



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE PREGRADO

**EFFECTO DE LA SOBREENPRESIÓN DE ERP57 EN UN MODELO FARMACOLÓGICO
DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON *IN VIVO***

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los
requisitos para optar al título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

Valentina Fernanda Castillo Salgado

Director del Seminario de Título: Claudio Hetz Flores

Co-director del Seminario de Título: René Vidal Gómez

Abril, 2014

Santiago-Chile

UCH-FC
Biotecnología
C.352
C.1



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE PREGRADO

**EFFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN DE ERP57 EN UN MODELO FARMACOLÓGICO
DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON *IN VIVO***

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los
requisitos para optar al título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

Valentina Fernanda Castillo Salgado

Director del Seminario de Título: Claudio Hetz Flores

Co-director del Seminario de Título: René Vidal Gómez

Abril, 2014

Santiago-Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile que el Seminario de Título presentado por la **Srta. Valentina Fernanda Castillo Salgado**,

“EFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN DE ERP57 EN UN MODELO FARMACOLÓGICO DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON *IN VIVO*”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de **Ingeniero en Biotecnología Molecular**.

Dr. Claudio Hetz Flores
Director Seminario de Título

Dr. René Vidal Gómez
Co-director Seminario de Título

Comisión Revisora y Evaluadora

Dr. Alejandro Roth
Presidente Comisión

Dr. Elías Utreras Puratich
Evaluador

Santiago, 4 de Abril de 2014

BIOGRAFÍA

Los cimientos de mi crianza forjaron desde pequeña una niña que siempre intentaba 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. Aunque debo admitir que en educación física había una extraña atracción de las pelotas hacia mí. Cuando pequeña pensaban que me iría por las artes, pues solía escribir historias, pintar y me encantaba diseñar vestuario. Me fascinaba innovar, descubrir cosas nuevas, inventar, ingeniármelas, eso me abrió un mundo de posibilidades donde escoger para mis estudios superiores. Recuerdo que un día cuando estaba en segundo año medio fue una ex alumna de mi liceo a dar una charla, a contarnos sobre su carrera y el campo en que se desempeñaba, mis ojos se centraron en esa carrera tan novedosa, que no era ni biología ni matemáticas ni técnico manual, sino todas ellas juntas. Me pareció increíble, una carrera para innovar, descubrir, desentrañar los misterios de la vida y utilizarlos a beneficio del hombre, 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. No niego que no ha sido un camino fácil, pero sí lleno de aprendizaje, de crecimiento profesional, intelectual y personal, y estoy consciente que éste es sólo el comienzo. Hoy puedo decir que he aprendido que no es necesario ser brillante para lograr algo, basta que te lo propongas, pienses que es lo más fabuloso del mundo,



pongas toda tu energía en lograrlo y las circunstancias y las personas adecuadas harán el resto!

AGRADECIMIENTOS

Porque sin la ayuda de ciertas personas no hubiera sido posible culminar esta etapa académica, me gustaría dar las gracias en primer lugar a mi gran amiga, parner, consejera, paño de lagrimas, red bull; mi madre, Marcela, porque mis logros son sus logros, gracias por escucharme, entenderme, soportarme en mis peores momentos, por estar siempre ahí, por creer siempre en mí. También me gustaría agradecer a una persona muy importante en mi formación personal, una persona muy presente en mi vida que ha aportado mucho conocimiento y sabiduría, mi abuela, Nancy, muchas gracias por la paciencia, por el cariño, apoyo, comprensión y consejos. Sé que en estos momentos debes estar muy orgullosa de mí. A mi prima Natacha, que durante la infancia fue como una hermana y ahora se ha convertido en una gran amiga, una persona de carácter y rectitud y por ello de mucha confianza. A mis primas; Javi, Vicky, Cota y mi prima adoptiva Gaby que estuvieron muy presentes en esta última etapa, resultaron ser excelentes amigas y confidentes. Las quiero mucho.

A mi amiga Nicole, que a pesar de no vernos nunca, después de 10 años de amistad aún seguimos siendo muy unidas, gracias por hacerme tanto reír durante tantos años en el colegio y aún seguir haciéndolo.

A Roxana, una gran amiga de la universidad a la cual aprecio mucho, una persona íntegra, de gran corazón, siempre preocupada, espero seguir viéndote siempre.

A mis queridos amigos "Blotec"; Fablán, Ester y Natalla, por la linda amistad que se dio naturalmente en los últimos años de la carrera, y que a pesar de que

tomamos rumbos bastante distintos, aún mantenemos y cosechamos. Gracias por los lindos momentos, y creo con seguridad que seguiremos apoyándonos a la distancia.

A mis amigos Biólogos Karl, Paull, Seba, Matías, Nico, y Dani por ser parte importante de mi etapa universitaria, gracias por ser todos tan muebles, espero seguir viéndolos siempre, son los mejores.

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 proactividad y crecimiento personal como científica. Quiero agradecer también a una persona fundamental en el desarrollo de mi seminario de título, Pamela Valdés, muchas gracias Pame por dedicar tanto tiempo en transmitirme tu conocimiento y por hacerlo de manera tan pedagógica. Además gracias por ser una persona tan agradable y comprometida. También me gustaría agradecer a Gabriela Martínez por acogerme con tanta calidez cuando llegue al laboratorio, por guiarme y aconsejarme hasta el día de hoy en cualquier ámbito. A Gabriela Mercado por enseñarme histología, estereotaxis y guiarme con alta rigurosidad científica. Espero que hagamos un buen equipo de trabajo en los proyectos venideros. A Ute, por sus consejos en el manejo de la colonia y por sus excelentes sugerencias y críticas científicas. A René Vidal por su co-tutoría en mi seminario de título. A Diego Rojas y Claudia Durán por sus conocimientos estadísticos.

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; a Huguito por su ayuda desinteresada ante cualquier inconveniente y por el tiempo invertido en la revisión de mi escrito con tanta eficiencia. A Natalia Muñoz por su calidez humana y

compañerismo en momentos difíciles, y por ser la reina del Western blot obvio. A Daniela por las risas compartidas. A Silke, por su instrucción en el manejo de animales y por sobre todo por la buena disposición, preocupación y amistad durante el tiempo que estuvimos juntas.

Me gustaría agradecer especialmente a Claudia Molina por convertirse en una gran amiga brindándome un apoyo fundamental tanto en el ámbito profesional como emocional durante todo este periodo. Y por su puesto a mi amiga querida, Leslie, gracias por la incondicionalidad, la relación de confianza y apoyo que hemos formado durante estos dos últimos años, y espero que sigamos construyendo.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

BIOGRAFÍA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
ÍNDICE DECONTENIDOS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ÍNDICE DETABLAS.....	ix
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	x
1. RESUMEN.....	1
1. ABSTRACT.....	3
2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....	4
2.1 La enfermedad de Parkinson.....	4
2.2 El estrés de RE y la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR).....	9
2.3 El estrés de RE y la EP.....	11
2.3.1 El estrés de RE en modelos genéticos de la EP.....	13
2.3.2 El estrés de RE en modelos toxicológicos de la EP.....	18
El estrés de RE en el modelo toxicológico de 6-OHDA.....	19
2.3.3 Manipulación de la UPR en modelos experimentales de la EP.....	23
2.4 La familia de las proteínas disulfuro isomerasas (PDIs).....	26
2.5 Rol fisiológico de ERp57.....	28
2.6 PDIs y neurodegeneración.....	31
3. HIPÓTESIS.....	36
4. OBJETIVOS.....	37
4.1 Objetivo general.....	37
4.2 Objetivos específicos.....	37
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
5.1 Generación de un ratón transgénico para ERp57 en el SNC.....	37
5.2 Inyecciones estereotáxicas de 6-hidroxidopamina.....	40
5.3 Inmunohistoquímica anti-Tirosina Hidroxilasa.....	41
5.4 Cuantificación de somas TH ⁺ de la SNpc y terminales axonales del cuerpo estriado.....	43
5.5 Análisis mediante SDS-PAGE y Western blot.....	44
5.6 Extracción de ARN, RT-PCR y PCR en tiempo real.....	46

5.6 Extracción de ARN, RT-PCR y PCR en tiempo real.....	46
5.7 Test de comportamiento del cilindro.	48
5.8 Expresión de resultados y análisis estadístico.	48
6. RESULTADOS.	50
6.1 Modelo de estudio: Ratón transgénico para ERp57 en el SNC.....	50
6.2 Objetivo específico 1: Cuantificar la expresión basal de PDIs en la SN y en el cuerpo estriado de ratones transgénicos para ERp57 en el SNC.	54
6.3 Objetivo específico 2: Analizar la susceptibilidad de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc frente a la muerte inducida por la neurotoxina 6-OHDA en ratones transgénicos para ERp57 en el SNC.	57
6.3.1 Efecto de la sobreexpresión de ERp57 sobre la viabilidad de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc luego de la inyección de 6-OHDA.	57
6.3.2 Evaluación de cambios motores espontáneos inducidos por la inyección de 6-OHDA en el cuerpo estriado de ratones transgénicos para ERp57 en el SNC. ...	66
6.4 Objetivo específico 3: Cuantificar la expresión de algunas PDIs en la SN y en el cuerpo estriado de ratones transgénicos para ERp57 en el SNC después del tratamiento con 6-OHDA.	67
6.4.1 Evaluación de los niveles de ARNm de PDI y ERp72 en la SN de ratones ERp57 ^{Tg} inyectados con 6-OHDA.	69
6.4.2 Evaluación de los niveles de expresión de las proteínas PDI y ERp72 en la SN y en el cuerpo estriado de ratones ERp57 ^{Tg} inyectados con 6-OHDA.	69
7. DISCUSIÓN.....	77
7.1 ERp57, una proteína multifuncional.	77
7.2 Modelo de ratones transgénicos para ERp57 en el SNC.	78
7.3. Efecto funcional de ERp57 en la sobrevivencia de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc.....	80
7.4. Estrés de RE y activación de la UPR en ratones transgénicos para ERp57 inyectados con 6-OHDA.	85
8. CONCLUSIONES.	87
9. PROYECCIONES.	88
10. REFERENCIAS.	89

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1	Esquema representativo del circuito nigro-estriatal que se encuentra afectado en la EP.	6
Figura 2	Respuesta a proteínas mal plegadas (UPR).	12
Figura 3	Estrés de RE y activación de la UPR en tejido <i>post mortem</i> y en modelos animales de la EP.	14
Figura 4	La familia de las PDIs.	29
Figura 5	Participación de ERp57 en el ciclo de CNX/CRT.	30
Figura 6	Diferentes funciones de ERp57 en el RE.	32
Figura 7	Evidencia que vincula las PDIs con enfermedades neurodegenerativas.	34
Figura 8	Estrategia experimental utilizada para la generación de ratones transgénicos para ERp57 en el SNC.	39
Figura 9	Curso temporal de los experimentos llevados a cabo en ratones ERp57 ^{Tg} .	49
Figura 10	Caracterización de las líneas de ratones transgénicos para ERp57 en el SNC.	52
Figura 11	Análisis de la expresión de la proteína ERp57 en disecciones de SN y cuerpo estriado de ratones ERp57 ^{No-Tg} y ERp57 ^{Tg} .	55
Figura 12	Análisis de los niveles de ARNm de las foldasas ERp72 y PDI en disecciones de SN de ratones ERp57 ^{No-Tg} y ERp57 ^{Tg} .	58
Figura 13	Análisis histológico y cuantificación del daño inducido por 6-OHDA en el cuerpo estriado de ratones ERp57 ^{No-Tg} y ERp57 ^{Tg} .	60
Figura 14	Análisis histológico de la distribución de somas TH ⁺ en la SNpc de ratones ERp57 ^{No-Tg} y ERp57 ^{Tg} .	62
Figura 15	Cuantificación del daño global inducido por 6-OHDA en la SNpc de ratones ERp57 ^{No-Tg} y ERp57 ^{Tg} .	63

Figura 16	Análisis histológico y cuantificación espacial del daño inducido por 6-OHDA en la SNpc de ratones ERp57 ^{No-Tg} y ERp57 ^{Tg} .	64
Figura 17	Cuantificación espacial del daño inducido por 6-OHDA en la SNpc de ratones ERp57 ^{No-Tg} .	65
Figura 18	Evaluación de cambios motores espontáneos inducidos por la inyección de 6-OHDA en el cuerpo estriado de ratones ERp57 ^{Tg} y ERp57 ^{No-Tg} .	68
Figura 19	Análisis de los niveles de ARNm de las foldasas PDI y ERp72 en disecciones de SN de ratones ERp57 ^{No-Tg} y ERp57 ^{Tg} inyectados con 6-OHDA.	70
Figura 20	Análisis de expresión de la proteína ERp57 en disecciones de cuerpo estriado de ratones ERp57 ^{No-Tg} y ERp57 ^{Tg} inyectados con 6-OHDA.	72
Figura 21	Análisis de expresión de la proteína ERp72 en disecciones de cuerpo estriado de ratones ERp57 ^{No-Tg} y ERp57 ^{Tg} inyectados con 6-OHDA.	73
Figura 22	Análisis de expresión de la proteína TH en disecciones de SN de ratones ERp57 ^{No-Tg} y ERp57 ^{Tg} inyectados con 6-OHDA.	74
Figura 23	Análisis de expresión de las proteínas PDI y ERp72 en disecciones de SN de ratones ERp57 ^{No-Tg} y ERp57 ^{Tg} inyectados con 6-OHDA.	76

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1	Análisis semi-cuantitativo de los niveles de expresión de ERp57 en cerebelo y médula espinal de animales ERp57 ^{No-Tg} y ERp57 ^{Tg} .	53
Tabla 2	Análisis semi-cuantitativo de los niveles de expresión de ERp57 en la SN y cuerpo estriado de animales ERp57 ^{No-Tg} y ERp57 ^{Tg} .	56

ÍNDICE DE ABREVIATURAS.

6-OHDA: 6-hidroxidopamina

α -sin: alfa-sinucleína

A53T: mutación puntual que reemplaza una Alanina por una Treonina

A30P: mutación puntual que reemplaza una Alanina por una Prolina

AP: coordenada estereotáctica en el eje anteroposterior según el atlas del cerebro de ratón de Franklin y Paxinos

ASK1: Apoptosis Signal-regulating Kinase

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ARNm: Ácido Ribonucleico Mensajero

ATF4: Activating Transcription Factor 4

ATF6: Activating Transcription Factor 6

ATF6f: fragmento de ATF6 que actúa como factor transcripcional

BCL2: B-cell lymphoma 2 protein

Bip: Binding Immunoglobulin Protein

Chop: C/EBP Homologous Protein

CJ: Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob

CNX: Calnexina

CRT: Calreticulina

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

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

EA: Enfermedad de Alzheimer

EF1a: Elongation Factor-1 alpha

EGFP: Enhanced Green Fluorescent Protein

EH: Enfermedad de Huntington

eIF2 α : Eukariotic Initiation Factor 2 alpha

ELA: Esclerosis Lateral Amiotrónica

EP: Enfermedad de Parkinson

ERAD: Endoplasmic-Reticulum-Associated Degradation Protein

ERp57: Endoplasmic Reticulum Protein 57/Grp58

ERp57^{Tg}: ratones transgénicos para ERp57

ERp57^{No-Tg}: ratones no transgénicos para ERp57

GAAD34: Growth Arrest and DNA Damage Protein-34.

GSH: Glutathione

Grp78: Glucose-regulated Protein-78 Kilodaltons

h: horas

Herp: Homocysteine-induced Endoplasmic Reticulum Protein

IHC: Inmunohistoquímica

IRE1 α : Inositol Requiring Protein-1 alpha

JNK: stress-activated protein kinases SAPK/c-Jun N-terminal kinase

KO: knock-out

LRRK2: Leucine-Rich Repeat Kinase 2

MEFs: Mouse Embryonic Fibroblast

MFB: Medial Forebrain Bundle

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

MPTP: 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine

NF- κ B: Nuclear Factor- kappa B

OCT: Optimal Cutting Temperature medium

PBS: Phosphate Buffered Saline

PCR: Polymerase Chain Reaction

PDI: Protein Disulfide Isomerase

PDIp: Pancreas specific Protein Disulfide Isomerase

PERK: Protein Kinase RNA (PKR)-like ER kinase.

PFA: paraformaldehído

PMDs: Protein Misfolding Disorders

PUMA: p53 up-regulated modulator of apoptosis

qPCR: quantitative PCR

RE: Retículo Endoplasmático

ROS: Reactive Oxygen Species

SNC: Sistema Nervioso Central

SNpc: Substantia Nigra pars compacta

shARN: short-hairpin ARN

Tm: tunicamicina

UPR: Unfolded Protein Response

WT: Wild Type

XBP1: X-Box binding Protein-1

XBP1s: X-Box binding Protein-1 spliced

XBP1u: X-Box binding Protein-1 unspliced

1. RESUMEN

ERp57 es una proteína multifuncional con actividad tior oxidoreductasa. Pertenece a la familia de las proteínas disulfuro isomerasas (PDIs) y se encuentra principalmente localizada en el retículo endoplásmico (RE), donde juega un rol importante en el control de calidad y plegamiento de glicoproteínas recién sintetizadas, catalizando la formación de puentes disulfuro en el ciclo de Calnexina/Calreticulina (CNX/CRT). A pesar de que la función de la proteína ERp57 en el sistema nervioso y su posible contribución en enfermedades neurodegenerativas aún no ha sido dilucidado, existe numerosa evidencia que sugiere un posible rol neuroprotector de la proteína ERp57 o su miembro más cercano, PDI, en la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJ), la enfermedad de Alzheimer (EA), la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y la enfermedad de Parkinson (EP). Es por ello que esta proteína resulta un blanco atractivo para el desarrollo de nuevos tratamientos y el diagnóstico temprano de varias enfermedades neurodegenerativas humanas. En este seminario de título se estudió el posible efecto de la sobreexpresión de ERp57 en la sobrevivencia de las neuronas dopaminérgicas de la *Substantia Nigra pars compacta* (SNpc) en un modelo toxicológico *in vivo* de la EP. Para ello se realizó la inyección estriatal de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) en ratones transgénicos para ERp57 (ERp57^{Tg}) en el sistema nervioso central (SNC) y se determinó la lesión generada por la neurotoxina en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc. Mediante un análisis histológico de cortes de cerebro que comprendían todo el cuerpo estriado y la SNpc en el eje anteroposterior, no se encontraron diferencias significativas en la pérdida de células positivas para el marcador dopaminérgico tirosina hidroxilasa (TH) en la SNpc, ni tampoco en los terminales axonales del cuerpo estriado de animales ERp57^{Tg} en comparación con aquellos no transgénicos (ERp57^{No-Tg}).

Además, a partir del test del cilindro fue posible evaluar asimetrías motoras espontáneas asociadas al daño hemilateral causado por la inyección de 6-OHDA. En correlación con los resultados obtenidos por análisis histológico, los animales ERp57^{Tg} no mostraron diferencias en los niveles de asimetría motora al compararlos con el grupo de animales ERp57^{No-Tg}. En conjunto estos resultados indican que la sobreexpresión de ERp57 no protege frente a la neurotoxicidad inducida por la 6-OHDA.

Adicionalmente, se evaluaron los niveles de expresión de las foldasas PDI y ERp72 en la SN y el cuerpo estriado de ratones ERp57^{Tg} y ERp57^{No-Tg} inyectados con 6-OHDA, observándose un aumento significativo en los niveles de ARNm de PDI y ERp72 en la SN de ratones ERp57^{No-Tg}. Estos resultados sugieren que la neurodegeneración inducida por 6-OHDA genera alteraciones en la expresión de chaperonas asociadas a estrés de RE.

El presente trabajo contribuye a la exploración actual de la etiología de la EP y a la búsqueda de posibles blancos terapéuticos para esta patología, ya que proporciona evidencia del efecto funcional de la sobreexpresión de una proteína moduladora de estrés celular, en un modelo toxicológico *in vivo* que recapitula la neurodegeneración observada en pacientes con la EP. Además estos resultados conducen a explorar nuevas estrategias experimentales que complementen lo descrito anteriormente, como la expresión de ERp57 en la SN mediante virus recombinantes o el uso de modelos genéticos de la EP como la expresión de alfa-sinucleína (α -sin) en ratones ERp57^{Tg}.

1. ABSTRACT

ERp57 is a multifunctional protein with thiol oxidoreductase activity. It belongs to the protein disulfide isomerases (PDIs) family and is found mainly in the endoplasmic reticulum (ER) where it plays an important role in quality control and folding of newly synthesized glycoproteins, catalyzing disulfide bonds formation in the Calnexin/Calreticulin (CNX/CRT) cycle. Although the role of ERp57 protein in the nervous system and its possible contribution to neurodegenerative diseases has not yet been elucidated, there is a lot of evidence suggesting a possible neuroprotective role of ERp57 or its nearest member, PDI, in Creutzfeldt-Jakob disease (CJ), Alzheimer's disease (AD), Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) and Parkinson's disease (PD). Making this protein an attractive target for the development of new treatments and early diagnosis of several human neurodegenerative diseases. In this seminar the possible effect of ERp57 overexpression in dopaminergic neurons survival in the *Substantia Nigra pars compacta* (SNpc) in a toxicological *in vivo* model of PD was studied. For this purpose, the striatal injection of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) was performed in mice transgenic for ERp57 (ERp57^{Tg}) in the central nervous system (CNS) and the injury caused by the neurotoxin 6-OHDA in the dopaminergic neurons from SNpc was determined. By histological analysis of brain sections spanning the entire striatum and SNpc in the anteroposterior axis, no significant differences were found in the loss of cells positive for the dopaminergic marker tyrosine hydroxylase (TH) in the SNpc, nor axon terminals from the striatum of animals ERp57^{Tg} compared to those non transgenic (ERp57^{Non-Tg}). In addition, the cylinder test was used to evaluate spontaneous motor asymmetries associated with hemilateral damage caused by 6-OHDA injection. In agreement with the histological analysis, the transgenic ERp57^{Tg} animals showed no

differences in the levels of motor asymmetry compared to the ERp57^{Non-Tg} group. Together these results indicate that ERp57 overexpression does not protect against 6-OHDA neurotoxicity.

Still, when expression levels of PDI and ERp72 foldases in the SN and the striatum of ERp57^{Tg} and ERp57^{Non-Tg} mice injected with 6-OHDA were evaluated and a significant increase was observed in mRNA levels of both proteins in SN from ERp57^{Non-Tg} but no in ERp57^{Tg} mice. These results suggest that neurodegeneration induced by 6-OHDA produces an alteration in the expression of some ER stress-associated chaperones.

This work contributes to the current exploration of PD's etiology and the search of potential therapeutic targets for this disease, providing evidence of the functional effect of a cellular stress modulator protein in a toxicological *in vivo* model that recapitulates the neurodegeneration observed in PD patients. Furthermore, these results lead to explore new experimental strategies that complement previously done, as the ERp57 expression in the SN by recombinant viruses or the use of genetic models of PD as the expression of alpha-synuclein (α -syn) in ERp57^{Tg} mice.

2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.

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% de los individuos mayores de

60 años. El porcentaje de incidencia de la EP se ve incrementado con la edad, así un 0,6% de la población entre 60 y 69 años se ve afectado por la enfermedad, en tanto un 2,6% de la población entre 85 y 89 años sufren esta patología (revisado en de Lau y col. 2006).

La EP es una patología progresiva e irreversible cuyas características clínicas se asocian con la pérdida de los movimientos voluntarios, temblores en estado de reposo, rigidez, inestabilidad postural y lentitud en la realización de los movimientos (bradiquinesia). Dentro de las características patológicas que se asocian a los síntomas clínicos de la EP se encuentran la pérdida selectiva de las neuronas dopaminérgicas de la *Substantia Nigra pars compacta* (SNpc) y la acumulación de inclusiones citoplasmáticas proteicas denominadas cuerpos de Lewy. Los cuerpos de Lewy están conformados principalmente por agregados de la proteína alfa-sinucleína (α -sin), la cual puede sufrir modificaciones post-traduccionales tales como ubiquitinaciones, fosforilaciones y S-nitrosilaciones (Duda y col. 2006).

Las neuronas dopaminérgicas de la SNpc forman parte del circuito neuronal nigro-estriatal, el cual está compuesto por la SNpc y el cuerpo estriado. 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). El cuerpo estriado es un componente de los ganglios basales que en conjunto con el cerebelo, contribuyen a la modulación de la iniciación, coordinación y finalización perfecta del movimiento voluntario (Zuleta, 2007). De este modo, la liberación de dopamina en el cuerpo estriado permite el control de los movimientos voluntarios (revisado en Dauer y col.2003).

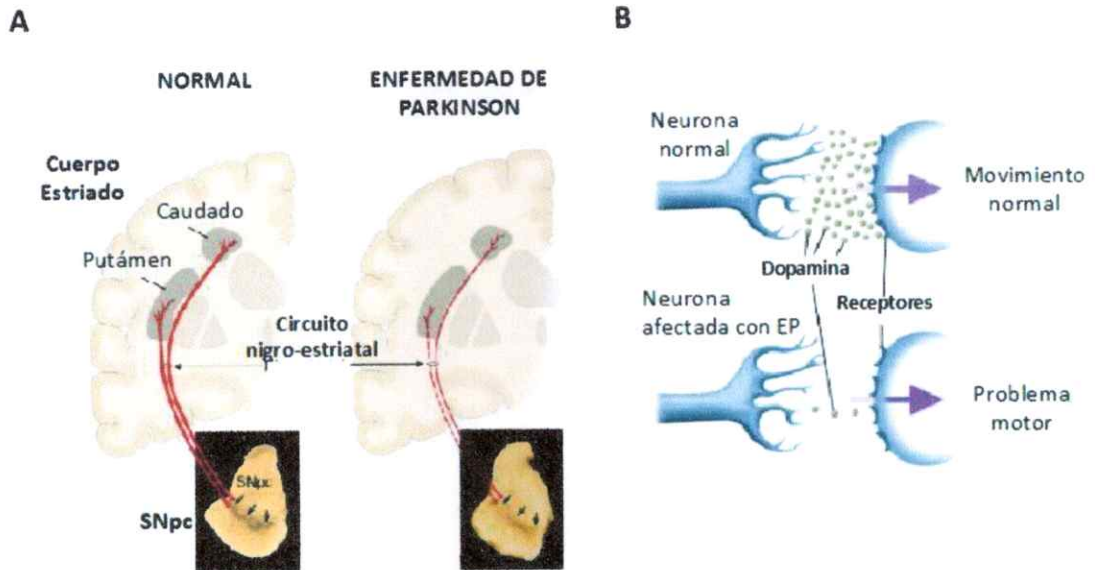


Figura 1. Esquema representativo del circuito nigro-estriatal que se encuentra afectado en la EP. (A) Los somas neuronales dopaminérgicos localizados en la *Substantia Nigra pars compacta* (SNpc) proyectan sus axones (en rojo) hacia la zona del cuerpo estriado (en humanos compuesto por el Caudado y el 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 las neuronas dopaminérgicas liberan el neurotransmisor dopamina en la zona del cuerpo estriado a partir de sus terminales axonales, lo cual posibilita el control de los movimientos voluntarios. Bajo condiciones patológicas, la cantidad neta de dopamina disminuye significativamente en la zona del cuerpo estriado debido a la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc que se produce en los pacientes con la EP. Esta reducción en los niveles de dopamina se traduce en una alteración de la ejecución y el control de los movimientos voluntarios, una característica clínica clásica de esta patología. Figura adaptada de la revisión "Parkinson's Disease: Mechanisms and Models" (Dauer y Przedborski, Neuron, 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 depletado en un 80% lo que se corresponde con un 60% de pérdida de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc (revisado en Dauer y col.2003).

Los tratamientos actuales contra la EP contemplan el uso de fármacos que permiten disminuir los síntomas motores. Desde hace casi 50 años de uso clínico, la levodopa, un precursor metabólico de la dopamina, es el fármaco más utilizado, por su eficacia en disminuir los síntomas (revisado en Poewe, Mahlknecht y col.2012).

La levodopa actúa aumentando los niveles globales del neurotransmisor dopamina en el circuito nigro-estriatal (revisado en Poewe, Mahlknecht y col.2012). Sin embargo, su uso prolongado está asociado a problemas motores como movimientos involuntarios (disquinesia) en la mayoría de los pacientes y otros efectos secundarios como alucinaciones, problemas digestivos y cardiacos, entre otros (revisado en Poewe, Mahlknecht 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. Se han propuesto varios procesos patogénicos que podrían contribuir con 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 endoplásmico (RE) y el aparato de Golgi, entre otros (revisado en Dauer y col. 2013).

Aproximadamente un 95% de los casos de la EP son esporádicos y sin causa conocida, mientras que el 5% restante corresponden a casos de Parkinson familiar que están vinculados a mutaciones genéticas hereditarias (revisado en Martín 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 resulta de suma importancia para el entendimiento de los mecanismos moleculares asociados con la 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 α -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 α -sin se han asociado a mutaciones puntuales (A53T, A30P y E46K), duplicaciones o triplicaciones del gen (revisado en Martín y col. 2011).

Por otra parte, varias enfermedades neurodegenerativas tales como la EA, la enfermedad de Huntington (EH), la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y la EP comparten la presencia de agregados intracelulares y/o extracelulares de proteínas en el sistema nervioso central (SNC). Varios estudios han demostrado que este fenómeno

es acompañado por una condición denominada estrés de RE (revisado en Matus, Glimcher y Hetz, 2011). Aún cuando no hay un consenso sobre los eventos moleculares que subyacen la progresión de la EP, diversos estudios sugieren que el estrés de RE participa en el proceso de muerte selectiva de las neuronas dopaminérgicas característica de esta patología (revisado en Mercado, Valdés y Hetz, 2012). En la próxima sección resumiremos la evidencia actual que vincula el estrés de RE con la progresión de la EP.

2.2 El estrés de RE y la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR).

La homeostasis del RE puede ser alterada por diversas causas tales como, cambios de los niveles de calcio en el lumen de este organelo, alteraciones del estado redox de proteínas, el tráfico de proteínas mutantes a través de la vía secretora, entre otras. Estas perturbaciones podrían inducir la acumulación de proteínas mal plegadas y por consiguiente una condición de estrés de RE. Bajo estas condiciones se gatilla una compleja red de señalización intracelular denominada respuesta a proteínas mal plegadas o UPR (del inglés "unfolded protein response"). Si la condición de estrés de RE es temporal, se restablece la homeostasis del RE a partir del aumento en el plegamiento y la capacidad de degradación de proteínas mal plegadas. Sin embargo, en condiciones de estrés crónico esta respuesta celular puede gatillar finalmente la muerte celular por apoptosis eliminando las células dañadas irreversiblemente.

En mamíferos se han identificado tres sensores que se activan en respuesta al estrés de RE, iniciando la UPR (Figura 2). Estos sensores están localizados en la membrana del RE y corresponden a PERK (del inglés "double-stranded RNA-activated protein kinase-like ER kinase"), ATF6 (del inglés "activating transcription factor 6") e

IRE1 α (del inglés "insitol-requiring kinase 1 α ") (Walter y Ron 2011). El mecanismo molecular más ampliamente aceptado para la detección de proteínas mal plegadas en el RE involucra a la chaperona BiP/Grp78. En condiciones basales esta proteína se encontraría interactuando con los sensores de manera represiva, mientras que en condiciones de estrés de RE, la chaperona BiP se asociaría a las proteínas mal plegadas, liberando a los sensores de la interacción represiva y permitiendo así su activación. Una vez activados, estos tres sensores modulan la expresión de varios factores de transcripción específicos (Figura 2), que finalmente favorecen el plegamiento, el control de calidad y la degradación de proteínas alteradas o bien conducen a la muerte celular por apoptosis, según sea el nivel y prolongación del estrés de RE .

El sensor PERK, luego de su activación fosforila al factor iniciador de la traducción eIF2 α (del inglés "eukariotic initiation factor 2 α ") provocando la inactivación de éste y con ello, disminuye la traducción de proteínas (Harding y col. 2000). Este mecanismo de acción permitiría atenuar la sobrecarga proteica en el RE, previniendo la agregación de proteínas. No obstante, la fosforilación de eIF2 α induce también la traducción específica del factor de transcripción ATF4 (del inglés "activating transcription factor 4") (Harding, Zhang y col. 2003). La proteína ATF4 corresponde a un regulador positivo de genes implicados en el plegamiento de proteínas, la mantención del estado redox celular y en el metabolismo de aminoácidos. De este modo, bajo condiciones de estrés de RE, la activación de este sensor contribuye con la recuperación de la homeostasis. Sin embargo, si las condiciones de estrés son severas o se vuelven crónicas la activación de ATF4 conlleva a la transcripción de genes que codifican para proteínas pro-apoptóticas de la familia BCL-2, entre los cuales

encontramos PUMA, BIM, GADD34 y CHOP, conduciendo a la muerte celular por apoptosis.

En cuanto al sensor ATF6, luego de su activación por disociación de la chaperona BiP, transloca hacia el aparato de Golgi, donde el sensor es procesado por proteólisis y su dominio citoplasmático es liberado. Este fragmento citoplasmático corresponde a la forma activa de la proteína y se denomina ATF6f. Posteriormente ATF6f se moviliza al núcleo, donde regula positivamente la expresión de chaperonas y genes implicados en el control de la calidad de proteínas (Figura 2).

El sensor IRE1 α corresponde a una proteína serina treonina kinasa, que cuando está activa es capaz de procesar el ARN mensajero (ARNm) de la proteína XBP1 (del inglés "X-box binding protein 1") mediante su actividad endoribonucleasa. El procesamiento de este mensajero genera un cambio de lectura en la secuencia codificante permitiendo la expresión de un factor de transcripción denominado XBP1s (del inglés "spliced form of XBP1"), el cual resulta ser mucho más estable (Calfon y col. 2002; Lee y col. 2002) (Figura 2). La proteína XBP1s regula la expresión de genes relacionados con el plegamiento y la degradación proteica asociada al RE (ERAD, del inglés "ER-associated degradation"). Por su parte, IRE1 α en asociación con proteínas adaptadoras permite la activación de otras rutas de señalización como por ejemplo JNK (del inglés "c-Jun N-terminal kinase"), ASK1 (del inglés "apoptosis signal-regulating kinase") y NF- κ B (del inglés "nuclear factor-kappa B") que regulan procesos como la apoptosis, la autofagia y la respuesta inflamatoria.

2.3 El estrés de RE y la EP.

A pesar de que se desconoce la secuencia exacta de eventos moleculares que condu-

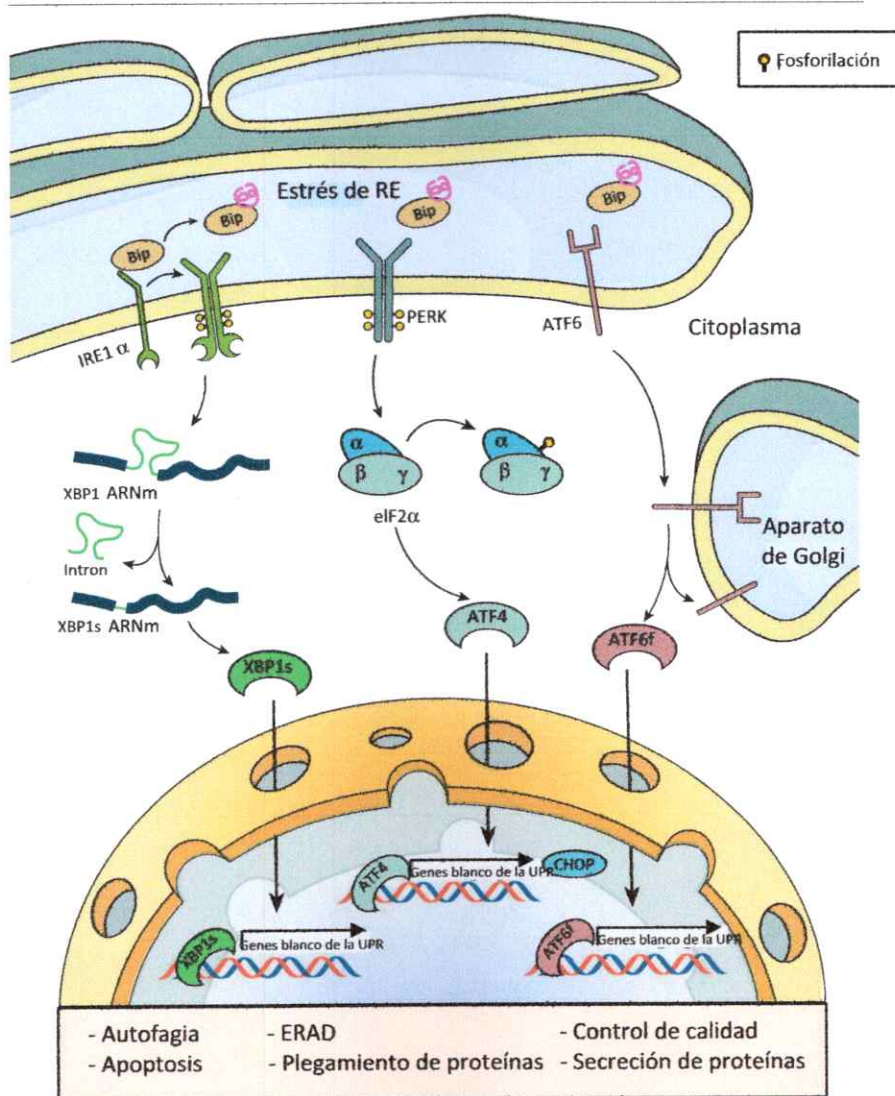


Figura 2. Respuesta a proteínas mal plegadas (UPR). Cuando se produce una acumulación de proteínas mal plegadas en el lumen del RE se gatilla la activación de los sensores IRE1 α , PERK y ATF6 por liberación de la proteína represora BiP. Una vez activo IRE1 α dimeriza y se autotransfosforila activando su dominio ARNasa a partir del cual se produce el procesamiento del ARNm de *xbp1*, un factor transcripcional 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 α . pEIF2 α 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, 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 G, Valdés P y Hetz C, Trends in Molecular Medicine, 2013).



-cen a la muerte selectiva de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc y la formación de cuerpos de Lewy observadas en la EP, existe evidencia de una gran variedad de procesos que podrían estar involucrados, entre los cuales se incluyen el estrés oxidativo, el desbalance en la homeostasis de calcio, la disfunción mitocondrial, la alteración en el tráfico entre el RE y el aparato de Golgi, y alteraciones en la mitofagia y la función del proteosoma, entre otras (revisado en Mercado, Valdés y Hetz 2012). Estudios recientes provenientes de distintos laboratorios indican que el estrés de RE tendría una contribución importante en esta enfermedad (revisado en Mercado, Valdés y Hetz, 2012).

Así, en tejidos *post mortem* derivados de pacientes con la EP se ha descrito la inmunoreactividad para algunos marcadores de la UPR tales como PERK y eIF2 α fosforilados en neuronas dopaminérgicas de la SNpc (Figura 3a), junto con agregados de la proteína α -sin (Hoozemans y col. 2007), lo que sugiere la activación de la UPR en neuronas dopaminérgicas que presentan inclusiones de α -sin. Otros estudios en tejido *post mortem* de pacientes con la EP dan cuenta de la inducción de proteínas de la UPR en la SNpc, como PDIp, Herp y Bip (Figura 3a). Estas proteínas además colocalizan 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 estrés de RE.

2.3.1 El estrés de RE en modelos genéticos de la EP.

Con el fin de estudiar la etiología de la EP e identificar posibles blancos terapéuticos se han generado numerosos modelos experimentales que intentan recapi-

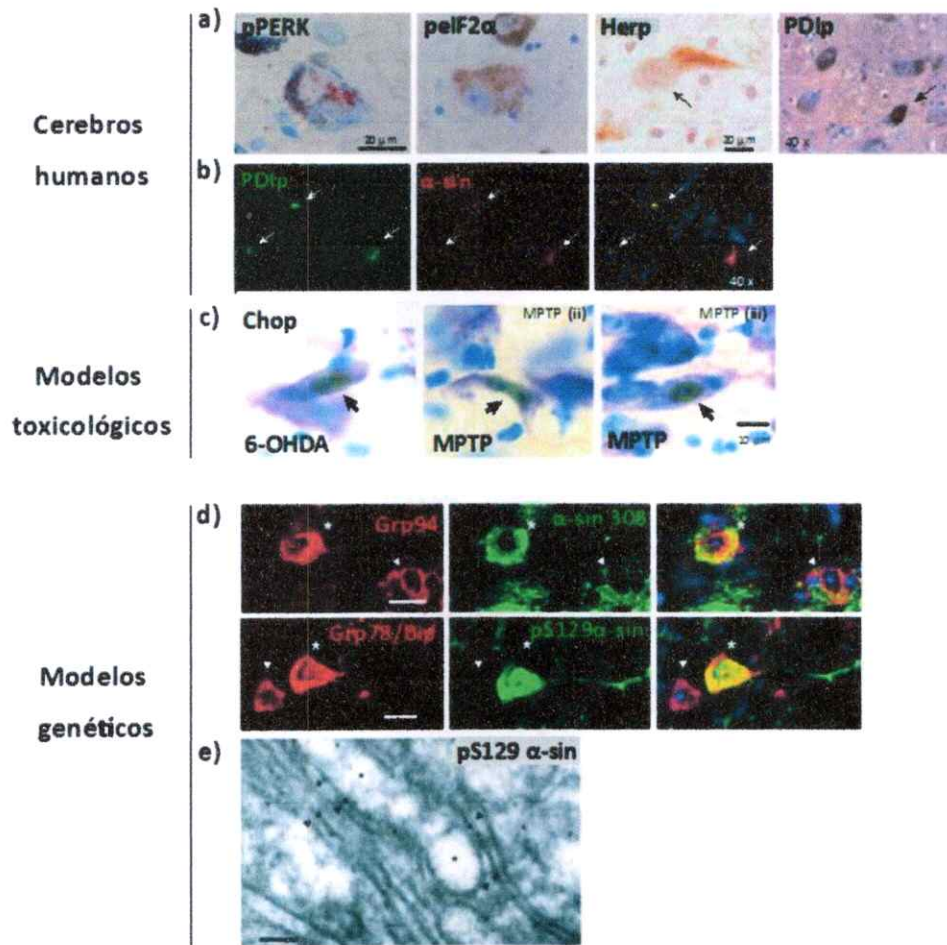


Figura 3. Estrés de RE y activación de la UPR en tejido *post mortem* y en modelos animales de la EP. **a)** Inmunohistoquímica de pPERK, pelf2 α , Herp y PDIp en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc de pacientes con la EP. Las flechas indican neuronas positivas para la marca. **b)** Co-localización (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 de CHOP en la SNpc de ratones WT 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 colocalización (amarillo) de Grp94 ó 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 para α -sin A53T. Figura adaptada de la revisión "An ERcentric view of Parkinson's disease" (Mercado G, Valdés P y Hetz C, Trends in Molecular Medicine, 2013).

-tular los marcadores neuropatológicos de la enfermedad. De este modo podemos dividir los modelos generados en dos grupos; modelos genéticos y modelos toxicológicos o farmacológicos. Los modelos genéticos expresan mutaciones en genes que han sido identificados como alterados en casos de Parkinson familiar, mientras que los modelos toxicológicos utilizan neurotoxinas para provocar la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc, tal y como ocurre en los pacientes con la EP.

Una de las proteínas más ampliamente estudiadas en modelos experimentales de la EP es la proteína α -sin cuya disfunción se encuentra relacionada con ambos tipos de Parkinson, tanto familiar como esporádico. El mecanismo de acción mediante el cual la proteína α -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 α -sin, ya sea en sus formas silvestre o mutante. Así, por mucho tiempo se postuló que los agregados fibrilares de α -sin en los llamados cuerpos de Lewy correspondían a la conformación neurotóxica de la proteína, debido a su presencia en cerebros de pacientes con la EP (Hensen y col. 2012). Sin embargo, varios estudios en modelos celulares y animales, así como también en tejido *post mortem* de pacientes con la EP, indican que la propagación de α -sin por transferencia célula-célula podría ser un evento determinante en la progresión de la enfermedad (Hensen y col. 2012). Se ha descrito que la sobreexpresión de la forma mutante de α -sin en cultivos celulares es capaz de inducir estrés de RE de manera crónica y con ello la activación de la UPR conducente a muerte celular (Smith, Jiang y col. 2005; Bellucci, Navarra y col. 2011; Belal, Ameli y col. 2012). Además de esta evidencia *in vitro*, en ratones transgénicos para la proteína α -sin se ha observado algunos marcadores de la UPR tales como BiP, ATF4, CHOP y XBP1. Curiosamente, también existe evidencia de

que el estrés de RE favorece la formación de agregados de la proteína α -sin (Saxena y Caroni 2011). De los antecedentes mencionados se desprende que existe una relación entre la agregación de α -sin y el estrés de RE y que ambos fenómenos se estarían retroalimentando, como ocurre en otros desordenes asociados al mal plegamiento proteico (PMDs, del inglés "protein misfolding disorders") (Saxena y Caroni 2011). Coincidentemente, investigaciones más recientes en ratones transgénicos para la proteína α -sin muestran la inducción de las chaperonas BiP y Grp94 en el RE, acompañada de la interacción física con formas oligoméricas tóxicas de α -sin (Bellucci y col. 2011; Colla y col. 2012) (Figura 3). Los trabajos discutidos anteriormente sugieren como posible evento asociado a la patología de la EP, que el RE estaría acumulando oligómeros neurotóxicos de la proteína α -sin y con ello generando una condición de estrés de RE, en un círculo de retroalimentación en el cual, el mismo estrés de RE induciría a su vez la generación de más de estos agregados proteicos neurotóxicos. Un posible mecanismo por el cual estos agregados podrían generar estrés de RE es a través de la interacción con ciertas chaperonas del RE, cuyo secuestro podría provocar disfunciones en el plegamiento de proteínas, acumulación de proteínas mal plegadas y en consecuencia la activación de la UPR.

Otro posible mecanismo por el cual la proteína α -sin podría contribuir a la neurodegeneración característica en la EP es a través del bloqueo del tráfico de proteínas entre el RE y el aparato de Golgi, lo cual conduciría a la acumulación de proteínas en el RE. Una posible explicación a este fenómeno es que la proteína α -sin podría secuestrar a la GTPasa Rab1, afectando el transporte vesicular entre el RE y el aparato de Golgi (Copper y col. 2006; Thayanidhi, y col. 2010).

Adicionalmente, existe evidencia que muestra que alteraciones en el tráfico de proteínas entre el RE y el aparato de Golgi inducen estrés mitocondrial (Su y col. 2010), un importante factor que contribuye a la neurotoxicidad de α -sin. Estudios recientes muestran que el estrés nitrosativo, la acumulación de sustratos de la vía de ERAD y el estrés de RE forman parte de los eventos patogénicos tempranos asociados a la neurotoxicidad gatillada por α -sin mutante en levadura y neuronas de pacientes con la EP (Chun, Khurana y col. 2013).

Otro factor que influye en la neurotoxicidad de α -sin son los niveles de calcio en el RE. En modelos celulares de la EP y en tejidos *post mortem* de pacientes con mutaciones en el gen de α -sin se ha observado que los niveles de calcio en el RE regulan positivamente la agregación de la proteína generando una condición de estrés de RE crónica (Belal y col. 2012).

Como se describió anteriormente, mutaciones en la secuencia codificante para la proteína serina/treonina kinasa LRRK2 son la causa genética más frecuente de la EP. LRRK2 colocaliza parcialmente con el RE en las neuronas dopaminérgicas de pacientes con la EP (Vitte, Traver y col. 2010). Además, se ha descrito que la expresión de la LRRK2 WT en *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) protege contra la muerte neuronal inducida por la toxina parkinsoniana 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (Yuan, Cao y col. 2011). Esta neuroprotección está mediada, en parte, por la regulación positiva de BiP a través de la vía de p38 (Yuan, Cao y col. 2011). En *C.elegans* la deficiencia de una proteína homóloga a LRRK2 de mamíferos, induce neurodegeneración de manera espontánea y además genera un aumento de la sensibilidad al estrés de RE experimental (Samann, Hegermann y col. 2009).

Otra proteína asociada a la EP es Parkina. Se ha descrito que la deficiencia de ésta proteína es responsable de la mayoría de los casos de parkinsonismo autosomal recesivo (Bouman y col. 2010). Interesantemente, Parkina es regulada por el factor de transcripción ATF4 en respuesta a la condición de estrés de RE y también se ha demostrado que el daño mitocondrial puede inducir estrés de RE y en consecuencia a un aumento en los niveles de expresión de Parkina (Bouman y col. 2010).

En resumen, los estudios realizados a partir de modelos genéticos y de tejido *post mortem* de pacientes con la EP familiar, mostrados anteriormente, dan cuenta que el estrés RE y la activación de la UPR serían eventos contribuyentes a la patogénesis de la EP.

2.3.2 El estrés de RE en modelos toxicológicos de la EP.

El 5% de los pacientes con la EP sufre este desorden por causas genéticas, mientras que en el 95% de los casos restantes este desorden está asociado a causas de origen indeterminado. No obstante, todos ellos comparten características comunes; (i) la muerte selectiva de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc y (ii) la formación de agregados proteicos citoplasmáticos denominados cuerpos de Lewy.

Décadas de estudios epidemiológicos sugieren que la exposición a pesticidas está relacionada con el desarrollo de la EP. Sin embargo, aún no es del todo claro como son capaces de conducir a la pérdida neuronal y gatillar los síntomas de la EP (Kamel 2013). Con el fin de estudiar los posibles mecanismos patogénicos de estos compuestos químicos, se han generado numerosos modelos celulares y animales que utilizan neurotoxinas. Dentro de las neurotoxinas más utilizadas, encontramos el compuesto 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), la 6-hidroxidopamina (6-

OHDA), el insecticida rotenona y el herbicida paraquat . Se cree que el mecanismo de acción principal mediante el cual estas neurotoxinas ejercen su acción es a través de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS, del inglés "reactive oxygen species") y especies reactivas de nitrógeno (RNS, del inglés "reactive nitrogen species"), lo cual resulta en la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc (Bove y Perier, 2012), que es la principal característica de la EP. Interesantemente, dos análisis de expresión génica en cultivo celular identificaron a la UPR como la vía más regulada por estas neurotoxinas parkinsonianas (Holtz y col. 2003; Ryu y col 2002). Los autores mostraron que las neurotoxinas MPTP, 6-OHDA y el pesticida rotenona generan una clara activación de las vías de PERK e IRE1 α , induciendo la expresión de marcadores clásicos como BiP, c-Jun, XBP1s y chaperonas del RE como la proteína disulfuro isomerasa (PDI) y ERp57 (Ryu y col. 2002; Holtz y O'Malley 2003). Este hallazgo ha sido confirmado por varios otros grupos usando modelos toxicológicos de la EP (revisado en Matus y col. 2011).

El estrés de RE en el modelo toxicológico de 6-OHDA.

La 6-OHDA fue la primera droga parkinsoniana utilizada en animales que selectivamente induce la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc. Esta neurotoxina no atraviesa la barrera hematoencefálica, por lo que debe ser inyectada mediante estereotaxis en la SNpc, el cuerpo estriado o el fascículo telencefálico medial. La inyección de 6-OHDA directamente en la SNpc o en el fascículo telencefálico medial induce una lesión rápida y masiva en los somas dopaminérgicos, lo cual dificulta el estudio de la progresión de la degeneración neuronal. Sin embargo, al inyectar esta neurotoxina en el cuerpo estriado se induce una degeneración retrógrada y progresiva de las neuronas dopaminérgicas, la que se asemeja mucho

más a lo descrito en la EP, resultando una pérdida permanente de los somas TH⁺ en la SNpc. Debido a la incorporación específica de esta neurotoxina por los transportadores de dopamina y noradrenérgicos, la toxicidad inducida por la 6-OHDA es selectiva sobre las neuronas monoaminérgicas, siendo las neuronas dopaminérgicas de la SNpc parte de este grupo. La inyección hemilateral de 6-OHDA genera una asimetría motora que depende directamente de la magnitud de la lesión en las neuronas dopaminérgicas y que puede ser evaluada a través de diferentes ensayos de comportamiento (Iancu, Mohapel y col. 2005; Alvarez-Fischer, Henze y col. 2008; Grealish, Mattsson y col. 2010).

Una de las desventajas de este modelo toxicológico de la EP 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 (revisado en Blum, Torch y col. 2001). Tampoco se ha observado la formación de cuerpos de Lewy en ninguno de los modelos animales basados en la 6-OHDA, siendo ésta una de las principales características histopatológicas de la enfermedad. No obstante, este modelo toxicológico es ampliamente utilizado en roedores para estudiar la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc debido a su selectividad sobre este tipo neuronal y disminución de los niveles de dopamina, la cual es otra de las características fundamentales de esta enfermedad (revisado en Bove y Perier 2012). Además, algunos estudios indican que, tanto *in vitro* como *in vivo*, la toxicidad de la 6-OHDA está mediada por la generación de estrés oxidativo (Perumal, Tordzro y col. 1989; Perumal, Gopal y col. 1992; Kumar, Agarwal y col. 1995), uno de los procesos asociados a la neurodegeneración en la EP (revisado en Mercado, Valdés y Hetz 2012).

Aún cuando existen evidencias de que la droga 6-OHDA genera estrés de RE y activación de la UPR *in vitro* (Holtz y col. 2003; Ryu y col 2002), los estudios de este fenómeno *in vivo* son controversiales. Así, se ha descrito que en células en cultivo expuestas a 6-OHDA se genera la activación de todas las vías de la UPR lo que se correlaciona con una pérdida de la viabilidad celular (revisado en Wang and Takahashi 2007). Sin embargo estudios realizados en nuestro laboratorio muestran que la inyección intraestriatal de 6-OHDA en ratones WT adultos no induce el procesamiento del ARNm de *xbp1* ni la sobreexpresión del factor transcripcional *chop* en SN y cuerpo estriado utilizando métodos bioquímicos en los que se analizan extractos totales (Valdés 2013, no publicado), sugiriendo que la inyección de 6-OHDA no genera la activación de las vías de la UPR de IRE1 α y PERK a los tiempos evaluados. No obstante, no podemos descartar la activación de la vía de ATF6. En contraposición con nuestros resultados, hay estudios que demuestran que 6-OHDA y MPTP inducen la activación de la UPR en la SN de rata y ratón (Akazawa, Saito y col. 2010; Selvaraj, Sun y col.; Egawa, Yamamoto y col. 2011). Adicionalmente, en un estudio reciente se encontró por análisis proteómico un aumento en los niveles de CHOP y ERp57, blancos de la UPR, en el cuerpo estriado y cerebro medio de ratas neonatas inyectadas con 6-OHDA (Akazawa, Saito y col. 2010). En esta misma línea, la inyección de 6-OHDA en el cuerpo estriado de ratas neonatas genera un aumento en la expresión del factor transcripcional CHOP, específicamente en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc, lo que se correlaciona con una pérdida de la viabilidad neuronal (Silva, Ries y col. 2005). Sin embargo, no hubo cambios en la expresión de otros marcadores de la UPR tales como la chaperona BiP y en el procesamiento del ARNm de *Xbp1* (Silva, Ries y col. 2005), lo que concuerda con nuestros resultados (Valdés 2013, no publicado). Se ha visto que la sobreexpresión de CHOP puede ocurrir

independiente de estrés de RE, como por ejemplo disminución de los niveles de glucosa, restricción de aminoácidos e irradiación UV y daño al ADN (Fornace, Alamo y col. 1988; Wang, Lawson y col. 1996; Zhou y Pan 2011). Por esta razón, un aumento en la expresión de la proteína pro-apoptótica CHOP no es suficiente indicador de una condición de estrés de RE y/o la activación de la UPR.

Por otro lado, existe evidencia en tejido *post mortem* de pacientes con la EP así como también en cultivos celulares tratados con neurotoxinas, de que la PDI, una "foldasa" del RE, es S-nitrosilada bajo estas condiciones, perdiendo su actividad catalítica (Uehara, Nakamura y col. 2006). La pérdida de la actividad "foldasa" de esta proteína del RE, podría ser un contribuyente a la neurodegeneración observada *in vitro* y en tejidos *post mortem* de pacientes con la EP, y daría cuenta de la importancia de la homeostasis del RE en el desarrollo de esta patología.

En resumen, tanto los modelos genéticos como toxicológicos de la EP son herramientas de gran utilidad para explorar los mecanismos moleculares asociados a la neurodegeneración observada en esta patología, y han permitido identificar que el estrés de RE y la activación de la UPR podrían ser eventos asociados a la progresión de la enfermedad, y que disfunciones en algunos blancos importantes de la UPR, como por ejemplo, las proteínas disulfuro isomerasas (PDIs), podrían contribuir de manera importante a la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc. Por esta razón la manipulación genética de algunos componentes de la UPR, como estas chaperonas, podría ser explorada como herramienta neuroprotectiva en modelos animales de la EP con el fin de encontrar nuevos blancos terapéuticos para el tratamiento de esta enfermedad.

2.3.3 Manipulación de la UPR en modelos experimentales de la EP.

A raíz de los numerosos estudios que vinculan la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc con la activación de la UPR (revisado en Mercado, Valdés y Hetz 2013), han surgido nuevas líneas de investigación dirigidas a dilucidar los mecanismos moleculares que subyacen dicho fenómeno. De este modo diversos estudios se han dedicado a estudiar el efecto de la modificación de algún componente de la UPR en la sobrevivencia de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc en modelos experimentales de la EP. Por ejemplo, ratones deficientes para ATF6 α presentan mayor acumulación de inclusiones positivas para ubiquitina y presentan una mayor pérdida de las neuronas dopaminérgicas en el modelo toxicológico de MPTP (Egawa, Yamamoto y col. 2011; Hashida, Kitao y col. 2012), lo que sugiere que el sensor ATF6 o bien la activación de la UPR por esta vía sería un evento clave para contrarrestar los efectos de la neurotoxina. Así mismo, ratones deficientes para la proteína CHOP presentan menor pérdida de las neuronas positivas para el marcador dopaminérgico tirosina hidroxilasa (TH) en el modelo de inyección de 6-OHDA (Silva, Ries y col. 2005), sugiriendo que la deficiencia de este factor pro-apoptótico protege frente a la muerte celular por apoptosis gatillada por la neurotoxina.

Utilizando estrategias de terapia génica se ha descrito la contribución funcional del factor transcripcional XBP1s en un modelo experimental de la EP, observándose que ratas que sobreexpresan XBP1s, a partir de la inyección de vectores adenovirales en la zona del cuerpo estriado, presentan una protección parcial frente a la neurodegeneración inducida por la neurotoxina MPTP (Sado, Yamasaki y col 2009). Con una estrategia similar, otro estudio demostró que la sobreexpresión de la chaperona BiP en la SNpc de ratas protege frente a la neurotoxicidad inducida por la

sobreexpresión α -sin en la SNpc (Gorbatyuk, Shabashvili y col. 2012). Esto se logró mediante la co-inyección del gen patogénico α -sin y el gen terapéutico BiP, utilizando vectores virales adenoasociados (AAV) en la zona de la SNpc. Éstos son los primeros estudios que muestran que la manipulación de algunos componentes de la UPR puede ser utilizada como terapia génica en modelos experimentales de la EP.

Estudios recientes realizados en nuestro laboratorio demostraron que la deficiencia de XBP1 en el SNC en ratones "knock-out" para el gen de *xbp1* genera una condición de estrés de RE adaptativo, no tóxico, específicamente en la SNpc lo que se correlaciona con una protección de las neuronas dopaminérgicas frente a la toxicidad inducida por la 6-OHDA (Valdés 2013, no publicado). Por otra parte, la expresión de un ARN interferente dirigido contra el mRNA de *xbp1* localmente en las neuronas dopaminérgicas adultas induce la pérdida de los marcadores neuronales NeuN y TH. Además, provoca alteraciones en la morfología neuronal, asociado a una condición de estrés de RE crónico y letal (Valdés 2013, no publicado). Estos resultados sugieren que la deficiencia de XBP1 en el SNC desde etapas tempranas del desarrollo podría generar un pre-acondicionamiento o una condición adaptativa de las neuronas dopaminérgicas que permite restablecer de manera más eficiente la homeostasis proteica frente a la toxicidad inducida por la 6-OHDA.

Otra estrategia que permite explorar la contribución funcional de la UPR en la EP es la manipulación farmacológica de componentes de la UPR en modelos experimentales de la EP. Un ejemplo de ello es el uso de salubrinal, un compuesto que disminuye la desfosforilación de eIF2 α por inhibición de la fosfatasa PP1 (Boyce y col. 2005), la cual disminuye la sobrecarga de proteínas del RE. Existe evidencia de que la aplicación de Salubrinal disminuye la apoptosis en modelos celulares de la EP (Smith y

col. 2005). Adicionalmente, se ha descrito en ratas que este compuesto provoca una atenuación y un retardo de la deficiencia motora inducida por la sobreexpresión de la proteína α -sin en la SNpc (Colla, Coune y col. 2012), sin embargo, no se observan cambios significativos en la pérdida de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc evidenciada en este modelo (Colla, Coune y col. 2012). Así mismo, ratones transgénicos para α -sin tratados con salubrinal también presentan un retardo y atenuación de la manifestación de la enfermedad sin proteger frente a la neurodegeneración evidenciada en este modelo (Colla, Coune y col. 2012). Por otro lado se ha descrito que el fármaco metoxiflavona aumenta los niveles de la chaperona BiP, lo que correlaciona con una reducción de la pérdida de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc en ratones tratados con la neurotoxina MPTP (Takano, Tabata y col. 2007).

En resumen, existe evidencia creciente, tanto *in vitro* como *in vivo*, que apunta a que el estrés de RE y la UPR serían eventos celulares que podrían modular la neurodegeneración en la EP. Estos estudios muestran que la sobreactivación o la sobreexpresión de algunos de los componentes de la UPR resulta en una disminución de la pérdida de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc y/o en una atenuación o retardo de las deficiencias motoras. No obstante la protección contra la neurodegeneración no es observada en todos los casos, por lo que el mecanismo molecular por el cual estaría influyendo esta vía de señalización todavía no ha sido definido. Por lo tanto, aún queda por dilucidar los mecanismos moleculares y la secuencia de eventos que vinculan el estrés de RE y la UPR con la progresión de la EP, así como también explorar la contribución de blancos más específicos río abajo de la UPR. Uno de los blancos de la UPR que está adquiriendo gran relevancia en los

últimos tiempos es la familia de las PDIs, dado sus potentes efectos sobre el plegamiento proteico, el estrés oxidativo y la apoptosis (Andreu y col. 2012).

2.4 La familia de las proteínas disulfuro isomerasas (PDIs).

Se ha descrito que algunos de los miembros de la familia de las PDIs son regulados por la UPR, dentro de los cuales se incluyen PDI, ERp57 y ERp72 (Dorner y col. 1990; Maattanen y col. 2010), entre otras. Las PDIs corresponden a una familia de proteínas compuesta por aproximadamente 20 miembros de la superfamilia de las tiorredoxinas. Dentro de los miembros de esta familia encontramos algunos miembros tiol-reactivos como por ejemplo PDI, PDIp, ERp57 y ERp72 y miembros no-reactivos como ERp27 y ERp29 (Kozlov y col. 2010).

Las PDIs se localizan mayoritariamente en el RE y catalizan la formación de puentes disulfuro. El lumen del RE resulta ser un ambiente favorable para su actividad catalítica pues es más oxidante que el citoplasma (Feige y Hendershot, 2011). Los puentes disulfuro presentes en las proteínas se forman por oxidación de dos grupos tioles libres provenientes de dos residuos de cisteína. La presencia de estos puentes disulfuros dentro (intramolecular) y entre (intermolecular) proteínas resulta de suma importancia, pues tiene una contribución importante a su estabilidad estructural y además pueden ser utilizados como sitios regulatorios para el control funcional de las proteínas o los complejos proteicos (Feige y Hendershot, 2011). De este modo, para muchas proteínas que transitan por el RE la formación de puentes disulfuros resulta un evento clave para su maduración. En adición a su actividad foldasa, las PDIs actúan también como chaperonas moleculares previniendo la formación de agregados de proteínas mal plegadas que carecen de puentes disulfuro (Ferrari y Soling, 1999;

Grubb y col., 2012; Maattanen y col., 2010; Turano y col., 2002).

En cuanto a la conformación de estas proteínas, éstas presentan una estructura modular que incluye un dominio catalítico "a" tipo-tiorredoxina y un dominio no-catalítico "b" (ver Figura 4a). El dominio catalítico "a" de las PDIs contiene motivos CXXC que reaccionan con los grupos tioles de proteínas recientemente sintetizadas, determinando el estado redox de la PDI y definiendo su rol como oxidasa, reductasa o isomerasa (Kozlov y col. 2010). El dominio no-catalítico "b" actúa como un "espaciador" y es responsable del reclutamiento del sustrato (Denisov y col., 2009). Adicionalmente se ha descrito una región "linker" (x-linker) de 19 aminoácidos, la cual otorgaría mayor flexibilidad entre los dominios a y b (Pirmeskoski y col. 2004), facilitando así la unión del sustrato. Las PDIs también tienen la capacidad de actuar como isomerasas, catalizando el rearreglo de puentes disulfuro formados incorrectamente mediante ciclos de oxidación y reducción (Appenzeller-Herzog y Ellgaard, 2008).

Se ha descrito que la formación de puentes disulfuro en el RE es catalizada principalmente por las oxidasas ERO1 α y ERO1 β (Feige y Hendershot, 2011; Tu y Weissman, 2002). Estas oxidasas participan en el ciclo de oxido-reducción en el cual se transfieren electrones entre el sustrato y las PDIs, luego entre las PDIs y ERO1 y finalmente entre ERO1 y una molécula de oxígeno generando peróxido de hidrógeno (Tu y Weissman, 2002), como se observa en la Figura 4B.

En resumen, las PDIs desempeñan gran diversidad de roles estructurales y funcionales, actúan como foldasas del RE promoviendo el plegamiento de proteínas nativas y participando activamente en procesos relacionados con el RE. Además, las PDIs también estarían jugando un rol de chaperona molecular previniendo el mal

plegamiento y agregación de proteínas (Figura 4C).

2.5 Rol fisiológico de ERp57.

ERp57 (también conocida como Grp58, PDIA3 o ERp60) es un miembro de la familia de las PDIs que corresponde a una tior-oxidoreductasa de 58 kDa que se expresa mayoritariamente en el RE, sin embargo también ha sido localizada en el núcleo, el citoplasma y en la membrana celular (Coppari y col. 2002). El gen *ERp57* humano se encuentra localizado en el cromosoma 15q15, tiene una extensión de 18 kb y consta de 12 intrones y 13 exones (Koivunen y col. 1997).

Su secuencia codifica para una proteína de 505 aminoácidos. Su homólogo en ratón se ubica en el cromosoma 2 (Khanal y Nemere, 2007). La proteína ERp57 humana se expresa en distintos tejidos entre ellos se incluye hígado, pulmón, páncreas, placenta y riñón, así como también musculo esquelético, corazón y cerebro, donde se han observado niveles de expresión basales bajos (Koivunen y col. 1997).

La función principal de ERp57 está asociada al control de la calidad de proteínas en el RE. ERp57 forma parte del ciclo calnexina (CNX) y calreticulina (CRT), promoviendo la formación de puentes disulfuro y la isomerización de las glicoproteínas (Ellgaard y Frickel, 2003). En este ciclo las glicoproteínas que serán plegadas se asocian a CNX/CRT y ERp57 en el RE para luego ser exportadas al aparato de Golgi. No obstante, si el plegamiento de los sustratos no fue adecuado, éstos retornan al ciclo. Finalmente, si las glicoproteínas no logran ser plegadas correctamente son degradadas por la vía ERAD (Figura 5).

Por otro lado, ERp57 también juega un papel en la regulación del transductor de señales y activador transcripcional 3 (STAT3), dando secuestro tanto a la forma ac-

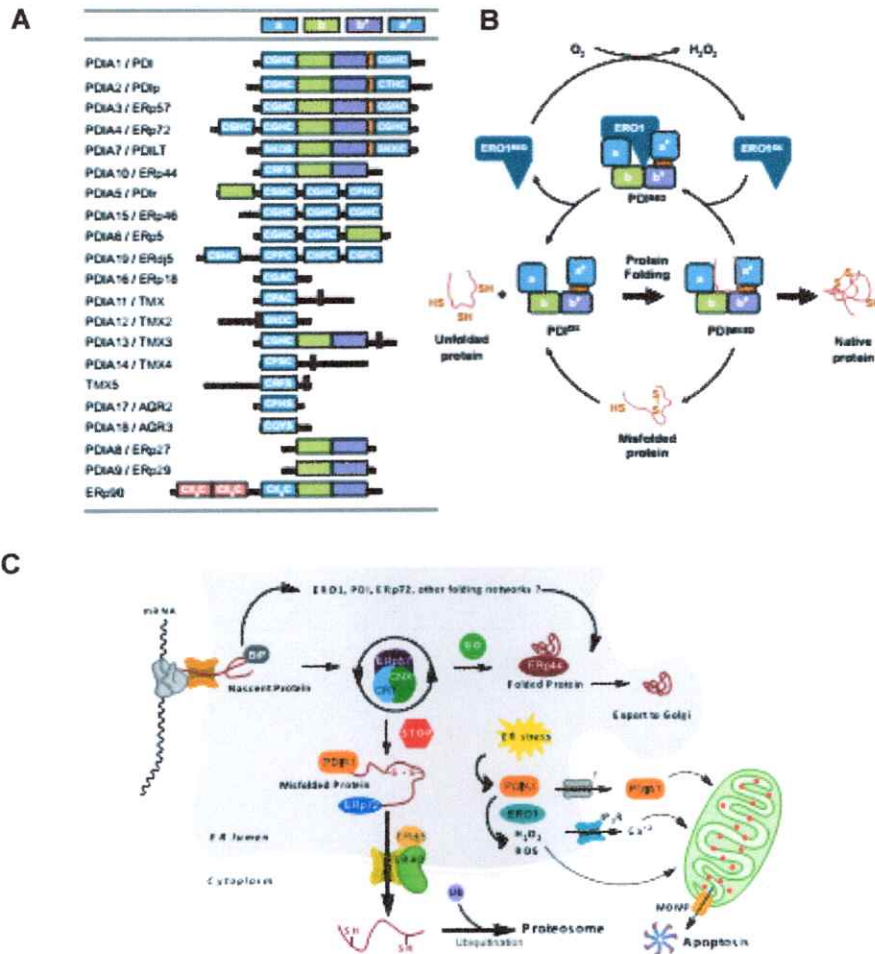


Figura 4. La familia de las PDIs. (A) Dominios estructurales de las PDIs: En azul, los dominios catalíticos a y a'; los dominios no-catalíticos b y b' en verde y morado, respectivamente. En naranja se muestra el linker x entre b' y a', mientras que el dominio transmembrana en rojo oscuro. **(B)** Representación esquemática de la actividad foldasa de PDI y la transferencia de electrones entre PDI y ERO1, resultando en la generación de H₂O₂. PDI^{OX}: PDI oxidada; PDI^{RED}: PDI reducida; PDI^{MIXED}: PDI unida a la proteína blanco a plegar; ERO1^{OX}: ERO1 oxidada; ERO1^{RED}: ERO1 reducida. **(C)** Funciones de las PDIs en el RE. Las proteínas recién sintetizadas son translocadas al interior del RE, donde ocurre el plegamiento mediado por CNX (verde) o CRT (azul claro) y ERp57 (morado). ERp44 (rojo oscuro) retiene aquellas proteínas mal plegadas previniendo su transporte prematuro al Golgi. Las proteínas plegadas correctamente se exportan a través de la vía secretoria (GO). Las proteínas mal-plegadas (STOP) pueden unirse a PDIA1 (naranja) y ERp72 (azul) y retro-translocar hacia el citosol vía ERAD, donde ERdj5 juega un rol importante en la ruptura de puentes disulfuro. Bajo estrés de RE, PDIA1 puede ser liberada al citosol por activación de BAX y BAK, movilizándose hacia la mitocondria. Este evento gatilla el ensamblaje del apoptosoma conducente a la muerte celular. A partir del estado redox de los canales de calcio (IP3 y bombas SERCA), las PDIs pueden controlar la liberación de calcio del RE. La producción anormal de H₂O₂ a través de ERO1 (azul oscuro) puede llevar a la generación de ROS. Estos dos eventos contribuyen en la permeabilización de la membrana mitocondrial externa acompañada de la liberación de citocromo c (círculos rojos) y la activación del apoptosoma. Figura tomada de la revisión "Protein Disulfide Isomerases in Neurodegeneration: from disease mechanisms to biomedical applications" (Andreu y col. 2012).

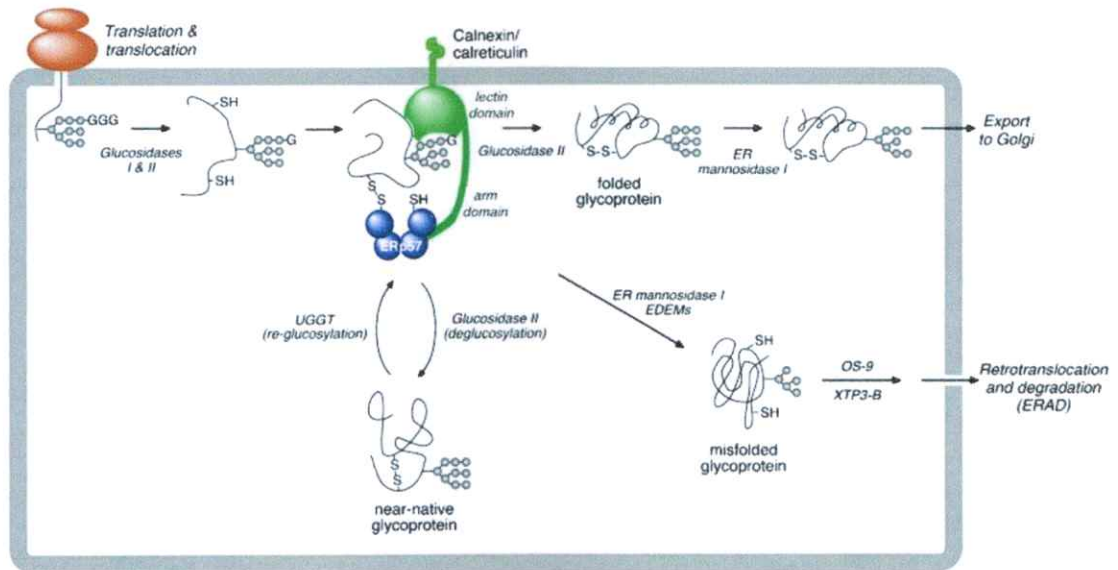


Figura 5. Participación de ERp57 en el ciclo de CNX/CRT. La proteína que será plegada se une a CNX/CRT lo cual retrasa su plegamiento, previene su agregación y retiene intermediarios de plegamiento en el RE en asociación con ERp57, lo que permite la formación de puentes disulfuro e isomerización. Si el plegamiento de la glicoproteína fue correcto ésta es finalmente exportada al Golgi, de lo contrario ingresa nuevamente al ciclo CNX/CRT hasta que sea plegada adecuadamente. Las glicoproteínas mal plegadas que permanecen por un tiempo prolongado en el ciclo van finalmente a la vía ERAD. G=glucosa; esfera gris= manosa. Figura adaptada desde Rutkevich y Williams, 2011.

-tiva como inactiva de éste (Coe y col. 2010) (Figura 6). STAT3 regula numerosos procesos celulares tales como la proliferación celular y la apoptosis (Coe y col. 2010). Adicionalmente, el rol de ERp57 ha sido ampliamente estudiado en el sistema inmune, debido a que está involucrada en el ensamblaje de la cadena pesada del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC I) (Garbi y col. 2006) (Figura 6).

ERp57 también se ha relacionado con numerosas enfermedades neurodegenerativas, como lo veremos en más detalle en la sección "PDIs y neurodegeneración", sin embargo el rol de ERp57 en el sistema nervioso central y su contribución en la EP aún permanece sin dilucidar.

2.6 PDIs y neurodegeneración.

Se han identificado diversas funciones de los miembros de esta familia en distintas condiciones neurodegenerativas. Las evidencias actuales sugieren que las PDIs presentan una función dual, ya que, dependiendo de las condiciones fisiopatológicas, son capaces de modular la muerte celular (Andreu, Hetz y col. 2012). Por una parte presentan una actividad anti-apoptótica, atenuando el estrés de RE y la agregación específica de proteínas asociadas a PMDs y por otra parte exhiben actividad pro-apoptótica, promoviendo la muerte celular por apoptosis (Andreu, Hetz y col.2012).

Así las PDIs han sido relacionadas con numerosas enfermedades neurodegenerativas como se resume en la Figura 7A. Por ejemplo, se observó en un análisis proteómico de médula espinal de ratas transgénicas para la proteína SOD mu-

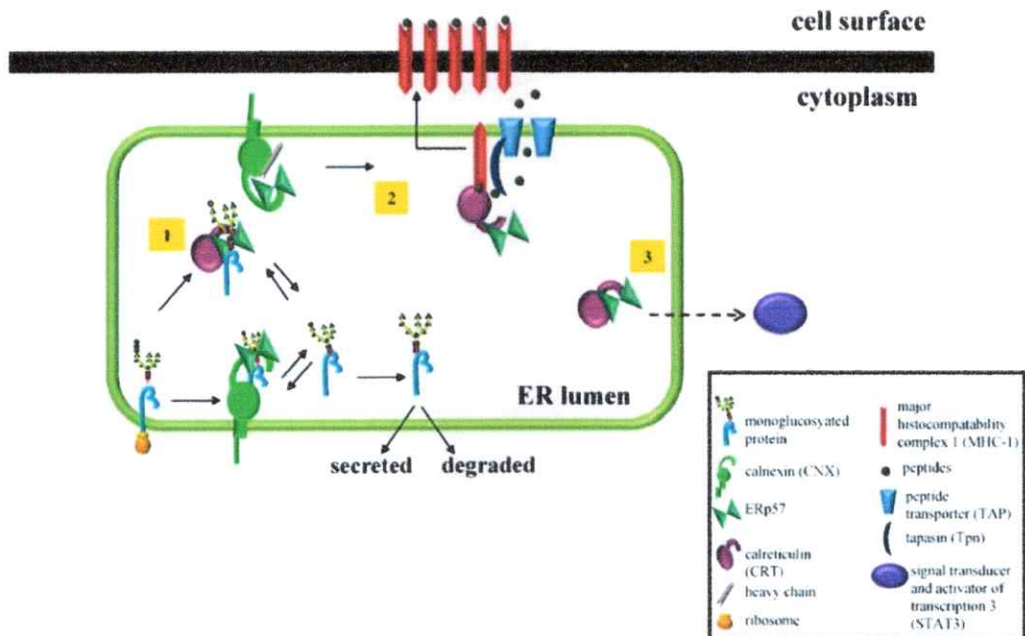


Figura 6. Diferentes funciones de ERp57 en el RE. ERp57 desempeña un papel en el control de calidad de plegamiento de proteínas en asociación con CNX (verde) y CRT (morado), también en el procesamiento del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (rojo) y modula la señalización de STAT3 (morado brillante) desde el lumen del RE. Figura adaptada desde Coe y Michalak, 2010.

-tante y de ratones modelos de ELA, que ERp57 y PDI son las proteínas que presentan los mayores niveles de inducción (Atkin y col. 2006; Massignan y col. 2007). Además se encontró un aumento en los niveles de estas mismas PDIs en médula espinal y líquido cefalorraquídeo de pacientes con ELA esporádica (Atkin y col. 2008; Hetz y col. 2009) (Figura 7B). Aún más importante, se ha sugerido el uso de ERp57 como biomarcador para la progresión de ELA a partir de sangre de pacientes (Nardo y col. 2011).

Otros estudios muestran un aumento en los niveles de ERp57 en cerebros de pacientes con la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJ), así como también en cerebros de ratones infectados con la proteína de PrP (Hetz y col. 2005). Por otra parte se identificó que ERp57 interactúa con el péptido β -amiloide en líquido céfalo raquídeo de individuos sanos, lo que sugiere que ERp57 podría estar jugando un papel de proteína transportadora, previniendo la agregación del β -amiloide, el componente principal de las placas observadas en pacientes con la EA (Honjo y col. 2010). Junto con estos antecedentes, se describió la presencia de PDI en ovillos neurofibrilares de cerebros de pacientes con la EA lo que refuerza su participación en este proceso neurodegenerativo (Honjo y col. 2010) (Figura 7B).

Estudios *in vitro* e *in vivo* muestran que la disminución de los niveles de PDI o la pérdida de actividad de ésta se correlaciona con un aumento de las inclusiones proteicas de SOD1 mutante y de manera inversa, la sobreexpresión de PDI disminuye la agregación de la proteína SOD1 y de este modo la neurotoxicidad asociada a esta enfermedad (Walker y col. 2010; Jeon, Nakamura y col.2013). Estos eventos están vinculados con una interacción física entre las proteínas PDI y SOD mutante (Walker y

A

Enfermedad	Efecto	Referencia
ELA	•PDIA1 y ERp57 son reguladas positivamente en modelos de ratón y pacientes con ALS.	(Atkin y col. 2006; Hetz y col. 2009; Massignan y col., 2007)
	• La deficiencia o sobreexpresión de PDIA1 aumenta o disminuye los niveles de agregación de SOD1 mutante, respectivamente.	(Walkery col. 2010)
	•PDIA1 es S-nitrosilada en modelos de ratón y pacientes con ALS.	(Walkery col. 2010)
Parkinson	• PDIA1 es S-nitrosilada en cerebros de pacientes con la EP.	(Uehara y col. 2006)
	•PDIp es regulada positivamente en cerebros de pacientes con la EP y colocaliza con cuerpos de Lewy.	
Alzheimer	•ERp57 interactúa con el péptido β -amiloide y previene su agregación en CSF.	(Erickson y col. 2005)
	•Presencia de PDIA1 en ovillos neurofibrilares.	(Honjo y col. 2010)
	•PDIA1 es S-nitrosilada en cerebros de pacientes con la EA.	(Uehara y col.2006)
	•La inhibición de PDIA1 y ERp57 protege contra la degeneración inducida por el β -amiloide.	(Hoffstrom y col 2010)
Creutzfeldt-Jakob	•ERp57 es regulada positivamente en cerebros de pacientes con CJD y en ratones que expresan PrP patológicos.	(Hetz y col.2003; Yoo y col.2002)
	•ERp57 y PDIA1 protegen contra la neurotoxicidad inducida por PrP en modelos celulares.	(Hetz y col.2005)
Huntington	•La inhibición de PDIA1 y ERp57 atenúa la neurodegeneración inducida por huntingtina mutante.	(Hoffstrom y col. 2010)

B

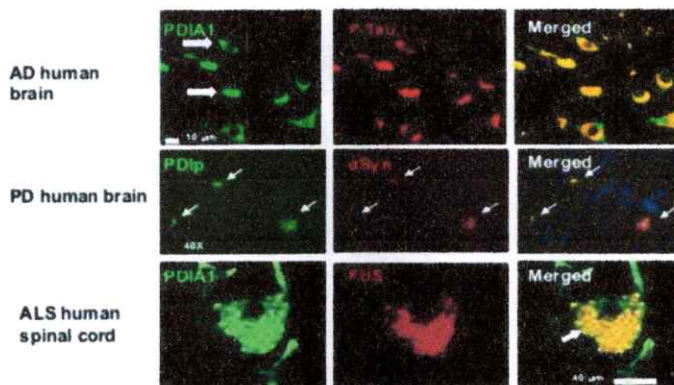


Figura 7. Evidencia que vincula las PDIs con enfermedades neurodegenerativas. (A) Resumen de los hallazgos más relevantes que relacionan algunos miembros de la familia de las PDIs con varias condiciones neurodegenerativas. **(B)** Colocalización *in vivo* de inclusiones proteicas, encontradas en tejido *post mortem* de individuos con la EA, la EP y ELA, con distintos miembros de la familia de las PDIs. CFS: líquido cefalorraquideo (del inglés, "Cerebrospinal fluid"); PrP: prión. Figura adaptada de la revisión "Protein Disulfide Isomerases in Neurodegeneration: from disease mechanisms to biomedical applications" (Andreu y col.2012).

col. 2010). De manera similar, la regulación negativa de ERp57 en células de neuroblastoma N2A aumenta la neurotoxicidad inducida por el PrP y a su vez una sobreexpresión de ERp57 confiere resistencia a la toxicidad de priones patológicos (Hetz y col. 2005).

Interesantemente, en médula espinal de pacientes con ELA, así como también en cerebros de pacientes con ELA, la EA y la EP se ha encontrado PDI S-nitrosilada (Uehara y col. 2006), una forma inactiva de la proteína, sugiriendo que la disfunción de esta proteína, podría contribuir a la progresión de estas enfermedades neurodegenerativas (Uehara y col. 2006).

En resumen, los estudios antes mencionados muestran evidencias de un posible rol neuroprotector de las PDIs en las enfermedades neurodegenerativas (en especial PDI y ERp57), dando lugar a nuevos blancos terapéuticos para el tratamiento de estas patologías.

Por otra parte, en estudios recientes se identificaron 5 compuestos que son capaces de prevenir la apoptosis inducida por huntingtina mutante: 16F16, Arteannuin B, BBC7M13, BBC7E8 y tiomuscimol (Hoffstrom, Kaplan, y col 2010). Estas moléculas son capaces de inhibir la actividad de las proteínas PDI y ERp57 (Hoffstrom, Kaplan, y col 2010). En este mismo estudio, se encontró que PDI y ERp57 inducen la permeabilización de la membrana mitocondrial externa de forma dependiente de la proteína BAK, gatillando la activación de la vía apoptótica canónica. El fenómeno fue asociado con la acumulación de PDIs en los sitios de unión entre el RE y la mitocondria (Hoffstrom, Kaplan, y col 2010). Esta función pro-apoptótica de las PDIs que vincula el mal plegamiento de proteínas y la muerte celular, resulta contrastante con los roles

anteriormente descritos de las PDIs, los cuales mostraban que estas proteínas eran capaces de aliviar el estrés de RE y promover la sobrevivencia celular (Andreu, Hetz y col.2012).

Finalmente, de los antecedentes presentados se desprende la idea de que el estrés de RE podría participar en la etiología o el desarrollo de patologías neurodegenerativas tales como la EP, sin embargo, es necesario investigar en detalle cual es la participación de cada uno de los componentes de este complejo proceso celular, con el fin de encontrar posibles blancos terapéuticos para esta enfermedad. Las PDIs podrían ser uno de estos blancos, específicamente resulta de gran interés estudiar la participación de ERp57 considerando la gran cantidad de evidencia que da cuenta de su posible rol neuroprotector en enfermedades neurodegenerativas.

En este seminario de título se exploró el efecto de la sobreexpresión de ERp57 en el SNC en la sobrevivencia de las neuronas dopaminérgicas de la SN. Para ello se utilizó un modelo farmacológico de la EP basado en la neurotoxina 6-OHDA. Con este estudio se pretendió evaluar la posible contribución funcional de ERp57 en la EP *in vivo*.

3. HIPÓTESIS.

La sobreexpresión de ERp57 en el SNC protege frente a la neurodegeneración gatillada por la neurotoxina 6-OHDA en las neuronas dopaminérgicas de la *Substantia Nigra pars compacta*.

4. OBJETIVOS.

4.1 Objetivo general.

Evaluar la neurodegeneración provocada por 6-OHDA en ratones transgénicos para ERp57 en el SNC.

4.2 Objetivos específicos.

Objetivo específico 1: Cuantificar la expresión basal de PDIs en la *Substantia Nigra* y en el cuerpo estriado de ratones transgénicos para ERp57 en el SNC.

Objetivo específico 2: Evaluar la susceptibilidad de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc frente a la muerte inducida por la neurotoxina 6-OHDA en ratones transgénicos para ERp57 en el SNC.

Objetivo específico 3: Cuantificar la expresión de PDIs en la *Substantia Nigra* y en el cuerpo estriado de ratones transgénicos para ERp57 en el SNC después del tratamiento con 6-OHDA.

5. MATERIALES Y MÉTODOS.

5.1 Generación de un ratón transgénico para ERp57 en el sistema nervioso central.

En nuestro laboratorio se generó un modelo de ganancia de función para ERp57 en el SNC como parte del seminario de título de Catherine Andreu (Andreu 2012). Esto fue llevado a cabo introduciendo el gen que codifica para la proteína

ERp57 humana (Gene ID: 2923), derivado del ADNc, en el plásmido de expresión MoPrP.XhoI (adquirido de David Borchelt of the Johns Hopkins School of Medicine, Baltimore, USA. Borchelt y col. 1996), junto con la secuencia codificante para el tag Flag a partir del sitio de restricción XhoI. El plásmido resultante porta la secuencia codificante para ERp57 humana fusionada al tag Flag bajo el control del promotor PrP (Figura 8A).

Para la generación de ratones transgénicos para ERp57 (Figura 8B), el plásmido fue purificado y linealizado en el "Centro de Estudios Científicos" (CECS), Valdivia. Posterior al cruzamiento de ratones machos con hembras, fueron extraídos los cigotos y se microinyectaron los pronúcleos masculinos con dicho plásmido. Luego estos cigotos fueron transferidos a hembras pseudo-preñadas (hembras cruzadas con machos vasectomizados) y se obtuvieron aproximadamente 10 a 15 embriones por oviducto. Las crías resultantes fueron genotipificadas para conocer el número de animales transgénicos. Cada animal transgénico obtenido fue asignado como una línea independiente de fondo genético mixto C57BL/6. La genotipificación fue realizada a partir de ADN procedente de la cola de los ratones. Para la extracción de ADN, se cortaron piezas de 5 mm de la cola del ratón, las que fueron incubadas con 600 μ L de buffer de lisis (Tris 50 mM [pH 8,0], EDTA 100 mM, NaCl 100 mM y SDS 1%) y 6 μ L de proteinasa K 10 mg/mL por 16 h a 55 °C. A continuación se centrifugó por 5 min a 13000 g. El sobrenadante fue mezclado con 450 μ L de isopropanol al 100% y se centrifugó nuevamente por 5 min a 13000 g. Finalmente el precipitado fue lavado con 1 mL de etanol 70%, resuspendido en 300 μ L de buffer TE (Tris-Cl 10 mM [pH 7,5], EDTA 1 mM) e incubado 2 h a 55 °C para facilitar su homogenización.

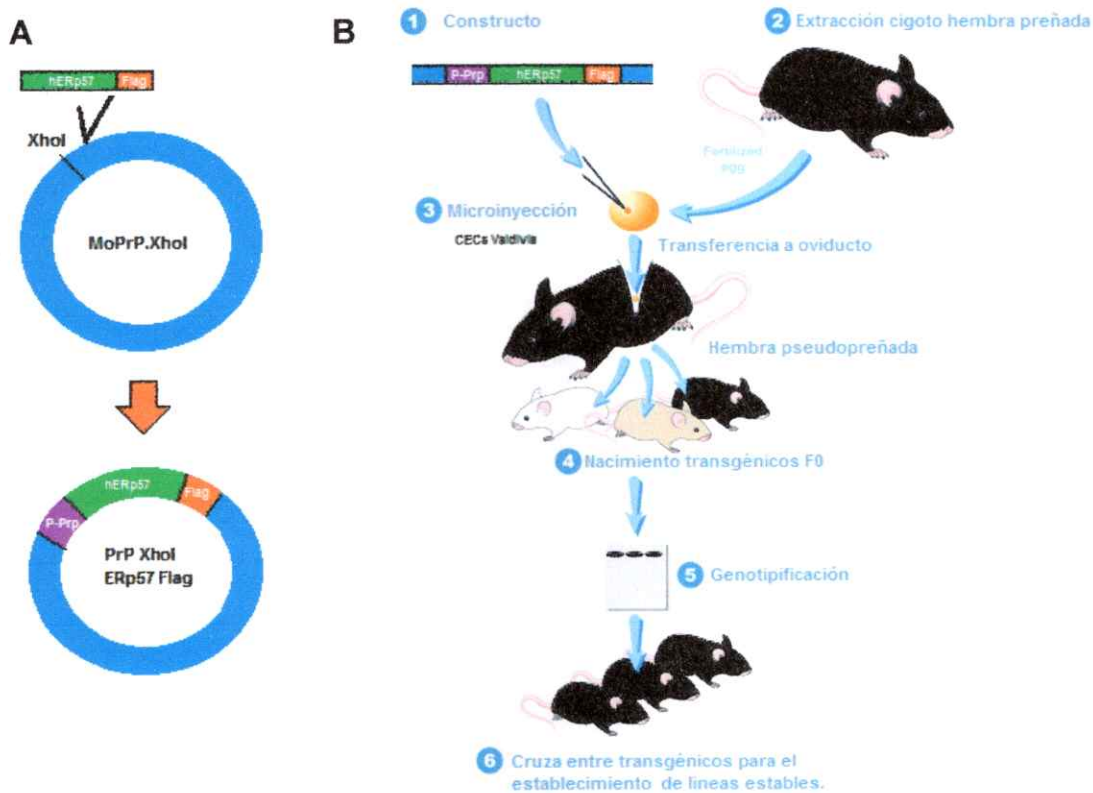


Figura 8. Estrategia experimental utilizada para la generación de ratones ERp57^{Tg}. (A) Clonamiento del plásmido que porta la secuencia codificante para ERp57 humana con el tag Flag bajo el control del promotor de PrP en el plásmido de expresión MoPrP.XhoI a partir del sitio de restricción XhoI. (B) Generación de ratones transgénicos llevada a cabo en el CECs, Valdivia. El plásmido obtenido en (A) fue microinyectado en un cigoto extraído desde una hembra y a continuación este cigoto fue transferido a una hembra pseudopreñada. Transcurridos 21 días del periodo de gestación, algunas de las crías nacidas resultaron ser transgénicas para ERp57-Flag. Cada uno de los animales transgénicos obtenidos constituyó una línea independiente de la F0. Figura (B) modificada de la pagina web de la UC San Diego.

La reacción de PCR fue realizada con 1 μ L de ADN, 10 μ L de Go Taq Master Mix (Promega) y cada partidor a una concentración 1 μ M en un volumen final de 20 μ L. Las secuencias de los partidores utilizados fueron las siguientes: erp57 866 sentido 5'-AATTCCTGGATGCTGGGCACAAAC -3' y erp57 1535 antisentido 5'-TCTGCTTGTCATCGTCGTCCTTGT-3'. El programa de PCR usado consistió en 1 ciclo de denaturación por 2 min a 94 °C, 20 ciclos de 30 seg a 94 °C, 30 seg a 65 °C (descendiendo 0,5 °C por ciclo), 50 seg a 72 °C; 16 ciclos de 50 seg a 94 °C, 30 seg a 55 °C, 50 seg a 72 °C y un ciclo final de elongación de 5 min a 72 °C.

Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio 1 μ g/mL y corridos a un voltaje constante de 100 V. En ratones transgénicos (ERp57^{Tg}) fue observada una banda de 650 pb mientras que en los no transgénicos (ERp57^{No-Tg}) no se observó dicha banda.

Las líneas de ratones transgénicos seleccionadas fueron mantenidas en los bioterios de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (Santiago, Chile). Para este seminario de título fue utilizada sólo la línea 1. Todos los experimentos realizados en animales fueron previamente aprobados por el comité de bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

5.2 Inyecciones estereotáxicas de 6-hidroxidopamina.

Previo a la inyección estereotáxica, ratones ERp57^{No-Tg} y ERp57^{Tg} de 90 días de edad fueron anestesiados con ketamina/xilacina (ketamina: 100 mg/Kg, xilacina: 10 mg/Kg, Vetcom, Chile) por inyección intraperitoneal. Transcurridos 5-10 min post anestesia o en su defecto, hasta que el ratón estuviera completamente insensibilizado, fue dispuesto 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 μ 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 μ g de 6-OHDA (Sigma-Aldrich, USA) a una concentración de 4 μ g/ μ l en ácido ascórbico al 0,02% (Sigma-Aldrich, USA).

Para llegar a las coordenadas DV: -0,31 cm se introdujo la jeringa a una velocidad de 0,05 cm/min. Una vez en las coordenadas, fueron inyectados 2 μ 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 μ l/min. Después de vaciar el volumen establecido la aguja fue retenida en el sitio durante 5 min con el fin de evitar el retorno del líquido inyectado. Finalmente, la aguja fue retirada a una velocidad de 0,1 cm/min. Los ratones fueron sacrificados 7 días post inyección para el análisis histológico o molecular.

5.3 Inmunohistoquímica anti-Tirosina Hidroxilasa.

Siete días post inyección, los ratones fueron anestesiados tal y como se describió previamente y luego fueron perfundidos con cloruro de sodio 0,9% y PFA al 4% utilizando una bomba de perfusión. El cerebro fue removido e incubado con PFA al 4% por 12 h a 4 °C. Posteriormente fue deshidratado en sacarosa al 30% 0,02% azida durante 48 h a 4 °C, cambiando por solución fresca al menos dos veces.

Se realizaron cortes coronales seriados en criostato (Leica, USA), de 25 μ m de espesor que comprendieron tanto la zona del cuerpo estriado como de la SNpc. Antes de ello fue necesario aplicar a los cerebros el medio de congelamiento OCT (del inglés,

"optimal cutting temperature compound", Tissue-Tek, USA). Los cortes fueron colectados en PBS con azida al 0,02% en placas de 48 pocillos.

A continuación se realizó una IHQ para el marcador dopaminérgico TH, en cortes flotantes seleccionados con una distancia de 100 μm tanto para la SNpc como para el cuerpo estriado. En primera instancia fueron realizados 3 lavados por 5 min en PBS para remover la azida sódica y luego los cortes fueron incubados con la solución inactivadora (H_2O_2 al 0,03% en PBS) durante 30 min a temperatura ambiente y en agitación, para bloquear la actividad de la peroxidasa endógena. Posteriormente los cortes fueron incubados 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 fueron incubados 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 fueron lavados 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 los cortes fueron incubados 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 fueron incubados con este reactivo por un tiempo aproximado de 1-2 min y para el cuerpo estriado por alrededor de 3 min. Los cortes obtenidos fueron montados utilizando el medio de montaje Entellan (Sigma-Aldrich, USA).

5.4 Cuantificación de somas TH⁺ de la SNpc y terminales axonales del cuerpo estriado.

Para la zona del cerebro medio correspondiente a la SNpc, fueron seleccionados 12 cortes seriados de 25 μm de espesor y separados cada 100 μm para cada animal. Luego de la IHQ anti-TH los cortes fueron analizados bajo un microscopio usando un ocular micrométrico graduado. El conteo de somas TH positivos (TH⁺) en la SNpc fue efectuado 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 fue considerada sólo el área de la SNpc, descartándose los somas TH⁺ de la zona del VTA. Todas las cuantificaciones fueron realizadas a ciegas. Los resultados fueron graficados como el promedio del número total de neuronas TH⁺ en la SNpc por cada hemisferio y también como el porcentaje de pérdida promedio por grupo del marcador TH en el lado inyectado con respecto al lado no inyectado. Además con el fin de comparar la distribución de somas TH⁺ por grupo a lo largo de toda la zona de SNpc, fue graficado el número promedio de neuronas por corte haciendo distinción entre lado inyectado y 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 fueron escaneados 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 Image J (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⁺ por animal en el lado inyectado con respecto al lado control no inyectado. Los resultados fueron graficados como el promedio de la sumatoria de las densidades integradas por lado y como el promedio del porcentaje de pérdida de los terminales axonales TH⁺, tanto para los ratones ERp57^{No-Tg} como para los ERp57^{Tg}.

5.5 Análisis mediante SDS-PAGE y Western blot .

Transcurridos 7 días post inyección estereotáxica de 6-OHDA en el cuerpo estriado, ratones ERp57^{No-Tg} y ERp57^{Tg} fueron sacrificados mediante inhalación de CO₂ para la extracción de tejido de distintas áreas del cerebro. Se hicieron disecciones de las áreas de la corteza, cerebelo, SN y cuerpo estriado, haciendo distinción entre lado inyectado y lado no inyectado en estos dos últimos tejidos. Los tejidos fueron congelados a -80 °C hasta su procesamiento. Para el homogeneizado de los tejidos, éstos fueron disgregados en 100 µl de PBS frío con inhibidor de proteasas (Roche, Switzerland) con la ayuda de homogenizadores mecánicos. A continuación 60 µl del homogenizado fueron destinados a la extracción de proteínas por lo que se les adicionó 60 µl de la solución tampón RIPA 2x (Tris 20 mM [pH 8,0], NaCl 150 mM, SDS 0,1%, DOC 0,5% y Tritón X-100 0,5%) con inhibidor de proteasas. Posteriormente las muestras fueron sonicadas 2 veces por 10 seg cada vez y luego la concentración de proteínas fue determinada en cada muestra utilizando el kit BCA Protein Assay (Pierce, Rockford, IL).

Las muestras de proteína fueron preparadas usando 60-70 µg de proteína total incubadas con DTT 100 mM por 10 min en hielo, mezcladas con buffer de carga 5X (Tris-HCl 0,2 M [pH 6,8], SDS 10%, azul de bromofenol 0,05%, y glicerol 20%) y luego calentadas por 5 min a 95 °C. 10 µg de proteína fueron cargados en geles denaturantes al 8%. El gel de poliacrilamida separador al 8% fue preparado con Tris-HCl 380 mM [pH 8,3], acrilamida-bis-acrilamida 8%, SDS 0,1%, Persulfato de amonio 0,1% y TEMED 0,06%. El gel de poliacrilamida compresor fue preparado con Tris-HCl 60 mM [pH 6,8], acrilamida-bis-acrilamida 4%, SDS 0,1%, persulfato de amonio 0,1% y TEMED 0,06%.

La electroforesis fue llevada a cabo en buffer de corrida (Tris 25 mM, Glicina 250 mM y SDS 0,1%) a un voltaje constante de 90 V hasta que el frente abandonara el gel compresor, luego el voltaje fue ajustado a 100 V. La corrida electroforética fue detenida cuando el frente azul abandonó el gel. A continuación las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF en buffer de transferencia (Tris 25mM, glicina 250 mM y metanol 20%) a un voltaje constante de 120 V por 2 h 15 min en hielo. Posteriormente la membrana fue incubada en solución de bloqueo (leche 5% en PBS) por 1 h a temperatura ambiente y en agitación. Finalmente, las membranas fueron incubadas con alguno de los siguientes anticuerpos, diluidos en leche 5% PBS tween 0,02%; anti-TH (1:2000, Chemicon, USA), anti-ERp57 1:3000 (SC-28823, Santa Cruz), anti-HSP90 1:3000 (SC-7947, H114, Santa Cruz), anti-PDI 1:3000 (SPA-891, ENZO/Stressgen), anti-ERp72 1:3000 (SPS-720, ENZO/Stressgen), anti-βactin HRP-conjugate 1:1000 (5125, Cell Signaling) por 16 h a 4 °C en agitación. Al día siguiente las membranas fueron lavadas 3 veces por 5 min con PBS Tween 0,1% y posteriormente incubadas 1 h a temperatura ambiente y en agitación con los anticuerpos secundarios

correspondientes: anti-rabbit-HRP o anti-mouse-HRP (Invitrogen), diluidos 1:3000 (leche 5% en PBS Tween 0,02%). Transcurrido este periodo, las membranas fueron lavadas con PBS Tween 0,1%, esta vez 5 veces por 5 min. Finalmente, el revelado fue realizado utilizando el kit Western blotting Substrate (Pierce) y los films fotográficos Super HR-U (Fujifilm).

El nivel de expresión de las proteínas fue cuantificado a partir de la intensidad de las bandas, ésta fue determinada utilizando el programa computacional ImageJ (NIH software, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Los valores obtenidos para la proteína de interés fueron normalizados por la intensidad obtenida para el control de carga HSP90 o actina.

5.6 Extracción de ARN, RT-PCR y PCR en tiempo real.

Transcurridos 7 días post inyección estereotáxica de 6-OHDA en el cuerpo estriado, ratones ERp57^{No-Tg} y ERp57^{Tg} fueron sacrificados mediante inhalación de CO₂ para la extracción de tejido de distintas áreas del cerebro. Se hicieron disecciones de las áreas de la corteza, cerebelo, SN y cuerpo estriado, haciendo distinción entre lado inyectado y lado no inyectado en estos dos últimos tejidos. Los tejidos fueron congelados a -80 °C hasta su procesamiento. Para el homogeneizado estos tejidos fueron disgregados en 100 µl de PBS frío con inhibidor de proteasas (Roche, Switzerland) con la ayuda de homogenizadores mecánicos. A continuación 40 µl 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), Buffer RT 10X, dNTPs 1 mM cada uno,

partidores random p(dN)6 (Roche) y 1 μ L de transcriptasa reversa en un volumen final de 20 μ L.

El PCR en tiempo real (qPCR, del inglés "quantitative PCR") fue llevado a cabo empleando el master mix Brilliant II Sybr Green qPCR (N#600828, Agilent Technologies) en una mezcla que contenía 2 μ L de una dilución de cDNA 1:20, 0,5 μ L de partidores 10 μ M, 10 μ L de Mix 2x y 7,5 μ L de agua libre de nucleasas en un volumen final de 20 μ L. Los siguientes pares de partidores fueron utilizados:

Erp57 sentido 5'-GAGGCTTGCCCCTGAGTATG -3'

Erp57 antisentido 5'-GTTGGCAGTGCAATCCACC -3'

Erp72 sentido 5'- ACGACATCACCAACGACCAA-3'

Erp72 antisentido 5'- AGCCAGGCCTTTAAAGCTCT-3'

Pdi sentido 5'-CAAGATCAAGCCCCACCTGAT-3'

Pdi antisentido 5'-AGTTCGCCCCAACCAGTACTT-3'

Beta-actina sentido 5'-CTCAGGAGGAGCAATGATCTTGAT-3'

Beta-actina antisentido 5'-TACCACCATGTACCCAGGCA-3'.

Las secuencias de los partidores fueron diseñadas con el programa Primer Express (Applied Biosystems, Foster City, CA) 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 seg a 95 °C, 15 seg a 57 °C (annealing), 15 seg a 72 °C y 1 ciclo de 10

seg a 95 °C, 5 seg a 25 °C, 1 seg a 70 °C y 1 seg 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 de actina fue utilizado como control de amplificación.

5.7 Test de comportamiento del cilindro.

Esta prueba fue realizada previo a la inyección (línea base) y 7 días post inyección de 6-OHDA en el cuerpo estriado de los ratones ERp57^{No-Tg} y ERp57^{Tg}. Se utilizó este test para evidenciar, de manera espontánea, posibles daños motores asociados a la inyección y consiste en introducir al ratón en un cilindro de vidrio translúcido de aproximadamente 20 cm de diámetro y luego registrar el movimiento del animal mediante una cámara filmadora durante 5 min. Posteriormente el número de toques realizado con cada pata delantera del animal fue cuantificado por los 5 min de duración del video. En el caso de aquellos ratones que presentaron bajos niveles de movimiento la duración de la grabación fue extendida hasta un máximo de 8 min dependiendo de cada caso, siempre considerando el mismo tiempo para contar los toques con ambas patas. Los análisis fueron realizados a ciegas.

Los resultados fueron graficados como porcentaje de toques con la pata izquierda (contralateral al sitio de la inyección) respecto al número total de toques con ambas patas.

5.8 Expresión de resultados y análisis estadístico.

Los resultados fueron expresados como el promedio por genotipo \pm error estándar.

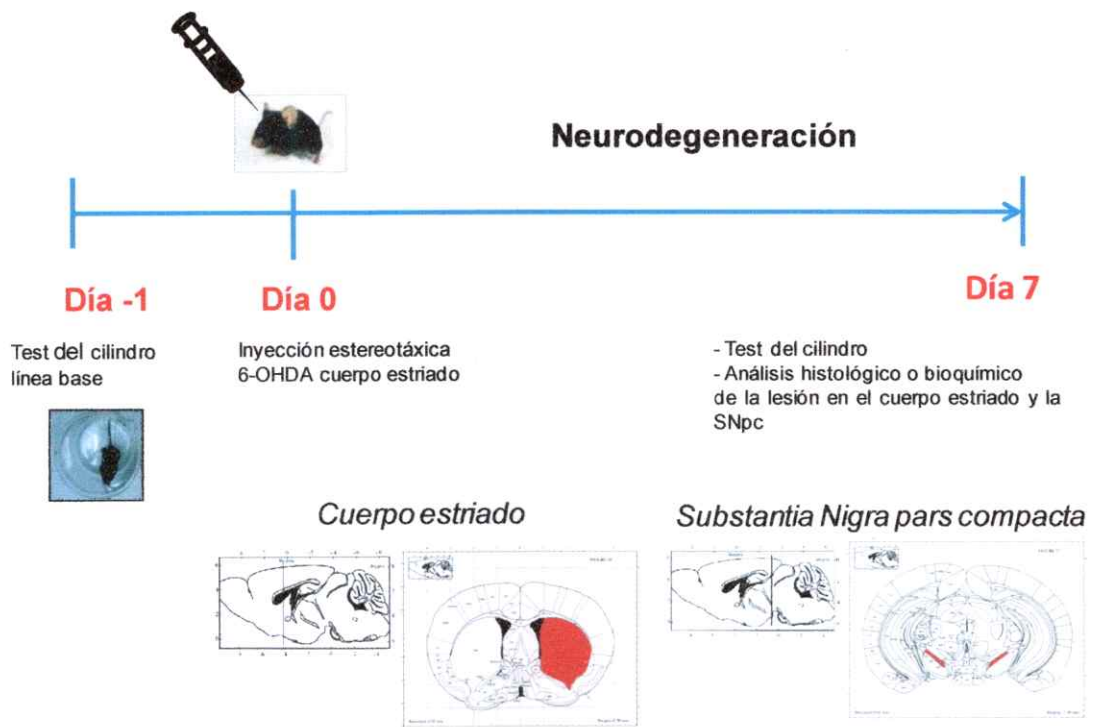


Figura 9. Curso temporal de los experimentos llevados a cabo en ratones ERp57^{Tg}. La línea temporal se basa en la inyección de la neurotoxina 6-OHDA (día 0), la cual fue realizada en ratones ERp57^{Tg} y ERp57^{No-Tg} adultos de 90 días. Previo a la inyección estereotáxica de 6-OHDA en el cuerpo estriado, se realizó el test de comportamiento del cilindro (Día -1) en estos mismos animales con el fin de cuantificar asimetrías motoras basales, este análisis fue asignado como línea base. Transcurridos 7 días después de la inyección estereotáxica de 6-OHDA en el cuerpo estriado fue realizado nuevamente el test del cilindro en estos animales y a continuación el análisis histológico o bioquímico según fuera el caso.

-dar (SEM). Para el análisis estadístico se utilizó la prueba t de Student, el test no paramétrico Mann-Whitney o bien un ANOVA de dos vías seguida del un post test de Bonferroni. Se consideró como límite superior de significancia estadística valores de $p < 0,05$.

6. RESULTADOS.

6.1 Modelo de estudio: Ratón transgénico para ERp57 en el SNC.

En este trabajo fue utilizado como modelo de estudio un ratón transgénico para ERp57 en el SNC. La sobreexpresión localizada de ERp57 en el sistema nervioso se logró utilizando la región promotora de PrP como elemento génico encargado de dirigir la expresión de este transgén. La proteína PrP tiene altos niveles de expresión en tejidos del sistema nervioso (Ford et al., 2002; Linden et al., 2008) y ha sido ampliamente utilizada para regular la expresión de genes en el cerebro (Waldron-Roby et al., 2012).

Previamente en nuestro laboratorio fue generado un plásmido que contiene el gen *ERp57* humano fusionado a un tag Flag bajo el promotor PrP utilizando un vector de expresión MoPrP.XhoI (Borchelt et al., 1996). Posteriormente, en el CECS (Valdivia, Chile) este plásmido fue utilizado para generar un modelo de ratón que sobreexpresa la proteína ERp57 humana en el SNC. Se obtuvieron cinco líneas de ratones transgénicos, las que fueron confirmadas por PCR. Para genotipificar estos animales se diseñaron partidores específicos, así como también un programa de PCR apropiado (ver sección 5 Materiales y métodos). Para el caso de los animales ERp57^{Tg} fue obtenido un producto de PCR de 650 pb, en tanto que para los animales ERp57^{No-Tg} no

se obtuvo dicho producto (Figura 10A). Los niveles de expresión de ERp57 fueron analizados por Western blot en cada una de las líneas para tejidos de la médula espinal y cerebelo (Figura 10B). El nivel de expresión de la proteína ERp57 fue cuantificado en cada línea de acuerdo a su intensidad de banda utilizando el programa ImageJ y normalizando por el control de carga HSP90. Posteriormente el nivel de sobreexpresión de cada línea fue calculado normalizando por el nivel de expresión de los ratones ERp57^{No-Tg} (Tabla 1). Las líneas ERp57^{Tg} 1 y 5 (F0) resultaron tener los niveles de sobreexpresión más altos para los tejidos de médula espinal y corteza, alcanzando casi dos veces el nivel de expresión de los animales ERp57^{No-Tg} por lo que fueron seleccionadas para su expansión y mantenimiento.

Adicionalmente, los niveles de expresión de ERp57 fueron analizados en los tejidos de corteza e hígado para animales de las líneas 1 y 5 (F0). Tal y como se esperaba, fue posible observar la sobreexpresión de la proteína en la corteza, pero no en el hígado (Figura 10C). Finalmente, los niveles de sobreexpresión de ERp57 fueron analizados en animales ERp57^{Tg} de las líneas 1 y 5 correspondientes a la F₁ en médula y cerebelo para confirmar que la sobreexpresión del transgén se mantiene en el tiempo (Figura 10D). Estos resultados dan cuenta de la obtención de un modelo de ratón transgénico que sobreexpresa la proteína ERp57 en el sistema nervioso central (Andreu, 2012, no publicado). Este modelo fue caracterizado fenotípicamente por Catherine Andreu en su seminario de título de Ingeniero en Biotecnología molecular. Los resultados correspondientes a las mediciones de peso corporal y pruebas motoras de Rotarod y Hanging test no arrojaron diferencias significativas entre los animales ERp57^{Tg} y ERp57^{No-Tg}, indicando que la sobreexpresión de ERp57 en el SNC no provoca cambios fenotípicos, al menos en las condiciones testeadas (Andreu 2012, no

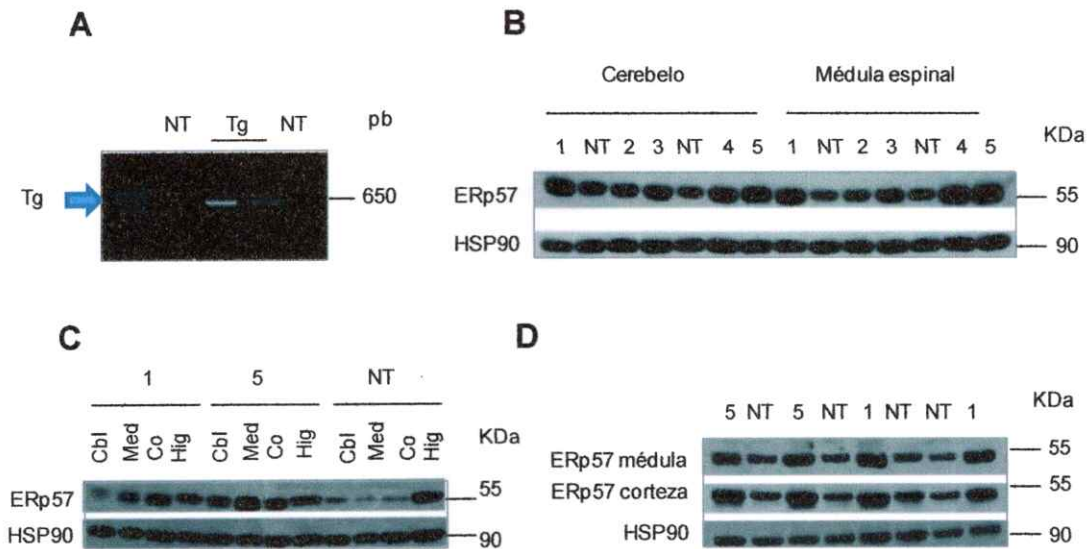


Figura 10. Caracterización de las líneas de ratones transgénicos para ERp57 en el SNC. (A) Ejemplo de la genotipificación de ratones ERp57^{Tg} (Tg) y ERp57^{No-Tg} (NT). Fueron utilizados los partidores erp57 866 sentido y 1535 antisentido que generan un producto de 650pb en el caso de ratones ERp57^{Tg} y no generan producto en los ratones ERp57^{No-Tg}. (B) Western blot de extractos de proteínas de cerebelo y médula espinal provenientes de la F0 de las 5 líneas transgénicas obtenidas (1-5) y de extractos de ratones ERp57^{No-Tg}. Las líneas 1 y 5 mostraron los niveles de sobreexpresión de ERp57 más altos por lo que fueron seleccionadas para amplificar la colonia. (C) Western blot de extractos de proteínas de cerebelo (Cbl), médula espinal (Med), corteza (Co) e Hígado (Hig) provenientes de animales ERp57^{Tg} de las líneas 1 y 5 comparados con extractos de animales ERp57^{No-Tg}. Se confirma la sobreexpresión de ERp57 en las líneas transgénicas 1 y 5 para todos los tejidos analizados, a excepción del hígado que muestra niveles similares al de los animales no transgénicos. (D) Western blot de médula espinal y corteza de ratones provenientes de la F1 de las líneas transgénicas 1 y 5 (n=2) comparado con extractos de ERp57^{No-Tg}. Se confirma que la sobreexpresión de ERp57 se mantiene entre generaciones. Los niveles de la proteína ERp57 fueron detectados utilizando un anticuerpo anti-ERp57 que reconoce tanto la isoforma humana como la de ratón. Se utilizó HSP90 como control de carga.

Tabla 1. Análisis semi-cuantitativo de los niveles de expresión de ERp57 en cerebelo y médula espinal de animales ERp57^{No-Tg} y ERp57^{Tg}. Se muestran los niveles de la proteína ERp57 en los tejidos de cerebelo y médula espinal de animales ERp57^{No-Tg} y ERp57^{Tg} normalizados por el control de carga HSP90 y luego por el nivel de expresión del control ERp57^{No-Tg}. Las líneas 1 y 5 muestran los niveles más altos de expresión tanto en cerebelo como en médula espinal por lo que fueron seleccionadas para mantener la colonia. Números 1-5 corresponden a las 5 líneas transgénicas obtenidas y NT corresponde a animales no transgénicos.

Línea/Tejido	N° veces de expresión (relativo al NT)	
	Cerebelo	Médula espinal
1	1,8	1,8
2	1,3	1,1
3	1,5	1,3
4	1,5	1,7
5	1,8	2,1

publicado).

6.2 Objetivo específico 1: Cuantificar la expresión basal de PDIs en la SN y en el cuerpo estriado de ratones transgénicos para ERp57 en el SNC.

Para el desarrollo de este trabajo fueron utilizados ratones ERp57^{Tg} de la línea 1. Con el fin de comprobar la sobreexpresión de ERp57 en los tejidos de interés para este estudio, un análisis por Western blot fue llevado a cabo en tejidos de la SN y el cuerpo estriado de animales ERp57^{No-Tg} y ERp57^{Tg} (Figura 11A). Los niveles de expresión de ERp57 fueron determinados a partir de la intensidad de bandas, utilizando el programa ImageJ y normalizando por los niveles de la proteína HSP90 usada como control.

El nivel de sobreexpresión de ERp57 en los ratones ERp57^{Tg} fue calculado normalizando por la intensidad de banda obtenida en los animales ERp57^{No-Tg} para las respectivas proteínas (Tabla 2). Para determinar los niveles de expresión en el tejido de interés para este trabajo fue realizado un análisis por Western blot de disecciones de SN de 6 animales ERp57^{No-Tg} y 5 animales ERp57^{Tg} (Figura 11C). Los niveles de expresión de ERp57 fueron determinados a partir de la intensidad de bandas utilizando el programa ImageJ y normalizando por el control de carga actina (Figura 11D).

A partir de este análisis fue posible observar un incremento significativo de los niveles de ERp57 en los animales ERp57^{Tg} que resultó ser aproximadamente 4 veces por sobre los niveles de la misma proteína en animales ERp57^{No-Tg}. Los resultados obtenidos permiten verificar la sobreexpresión de ERp57 en los tejidos de la SN y el cuerpo estriado de animales ERp57^{Tg}.

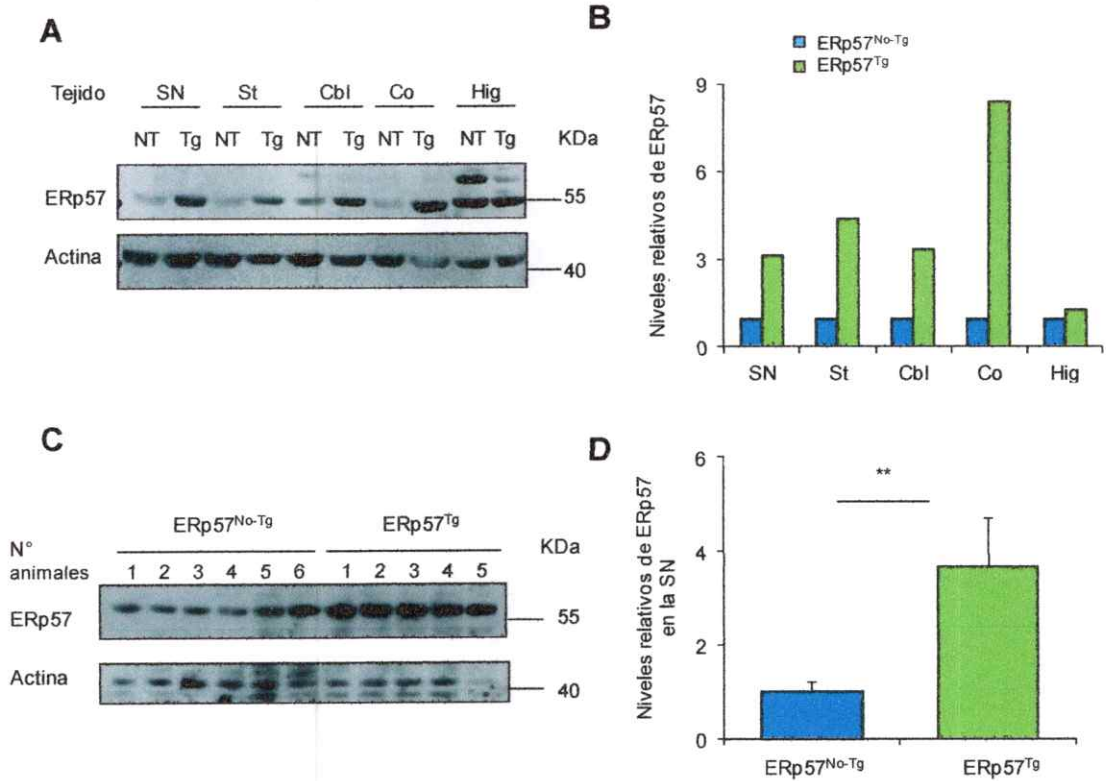


Figura 11. Análisis de la expresión de la proteína ERp57 en disecciones de SN y cuerpo estriado de ratones ERp57^{No-Tg} y ERp57^{Tg}. (A) Análisis por Western blot de extractos de proteína de *Substantia nigra* (SN), cuerpo estriado (St), cerebelo (Cbl), corteza (Co) e hígado (Hig) de ratones ERp57^{Tg} (Tg) y ERp57^{No-Tg} (NT). Se muestra la sobreexpresión de ERp57 en la *Substantia nigra* y el cuerpo estriado de animales ERp57^{Tg} comparados con ERp57^{No-Tg}. Se utilizó como control positivo de sobreexpresión tejidos previamente analizados (cerebelo y corteza) y como control negativo hígado. Se utilizó actina como control de carga. (B) Gráfico que muestra un análisis semi-cuantitativo de los niveles de ERp57 relativos a actina de (A). (C) Análisis por Western blot de extractos de proteína de SN de 6 ratones ERp57^{No-Tg} y 5 ERp57^{Tg} (Tg). Se muestra la sobreexpresión de ERp57 en la SN de animales ERp57^{Tg} comparados con ERp57^{No-Tg}. Como control positivo de sobreexpresión fueron utilizados tejidos previamente analizados (cerebelo y corteza) y como control negativo hígado. Actina fue utilizada como control de carga. (D) Gráfico que muestra un análisis semi-cuantitativo de los niveles de ERp57 en la SN relativos a actina de (C), los valores corresponden a los promedios y respectivos errores estándar. El análisis estadístico fue realizado mediante el test no paramétrico Mann-Whitney. **: $p < 0,01$.

Tabla 2. Análisis semi-cuantitativo de los niveles de expresión basales de ERp57 en la Substantia nigra y cuerpo estriado de animales ERp57^{No-Tg} y ERp57^{Tg}. Se muestran los niveles de la proteína ERp57 en los tejidos de SN y cuerpo estriado de animales ERp57^{No-Tg} y ERp57^{Tg} normalizados por el control de carga HSP90 y luego por el nivel de expresión del control ERp57^{No-Tg} (NT). Los tejidos de cerebelo y corteza se muestran como controles positivos de sobreexpresión y el hígado como control negativo.

Tejido	N° veces de expresión (relativo al NT)
Substantia nigra	3,1
Cuerpo estriado	4,4
Cerebelo	3,3
Corteza	8,4
Hígado	1,2

Posteriormente, los niveles basales del ARNm de PDI y ERp72 fueron cuantificados en la SN de animales ERp57^{Tg} y ERp57^{No-Tg} de 90 días de edad (Figura 12). No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos para ninguno de los mensajeros analizados, sin embargo se observa una tendencia al incremento de PDI y a la disminución de ERp72 en los animales ERp57^{Tg} en relación a los ERp57^{No-Tg}. De estos resultados se desprende que no hay cambios compensatorios en los niveles de otras PDIs asociados a la sobreexpresión de ERp57 en la SN de los animales ERp57^{Tg}.

6.3 Objetivo específico 2: Analizar la susceptibilidad de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc frente a la muerte inducida por la neurotoxina 6-OHDA en ratones transgénicos para ERp57 en el SNC.

6.3.1 Efecto de la sobreexpresión de ERp57 sobre la viabilidad de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc luego de la inyección de 6-OHDA.

Con el fin de evaluar el posible rol protector de ERp57 en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc en un modelo experimental de la EP fueron realizadas inyecciones estereotáxicas de la 6-OHDA en el cuerpo estriado de ratones ERp57^{No-Tg} y ERp57^{Tg} de aproximadamente 90 días incluyendo tanto machos como hembras. Siete días después de la inyección los animales fueron sacrificados y se realizaron cortes seriados de 25 µm de espesor de la zona del cuerpo estriado y de cerebro medio. Posteriormente fueron seleccionados cortes cada 100 µm tanto para el cuerpo estriado como para el cerebro medio (abarcando toda la zona de la SNpc) y la detección de la

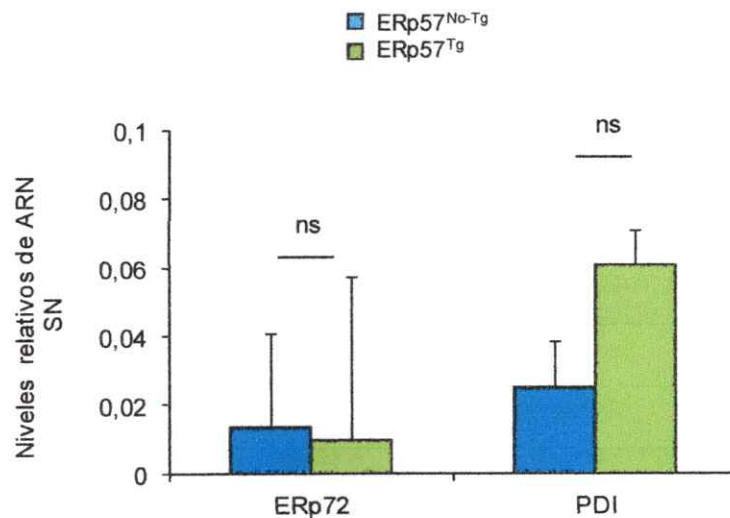


Figura 12. Análisis de los niveles de ARNm de las foldasas ERp72 y PDI en disecciones de SN de ratones ERp57^{No-Tg} y ERp57^{Tg}. Gráfico que muestra la cuantificación de los niveles basales de ARNm de las foldasas ERp72 y PDI en disecciones de SN de ratones ERp57^{No-Tg} y ERp57^{Tg} de 90 días de edad. La cuantificación se llevó a cabo mediante un PCR en tiempo real. Los valores se expresan como los promedios y los errores estándar de los niveles de ARNm de ERp72 y PDI relativos a actina obtenidos para 3 ERp57^{No-Tg} y 3 ERp57^{Tg}. El análisis estadístico fue realizado mediante el test no paramétrico Mann-Whitney. ns: diferencia estadísticamente no significativa ($p > 0,05$).

proteína TH fue llevada a cabo mediante una IHC (Figura 13). Para determinar si la sobreexpresión de ERp57 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, la marca TH fue cuantificada en la zona del cuerpo estriado. Para ello la densidad integrada asociada al marcador TH fue determinada en cortes que abarcan toda la zona del cuerpo estriado en animales ERp57^{No-Tg} y ERp57^{Tg} inyectados con 6-OHDA. La sumatoria de las densidades integradas fue hecha utilizando todos los cortes tanto para el lado inyectado como para el lado no inyectado y posteriormente fue calculado el porcentaje de pérdida del marcador TH del lado inyectado con respecto al no inyectado para ambos grupos de animales (ERp57^{No-Tg} y ERp57^{Tg}). Como se observa en la Figura 13B, el hemisferio inyectado con la neurotoxina muestra una gran pérdida del marcador dopaminérgico, alcanzando una pérdida promedio alrededor del 80% tanto para animales ERp57^{No-Tg} como para ERp57^{Tg} (Figura 13D). Estos resultados muestran que no existen diferencias significativas en la pérdida de la marca TH entre ambos grupos de animales. Además se descartan diferencias basales del marcador dopaminérgico TH en el cuerpo estriado entre animales ERp57^{No-Tg} y ERp57^{Tg} (Figura 13C).

Por otro lado el número de somas TH⁺ a lo largo de toda la SNpc fue cuantificado a partir de conteo manual utilizando microscopia de luz visible. Éste fue llevado a cabo excluyendo la zona del VTA y haciendo distinción entre hemisferio inyectado y no inyectado (Figura 14A). Al cuantificar el número de somas TH⁺ en la zona de la SNpc desde cortes más anteriores hasta cortes más posteriores (Figura 14) no se encontraron diferencias significativas en el número de somas TH⁺ del lado control no inyectado en las distintas áreas de la SNpc entre animales ERp57^{No-Tg} y

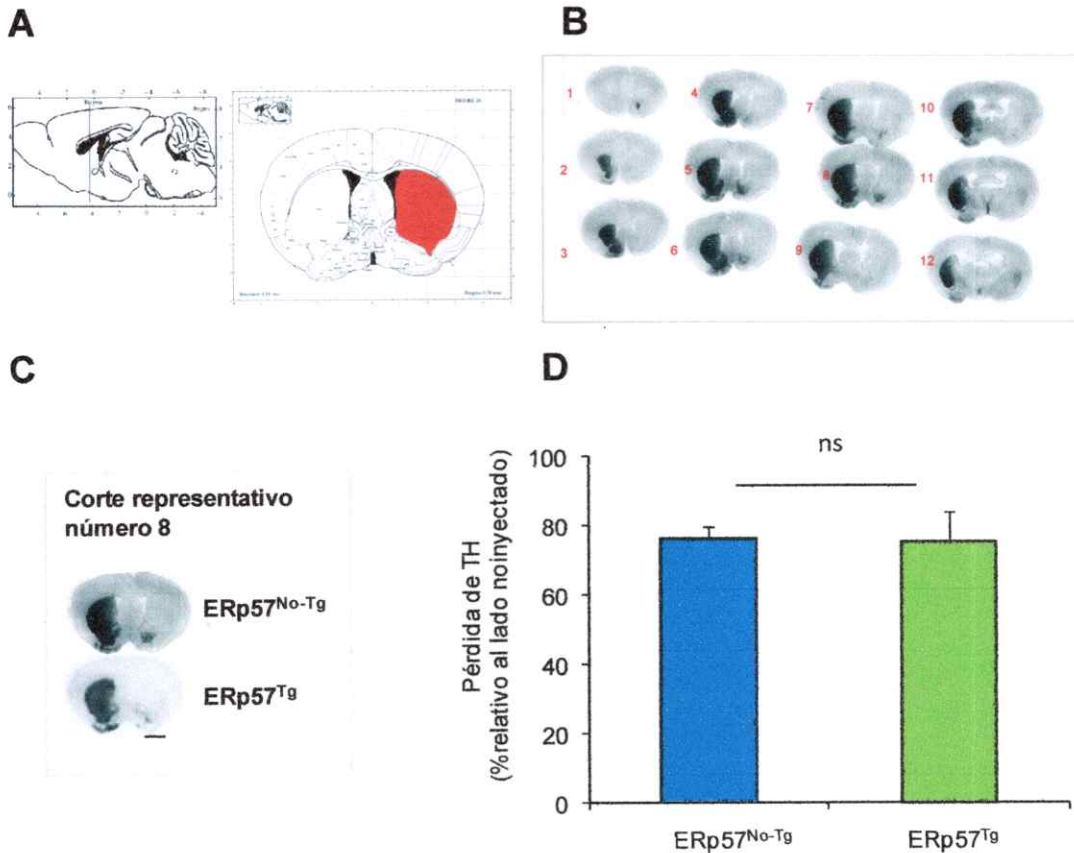


Figura 13. Análisis histológico y cuantificación del daño inducido por 6-OHDA en el cuerpo estriado de ratones ERp57^{No-Tg} y ERp57^{Tg}. (A) Esquema modificado del atlas del cerebro de ratón de Franklin y Paxinos (2001) de una sección representativa del área cerebral del cuerpo estriado. En la esquina superior izquierda se muestra la localización anteroposterior de la sección seleccionada y a la derecha una representación de un corte coronal en el cual se marca en rojo la zona del cuerpo estriado. (B) IHQ anti-TH en cortes coronales seriados de 25 μm de espesor espaciados cada 100 μm abarcando toda la zona del cuerpo estriado de un animal ERp57^{No-Tg} de 90 días de edad inyectado con 8 μg de 6-OHDA y sacrificado 7 días después. Los números asignados al lado izquierdo de cada corte indican el orden del mismo en el eje anteroposterior del cuerpo estriado. (C) IHC anti-TH del corte representativo número 8 de animales ERp57^{No-Tg} (ver Figura 13A) y ERp57^{Tg} de 90 días de edad inyectados con 8 μg de 6-OHDA y sacrificado 7 días más tarde. La barra de escala corresponde a 1 mm. (D) Análisis densitométrico de la marca TH en el cuerpo estriado, incluyendo todos los cortes de la serie de animales ERp57^{No-Tg} y ERp57^{Tg} inyectados con 6-OHDA. Los valores se expresan como porcentaje de pérdida relativo al lado no inyectado y corresponden al promedio con el error estándar de 8 animales ERp57^{No-Tg} y 5 animales ERp57^{Tg}. El análisis estadístico fue realizado mediante el test no paramétrico Mann-Whitney. ns: diferencia estadísticamente no significativa. ($p > 0,05$).

ERp57^{Tg} (Figura 14C). De estos resultados se desprende que no existen diferencias a nivel basal en la distribución de neuronas dopaminérgicas de la SNpc entre animales ERp57^{No-Tg} y ERp57^{Tg}.

Al analizar el número total de somas TH⁺ comprendiendo toda la SNpc no se detectaron diferencias significativas entre ambos grupos, observándose aproximadamente 1300 somas TH⁺ tanto para animales ERp57^{No-Tg} como ERp57^{Tg} (Figura 15B). Estos resultados muestran que no existen cambios a nivel global en el número de neuronas dopaminérgicas en la SNpc de los animales ERp57^{Tg} al compararlos con los ERp57^{No-Tg}. Posteriormente, fue cuantificada la pérdida del marcador TH en el lado inyectado con la 6-OHDA (Figura 15). Como se observa en la Figura 15C tanto ratones ERp57^{Tg} como ERp57^{No-Tg} presentan porcentajes de pérdida de TH muy similares, cercanos al 40% en ambos casos, tal y como se observa en el corte representativo de la Figura 15A. De este resultado se desprende que la sobreexpresión de ERp57 en el SNC no genera protección frente a la 6-OHDA en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc, al menos a nivel global. Con el fin de estudiar una posible neuroprotección local en una zona específica de la SNpc, fue realizado un análisis más exhaustivo del número de neuronas en cada corte por genotipo, antes y después de la inyección. Fue posible apreciar diferencias significativas en el número de somas TH⁺ luego de la inyección con 6-OHDA sólo en los cortes 2, 3, 4 y 5 en ambos grupos (Figura 16). Así mismo, no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de pérdida neuronal por corte al comparar entre animales ERp57^{No-Tg} y ERp57^{Tg} (Figura 17). Estos resultados permiten descartar que la sobreexpresión de ERp57 genere una neuroprotección localizada a un grupo particular de neuronas dopaminérgicas en la SNpc.

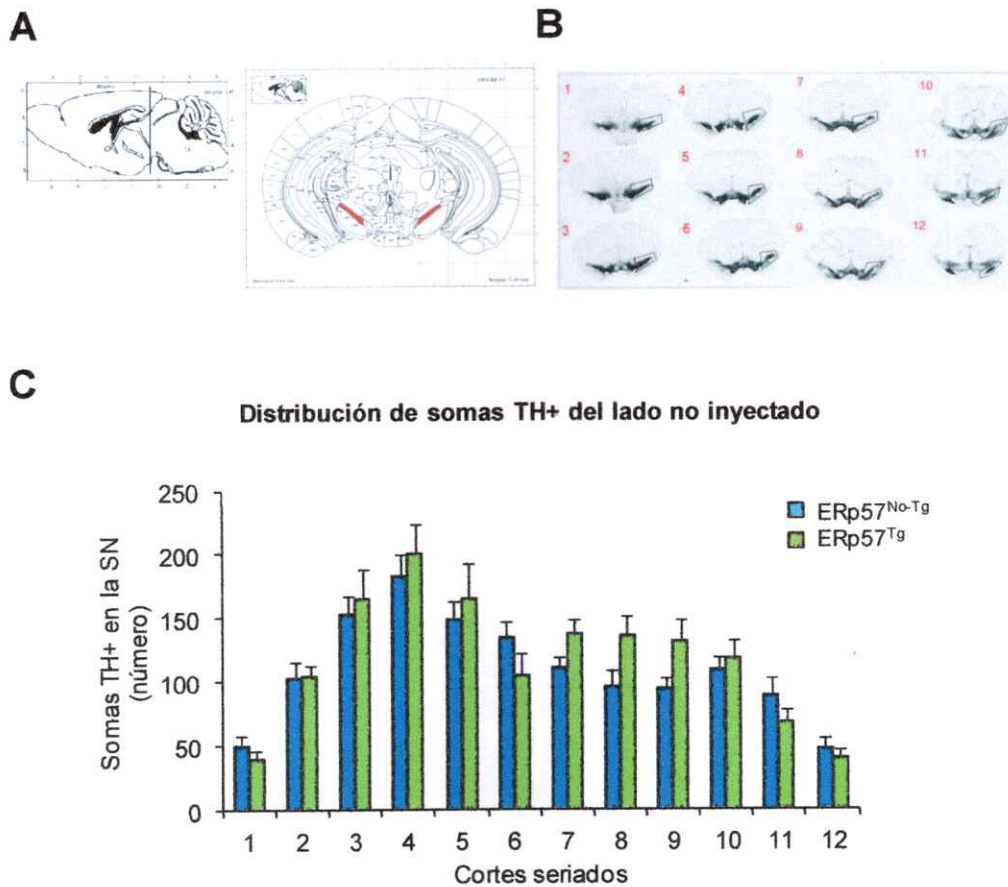


Figura 14. Análisis histológico de la distribución de somas TH⁺ en la SNpc de ratones ERp57^{No-Tg} y ERp57^{Tg}. (A) Esquema modificado del atlas del cerebro de ratón de Franklin y Paxinos(2001) de una sección representativa del área cerebral de la SNpc. En la esquina superior izquierda se muestra la localización anteroposterior de la sección seleccionada y a la derecha una representación de un corte coronal en el cual se marca en rojo la zona de la SNpc. (B) IHC anti-TH que muestra la distribución representativa de la SNpc a lo largo del eje anteroposterior de un animal WT C57BL/6. La IHC anti-TH fue realizada en cortes coronales seriados de 25 μ m de espesor espaciados cada 100 μ m abarcando toda la zona de la SN. Los números asignados al lado izquierdo de cada corte indican el orden del mismo en el eje anteroposterior de la SN. La zona de la SNpc en cada corte se muestra enmarcada por un romboide. (C) Gráfico que muestra el conteo manual de los somas TH⁺ de la SNpc en el lado no inyectado en de ratones ERp57^{No-Tg} y ERp57^{Tg} inyectados con 8 μ g de 6-OHDA en el cuerpo estriado. El número de cada corte del eje X está representado en la Figura 14B. Los valores corresponden a los promedios y errores estándar del número absoluto de somas TH⁺ presentes en cada corte, obtenidos a partir 8 ratones ERp57^{No-Tg} y de 5 ERp57^{Tg}. El análisis estadístico fue realizado mediante un test de ANOVA de dos vías seguido de un post-test de Bonferroni. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos para ninguno de los cortes ($p > 0,05$).

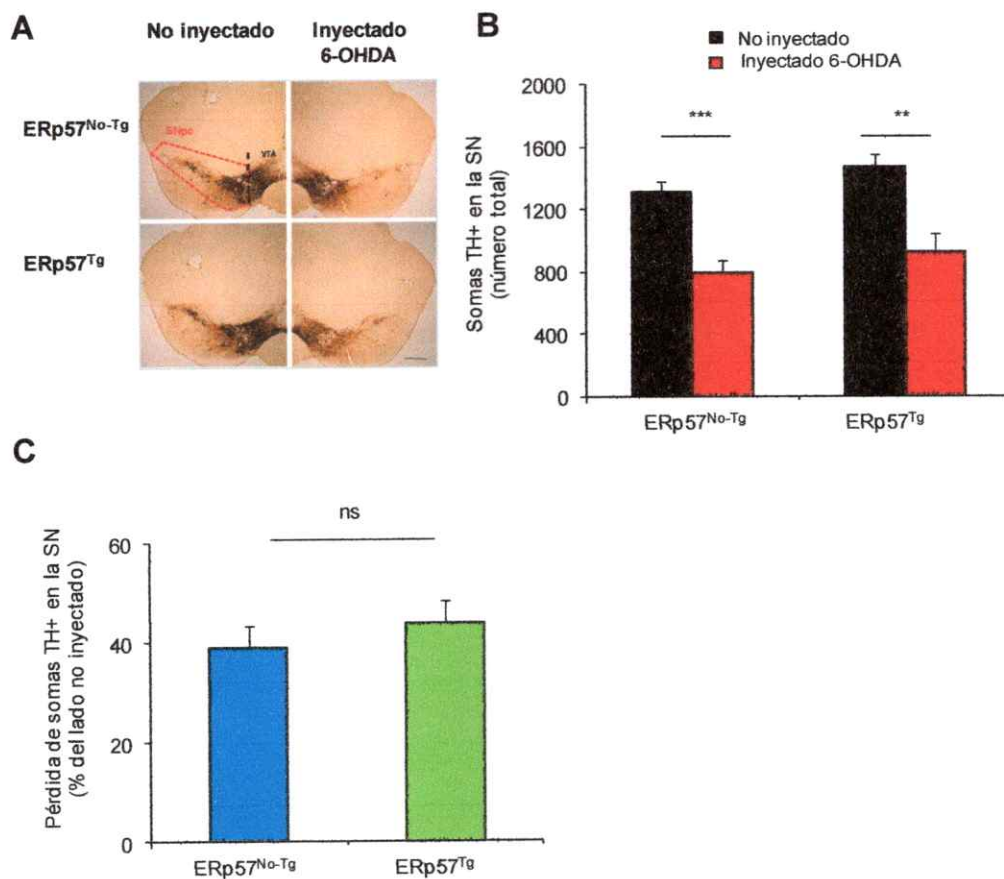


Figura 15. Cuantificación del daño global inducido por 6-OHDA en la SNpc de ratones ERp57^{No-Tg} y ERp57^{Tg}. (A) IHC anti-TH representativa de un corte de cerebro medio (corte N° 7 en la Figura 14B) de 25µm de espesor proveniente de un ratón ERp57^{No-Tg} y uno ERp57^{Tg} de 90 días de edad inyectados con 8 µg de 6-OHDA en el cuerpo estriado y sacrificados 7 días más tarde. La barra de escala corresponde a 200µm. En rojo se marca la zona de la SNpc y en negro se destaca el área tegmental ventral (VTA), excluida de la cuantificación manual de somas TH⁺. Se observa la pérdida parcial de los somas TH⁺ en la zona de la SNpc luego de la inyección de 6-OHDA en ambos grupos. (B) Gráfico que muestra la sumatoria de somas TH⁺ abarcando toda la zona de la SNpc (cortes 1-12) de animales ERp57^{No-Tg} y ERp57^{Tg} inyectados con 8 µg de 6-OHDA en el cuerpo estriado y sacrificados 7 días más tarde. Los valores se expresan como el promedio del número total de somas TH⁺ con el error estándar de 8 animales ERp57^{No-Tg} y 5 ERp57^{Tg}. (C) Gráfico que muestra la cuantificación de la pérdida global de somas TH⁺ en la SNpc por grupo. Los valores se expresan como porcentaje de pérdida relativo al lado no inyectado y corresponden al promedio con el error estándar de 8 animales ERp57^{No-Tg} y 5 animales ERp57^{Tg}. El análisis estadístico fue realizado mediante el test no paramétrico Mann-Whitney. ***: $p < 0,001$, *: $p < 0,05$, ns: diferencia estadísticamente no significativa ($p > 0,05$).

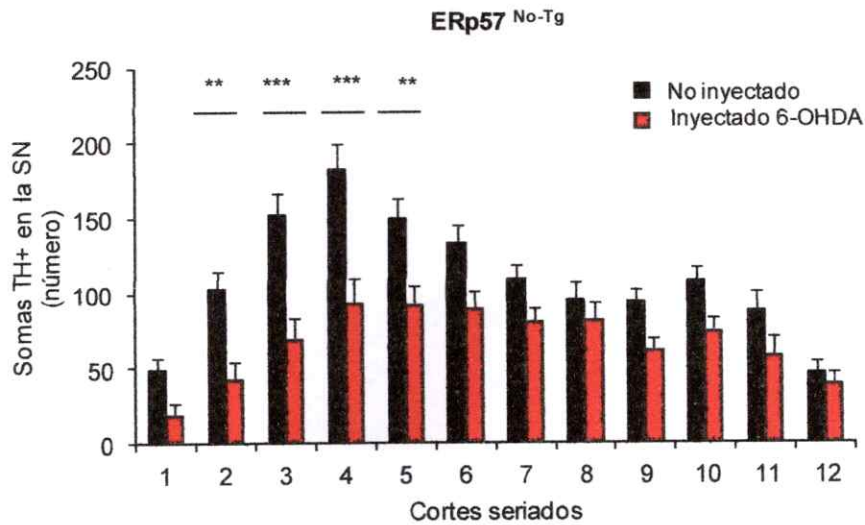
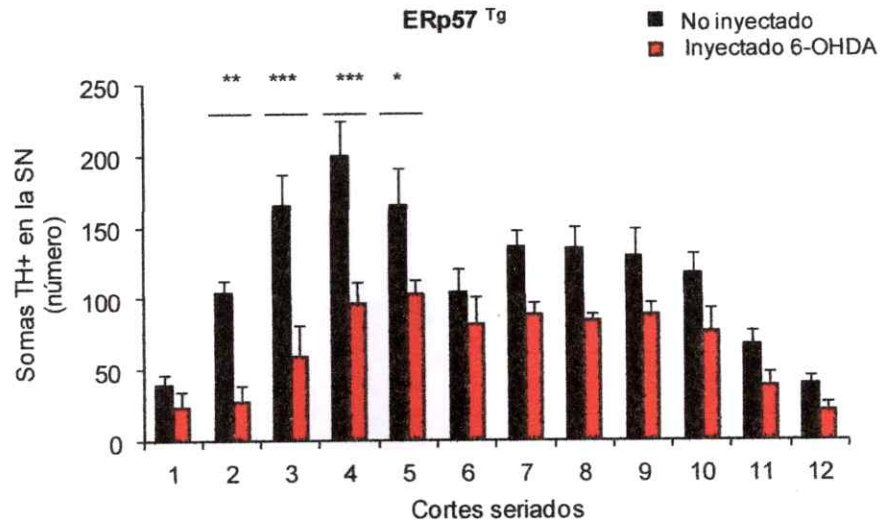
A**B**

Figura 16. Análisis histológico y cuantificación espacial del daño inducido por 6-OHDA en la SNpc de ratones ERp57^{No-Tg} y ERp57^{Tg}. (A) Gráfico que muestra el conteo manual de los somas TH⁺ de la SNpc de ratones ERp57^{No-Tg} correspondientes al lado no inyectado e inyectado con 8 μ g de 6-OHDA en el cuerpo estriado luego de 7 días de la inyección. El número de cada corte del eje X está representado en la Figura 14B. Los valores corresponden a los promedios y errores estándar del número absoluto de somas TH⁺ presentes en cada corte, obtenidos a partir 8 ratones ERp57^{No-Tg}. (B) Gráfico que muestra el conteo manual de los somas TH⁺ de la SNpc de ratones ERp57^{Tg} correspondientes al lado no inyectado e inyectado con 8 μ g de 6-OHDA en el cuerpo estriado luego de 7 días. El número de cada corte del eje X está representado en la Figura 14B. Los valores corresponden a los promedios y errores estándar del número absoluto de somas TH⁺ presentes en cada corte, obtenidos a partir 5 ratones ERp57^{Tg}. El análisis estadístico fue realizado mediante un test de ANOVA de dos vías seguido de un post-test de Bonferroni. ***: $p < 0,001$, **: $p < 0,01$, *: $p < 0,05$, ns: diferencia estadísticamente no significativa ($p > 0,05$).

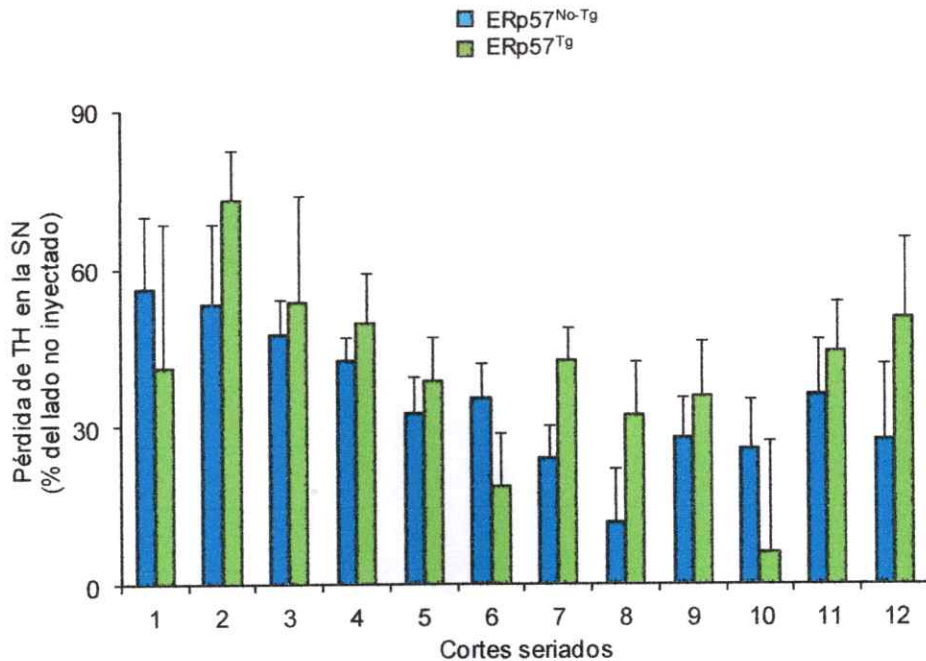


Figura 17. Cuantificación espacial del daño inducido por 6-OHDA en la SNpc de ratones ERp57^{No-Tg} y ERp57^{Tg}. Gráfico que muestra el porcentaje de pérdida de TH en la SNpc por corte relativo al lado no inyectado y corresponde al promedio con el error estándar de 8 animales ERp57^{No-Tg} y 5 animales ERp57^{Tg}. El número de cada corte del eje X está representado en la Figura 14B. El análisis estadístico fue realizado mediante un test de ANOVA de dos vías seguido de un post-test de Bonferroni. No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de pérdida de TH entre ratones ERp57^{Tg} y ERp57^{No-Tg} en ninguno de los cortes analizados.

En resumen, estos resultados nos indican que el modelo toxicológico de 6-OHDA que fue previamente establecido en nuestro laboratorio generó la neurodegeneración retrograda esperada en los animales inyectados, afectando tanto a los terminales axonales ubicados en el cuerpo estriado como a los somas dopaminérgicos localizados en la SNpc. Sin embargo, la sobreexpresión de ERp57 en el SNC no generó protección en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc frente a la neurotoxina 6-OHDA, obteniéndose una lesión de magnitud similar entre animales ERp57^{No-Tg} y ERp57^{Tg}, tanto en el cuerpo estriado (80 % de pérdida) como en la SNpc (40 % de pérdida), además se descarta algún tipo de protección localizada. Estos resultados dan cuenta que la hipótesis planteada es nula y debe ser reformulada considerando las nuevas evidencias obtenidas en el presente estudio.

6.3.2 Evaluación de cambios motores espontáneos inducidos por la inyección de 6-OHDA en el cuerpo estriado de ratones transgénicos para ERp57 en el SNC.

Cuando se produce una pérdida hemilateral masiva de los terminales axonales dopaminérgicos del cuerpo estriado ($\geq 50\%$) es posible constatar determinados síntomas motores asociados a una asimetría en la transmisión sináptica dopaminérgica. En modelos murinos es posible evaluar estos signos motores a partir de algunas pruebas motoras, una de las más utilizadas es el test del cilindro. El test del cilindro consiste en introducir al ratón en cilindro de vidrio translúcido de aproximadamente 20 cm de diámetro y cuantificar el número de toques que realiza el ratón con cada pata delantera en las paredes del cilindro (ver sección 5 Materiales y métodos). Si existe una pérdida considerable de los terminales axonales dopaminérgicos del cuerpo estriado de un hemisferio del cerebro entonces se

evidencia un uso asimétrico de las patas delanteras producto de la disminución en los niveles de dopamina y en consecuencia de la transmisión sináptica mediada por ese neurotransmisor. De este modo, un ratón hemi-lesionado tendrá menos capacidad de tocar las paredes del cilindro con la pata del lado opuesto a la lesión (contralateral). En nuestro modelo, la inyección estereotáxica de 6-OHDA se realiza en el hemisferio derecho por lo que se espera que el ratón hemi-lesionado toque en menos ocasiones con la pata izquierda.

Para complementar los resultados obtenidos en la sección 6.3.1, fue llevado a cabo el test del cilindro en animales ERp57^{No-Tg} y ERp57^{Tg} previamente a la inyección (línea base) y 7 días post-inyección de 6-OHDA (Figura 18). Como se observa en la Figura 18B la lesión ocasionada por la inyección de 6-OHDA indujo una disminución significativa en el porcentaje de toques contralaterales a las 7 días post-inyección, tanto para ratones ERp57^{No-Tg} como ERp57^{Tg} (Figura 18B), observándose alrededor de un 50% en la línea base y aproximadamente un 35% de asimetría motora 7 días después de la inyección de 6-OHDA en ambos grupos. Los resultados de esta prueba indican que no hay diferencias basales, ni tampoco inducidas, en el desempeño motor, de animales ERp57^{Tg} en comparación con aquellos ERp57^{No-Tg}, lo que se correlaciona con el análisis histológico previo.

6.4 Objetivo específico 3: Cuantificar la expresión de algunas PDIs en la SN y en el cuerpo estriado de ratones transgénicos para ERp57 en el SNC después del tratamiento con 6-OHDA.

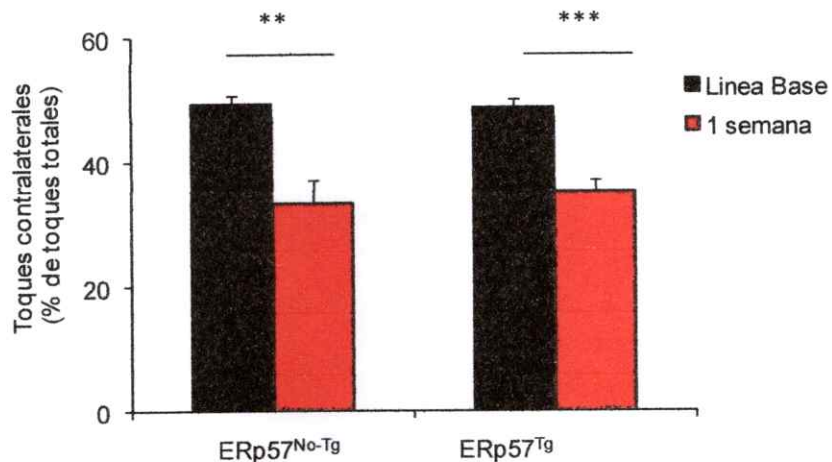
A**B**

Figura 18. Evaluación de cambios motores espontáneos inducidos por la inyección de 6-OHDA en el cuerpo estriado de ratones ERp57^{No-Tg} y ERp57^{Tg}. (A) Fotografía representativa del montaje experimental del test del cilindro. El test del cilindro permite evaluar cambios motores espontáneos provocados por asimetrías hemilaterales en los niveles de dopamina. En esta prueba se introduce al ratón en un cilindro de vidrio y se cuenta el número de toques con cada pata delantera sobre las paredes del cilindro por un tiempo aproximado de 5 min. (B) Gráfico que muestra el resultado obtenido en el test del cilindro realizado a ratones ERp57^{No-Tg} y ERp57^{Tg} de 90 días de edad. El test se realizó previamente a la inyección (Línea base) y 1 semana post inyección con 8 μ g de 6-OHDA en el cuerpo estriado del hemisferio derecho del ratón. Los valores se expresan como porcentaje del número de toques efectuados con la pata delantera izquierda (contralateral al lado lesionado inyectado) respecto al número de toques totales (realizados con ambas patas) y corresponden a los promedios y errores estándar de 10 ratones ERp57^{No-Tg} y 8 ERp57^{Tg}. El análisis estadístico fue realizado mediante un test de t de Student. ***: $p < 0,001$, **: $p < 0,01$.

6.4.1 Evaluación de los niveles de ARNm de PDI y ERp72 en la SN de ratones ERp57^{Tg} inyectados con 6-OHDA.

Con el fin de evaluar la contribución del estrés de RE y la activación de la UPR en el modelo de 6-OHDA y una posible regulación diferencial de esta vía en los animales ERp57^{Tg} se evaluaron los niveles de ARNm de algunas PDIs (PDI y ERp72) luego de la inyección de 6-OHDA. El análisis de ARNm fue realizado mediante qPCR a partir del ADNc proveniente de la SN de 3 animales ERp57^{Tg} y 3 ERp57^{No-Tg} inyectados con 6-OHDA, tal y como se describió en la sección Materiales y métodos.

Los resultados obtenidos muestran un incremento significativo en los niveles de ARNm de PDI y ERp72 en la SN (Figura 19A y 19B, respectivamente) luego de la inyección de 6-OHDA en el cuerpo estriado para el grupo de animales ERp57^{No-Tg}. Esta inducción no fue observada en el grupo de animales ERp57^{Tg} (Figura 19). Este resultado indica que existe una regulación en los niveles de mensajero de PDI y ERp72 asociada al tratamiento con 6-OHDA.

6.4.2 Evaluación de los niveles de expresión de las proteínas PDI y ERp72 en la SN y en el cuerpo estriado de ratones ERp57^{Tg} inyectados con 6-OHDA.

Con el objetivo de estudiar posibles cambios en los niveles de expresión de algunas PDIs en el cuerpo estriado y la SN de animales ERp57^{Tg} y ERp57^{No-Tg}, se analizaron los niveles de las chaperonas mediante Western blot a partir de disecciones de cuerpo estriado y SN de animales ERp57^{Tg} y ERp57^{No-Tg} de 90 días de edad inyectados con 6-OHDA en el cuerpo estriado y sacrificados 7 días después.

En primera instancia se evaluaron los niveles de expresión de la proteína ERp57 en el cuerpo estriado de los mismos animales ERp57^{No-Tg} y ERp57^{Tg} analizados

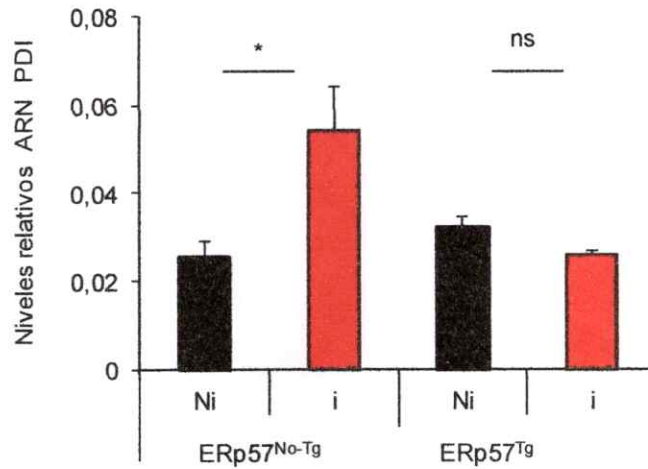
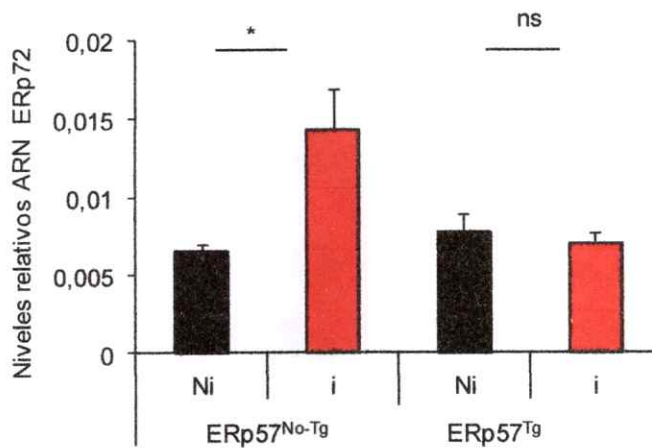
A**B**

Figura 19. Análisis de los niveles de ARNm de las foldasas PDI y ERp72 en disecciones de SN de ratones ERp57^{No-Tg} y ERp57^{Tg} inyectados con 6-OHDA. Los gráficos muestran la cuantificación de los niveles de ARNm de las foldasas PDI (A) y ERp72 (B) en disecciones de SN de ratones ERp57^{No-Tg} y ERp57^{Tg} de 90 días de edad inyectados con 8 μ g de 6-OHDA y sacrificados 1 semana más tarde. Ni: lado no inyectado, i: lado inyectado. La cuantificación se llevo a cabo mediante un PCR en tiempo real. Los valores se expresan como los promedios y los errores estándar de los niveles de ARNm de PDI y ERp72 relativos a actina obtenidos para 3 ERp57^{No-Tg} y 3 ERp57^{Tg}. El análisis estadístico fue realizado mediante el test no paramétrico Mann-Whitney. *: $p < 0,05$, ns: diferencia estadísticamente no significativa ($p > 0,05$).

por qPCR. No se observan cambios significativos en los niveles de ERp57 luego de la inyección con 6-OHDA para ninguno de los grupos de animales (Figura 20), lo que indica que los niveles de ERp57 no son regulados por la neurotoxina en el cuerpo estriado o no es posible detectar esta regulación.

En cuanto a los niveles de expresión basales (no inyectado) se observa un incremento significativo de los niveles ERp57 en los animales ERp57^{Tg} resultando ser alrededor de ocho veces más que el de animales ERp57^{No-Tg} (Figura 20C). Este resultado confirma la sobreexpresión de ERp57 en uno de los tejidos de interés en el modelo de estudio.

Los niveles proteicos de ERp72 en el cuerpo estriado de animales ERp57^{No-Tg} y ERp57^{Tg} (Figura 21), resultaron ser similares a nivel basal (Figura 21C) y no se observaron cambios significativos en los niveles de esta proteína asociados a la inyección de 6-OHDA en ratones ERp57^{No-Tg}, ni tampoco en los ERp57^{Tg} (Figura 21B). Este resultado nos indica que a nivel proteico no es posible detectar una regulación en los niveles de ERp72 en el cuerpo estriado de ratones inyectados con 6-OHDA.

Además, para confirmar la efectividad de la inyección fueron cuantificados los niveles proteicos de TH en la SN después del tratamiento con 6-OHDA. Tanto ratones ERp57^{Tg} como ERp57^{No-Tg} mostraron una pérdida significativa del marcador dopaminérgico TH en el lado inyectado con la neurotoxina en comparación con el lado no inyectado, observándose un 51% de pérdida de TH en animales ERp57^{Tg} y un 43% de pérdida en ERp57^{No-Tg} (Figura 22). Este resultado nos permite confirmar la efectividad de la lesión ocasionada por la inyección de 6-OHDA.

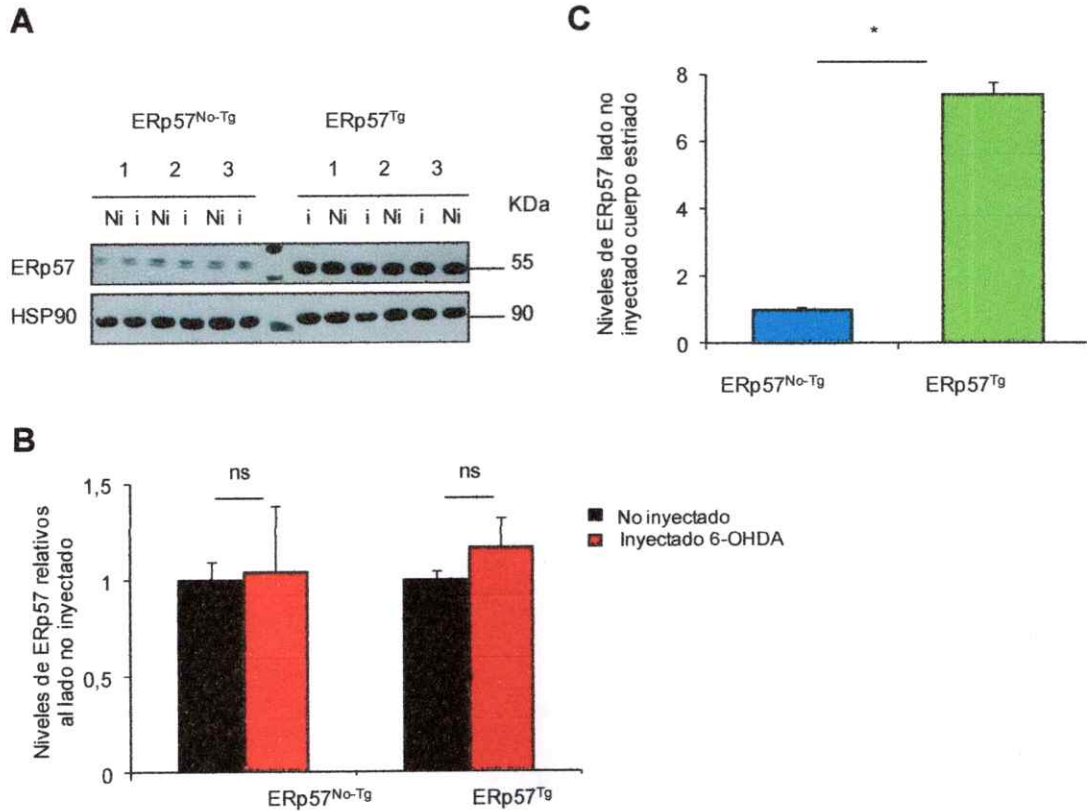


Figura 20 Análisis de expresión de la proteína ERp57 en disecciones de cuerpo estriado de ratones ERp57^{No-Tg} y ERp57^{Tg} inyectados con 6-OHDA. (A) Western blot anti-ERp57 realizado a partir de disecciones de cuerpo estriado de 3 ratones ERp57^{No-Tg} y 3 ERp57^{Tg} de 90 días de edad inyectados con 8µg de 6-OHDA en el cuerpo estriado y sacrificados 1 semana más tarde. Ni: lado no inyectado, i: lado inyectado. (B) Cuantificación densitométrica de la señal correspondiente a ERp57 en (A). Los valores corresponden al promedio y error estándar de los niveles de ERp57 normalizados por el control de carga HSP90. (C) Gráfico que muestra la comparación de los niveles basales (lado no inyectado) de la proteína ERp57 en el cuerpo estriado de animales ERp57^{No-Tg} y ERp57^{Tg} extraído de la cuantificación en (B). El análisis estadístico fue realizado mediante el test no paramétrico Mann-Whitney. *: p < 0,05, ns: diferencia estadísticamente no significativa (p > 0,05).

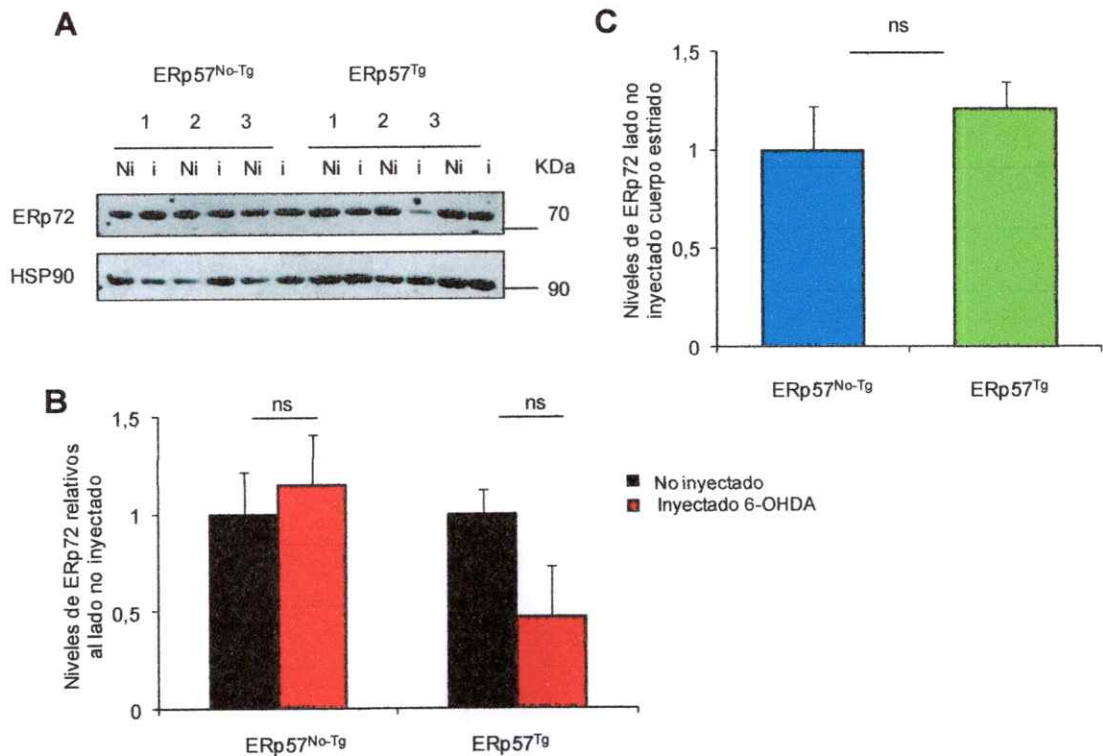


Figura 21. Análisis de expresión de la proteína ERp72 en disecciones de cuerpo estriado de ratones ERp57^{No-Tg} y ERp57^{Tg} inyectados con 6-OHDA. (A) Western blot anti-ER72 realizado a partir de disecciones de cuerpo estriado de 3 ratones ERp57^{No-Tg} y 3 ERp57^{Tg} de 90 días de edad inyectados con 8 µg de 6-OHDA en el cuerpo estriado y sacrificados 1 semana más tarde. Ni: lado no inyectado, i: lado inyectado. (B) Cuantificación densitométrica de la señal correspondiente a ERp72 en (A). Los valores corresponden al promedio y error estándar de los niveles de ERp72 normalizados por el control de carga HSP90. (C) Gráfico que muestra la comparación de los niveles basales (lado no inyectado) de la proteína ERp72 en el cuerpo estriado de animales ERp57^{No-Tg} y ERp57^{Tg} extraído de la cuantificación en (B). El análisis estadístico fue realizado mediante el test no paramétrico Mann-Whitney. ns: diferencia estadísticamente no significativa ($p > 0,05$).

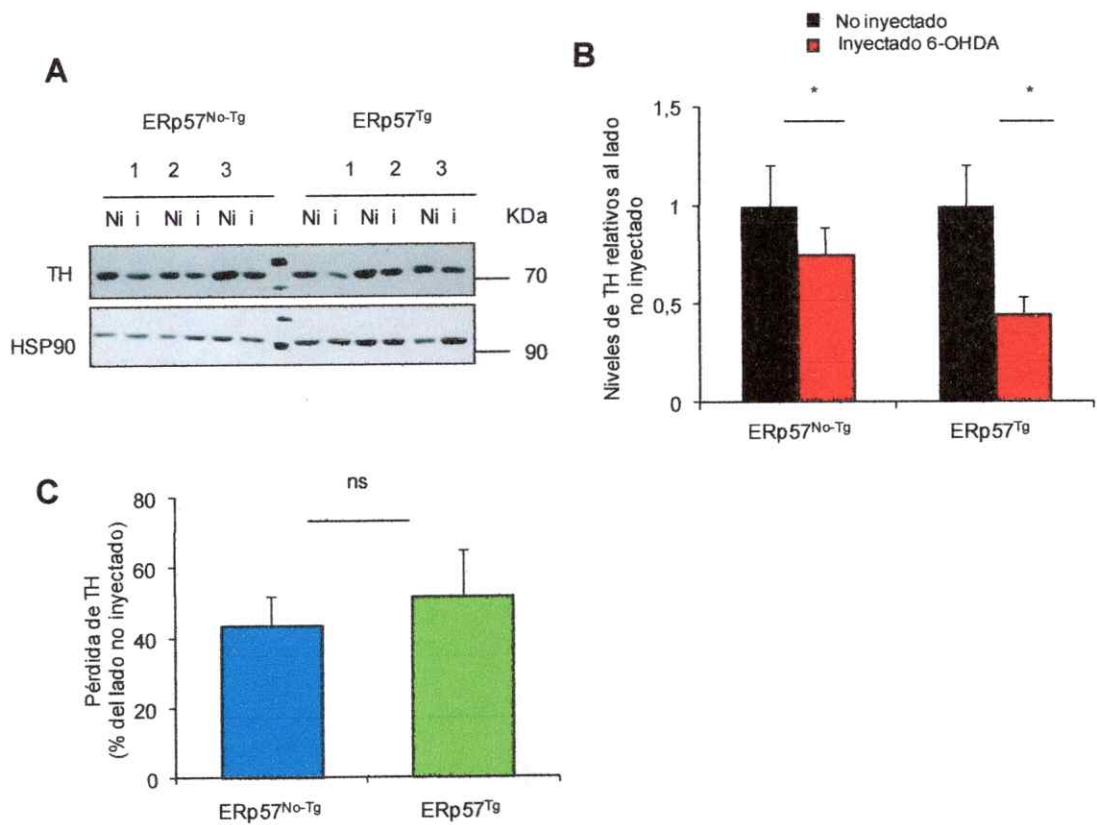


Figura 22. Análisis de expresión de la proteína TH en disecciones de SN de ratones ERp57^{No-Tg} y ERp57^{Tg} inyectados con 6-OHDA. (A) Western blot anti-TH realizado a partir de disecciones de la SN de 3 ratones ERp57^{No-Tg} y 3 ERp57^{Tg} de 90 días de edad inyectados con 8 µg de 6-OHDA en el cuerpo estriado y sacrificados 1 semana más tarde. Ni: lado no inyectado, i: lado inyectado. (B) Cuantificación densitométrica de la señal correspondiente a TH en (A). Los valores corresponden al promedio y error estándar de los niveles de TH normalizados por el control de carga HSP90. (C) Gráfico que muestra la comparación del porcentaje de pérdida del marcador dopaminérgico TH en el hemisferio inyectado con respecto al no inyectado entre animales ERp57^{No-Tg} y ERp57^{Tg}. Los valores corresponden al promedio y error estándar de los niveles relativos de proteína TH normalizados por el control de carga HSP90 mostrados del Western blot de (A). El análisis estadístico fue realizado mediante el test no paramétrico Mann-Whitney. *: $p < 0,05$, ns: diferencia estadísticamente no significativa ($p > 0,05$).

Con el fin de estudiar la posible regulación de algunas PDIs asociada a la inyección de 6-OHDA en la SN, también se analizaron los niveles de expresión de PDI en la SN de los mismos animales ERp57^{No-Tg} y ERp57^{Tg} empleados en las secciones anteriores (Figura 23). Los niveles de expresión de PDI en el hemisferio inyectado con 6-OHDA fueron muy similares a los obtenidos en el lado control no inyectado tanto en animales ERp57^{No-Tg} como ERp57^{Tg} como se observa en la Figura 23B. Este resultado muestra que a nivel proteico no es posible detectar una regulación en los niveles de PDI asociada a la inyección de 6-OHDA, como se observó a nivel de ARNm. A nivel basal, se observa una tendencia a mayores niveles de PDI en los animales ERp57^{Tg}, sin embargo los niveles de expresión son muy variables entre animales y esta diferencia no resultó ser significativa (Figura 23D).

Finalmente, fueron evaluados los niveles de expresión de la proteína ERp72 en la SN de los mismos animales ERp57^{No-Tg} y ERp57^{Tg} (Figura 23). Los niveles de expresión de ERp72 después de la inyección de 6-OHDA en estos animales no fueron modificados, sin embargo se observa una tendencia hacia menores niveles de ERp72 luego de la inyección de 6-OHDA en ambos grupos de animales, como se observa en la Figura 23C. Tampoco se observan diferencias en los niveles basales (lado no inyectado) de ERp72 al comparar entre ambos grupos (Figura 23D).

En resumen, no fue posible detectar diferencias significativas en los niveles proteicos de PDI y ERp72 en la SN, asociados a la inyección de 6-OHDA, a diferencia de lo observado a nivel de ARNm, lo que sugiere que no hay regulación de estas PDIs por esta neurotoxina a nivel proteico o que no es posible detectar estos cambios. No obstante, los niveles de expresión mostraron ser muy variables entre animales por lo que no es posible concluir al respecto.

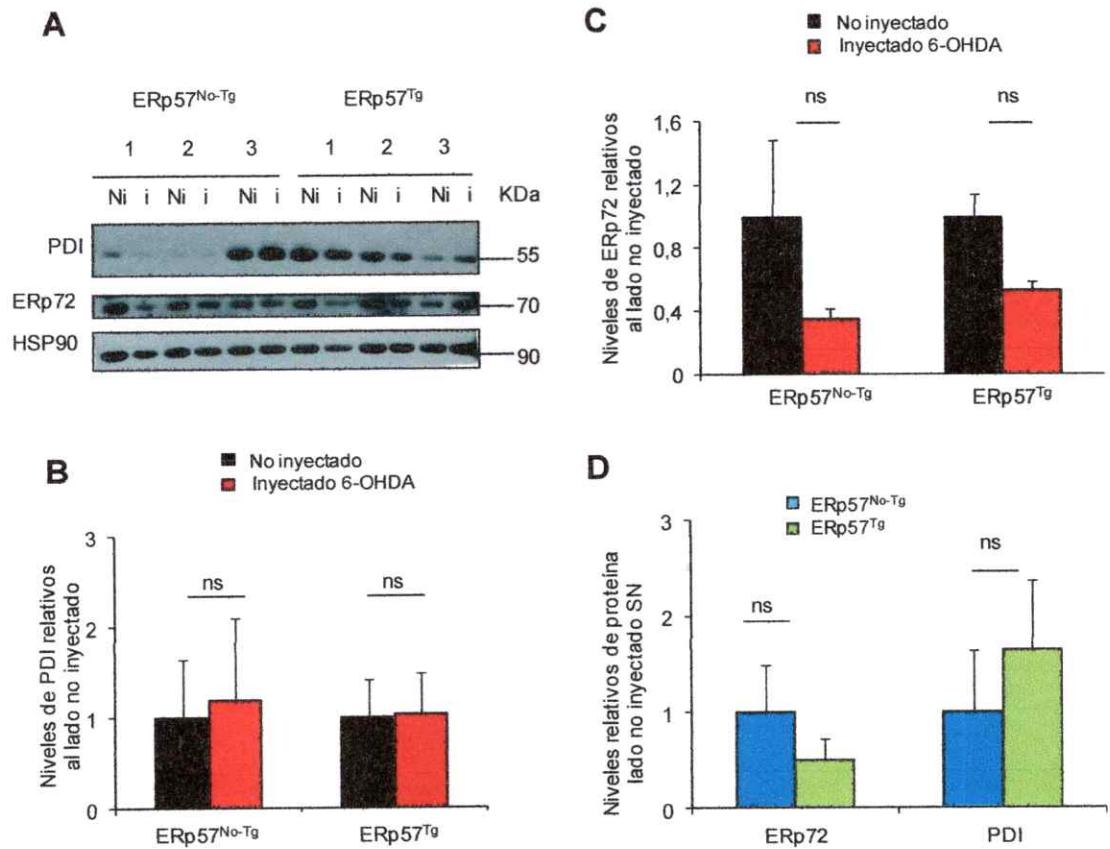


Figura 23. Análisis de expresión de las proteínas PDI y ERp72 en disecciones de SN de ratones ERp57^{No-Tg} y ERp57^{Tg} inyectados con 6-OHDA. (A) Western blot anti-PDI y anti-ERp72 realizado a partir de disecciones de la SN de 3 ratones ERp57^{No-Tg} y 3 ERp57^{Tg} de 90 días de edad inyectados con 8 μ g de 6-OHDA en el cuerpo estriado y sacrificados 1 semana más tarde. Ni: lado no inyectado, i: lado inyectado. Cuantificación densitométrica de la señal correspondiente a PDI (B) y ERp72 (C) del Western blot de (A). Los valores corresponden al promedio y error estándar de los niveles de PDI y ERp72 normalizados por el control de carga HSP90. (D) Gráfico que muestra la comparación de los niveles basales (lado no inyectado) de las proteínas PDI y ERp72 en la SN de animales ERp57^{No-Tg} con ERp57^{Tg} extraído de la cuantificación mostrada en (B) y (C). El análisis estadístico fue realizado mediante el test no paramétrico Mann-Whitney. ns: diferencia estadísticamente no significativa ($p > 0,05$).

7. DISCUSIÓN

7.1 ERp57, una proteína multifuncional.

ERp57 es una glicoproteína con actividad tior oxidoreductasa, perteneciente a la familia de las PDIs. Se encuentra principalmente localizada en el RE, donde juega un papel importante en el control de la calidad y el plegamiento de glicoproteínas recién sintetizadas, catalizando la formación de puentes disulfuro en el ciclo CNX/CRT (Ellgaard y Frickel, 2003). Sin embargo, ERp57 también puede desempeñar diversas funciones fuera del RE (Coppari y col. 2002). Por ejemplo, se ha descrito que ERp57 es capaz de unirse al ADN así como también a proteínas nucleares (Coppari y col. 2002).

Además, ERp57 puede actuar como chaperona molecular previniendo la formación de agregados proteicos (Ferrari y Soling, 1999; Grubb y col., 2012; Maattanen y col., 2010; Turano y col., 2002). Adicionalmente, ERp57 tiene un papel crítico en el desarrollo embrionario, pues su deficiencia en ratones "knock-out" resulta letal en etapa embrionaria (Coe y col. 2010). Algunos estudios sugieren que ERp57 podría tener un rol importante en la transducción de señales y regulación génica, ya que se ha observado que se asocia al activador de la transcripción 3 (STAT3) y regula la señalización mediada por este factor (Coe y col. 2010). La función de ERp57 en el sistema inmune ha sido ampliamente estudiada debido a que está involucrada en el ensamblaje de la cadena pesada del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC I) (Garbi y col. 2006).

En el contexto patológico, ERp57 se ha considerado como un posible biomarcador de la progresión de diversas enfermedades tales como; cáncer, hepatitis,

ELA, EA y desordenes asociados a priones (Coe y col. 2010). Además, existe numerosa evidencia que da cuenta del posible rol neuroprotector de la proteína ERp57 en enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de CJ, EA y ELA (Hetz y col. 2005; Erickson et al., 2005; Atkin y col. 2006; Massignan y col. 2007). Es por ello que esta proteína resulta un blanco atractivo para el desarrollo de nuevos tratamientos y el diagnóstico temprano de varias enfermedades humanas (Coe y col. 2010).

En este seminario de título se estudió el posible efecto de la sobreexpresión de ERp57 en la sobrevivencia de las neuronas dopaminérgicas de la SN en un modelo toxicológico animal de la EP. Para ello, fue utilizado un modelo farmacológico de 6-OHDA en ratones transgénicos para ERp57. Con este estudio se pretendió evaluar la posible contribución terapéutica de ERp57 en un modelo de la EP *in vivo*.

7.2 Modelo de ratones transgénicos para ERp57 en el SNC.

Aun cuando la proteína ERp57 ha sido relacionada con numerosas enfermedades neurodegenerativas (Atkin y col. 2006; Hetz y col. 2005; Massignan y col. 2007; Erickson y col. 2005; Hoffstrom y col. 2010; Hetz y col. 2003; Hetz y col. 2005), su rol en el SNC y su contribución en patologías como la EP aún permanece sin dilucidar.

En el presente seminario de título fue utilizado un ratón transgénico que expresa el gen de *Erp57* humano bajo el control génico del promotor neuronal de PrP, para evaluar el posible efecto neuroprotector de ERp57 en un modelo toxicológico de la EP.

Un aspecto a considerar para validar los resultados que fueron obtenidos en este seminario de título es la reproducibilidad y robustez de nuestro modelo en estudio.

Para ello resulta de importancia la caracterización exhaustiva de éste tanto a nivel fenotípico como molecular. Previamente, en este modelo fue verificada la expresión de la proteína ERp57 en tejidos nerviosos tales como corteza, cerebelo y médula espinal (Andreu, 2012, no publicado), mientras que en este seminario de título fue comprobado que los ratones ERp57^{Tg} expresan la proteína ERp57 humana en los tejidos de la SN y el cuerpo estriado, correspondientes a las áreas del cerebro que albergan las neuronas dopaminérgicas que sufren neurodegeneración en la EP.

El análisis de peso y actividad motora no mostró diferencias aparentes entre ratones ERp57^{Tg} y ERp57^{No-Tg} (Andreu, 2012, no publicado). Estos resultados dan cuenta que la expresión de la proteína ERp57 humana en el sistema nervioso no altera drásticamente parámetros fisiológicos. Sin embargo, este estudio corresponde a una caracterización parcial del fenotipo y no debemos descartar la posibilidad de que estos ratones presenten diferencias en el desempeño de otro tipo de pruebas motoras y/o cognitivas que den cuenta del rol funcional de esta proteína *in vivo*.

Una limitante del modelo utilizado es que se desconocen las características fisicoquímicas y funcionales de la proteína que se está sobreexpresando a partir del transgén. El constructo utilizado para generar estos ratones ha demostrado ser funcional (Borchelt y col. 1996), sin embargo resta estudiar si la proteína ERp57 humana fusionada al tag flag en su dominio c-terminal, conserva las propiedades estructurales de la proteína nativa y si esta proteína fusión humana mantiene su funcionalidad en el contexto murino. Es por ello que en nuestro laboratorio se están realizando estudios, que nos darán cuenta de la funcionalidad de la proteína *in vivo*. Mediante la inyección intraperitoneal de tunicamicina, un compuesto que produce estrés de RE a nivel sistémico, específicamente pretendemos evaluar si la magnitud

del estrés de RE generado a partir de este fármaco es menor en animales ERp57^{Tg} en comparación con ERp57^{No-Tg} en tejidos nerviosos tales como la SN, el cuerpo estriado, médula, corteza y cerebelo. Para analizar la magnitud del estrés de RE generado se harán ensayos de procesamiento del ARNm de *Xbp1*, como indicador de activación de la UPR vía IRE1 α , y adicionalmente se analizarán los niveles de ARNm de marcadores clásicos de estrés de RE como ATF4, BiP, CHOP y de chaperonas que se activan en estas condiciones como ERp57, ERp72 y PDI.

Un antecedente que permite constatar la funcionalidad de la proteína ERp57 humana sobreexpresada en este modelo de ratón lo constituye estudios realizados en nuestro laboratorio en colaboración con el laboratorio del Dr. Felipe Court (Oñate 2012, no publicado), donde se describe que la expresión de ERp57 en los animales transgénicos favorece la recuperación motora e incrementa la remoción de mielina y la regeneración axonal luego de un daño inducido en nervio periférico, desconociéndose aún el mecanismo por el cual ocurre dicho fenómeno.

7.3. Efecto funcional de ERp57 en la sobrevivencia de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc.

Considerando los antecedentes de la posible capacidad neuroprotectora de ERp57 y la previa caracterización de un modelo de ratón transgénico para ERp57 en el SNC, fue evaluado el efecto de la sobreexpresión de ERp57 en un modelo farmacológico de la EP, como una aproximación *in vivo* para la identificación de un posible blanco terapéutico de la EP. No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de pérdida de neuronas dopaminérgicas de la SNpc entre animales ERp57^{Tg} y ERp57^{No-Tg}, ni tampoco en las pruebas motoras realizadas después de la inyección de 6-OHDA. Dada la alta reproducibilidad del modelo toxicológico empleado, los resultados que

fueron obtenidos en este seminario de título proporcionan evidencia para rechazar la hipótesis de trabajo, por lo que podemos postular que la sobreexpresión de la proteína ERp57 en el SNC no protege frente a la neurodegeneración gatillada por la neurotoxina 6-OHDA en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc, al menos en este modelo murino toxicológico. Queda abierta la búsqueda de nuevos modelos de EP para complementar este estudio y el posible impacto de esta proteína en otros procesos neurodegenerativos.

Con el fin de complementar este estudio, deberían realizarse pruebas funcionales de la proteína ERp57-flag expresada en estos ratones, pues existe la posibilidad de que el tag haya modificado en alguna medida su actividad catalítica o interfiera en la interacción con otras proteínas. Por otro lado, es posible que el transgén por ser de procedencia humana se traduzca en una proteína menos eficiente en un contexto murino.

Un aspecto importante que no fue abordado con anterioridad, es el hecho que la caracterización del modelo de ratón transgénico para ERp57 en el SNC, así como también la implementación del modelo toxicológico de 6-OHDA, fueron realizadas en ratones machos, sin embargo para este trabajo se utilizaron indistintamente machos y hembras de ambos genotipos. Esto último se debió a la limitante del número de animales disponibles que cumplieran con un mínimo de 90 días para llevar a cabo la inyección estereotáxica. No obstante, los resultados que fueron reportados aquí para los animales no transgénicos muestran valores similares a los obtenidos previamente para el análisis histológico de ratones WT machos de tres meses de edad inyectados con 6-OHDA (Valdez 2013, no publicado), donde, se observó poca variabilidad entre animales. Esto nos permite descartar un efecto de género-dependencia en este modelo

toxicológico. Así mismo, los niveles de expresión de la proteína ERp57 en la SN y el cuerpo estriado también resultaron similares entre animales de distintos géneros para cada grupo, no obstante sería más concluyente hacer una comparación por género.

Respecto a los análisis del desempeño motor realizado mediante la prueba del cilindro fue posible también descartar problemas motores basales en los animales ERp57^{Tg}, pues el porcentaje de toques contralaterales en la línea base resultó cercano al 50%, lo que da cuenta de una capacidad equivalente de utilizar ambas patas delanteras. Además, por inspección visual es posible constatar que los animales transgénicos presentan igual capacidad de movimiento que animales no transgénicos. Este estudio amplía la caracterización del modelo de ratón transgénico para ERp57 en el SNC y permite que pueda ser utilizado en la evaluación de daños motores inducidos, ya sea, en este modelo toxicológico u otros modelos de enfermedades neurodegenerativas.

La evidencia actual acerca del vínculo entre el estrés oxidativo y la EP podría ser una posible explicación de los resultados obtenidos. Estudios recientes demostraron que la depleción de glutatión (GSH), el tiol de bajo peso molecular más abundante y el mayor antioxidante encontrado en las células, es uno de los eventos bioquímicos que ocurre más tempranamente en la EP (Jenner y col. 1993; Perry y col.1986). A partir de esta evidencia, el concepto de estrés oxidativo ha sido asociado a la señalización redox, un complejo proceso, basado en tioles que regulan no sólo el daño oxidativo sino también la activación de mecanismos enzimáticos de señalización. El GSH y los sistemas antioxidantes basados en GSH son reguladores importantes de la neurodegeneración asociada a la EP (revisado en García y col.2012). Adicionalmente, se ha demostrado que los sistemas redox basados en tioles, tales como,

peroxiredoxinas, tioredoxinas, metalotioneinas, metioninas sulfoxido reductasas y factores de trascrición así como también modificaciones oxidativas en grupos tioles de proteínas (cisteínas), que incluyen hidroxilaciones, glutatiónilaciones y nitrosilaciones, son capaces de regular la pérdida de las neuronas dopaminérgicas (Alam y col.1997; Danielson y col. 2008.). Algunos estudios han demostrado que sistemas antioxidantes basados en GSH ejercen un efecto protector frente a la muerte de las neuronas dopaminérgicas inducida en modelos toxicológicos animales de la EP, por ejemplo; ratones deficientes en la glutatión peroxidasa 1 (GPX1) exhiben un incremento en la sensibilidad a la neurotoxina MPTP (Klivenyi y col. 2000), mientras que la sobreexpresión de esta misma proteína protege frente a la toxicidad inducida por MPP⁺ y 6-OHDA *in vitro* e *in vivo*. También se ha descrito que la administración oral del antioxidante N-acetil-l-cisteína (NAC), la cual actúa como dador de cisteínas para la síntesis de GSH, atenúa la pérdida de células dopaminérgicas inducida por MPTP, 6-OHDA y la sobreexpresión de α -sin *in vivo* (revisado en Garcia y col. 2012).

Por otro lado, el estado redox de PDI y otros miembros de la familia de las PDIs es posiblemente regulado por glutatión ya sea en su estado reducido (GSH) o en su estado oxidado (GSSG), así como también por otras oxidasas, reductasas y/o sustratos (Hatahet y Ruddock, 2009).

Considerando estas evidencias, es posible especular que alteraciones en estado redox de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc de animales inyectados con 6-OHDA, resulte en una pérdida funcional de la proteína ERp57 por disminución en los niveles de GSH u otra molécula que regule el estado oxidativo y por ende la actividad catalítica oxido-reductasa de ERp57. Un estudio realizado en corazón de pacientes diabéticos muestra que alteraciones en el estado redox conlleva a la pérdida de la

cardioprotección otorgada por la proteína PDI (Toldo y col. 2011). Es posible que el nivel de estrés oxidativo generado por la 6-OHDA no logre ser compensado con la sobreexpresión de ERp57 en nuestro modelo de ratón transgénico. Sería necesario realizar estudios con dosis de 6-OHDA menores a las utilizadas en este estudio para descartar esta hipótesis. Si bien es cierto, 7 días es el tiempo en el cual se alcanza la mayor pérdida de neuronas dopaminérgicas en este modelo toxicológico, es posible que el efecto de la chaperona ERp57 ocurra en etapas tempranas de la muerte neuronal, por lo cual, resulta de gran interés realizar una cinética de neurotoxicidad de 6-OHDA en estos animales transgénicos.

Otra posible razón que explica por qué la sobreexpresión de ERp57 no genera la protección esperada, es que los niveles de estrés oxidativo generado por el modelo de 6-OHDA sean tales que esta proteína sufra inactivación por S-nitrosilación y que la sobreexpresión de ERp57 no sea suficiente para compensar el daño oxidativo. Esta idea es apoyada por un estudio en el cual se encontró que la PDI, el miembro más cercano a ERp57, es S-nitrosilada en tejido *post mortem* de pacientes con la EP y modelos toxicológicos de la enfermedad, lo cual inhibe su actividad enzimática conduciendo a la acumulación de proteínas mal plegadas y la concomitante activación de la UPR (Uehara, Nakamura y col. 2006). Aún queda por determinar si ERp57 también es nitrosilada bajo estas mismas condiciones.

Desde otro punto de vista, la sobreexpresión de ERp57 en el SNC desde el desarrollo del animal podría causar cambios en los niveles de expresión de otras proteínas. Por ejemplo, otras PDIs, chaperonas de plegamiento o proteínas que controlan el estrés oxidativo podrían estar siendo reguladas de manera negativa. Por lo que el efecto neuroprotector de ERp57 estaría siendo enmascarado por la pérdida de

funcionalidad neta de otras chaperonas. Con el fin de evitar estos cambios compensatorios resulta interesante evaluar el efecto de la sobreexpresión local de ERp57 en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc en ratones adultos usando inyección de virus recombinantes.

7.4. Estrés de RE y activación de la UPR en ratones transgénicos para ERp57 inyectados con 6-OHDA.

Existe gran controversia acerca de la contribución del estrés de RE a 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* (Wang y Takahashi 2007; Fouillet y col. 2012). Sin embargo, estudios realizados en nuestro laboratorio mostraron que en nuestro modelo toxicológico no hay activación de la UPR vía PERK e IRE1 α . No obstante, debido a la multifuncionalidad de ERp57 y la regulación positiva observada *in vitro* e *in vivo* por 6-OHDA y por otros modelos de enfermedades neurodegenerativas, no resulta extraño que esta proteína sea activada por otras cascadas de señalización y que pueda mediar respuestas adaptativas en otro tipo de mecanismos implicados en la neurodegeneración gatillada por esta neurotoxina, como por ejemplo estrés oxidativo, disfunción mitocondrial o cambios inflamatorios.

Con el objetivo de evaluar el estrés de RE, la activación de la UPR y/o la regulación de otras PDIs en el modelo de ratón transgénico fueron analizados los niveles de expresión PDI y ERp72 en la SN de animales inyectados con 6-OHDA, observándose un aumento significativo de los niveles de ARNm de *pdi* y *erp72* en los animales ERp57^{No-Tg} 7 días después de la inyección de 6-OHDA, sin embargo en

ratones ERp57^{Tg} no se observó dicho incremento. Estos resultados sugieren que la muerte neuronal gatillada por 6-OHDA induce estrés de RE crónico y que la sobreexpresión de ERp57 podría disminuir los niveles de estrés.

La regulación positiva en los niveles de ARNm de *pdi* y *erp72* observada en animales no transgénicos luego de la inyección de 6-OHDA no se corresponde con los resultados obtenidos a nivel proteico, puesto que no se observaron cambios significativos en los niveles de proteína asociados a la inyección de 6-OHDA para ninguna de las PDIs evaluadas. Estas chaperonas presentan niveles altísimos de expresión respecto a otras proteínas del proteoma, además de tener una vida media alta, por lo que cambios medianos en los niveles de ARNm podrían ser insignificantes en términos de la expresión relativa de proteína en estado estacionario.

Debido a la gran variabilidad observada en los niveles de las proteínas PDI y ERp72 en la SN dentro de cada grupo experimental resulta necesario incrementar el número de animales en el análisis para sacar conclusiones más robustas. Aún cuando los porcentajes similares de pérdida de TH en la SN que fueron obtenidos mediante análisis por Western blot concuerdan con lo obtenido por histología, hay que tener en cuenta que la disección de tejido es realizada de manera manual por lo que pequeñas variaciones en la posición del cerebro en el molde coronal o en el tamaño del cerebro del ratón pueden causar un desplazamiento en el eje anteroposterior. De este modo, es posible que se haya extraído una zona muy anterior o posterior no representativa. Sería óptimo utilizar técnicas más precisas como inmunofluorescencia o inmunohistoquímica para evaluar los niveles de proteína de manera restringida en la zona de la SN y una población particular de neuronas, las neuronas dopaminérgicas.

Finalmente, es importante destacar lo compleja que es la red de la familia de las PDIs, pues la modificación en los niveles de expresión de algunos de los componentes de esta familia puede no ser suficiente para observar efectos funcionales. Probablemente existan efectos compensatorios a partir de los cuales se regulen los niveles de expresión de los otros miembros de la familia, que presentan actividades similares y/o sustratos comunes.

8. CONCLUSIONES.

- Los animales ERp57^{Tg} sobreexpresan la proteína ERp57 en la SN y el cuerpo estriado, siendo la magnitud de esta sobreexpresión aproximadamente 4 veces la expresión de animales ERp57^{No-Tg} para la SN y aproximadamente 8 veces para el cuerpo estriado.
- La sobreexpresión de ERp57 en el SNC no ejerce protección frente a la neurodegeneración inducida por la neurotoxina 6-OHDA en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc, al menos en las condiciones analizadas.
- La inyección de 6-OHDA en el cuerpo estriado induce un aumento en los niveles de ARNm de PDI y ERp72 en la SN de animales ERp57^{No-Tg}, sin embargo, no se observan cambios en la expresión estas foldasas a nivel proteico.
- El modelo toxicológico de 6-OHDA utilizado en este trabajo resulta una herramienta útil y altamente reproducible para evaluar el efecto de la manipulación genética de alguna proteína blanco en la susceptibilidad degenerativa de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc.

9. PROYECCIONES.

Este trabajo contribuye a la exploración actual de posibles blancos terapéuticos para la EP, pues nos proporciona evidencia *in vivo* del efecto funcional de la sobreexpresión de una proteína en un modelo toxicológico animal que recapitula la neurodegeneración observada en pacientes con la EP. Este estudio podría complementarse utilizando otros modelos genéticos de la EP como la expresión de α -sin en ratones ERp57^{Tg}

En base a los resultados obtenidos en este trabajo, resulta interesante evaluar el efecto de la sobreexpresión local de ERp57 en neuronas dopaminérgicas adultas con el fin de descartar posibles cambios compensatorios en los niveles de otras proteínas durante el desarrollo del animal. Para ello sería interesante utilizar como herramienta virus adeno-asociados que permitan la sobreexpresión ERp57 en la SN de ratones WT.

Por otro lado, el estudio de la posible S-nitrosilación de ERp57 en un modelo animal de la EP resulta de gran interés debido a la evidencia que muestra la presencia de la forma S-nitrosilada de PDI en tejido *post mortem* de pacientes con la EP, sugiriendo que la pérdida de actividad de esta foldasa sería un posible contribuyente a la neurodegeneración observada (Uehara, Nakamura y col. 2006). Se cree que el mecanismo de acción principal a través del cual la 6-OHDA causa neurotoxicidad en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc es a través de la generación de ROS y RNS por lo que el uso del modelo de 6-OHDA en ratones para evaluar S-nitrosilación de ERp57 en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc se vislumbra como una herramienta útil y reproducible para dilucidar más acerca de los mecanismos

moleculares asociados a la etiología de la EP.

10. REFERENCIAS.

Acosta-Alvear, D., Zhou, Y., Blais, A., Tsikitis, M., Lents, N.H., Arias, C., Lennon, C.J., Kluger, Y., Dynlacht, B.(2007). XBP1 controls diverse cell type- and condition-specific transcriptional regulatory networks. *Mol. Cell* 27, 53–66.

Alam, ZI., Danie,I S., Lees, A., Marsden, D., Jenner, P., Halliwell, B. (1997). A generalized increase in protein carbonyls in the brain in Parkinson's but not incidental Lewy body disease. *J Neurochem* 69: 1326–1329.

Alam, ZI., Jenner, A., Daniel, S., Lees, A., Cairns, N., Marsden, C., Jenner, P., Halliwell, B.(1997). Oxidative DNA damage in the parkinsonian brain: an apparent selective increase in 8-hydroxyguanine levels in substantia nigra. *J Neurochem* 69:1196–1203.

Andreu, C. (2012). Caracterización de modelos de pérdida y ganancia de función para la foldasa ERp57 en el sistema nervioso central. Seminario de Título para optar al título de Ingeniero en Biotecnología Molecular. Chile: Facultad de Ciencias, Universidad de Chile

Andreu, C. I., Woehlbier, U., Torres, M., Hetz, C. (2012). Protein disulfide isomerases in neurodegeneration: from disease mechanisms to biomedical applications. *FEBS Lett.* 586, 2826 - 2834.

Akazawa, Y. O., Y. Saito, y col. (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): 410-21.

Alvarez-Fischer, D., C. Henze, C. Strenzke, J. Westrich, B. Ferger, G. U. Hoglinger, W. H. Oertel and A. Hartmann.(2008). Characterization of the striatal 6-OHDA model of Parkinson's disease in wild type and alpha-synuclein-deleted mice.*Exp Neurol* 210(1): 182-193.

Ameri, K., A. L. Harris.(2008). Activating transcription factor 4. *Int J Biochem Cell Biol* 40(1): 14-21.

Appenzeller-Herzog, C., Ellgaard, L. (2008). The human PDI family: versatility packed into a single fold. *Biochim Biophys Acta* 1783, 535-548.

Atkin, J. D., Farg, M. A., Turner, B. J., Tomas, D., Lysaght, J. A., Nunan, J., Rembach,

A., Nagley, P., Beart, P. M., Cheema, S. S., Horne, M. K. (2006). Induction of the unfolded protein response in familial amyotrophic lateral sclerosis and association of protein-disulfide isomerase with superoxide dismutase 1. *J Biol Chem* 281, 30152-30165.

Atkin, J. D., Farg, M. A., Walker, A. K., McLean, C., Tomas, D., and Horne, M. K. (2008). Endoplasmic reticulum stress and induction of the unfolded protein response in human sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* 30, 400-407.

Belal, C., Ameli, NJ., El Kommos, A., Bezalel, S., Al'Khafaji, AM., Mughal, MR., Mattson, MP., Kyriazis, GA., Tyrberg, B., Chan SL. (2012). The homocysteine-inducible endoplasmic reticulum (ER) stress protein Herp counteracts mutant alpha-synuclein-induced ER stress via the homeostatic regulation of ER-resident calcium release channel proteins. *Hum Mol Genet* 21(5): 963-977.

Bellucci, A., Navarria, L., Zaltieri, M., Falarti, E., Bodei, S., Sigala, S., Battistin, L., Spillantini, M., Missale, C., Spano, P. (2011). Induction of the unfolded protein response by alpha-synuclein in experimental models of Parkinson's disease. *J Neurochem* 116(4): 588-605.

Blesa, J., Phani, S., Jackson-Lewis, V., Przedborski, S. (2012). Classic and new animal models of Parkinson's disease. *J Biomed Biotechnol* 2012: 845618.

Blum, D., Torch, S., Lambeng, N., Nissou, M., Benabid, AL., Sadoul, R., Verna, JM. (2001). Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 65(2): 135-72.

Borchelt, D., Davis, R., Fischer, J., Lee, M., Slunt, M., Ratovitsky, H., Regard, T., Copeland, J., Jenkins, N., Sisodia, A., Price, D. (1996). A vector for expressing foreign genes in the brains and hearts of transgenic mice. *Genet Anal* 13, 159-163.

Bouman, L., Schlierf, A., Lutz, AK., Shan, J., Deinlein, A., Kast, J., Galehdar, Z., Palmisano, V., Patenge, N., Berg, D., Gasser, T., Augustin, R., Trümbach, D., Irrcher, I., Park, D.S, Wurst W, Kilberg MS, Tatzelt J, Winklhofer KF.(2010). Parkin is transcriptionally regulated by ATF4:evidence for an interconnection between mitochondrial stress and ER stress. *Cell Death Differ.* 18, 769–782.

Bove, J. y Perier, C. (2012). Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. *J Neurosci* 211: 51-76.

Boyce, M., Bryant, K., Jousse, C., Long, K., Harding, H., Scheuner, D., Kaufman, R., Ma, D., Coen, D., Ron, D., Yuan, J. (2005). A selective inhibitor of eIF2alpha dephosphorylation protects cells from ER stress. *Science* 307(5711): 935-939.

- Chung CY, Khurana V, Auluck PK, y col. (2013). Identification and rescue of α -synuclein toxicity in Parkinson patient-derived neurons. *Science* 342(6161):983-7.
- Coe, H. y Michalak, M. (2010). ERp57, a multifunctional endoplasmic reticulum resident oxidoreductase. *Int J Biochem Cell Biol* 42, 796-799.
- Colla, E., Coune, P., Liu, Y., Pletnikova, O., Troncoso, JC., Iwatsubo, T., Schneider, BL., Lee, MK. (2012). Endoplasmic reticulum stress is important for the manifestations of alpha-synucleinopathy in vivo. *J Neurosci* 32(10): 3306-3320.
- Colla, E., Jensen, PH., Pletnikova, O., Troncoso, JC., Glabe, C., Lee, MK. (2012). Accumulation of toxic alpha-synuclein oligomer within endoplasmic reticulum occurs in alpha-synucleinopathy in vivo. *J Neurosci* 32(10): 3301-3305.
- Conn, KJ., Gao, W., McKee, A., Lan, MS., Ullman, MD., Eisenhauer, PB., Fine, RE., Wells, JM. (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, AA., Gitler, AD., Cashikar, A., Haynes, CM., Hill, KJ., Bhullar, B., Liu, K., Xu, K., Strathearn, KE., Liu, F., Cao, S., Caldwell, KA., Caldwell, GA., Marsischky, G., Kolodner, RD., Labaer, J., Rochet, JC., Bonini, NM., Lindquist, S. (2006). Alpha-synuclein blocks ER-Golgi traffic and Rab1 rescues neuron loss in Parkinson's models. *Science* 313(5785): 324-328.
- Coppari, S., Altieri, F., Ferraro, A., Chichiarelli, S., Eufemi, M., Turano, C. (2002). Nuclear localization and DNA interaction of protein disulfide isomerase ERp57 in mammalian cells. *J Cell Biochem* 85, 325-333.
- Danielson, SR., Andersen, JK. Oxidative and nitrate protein modifications in Parkinson's disease. *Free Radic Biol Med* 44: 1787-1794, 2008.
- Dauer, W., Przedborski, S. (2003). Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 39(6): 889-909.
- De Lau, L., Breteler, M. (2006). Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 5(6): 525-535.
- Denisov, A., Maattanen, P., Dabrowski, C., Kozlov, G., Thomas, D. Y., Gehring, K. (2009). Solution structure of the bb' domains of human protein disulfide isomerase. *Febs J* 276, 1440-1449.
- Dexter DT, Carter CJ, Wells FR, Javoy-Agid F, Agid Y, Lees A, Jenner P, Marsden CD. (1989). Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease. *J Neurochem* 52(2):381-9.

Dorner, A. J., Wasley, L. C., Raney, P., Haugejorden, S., Green, M., Kaufman, R. (1990). The stress response in Chinese hamster ovary cells. Regulation of ERp72 and protein disulfide isomerase expression and secretion. *J Biol Chem* 265, 22029-22034.

Duda, JE., Giasson, BI., Chen, Q., Gur, TL., Hurtig, HI., Stern, MB., Gollomp, SM., Ischiropoulos, H., Lee, VM., Trojanowski, JQ. (2000). Widespread nitration of pathological inclusions in neurodegenerative synucleinopathies. *Am J Pathol* 157(5):1439- 445.

Egawa, N., Yamamoto, K., Inoue, H., Hikawa, R., Nishi, K., Mori, K., Takahashi, R. (2011). The endoplasmic reticulum stress sensor, ATF6 α , protects against neurotoxin-induced dopaminergic neuronal death. *J Biol Chem.*; 286(10):7947-57

Ellgaard, L., Frickel, E. M. (2003). Calnexin, calreticulin, and ERp57: teammates in glycoprotein folding. *Cell Biochem Biophys* 39, 223-247.

Ellgaard, L., Ruddock, L. W. (2005). The human protein disulphide isomerase family: substrate interactions and functional properties. *EMBO Rep* 6, 28-32.

Erickson, R., Dunning, L., Olson, D., Cohen, S., Davis, A., Wood, W., Kratzke, R., Holtzman, J. (2005). In cerebrospinal fluid ER chaperones ERp57 and calreticulin bind beta-amyloid. *Biochem Biophys Res Commun* 332, 50-57.

Feige, M., Hendershot, L. (2011). Disulfide bonds in ER protein folding and homeostasis. *Curr Opin Cell Biol* 23, 167-175.

Ferrari, D., Soling, H. (1999). The protein disulphide-isomerase family: unravelling a string of folds. *Biochem J* 339 (Pt 1), 1-10.

Fornace, AJ Jr., Alamo, I Jr., Hollander, MC. (1988). DNA damage-inducible transcripts in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 85(23): 8800-4.

Fouillet, A., Levet, C., Virgone, A., Robin, M., Dourlen, P., Rieusset, J., Belaidi, E., Ovize, M., Touret, M., Nataf, S., Mollereau, B. (2012). ER stress inhibits neuronal death by promoting autophagy. *Autophagy* 8, 915-926.

Garcia-Garcia, A., Zavala-Flores, L., Rodriguez-Rocha, H., Franco, R. (2012). Thiol-redox signaling, dopaminergic cell death, and Parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal.* 17(12):1764-84.

Garbi, N., Tanaka, S., Momburg, F., Hammerling, G. J. (2006). Impaired assembly of the major histocompatibility complex class I peptide-loading complex in mice deficient in the oxidoreductase ERp57. *Nat Immunol* 7, 93-102.

Giasson, BI., Duda, JE., Quinn, SM., Zhang, B., Trojanowski, JQ., Lee, VM. (2002). Neuronal alpha-synucleinopathy with severe movement disorder in mice expressing

A53T human alpha-synuclein. *Neuron* 34(4): 521-533.

Gorbatyuk, MS., Shabashvili, A., Chen, W., Meyers, C., Sullivan, LF., Salganik, M., Lin, JH., Lewin, AS., Muzyczka, N., Gorbatyuk, OS.(2012). Glucose Regulated Protein 78 Diminishes alpha-Synuclein Neurotoxicity in a Rat Model of Parkinson Disease. *Mol Ther.* (7):1327-37.

Grealish, S., Mattsson, B., Draxler, P., Björklund, A. (2010). Characterisation of behavioural and neurodegenerative changes induced by intranigral 6-hydroxydopamine lesions in a mouse model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci* 31(12): 2266-2278.

Grubb, S., Guo, L., Fisher, E., Brodsky, J. (2012). Protein disulfide isomerases contribute differentially to the endoplasmic reticulum-associated degradation of apolipoprotein B and other substrates. *Mol Biol Cell* 23, 520-532.

Harding, H., 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.

Harding, HP, Zhang, Y., Zeng, H., Novoa, I., Lu, PD., Calton, M., Sadri, N., Yun, C., Popko, B., Paules, R., Stojdl, D., Bell, JC., Hettmann T, Leiden JM, Ron D. (2003). An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell* 11(3): 619-633.

Hashida, K., Kitao, Y., Sudo, H., Awa, Y., Maeda, S., Mori, K., Takahashi, R., Inuma, M., Hori, O. (2012). ATF6alpha promotes astroglial activation and neuronal survival in a chronic mouse model of Parkinson's disease. *PLoS One* 7(10): e47950.

Hatahet, F., Ruddock, L. (2009). Protein disulfide isomerase: a critical evaluation of its function in disulfide bond formation. *Antioxid Redox Signal* 11, 2807-2850.

Haze, K., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T., Mori, K.(1999). Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell* 10(11): 3787-3799.

Hensen C, Li JY. (2012). Beyond α -synuclein transfer: pathology propagation in Parkinson's disease. *Trends Mol Med.*18(5):248-55

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., Russelakis-Carneiro, M., Maundrell, K., Castilla, J., Soto, C.(2003). Caspase-12 and endoplasmic reticulum stress mediate neurotoxicity of pathological prion protein. *EMBO J* 22, 5435-5445.

Hetz, C., Russelakis-Carneiro, M., Walchli, S., Carboni, S., Vial-Knecht, E., Maundrell,

K., Castilla, J., Soto, C.(2005). The disulfide isomerase Grp58 is a protective factor against prion neurotoxicity. *J Neurosci* 25, 2793-2802.

Hetz, C., Thielen, P., Matus, S., Nassif, M., Court, F., Kiffin, R., Martinez, G., Cuervo, A. M., Brown, R. H., and Glimcher, L. H. (2009). XBP-1 deficiency in the nervous system protects against amyotrophic lateral sclerosis by increasing autophagy. *Genes Dev* 23, 2294-2306.

Hetz, C., Martinon, F., Rodriguez, D., Glimcher, L.H. (2011). The Unfolded Protein Response: Integrating Stress Signals Through the Stress Sensor IRE1 α . *Physiol Rev* 91, 1219-43.

Hirano, N., Shibasaki, F., Sakai, R., Tanaka, T., Nishida, J., Yazaki, Y., Takenawa, T., Hirai, H. (1995). Molecular cloning of the human glucose-regulated protein ERp57/GRP58, a thiol-dependent reductase. Identification of its secretory form and inducible expression by the oncogenic transformation. *Eur J Biochem* 234, 336-342.

Hoffstrom, B., Kaplan, A., Letso, R., Schmid, R., Turmel, G., Lo, D., Stockwell, B.(2010). Inhibitors of protein disulfide isomerase suppress apoptosis induced by misfolded proteins. *Nat Chem Biol* 6, 900-906.

Holtz, WA., Turetzky, JM., Jong, YJ., O'Malley, KL.(2006). Oxidative stress-triggered unfolded protein response is upstream of intrinsic cell death evoked by parkinsonian mimetics. *J Neurochem* 99(1): 54-69.

Holtz, WA., O'Malley, KL.(2003). Parkinsonian mimetics induce aspects of unfolded protein response in death of dopaminergic neurons. *J Biol Chem* 278(21): 19367-19377.

Honjo, Y., Ito, H., Horibe, T., Takahashi, R., Kawakami, K. (2010). Protein disulfide isomerase-immunopositive inclusions in patients with Alzheimer disease. *Brain Res* 1349, 90-96.

Hoozemans, JJ., van Haastert, ES., Nijholt, DA., Rozemuller, AJ., Scheper, W. (2007). Activation of the unfolded protein response is an early event in Alzheimer's and Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 354(3): 707-711.

Hu, P., Z. Han, A. D. Couvillon, R. J. Kaufman J. H. Exton (2006). Autocrine tumor necrosis factor alpha links endoplasmic reticulum stress to the membrane death receptor pathway through IRE1 α -mediated NF- κ B activation and down-regulation of TRAF2 expression. *Mol Cell Biol* 26(8): 3071-3084.

Iancu, R., Mohapel, P., Brundin, P., Paul, G.(2005). Behavioral characterization of a unilateral 6-OHDA-lesion model of Parkinson's disease in mice. *Behav Brain Res* 162(1): 1-10.

Javoy, F., Sotelo, C., Herbet, A., Agid, Y. (1976). Specificity of dopaminergic neuronal degeneration induced by intracerebral injection of 6-hydroxydopamine in the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res* 102(2): 201-15.

Jeon, G., Nakamura, T., Lee, J., Choi, W., Ahn, SW., Lee, K., Sung, J., Lipton, S. (2013). Potential Effect of S-nitrosylated Protein Disulfide Isomerase on Mutant SOD1 Aggregation and Neuronal Cell Death in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Mol Neurobiol*.

Jenner, P. (2004). Preclinical evidence for neuroprotection with monoamine oxidase-B inhibitors in Parkinson's disease. *Neurology* 63: S13-S22.

Jessop, C., Chakravarthi, S., Garbi, N., Hammerling, G., Lovell, S., Bulleid, N. (2007). ERp57 is essential for efficient folding of glycoproteins sharing common structural domains. *Embo J* 26, 28-40.

Kamel, F. (2013). Paths from Pesticides to Parkinson's. *Science* 341, 722-723.

Khanal, R., Nemere, I. (2007). The ERp57/GRp58/1,25D3-MARRS receptor: multiple functional roles in diverse cell systems. *Curr Med Chem* 14, 1087-1093.

Kimata, Y., Kohno, K., (2011). Endoplasmic reticulum stress-sensing mechanisms in yeast and mammalian cells. *Curr Opin Cell Biol* 23(2): 135-142.

Klivenyi, P., Andreassen, O., Ferrante, R., Dedeoglu, A., Mueller, G., Lancelot, E., Bogdanov, M., Andersen, JK., Jiang, D., Beal, M. (2000). Mice deficient in cellular glutathione peroxidase show increased vulnerability to malonate, 3-nitropropionic acid, and 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *J Neurosci* 20: 1-7.

Ko, H., Uehara, T., Nomura, Y. (2002). Role of ubiquilin associated with protein-disulfide isomerase in the endoplasmic reticulum in stress-induced apoptotic cell death. *J Biol Chem* 277(38):35386-92.

Kozlov, G., Maattanen, P., Thomas, D., Gehring, K. (2010). A structural overview of the PDI family of proteins. *Febs J* 277, 3924-39.

Koivunen, P., Horelli-Kuitunen, N., Helaakoski, T., Karvonen, P., Jaakkola, M., Palotie, A., Kivirikko, K. (1997). Structures of the human gene for the protein disulfide isomerase-related polypeptide ERp60 and a processed gene and assignment of these genes to 15q15 and 1q21. *Genomics* 42, 397-404.

Kumar, R., A. K. Agarwal, y col. (1995). Free radical-generated neurotoxicity of 6-hydroxydopamine. *J Neurochem* 64(4): 1703-7.

Lee, A., Iwakoshi, N., Glimcher, L. (2003). XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Mol Cell Biol* 23: 7448-7459.

Lee, MK., Stirling, W., Xu, Y., Xu, X., Qui, D., Mandir, AS., Dawson, TM., Copeland, NG., Jenkins, NA., Price, DL. (2002). Human alpha-synuclein-harboring familial Parkinson's disease-linked Ala-53 → Thr mutation causes neurodegenerative disease with alpha-synuclein aggregation in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(13): 8968-8973.

Luthman, J., Fredriksson, A., Sundström, E., Jonsson, G., Archer, T. (1989). Selective lesion of central dopamine or noradrenaline neuron systems in the neonatal rat: motor behavior and monoamine alterations at adult stage. *Behav Brain Res* 33(3): 267-77.

Maattanen, P., Gehring, K., Bergeron, J., Thomas, D. Y. (2010). Protein quality control in the ER: the recognition of misfolded proteins. *Semin Cell Dev Biol* 21, 500-511.

Martin, I., Dawson, VL., Dawson, TM. (2011). Recent advances in the genetics of Parkinson's disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 12: 301-325.

Massignan, T., Casoni, F., Basso, M., Stefanazzi, P., Biasini, E., Tortarolo, M., Salmona, M., Gianazza, E., Bendotti, C., Bonetto, V. (2007). Proteomic analysis of spinal cord of presymptomatic amyotrophic lateral sclerosis G93A SOD1 mouse. *Biochem Biophys Res Commun* 353, 719-725.

Maslah, E., Rockenstein, E., Veinbergs, I., Mallory, M., Hashimoto, M., Takeda, A., Sagara, Y., Sisk, A., Mucke, L. (2000). Dopaminergic loss and inclusion body formation in alpha-synuclein mice: implications for neurodegenerative disorders. *Science* 287(5456): 1265-1269.

Matus, S., Glimcher, L., Hetz, C. (2011). Protein folding stress in neurodegenerative diseases: a glimpse into the ER. *Curr Opin Cell Biol*.

Mercado, G., Valdes, P., Hetz, C. (2013). An ERcentric view of Parkinson's disease. *Trends Mol Med* 19(3): 165-175.

Nardo, G., Pozzi, S., Pignataro, M., Lauranzano, E., Spano, G., Garbelli, S., Mantovani, S., Marinou, K., Papetti, L., Monteforte, M. (2011). Amyotrophic lateral sclerosis multiprotein biomarkers in peripheral blood mononuclear cells. *PLoS One* 6, e25545.

Obeso, JA., Rodríguez-Oroz, MC., Benitez-Temino, B., Blesa, FJ., Guridi, J., Marin, C., Rodríguez, M. (2008). Functional organization of the basal ganglia: therapeutic implications for Parkinson's disease. *Mov Disord* 23 Suppl 3: S548-559.

Perry, T., Yong, V. Idiopathic Parkinson's disease, progressive supranuclear palsy and glutathione metabolism in the substantia nigra of patients. *Neurosci Lett* 67: 269-274, 1986.

Perumal, AS., Gopal, VB., Tordzro, WK., Cooper, TB., Cadet, JL. (1992). Vitamin E attenuates the toxic effects of 6-hydroxydopamine on free radical scavenging systems

in rat brain. *Brain Res Bull* 29(5): 699-701.

Perumal, AS., Tordzro, WK., Katz, M., Jackson-Lewis, V., Cooper, TB., Fahn, S., Cadet, JL. (1989). Regional effects of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) on free radical scavengers in rat brain. *Brain Res* 504(1): 139-41.

Pineskoski, A., Klappa, P., Lobell, M., Williamson, R., Byrne, L., Alanen, H. I., Salo, K. E., Kivirikko, K. I., Freedman, R. B., and Ruddock, L. W. (2004). Molecular characterization of the principal substrate binding site of the ubiquitous folding catalyst protein disulfide isomerase. *J Biol Chem* 279, 10374-10381.

Poewe, W., Mhlknecht, P., Jankovic, J. (2012). Emerging therapies for Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol* 25(4): 448-459.

Rutkevich, L., Cohen-Doyle, M., Brockmeier, U., Williams, D. (2010). Functional relationship between protein disulfide isomerase family members during the oxidative folding of human secretory proteins. *Mol Biol Cell* 21, 3093-3105.

Ryu, EJ., Harding, HP., Angelastro, JM., Vitolo, OV., Ron, D., Greene, LA. (2002). Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in cellular models of Parkinson's disease. *J Neurosci* 22(24):10690-10698.

Ryu, EJ., Angelastro, JM., Greene, LA. (2005). Analysis of gene expression changes in a cellular model of Parkinson disease. *Neurobiol Dis* 18(1): 54-74.

Sado, M., Yamasaki, Y., Iwanaga, T., Onaka, Y., Ibuki, T., Nishihara, S, Mizuguchi, H., Momota, H., Kishibuchi, R., Hashimoto, T., Wada, D., Kitagawa, H., Watanabe, TK., (2009). Protective effect against Parkinson's disease-related insults through the activation of XBP1. *Brain Res* 1257: 16-24.

Samann, J., Hegermann, J., von Gromoff, E., Eimer, S., Baumeister, R., Schmidt, E. (2009). *Caenorhabditis elegans* LRK-1 and PINK-1 act antagonistically in stress response and neurite outgrowth. *J Biol Chem* 284(24): 16482-16491.

Saxena, S., Caroni, P. (2011). Selective neuronal vulnerability in neurodegenerative diseases: from stressor thresholds to degeneration. *Neuron* 71(1): 35-48.

Scorrano, L., Oakes, SA., Opferman, JT., Cheng, EH., Sorcinelli, MD., Pozzan, T., Korsmeyer, SJ. (2003). BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis. *Science* 300,135-9.

Selvaraj, S., Sun, Y., Watt, JA., Wang, S., Lei, S., Birnbaumer, L., Singh, BB. (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.

Silva, RM., Ries, V., Oo, TF., Yarygina, O., Jackson-Lewis, V., Ryu, EJ., Lu,

PD., Marciniak, S.J., Ron, D., Przedborski, S., Kholodilov, N., Greene, L.A., Burke, R.E. (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.

Smith, WW., Jiang, H., Pei, Z., Tanaka, Y., Morita, H., Sawa, A., Dawson, VL., Dawson, TM., Ross, CA. (2005). Endoplasmic reticulum stress and mitochondrial cell death pathways mediate A53T mutant alpha-synuclein-induced toxicity. *Hum Mol Genet* 14(24): 3801-3811.

Soto, C. (2012). Transmissible proteins: expanding the prion heresy. *Cell* 149(5): 968-977.

Slodzinski, H., Moran, L.B., Michael, G.J., Wang, B., Novoselov, S., Cheetham, M.E., Pearce, R.K., Graeber, M.B. (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.

Su, L.J., Auluck, P.K., Outeiro, T.F., Yeger-Lotem, E., Kritzer, J.A., Tardiff, D.F., Strathearn, K.E., Liu, F., Cao, S., Hamamichi, S., Hill, K.J., Caldwell, K.A., Bell, G.W., Fraenkel, E., Cooper, A.A., Caldwell, G.A., McCaffery, J.M., Rochet, J.C., Lindquist, S. (2010). Compounds from an unbiased chemical screen reverse both ER-to-Golgi trafficking defects and mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease models. *Dis Model Mech* 3(3-4): 194-208.

Tanaka, K., Fukuoka, S., Kawahara, S., Kimoto, N., Ogawa, N. (2013). Effect of cabergoline on increase of several ER stress-related molecules in 6-OHDA-lesioned mice. *Neurol Sci* 34(2): 259-61.

Tabas, I., Ron, D. (2011). Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat Cell Biol* 13(3): 184-190.

Takano, K., Tabata, Y., Kitao, Y., Murakami, R., Suzuki, H., Yamada, M., Iinuma, M., Yoneda, Y., Ogawa, S., Hori, O. (2007). Methoxyflavones protect cells against endoplasmic reticulum stress and neurotoxin. *Am J Physiol Cell Physiol* 292(1): C353-361.

Thayanidhi, N., Helm, J.R., Nycz, D.C., Bentley, M., Liang, Y., Hay, J.C. (2010). Alpha-synuclein delays endoplasmic reticulum (ER)-to-Golgi transport in mammalian cells by antagonizing ER/Golgi SNAREs. *Mol Biol Cell* 21(11): 1850-1863.

Tobón-Velasco, J.C., Limón-Pacheco, J.H., Orozco-Ibarra, M., Macías-Silva, M., Vázquez-Victorio, G., Cuevas, E., Ali, S.F., Cuadrado, A., Pedraza-Chaverri, J., Santamaría, A. (2013). 6-OHDA-induced apoptosis and mitochondrial dysfunction are mediated by early modulation of intracellular signals and interaction of Nrf2 and NF- κ B factors. *Toxicology*. 304:109-19.

Toldo, S., Boccellino, M., Rinaldi, B., Seropian, IM., Mezzaroma, E., Severino, A., Quagliuolo, L., Van Tassell, BW., Marfella, R., Paolisso, G., Rossi, F., Natarajan, R., Voelkel, N., Abbate, A., Crea, F., Baldi, A. (2011). Altered oxido-reductive state in the diabetic heart: loss of cardioprotection due to protein disulfide isomerase. *Mol Med* 17(9-10):1012-21.

Tu, B., Weissman, J. (2002). The FAD- and O₂-dependent reaction cycle of Ero1-mediated oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Mol Cell* 10, 983-994.

Turano, C., Coppari, S., Altieri, F., Ferraro, A. (2002). Proteins of the PDI family: unpredicted non-ER locations and functions. *J Cell Physiol* 193, 154-163.

Uehara, T., Nakamura, T., Yao, D., Shi, Z. Q., Gu, Z., Ma, Y., Masliah, E., Nomura, Y., Lipton, S. A. (2006). S-nitrosylated protein-disulphide isomerase links protein misfolding to neurodegeneration. *Nature* 441, 513-517.

Ungerstedt, U. (1968). 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J Pharmacol* 5(1): 107-10.

Urano, F., Wang, X., Bertolotti, A., Zhang, Y., Chung, P., Harding, HP., Ron, D. (2000). Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* 287(5453): 664-666.

Valdés, P. (2013). Control de la sobrevivencia de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc por el factor transcripcional de la UPR XBP1 en condiciones basales y frente a la neurotoxina 6-OHDA. Tesis de Doctorado en ciencias con mención en biología molecular, celular y neurociencias. Chile: Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Vitte, J., Traver, S., Maués, De Paula A., Lesage, S., Rovelli, G., Corti, O., Duyckaerts, C., Brice, A. (2010). Leucine-rich repeat kinase 2 is associated with the endoplasmic reticulum in dopaminergic neurons and accumulates in the core of Lewy bodies in Parkinson disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 69(9): 959-972.

Waldron-Roby, E., Ratovitski, T., Wang, X., Jiang, M., Watkin, E., Arbez, N., Graham, R. K., Hayden, M. R., Hou, Z., Mori, S. (2012). Transgénico mouse model expressing the caspase 6 fragment of mutant huntingtin. *J Neurosci* 32, 183-193.

Walker, A., Farg, M., Bye, C., McLean, C., Horne, M., Atkin, J. (2010). Protein disulphide isomerase protects against protein aggregation and is S-nitrosylated in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 133, 105-116.

Walter, P., Ron (2011). The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* 334(6059): 1081-1086.

Wang, X., Lawson, B., Brewer, J., Zinszner, H., Sanjay, A., Mi, L., Boorstein, R., Kreibich, G., Hendershot, L., Ron, D. (1996). Signals from the stressed endoplasmic

reticulum induce C/EBP-homologous protein (CHOP/GADD153). *Mol Cell Biol.* 16(8):4273-80.

Wang, HQ., Takahashi, R. (2007). Expanding insights on the involvement of endoplasmic reticulum stress in Parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal* 9(5): 553-61.

Woehlbier, U., Hetz, C. (2011). Modulating stress responses by the UPRosome: a matter of life and death. *Trends Biochem Sci.* 36, 329-337.

Yamamoto, K., Sato, T., Matsui, T., Sato, M., Okada, T., Yoshida, H., Harada, A., Mori, K. (2007). Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6alpha and XBP1. *Dev Cell* 13(3): 365-376.

Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., Mori, K. (2001). XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* 107(7): 881-891.

Yuan, Y, Cao, P., Smith, MA., Kramp, K., Huang, Y., Hisamoto, N., Matsumoto K, Hatzoglou, M., Jin H, Feng, Z., (2011). Dysregulated LRRK2 signaling in response to endoplasmic reticulum stress leads to dopaminergic neuron degeneration in *C. elegans*. *PLoS One* 6(8): e22354.

Zhou, D., Pan, Y. (2011). Gestational low protein diet selectively induces the amino acid response pathway target genes in the liver of offspring rats through transcription factor binding and histone modifications. *Biochim Biophys Acta* 1809(10):549-56.

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.