

UCH-FC
Doc-B.Mol
V 145
CI



“Control de la sobrevivencia de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc por el factor transcripcional de la respuesta a proteínas mal plegadas XBP1 en condiciones basales y frente a la neurotoxina 6-hidroxidopamina”.

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

Doctor en Ciencias con mención en
Biología Molecular, Celular y Neurociencias

Facultad de Ciencias

por

Pamela Solange Valdés Undurraga

Abril, 2013

Director de tesis: Dr. Claudio Hetz



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la escuela de postgrado de la Facultad de Ciencias que la tesis de doctorado presentada por la candidata:

Pamela Solange Valdés Undurraga

Ha sido aprobada por la comisión de evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en biología molecular, celular y neurociencias, en el examen de defensa privada de tesis rendido el día 15 de Abril del año 2013.

Director de Tesis:

Dr. Claudio Hetz

Comisión de evaluación de la tesis

Dr. Cristian Gonzalez-Billault (Presidente)

Dr. Andres Couve

Dr. Alejandra Alvarez

Dr. Nibaldo Inestroza



Agradecimientos

- 1- En primer lugar quisiera agradecer a mi familia: mis padres, mi hermano y mis abuelos por todo el amor y apoyo incondicional en este largo camino.
- 2- A mi tutor de tesis el Dr. Claudio Hetz por su apoyo, motivación y paciencia durante mi estadía en su laboratorio. Agradezco sobretodo su guía en los momentos difíciles y su compromiso como tutor.
- 3- A mi novio por su amor, entrega y por la alegría que le da a mi vida. Le agradezco también por la increíble ayuda que significaron las continuas discusiones científicas a cualquier hora.
- 4- A los científicos que aportaron a mi desarrollo durante mis pasantías en el extranjero: Dr. Patrick Aebischer (EPFL, Suiza) y Dr. Laurie Glimcher (Cornell University, USA) y sobretodo al Dr. Bernard Schneider (EPFL, Suiza) por su energía y pasión por la ciencia inagotables.
- 5- A todo el laboratorio de estrés celular y biomedicina, en especial a Diego Rojas y Gabriela Martínez, que aparte de entregarme su amistad, son unos científicos brillantes y siempre dispuestos a aportar. En especial también quisiera agradecer a mis compañeros Mauricio Torres, Gabriela Mercado, René Vidal, Víctor Hugo Cornejo, Valentina Castillo y Claudia Molina. Todos ellos colaboraron enormemente a este trabajo además de ser un apoyo constante durante mis años en el laboratorio.
- 6- A mis amigos incondicionales, que siempre me han apoyado, en especial a Carol San Martín, Daniela García, Alejandra Gleisner, Tamara García, Laura Ramajo, Daniela Olivares, Wojtek Bobela y Julianne Aebischer.

Financiamiento

Esta tesis de doctorado fue realizada en el laboratorio de "Estrés Celular y Biomedicina", perteneciente a:

- 1) Instituto de Ciencias Biomédicas. Facultad de Medicina. Universidad de Chile.
- 2) Centro FONDAP de Estudios Moleculares de la Célula. Facultad de Medicina. Universidad de Chile.
- 3) Instituto Milenio de Morfogénesis Neural (NEMO). Facultad de Medicina. Universidad de Chile.
- 4) Fundación Biomédica Neurounion

Además durante el desarrollo de esta tesis contamos con el siguiente financiamiento:

- 1) Michael J. Fox Foundation for Parkinson research.
- 2) Proyecto FONDECYT #1100176 y #3120146.
- 3) Proyecto FONDAP #15010006.
- 4) Beca para la realización de doctorado en Chile CONICYT 2008-2012.
- 5) Beca Chile para la realización de pasantías en el extranjero 2010.
- 6) Beca de apoyo para la realización de tesis doctoral CONICYT 2010 y 2011.
- 7) Beca de la Vicerrectoría de asuntos académicos de la Universidad de Chile para estadías cortas en el extranjero 2011.

Actividades y material de difusión

1. Publicaciones.

Pamela Valdés, Gabriela Mercado, Rene Vidal, Geoffrey Parsons, Felipe Court, Alexis Martinez, Danny Galleguillos, Donna Armentano, Bernard Schneider, Claudio Hetz. *Control of dopaminergic neuron survival by the unfolded protein response transcription factor XBP1*. En preparación.

Martínez, G., Vidal, R.L., Wirth, C., Serrano, F.G., Valdés, J.L., **Valdés, P.**, Molina C., Glimcher, L.H. and Hetz, C. *Novel function of the UPR transcription factor XBP1 in the regulation of learning and memory*. En preparación.

Gabriela Mercado, **Pamela Valdés**, Claudio Hetz. *An ERcentric view of Parkinson's disease*. Trends in Molecular Medicine, 19(3):165-75, 2013.

2. Presentaciones en congresos.

- Martínez, G., Vidal, R.L., Wirth, C., Serrano, F.G., Valdés, J.L., Valdés, P., Molina C., Glimcher, L.H. and Hetz, C. *Novel function of the UPR transcription factor XBP1 in the regulation of learning and memory*. FASEB conferences: From unfolded proteins in the ER to disease. Vermont, USA, 2013.
- Mercado G, Valdés P, Vidal R, Parsons G, Court F, Martinez A, Armentano D, Schneider B, Aebischer P, and Hetz C. *Control of dopaminergic neuron survival by the unfolded protein response transcription factor XBP1*. XXVI

reunión anual de la sociedad de biología celular de Chile, Puerto Varas, Chile, 2012.

- Pamela Valdés, Alexis Martínez, Claudio Hetz. *XBP-1 deficiency protects against 6-OHDA neurotoxicity in mice possibly through the upregulation of ER chaperones and autophagy*. XXIV reunión anual de la sociedad de biología celular de Chile, Puerto Varas, Chile, 2010.
- Pamela Valdés, Benjamin Caballero, Claudio Hetz. *Targeting endoplasmic reticulum (ER) stress to prevent neuronal death in a pharmacological model of Parkinson's disease*. XXIII annual meeting of the Chilean Society for Cell Biology, Pucón, Chile. 2009

3. Pasantías internacionales.

- Efecto de la sobreexpresión de en la sobrevida de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc un modelo genético de la enfermedad de Parkinson en ratas. Laboratorio de enfermedades neurodegenerativas, Dr. Patrick Aebischer, Ecole Polytechnique Federale de Lausanne, Lausanne, Suiza. Agosto 2011-Mayo 2012.
- Estudio del efecto la deficiencia de XBP1 en la sobrevida de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc en un modelo genético de la enfermedad de Parkinson en ratones. Departamento de inmunología y enfermedades infecciosas, Dr. Laurie Glimcher, Harvard school of public health, Boston, USA. Julio- Octubre 2010.
- Generación de un modelo genético de la enfermedad de Parkinson mediante la inyección de virus adenoasociados portadores de alfa sinucleína en ratones. Laboratorio de enfermedades neurodegenerativas,

Dr. Patrick Aebischer, Ecole Polytechnique Federale de Lausanne,
Lausanne, Suiza. Mayo-Julio 2010.

1. Índice general.

1. ÍNDICE GENERAL.	1
2. ÍNDICE DE FIGURAS.	3
3. ABREVIACIONES.	4
4. RESUMEN.	7
5. SUMMARY.	9
6. INTRODUCCIÓN.	11
6.1 LA ENFERMEDAD DE PARKINSON.	11
6.2 EL ESTRÉS DE RE Y LA RESPUESTA A PROTEÍNAS MAL PLEGADAS O UPR.	15
6.3 ESTRÉS DE RE Y LA EP.	18
6.4 MANIPULACIÓN DE LOS COMPONENTES DE LA UPR EN MODELOS EXPERIMENTALES DE LA EP.	23
6.6 FUNCIÓN DE XBP1 EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.	25
7. HIPÓTESIS.	28
8. OBJETIVO GENERAL.	28
9. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	28
10. MATERIALES Y MÉTODOS.	29
11. RESULTADOS.	39
11.1 OBJETIVO ESPECÍFICO 1: ANALIZAR LA SUSCEPTIBILIDAD DE LAS NEURONAS DOPAMINÉRGICAS DE LA SNPC FRENTE A LA NEUROTOXINA 6-OHDA EN LOS RATONES DEFICIENTES PARA XBP1 EN EL SNC Y EN LOS RATONES WT.	39
11.1.1 MODELO DE ESTUDIO: RATÓN DEFICIENTE PARA XBP1 EN EL SNC.	39
11.1.2 EFECTO DE LA DEFICIENCIA DE XBP1 EN EL SNC EN EL NÚMERO DE LAS NEURONAS DOPAMINÉRGICAS DE LA SNPC EN LOS RATONES ADULTOS.	41
11.1.3 ESTABLECIMIENTO DE UN MODELO TOXICOLÓGICO EN LAS NEURONAS DOPAMINÉRGICAS MEDIADO POR LA TOXINA 6-HIDROXIDOPAMINA EN RATONES ADULTOS.	43
11.1.4 EFECTO DE LA DEFICIENCIA DE XBP1 EN EL SNC EN LA SOBREVIVENCIA DE LAS NEURONAS DOPAMINÉRGICAS DE LA SNPC FRENTE A LA TOXINA 6-OHDA.	45
11.2 OBJETIVO ESPECÍFICO 2: EVALUAR EN CONDICIONES BASALES EL NIVEL DE ESTRÉS DE RE EN LA SN DE LOS RATONES DEFICIENTES PARA XBP1 EN EL SNC Y EN LOS RATONES XBP1 WT.	50
11.2.1 EFECTO DE LA DEFICIENCIA DE XBP1 EN LA EXPRESIÓN DE CHAPERONAS Y FOLDASAS DEL RE EN LA SN DE RATONES ADULTOS EN CONDICIONES BASALES.	50
11.2.2 IMPACTO DE LA DEFICIENCIA DE XBP1 EN LA ACTIVACIÓN DE LA VÍA DE IRE1 α EN LA SN DE LOS RATONES ADULTOS EN CONDICIONES BASALES.	52
11.2.3 EFECTO DE LA DEFICIENCIA DE XBP1 EN OTRAS VÍAS DE LA UPR: DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE EIF2 α FOSFORILADO EN LA SN DE LOS RATONES ADULTOS.	55

11.2.4 IMPACTO DE LA DEFICIENCIA DE XBP1 EN LA EXPRESIÓN DE GENES PROAPOPTÓTICOS INDUCIDOS POR ESTRÉS DE RE EN LA SN DE LOS RATONES ADULTOS.	58
11.2.5 ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA DEFICIENCIA DE XBP1 EN EL SNC EN LA EXPRESIÓN DE MARCADORES DE ESTRÉS DE RE EN DISECCIONES DE CORTEZA CEREBRAL EN RATONES ADULTOS.	58
11.3 OBJETIVO ESPECÍFICO 3: ESTUDIAR EL EFECTO DE LA REGULACIÓN NEGATIVA DE XBP1 EN LA SOBREVIDA Y EL ESTRÉS DE RE DE LAS NEURONAS DOPAMINÉRGICAS DE LA SNPC DE RATONES ADULTOS.	60
11.3.1 GENERACIÓN Y VALIDACIÓN DE UN SHARN PARA <i>XBP1 IN VITRO</i> Y GENERACIÓN DE ADENOVIRUS ASOCIADOS PARA LA TRANSDUCCIÓN DE LAS NEURONAS DOPAMINÉRGICAS DE LA SNPC.	60
11.3.2 DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LA INYECCIÓN DEL AAV SHXBP1/EGFP EN LA EXPRESIÓN DE <i>XBP1S IN VIVO</i> .	65
11.3.3 EFECTO DE LA EXPRESIÓN DEL SHXBP1 EN LA SOBREVIDA DE LAS NEURONAS DOPAMINÉRGICAS DE LA SNPC EN CONDICIONES BASALES.	68
11.3.4 EVALUACIÓN DE POSIBLES CAMBIOS MOTORES ESPONTÁNEOS INDUCIDOS POR LA EXPRESIÓN DEL SHXBP1 EN LAS NEURONAS DOPAMINÉRGICAS DE LA SNPC EN LOS RATONES ADULTOS.	74
11.3.5 ANÁLISIS DEL EFECTO DEL SHXBP1 EN LOS MARCADORES DE ESTRÉS DE RE UNA SEMANA POST INYECCIÓN.	76
11.3.6 EFECTO DEL SHXBP1 EN LOS MARCADORES DE ESTRÉS DE RE DOS SEMANAS POST INYECCIÓN.	78
12. ANEXO	85
13. DISCUSIÓN.	91
14. CONCLUSIONES.	111
14. BIBLIOGRAFÍA.	112

2. Índice de figuras.

Figura 1: Esquema simplificado del circuito neuronal nigro-estriatal afectado en la enfermedad de Parkinson.....	13
Figura 2: Respuesta a proteínas mal plegadas (UPR).....	17
Figura 3: Marcadores de estrés de RE y activación de la UPR en tejido <i>post mortem</i> y en modelos animales de la EP.....	19
Figura 4: Esquema representativo de los AAVs portadores de los shARN diseñados para XBP1 y Luciferasa.	36
Figura 5: Esquema de la delección de <i>xbp1</i> en el SNC en el ratón XBP1 KO.	40
Figura 6: Cuantificación estereológica de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc en los ratones XBP1 KO y en los ratones XBP1 WT adultos.	42
Figura 7: Modelo de toxicidad inducido por 6-OHDA en las neuronas dopaminérgicas de ratones XBP1 WT adultos.	44
Figura 8: Análisis histológico y cuantificación del daño inducido por la 6-OHDA en el cuerpo estriado de los ratones XBP1 WT y de los ratones XBP1 KO.	46
Figura 9: Análisis histológico y cuantificación espacial del daño inducido por la 6-OHDA en la SNpc de los ratones XBP1 WT y los ratones XBP1 KO.	48
Figura 10: Cuantificación del daño inducido por la 6-OHDA en una sub-región de la SNpc en los ratones XBP1 WT y los ratones XBP1 KO.....	49
Figura 11: Análisis de la expresión de las proteínas ERp72 y Calreticulina en las disecciones de la SN de ratones XBP1 WT y de ratones XBP1 KO.	51
Figura 12: Detección de la proteína ERp72 en cortes de cerebro medio que contienen la SNpc en los ratones WT adultos.....	53
Figura 13: Esquema explicativo del ensayo de RT-PCR para evaluar el procesamiento del ARNm de <i>xbp1</i> en los ratones deficientes para XBP1.	54
Figura 14: Ensayo para evaluar el procesamiento del ARNm de <i>xbp1</i> en disecciones de la SN de los ratones XBP1 WT y XBP1 KO.	56
Figura 15. Análisis de la fosforilación de eIF2 α en las disecciones de la SN de ratones XBP1 WT y de ratones XBP1 KO.	57
Figura 16: Análisis de los niveles de ARNm de los factores pro-apoptóticos <i>chop</i> , <i>bim</i> y <i>puma</i> a en las disecciones de la SN de ratones XBP1 WT y de ratones XBP1 KO.....	59
Figura 17: Análisis de la expresión de las proteínas ERp72 y Calnexina en disecciones de corteza de ratones XBP1 WT y de ratones XBP1 KO.	61
Figura 18: Ensayo para evaluar el procesamiento del ARNm de <i>xbp1</i> en disecciones de corteza de los ratones XBP1 WT y XBP1 KO.....	62
Figura 19: Validación <i>in vitro</i> del shXBP1 en células N2A.....	64

Figura 20. Transducción de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc con los virus AAV portadores de los shARN.	66
Figura 21: Efecto del shXBP1 en la expresión de <i>xbp1</i> en la SN de ratones adultos.	67
Figura 22: Efecto del shXBP1 sobre las viabilidad de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc.	69
Figura 23: Efecto del shXBP1 sobre el marcador dopaminérgico TH en las neuronas de la SNpc. ..	70
Figura 24: Efecto del shXBP1 sobre la expresión del marcador neuronal NeuN en la SNpc.	72
Figura 25. Evaluación del rescate de la toxicidad inducida por el shXBP1 <i>in vivo</i>	73
Figura 26: Efecto del shXBP1 en los terminales dopaminérgicos del cuerpo estriado.....	75
Figura 27: Evaluación del fenotipo motor en ratones inyectados con el AAV shXBP1/EGFP.....	77
Figura 28: Transducción de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc con el AAV shXBP1/EGFP 1 semana post inyección.	79
Figura 29: Análisis de la expresión de ERp72 y <i>chop</i> en disecciones de SN en ratones inyectados con el AAV shXBP1/EGFP.....	80
Figura 30: Análisis de la expresión de TH en las disecciones de SN en ratones inyectados con el AAV shXBP1/EGFP.....	82
Figura 31: Análisis de la expresión de ERp72 y Calreticulina en disecciones de SN en los ratones inyectados con el AAV shXBP1/EGFP.	83
Figura 32: Análisis de la expresión del ARNm de <i>chop</i> en disecciones de SN en los ratones inyectados con el AAV shXBP1/EGFP.	84
Figura 33: Efecto de 6-OHDA sobre la viabilidad celular y el procesamiento del ARNm de <i>xbp1</i> en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y.	86
Figura 34: Efecto de 6-OHDA sobre el procesamiento del ARNm de <i>xbp1 in vivo</i>	87
Figura 35: Efecto de 6-OHDA sobre el procesamiento del ARNm de <i>xbp1 in vivo</i>	88
Figura 36: Análisis de la expresión de <i>chop</i> en disecciones de SN en los ratones inyectados con 6-OHDA.....	90

3. Abreviaciones.

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 estereotáxica en el eje antero-posterior según el atlas del cerebro de ratón de Franklin y Paxinos

ASK1: apoptosis signal-regulating kinase

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

DV: coordenada estereotáxica 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: human elongation factor-1 alpha

EGFP: enhanced green fluorescent protein

EH: enfermedad de Huntington

eIF2 α : Eukariotic initiation factor 2 alpha

ELA: esclerosis lateral amiotrófica

EP: enfermedad de Parkinson

ERAD: endoplasmic-reticulum-associated protein degradation

GAAD34: growth arrest and DNA damage protein-34.

Grp78: glucose-regulated protein-78 Kilodaltons

h: horas

Herp: homocysteine-induced endoplasmic reticulum protein

IHC: inmunohistoquímica

IRE1 α : inositol requiring protein-1 alpha
ITR: secuencias de repetidos invertidos terminales conservadas de los adenovirus
JNK: stress-activated protein kinases SAPK/c-Jun N-terminal kinase
KO: knock-out
LRRK2: leucine-rich repeat kinase 2
MEFs: células embrionarias de fibroblasto, del inglés: mouse embryonic fibroblast
MFB: medial forebrain bundle
ML: coordenada estereotáxica en el eje lateral según el atlas del cerebro de ratón de Franklin y Paxinos
MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
NF- κ B: nuclear factor- kappa B
OCT: optimal cutting temperature medium
PBS: Solución tampón de fosfato
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PDI: proteína disulfuro isomerasa
PDIP: proteína disulfuro isomerasa de páncreas
PERK: protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase.
PFA: paraformaldehído
PMDs: protein misfolding disorders
PUMA: p53 up-regulated modulator of apoptosis
qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RE: retículo endoplasmático
ROS: especies reactivas del oxígeno
SNpc: substantia nigra pars compacta
shARN: ARN pequeño tipo horquilla, del inglés: short-hairpin
Tm: tunicamicina
UPR: respuesta a proteínas desplegadas, del inglés unfolded protein response
WT: wild type, forma silvestre
XBP1: X-box binding protein-1
XBP1s: forma procesada de la proteína XBP1
XBP1u: forma no procesada de la proteína XBP1

4. Resumen.

La enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común en la población mayor a los 60 años de edad. Este desorden degenerativo se caracteriza por la muerte selectiva de las neuronas dopaminérgicas de la *Substantia Nigra pars compacta* (SNpc), las cuales forman parte del complejo circuito neuronal denominado nigro-estriatal. Las neuronas dopaminérgicas de la SNpc liberan el neurotransmisor dopamina, permitiendo la regulación y el control de los movimientos voluntarios. En los pacientes afectados con esta patología la muerte de las neuronas dopaminérgicas genera una disminución en los niveles netos del neurotransmisor dopamina en el cuerpo estriado, desencadenando la aparición de síntomas motores característicos en la enfermedad tales como los temblores en estado de reposo, la bradiquinesia, la rigidez corporal, entre otros.

Se ha descrito que el estrés de retículo endoplasmático (RE) y la concomitante activación de la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR) podrían ser parte de los mecanismos patológicos que participan en la muerte selectiva de las neuronas dopaminérgicas característica de esta patología. Dentro de las vías de la UPR, la más conservada en la evolución es la iniciada por el sensor de estrés de RE IRE1 α (del inglés *inositol requiring protein-1 alpha*). La activación de esta vía genera la expresión de la proteína XBP1s, la cual es un potente factor de transcripción. Hasta la fecha no se conoce el rol exacto de XBP1 en la fisiología de las neuronas en el sistema nervioso central, pero varios estudios han demostrado que la manipulación en los niveles de expresión de este factor transcripcional tiene efectos en la sobrevivencia de las neuronas en varios modelos de enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la enfermedad de Parkinson.

En esta tesis se propuso estudiar el efecto de la deficiencia de XBP1 en la sobrevivencia de las neuronas dopaminérgicas en condiciones basales y frente a la toxina parkinsoniana 6-hidroxidopamina (6-OHDA). Los resultados obtenidos indican que la delección de *xbp1* en el sistema nervioso central generó protección en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc frente a la toxicidad inducida por la inyección de 6-OHDA en ratones adultos. La deficiencia de XBP1 indujo un incremento en la expresión de varios marcadores de la UPR en la SNpc de estos ratones en condiciones basales, tales como la foldasa de RE Calreticulina y la disulfuro isomerasa ERp72, así como también un aumento en el procesamiento del ARNm de *xbp1*. Estos cambios fueron

detectados específicamente en la SNpc, debido a que en disecciones de corteza cerebral no observamos diferencias al comparar los ratones XBP1 WT y XBP1 KO. Sin embargo, no encontramos diferencias en los niveles de expresión del factor proapoptótico de la UPR *chop* entre los ratones deficientes para XBP1 y los ratones XBP1 WT en la SNpc, indicando que el estrés de RE generado en la SNpc en condiciones basales probablemente es adaptativo. Por otra parte, demostramos que la expresión de un shARN diseñado para *xbp1*, validado en cultivos celulares, indujo espontáneamente la pérdida del marcador dopaminérgico TH y del marcador neuronal NeuN en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc en ratones adultos. Sumado a esto, la expresión del shXBP1 generó alteraciones en la morfología de las fibras neuronales, sugiriendo que probablemente se desencadena la muerte neuronal. Este fenómeno se correlacionó con un aumento en la expresión de los marcadores de la UPR ERp72, Calreticulina y el factor proapoptótico *chop*, indicando que la delección de *xbp1* en las neuronas dopaminérgicas adultas generó una condición de estrés de RE no adaptativo y crónico que finalmente desencadena la muerte neuronal.

En conjunto estos resultados sugieren que la deficiencia de XBP1 tiene un impacto en la homeostasis proteica en el RE y en la fisiología de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc. Durante el desarrollo embrionario del ratón, esta deficiencia genera una condición de estrés de RE adaptativa no letal que probablemente induce un efecto de pre condicionamiento frente a injurias posteriores tal como la neurotoxina 6-OHDA. Por otra parte, la deficiencia de este factor de la UPR generada en las neuronas dopaminérgicas adultas, desencadena una condición de estrés de RE no adaptativa, sugiriendo que XBP1 tiene un rol fundamental en la mantención de la sobrevida en estas neuronas.

Concluimos que XBP1 tiene un papel clave en las neuronas dopaminérgicas en condiciones basales, y que la disminución de su expresión genera estrés de RE, el que dependiendo del contexto puede ser adaptativo o crónico. Este trabajo abre la posibilidad de estudiar la selectividad de las distintas vías de la UPR en los procesos fisiológicos en estas neuronas. Por otra parte, el efecto específico de la deficiencia de XBP1 en la sobrevida de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc resulta interesante desde el punto de vista de la vulnerabilidad diferencial de las neuronas en la EP, sugiriendo a este factor de la UPR como un posible blanco terapéutico en el contexto patológico.

5. Summary.

Parkinson's disease is the second most common neurodegenerative disease, affecting people over 60 years old. This degenerative disorder is characterized by the selective loss of dopaminergic neurons from the *Substantia Nigra pars compacta* (SNpc), which are part of the nigro-striatal neuronal circuit. Dopaminergic neurons from the SNpc release the neurotransmitter dopamine allowing the control of voluntary movements. In patients affected with Parkinson's disease dopaminergic neurons loss causes a global dopamine decrease in the *Striatum*, triggering the appearance of characteristic symptoms including resting tremors, bradikinesy, body rigidity, among others.

It has been described that the endoplasmic reticulum (ER) stress and the unfolded protein response (UPR) could be part of the pathological mechanisms involved in the selective dopaminergic neuronal loss observed in Parkinson's disease. The most conserved UPR pathway is initiated by the stress sensor *inositol requiring protein-1 alpha* (IRE1 α). The activation of this UPR pathway generates XBP1s protein, which is a potent transcription factor. So far, the physiological role of XBP1 in the central nervous system remains unknown, however several studies have demonstrated that modulating the expression levels of this transcriptional factor affect the neurons survival in animals models of neurodegenerative diseases, including Parkinson's disease

In this thesis we proposed to study the effect of XBP1 negative regulation in dopaminergic neurons survival at basal conditions and in 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-injected mice. Our results show that *xbp1* deletion in the central nervous system protected dopaminergic neurons against 6-OHDA-induced toxicity in adult mice. Moreover, we described that *xbp1* deletion induced an increase in the expression of UPR markers including the protein disulfide isomerase ERp72, the foldase Calreticulin and *xbp1* splicing in the SNpc, suggesting an ER stress condition which is adaptive and non lethal. These changes were specifically induced in the SNpc because we did not observe them in cortex dissections. Moreover, we did not detect differences in the expression of the pro-apoptotic UPR factor *chop* between XBP1 WT and XBP1 KO mice, suggesting that the ER stress condition is an adaptive non lethal response.

On the other hand we demonstrated that injection of adenoassociated (AAV) virus carrying an shRNA against *xbp1* in dopaminergic neurons from the SNpc in adult mice triggered

the loss of neuronal markers tyrosine hydroxylase (TH) and NeuN, suggesting the occurrence of cell death. This phenomenon correlated with an increase in the expression of the UPR markers ERp72, Calreticulin and the UPR pro-apoptotic factor *chop*, suggesting that XBP1 deficiency in adult dopaminergic neurons triggered a non-adaptive and chronic ER-stress condition, which finally induced cell death.

In summary all this results suggest that XBP1 deficiency has a direct impact in dopaminergic neurons survival. It is possible that during mice development this deficiency generates an adaptive and non-lethal ER-stress condition, which has a pre-conditioning effect against futures injures such as the neurotoxin 6-OHDA, however the exact mechanisms involved in this protection remains still unknown. On the other hand, the expression of an shXBP1 in adult dopaminergic neurons triggers spontaneous degeneration, suggesting that XBP1 has an important role in the maintenance of these neurons.

We conclude that XBP1 has an important role at basal levels in dopaminergic neurons from the SNpc and that decreased levels of this factor triggers ER stress, which depending on the context could be adaptive or chronic. This work opens the possibility of studying the selectivity of the UPR pathways in physiological processes of these neurons. On the other hand, the specific effect of XBP1 depletion in dopaminergic neurons survival is very interesting in the context of differential vulnerability of these neurons in PD, suggesting that this UPR factor could be an therapeutic target to test in pathological conditions.

6. Introducción.

6.1 La enfermedad de Parkinson.

La EP es un desorden neurodegenerativo progresivo e irreversible que afecta principalmente el control de los movimientos voluntarios. La EP se caracteriza por la aparición de varios síntomas motores dentro de los que se incluyen la rigidez corporal, los temblores en estado de reposo, la bradiquinesia o lentitud para ejecutar movimientos y la inestabilidad postural. Las características patológicas que subyacen a las manifestaciones clínicas de esta enfermedad se deben principalmente a la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc (revisado en Dauer y Przedborski 2003). La característica histopatológica distintiva más común en los pacientes con la EP es la presencia de inclusiones proteicas intracelulares denominadas cuerpos de Lewy. Estas inclusiones están formadas mayoritariamente por agregados fibrilares de la proteína alfa-sinucleína (α -sin), la cual puede encontrarse modificada post-traduccionalmente mediante ubiquitinaciones, fosforilaciones y S-nitrosilaciones (revisado en Duda, Giasson y col. 2000).

La EP es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común en la población anciana, afectando al 1 % de las personas mayores a 60 años de edad (revisado en de Lau y Breteler 2006). El envejecimiento es el mayor factor de riesgo para desarrollar la EP, por lo que este porcentaje de incidencia se incrementa con la edad: un 0,6 % de la población entre 60 y 69 años de edad está afectado por la EP mientras que un 2,6 % de la población entre 85 y 89 años padece este desorden (revisado en de Lau and Breteler 2006).

La pérdida de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc en la EP se traduce en una disminución progresiva y severa del contenido del neurotransmisor dopamina en el cuerpo estriado, fenómeno responsable de los síntomas motores característicos de la enfermedad (revisado en Dauer and Przedborski 2003). Las neuronas dopaminérgicas de la SNpc forman parte de un complejo circuito neuronal denominado circuito nigro-estriatal, el cual en conjunto con otros circuitos cerebrales controla finamente los movimientos voluntarios vía la liberación del neurotransmisor dopamina por parte de éstas células. El circuito nigro-estriatal está compuesto por la SNpc y por el cuerpo estriado. La SNpc aloja los somas de las neuronas dopaminérgicas, las cuales proyectan sus terminales axonales hasta el cuerpo estriado en donde liberan la dopamina

como parte de la transmisión sináptica (figura 1). Altos niveles de dopamina promueven la actividad motora, mientras que bajos niveles de ésta demandan un mayor esfuerzo para la ejecución de cualquier movimiento voluntario (revisado en Obeso, Rodriguez-Oroz y col. 2008). Por lo tanto, la consecuencia neta de la disminución de la dopamina en la EP es una reducción global en los movimientos, lo que se conoce como hipoquinesia.

Desde hace más de 40 años la farmacoterapia oral de una mezcla del precursor metabólico de la dopamina, L-dopa, e inhibidores de la descarboxilasa que actúan a nivel periférico, ha sido el pilar fundamental en el tratamiento de los pacientes con la EP. Sin embargo, este tratamiento que es únicamente paliativo, aumenta los niveles globales del neurotransmisor en el circuito nigro-estriatal, lo que genera varios efectos secundarios asociados a su uso crónico. El principal efecto secundario del uso de L-dopa se deriva de su mecanismo de acción, ya que al aumentar los niveles globales de la dopamina se produce una excesiva actividad neuronal, generando la aparición de movimientos involuntarios, lo que se conoce como disquinesia (revisado en Poewe, Mahlknecht y col. 2012). Hasta la fecha no existe cura para la EP, sin embargo la medicación y un apropiado tratamiento multidisciplinario, otorgan un alivio temporal de los síntomas de la enfermedad. A pesar de la intensiva investigación en el área, los tratamientos actuales siguen siendo paliativos y están, en su mayoría, enfocados en mejorar la calidad de vida de los pacientes, ya que ninguno de estos detiene la neurodegeneración progresiva en el cerebro de los pacientes (revisado en Poewe, Mahlknecht y col. 2012).

Una de las principales preocupaciones en el campo de la neurodegeneración asociada a la EP, es entender los mecanismos moleculares involucrados en la vulnerabilidad selectiva de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc. Varios procesos patogénicos se han propuesto como posibles contribuyentes en la muerte de las neuronas dopaminérgicas observada, entre ellos se encuentran el estrés oxidativo, la desregulación en la homeostasis del calcio, la disfunción mitocondrial, la alteración del tráfico entre el RE y el aparato de Golgi, la desregulación en la mitofagia y la degradación proteosomal, entre otros (revisado en Dauer y Przedborski 2003).

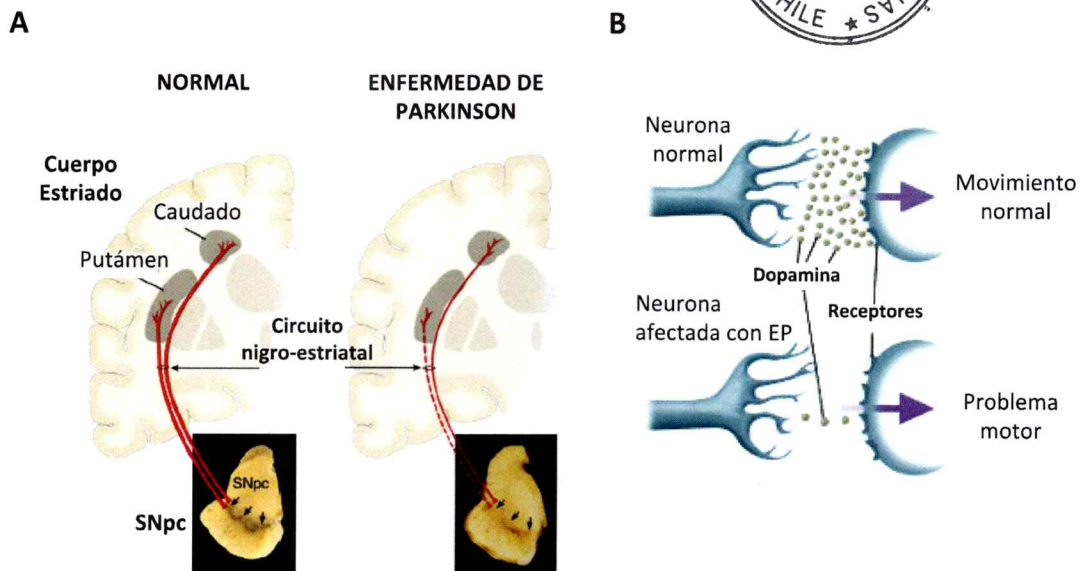


Figura 1: Esquema simplificado del circuito neuronal nigro-estriatal afectado en la enfermedad de Parkinson. A) Los cuerpos neuronales dopaminérgicos ubicados en la *Substantia Nigra pars compacta* (SNpc) proyectan sus axones (coloreados en rojo) hasta el cuerpo estriado (formado por el Caudado y el Putamen en humanos) en donde liberan el neurotransmisor dopamina. En los individuos afectados por la EP este circuito está alterado debido a la muerte selectiva de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc. **B)** En condiciones normales las neuronas dopaminérgicas liberan el neurotransmisor dopamina a través de sus terminales axonales localizados en el cuerpo estriado, permitiendo así la ejecución y el control de los movimientos voluntarios. En los pacientes afectados con la EP, la cantidad neta de dopamina en el cuerpo estriado disminuye considerablemente debido a la muerte de las neuronas que la producen, dando como resultado los problemas en la ejecución y en el control de los movimientos voluntarios, característicos de esta patología. La figura fue modificada de "Parkinson's Disease: Mechanisms and Models" de los autores Dauer y Przedborski, *Neuron*, 2003.

A pesar de que más del 90 % de los casos de la EP son esporádicos y de causa desconocida, se ha demostrado que mutaciones en distintos genes pueden desencadenar el desarrollo de síndromes de Parkinson familiar. A pesar de que la identificación de estas mutaciones ha permitido profundizar en el estudio de los mecanismos moleculares de la patología, estas mutaciones heredables representan sólo el 5 % de los casos totales de la EP (revisado en Martin, Dawson y col. 2011). Mutaciones en dos de estos genes, LRRK2 (del inglés *leucine-rich repeat serine/threonine kinase 2*) y α -sin, son el foco de intensa investigación ya que son las únicas causas conocidas del Parkinson familiar que se heredan de forma autosómica-dominante. Por ejemplo, se sabe que el 2 % de los casos totales de la EP se deben a mutaciones en el gen LRRK2, representando la variante genética más común de esta enfermedad. Por otra parte, mutaciones puntuales (A53T, A30P y E46K), así como también duplicaciones y triplicaciones del gen de la α -sin, han sido asociadas a formas familiares de la enfermedad (revisado en Martin, Dawson y col. 2011).

Debido a que los cuerpos de Lewy, presentes en los cerebros de los pacientes con la EP esporádica o familiar, están enriquecidos en agregados fibrilares de la proteína α -sin, por muchos años se postuló que estos agregados representaban la conformación neurotóxica de la proteína (Masliah, Rockenstein y col. 2000, Giasson, Duda y col. 2002, Lee, Stirling y col. 2002). Sin embargo, evidencia más reciente indica que las formas oligoméricas de la α -sin, las que son las precursoras de los agregados fibrilares, son altamente difusibles y neurotóxicas (Luk, Song y col. 2009, Waxman and Giasson 2009). Más aún, varios estudios en modelos celulares y animales, así como también hallazgos en tejido *post-mortem* de pacientes con la EP, indican que la transferencia célula-célula y la propagación de α -sin podría ser un evento clave en la naturaleza progresiva de esta patología (revisado en Soto 2012).

La acumulación de proteínas mal plegadas en el cerebro es una característica que comparten varios desórdenes neurodegenerativos, incluyendo la enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad de Huntington (EH) y la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) (revisado en Matus, Glimcher y col. 2011). Estas enfermedades son clasificadas como desórdenes de mal plegamiento de proteínas (PMDs del inglés *protein misfolding disorders*) (revisado en Soto 2003). Aunque las poblaciones neuronales y las funciones neurológicas específicas afectadas en cada PMDs son diferentes, la evidencia proveniente de distintos modelos experimentales sugiere que las alteraciones en la función del RE serían un fenómeno común en todas ellas (revisado en Roussel,

Kruppa y col. 2013). A pesar de que aún no existe un consenso sobre los posibles eventos moleculares comunes que subyacen las formas esporádicas y familiares de la EP, estudios provenientes de diferentes laboratorios sugieren una contribución central del estrés de RE en la muerte de las neuronas dopaminérgicas característica de esta enfermedad (revisado en Mercado, Valdes y col. 2013).

6.2 El estrés de RE y la respuesta a proteínas mal plegadas o UPR.

Se ha propuesto que las alteraciones en el RE podrían ser uno de los mecanismos involucrados en la muerte neuronal selectiva observada en la EP. La homeostasis del RE puede ser alterada por una serie de condiciones, incluyendo por ejemplo la disminución del calcio en su lumen, el estrés oxidativo, las expresión de proteínas mutadas que trafican a través de la vía secretora, entre otras. Todas estas perturbaciones pueden generar una disfunción en el proceso del plegamiento de las proteínas dentro del RE, resultando en la acumulación de proteínas desplegadas o mal plegadas, condición denominada como estrés de RE (revisado en Hetz 2012).

El estrés de RE desencadena la activación de una respuesta celular denominada respuesta a proteínas desplegadas o UPR, de su sigla en inglés *unfolded protein response*, la cual corresponde a una compleja red de transducción de señales que media la adaptación celular restableciendo la homeostasis del RE (revisado en Hetz 2012). En etapas tempranas la UPR promueve una respuesta celular adaptativa, sin embargo bajo condiciones crónicas de estrés de RE, la homeostasis no se recupera, desencadenando la muerte celular por apoptosis, lo que elimina a las células dañadas irreversiblemente (revisado en Tabas y Ron 2011).

En las células de mamíferos, la UPR es iniciada por la activación de tres sensores de estrés localizados en la membrana del RE denominados PERK (del inglés *double-stranded RNA-activated protein kinase-like ER kinase*), ATF6 (del inglés *activating transcription factor 6*) e IRE1 α (del inglés *inositol-requiring kinase 1 α*). El mecanismo por el cual estas proteínas detectan el estrés en el RE no está totalmente dilucidado. Uno de los modelos más ampliamente aceptados involucra el reconocimiento de proteínas desplegadas o mal plegadas por la chaperona del RE Grp78/BiP, generando así su disociación desde el dominio luminal de estos sensores y liberándolos de esta forma de su interacción represiva (Kimata y Kohno 2011). Una vez activados, estos tres sensores

transmiten la información acerca del estado del plegamiento de las proteínas en el RE hacia el núcleo mediante el control de la expresión de factores de transcripción específicos, que regulan positivamente la expresión de una variedad de genes con funciones en prácticamente todos los aspectos de la vía secretora (figura 2) (revisado en Walter y Ron 2011).

IRE1 α es una serina treonina kinasa y endoribonucleasa la cual, una vez activada, cataliza el procesamiento no convencional del ARN mensajero (ARNm) que codifica para el factor de transcripción XBP1 (del inglés *X-box binding protein 1*). Este procesamiento genera un cambio en el marco de lectura de este ARNm, lo que resulta en la expresión de un factor de transcripción más estable y activo denominado XBP1s (figura 2) (Yoshida, Matsui y col. 2001). XBP1s regula la expresión de un subgrupo de genes blanco de la UPR relacionados con la biogénesis del RE y del aparato de Golgi, así como también con el plegamiento proteico y la degradación de las proteínas asociada al RE (ERAD, del inglés *ER-associated degradation*) (revisado en Hetz 2012). IRE1 α también genera señales en el citoplasma mediante la unión de proteínas adaptadoras, las cuales gatillan la activación de vías de señalización de alarma tales como 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*) (Urano, Wang y col. 2000, Hu, Han y col. 2006). Estos eventos de señalización tienen un impacto directo en diversos procesos celulares tales como la autofagia, la apoptosis y la respuesta inflamatoria. Adicionalmente, IRE1 α puede degradar selectivamente los ARNm que codifican para las proteínas difíciles de plegar y micro ARNs lo cual contribuye también a la regulación de distintos procesos celulares (Hollien y Weissman 2006, Han, Lerner y col. 2009, Hollien, Lin y col. 2009).

El sensor ATF6 es una proteína de transmembrana localizada en el RE. Una vez disociada de la chaperona BiP, ATF6 transloca al aparato de Golgi en donde sufre un procesamiento proteolítico que libera su dominio citoplasmático que contiene un transcripción activo denominado ATF6f (figura 2). ATF6f es importado al núcleo en donde, de manera independiente o en sinergia con XBP1s, induce la expresión de un grupo de genes involucrados en el control de calidad de las proteínas (Haze, Yoshida y col. 1999, Yamamoto, Sato y col. 2007).

PERK una vez activado fosforila al factor iniciador de la traducción eIF2 α (del inglés *eukariotic initiation factor 2 α*), lo que resulta en su inactivación y por lo tanto en una atenuación global de la traducción de las proteínas (Harding, Novoa y col. 2000). Este es otro mecanismo que

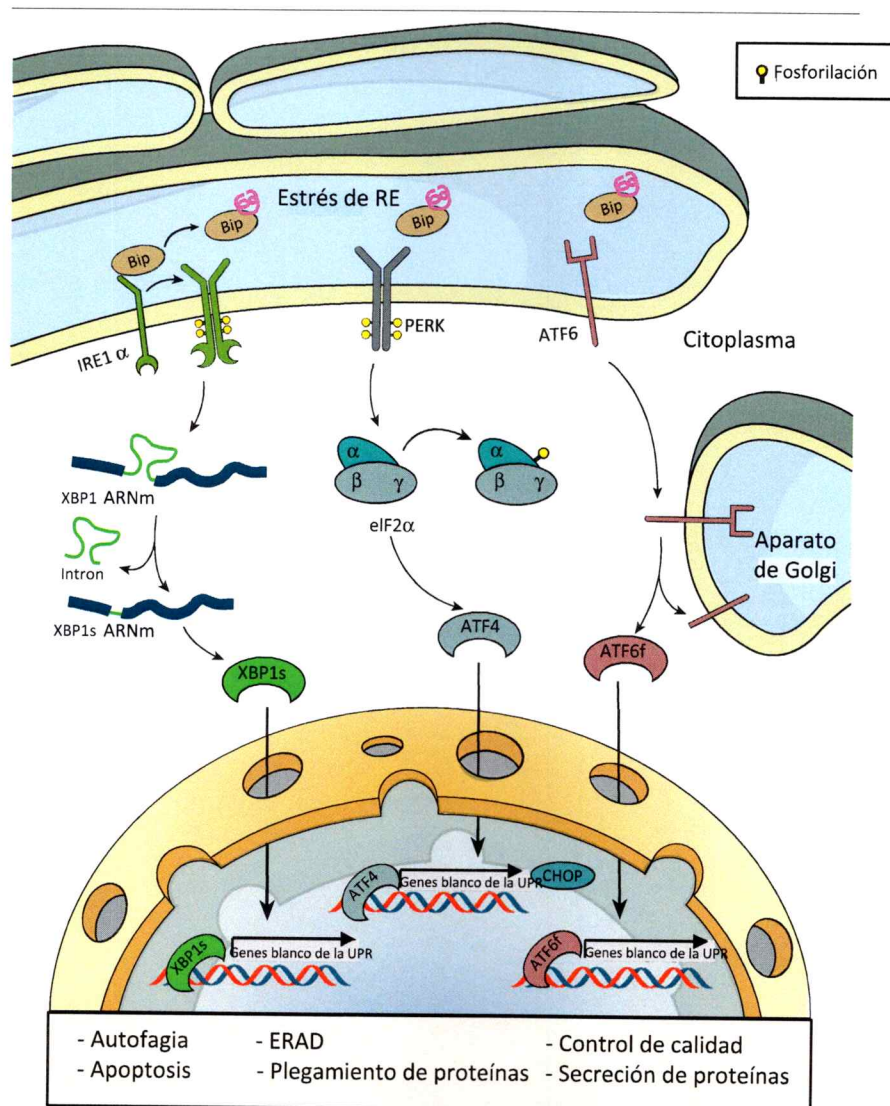


Figura 2: Respuesta a proteínas mal plegadas (UPR). La acumulación de proteínas desplegadas o mal plegadas en el lumen del RE desencadena la activación de los sensores de estrés IRE1 α , PERK y ATF6. IRE1 α una vez activado dimeriza y se autotransfosforila activando a su dominio ARNasa. Una vez activo, IRE1 α procesa el ARNm de *xbp1*, un factor transcripcional que regula la expresión de varios genes esenciales de la UPR. La activación de PERK inhibe la traducción global de las proteínas a través de la fosforilación del factor iniciador de la traducción eIF2 α . pEIF2 α activa la traducción del ARNm de ATF4, un factor transcripcional involucrado en la expresión de genes relacionados con el metabolismo de oxido-reducción celular, la apoptosis, entre otros. En condiciones de estrés de RE, ATF6 es procesado en el aparato de Golgi, liberando su dominio citoplasmático el cual es un factor transcripcional que puede ser translocado al núcleo, activando la expresión de chaperonas de RE y genes involucrados en la degradación de proteínas asociada al RE (ERAD). La figura fue modificada de la revisión "An ERcentric view of Parkinson's disease" de los autores Mercado G, Valdés P y Hetz C, Trends in Molecular Medicine, 2013

contribuye a la disminución de la sobrecarga de las proteínas en el RE. Sin embargo, la fosforilación de eIF2 α permite la traducción específica del factor de transcripción ATF4 (del inglés *activating transcription factor 4*), el cual regula positivamente la expresión de los genes blanco involucrados en el control del estado de oxido-reducción celular, en el metabolismo de aminoácidos y en el plegamiento de las proteínas (Harding, Zhang y col. 2003, revisado en Ameri y Harris 2008). Bajo condiciones de estrés de RE persistentes o severas, ATF4 contribuye a la inducción de la muerte celular mediante el control transcripcional de algunos miembros proapoptóticos de la familia BCL-2, incluyendo PUMA y BIM, además de GADD34 y CHOP (revisado en Woehlbier and Hetz 2011).

En resumen, la UPR es una red de señalización global que integra la información sobre la intensidad y niveles de expresión de las proteínas y estrés de RE, controlando finamente el destino celular a través de una variedad de mecanismos complementarios.

6.3 Estrés de RE y la EP.

Hasta la fecha existe variada evidencia a favor de que el estrés de RE y la activación de la UPR podrían ser parte de los procesos celulares involucrados en la degeneración neuronal observada en la EP. Dentro de estas evidencias resultan particularmente interesantes por su relevancia, las observaciones descritas en tejidos *post-mortem* derivados de pacientes con la EP. El primer estudio en el cual se observó la presencia de algunos marcadores de la UPR en tejido *post-mortem* reveló la presencia de inmunoreactividad para PERK y eIF2 α fosforilados en neuronas dopaminérgicas de la SNpc (Hoozemans, van Haastert y col. 2007). Estas neuronas además resultaron positivas para inclusiones de la proteína α -sin, sugiriendo que la agregación de esta proteína y la activación de la UPR son eventos que ocurren en una misma neurona (figura 3). Posteriormente, otros estudios demostraron que los marcadores de estrés de RE Herp, BiP y PDip están sobreexpresados en la SNpc de los pacientes con la EP y además colocalizan con los cuerpos de Lewy (figura 3) (Conn, Gao y col. 2004, Slodzinski, Moran y col. 2009, Selvaraj, Sun y col. 2012). Aunque estos estudios sugieren la existencia de estrés de RE en las neuronas dopaminérgicas afectadas en la EP, aún no existe una caracterización extensa de los marcadores de estrés ni de las señales más proximales de la UPR tales como ATF6 e IRE1 α .

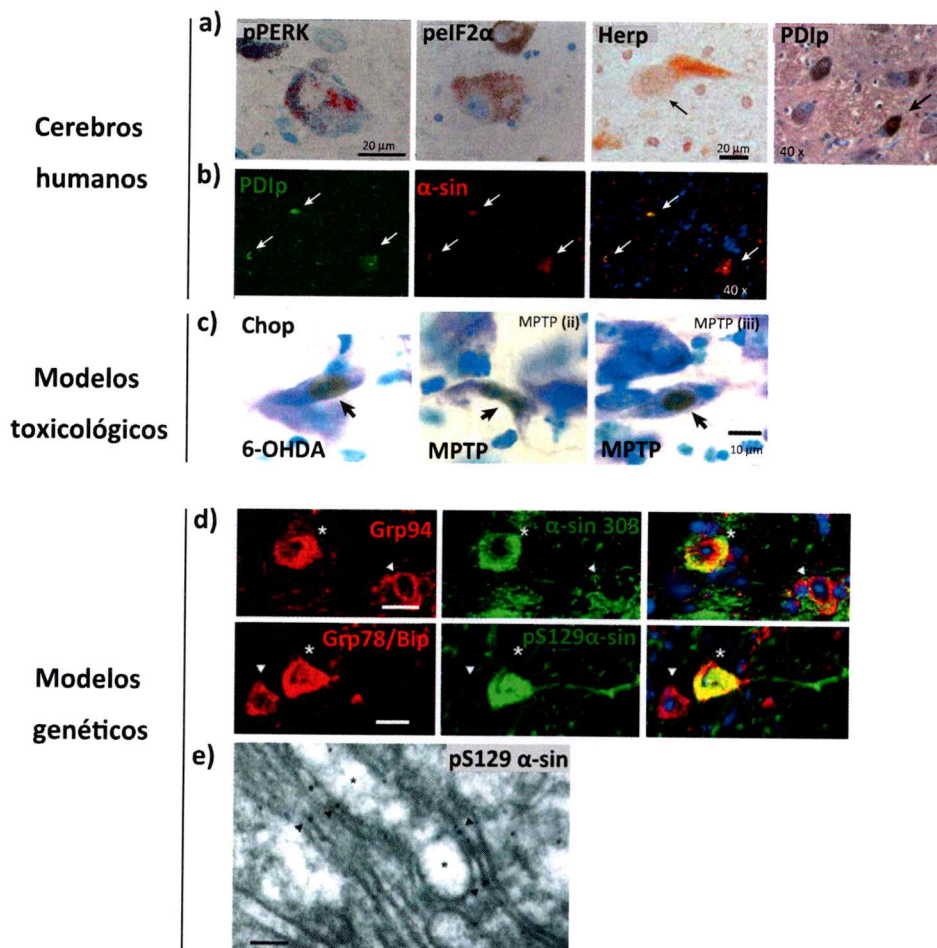


Figura 3: Marcadores de estrés de RE y activación de la UPR en tejido *post mortem* y en modelos animales de la EP. a) Detección inmunohistoquímica de pPERK, pEIF2α, Herp y PDip en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc en individuos con la EP. Las flechas indican neuronas positivas para la marca. b) Co-expresión de las proteínas α-sin (rojo) y PDip (verde) en los cuerpos de Lewi (flechas) de la SNpc de tejido proveniente de pacientes afectados con la EP. En amarillo se muestran las áreas en las que se encuentran ambas proteínas. c) Detección inmunohistoquímica de CHOP en la SNpc de ratones WT adultos inyectados con la neurotoxina 6-OHDA o MPTP según se indica. d) Expresión de las chaperonas Grp94 o Grp78/Bip en células que presentan depósitos de la proteína α-sin en la corteza de los ratones transgénicos para α-sin A53T. Los cortes fueron utilizados para la inmunodetección doble 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) Detección mediante inmuno oro de pS129/α-sin y microscopía electrónica de cortes de médula espinal de ratones transgénicos para α-sin A53T. La figura fue modificada de la revisión "An ERcentric view of Parkinson's disease" de los autores Mercado G, Valdés P y Hetz C, Trends in Molecular Medicine, 2013.

Debido a la gran cantidad de modelos que se utilizan en el estudio de la EP, en las siguientes dos secciones se entregará información relevante acerca de la presencia de marcadores estrés de RE y de la activación de la UPR en modelos experimentales de la EP, clasificándolos como modelos genéticos y farmacológicos.

Estrés de RE en modelos genéticos de la EP.

Como mencionamos previamente uno de los genes relacionados con la EP más estudiados es el de la proteína α -sin. Con el objetivo de estudiar los posibles mecanismos patogénicos involucrados en la neurodegeneración se han generado una serie de modelos celulares y animales mediante la sobreexpresión de esta proteína en sus formas WT o mutante (revisado en Dauer y Przedborski 2003). Se ha demostrado que la sobreexpresión de α -sin mutante en cultivos celulares induce estrés de RE crónico, desencadenando la activación de la UPR y la concomitante muerte neuronal (Smith, Jiang y col. 2005). Por otra parte, también se ha observado que el estrés de RE induce un incremento en la agregación de la proteína α -sin, sugiriendo la existencia de un círculo de retroalimentación entre ambos fenómenos, tal como ocurre en otras PMDs (revisado en Saxena y Caroni 2011). Más interesante aún ha sido la observación de que ciertos marcadores de estrés de RE como BiP, ATF4, CHOP y XBP1 se encuentran sobreexpresados en los cerebros de los ratones transgénicos para la α -sin (Bellucci, Navarria y col. 2011, Belal, Ameli y col. 2012, Colla, Coune y col. 2012), apoyando la hipótesis de que el estrés de RE y la agregación de la α -sin serían dos fenómenos relacionados.

Recientemente, un grupo de investigación describió en más detalle la relación entre la acumulación de la α -sin y el estrés de RE. En ratones transgénicos que sobreexpresan la α -sin se detectó la presencia de las formas oligoméricas tóxicas de esta proteína en el RE, las cuales interactúan con las chaperonas BiP y Grp94, correlacionándose además con la generación de estrés de RE (figura 3) (Colla, Coune y col. 2012, Colla, Jensen y col. 2012). Estos resultados fueron además validados en tejido *post-mortem* proveniente de pacientes con la EP (Colla, Coune y col. 2012). Estos estudios posicionaron al RE como el posible sitio de generación y acumulación de las especies neurotóxicas de la α -sin sugiriendo de esta forma un posible mecanismo patogénico en el cual formas anormales de la proteína podrían secuestrar algunas chaperonas y foldasas del lumen

del RE, generando alteraciones en la maquinaria de plegamiento, desencadenando estrés de RE y la concomitante activación de la UPR.

Algunos años atrás, otro grupo de investigación describió que la sobreexpresión de la α -sin interrumpe el tráfico de las proteínas entre el RE y el aparato de Golgi, generando la acumulación de las proteínas en vía de síntesis en el RE e induciendo así una condición de estrés (Cooper, Gitler y col. 2006). Específicamente, la α -sin secuestraría a la GTPasa Rab1, lo cual tendría efectos directos sobre el transporte de las vesículas entre ambos organelos (Thayanidhi, Helm y col. 2010). Es interesante destacar que las alteraciones en el tráfico vesicular entre el RE y el aparato de Golgi generadas por la sobreexpresión de la α -sin también afectan la función mitocondrial, el cual constituye otro fenómeno clave en esta patología (Su, Auluck y col. 2010). Por otra parte, las alteraciones en los niveles del calcio reticular tienen un efecto de retroalimentación positiva sobre la agregación de la α -sin, desencadenando una condición de estrés de RE crónica en modelos celulares de la EP (Belal, Ameli y col. 2012). Un resultado similar se obtuvo al analizar los cerebros de ratones transgénicos para la α -sin y tejidos *post mortem* derivados de pacientes afectados con la EP. En estos estudios se observó que la disfunción de un canal de calcio del RE se correlaciona con aumentos en la expresión de algunos marcadores de estrés (Belal, Ameli y col. 2012, Selvaraj, Sun y col. 2012). En conjunto, esta evidencia sugiere que la disfunción del ER causado por la sobreexpresión de la α -sin contribuye a la patogénesis de la EP .

Mutaciones en el gen de la serina/treonina kinasa LRRK2 son la causa genética más frecuente identificada en pacientes con la EP. Interesantemente, LRRK2 colocaliza parcialmente con el RE en las neuronas dopaminérgicas de pacientes con la EP (Vitte, Traver y col. 2010). Aunque la función de la LRRK2 aún no ha sido determinada, 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-hidroxi dopamina (6-OHDA) (Yuan, Cao y col. 2011). Además, esta neuroprotección está mediada, en parte, por la regulación positiva de BiP a través de la vía de p38 (Yuan, Cao y col. 2011). Adicionalmente, la deficiencia del homólogo de la LRRK2 en *C. elegans* induce una neurodegeneración espontánea e hipersensibilidad al estrés de RE experimental (Samann, Hegermann y col. 2009). Sin embargo, esta evidencia es correlativa y la posible contribución del estrés de RE a la patogénesis mediada por mutaciones en la proteína LRRK2 en células de mamífero aún no ha sido explorada. Al diferencia de α -sin y LRRK2, para el resto de los

genes cuyas mutaciones han sido identificadas en formas familiares de la EP existe poca evidencia sobre a su posible relación con el RE, donde casi no existen validaciones *in vivo* (revisado en Mercado, Valdes y col. 2013).

Estrés de RE en modelos toxicológicos de la EP.

Debido a que la mayoría de los casos de la EP son esporádicos y no tienen un componente genético asociado, se han desarrollado modelos toxicológicos de esta enfermedad, los cuales se basan en la utilización de neurotoxinas que emulan la muerte selectiva de las neuronas dopaminérgicas observada en la patología (revisado en Dauer y Przedborski 2003). Las neurotoxinas utilizadas comúnmente en modelos animales de la EP son el 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), la 6-OHDA, el insecticida rotenona y el herbicida paraquat. Todos estos compuestos inducen la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc y se ha descrito que el posible mecanismo patogénico involucrado en su toxicidad es la generación de estrés oxidativo (revisado en Dauer and Przedborski 2003).

Una década atrás, dos estudios de perfiles de expresión génica identificaron a la UPR como uno de los principales procesos inducidos por la exposición de cultivos celulares a neurotoxinas que inducen la EP (Ryu, Harding y col. 2002, Holtz y O'Malley 2003). En estos dos estudios se utilizaron las toxinas MPTP, 6-OHDA y rotenona, se observó una clara activación de las vías de la UPR mediadas por PERK e IRE1 α . Posteriormente, otros grupos de investigación confirmaron estos resultados usando otros modelos toxicológicos de la EP (revisado en Matus, Glimcher y col. 2011). A nivel del mecanismo involucrado en la toxicidad de estos compuestos, tanto la disfunción mitocondrial como el estrés oxidativo desencadenados por la exposición a estas neurotoxinas pueden causar estrés de RE, debido al daño oxidativo generado en las proteínas residentes del RE (Holtz, Turetzky y col. 2006). Por ejemplo, la S-nitrosilación de la proteína disulfuro isomerasa (PDI), una foldasa de RE, observada en tejido *post-mortem* derivado de pacientes con la EP y en cultivos celulares expuestos a ciertas neurotoxinas, resulta en una pérdida de su actividad foldasa, desencadenando la muerte neuronal (Uehara, Nakamura y col. 2006, Andreu, Woehlbier y col. 2012). En resumen, existen variados estudios en modelos farmacológicos de la EP en los que se observa la presencia de estrés de RE en las neuronas dopaminérgicas, sin embargo son muy pocos

los estudios que evalúan *in vivo* la contribución de este estrés a la degeneración inducida por las neurotoxinas.

En conjunto la información proveniente tanto de estudios en modelos genéticos como en modelos toxicológicos de la EP, han permitido proponer que el estrés de RE y la activación de la UPR podrían ser procesos patológicos en esta enfermedad que contribuyen a la muerte de las neuronas dopaminérgicas.

6.4 Manipulación de los componentes de la UPR en modelos experimentales de la EP.

Debido a la gran cantidad de evidencia que correlaciona la activación de la UPR con la degeneración de las neuronas dopaminérgicas en la EP, la manipulación genética de algunos componentes de estas vías de señalización en modelos experimentales de la EP ha permitido definir la contribución funcional de éstos en la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas. Por ejemplo, en modelos farmacológicos, la acumulación de inclusiones positivas para la proteína ubiquitina y la pérdida de las neuronas dopaminérgicas inducida por la neurotoxina MPTP aumenta en los ratones deficientes para ATF6 α , sugiriendo que la activación de la UPR es necesaria para mantener la homeostasis proteica en las neuronas dopaminérgicas de este modelo (Egawa, Yamamoto y col. 2011, Hashida, Kitao y col. 2012). De forma similar, la deficiencia del factor proapoptótico CHOP protege a las neuronas dopaminérgicas frente a la exposición a la 6-OHDA o a MPTP en diferentes condiciones experimentales *in vivo* (Silva, Ries y col. 2005), sugiriendo que la activación de PERK podría participar en la muerte de las neuronas en este modelo experimental.

Mediante el uso de herramientas de terapia génica, se ha explorado la participación de otros factores de la UPR en modelos de la EP. La sobreexpresión del factor transcripcional de la UPR XBP1s, mediante la inyección de vectores adenovirales en el cuerpo estriado, genera protección parcial frente a la neurotoxicidad inducida por MPTP en ratas (Sado, Yamasaki y col. 2009). En este estudio los autores demostraron que la sobreexpresión localizada de XBP1s disminuye la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc. En un estudio más reciente, basado en un modelo genético de la EP en ratas, los autores demostraron que la sobreexpresión de la chaperona de RE BiP, mediante la inyección de vectores virales adenoasociados (AAV) en la

SNpc, protege frente a la toxicidad inducida por la sobreexpresión de la α -sin, probablemente debido a la disminución de los niveles de estrés de RE. En este estudio los autores co-inyectaron los vectores virales portadores del gen patogénico (α -sin) y los portadores del gen terapéutico (chaperona BiP) (Gorbatyuk, Shabashvili y col. 2012). En este caso, la sobreexpresión de BiP disminuye la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc inducida por α -sin, resultando en una restitución de los niveles de dopamina en el cuerpo estriado y una mejora en las alteraciones motoras observadas en las ratas. Estos dos estudios aportaron la primera evidencia de que la manipulación de componentes de la UPR en animales adultos podría ser utilizada como herramienta terapéutica en otros modelos de esta enfermedad.

La manipulación farmacológica del estrés de RE en modelos experimentales de la EP ha sido otro campo interesante de estudio. En este caso encontramos por ejemplo el uso del compuesto Salubrinal, que es una molécula pequeña que incrementa la fosforilación de eIF2 α mediante la inhibición de la fosfatasa PP1 (Boyce, Bryant y col. 2005). Se ha descrito, que Salubrinal protege parcialmente de la apoptosis en modelos celulares de la EP, y en ratas produce tanto un retardo en la aparición y una atenuación de los déficit motores inducidos por la sobreexpresión de la proteína α -sin en la SNpc (Colla, Coune y col. 2012). Sin embargo, este compuesto no produjo un efecto significativo en la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc. Un efecto similar se observó en ratones transgénicos para la α -sin tratados con Salubrinal, lo que fue asociado a aumentos en la expresión de genes blanco de la UPR tales como la chaperona BiP (Colla, Coune y col. 2012). También se observó que otro compuesto farmacológico, metoxiflavona, incrementa los niveles de BiP en ratones tratados lo cual reduce la pérdida de neuronas dopaminérgicas generada por la exposición a la neurotoxina MPTP (Takano, Tabata y col. 2007).

Existe otro tipo de compuestos, denominados chaperonas químicas, cuyo mecanismo de acción es desconocido, pero se sabe que disminuyen los niveles de estrés de RE en modelos experimentales de varias enfermedades neurodegenerativas incluyendo la EP (revisado en Matus, Glimcher y col. 2011). Por ejemplo, la chaperona química 4-fenilbutirato (4-PBA) protege contra la neurodegeneración inducida por la sobreexpresión de la α -sin en ratones (Inden, Kitamura y col. 2007, Ono, Ikemoto y col. 2009). De manera similar, la chaperona química, ácido tauroursodeoxicólico (TUDCA) incrementa la supervivencia neuronal en ratas tratadas con la

neurotoxina MPTP (Duan, Rodrigues y col. 2002, Castro-Caldas, Carvalho y col. 2012). A pesar de estos interesantes resultados, en ninguno de estos estudios se demostró que la protección neuronal observada esté mediada por una disminución de los niveles de estrés de RE.

En resumen, existe evidencia que sugiere un posible rol funcional del estrés de RE y componentes de la UPR en diferentes modelos de la EP. Sin embargo, aún queda por aclarar los mecanismos que relacionan estas vías de señalización celular con el funcionamiento de las neuronas dopaminérgicas en un contexto fisiológico y patológico.

6.6 Función de XBP1 en el sistema nervioso central.

La vía de señalización de la UPR más conservada en la evolución es la de IRE1 α /XBP1, por lo que resulta de gran interés conocer su rol específico en condiciones fisiológicas y patológicas. Se ha descrito que la activación de esta vía de respuesta a estrés de RE es fundamental en la mantención de ciertos tipos celulares. Por ejemplo, el procesamiento del ARNm de *xbp1* es necesario para el correcto funcionamiento de células secretoras altamente especializadas tales como las células B plasmáticas, las células β pancreáticas y las células de las glándulas salivales (Reimold, Iwakoshi y col. 2001, Iwakoshi, Lee y col. 2003, Lee, Chu y col. 2005, Lee, Heidtman y col. 2011). En otros tejidos tales como hígado, la función de XBP1 es clave en la fisiología de los hepatocitos (Reimold, Etkin y col. 2000, Lee, Scapa y col. 2008), mientras que en el epitelio gástrico este factor transcripcional es crucial en la diferenciación de este tejido (Huh, Esen y col. 2010).

A pesar de la extensa información acerca del rol de XBP1 en células secretoras, la función de este factor transcripcional en células del sistema nervioso central (SNC) aún no ha sido dilucidada. Existen algunos estudios en los que se ha explorado el posible rol de XBP1 en la fisiología de las neuronas. Por ejemplo, se ha descrito que polimorfismos en el gen de *xbp1* son un factor de riesgo para el desarrollo del desorden bipolar, la esquizofrenia y la EA en ciertas poblaciones japonesas y chinas (Kakiuchi, Iwamoto y col. 2003, Chen, Duan y col. 2004, Hou, Yen y col. 2004, Kakiuchi, Ishiwata y col. 2004, Jonsson, Cichon y col. 2006, Watanabe, Fukui y col. 2006, Liu, Wang y col. 2013). También se ha descrito que XBP1 regula la expresión de *Wsf1* en células SHSY5Y, el cual es una de las causas genéticas de la enfermedad de Wolfram, que normalmente

acompaña a los desórdenes mentales (Kakiuchi, Ishiwata y col. 2006). En términos conductuales, el ratón heterocigoto para XBP1 presenta alteraciones en ciertos test de comportamiento, lo que se correlaciona con una desregulación en la expresión de varios genes en hipocampo y corteza prefrontal (Takata, Kakiuchi y col. 2010). Por otra parte, un estudio en *C. elegans* demostró que XBP1 es necesario para la salida del receptor de glutamato desde el RE hacia la vía secretora y para su inserción en la membrana plasmática (Shim, Umemura y col. 2004). Mas aún, en cultivos primarios de neuronas corticales derivados de los embriones de ratones deficientes para XBP1 se observó una disminución en el crecimiento de las neuritas inducido por BDNF (Hayashi, Kasahara y col. 2007), probablemente debido a una desregulación en la expresión de marcadores gabaérgico, indicando que XBP1 contribuye al desarrollo de estas neuronas.

Nuestro laboratorio junto con otros grupos de investigación han estudiado el posible rol de XBP1 distintas enfermedades neurodegenerativas. Dos estudios demostraron que la deficiencia de XBP1 en el SNC protege frente a la neurodegeneración en modelos de la ELA y la EH en ratones, lo cual se correlacionó con un incremento en la vía degradativa de la autofagia (Hetz, Thielen y col. 2009, Vidal, Figueroa y col. 2012). Sin embargo, en un modelo de la enfermedad de prion en ratones, la deficiencia de este factor transcripcional de la UPR no tuvo efecto en la progresión de la patología (Hetz, Lee y col. 2008). Otros trabajos, sin embargo, han demostrado que la sobreexpresión de XBP1s es protectora en modelos animales de la EH, la EA, en un modelo de daño a la médula espinal y en un modelo de daño axonal y degeneración del ganglio retinal (Casas-Tinto, Zhang y col. 2011, Hu, Park y col. 2012, Valenzuela, Collyer y col. 2012, Zuleta, Vidal y col. 2012). Sumado a estos antecedentes, en un modelo toxicológico de la EP en ratón, la sobreexpresión de XBP1s tiene efectos protectores en la sobrevivencia de las neuronas dopaminérgicas expuestas a MPTP (Sado, Yamasaki y col. 2009).

Es interesante destacar que debido a los efectos contrapuestos obtenidos en variados modelos animales de enfermedades neurodegenerativas, no es posible predecir la consecuencia que tendrá la manipulación de la expresión de XBP1 en la fisiología de las neuronas. Debido además a la evidencia que apoya la posible participación de la UPR en la muerte de las neuronas dopaminérgicas en modelos experimentales de la EP, nos parece relevante explorar la contribución de este XBP1 en la funcionalidad y sobrevivencia de las neuronas dopaminérgicas en

condiciones basales y patológicas relacionadas con la EP. Por este motivo, en este trabajo se plantea la siguiente hipótesis:

7. Hipótesis.

La deficiencia de XBP1 disminuye la viabilidad de las neuronas dopaminérgicas de la *Substantia Nigra pars compacta* frente a la exposición de la neurotoxina 6-hidroxidopamina, asociado a un aumento en los niveles de estrés de retículo endoplasmático.

8. Objetivo general.

Evaluar si la modulación de los niveles de XBP1 afecta la viabilidad de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc de los ratones en condiciones basales y frente a la neurotoxina 6-OHDA.

9. Objetivos específicos.

Objetivo específico 1: Evaluar en condiciones basales el número de las neuronas dopaminérgicas y los niveles de marcadores de estrés de RE en la SNpc en ratones deficientes para XBP1 en el sistema nervioso central (SNC) y ratones WT.

Objetivo específico 2: Analizar la susceptibilidad de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc frente a la neurotoxina 6-OHDA en ratones deficientes para XBP1 en el SNC y ratones WT.

Objetivo específico 3: Estudiar el efecto de la regulación negativa de XBP1 en la SNpc de ratones adultos en la sobrevivencia y el estrés de RE de las neuronas dopaminérgicas.

10. Materiales y métodos.

Materiales.

Tunicamicina (Tm) fue adquirida en Calbiochem EMB Bioscience Inc. El medio de cultivo, los sueros fetales bovinos y los antibióticos se obtuvieron en Life Technologies. Las sondas fluorescentes Hoechst y los anticuerpos secundarios acoplados a fluoróforos ALEXA se adquirieron en Molecular Probes, Invitrogen. La 6-OHDA y el ácido ascórbico fueron adquiridos en Sigma. Los anticuerpos secundarios biotinilados y el complejo avidina-biotina fueron adquiridos en Vector Laboratories.

Animales.

Para los experimentos se utilizaron ratones WT de la cepa C57BL/6 machos de 3 meses de edad y ratones XBP1 WT y XBP1 KO de la cepa C57BL/6 machos de 3 y 6 meses de edad. Todos los experimentos realizados en animales fueron previamente aprobados por el comité de bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Cultivo celular

Las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y (ATCC CRL-2266) fueron cultivadas en medio MEM-F12 suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB) y mantenidas en una incubadora bajo condiciones controladas de temperatura (37°C) y dióxido de carbono (5 %). Para los experimentos de viabilidad celular utilizamos el kit de MTT (Promega, USA) basado en la capacidad reductora de la mitocondria. Las células fueron sembradas en placas de 96 pozos e incubadas con 6-OHDA a las concentraciones de 1, 10, 50 y 100 μ M durante 16 h. A continuación las células fueron incubadas con el sustrato MTT siguiendo las recomendaciones del fabricante y se determinó la absorbancia a 570 nm. Los resultados fueron mostrados como el porcentaje de viabilidad respecto a las células no tratadas. Para la evaluación del procesamiento del ARNm de *xbp1* las células fueron sembradas en placas de 6 pozos e incubadas con 6-OHDA a las concentraciones de 1, 10, 50 y 100 μ M durante 16 h o incubadas durante 2, 4, 8, 24 o 32 h con 10

μ M 6-OHDA. Posteriormente las células fueron colectadas para ser sometidas a la extracción de ARN.

Como control positivo de la inducción de estrés de RE en las líneas celulares se sembraron células MEFs en placas de 6 pozos las que fueron incubadas durante 16 h con 2,5 μ g/ml de Tm. Luego las células fueron colectadas para ser sometidas a extracción de ARN y proteínas.

Inyecciones estereotáxicas de 6-OHDA y Tm.

Ratones XBP1 WT o XBP1 KO machos de 3 meses de edad fueron anestesiados con una mezcla de ketamina/xilacina (ketamina: 100 mg/kg, xilacina: 10 mg/kg, Vetcom, Chile) y posicionados en un aparato estereotáxico para ratones (David Kopf Instruments, USA). Se realizaron inyecciones estereotáxicas unilaterales de 8 μ g de 6-OHDA (Sigma-Aldrich, USA) para lo cual la toxina fue preparada el día de la inyección a una concentración de 4 μ g/ μ l en ácido ascórbico al 0,02 % (Sigma-Aldrich, USA) y mantenida protegida de la luz. 2 μ l de esta solución fueron inyectados en un punto único en el cuerpo estriado derecho utilizando una jeringa Hamilton (Hamilton, USA) de 5 μ l, siguiendo las siguientes coordenadas según el atlas de cerebro de ratón de Franklin y Paxinos : AP: +0,07 cm, ML: -0,17 cm y DV: -0,31 cm (segunda edición, 2001). La inyección fue realizada a una velocidad de 0,5 μ l/min y la aguja fue dejada en el sitio después de la inyección durante 5 min. Posteriormente, la aguja fue retirada a una velocidad de 0,1 cm/min. Los ratones fueron sacrificados 7 días post inyección para en análisis histológico.

Para inducir estrés de RE *in vivo* se inyectaron ratones WT machos de 3 meses de edad directamente en la SNpc derecha (coordenadas estereotáxicas AP: -0,29 cm ML: -0,13 cm y DV: -0,42 cm) con 2 μ l de una solución de Tm 5 μ g/ μ l preparada en DMSO. Los ratones fueron sacrificados 24 h post inyección.

Inmunohistoquímica anti-Tirosina Hidroxilasa y estereología.

Los ratones fueron anestesiados y perfundidos con suero salino y posteriormente con PFA al 4 % frío. El cerebro fue removido, post-fijado con PFA al 4 % durante 16 h a 4 °C y posteriormente deshidratado con sacarosa al 30 % durante 48 h a 4 °C. Los cerebros fueron

congelados en el medio OCT (*optimal cutting temperature compound*, Tissue-Tek, USA) y utilizando un criostato (Leica, USA) se realizaron cortes coronales seriados de 25 μm de espesor abarcando completamente las áreas del cuerpo estriado y del cerebro medio, este último incluyendo la SNpc. Posteriormente los cortes flotantes fueron sometidos a una IHC para el marcador dopaminérgico tirosina hidroxilasa (TH). Con el objetivo de bloquear la actividad de la peroxidasa endógena, los cortes fueron incubados con la solución inactivadora (H_2O_2 al 0,03 % en PBS) durante 30 min a temperatura ambiente, luego los cortes fueron incubados con la solución de bloqueo general (BSA al 5 % y Tritón X-100 al 0,2 % en PBS) durante 2 h a temperatura ambiente y 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. Al día siguiente los cortes fueron lavados e incubados con el anticuerpo secundario biotinilado (IgG-biotina 1:500, Vector Laboratories, USA) durante 2 h a temperatura ambiente. Los cortes fueron posteriormente lavados e incubados con el complejo avidina-biotina conjugado a peroxidasa (1:1000, Vector Laboratories, USA). Finalmente se reveló utilizando el cromógeno 3,3-diaminobenzidina (Sigma-Aldrich, USA) y los cortes fueron montados utilizando el medio de montaje Entellan (Sigma-Aldrich, USA). Para la cuantificación del número total de neuronas dopaminérgicas de la SNpc de los ratones XBP1 WT y XBP1 KO en condiciones basales, se utilizó la técnica de la estereología a través del método de fraccionamiento óptico con el programa computacional "*Stereo Investigator*" (MBF Bioscience, USA) (Dusonchet, Kochubey y col. 2011). Para ello se utilizó una grilla óptica de 40 x 40 μm la cual se posicionó al azar en cortes seriados de 25 μm separados cada 100 μm . Cortes espaciados cada 6 secciones fueron considerados en el análisis estereológico, cubriendo la SNpc completa. Los resultados fueron graficados como número total de neuronas TH positivas (TH^+) en la SNpc por cada hemisferio. Todas las cuantificaciones fueron realizadas siguiendo el procedimiento de doble ciego.

Inmunofluorescencia de tejido.

Para el análisis de inmunofluorescencia, cortes flotantes de cerebro medio de 25 μm de espesor, que incluyen a la SNpc, fueron lavados con PBS y luego bloqueados (BSA al 5 % y Tritón X-100 al 0,2 % en PBS) durante 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente los cortes fueron incubados con los anticuerpos primarios durante 16 h a 4 °C. Los anticuerpos y las diluciones utilizadas fueron los siguientes: TH (1:2500, Calbiochem, USA), DAT (1:200, Chemicon, USA), ERp72

(1:200, ENZO/Stressgen, USA) y NeuN (1:200, Invitrogen, USA). Al día siguiente los cortes fueron incubados durante 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente: Alexa-488 o Alexa 594 (1:1000, Molecular Probes, Invitrogen, USA). La sonda Hoechst (Invitrogen, USA) fue utilizada como marcador nuclear. Los cortes fueron montados con el medio de montaje Fluoromount (Electron Mycroscope Science, USA) y analizados por microscopía de fluorescencia o microscopía confocal utilizando un microscopio Olympus IX71 (Olympus, Center Valley, USA). Las imágenes fueron captadas utilizando la cámara QImaging QICAM Fast 1394 (Surrey, Canada).

Cuantificación del daño en los somas dopaminérgicas de la SNpc y en los terminales axonales del cuerpo estriado.

Para la determinación del daño inducido en la SNpc en los ratones inyectados con 6-OHDA, realizamos cortes seriados de cerebro medio de 25 μm de espesor separados cada 100 μm , abarcando la SNpc completa, los cuales fueron sometidos a una IHC anti-TH. Los 9 cortes obtenidos para cada ratón fueron analizados bajo el microscopio y, utilizando una grilla de 10 x 10 mm dividida en 100 cuadrantes, se contó manualmente el número de somas TH⁺ en la zona de la SNpc para cada corte de la serie en el lado inyectado y el lado control no inyectado. Con el objetivo de mostrar la distribución de los somas en toda la SNpc se graficó el promedio del número total de somas para cada corte en el lado inyectado y el lado no inyectado. Posteriormente se realizó la sumatoria de los somas TH⁺ de los cortes número 5, 6 y 7 para cada lado en cada ratón (cortes correspondiente a la zona de la SNpc entre las coordenadas AP: -0,29 y AP: -0.35 cm según el atlas de cerebro de ratón de Franklin y Paxinos, segunda edición, 2001) más el resultado del corte número 2. El resultado final se obtuvo del promedio de las sumatorias para todos los ratones por cada lado. Para la cuantificación del daño generado por la inyección de los adenovirus asociados (AAVs) se realizó la misma cuantificación manual, sin embargo para este caso se calculó la sumatoria del número de neuronas en todos los cortes seriados (corte 1 al 9, abarcando la SNpc completa) por cada ratón y el resultado final se generó del promedio de las sumatorias para todos los ratones por cada lado.

Con el objetivo de cuantificar la lesión generada en los terminales axonales dopaminérgicos en el cuerpo estriado de los ratones inyectados con 6-OHDA o con los AAVs, determinamos la inervación dopaminérgica en el cuerpo estriado. Para ello se realizaron cortes

seriados de 25 μm de espesor abarcando todo el cuerpo estriado, uno de cada 5 cortes fueron sometidos a una IHC anti-TH y posteriormente escaneados en un scanner Nikon Super Coolscan 4000. Las imágenes obtenidas fueron analizadas utilizando el programa Image J (NIH software, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) y se determinó la densidad integrada de los píxeles asociada a la marca de TH en el área del cuerpo estriado, substrayendo el valor correspondiente al ruido inespecífico, en el lado inyectado y el lado control para cada corte de la serie en cada ratón. Posteriormente se realizó la sumatoria de las densidades integradas de todos los cortes analizados para cada animal y el resultado se calculó como el promedio de las sumatorias para todos los animales por lado. Todas las cuantificaciones fueron realizadas siguiendo el procedimiento de doble ciego.

Análisis mediante Western Blot (WB).

Los ratones fueron sacrificados mediante inhalación de CO_2 y rápidamente se realizaron disecciones de distintas áreas cerebrales, incluyendo SN, cuerpo estriado y corteza. El tejido fue homogenizado en 100 μl de PBS frío suplementado con una mezcla de inhibidores de proteasas (Roche, Switzerland). 60 μl del homogenizado fueron separados y se le agregaron 60 μl de la solución tampón RIPA 2x (20 mM Tris [pH 8,0], 150 mM NaCl, 0,1 % SDS, 0,5 % DOC y 0,5 % Tritón X-100) suplementada con una mezcla de inhibidores de proteasas. Posteriormente las muestras se sometieron a 2 ciclos de sonicado y la concentración total de proteínas fue determinada mediante el ensayo micro-BCA (Pierce, Rockford, IL) (Hetz y col, 2006). 10 y 30 μg de proteínas totales fueron cargadas en minigeles denaturantes al 8 %, 10 % o 12 %, dependiendo del peso molecular estimado de la proteína a analizar. Los anticuerpos primarios y sus diluciones respectivas utilizadas se detallan a continuación: Hsp90 (1:3000, Santa Cruz, USA), ERp72 (1:3000, ENZO/Stressgen, USA), ERp57 (1:3000, ENZO/Stressgene, USA), PDI (1:1000, Santa Cruz, USA), Calreticulina (1:1000, ENZO/Stressgen, USA), Bip (1:2000, ENZO/Stressgen, USA), eIF2 α (1:2000, Cell Signaling, USA), pEIF2 α (1:2000, Cell Signaling, USA), Beclin 1 (1:3000, Cell Signaling, USA), TH (1:2000, Chemicon, USA), GFP (1:3000, Invitrogen, USA), Actina (1:3000, Cell Signaling, USA) y Ubiquitina (1:2000, Santa Cruz, USA).

Extracción de ARN, generación de ADNc y PCR en tiempo real.

Los ratones fueron sacrificados mediante inhalación de CO_2 y rápidamente se realizaron

disecciones de distintas áreas cerebrales, incluyendo SN, cuerpo estriado y corteza. El tejido fue homogenizado en 100 μ l de PBS frío suplementado con una mezcla de inhibidores de proteasas (Roche, Switzerland). 40 μ l del homogenizado fueron separados y se le agregó 1 ml de Trizol (Invitrogen, USA). Para la extracción del ARN se siguió el protocolo recomendado por el fabricante (Trizol, Invitrogen, USA). El ADNc fue sintetizado a partir de 1 μ g de ARN total utilizando un kit de transcripción reversa (Applied Biosystems, USA). El PCR en tiempo real cuantitativo fue realizado con el sistema "light cycler" de Stratagene empleando la zona fluorescente SYBRgreen (Applied Biosystems, USA) y usando los siguientes pares de partidores: *chop* sentido 5'-TGGAGAGCGAGGGCTTTG-3', *chop* antisentido 5'-GTCCCTAGCTGGCTGACAGA-3'; *actina* sentido 5'-CTCAGGAGGAGCAATGATCTTGAT-3', *actina* antisentido 5'-TACCACCATGTACCCAGGCA-3'; *xbp1s* sentido 5'-TTGTACCTCCCCAGAATC-3', *xbp1s* antisentido 5'-TCCAGAATGCCAAAAGGAT-3'; *xbp1* total sentido 5'-TTGTACCTCCCCAGAATC-3', *xbp1* total antisentido 5'-TCCAGAATGCCAAAAGGAT-3'; *edem* sentido 5'-AAGCCCTCTGGAAGTTCG-3', *edem* antisentido 5'-AACCAATGGCCTGTCTGG-3'; *sec61* sentido 5'-CTATTCCAGGGCTTCCGAGT-3', *sec61* antisentido 5'-AGGTGTTGTAAGCCTCGGT-3'; *bim* sentido 5'-CGACAGTCTCAGGAGGAACC-3', *bim* antisentido 5'-CATTTGCAAACACCTCCTT-3'; *puma* sentido 5'-GCCAGCAGCACTTAGAGTC-3', *puma* antisentido 5'-GGTGTGATGCTGCTCTTCT-3'; *noxa* sentido 5'-GGAGTGCACCGGACATAACT-3', *noxa* antisentido 5'-TTGAGCACTCGTCCTCA-3'; *wsf1* sentido 5'-CCATCAACATGCTCCCGTTC-3', *wsf1* antisentido 5'-GGGTAGGCCTCGCCATACA-3'.

Las cantidades relativas de ARNm para cada gen analizado fueron calculadas de los valores de ciclo umbral comparativo utilizando β -actina como control de amplificación y normalizando los valores del ARNm de interés con el de actina. Las secuencias de los partidores fueron diseñadas con el programa *Primer Express* (Applied Biosystems, Foster City, CA) o fueron obtenidas desde el *Primer Data Bank* (<http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/index.html>). La mayoría de las reacciones de PCR en tiempo real han sido descritas previamente (Lee, Chu y col. 2005). Para el ensayo de procesamiento del ARNm de *xbp1* utilizamos las mismas condiciones descritas previamente por nuestro laboratorio (Rodríguez, Zamorano y col. 2012).

Virus adenoasociados.

La secuencias del shXBP1 y del shLuc previamente validados por nuestro laboratorio fueron

clonadas en plásmidos adenovirales portadores de 2 secuencias ITRs de AAV de serotipo 2 (secuencias de repetidos invertidos terminales conservadas) que flanquean un cassette de expresión. Este cassette posee el promotor U6 que controla la expresión del shARN correspondiente y el promotor EF1a que controla la expresión del gen de la proteína reportera EGFP. Posteriormente estos plásmidos, denominados pAAV shXBP1/EGFP y pAAV shLuc/EGFP fueron confirmados mediante secuenciación (figura 4).

Los virus adenoasociados portadores de los shARN para XBP1 (AAV shXBP1/EGFP) y el control Luciferasa (AAV shLuc/EGFP) fueron producidos mediante una transfección triple en células Hek293T utilizando los siguientes plásmidos: 1) plásmido rep/cap, portador de los genes virales rep y cap que codifican las proteínas para la replicación y la formación de la cápside del virus (Stratagene, La Jolla CA, USA); 2) plásmido pHelper necesario para la replicación del AAV (Stratagene, La Jolla CA, USA); y 3) plásmido pAAV portador del cassette de expresión que posee el transgen de interés (pAAV shXBP1/EGFP o pAAV shLuc/EGFP). 48 h post-transfección las células fueron colectadas mediante centrifugación y resuspendidas en una solución de la nucleasa benzonasa (American International Chemical, USA). Posteriormente las células fueron lisadas utilizando una solución de 0,05 % tripsina y 1 % de Tween-80 y el lisado fue filtrado en filtros de 0,8 μm . Las partículas virales fueron purificadas mediante cromatografía líquida de alta eficiencia utilizando extracciones secuenciales a través de una columna de cerámica hidroxapatita, cromatografía de intercambio iónico DEAE y finalmente cromatografía en sulfato matrex cellulose tal como se ha descrito previamente (O'Riordan, Lachapelle y col. 2000). Los virus fueron titulados mediante PCR en tiempo real utilizando primarios específicos para la secuencia BGH polyA (O'Riordan, Lachapelle y col. 2000), obteniéndose los siguientes títulos: $3,76 \times 10^{11}$ genomas virales (GVs) para el AAV shLuc/EGFP y $3,50 \times 10^{11}$ GVs para el AAV shXBP1/EGFP.

Ratones WT machos de 3 meses de edad fueron inyectados unilateralmente en la SNpc derecha (coordenadas: AP: -0,29 cm ML: -0,13 cm y DV: -0,42 cm) con 2 μl de los virus AAV shLuc/EGFP o AAV shXBP1/EGFP, representando una dosis viral de 3×10^8 GVs totales. Los ratones fueron sacrificados 1, 2, 4 u 8 semanas post inyección.

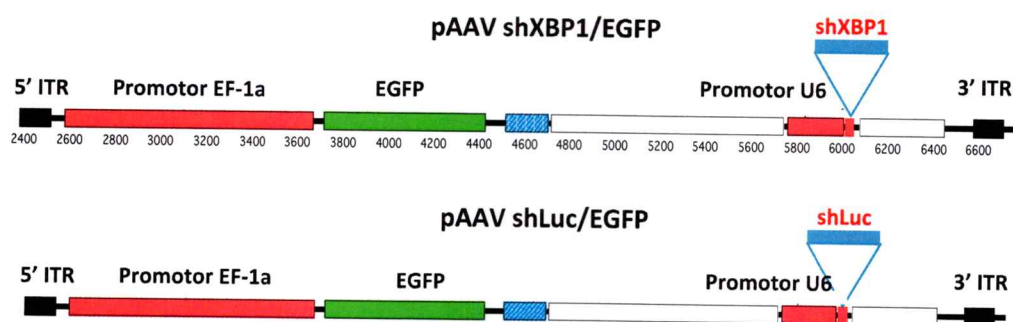


Figura 4: Esquema representativo de los AAVs portadores de los shARN diseñados para XBP1 y Luciferasa. A) La figura muestra un esquema de los pAAV portadores de los shXBP1 y shLuc. El cassette de expresión contiene el gen de la proteína EGFP (en verde) bajo el control del promotor EF-1a y las secuencias del shARN correspondiente bajo el control del promotor U6. Las secuencias promotoras se indican en rojo. Adicionalmente se muestran las secuencias ITR (en color negro) flanqueando el cassette de expresión en ambos extremos.

Silenciamiento de XBP1.

Con el objetivo de silenciar la expresión de XBP1 utilizamos un shARN diseñado para el ARNm de *xbp1* previamente validado y publicado por nuestro laboratorio (Hetz, Thielen y col. 2009, Vidal, Figueroa y col. 2012). Para validar el silenciamiento de XBP1 *in vitro*, células N2A fueron sembradas en placas de 6 pozos y transfectadas con plásmidos portadores del shXBP1 o shLuc correspondiente. 48 h post-transfección las células fueron incubadas con 2,5 µg/ml de Tm o con el vehículo DMSO durante 16 h y luego fueron sometidas a extracción de RNA con Trizol siguiendo las recomendaciones del fabricante. A partir de 1 µg de ARN total se generó el ADNc utilizando el kit de transcripción reversa (Applied Biosystems, USA). Realizamos un PCR en tiempo real para *xbp1s* utilizando los partidores mencionados en la sección PCR en tiempo real.

Para validar el silenciamiento de XBP1 *in vivo*, ratones WT machos de 3 meses de edad fueron inyectados en la SNpc derecha (coordenadas: AP: -0,29 cm ML: -0,13 cm y DV: -0,42 cm) con 2 µl de los virus AAV shXBP1/EGFP ó AAV shLuc/EGFP representando una dosis viral final de 3×10^8 GV. 2 semanas más tarde los ratones fueron inyectados intra-peritonealmente (i.p) con 5 µg/g de Tm y 24 h más tarde los ratones fueron sacrificados. La SN de cada hemisferio cerebral fue disectada, se extrajo el ARN y se generó el ADNc tal como se describió en las secciones anteriores. Finalmente realizamos un PCR en tiempo real para *xbp1s* utilizando los partidores mencionados en la sección PCR en tiempo real. Para el experimento de rescate *in vivo* los ratones fueron inyectados con una mezcla de AAV shXBP1/EGFP/AAV XBP1s-HA en una proporción 1:2 de dosis viral, siendo las dosis finales 3×10^8 GV para el shXBP1/EGFP y 6×10^8 para el AAV XBP1s-HA. Los ratones fueron sacrificados 1 mes posterior a la inyección y procesados para el análisis histológico.

Test de comportamiento del cilindro.

Los ratones inyectados con el AAV shLuc/EGFP ó AAV shXBP1/EGFP fueron sometidos al test del cilindro 2, 4 y 8 semanas post inyección. Previo a la inyección todos los ratones fueron sometidos al test para generar la línea base del experimento. El test consistió en introducir al ratón en un cilindro vertical transparente de 20 cm de base y grabar desde la parte superior del cilindro la actividad motora del animal durante 5 min (Grealish, Mattsson y col. 2010). Siguiendo un procedimiento de doble ciego un investigador cuantificó el número de toques en las paredes

del cilindro con la pata delantera derecha e izquierda durante los 5 minutos que duró la grabación. Para aquellos animales con poca capacidad exploratoria el tiempo de grabación fue extendido hasta obtener al menos 50 toques totales. El resultado se entregó como el porcentaje de toques con la pata izquierda (o contralateral al sitio de la inyección) respecto al número de toques totales realizados con ambas patas.

Expresión de resultados y análisis estadístico

Los resultados presentados corresponden al promedio \pm error estándar (SEM) del número de animales indicados. En algunos casos particulares las figuras o imágenes corresponden a resultados representativos de cada grupo de experimentos, sin embargo esto queda claramente señalado en los pie de figura. La significancia estadística de los datos se analizó mediante la prueba t de Student o mediante un ANOVA de dos vías seguida de un post-test de Bonferroni según corresponda al experimento. Se consideró como límite superior de significancia estadística valores de $p < 0,05$. En el caso particular de experimentos con un $n=1$ esta información está claramente indicada en el pie de figura.

11. Resultados.

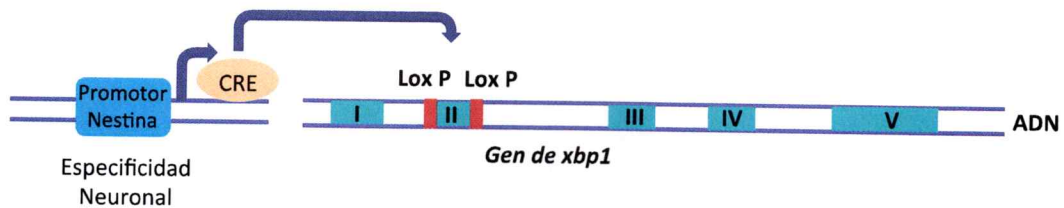
11.1 Objetivo específico 1: Analizar la susceptibilidad de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc frente a la neurotoxina 6-OHDA en los ratones deficientes para XBP1 en el SNC y en los ratones WT.

11.1.1 Modelo de estudio: ratón deficiente para XBP1 en el SNC.

En términos generales, la UPR ha sido asociada clásicamente a problemas en el proceso de plegamiento de las proteínas bajo condiciones fisiológicas o patológicas en células secretoras especializadas, sin embargo este último tiempo se ha demostrado que esta compleja red de señalización celular participa en importantes procesos fisiológicos que van desde la regulación del metabolismo de los lípidos y el colesterol hasta procesos de inflamación y diferenciación celular (revisado en Rutkowski y Hegde 2010).

Se ha demostrado que la expresión de XBP1 es crucial en células altamente secretoras en las cuales la delección de este factor de transcripción genera fenotipos asociados a una respuesta basal de estrés de RE o a una disminución en la supervivencia celular (revisado en Hetz y Glimcher 2011), sin embargo la función exacta de esta proteína en la fisiología de las neuronas no ha sido aún dilucidada. Previamente, nuestro laboratorio generó un ratón *knock-out* (KO) condicional para XBP1 en el SNC (de aquí en adelante denominado XBP1 KO) utilizando el sistema *Cre-loxP* en el cual la expresión de la recombinasa CRE es controlada por el promotor de la proteína Nestina, lo cual genera la especificidad neuronal del sistema (figura 5) (Hetz, Lee y col. 2008). El gen de *xbp1* contiene 5 exones, de los cuales el exón 2 fue flanqueado por los sitios loxP. En presencia de la recombinasa CRE se genera la delección específica de este exón, cambiando el marco de lectura del ARNm lo que se traduce finalmente en una proteína truncada de 6 aminoácidos no funcional. Como se describió en ese trabajo, los ratones deficientes para XBP1 son viables, nacen en proporción mendeliana y no presentan ninguna disfunción neurológica aparente (Hetz, Lee y col. 2008). Estos animales constituyen nuestro modelo de estudio para evaluar el posible rol de XBP1 en la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas en condiciones basales y frente a la neurotoxina 6-OHDA.

A

Generación de la deleción de *xbp1*

B

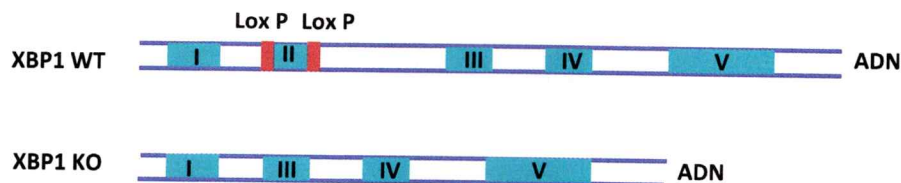
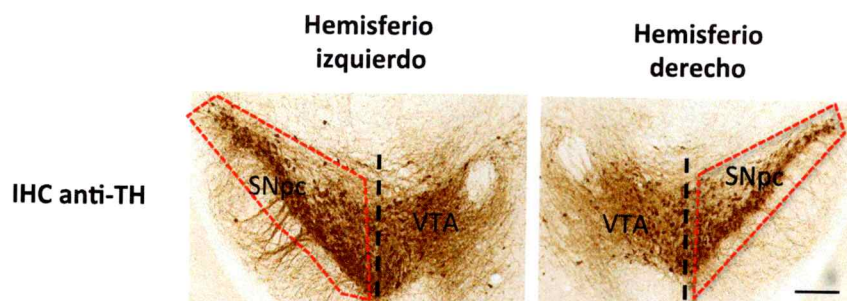
Gen de *xbp1* en ratones *XBP1* WT y *XBP1* KO

Figura 5: Esquema de la deleción de *xbp1* en el SNC en el ratón *XBP1* KO. A) La figura muestra un esquema de la deleción generada en el gen de *xbp1* en células del SNC mediante el sistema CRE-loxP. El gen de *xbp1* posee 5 exones (coloreados en celeste), de los cuales el número 2 (II) fue flanqueado por los dos sitios loxP (coloreados en rojo). El gen de la recombinasa CRE se encuentra bajo el control del promotor de la proteína Nestina, lo cual le otorga al sistema la especificidad neuronal. En presencia de la recombinasa CRE se genera la deleción específica del exón 2 de *xbp1*. B) La figura muestra un esquema representativo de gen de *xbp1* en un ratón *XBP1* WT y en un ratón *XBP1* KO. Los ratones *XBP1* WT poseen el exón 2 flanqueado por los sitios loxP pero no cuentan en su genoma con el gen de la recombinasa CRE, por lo que se traduce la proteína *XBP1*s. Los ratones *XBP1* KO poseen en su genoma, además de los sitios loxP flanqueando a *xbp1*, el gen de la recombinasa CRE por lo que durante el desarrollo del ratón se genera la deleción específica del exón 2 en los progenitores neuronales, lo cual se traduce en una proteína truncada no funcional. Teóricamente en los ratones *XBP1* KO todas las células del SNC poseen la deleción específica del exón 2 del gen de *xbp1*.

11.1.2 Efecto de la deficiencia de XBP1 en el SNC en el número de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc en los ratones adultos.

Con el objetivo de evaluar el posible rol del factor transcripcional XBP1 en el contenido de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc, evaluamos en condiciones basales el número de los somas de estas neuronas presentes en la SNpc de los ratones XBP1 KO machos de 6 meses de edad y los ratones XBP1 WT del mismo sexo y edad. Para ello, realizamos cortes seriados de cerebro medio (incluyendo la zona de la SNpc) de 25 μm de espesor. Posteriormente, sometimos los cortes seriados, espaciados cada 100 μm y que abarcan toda la SNpc en su eje antero-posterior, a una inmunohistoquímica (IHC) utilizando un anticuerpo anti-Tirosina Hidroxilasa (TH) (figura 6). La TH es la enzima limitante en la síntesis del neurotransmisor dopamina, por lo que es considerada un marcador dopaminérgico clásico. Los cortes histológicos obtenidos los analizamos mediante estereología utilizando el método del fraccionamiento óptico con el programa computacional *Stereo Investigator*. La estereología es una herramienta muy utilizada para estimar en forma bastante precisa el número de partículas de interés en un volumen determinado basada exclusivamente en la información de partículas presentes en un área específica. En palabras más simples la estereología nos entrega una interpretación tridimensional a partir de secciones planas en dos dimensiones. Mediante esta herramienta, obtuvimos el número total de los somas de las neuronas dopaminérgicas positivas para el marcador TH (TH⁺) presentes en la SNpc completa. Cabe destacar que en todas las cuantificaciones de los somas TH⁺ realizadas en este trabajo se excluyó a las neuronas dopaminérgicas ubicadas en el área tegmental ventral (VTA), debido a que a pesar de estar contiguas al área la SNpc no pertenecen al circuito nigro-estriatal involucrado en el control de los movimientos voluntarios afectados en la EP. Como se muestra en la figura 6, no encontramos diferencias significativas en el número total de somas TH⁺ al comparar la SNpc de los hemisferios cerebrales derecho e izquierdo de los ratones deficientes para XBP1 y de los ratones XBP1 WT. En ambos grupos obtuvimos entre 10000 y 12000 neuronas dopaminérgicas por hemisferio cerebral, lo cual concuerda con lo reportado en la literatura. Este resultado nos indica que la deficiencia de XBP1 no altera el número de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc en ratones adultos.

A



B

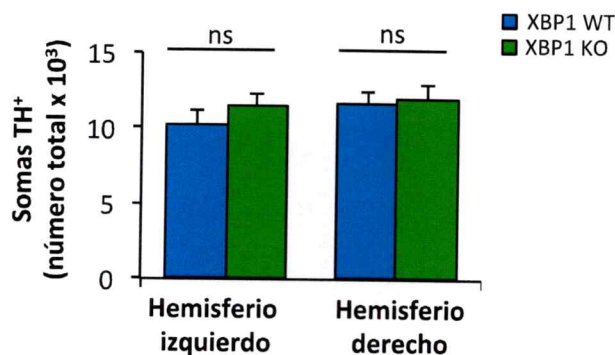


Figura 6: Cuantificación estereológica de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc en los ratones XBP1 KO y en los ratones XBP1 WT adultos. **A)** La imagen muestra una IHC representativa realizada con el anticuerpo primario anti-TH en los cortes histológicos de cerebro medio de 25 μm de espesor que contienen la SNpc en un ratón XBP1 WT de 6 meses de edad. La imagen muestra un corte representativo del hemisferio izquierdo y del hemisferio derecho. Adicionalmente en la imagen destacamos la zona correspondiente al área tegmental ventral (VTA), excluida de la cuantificación estereológica y en rojo se marca la zona correspondiente a la SNpc dentro de la cual se cuantificaron las neuronas dopaminérgicas. **B)** El gráfico muestra la cuantificación mediante estereología de los somas TH⁺ de la SNpc de los ratones XBP1 WT y los ratones XBP1 KO en cortes histológicos seriados de 25 μm de espesor y espaciados cada 100 μm . El gráfico muestra el número total de los somas TH⁺ en ambos hemisferios cerebrales (derecho e izquierdo). Los valores mostrados corresponden a los promedios y errores estándar obtenidos a partir de 5 ratones por cada grupo experimental. El análisis estadístico fue realizado mediante un test de ANOVA de dos vías seguida de un post-test de Bonferroni. ns: diferencia estadísticamente no significativa.

11.1.3 Establecimiento de un modelo toxicológico en las neuronas dopaminérgicas mediado por la toxina 6-hidroxidopamina en ratones adultos.

Con el objetivo de evaluar el posible rol de XBP1 en la susceptibilidad de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc establecimos un modelo toxicológico de la EP basado en la inyección de 6-OHDA en ratones adultos. Según lo descrito en la literatura, la inyección de 6-OHDA directamente en el cuerpo estriado provoca su internalización en las neuronas dopaminérgicas a través del receptor DAT presente en los terminales axonales, generando un daño celular retrógrado que comienza en los terminales axonales dopaminérgicos, se transmite a lo largo de todo el axón y finalmente daña los somas neuronales localizados en la SNpc (Alvarez-Fischer, Henze y col. 2008).

Nuestro punto de partida en este trabajo fue montar un modelo toxicológico *in vivo* de la EP utilizando la inyección intraestriatal de la 6-OHDA en los ratones WT machos de 3 meses de edad. Para ello realizamos inyecciones estereotáxicas hemilaterales de 8 μ g de la 6-OHDA en el cuerpo estriado, área en la cual se localizan los terminales axonales de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc (figura 7). Realizamos inyecciones hemilaterales de 6-OHDA debido a que se ha reportado que la inyección bilateral de esta neurotoxina genera una alta mortalidad en los ratones. Adicionalmente, la inyección bilateral permite realizar una comparación interna con el lado no inyectado. Siete días post inyección sacrificamos los ratones para el posterior análisis histológico, el cual consistió en la evaluación de la lesión generada mediante la detección mediante una IHC del marcador dopaminérgico TH en el cuerpo estriado y en la SNpc.

Como se observa en la IHC representativa y en la cuantificación de la figura 7, la 6-OHDA generó una pérdida extensa, de un 80 %, de la marca de TH en los terminales axonales en el lado inyectado con la neurotoxina en el cuerpo estriado, 7 días post inyección. Sin embargo, a diferencia de lo detectado en el cuerpo estriado, en el caso de la SNpc se observa que la inyección generó una pérdida parcial de un 30 % de los somas TH⁺ en la zona, en la que aún se visualiza la presencia de somas neuronales positivos para el marcador dopaminérgico. Esto indica que el daño masivo generado en los terminales axonales se traduce en una pérdida parcial de los somas dopaminérgicos de la SNpc (figura 7). Como se muestra en los errores estándar de la cuantificación de la figura 6, la lesión generada por 6-OHDA resultó consistente y reproducible entre los ratones

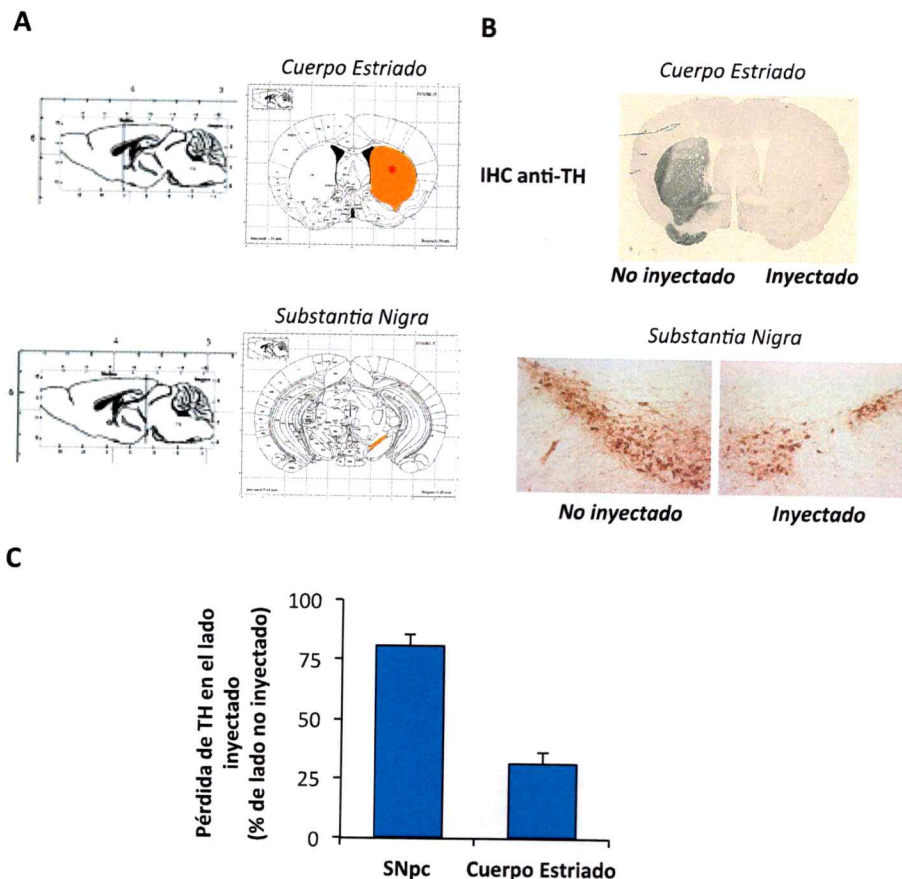


Figura 7: Modelo de toxicidad inducido por 6-OHDA en las neuronas dopaminérgicas de ratones XBP1 WT adultos. **A)** La figura muestra un esquema modificado del atlas del cerebro de ratón de Franklin y Paxinos de las áreas cerebrales del cuerpo estriado y de la SNpc. Las imágenes de la izquierda corresponden a un esquema de un corte sagital del cerebro del ratón indicando la zona específica donde se ubica el corte coronal mostrado a la derecha. En la imagen de la derecha se muestran esquemas de cortes coronales correspondientes a las zonas del cuerpo estriado (arriba) y a la SNpc (abajo). 8 μ g de 6-OHDA fueron inyectados hemilateralmente mediante estereotaxis en el cuerpo estriado derecho de ratones XBP1 WT de 3 meses de edad. En el esquema, el asterisco rojo indica el sitio de la inyección y en color naranja se destaca el cuerpo estriado y la SNpc del hemisferio cerebral lesionado. **B)** La figura muestra una IHC anti-TH representativa de un corte de 25 μ m de espesor del cuerpo estriado y de la SNpc 7 días post inyección de la 6-OHDA en un ratón WT. Se observa el lado control o no inyectado y el lado inyectado para cada caso. **C)** El gráfico muestra la cuantificación de la pérdida de la marca de TH en la IHC de la SNpc y en el cuerpo estriado de los animales WT inyectados con 6-OHDA. Para la SNpc se realizó una cuantificación manual del número de somas TH⁺ y en el cuerpo estriado se realizó la cuantificación integrada de la marca de TH. En ambos casos se muestra el porcentaje de pérdida en el lado inyectado respecto al lado no inyectado. Los valores corresponden al promedio y el error estándar de 4 animales por grupo.

inyectados, por lo que decidimos utilizar este modelo para explorar el efecto de la deficiencia de XBP1 en la susceptibilidad de las neuronas dopaminérgicas frente a la 6-OHDA.

11.1.4 Efecto de la deficiencia de XBP1 en el SNC en la sobrevivencia de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc frente a la toxina 6-OHDA.

Con el objetivo de determinar si la deficiencia de XBP1 tenía un efecto en la susceptibilidad de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc frente a la 6-OHDA, inyectamos ratones XBP1 WT y XBP1 KO de 3 meses de edad con 8 µg de la neurotoxina directamente en el cuerpo estriado. Para caracterizar la extensión y la magnitud de la lesión inducida por la 6-OHDA, analizamos la lesión generada tanto en los terminales axonales del cuerpo estriado como en las somas neuronales de la SNpc. Para ello, realizamos cortes seriados de cuerpo estriado y de cerebro medio de 25 µm de espesor abarcando todo el eje antero-posterior de las áreas de interés, y sometimos las series de cortes seleccionados a una IHC utilizando un anticuerpo anti-TH.

Primero determinamos si la deficiencia en XBP1 afectaba la magnitud de la lesión inducida por la 6-OHDA a nivel de los terminales axonales. Como se observa en la figura 8A, la lesión inducida por 6-OHDA en el cuerpo estriado de los ratones XBP1 WT es bastante extensa, abarcando desde los cortes muy anteriores hasta los más posteriores, indicando que la mayor parte de los terminales dopaminérgicos fueron afectados por la neurotoxina. Para cuantificar el daño inducido por la 6-OHDA a nivel de los terminales axonales, determinamos la densidad integrada asociada a la marca del anticuerpo TH en las IHC realizadas en el cuerpo estriado de los ratones XBP1 WT y XBP1 KO inyectados con la 6-OHDA. Como se observa en el gráfico de la figura 7, la inyección de 6-OHDA indujo una pérdida masiva de la marca de TH en el lado inyectado en los ratones XBP1 WT, sugiriendo una denervación extensa de los terminales axonales en el cuerpo estriado. Adicionalmente, no encontramos diferencias significativas en la pérdida de la marca de TH entre los animales XBP1 WT y XBP1 KO, obteniéndose en ambos casos una pérdida de aproximadamente un 80 % en la marca de TH, lo cual sugiere que la deficiencia de XBP1 no afecta el daño de los terminales axonales inducido por 6-OHDA en el cuerpo estriado después de 7 días de la inyección de esta toxina.

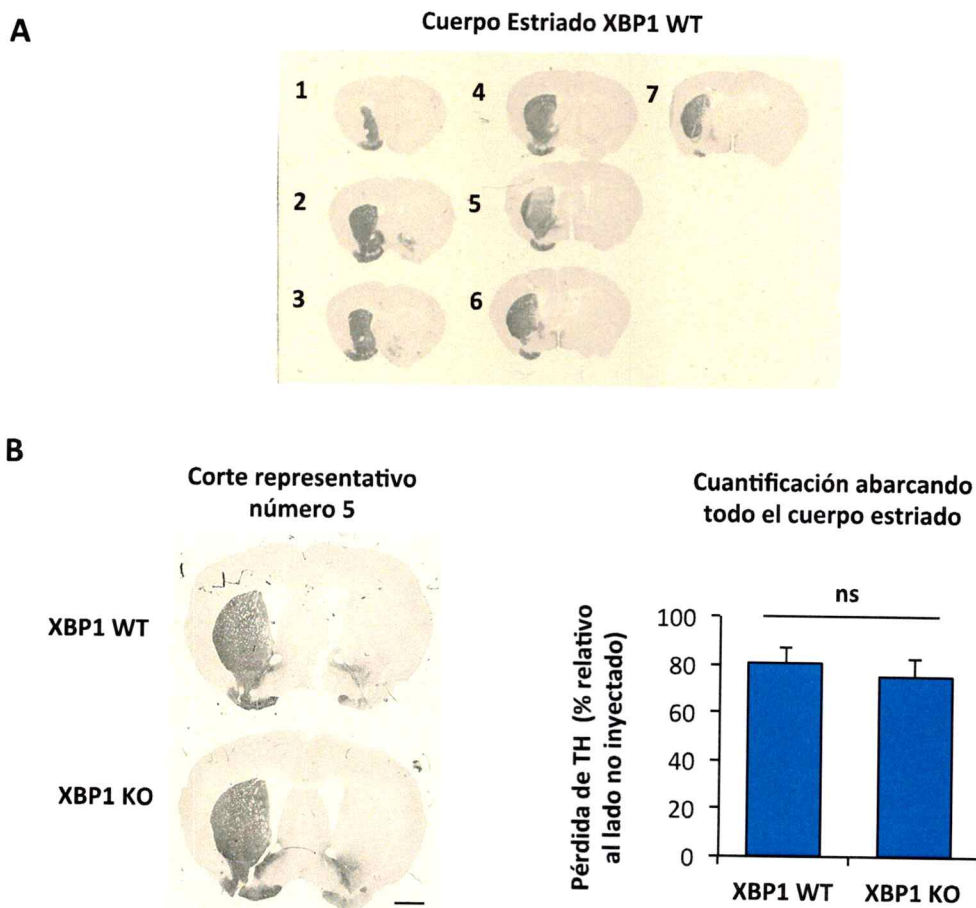


Figura 8: Análisis histológico y cuantificación del daño inducido por la 6-OHDA en el cuerpo estriado de los ratones XBP1 WT y de los ratones XBP1 KO. **A)** La imagen corresponde a una IHC anti-TH representativa de los cortes seriados del cuerpo estriado de 25 μm de espesor y espaciados cada 100 μm en un ratón XBP1 WT de 3 meses de edad inyectado con 8 μg de 6-OHDA en el cuerpo estriado y sacrificado 7 días más tarde. El número presente en el extremo superior de cada corte indica la posición del mismo en el eje antero-posterior del cuerpo estriado. **B)** La imagen de la izquierda muestra una IHC anti-TH representativa del corte N^o5 (ver figura 7A) de un ratón XBP1 WT y de un ratón XBP1 KO de 3 meses de edad inyectados con 8 μg de 6-OHDA en el cuerpo estriado y sacrificados 7 días más tarde. La barra de tamaños corresponde a 1 mm. El gráfico de la derecha muestra la cuantificación densitométrica de la marca de TH en el cuerpo estriado, incluyendo todos los cortes de la serie, en los ratones XBP1 WT y en los ratones XBP1 KO inyectados con la 6-OHDA. Los valores se indican como el porcentaje relativo al lado no inyectado, y corresponden al promedio y el error estándar de 4 animales por grupo. El análisis estadístico fue realizado mediante un test de ANOVA de dos vías seguido de un post-test de Bonferroni. ns: diferencia estadísticamente no significativa.

A continuación, con el objetivo de explorar la extensión del daño inducido por la 6-OHDA a nivel de los somas de las neuronas dopaminérgicas en toda la SNpc, realizamos una cuantificación manual de los somas TH⁺ presentes en toda la serie de cortes sometidos previamente a una IHC anti-TH, abarcando desde los cortes más anteriores hasta los cortes más posteriores donde prácticamente desaparece la SNpc.

La IHC anti-TH representativa de la figura 9 muestra una serie correspondiente a 9 cortes de 25 µm de espesor cada uno y espaciados cada 100 µm entre ellos, los que en conjunto abarcan la zona de la SNpc completa en su eje antero-posterior. Al analizar el histograma de la figura 9 observamos que en los ratones XBP1 WT la inyección de la 6-OHDA en el cuerpo estriado afectó selectivamente dos zonas particulares de la SNpc, correspondiente a los cortes número 2 y los cortes entre el 5 y el 7. En todos estos cortes detectamos una caída significativa del número de somas TH⁺ en el lado inyectado con respecto al lado no inyectado. Al analizar la extensión del daño inducido por la 6-OHDA en los ratones deficientes para XBP1 encontramos que en la zona susceptible a la 6-OHDA descrita para los ratones XBP1 WT, la pérdida de los somas TH⁺ es mucho menor y no significativa al compararla con el lado no inyectado (figura 9). Al promediar el número de neuronas dopaminérgicas en los cortes mencionados, observamos que en los ratones XBP1 WT la inyección de 6-OHDA generó una pérdida de aproximadamente el 50 % de los somas TH⁺ en el lado inyectado comparado con el lado control no inyectado (figura 10). En contraste, en los ratones XBP1 KO no detectamos una caída significativa del número de somas TH⁺ en los cortes mencionados. Concordante con lo descrito en el análisis estereológico de la figura 6, no encontramos diferencias significativas en el número absoluto de somas TH⁺ entre los ratones XBP1 WT y XBP1 KO en cada corte de la serie del lado no inyectado (basal) (figura 10).

Estos resultados nos indican que en nuestro modelo toxicológico la 6-OHDA generó un daño celular retrógrado que afectó tanto a los terminales axonales en el cuerpo estriado, ruta de entrada de la 6-OHDA, como a los somas neuronales, generando la pérdida del marcador dopaminérgico en un subgrupo de somas neuronales de la SNpc. Más importante aún, la deficiencia de XBP1 en el SNC, al contrario de lo esperado, otorgó resistencia a las neuronas dopaminérgicas de la SNpc frente a esta neurotoxina evitando el daño generado a nivel de los somas neuronales.

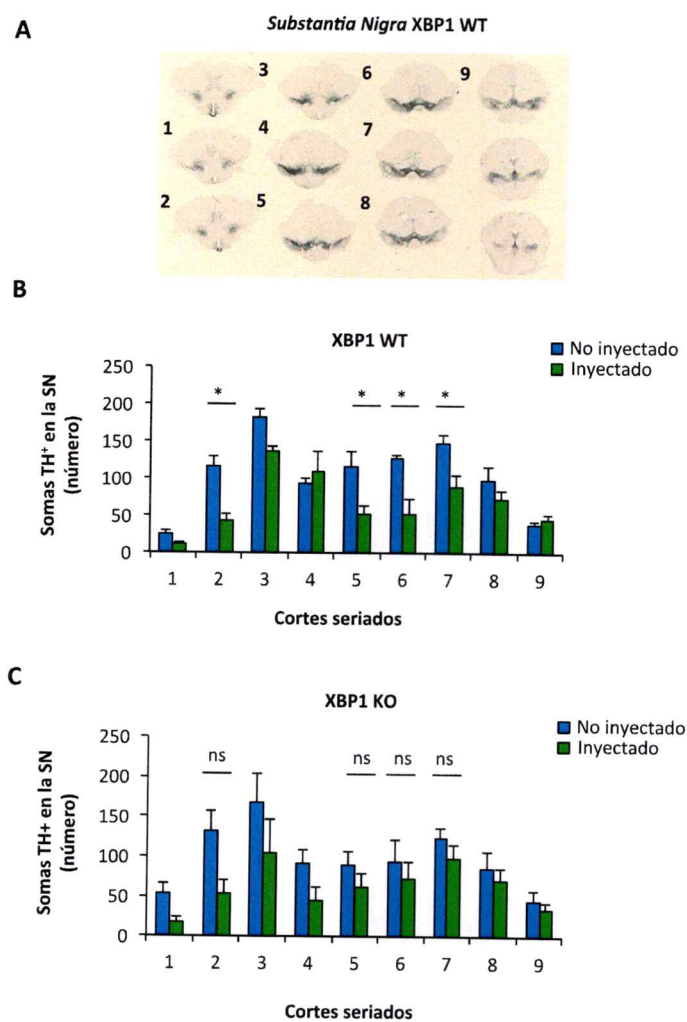


Figura 9: Análisis histológico y cuantificación espacial del daño inducido por la 6-OHDA en la SNpc de los ratones XBP1 WT y los ratones XBP1 KO. **A)** La imagen corresponde a una IHC anti-TH representativa de los cortes seriados de cerebro medio de 25 μm de espesor y espaciados cada 100 μm en un ratón XBP1 WT de 3 meses de edad inyectado con 8 μg de 6-OHDA en el cuerpo estriado y sacrificado 7 días más tarde. El número presente en el extremo superior de cada corte indica la posición del mismo en el eje antero-posterior de la SNpc. **B)** Gráfico que muestra el conteo manual de los somas TH⁺ de la SNpc en los cortes seriados de 25 μm de espesor separados cada 100 μm de ratones XBP1 WT inyectados con 8 μg de la 6-OHDA en el cuerpo estriado. El número de cada corte del eje X está representado en la figura 9A. **C)** Gráfico del conteo manual de los somas TH⁺ de la SNpc en los ratones XBP1 KO inyectados con la 6-OHDA. Los detalles experimentales son los mismos descritos en el punto B. Los gráficos muestran los promedios y errores estándar del número absoluto de somas TH⁺ presentes en cada corte, obtenidos a partir de 4 ratones por cada grupo. El análisis estadístico fue realizado mediante un test de ANOVA de dos vías seguido de un post-test de Bonferroni. *: $p < 0,05$, ns: diferencia estadísticamente no significativa.

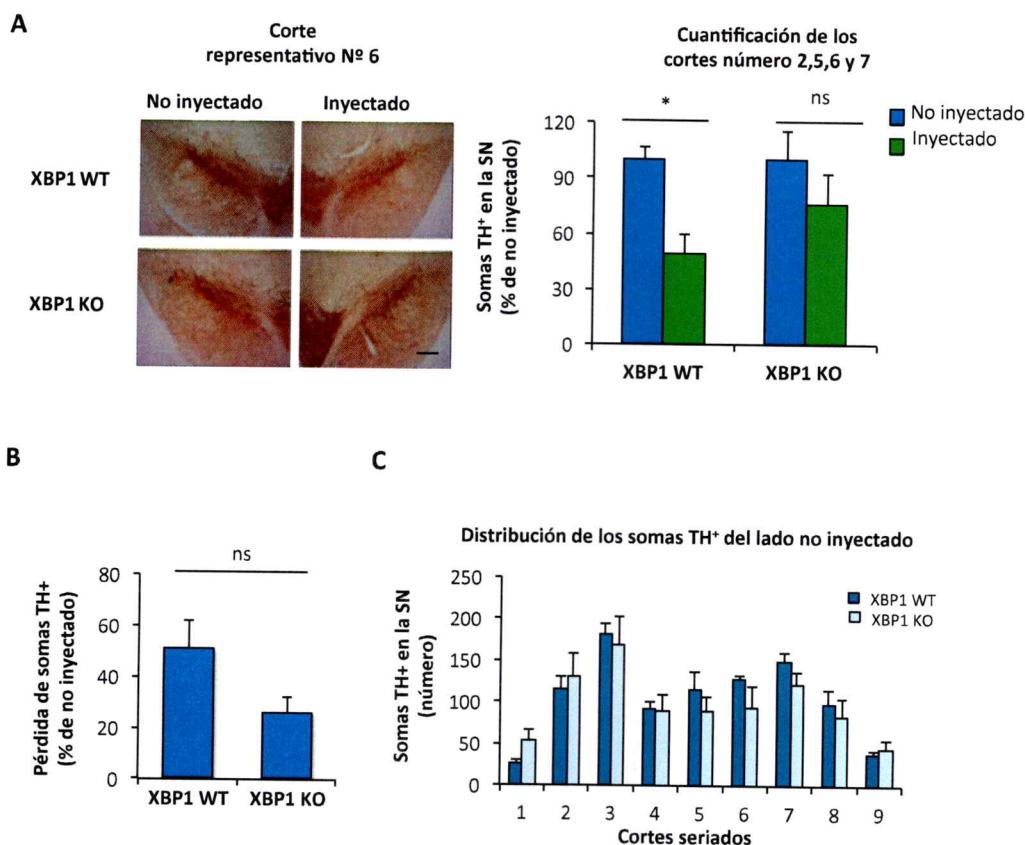


Figura 10: Cuantificación del daño inducido por la 6-OHDA en una subregión de la SNpc en los ratones XBP1 WT y los ratones XBP1 KO. A) La imagen de la izquierda corresponde a una IHC anti-TH representativa de un corte de cerebro medio (corte N° 6) que incluye la SNpc de 25 μm de espesor en un ratón XBP1 WT y un ratón XBP1 KO de 3 meses de edad inyectados con 8 μg de 6-OHDA en el cuerpo estriado y sacrificados 7 días más tarde. La barra de tamaños corresponde a 200 μm . El gráfico de la derecha corresponde al promedio del número de sommas TH⁺ en los cortes seriados número 2, 5, 6 y 7 mostrados en la figura 9. Los valores se indican como el porcentaje relativo al lado no inyectado, y corresponden al promedio y el error estándar de 4 animales por grupo. **B)** Gráfico que muestra la cuantificación del promedio de la pérdida de los sommas TH⁺ en los cortes 2,5,6 y 7 de ratones XBP1 WT y XBP1 KO inyectados con 6-OHDA. El gráfico muestra los promedios y errores estándar del promedio de sommas TH⁺ presentes en el lado no inyectado a partir de 4 ratones por cada grupo. **C)** Gráfico que muestra el conteo manual de los sommas TH⁺ del lado no inyectado de la SNpc en los cortes seriados de 25 μm de espesor separados cada 100 μm de ratones XBP1 WT y XBP1 KO. El número de cada corte del eje X está representado en la figura 9A. El gráfico muestra los promedios y errores estándar del número absoluto de sommas TH⁺ presentes en el lado no inyectado de cada corte obtenidos a partir de 4 ratones por cada grupo. El análisis estadístico fue realizado mediante un test de ANOVA de dos vías seguido de un post-test de Bonferroni. *: $p < 0,05$, ns: diferencia estadísticamente no significativa.

11.2 Objetivo específico 2: Evaluar en condiciones basales el nivel de estrés de RE en la SN de los ratones deficientes para XBP1 en el SNC y en los ratones XBP1 WT.

11.2.1 Efecto de la deficiencia de XBP1 en la expresión de chaperonas y foldasas del RE en la SN de ratones adultos en condiciones basales.

Como mencionamos en la introducción, la delección de *xbp1* tiene efectos drásticos en células secretoras altamente especializadas, induciendo alteraciones importantes en su funcionalidad y en la homeostasis proteica, lo que finalmente genera la pérdida de la viabilidad celular (Reimold, Iwakoshi y col. 2001, Lee, Chu y col. 2005). Este fenómeno, sin embargo, aún no ha sido descrito en células del SNC, ni tampoco se ha estudiado el impacto de la delección de este factor transcripcional de la UPR en la homeostasis del RE en las neuronas.

En la sección anterior describimos que la delección de *xbp1* en el SNC generó resistencia en las neuronas dopaminérgicas frente a la neurotoxina 6-OHDA, por lo que nuestro paso siguiente fue explorar las posibles causas de esta protección. Debido a que XBP1 es uno de los principales componentes de la UPR involucrados en la mantención de la homeostasis del RE, decidimos estudiar el impacto de la deficiencia de este factor en el nivel de estrés de este organelo en la SN de los ratones XBP1 WT y XBP1 KO en condiciones basales. Para ello realizamos disecciones de tejido de 2 mm de espesor de la zona ventral del cerebro medio que contiene la SNpc (en adelante denominadas disecciones de SN) de ratones XBP1 KO machos de 6 meses de edad y ratones XBP1 WT del mismo sexo y edad (figura 11A). En el tejido obtenido de estas disecciones determinamos la expresión de las proteínas residentes del RE, consideradas además blancos de la UPR, Calreticulina y ERp72 mediante la técnica de WB. A pesar de que no encontramos diferencias significativas en el número de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc (figura 6), en los ratones deficientes para XBP1 observamos un aumento significativo en promedio de 2 veces en la expresión de la proteína Calreticulina y de 3 veces en la proteína ERp72 (figura 11B y 11C).

Con el objetivo de explorar el patrón de expresión de la proteína ERp72 en la SNpc, realizamos un análisis histológico mediante inmunofluorescencia (IF) en cortes de cerebro medio de 25 μ m de espesor de ratones WT de 6 meses de edad. Para ello utilizamos un anticuerpo

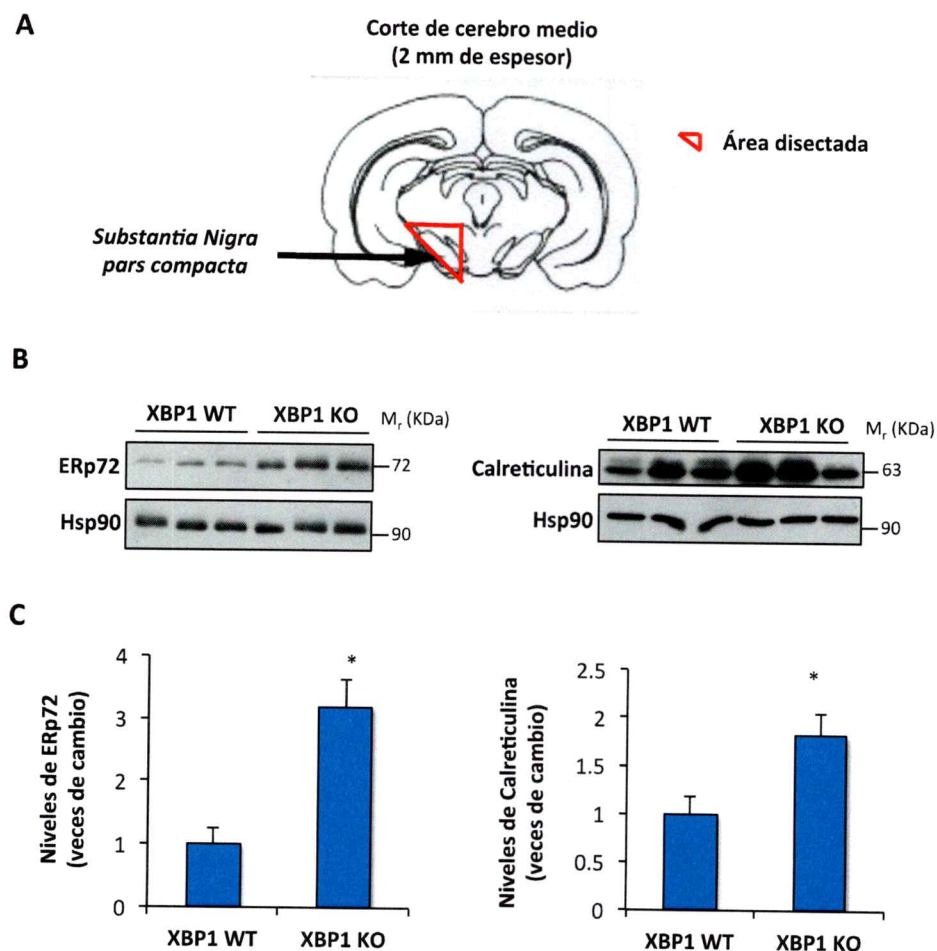


Figura 11: Análisis de la expresión de las proteínas ERp72 y Calreticulina en las disecciones de la SN de ratones XBP1 WT y de ratones XBP1 KO. **A)** Diagrama que representa un corte coronal del cerebro medio del ratón indicando la zona de la SNpc y el área disectada (marcada en rojo). **B)** WB realizado a partir de extractos de proteínas de las disecciones de SN en los ratones XBP1 WT y los ratones XBP1 KO machos de 6 meses de edad. Se utilizaron anticuerpos primarios específicos para las proteínas ERp72, Calreticulina y Hsp90. Esta última fue utilizada como control de carga en ambos casos. **C)** Gráfico que muestra la cuantificación densitométrica de los WB mostrados en B. Los valores obtenidos fueron normalizados utilizando la expresión de la proteína Hsp90 y se graficaron como las veces de cambio en la expresión de la proteína respectiva relativo a la expresión en los ratones controles XBP1 WT. Los valores mostrados corresponden a los promedios y los errores estándar obtenidos a partir de 3 ratones por grupo en el caso de ERp72 y 5 ratones XBP1 WT versus 7 XBP1 KO para el caso de Calreticulina. En este último caso se muestra un WB representativo. El análisis estadístico fue realizado mediante un test de t de Student $*:p < 0,05$

primario anti-ERp72 junto con un anticuerpo primario anti-transportador de dopamina (DAT), el cual es otro marcador dopaminérgico ampliamente utilizado (figura 12).

Como se observa en la figura 12, en los cortes histológicos detectamos un patrón de expresión de la proteína ERp72 restringido casi completamente a la zona de expresión del marcador dopaminérgico DAT, sugiriendo que ambas proteínas se expresan en la misma zona, la cual corresponde a la SNpc. Este resultado nos indica que las neuronas dopaminérgicas de la SNpc expresan la proteína ERp72 y podríamos especular que el aumento en la expresión de esta proteína, observada las disecciones de la SN proveniente de los ratones XBP1 KO, podría tener una contribución mayoritaria de las neuronas dopaminérgicas presentes en la disección más que de otros tipos celulares tales como glías. Lamentablemente no logramos evaluar la distribución de la proteína Calreticulina en los cortes de cerebro medio que contienen la SNpc debido a la carencia de anticuerpos que detecten la proteína en tejido de manera específica.

11.2.2 Impacto de la deficiencia de XBP1 en la activación de la vía de IRE1 α en la SN de los ratones adultos en condiciones basales.

Debido a la elevada expresión de los marcadores de estrés de RE, Calreticulina y Erp72, en los ratones XBP1 KO, nos enfocamos a continuación en explorar las consecuencias de la delección de *xbp1* en la SNpc de ratón en la activación de la UPR río arriba del factor de transcripción XBP1. El procesamiento del ARNm de *xbp1* es una herramienta útil para determinar de manera directa el estado de activación del sensor de estrés de RE IRE1 α . Los ratones deficientes para XBP1 en el SNC, expresan un ARNm de *xbp1* truncado el cual contiene en el exón 5 el sitio de procesamiento que es reconocido por el dominio ARNasa del sensor IRE1 α (Lee, Heidtman y col.) (figura 13). Mediante un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) y analizando el producto del PCR en un gel de agarosa al 2,5 %, es posible evaluar el estado de activación de este sensor de la UPR. La reacción de RT-PCR amplifica dos fragmentos de 144 y 170 pares de bases (pb), correspondientes a las formas procesada (*xbp1s*) y no procesada (*xbp1u*) del ARNm de *xbp1* respectivamente (figura 13). Mediante la cuantificación de la razón entre los amplificadores correspondientes a *xbp1s* y *xbp1* total (*xbp1s* + *xbp1u*) es posible determinar el porcentaje de activación de IRE1 α . A una mayor actividad de IRE1 α mayor será la razón *xbp1s/xbp1* total. Como ejemplo representativo de este ensayo se incluye en la figura 13 el

Substantia Nigra pars compacta

XBP1 WT

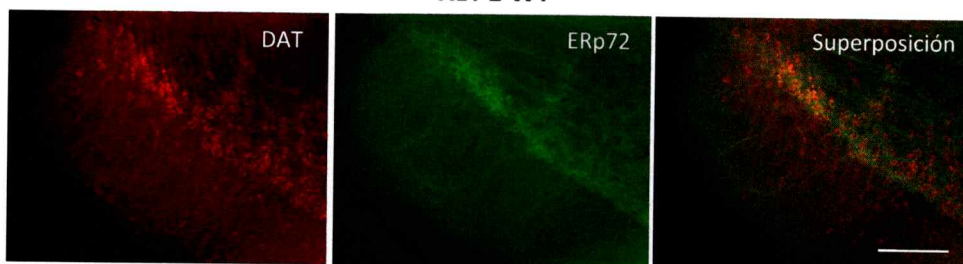


Figura 12: Detección de la proteína ERp72 en cortes de cerebro medio que contienen la SNpc en los ratones WT adultos. La figura muestra una IF en cortes de 25 μm de cerebro medio que contienen la SNpc de ratones WT de 6 meses de edad en condiciones basales. Se observa el canal rojo, el canal verde y la superposición de ambos canales en amarillo. Para la IF se utilizaron anticuerpos primarios específicos para las proteínas DAT (señal roja) y ERp72 (señal verde), en ratones XBP1 WT adultos. La imagen de la derecha muestra la superposición de los canales rojo y verde. La barra de tamaños corresponde a 200 μm .

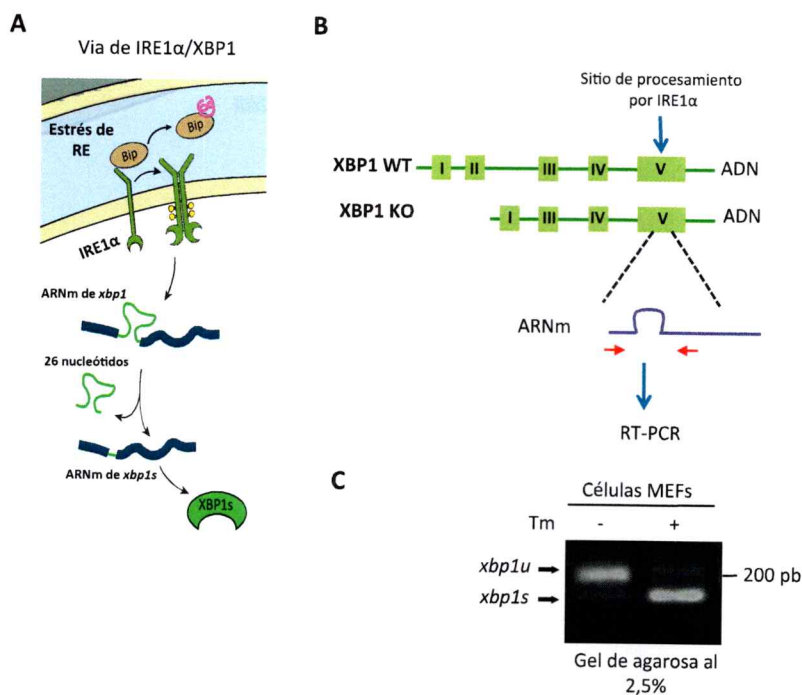


Figura 13: Esquema explicativo del ensayo de RT-PCR para evaluar el procesamiento del ARNm de *xbp1* en los ratones deficientes para XBP1. **A)** Bajo condiciones de estrés de RE, IRE1 α procesa el ARNm de *xbp1*, liberando un intrón de 26 nucleótidos y generando un corrimiento en el marco de lectura que se traduce en la expresión de la proteína XBP1s. **B)** El gen de *xbp1* en los ratones XBP1 WT posee 5 exones, de los cuales el número 5 contiene el sitio de procesamiento reconocido por el sensor IRE1 α . Los ratones XBP1 KO poseen el gen de *xbp1* con la delección en el exón 2 pero conservan el sitio de procesamiento del ARNm en el exón 5. Mediante un ensayo de RT-PCR, utilizando partidores que flanquean el sitio del procesamiento (esquematisados como flechas rojas), es posible discriminar la forma procesada y no procesada del ARNm de *xbp1* tanto en los ratones XBP1 WT como en los ratones XBP1 KO. **C)** RT-PCR representativo de células MEFs incubadas durante 16 h con 2,5 μ g/ml de Tm o con el vehículo DMSO. El gel de agarosa al 2,5 % muestra las bandas amplificadas en el PCR, correspondientes a las formas procesadas (*xbp1s*) y no procesadas (*xbp1u*) del ARNm de *xbp1*. Los tamaños esperados para cada una de ellas son: 144 pb *xbp1s* y 170 pb *xbp1u*.

resultado obtenido en extractos del ARNm de células MEFs tratadas durante 16 h con 2,5 $\mu\text{g/ml}$ de Tm, la cual es utilizada comúnmente como un inductor farmacológico del estrés de RE. Como control se muestran células MEFs tratadas con el vehículo DMSO. Concordante con lo descrito en la literatura observamos que en células MEFs tratadas con Tm se generó un aumento en la banda correspondiente a *xbp1s* respecto a las células tratadas con DMSO, indicando la activación del sensor IRE1 α (Lisbona, Rojas-Rivera y col. 2009). Como se observa en la figura 14, detectamos un aumento promedio de 3 veces en el procesamiento del ARNm de *xbp1* en los ratones deficientes para XBP1 comparado con los ratones XBP1 WT, revelado por un incremento en la intensidad de la banda correspondiente a *xbp1s* respecto al total, indicando una sobreactivación del sensor IRE1 α . Estos resultados indican que la deficiencia de XBP1 en el SNC indujo una sobreactivación del sensor de estrés de RE IRE1 en la SNpc. Este resultado es muy interesante debido a que se ha descrito que la delección de *xbp1* en el hígado, induce una sobreactivación de IRE1 α en las células hepáticas, sin embargo en ese trabajo no se observaron signos de estrés de RE asociados a este fenómeno, sugiriendo que la sobreactivación del sensor de la UPR observada en ese contexto sería el resultado de una compensación frente a la ausencia de XBP1 más que un estado global de estrés de RE generado por la delección de este factor (Lee, Scapa y col. 2008). Cabe destacar que este es el primer caso en el que se observa que la deficiencia de XBP1 desencadena signos espontáneos de estrés de RE en el SNC.

11.2.3 Efecto de la deficiencia de XBP1 en otras vías de la UPR: determinación de los niveles de eIF2 α fosforilado en la SN de los ratones adultos.

Posteriormente quisimos evaluar si otras vías de la UPR también estaban sobreactivadas en la SN de los ratones deficientes para XBP1. Bajo condiciones de estrés de RE, el sensor PERK es activado, lo que desencadena la fosforilación y la concomitante inactivación del factor de iniciación de la traducción eIF2 α . La fosforilación de eIF2 α resulta en una represión global de la traducción de las proteínas y en la expresión específica del factor de transcripción ATF4 (figura 2). Como se muestra en el WB de la figura 15, a pesar de una tendencia de aumento en los ratones XBP1 KO, no observamos diferencias significativas en los niveles de p-eIF2 α en las muestras de SN provenientes de los ratones XBP1 KO y XBP1 WT. Sin embargo, no podemos descartar la activación

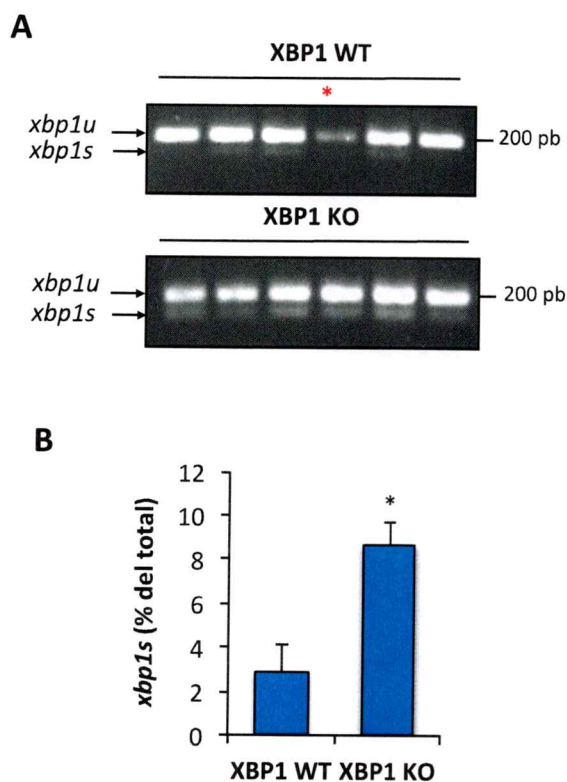


Figura 14: Ensayo para evaluar el procesamiento del ARNm de *xbp1* en disecciones de la SN de los ratones XBP1 WT y XBP1 KO. A) Gel que muestra el ensayo de RT-PCR convencional para evaluar el procesamiento del ARNm de *xbp1* en muestras de la SN de ratones XBP1 WT y ratones XBP1 KO. El RT-PCR se realizó a con partidores que flanquean el sitio de procesamiento en el ARNm de *xbp1*. En la imagen se observan las bandas correspondientes a la forma procesada (*xbp1s*) y la forma no procesada (*xbp1u*) del ARNm de *xbp1*. Las muestras fueron cargadas en un gel de agarosa al 2,5 % y corridas durante 1 h a 90 volts. **B)** El gráfico muestra la cuantificación densitométrica del gel mostrado en A. Los valores indican el porcentaje de *xbp1s* respecto a *xbp1* total (suma de las bandas de *xbp1s* y de *xbp1u*). Los valores mostrados corresponden a los promedios y los errores estándar obtenidos a partir de 5 ratones XBP1 WT versus 6 ratones XBP1 KO. El análisis estadístico fue realizado mediante un test de t de Student. *: $p < 0,05$. El asterisco rojo indica un ratón excluido del análisis densitométrico debido a un problema en la carga del gel.

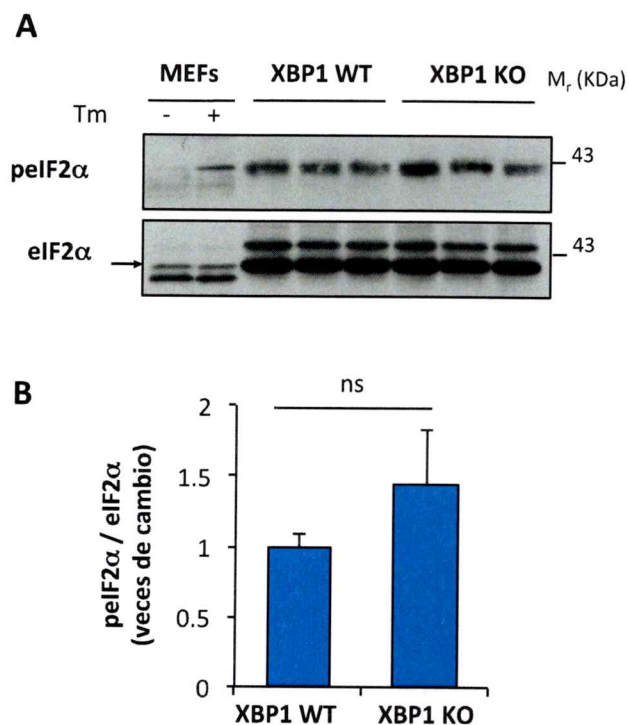


Figura 15. Análisis de la fosforilación de eIF2 α en las disecciones de la SN de ratones XBP1 WT y de ratones XBP1 KO. A) WB realizado a partir de extractos de proteínas de las disecciones de SN en los ratones XBP1 WT y los ratones XBP1 KO machos de 6 meses de edad. Se utilizaron anticuerpos primarios específicos para la proteína eIF2 α y para la forma fosforilada de ésta. Ambos WB corresponden a geles de acrilamida/bisacrilamida al 12 %. Como control positivo de la fosforilación de eIF2 α se incluyeron extractos de células MEFs tratadas con 2,5 μ g/ml de Tm o DMSO durante 16h **B)** Gráfico que muestra la cuantificación densitométrica de los WB mostrados en B. Los valores obtenidos para peIF2 α fueron normalizados utilizando la expresión eIF2 α total y se graficaron como las veces de cambio en la razón peIF2 α / eIF2 α relativo al valor obtenido en los ratones XBP1 WT. Los valores mostrados corresponden a los promedios y los errores estándar obtenidos a partir de 3 ratones por grupo. El análisis estadístico fue realizado mediante un test de t de Student. ns: diferencia estadísticamente no significativa.

de esta vía en las neuronas dopaminérgicas presentes en la disección, la cual se podría diluir al realizar el WB del extracto de proteínas en la disección total.

11.2.4 Impacto de la deficiencia de XBP1 en la expresión de genes proapoptóticos inducidos por estrés de RE en la SN de los ratones adultos.

Hasta ahora nuestros resultados indican que la deficiencia de XBP1 en el SNC genera un aumento en la expresión de algunos marcadores de la UPR en la SN, sugiriendo una condición de estrés de RE basal. Sin embargo, como mostramos en la figura 6, el número total de neuronas dopaminérgicas de la SNpc en los ratones XBP1 KO es comparable al de los ratones WT, sugiriendo que el estrés de RE observado en los ratones deficientes para XBP1 es subletal y que no desencadena la apoptosis. La apoptosis mediada por el estrés de RE es, en parte, controlada por la activación transcripcional de las proteínas CHOP/GADD153 y algunos miembros proapoptóticos de la familia de proteínas BCL-2, incluyendo BIM, PUMA y NOXA (revisado en Woehlbier y Hetz 2011). Por este motivo, para comprobar que los niveles de estrés de RE observados en las neuronas dopaminérgicas de la SN de los ratones deficientes para XBP1 no inducen la señalización apoptótica, evaluamos los niveles del ARNm de *chop*, *bim* y *puma* en extractos de ARN de disecciones de SN a través de PCR en tiempo real. Como control positivo en este ensayo analizamos la expresión de estos genes en extractos de SN de ratones XBP1 WT inyectados con 10 µg de Tm directamente en la SNpc y sacrificados 24 h post inyección. Como se observa en el gráfico de la figura 16, la inyección directa de Tm en la SN generó un aumento en la expresión de *chop*, pero no así de *bim* o *puma*, con respecto a los ratones XBP1 WT no inyectados. En el caso de los extractos obtenidos desde la SN de ratones deficientes para XBP1, no observamos diferencias en el nivel de expresión de estos genes proapoptóticos comparados con los ratones XBP1 WT, lo cual sugiere que los niveles de estrés de RE observados en la SN de estos animales son subletales y posiblemente representan una respuesta adaptativa.

11.2.5 Análisis del efecto de la deficiencia de XBP1 en el SNC en la expresión de marcadores de estrés de RE en disecciones de corteza cerebral en ratones adultos.

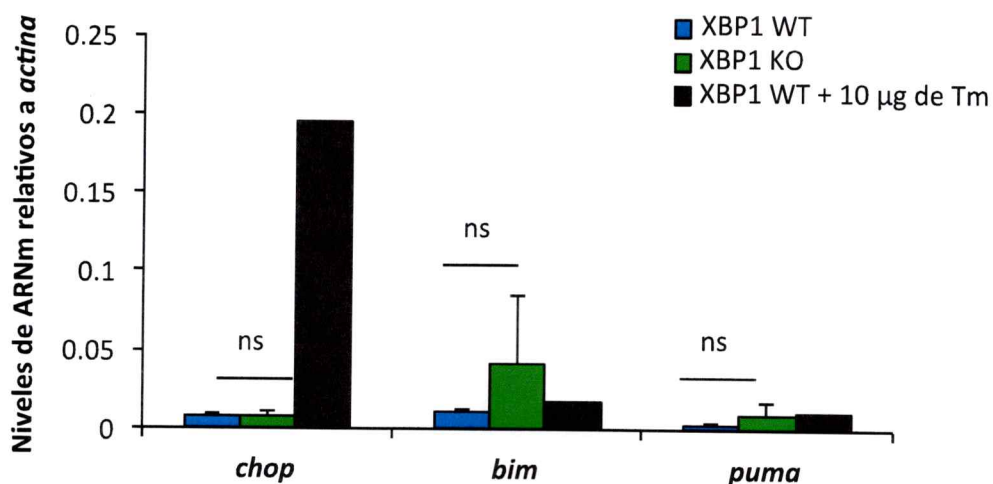


Figura 16: Análisis de los niveles de ARNm de los factores pro-apoptóticos *chop*, *bim* y *puma* a en las disecciones de la SN de ratones XBP1 WT y de ratones XBP1 KO. El gráfico muestra el resultado de un PCR en tiempo real realizado con partidores para los ARNm de *chop*, *bim*, *puma* y *actina* en disecciones de SN de los ratones XBP1 WT y XBP1 KO en condiciones basales. Como control positivo se incluye el resultado obtenido en extractos de SN en un ratón XBP1 WT inyectado con 10 µg de Tm directamente en la SNpc y sacrificado 24 h mas tarde. Todos los valores obtenidos fueron normalizados con la expresión de *actina* y corresponden a los promedios y los errores estándar obtenidos a partir de 3 ratones XBP1 WT, 3 ratones XBP1 KO y 1 ratón XBP1 WT inyectado con Tm. El análisis estadístico fue realizado mediante un test de t de Student. ns: diferencia estadísticamente no significativa.

Debido a que en este estudio observamos que la deficiencia de XBP1 en el SNC genera una condición de estrés de RE espontánea quisimos explorar si este fenómeno ocurría en otros tejidos del cerebro de los ratones XBP1 KO. Para ello realizamos disecciones de tejido correspondiente a la corteza pre-frontal en los ratones XBP1 WT y XBP1 KO en condiciones basales las que fueron sometidas a extracción de proteínas y ARN (figura 17). Como se observa en el WB de la figura 17, no observamos diferencias en la expresión de las proteínas de RE ERp72 y Calnexina en muestras provenientes de corteza entre los ratones XBP1 KO y los ratones XBP1 WT. Tampoco observamos el procesamiento del ARNm de *xbp1* en estos ratones, indicando que la deficiencia de XBP1 no induce una sobreactivación de IRE1 α en esta región del SNC (figura 18). Estos resultados concuerdan con los resultados publicados previamente por nuestro laboratorio, en los que se muestra que la deficiencia de XBP1 no induce los marcadores de estrés de RE en cultivos primarios de corteza ni en disecciones proveniente de cuerpo estriado (Hetz, Lee y col. 2008, Valenzuela, Collyer y col. 2012, Vidal, Figueroa y col. 2012).

En conjunto, todos estos resultados nos indican que la generación de estrés de RE espontáneo observado en la SN de los ratones deficientes para XBP1 en el SNC es un fenómeno específico, probablemente adaptativo, sugiriendo que este factor de la UPR podría tener un papel importante en la mantención de la homeostasis del RE de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc.

11.3 Objetivo específico 3: Estudiar el efecto de la regulación negativa de XBP1 en la sobrevivencia y el estrés de RE de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc de ratones adultos.

11.3.1 Generación y validación de un shARN para *xbp1* *in vitro* y generación de adenovirus asociados para la transducción de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc.

Hasta ahora nuestros resultados indican que la deficiencia de XBP1 en el SNC utilizando el sistema Cre-loxP protege a las neuronas dopaminérgicas de la SNpc frente a la toxicidad inducida por la 6-OHDA y al mismo tiempo induce niveles subletales de estrés de RE específicamente en la SNpc en condiciones basales. Estos resultados podrían representar un cambio compensatorio en la

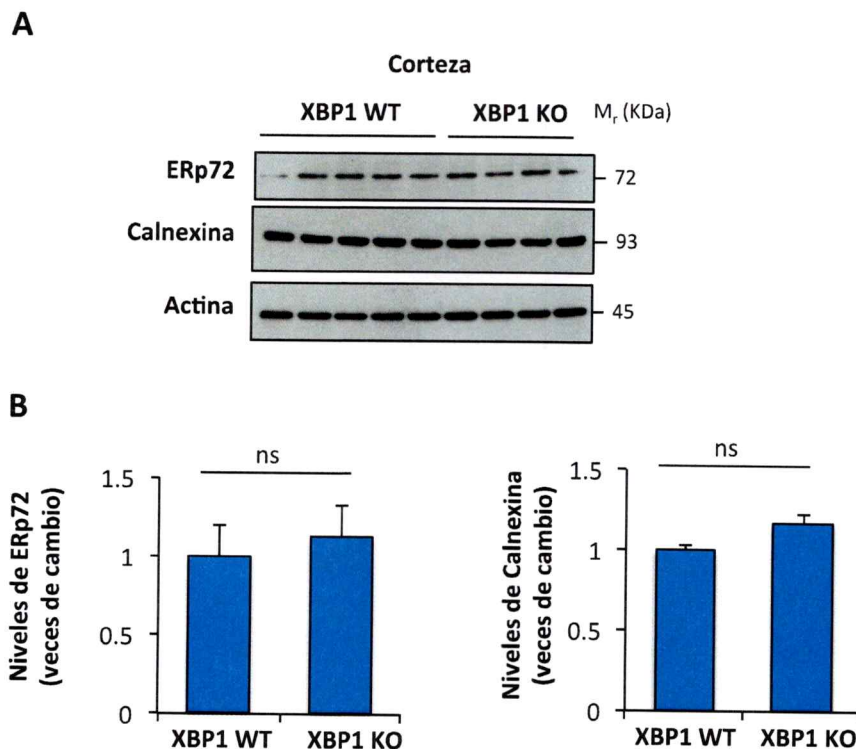


Figura 17: Análisis de la expresión de las proteínas ERp72 y Calnexina en disecciones de corteza de ratones XBP1 WT y de ratones XBP1 KO. **A)** WB realizado a partir de extractos de proteínas de las disecciones de corteza en los ratones XBP1 WT y los ratones XBP1 KO machos de 6 meses de edad. Se utilizaron anticuerpos primarios específicos para las proteínas ERp72, Calnexina y Hsp90. Esta última fue utilizada como control de carga en ambos casos. Ambos WB corresponden a geles de acrilamida/bisacrilamida al 10 %. **B)** Gráfico que muestra la cuantificación densitométrica de los WB mostrados en A. Los valores obtenidos fueron normalizados utilizando la expresión de la proteína Hsp90 y se graficaron como las veces de cambio en la expresión de la proteína respectiva relativo a la expresión en los ratones controles XBP1 WT. Los valores mostrados corresponden a los promedios y los errores estándar obtenidos a partir de 5 ratones XBP1 WT versus 6 XBP1 KO. El análisis estadístico fue realizado mediante un test de t de Student. ns: diferencia estadísticamente no significativa.

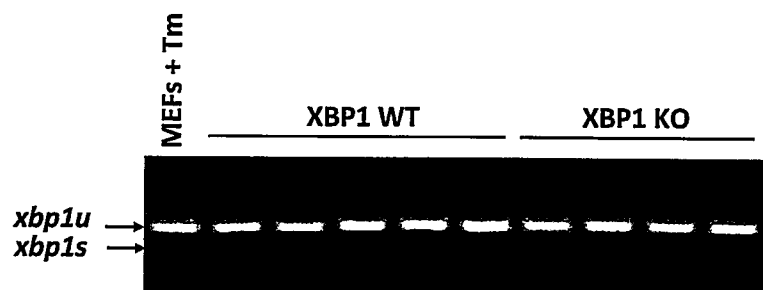


Figura 18: Ensayo para evaluar el procesamiento del ARNm de *xbp1* en disecciones de corteza de los ratones XBP1 WT y XBP1 KO. A) Gel que muestra el ensayo de RT-PCR convencional para evaluar el procesamiento del ARNm de *xbp1* en muestras de corteza de ratones XBP1 WT y ratones XBP1 KO. El RT-PCR se realizó a con partidores que flanquean el sitio de procesamiento en el ARNm de *xbp1*. En la imagen se observan las bandas correspondientes a la forma procesada (*xbp1s*) y la forma no procesada (*xbp1u*) del ARNm de *xbp1*. Como control positivo se incluyó el resultado correspondiente a células MEFs incubadas durante 16 h con 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Tm. Las muestras fueron cargadas en un gel de agarosa al 2,5 % y corridas durante 1 h a 90 volts. El gel muestra el resultado de 5 ratones XBP1 WT y 4 XBP1 KO.

homeostasis proteica en el RE durante el desarrollo embrionario necesario para la mantención de la correcta función y viabilidad de estas neuronas. Para evaluar el impacto de la deficiencia de XBP1 en la mantención de las neuronas dopaminérgicas en ratones adultos, generamos un vector viral adenoasociado de serotipo 2 (AAV2) que codifica para un ARN pequeño tipo horquilla (del inglés *short hairpin*) contra el ARNm de *xbp1* (shXBP1) previamente validado por nuestro laboratorio (Hetz, Thielen y col. 2009, Lisbona, Rojas-Rivera y col. 2009, Castillo, Rojas-Rivera y col. 2011, Vidal, Figueroa y col. 2012).

Está ampliamente demostrado que los AAV2 son capaces de transducir neuronas en distintas zonas del SNC (revisado en McCown 2005). Para verificar la eficiencia del shXBP1 *in vitro*, transfectamos células N2A con los plásmidos portadores del shXBP1 o el shARN control diseñado contra el gen de la *luciferasa* (shLuc). Debido a que los niveles basales de XBP1s son prácticamente indetectables mediante WB y PCR en tiempo real en estas células, para evaluar el efecto del shARN es necesario inducir la expresión de este factor transcripcional utilizando un estresor de RE clásico tal como la Tm. Para ello, 48 h post transfección incubamos las células con Tm durante 16 h y posteriormente realizamos un PCR en tiempo real. El gráfico de la figura 19 muestra el efecto del shXBP1 en el nivel del ARNm de *xbp1s* en las células N2A transfectadas con el shXBP1 respecto a las células controles transfectadas con el shLuc, ambas incubadas con Tm o DMSO según se indica. En estas condiciones la transfección con el plásmido portador del shXBP1 generó una reducción de aproximadamente un 60 % del ARNm de *xbp1s*.

Luego de la validación del constructo en células N2A, subclonamos las secuencias que codifican para los shXBP1 y shLuc en plásmidos compatibles con la producción de vectores virales adenoasociados (pAAV) los cuales contienen un cassette de expresión que adicionalmente codifica para la proteína *enhanced green fluorescent protein* (EGFP). De esta forma generamos las construcciones virales pAAV shXBP1/EGFP y pAAV shLuc/EGFP representados esquemáticamente en la figura 4. En colaboración con la empresa Genzyme Corporation (Boston, USA), generamos las partículas virales que portan el shLuc o el shXBP1, denominadas AAV shLuc/EGFP y AAV shXBP1/EGFP respectivamente. En una pasantía realizada en el laboratorio de enfermedades neurodegenerativas del EPFL en Suiza recibí entrenamiento en las técnicas de producción y titulación viral así como también en la manipulación de estos virus para las posteriores inyecciones estereotáxicas en la SNpc tanto de ratas como ratones. Esta herramienta molecular

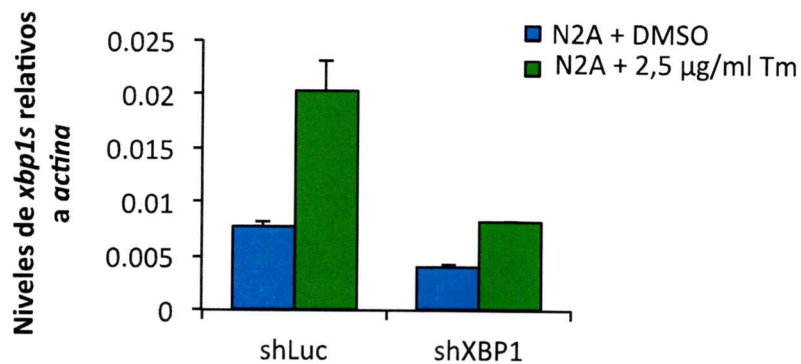


Figura 19: Validación *in vitro* del shXBP1 en células N2A. Gráfico que muestra el resultado de un PCR en tiempo real realizado con partidores para los ARNm de *xbp1s* y *actina* en células N2A transfectadas con los plásmidos de expresión que codifican para el shLuc o el shXBP1 y 48 h mas tarde incubadas con 2,5 µg de Tm o DMSO durante 16 h. Los valores mostrados corresponden a los promedios de los duplicados y desviaciones estándar obtenidos relativos a la expresión de *actina* (N=1).

complementada con la técnica de la esterotaxis, permite dirigir la expresión del shARN de interés a una zona determinada del cerebro de un ratón adulto además de permitir la identificación mediante microscopía de fluorescencia de las células transducidas, mediante la expresión del gen reportero EGFP.

Para determinar la eficiencia de transducción de estos AAV2 en las neuronas dopaminérgicas, realizamos inyecciones estereotáxicas del virus control AAV shLuc/EGFP en la SNpc de ratones WT de 3 meses de edad utilizando una dosis de 3×10^8 genomas virales (GVs) en un volumen total de 2 μ L. Evaluamos la transducción de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc a través de IF utilizando un anticuerpo primario anti-TH y monitoreando la fluorescencia de EGFP. Como se aprecia en la IF representativa de la figura 20, observamos que una gran cantidad de neuronas dopaminérgicas (TH⁺) expresan EGFP 2 semanas post inyección, indicando una transducción efectiva con el virus.

11.3.2 Determinación del efecto de la inyección del AAV shXBP1/EGFP en la expresión de *xbp1s* *in vivo*.

Una vez analizada la transducción local de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc, evaluamos el efecto del AAV shXBP1/EGFP en la expresión de *xbp1* directamente en la zona inyectada. Para ello inyectamos 3×10^8 GVs del AAV shXBP1/EGFP o del AAV shLuc/EGFP directamente en la SNpc de ratones WT de 3 meses de edad. Con el objetivo de inducir la expresión de XBP1 y obtener niveles detectables del ARNm, inyectamos intraperitonealmente (ip) los ratones con 5 μ g/g de Tm 2 semanas pasadas la inyección de los virus. 24 h post inyección de Tm sacrificamos los ratones y disectamos la SNpc.

Como se observa en la figura 21, la expresión del ARNm de *xbp1* mediada por Tm observada en el lado inyectado con el control AAV shLuc/EGFP, disminuye en los ratones inyectados con el AAV shXBP1/EGFP. Cabe destacar que si bien la disminución en el ARNm de *xbp1* es consistente en todos los animales inyectados con el AAV shXBP1/EGFP, esta no es significativa. Este resultado puede ser explicado por un problema metodológico debido a que en las disecciones de SN hay presentes tanto neuronas transducidas como neuronas y glías no transducidas. Estas últimas dos poblaciones no expresan el shARN para *xbp1* por lo que responden a la Tm

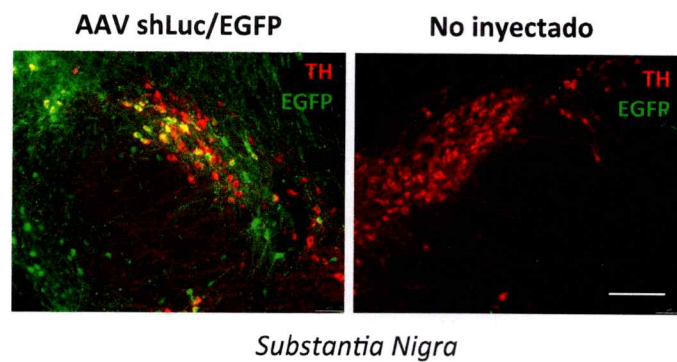


Figura 20. Transducción de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc con los virus AAV portadores de los shARN. La imagen muestra una IF representativa de la SNpc en cortes de cerebro medio de 25 μm de espesor de un ratón WT, 2 semanas post inyección de $1,3 \times 10^8$ GVs del AAV shLuc/EGFP. Las neuronas dopaminérgicas fueron detectadas utilizando un anticuerpo primario anti-TH y se observan en rojo. Las neuronas transducidas que expresan la proteína reportera EGFP se observan en verde. En amarillo se detectan las neuronas dopaminérgicas (TH^+) que fueron transducidas con el AAV shLuc/EGFP. La imagen muestra el lado inyectado con el AAV y el lado control no inyectado. Barra de tamaños: 200 μm .

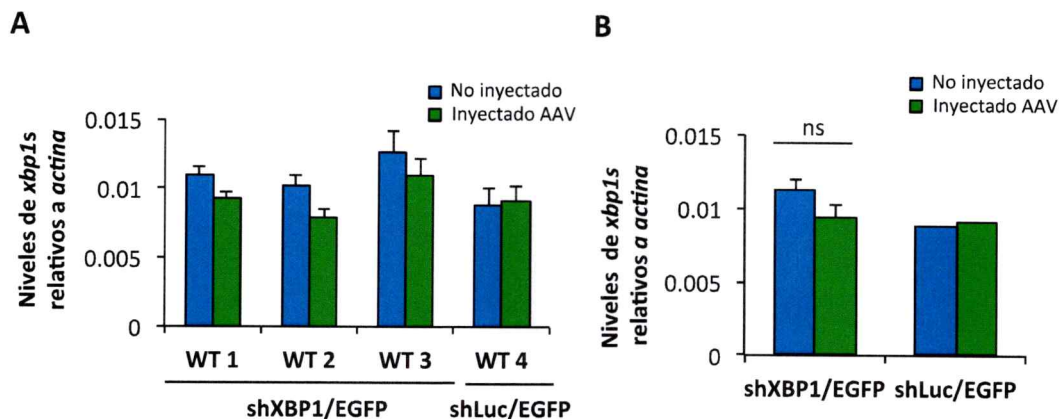


Figura 21: Efecto del shXBP1 en la expresión de *xbp1* en la SN de ratones adultos. A) El gráfico muestra el resultado de un PCR en tiempo real utilizando partidores para *xbp1s* y *actina* en disecciones de SN de ratones inyectados con el AAVs shXBP1/EGFP o el AAV shLuc/EGFP. 2 semanas post inyección de los virus los ratones fueron inyectados con 5 μ g/g de Tm ip y pasadas 24 h fueron sacrificados. El gráfico muestra el resultado obtenido para cada ratón inyectado con los virus. Los valores mostrados corresponden a los valores y las desviaciones estándar obtenidos de los duplicados del PCR para cada ratón B) El gráfico muestra el resultado del PCR en tiempo real considerando el valor promedio y los errores estándar obtenidos a partir de los 3 ratones inyectados con el AAV shXBP1/EGFP y 1 ratón inyectado con el AAV shLuc/EGFP. Para este último caso al ser sólo 1 ratón no se muestra error estándar. El análisis estadístico fue realizado mediante un test de t de Student. ns: diferencia estadísticamente no significativa.

umentando los niveles de este factor de la UPR, diluyendo en el extracto total de tejido el efecto generado por el silenciamiento de este gen en las neuronas transducidas con el virus.

1.1.3.3 Efecto de la expresión del shXBP1 en la sobrevivencia de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc en condiciones basales.

Con el objetivo de explorar el efecto del shXBP1 en la viabilidad de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc, inyectamos 3×10^8 GVs del AAV shXBP1/EGFP o del AAV shLuc/EGFP directamente en la SNpc de ratones WT de 3 meses de edad. Dos semanas post inyección sacrificamos los animales para someterlos a un análisis histológico. Para ello realizamos cortes seriados del cuerpo estriado y del cerebro medio, tal como se describió en las secciones previas, y los sometimos a una IHC utilizando un anticuerpo anti-TH. Observamos que en el lado inyectado con el AAV shXBP1/EGFP se produjo una pérdida consistente pero no significativa del marcador dopaminérgico TH (figura 22A). Sin embargo, al cuantificar las neuronas dopaminérgicas 4 semanas post inyección la reducción resultó significativa, alcanzando aproximadamente un 45 % de somas TH⁺ en la SNpc del lado inyectado (figura 22B). Cabe destacar que la inyección del virus control AAV shLuc/EGFP, no generó una baja significativa en el número de somas TH⁺ a los tiempos evaluados, indicando que el fenotipo observado es específico para el shXBP1.

Adicionalmente, corroboramos la pérdida de neuronas dopaminérgicas a través de IF y microscopía de fluorescencia (figura 23). Observamos que en la SNpc de los ratones inyectados con los AAVs shXBP1/EGFP prácticamente no hay somas EGFP positivos, sugiriendo que probablemente la mayoría de las células transducidas con el virus degeneran. A pesar de la dificultad para detectar somas dopaminérgicos transducidos en los ratones inyectados con el AAV shXBP1/EGFP, detectamos fibras EGFP positivas con una morfología alterada, posiblemente correspondientes a axones remanentes, apoyando la idea de una degeneración neuronal inducida por la expresión del shXBP1 (figura 23). Por el contrario, al analizar mediante IF la SNpc de los ratones inyectados con el control AAV shLuc/EGFP, observamos la transducción de neuronas dopaminérgicas, revelada por la presencia de somas neuronales positivos para ambos marcadores, EGFP y TH. Cabe destacar que en los ratones inyectados con el virus control no detectamos alteraciones en la morfología de las fibras dopaminérgicas transducidas, indicando que el fenotipo

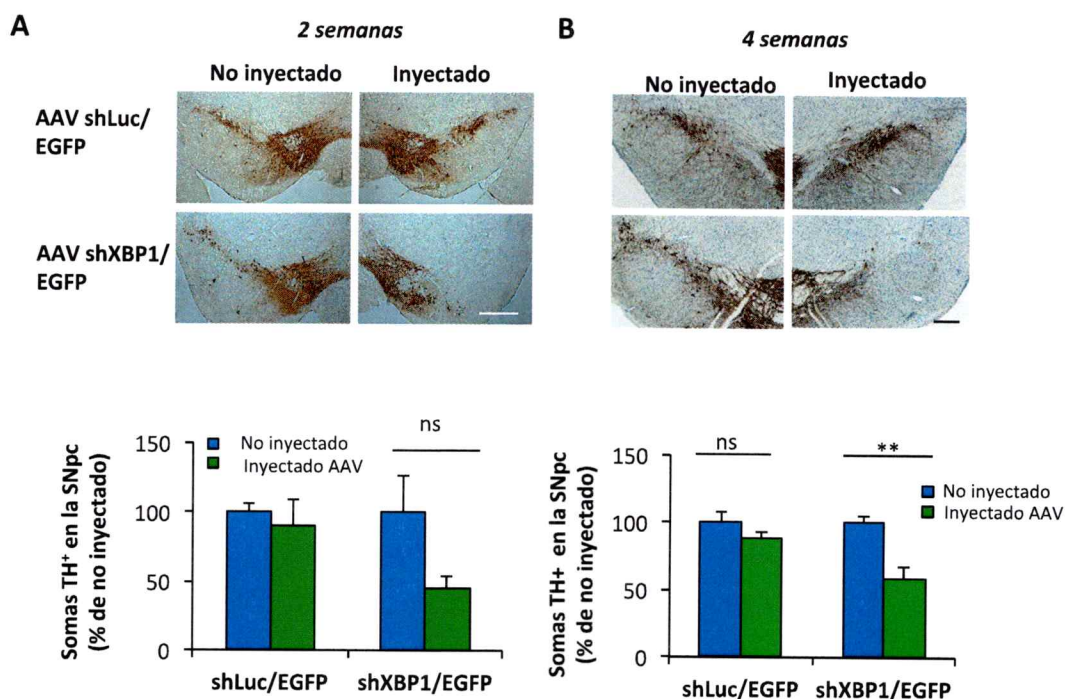


Figura 22: Efecto del shXBP1 sobre las viabilidad de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc. A) La figura superior muestra una IHC representativa con un anticuerpo primario anti-TH en cortes de 25 μm de espesor de cerebro medio conteniendo la SN de ratones WT inyectados con los AAV shXBP1/EGFP o el control AAV shLuc/EGFP según se indica y sacrificados 2 semanas post inyección. El gráfico inferior muestra la cuantificación del conteo manual de los somas TH⁺ en cortes seriados espaciados cada 100 μm abarcando toda la SNpc. **B)** La figura superior muestra una IHC representativa con un anticuerpo primario anti-TH realizada en ratones sacrificados 4 semanas post inyección. El gráfico inferior muestra la cuantificación del conteo manual de los somas TH⁺ en cortes seriados de la SNpc de los ratones inyectados con los virus respectivos y sacrificados 4 semanas post inyección. Los valores se muestran como el porcentaje relativo al lado no inyectado y corresponden a los promedios y errores estándar obtenidos a partir de 4 ratones por grupo. El análisis estadístico fue realizado mediante un test de ANOVA de dos vías seguido de un post-test de Bonferroni. **: $p < 0,01$, ns: diferencia estadísticamente no significativa.

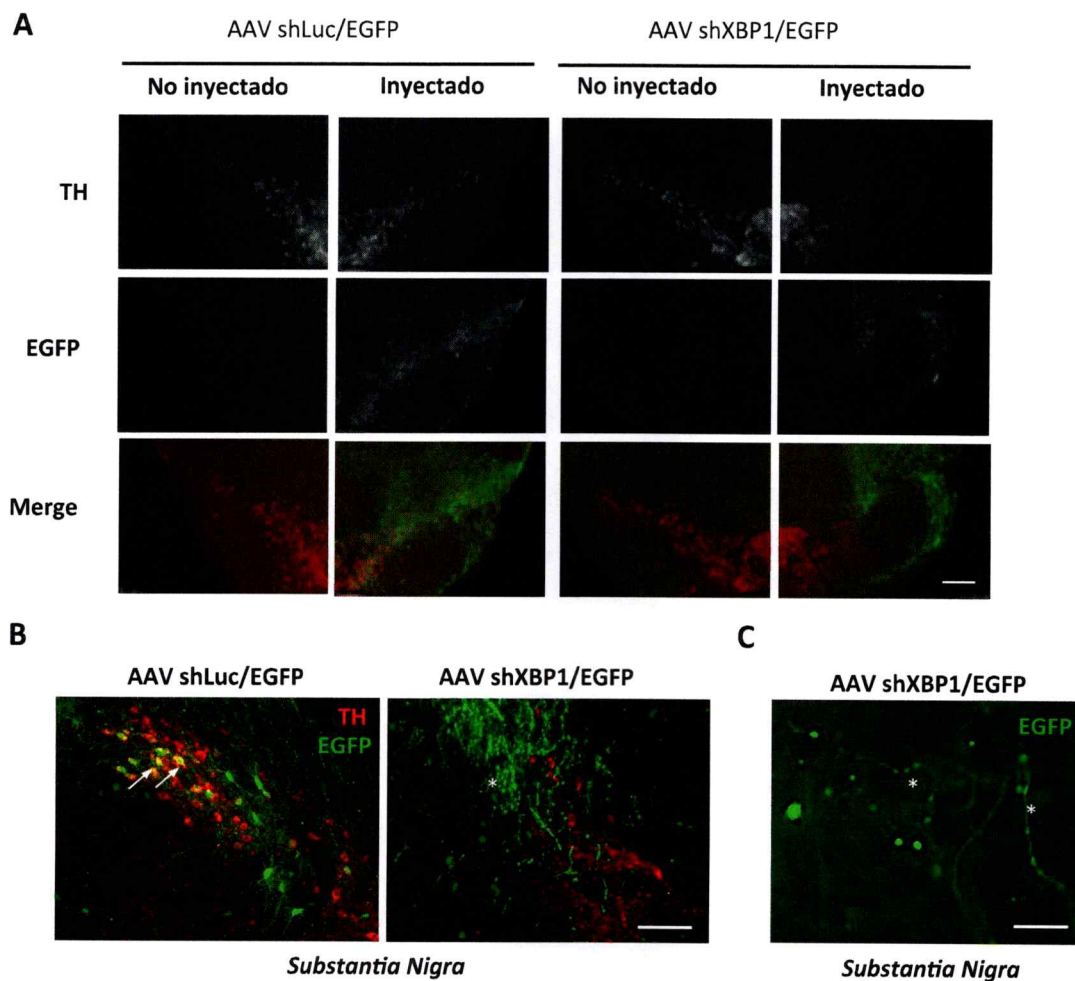


Figura 23: Efecto del shXBP1 sobre el marcador dopaminérgico TH en las neuronas de la SNpc. A) La figura muestra una IF representativa utilizando un anticuerpo anti-TH en cortes de cerebro medio de 25 μm de espesor de ratones WT inyectados con el AAV shLuc/EGFP o con el AAV shXBP1/EGFP y sacrificados 4 semanas post inyección. En rojo se observa la marca asociada a TH y en verde EGFP. La barra de tamaños corresponde a 200 μm . **B)** La imagen muestra con mayor magnificación la SN transducida en un ratón inyectado con el control AAV shLuc/EGFP o con el AAV shXBP1/EGFP y sacrificados 4 semanas post inyección. Las flechas indican neuronas dopaminérgicas TH⁺ que expresan la proteína reportera EGFP. Barra de tamaños: 50 μm **C)** La imagen muestra una IF representativa en la que se observan las fibras distróficas en la SNpc transducida con el AAV shXBP1/EGFP. Los asteriscos indican fibras distróficas positivas para EGFP en un corte representativo de un ratón inyectado con el AAV shXBP1/EGFP. Barra de tamaños: 20 μm .

observado en los ratones inyectados con el AAVs shXBP1/EGFP es específicamente generado por la expresión del shXBP1 y no por una sobrecarga viral (figura 23).

Con el fin de determinar si el fenotipo desencadenado por la regulación negativa de XBP1 se debía a una degeneración neuronal y no exclusivamente a una regulación negativa del marcador dopaminérgico TH, evaluamos la expresión de NeuN, un marcador neuronal general, en los ratones inyectados con el AAV shXBP1/EGFP. Para ello sometimos cortes de cerebro medio que contienen la SNpc a una IF con un anticuerpo anti-NeuN. Como muestra la IF de la figura 24, en los ratones control inyectados con el AAV shLuc/EGFP detectamos neuronas transducidas que expresan el marcador neuronal NeuN. En la imagen de mayor aumento se observa incluso la localización nuclear de esta proteína (imagen con mayor magnificación de la figura 24A). Por el contrario, en los ratones inyectados con el AAV shXBP1/EGFP observamos que en el lado inyectado se pierde casi por completo la señal del marcador neuronal NeuN cuando lo comparamos con el lado control no inyectado.

Con el objetivo de evaluar si el efecto de neurodegeneración generado por el shXBP1 puede ser revertido con la sobreexpresión de XBP1s *in vivo*, realizamos un experimento de rescate mediante la sobreexpresión de XBP1s. Se ha reportado que la inyección de dos virus simultáneamente en la misma preparación genera una alta cotransducción en las neuronas dopaminérgicas por lo que utilizamos esta herramienta como aproximación experimental. Inyectamos una mezcla de AAV shXBP1/EGFP : AAV XBP1s-HA, en una proporción aproximada de 1:2 respectivamente, en la SNpc de ratones WT de 3 meses de edad. La ventaja de usar el AAV XBP1s-HA es que al contener la secuencia HA fusionada al extremo C-terminal de XBP1s es posible detectar la expresión de esta proteína directamente en el tejido. Como se observa en la IF de la figura 25A, la inyección de la mezcla de los AAV indujo, al igual que lo descrito para el AAV shXBP1/EGFP, la pérdida del marcador TH en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc 1 mes post inyección, sugiriendo que la sobreexpresión de XBP1s no fue suficiente para evitar el efecto del shXBP1 en estas neuronas. Interesantemente, al analizar la expresión del XBP1-HA y EGFP en los cortes histológicos de la SNpc transducida, observamos que las pocas células que expresan EGFP no expresan XBP1s-HA, y que viceversa, las células que expresan XBP1s no expresan EGFP (figura 25B). No observamos ninguna célula cotransducida, sugiriendo que probablemente todas las neuronas que expresan el shXBP1/EGFP en conjunto con XBP1-HA degeneran probablemente

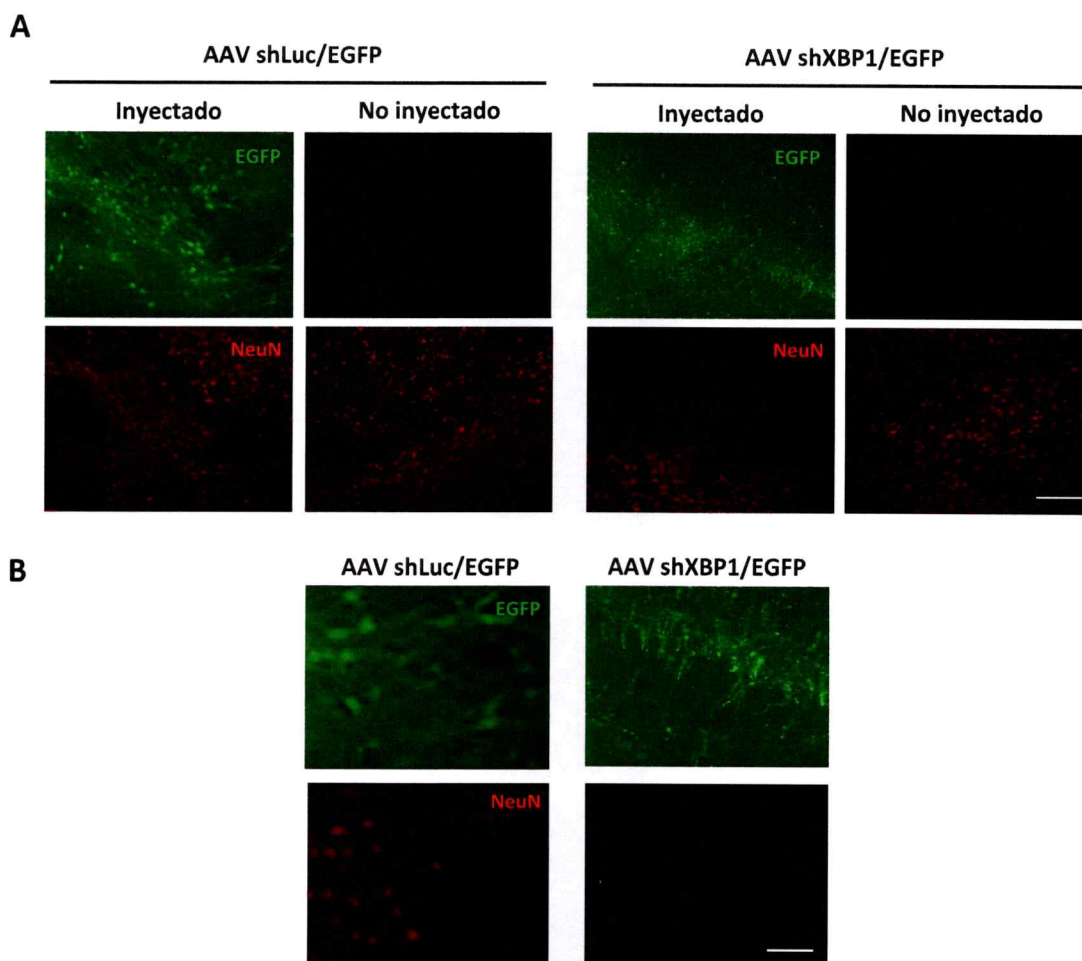


Figura 24: Efecto del shXBP1 sobre la expresión del marcador neuronal NeuN en la SNpc. A) La figura muestra una IF representativa del lado inyectado y no inyectado en cortes de cerebro medio de 25 μm de espesor de ratones WT de 3 meses de edad y sacrificados 4 semanas post inyección del AAV shLuc/EGFP o el AAV shXBP1/EGFP según se indica. En rojo se observa el marcador neuronal NeuN y en verde la proteína reportera EGFP. Barra de tamaños : 200 μm . **B)** La imagen muestra con mayor magnificación una IF representativa en cortes de cerebro medio de 25 μm de espesor de ratones WT mencionados en el panel A. La figura muestra el lado no inyectado y el lado inyectado con los virus indicados. Barra de tamaños : 100 μm .

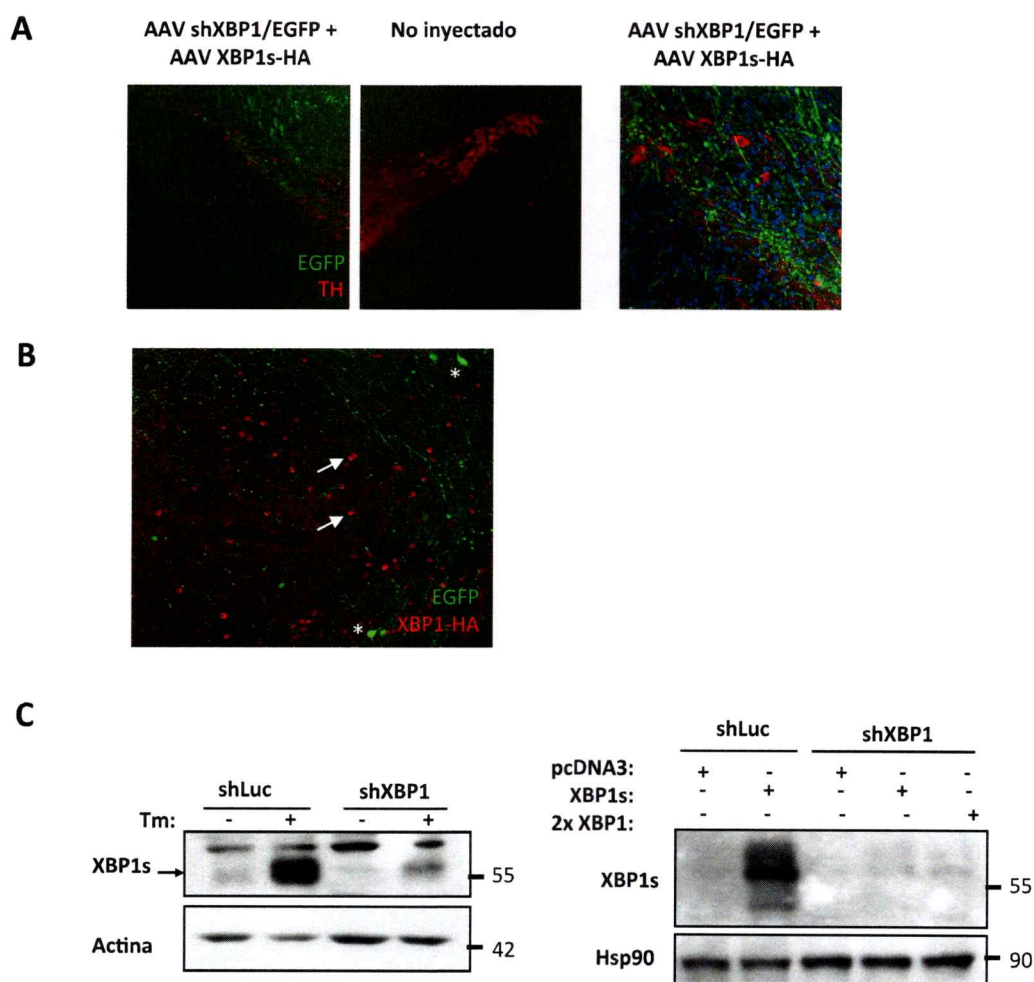


Figura 25. Evaluación del rescate de la toxicidad inducida por el shXBP1 *in vivo*. **A)** La IF representativa muestra la expresión de TH y EGFP en cortes de cerebro medio en un ratón WT inyectado con una mezcla de AAV shXBP1/EGFP: AAV XBP1s-HA (proporción de la dosis viral 1:2) y sacrificado 1 mes post inyección. Se indican los lados inyectados y control (no inyectado). La imagen de la derecha muestra con un mayor aumento el lado inyectado con la mezcla de los AAVs. **B)** La IF representativa muestra la expresión de XBP1s-HA y EGFP en cortes de cerebro medio del ratón representado en el panel A. La IF fue realizada con un anticuerpo específico para HA. Las flechas blancas indican células que expresan XBP1s-HA y los asteriscos células que expresan EGFP. **C)** La imagen de la izquierda muestra un WB para XBP1 en extractos de células N2A que expresan establemente el shLuc o el shXBP1, tratadas con 2,5 μ g/ml de Tm o con el vehículo DMSO durante 16 h. La imagen de la derecha corresponde a un WB a partir de extractos de células N2A que expresan establemente el shLuc o shXBP1 transfectadas con un plásmido de expresión portador del gen de xbp1s o con el plásmido vacío (control). Las células fueron colectadas 48 h pasadas la transfección. La nomenclatura 2x corresponde a 2 veces la cantidad de plásmido portador de XBP1s transfectada.

debido a la alta la eficiencia de *knockdown* del constructo shRNA utilizado es muy eficiente. Aún así, detectamos la presencia de fibras positivas para EGFP, posiblemente de células que degeneraron (figura 25B).

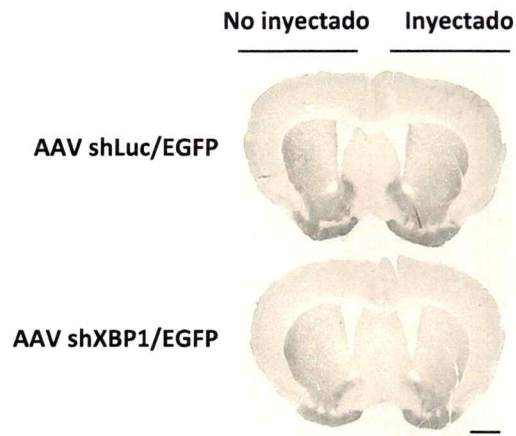
Para validar esta hipótesis, realizamos experimentos en una línea celular neuronal. Generamos líneas celulares N2A que expresan establemente el constructo shLuc o el shXBP1 utilizando lentivirus y luego expresamos en forma transitoria el XBP1s mediante transfección. En estos experimentos observamos que la expresión de la proteína XBP1s inducida por la Tm en las células shLuc disminuye considerablemente en las células shXBP1 (figura 25C, control positivo). Al transfectar un plásmido de expresión de XBP1s en las células shXBP1 observamos una pobre expresión comparada con el control. Esto sugiere que el efecto de silenciamiento de la expresión de XBP1s mediado por el shXBP1 es muy potente, por lo que probablemente con estas condiciones no es posible rescatar el fenotipo de neurotoxicidad *in vivo*. Estos dos experimentos nos sugieren que para evaluar el rescate del fenotipo generado por la expresión del shXBP1, es necesario desarrollar un AAV portador de la secuencia de *XBP1s-HA* con una mutación puntual silente en el sitio de reconocimiento del shXBP1, el cual se expresa independiente de la presencia del shXBP1. Actualmente estamos desarrollando mutaciones en la secuencia de XBP1s-HA con el objetivo de validar el efecto neurotóxico del shXBP1 *in vivo*.

En conjunto, estos resultados sugieren que XBP1 podría tener un rol importante en la mantención de la homeostasis proteica en neuronas dopaminérgicas de la SNpc de ratones adultos, debido a que la expresión local de un shXBP1 específico induce degeneración y probablemente muerte neuronal.

11.3.4 Evaluación de posibles cambios motores espontáneos inducidos por la expresión del shXBP1 en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc en los ratones adultos.

Quisimos evaluar si la pérdida de los somas dopaminérgicos observada en la SNpc de los ratones inyectados con el AAV shXBP1/EGFP generaba denervación de los axones a nivel del cuerpo estriado. Como se observa en la IHC representativa de la figura 26, la inyección del AAV shXBP1/EGFP en la SNpc provocó una pérdida en promedio de un 35 % de la marca de TH en el cuerpo estriado correspondiente al lado inyectado, indicando que la lesión generada inicialmente

A



B

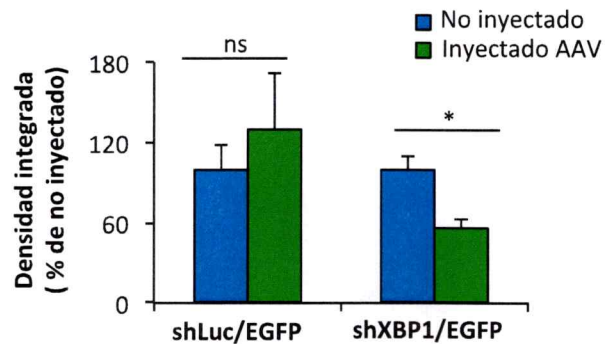


Figura 26: Efecto del shXBP1 en los terminales dopaminérgicos del cuerpo estriado. A) La figura muestra una IHC representativa del corte N^o5 (ver figura 7A) utilizando un anticuerpo primario anti-TH en cortes seriados de 25 μ m del cuerpo estriado de los ratones WT de 3 meses de edad y sacrificados 4 semanas post inyección. La barra de tamaños corresponde a 1 mm B) El gráfico muestra la cuantificación densitométrica de la marca de TH en el cuerpo estriado, en los ratones WT inyectados en la SNpc con los AAV shLuc/EGFP o AAV shXBP1/EGFP. Los valores se indican como el porcentaje relativo al lado no inyectado, y corresponden al promedio y el error estándar de 3 ratones por grupo. El análisis estadístico fue realizado mediante un test de ANOVA de dos vías seguido de un post-test de Bonferroni. *: $p < 0,05$, ns: diferencia estadísticamente no significativa.

en los somas neuronales se extendió hasta los terminales axonales. Se ha descrito que cuando el daño neuronal hemilateral en la SNpc tiene como resultado una pérdida masiva de los terminales sinápticos del cuerpo estriado es posible observar ciertos síntomas motores asociados a una asimetría en la transmisión dopaminérgica (Grealish, Mattsson y col. 2010), los cuales pueden ser evaluados a través del test del cilindro, entre otros (Iancu, Mohapel y col. 2005). El test del cilindro consiste en introducir al ratón en un cilindro transparente vertical (similar a un vaso precipitado) y cuantificar los toques que el ratón realiza con las patas delanteras en las paredes del cilindro. Si existe un daño extenso en los terminales axonales se generará una disminución en el nivel de dopamina en el cuerpo estriado lo que se traducirá en una asimetría en el uso de las patas delanteras. Un ratón hemi-lesionado tocará en menos oportunidades las paredes del cilindro con la pata del lado opuesto a la lesión (contralateral). Mediante este test determinamos si la degeneración inducida por la regulación negativa de XBP1 observada en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc generaba también un fenotipo conductual. Como control positivo del test del cilindro utilizamos ratones WT adultos inyectados con 8 μ g de 6-OHDA directamente en el cuerpo estriado, la cual generó una caída de aproximadamente un 80 % en la marca para TH en los terminales axonales (figura 7). Tal como lo esperábamos, la inyección de 6-OHDA indujo una asimetría en el uso de las patas delanteras de los ratones 7 días post inyección, revelada por una clara disminución del número de toques realizados con la pata contralateral (figura 27). Al someter a este test a los ratones inyectados con el AAV shXBP1/EGFP a las 1, 4 y 8 semanas post inyección no observamos asimetría en el uso de las patas delanteras, representado como un 50 % de toques contralaterales en el gráfico de la figura 27. Este resultado nos indica que la pérdida de los terminales dopaminérgicos en el cuerpo estriado inducida por la regulación negativa de XBP1 en la SNpc, no fue suficiente para inducir un cambio motor espontáneo en los ratones adultos. Esta observación es consistente con lo mostrado en la literatura ya que se ha reportado que para generar cambios motores espontáneos en ratones dañados hemilateralmente en la SNpc se requiere de una pérdida masiva de por lo menos un 50 % de los terminales dopaminérgicos del cuerpo estriado (Alvarez-Fischer, Henze y col. 2008).

11.3.5 Análisis del efecto del shXBP1 en los marcadores de estrés de RE una semana post inyección.

De acuerdo a lo descrito en la figura 22, la expresión de el shXBP1 en las neuronas dopaminérgicas adultas indujo espontáneamente toxicidad neuronal. Esta pérdida neuronal

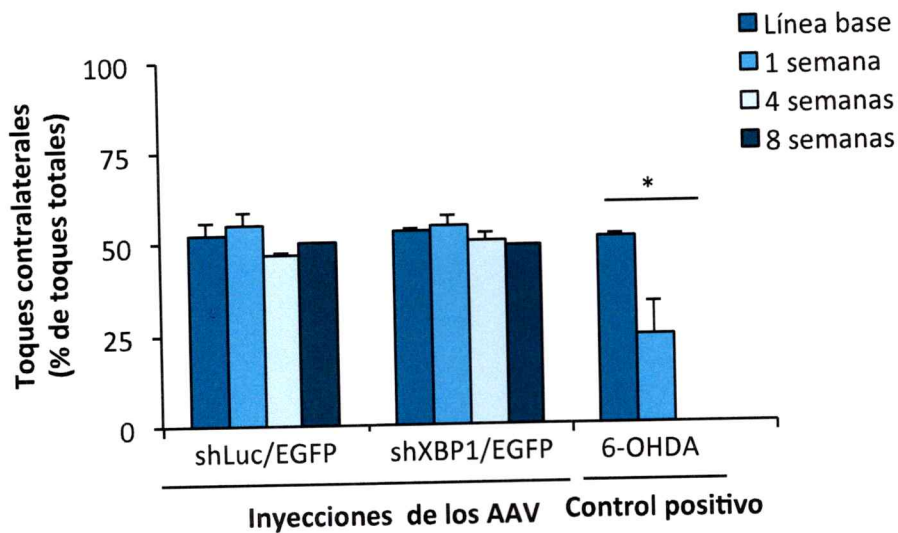


Figura 27: Evaluación del fenotipo motor en ratones inyectados con el AAV shXBP1/EGFP. El gráfico muestra el resultado obtenido en el test del cilindro en los ratones WT de 3 meses de edad inyectados con los virus AAV shLuc/EGFP o AAV shXBP1/EGFP en la SN, 1, 4 y 8 semanas post inyección. Brevemente, el test del cilindro se basa en introducir al ratón en un cilindro de vidrio vertical y contar los toques realizados con la pata delantera contralateral (opuesta al lado lesionado) del ratón, cuando éste se apoya en las paredes del cilindro. Como control positivo del ensayo se inyectaron ratones WT de 3 meses de edad con 8 μ g de 6-OHDA en el cuerpo estriado y se sometieron al test 1 semana post inyección. Los valores se muestran como el porcentaje del número de toques realizados con la pata delantera contralateral respecto al número de toques realizados con ambas patas y corresponden a los promedios y errores estándar obtenidos a partir de 4 ratones inyectados con el AAV shLuc/EGFP, 6 ratones inyectados con el AAV shXBP1/EGFP y 3 ratones inyectados con 8 μ g de 6-OHDA. Los ratones fueron analizados durante 5 minutos. El análisis estadístico fue realizado mediante un test de t de Student. *: $p < 0,05$, ns: diferencia estadísticamente no significativa

ocurrió gradualmente ya que tan solo a las 4 semanas post inyección fue posible observar una disminución significativa en el número de neuronas TH⁺.

Con el objetivo de explorar las posibles causas de esta toxicidad neuronal quisimos evaluar si, a tiempos cortos, previo a la muerte neuronal masiva, la expresión del shXBP1 inducía cambios en la expresión de algunos marcadores de estrés de RE. Para ello inyectamos ratones WT adultos en la SNpc con los virus AAV shXBP1/EGFP. Con el objetivo de evaluar la expresión de la construcción y la viabilidad de las neuronas dopaminérgicas transducidas de la SNpc a tiempos cortos, sacrificamos los ratones 1 semana post inyección y realizamos el análisis histológico mediante IHC e IF en cortes de cerebro medio. Al analizar estos cortes detectamos la expresión del reportero EGFP en las neuronas dopaminérgicas transducidas 1 semana post inyección, sin embargo, esta expresión temprana del shXBP1/EGFP no indujo la pérdida de las neuronas dopaminérgicas, tal como se muestra en la cuantificación de una IHC anti-TH en la figura 28.

Luego, quisimos evaluar si la inyección del AAV shXBP1/EGFP generaba cambios en la expresión de los marcadores de estrés de RE ERp72 y *chop* en la SN 1 semana post inyección. Concordante con lo observado en la imagen de la figura 28, en todos los ratones inyectados con el AAV shXBP1/EGFP detectamos la presencia de la proteína EGFP en las disecciones de SN (figura 29A). Cabe destacar que en un ratón, denominado WT3 en la figura, detectamos la expresión de EGFP tanto en el lado inyectado como en el no inyectado, indicando que la transducción viral en algunos casos puede afectar el lado opuesto a la inyección. Adicionalmente, no observamos cambios en la expresión de la proteína TH entre el lado inyectado con el AAV shXBP1/EGFP y el no inyectado de cada ratón (figura 29A), ni en la expresión del factor proapoptótico *chop* (figura 29B). Estos resultados concuerdan con lo observado en la cuantificación manual de neuronas TH⁺ mostrado en la figura 28. De forma interesante, al explorar la expresión de la proteína ERp72 en las disecciones de SN observamos una tendencia de aumento en el lado inyectado con el AAVs shXBP1/EGFP al compararlo con el lado no inyectado, sin embargo esta diferencia no fue significativa

11.3.6 Efecto del shXBP1 en los marcadores de estrés de RE dos semanas post inyección.

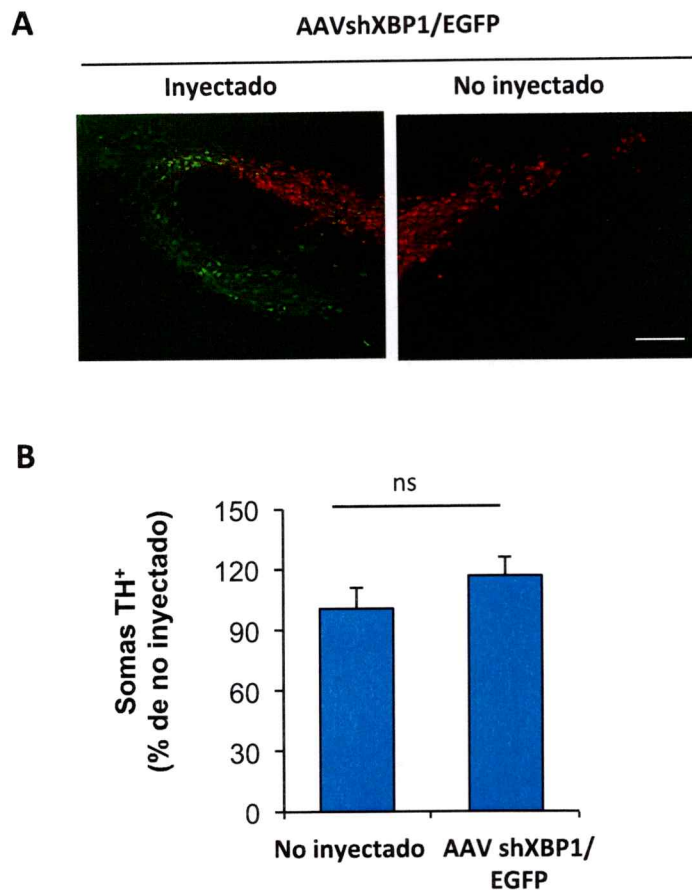


Figura 28: Transducción de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc con el AAV shXBP1/EGFP 1 semana post inyección. A) La imagen muestra una IF representativa en cortes de cerebro medio de 25 μm de espesor de ratones WT de 3 meses de edad inyectados con el AAV shXBP1/EGFP y sacrificados 1 semana post inyección. En rojo se observa el marcador TH y en verde EGFP. B) El gráfico muestra el resultado del conteo manual de los somas TH⁺ en cortes seriados de la SNpc de los ratones inyectados con el AAV shXBP1/EGFP y sacrificados 1 semana post inyección. Los valores se muestran como el porcentaje relativo al lado no inyectado y corresponden a los promedios y errores estándar obtenidos a partir de 4 ratones por grupo. El análisis estadístico fue realizado mediante un test de t de Student. ns: diferencia estadísticamente no significativa.

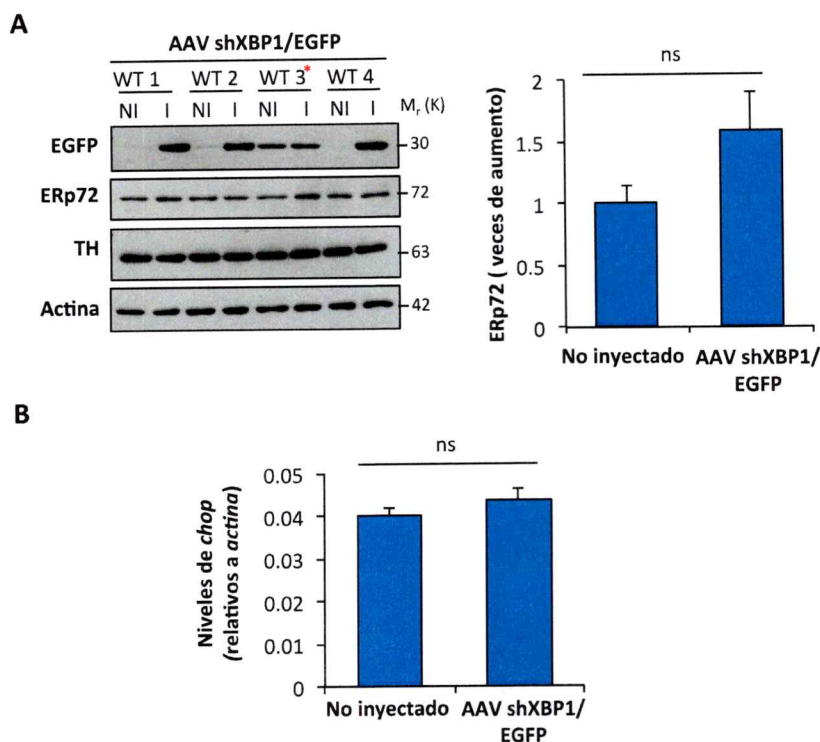


Figura 29: Análisis de la expresión de ERp72 y chop en disecciones de SN en ratones inyectados con el AAV shXBP1/EGFP. A) La figura de la izquierda muestra un WB realizado con anticuerpos primarios para las proteínas ERp72, EGFP, TH y actina a partir de disecciones de SN de 4 ratones WT de 3 meses de edad inyectados con el AAV shXBP1/EGFP y sacrificados 1 semana post-inyección. El WB corresponde a un gel de acrilamida/bisacrilamida al 10 %. NI: SN no inyectada, I: SN inyectada. El gráfico de la derecha muestra el resultado de la cuantificación densitométrica del WB de la figura de la izquierda. Los valores obtenidos fueron normalizados utilizando la expresión de la proteína actina y se graficaron como las veces de cambio en la expresión de ERp72 en el lado inyectado relativa a la expresión en el lado no inyectado. Los valores mostrados corresponden a los promedios y los errores estándar obtenidos para 3 ratones. El asterisco rojo indica un ratone eliminado del análisis densitométrico debido a la presencia de EGFP en ambos lados. **B)** El gráfico muestra el resultado de un PCR en tiempo real utilizando partidores para los ARNm de chop y actina en las disecciones de SN de los ratones inyectados con el AAV shXBP1/EGFP y sacrificados 1 semana post-inyección. Los valores mostrados corresponden a los promedios y los errores estándar obtenidos para 3 ratones. El análisis estadístico fue realizado mediante un test de t de Student. ns: diferencia estadísticamente no significativa.

Probablemente los procesos celulares afectados por la expresión del shXBP1 en las neuronas dopaminérgicas que desencadenan la toxicidad neuronal requieren un mayor tiempo de expresión o acumulación del shARN. Por este motivo, analizamos la expresión de algunos marcadores de estrés de RE en las disecciones de SN de los ratones inyectados con los AAVs, dos semanas post inyección. Como se observa en el WB de la figura 30, la inyección del AAV shXBP1/EGFP, y no así la del AAV shLuc/EGFP, generó una disminución de aproximadamente 3 veces en la expresión del marcador dopaminérgico TH. Adicionalmente, detectamos la expresión de la proteína reportera EGFP, indicando que las disecciones de SN realizadas abarcan la zona transducida (figura 31).

Interesantemente, al analizar la expresión de algunos marcadores de estrés de RE, observamos que la inyección del AAV shXBP1/EGFP indujo un aumento en la expresión de las proteínas ERp72 y Calreticulina. No observamos este aumento en los ratones controles inyectados con el AAV shLuc/EGFP, sugiriendo que el resultado obtenido es específico del shARN para *xbp1* y no una respuesta generada por la transducción viral o la expresión de un shARN no específico (figura 31). Quisimos determinar además si la pérdida de neuronas TH⁺ inducida por la regulación negativa de XBP1 se correlacionaba con la sobreexpresión de *chop*. Como se observa en la figura 32, la inyección del AAV shXBP1/EGFP, no así la inyección del control AAVs shLuc/EGFP, indujo un aumento significativo en la expresión del ARNm de *chop*. Por lo tanto, estos resultados nos indican que la expresión del shXBP1 genera una respuesta de estrés de RE crónico que correlaciona con una pérdida de la viabilidad de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc.

En conjunto, estos resultados nos sugieren que XBP1 es necesario para la mantención de la sobrevivencia de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc y que probablemente la disminución de los niveles de este factor en el adulto tiene efectos drásticos en la sobrevivencia de estas neuronas en condiciones basales.

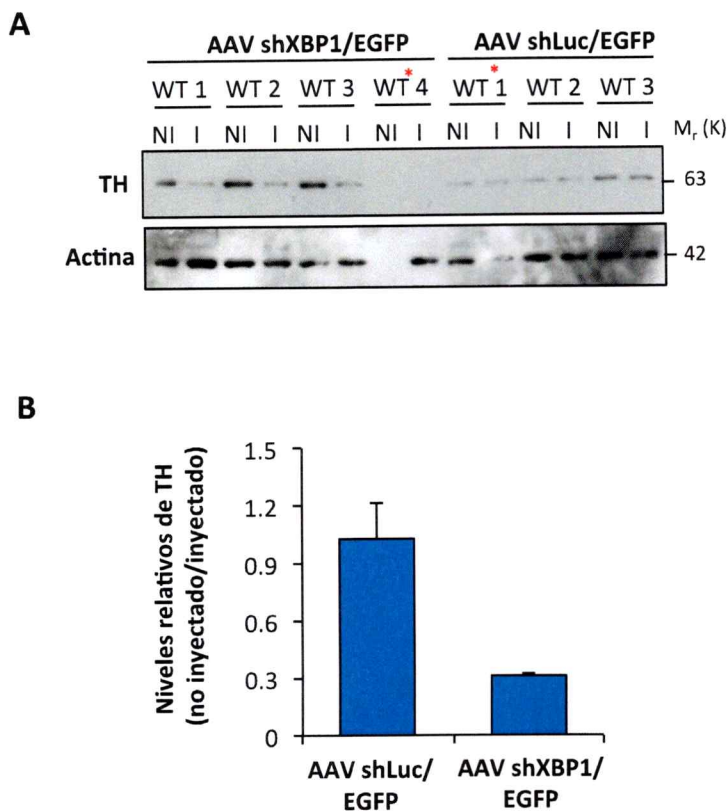


Figura 30: Análisis de la expresión de TH en las disecciones de SN en ratones inyectados con el AAV shXBP1/EGFP. A) La figura muestra un WB realizado con los anticuerpos primarios TH y actina a partir de disecciones de SN de ratones inyectados con el AAV shLuc/EGFP o el AAV shXBP1/EGFP y sacrificados 2 semanas post inyección. La expresión de la proteína actina fue utilizada como control de carga. NI: SN no inyectada, I: SN inyectada. **B)** El gráfico muestra el resultado de la cuantificación densitométrica del WB de la figura A. Los valores obtenidos fueron normalizados utilizando la expresión de la proteína actina y se graficaron como las veces de cambio en la expresión de TH en el lado inyectado relativa a la expresión en el lado no inyectado. Los valores mostrados corresponden a los promedios y los errores estándar obtenidos para 3 ratones inyectados con el AAV shXBP1/EGFP y 3 ratones inyectados con el AAV shLuc/EGFP. El asterisco rojo indica los ratones que fueron eliminados del análisis densitométrico debido a problemas en la detección de la actina en el WB

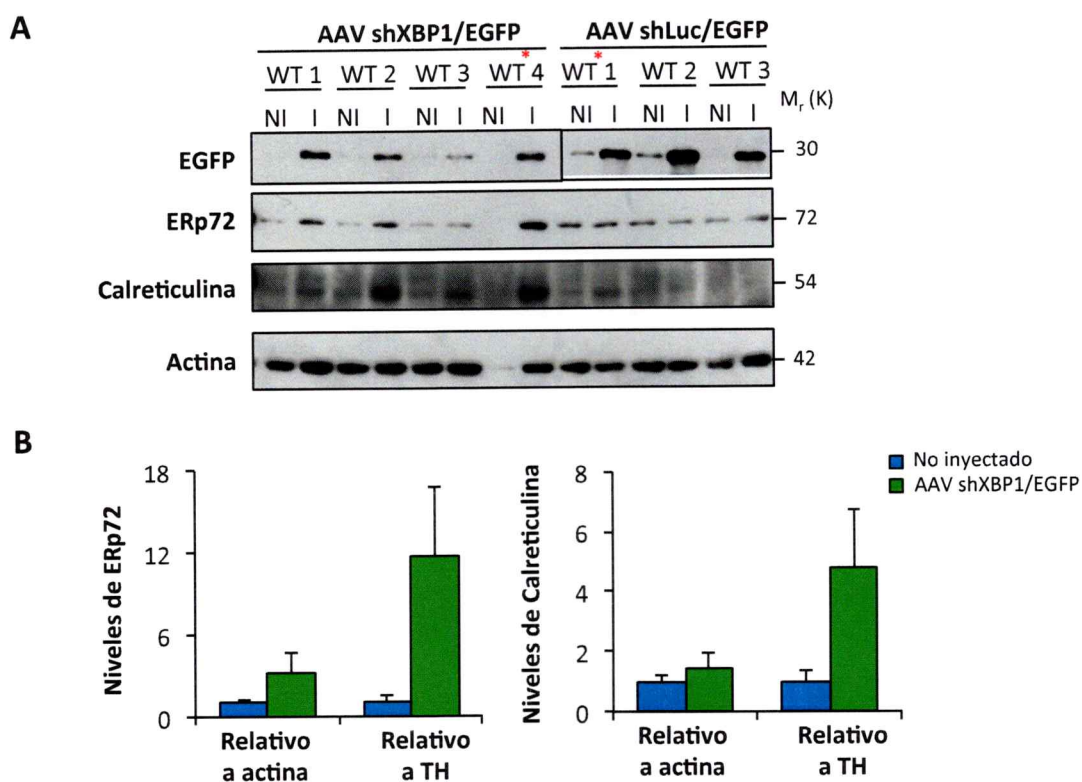


Figura 31: Análisis de la expresión de ERp72 y Calreticulina en disecciones de SN en los ratones inyectados con el AAV shXBP1/EGFP. **A)** La figura muestra un WB realizado con los anticuerpos primarios EGFP, ERp72, Calreticulina y Actina a partir de disecciones de SN de ratones inyectados con el AAV shLuc/EGFP o el AAV shXBP1/EGFP y sacrificados 2 semanas post inyección. La expresión de la proteína actina fue utilizada como control de carga. NI: SN no inyectada, I: SN inyectada. **B)** El gráfico muestra el resultado de la cuantificación densitométrica del WB de la figura A. Los valores obtenidos fueron normalizados utilizando la expresión de la proteína actina o TH según se indica y se graficaron como las veces de cambio en la expresión en el lado inyectado relativa a la expresión en el lado no inyectado. Los valores mostrados corresponden a los promedios y los errores estándar obtenidos para 3 ratones inyectados con el AAV shXBP1/EGFP y 2 ratones inyectados con el AAV shLuc/EGFP. El asterisco rojo indica los ratones que fueron eliminados del análisis densitométrico debido a problemas en la detección de la actina en el WB

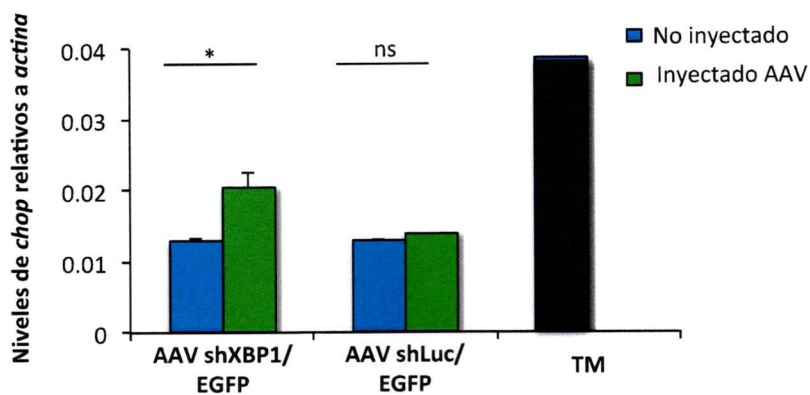


Figura 32: Análisis de la expresión del ARNm de *chop* en disecciones de SN en los ratones inyectados con el AAV shXBP1/EGFP. El gráfico muestra el resultado de un PCR en tiempo real utilizando partidores para los ARNm de *chop* y *actina* en las disecciones de SN de los ratones inyectados con el AAV shXBP1/EGFP y sacrificados 2 semanas post inyección. Como control positivo se muestra el resultado obtenido en la SN disectada de un ratón inyectado ip con 5 $\mu\text{g/g}$ de Tm y sacrificado 24 h post inyección. Los valores mostrados corresponden a los promedios y los errores estándar obtenidos para 3 ratones inyectados con el AAV shXBP1/EGFP, 3 ratones inyectados con el AAV shLuc/EGFP y 1 ratón inyectado con Tm. El análisis estadístico fue realizado mediante un test de t de Student. *: $p < 0,05$, ns: diferencia estadísticamente no significativa.

12. Anexo

12.1 Determinación del nivel de activación de la vía de IRE1 en el modelo toxicológico de 6-OHDA *in vivo*.

Hasta la fecha, los mecanismos involucrados en la toxicidad inducida por 6-OHDA *in vivo* no han sido completamente aclarados y se ha propuesto, entre varias hipótesis, que tanto el estrés oxidativo como el estrés del RE podrían participar en la muerte de las neuronas dopaminérgicas inducida por esta neurotoxina (revisado en Holtz, Turetzky y col. 2006). Por otra parte, varios estudios realizados en modelos celulares han demostrado que la neurotoxina 6-OHDA induce estrés del RE con una concomitante activación de la UPR (Silva, Ries y col. 2005). Como se observa en la figura 33, y de acuerdo a lo reportado en la literatura, observamos que células de neuroblastoma humano SH-SY5Y tratadas con 6-OHDA presentaron una disminución de la viabilidad celular evaluada a las 24 h, la cual es dependiente de la concentración utilizada de la neurotoxina. Adicionalmente, corroboramos que la exposición de las células a esta neurotoxina indujo el procesamiento del ARNm de *xbp1*, el cual responde al tiempo de incubación y a la dosis utilizada, indicando una activación de la vía de la UPR dependiente del sensor IRE1 α .

Para evaluar si la inyección de 6-OHDA en ratones adultos generaba la activación del sensor de la UPR IRE1 α , realizamos inyecciones estereotáxicas hemilaterales con 8 μ g de 6-OHDA en el cuerpo estriado de ratones WT de 3 meses de edad y disectamos la SN y el cuerpo estriado a distintos tiempos post inyección. Como control positivo del ensayo de RT-PCR incluimos extractos de células MEFs tratadas durante 16 h con 2,5 μ g de Tm en los cuales es posible detectar tanto la forma procesada como al no procesada del ARNm de *xbp1* (figura 34). Al analizar las muestras provenientes de los extractos de SN y cuerpo estriado de los animales inyectados con 6-OHDA, no observamos el procesamiento del ARNm de *xbp1* en un intervalo de 8 a 48 h posterior a la inyección. Sorprendidos con este resultado negativo, decidimos evaluar si a tiempos más cortos podríamos detectar la actividad de IRE1 α . Para ello analizamos el procesamiento del ARNm de *xbp1* a tiempo cortos incluyendo 2, 3 y 4 h posterior a la inyección. Como muestran las figuras 34 y 35 nuevamente observamos el mismo resultado, 6-OHDA no indujo el procesamiento del ARNm de *xbp1* en disecciones de SN y cuerpo estriado.

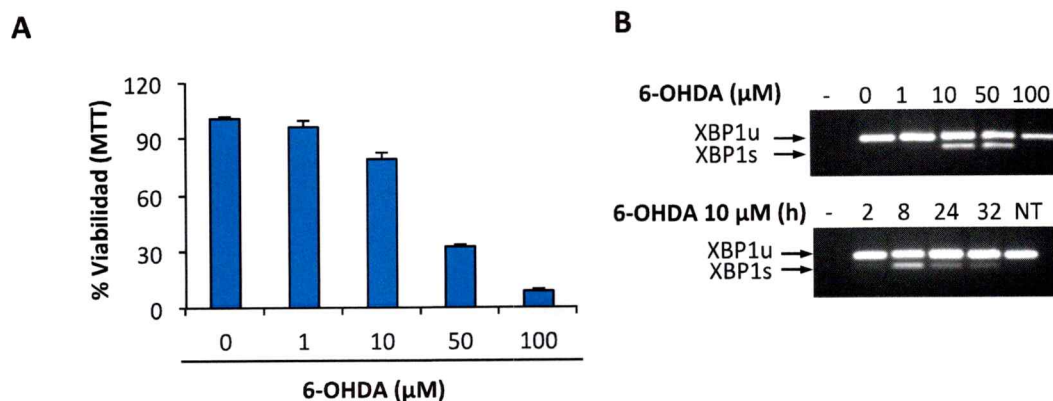


Figura 33: Efecto de 6-OHDA sobre la viabilidad celular y el procesamiento del ARNm de *xbp1* en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y. A) El gráfico muestra el resultado de un ensayo de viabilidad celular (MTT) en células SH-SY5Y incubadas con concentraciones crecientes de 6-OHDA durante 24 h. Las células fueron sembradas en placas de 96 pozos a una concentración de 40000 células/pozo. Los valores mostrados muestran al porcentaje respecto a células no tratadas y corresponden a los promedios y desviaciones estándar de los triplicados del ensayo. **B)** La figura muestra el gel de agarosa al 2,5 % en el que se corrió el resultado de un ensayo de RT-PCR para evaluar el procesamiento del ARNm de *xbp1* en células SH-SY5Y incubadas con 6-OHDA a las concentraciones y tiempos indicados. NT: células SH-SY5Y no tratadas, (-) control negativo sin templado, XBP1u: *xbp1* no procesado, XBP1s: *xbp1* procesado.

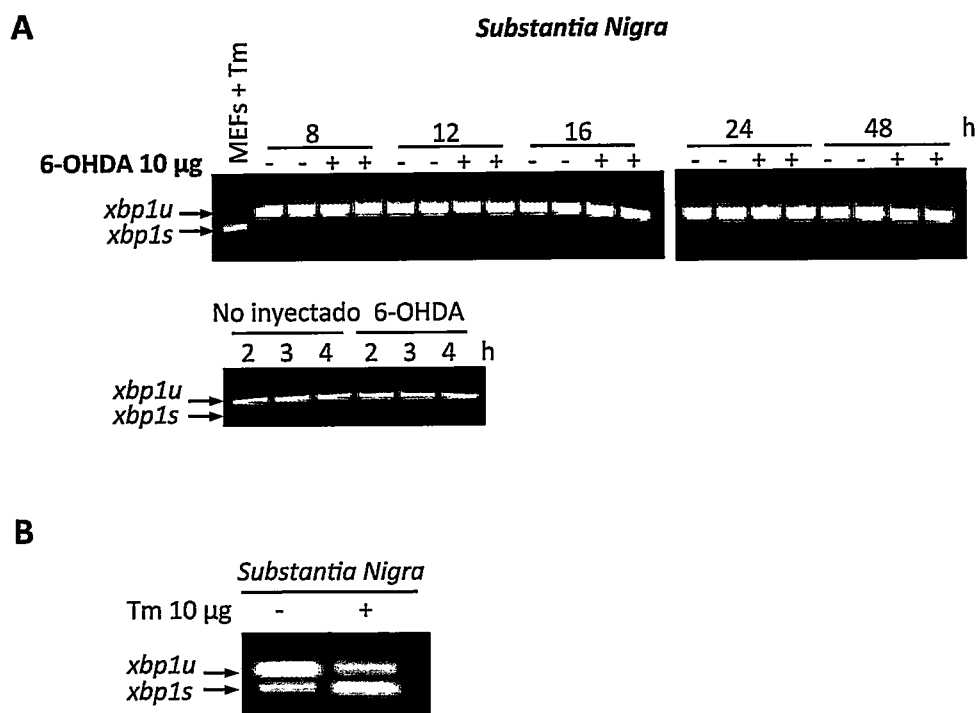


Figura 34: Efecto de 6-OHDA sobre el procesamiento del ARNm de *xbp1* *in vivo*. A) El gel muestra el resultado de un curso temporal del procesamiento del ARNm de *xbp1* en la SN disectada a distintos tiempos post inyección de ratones inyectados con 8 μ g de 6-OHDA en el cuerpo estriado. Cada carril corresponde a la SN inyectada (+) o no inyectada (-) para 2 ratones por tiempo. Como control positivo del ensayo se muestran extractos de células MEFs tratadas con 2,5 μ g de Tm durante 16 h. La imagen superior muestra los resultados obtenidos 8, 12, 16, 24 y 48 h post inyección y la imagen inferior muestra el resultado obtenido a las 2, 3 y 4 h post inyección. B) El gel muestra el resultado obtenido del ensayo de procesamiento del ARNm de *xbp1* en extractos de SN en un ratón inyectado con 10 μ g de Tm directamente en la SNpc y sacrificado 24 h más tarde.

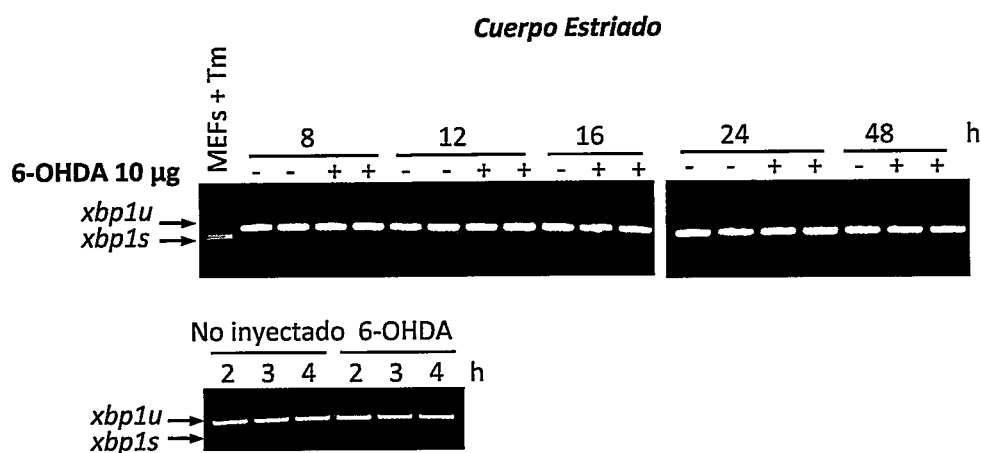


Figura 35: Efecto de 6-OHDA sobre el procesamiento del ARNm de *xbp1* *in vivo*. A) El gel muestra el resultado de un curso temporal del procesamiento del ARNm de *xbp1* en el cuerpo estriado disectado a distintos tiempos post inyección de ratones inyectados con 8 μ g de 6-OHDA en el cuerpo estriado. Cada carril corresponde al lado inyectado (+) o no inyectado (-) para 2 ratones por tiempo. Como control positivo del ensayo se muestran extractos de células MEFs tratadas con 2,5 μ g de Tm durante 16 h. La imagen superior muestra los resultados obtenidos 8, 12, 16, 24 y 48 h post inyección y la imagen inferior muestra el resultado obtenido a las 2, 3 y 4 h post inyección.

Con el fin de discriminar si el resultado obtenido con la 6-OHDA se debe a que esta neurotoxina realmente no es capaz de activar al sensor de la UPR IRE1 α o si las neuronas dopaminérgicas no responden al estrés de RE activando esta vía, realizamos inyecciones hemilaterales de 10 μ g de Tm directamente en la SN de ratones WT. Como se observa en el ensayo de RT-PCR en extractos de SN realizados 24 h posteriores a la inyección de Tm (figura 34), es posible detectar el procesamiento del ARNm de *xbp1*, sugiriendo que específicamente 6-OHDA no activó la vía de IRE1 α *in vivo*.

12.2 Determinación del nivel de expresión del factor proapoptótico de la UPR *chop* en el modelo toxicológico de 6-OHDA *in vivo*.

Debido a que se ha demostrado que la inyección de 6-OHDA en el cuerpo estriado de ratas neonatas induce la activación de CHOP (Silva, Ries y col. 2005), decidimos evaluar en nuestro modelo toxicológico en ratones la activación de este factor proapoptótico. Para esto inyectamos 8 μ g de 6-OHDA en el cuerpo estriado de ratones WT adultos y determinamos la activación transcripcional de *chop* en la SN mediante un PCR en tiempo real a las 8, 12, 16, 24 y 48 h post inyección. Como se observa en la figura 36, no detectamos cambios en la expresión del ARNm de *chop* a ninguno de los tiempos evaluados. Sin embargo, concordante a lo observado en el ensayo de procesamiento del ARNm de *xbp1*, observamos que la inyección de Tm directamente en la SN indujo un aumento de 4 veces en los niveles relativos del ARNm de *chop*, demostrando que el sistema dopaminérgico responde a un activador clásico de la UPR.

En conjunto estos resultados indican que la neurotoxina 6-OHDA no indujo el procesamiento del ARNm de *xbp1* ni la activación transcripcional de *chop* *in vivo*, descartando la activación de las vías de UPR dependientes de los sensores IRE1 α y PERK, sin embargo no podemos excluir la posible activación de la vía de ATF6. Debido a que la regulación de ATF6 es post-traducciona, y depende de su procesamiento en el aparato de Golgi (ver figura 2), es necesario evaluar a través de WB la presencia de las formas procesada y no procesada. Lamentablemente en nuestro laboratorio no contamos con buenos anticuerpos para esta proteína por lo que no pudimos determinar si la deficiencia de XBP1 genera cambios en la activación de esta vía de la UPR.

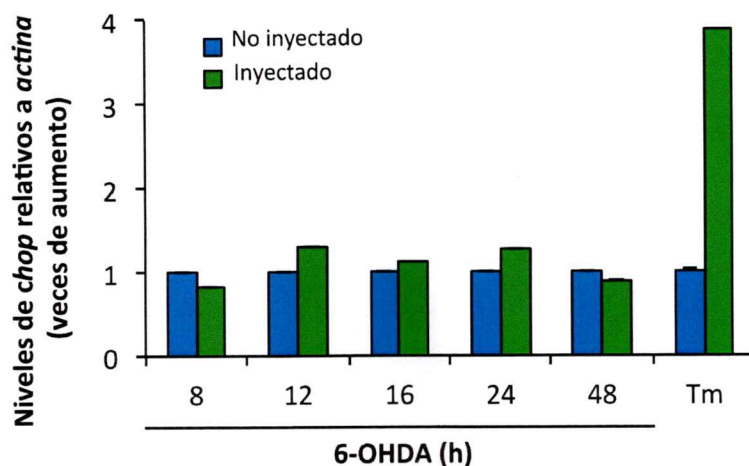


Figura 36: Análisis de la expresión de *chop* en disecciones de SN en los ratones inyectados con 6-OHDA. El gráfico muestra el resultado de un PCR en tiempo real utilizando partidores para los ARNm de *chop* y *actina* en las disecciones de SN de los ratones inyectados con 8 μ g de 6-OHDA y sacrificados 8,12,16,24 y 48 h post inyección. Como control positivo se muestra el resultado obtenido en la SN disectada de un ratón inyectado con 10 μ g de Tm directamente en la SN y sacrificado 24 h post inyección. Los valores fueron normalizados a *actina* y se muestran como las veces de cambio en la expresión relativo al lado no inyectado. Los valores mostrados corresponden a los promedios y las desviaciones estándar obtenidos para 2 ratones por grupo para las inyecciones de 6-OHDA y 1 ratón inyectado con Tm.

13. Discusión.

13.1 Modelo toxicológico de la 6-OHDA.

Diversos modelos genéticos de la EP han entregado información valiosa sobre los posibles mecanismos patogénicos causantes de esta patología. Sin embargo, hoy en día se cree que estos no entregan información suficiente sobre los mecanismos moleculares que subyacen a la muerte de las neuronas dopaminérgicas en la mayoría de los casos en los que no existe un componente genético asociado, los cuales corresponden al 90 % de los pacientes afectados con la EP. Es por este motivo que los modelos basados en el uso de neurotoxinas que selectivamente generan la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc adquieren gran relevancia para el estudio de la EP. Las neurotoxinas más utilizadas para generar modelos de la EP en animales y en cultivos celulares son el MPTP, la 6-OHDA, la rotenona y el paraquat (revisado en Blesa, Phani y col. 2012). Teóricamente todas estas neurotoxinas ejercen su acción a través de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), lo cual resulta en la degeneración de las neuronas dopaminérgicas que es la principal característica de la EP (revisado en Blesa, Phani y col. 2012).

La 6-OHDA fue la primera droga parkinsoniana utilizada en animales que selectivamente induce la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc (Ungerstedt 1968). 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 (Javoy, Sotelo y col. 1976). 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 (Alvarez-Fischer, Henze y col. 2008). 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 (Luthman, Fredriksson y col. 1989). 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). Sin embargo, una de las grandes 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 completamente conocidos (revisado en Blum, Torch y col. 2001). No obstante, ningún modelo animal basado en la 6-OHDA ha generado la formación de los cuerpos de Lewy, los cuales son una de las principales características histopatológicas de la EP. Aún así, debido a su selectividad sobre las neuronas dopaminérgicas, este modelo toxicológico se utiliza ampliamente en roedores como modelo de estudio de la muerte de estas neuronas en la SNpc (revisado en Bove y Perier 2012).

En esta tesis implementamos un modelo toxicológico de la EP en ratones adultos, basado en una única inyección intraestriatal de 6-OHDA, obteniendo a los 7 días post inyección una lesión de aproximadamente un 80 % en los terminales axonales dopaminérgicos en el cuerpo estriado (figura 7). Cabe destacar que, para el análisis de la lesión en la SNpc, realizamos una cuantificación manual de los somas TH⁺, a través de un análisis detallado de diferentes zonas de la SNpc en todo su eje antero-posterior. Utilizando esta metodología, describimos que dos zonas particulares de la SNpc resultaron selectivamente afectadas con la 6-OHDA, lo que se reflejó en una pérdida del 50 % de los somas TH⁺ (figuras 9 y 10). Especulamos que la susceptibilidad frente a 6-OHDA de zonas específicas de la SNpc podría deberse a la inervación sectorizada de los axones de estas neuronas hacia el cuerpo estriado. Es probable que los somas localizados en estas zonas de la SNpc proyecten sus axones al área del cuerpo estriado en la cual inyectamos directamente la toxina, siendo selectivamente más afectados que el resto de los somas neuronales que inervan sus axones a zonas del cuerpo estriado más alejadas del punto de la inyección. Sin embargo, debido a la complejidad del circuito nigro-estriatal, el mapa de la inervación de los terminales axonales de las neuronas de la SNpc hacia el cuerpo estriado aún es materia de estudio, esto principalmente debido al complejo árbol dendrítico y las conexiones sinápticas involucradas (Groves, Linder y col. 1994; Prensa y Parent 2001). Por otra parte, no podemos descartar que estas zonas de la SNpc contengan una población de neuronas dopaminérgicas más vulnerable a la 6-OHDA. Por ejemplo, se ha descrito que dentro de la SNpc existen subpoblaciones de neuronas dopaminérgicas que, dependiendo de su localización, tienen distintas susceptibilidades a degenerar. Por ejemplo, las neuronas ventro-laterales de la SNpc son más vulnerables que las dorso-mediales, sugiriendo que existen propiedades características, que diferencian una población de otra (Gonzalez-Hernandez,

Afonso-Oramas y col. 2009). Es probable que un fenómeno similar ocurra a través del eje antero-posterior de la SNpc, y que particularmente las neuronas localizadas en ciertos cortes coronales sean más afectadas que el resto debido a propiedades neuroquímicas, expresión diferencial de factores antioxidantes u otros.

Al comparar la magnitud de la lesión en la SNpc obtenida en este trabajo con un estudio realizado por otro grupo de investigación utilizando un protocolo similar (Alvarez-Fischer, Henze y col. 2008), notamos que en nuestro caso obtuvimos un porcentaje levemente menor de pérdida de neuronas TH⁺. Los autores describen una pérdida de un 60 % en los somas TH⁺ de la SNpc a los 7 días post inyección, mientras nosotros obtuvimos un 50 % en una zona restringida (sólo un 30 % al analizar globalmente la SNpc). Es probable que esta diferencia se deba al tipo de cuantificación realizada. Los autores utilizan la estereología para cuantificar el número de somas TH⁺, mientras que en nuestro trabajo nos basamos en el conteo manual. Por otra parte, Alvarez-Fisher y colaboradores describen en su protocolo de cirugía que la inyección de la 6-OHDA fue realizada en el cuerpo estriado izquierdo, mientras que en nuestro caso fue realizada en el cuerpo estriado derecho de los animales, lo cual podría afectar la magnitud de la lesión generada. La pérdida de neuronas dopaminérgicas de la SNpc generada en nuestro modelo toxicológico en ratones adultos resultó consistente y reproducible, permitiéndonos realizar los estudios posteriores sobre el efecto de la deficiencia de XBP1 en el SNC en la susceptibilidad de las neuronas dopaminérgicas frente a la 6-OHDA.

13.2 Estrés de RE en el modelo de 6-OHDA.

Existe evidencia que indica 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). Sin embargo, los mecanismos asociados al estrés oxidativo que desencadenan la disfunción celular y la posterior muerte neuronal no son completamente conocidos (revisado en Blum, Torch y col. 2001). Una década atrás, dos grupos de investigación realizaron estudios de expresión génica en células PC12 y SH-SY5Y expuestas a la 6-OHDA y describieron que gran parte de los cambios de expresión inducidos por esta neurotoxina ocurre en genes blanco de la UPR (Ryu, Harding y col. 2002; Holtz y O'Malley 2003; Ryu, Angelastro y col. 2005), los que correlacionaron con una pérdida de la viabilidad celular. Estos cambios de expresión

génica junto con la expresión de componentes río arriba en las vías de la UPR, tales como pPERK, pIRE1 α y ATF4, fueron validados por los autores mediante WB. Estos resultados sugirieron por primera vez que el estrés de RE y la UPR podrían contribuir a la muerte neuronal inducida por la 6-OHDA. A pesar de la gran cantidad de estudios realizados *in vitro* (revisado en Wang y Takahashi 2007), son muy pocos los trabajos que evalúan la activación de la UPR inducida por 6-OHDA en las neuronas dopaminérgicas *in vivo* (Silva, Ries y col. 2005; Akazawa, Saito y col. 2010; Tanaka, Fukuoka y col. 2013), por lo que la información disponible sobre el estrés de RE en este modelo toxicológico es bastante escasa y poco concluyente.

En esta tesis describimos que la inyección intraestriatal de 6-OHDA en ratones WT adultos no indujo el procesamiento del ARNm de *xbp1* ni la sobreexpresión del factor transcripcional *chop* en disecciones de SN y cuerpo estriado utilizando métodos bioquímicos en los que se analizan extractos totales (figuras 34, 35 y 36), sugiriendo que la inyección de 6-OHDA no generó la activación fuerte 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, la cual, debido a razones técnicas, no pudimos evaluar. Estos resultados se contraponen con lo descrito previamente en células en cultivo expuestas a 6-OHDA y corroborado en esta tesis, en donde se ha observado que todas las vías de la UPR se activan, lo cual se correlaciona con una pérdida de la viabilidad celular (revisado en Wang and Takahashi 2007). Sin embargo los modelos experimentales *in vitro* son completamente diferentes a los *in vivo* por lo que es difícil hacer una comparación. Aún así, este resultado negativo nos sorprendió bastante debido a que unos pocos estudios demuestran que 6-OHDA y MPTP inducen la activación de la UPR en la SN de rata y ratón (Akazawa, Saito y col. ; Selvaraj, Sun y col. ; Egawa, Yamamoto y col. 2011). Para explicar estos resultados debemos considerar que nuestra aproximación experimental fue realizada a partir de disecciones de cerebro medio ventral que contienen completamente la SNpc mas zonas aledañas donde también hay presentes otros tipos neuronales tales como neuronas gabaérgicas de la SN *pars reticulata*, neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral además de glias. Debido a esto, cualquier fenómeno que ocurra en una subpoblación celular del área disectada, por ejemplo un aumento de marcadores de la UPR en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc, puede ser enmascarado en el extracto total. También la posible activación transitoria y asincrónica de la UPR predecimos que seria difícil de detectar con nuestros métodos. Por esta razón, basándonos exclusivamente en esta aproximación experimental, no podemos descartar que la 6-OHDA induzca la activación de la UPR

en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc. Por otra parte, si la cinética de activación de las vías de la UPR varía entre las distintas poblaciones celulares de la zona disectada, este fenómeno también podría afectar el análisis de una vía particular en extracto total. Para resolver estos dos puntos es necesario evaluar la expresión de los marcadores de la UPR en ratones inyectados con 6-OHDA directamente en cortes de cerebro medio, mediante histología. De esta forma es posible identificar específicamente si en las neuronas dopaminérgicas se activa la UPR. Lamentablemente en nuestro laboratorio no contamos con anticuerpos para marcadores de la UPR que funcionen en tejido cerebral, por lo que esta pregunta permanece aún abierta.

En contraste con nuestro resultado, un estudio realizado en ratas neonatas demostró que la inyección de 6-OHDA en el cuerpo estriado genera un aumento en la expresión del factor transcripcional CHOP, específicamente en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc, lo que se correlacionó con una pérdida de la viabilidad neuronal (Silva, Ries y col. 2005). Los autores realizaron un análisis histológico de cortes de cerebro medio donde detectaron la localización nuclear de este factor transcripcional en las ratas inyectadas con la neurotoxina. Sin embargo, no hubo cambios en la expresión de otros marcadores de la UPR tales como la chaperona BiP, medido por hibridación *in situ*, y en el procesamiento del ARNm de *xbp1*, en disecciones de SN, lo que concuerda con nuestros resultados. Estos datos sugieren que la muerte neuronal inducida por la 6-OHDA probablemente no está mediada directamente por estrés de RE. Esta observación está acorde con el hecho de que la sobreexpresión de CHOP puede ocurrir en condiciones independientes de estrés de RE, como por ejemplo escasez 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, la observación de aumentos en la expresión de esta proteína pro apoptótica CHOP como único marcador de la UPR no es suficiente para asegurar una condición de estrés de RE. Es probable que las diferencias observadas entre nuestro modelo y el modelo de Silva y colaboradores respecto a la expresión de CHOP, mediada por la inyección de 6-OHDA, se deba a la técnica de detección utilizada (IHC versus RT-PCR de disecciones de SN) o a que los modelos animales utilizados son diferentes, ya que los autores utilizan ratas neonatas, mientras que en nuestros experimentos utilizamos ratones adultos.

En conjunto estos resultados nos sugieren que probablemente el estrés de RE no contribuye directamente a la muerte neuronal inducida por la neurotoxina 6-OHDA en nuestro

génica junto con la expresión de componentes río arriba en las vías de la UPR, tales como pPERK, pIRE1 α y ATF4, fueron validados por los autores mediante WB. Estos resultados sugirieron por primera vez que el estrés de RE y la UPR podrían contribuir a la muerte neuronal inducida por la 6-OHDA. A pesar de la gran cantidad de estudios realizados *in vitro* (revisado en Wang y Takahashi 2007), son muy pocos los trabajos que evalúan la activación de la UPR inducida por 6-OHDA en las neuronas dopaminérgicas *in vivo* (Silva, Ries y col. 2005; Akazawa, Saito y col. 2010; Tanaka, Fukuoka y col. 2013), por lo que la información disponible sobre el estrés de RE en este modelo toxicológico es bastante escasa y poco concluyente.

En esta tesis describimos que la inyección intraestriatal de 6-OHDA en ratones WT adultos no indujo el procesamiento del ARNm de *xbp1* ni la sobreexpresión del factor transcripcional *chop* en disecciones de SN y cuerpo estriado utilizando métodos bioquímicos en los que se analizan extractos totales (figuras 34, 35 y 36), sugiriendo que la inyección de 6-OHDA no generó la activación fuerte 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, la cual, debido a razones técnicas, no pudimos evaluar. Estos resultados se contraponen con lo descrito previamente en células en cultivo expuestas a 6-OHDA y corroborado en esta tesis, en donde se ha observado que todas las vías de la UPR se activan, lo cual se correlaciona con una pérdida de la viabilidad celular (revisado en Wang and Takahashi 2007). Sin embargo los modelos experimentales *in vitro* son completamente diferentes a los *in vivo* por lo que es difícil hacer una comparación. Aún así, este resultado negativo nos sorprendió bastante debido a que unos pocos estudios demuestran que 6-OHDA y MPTP inducen la activación de la UPR en la SN de rata y ratón (Akazawa, Saito y col. ; Selvaraj, Sun y col. ; Egawa, Yamamoto y col. 2011). Para explicar estos resultados debemos considerar que nuestra aproximación experimental fue realizada a partir de disecciones de cerebro medio ventral que contienen completamente la SNpc mas zonas aledañas donde también hay presentes otros tipos neuronales tales como neuronas gabaérgicas de la SN *pars reticulata*, neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral además de glías. Debido a esto, cualquier fenómeno que ocurra en una subpoblación celular del área disectada, por ejemplo un aumento de marcadores de la UPR en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc, puede ser enmascarado en el extracto total. También la posible activación transitoria y asincrónica de la UPR predecimos que sería difícil de detectar con nuestros métodos. Por esta razón, basándonos exclusivamente en esta aproximación experimental, no podemos descartar que la 6-OHDA induzca la activación de la UPR

modelo *in vivo*. Sin embargo, datos generados en esta tesis obtenidos en ratones deficientes para XBP1 en el SNC, indican que la manipulación de la expresión de este factor transcripcional afecta la vulnerabilidad de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc frente a la neurotoxina 6-OHDA, sugiriendo que XBP1 podría tener un rol en la fisiología de estas neuronas (ver próxima sección).

13.3. Protección de las neuronas dopaminérgicas frente a la 6-OHDA y cambios adaptativos en la SNpc de ratones deficientes para XBP1.

Con el objetivo de evaluar la posible participación de XBP1 en la toxicidad inducida por 6-OHDA *in vivo*, utilizamos ratones deficientes en el SNC para este factor de transcripción. Al explorar la susceptibilidad de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc frente a la neurotoxina 6-OHDA, encontramos que la deficiencia de XBP1 generó una protección parcial en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc evaluado a nivel de los somas neuronales. Esta protección la detectamos en la zona descrita como susceptible en los ratones WT. La inyección de 6-OHDA generó una pérdida de un 50 % de los somas TH⁺ en los ratones XBP1 WT y sólo un 25 % en los ratones XBP1 KO (figuras 9 y 10). Sin embargo, a nivel de los terminales axonales en el cuerpo estriado no vemos diferencias en la magnitud de la lesión generada (figura 8), por lo que especulamos que la diferencia de un 25 % de protección generada en los somas TH⁺ de la SNpc entre ambos grupos experimentales, probablemente no es suficiente para inducir un cambio a nivel de los terminales axonales del cuerpo estriado.

La protección de las neuronas TH⁺ de la SNpc de los ratones XBP1 KO observada en este trabajo concuerda con estudios que demuestran que la deficiencia de XBP1 tiene efectos protectores en la sobrevida neuronal en modelos animales de ciertas enfermedades neurodegenerativas. Por ejemplo, la deficiencia de XBP1 en el SNC protege de la muerte neuronal en modelos de la ELA y la HD en ratones (Hetz, Thielen y col. 2009; Vidal, Figueroa y col. 2012). Esta protección, en ambos casos, se correlaciona con un incremento en mecanismos de sobrevida celular tales como la autofagia, sugiriendo una conexión funcional entre la UPR y esta vía de degradación de componentes celulares. A pesar de los efectos protectores observados en los modelos de la ELA y la EH, en un modelo infeccioso de la enfermedad de prion en ratones, la deficiencia de XBP1 no afecta la agregación de la proteína prion, la muerte neuronal ni la sobrevida de los animales infectados (Hetz, Lee y col. 2008). No obstante, varios trabajos indican

que la sobreexpresión de XBP1s tiene efectos beneficiosos en diversos modelos animales de enfermedades neurodegenerativas. Por ejemplo, nuestro laboratorio demostró que la sobreexpresión local de XBP1s en el cuerpo estriado, disminuye la cantidad de inclusiones citoplasmáticas de Huntingtina generado por la inyección de AAVs recombinantes portadores del gen de la Huntingtina mutante, en un modelo de la EH en ratones (Zuleta, Vidal y col. 2012). Por otra parte, en un modelo de la EP en moscas que sobreexpresan el péptido A β , la sobreexpresión de XBP1s tiene actividad neuroprotectora, evaluado por la disminución de las alteraciones morfológicas en el ojo de las moscas generadas por el péptido neurotóxico (Casas-Tinto, Zhang y col. 2011). Otro grupo de investigación describió que, en un modelo toxicológico de la EP, la sobreexpresión de este factor de transcripción protege a las neuronas dopaminérgicas de la toxicidad inducida por el MPTP en ratones adultos (Sado, Yamasaki y col. 2009). Y más recientemente, el trabajo de Hu y colaboradores demostró el rol protector de la sobreexpresión de XBP1s en un modelo de daño al nervio óptico y degeneración del ganglio retinal (Hu, Park y col. 2011).

En resumen, estos antecedentes indican que la contribución funcional de XBP1 y la UPR en las neuronas varía dependiendo del modelo utilizado, por lo que predecir el posible efecto que esta manipulación tendrá en la progresión de distintas enfermedades neurodegenerativas no resulta obvio. Es probable que existan mecanismos regulatorios acoplados a las vías de la UPR que varían en los distintos tipos neuronales y que dependen del estímulo patológico al cual son expuestas las neuronas, por lo que no es posible extrapolar los resultados obtenidos de un modelo a otro.

Cabe destacar que la protección de las neuronas dopaminérgicas frente a la 6-OHDA observada en los ratones XBP1 KO difiere de lo previamente descrito en ratones ATF6 KO expuestos a la neurotoxina MPTP. La deficiencia del sensor de la UPR ATF6 α aumenta la susceptibilidad de las neuronas dopaminérgicas frente al MPTP, evaluado mediante la acumulación de inclusiones citoplasmáticas positivas para ubiquitina y la pérdida de la viabilidad neuronal (Egawa, Yamamoto y col. 2011). En ese estudio los autores concluyen que la vía de ATF6 regula positivamente la expresión de chaperonas del RE y componentes del ERAD en las neuronas dopaminérgicas, y que la atenuación en la expresión de estos componentes en los ratones ATF6 KO contribuyen al aumento de la vulnerabilidad frente al MPTP. Por otra parte, se ha descrito que

las neuronas dopaminérgicas de ratones deficientes para CHOP, componente río abajo de la vía de PERK, están protegidas frente a la neurotoxina 6-OHDA (Silva, Ries y col. 2005), sugiriendo que CHOP contribuye a la muerte neuronal en este modelo. Estos resultados nos sugieren que probablemente existe una contribución diferencial de estas vías de la UPR en la mantención de la sobrevivencia de las neuronas dopaminérgicas cuando son expuestas a estas neurotoxinas. Podríamos especular que el efecto de estos compuestos tóxicos en las vías de la UPR en las neuronas dopaminérgicas ocurre en dos fases. Inicialmente, en una fase adaptativa, la vía de ATF6 y probablemente la vía de IRE1 α contribuyen a la mantención de la homeostasis y sobrevivencia neuronal mediante la regulación positiva de chaperonas y foldasas del RE. En una segunda fase, la activación sostenida de la vía de PERK probablemente induce la activación de CHOP, desencadenando la muerte neuronal. A pesar de que la hipótesis de que el estrés de RE induce la activación de las 3 vías de la UPR de manera secuencial es bastante aceptada (Ron and Walter 2007), es probable que en el caso de las neuronas, exista una especialización de la respuesta UPR frente a los estímulos tóxicos, activándose ciertas vías preferencialmente. Hasta la fecha no se conoce la contribución exacta de cada una de las vías de la UPR en la fisiología de las neuronas dopaminérgicas, por lo que no podemos predecir si la manipulación de una u otra tendrá el mismo efecto en la viabilidad neuronal en condiciones patológicas. No obstante, como se mencionó anteriormente existe evidencia proveniente de otros modelos de enfermedades neurodegenerativas, que sugiere que cada vía de la UPR tiene una especialización diferente que depende del tipo neuronal y del contexto fisiológico o patológico en el que se activa (revisado en Hetz 2012).

Un ejemplo claro de la complejidad de la red de señalización de la UPR en un contexto patológico, proviene de un modelo de la ELA en ratones transgénicos que sobreexpresan la proteína superóxido dismutasa 1 mutante (SODmut). Se ha descrito que la deficiencia de XBP1 en el SNC retrasa la aparición de los síntomas y prolonga la sobrevivencia de los ratones SODmut (Hetz, Thielen y col. 2009), mientras que la haploinsuficiencia de PERK aumenta la severidad de la patología (Wang, Popko y col. 2011), contrastando los efectos entre las vías de IRE1 α y de PERK en este modelo. Sin embargo, el tratamiento de los ratones SODmut con Salubrinal, un compuesto que induce la fosforilación de eIF2 α , río abajo en la señalización de PERK, genera una protección significativa en la progresión de la patología en este mismo modelo (Saxena, Cabuy y col. 2009). Estos estudios demuestran la complejidad de la señalización de la UPR en una condición patológica

particular, sugiriendo que los efectos de la manipulación de cada vía y de los componentes de estas dependen probablemente de mecanismos regulatorios específicos para cada vía de la UPR. Otro ejemplo reciente de la especialización de las vías de la UPR fue descrito en un modelo de daño axonal y degeneración de las células del ganglio retinal (Hu, Park y col. 2011). En este modelo de neurodegeneración, el daño axonal induce un aumento transitorio del procesamiento del ARNm de *xbp1* y la expresión persistente de CHOP. Concordante con esta observación, la deficiencia para CHOP y la sobreexpresión de XBP1s en estos ratones promueven la supervivencia neuronal frente al daño axonal. Como estos ejemplos, existen varios reportes mostrando los efectos diferenciales de la manipulación de las vías de señalización de la UPR en diferentes condiciones patológicas. Por esta razón resulta interesante determinar particularmente en las neuronas dopaminérgicas el impacto de la deficiencia de XBP1 en condiciones basales y en un modelo toxicológico de la EP.

Específicamente en modelos de la EP, Sado y colaboradores describieron que la sobreexpresión local de XBP1s en ratas adultas protege frente al MPTP, lo cual parece contraponerse con nuestra observación de que la deficiencia de XBP1 es protectora en el modelo de 6-OHDA en ratones. Los autores demuestran que el MPTP induce la expresión de CHOP pero no el procesamiento del ARNm de *xbp1 in vitro*, por lo que especulan que la protección mediada por la sobreexpresión de XBP1s *in vivo* estaría dada por la activación de blancos transcripcionales de la UPR que promueven la supervivencia celular frente al estrés de RE (Sado, Yamasaki y col. 2009). Sin embargo, esta hipótesis no se demuestra experimentalmente. En nuestro modelo de ratones XBP1 KO, la deficiencia de XBP1 se genera desde etapas muy tempranas del desarrollo embrionario del animal, por lo que para disecar la(s) causa(s) de la protección de estos animales frente a la 6-OHDA debemos considerar posibles cambios compensatorios que contribuyan a este fenómeno. No podemos descartar que la deficiencia de XBP1 desde el desarrollo induzca una sobreactivación de las otras vías de señalización de la UPR, lo cual podría contribuir a la protección observada frente a la 6-OHDA.

En el contexto de posibles cambios compensatorios generados en los ratones XBP1 KO, observamos que la deficiencia de XBP1 indujo un aumento en la expresión de dos marcadores de estrés de RE clásicos como la chaperona de RE Calreticulina y la disulfuro isomerasa ERp72 en la SN (figura 11). Adicionalmente, observamos un aumento en el procesamiento del ARNm de *xbp1*

en disecciones de SN en estos ratones, indicando una sobreactivación del sensor de estrés de RE IRE1 α (figura 14). A pesar de que la sobreactivación de IRE1 α ha sido descrita previamente en hígado y páncreas de ratones deficientes para XBP1, a diferencia de nuestros resultados, los autores no detectaron aumento en otros marcadores de la UPR, sugiriendo que la sobreactivación en este caso es probablemente un mecanismo regulatorio que controla la actividad del sensor en la ausencia de XBP1 (Lee, Scapa y col. 2008; Lee, Heidtman y col. 2011; Hur, So y col. 2012). Nuestros resultados sugieren que la deficiencia de XBP1 en el SNC induce una condición de estrés de RE basal en la SN. Un resultado interesante es que este fenómeno es específico para la SN, debido a que no detectamos cambios en estos marcadores de la UPR en disecciones provenientes de corteza cerebral (figuras 17 y 18). Estos resultados concuerdan con lo publicado previamente por nuestro laboratorio, en donde no se observaron aumentos en la expresión de marcadores de estrés de RE en tejidos del SNC tales como médula espinal, cuerpo estriado y cultivos primarios de corteza cerebral de estos ratones (Hetz, Lee y col. 2008; Hetz, Thielen y col. 2009; Valenzuela, Collyer y col. 2012; Vidal, Figueroa y col. 2012). Concordante con la observación de que la deficiencia de XBP1 no afecta el número de neuronas dopaminérgicas en la SNpc en condiciones basales, no detectamos aumentos en la expresión del factor transcripcional proapoptótico *chop* en los animales deficientes para XBP1, sugiriendo que el estrés de RE generado es adaptativo (figura 16).

Estos resultados en conjunto nos sugieren que los cambios observados a nivel basal en la SN de los ratones deficientes para XBP1 podrían representar una reacción adaptativa de las neuronas dopaminérgicas que restablece la homeostasis proteica cuando la UPR está comprometida, y especulamos que probablemente la protección de estas neuronas frente a la 6-OHDA sea el resultado de los cambios producidos por la ausencia de XBP1. Aún queda por determinar cuál es el mecanismo que media la inducción de estos cambios compensatorios. A pesar de que hasta la fecha no se ha descrito en otros sistemas, especulamos que la ausencia de XBP1 genera una sobreactivación de la vía de ATF6 en las neuronas dopaminérgicas, lo que explicaría los aumentos en la expresión de las chaperonas y foldasas de RE observados. Por otra parte, la sobreactivación de IRE1 α podría ser un evento particular generado como una regulación positiva de la vía. Actualmente nuestro laboratorio plantea generar un ratón doble deficiente para XBP1 y ATF6, aún no publicado, el cual consistirá en una potente herramienta genética que

proponemos utilizar con el objetivo de aclarar si la protección observada en los ratones XBP1 KO frente a la 6-OHDA depende de la vía de ATF6.

Respecto a los posibles mecanismos moleculares involucrados en la protección frente a 6-OHDA en los ratones deficientes para XBP1 existen varias posibilidades para explorar. Por ejemplo, la vía de ATF4 regula la expresión de genes involucrados en la incorporación de aminoácidos en la célula, el metabolismo del glutatión y la resistencia a estrés oxidativo (Harding, Zhang y col. 2003, revisado en Walter y Ron 2011), por lo que células MEF deficientes para ATF4 o PERK son más sensibles a la muerte inducida por estrés oxidativo (Harding, Zhang y col. 2003). De los genes antioxidantes regulados por esta vía, el de la *Hemoxygenasa-1* (HO-1) nos resulta de un particular interés debido a que en células de neuroblastoma SH-SY5Y, la regulación positiva de esta proteína mediada por estrés de RE, protege de la toxicidad inducida por la 6-OHDA (Hara, Kamiya y col. 2011). En esta misma línea, nuestros resultados sugieren una tendencia de aumento en la fosforilación de eIF2 α en los ratones deficientes para XBP1 en condiciones basales, sugiriendo una posible activación de la vía de PERK (figura 15). Por lo tanto, no podemos descartar que la protección de las neuronas dopaminérgicas frente a la 6-OHDA observada en los ratones deficientes para XBP1 sea debido a una mayor capacidad antioxidante generada basalmente por la activación basal de la vía de PERK en estas neuronas. Debido a que la vía de PERK/ATF4 controla además la expresión del factor proapoptótico CHOP, el papel protector de esta vía frente a estrés oxidativo es aún controversial, sin embargo en los ratones deficientes para XBP1 no observamos aumentos en la expresión del ARNm de *chop*, por lo que especulamos que la sobreactivación de esta vía en la SN podría tener un rol adaptativo.

Otro posible mecanismo protector frente a la 6-OHDA en los ratones deficientes para XBP1 es que la condición de estrés de RE basal generada en la SN inhiba directamente la apoptosis. Bajo condiciones de estrés de RE adaptativo la UPR induce la expresión de genes que promueven la supervivencia, sin embargo, también puede inhibir la muerte celular. Por ejemplo, recientemente se descubrió que un microRNA, denominado miR-211, que inhibe la expresión del factor proapoptótico CHOP, es regulado positivamente por estrés de RE a través de la vía de PERK (Chitnis, Pytel y col. 2012). Nuestros datos sugieren una tendencia de activación de la vía de PERK basalmente en la SN de los ratones deficientes para XBP1, por lo que es probable que la expresión de este micro RNA esté incrementada basalmente en las neuronas dopaminérgicas. Debido a que

CHOP podría participar en la muerte de las neuronas dopaminérgicas expuestas a 6-OHDA, especulamos que la regulación negativa de este factor transcripcional, mediado por el miR-211, puede contribuir a la protección de las neuronas dopaminérgicas frente a la toxicidad inducida por la 6-OHDA.

Debido a que la UPR tiene un rol clave en la secreción en tejidos altamente especializados como hígado, páncreas, glándulas salivales, entre otros, no podemos descartar que, la sobreactivación de estas vías en las neuronas dopaminérgicas de los ratones deficientes para XBP1 estimule la liberación de factores neurotróficos lo cual podría resultar en una protección frente a estímulos neurotóxicos tales como la inyección de 6-OHDA.

Debido a que la UPR controla la expresión de genes que participan en el tráfico y secreción de proteínas, podríamos especular también que las neuronas dopaminérgicas de los ratones deficientes para XBP1 que presentan un estrés de RE basal, poseen una mayor capacidad secretora, lo cual podría traducirse en beneficios como por ejemplo una mayor liberación de factores de crecimiento o neurotróficos que protejan del daño oxidativo generado por la 6-OHDA. XBP1.

Estos resultados fueron el punto de partida para un estudio en colaboración con el centro de genómica y bioinformática de la Universidad Mayor, que tiene por objetivo principal determinar los blancos transcripcionales afectados en las neuronas dopaminérgicas de los ratones XBP1 KO. Para ello estamos realizando un análisis transcriptómico en disecciones de SN proveniente de ratones deficientes para XBP1 y sus respectivos controles en condiciones basales. Los resultados obtenidos en este estudio nos darán una visión más global acerca de los procesos celulares alterados en los ratones deficientes para XBP1, lo que nos permitirá explorar mecanismos específicos que podrían contribuir a la protección de las neuronas dopaminérgicas frente a la toxicidad inducida por la 6-OHDA.

13.4. Efecto de la expresión de un shRNA contra XBP1 en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc de ratones adultos.

Los resultados obtenidos en los ratones XBP1 KO indican que la deficiencia de *xbp1* desde el desarrollo embrionario altera la homeostasis del RE generando una condición de estrés de RE basal adaptativa específicamente en la SN. Esta observación sugiere que el factor transcripcional XBP1 tiene un rol importante en la fisiología de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc. Con el objetivo de evaluar el efecto de la deficiencia de XBP1 en las neuronas dopaminérgicas y evitar los cambios compensatorios debido a la ausencia de este factor desde el desarrollo embrionario, expresamos localmente un shARN diseñado contra *xbp1* en la SNpc de ratones adultos. La expresión del shXBP1 en las neuronas dopaminérgicas indujo neurotoxicidad espontánea, la que fue revelada por una pérdida de un 40 % de los somas TH⁺ en la SNpc y un 40 % de los terminales axonales del cuerpo estriado 1 mes post-inyección (figuras 22 y 26). Adicionalmente, detectamos la pérdida del marcador NeuN y alteraciones en la morfología de las neuronas transducidas únicamente en la SNpc de los ratones que sobreexpresan el shXBP1, sugiriendo que el fenotipo generado corresponde a muerte neuronal (figuras 23 y 24). Si bien la pérdida de neuronas TH⁺ inducida por la expresión del shXBP1 resultó significativa, ésta no fue suficiente para gatillar alteraciones motoras espontánea detectables mediante el test del cilindro (figura 27). Este resultado concuerda con lo descrito en la literatura para modelos toxicológicos de la EP en ratones, en donde se ha observado que para obtener fenotipos motores es necesaria una pérdida de al menos un 50 % de los terminales axonales en el cuerpo estriado (Alvarez-Fischer, Henze y col. 2008; Grealish, Mattsson y col. 2010). Sin embargo, la correlación entre alteraciones motoras y extensión de la lesión en el cuerpo estriado varía dependiendo del test y del tipo del protocolo de hemilesión utilizado (Iancu, Mohapel y col. 2005).

Concordante con los resultados obtenidos en los ratones XBP1 KO, la inyección del AAV shXBP1/EGFP, y no así la del AAV shLuc/EGFP, indujo un aumento en la expresión de las proteínas de RE ERp72 y Calreticulina, 2 semanas post inyección (figura 31). No obstante, en este caso, la expresión del shXBP1 localmente en las neuronas dopaminérgicas adultas indujo un aumento en la expresión de *chop*, sugiriendo una condición de estrés de RE no adaptativo (figura 32). Esta observación concuerda con la muerte de las neuronas TH⁺ transducidas con el AAV shXBP1/EGFP detectada en la SNpc 1 mes post inyección (figura 22).

Es importante mencionar que, a pesar de haber validado la regulación negativa de XBP1 mediada por el shXBP1 *in vitro*, es necesario validar el silenciamiento de este factor

transcripcional *in vivo*. Como experimento preliminar determinamos el nivel de expresión del ARNm de *xbp1* en disecciones de SN de ratones inyectados con el AAVshXBP1/EGFP y posteriormente inyectados con Tm (figura 21). A pesar de observar una baja consistente en todos los animales inyectados, esta no resultó significativa debido probablemente a que las células no transducidas enmascaran el efecto generado en las neuronas transducidas. Para determinar si el efecto de neurodegeneración causado por el shXBP1 puede ser revertido con la sobreexpresión de XBP1s, inicialmente realizamos un experimento de rescate *in vitro*. Al sobreexpresar XBP1s en células N2A que expresan establemente el shXBP1 observamos un leve rescate de la expresión de XBP1s, sugiriendo una alta eficiencia del shXBP1. Basados en este leve rescate *in vitro* y, debido a que disponíamos de la herramienta adenoviral, evaluamos si la sobreexpresión de XBP1s con un tag HA revertía el fenotipo de toxicidad inducido por el shXBP1. A pesar de agregar 2 veces más partículas virales portadoras del XBP1s respecto al shXBP1, no detectamos rescate de la muerte neuronal y, más aún, no observamos neuronas que expresen el ambas construcciones simultáneamente, sugiriendo que todas las neuronas transducidas con el shXBP1 probablemente degeneran (figura 25). Debido a la alta eficiencia del shXBP1, actualmente estamos trabajando en la generación de un AAV portador del gen de *xbp1s* con una mutación puntual silente en el sitio de reconocimiento del shARN. Con esta aproximación experimental evaluaremos si la sobreexpresión de XBP1s revierte el fenotipo tóxico generado por el shXBP1 *in vivo*.

Estos resultados nos sugieren que, a diferencia de lo observado en los ratones XBP1 KO, la deficiencia de XBP1 en las neuronas dopaminérgicas adultas genera estrés de RE crónico y letal. En el caso de los XBP1 KO, generados mediante el sistema CRE/LoxP, la expresión del promotor de Nestina en etapas muy tempranas del desarrollo embrionario induce la delección en el gen de *xbp1*, lo que se traduce en una deficiencia de la proteína XBP1 desde las células progenitoras neurales. Probablemente la plasticidad del sistema neural durante el desarrollo nervioso promueve la generación de los cambios compensatorios necesarios para mantener la diferenciación y la supervivencia neuronal en ausencia de XBP1 y permite el desarrollo adecuado del ratón. Por el contrario, en el caso de un ratón adulto, el sistema nervioso es mucho menos plástico frente a alteraciones que comprometen la homeostasis celular, por lo que probablemente los mecanismos desencadenados para mantener la supervivencia cuando la UPR está comprometida no son suficientes, por lo que se desencadena la muerte neuronal. Se ha descrito

que XBP1 es expresado prácticamente en todo el cerebro durante el desarrollo del SNC, sin embargo en etapas post natales su expresión se restringe principalmente a áreas con abundantes cuerpos neuronales tales como la corteza cerebral, el bulbo olfatorio, el cuerpo estriado, el cerebelo, entre otros (Hayashi, Kasahara y col. 2007). Los autores determinan específicamente como varía la expresión de XBP1 en el hipocampo durante el desarrollo del ratón, no obstante, debido a los resultados obtenidos en este trabajo, sería interesante determinar este patrón en la SNpc y poder especular acerca de su posible rol en la generación y mantención de las neuronas dopaminérgicas.

En conjunto, estos datos más los obtenidos en los ratones XBP1 KO sugieren que XBP1 tiene una función, aún por dilucidar, en la fisiología de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc y que la disminución de la expresión de este factor transcripcional altera la homeostasis del RE y la señalización de la UPR, la cual dependiendo del contexto puede ser beneficiosa o letal.

13.5 Efecto de pre-condicionamiento en la SNpc de los ratones deficientes para XBP1.

Debido a que la UPR tiene un rol dual en la sobrevivencia celular, por una parte manteniendo la homeostasis proteica y por otra desencadenando la apoptosis bajo condiciones de estrés de RE crónico, se podría especular que la inducción de niveles controlados de estrés de RE en modelos experimentales de la EP podrían tener un efecto protector frente a estímulos neurotóxicos. Recientemente, un grupo de investigación exploró esta hipótesis en modelos de la EP en ratones y moscas. En este estudio, se observó que el tratamiento de los animales con bajas concentraciones de Tm incrementa la sobrevivencia de las neuronas dopaminérgicas en modelos genéticos y farmacológicos de la EP. El tratamiento con bajas dosis de Tm produce un efecto de pre-condicionamiento, en el que aumenta selectivamente la expresión de XBP1s y no así la del factor proapoptótico CHOP (Fouillet, Levet y col. 2012). En este trabajo los autores relacionan la protección de las neuronas dopaminérgicas inducida por el tratamiento con Tm con el aumento en el proceso de autofagia. Se ha descrito que ciertas alteraciones en esta vía degradativa desencadenan espontáneamente neurodegeneración, indicando que la autofagia es un proceso necesario en la mantención de la sobrevivencia neuronal. Por ejemplo, la deficiencia de Atg7, un componente clave en la maquinaria autofágica, induce alteraciones de comportamiento en los

ratones, lo que se correlaciona con una muerte neuronal masiva en la corteza y cerebelo además de la presencia de proteínas ubiquitinadas en las neuronas remanentes (Komatsu, Waguri y col. 2006).

En el trabajo de Fouillet y colaboradores los autores describen que la generación de estrés de RE medio condiciona a las neuronas dopaminérgicas para desencadenar rápidamente la autofagia frente a estímulos proapoptóticos tales como la neurotoxina 6-OHDA. Varios estudios han explorado la relación entre los procesos de estrés de RE y autofagia, y su participación en la neurodegeneración, sin embargo, los mecanismos exactos que explican cómo la UPR activa la autofagia no están completamente aclarados (revisado en Matus, Lisbona y col. 2008).

En nuestro trabajo demostramos que la deficiencia de XBP1 generó una condición de estrés de RE adaptativo, no tóxico, específicamente en la SN lo que se correlacionó con una protección de las neuronas dopaminérgicas frente a la toxicidad inducida por la 6-OHDA. Es probable que esta condición adaptativa generada durante el desarrollo produzca un efecto de precondicionamiento que proteja a las neuronas dopaminérgicas frente a la 6-OHDA. Aún queda por determinar si estos cambios adaptativos involucran aumentos en la autofagia, tal como lo describe Fouillet y colaboradores en su estudio. Sin embargo, experimentos preliminares nos sugieren que la deficiencia de XBP1 en las neuronas dopaminérgicas genera cambios en algunos marcadores de la autofagia tales como las proteínas Beclin1 y LC3II, lo cual concuerda con los trabajos previos de nuestro laboratorio en los que se ha descrito la activación de la autofagia en los ratones deficientes para XBP1 en modelos de la ELA y la EH (Hetz, Thielen y col. 2009; Vidal, Figueroa y col. 2012). Recientemente nuestro laboratorio desarrolló un método para detectar el flujo del proceso autofágico *in vivo*, con el que evaluaremos posibles cambios en este procesos de degradación celular en las neuronas dopaminérgicas de los ratones deficientes para XBP1 (Castillo y col, en revisión).

Siguiendo en la línea de los cambios adaptativos generados en la SN de ratones deficientes para XBP1 hay que mencionar que la deficiencia de este factor transcripcional indujo una sobreactivación del sensor IRE1 α (figura 14). Por este motivo, debemos considerar que otros procesos celulares relacionados específicamente con esta vía de señalización de la UPR contribuyan a la protección de las neuronas dopaminérgicas frente a la 6-OHDA en los ratones

deficientes para XBP1. La actividad nucleasa de IRE1 α , además de catalizar el procesamiento del ARNm de *xbp1*, cataliza la degradación de un subgrupo de ARNs mensajeros que codifican para proteínas de la vía secretora, lo que atenúa la carga neta de proteínas traducidas en el RE en condiciones de estrés (Hollien y Weissman 2006; Han, Lerner y col. 2009; Hollien, Lin y col. 2009). Adicionalmente, en mamíferos, IRE1 α participa en la degradación de ARNm de proteínas residentes de RE y recientemente se demostró que cataliza la degradación de un microRNA que inhibe la traducción de Caspasa2, por lo que también contribuye al proceso apoptosis en condiciones de estrés de RE crónicas (Han, Lerner y col. 2009; Upton, Wang y col. 2012). No obstante, este mecanismo de degradación de ARNm también se ha descrito en procesos fisiológicos como por ejemplo la secreción de insulina en las células β (Lipson, Ghosh y col. 2008) y en el metabolismo de lípidos en el hígado (Lee, Heidtman y col. 2011; So, Hur y col. 2012). Es interesante destacar que un trabajo reciente demostró que la sobreactivación de IRE1 α en el hígado de ratones adultos genera protección frente a la hepatotoxicidad inducida por acetaminofeno, conocido comúnmente como paracetamol (Hur, So y col. 2012). La sobredosis de este compuesto es la causa más frecuente de daño hepático en adultos jóvenes en Estados Unidos, por lo que los mecanismos involucrados en su toxicidad son el centro de variados estudios celulares. La protección frente a acetaminofeno descrita en este trabajo, se debe a la degradación selectiva de 3 ARNm que codifican para las enzimas que metabolizan el acetaminofeno, la cual es catalizada por IRE1 α . Debido a que los procesos fisiopatológicos regulados por este nuevo proceso celular asociado a IRE1 α están recientemente siendo estudiados, resulta interesante explorar si un mecanismo similar al observado en el caso del acetaminofeno podría ocurrir en las neuronas dopaminérgicas deficientes para XBP1 otorgándoles protección frente a la 6-OHDA. Sin embargo, debido a que los mecanismos exactos involucrados en el metabolismo y toxicidad de la 6-OHDA *in vivo* no son conocidos, es difícil especular sobre blancos específicos. No obstante, en nuestro laboratorio contamos actualmente con ratones IRE1 α KO los cuales son una buena aproximación para explorar si la protección observada frente a 6-OHDA en los ratones deficientes para XBP1 es dependiente de la sobreactivación de IRE α o si es causada por otros mecanismos celulares no relacionados con esta vía de señalización.

Resulta de un particular interés el hecho de que la disminución de la expresión de XBP1 en los ratones XBP1 KO genera cambios en la homeostasis del RE en la SN, y no en otros tejidos cerebrales, sugiriendo que las neuronas dopaminérgicas en esta región son más susceptibles a

alteraciones en la expresión de este factor transcripcional. Esta observación sugiere que XBP1 tiene un rol basal en la fisiología de las neuronas dopaminérgicas, el cual podría ser complementario a su función en condiciones de estrés de RE. Existen tres observaciones en nuestro trabajo que nos sugieren que XBP1 cumple un rol fisiológico en estas neuronas: 1) en disecciones de SN de ratones XBP1 WT, a diferencia de otras zonas del SNC, detectamos basalmente el procesamiento del ARNm de *xbp1* (figura 14); 2) la expresión de un shXBP1 localmente en las neuronas dopaminérgicas genera muerte neuronal espontánea (figura 22) y 3) la deficiencia de XBP1 en el SNC desde el desarrollo perturba a las neuronas dopaminérgicas e induce cambios adaptativos en la homeostasis del RE (figuras 11, 14 y 15).

La pregunta que surge a partir de estos datos es cual es la función de XBP1 en la fisiología de las neuronas dopaminérgicas. Estudios realizados por otros grupos de investigación indican que XBP1 regula la expresión de genes involucrados en la secreción de proteínas y que es fundamental en el desarrollo y diferenciación de células altamente secretoras (revisado en Hetz 2012). A pesar de que las neuronas tienen una alta capacidad secretora no se ha explorado el rol de la UPR en la liberación de neurotransmisores o factores neurotróficos. Sin embargo, en un estudio en *C.elegans* se exploró el rol de XBP1 en el ensamblaje y destinación a membrana del receptor de glutamato. En este estudio se demostró que XBP1 es necesario para el ensamblaje del receptor en el RE y para su salida y destinación a la membrana plasmática (Shim, Umemura y col. 2004). Debido a que el metabolismo de la dopamina es sumamente oxidativo, cualquier desregulación en su síntesis o liberación puede inducir toxicidad neuronal. Aunque no se ha descrito si la deficiencia de XBP1 afecta la distribución subcelular de receptores y transportadores de dopamina sería interesante explorar la posible participación de este factor transcripcional en la síntesis y destinación a membrana de proteínas claves en el metabolismo de este neurotransmisor tales como el transportador de dopamina (DAT), el transportador vesicular (VMAT) y los receptores post sinápticos de dopamina D1 y D2. La posible participación de XBP1 en el metabolismo de la dopamina explicaría la toxicidad de su deficiencia en las neuronas adultas, las cuales no tienen la capacidad plástica que poseen durante el desarrollo para compensar la ausencia de este factor. No obstante, debido a su rol como factor transcripcional, XBP1 podría participar en un sin número de procesos fisiológicos en el SNC, sin embargo, cada vez es más evidente que este miembro clave de la UPR tiene roles en el SNC que no dependen necesariamente de la generación de estrés de RE.

Los resultados presentados en esta tesis, sumados a los antecedentes aportados por la literatura, indican que predecir la contribución de las vías de la UPR en la EP es sumamente complejo, debido principalmente al efecto dual de esta respuesta en la supervivencia y muerte celular. La EP, como la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas, se caracteriza por una larga fase pre-sintomática en la cual las neuronas dopaminérgicas mueren en forma silenciosa. Resulta de un gran interés estudiar esta etapa de la patología en la cual se podría prevenir la muerte neuronal progresiva. Basados en los antecedentes presentados en esta tesis y en algunos reportes recientes podríamos especular que la inducción artificial de niveles bajos y controlados de estrés de RE en etapas pre-sintomáticas de la EP podrían proteger a las neuronas dopaminérgicas de la degeneración, mediante un fenómeno de pre-condicionamiento, retrasando la aparición de los síntomas. En este contexto, la manipulación particular de los niveles de expresión de XBP1 resulta un blanco interesante de evaluar en otros modelos toxicológicos y en modelos genéticos de la EP. Gracias a las herramientas de terapia génica es posible dirigir local y temporalmente la expresión de proteínas o moduladores de la expresión (shARN, microARN, ARN de interferencia) de XBP1 u otros componentes de la UPR y validar algunos de los hallazgos realizados hasta la fecha. A partir de los datos obtenidos en esta tesis nuestro laboratorio generó una colaboración con el EPFL de Suiza, a través de la cual estamos evaluando en un modelo de la EP en ratas si la manipulación de la expresión de XBP1 tiene un efecto en la progresión de la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc.

Aún quedan muchas preguntas abiertas respecto a la función de XBP1 y de las vías de la UPR en la fisiología de las neuronas dopaminérgicas. Hasta ahora la gran mayoría de los estudios se enfocan en evaluar la contribución de esta respuesta celular en el SNC en condiciones patológicas, sin embargo algunos estudios han demostrado que la alteración de componentes del circuito dopaminérgico, como el receptor D2 (Tinsley, Bye y col. 2009) o los niveles de dopamina (Dukes, Van Laar y col. 2008), inducen espontáneamente estrés de RE. Conocer los procesos fisiológicos regulados por la UPR en las neuronas dopaminérgicas abre la posibilidad de explorar la vulnerabilidad selectiva de estas neuronas a degenerar en la EP. Debido a esta vulnerabilidad selectiva es que, como mencionamos previamente, decidimos colaborar con el centro de bioinformática y genómica de la Universidad Mayor y explorar básicamente en la SN los blancos transcripcionales alterados en ratones deficientes para XBP1. Esperamos que estos resultados nos

den luces acerca de la participación de este factor en la fisiología de las neuronas dopaminérgicas además de poder validar nuestros hallazgos realizados mediante técnicas bioquímicas.

Finalmente debemos recalcar que las estrategias para manipular el nivel de estrés de RE mediante herramientas moleculares podría tener un impacto terapéutico en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas del SNC, y más aun, comprender los procesos fisiológicos regulados por la UPR en cada tipo neuronal abre la posibilidad de generar blancos específicos que impacten en la homeostasis del RE y en la supervivencia neuronal.

14. Conclusiones.

Las conclusiones más relevantes del trabajo realizado en esta tesis son:

La deficiencia de XBP1 en el SNC en los ratones XBP1 KO:

- *Genera protección en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc frente a la toxicidad inducida por la 6-OHDA.*
- *Induce la sobreexpresión de las proteínas residentes del RE Calreticulina y ERp72 junto con un aumento en el procesamiento del ARNm de XBP1 específicamente en la SN.*
- *No afecta el número de neuronas dopaminérgicas de la SNpc ni induce la expresión del factor proapoptótico chop, sugiriendo una condición de estrés de RE adaptativo.*

La expresión del shXBP1 localmente en las neuronas dopaminérgicas adultas:

- *Induce la pérdida de los marcadores neuronales NeuN y TH además de alteraciones en la morfología neuronal.*
- *No genera alteraciones motoras espontáneas en los ratones adultos.*
- *Induce la expresión de los marcadores de estrés de RE Calreticulina, ERp72 y chop, sugiriendo la generación de estrés de RE crónico y letal.*

14. Bibliografía.

- 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. and A. L. Harris (2008). "Activating transcription factor 4." Int J Biochem Cell Biol **40**(1): 14-21.
- Andreu, C. I., U. Woehlbier, M. Torres and C. Hetz (2012). "Protein disulfide isomerases in neurodegeneration: from disease mechanisms to biomedical applications." FEBS Lett **586**(18): 2826-2834.
- Belal, C., N. J. Ameli, A. El Kommos, S. Bezalel, A. M. Al'Khafaji, M. R. Mughal, M. P. Mattson, G. A. Kyriazis, B. Tyrberg and S. L. Chan (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., L. Navarra, M. Zaltieri, E. Falarti, S. Bodei, S. Sigala, L. Battistin, M. Spillantini, C. Missale and P. Spano (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., S. Phani, y col. (2012). "Classic and new animal models of Parkinson's disease." J Biomed Biotechnol **2012**: 845618.
- Blum, D., S. Torch, y col. (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.
- Bove, J. and C. Perier (2012). "Neurotoxin-based models of Parkinson's disease." Neuroscience **211**: 51-76.
- Boyce, M., K. F. Bryant, C. Jousse, K. Long, H. P. Harding, D. Scheuner, R. J. Kaufman, D. Ma, D. M. Coen, D. Ron and J. Yuan (2005). "A selective inhibitor of eIF2alpha dephosphorylation protects cells from ER stress." Science **307**(5711): 935-939.
- Casas-Tinto, S., Y. Zhang, J. Sanchez-Garcia, M. Gomez-Velazquez, D. E. Rincon-Limas and P. Fernandez-Funez (2011). "The ER stress factor XBP1s prevents amyloid-beta neurotoxicity." Hum Mol Genet **20**(11): 2144-2160.
- Castillo, K., D. Rojas-Rivera, F. Lisbona, B. Caballero, M. Nassif, F. A. Court, S. Schuck, C. Ibar, P. Walter, J. Sierralta, A. Glavic and C. Hetz (2011). "BAX inhibitor-1 regulates autophagy by controlling the IRE1alpha branch of the unfolded protein response." EMBO J **30**(21): 4465-4478.
- Castro-Caldas, M., A. N. Carvalho, E. Rodrigues, C. J. Henderson, C. R. Wolf, C. M. Rodrigues and M. J. Gama (2012). "Tauroursodeoxycholic acid prevents MPTP-induced dopaminergic cell death in a mouse model of Parkinson's disease." Mol Neurobiol **46**(2): 475-486.

Chen, W., S. Duan, J. Zhou, Y. Sun, Y. Zheng, N. Gu, G. Feng and L. He (2004). "A case-control study provides evidence of association for a functional polymorphism -197C/G in XBP1 to schizophrenia and suggests a sex-dependent effect." Biochem Biophys Res Commun **319**(3): 866-870.

Chitnis, N. S., D. Pytel, y col. (2012). "miR-211 is a prosurvival microRNA that regulates chop expression in a PERK-dependent manner." Mol Cell **48**(3): 353-64.

Colla, E., P. Coune, Y. Liu, O. Pletnikova, J. C. Troncoso, T. Iwatsubo, B. L. Schneider and M. K. Lee (2012). "Endoplasmic reticulum stress is important for the manifestations of alpha-synucleinopathy in vivo." J Neurosci **32**(10): 3306-3320.

Colla, E., P. H. Jensen, O. Pletnikova, J. C. Troncoso, C. Glabe and M. K. Lee (2012). "Accumulation of toxic alpha-synuclein oligomer within endoplasmic reticulum occurs in alpha-synucleinopathy in vivo." J Neurosci **32**(10): 3301-3305.

Conn, K. J., W. Gao, A. McKee, M. S. Lan, M. D. Ullman, P. B. Eisenhauer, R. E. Fine and J. M. Wells (2004). "Identification of the protein disulfide isomerase family member PDip in experimental Parkinson's disease and Lewy body pathology." Brain Res **1022**(1-2): 164-172.

Cooper, A. A., A. D. Gitler, A. Cashikar, C. M. Haynes, K. J. Hill, B. Bhullar, K. Liu, K. Xu, K. E. Strathearn, F. Liu, S. Cao, K. A. Caldwell, G. A. Caldwell, G. Marsischky, R. D. Kolodner, J. Labaer, J. C. Rochet, N. M. Bonini and S. Lindquist (2006). "Alpha-synuclein blocks ER-Golgi traffic and Rab1 rescues neuron loss in Parkinson's models." Science **313**(5785): 324-328.

Dauer, W. and S. Przedborski (2003). "Parkinson's disease: mechanisms and models." Neuron **39**(6): 889-909.

de Lau, L. M. and M. M. Breteler (2006). "Epidemiology of Parkinson's disease." Lancet Neurol **5**(6): 525-535.

Duan, W. M., C. M. Rodrigues, L. R. Zhao, C. J. Steer and W. C. Low (2002). "Tauroursodeoxycholic acid improves the survival and function of nigral transplants in a rat model of Parkinson's disease." Cell Transplant **11**(3): 195-205.

Duda, J. E., B. I. Giasson, Q. Chen, T. L. Gur, H. I. Hurtig, M. B. Stern, S. M. Gollomp, H. Ischiropoulos, V. M. Lee and J. Q. Trojanowski (2000). "Widespread nitration of pathological inclusions in neurodegenerative synucleinopathies." Am J Pathol **157**(5): 1439-1445.

Dukes, A. A., V. S. Van Laar, y col. (2008). "Changes in endoplasmic reticulum stress proteins and aldolase A in cells exposed to dopamine." J Neurochem **106**(1): 333-46.

Dusonchet, J., O. Kochubey, K. Stafa, S. M. Young, Jr., R. Zufferey, D. J. Moore, B. L. Schneider and P. Aebischer (2011). "A rat model of progressive nigral neurodegeneration induced by the Parkinson's disease-associated G2019S mutation in LRRK2." J Neurosci **31**(3): 907-912.

Egawa, N., K. Yamamoto, H. Inoue, R. Hikawa, K. Nishi, K. Mori and R. Takahashi (2011). "The endoplasmic reticulum stress sensor, ATF6{alpha}, protects against neurotoxin-induced dopaminergic neuronal death." J Biol Chem.

Fornace, A. J., Jr., I. Alamo, Jr., y col. (1988). "DNA damage-inducible transcripts in mammalian cells." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(23): 8800-4.

- Giasson, B. I., J. E. Duda, S. M. Quinn, B. Zhang, J. Q. Trojanowski and V. M. Lee (2002). "Neuronal alpha-synucleinopathy with severe movement disorder in mice expressing A53T human alpha-synuclein." Neuron **34**(4): 521-533.
- Gonzalez-Hernandez, T., D. Afonso-Oramas, y col. (2009). "Phenotype, compartmental organization and differential vulnerability of nigral dopaminergic neurons." J Neural Transm Suppl(73): 21-37.
- Gorbatyuk, M. S., A. Shabashvili, W. Chen, C. Meyers, L. F. Sullivan, M. Salganik, J. H. Lin, A. S. Lewin, N. Muzyczka and O. S. Gorbatyuk (2012). "Glucose Regulated Protein 78 Diminishes alpha-Synuclein Neurotoxicity in a Rat Model of Parkinson Disease." Mol Ther.
- Grealish, S., B. Mattsson, P. Draxler and A. Bjorklund (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.
- Groves, P. M., J. C. Linder, y col. (1994). "5-hydroxydopamine-labeled dopaminergic axons: three-dimensional reconstructions of axons, synapses and postsynaptic targets in rat neostriatum." Neuroscience **58**(3): 593-604.
- Han, D., A. G. Lerner, L. Vande Walle, J. P. Upton, W. Xu, A. Hagen, B. J. Backes, S. A. Oakes and F. R. Papa (2009). "IRE1alpha kinase activation modes control alternate endoribonuclease outputs to determine divergent cell fates." Cell **138**(3): 562-575.
- Hara, H., T. Kamiya, y col. (2011). "Endoplasmic reticulum stress inducers provide protection against 6-hydroxydopamine-induced cytotoxicity." Neurochem Int **58**(1): 35-43.
- Harding, H. P., I. Novoa, Y. Zhang, H. Zeng, R. Wek, M. Schapira and D. Ron (2000). "Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells." Mol Cell **6**(5): 1099-1108.
- Harding, H. P., Y. Zhang, H. Zeng, I. Novoa, P. D. Lu, M. Calfon, N. Sadri, C. Yun, B. Popko, R. Paules, D. F. Stojdl, J. C. Bell, T. Hettmann, J. M. Leiden and D. Ron (2003). "An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress." Mol Cell **11**(3): 619-633.
- Hashida, K., Y. Kitao, H. Sudo, Y. Awa, S. Maeda, K. Mori, R. Takahashi, M. Inuma and O. Hori (2012). "ATF6alpha promotes astroglial activation and neuronal survival in a chronic mouse model of Parkinson's disease." PLoS One **7**(10): e47950.
- Hayashi, A., T. Kasahara, K. Iwamoto, M. Ishiwata, M. Kametani, C. Kakiuchi, T. Furuichi and T. Kato (2007). "The role of brain-derived neurotrophic factor (BDNF)-induced XBP1 splicing during brain development." J Biol Chem **282**(47): 34525-34534.
- Haze, K., H. Yoshida, H. Yanagi, T. Yura and K. Mori (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.
- 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. and L. H. Glimcher (2011). "Protein homeostasis networks in physiology and disease." Curr Opin Cell Biol **23**(2): 123-125.
- Hetz, C., A. H. Lee, D. Gonzalez-Romero, P. Thielen, J. Castilla, C. Soto and L. H. Glimcher (2008). "Unfolded protein response transcription factor XBP-1 does not influence prion replication or pathogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(2): 757-762.

- Hetz, C., P. Thielen, S. Matus, M. Nassif, F. Court, R. Kiffin, G. Martinez, A. M. Cuervo, R. H. Brown and L. H. Glimcher (2009). "XBP-1 deficiency in the nervous system protects against amyotrophic lateral sclerosis by increasing autophagy." *Genes Dev* **23**(19): 2294-2306.
- Hollien, J., J. H. Lin, H. Li, N. Stevens, P. Walter and J. S. Weissman (2009). "Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells." *J Cell Biol* **186**(3): 323-331.
- Hollien, J. and J. S. Weissman (2006). "Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response." *Science* **313**(5783): 104-107.
- Holtz, W. A. and K. L. O'Malley (2003). "Parkinsonian mimetics induce aspects of unfolded protein response in death of dopaminergic neurons." *J Biol Chem* **278**(21): 19367-19377.
- Holtz, W. A., J. M. Turetzky, Y. J. Jong and K. L. O'Malley (2006). "Oxidative stress-triggered unfolded protein response is upstream of intrinsic cell death evoked by parkinsonian mimetics." *J Neurochem* **99**(1): 54-69.
- Hoozemans, J. J., E. S. van Haastert, P. Eikelenboom, R. A. de Vos, J. M. Rozemuller and W. Scheper (2007). "Activation of the unfolded protein response in Parkinson's disease." *Biochem Biophys Res Commun* **354**(3): 707-711.
- Hou, S. J., F. C. Yen, C. Y. Cheng, S. J. Tsai and C. J. Hong (2004). "X-box binding protein 1 (XBP1) C--116G polymorphisms in bipolar disorders and age of onset." *Neurosci Lett* **367**(2): 232-234.
- Hu, P., Z. Han, A. D. Couvillon, R. J. Kaufman and J. H. Exton (2006). "Autocrine tumor necrosis factor alpha links endoplasmic reticulum stress to the membrane death receptor pathway through IRE1alpha-mediated NF-kappaB activation and down-regulation of TRAF2 expression." *Mol Cell Biol* **26**(8): 3071-3084.
- Hu, Y., K. K. Park, L. Yang, X. Wei, Q. Yang, K. S. Cho, P. Thielen, A. H. Lee, R. Cartoni, L. H. Glimcher, D. F. Chen and Z. He (2012). "Differential effects of unfolded protein response pathways on axon injury-induced death of retinal ganglion cells." *Neuron* **73**(3): 445-452.
- Huh, W. J., E. Esen, J. H. Geahlen, A. J. Bredemeyer, A. H. Lee, G. Shi, S. F. Konieczny, L. H. Glimcher and J. C. Mills (2010). "XBP1 controls maturation of gastric zymogenic cells by induction of MIST1 and expansion of the rough endoplasmic reticulum." *Gastroenterology* **139**(6): 2038-2049.
- Hur, K. Y., J. S. So, y col. (2012). "IRE1alpha activation protects mice against acetaminophen-induced hepatotoxicity." *J Exp Med* **209**(2): 307-18.
- Iancu, R., P. Mohapel, P. Brundin and G. Paul (2005). "Behavioral characterization of a unilateral 6-OHDA-lesion model of Parkinson's disease in mice." *Behav Brain Res* **162**(1): 1-10.
- Inden, M., Y. Kitamura, H. Takeuchi, T. Yanagida, K. Takata, Y. Kobayashi, T. Taniguchi, K. Yoshimoto, M. Kaneko, Y. Okuma, T. Taira, H. Ariga and S. Shimohama (2007). "Neurodegeneration of mouse nigrostriatal dopaminergic system induced by repeated oral administration of rotenone is prevented by 4-phenylbutyrate, a chemical chaperone." *J Neurochem* **101**(6): 1491-1504.
- Iwakoshi, N. N., A. H. Lee, P. Vallabhajosyula, K. L. Otipoby, K. Rajewsky and L. H. Glimcher (2003). "Plasma cell differentiation and the unfolded protein response intersect at the transcription factor XBP-1." *Nat Immunol* **4**(4): 321-329.

- Javoy, F., C. Sotelo, y col. (1976). "Specificity of dopaminergic neuronal degeneration induced by intracerebral injection of 6-hydroxydopamine in the nigrostriatal dopamine system." Brain Res **102**(2): 201-15.
- Jonsson, E. G., S. Cichon, J. Schumacher, R. Abou Jamra, T. G. Schulze, M. Deschner, K. Forslund, H. Hall, P. Propping, P. M. Czerski, M. Dmitrak-Weglarz, P. Kapelski, M. Driessen, W. Maier, J. Hauser, M. Rietschel and M. M. Nothen (2006). "Association study of a functional promoter polymorphism in the XBP1 gene and schizophrenia." Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet **141B**(1): 71-75.
- Kakiuchi, C., M. Ishiwata, A. Hayashi and T. Kato (2006). "XBP1 induces WFS1 through an endoplasmic reticulum stress response element-like motif in SH-SY5Y cells." J Neurochem **97**(2): 545-555.
- Kakiuchi, C., M. Ishiwata, T. Umekage, M. Tochigi, K. Kohda, T. Sasaki and T. Kato (2004). "Association of the XBP1-116C/G polymorphism with schizophrenia in the Japanese population." Psychiatry Clin Neurosci **58**(4): 438-440.
- Kakiuchi, C., K. Iwamoto, M. Ishiwata, M. Bundo, T. Kasahara, I. Kusumi, T. Tsujita, Y. Okazaki, S. Nanko, H. Kunugi, T. Sasaki and T. Kato (2003). "Impaired feedback regulation of XBP1 as a genetic risk factor for bipolar disorder." Nat Genet **35**(2): 171-175.
- Kimata, Y. and K. Kohno (2011). "Endoplasmic reticulum stress-sensing mechanisms in yeast and mammalian cells." Curr Opin Cell Biol **23**(2): 135-142.
- Komatsu, M., S. Waguri, y col. (2006). "Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice." Nature **441**(7095): 880-4.
- Kumar, R., A. K. Agarwal, y col. (1995). "Free radical-generated neurotoxicity of 6-hydroxydopamine." J Neurochem **64**(4): 1703-7.
- Lee, A. H., G. C. Chu, N. N. Iwakoshi and L. H. Glimcher (2005). "XBP-1 is required for biogenesis of cellular secretory machinery of exocrine glands." Embo J **24**(24): 4368-4380.
- Lee, A. H., K. Heidtman, G. S. Hotamisligil and L. H. Glimcher (2011). "Dual and opposing roles of the unfolded protein response regulated by IRE1alpha and XBP1 in proinsulin processing and insulin secretion." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(21): 8885-8890.
- Lee, A. H., E. F. Scapa, D. E. Cohen and L. H. Glimcher (2008). "Regulation of hepatic lipogenesis by the transcription factor XBP1." Science **320**(5882): 1492-1496.
- Lee, M. K., W. Stirling, Y. Xu, X. Xu, D. Qui, A. S. Mandir, T. M. Dawson, N. G. Copeland, N. A. Jenkins and D. L. Price (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.
- Lipson, K. L., R. Ghosh, y col. (2008). "The role of IRE1alpha in the degradation of insulin mRNA in pancreatic beta-cells." PLoS One **3**(2): e1648.
- Lisbona, F., D. Rojas-Rivera, P. Thielen, S. Zamorano, D. Todd, F. Martinon, A. Glavic, C. Kress, J. H. Lin, P. Walter, J. C. Reed, L. H. Glimcher and C. Hetz (2009). "BAX inhibitor-1 is a negative regulator of the ER stress sensor IRE1alpha." Mol Cell **33**(6): 679-691.

- Liu, S. Y., W. Wang, Z. Y. Cai, L. F. Yao, Z. W. Chen, C. Y. Wang, B. Zhao and K. S. Li (2013). "Polymorphism -116C/G of Human X-box-Binding Protein 1 Promoter is Associated with Risk of Alzheimer's Disease." CNS Neurosci Ther.
- Luk, K. C., C. Song, P. O'Brien, A. Stieber, J. R. Branch, K. R. Brunden, J. Q. Trojanowski and V. M. Lee (2009). "Exogenous alpha-synuclein fibrils seed the formation of Lewy body-like intracellular inclusions in cultured cells." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(47): 20051-20056.
- Luthman, J., A. Fredriksson, y col. (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.
- Martin, I., V. L. Dawson and T. M. Dawson (2011). "Recent advances in the genetics of Parkinson's disease." Annu Rev Genomics Hum Genet **12**: 301-325.
- Masliyah, E., E. Rockenstein, I. Veinbergs, M. Mallory, M. Hashimoto, A. Takeda, Y. Sagara, A. Sisk and L. Mucke (2000). "Dopaminergic loss and inclusion body formation in alpha-synuclein mice: implications for neurodegenerative disorders." Science **287**(5456): 1265-1269.
- Matus, S., L. H. Glimcher and C. Hetz (2011). "Protein folding stress in neurodegenerative diseases: a glimpse into the ER." Curr Opin Cell Biol.
- McCown, T. J. (2005). "Adeno-associated virus (AAV) vectors in the CNS." Curr Gene Ther **5**(3): 333-338.
- Matus, S., F. Lisbona, y col. (2008). "The stress rheostat: an interplay between the unfolded protein response (UPR) and autophagy in neurodegeneration." Curr Mol Med **8**(3): 157-72.
- Mercado, G., P. Valdes and C. Hetz (2013). "An ERcentric view of Parkinson's disease." Trends Mol Med **19**(3): 165-175.
- O'Riordan, C. R., A. L. Lachapelle, K. A. Vincent and S. C. Wadsworth (2000). "Scaleable chromatographic purification process for recombinant adeno-associated virus (rAAV)." J Gene Med **2**(6): 444-454.
- Obeso, J. A., M. C. Rodriguez-Oroz, B. Benitez-Temino, F. J. Blesa, J. Guridi, C. Marin and M. Rodriguez (2008). "Functional organization of the basal ganglia: therapeutic implications for Parkinson's disease." Mov Disord **23** Suppl 3: S548-559.
- Ono, K., M. Ikemoto, T. Kawarabayashi, M. Ikeda, T. Nishinakagawa, M. Hosokawa, M. Shoji, M. Takahashi and M. Nakashima (2009). "A chemical chaperone, sodium 4-phenylbutyric acid, attenuates the pathogenic potency in human alpha-synuclein A30P + A53T transgenic mice." Parkinsonism Relat Disord **15**(9): 649-654.
- Perumal, A. S., V. B. Gopal, y col. (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, A. S., W. K. Tordzro, y col. (1989). "Regional effects of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) on free radical scavengers in rat brain." Brain Res **504**(1): 139-41.
- Prensa, L. and A. Parent (2001). "The nigrostriatal pathway in the rat: A single-axon study of the relationship between dorsal and ventral tier nigral neurons and the striosome/matrix striatal compartments." J Neurosci **21**(18): 7247-60.
- Poewe, W., P. Mahlknecht and J. Jankovic (2012). "Emerging therapies for Parkinson's disease." Curr Opin Neurol **25**(4): 448-459.

- Reimold, A. M., A. Etkin, I. Clauss, A. Perkins, D. S. Friend, J. Zhang, H. F. Horton, A. Scott, S. H. Orkin, M. C. Byrne, M. J. Grusby and L. H. Glimcher (2000). "An essential role in liver development for transcription factor XBP-1." *Genes Dev* **14**(2): 152-157.
- Reimold, A. M., N. N. Iwakoshi, J. Manis, P. Vallabhajosyula, E. Szomolanyi-Tsuda, E. M. Gravallese, D. Friend, M. J. Grusby, F. Alt and L. H. Glimcher (2001). "Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1." *Nature* **412**(6844): 300-307.
- Rodriguez, D. A., S. Zamorano, F. Lisbona, D. Rojas-Rivera, H. Urra, J. R. Cubillos-Ruiz, R. Armisen, D. R. Henriquez, E. H. Cheng, M. Letek, T. Vaisar, T. Irrazabal, C. Gonzalez-Billault, A. Letai, F. X. Pimentel-Muinos, G. Kroemer and C. Hetz (2012). "BH3-only proteins are part of a regulatory network that control the sustained signalling of the unfolded protein response sensor IRE1alpha." *Embo J* **31**(10): 2322-2335.
- Ron, D. and P. Walter (2007). "Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response." *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(7): 519-29.
- Roussel, B. D., A. J. Kruppa, E. Miranda, D. C. Crowther, D. A. Lomas and S. J. Marciniak (2013). "Endoplasmic reticulum dysfunction in neurological disease." *Lancet Neurol* **12**(1): 105-118.
- Rutkowski, D. T. and R. S. Hegde (2010). "Regulation of basal cellular physiology by the homeostatic unfolded protein response." *J Cell Biol* **189**(5): 783-794.
- Ryu, E. J., H. P. Harding, J. M. Angelastro, O. V. Vitolo, D. Ron and L. A. Greene (2002). "Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in cellular models of Parkinson's disease." *J Neurosci* **22**(24): 10690-10698.
- Ryu, E. J., J. M. Angelastro, y col. (2005). "Analysis of gene expression changes in a cellular model of Parkinson disease." *Neurobiol Dis* **18**(1): 54-74.
- Sado, M., Y. Yamasaki, T. Iwanaga, Y. Onaka, T. Ibuki, S. Nishihara, H. Mizuguchi, H. Momota, R. Kishibuchi, T. Hashimoto, D. Wada, H. Kitagawa and T. K. Watanabe (2009). "Protective effect against Parkinson's disease-related insults through the activation of XBP1." *Brain Res* **1257**: 16-24.
- Samann, J., J. Hegermann, E. von Gromoff, S. Eimer, R. Baumeister and E. Schmidt (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. and P. Caroni (2011). "Selective neuronal vulnerability in neurodegenerative diseases: from stressor thresholds to degeneration." *Neuron* **71**(1): 35-48.
- Selvaraj, S., Y. Sun, J. A. Watt, S. Wang, S. Lei, L. Birnbaumer and B. B. Singh (2012). "Neurotoxin-induced ER stress in mouse dopaminergic neurons involves downregulation of TRPC1 and inhibition of AKT/mTOR signaling." *J Clin Invest* **122**(4): 1354-1367.
- Shim, J., T. Umemura, E. Nothstein and C. Rongo (2004). "The unfolded protein response regulates glutamate receptor export from the endoplasmic reticulum." *Mol Biol Cell* **15**(11): 4818-4828.
- Silva, R. M., V. Ries, T. F. Oo, O. Yarygina, V. Jackson-Lewis, E. J. Ryu, P. D. Lu, S. J. Marciniak, D. Ron, S. Przedborski, N. Kholodilov, L. A. Greene and R. E. Burke (2005). "CHOP/GADD153 is a mediator of apoptotic death in substantia nigra dopamine neurons in an in vivo neurotoxin model of parkinsonism." *J Neurochem* **95**(4): 974-986.

- Slodzinski, H., L. B. Moran, G. J. Michael, B. Wang, S. Novoselov, M. E. Cheetham, R. K. Pearce and M. B. Graeber (2009). "Homocysteine-induced endoplasmic reticulum protein (herp) is up-regulated in parkinsonian substantia nigra and present in the core of Lewy bodies." Clin Neuropathol **28**(5): 333-343.
- Smith, W. W., H. Jiang, Z. Pei, Y. Tanaka, H. Morita, A. Sawa, V. L. Dawson, T. M. Dawson and C. A. Ross (2005). "Endoplasmic reticulum stress and mitochondrial cell death pathways mediate A53T mutant alpha-synuclein-induced toxicity." Hum Mol Genet **14**(24): 3801-3811.
- So, J. S., K. Y. Hur, y col. (2012). "Silencing of lipid metabolism genes through IRE1alpha-mediated mRNA decay lowers plasma lipids in mice." Cell Metab **16**(4): 487-99.
- Soto, C. (2003). "Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases." Nat Rev Neurosci **4**(1): 49-60.
- Soto, C. (2012). "Transmissible proteins: expanding the prion heresy." Cell **149**(5): 968-977.
- Su, L. J., P. K. Auluck, T. F. Outeiro, E. Yeager-Lotem, J. A. Kritzer, D. F. Tardiff, K. E. Strathearn, F. Liu, S. Cao, S. Hamamichi, K. J. Hill, K. A. Caldwell, G. W. Bell, E. Fraenkel, A. A. Cooper, G. A. Caldwell, J. M. McCaffery, J. C. Rochet and S. Lindquist (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.
- Tabas, I. and D. Ron (2011). "Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress." Nat Cell Biol **13**(3): 184-190.
- Takano, K., Y. Tabata, Y. Kitao, R. Murakami, H. Suzuki, M. Yamada, M. Iinuma, Y. Yoneda, S. Ogawa and O. Hori (2007). "Methoxyflavones protect cells against endoplasmic reticulum stress and neurotoxin." Am J Physiol Cell Physiol **292**(1): C353-361.
- Takata, A., C. Kakiuchi, M. Ishiwata, S. Kanba and T. Kato (2010). "Behavioral and gene expression analyses in heterozygous XBP1 knockout mice: Possible contribution of chromosome 11qA1 locus to prepulse inhibition." Neurosci Res **68**(3): 250-255.
- Tanaka, K., S. Fukuoka, y col. (2013). "Effect of cabergoline on increase of several ER stress-related molecules in 6-OHDA-lesioned mice." Neurol Sci **34**(2): 259-61.
- Thayanidhi, N., J. R. Helm, D. C. Nycz, M. Bentley, Y. Liang and J. C. Hay (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.
- Tinsley, R. B., C. R. Bye, y col. (2009). "Dopamine D2 receptor knockout mice develop features of Parkinson disease." Ann Neurol **66**(4): 472-84.
- Uehara, T., T. Nakamura, D. Yao, Z. Q. Shi, Z. Gu, Y. Ma, E. Masliah, Y. Nomura and S. A. Lipton (2006). "S-nitrosylated protein-disulphide isomerase links protein misfolding to neurodegeneration." Nature **441**(7092): 513-517.
- Ungerstedt, U. (1968). "6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons." Eur J Pharmacol **5**(1): 107-10.
- Upton, J. P., L. Wang, y col. (2012). "IRE1alpha cleaves select microRNAs during ER stress to derepress translation of proapoptotic Caspase-2." Science **338**(6108): 818-22.

- Urano, F., X. Wang, A. Bertolotti, Y. Zhang, P. Chung, H. P. Harding and D. Ron (2000). "Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1." Science **287**(5453): 664-666.
- Valenzuela, V., E. Collyer, D. Armentano, G. B. Parsons, F. A. Court and C. Hetz (2012). "Activation of the unfolded protein response enhances motor recovery after spinal cord injury." Cell Death Dis **3**: e272.
- Vidal, R. L., A. Figueroa, F. A. Court, P. Thielen, C. Molina, C. Wirth, B. Caballero, R. Kiffin, J. Segura-Aguilar, A. M. Cuervo, L. H. Glimcher and C. Hetz (2012). "Targeting the UPR transcription factor XBP1 protects against Huntington's disease through the regulation of FoxO1 and autophagy." Hum Mol Genet.
- Vitte, J., S. Traver, A. Maues De Paula, S. Lesage, G. Rovelli, O. Corti, C. Duyckaerts and A. Brice (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.
- Walter, P. and D. Ron (2011). "The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation." Science **334**(6059): 1081-1086.
- Wang, H. Q. and R. Takahashi (2007). "Expanding insights on the involvement of endoplasmic reticulum stress in Parkinson's disease." Antioxid Redox Signal **9**(5): 553-61.
- Wang, L., B. Popko, y col. (2011). "The unfolded protein response in familial amyotrophic lateral sclerosis." Hum Mol Genet **20**(5): 1008-15.
- Watanabe, Y., N. Fukui, T. Muratake, H. Amagane, N. Kaneko, A. Nunokawa and T. Someya (2006). "Association study of a functional promoter polymorphism of the X-box binding protein 1 gene in Japanese patients with schizophrenia." Psychiatry Clin Neurosci **60**(5): 633-635.
- Waxman, E. A. and B. I. Giasson (2009). "Molecular mechanisms of alpha-synuclein neurodegeneration." Biochim Biophys Acta **1792**(7): 616-624.
- Woehlbier, U. and C. Hetz (2011). "Modulating stress responses by the UPRosome: a matter of life and death." Trends Biochem Sci **36**(6): 329-337.
- Yamamoto, K., T. Sato, T. Matsui, M. Sato, T. Okada, H. Yoshida, A. Harada and K. Mori (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., T. Matsui, A. Yamamoto, T. Okada and K. Mori (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., P. Cao, M. A. Smith, K. Kramp, Y. Huang, N. Hisamoto, K. Matsumoto, M. Hatzoglou, H. Jin and Z. Feng (2011). "Dysregulated LRRK2 signaling in response to endoplasmic reticulum stress leads to dopaminergic neuron degeneration in *C. elegans*." PLoS One **6**(8): e22354.
- Zuleta, A., R. L. Vidal, D. Armentano, G. Parsons and C. Hetz (2012). "AAV-mediated delivery of the transcription factor XBP1s into the striatum reduces mutant Huntingtin aggregation in a mouse model of Huntington's disease." Biochem Biophys Res Commun.