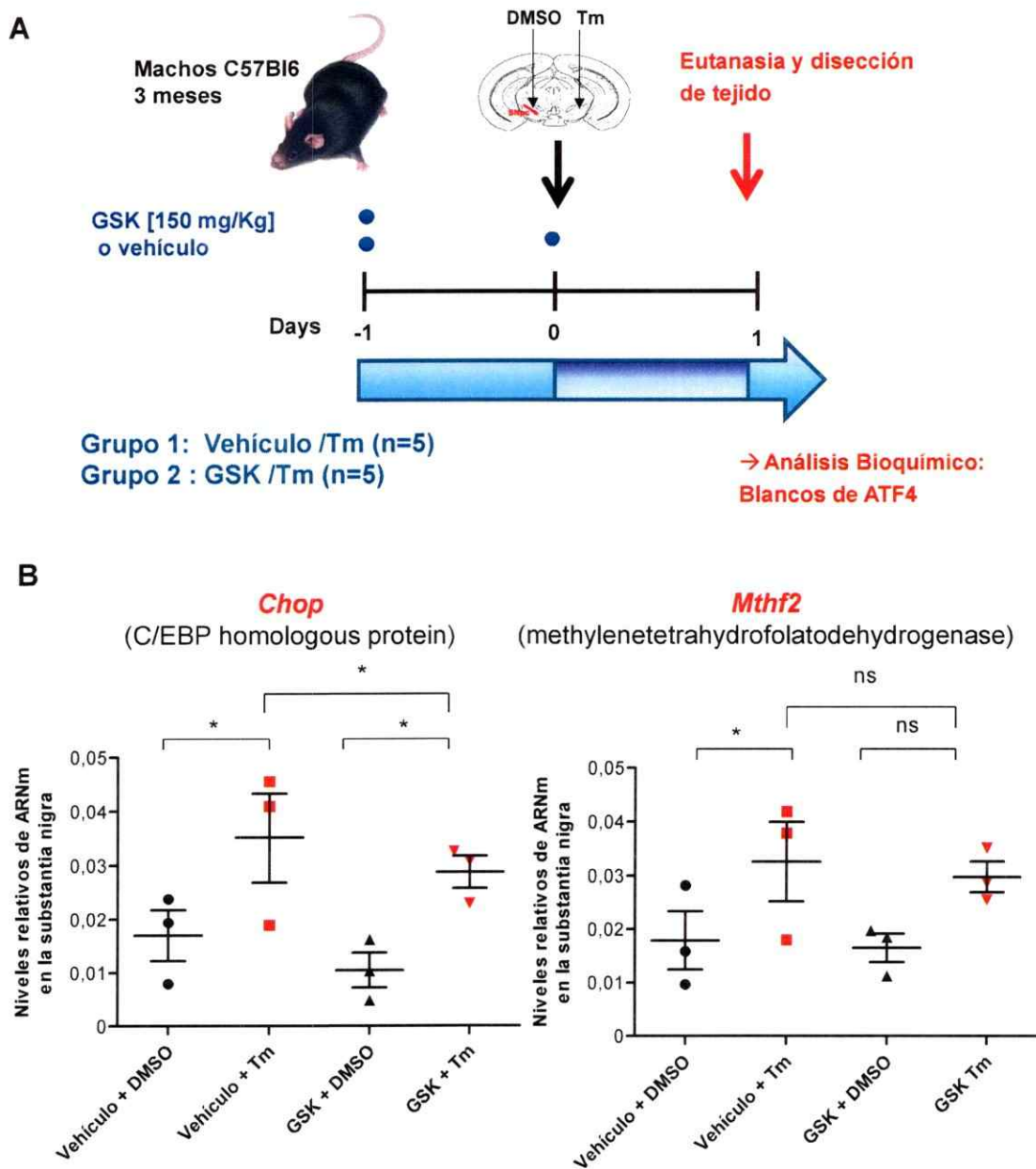
**Figura 12. Efecto de la administración de ISRIB en la neurodegeneración inducida por 6-OHDA (tratamiento largo).** (A) La denervación estriatal inducida por 6-OHDA se midió como densidad integrada de la intensidad de píxeles calculada a partir de imágenes de IHQ con un anticuerpo contra el marcador dopaminérgico tirosina hidroxilasa (TH) abarcando toda la zona del cuerpo estriado. Los resultados se expresan como porcentaje de pérdida relativo al lado control no inyectado. Los resultados se presentan como los promedios por grupo y sus errores estándar (n=10 por grupo). Imágenes representativas se muestra en el panel izquierdo. Barra de tamaño 1 mm. (B) Las neuronas dopaminérgicas de la SNpc se cuantificaron mediante IHQ anti-TH en cortes de cerebro medio de 25  $\mu\text{m}$  de espesor espaciadas cada 100  $\mu\text{m}$  y abarcando toda la zona de la SNpc. Los resultados se expresan como porcentaje de pérdida de somas TH-positivos (TH<sup>+</sup>) relativo al lado control no inyectado y se presentan como los promedios y sus errores estándar por grupo (n=10 por grupo). Imágenes representativas se muestran en el panel

izquierdo. Barra de tamaño 100 $\mu$ m El análisis estadístico se hizo utilizando la prueba t de student, no se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ).

De este resultado se desprende que el tratamiento de ISRIB no genera protección frente a la 6-OHDA en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc, aun cuando produce mejoras en algunas de las pruebas motoras con las que se evaluaron los grupos experimentales.

### **6.3. Análisis de la actividad de GSK en la SN.**

Previo al análisis del potencial terapéutico del compuesto GSK en un modelo animal de la EP, se probó la eficiencia de esta molécula en un régimen de administración oral a una concentración de [150 mg/kg; dos veces al día] en nuestro modelo de estrés de RE agudo basado en la inyección de Tm directamente en la SNpc (**Figura 13A**). Los animales se eutanasiaron 24 h después de la inyección de Tm, y se realizaron disecciones de cerebro medio, que contiene la zona de la SNpc, separando el lado inyectado del lado no inyectado. Se seleccionaron aquellos genes blancos de ATF4 (**Tabla 1**) en los cuales se observó una inducción significativa con Tm en animales controles y algún efecto en aquellos tratados con GSK.



**Figura 13. Validación de la eficacia de GSK *in vivo* en la substantia nigra (dosis alta).** (A) Representación esquemática del pretratamiento con GSK en un modelo clásico de estrés de RE inducido por tunicamicina (Tm). Se sometieron ratones silvestres C57BL/6 a un pretratamiento con GSK [150 mg/kg] administrado con una sonda oral dos veces al día desde un día antes de la inyección de 10  $\mu$ m de Tm directamente en la SN del hemisferio derecho del cerebro del animal. Veinticuatro horas más tarde se eutanasiaron los animales para la disección de tejido de cerebro medio que contiene a la SN, separando el lado inyectado del lado no inyectado con Tm.

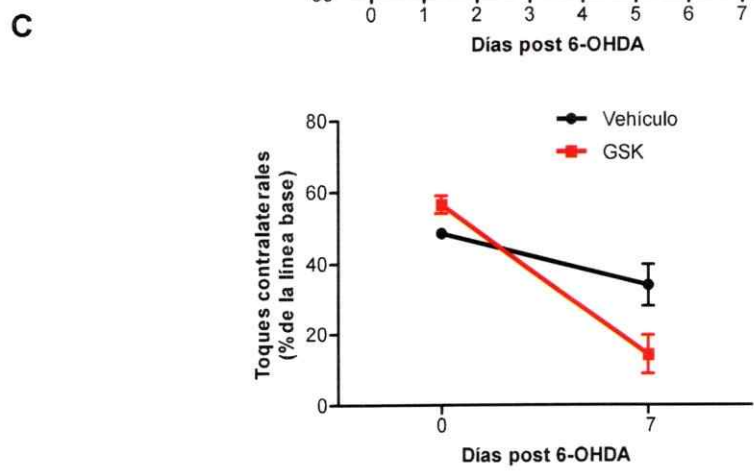
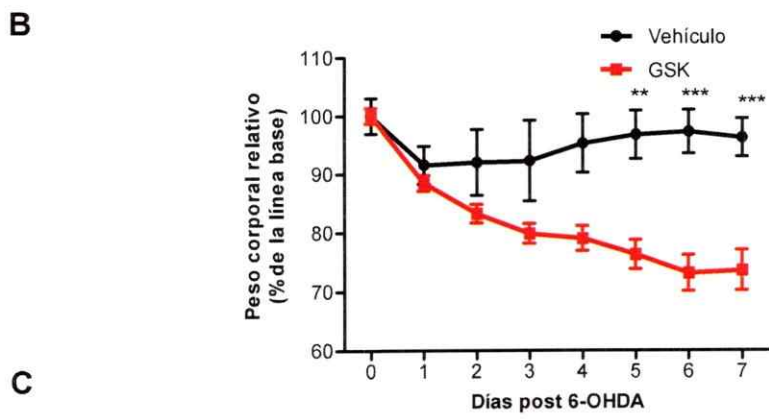
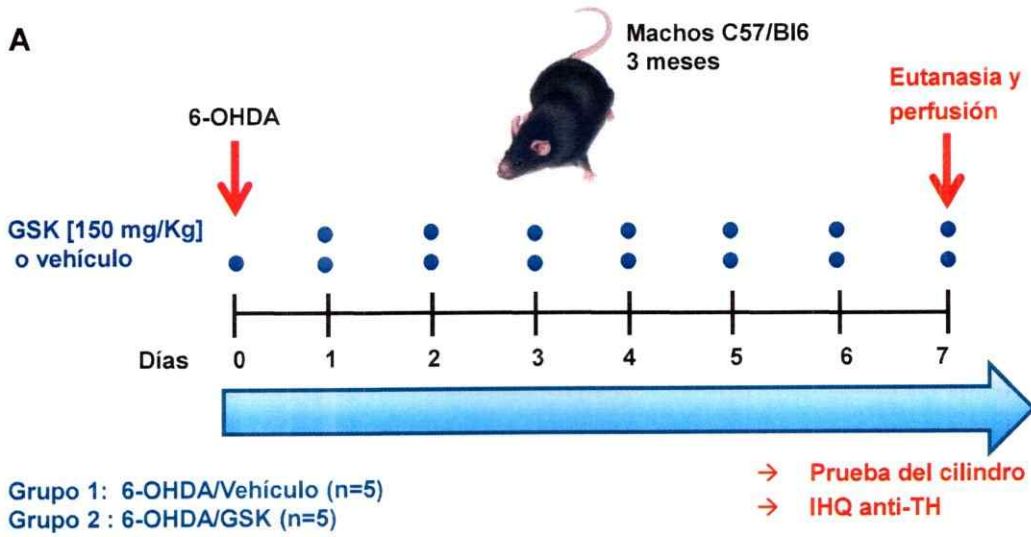
(B) Los niveles de expresión de genes blancos de ATF4 (*Chop* y *Mthf2*) se determinaron en tejido de cerebro medio de animales tratados con GSK o el vehículo utilizando PCR en tiempo real. (n = 3 por grupo). Los resultados se presentan como el promedio por grupo y su error estándar. El análisis estadístico se hizo utilizando la prueba no paramétrica de Mann-Whitney; \*:  $p < 0,05$ ; ns: no significativo.

#### 6.4. Efecto del tratamiento de GSK en un modelo toxicológico de la EP.

Para determinar el potencial terapéutico de GSK en un modelo toxicológico de la EP, ratones C57BL/6 se inyectaron mediante estereotaxis en el cuerpo estriado con 8  $\mu\text{g}$  de 6-OHDA. A partir del día de la inyección los animales se trataron oralmente con GSK [150 mg/kg] o su vehículo dos veces al día todos los días durante 7 días (Figura 14A).

El peso corporal de los animales se midió día por medio durante toda la semana de tratamiento con GSK o vehículo. En el grupo de animales tratados con GSK se observó una pérdida progresiva y estadísticamente significativa en los 3 últimos días de tratamiento al compararlo con el grupo tratado con vehículo (Figura 14B).

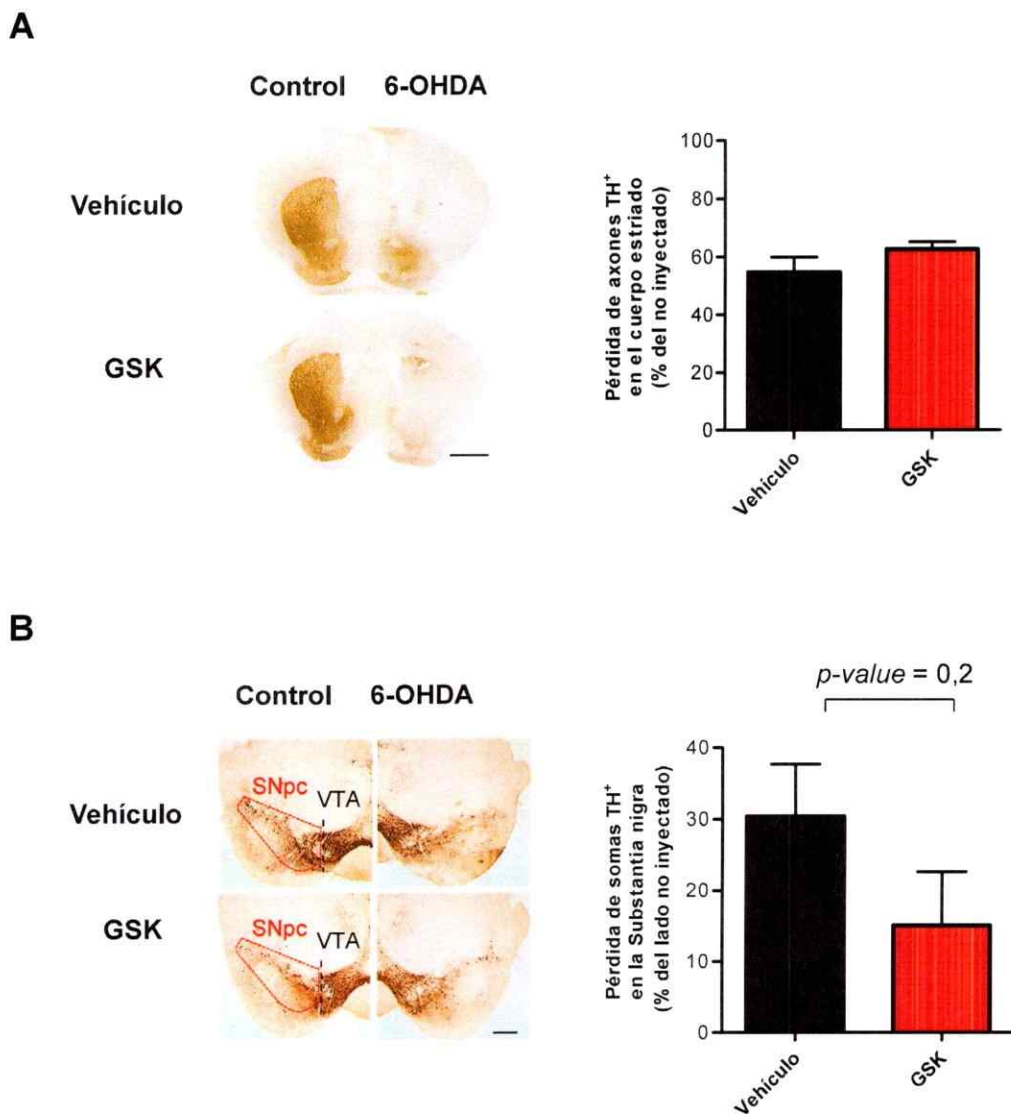
Para evaluar el posible efecto terapéutico de GSK a nivel del desempeño motor en este modelo toxicológico, se utilizó la prueba del cilindro. En los animales tratados con el vehículo el porcentaje de toques contralaterales disminuyó desde un ~50% (línea base) hasta un ~30% después de la inyección de 6-OHDA, esta disminución fue de mayor magnitud en animales tratados con GSK, alcanzando un ~15%, sin embargo esta diferencia no es estadísticamente significativa (Figura 14C). Este resultado nos indica que GSK no induce mejoras motoras en la prueba del cilindro luego de la lesión de 6-OHDA, en estas condiciones experimentales.





**Figura 14. Administración de GSK en un modelo toxicológico de la EP en ratón (tratamiento corto).** (A) Representación esquemática de las condiciones experimentales utilizadas para evaluar el potencial terapéutico de GSK contra la neurotoxina 6-OHDA. Ratones silvestres C57BL/6 se inyectaron con 8 µg de 6-OHDA en el cuerpo estriado derecho y posteriormente se trataron con GSK [150 mg/kg] o su vehículo dos veces al día durante 7 días. (B) Se midió el peso corporal durante el tiempo de tratamiento y en el gráfico se presentan los datos como porcentaje del peso inicial (línea base). (C) Las asimetrías motoras espontáneas se evaluaron con la prueba del cilindro. Se cuantificó el número de toques con cada pata delantera en las paredes del cilindro. Se cuantificó el número de toques con la pata izquierda (contralateral) respecto al número total toques con ambas patas delanteras. En los gráficos se presentan los promedios y errores estándar por grupo (n=10 por grupo). El análisis estadístico se realizó utilizando el test ANOVA de dos vías seguido de un post-test de Bonferroni. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ( $p > 0,05$ ).

Con el objetivo de estudiar el efecto del tratamiento con GSK a nivel de la pérdida de neuronas dopaminérgicas de la SNpc se realizó un análisis IHQ con un anticuerpo anti-TH en cortes de 25 µm de espesor, seriados cada 100 µm, abarcando la zona del cuerpo estriado y del cerebro medio. Para determinar si el tratamiento con GSK tiene algún efecto sobre la magnitud de la lesión provocada por la toxina 6-OHDA en los terminales axonales de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc, se cuantificó la inmunoreactividad del anticuerpo anti-TH en la zona del cuerpo estriado. Se determinó la densidad integrada asociada a TH en cortes seriados que abarcan toda la zona del cuerpo estriado en animales inyectados con 6-OHDA y tratados con GSK o vehículo. La inyección de la neurotoxina 6-OHDA produce una pérdida promedio de aproximadamente un 60% del marcador dopaminérgico TH en el hemisferio inyectado luego de 7 días, siendo esta pérdida similar para ambos grupos de animales, tratados con GSK o controles tratados con el vehículo (Figura 15A). Estos resultados demuestran que el tratamiento con GSK no produce diferencias significativas a nivel de innervación estriatal bajo estas condiciones experimentales.

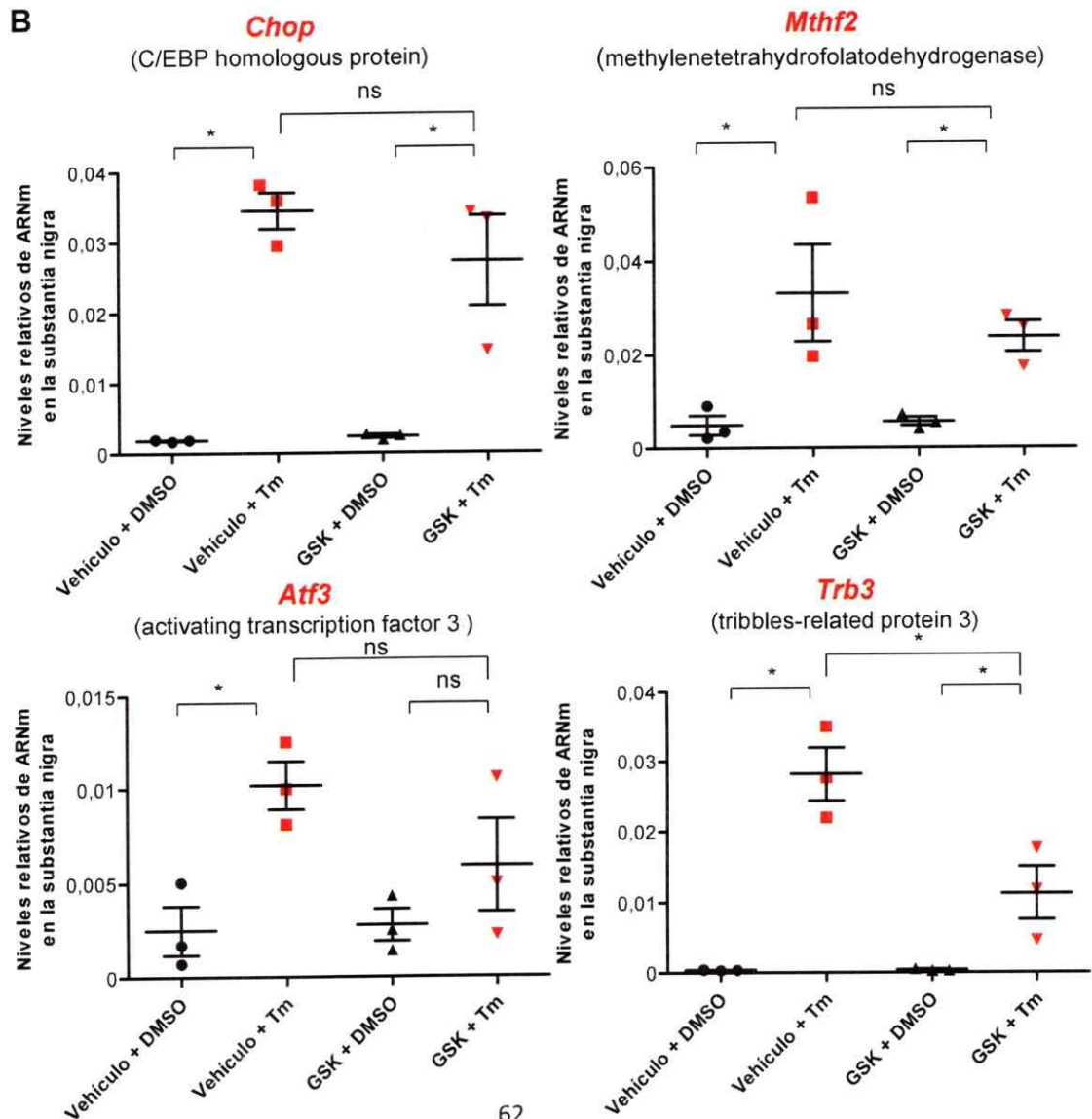
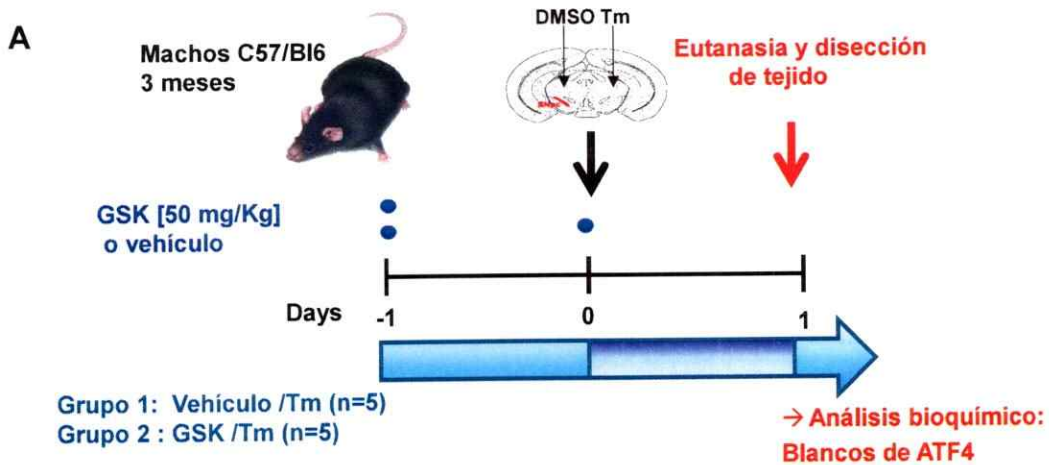


**Figura 15. Efecto de la administración de GSK en la neurodegeneración inducida por 6-OHDA (tratamiento corto).** (A) La denervación estriatal inducida por 6-OHDA se midió como densidad integrada de la intensidad de píxeles calculada a partir de imágenes de IHQ utilizando un anticuerpo anti-TH y abarcando toda la zona del cuerpo estriado. Los resultados se expresan como porcentaje de pérdida relativo al lado control no inyectado. Los resultados se presentan como promedios y sus errores estándar (n=10 por grupo). Imágenes representativas se muestran en el panel izquierdo. Barra de tamaño 1mm. (B) Las neuronas dopaminérgicas de la SNpc se cuantificaron mediante IHQ anti-TH en cortes de cerebro medio de 25  $\mu$ m de espesor y espaciadas cada 100  $\mu$ m, abarcando toda la zona de la SNpc. Los resultados se expresan como porcentaje de pérdida de somas TH<sup>+</sup> relativo al lado control no inyectado y se presentan como los promedios y sus errores estándar por grupo (n=10 por grupo). Imágenes

representativas se muestran en el panel izquierdo. Barra de tamaño 100 $\mu$ m. El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba t de Student, no se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ); ns: no significativo.

Para analizar el efecto del tratamiento con GSK directamente en el número de neuronas dopaminérgicas se cuantificó el número de somas TH<sup>+</sup> a lo largo de toda la SNpc, y se observó que en el grupo de animales tratados con GSK el porcentaje de pérdida de somas TH<sup>+</sup> resultó ser menor (~15%) que el de los animales tratados con el vehículo (~30%), sin embargo esta diferencia no resultó ser estadísticamente significativa (**Figura 15B**).

Considerando la tendencia protectora del tratamiento con GSK [150 mg/kg] por 7 días a nivel de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc, así como sus efectos adversos evidenciados en la pérdida de peso corporal de los animales tratados con GSK, se decidió ensayar una concentración 3 veces menor de GSK [50 mg/kg] y extender el tiempo de tratamiento a 21 días con el fin de monitorear el desempeño motor de los animales tratados con pruebas motoras complementarias. Previamente se corroboró que la dosis de GSK [50 mg/kg] fuese igualmente activa en la SN (**Figura 16**). El análisis de genes blanco de ATF4 mediante qPCR reveló un aumento estadísticamente significativo de los niveles de *Chop*, *Mthf2*, *Atf3* y *Trb3* en los animales inyectados con Tm y tratados con el vehículo en comparación a su lado control, indicando que el estresor de RE Tm induce la regulación transcripcional de estos genes. En los animales tratados con GSK se observó la reducción parcial de los niveles de *Chop*, *Mthf2* y *Atf3*, y una reducción significativa de los niveles de *Trb3* en condiciones de estrés de RE en comparación con el grupo tratado con vehículo. (**Figura 16B**). Interesantemente, *Atf3* no mostró una inducción significativa con Tm en los animales tratados con GSK a diferencia del grupo tratado con el vehículo.

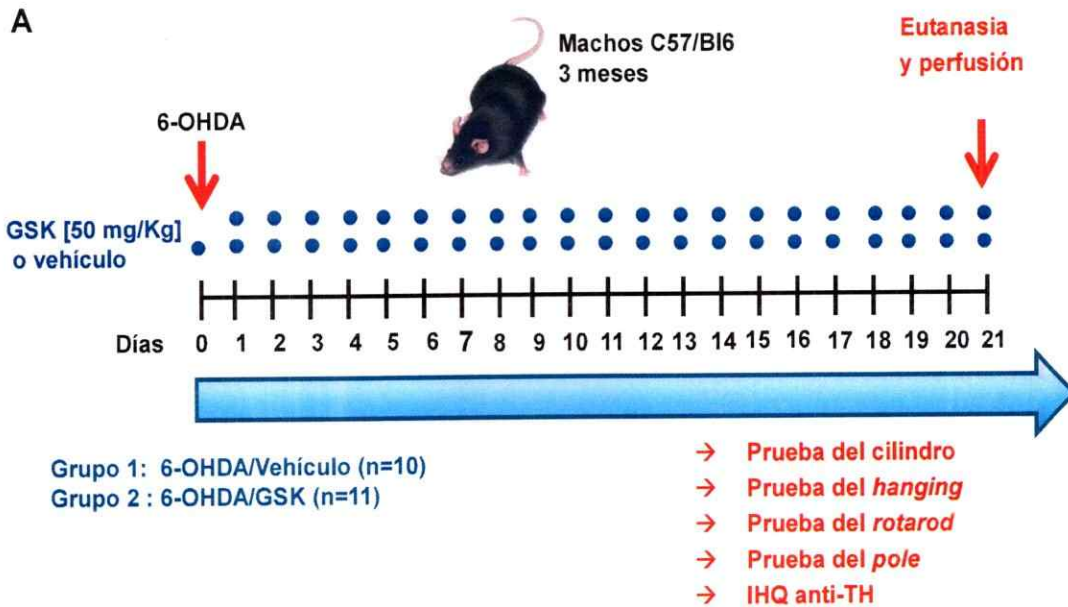


**Figura 16. Validación de la eficacia de GSK *in vivo* en la substantia nigra (dosis baja).** (A) Representación esquemática del pretratamiento con GSK en un modelo clásico de estrés de RE inducido por tunicamicina (Tm). Se sometieron ratones silvestres C57BL/6 a un pretratamiento con GSK [50 mg/kg] administrado con una sonda oral dos veces al día desde un día antes de la inyección de 10  $\mu$ m de Tm directamente en la SN del hemisferio derecho del cerebro del animal. Veinticuatro horas más tarde se eutanasiaron los animales para la disección de tejido de cerebro medio que contiene a la SN, separando el lado inyectado del lado no inyectado con Tm. (B) Los niveles de expresión de genes blancos de ATF4 (*Chop*, *Mthf2*, *Atf3* y *Trb3*) se determinaron en tejido de cerebro medio de animales tratados con GSK o el vehículo utilizando PCR en tiempo real. (n = 3 por grupo). Los resultados se presentan como el promedio por grupo y su error estándar. El análisis estadístico se hizo utilizando la prueba no paramétrica de Mann-Whitney; \*:  $p < 0,05$ ; ns: no significativo.

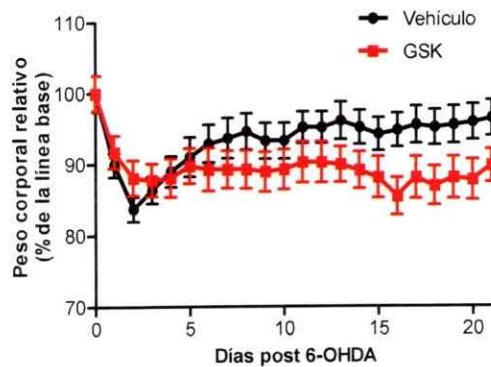
De estos resultados se desprende que el tratamiento con GSK puede inhibir parcial o totalmente los blancos de ATF4 analizados, sin embargo resulta menos eficiente en alcanzar la SNpc o en inhibir la regulación transcripcional estos blancos en comparación con el compuesto ISRIB.

El peso corporal de los animales se midió todos los días durante las 3 semanas de tratamiento con GSK o vehículo (**Figura 17B**). Las mediciones de peso corporal durante el tratamiento mostraron que ambos grupos, tratados con GSK o con vehículo, pierden peso de manera significativa después de la inyección de 6-OHDA y que la recuperación posterior de peso corporal es similar para ambos grupos (**Figura 17B**) a diferencia de lo observado con la dosis mayor de GSK (**Figura 14B**).

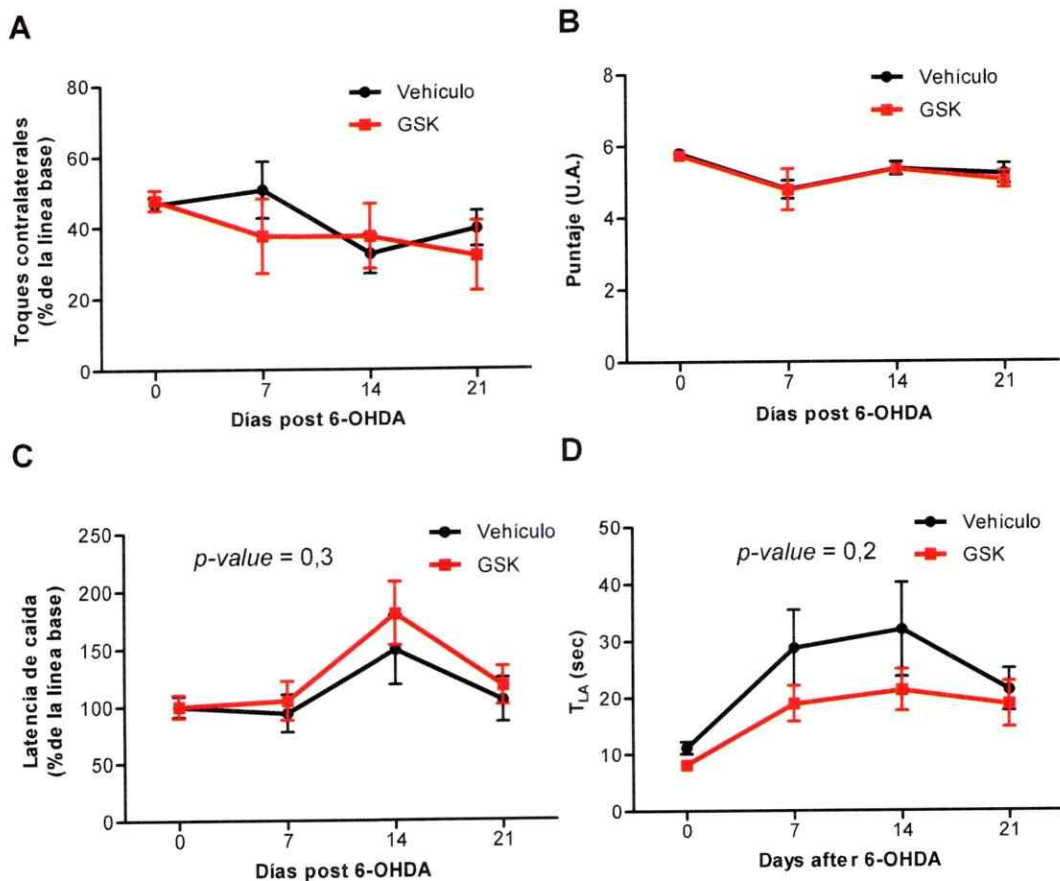
La prueba del cilindro se realizó una vez a la semana comenzando una semana después de la inyección de 6-OHDA. El porcentaje de toques contralaterales disminuyó desde ~50% (línea base) hasta ~35% 7 días después de la inyección de 6-OHDA para el grupo de animales tratados con GSK, mientras que la disminución en el porcentaje de toques contralateral se observó recién a los 14 días para el grupo tratado con vehículo, luego estos valores se mantuvieron cercanos a este valor hasta los 21 días post-inyección (**Figura 18A**).



**B**



**Figura 17. Administración de GSK en un modelo toxicológico de la EP en ratón (tratamiento largo).** (A) Representación esquemática de las condiciones experimentales utilizadas para evaluar el potencial terapéutico de GSK contra la neurotoxina parkinsoniana 6-OHDA. Ratones silvestres C57BL/6 se inyectaron con 8  $\mu$ g de 6-OHDA en el cuerpo estriado derecho y posteriormente se trataron oralmente con GSK [50 mg/kg] o su vehículo dos veces al día durante 21 días. (B) Se midió el peso corporal durante el tiempo de tratamiento y en el gráfico se muestra representado como porcentaje del peso inicial (línea base). El análisis estadístico se realizó mediante un test de ANOVA de dos vías seguido de un post-test de Bonferroni. No se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ).



**Figura 18. Efecto de la administración de GSK a nivel motor en un modelo toxicológico de la EP en ratón (tratamiento largo).** (A) Las asimetrías motoras espontáneas se evaluaron con la prueba del cilindro. Se cuantificó el número de toques con cada pata delantera en las paredes de un cilindro transparente. Los datos se expresan como porcentaje de toques con la pata izquierda (contralateral) respecto al número total toques con ambas patas delanteras. En el gráfico se presentan los promedios y error estándar por grupo (n=10 por grupo). (B) El desempeño motor funcional se cuantificó usando la prueba del *hanging*. Los ratones se posicionaron en una barra horizontal con las dos patas delanteras y fue asignado un puntaje desde 0 a 5 en unidades arbitrarias (U.A.) según su desplazamiento desde esta posición. La prueba tuvo una extensión total de 90 segundos (s) por animal. Se evaluó cada animal tres veces en intervalos de 30 s. Los datos se expresan como el puntaje promedio por grupo y su error estándar respectivo (n=10 por grupo). (C) La coordinación motora se evaluó utilizando la prueba del *rotarod*. El equipo de *rotarod* se configuró para comenzar a una velocidad de 4 rpm, con una tasa de aceleración de 20 rpm/min y se registró el tiempo de latencia por animal. Los resultados corresponden al promedio de 3 intentos por animal y se expresan como el porcentaje

promedio con respecto al rendimiento de la línea base para ambos grupos y su respectivo error estándar (n=10 por grupo). Otra prueba que permite evaluar desordenes motores es (D) la prueba de *pole*, que se llevó a cabo en estos mismos animales. Los ratones se posicionaron en la cima de una barra orientada verticalmente. El tiempo de deslizamiento por la barra, tiempo de latencia ( $T_{LA}$ ), es inversamente proporcional a su condición motora. Los resultados corresponden al promedio de 3 intentos por animal y se expresan como el promedio por grupo y su respectivo error estándar (n=10 por grupo). El análisis estadístico se realizó mediante un test de ANOVA de dos vías seguido de un post-test de Bonferroni. No se observaron diferencias significativas :  $p > 0,05$ .

Complementariamente se evaluó el desempeño motor de estos animales a nivel de balance, coordinación y fuerza muscular utilizando la prueba del *hanging*. 7, 14 y 21 días después de la inyección de 6-OHDA. La puntuación obtenida en esta prueba motora para cada semana de tratamiento tanto en el grupo tratado con GSK como en el tratado con vehículo fueron similares (Figura 18B).

Se realizó la prueba del *rotarod* para evaluar la capacidad física, el balance y la condición física de los animales, 7, 14 y 21 días después de la inyección de 6-OHDA. En esta prueba no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos (Figura 18C), sin embargo es posible constatar una tendencia a mejorar el desempeño en los animales tratados con GSK en comparación con aquellos tratados con el vehículo ( $p$ -value = 0,3).

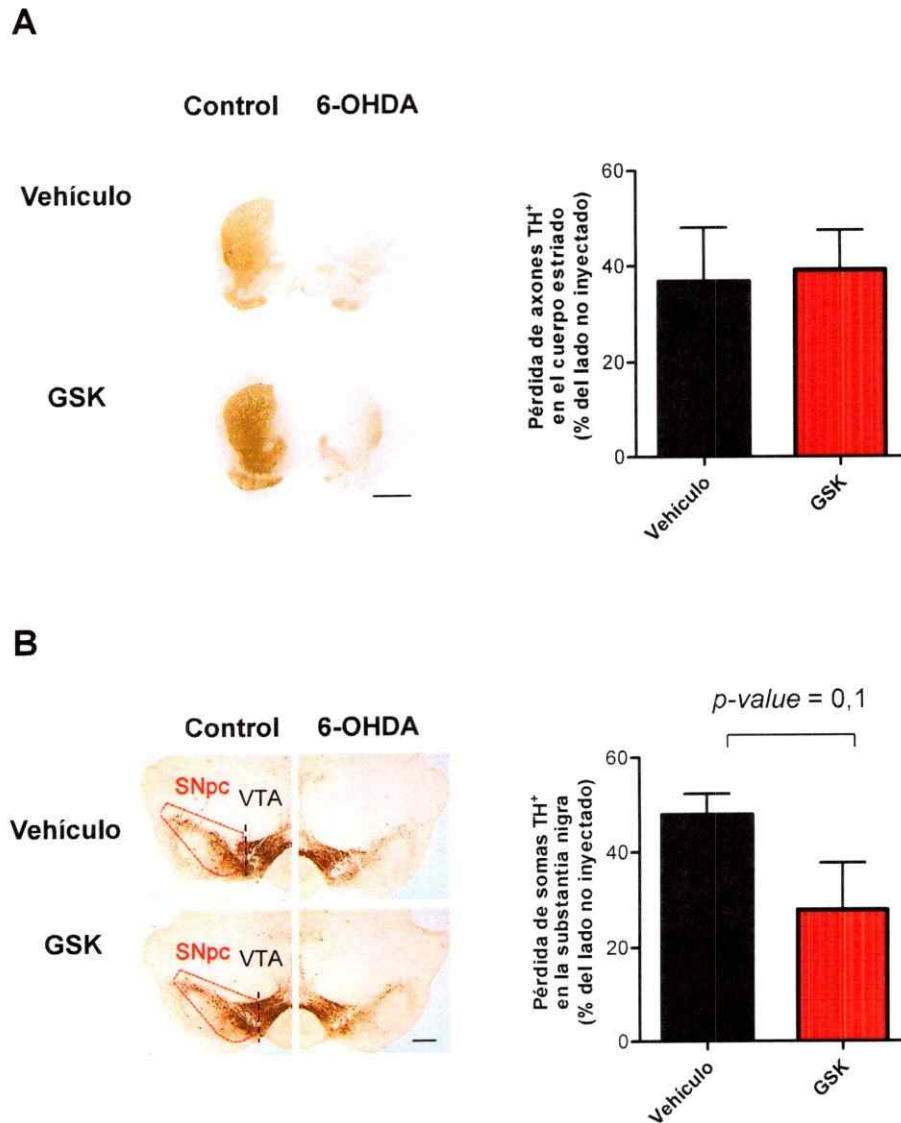
Adicionalmente, se realizó la prueba del *pole* que permite evaluar problemas motores en animales que presentan daños a nivel cortical. El animal se posicionó en la cima de una barra orientada de manera vertical y se midió el tiempo de deslizamiento por la barra hasta que tocó con sus cuatro patas la base de la barra vertical, o tiempo de latencia ( $T_{LA}$ ), que es un indicativo de su condición motora. Mayor  $T_{LA}$  se asocia a un mayor daño motor. La prueba motora de *pole* se realizó previo a la inyección de 6-OHDA (línea base) y luego 1 vez por semana hasta el día de su eutanasia. En los



animales tratados con el vehículo se observó mayor daño motor después de la inyección de 6-OHDA en comparación con aquellos tratados con GSK, sin embargo estas diferencias no resultaron estadísticamente significativas ( $p\text{-value} = 0,2$ ) (**Figura 18D**).

El análisis histológico reveló que luego del tratamiento de GSK [50 mg/kg] por 21 días la 6-OHDA indujo la pérdida del marcador TH en el cuerpo estriado de estos animales que alcanzó un ~40% sin diferencias entre los grupos tratados con GSK o vehículo (**Figura 19A**). La cuantificación del número de somas TH<sup>+</sup> en la zona de la SNpc mostró la misma tendencia que la obtenida para el tratamiento de 7 días, esto es; menor pérdida de somas TH<sup>+</sup> en el grupo de animales tratados con GSK (~30%) en comparación con los tratados con vehículo (~50%), sin embargo esta tendencia no es estadísticamente significativa ( $p\text{-value} = 0,1$ ) (**Figura 19B**).

Estos resultados sugieren que el tratamiento oral con GSK (en las dos dosis probadas) induce un nivel no significativo de protección de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc contra el efecto tóxico de la 6-OHDA y también una tendencia a mejorar el rendimiento motor de los animales tratados en la prueba del *pole*.



**Figura 19. Efecto de la administración de GSK en la neurodegeneración inducida por 6-OHDA (tratamiento largo).** (A) La denervación estriatal inducida por 6-OHDA se midió como densidad integrada de la intensidad de píxeles calculada a partir de imágenes de IHQ con un anticuerpo contra el marcador dopaminérgico tirosina hidroxilasa (TH) abarcando toda la zona del cuerpo estriado. Los resultados se expresan como porcentaje de pérdida relativo al lado control no inyectado. Los resultados se presentan como los promedios y sus errores estándar ( $n=10$  por grupo). Imágenes representativas se muestra en el panel izquierdo. Barra de tamaño 1mm. (B) Las neuronas de la SNpc se cuantificaron mediante IHQ anti-TH en cortes de cerebro medio de  $25\ \mu\text{m}$  de espesor y espaciadas cada  $100\ \mu\text{m}$ , abarcando toda la zona de la SNpc. Los resultados se expresan como porcentaje de pérdida de somas TH-positivos ( $\text{TH}^+$ ) relativo al

lado control no inyectado y se presentan como los promedios y sus errores estándar por grupo (n=10 por grupo). Imágenes representativas se muestran en el panel izquierdo. Barra de tamaño 100 $\mu$ m El análisis estadístico se hizo utilizando la prueba t de Student, no se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ); ns: no significativo.

## 7. DISCUSIÓN

Con el objetivo de evaluar el potencial terapéutico de la inhibición farmacológica de la vía de la UPR mediada por el receptor PERK en la enfermedad de Parkinson, se realizaron tratamientos con dos compuestos recientemente descritos, ISRIB y GSK. Estos compuestos inhiben a distintos niveles esta vía de señalización. El modelo animal de la EP utilizado consiste en la inyección estereotáxica de la neurotoxina 6-OHDA en el cuerpo estriado de ratones, que induce la pérdida selectiva de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc. Para ambos compuestos se evaluó mediante histología los efectos neurodegenerativos de la toxina y desempeño motor de los animales.

Nuestros resultados muestran que la modulación de la vía de PERK a partir de la administración de los inhibidores ISRIB y GSK no genera cambios significativos en la sobrevivencia de las neuronas dopaminérgicas en nuestro modelo de 6-OHDA en ratón, sin embargo el tratamiento de ISRIB durante 21 días en ratones inyectados con 6-OHDA induce una mejora en el desempeño motor de la prueba motora de *hanging* de estos animales, mientras que el tratamiento crónico con GSK induce una tendencia de aumento en la sobrevivencia de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc acompañado por un mejor desempeño en la prueba del *pole*, siendo ambas tendencias no significativas ( $p\text{-value} = 0,1$  y  $p\text{-value} = 0,2$ , respectivamente).

Esta tesis resulta un aporte a la búsqueda y validación de nuevos posibles blancos terapéuticos y compuestos para el tratamiento farmacológico de la EP, que idealmente detengan la progresión de la neurodegeneración o bien que mejoren los

problemas motores y cognitivos causados por ésta. Este trabajo además representa un aporte al estudio de la contribución del estrés de RE en la etiología de la EP y los posibles efectos de su manipulación farmacológica con fines terapéuticos. Nuestros resultados corresponden al primer estudio del efecto de la inhibición farmacológica de la vía mediada por el sensor PERK de la UPR *in vivo* en un modelo animal de la EP. Estudios previos usando la manipulación farmacológica de esta vía con la molécula salubrinal, que es un inhibidor de la fosfatasa de eIF2 $\alpha$ , demostraron que la activación sostenida de la vía de PERK en un modelo genético animal de la EP ( $\alpha$ -sin<sup>A53T</sup>Tg) atenúa los síntomas motores en este modelo Colla y col. 2012a, sin embargo este compuesto no genera protección a nivel de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc y además presenta limitaciones adicionales pues su uso prolongado provoca nefrotoxicidad en ratones (Wu y col. 2011).

En esta tesis demostramos que ISRIB y GSK son activos en el cerebro, específicamente en el tejido de interés, la SN. Éste corresponde al primer reporte de que ISRIB y GSK son capaces de llegar a la zona de la SN e inhibir la regulación transcripcional de la vía de la UPR mediada por PERK inducida por la inyección de Tm en este tejido, lo que representa un antecedente importante para el estudio de sus posibles efectos terapéuticos sobre las neuronas dopaminérgicas en diferentes modelos pre-clínicos de la EP.

Adicionalmente, mediante este estudio fue posible confirmar lo previamente reportado en la literatura; relativa inocuidad general de los compuestos a las concentraciones utilizadas, a excepción del compuesto GSK a altas dosis [150 mg/kg], y por otro lado efectividad a los tiempos utilizados de acuerdo a los estudios fármaco cinéticos previos. La dosis más alta probada del compuesto GSK [150 mg/kg] indujo

una pérdida significativa del peso corporal de los animales tratados con respecto a los tratados con el vehículo, sugiriendo que GSK provoca un deterioro en la condición física de los animales. Este hecho concuerda con reportes previos en los cuales los animales tratados con GSK sufren pérdida de peso e hiperglicemia debido a efectos sistémicos del compuesto. Dichos efectos han sido asociados a niveles insuficientes de insulina por la muerte de las células de los islotes pancreáticos e insuficiencia pancreática exocrina (Moreno y col. 2013).

En esta tesis se utilizó un modelo animal de la EP en el cual se inyecta la neurotoxina 6-OHDA directamente en el cuerpo estriado de ratones adultos para inducir la pérdida aguda de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc. Este modelo presenta numerosas ventajas al estar rigurosamente estandarizado en nuestro laboratorio, logrando resultados reproducibles en tiempos cortos de tratamiento. Puesto que la 6-OHDA fue inyectada en el cuerpo estriado, donde se encuentran los terminales axonales de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc y por su alta selectividad, la 6-OHDA induce específicamente la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc que inervan la zona del cuerpo estriado ventral. Este es un modelo en el cual se obtiene una neurodegeneración retrograda y progresiva, que comienza en los terminales axonales dopaminérgicos del cuerpo estriado y se extiende hasta los somas localizados en la SNpc, al igual como ocurre en pacientes con la EP. A los 7 días de la inyección de 6-OHDA se alcanza aproximadamente un 70% de denervación axonal, lo que se traduce en asimetrías motoras espontáneas que pueden ser cuantificadas. Sin embargo este modelo presenta también varias limitaciones. Una de sus desventajas es que los mecanismos moleculares involucrados en la muerte de las neuronas dopaminérgicas inducidos por la 6-OHDA *in vivo*, no son del todo

conocidos pero se deduce por su temporalidad que no serían similares a los que ocurren en los pacientes (revisado en Blum y col. 2001). Tampoco se ha observado la formación de cuerpos de Lewy en ninguno de los modelos animales basados en la inyección de 6-OHDA, siendo ésta una de las principales características histopatológicas de la enfermedad.

Existe gran controversia acerca de la contribución del estrés de RE sobre la muerte neuronal inducida por la 6-OHDA. Trabajos actuales muestran la activación de algunos de los marcadores de estrés de RE y la UPR en este modelo toxicológico tanto *in vitro* como *in vivo* (Silva y col. 2005; Wang y Takahashi 2007; Akazawa y col. 2010; Egawa y col. 2011; Fouillet y col. 2012; Selvaraj y col. 2012). Sin embargo, estudios realizados en nuestro laboratorio mostraron que en nuestro modelo toxicológico no se observa la activación de las vías mediadas por PERK o IRE1 $\alpha$  de la UPR (Valdes y col. 2014; Castillo y col. 2015).

Puesto que el principal mecanismo mediante el cual la 6-OHDA estaría generando neurotoxicidad sería a través del estrés oxidativo, ISRIB o GSK podrían modular algún(os) blancos en común río abajo de PERK y mediar respuestas adaptativas en otro tipo de mecanismos implicados en la neurodegeneración inducida por esta neurotoxina, como por ejemplo estrés oxidativo y/o disfunción mitocondrial. No obstante, si el mecanismo molecular de neurodegeneración de nuestro modelo comparte blancos río abajo de la vía de PERK, la inhibición farmacológica de esta vía no fue suficiente para ver un efecto neuroprotector. Por lo tanto, el modelo de 6-OHDA no sería el más apropiado para evaluar el potencial de estos compuestos, sería conveniente evaluar el efecto de estos compuestos en otros modelos pre-clínicos de la enfermedad de Parkinson en los cuales el estrés de RE tenga una mayor contribución

en el proceso neurodegenerativo, por ejemplo en modelos de agregación de proteínas como el modelo de  $\alpha$ -sin.

Un punto interesante a tratar es que a pesar de no observar neuroprotección en el modelo de 6-OHDA con el tratamiento de ISRIB por 21 días si fue posible evidenciar mejoras en el desempeño motor en una de las pruebas motoras realizadas (la prueba de *hanging*). Este resultado abre la posibilidad de que ISRIB podría estar mejorando el funcionamiento de las neuronas dopaminérgicas remanentes y con ello contribuyendo a paliar el daño motor ocasionado por la pérdida masiva de neuronas dopaminérgicas en nuestro modelo. Una hipótesis es que ISRIB, por algún mecanismo aún no descrito, esté aumentando la capacidad secretora de las neuronas dopaminérgicas y esta manera aumentando los niveles de dopamina en los terminales axonales del cuerpo estriado. Igualmente, podría estar favoreciendo la síntesis de dopamina o inhibición de la degradación en algún punto de la vía. No hay que descartar algún efecto de ISRIB a nivel sistémico. Para descartar esta hipótesis sería necesario repetir el análisis en animales tratados con ISRIB versus el vehículo a nivel basal, esto es, sin dañar con la neurotoxina. Considerando estudios anteriores en los cuales se ha observado que ratones tratados con ISRIB mejoran su capacidad de memoria y aprendizaje en condiciones basales (Sidrauski y col. 2013) existe la posibilidad de que los ratones tratados con ISRIB simplemente hayan aprendido mejor a llevar a cabo la prueba siendo capaces de compensar sus problemas motores, esto concuerda con nuestros resultados; el grupo de animales tratados con ISRIB muestran mejor desempeño motor en todo el periodo de tratamiento (**Figura 11C**).

Este estudio deja abierta la posibilidad de probar estas drogas en otros modelos pre-clínicos de la EP, en los cuales el estrés de RE represente una mayor contribución



a la neurodegeneración, como por ejemplo el modelo de MPTP o modelos genéticos en los cuales la neurodegeneración es mediada por la sobreexpresión de la proteína  $\alpha$ -sin. Es por ello que actualmente en nuestro laboratorio se está evaluando el tratamiento de ISRIB y GSK en un modelo de ratas adultas inyectadas con AAVs que sobreexpresan la proteína  $\alpha$ -sin silvestre humana directamente en la SNpc de estos animales. Adicionalmente se planea analizar el efecto de ISRIB y GSK en un nuevo modelo lentiviral de ratón que sobreexpresa la proteína  $\alpha$ -sin. Estos experimentos resultan prometedores considerando que los mecanismos moleculares de la neurodegeneración, sumado a una lenta progresión se asemejan más a las condiciones patológicas que afectan a los pacientes que padecen de la EP. Además, los modelos en los cuales se han descrito efectos protectores de la inhibición de la vía de la UPR mediada por PERK, son modelos mediados por la agregación patológicas de proteínas mal plegadas (Moreno y col. 2013; Halliday y col. 2015).

Finalmente, con el objetivo de comparar la inhibición farmacológica de la vía de PERK con el efecto de la inhibición genética de esta misma, actualmente se están generando ratones deficientes para la proteína PERK en el sistema nervioso central, en los que se evaluara también el efecto sobre las neuronas dopaminérgicas y sus fenotipos motores luego de ser lesionados con la neurotoxina 6-OHDA.

## 8. CONCLUSIONES

- Los compuestos GSK e ISRIB inhiben la inducción de blancos de ATF4 mediada tunicamicina *in vivo* en la SN de ratones inyectados directamente en este tejido.
- ISRIB mejora significativamente el desempeño motor (prueba de *hanging*) en nuestro modelo de 6-OHDA en ratón, sin embargo este compuesto no ejerce efectos neuroprotectores.
- GSK induce una leve protección a nivel de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc en nuestro modelo de 6-OHDA, así como también una tendencia a mejorar el desempeño motor en la prueba del *pole*.
- Este trabajo representa una contribución en la búsqueda de blancos terapéuticos contra la EP y corresponde al primer reporte de la inhibición farmacológica de la vía de PERK/ ATF4 en un modelo pre-clínico de la enfermedad, sin embargo, ya que el modelo de 6-OHDA presenta las limitaciones antes mencionadas, sería idóneo probar estas drogas en otros modelos pre-clínicos de la EP, en los cuales el estrés de RE y la agregación de proteínas sean eventos claves en el proceso neurodegenerativo.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Akazawa, Y. O., Y. Saito, K. Nishio, M. Horie, T. Kinumi, Y. Masuo, Y. Yoshida, H. Ashida, E. Niki (2010). "Proteomic characterization of the striatum and midbrain treated with 6-hydroxydopamine: alteration of 58-kDa glucose-regulated protein and C/EBP homologous protein." *Free Radic Res* 44(4): 410-421.
- Atkins, C., Q. Liu, E. Minthorn, S. Y. Zhang, D. J. Figueroa, K. Moss, T. B. Stanley, B. Sanders, A. Goetz, N. Gaul, A. E. Choudhry, H. Alsaïd, B. M. Jucker, J. M. Axten, R. Kumar (2013). "Characterization of a novel PERK kinase inhibitor with antitumor and antiangiogenic activity." *Cancer Res* 73(6): 1993-2002.
- Axten, J. M., J. R. Medina, Y. Feng, A. Shu, S. P. Romeril, S. W. Grant, W. H. Li, D. A. Heerding, E. Minthorn, T. Mencken, C. Atkins, Q. Liu, S. Rabindran, R. Kumar, X. Hong, A. Goetz, T. Stanley, J. D. Taylor, S. D. Sigethy, G. H. Tomberlin, A. M. Hassell, K. M. Kahler, L. M. Shewchuk, R. T. Gampe (2012). "Discovery of 7-methyl-5-(1-[[3-(trifluoromethyl)phenyl]acetyl]-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-amine (GSK2606414), a potent and selective first-in-class inhibitor of protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase (PERK)." *J Med Chem* 55(16): 7193-7207.
- Bach, A., S. McGowan, A. S. Gold, V. M. Villegas, A. C. Wildner, F. J. Ehli, J. M. Thompson, J. A. Bermudez-Magner, S. R. Dubovyy, T. G. Murray (2014). "Tapioca melanoma of the iris without iris heterochromia." *Optom Vis Sci* 91(4 Suppl 1): S20-24.
- Bertolotti, A., Y. Zhang, L. M. Hendershot, H. P. Harding, D. Ron (2000). "Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response." *Nat Cell Biol* 2(6): 326-332.
- Blum, D., S. Torch, N. Lambeng, M. Nissou, A. L. Benabid, R. Sadouly, J. M. Verna (2001). "Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease." *Prog Neurobiol* 65(2): 135-172.
- Boyce, M., K. F. Bryant, C. Jousse, K. Long, H. P. Harding, D. Scheuner, R. J. Kaufman, D. Ma, D. M. Coen, D. Rony, J. Yuan (2005). "A selective inhibitor of eIF2alpha dephosphorylation protects cells from ER stress." *Science* 307(5711): 935-939.
- Castillo, V., M. Onate, U. Woehlbier, P. Rozas, C. Andreu, D. Medinas, P. Valdes, F. Osorio, G. Mercado, R. L. Vidal, B. Kerr, F. A. Courty, C. Hetz (2015). "Functional Role of the Disulfide Isomerase ERp57 in Axonal Regeneration." *PLoS One* 10(9): e0136620.
- Colla, E., P. Coune, Y. Liu, O. Pletnikova, J. C. Troncoso, T. Iwatsubo, B. L. Schneider, M. K. Lee (2012a). "Endoplasmic reticulum stress is important for the manifestations of alpha-synucleinopathy in vivo." *J Neurosci* 32(10): 3306-3320.
- Colla, E., P. H. Jensen, O. Pletnikova, J. C. Troncoso, C. Glabey, M. K. Lee (2012b). "Accumulation of toxic alpha-synuclein oligomer within endoplasmic reticulum occurs in alpha-synucleinopathy in vivo." *J Neurosci* 32(10): 3301-3305.
- Conn, K. J., W. Gao, A. McKee, M. S. Lan, M. D. Ullman, P. B. Eisenhauer, R. E. Finney, J. M. Wells (2004). "Identification of the protein disulfide isomerase family member PDiP in experimental Parkinson's disease and Lewy body pathology." *Brain Res* 1022(1-2): 164-172.
- Cooper, A. A., A. D. Gitler, A. Cashikar, C. M. Haynes, K. J. Hill, B. Bhullar, K. Liu, K. Xu, K. E. Strathearn, F. Liu, S. Cao, K. A. Caldwell, G. A. Caldwell, G. Marsischky, R. D. Kolodner, J. Labaer, J. C. Rochet, N. M. Bonini, S. Lindquist (2006). "Alpha-synuclein blocks ER-Golgi traffic and Rab1 rescues neuron loss in Parkinson's models." *Science* 313(5785): 324-328.

- Costa-Mattioli, M., W. S. Sossin, E. Klanny, N. Sonenberg (2009). "Translational control of long-lasting synaptic plasticity and memory." *Neuron* **61**(1): 10-26.
- Coune, P. G., J. C. Bensadoun, P. Aebischer, B. L. Schneider (2011). "Rab1A over-expression prevents Golgi apparatus fragmentation and partially corrects motor deficits in an alpha-synuclein based rat model of Parkinson's disease." *J Parkinsons Dis* **1**(4): 373-387.
- Credle, J. J., P. A. Forcelli, M. Delannoy, A. W. Oaks, E. Permaul, D. L. Berry, V. Duka, J. Wills, A. Sidhu (2015). "alpha-Synuclein-mediated inhibition of ATF6 processing into COPII vesicles disrupts UPR signaling in Parkinson's disease." *Neurobiol Dis* **76**: 112-125.
- Chung, C. Y., V. Khurana, P. K. Auluck, D. F. Tardiff, J. R. Mazzulli, F. Soldner, V. Baru, Y. Lou, Y. Frey, S. Cho, A. E. Mungenast, J. Muffat, M. Mitalipova, M. D. Pluth, N. T. Jui, B. Schule, S. J. Lippard, L. H. Tsai, D. Krainc, S. L. Buchwald, R. Jaenisch, S. Lindquist (2013). "Identification and rescue of alpha-synuclein toxicity in Parkinson patient-derived neurons." *Science* **342**(6161): 983-987.
- Dauer, W., S. Przedborski (2003). "Parkinson's disease: mechanisms and models." *Neuron* **39**(6): 889-909.
- de Lau, L. M., M. M. Breteler (2006). "Epidemiology of Parkinson's disease." *Lancet Neurol* **5**(6): 525-535.
- Egawa, N., K. Yamamoto, H. Inoue, R. Hikawa, K. Nishi, K. Moriyama, R. Takahashi (2011). "The endoplasmic reticulum stress sensor, ATF6alpha, protects against neurotoxin-induced dopaminergic neuronal death." *J Biol Chem* **286**(10): 7947-7957.
- Fouillet, A., C. Levet, A. Virgone, M. Robin, P. Dourlen, J. Rieusset, E. Belaidi, M. Ovize, M. Touret, S. Nataf, B. Mollereau (2012). "ER stress inhibits neuronal death by promoting autophagy." *Autophagy* **8**(6): 915-926.
- Gitler, A. D., B. J. Bevis, J. Shorter, K. E. Strathearn, S. Hamamichi, L. J. Su, K. A. Caldwell, G. A. Caldwell, J. C. Rochet, J. M. McCaffery, C. Barlowey, S. Lindquist (2008). "The Parkinson's disease protein alpha-synuclein disrupts cellular Rab homeostasis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(1): 145-150.
- Gorbatyuk, M. S., A. Shabashvili, W. Chen, C. Meyers, L. F. Sullivan, M. Salganik, J. H. Lin, A. S. Lewin, N. Muzyczka, O. S. Gorbatyuk (2012). "Glucose regulated protein 78 diminishes alpha-synuclein neurotoxicity in a rat model of Parkinson disease." *Mol Ther* **20**(7): 1327-1337.
- Halliday, M., H. Radford, G. R. Mallucci (2014). "Prions: generation and spread versus neurotoxicity." *J Biol Chem* **289**(29): 19862-19868.
- Halliday, M., H. Radford, Y. Sekine, J. Moreno, N. Verity, J. Le Quesne, C. A. Ortori, D. A. Barrett, C. Fromont, P. M. Fischer, H. P. Harding, D. Rony, G. R. Mallucci (2015). "Partial restoration of protein synthesis rates by the small molecule ISRIB prevents neurodegeneration without pancreatic toxicity." *Cell Death Dis* **6**: e1672.
- Harding, H. P., I. Novoa, Y. Zhang, H. Zeng, R. Wek, M. Schapira, D. Ron (2000). "Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells." *Mol Cell* **6**(5): 1099-1108.
- Hashida, K., Y. Kitao, H. Sudo, Y. Awa, S. Maeda, K. Mori, R. Takahashi, M. Inumayama, O. Hori (2012). "ATF6alpha promotes astroglial activation and neuronal survival in a chronic mouse model of Parkinson's disease." *PLoS One* **7**(10): e47950.
- Hetz, C. (2012). "The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond." *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**(2): 89-102.
- Hetz, C., E. Chevet, H. P. Harding (2013). "Targeting the unfolded protein response in disease." *Nat Rev Drug Discov* **12**(9): 703-719.
- Hetz, C., E. Chevet, S. A. Oakes (2015). "Erratum: Proteostasis control by the unfolded protein response." *Nat Cell Biol* **17**(8): 1088.
- Hetz, C., B. Mollereau (2014). "Disturbance of endoplasmic reticulum proteostasis in neurodegenerative diseases." *Nat Rev Neurosci* **15**(4): 233-249.
- Hetz, C., C. Soto (2003). "Protein misfolding and disease: the case of prion disorders." *Cell Mol Life Sci* **60**(1): 133-143.

- Hoozemans, J. J., E. S. van Haastert, P. Eikelenboom, R. A. de Vos, J. M. Rozemuller, W. Scheper (2007). "Activation of the unfolded protein response in Parkinson's disease." *Biochem Biophys Res Commun* **354**(3): 707-711.
- Lange, P. S., J. C. Chavez, J. T. Pinto, G. Coppola, C. W. Sun, T. M. Townes, D. H. Geschwind, R. R. Ratan (2008). "ATF4 is an oxidative stress-inducible, prodeath transcription factor in neurons in vitro and in vivo." *J Exp Med* **205**(5): 1227-1242.
- Ma, T., M. A. Trinh, A. J. Wexler, C. Bourbon, E. Gatti, P. Pierre, D. R. Cavener, E. Klann (2013). "Suppression of eIF2 $\alpha$  kinases alleviates Alzheimer's disease-related plasticity and memory deficits." *Nat Neurosci* **16**(9): 1299-1305.
- Martin, I., V. L. Dawson, T. M. Dawson (2011). "Recent advances in the genetics of Parkinson's disease." *Annu Rev Genomics Hum Genet* **12**: 301-325.
- Matus, S., L. H. Glimcher, C. Hetz (2011). "Protein folding stress in neurodegenerative diseases: a glimpse into the ER." *Curr Opin Cell Biol* **23**(2): 239-252.
- Matus, S., E. Lopez, V. Valenzuela, M. Nassif, C. Hetz (2013a). "Functional contribution of the transcription factor ATF4 to the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis." *PLoS One* **8**(7): e66672.
- Matus, S., V. Valenzuela, D. B. Medina, C. Hetz (2013b). "ER Dysfunction and Protein Folding Stress in ALS." *Int J Cell Biol* **2013**: 674751.
- Mercado, G., V. Castillo, R. Vidaly, C. Hetz (2015). "ER proteostasis disturbances in Parkinson's disease: novel insights." *Front Aging Neurosci* **7**: 39.
- Mercado, G., P. Valdes, C. Hetz (2013). "An ERcentric view of Parkinson's disease." *Trends Mol Med* **19**(3): 165-175.
- Morales, R., L. D. Estrada, R. Diaz-Espinoza, D. Morales-Scheihing, M. C. Jara, J. Castillay, C. Soto (2010). "Molecular cross talk between misfolded proteins in animal models of Alzheimer's and prion diseases." *J Neurosci* **30**(13): 4528-4535.
- Moreno, J. A., M. Halliday, C. Molloy, H. Radford, N. Verity, J. M. Axten, C. A. Ortori, A. E. Willis, P. M. Fischer, D. A. Barretty, G. R. Mallucci (2013). "Oral treatment targeting the unfolded protein response prevents neurodegeneration and clinical disease in prion-infected mice." *Sci Transl Med* **5**(206): 206ra138.
- Moreno, J. A., H. Radford, D. Peretti, J. R. Steinert, N. Verity, M. G. Martin, M. Halliday, J. Morgan, D. Dinsdale, C. A. Ortori, D. A. Barrett, P. Tsaytler, A. Bertolotti, A. E. Willis, M. Bushell, G. R. Mallucci (2012). "Sustained translational repression by eIF2 $\alpha$ -P mediates prion neurodegeneration." *Nature* **485**(7399): 507-511.
- Novoa, I., H. Zeng, H. P. Harding, D. Ron (2001). "Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2 $\alpha$ ." *J Cell Biol* **153**(5): 1011-1022.
- Poewe, W., P. Mahr, Knechty, J. Jankovic (2012). "Emerging therapies for Parkinson's disease." *Curr Opin Neurol* **25**(4): 448-459.
- Roussel, B. D., A. J. Kruppa, E. Miranda, D. C. Crowther, D. A. Lomas, S. J. Marciniak (2013). "Endoplasmic reticulum dysfunction in neurological disease." *Lancet Neurol* **12**(1): 105-118.
- Rutkowski, D. T., S. M. Arnold, C. N. Miller, J. Wu, J. Li, K. M. Gunnison, K. Mori, A. A. Sadighi Akha, D. Radeny, R. J. Kaufman (2006). "Adaptation to ER stress is mediated by differential stabilities of pro-survival and pro-apoptotic mRNAs and proteins." *PLoS Biol* **4**(11): e374.
- Sado, M., Y. Yamasaki, T. Iwanaga, Y. Onaka, T. Ibuki, S. Nishihara, H. Mizuguchi, H. Momota, R. Kishibuchi, T. Hashimoto, D. Wada, H. Kitagawa, T. K. Watanabe (2009). "Protective effect against Parkinson's disease-related insults through the activation of XBP1." *Brain Res* **1257**: 16-24.
- Salganik, M., V. G. Sergeev, V. Shinde, C. A. Meyers, M. S. Gorbatyuk, J. H. Lin, S. Zolotukhina, O. S. Gorbatyuk (2015). "The loss of glucose-regulated protein 78 (GRP78) during normal aging or from siRNA knockdown augments human alpha-synuclein (alpha-syn) toxicity to rat nigral neurons." *Neurobiol Aging* **36**(6): 2213-2223.

- Sekine, Y., A. Zyryanova, A. Crespillo-Casado, P. M. Fischer, H. P. Harding, D. Ron (2015). "Stress responses. Mutations in a translation initiation factor identify the target of a memory-enhancing compound." *Science* **348**(6238): 1027-1030.
- Selvaraj, S., Y. Sun, J. A. Watt, S. Wang, S. Lei, L. Birnbaum, B. B. Singh (2012). "Neurotoxin-induced ER stress in mouse dopaminergic neurons involves downregulation of TRPC1 and inhibition of AKT/mTOR signaling." *J Clin Invest* **122**(4): 1354-1367.
- Sidrauski, C., D. Acosta-Alvear, A. Khoutorsky, P. Vedantham, B. R. Hearn, H. Li, K. Gamache, C. M. Gallagher, K. K. Ang, C. Wilson, V. Okreglak, A. Ashkenazi, B. Hann, K. Nader, M. R. Arkin, A. R. Renslo, N. Sonenberg, P. Walter (2013). "Pharmacological brake-release of mRNA translation enhances cognitive memory." *Elife* **2**: e00498.
- Silva, R. M., V. Ries, T. F. Oo, O. Yarygina, V. Jackson-Lewis, E. J. Ryu, P. D. Lu, S. J. Marciniak, D. Ron, S. Przedborski, N. Kholodilov, L. A. Greeney, R. E. Burke (2005). "CHOP/GADD153 is a mediator of apoptotic death in substantia nigra dopamine neurons in an in vivo neurotoxin model of parkinsonism." *J Neurochem* **95**(4): 974-986.
- Slodzinski, H., L. B. Moran, G. J. Michael, B. Wang, S. Novoselov, M. E. Cheetham, R. K. Pearce, M. B. Graeber (2009). "Homocysteine-induced endoplasmic reticulum protein (herp) is up-regulated in parkinsonian substantia nigra and present in the core of Lewy bodies." *Clin Neuropathol* **28**(5): 333-343.
- Soto, C. (2003). "Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases." *Nat Rev Neurosci* **4**(1): 49-60.
- Spillantini, M. G., M. L. Schmidt, V. M. Lee, J. Q. Trojanowski, R. Jakes, M. Goedert (1997). "Alpha-synuclein in Lewy bodies." *Nature* **388**(6645): 839-840.
- Tabas, I., D. Ron (2011). "Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress." *Nat Cell Biol* **13**(3): 184-190.
- Torres, M., L. Cartier, J. M. Matamala, N. Hernandez, U. Woehlbiery, C. Hetz (2012). "Altered Prion protein expression pattern in CSF as a biomarker for Creutzfeldt-Jakob disease." *PLoS One* **7**(4): e36159.
- Tsaytler, P., A. Bertolotti (2013). "Exploiting the selectivity of protein phosphatase 1 for pharmacological intervention." *FEBS J* **280**(2): 766-770.
- Ulusoy, A., M. Decressac, D. Kiriky, A. Bjorklund (2010). "Viral vector-mediated overexpression of alpha-synuclein as a progressive model of Parkinson's disease." *Prog Brain Res* **184**: 89-111.
- Urra, H., E. Dufey, F. Lisbona, D. Rojas-Riveray, C. Hetz (2013). "When ER stress reaches a dead end." *Biochim Biophys Acta* **1833**(12): 3507-3517.
- Valdes, P., G. Mercado, R. L. Vidal, C. Molina, G. Parsons, F. A. Court, A. Martinez, D. Galleguillos, D. Armentano, B. L. Schneidery, C. Hetz (2014). "Control of dopaminergic neuron survival by the unfolded protein response transcription factor XBP1." *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**(18): 6804-6809.
- Valenzuela, V., E. Collyer, D. Armentano, G. B. Parsons, F. A. Courty, C. Hetz (2012). "Activation of the unfolded protein response enhances motor recovery after spinal cord injury." *Cell Death Dis* **3**: e272.
- Vidal, R. L., A. Figueroa, F. A. Court, P. Thielen, C. Molina, C. Wirth, B. Caballero, R. Kiffin, J. Segura-Aguilar, A. M. Cuervo, L. H. Glimchery, C. Hetz (2012). "Targeting the UPR transcription factor XBP1 protects against Huntington's disease through the regulation of FoxO1 and autophagy." *Hum Mol Genet* **21**(10): 2245-2262.
- Walter, P., D. Ron (2011). "The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation." *Science* **334**(6059): 1081-1086.
- Wang, H. Q., R. Takahashi (2007). "Expanding insights on the involvement of endoplasmic reticulum stress in Parkinson's disease." *Antioxid Redox Signal* **9**(5): 553-561.
- Wu, C. T., M. L. Sheu, K. S. Tsai, C. K. Chiang, S. H. Liu (2011). "Salubrinal, an eIF2alpha dephosphorylation inhibitor, enhances cisplatin-induced oxidative stress and nephrotoxicity in a mouse model." *Free Radic Biol Med* **51**(3): 671-680.
- Zimprich, A., A. Benet-Pages, W. Struhal, E. Graf, S. H. Eck, M. N. Offman, D. Haubenberger, S. Spielberger, E. C. Schulte, P. Lichtner, S. C. Rossle, N. Klopp, E. Wolf, K. Seppi, W.

- Pirker, S. Presslauer, B. Mollenhauer, R. Katzenschlager, T. Foki, C. Hotzy, E. Reinthaler, A. Harutyunyan, R. Kralovics, A. Peters, F. Zimprich, T. Brucke, W. Poewe, E. Auff, C. Trenkwalder, B. Rost, G. Ransmayr, J. Winkelmann, T. Meitinger, T. M. Strom (2011). "A mutation in VPS35, encoding a subunit of the retromer complex, causes late-onset Parkinson disease." *Am J Hum Genet* **89**(1): 168-175.
- Zuleta, A., R. L. Vidal, D. Armentano, G. Parsons, C. Hetz (2012). "AAV-mediated delivery of the transcription factor XBP1s into the striatum reduces mutant Huntingtin aggregation in a mouse model of Huntington's disease." *Biochem Biophys Res Commun* **420**(3): 558-563.
- Zuleta, B (2007). *El sistema nervioso: desde las neuronas hasta el cerebro humano*. Editorial. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia. 1era edición. Cap.11 págs. 140-141.