



**Universidad Nacional del Sur**

**Tesis**

**Doctor en Biología**

**“Fosfolipasas D y A2: nuevos  
mecanismos de respuesta al  
estrés oxidativo asociado con la  
enfermedad de Parkinson”**

**Pablo Andrés Iglesias González**

**Bahía Blanca**

**Argentina**

**2020**



**Universidad Nacional del Sur**

**Tesis**

**Doctor en Biología**

**“Fosfolipasas D y A2: nuevos  
mecanismos de respuesta al  
estrés oxidativo asociado con la  
enfermedad de Parkinson”**

**Pablo Andrés Iglesias González**

**Bahía Blanca**

**Argentina**

**2020**

Directora de Tesis: Dra. Gabriela A. Salvador

Co-directora de Tesis: Dra. Romina M. Uranga

Esta tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Biología de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido anteriormente presentada para la obtención de otro título en esta universidad u otra. Contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBIBB) dependiente de la Universidad Nacional del Sur (UNS) y del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), durante el período comprendido entre el 01 de Abril de 2016 y el 20 de Noviembre de 2020, y ha sido realizada bajo la dirección de la Dra. Gabriela A. Salvador, Profesora Adjunta de la UNS e Investigadora Independiente del CONICET, y de la Dra. Romina M. Uranga, Profesora Adjunta de la UNS e Investigadora Adjunta del CONICET.

Este trabajo de tesis fue financiado con subsidios otorgados por la UNS para Proyectos de Grupos de Investigación (PGI), la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y CONICET, instituciones a las que agradezco profundamente.

20 de noviembre de 2020

Pablo Andrés Iglesias González

Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia

Universidad Nacional del Sur

## **AGRADECIMIENTOS**

- A mis directoras Gabriela y Romina
- A mis compañeras de trabajo Melisa y Natalia
- A mis padres, hermanos y demás familiares y conocidos
- A Dios, por haberme ayudado a finalizar la tesis

# ÍNDICE

RESUMEN .....	1
SUMMARY .....	5
INTRODUCCIÓN .....	8
1.    Características de la EP.....	8
2.    Toxicidad mediada por 6-OHDA .....	17
3.    El Fe como inductor del daño.....	21
4.    El ácido fosfatídico (PA) y las fosfolipasas: su participación en los estados de neuroinflamación y neurodegeneración.....	27
OBJETIVOS.....	41
MATERIALES .....	42
1.    Reactivos.....	42
MÉTODOS.....	47
1.    Líneas celulares .....	47
2.    Cultivo celular .....	48
3.    Tratamientos experimentales.....	48
4.    Inmunocitoquímica (ICQ).....	51
5.    Experimentos de incorporación de la dopamina.....	52
6.    Ensayo de viabilidad celular .....	52
7.    Determinación de los niveles de oxidantes intracelulares.....	53
8.    Evaluación de la permeabilidad de la membrana plasmática .....	53
9.    Ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	54
10.  Análisis de Western blot (WB) .....	55
10.1 Extracción de proteínas .....	55
10.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	55
10.3 Transferencia de las proteínas a membranas de PVDF .....	56
10.4 Bloqueo de las membranas y tratamiento con anticuerpos .....	56
11.  Fraccionamiento subcelular .....	57
12.  Cuantificación de proteínas por el método de Bradford .....	58
13.  Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR).....	58
14.  Ensayo de actividad de la PLD.....	60
15.  Cuantificación de fósforo.....	60
16.  Análisis estadístico .....	61
RESULTADOS-CAPÍTULO I.....	62
1.    Caracterización del daño inducido por 6-OHDA en neuronas IMR-32.....	62

2.	Respuesta de NF- $\kappa$ B a la toxicidad inducida por 6-OHDA <i>in vitro</i> .....	65
3.	Señalización lipídica en células de neuroblastoma con 6-OHDA .....	71
4.	Regulación de genes modulados por NF- $\kappa$ B frente al estímulo de 6-OHDA .....	76
5.	Rol de la señalización lipídica en la localización subcelular de NF- $\kappa$ B .....	78
DISCUSIÓN-CAPÍTULO I .....		82
RESULTADOS-CAPÍTULO II .....		93
1.	Caracterización de la respuesta neuronal inducida por FAC.....	93
2.	Activación y roles de las fosfolipasas en respuesta a la injuria oxidativa desencadenada por FAC.....	95
3.	Modulación de la fosforilación de $\alpha$ -sinucleína .....	105
4.	Efectos de medios condicionados de células astrogliales expuestas al FAC sobre cultivos neuronales.....	111
DISCUSIÓN-CAPÍTULO II .....		120
CONCLUSIONES .....		132
REFERENCIAS .....		133
PUBLICACIONES ORIGINADAS DE ESTA TESIS .....		155
ABREVIATURAS.....		156

## RESUMEN

La enfermedad de Parkinson (EP) es el segundo trastorno neurodegenerativo más común en la población mundial. Esta patología es causada principalmente por la degeneración y muerte progresiva de las neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra pars compacta* (SNpc). La señalización celular en la EP ha sido y es uno de los aspectos más estudiados de la enfermedad, para tratar de comprender su etiopatogenia y encontrar nuevas dianas terapéuticas que permitan un tratamiento más específico de la enfermedad. Un componente clave en la muerte de las neuronas dopaminérgicas es el estrés oxidativo (EO), sin embargo, poco se sabe sobre el papel que juega la señalización mediada por las fosfolipasas D y A2 (PLD y PLA2, respectivamente) en este evento que inicia en etapas tempranas de la EP. El objetivo de este trabajo de tesis fue caracterizar el rol que cumplen las isoformas más importantes y estudiadas de las enzimas PLD y PLA2 en la respuesta neuronal frente al daño oxidativo. Para esto, se utilizaron como estímulo la 6-hidroxidopamina (6-OHDA) y la sobrecarga de hierro (Fe), dos agentes neurotóxicos ampliamente utilizados en el estudio de esta patología.

La exposición neuronal a la 6-OHDA, un análogo hidroxilado de la dopamina, constituye una estrategia útil para estudiar los eventos moleculares asociados con la muerte neuronal en la EP. La 6-OHDA aumenta los niveles de oxidantes celulares y deteriora la cadena respiratoria mitocondrial, promoviendo así la lesión neuronal y la muerte. A pesar del uso extensivo de 6-OHDA en modelos animales, los eventos moleculares precisos desencadenados por este neurotóxico a nivel neuronal aún no se han dilucidado completamente. Las células de neuroblastoma humano IMR-32 expuestas a concentraciones crecientes de 6-OHDA mostraron altos niveles de especies reactivas de oxígeno (EROs) y



aumento de la permeabilidad de la membrana plasmática con disminución concomitante de la viabilidad celular.

Como parte de la respuesta neuronal a la exposición a 6-OHDA, se observó la translocación de la subunidad p65 del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- $\kappa$ B) hacia el núcleo. La localización nuclear de NF- $\kappa$ B también fue acompañada por un aumento de la fosforilación del inhibidor de kappa B (I $\kappa$ B), así como por un aumento en los niveles de ARNm de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) y el receptor 4 de prostaglandina E2 (RP4). Aunque las vías canónicas que participan en la modulación de NF- $\kappa$ B se han descrito ampliamente, aquí se trabajó con la hipótesis de que la lesión inducida por 6-OHDA puede activar las vías de señalización de lípidos y, a su vez, modular la respuesta transcripcional. El EO generado en la célula por la 6-OHDA desencadenó la activación de vías de señalización de lípidos y produjo un aumento de los niveles de ácido fosfatídico (PA), diacilglicerol (DAG) y ácidos grasos libres en las células de neuroblastoma humano. La inhibición de la producción de PA pudo prevenir la disminución de la viabilidad celular provocada por 6-OHDA, la translocación nuclear de la subunidad p65 de NF- $\kappa$ B y el aumento en la expresión del ARNm de COX-2.

En el primer capítulo de esta tesis, nuestros resultados indican que la respuesta neuronal desencadenada por 6-OHDA implica la activación de vías de señalización mediadas por PA que, a su vez, gobiernan la localización subcelular de NF- $\kappa$ B y la expresión de COX-2 de manera diferencial.

La acumulación de Fe y la sobre-expresión de  $\alpha$ -sinucleína son rasgos característicos de varios trastornos neurodegenerativos. Previamente en nuestro laboratorio hemos demostrado que el EO inducido por Fe activa la liberación de ácidos grasos catalizada por diferentes

isoformas de PLA2 en el sistema nervioso. En este trabajo, nuestro objetivo fue estudiar la participación de las PLA2 en la regulación de la biología de la  $\alpha$ -sinucleína y en la respuesta neuronal a la sobrecarga de Fe. También investigamos el papel de los factores secretados por la glía en la resolución del daño oxidativo por parte de las neuronas. Se estudió el estado redox, la fosforilación de  $\alpha$ -sinucleína y la participación de las isoformas de PLA2 citosólica e independiente de calcio (cPLA2 e iPLA2, respectivamente) en la regulación de estos eventos. Las neuronas IMR-32 expuestas a una sobrecarga de Fe, bajo la forma del compuesto denominado citrato amonio férrico (FAC), mostraron un aumento de los niveles de expresión de iPLA2, concomitantemente con un aumento de los peróxidos lipídicos y las EROs. El bloqueo farmacológico de la actividad de iPLA2 aumentó, aún más, los niveles de peróxidos lipídicos y el contenido de EROs. Por el contrario, la inhibición conjunta de cPLA2 e iPLA2 mostró el efecto opuesto al promover una disminución de los marcadores de EO asociados con una mayor viabilidad neuronal. Las neuronas estimuladas con Fe también mostraron un aumento de la fosforilación de  $\alpha$ -sinucleína. La fosforilación de  $\alpha$ -sinucleína fue bloqueada por la inhibición de la actividad de la iPLA2. Gran parte de estos resultados también fueron corroborados por estudios en la línea celular de neuronas dopaminérgicas de rata (N27).

Para estudiar el papel de la glía en la respuesta neuronal al Fe, se expusieron las células de astroglioma C6 a FAC o su vehículo, y los medios derivados de los astrocitos incubados en estas condiciones se añadieron, luego, a cultivos neuronales. En la caracterización de los astrocitos expuestos a Fe, estos mostraron un aumento en el marcador glial S100 $\beta$  y en los niveles de peroxidación lipídica, indicando una reactividad al EO. Los astrocitos fueron

positivos para  $\gamma$ -glutamylcisteína ligasa, enzima limitante de la reacción de biosíntesis de glutatión.

La respuesta de las neuronas a los medios condicionados de los astrocitos fue diferente dependiendo del origen de la línea celular. Mientras que el medio condicionado de astrocitos demostró ser neuroprotector para las neuronas humanas IMR-32, el efecto contrario se observó en las células dopaminérgicas N27 derivadas de mesencéfalo de rata.

Los resultados del segundo capítulo de esta tesis muestran roles específicos para la iPLA2 en cuanto a la neuroprotección y modulación de la fosforilación de  $\alpha$ -sinucleína en la respuesta neuronal a la lesión inducida por Fe.

En conjunto los hallazgos de este trabajo de tesis contribuyen a dilucidar nuevos mecanismos de acción de determinadas isoformas de la PLA2 y la PLD en procesos de injuria neuronal asociados con la EP.

## SUMMARY

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disorder worldwide. This pathology is mainly caused by the degeneration and progressive death of the dopaminergic neurons of the *substantia nigra pars compacta* (SNpc). Cell signaling in PD has always been one of the most studied key aspects of the disease in an attempt not only to understand its etiopathogenesis but also to find new therapeutic targets towards a more specific treatment of this pathology. However, little is known to date about the role of phospholipase D and A2 signaling (PLD and PLA2, respectively) in the neuronal response to oxidative injury, beginning in the early stages of PD. The objective of this thesis work was to begin to delineate the role played by the most important and studied isoforms of PLD and PLA2 enzymes in the neuronal response to oxidative damage, when they were subjected to the stimulus of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) and to iron overload (Fe), two neurotoxic agents widely used in the study of PD. Likewise, the relationship and impact of the latter on the biology of  $\alpha$ -synuclein were figured.

Neuronal exposure to 6-OHDA, a hydroxylated analog of dopamine, is a useful strategy to study the molecular events associated with neuronal death in PD. 6-OHDA increases the levels of cellular oxidants and impairs the mitochondrial respiratory chain, thus promoting neuronal damage and death. Despite the extensive use of 6-OHDA in animal models, the exact molecular events triggered by this neurotoxic at the neuronal level have not yet been fully understood. Human IMR-32 neuroblastoma cells exposed to increasing concentrations of 6-OHDA showed high levels of reactive oxygen species (ROS) and increased plasma membrane permeability with concomitant decrease in cell viability.

As part of the neuronal response to exposure to 6-OHDA, the translocation to the nucleus of the p65 subunit of the nuclear factor enhancer of the kappa light chains of activated B cells (NF- $\kappa$ B) was observed. The nuclear localization of NF- $\kappa$ B was also accompanied by an increase in phosphorylation of the inhibitor of kappa B (I $\kappa$ B) as well as an increase in the levels of mRNA of cyclooxygenase-2 (COX-2) and prostaglandin E2 receptor 4 (RP4). Although the canonical pathways involved in NF- $\kappa$ B modulation have been extensively described, the hypothesis that 6-OHDA-induced injury can activate lipid signaling pathways and, in turn, modulate the transcriptional response has been challenged here. The oxidative stress generated in the cell by 6-OHDA triggered the activation of lipid signaling pathways and produced an increase in the levels of phosphatidic acid (PA), diacylglycerol (DAG) and free fatty acids in human neuroblastoma cells. Inhibition of PA production could prevent the decrease in cell viability caused by 6-OHDA, the nuclear translocation of the p65 subunit of NF- $\kappa$ B and the increase in the expression of COX-2 mRNA. Our results indicate that the initiation of the inflammatory process triggered by 6-OHDA involves the activation of PA signaling which, in turn, governs the subcellular localization of NF- $\kappa$ B and the expression of COX-2 mRNA.

Iron accumulation and  $\alpha$ -synuclein overexpression are characteristic features of several neurodegenerative disorders. We have previously shown in our laboratory that oxidative stress induced by Fe activates the release of fatty acids catalyzed by different isoforms of PLA2 in the nervous system. In this work, our objective was to study the participation of PLA2 in the regulation of  $\alpha$ -synuclein biology and the redox response developed by neurons in response to Fe overload. We also investigated the role of factors secreted by the glia in the resolution of oxidative damage by neurons. The redox state, the phosphorylation of  $\alpha$ -

synuclein and the participation of the calcium-dependent and independent PLA2 isoforms (cPLA2 and iPLA2, respectively) in the regulation of these events were studied. IMR-32 neurons exposed to Fe overload, in the form of the compound called ferric ammonium citrate (FAC), showed an increase in iPLA2 expression levels, concomitantly with an increase in lipid peroxides and ROS. The pharmacological blocking of iPLA2 activity further increased the levels of lipid peroxides and the content of ROS. In contrast, cPLA2 inhibition showed the opposite effect by promoting a decrease in oxidative stress markers associated with higher neuronal viability. Fe-stimulated neurons also showed increased  $\alpha$ -synuclein phosphorylation. The phosphorylation of  $\alpha$ -synuclein was blocked by the inhibition of iPLA2 activity. Several of these results were also corroborated by studies in the rat dopaminergic neuron cell line (N27).

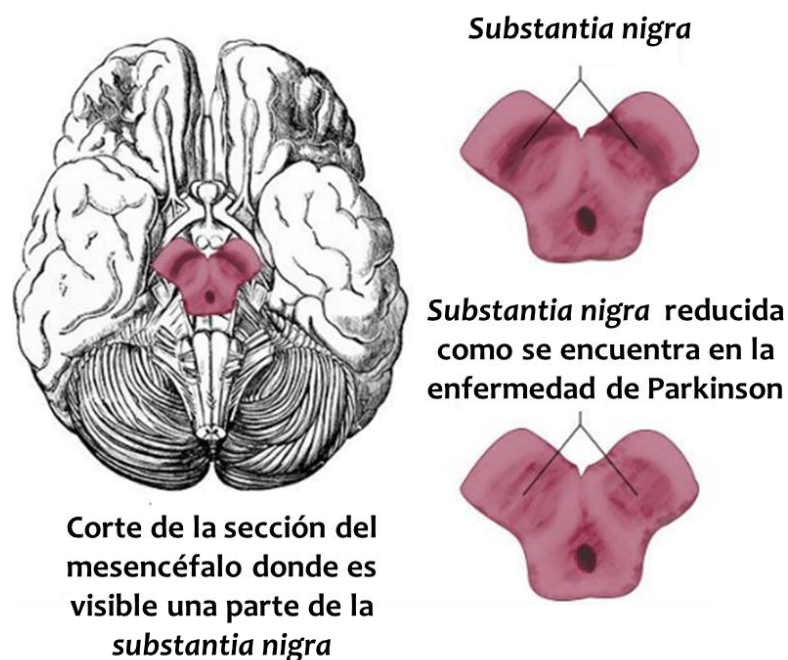
To study the role of glia in the neuronal response to Fe, C6 astroglioma cells were subjected to FAC or vehicle, and astrocyte-derived media was added to neuronal cultures of the same species (N27). In the characterization of the astrocytes exposed to Fe, they showed an increase in the glial marker S100 $\beta$  and the levels of lipid peroxidation, indicating a reactivity to oxidative stress. Neurons incubated with the above-mentioned astrocyte-derived media showed higher levels of oxidative damage than neurons exposed solely to Fe. Astrocytes were positive for the rate-limiting step enzyme for glutathione biosynthesis. Taken together, our results show specific roles for iPLA2 in terms of neuroprotection and modulation of  $\alpha$ -synuclein phosphorylation in the neuronal response to Fe-induced injury.

Together, the results of this thesis work contribute to elucidate new mechanisms of action of certain isoforms of PLA2 and PLD in neuronal injury processes associated with PD.

## INTRODUCCIÓN

### 1. Características de la EP

La enfermedad de Parkinson (EP) representa el segundo desorden neurodegenerativo que más afecta a la población mundial luego de la enfermedad de Alzheimer (EA), manifestándose en alrededor del 1 % de las personas mayores de 60 años (Elbaz *et al.* 2016; Tysnes y Storstein 2017). La EP fue descrita por primera vez en 1817 por James Parkinson como un síndrome asociado a lesiones neuropatológicas. Esta enfermedad se caracteriza principalmente por una pérdida de las neuronas dopaminérgicas, localizadas específicamente en una región del mesencéfalo cerebral llamada *substantia nigra pars compacta* (SNpc) (**Figura 1**) (Goedert *et al.* 2013; Kordower *et al.* 2013; Plum *et al.* 2016).



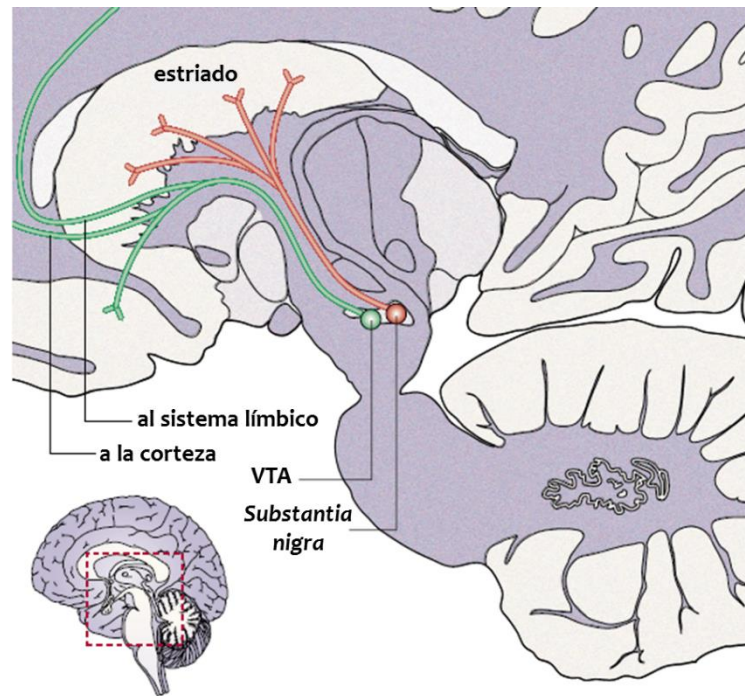
**Figura 1. Localización de las neuronas dopaminérgicas en la SNpc.** Figura del cerebro en posición ventral indicando la posición de la SNpc donde se encuentran las neuronas dopaminérgicas que conectan con el estriado. Esta región presenta una coloración oscura debido a la presencia del pigmento neuromelanina presente en esas neuronas dopaminérgicas. En los pacientes de la EP, en un estado avanzado de la enfermedad, la gran pérdida de neuronas dopaminérgicas se ve reflejada por la desaparición del área de pigmentación oscura.

Desde los estadios tempranos de la enfermedad, la pérdida de las neuronas dopaminérgicas es acompañada de la presencia de inclusiones citoplasmáticas eosinófilas llamadas cuerpos de Lewy. Los cuerpos de Lewy se forman como producto final de una serie de fallas en procesos celulares que terminan produciendo un plegamiento anómalo de neurofilamentos y proteínas entre las cuales se encuentra la  $\alpha$ -sinucleína, cuya participación en la formación de estos cuerpos y en el curso de esta patología se considera de relevancia (Uemura *et al.* 2018). Las neuronas dopaminérgicas son responsables de la producción y liberación del neurotransmisor dopamina. Esta vía de síntesis utiliza como precursor a la tirosina, un aminoácido que sufre una primera etapa de hidroxilación a través de una enzima especial, la tirosina hidroxilasa (TH), quien cataliza el remplazo de un hidrógeno por un oxhidrilo en el carbono del anillo aromático. La TH va a convertir a esa tirosina en un aminoácido intermediario, la dihidroxifenilalanina, que posteriormente va a ser convertida en el neurotransmisor dopamina por eliminación de un grupo carboxilo. Esta última reacción es llevada a cabo por una descarboxilasa. La TH constituye la enzima limitante en la reacción de la síntesis de dopamina y la actividad de esta enzima está controlada principalmente por la inhibición de sus productos finales (Juárez Olguín *et al.* 2016).

La dopamina ejerce importantes respuestas neuromoduladoras como el control de la plasticidad sináptica en áreas corticales y subcorticales del cerebro. Estas funciones neuromoduladoras están a su vez vinculadas con el control motor del organismo, entre las cuales la vía nigroestriatal juega un rol preponderante (Brichta y Greengard 2014; Chen y Xie 2018) (**Figura 2**). Esta es la razón por la cual los síntomas clínicos de la EP están asociados con la rigidez, la bradicinesia, el temblor esencial o en reposo y la inestabilidad postural. La principal problemática es que, al momento del diagnóstico, ya se ha perdido



aproximadamente el 50-70 % de las neuronas dopaminérgicas (Bernheimer *et al.* 1973; Rajput *et al.* 2008). Por esto, existe un gran interés en la búsqueda de marcadores para el diagnóstico temprano de la enfermedad. Las causas que desencadenan la EP son multifactoriales: la más frecuente es el deterioro fisiológico y anatómico asociado con el envejecimiento. Sin embargo, pueden existir predisposiciones genéticas, a partir de mutaciones en genes que se consideran desencadenantes de esta patología (Salari y Bagheri 2019). En el primer caso, el envejecimiento es acompañado por un incremento de las EROs, que se acumulan en distintos órganos, entre los cuales está el cerebro. Este aumento también está acompañado de una deficiencia en los sistemas de detoxificación, como demuestra el caso de que en cerebros de pacientes con EP, el glutatión (GSH), que representa la molécula



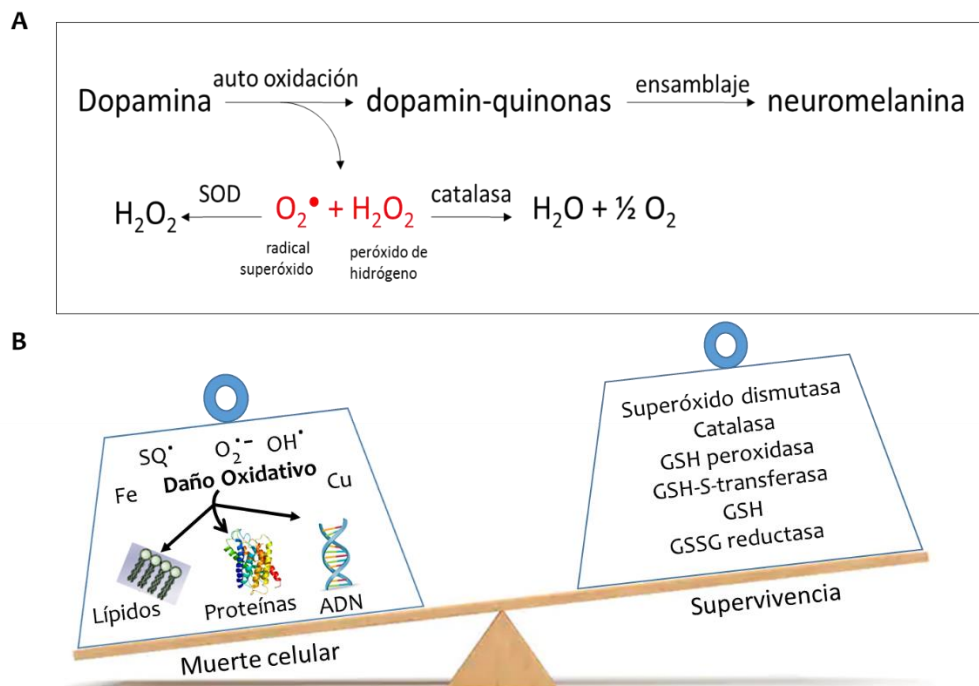
**Figura 2. Vías dopaminérgicas en el cerebro.** La EP está desarrollada por una alteración en la vía nigroestriatal. Esta vía surge de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc del mesencéfalo y llega a varios núcleos de los ganglios basales que conforman el estriado. Además existen otras dos vías, la mesolímbica y la

mesocortical, que también utilizan como mensajero químico a la dopamina. El mal funcionamiento de estas tres vías está implicado en el desarrollo de trastornos psicomotores. Extraído de Goedert 2001.

antioxidante más importante para la desactivación de las EROs, se encuentra disminuido. En cerebros de pacientes seniles afectados de EP, se pudieron detectar altos niveles de delecciones en el ADN mitocondrial de las neuronas de la SNpc causadas por las EROs. Esto conduce a la expresión de formas mutantes de las subunidades que constituyen la cadena transportadora de electrones, y también en el ARN de transferencia mitocondrial implicado en el transporte del aminoácido leucina, exacerbando en conjunto la producción de EROs. Este escenario crearía entonces un círculo vicioso de más daño al ADN mitocondrial y otros componentes mitocondriales incrementando la formación de EROs. Además es propio del envejecimiento el deterioro de la función mitocondrial (Abramov *et al.* 2010; Hubbard *et al.* 2012; Kraytsberg *et al.* 2006; Surmeier *et al.* 2011).

Las neuronas dopaminérgicas de la SNpc son, además, particularmente susceptibles al EO debido a que la metabolización de la dopamina puede producir compuestos neurotóxicos. La dopamin-quinona ( $SQ^{\bullet}$ ), por ejemplo, se produce cuando la dopamina se oxida espontáneamente en el citosol, y es capaz de reaccionar con las proteínas que la rodean modificando los enlaces covalentes de los residuos de cisteína. Dicha auto-oxidación, además, permite que se generen radicales superóxido ( $O_2^{\bullet}$ ) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Otra manera que tiene la dopamina de reaccionar es por la desaminación llevada a cabo por la monoamino oxidasa, dando dos productos de reacción: el ácido 3,4 dihidroxifenilacético y el  $H_2O_2$ . El  $O_2^{\bullet}$  no es una molécula altamente reactiva, pero puede ser convertida en  $H_2O_2$  por la superóxido dismutasa (SOD), o en radicales de peroxinitrito ( $ONOO^{\bullet}$ ) en presencia de óxido nítrico. El  $H_2O_2$  es una molécula altamente reactiva cuyos niveles son controlados a

través de enzimas como la catalasa, dado que puede generar radicales libres oxhidrilos ( $\text{OH}^\bullet$ ), que son citotóxicos para la célula, en un grado mayor. Todos estos subproductos son responsables de que, en condiciones de sobreproducción, el GSH y las enzimas relacionadas con su síntesis y reducción de las formas oxidadas no alcancen a dar sostén a los mecanismos antioxidantes de los que forman parte (Dias *et al.* 2013) (**Figura 3**). Debido a esta potencial actividad neurotóxica, la dopamina es almacenada en vesículas sinápticas, para ser resguardada de la acción de la monoamino oxidasa y, además, para ser liberada en respuesta a un potencial de acción.



**Figura 3. La dopamina libre en el citoplasma representa una amenaza potencial.** (A) La molécula de dopamina, por su naturaleza, es una molécula muy reactiva. A pH fisiológico (pH=7), tiende naturalmente a auto-oxidarse, formando lo que se denominan dopamin-quinonas, que representan los bloques constitutivos de la neuromelanina. En el proceso de auto-oxidación de la dopamina, se genera el radical libre  $\text{O}_2^\bullet$  y su producto de reacción, el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , que deben ser fuertemente controlados a través de la acción de las enzimas SOD y catalasa, respectivamente. Ante situaciones de EO, va a aumentar la generación de estas moléculas neurotóxicas, que no

van a poder ser reducidas por los sistemas de defensa de la célula para lograr mantener el equilibrio óxido-reducción. **(B)** El aumento de las especies reactivas genera un estado desbalanceado de la homeostasis de la célula y va a inducir una situación de EO que va a provocar el aumento de la oxidación natural de la dopamina por parte de las EROs, pero además va a aumentar la auto-oxidación de las catecolaminas, en este caso particular, de la dopamina, que va a producir la formación del radical  $O_2^{\bullet}$ . De esta manera, se desencadena un aumento en la producción de  $SQ^{\bullet}$ , también va a producirse la liberación y oxidación de metales de transición como el Fe y el Cu, y va a aumentar también la producción de peróxido de hidrógeno y de radical oxhidrilo. Todo esto va a conducir al daño de proteínas, fosfolípidos y ácidos nucleicos a través de ataques nucleofílicos sobre las cadenas expuestas.  $O_2^{\bullet}$ : radical superóxido,  $H_2O_2$ : peróxido de hidrógeno,  $OH^{\bullet}$ : radical oxhidrilo, SOD: superóxido dismutasa, EO: estrés oxidativo,  $SQ^{\bullet}$ : dopamin-quinona, Fe: hierro, Cu: cobre, EROs: especies reactivas de oxígeno, GSH: glutatión reducido, GSSG: glutatión oxidado.

Respecto de los factores genéticos relacionados con la EP, hasta ahora se han descrito al menos 17 mutaciones en genes que son responsables de causar variantes de la enfermedad en sus formas autosómicas dominantes y recesivas. Estos incluyen mutaciones en la  $\alpha$ -sinucleína, parkina, ubiquitina carboxil terminal hidrolasa L1 (UCH-L1), deglicasa asociada al parkinsonismo (DJ-1), fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (PTEN) inducible por quinasa 1 (PINK1), quinasa 2 repetida rica en leucina (LRRK2) y glucocerebrosidasa (GBA). Todas estas mutaciones afectan diferentes procesos entre los cuales los más estudiados son el EO, la disfunción del sistema proteosomal con la consecuente acumulación de proteínas mal plegadas y tóxicas que no se pueden eliminar, la excitotoxicidad, la depleción de energía y la apoptosis (Abou-Sleiman *et al.* 2006) (**Tabla 1**).

Otro aspecto de relevancia en la EP son los factores ambientales, como el uso indiscriminado y sin precaución de pesticidas entre los que podemos mencionar el paraquat, la rotenona y los ditiocarbamatos, entre muchos otros, que han sido causa de que poblaciones rurales desarrollaran una sintomatología en conformidad con esta enfermedad. Aunque estas toxinas

actúan por diferentes mecanismos, todas tienen como punto en común el ser generadoras de EROs, lo cual produce como resultado un mayor EO (Blesa *et al.*, 2012; Bové y Perier, 2012).

<b>Locus</b>	<b>Posición en el mapa cromosómico</b>	<b>Inicio de aparición de la enfermedad (años)</b>	<b>Herencia</b>	<b>Gen/Proteína</b>
PARK1	4q1	40	Dominante	SNCA/ $\alpha$ -sinucleína
PARK2	6q25	20	Recesivo	PARK2/parkina
PARK3	2p13	60	Dominante	Desconocido
PARK4	4q21	30	Dominante	Multiplicaciones de $\alpha$ -sinucleína
PARK5	4p14	~ 50	Dominante	UCH-L1
PARK6	1p35-37	~ 40	Recesivo	PINK1
PARK7	1p38	~ 40	Recesivo	PARK7/DJ-1
PARK8	12p 11.2-13.1	~ 50	Dominante	PARK8/LRRK2
PARK10	1p32	50-60	Dominante	Desconocido
PARK11	2q34	tardío	Dominante	Desconocido
-	1q21		Susceptible	GBA/glucocerebrosidasa
FTDP-17	17q21		Susceptible	MAPT/tau
SCA2	12q24		Dominante	ATXN2/ataxina-2
SCA3	14q24.3-q31		Dominante	ATXN3/ataxina-3
-	2q22-23		Desconocido	NR4A2/Nurr1
-	5q23.1-23.3		Susceptible	SNCAIP/sinfilina-1
-	2p 12-13		Desconocido	Omi/HtrA2

**Tabla 1. Mutaciones responsables de las formas familiares de la EP.** En la tabla se pueden apreciar las principales mutaciones que constituyen las formas genéticas de la EP, representando un 5 % de los casos totales de la patología. Hay que remarcar, además, que existen ciertas mutaciones de genes mitocondriales relacionados con la fisión y la fusión mitocondrial y que, en condiciones fisiológicas normales, estos procesos cumplen un rol muy importante en el control de la transmisión sináptica, en la cual también se halla implicada la  $\alpha$ -sinucleína. Extraído de Belin & Westerlund 2008.

Debido a la importancia a nivel global de la EP, se han generado una miríada de modelos que intentan dilucidar los mecanismos que subyacen al desencadenamiento de los trastornos, tanto a nivel molecular, celular como de comportamiento. Estos modelos se pueden clasificar, a grandes rasgos, en dos categorías: los modelos genéticos y los farmacológicos. En los modelos de manipulación genética se encuentran, por una parte, la generación de animales transgénicos, en los cuales, mediante recombinación homóloga entre el ADN mutante introducido y el ADN cromosómico, se pueden suprimir los genes involucrados en la EP de tal manera de anular su función. En líneas celulares, se utilizan vectores plasmídicos, que una vez transfectados inducen la sobre-expresión de diversas proteínas relacionadas con la EP tales como la  $\alpha$ -sinucleína, DJ-1 y UCH-L1 (Conde *et al.* 2018; Shen *et al.* 2016; W. J. Wang *et al.* 2008). El uso de vectores virales que expresan genes en la SNpc también se ha constituido en una herramienta clave para el estudio de la EP, dada la eficiencia en la transferencia génica que presenta este modelo, sumado a la especificidad de la expresión de la proteína en un determinado tipo celular. Otra forma es la interferencia por ARN (ARNi), que consiste básicamente en la introducción de un ARN de doble cadena cuya secuencia se corresponda con la del ARNm de la proteína de interés y que induce la degradación del mismo. Dentro de los modelos farmacológicos, podemos mencionar la toxicidad inducida por distintos agentes: 6-OHDA (que simula muchos de los efectos dañinos ejercidos por la

dopamina), 1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina (MPTP) (que genera daño mitocondrial), pesticidas paraquat, maneb y rotenona, y el uso de metales de transición como Fe, manganeso (Mn) y cobre (Cu) (Kin *et al.* 2019; Salari y Bagheri 2019) (**Figura 4**).

En esta tesis se trabajó en modelos celulares expuestos a la neurotoxina 6-OHDA y a sobrecarga con Fe como inductores de estrés oxidativo.

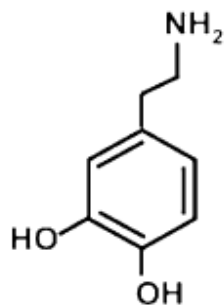


**Figura 4. Modelos de estudio de la EP.** Los modelos animales de la EP deben cumplir como requisito que desarrollen al menos alguna característica genotípica o fenotípica de la patología, con miras a desarrollar, probar y refinar las terapias dirigidas a pacientes. Estos modelos han supuesto un gran avance en el conocimiento de los mecanismos involucrados en el desarrollo de la EP, así como en la identificación de las dianas terapéuticas, por lo que siguen siendo utilizados hoy en día. La información que se obtiene de esos estudios contribuye además al conocimiento del funcionamiento celular. La principal limitante que existe hoy en día es que la mayoría de estos modelos solo tienen en cuenta uno de tres factores (ambiental, genético y envejecimiento) y, por lo tanto, no reproducen la complejidad de las enfermedades. Sin embargo, estos modelos animales de la EP

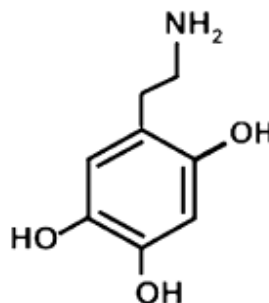
son los más adecuados para el análisis combinado de estos factores y la evaluación de su contribución exacta al desarrollo de la patología.

## 2. Toxicidad mediada por 6-OHDA

La 6-OHDA es una neurotoxina ampliamente usada en modelos experimentales de la EP. Su estructura es idéntica a la de la dopamina, con la excepción de un grupo hidroxilo en el carbono de la posición 6 del anillo aromático (Blandini y Armentero 2012) (**Figura 5**). Su uso en modelos *in vivo* requiere de la administración por inyección estereotáxica en el área del cuerpo estriado, la SNpc o el haz medial del cerebro anterior ya que, a diferencia de otras toxinas comúnmente usadas, como el MPTP, no es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica (Hernandez-Baltazar *et al.* 2013; Stanic *et al.* 2003; Venero *et al.* 2002). Se ha visto que la administración intracraneal de la 6-OHDA induce una degeneración rápida y casi completa de las neuronas TH positivas de la SNpc. El efecto selectivo del daño de la 6-OHDA en las neuronas catecolaminérgicas se debe a su entrada a través de los transportadores de monoaminas insertados en la membrana plasmática de estas células (González-Hernández *et al.* 2004; Ljungdahl *et al.* 1971). Un síntoma característico cuando se inyecta esta toxina de forma unilateral en animales junto con la presencia de apomorfina es la aparición de un caminar inclinado en círculo (Mendez y Finn 1975).



**Dopamina**



**6-Hidroxidopamina**

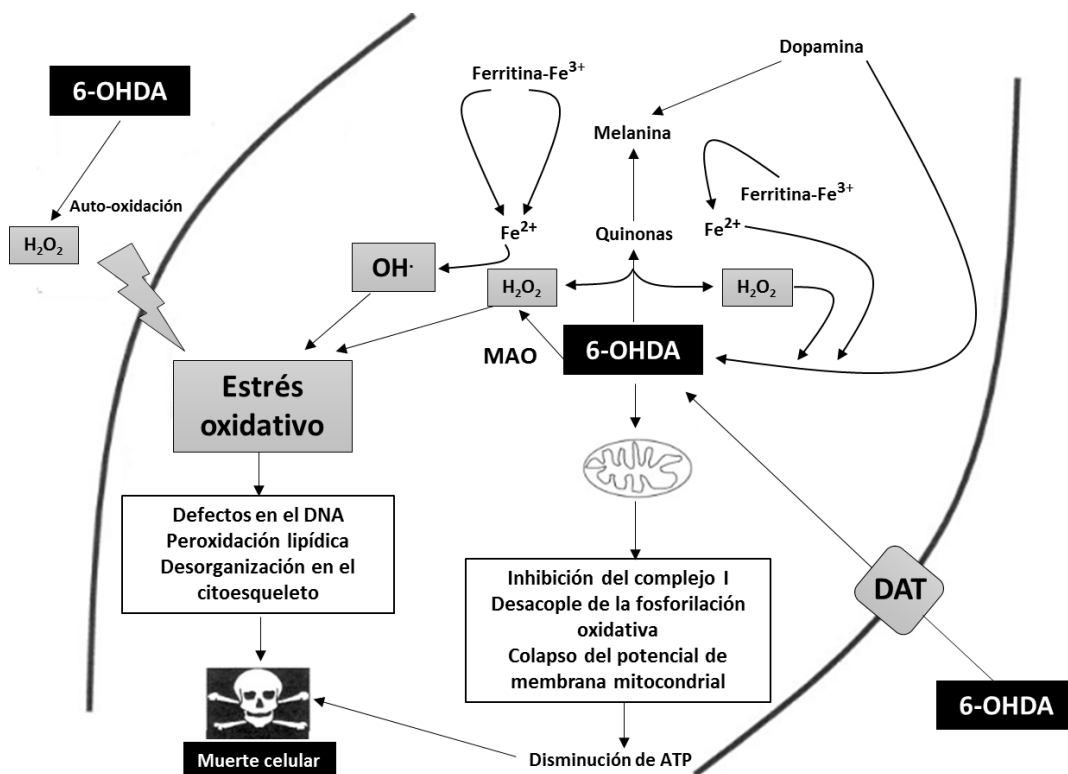


**Figura 5. Estructuras de la dopamina y de la 6-OHDA utilizada para replicar características de la EP en modelos animales y cultivos celulares.** La 6-OHDA es un análogo hidroxilado de la dopamina con una alta afinidad por el transportador de dopamina, el cual transporta la toxina dentro de las neuronas dopaminérgicas. En el caso de su uso para modelos animales, se requiere la inyección local en atención a que la 6-OHDA no es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, lo que conduce a una degeneración masiva anterógrada de la vía nigroestriatal.

No obstante, en estudios *in vitro*, ya sea utilizando cultivos primarios de neuronas, líneas celulares o cortes de hipocampo y de corteza cerebral, se pudo observar que, por el contrario, no había toxicidad selectiva hacia las neuronas catecolaminérgicas por parte de la 6-OHDA (Storch *et al.* 2003; Massari *et al.* 2016). Hasta el momento, se sabe que la toxicidad ejercida por la 6-OHDA estaría mediada por el incremento del EO. Una vez que se encuentra en el citoplasma, la 6-OHDA se comporta de manera análoga a la dopamina: es rápidamente auto-oxidada, promoviendo la formación de EROs al reaccionar con el Fe intracelular, por medio de la reacción de Fenton, dando como producto final el radical libre  $\text{OH}^{\bullet}$ , altamente inestable, que reaccionará con el ADN y las membranas celulares, conduciendo finalmente a un incremento de la peroxidación lipídica y activando el programa de muerte celular o apoptosis. También la 6-OHDA oxidada puede acumularse en la mitocondria, inhibiendo la cadena transportadora de electrones, poniendo en compromiso el sustento de energía para la célula. Una tercera vía en que la 6-OHDA puede ejercer su efecto neurotóxico es mediante la generación extracelular de EROs y quinonas que reaccionan con las proteínas ancladas a la membrana, alterando su función biológica (Blum *et al.* 2000; Izumi *et al.* 2005; Simola *et al.* 2007) (**Figura 6**).

Este daño generado por la 6-OHDA produce además una respuesta neuroinflamatoria, la cual se ha demostrado que ocurre en pacientes y en modelos animales de la EP. La

neuroinflamación es inicialmente una respuesta protectora del cerebro, pero este proceso, sin la debida resolución, es perjudicial, llegando a impedir la regeneración neuronal. La muerte de neuronas dopaminérgicas libera proteínas oxidadas, lípidos y ADN en el espacio extracelular, que son reconocidos por la microglía como moléculas dañinas, causando su activación. La activación de la microglía lleva, a su vez, a un incremento en la formación de citoquinas, un incremento en la producción de EROs y especies reactivas de nitrógeno y una menor secreción de factores tróficos responsables del normal mantenimiento de la viabilidad neuronal (Herrera *et al.* 2000; Iravani *et al.* 2005, 2012; McNaught *et al.* 2002). En consecuencia, la muerte neuronal disparada por la microglía induce una retroalimentación positiva, creando un ciclo vicioso neurotóxico (Block *et al.* 2007). En virtud de que el mesencéfalo contiene mayor número de células microgliales comparado con otras regiones cerebrales, estas células son particularmente dañinas para las neuronas dopaminérgicas en situaciones de neurotoxicidad (Qian *et al.* 2010).



**Figura 6. Mecanismos de acción de la 6-OHDA.** La neurotoxina 6-OHDA es ampliamente usada para inducir modelos de la EP. Esta neurotoxina reproduce los principales procesos celulares involucrados en la EP, como el EO, la neurodegeneración, la neuroinflamación y la muerte neuronal por apoptosis. Se cree que la 6-OHDA produce daño desde distintos compartimentos, como el extracelular, el mitocondrial y el citosólico. Esto se debe a que, al igual que la dopamina, se auto-oxida muy rápidamente o se oxida por enzimas celulares, conduciendo a la formación abundante de EROs, que colapsan los mecanismos de defensa anti-oxidante y la degradación proteosomal de la célula, que finalmente llevan a una pérdida de la homeostasis celular y la muerte. DAT: transportador de dopamina, MAO: monoamino oxidasa, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrógeno, OH<sup>\*</sup>: radical oxhidrilo, 6-OHDA: 6-hidroxidopamina, Fe<sup>2+</sup>: Fe ferroso, Fe<sup>3+</sup>: Fe férrico, ATP: adenosina trifosfato. Extraído de Blum *et al.* 2001.

El proceso de neuroinflamación se ha estudiado extensamente en modelos *in vivo* de la EP inducida por la 6-OHDA en donde neuronas y células de la glía coexisten (Stott y Barker 2014; Walsh *et al.* 2011). Sin embargo, los interrogantes actuales acerca de las vías de señalización neuronal que se encuentran afectadas por la presencia de la 6-OHDA se pueden comprender mediante sistemas más simplificados como el uso exclusivo de neuronas cultivadas *in vitro*.

Es por ello que en la primera parte de este trabajo de tesis, trabajamos con cultivos de una línea celular de neuroblastoma humano, IMR-32, que fueron expuestos a la 6-OHDA con el fin de estudiar los eventos de señalización desencadenados por el EO que induce esta neurotoxina. Las células IMR-32 expresan los transportadores de DA y son capaces, también, de captar este neurotransmisor (Richards y Sadee 1986; Koutsilieri *et al.* 1996; McLaughlin *et al.* 2006); por ende, constituyen un modelo *in vitro* que se considera apropiado para el estudio de los efectos que pueda ejercer la 6-OHDA tanto a nivel extracelular como intracelular en la respuesta neuronal.

### 3. El Fe como inductor del daño

El Fe es un elemento indispensable en la homeostasis de todos los tipos de células, incluyendo las del cerebro. Está presente en proteínas con y sin grupo hemo involucradas en la síntesis de ADN y el transporte de oxígeno y de electrones. Juega un papel muy importante en la eritropoyesis, como un componente fundamental de la hemoglobina, y también en el almacenamiento de oxígeno por medio de la producción de mioglobina (Pantopoulos *et al.* 2012). La función biológica de este metal se basa en su potencial de óxido-reducción, ya que le permite la transición reversible del estado ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) al férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ), catalizando así las reacciones de transferencia de electrones. Sin embargo, esta propiedad redox puede desencadenar reacciones perjudiciales con  $\text{O}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  a través de la reacción de Haber-Weiss y Fenton, que conducen a la formación de radicales altamente reactivos y dañinos tales como  $\text{OH}^\bullet$ . Si bien las EROs son un subproducto normal de la respiración mitocondrial, y hasta cierto punto esenciales para los organismos por lo que acabamos de describir, si se encuentran en exceso y hay un desbalance con las respuestas antioxidantes, pueden conducir a daño de los componentes celulares, disfunción y muerte celular. A causa de esto, los mecanismos fisiológicos de absorción y distribución de Fe se encuentran finamente regulados (Andrews 2008; Crichton 2001; Ganz 2013).

El cerebro es un órgano capaz de acumular Fe. De hecho, la sobrecarga de Fe ha sido asociada con enfermedades hereditarias que han sido dadas a conocer con el nombre de síndromes de neurodegeneración con acumulación de Fe (**Tabla 2**), caracterizadas principalmente por síntomas extrapiramidales (Z. Bin Wang *et al.* 2019). La acumulación de Fe también ocurre en el cerebro de animales y humanos como consecuencia del envejecimiento. Las principales áreas cerebrales en las que se ha encontrado una notable acumulación del metal corresponden

al globo pálido, el núcleo rojo, el núcleo dentado del cerebelo y la SNpc (Gelman *et al.* 1999; Hallgren y Sourander 1958; Hill y Switzer 1984; Koeppen 1995). Los niveles de Fe en el globo pálido son similares a los del hígado (Sullivan *et al.* 2009). Todavía no se sabe con certeza por qué tanto Fe se almacena en el globo pálido y otros ganglios basales, pero es posible que algunas neuronas especializadas de estas regiones cerebrales estén programadas para transcribir grandes cantidades de ferritina, la principal proteína que almacena Fe en el cerebro. Se generaría, entonces, en el sistema nervioso central (SNC), un depósito de almacenamiento intracelular unido a la proteína ferritina, que sería análogo al depósito hepático que sirve para que los hepatocitos lo distribuyan por medio de la circulación sistémica.

### **Ataxia de Friedreich**

#### **Neurodegeneración asociada a pantotenato-quinasa**

#### **Neurodegeneración asociada a la fosfolipasa A2G6**

#### **Neurodegeneración asociada a hidroxilasa-2 de ácidos grasos**

#### **Enfermedad de Kufor-Rakeb**

#### **Aceruloplasminemia**

#### **Neuroferritinopatía**

**Tabla 2. Trastornos de neurodegeneración con acumulación de Fe en el cerebro (NAHC).** Este grupo de enfermedades se caracterizan por depósitos de Fe en el cerebro (principalmente en los ganglios basales), conduciendo a un parkinsonismo progresivo, con espasticidad, distonía, degeneración retiniana, atrofia óptica a menudo acompañada de manifestaciones psiquiátricas y deterioro cognitivo.

Utilizando diversas técnicas de imagen para evaluar los cambios en los niveles de Fe que ocurren conforme transcurren los años, se ha demostrado que un incremento significativo se presenta alrededor de los 40 años en la SNpc. En la EP y EA, se ha demostrado un incremento

en la acumulación de Fe. Algunos de los postulados sugieren que, como  $\alpha$ -sinucleína y la proteína precursora del amiloide, claves en generar estos procesos neuropatológicos, presentan elementos de respuesta al Fe en su ARNm, un incremento de este metal asociado con la edad produciría una sobre-expresión de estas proteínas, con la aparición de los procesos patológicos característicos de ambas enfermedades (Dev y Babitt 2017). Por ejemplo, los cerebros postmortem de pacientes con EP presentan niveles elevados de Fe en la SNpc con relación a los controles. Este aumento del Fe se ha relacionado con incrementos en los niveles de malondialdehído (MDA) y de la peroxidación lipídica. Por otro lado, la neuromelanina, un pigmento específico de este tipo de células, sería capaz de unirse al Fe y quelarlo, estableciendo un vínculo de protección para las neuronas. A este respecto, aunque el rol de la neuromelanina aún no es muy claro, se sugiere que actúa mediante la unión y el almacenamiento, para proteger a la célula de un exceso de este metal en su forma libre (Zaręba *et al.* 1995; Zecca *et al.* 2004). En la EP, parece que se encuentra disminuida esta capacidad de almacenamiento de la neuromelanina, generando una acumulación mayor de Fe libre en la SNpc, un hecho que no se observa en otras áreas del cerebro (Hagemeier *et al.* 2012; Rivera-Mancía *et al.* 2010). Este exceso de Fe libre en la SNpc, tanto en la forma  $\text{Fe}^{3+}$  como en la  $\text{Fe}^{2+}$ , puede reaccionar con el  $\text{O}_2^{\bullet}$  y el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , para generar radicales  $\text{OH}^{\bullet}$  como se mencionó anteriormente. Esto conlleva, finalmente, a un incremento en el EO y a la muerte neuronal. A la inversa, otros autores han sugerido que los elevados niveles de neuromelanina están conectados a una mayor vulnerabilidad de las neuronas a la EP (Kastner *et al.* 1992) y a un incremento de la toxicidad de la  $\alpha$ -sinucleína en las neuronas dopaminérgicas (Li *et al.* 2012).

La  $\alpha$ -sinucleína se expresa de manera abundante en amplias regiones del SNC. Es una proteína soluble altamente enriquecida en las terminales pre-sinápticas de las neuronas. Sin embargo, la acumulación de  $\alpha$ -sinucleína en la forma de agregados filamentosos intracelulares, formando parte de los cuerpos de Lewy, ocurre en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc. Esta es la característica patognomónica de las formas esporádicas y genéticas de la EP. Si bien la degeneración tiene comienzo y afecta solo a las neuronas dopaminérgicas de la vía nigroestriatal, los precipitados proteicos de  $\alpha$ -sinucleína presentan habilidades priónicas, “infectando” otras células y obligando a las proteínas normales de otras regiones cerebrales a adoptar la conformación aberrante. Esto explicaría por qué, en un principio, estos pacientes presentan problemas asociados con la motricidad fina que se relacionan con un desbalance en la señalización colinérgica/dopaminérgica presente en el cuerpo estriado y, a medida que el daño se extiende a otras zonas, los pacientes son capaces de desarrollar una demencia (Masuda-Suzukake *et al.* 2013; Volpicelli-Daley y Brundin 2018).

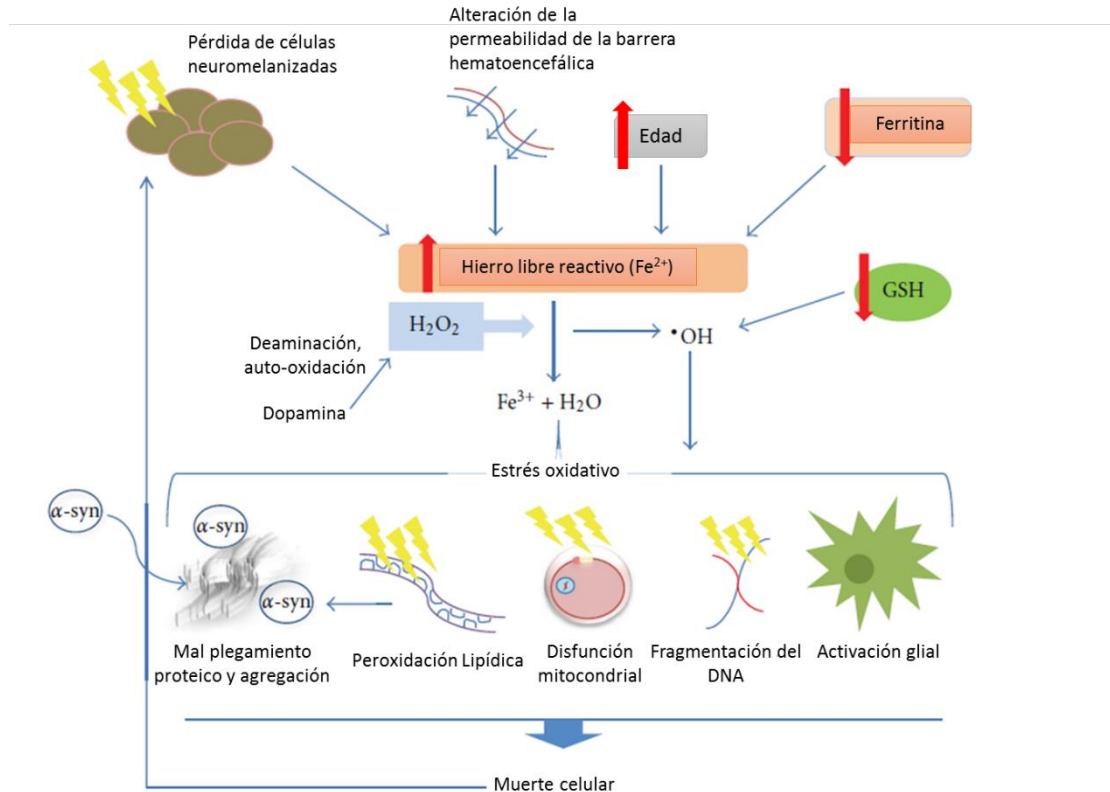
Se ha encontrado una clara asociación entre la fosforilación de la  $\alpha$ -sinucleína y el aumento de radicales libres, confirmando, de esta manera, que la proteína participaría del comienzo de la degeneración neuronal y continuaría, luego, exacerbando el estado de estrés fisiopatológico al que se hallan sometidas las células de la SNpc. Su neurotoxicidad también puede explicarse en estas condiciones, si consideramos que la transcripción de la  $\alpha$ -sinucleína está regulada por los niveles de Fe en la neurona (Friedlich *et al.* 2007; Olivares *et al.* 2009). De hecho, se ha encontrado un elemento de respuesta al Fe en la región 5' no traducida del ARNm de esta proteína, lo que aporta una prueba significativa de una regulación de la  $\alpha$ -sinucleína que es mediada por el Fe. En un estudio *in vitro*, se ha demostrado que la quelación

del Fe produce una regulación negativa en la expresión de la  $\alpha$ -sinucleína (Febbraro *et al.* 2012). Por otra parte, se ha demostrado que la  $\alpha$ -sinucleína está activamente involucrada en el metabolismo del metal. Esto es debido a la capacidad de esta proteína de actuar como una ferrireductasa, ya que posee un sitio de unión en el extremo C-terminal donde tiene lugar la reducción del  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  (Davies *et al.* 2011).

Por lo tanto, se postula que el contenido de Fe en las neuronas de la SNpc sería responsable de la susceptibilidad a la muerte que ocurre en la EP, principalmente por la formación de EROs a través de la reacción de Fenton, teniendo en consideración la mayor susceptibilidad que presentan estas neuronas por su asociación con este metal, los mayores niveles de expresión de la  $\alpha$ -sinucleína y la dopamina, potenciando así el EO (**Figura 7**).

También, los niveles de Fe pueden ser aumentados por el EO a través de varias vías, incluyendo el incremento de la liberación de Fe unido a la ferritina por el anión  $\text{O}_2^-$ , de las proteínas que presentan grupos hemo como la hemoglobina y el citocromo c por la peroxidasa, y de las proteínas que poseen grupos Fe-S por el  $\text{ONOO}^\bullet$  (Berg *et al.* 2001; Chinta y Andersen 2008; Kaur y Andersen 2004).





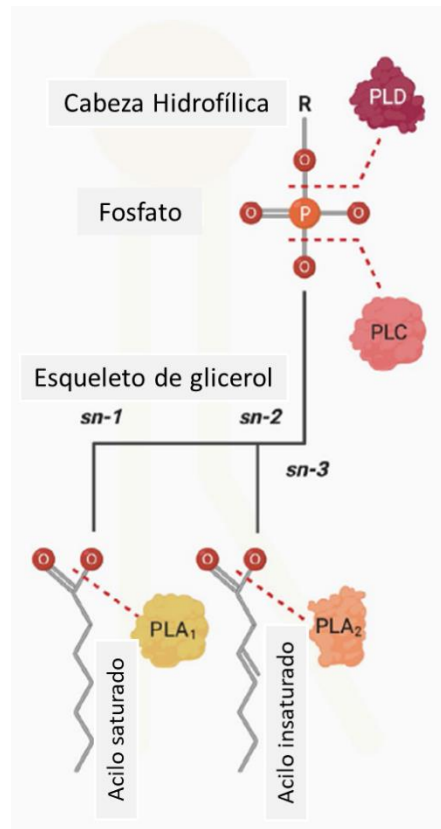
**Figura 7. Muerte celular mediada por Fe en la EP.** Existe una menor capacidad de almacenamiento del Fe en la EP debido a la disminución en la expresión de ferritina y la degeneración nigral de las neuronas que contienen neuromelanina, causando un aumento de la concentración libre de  $\text{Fe}^{2+}$ , el cual es muy reactivo. Los aumentos del Fe relacionados con la edad, sumado a una mayor permeabilidad de la barrera hematoencefálica, provocan una mayor acumulación de Fe. La formación del  $\text{Fe}^{3+}$  a partir del  $\text{Fe}^{2+}$  libre, por medio de la reacción de Fenton, que es mediada por el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , hace que se produzca el radical hidroxilo, muy tóxico. El nivel comprometido de GSH, por otro lado, exagera los niveles de radicales libres, mientras que la desaminación y la auto-oxidación de la dopamina produce más  $\text{H}_2\text{O}_2$ . El estrés oxidativo posterior puede provocar una gama de reacciones citotóxicas que incluyen el plegamiento anómalo de proteínas, la peroxidación lipídica (que a su vez puede causar agregación de  $\alpha$ -sinucleína), disfunción mitocondrial y activación de células gliales. Estos diversos insultos pueden inducir la muerte celular por apoptosis, causando una mayor degeneración. EP: enfermedad de Parkinson, Fe: hierro,  $\text{Fe}^{2+}$ : Fe ferroso,  $\text{Fe}^{3+}$ : Fe férrico,  $\text{H}_2\text{O}_2$ : peróxido de hidrógeno,  $\text{OH}\cdot$ : radical oxhidrilo, GSH: glutatión,  $\alpha$ -syn:  $\alpha$ -sinucleína. Extraído de Mounsey y Teismann 2012.

#### **4. El ácido fosfatídico (PA) y las fosfolipasas: su participación en los estados de neuroinflamación y neurodegeneración**

El cerebro constituye el órgano que, luego del tejido adiposo, presenta la mayor concentración de lípidos, representando los fosfolípidos el 6 % del peso seco de este órgano. Hallazgos recientes sugieren que los lípidos juegan un papel muy importante en la EP (Gómez-Soler *et al.* 2018; Hallett *et al.* 2019; Hernando *et al.* 2019). Se ha visto que los cambios en la actividad de un grupo de enzimas conocidas como fosfolipasas, las que actúan hidrolizando los fosfolípidos de membrana, están relacionados con el daño cerebral, la apoptosis, el metabolismo fosfolipídico alterado y la neurodegeneración (A. A. Farooqui y Horrocks 2006). Es por esta razón que el estudio de estas enzimas reviste importancia en el estudio de los mecanismos etiopatogénicos que operan en la EP.

Un glicerofosfolípido típico está compuesto por dos moléculas de ácido graso (AG), uno saturado y uno insaturado (resultando en un anclaje firme de la molécula lipídica en las membranas celulares) esterificados al esqueleto glicerol y un grupo fosfato al que se unen moléculas de diversa naturaleza y que aportan gran parte de la variabilidad de estos lípidos. Las fosfolipasas son una familia de enzimas lipolíticas que catalizan la escisión de los enlaces éster dentro de los fosfolípidos. Pertenecen al grupo de las hidrolasas, ya que utilizan una molécula de agua para transformar a sus substratos. La familia de fosfolipasas consta de cuatro tipos principales (A, B, C y D), que se clasifican de acuerdo con la posición en que hidrolizan en el esqueleto del glicerol. Las fosfolipasas A1 (PLA1) hidrolizan el enlace éster entre el primer acilo y el glicerol, las PLA2 entre el segundo AG y el glicerol, las de tipo B el enlace éster del primer acilo y del segundo acilo con el glicerol, las fosfolipasas C (PLC)

entre el glicerol y el grupo fosfato y las PLD catalizan esta hidrólisis entre el fosfato y el grupo variable (Aloulou *et al.* 2012; Dennis 2015) (**Figura 8**).



**Figura 8.** Esquema representando un glicerofosfolípido con los sitios de clivaje de las distintas fosfolipasas. Las fosfolipasas son enzimas que hidrolizan los enlaces éster presentes en los glicerofosfolípidos. Dependiendo del enlace éster que clivan se clasifican como A1, A2, C o D. Cada una de estas enzimas relacionadas con el metabolismo lipídico genera moléculas de señalización, que participan en múltiples funciones celulares, algunas de ellas, aún desconocidas. Por ejemplo, la PLA2 genera un lisofosfolípido y un AG, la PLC produce DAG y la cabeza polar (con el fosfato), mientras que la PLD es responsable de la generación de PA junto con un grupo de cabeza polar. Este PA, a su vez puede ser vuelto a clivar por una PLA2, para formar LPA, o ser reconvertido a DAG por la enzima denominada lipina. PLA1: fosfolipasa A1, PLA2: fosfolipasa A2, AG: ácido graso, PLC: fosfolipasa C, DAG: diacilglicerol, PLD: fosfolipasa D, PA: ácido fosfatídico, LPA: ácido lisofosfatídico. Extraído de Joensuu *et al.* 2019.

Las isoformas clásicas de la PLD (PLD1 y 2) hidrolizan el enlace fosfodiéster de la fosfatidilcolina (PC), el fosfolípido predominante de la membrana. En este clivaje se produce el PA y la colina libre. La actividad celular de la PLD puede ser regulada por varios mecanismos. Estos incluyen una regulación directa tanto mediante los fosfolípidos de membrana como por cierto número de proteínas efectoras. Por ejemplo, se ha demostrado que algunas GTPasas monoméricas como ARF y Rho, y algunas isoformas de la proteína quinasa C (PKC), regulan la actividad de la PLD por medio interacciones intermoleculares específicas. Por otro lado, los fosfolípidos pueden también regular en forma indirecta a la PLD, ya que su regulación por parte de la PKC y las GTPasas puede depender estrechamente de la composición fosfolipídica (Cazzolli *et al.* 2006).

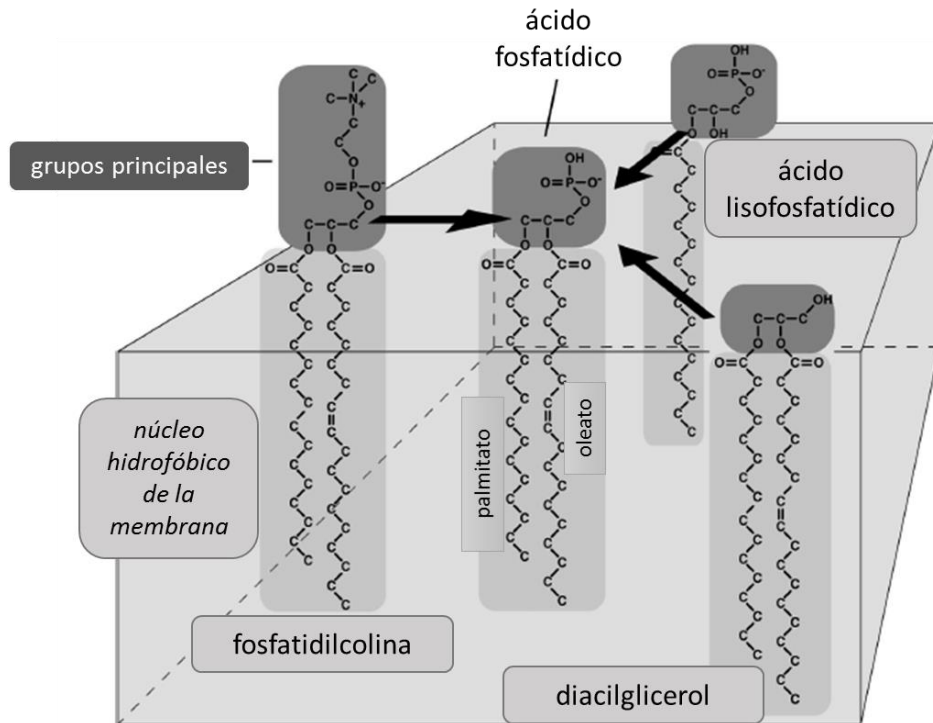
Las PLD son enzimas asociadas a la membrana. Las dos isoformas que se estudiaron en esta tesis fueron las clásicas, a saber, PLD1 y PLD2 que poseen distintos reguladores y localización subcelular, pero que hidrolizan mayormente PC (**Tabla 3**).

Nombres	Abrev.	Sust.	Activación, inhibición	Localización subcelular	Sitio catalítico	Funciones	Fisiol. / patofisiol.
<b>Fosfolipasa D1</b>	PLD1	PC	Activadores: PKC $\alpha$ , $\beta$ 1, $\beta$ 2, Arf, Familia RhoA, PKN Rheb, Ras (vía indirecta), Cofilina CtBP1/BARS AMPK, p90 RSK Inhibidores: AP3	Retículo endoplásmico, Aparato de Golgi, Endosomas tardíos	Dos copias del motivo HKD (HXK(X) <sub>4</sub> D)	Transducción de señales, Migración celular, Activación de Ras, Tráfico subcelular	EA, Defecto cardíaco congénito, Cáncer (angiogénesis, metástasis, invasión tumoral, respuesta hipóxica), Respuestas inmunes (autoinmunidad), Enfermedad trombotica, Regeneración muscular, Fibrosis tisular
<b>Fosfolipasa D2</b>	PLD2 o PLD1C	PC	Activadores: Fosforilación de Cdk5,	Membrana plasmática	Dos copias del motivo HKD	Organización del citoesqueleto,	EA, Cáncer (angiogénesis,

			Fosforilación de Grb2, PKC $\delta$ Inhibidores: Aldolasa, $\alpha$ Actinina, CRMP-2, Munc18-1		(HXK(X) <sub>4</sub> D)	Control del ciclo celular, Regulación transcripcional, Regulación de la secreción vesicular	metástasis, invasión tumoral, respuesta hipóxica, Función inmune, Replicación del virus de la Influenza, Enfermedad trombótica
--	--	--	--	--	----------------------------	---	---

**Tabla 3. Semejanzas y diferencias de las isoformas clásicas de la PLD.**

En mamíferos, la PLD es una enzima clave en la señalización celular cuya función se atribuye principalmente a su producto de reacción, el PA, y a mediadores lipídicos derivados del mismo. El PA puede ser rápidamente convertido en DAG o ácido lisofosfatídico (LPA) por fosfohidrolasas del PA (PAP-1 y PAP-2) o por las PLA1 y PLA2. Las fosfohidrolasas del PA, comúnmente llamadas lipinas, pueden convertir el PA en DAG, un mediador que se sabe que activa a la PKC (**Figura 9**). No obstante, mediante un análisis integral de la composición de los DAG y los PAs, se ha demostrado que es poco probable que el DAG derivado de la actividad de la PLD active a la PKC, sugiriendo un rol de finalización de la señal del PA (Pettitt *et al.* 1997). Las isoformas de PLA2 (secretoria (sPLA2), iPLA2 y cPLA2) son capaces de convertir el PA en LPA (Eder *et al.* 2000; Joensuu *et al.* 2019).



**Figura 9. Diferentes vías de formación de PA.** Las especies de PA (se muestra el 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3 fosfato) pueden formarse a partir del LPA, por la acción de las aciltransferasas, y del DAG, por la acción de las DAGK. La acción de la PLD hidroliza la PC, para producir PA. Por el contrario, el PA puede convertirse en LPA o DAG por la acción de las PLA1 y 2 o las fosfohidrolasas de PA, respectivamente. PA: ácido fosfatídico, LPA: ácido lisofosfatídico, DAG: diacilglicerol, DAGK: diacilglicerol quinasas, PLD: fosfolipasa D, PC: fosfatidilcolina, PLA1: fosfolipasa A1, PLA2: fosfolipasa A2. Extraído de Cazzoli *et al.* 2006.

El PA actúa como un importante segundo mensajero, encontrándose de a poco nuevas funciones que apoyan su rol sustancial en la respuesta de la célula a diferentes señales. Así, por ejemplo, se sabe que actúa como activador de un gran número de quinasas claves en la regulación, incluyendo la fosfatidilinositol 4-fosfato 5-quinasa (PI4P5K tipo I), la diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR), la esfingosina quinasa 1 (SPHK1) y la proteína quinasa Raf-1. También se ha hallado a estas últimas dos implicadas en translocarse a regiones de la membrana enriquecidas en el PA derivado de la PLD (Delon *et al.* 2004; Rizzo

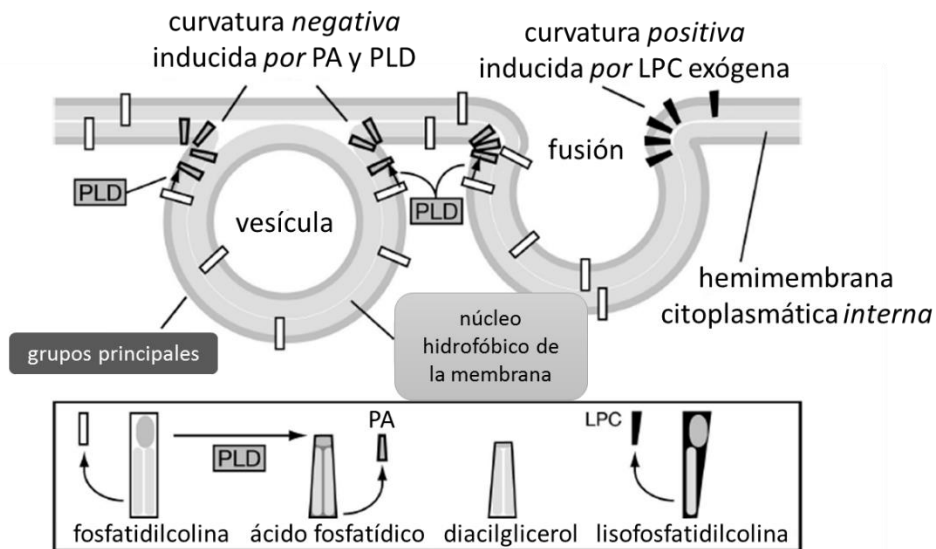
*et al.* 1999). El PA también es capaz de unirse a importantes enzimas de señalización como la fosfodiesterasa específica de AMPc y a la proteína fosfatasa-1 (PP1) (Grange *et al.* 2000; Jones *et al.* 2005). Muchos estudios lo han implicado en el control de procesos biológicos como el reordenamiento del citoesqueleto, la proliferación y supervivencia celular (Cazzolli *et al.* 2006).

La regulación del PA sobre la fosfatidilinositol-4-fosfato-5-quinasa (PIP45K) explica su participación en la estructura del citoesqueleto, ya que se sabe que el fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP<sub>2</sub>), el producto de reacción de esta enzima, tiene un rol bien definido en la formación de los filamentos de actina (Janmey y Lindberg 2004). Por otro lado, el PA recluta a la quinasa Raf-1 para iniciar la respuesta proliferativa mediada por la señalización de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK). También se ha descrito la promoción de la supervivencia celular por parte del PA, la cual es mediada, en este caso, por mTOR y la quinasa 1 S6 (S6K1) (Cazzolli *et al.* 2006).

Pero quizás el rol más conocido del PA derivado de la PLD1 sea el de participar en el tráfico vesicular como la exocitosis y la endocitosis en la membrana plasmática, en vesículas de Golgi y en vesículas sinápticas (Huang *et al.* 2005). Por ejemplo, la translocación del transportador de glucosa (GLUT) 4 en vesículas hacia la membrana plasmática depende, además de insulina, de la generación de PA por la PLD1 (Emoto *et al.* 2000; Huang *et al.* 2005). De esta manera, la mayor actividad de la PLD1 permite una mayor captación de glucosa para las células por medio de una mayor exocitosis de las vesículas y aumento de la densidad de receptores GLUT4 en la membrana plasmática. A la inversa, una menor producción de PA, resultado de una menor actividad de la PLD1, conlleva una menor exocitosis e incorporación de glucosa. El bloqueo no ocurre en el tráfico de las vesículas con

GLUT4 o en su reclutamiento a la membrana plasmática, sino en el proceso de fusión de la vesícula a la membrana plasmática.

La fusión de la membrana es un proceso de remodelación que requiere energía para superar el poderoso efecto hidrofóbico del núcleo de la bicapa lipídica y se han descrito muchas proteínas y lípidos que facilitan este proceso de fusión (Chernomordik y Kozlov 2003, 2005; H. T. McMahon y Gallop 2005). El PA con carga negativa en el grupo de la cabeza polar y cercana a las cadenas de acilo, generado en la cara citoplasmática o interna de las membranas, es capaz de inducir una curvatura negativa de la membrana y un entorno que favorezca la fusión (Kooijman *et al.* 2003). Esto, además, fue demostrado por la agregación de lisofosfatidilcolina (LPC), la cual induce una curvatura positiva de la membrana. El agregado de LPC en la cara extracelular de la membrana evita el bloqueo en la exocitosis generado por la inhibición de la actividad de la PLD y la consecuente producción de PA (Huang *et al.* 2005). Esto demuestra un mecanismo en el cual el PA derivado de la PLD regula la fusión de las membranas (**Figura 10**).



**Figura 10. Modelo del proceso de fusión vesicular mediado por la PLD.** El dibujo muestra la fusión de la membrana a través de un intermedio de hemifusión, detallando cómo la “forma” de los fosfolípidos (PC, PA,



DAG, LPC) puede promover la curvatura necesaria para permitir la fusión completa de dos bicapas lipídicas opuestas. El PA derivado de la PLD podría inducir una curvatura negativa en la lámina interna de la membrana citoplasmática. La LPC añadida exógenamente podría inducir una curvatura positiva en la lámina externa de la membrana. PLD: fosfolipasa D, PC: fosfatidilcolina, PA: ácido fosfatídico, DAG: diacilglicerol, LPC: lisofosfatidilcolina. Extraído de Cazzoli *et al.* 2006.

Si bien los aspectos mencionados describen el rol biológico del PA en general, existen evidencias que vinculan aspectos específicos de este lípido bioactivo en la patogenia de la EP. Los primeros estudios que se realizaron demostraron que la PLD2 interaccionaba y era inhibida por la  $\alpha$ -sinucleína (Jenco *et al.* 1998). La sobre-expresión de esta isoforma en la SNpc en modelos murinos, mediante transferencia génica viral, ha demostrado su participación en la pérdida de las neuronas dopaminérgicas. En este sistema, la  $\alpha$ -sinucleína es capaz de reducir la toxicidad *in vivo* provocada por la PLD2, al inhibir esta isoforma y, de esta manera, la neurodegeneración (Gorbatyuk *et al.* 2010). Esto sugiere que parte de las consecuencias de una desregulación en la función de la  $\alpha$ -sinucleína se asocian con cambios en la actividad de la PLD2. Algunos autores sugirieron que una de las funciones de la  $\alpha$ -sinucleína es modular el reciclado de vesículas sinápticas mediante la inhibición de la PLD2 (Ahn *et al.* 2002). La PLD2, al estar localizada en la membrana plasmática, podría ser importante en la formación de vesículas, ya que el PA tiene la capacidad de reclutar moléculas adaptadoras que se encargan de dicho proceso (Liscovitch *et al.* 2000). Otros estudios en ratones *knockout* para el gen de  $\alpha$ -sinucleína demostraron un incremento en la liberación de las vesículas sinápticas (Auluck *et al.* 2010). Sin embargo, un estudio reciente sugiere que el PA, actuando como segundo mensajero, sería el responsable de inducir la neurodegeneración, es decir, jugaría un rol más preponderante la actividad lipasa de la PLD2 (Mendez-Gomez *et al.* 2018). Investigaciones llevadas a cabo en nuestro laboratorio también

han hallado roles similares de la  $\alpha$ -sinucleína en la inhibición de la isoforma 1 de la PLD (Conde *et al.* 2018). Sin embargo, el rol de las isoformas clásicas de la PLD no está aún dilucidado en la EP.

Con respecto al segundo grupo de fosfolipasas que se estudiaron en esta tesis, las PLA2, se cree que existen al menos 22 genes que codifican estas enzimas en mamíferos. Las PLA2 hidrolizan el AG de la posición 2 del esqueleto de glicerol de los fosfolípidos, generando un AG libre y un lisofosfolípido. A modo general, las isoformas de PLA2 en mamíferos difieren con respecto a la distribución tisular y celular, las especificidades de sustrato y los requerimientos de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) (**Tabla 4**).

Clasificación de las PLA2			
Grupo	Organismos biológicos que los poseen /sitios anatómicos donde suelen expresarse	Otros nombres	Variedad
IA	Cobras y crótalos		Secretoria
IB	Páncreas humano y porcino		Secretoria
IIA	Sinovia humana y veneno de víboras caza ratones		Secretoria
IIB	Víbora de Gabón		Secretoria
IIC	Testículos de murinos		Secretoria
IID	Páncreas y bazo humanos y murinos		Secretoria
IIE	Cerebro, corazón y útero humanos y murinos		Secretoria
IIF	Testículos y embriones humanos y murinos		Secretoria
III	Humanos, murinos, lagartos y abejas		Secretoria
IVA	Humano y murino	cPLA2 $\alpha$	Citosólica
IVB	Humano	cPLA2 $\beta$	Citosólica
IVC	Humano	cPLA2 $\gamma$	Citosólica
IVD	Humano y murino	cPLA2 $\delta$	Citosólica
IVE	Murino	cPLA2 $\epsilon$	Citosólica
IVF	Murino	cPLA2 $\zeta$	Citosólica
V	Corazón, pulmones y macrófagos humanos y murinos		Secretoria
VIA-1	Humano y murino	iPLA2	Citosólica
VIA-2	Humano y murino	iPLA2 $\beta$	Citosólica
VIB	Humano y murino	iPLA2 $\gamma$	Nembranal-microsomal
VIC	Humano y murino ( <i>Neuropathy Target Esterase</i> )	iPLA2 $\delta$ , NTE	Nicosomal Nembranal
VID	Humano	iPLA2 $\epsilon$ , adiponutrina	Secretoria

VIE	Humano	iPLA2 $\zeta$ , TTS-2.2	Secretoria
VIF	Humano	iPLA2 $\gamma$ , GS2	Secretoria
VIIA	Humano, murino, porcino, bovino	Lp-PLA2	Secretoria
VIIIB	Humano, bovino	PAF-AHII	Citosólica
VIIIA	Humano	PAF-AH1b	Citosólica
VIIIB	Humano	(subunidad $\alpha 1$ ) PAF-AH1b	
VIIIB	Humano	(subunidad $\alpha 2$ )	Citosólica
IX	Veneno de víbora (conodipina N)		Secretoria
X	Leucocitos, timo y bazo humanos		Secretoria
XIA	Raíces vegetales tuberculares	PLA2-I	Secretoria
XIB	Raíces vegetales tuberculares	PLA2-II	Secretoria
XII	Humano y murino		Secretoria
XIII	Parvovirus		Secretoria
XIV	Hongos y bacterias simbióticas		Secretoria
XV	Humano, murino y bovino	ACS, LPLA2, LLPL	Lisosomal
XVI	Tejido adiposo	AdPLA, HREVI07, HRASLSC, NY-REN-65	Asociada con membrana, intracelular calcio-dependiente

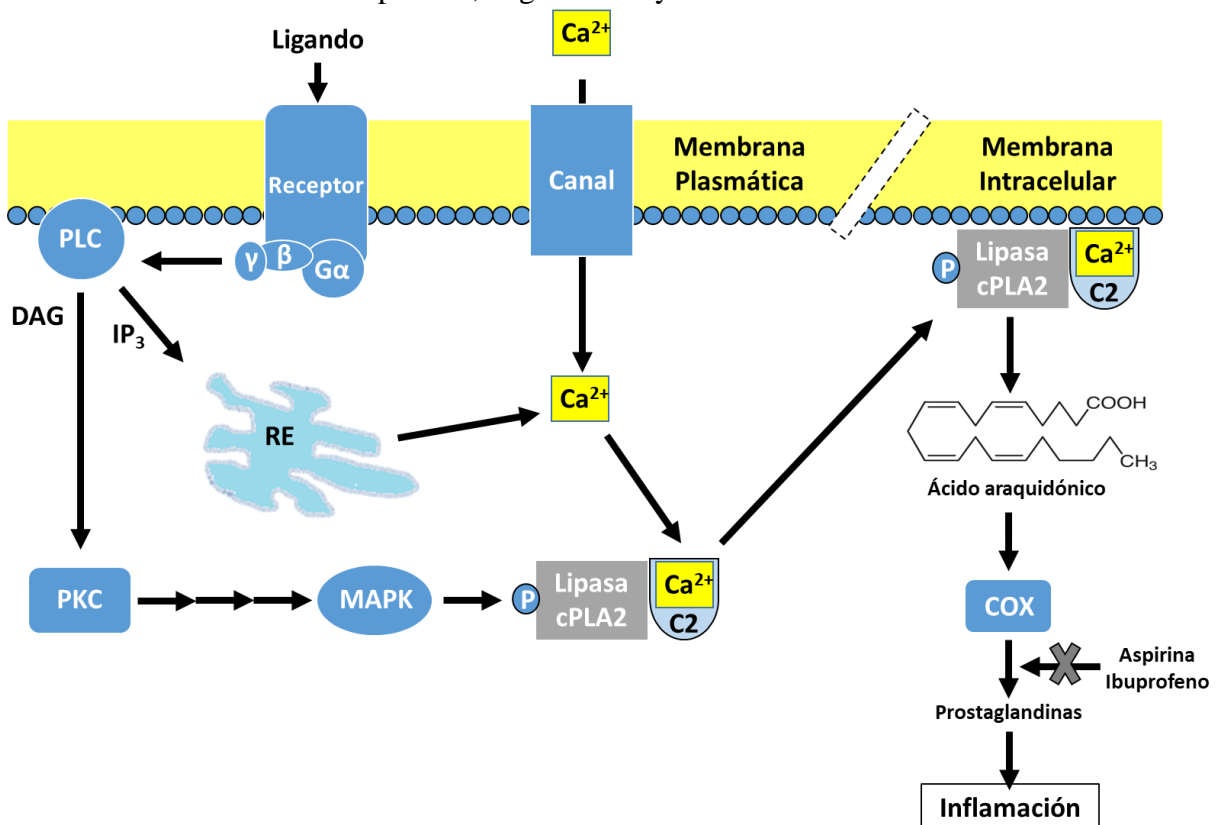
**Tabla 4. Clasificación de las isoformas de PLA2.** Las PLA2 se han podido clasificar por su funcionalidad y localización celular y tisular en dos grandes tipos: citosólicas de alto peso molecular y secretorias de bajo peso molecular. Por su dependencia de calcio en variedades: calcio-dependientes y calcio-independientes. Se utilizan números romanos para los dieciséis (16) grupos, es decir, del I al XVI, con diversos subgrupos nominados con letras mayúsculas, comprometiéndose la totalidad de enzimas conocidas en acariotas (virus), procariotas (bacterias) y eucariotas (hongos, reptiles y mamíferos). Extraído de Alfonso *et al.* 2009.

Las isoformas identificadas hasta ahora en el cerebro incluyen los grupos IVA, IVB y IVC de las cPLA2, los grupos IIA, IIC, IIE, V y X de las sPLA2 dependientes de  $Ca^{2+}$ , los grupos VIA y VIB de las iPLA2 y la fosfolipasa selectiva para plasmalógenos (PlsEtn-PLA2) (Hamaguchi *et al.* 2003; Hirashima *et al.* 1992; Kolko *et al.* 2006; Mancuso *et al.* 2000; Molloy *et al.* 1998; Pickard *et al.* 1999; Rao *et al.* 2007; Strokin *et al.* 2007).

En este trabajo se hizo énfasis en el grupo de las cPLA2 e iPLA2, por la mayor participación que se ha observado de estas isoformas en la EP (A. A. Farooqui *et al.* 2006; Sharon *et al.* 2003). Las cPLA2 tienen preferencia por los fosfolípidos esterificados con ácido araquidónico (AA) sobre otros AG, y requieren  $Ca^{2+}$  en concentraciones submicromolares

para la unión a la membrana. Debido a la presencia en el extremo N-terminal de un dominio de unión a fosfolípido dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , la cPLA2 transloca desde el citosol hacia las membranas nucleares u otras membranas de una manera dependiente de este ion. En estas membranas intracelulares o asociadas a ellas se hallan las enzimas que actúan corriente abajo en esta vía, responsables del metabolismo del AA a eicosanoides, incluyendo las ciclooxigenasas (COX) y lipooxigenasas (LOX) (A. A. Farooqui y Horrocks 2006; T. Farooqui y Farooqui 2011) (**Figura 11**).

El extremo C-terminal de la cPLA2 contiene el sitio de fosforilación y el sitio responsable de su actividad catalítica. Estos sitios podrían estar involucrados en la regulación de su actividad enzimática. La activación de cPLA2 puede ocurrir a través de la fosforilación de residuos de serina, principalmente en las serinas de la posición 505 y 727, por MAPK y PKC (Hirabayashi y Shimizu 2000). En membranas neuronales, la actividad de cPLA2 y la liberación de AA están asociadas por distintos mecanismos con la biología de neurotransmisores como la dopamina, el glutamato y la serotonina.



**Figura 11. Rol de la cPLA2 en la vía de señalización de la inflamación.** En células estimuladas, la unión del  $\text{Ca}^{2+}$  al dominio C2 de la fosfo-cPLA2 provoca la unión a la membrana (transloca del citosol a la membrana) y la posterior liberación hidrolítica de AA. En la figura se observa la quinasa que regula la cPLA2, que pertenece al grupo de las MAPK. Dentro de estas, tanto p38, ERK1/2 como JNK son capaces de regular su actividad, aunque no son las únicas. También otras quinasas que la regulan son PKA, receptores TKR vía JAK/STAT, la proteína quinasa II dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina y la quinasa de interacción con MAPK. La regulación de la cPLA2 por una u otra quinasa va a depender del estímulo recibido (ligando), del estadio de desarrollo en el que se encuentra el organismo y de la clase de tejido en la que actúa. cPLA2: fosfolipasa A2 citosólica, AA: ácido araquidónico, PLC: fosfolipasa C, PKC: proteína quinasa C, COX: ciclooxigenasa, DAG: diacilglicerol,  $\text{IP}_3$ : inositol trifosfato, MAPK: proteínas quinasas activadas por mitógenos, ERK1/2: quinasas reguladas por señal extracelular, p38: MAP quinasa p38, JNK: quinasa c-Jun N-terminal, PKA: proteína quinasa A, TKR: receptor tirosina quinasa, JAK: quinasa Jano, STAT: proteína transductora de señal y activadora de la transcripción.

La respuesta a estos neurotransmisores involucra la liberación de AA en el tejido cerebral (A. A. Farooqui *et al.* 2000). Los eicosanoides, que comprenden a los leucotrienos, prostaglandinas y tromboxanos, son mediadores lipídicos que pueden cruzar las membranas celulares para actuar en otras células vecinas. Pueden actuar por medio de receptores extracelulares e intracelulares específicos y así modular las vías de transducción de señales y la transcripción génica (A. A. Farooqui *et al.* 2002). Incluso podrían estar involucrados en la señalización cruzada entre distintos tipos de células neuronales del cerebro.

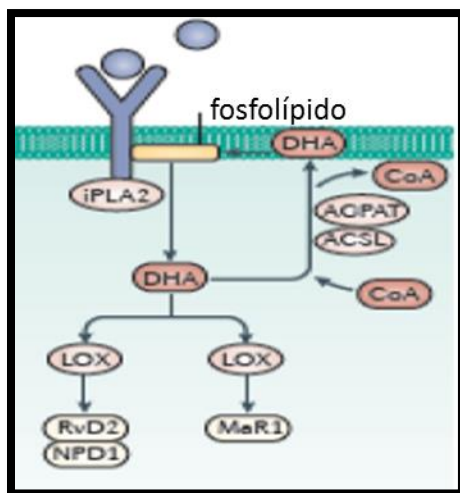
En relación a las iPLA2, existen dos miembros distintos de la familia de iPLA2, el grupo VIA de iPLA2 y el grupo VIB de iPLA2. La iPLA2 VIA tiene un peso de 85-88 kDa, y comparte con la iPLA2 VIB varias regiones conservadas en el extremo C-terminal, pero presenta muy poca homología con el extremo N-terminal. Las iPLA2 no requieren  $\text{Ca}^{2+}$  para su actividad, pero utilizan ATP para la estabilización, y son estimuladas por trombina y

bradiquinina, pero inhibidas por bromoenolactona (Ackermann *et al.* 1995; Balsinde y Balboa 2005; Strokin *et al.* 2003). Sin embargo, se conoce muy poco acerca de la regulación genética y molecular del grupo VI de las iPLA2, especialmente en el cerebro. Los primeros estudios que se realizaron sugirieron una función de homeostasis por medio de la regulación del remodelamiento de la membrana. No obstante, actualmente es conocida la participación en forma significativa en la transducción de señales, ya que media procesos relacionados con el crecimiento celular, la diferenciación, la secreción de insulina, la oxidación de AG y la memoria (Ming *et al.* 2019; Ramanadham *et al.* 2015; Xie *et al.* 2019).

La iPLA2 es principalmente responsable de la liberación del ácido docosahexaenoico (DHA), ubicado en la posición 2 en el esqueleto de glicerol. Aunque se han atribuido muchas funciones importantes al DHA en el cerebro (Calon y Cole 2007; Heird y Lapillonne 2005; Salem *et al.* 2001), pocos estudios han hecho foco en si dichas funciones guardaban relación con su liberación. Una parte del DHA liberado puede ser convertido en neuroprotectina D1 (NPD1) o resolvina D2 (RvD2), dos moléculas de señalización involucradas en la supervivencia celular y la resolución de la inflamación en el cerebro (Lukiw *et al.* 2005; Schwab *et al.* 2007) (**Figura 12**). Además, el DHA libre inhibe la actividad de la PKC, y ha sido implicado en la regulación de las vías de señalización en el cerebro en que están implicados el factor de transcripción NF- $\kappa$ B, la MAPK p38, Bcl-2 y Akt, mediando respuestas de inflamación, supervivencia y proliferación en el cerebro (Akbar *et al.* 2005; Keller *et al.* 1993; Lukiw *et al.* 2005; Marcheselli *et al.* 2003; Rao *et al.* 2007; Seung Kim *et al.* 2001; Xu *et al.* 2019).

En la tabla 2 de las enfermedades NAHC, se puede apreciar una en particular, en la que el gen *PLA2G6* que codifica para la iPLA2 grupo VI, cuando se encuentra mutado, produce

distrofia neuroaxonal y neurodegeneración con una acumulación de Fe en el cerebro, causando la EP. Sin embargo, la relación que existe entre el Fe, la iPLA2, y la  $\alpha$ -sinucleína no ha sido elucidada aún, por lo que en este trabajo de tesis el segundo objetivo particular estuvo centrado en este aspecto.



**Figura 12. Liberación de DHA y su conversión en mediadores por la activación del neuroreceptor colinérgico/serotoninérgico.** El DHA, el cual es liberado por activación del receptor de la vía colinérgica o serotoninérgica, es convertido a lípidos mediadores por la LOX. El DHA, además, puede volver a ser re-esterificado. Sin embargo, aún no se conoce del todo la función de los metales de transición en la liberación del DHA y los efectos en las patologías neurodegenerativas. iPLA2: fosfolipasa A2 independiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , DHA: ácido docosahexaenoico, LOX: lipooxigenasa, RvD2: resolvina D2, NPD1: neuroprotectina D1, Mar1: Maresina 1, CoA: coenzima A, ACPAT: acil-glicerol-fosfato-acil transferasa, ACSL: acil-CoA sintetasa de cadena larga. Extraído de Bazinet y Layé 2014.

## OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis fue estudiar la participación de las PLA2 y de las PLD en los eventos moleculares gatillados por EO inducido por el neurotóxico 6-OHDA o por exposición a Fe.

Los objetivos específicos fueron:

- Analizar y caracterizar distintos modelos experimentales *in vitro* de EP, utilizando líneas celulares de: neuroblastoma humano (IMR-32), neuronas dopaminérgicas (N27) y astroglioma (C6) de rata, expuestas a estímulos injuriantes tales como el neurotóxico 6-OHDA y la exposición a Fe.
- Caracterizar el rol de las distintas isoformas de la PLA2 y de la PLD en la respuesta al estímulo injuriantes en los diferentes modelos en estudio.
- Estudiar el rol de determinadas isoformas de la PLA2 durante los eventos de EO y su relación con la fosforilación de la  $\alpha$ -sinucleína.
- Evaluar la respuesta neuronal al EO en presencia de medios condicionados provenientes de cultivos astrocíticos.



## MATERIALES

### 1. Reactivos

A continuación, se detallan los reactivos utilizados durante el desarrollo de esta tesis:

- Coomassie brilliant blue, 2-amino-2-hidroximetil-propan-1,3-diol (Tris), glicina, dodecilsulfato de sodio (SDS), 2-mercaptoetanol, azul de bromofenol, fluoruro de sodio,  $\beta$ -glicerofosfato de sodio, ortovanadato de sodio, leupeptina, aprotinina, pepstatina, fluoruro de fenilmetilsulfonio (PMSF), ditiotreititol (DTT), persulfato de amonio, bisacrilamida, bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT), ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetansulfónico (HEPES), cloruro de magnesio, Nonidet P-40 (NP-40), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), bicarbonato de sodio, cloruro de calcio, dimetilsulfóxido (DMSO), seroalbúmina bovina (SAB), Tritón X-100, ácido tiobarbitúrico (ATB), 6-OHDA, DL- propranolol, fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (Estados Unidos).
- Cloruro de sodio, cloruro de potasio, fosfato monopotásico, fosfato disódico, de J. T. Baker (Estados Unidos).
- Glicerol, sílica gel 60 H y sílica gel 60 G, de Merck (Alemania).
- Ácido acético, acetona, amoníaco, cloroformo, etanol, éter etílico, isopropanol, metanol, n-hexano, tolueno, de Científica Nacional (Argentina).
- Antibiótico-antimicótico, medio de cultivo de células DMEM (del inglés *Dulbecco's Modified Eagle Medium*), RPMI (del inglés *Roswell Park Memorial Institute*) y tripsina, de Gibco (Estados Unidos).

- Placas radiográficas UltraCruz, VU0155069, CAY10594, R59022, U73122, U0126, LY294002, ATK, BEL, PTK y luteolina, de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, Estados Unidos).
- Tween 20, ECL Prime, de Amersham-GE Healthcare (Reino Unido).
- Acrilamida, de AppliChem (Alemania).
- N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina (TEMED), de Promega (Madison, WI, Estados Unidos).
- Paraformaldehído, de Biopack (Argentina).
- [<sup>3</sup>H]ácido oleico (9,2 Ci/mmol, [<sup>3</sup>H]AO), de New England Nuclear-Dupont (Boston, MA, Estados Unidos).
- Nitrógeno, de AGA (Argentina).
- Diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCDHF-DA), de Molecular Probes (Estados Unidos).
- Membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF) para transferencia Western blot Immobilon-P (0,45 μM), de Millipore Corporation (Temecula, CA, Estados Unidos).
- Revelador marca Ilford, de Harman Technology Limited (Reino Unido).
- Fijador universal marca Romek, de Gamaxa S.R.L (Argentina).
- Leche en polvo descremada, de La Serenísima (Argentina).
- Centelleador Preblended Dry Fluor 2a70, de Research Products International Corp. (Estados Unidos).
- Ácido clorhídrico, de Carlo Erba (Italia).

- Kit comercial para determinar la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa, LDH-P UV AA, gentilmente donado por Wiener Lab. (Argentina).
- TRIzol®, de Invitrogen (Argentina).
- Random Primer hexamers y Mezcla Real para Real-Time PCR, de Biodynamics (Argentina).
- Inhibidor de RNasa y M-MLV Reverse Transcriptase, de Promega (Estados Unidos).
- Suero fetal bovino (SFB), de Internegocios (Argentina).
- Hoechst [Catálogo: C-10339], de Thermo Fisher (Invitrogen, Argentina).
- Anticuerpos: anti-p65 [sc-109] policlonal de conejo, anti- $\beta$ -actina monoclonal de ratón [sc-47778], IgG<sub>2A</sub> anti-ribonucleoproteína nuclear heterogénea (hnRNP) monoclonal de ratón [sc-32301], IgG policlonal de ratón anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano (HRP, del inglés *horseradish peroxidase*) [sc-2357], IgG $\kappa$  de ratón conjugado con HRP [sc-516102], anti-p65 monoclonal de ratón [sc-8008], anti-ratón IgG2a policlonal de cabra [sc-2970], anti-p-Akt policlonal de conejo [sc-7985], anti-p-ERK1/2 monoclonal de ratón [sc-7383], anti-PLD2 monoclonal de ratón [sc-515744], anti-GFAP monoclonal de ratón [sc-33673], anti-GCLc monoclonal de ratón [sc-390811] anti-iPLA2 grupo VI monoclonal de ratón [sc-376563] y anti-p- $\alpha$ -sinucleína policlonal de conejo [sc-135638], fueron obtenidos de Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, Estados Unidos). Anti-p-I $\kappa$ B $\alpha$  monoclonal de ratón [cs-9246S] y anti-S100 $\beta$  monoclonal de conejo [cs-D10G6] fueron obtenidos de Cell Signaling Technology (Beverly, MA,

Estados Unidos). Anti- $\alpha$ -tubulina monoclonal de ratón [CP06] fue obtenido de Calbiochem (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, Estados Unidos). Anti-ratón conjugado con Alexa Fluor 488 [A-11001] y anti-conejo conjugado con Alexa Fluor 546 [A-11035] fueron obtenidos de Thermo Fisher (Invitrogen, Argentina). Anti-conejo conjugado con Cy2 [111-225-144] fue obtenido de Jackson ImmunoResearch (Sero-immuno Diagnostics, GA, Estados Unidos).

Todos los demás reactivos y químicos utilizados fueron de la mayor pureza disponible.

## 1.2. Equipamiento.

- Balanza de precisión CAHN 21.
- Balanza de precisión OHAUS AS200.
- Balanza de precisión Sartorius, modelo 2006 MP.
- Cabina de flujo laminar Heraeus Laminin Air, modelo ELB 2472.
- Cámara de transferencia Bio-Rad, modelo Mini Trans-Blot.
- Cápsulas y frascos para cultivo celular, de Greiner Bio-One International (GBO).
- Centrífuga de mesa Beckman, modelo TJ-6.
- Contador de centelleo líquido LKB-Wallac, modelo 1214 Rackbeta.
- Cuba para electroforesis vertical Bio-Rad, modelo Mini-Protean II.
- Cubetas de vidrio y cuarzo Coler-Parmer Instrument Co.
- Espectrofotómetro UV-VIS-NIR Jasco, modelo V-630.
- Espectrofotómetro UV-VIS PicoDrop, versión 4.0/21/03/11.
- Estufa Fisher Isotemp. Oven 300 series.
- Freezer de -20 °C Gafa, modelo FGV 1650.

- Freezer de -80 °C Forma Scientific, modelo 8423.
- Fuente de alimentación para electroforesis Bio-Rad, modelo Power Pack Basic.
- Medidor de pH Altronix, modelo TPX I.
- Microcentrífuga Eppendorf, modelo 5415 R.
- Microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse E-600 (Nikon, Melville, NY, USA).
- Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Australia).
- Vórtex Mistral.

## MÉTODOS

### 1. Líneas celulares

Para esta tesis se utilizó como modelo de estudio la línea neuronal inmortalizada de neuroblastoma humano, IMR-32, inicialmente establecida en la década del '70 por Tumilowicz y colaboradores (Tumilowicz *et al.* 1970). Estudios posteriores pudieron demostrar que esta línea celular IMR-32 presentaba transportadores de dopamina y otros transportadores vesiculares de monoaminas (Koutsilieri *et al.* 1996; Kereszturi *et al.* 2006; McLaughlin *et al.* 2006). Por otro lado, se encontró que eran capaces de incorporar dopamina y, asimismo, se ha demostrado la expresión basal de la enzima TH (Ross *et al.* 1981; Thompson *et al.* 1982), involucrada en el paso limitante de la síntesis de catecolaminas, catalizando la hidroxilación de tirosina en dihidroxifenilalanina (Corso y Dudás 2014), demostrando de esta manera la presencia de dopamina en estas neuronas (Gupta *et al.* 1985). En base a las características mencionadas, nos pareció apropiado establecer a las células IMR-32 como un modelo idóneo en el estudio de los eventos de neurotoxicidad *in vitro* asociados a la EP.

La segunda línea celular utilizada fue la de las neuronas N27 provenientes del mesencéfalo de rata. Se optó por esta línea como un método alternativo y complementario de la línea IMR-32 en los estudios realizados con el FAC. Estas neuronas, al igual que las IMR-32, presentan propiedades de neuronas dopaminérgicas, como niveles de expresión de TH y del transportador de dopamina, por lo que ha sido ampliamente utilizada como un modelo *in vitro* para el estudio de la EP y para el estudio de la neurotoxicidad, el EO, la neurodegeneración y vías moleculares asociadas con estos procesos (Charli *et al.* 2016; Hammond *et al.* 2015; Harischandra *et al.* 2015).

La tercera línea correspondió a las células C6 de astroglioma de rata. Este linaje ya se ha validado en estudios para medir los efectos neurotóxicos del Fe y la 6-OHDA (Raicevic *et al.* 2005; Song *et al.* 2007), por lo que se considera útil en el estudio de la EP.

## **2. Cultivo celular**

Las líneas celulares IMR-32 y C6 se mantuvieron en condiciones de esterilidad, cultivándose en medio DMEM alta glucosa suplementado con SFB al 10 % (v/v), penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 µg/ml y anfotericina B 0,25 µg/ml en un incubador a 37 °C en atmósfera húmeda y 5 % de CO<sub>2</sub>. La línea celular N27 se cultivó en idénticas condiciones pero utilizando el medio RPMI. Cuando las células alcanzaron una confluencia de aproximadamente un 90 %, se realizó el subcultivo de la línea. Se descartó el medio, se realizó un lavado con buffer fosfato salino (PBS, del inglés, *phosphate-buffered saline*) (KCl 2,7 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mM, NaCl 137 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, pH 7,4). Luego se incubaron las células por 2-3 min a 37 °C con tripsina 1,5X; se agregó medio de cultivo suplementado con SFB 10 % y se transfirió todo a un tubo cónico de 15 ml. Este último se centrifugó a 1000 rpm por 5 min; se descartó el sobrenadante y se añadió DMEM o RPMI con SFB al 10 %, disgregando y homogeneizando el pellet mecánicamente con una pipeta. Esta suspensión celular se utilizó luego para su siembra en placas individuales o multipocillo de acuerdo a las necesidades de cada experimento.

## **3. Tratamientos experimentales**

Las células se incubaron hasta un 80-90 % de confluencia y todos los tratamientos se llevaron a cabo en DMEM o RPMI sin SFB. Se procedió de la siguiente manera: se removió el medio de las cápsulas o placas y se reemplazó por medio nuevo y sin SFB, luego se añadieron los inhibidores o drogas en las concentraciones deseadas. En los controles, se agregó el vehículo

correspondiente. Las células se incubaron en esas condiciones por 12, 24, 48 o 72 h, de acuerdo a la necesidad de los experimentos.

Los tratamientos en el capítulo 1 de esta tesis fueron los siguientes:

6-OHDA: se preparó una solución madre con una concentración de 50 mM en ácido ascórbico al 0,1 % en agua. La concentración de uso en los distintos experimentos fue de 50, 75 y 100  $\mu$ M.

VU0155069: inhibidor farmacológico de la isoforma PLD1. Se preparó una solución madre con una concentración de 20 mM en DMSO. La concentración de uso en los distintos experimentos fue de 5  $\mu$ M.

CAY10594: inhibidor farmacológico de la isoforma PLD2. Se preparó una solución madre con una concentración de 20 mM en DMSO. La concentración de uso en los distintos experimentos fue de 5  $\mu$ M.

R59022: inhibidor farmacológico de las isoformas de diacilglicerol quinasas (DAGK). Se preparó una solución madre con una concentración de 37 mM en DMSO. La concentración de uso en los distintos experimentos fue de 5  $\mu$ M.

U73122: inhibidor farmacológico de la PLC. Se preparó una solución madre con una concentración de 20 mM en DMSO. La concentración de uso en los distintos experimentos fue de 5  $\mu$ M.

U0126: inhibidor farmacológico de las quinasas MEK1/2. Se preparó una solución madre con una concentración de 40 mM en DMSO. La concentración de uso en los distintos experimentos fue de 10  $\mu$ M.

LY294002: inhibidor farmacológico de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K). Se preparó una solución madre con una concentración de 25 mM en DMSO. La concentración de uso en los distintos experimentos fue de 10  $\mu$ M.



DL-Propranolol: inhibidor farmacológico de la lipina. Se preparó una solución madre con una concentración de 35 mM en DMSO. La concentración de uso en los distintos experimentos fue de 50  $\mu$ M.

ATK: inhibidor farmacológico de la cPLA2. Se preparó una solución madre con una concentración de 56,7 mM en DMSO. La concentración de uso en los distintos experimentos fue de 10  $\mu$ M.

BEL: inhibidor farmacológico de la iPLA2. Se preparó una solución madre con una concentración de 43 mM en DMSO. La concentración de uso en los distintos experimentos fue de 10  $\mu$ M.

Los tratamientos en el capítulo 2 de esta tesis fueron:

FAC: se preparó una solución madre con una concentración de 87 mM en agua 15 minutos antes de cada experimento. La concentración de uso en los distintos experimentos fue de 300, 500 y 1000  $\mu$ M.

CAY10594: inhibidor farmacológico de la isoforma PLD2. Se preparó una solución madre con una concentración de 20 mM en DMSO. La concentración de uso en los distintos experimentos fue de 5  $\mu$ M.

BEL: inhibidor farmacológico de la iPLA2. Se preparó una solución madre con una concentración de 43 mM en DMSO. La concentración de uso en los distintos experimentos fue de 10  $\mu$ M.

PTK: inhibidor farmacológico de la cPLA2. Se preparó una solución madre con una concentración de 53 mM en DMSO. La concentración de uso en los distintos experimentos fue de 45  $\mu$ M.

Luteolina: inhibidor farmacológico de la LOX-15. Se preparó una solución madre con una concentración de 40 mM en DMSO. La concentración de uso en los distintos experimentos fue de 40  $\mu$ M.

R59022: inhibidor farmacológico de las isoformas de diacilglicerol quinasas (DAGK). Se preparó una solución madre con una concentración de 37 mM en DMSO. La concentración de uso en los distintos experimentos fue de 5  $\mu$ M.

U73122: inhibidor farmacológico de la PLC. Se preparó una solución madre con una concentración de 20 mM en DMSO. La concentración de uso en los distintos experimentos fue de 5  $\mu$ M.

U0126: inhibidor farmacológico de las quinasas MEK1/2. Se preparó una solución madre con una concentración de 40 mM en DMSO. La concentración de uso en los distintos experimentos fue de 10  $\mu$ M.

LY294002: inhibidor farmacológico de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K). Se preparó una solución madre con una concentración de 25 mM en DMSO. La concentración de uso en los distintos experimentos fue de 10  $\mu$ M.

#### **4. Inmunocitoquímica (ICQ)**

Las células se cultivaron en cubreobjetos de vidrio y el medio de crecimiento fue remplazado por medio sin suero. Después del tratamiento (6-OHDA/FAC o vehículo) durante 24 h, las células se fijaron durante 20 minutos con paraformaldehído al 4 % en PBS. Para realizar la inmunotinción, las células se permeabilizaron y se bloquearon los sitios inespecíficos con SAB al 2 % en PBS y Triton X-100 (0,1 %) durante 45 minutos a temperatura ambiente. Las células se incubaron con el anticuerpo primario apropiado (1:50 en PBS, 2 % de SAB, 0,1 % de Triton X-100; 1 h a temperatura ambiente). Después de tres lavados con PBS, las células

se incubaron con el anticuerpo fluorescente secundario apropiado (1:300; 1 h a temperatura ambiente) y el colorante Hoechst, para tinción nuclear. Luego de lavar con PBS, se montaron los cubreobjetos sobre portaobjetos y se observaron los preparados, utilizando un microscopio Nikon Eclipse E-600. La cuantificación se realizó utilizando la plataforma FIJI (Schneider *et al.* 2012) y se analizaron al menos 100 células para cada condición, de tres cultivos celulares independientes.

### **5. Experimentos de incorporación de la dopamina**

Los experimentos de incorporación de la dopamina se realizaron conforme a lo descrito en Koutsilieri *et al.* (1996), con ligeras modificaciones. Las células sembradas en placas de 24 pocillos se lavaron una vez con PBS y luego se incubaron durante 0, 15, 30, 60, 120 o 180 minutos con 16 nM de [<sup>3</sup>H]dopamina (32,6 Ci/mmol, [<sup>3</sup>H]DA, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) en un buffer compuesto por PBS, 1 mM de CaCl<sub>2</sub> y 1 mM de MgCl<sub>2</sub>. La reacción de incorporación se detuvo al eliminar la solución que contenía la dopamina radiomarcada y enjuagar las células con el buffer de incubación helado. Para liberar la [<sup>3</sup>H]DA, las células se incubaron con 500 µl de etanol al 96 % (v/v) durante 30 minutos a 37 °C. Se añadió una alícuota a 5 ml de líquido de centelleo en viales y se evaluó la radioactividad en un contador de centelleo.

### **6. Ensayo de viabilidad celular**

La viabilidad celular se analizó mediante el ensayo de reducción de MTT. Este método se basa en la capacidad de las mitocondrias metabólicamente activas de reducir las sales de tetrazolio solubles en agua en sales de formazán insolubles. Esta reacción se ve demostrada por la presencia de una coloración azul. Para realizar este ensayo, luego de los tratamientos, las células sembradas en placas de 24 pocillos (8x10<sup>4</sup> células/pocillo) se incubaron durante 2

h con el reactivo de MTT en una concentración final de 0,5 mg/ml, a 37°C y con una atmósfera humidificada al 5 % de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, se retiró el medio y se permitió que los cristales de formazán se disolvieran durante el tiempo que fuera necesario con 200 µl de buffer de solubilización [SDS al 20 % (pH 4,7)]. Después de esto, la coloración se midió espectrofotométricamente a 570 nm (Uranga *et al.* 2013).

## **7. Determinación de los niveles de oxidantes intracelulares**

Se evaluaron los niveles de oxidantes celulares utilizando la sonda DCDHF-DA. Esta sonda es capaz de atravesar la membrana y, después de la oxidación, se convierte en un compuesto fluorescente.

Después de los tratamientos correspondientes, se descartó el medio y se añadió medio DMEM junto con la sonda DCDHF-DA en una concentración final de 10 µM. Después de 30 minutos de incubación a 37°C, se retiró el medio, se lavaron las células con PBS y, posteriormente, se lisaron las muestras en 500 µl de un buffer constituido por PBS y NP-40 al 1 %. La fluorescencia en los lisados ( $\lambda_{ex}=495$  nm,  $\lambda_{em}=530$  nm) se midió en un espectrofluorímetro de microplaca, agregando 150 µl de lisado/pocillo. Los resultados se normalizaron por el contenido de proteínas de cada lisado y se expresaron en unidades arbitrarias (UA).

## **8. Evaluación de la permeabilidad de la membrana plasmática**

La pérdida de la permeabilidad selectiva de la membrana plasmática se evaluó por medición espectrofotométrica de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) liberada al medio de incubación luego del tratamiento experimental correspondiente. Luego de los tratamientos, el medio de incubación se centrifugó a 1000 x g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante resultante se utilizó para determinar la actividad de la LDH, que se midió

espectrofotométricamente usando el kit LDH-P UV AA (Wiener lab.), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se midió la tasa de conversión del dinucleótido de nicotinamida adenina reducido a dinucleótido de nicotinamida adenina oxidado a 340 nm, a diferentes tiempos (0, 30, 90, 150 y 210 segundos). Los resultados se expresaron como UA.

### **9. Ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)**

En una fase posterior a la reacción de peroxidación de los AG, se generan otros productos de peroxidación lipídica, tales como el MDA, 4-hidroxinonanal, entre otros. Esta reacción ocurre en un paso posterior a la formación de dienos y trienos conjugados. En la determinación de peroxidación lipídica por el ensayo de TBARS, se evalúa fundamentalmente la generación de MDA (Adamczyk *et al.* 2006). Se tomaron alícuotas de 0,2 ml de las células levantadas en agua a 4°C, a las cuales se les agregó inmediatamente 0,5 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 30 % (p/v) de manera de frenar el proceso de peroxidación enzimática al desnaturalizar las enzimas presentes en la muestra. Se agitó vigorosamente y, a continuación, se agregó 0,05 ml de HCl 5N y 0,5 ml de ATB al 0,75 % (p/v), luego de lo cual se procedió a agitar nuevamente. Tanto el TCA como el ATB fueron preparados en agua ultrapura y este último se preparó inmediatamente antes de su uso y se lo conservó protegiéndolo de la luz hasta el momento de agregarlo. Los tubos se taparon y fueron llevados a un baño hirviente durante 15 minutos. Finalmente, las muestras se centrifugaron a 1000 x g durante 10 minutos en la centrífuga de mesa Beckman TJ-6 y se leyó la absorbancia de los sobrenadantes a 535 nm en el espectrofotómetro. Los resultados se expresaron como UA de absorbancia a 535 nm por mg de proteína [UA x mg proteína<sup>-1</sup>] o como porcentaje del valor control, según el caso, y se compararon con los valores obtenidos en la condición control.

## 10. Análisis de Western blot (WB)

### 10.1 Extracción de proteínas

Luego del tratamiento experimental correspondiente, las células se lavaron con PBS y se levantaron de la cápsula por raspado en 800  $\mu$ l de PBS. La suspensión celular se recibió en un microtubo. Para aumentar la recuperación celular, se repitió el raspado en 500  $\mu$ l de PBS y se recibió en el mismo microtubo. Luego, se centrifugaron las muestras a 500 x g por 5 min a 4 °C y se descartó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió, de acuerdo al tamaño del pellet obtenido, en un volumen de 80-120  $\mu$ l de buffer RIPA (del inglés, *radioimmunoprecipitation assay buffer*) 1x con inhibidores de proteasas (Tris-HCl 50 mM pH 7,4; Triton X-100 1 % (v/v); NaCl 150 mM; deoxicolato de sodio 0,1 % (p/v); NaF 50 mM;  $\beta$ -glicerofosfato 2 mM; o-vanadato de sodio 0,2 mM; leupeptina 10  $\mu$ g/ml; aprotinina 5  $\mu$ g/ml; pepstatina 1  $\mu$ g/ml; PMSF 0,5 mM; DTT 1 mM) y se incubó en hielo durante 1 h, con agitación cada 10 min. Una vez finalizada esta incubación, se sonicaron las muestras en 3 ciclos de 30 segundos para favorecer la lisis celular. A continuación, el lisado se centrifugó a 14000 x g durante 20 min a 4 °C y se recogió el sobrenadante, el cual se pasó a un nuevo microtubo, se midió su volumen y se tomó una alícuota para la cuantificación de proteínas por el método de Bradford (Bradford 1976). Los lisados celulares se combinaron con buffer Laemmli 4x (Tris-HCl 0,25 M pH 6,8; SDS 8 % (p/v); glicerol 40 % (v/v); 2-mercaptoetanol 20 % (v/v) y azul de bromofenol 0,05 % (v/v)) en una relación 3:1 y se calentaron en bloque seco a 100 °C por 5 min (Laemmli 1970). Las muestras se guardaron en freezer a -20 °C hasta su uso.

### 10.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida

Cantidades equivalentes de proteínas de los distintos lisados (30-50  $\mu\text{g}$ ) se sembraron y separaron en geles de poliacrilamida de 10 y 12,5 % con SDS (SDS-PAGE) (Laemmli 1970) junto con marcadores de peso molecular. La corrida electroforética se realizó a voltaje constante (70 V) y amperaje variable (verificando que este último no sobrepasara los 20 mA) durante aproximadamente 1 h, hasta que el indicador del frente de corrida llegó hasta el límite inferior del gel. Como buffer de corrida se empleó: Tris 25 mM pH 8,8; glicina 192 mM; SDS 0,1 % (p/v).

### ***10.3 Transferencia de las proteínas a membranas de PVDF***

Las proteínas separadas electroforéticamente se transfirieron a una membrana de PVDF previamente activada con metanol. La transferencia se realizó en una cámara de transferencia durante 45 min a voltaje constante (70 V) y amperaje variable ( $\approx 350$  mA) utilizando como buffer de transferencia: Tris 25 mM pH 8,3; glicina 192 mM.

### ***10.4 Bloqueo de las membranas y tratamiento con anticuerpos***

Las membranas de PVDF con las proteínas previamente transferidas se incubaron por 1 h a temperatura ambiente en leche descremada al 5 % (p/v) en TBS-T (Tris-HCl 20 mM pH 7,4; NaCl 150 mM; Tween 20 0,1 % (p/v)) para bloquear sitios de unión inespecífica; se lavaron 3 veces en TBS-T por 5 min y se incubaron, posteriormente, con los respectivos anticuerpos primarios por 2 h a temperatura ambiente y, luego de 3 lavados con TBS-T, con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasas por 1 h a temperatura ambiente. Todos los anticuerpos fueron preparados en SAB al 2 % (p/v) en TBS-T.

Los anticuerpos primarios utilizados en esta tesis y sus diluciones se detallan a continuación:

- Policlonal de conejo anti-p65 (catálogo sc-109), dilución 1:500
- Policlonal de conejo anti-p-Akt (catálogo sc-7985), dilución 1:500

- Monoclonal de ratón anti-p-I $\kappa$ B $\alpha$  (catálogo cs-9246S), dilución 1:500
- Monoclonal de ratón anti-p-ERK1/2 (catálogo sc-7383), dilución 1:500
- Monoclonal de ratón anti- $\beta$ -actina (catálogo sc-477778), dilución 1:500
- Monoclonal de ratón anti- $\alpha$ -tubulina (catálogo MilliporeSigma-CP06), dilución 1:500
- Monoclonal de ratón anti-hnRNP (catálogo sc-32301), dilución 1:500

Los anticuerpos secundarios utilizados en esta tesis y sus diluciones se detallan a continuación:

- Policlonal de cabra anti-conejo acoplado a HRP, (catálogo sc-2357), dilución 1:1000
- Policlonal de cabra anti-ratón acoplado a HRP, (catálogo sc-2005), dilución 1:1000

### ***10.5 Detección de inmunorreactividad***

Luego de la incubación con el anticuerpo secundario, se procedió a lavar las membranas 3 veces por 5 min con TBS-T y se revelaron las bandas inmunorreactivas en cuarto oscuro con un kit comercial de quimioluminiscencia, exponiéndolas después a placas autorradiográficas para visualizar las bandas de las proteínas de interés. La cuantificación se realizó con el programa ImageJ (Schindelin *et al.* 2012; Schneider *et al.* 2012).

## **11. Fraccionamiento subcelular**

Se aislaron las fracciones nuclear y citoplasmática de acuerdo a protocolos previos (Dignani *et al.* 1983; Osborn *et al.* 1989). Luego de los tratamientos correspondientes, se descartó el medio extracelular, se lavaron las células con PBS 1x, se rasparon y levantaron pasándolas a microtubos. Luego de una centrifugación a 800 x g por 10 min, el pellet se resuspendió en



80-100  $\mu$ l de buffer A (HEPES 20 mM pH 7,9;  $MgCl_2$  1,5 mM; KCl 10 mM; DTT 0,5 mM; NP-40 0,1 %; leupeptina 2  $\mu$ g/ $\mu$ l; aprotinina 1  $\mu$ g/ $\mu$ l; pepstatina 1  $\mu$ g/ $\mu$ l) y se incubó a 4 °C por 10 min, se centrifugó a continuación a 12000 x g por 2 min reservándose el sobrenadante como fracción citosólica (FC). El pellet resultante se resuspendió luego en 40-50  $\mu$ l de buffer B (HEPES 10 mM pH 7,9;  $MgCl_2$  1,5 mM; NaCl 420 mM; DTT 0,5 mM; EDTA 0,2 mM; glicerol 25 %; PMSF 0,5 mM; leupeptina 2  $\mu$ g/ $\mu$ l; aprotinina 1  $\mu$ g/ $\mu$ l; pepstatina 1  $\mu$ g/ $\mu$ l), se incubó a 4 °C por 20 min y se centrifugó a 10000 x g por 15 min, reservándose el sobrenadante como fracción nuclear (FN). Se separaron alícuotas de cada fracción y se determinó su concentración proteica por el método de Bradford (Bradford 1976). Las muestras fueron conservadas a -20 °C hasta su posterior uso para análisis por WB.

## **12. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford**

La cuantificación de proteínas para la siembra de cantidades iguales en la técnica de WB para normalizar resultados se realizó por el método de Bradford (Bradford 1976), el cual se basa en el cambio de la absorbancia del colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 al unirse a proteínas. Los lisados de proteínas fueron mezclados con el reactivo de Bradford a temperatura ambiente y luego de 5 min de reacción se midió la absorbancia a 595 nm en espectrofotómetro. Los resultados se corrigieron con un blanco y se realizó una curva de calibrado con estándares de SAB para la obtención de las concentraciones de las muestras.

## **13. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)**

Se aisló el ARN total de las células de interés con el reactivo TRIzol de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Luego, el ARN aislado fue resuspendido en agua libre de nucleasas y su concentración y pureza medidas por la relación A260:A280 en un

espectrofotómetro PicoDrop. El ARN aislado fue reservado a una temperatura de -80 °C hasta su uso.

Se realizó, a continuación, la reacción de transcripción reversa. Para esto, se utilizaron alícuotas de 2 µg de ARN total para sintetizar el ADNc correspondiente, incubándose con 1 µl de Random Primer hexamers, 1x de buffer de reacción de transcriptasa reversa M-MLV, 0,5 mM de cada desoxirribonucleótido trifosfato (dNTP), 25 UI de inhibidor de RNasas y 200 UI de transcriptasa reversa M-MLV, llevándose a un volumen final de 25 µl con agua libre de RNasas (Campos *et al.* 2015). El ADNc obtenido se conservó a -20 °C hasta su uso. Se procedió, luego, a realizar la amplificación del ADNc resultante por PCR cuantitativa en tiempo real. La qRT-PCR se realizó en un volumen final de 15 µl. Para ello se utilizó un Real Mix para Real-Time PCR y 0,4 µM de cada primer. Todos los pares de primers fueron comprados en Life Technologies y las secuencias fueron: para COX-2 forward CGCCTCCTTCAGCTCCACA y reverse CAGCAAGGATTTGCTGTATGGCT, para RP4 forward TGCTCTTCTTCAGCCTGTCC y reverse AGACTGCAAAGAGCGTGAGG, para 15-prostaglandina deshidrogenasa (15-PGDH) forward CATAGGCAGAGCCTTTGCAG y reverse TCATCCAGGGCAGCTTTACA, y para RiboL32 forward TGGAAGTGCTGCTGATGTGC y reverse CACGATGGCTTTGCGGTTCT. Las condiciones de la PCR utilizadas fueron: 50 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 20 segundos, apareamiento y extensión a 58 °C por 30 segundos y un paso de extensión final a 72 °C por 30 segundos. Al finalizar la reacción se obtuvieron valores de Ct (del inglés *threshold cycle*) para cada condición; estos valores obtenidos de 3 experimentos distintos fueron normalizados utilizando el método  $2^{-\Delta Ct}$  respecto del gen de referencia que fue RiboL32. Al final de la fase de amplificación, se realizó un análisis de la curva de *melting* y una electroforesis en gel de agarosa para confirmar el tamaño del producto. El nivel relativo

de COX-2, RP4 y PGDH se expresó como el cambio relativo en la expresión génica (Livak y Schmittgen 2001).

#### **14. Ensayo de actividad de la PLD**

El premarcado de los lípidos celulares se realizó en un medio sin suero suplementado con [<sup>3</sup>H]AO (0,5 µCi/placa), AO (1,5 µM) y SAB sin lípidos (4 moles de AO/mol de SAB) durante 24 h a 37°C. Luego, se descartó el medio y las células se incubaron con 6-OHDA durante 24 h. Luego, las células se incubaron con medio libre de suero (que contenía etanol (2 % vol/vol)) durante 3h. La reacción se detuvo descartando el medio y las células se lavaron 3 veces con PBS y se rasparon con 800 µl de PBS. Los lípidos se extrajeron mediante el método de Folch (Folch *et al.* 1957). El fosfatidiletanol (PEth), que se tomó como referencia para la producción de PA a partir de la actividad de la PLD, se separó del extracto lipídico mediante cromatografía en capa fina monodimensional sobre silicagel H y se desarrolló en cloroformo/metanol/acetona/ácido acético/agua (50:15:15:10:5, vol/vol) hasta aproximadamente el 70 % de la placa (Conde *et al.* 2018). La visualización del PEth en los cromatogramas se realizó después de haber expuesto las placas a vapores de yodo. Las manchas visualizadas en las placas se rasparon y se transfirieron a viales. Por último, se añadieron 0,2 ml de agua y 5 ml de Omnifluor al 4 % en tolueno/Triton X-100 (4:1, vol/vol) y se midió la radiactividad de PEth en un contador de centelleo líquido.

#### **15. Cuantificación de fósforo**

El contenido de fósforo en el extracto lipídico se determinó por el método de Rouser *et al.* (Rouser *et al.* 1970) de la siguiente manera: las alícuotas del extracto lipídico reservadas anteriormente se colocaron en tubos de vidrio para la digestión de la materia orgánica; a cada tubo se le agregaron 260 µl de ácido perclórico y se permitió la digestión en bloque seco a

180 °C por 1 h. En simultáneo, se realizaron un blanco de reactivos y una curva de calibrado utilizando un estándar de fósforo (8 µg/ml). Luego de la digestión, se agregaron a los tubos 920 µl de agua tridestilada, 400 µl de molibdato de amonio 1,25 % (p/v) y 400 µl de ácido ascórbico 5 % (p/v) agitando luego de cada adición. El desarrollo del color se observó luego de incubar en baño de agua hirviente por 5 min. La lectura de la absorbancia se realizó en un espectrofotómetro a 800 nm.

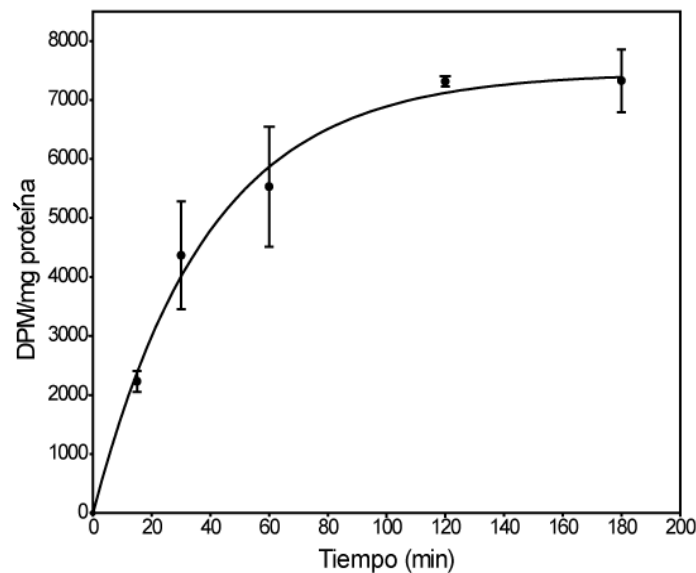
## **16. Análisis estadístico**

Los datos presentados representan la media  $\pm$  desvío estándar de las muestras (SD) de, por lo menos, 3 experimentos independientes. Las pruebas estadísticas utilizadas fueron ANOVA de una vía acompañado de la prueba de Bonferroni y el test t de Student. Los valores de p menores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos y se utilizó \*, \*\* o \*\*\* para representar  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  y  $p < 0,001$ , respectivamente. Los diferentes valores obtenidos para 6-OHDA/FAC y los diferentes inhibidores de drogas se analizaron con un ANOVA de dos vías (6-OHDA/FAC x drogas).

## RESULTADOS-CAPÍTULO I

### 1. Caracterización del daño inducido por 6-OHDA en neuronas IMR-32

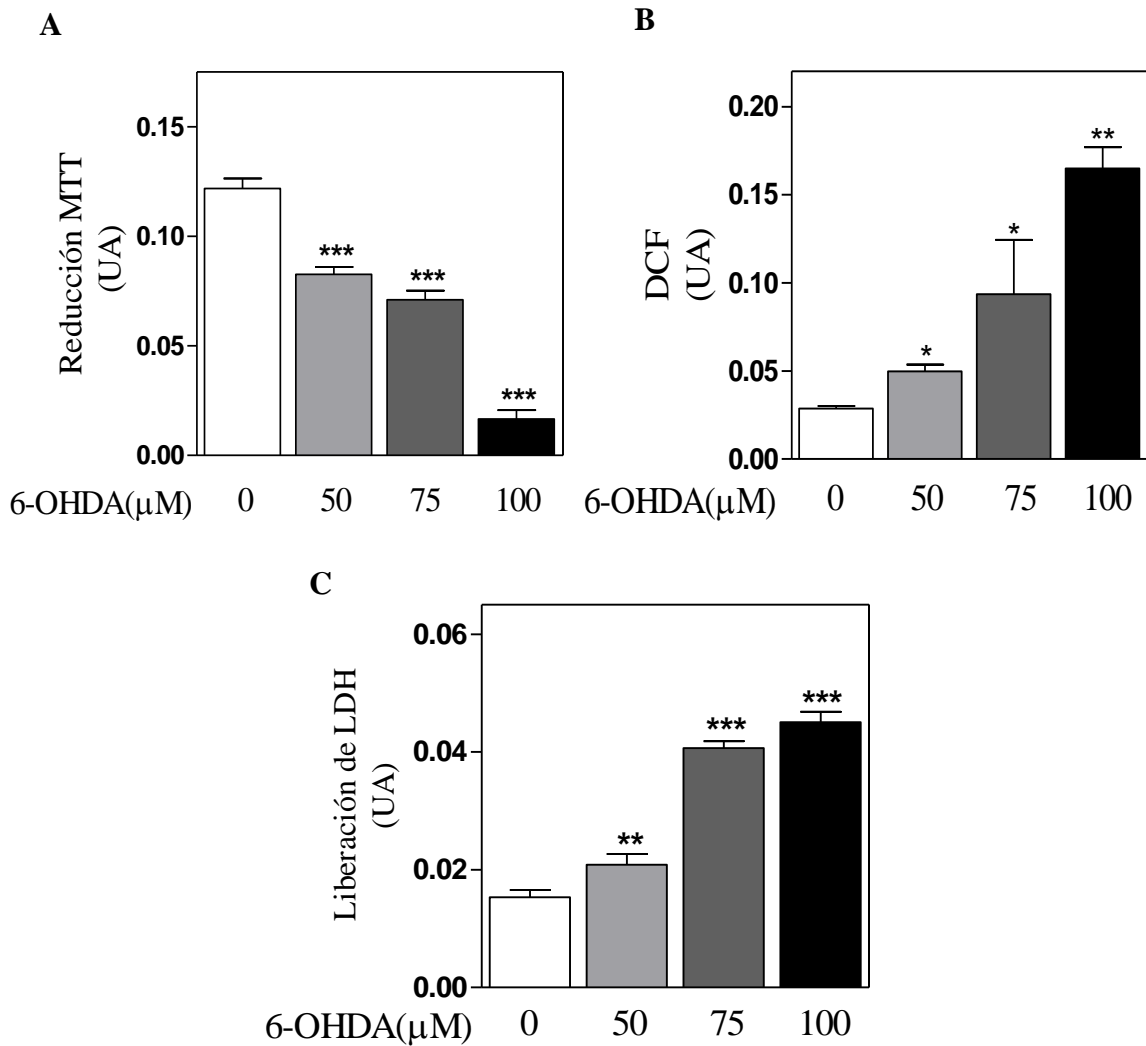
La toxicidad inducida por la 6-OHDA desencadena alteraciones relacionadas con la disfunción mitocondrial acompañada de un aumento en las EROs, lo que conduce a una pérdida de la homeostasis neuronal. Como la 6-OHDA es un tóxico mayormente utilizado en modelos *in vivo* en roedores, poco se ha estudiado su efecto en cultivos celulares y si las respuestas celulares reflejan ciertos eventos de toxicidad observados en animales. En primer lugar, para validar el modelo de toxicidad neuronal en cultivo, se evaluó la cinética de la captación de dopamina, utilizando [<sup>3</sup>H]DA, lo que demuestra que las células IMR-32 poseen la maquinaria necesaria para la incorporación de 6-OHDA (**Figura 13**).



**Figura 13. Medición de la incorporación de DA en neuronas IMR-32 a través de transportadores DAT en función del tiempo.** La incorporación de dopamina radiomarcada se determinó en función del tiempo. Se midió la radiactividad incorporada.

Una vez establecido que las células de neuroblastoma humano IMR-32 son capaces de captar dopamina, lo cual evidencia la existencia de transportadores funcionales para el

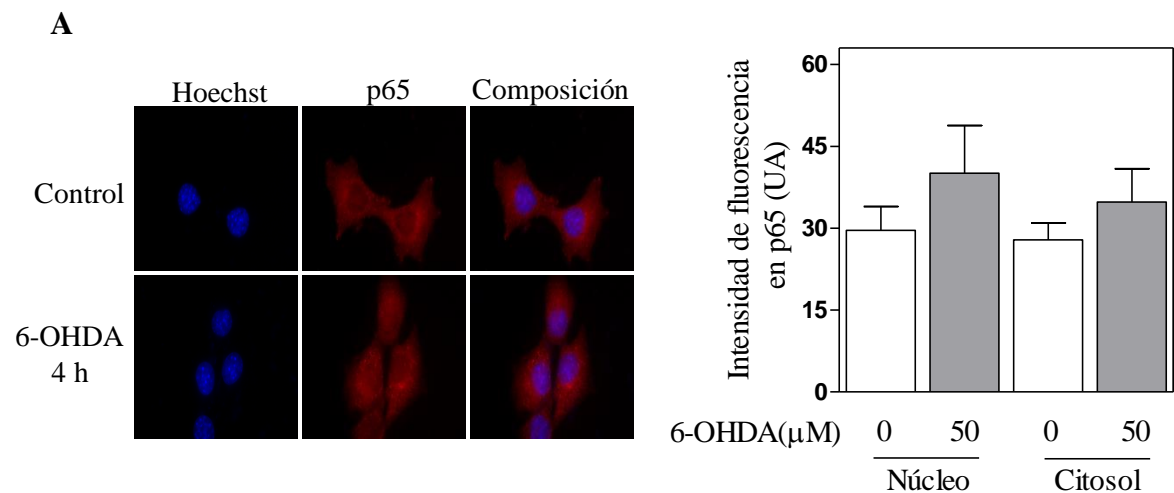
neurotransmisor, se procedió a la caracterización de la lesión neuronal provocada por 6-OHDA. Para ello, evaluamos la función mitocondrial como una medida de la viabilidad celular a través del ensayo de MTT. Las células IMR-32 fueron expuestas a diferentes concentraciones de 6-OHDA (0-100  $\mu\text{M}$ ), y luego se evaluó la funcionalidad mitocondrial tras agregar MTT luego de 24 h de incubación. Como se muestra en la **Figura 14A**, la funcionalidad mitocondrial disminuyó en función de la concentración de 6-OHDA. La concentración más baja utilizada, 50  $\mu\text{M}$ , disminuyó la viabilidad celular en un 38 % con respecto a los controles, mientras que a 100  $\mu\text{M}$  la pérdida de viabilidad celular fue de un 88 % con respecto a los controles. Las células IMR-32 tratadas con concentraciones crecientes de 6-OHDA mostraron un aumento en los niveles de EROs (80 %, 230 % y 489 %, respectivamente) con respecto a los controles (**Figura 14B**). El incremento en el contenido celular de EROs estuvo acompañado por una pérdida de integridad de la membrana plasmática, que fue medida como la liberación de LDH. El daño de la membrana plasmática se correspondió con la concentración del neurotóxico (**Figura 14C**). Estos resultados nos permiten concluir que la exposición *in vitro* a 50  $\mu\text{M}$  de 6-OHDA en las células de neuroblastoma humano induce una lesión oxidativa leve. Teniendo en cuenta estos resultados, se seleccionó la concentración de 50  $\mu\text{M}$  de 6-OHDA para los experimentos que se discutirán a continuación.



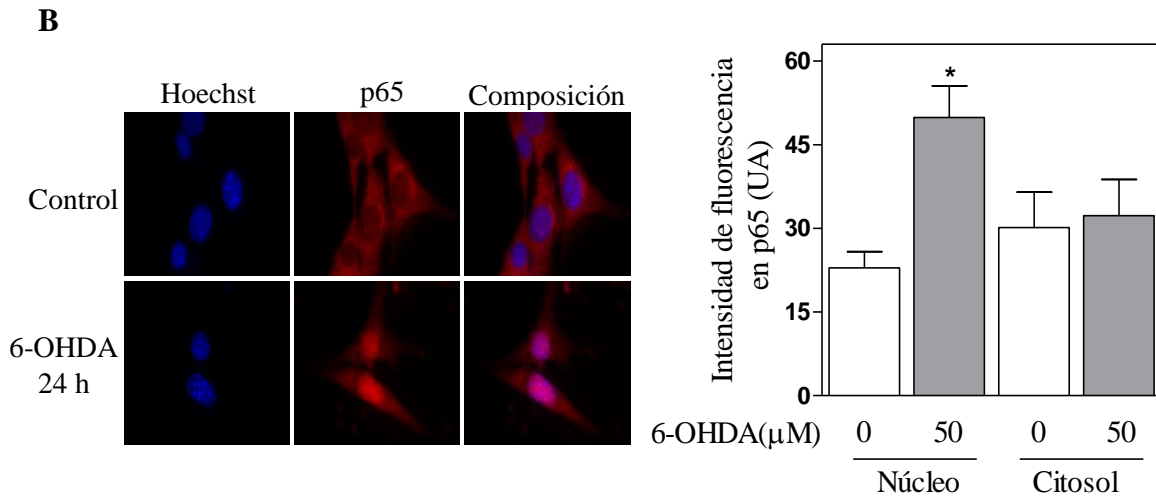
**Figura 14. Caracterización del estado de EO en células IMR-32 expuestas a 6-OHDA.** (A) Ensayo de reducción de MTT. Las células fueron tratadas con 6-OHDA (0-100  $\mu\text{M}$ ) o su vehículo durante 24 h y se evaluó la viabilidad celular. (B) Determinación de los niveles de oxidantes celulares. Las células fueron tratadas con 6-OHDA (0-100  $\mu\text{M}$ ) durante 24 h. Luego, las células se incubaron en presencia de DCDHF-DA 10  $\mu\text{M}$ , y los niveles de oxidantes celulares se cuantificaron por espectrofluorimetría. (C) Liberación de LDH. Las células fueron expuestas a 6-OHDA (0-100  $\mu\text{M}$ ) durante 24 h y se evaluó la liberación de LDH. El ANOVA a una vía seguido del post-test de Bonferroni reveló diferencias significativas. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

## 2. Respuesta de NF- $\kappa$ B a la toxicidad inducida por 6-OHDA *in vitro*

Como se demostró anteriormente por nuestro laboratorio y por otros, el EO puede modular diferentes vías de transducción de señales que finalmente impactan en la actividad de diversos factores de transcripción sensibles al estado redox de la célula (Belfield *et al.* 2014; Paul *et al.* 2018; Rodríguez Diez *et al.* 2013; Gabriela A. Salvador y Oteiza 2011; Uranga *et al.* 2013, 2017). A continuación, caracterizamos la implicancia de NF- $\kappa$ B en la respuesta neuronal a 6-OHDA. La primera respuesta evaluada fue la localización subcelular de este factor de transcripción, dado que su localización nuclear es un prerequisite para establecer su implicancia en la respuesta al EO. No observamos cambios significativos en la localización subcelular de la subunidad p65 de NF- $\kappa$ B después de 4 h de exposición a 6-OHDA (**Figura 15A**). Sin embargo, después de 24 h de exposición a 6-OHDA, detectamos un aumento de la localización nuclear de la subunidad p65 en comparación con los controles (aumento del 120 %) (**Figura 15B**).

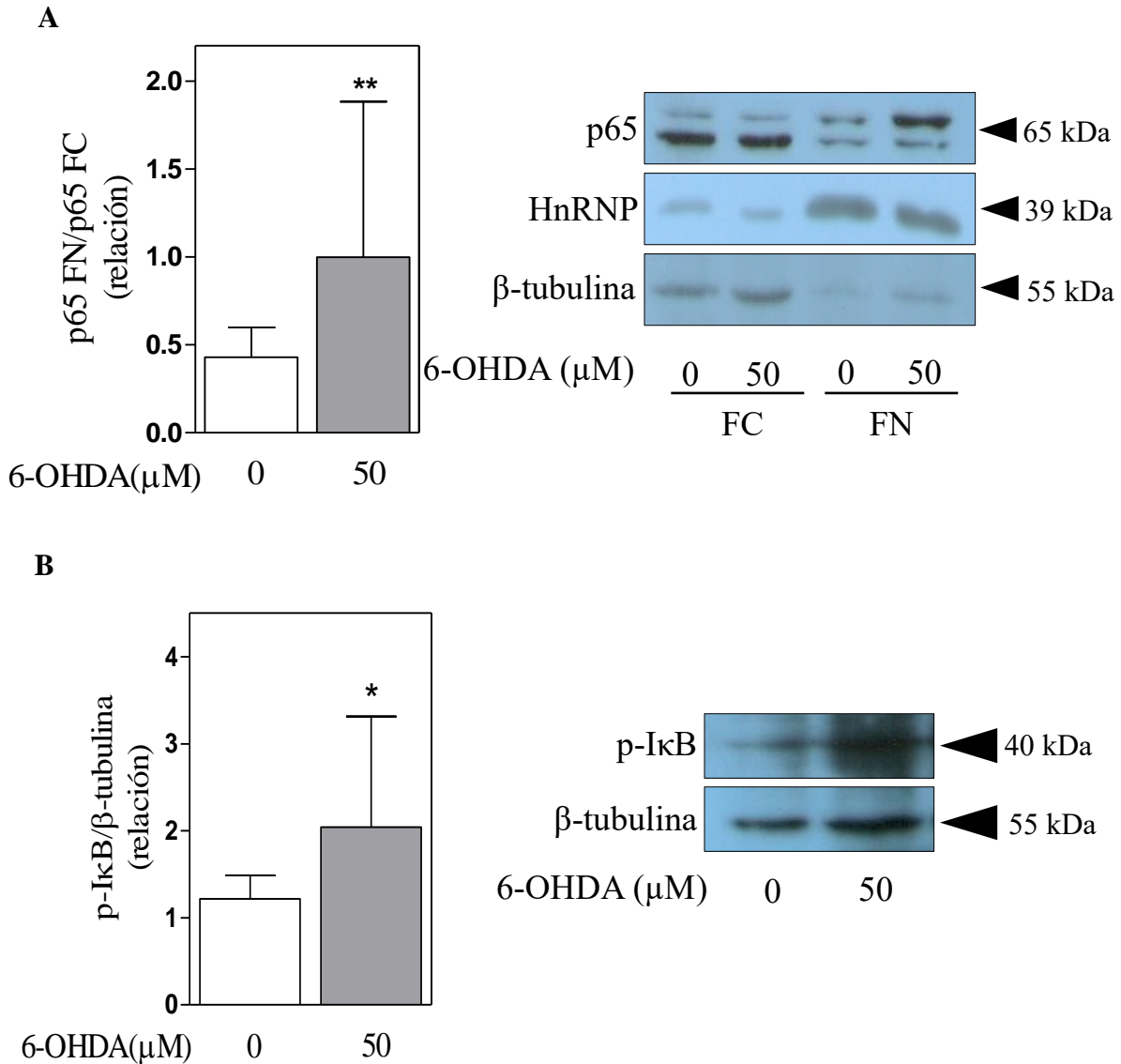






**Figura 15. Localización subcelular de la subunidad p65 de NF-κB.** Las células crecidas sobre cubreobjetos fueron expuestas a 6-OHDA 50 μM o su vehículo durante 4 (A) y 24 h (B), y se procesaron para inmunocitoquímica usando anticuerpos contra la subunidad p65 de NF-κB (rojo). El Hoechst se utilizó como marcador nuclear en todas las imágenes. El ANOVA a una vía seguido del post-test de Bonferroni reveló diferencias significativas. \* p<0,05.

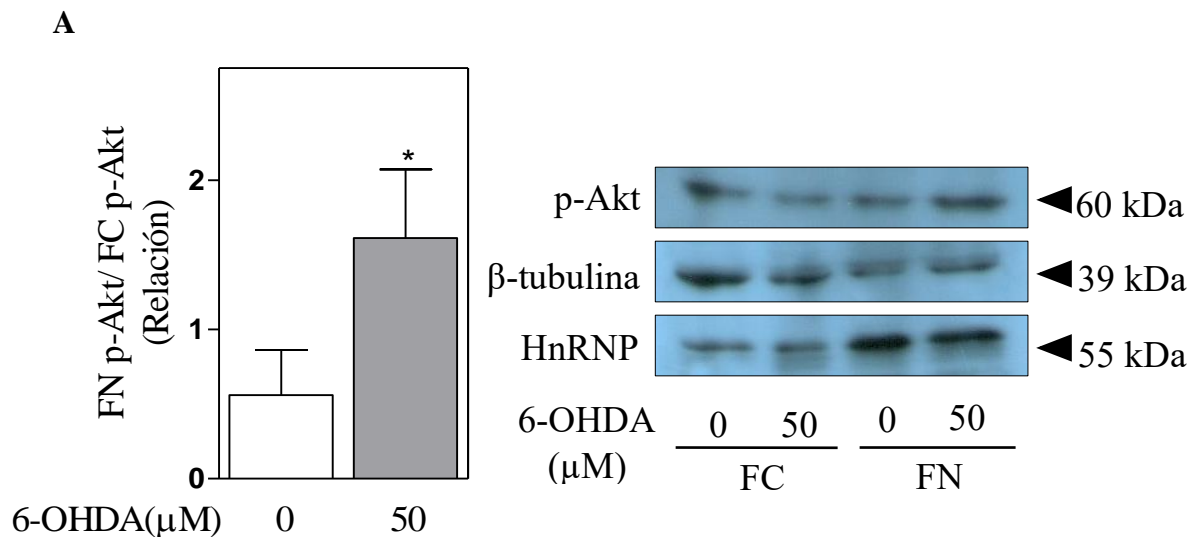
La localización nuclear de p65 inducida por 6-OHDA también se confirmó por fraccionamiento subcelular seguido de WB (**Figura 16A**). La fosforilación de IκB, un inhibidor de NF-κB, que es un requisito previo para la translocación nuclear de NF-κB, también se observó cuando las células se expusieron a 6-OHDA (**Figura 16B**). Nuestros resultados demuestran que la exposición *in vitro* de células de neuroblastoma a 6-OHDA genera injuria oxidativa leve que desencadena la localización nuclear de NF-κB.

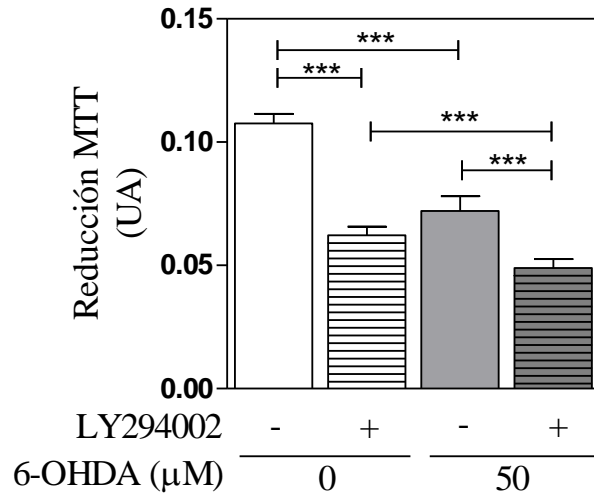


**Figura 16. Localización subcelular de la subunidad p65 de NF-κB y su relación con la fosforilación de IκB.** (A) Las fracciones subcelulares obtenidas de células expuestas a 6-OHDA 50 μM se analizaron mediante WB usando anticuerpos contra p65. HnRNP se utilizó como marcador nuclear. Se utilizó β-tubulina como control de carga. (B) Niveles de fosforilación de IκB en el control y las células tratadas con 6-OHDA 50 μM. Se utilizó β-tubulina como control de carga. El test t de Student reveló diferencias significativas. \* p<0,05; \*\* p<0,01.

El signalosoma canónico implicado en la activación de NF-κB incluye, no solo diferentes quinasas de IκB, sino también las proteínas MAPK y la vía PI3K/Akt (Kochumon *et al.*

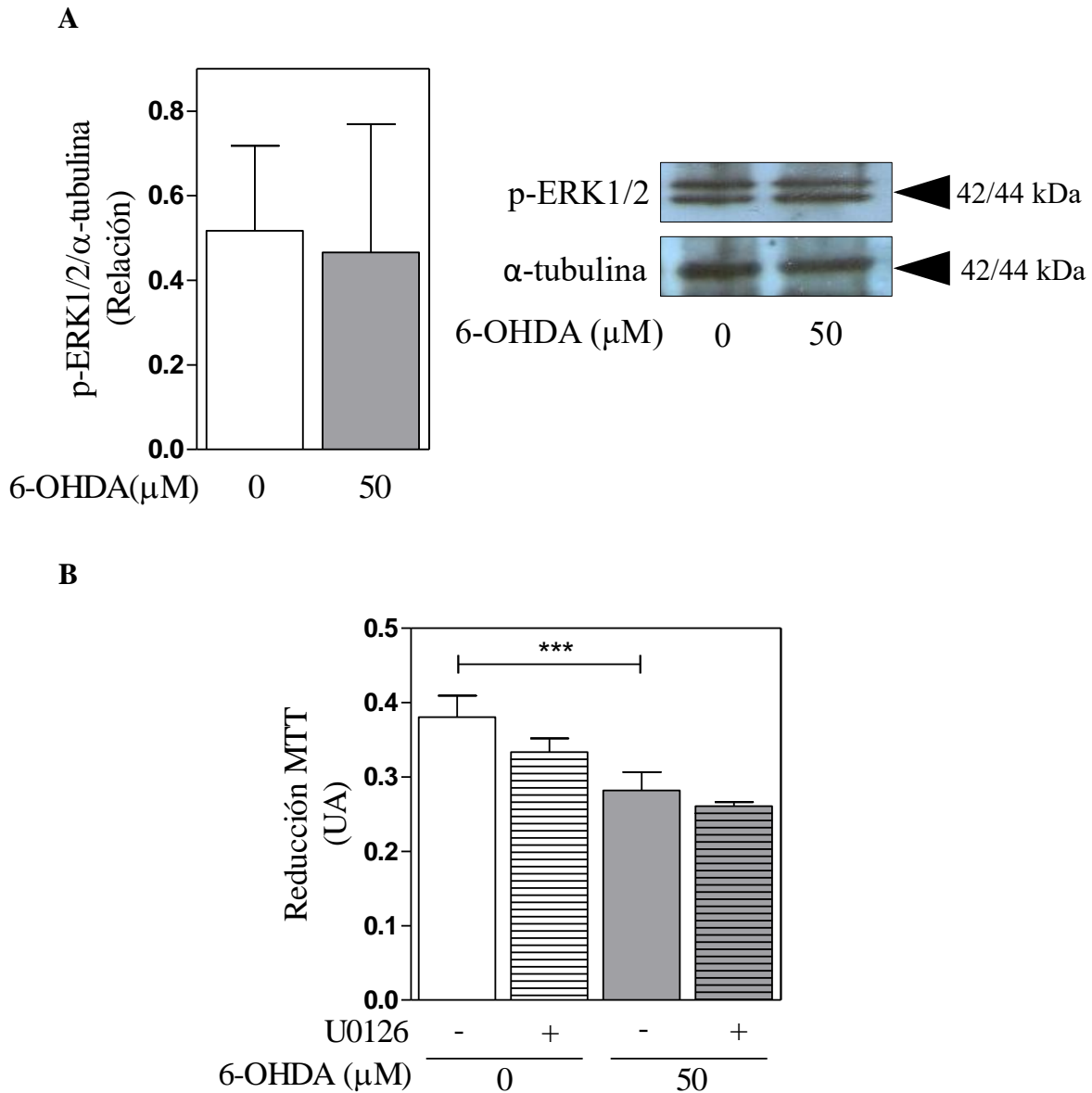
2018). Por ello, lo primero que se realizó fue estudiar la relación de la 6-OHDA con la forma fosforilada de Akt, la cual bajo esta modificación post-traducciona es capaz de translocar a compartimentos internos como el núcleo y el citosol. Akt es fosforilada secuencialmente por la quinasa dependiente de fosfoinositol-1 (PDK-1) en el residuo de treonina ubicado en la posición 308 y por el complejo rictor-mTOR en la serina ubicada en la posición 473 (Manning y Toker 2017). La exposición a 6-OHDA provocó un aumento de la forma fosforilada de Akt en la fracción nuclear en relación a la condición control (**Figura 17A**), indicando que el EO inducido por la 6-OHDA activa esta quinasa. A su vez, la inhibición de PI3K, responsable del reclutamiento inicial de Akt a la membrana celular para su activación, produjo una disminución de mayor magnitud en la viabilidad mitocondrial en presencia de 6-OHDA que cuando se agregaba únicamente la neurotoxina (**Figura 17B**).



**B**

**Figura 17. Localización subcelular de p-Akt y efecto de la inhibición farmacológica de PI3K sobre la viabilidad celular.** (A) Las fracciones subcelulares obtenidas de células expuestas a 6-OHDA 50 μM se analizaron mediante WB usando anticuerpos contra p-Akt. HnRNP se utilizó como marcador nuclear. Se utilizó β-tubulina como control de carga. El test t de Student reveló diferencias significativas (B) Ensayo de reducción de MTT tras la exposición al inhibidor de PI3K junto con la 6-OHDA. El test de ANOVA doble (6-OHDA x LY294002) detectó una interacción significativa. \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001.

Con estos resultados a la vista, quisimos evaluar si ocurría algo semejante con las quinasas ERK1/2, pertenecientes a la familia MAPK, que también median respuestas de proliferación y supervivencia junto con la vía PI3K/Akt. No obstante, la fosforilación de estas quinasas, no mostró cambios significativos tras la exposición a 6-OHDA en relación al control (**Figura 18A**). A su vez cuando se realizaron ensayos de viabilidad por MTT en presencia del inhibidor de las quinasas MEK1/2, corriente arriba de ERK1/2, no se encontraron cambios significativos en los valores de funcionalidad mitocondrial (**Figura 18B**).



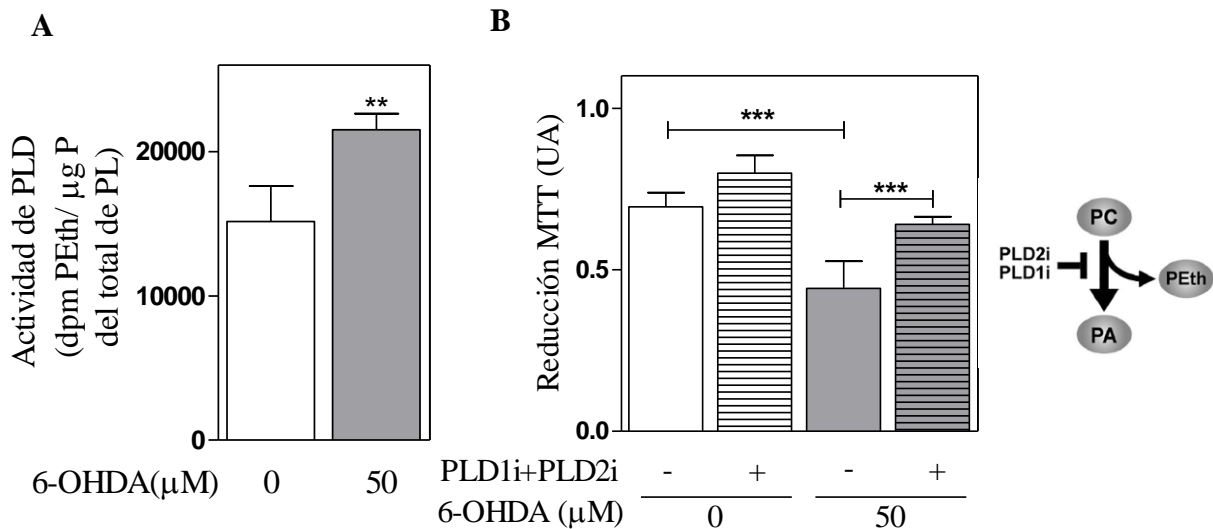
**Figura 18. Evaluación de la fosforilación de ERK1/2 y efecto de su inhibición farmacológica sobre la viabilidad celular. (A)** Niveles de fosforilación de ERK1/2 en el control y en células tratadas con 6-OHDA 50 μM. Se utilizó α-tubulina como control de carga. El test t de Student no reveló diferencias significativas. **(B)** Ensayo de reducción de MTT tras la exposición al inhibidor U0126. El test de ANOVA doble (6-OHDA x U0126) no detectó una interacción significativa. \*\*\* p<0,001.

### 3. Señalización lipídica en células de neuroblastoma con 6-OHDA

Además de las vías canónicas exhaustivamente descritas que regulan la actividad de NF- $\kappa$ B, en el laboratorio hemos demostrado previamente que diferentes mediadores de la respuesta inflamatoria, cuya expresión depende de este factor de transcripción, pueden ser modulados por mensajeros lipídicos (Mateos *et al.* 2014; Rodríguez Diez *et al.* 2013). Es por ello que en el contexto de citotoxicidad inducida por 6-OHDA investigamos si la señalización mediada por lípidos constituía un mecanismo de respuesta y si a su vez estaba involucrada en la modulación de NF- $\kappa$ B y, en consecuencia, en el destino neuronal. Para este propósito, marcamos previamente los cultivos neuronales con [ $^3$ H]AO y, después de la exposición a 6-OHDA, medimos la producción de mensajeros lipídicos generados por la hidrólisis de fosfolípidos a través de las actividades de diversas fosfolipasas. Dichas enzimas generan mensajeros que son característicos, los que, participan en diversas respuestas celulares tales como supervivencia, proliferación, tráfico de vesículas, apoptosis, etc. La PLD es responsable de producir PA a partir de la PC, la PLA2 libera distintos AG según la isoforma que participe, y la PLC es la encargada de generar DAG e inositol trifosfato (IP $_3$ ).

El PA es un lípido bioactivo que participa no solo en la síntesis *de novo* de los lípidos por la vía de Kennedy sino también en los eventos de señalización cuando es producido por la hidrólisis de la PC catalizada por las PLD clásicas 1 y 2 (Raben y Barber 2017). Las PLC convierten el PIP $_2$  en DAG e IP $_3$  (Cocco *et al.* 2015; D. Kim *et al.* 1997; Sakai *et al.* 2010; Trexler y Taraska 2017). Las PLA2 constituyen una gran familia de hidrolasas de fosfolípidos que liberan el AG en la posición sn-2 del esqueleto de glicerofosfolípido (Aizawa *et al.* 2016; Robichaud y Surette 2015).

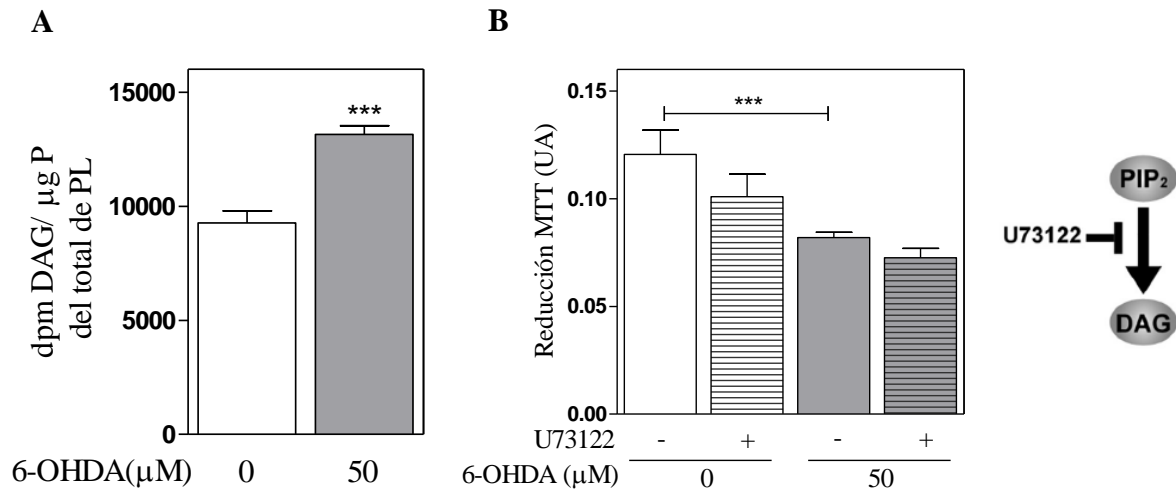
Para evaluar la participación de la vía de la PLD en la respuesta neuronal a 6-OHDA, utilizamos el ensayo de transfosfatidilación, que es una característica exclusiva de la actividad de las PLD clásicas 1 y 2 (G. A. Salvador y Giusto 1998). La reacción de transfosfatidilación se produce en presencia de alcoholes primarios que remplazan al H<sub>2</sub>O en el ataque nucleofílico en la descomposición de los fosfolípidos y produce fosfatidilalcoholes en lugar de PA. Para este ensayo, se incubaron células premarcadas con [<sup>3</sup>H]AO en presencia de etanol, como alcohol primario, y la producción de PEth se midió como un marcador de la producción de PA por PLD. Las células IMR-32 expuestas a 6-OHDA mostraron niveles aumentados de PEth (incremento del 40 % con respecto a los controles), lo que sugiere que este mensajero lipídico es producido por la vía de la PLD en respuesta al neurotóxico (**Figura 19A**). Para determinar el papel del PA producido por la PLD en el destino neuronal, evaluamos la viabilidad celular en presencia de inhibidores farmacológicos de la PLD1 y la PLD2. La inhibición farmacológica de ambas isoformas (inhibidor de PLD1 e inhibidor de PLD2) fue capaz de prevenir la disminución inducida por la 6-OHDA en la viabilidad celular, demostrando así que el PA participa en la promoción del daño neuronal desencadenado por la 6-OHDA (**Figura 19B**).



**Figura 19. Medición de la actividad de PLD y ensayo de viabilidad mitocondrial en presencia de inhibidores farmacológicos de isoformas clásicas de PLD en células tratadas con 6-OHDA.** (A) Las células se trataron con 6-OHDA 50  $\mu$ M o su vehículo durante 24 h y se determinaron los niveles de generación de PEth. El test t de Student reveló diferencias significativas. (B) Ensayo de reducción de MTT tras la exposición a los inhibidores de la PLD1 y PLD2. El test de ANOVA doble (6-OHDA x PLD1i-PLD2i) detectó una interacción significativa. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

La exposición a 6-OHDA también pudo desencadenar un incremento en los niveles de DAG en las células de neuroblastoma (**Figura 20A**). Bajo las mismas condiciones de ensayo (es decir en la presencia de etanol) la producción de DAG puede ser generada por la activación de la PLC. Sin embargo, los ensayos de viabilidad en presencia del inhibidor de PLC, U73122, no afectaron la viabilidad celular en presencia de 6-OHDA (**Figura 20B**).

Otra posibilidad de producción de PA es a través de la fosforilación del DAG catalizada por la enzima DAGK. Para evaluar la participación de DAGK en la respuesta neuronal a 6-OHDA, utilizamos R59022 como inhibidor de la fosforilación del DAG. La inhibición de la

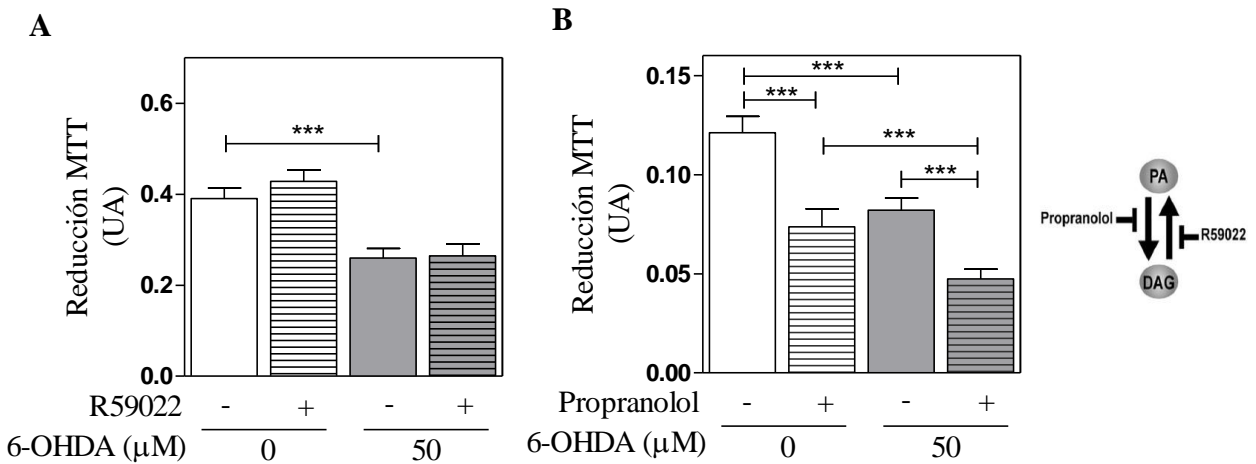


**Figura 20. Medición de la producción de DAG y ensayo de viabilidad mitocondrial en presencia del inhibidor farmacológico de la enzima PLC en células tratadas con 6-OHDA.** (A) Las células fueron tratadas con 6-OHDA 50  $\mu$ M o su vehículo durante 24 h y se determinaron los niveles de producción de DAG. El test t de Student reveló diferencias significativas. (B) Ensayo de reducción de MTT al inhibir la PLC. Las



células se trataron con 6-OHDA 50  $\mu\text{M}$  (o su vehículo) en presencia de U73122 (o su vehículo) durante 24 h y se evaluó la viabilidad celular. El test de ANOVA doble (6-OHDA x U73122) no detectó una interacción significativa. \*\*\*  $p < 0,001$ .

DAGK no produjo cambios en el efecto de la 6-OHDA sobre la viabilidad celular (**Figura 21A**). El PA producido por la PLD puede hidrolizarse por acción de la PAP a DAG. El uso de DL-propranolol, que bloquea la actividad de la PAP, constituye una herramienta farmacológica para aumentar los niveles de PA. Bajo condiciones experimentales control, el DL-propranolol disminuyó la viabilidad celular, lo que demuestra que el desequilibrio en los niveles de PA desencadenado por la inhibición de la hidrólisis de PA puede promover el daño celular. Además, las células de neuroblastoma expuestas a 6-OHDA y coincubadas con DL-propranolol mostraron una muerte celular aún mayor (**Figura 21B**). Estos resultados corroboran que el PA producido por las PLD estaría involucrado en la promoción del daño neuronal cuando las células están expuestas a 6-OHDA.

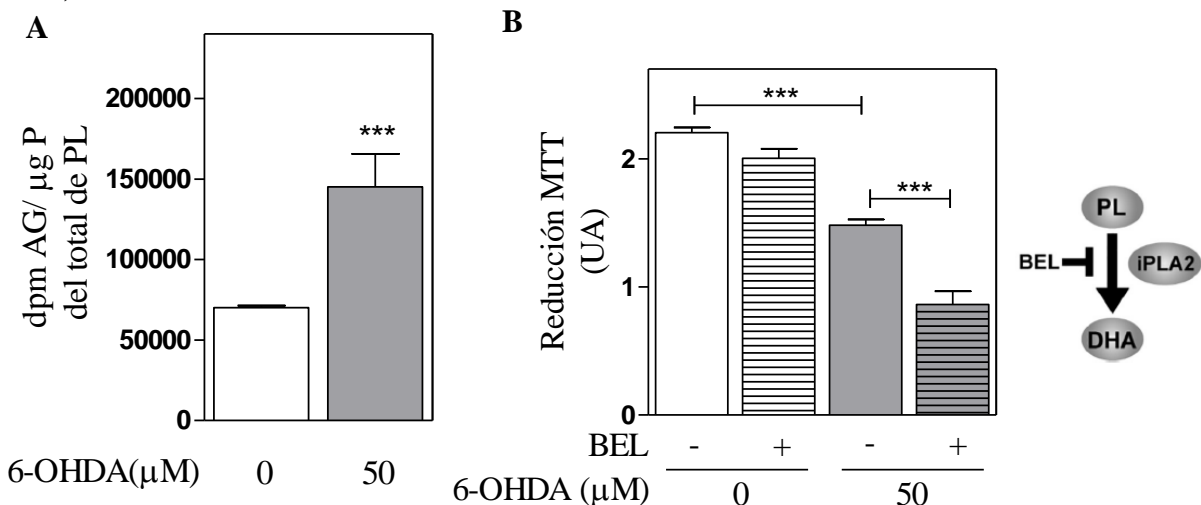


**Figura 21. Efecto de la fosforilación de DAG y la desfosforilación de PA en la viabilidad celular. (A)** Ensayo de reducción de MTT luego de la inhibición de la DAGK. Las células se trataron con 50  $\mu\text{M}$  de 6-OHDA (o su vehículo) en presencia de R59022 (o su vehículo) durante 24 h y se evaluó la viabilidad celular. El test de ANOVA doble (6-OHDA x R59022) no detectó una interacción significativa. **(B)** Ensayo de reducción de MTT después de la inhibición de la fosfatasa de PA. Las células se sometieron a 50  $\mu\text{M}$  de 6-

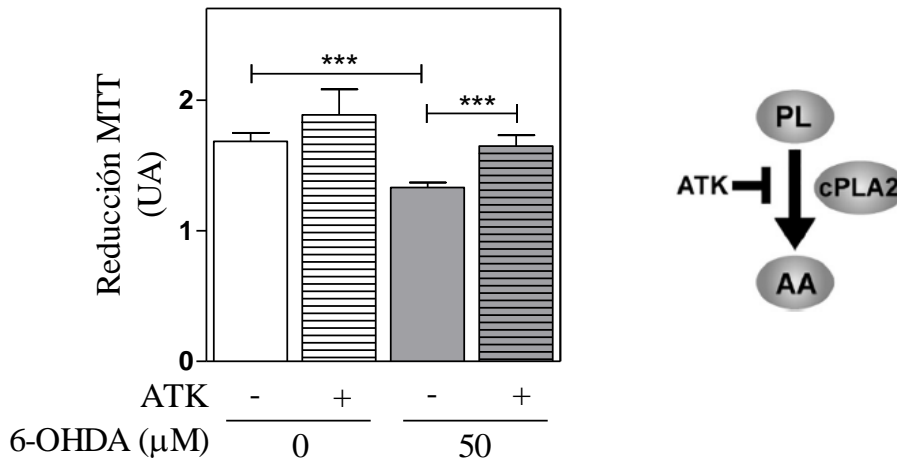
OHDA (o su vehículo) en la presencia de DL-propranolol (o su vehículo) durante 24 h y se evaluó la viabilidad celular. El test de ANOVA doble (6-OHDA x Propranolol) detectó una interacción significativa. \*\*\*  $p < 0,001$ .

La liberación de AG también fue estimulada por la exposición a 6-OHDA (**Figura 22A**). Diferentes isoformas de PLA2 participan en la liberación de AG específicos que intervienen en la promoción o la resolución del proceso inflamatorio. En general, la enzima cPLA2 escinde el AA proporcionando así el sustrato para la COX-2 y la consecuente producción de prostaglandinas. Por otro lado, la iPLA2 libera DHA, el sustrato principal para la síntesis de lípidos bioactivos conocidos como resolvinas, cuya función específica es la limitación y resolución del proceso inflamatorio (A. A. Farooqui y Horrocks 2004; Ramanadham *et al.* 2015). Los inhibidores específicos de las isoformas de PLA2 (iPLA2 y cPLA2) se usaron para determinar la naturaleza y el rol de la liberación de los AG inducida por 6-OHDA.

La inhibición de iPLA2 por BEL en células tratadas con 6-OHDA disminuyó la viabilidad celular, lo que sugiere que el AG liberado por esta enzima está proporcionando sustratos con bioactividad protectora (**Figura 22B**). Frente a eso, el ATK (inhibidor de cPLA2) fue capaz de aumentar la viabilidad celular que sería compatible con la liberación de AA, que es el principal sustrato para la generación de prostaglandinas con acción pro-inflamatoria (**Figura 22C**).



C

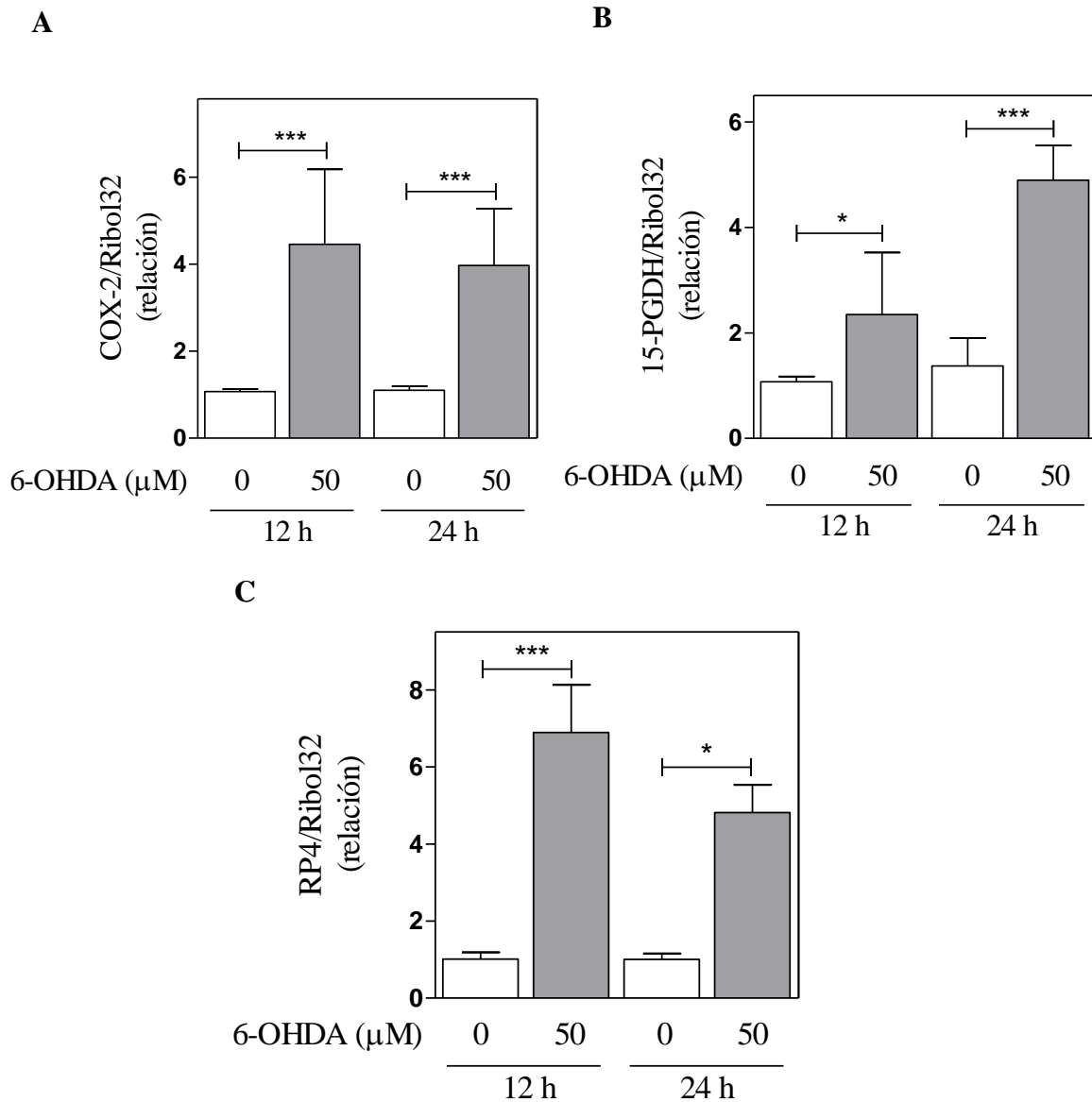


**Figura 22. Liberación de AG y roles de las PLA2.** (A) Las células se trataron con 50  $\mu\text{M}$  de 6-OHDA o su vehículo durante 24 h y se determinaron los niveles de AG libres intracelulares. El test t de Student reveló diferencias significativas. (B) Ensayo de reducción de MTT tras la inhibición de iPLA2. Las células fueron tratadas con 50  $\mu\text{M}$  de 6-OHDA (o su vehículo) en presencia de BEL (o su vehículo) durante 24 h y se evaluó la viabilidad celular. El test de ANOVA doble (6-OHDA x BEL) detectó una interacción significativa. (C) Ensayo de reducción de MTT tras la inhibición de cPLA2. Las células fueron tratadas con 50  $\mu\text{M}$  de 6-OHDA (o su vehículo) en presencia de ATK (o su vehículo) durante 24 h y se evaluó la viabilidad celular. El test de ANOVA doble (6-OHDA x ATK) no detectó una interacción significativa. \*\*\*  $p < 0,001$ .

#### 4. Regulación de genes modulados por NF- $\kappa\text{B}$ frente al estímulo de 6-OHDA

Luego, investigamos la expresión de genes regulados por NF- $\kappa\text{B}$  y asociados con la respuesta inflamatoria. En este caso, quisimos evaluar también esta respuesta a las 12 horas de exposición, para observar si ya se evidenciaba la respuesta desde horas antes. La exposición neuronal a 6-OHDA fue capaz de inducir un aumento en los niveles de ARNm de COX-2 y 15-PGDH después de 12 y 24 h de exposición (**Figura 23A y B**). También detectamos una mayor expresión de ARNm del receptor RP4 de prostaglandina, que está involucrado en la respuesta autocrina de los prostanoides en procesos inflamatorios (**Figura 23C**). Como se mostró previamente en la **Figura 17A**, el aumento en la expresión de COX-2 se correlacionó

con un aumento en la liberación de AG inducida por la 6-OHDA. Estos resultados demuestran que la injuria provocada por la 6-OHDA es capaz de activar componentes moleculares relacionados con la producción de mediadores lipídicos asociados con la cascada inflamatoria y también la liberación de AG, siendo estos últimos los sustratos necesarios para la generación de prostaglandinas a través de la acción de la COX-2.

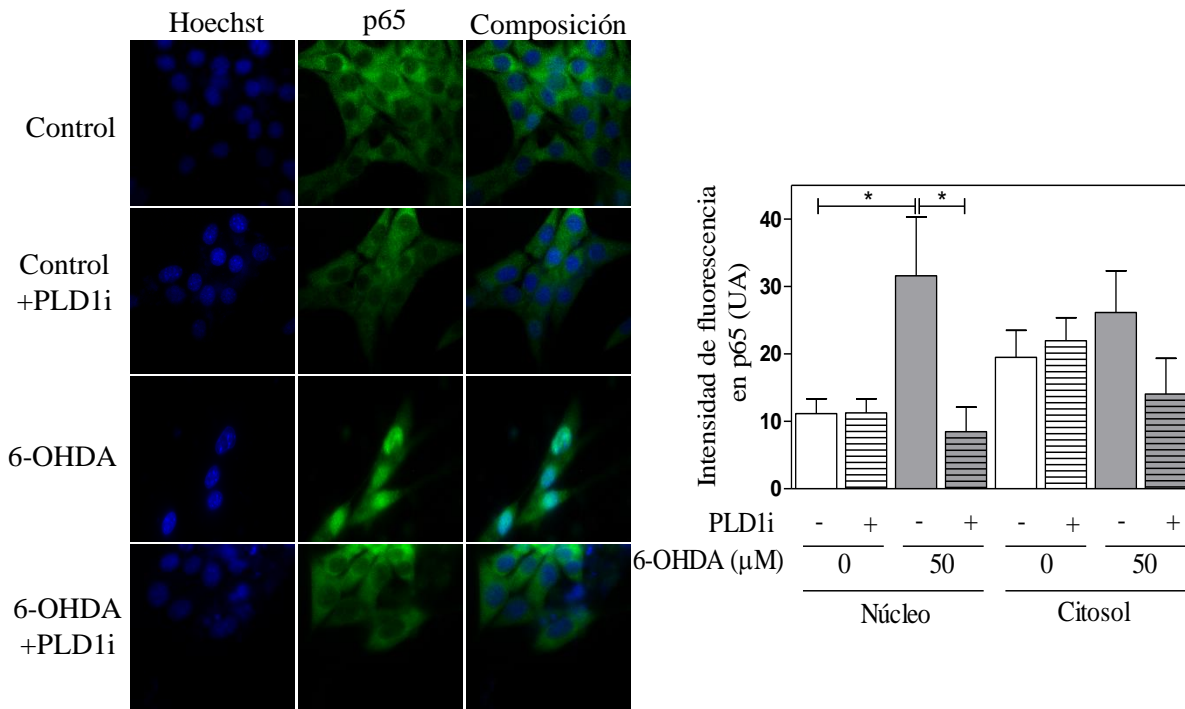


**Figura 23. Regulación de genes modulados por NF-κB frente al estímulo de 6-OHDA.** (A-C) Las células se trataron con 6-OHDA 50 μM (o su vehículo) durante 12 y 24 h y se evaluaron los niveles de expresión de

COX-2 (A), 15-PGDH (B) y RP4 (C) por qRT-PCR. El ANOVA a una vía seguido del post-test de Bonferroni reveló diferencias significativas. \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 5. Rol de la señalización lipídica en la localización subcelular de NF- $\kappa$ B

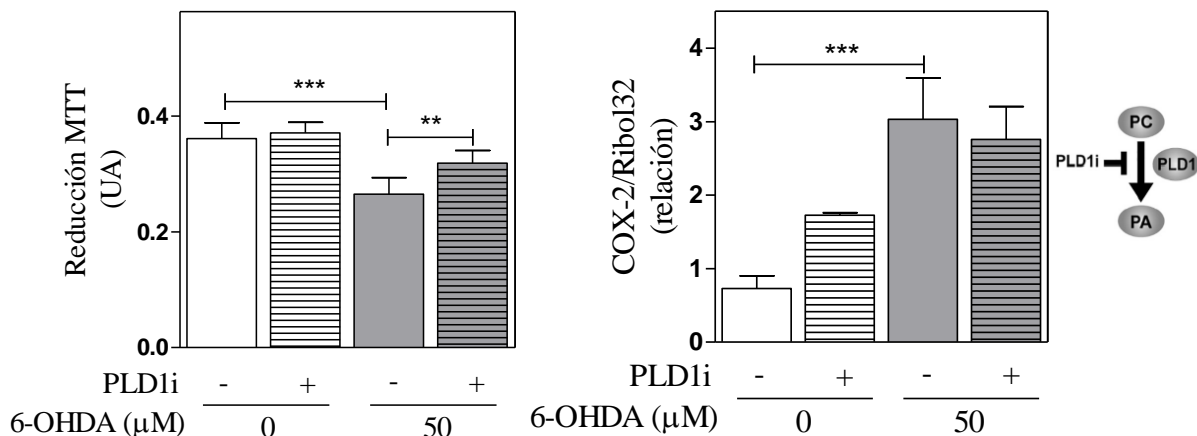
La localización nuclear de los factores de transcripción es una condición necesaria y excluyente para la regulación transcripcional. Habiendo determinado la activación de NF- $\kappa$ B junto con el aumento de PA en respuesta a la injuria por 6-OHDA, decidimos investigar la relación entre la activación de PLD y la localización subcelular de este factor de transcripción. La inhibición farmacológica de PLD1 fue capaz de prevenir la translocación de la subunidad p65 de NF- $\kappa$ B en respuesta a la exposición de la 6-OHDA (**Figura 24**).



**Figura 24. Efecto de la inhibición de PLD1 sobre la localización subcelular de p65 de NF- $\kappa$ B.** Las células sembradas sobre cubreobjetos fueron expuestas a 6-OHDA 50  $\mu$ M (o su vehículo) y el inhibidor de PLD1 (o su vehículo) durante 24 h, y se procesaron para inmunocitoquímica usando anticuerpos contra p65. Se utilizó

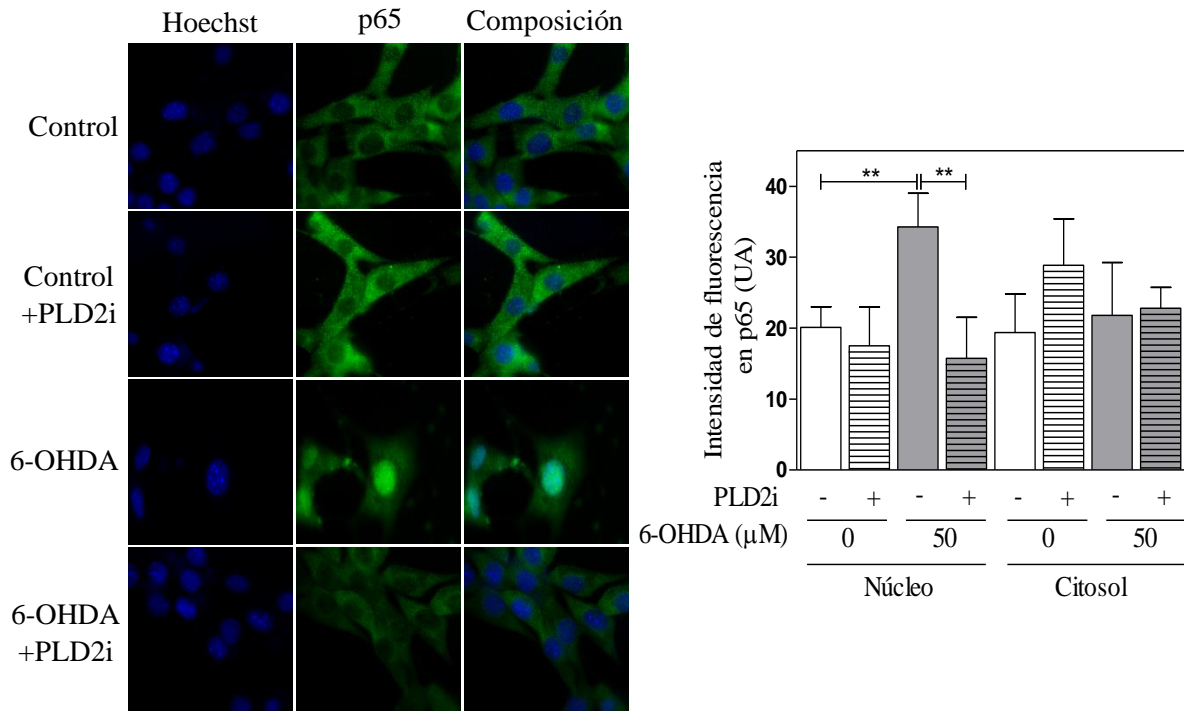
Hoechst como marcador nuclear en todas las imágenes. El test de ANOVA doble (6-OHDA x PLD1i) detectó una interacción significativa. \*  $p < 0,05$ .

Además, la pérdida en la viabilidad celular inducida por 6-OHDA se recuperó parcialmente en presencia del inhibidor de la PLD1 (**Figura 25A**). La interacción significativa (inhibidor de PLD1 x 6-OHDA) para los ensayos de viabilidad y translocación nuclear de NF- $\kappa$ B demostró que el PA producido por la PLD1 participa en la regulación de la actividad transcripcional y la supervivencia celular en células tratadas con 6-OHDA. La inhibición de la PLD1 sin embargo no resultó en un cambio sobre la expresión del ARNm de COX-2 cuando las células se trataron con 6-OHDA (**Figura 25B**).



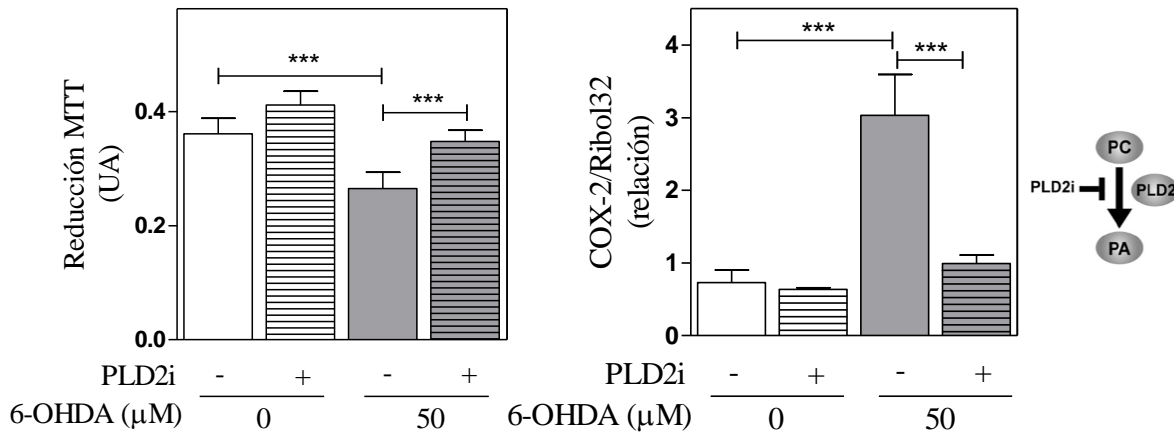
**Figura 25. Efectos de la inhibición de la producción de PA por la PLD1 en la viabilidad celular y la expresión de COX-2.** (A) Ensayo de reducción de MTT luego de la inhibición de la PLD1. El test de ANOVA doble (6-OHDA x PLD1i) no detectó una interacción significativa. (B) Las células se trataron con 6-OHDA 50  $\mu$ M (o su vehículo) y el inhibidor de la enzima PLD1 (o su vehículo) durante 24 h y se evaluaron los niveles de expresión del ARNm de COX-2 por qRT-PCR. El test de ANOVA doble (6-OHDA x PLD1i) no detectó una interacción significativa. \*\*\*  $p < 0,001$ .

La inhibición de la PLD2 también impidió la translocación nuclear de la subunidad p65 de NF- $\kappa$ B en presencia de 6-OHDA (**Figura 26**).



**Figura 26. Efecto de la inhibición de PLD2 sobre la localización subcelular de p65 de NF-κB.** Las células sembradas sobre cubreobjetos fueron expuestas a 6-OHDA 50 µM (o su vehículo) y el inhibidor de PLD2 (o su vehículo) durante 24 h, y se procesaron para inmunocitoquímica usando anticuerpos contra p65. Se utilizó Hoechst como marcador nuclear en todas las imágenes. El test de ANOVA doble (6-OHDA x PLD2i) detectó una interacción significativa. \*\* p<0,01.

La inhibición de la PLD2 restableció la viabilidad celular a niveles cercanos al control en neuronas tratadas con 6-OHDA (**Figura 27A**). La inhibición farmacológica de la PLD2 suprimió el aumento en la expresión del ARNm de COX-2 inducido por la 6-OHDA (**Figura 27B**). La interacción significativa (inhibidor de PLD2 x 6-OHDA) en la translocación nuclear de NF-κB y los valores del ARNm de COX-2 demostraron que el PA producido por la PLD2 participa en la regulación de la actividad transcripcional relacionada con la respuesta inflamatoria en las células tratadas con 6-OHDA.



**Figura 27. Efectos de la inhibición de la producción de PA por la PLD2 en la viabilidad celular y la expresión de COX-2.** (A) Ensayo de reducción de MTT luego de la inhibición de la PLD2. El test de ANOVA doble (6-OHDA x PLD2i) no detectó una interacción significativa. (B) Las células se trataron con 6-OHDA 50 μM (o su vehículo) y el inhibidor de la enzima PLD2 (o su vehículo) durante 24 h y se evaluaron los niveles de expresión del ARNm de COX-2 por qRT-PCR. El test de ANOVA doble (6-OHDA x PLD2i) detectó una interacción significativa. \*\*\* p<0,001.



## DISCUSIÓN-CAPÍTULO I

Los hallazgos obtenidos en el primer capítulo de la tesis señalan el papel clave que cumple el PA, un lípido con propiedades bioactivas originado a partir de la hidrólisis de la PC mediada por la actividad catalítica de las isoformas clásicas 1 y 2 de la PLD. En respuesta a la inducción de la toxicidad provocada por la 6-OHDA *in vitro*, demostramos un aumento en el PA generado a través de una mayor actividad catalítica de PLD. Esta mayor actividad regula de manera estrecha la localización subcelular del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, que es clave en la regulación génica de los procesos inflamatorios.

La 6-OHDA, por su parte, es una neurotoxina ampliamente utilizada tanto en modelos murinos *in vivo* como en cultivos *in vitro*, imitando parte de los mecanismos involucrados en la muerte neuronal de la EP y otras enfermedades neurodegenerativas asociadas con la disfunción mitocondrial y el aumento del EO (Michel y Hefti 1990; Storch *et al.* 2003; Bové y Perier 2012; Massari *et al.* 2016). Los efectos tóxicos provocados por la 6-OHDA se deben principalmente a su capacidad de generación de radicales libres tanto extracelularmente como después de su absorción por la célula. Nuestros resultados indican que la exposición *in vitro* a la 6-OHDA en células de neuroblastoma humano fue capaz de conducir a la pérdida de actividad metabólica mitocondrial (ensayo de MTT), así como el aumento de los niveles celulares de EROs acompañado de la pérdida de integridad de la membrana (ensayo de liberación de LDH). En este sistema, el MTT representa una medida directa de la muerte celular, ya que se correlaciona con los ensayos de viabilidad de azul tripán y de formación de colonias (Davis y Maher 1994).

Nuestros hallazgos coinciden con lo reportado en la bibliografía, en donde se señala a la 6-OHDA como un inductor potente del EO en virtud del daño que ejerce, principalmente de

tipo oxidativo. Por ejemplo, se ha podido demostrar en múltiples estudios el daño por parte de esta neurotoxina en la cadena respiratoria mitocondrial, lo que lleva a una disminución de los niveles de ATP (Blum *et al.* 2001) asociada al aumento de EROs, junto con la alteración de varios parámetros relacionados con la detoxificación de las sustancias oxidantes, como por ejemplo la actividad de la catalasa, enzima clave en aumentar la tasa de degradación del  $H_2O_2$  en células del sistema nervioso. También se sabe que la 6-OHDA es capaz de disminuir los niveles de GSH, el cual es necesario para producir en las neuronas una mayor velocidad de degradación del  $H_2O_2$  por parte de la enzima glutatión peroxidasa (Desagher *et al.* 1996). Por este motivo, el efecto de la 6-OHDA ha sido relacionado con una disminución de la actividad de esta enzima, resultado de una dependencia respecto a los niveles de GSH para su correcto funcionamiento (Magalingam *et al.* 2014). Esto explica en parte por qué las neuronas catecolaminérgicas de la SNpc son más susceptibles al EO, sumado a los menores niveles de expresión de glutatión peroxidasa, que junto con la desregulación del procesamiento y almacenamiento de las catecolaminas, asociado a la vejez, puede desencadenar fenómenos apoptóticos en esta región (Dias *et al.* 2013). El menor nivel de expresión de esta enzima estaría también relacionado con una baja concentración intracelular de GSH en estas neuronas (Collins *et al.* 2012). Además, se han detectado niveles aún menores de GSH en neuronas nigrales en pacientes con EP, en relación a individuos controles (Pearce *et al.* 1997).

En base a estos hallazgos y al hecho de que las células de neuroblastoma IMR-32 expresan el sistema dopaminérgico y son capaces de captar dopamina (Ross *et al.* 1981; Koutsilieri *et al.* 1996; McLaughlin *et al.* 2006), se puede suponer que este modelo *in vitro* es adecuado para estudiar los primeros eventos de señalización desencadenados en las neuronas, tanto por

los efectos intracelulares como extracelulares que ejerce la 6-OHDA. Además, al no ser células dopaminérgicas típicas, la línea celular de neuroblastoma IMR-32 expuesta a 6-OHDA proporciona un modelo *in vitro* alternativo, que es conveniente para el estudio de los eventos de neurotoxicidad.

Los procesos neuroinflamatorios son una característica de la degeneración neuronal en la EP. La activación desregulada de NF- $\kappa$ B se reconoce como una de las principales causas de enfermedades inflamatorias crónicas tales como la diabetes, la obesidad, las enfermedades cardiovasculares, pulmonares, etc. (Zhang *et al.* 2017). Por ejemplo, en modelos animales de fibrosis hepática inducida por hipoxia durante el sueño asociada a la obesidad se ha encontrado que los niveles de NF- $\kappa$ B y del receptor de tipo Toll4, marcador clave de las respuestas inflamatorias, se hallan elevados en relación a los grupos control (Kang *et al.* 2017). En un modelo de demencia vascular, se ha demostrado que la astrogliosis que ocurre en la materia blanca, responsable de la degeneración walleriana, implica una activación del factor NF- $\kappa$ B (Saggu *et al.* 2016). Asimismo, es de destacar el papel que juegan muchos productos naturales, la mayoría de ellos de naturaleza polifenólica, que son responsables de suprimir o atenuar la inflamación causante de muchas enfermedades, actuando como inhibidores directos de las vías que involucran a NF- $\kappa$ B (Killeen *et al.* 2014). Por otra parte, en patologías neurodegenerativas, la vía que involucra a NF- $\kappa$ B ha sido mayormente estudiada en células de la microglía durante la diferenciación al fenotipo M1 pro-inflamatorio, en la cual, luego de la unión del patógeno o la sustancia extraña al receptor de tipo Toll, este activa a NF- $\kappa$ B junto con la vía de MAPK, contribuyendo a la liberación de citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-6) (Corrigan *et al.* 2016). Sin embargo, queda aún

por establecer cuál es el rol que presenta este factor de transcripción en las neuronas y su relación con respecto a los procesos deletéreos desencadenados en la EP.

Por esta razón, es importante abordar el estudio de los mecanismos subyacentes a la activación de NF- $\kappa$ B y su papel como mediador pro-inflamatorio (Shih *et al.* 2015). La localización nuclear de las subunidades de NF- $\kappa$ B constituye un requisito para la regulación de su actividad transcripcional. Como parte de la respuesta neuronal a la toxicidad inducida por la 6-OHDA, observamos la translocación nuclear de la subunidad p65 de NF- $\kappa$ B y la regulación positiva concomitante de los niveles de ARNm de COX-2. El gen de COX-2 es regulado por NF- $\kappa$ B y la proteína resultante de su expresión cataliza la producción de prostaglandinas, derivados oxigenados del AA. Las prostaglandinas junto con los tromboxanos y eicosanoides, productos biológicos de la actividad de COX-2, son los mediadores lipídicos encargados de promover la respuesta inflamatoria. En las células en reposo, el AA y DHA se esterifican en fosfolípidos de membrana, pero después de un estímulo perjudicial, se liberan por acción de las enzimas cPLA2 e iPLA2, respectivamente. La forma libre de estos AG sirve y actúa como sustrato de agentes pro-inflamatorios y anti-inflamatorios (Wong *et al.* 2009).

El rol fundamental que cumple esta clase de AG en estos fenómenos se ve reflejado por el hecho de que los medicamentos anti-inflamatorios no esteroideos, que son los mayormente prescritos para aliviar el dolor y la inflamación, actúan sobre la COX-2 y, de esta manera, inhiben la formación de AA (Sala *et al.* 2018). Lo mismo puede decirse del DHA, un AG esencial que es reconocido como un componente dietético beneficioso y como una fuente de mediadores de la resolución de la inflamación, como las resolvinas, protectinas y maresinas (Kuda 2017). Por lo tanto, esto nos señala que estas vías enzimáticas son importantes para

estudiar los fenómenos de producción de mediadores de inflamación. Nuestros resultados indican que los eventos concatenados para el inicio de la respuesta inflamatoria, que comprenden la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B, la regulación de COX-2 y la activación de las PLA2, se producen por la exposición *in vitro* de células de neuroblastoma humano a 6-OHDA.

Los mediadores lipídicos producidos por la actividad de COX-2 actúan como ligandos para diferentes tipos de receptores de membrana. La prostaglandina E2 es uno de los principales productos de la actividad de COX-2, y puede ejercer efectos tanto pro-inflamatorios como anti-inflamatorios, promoviendo, de esta manera, respuestas tóxicas y protectoras en los tejidos neuronales (Andrade da Costa *et al.* 2009; Milatovic *et al.* 2011). Los RP son receptores acoplados a proteínas G que constituyen un área emergente en la búsqueda de nuevas terapias específicas para varias enfermedades. La prostaglandina E2 es capaz de activar los distintos tipos de receptores RP que existen en el organismo (RP1-RP4). Sin embargo, la expresión de RP4 se ha descrito en diferentes áreas del SNC y, específicamente, en las neuronas (Milatovic *et al.* 2011). Se ha demostrado que la activación de RP4, después de la unión del ligando, ejerce efectos tóxicos o de promoción de la supervivencia en varios modelos experimentales de enfermedades neurológicas (Andreasson 2010).

El aumento de la expresión de RP4 observado en las células de neuroblastoma humano expuestas a 6-OHDA sugiere que la respuesta neuronal al tóxico comprende una respuesta autocrina acoplada a COX-2. Resultados anteriores de nuestro laboratorio demuestran la activación de la misma cascada como respuesta al EO en el tejido retiniano, donde coexisten las células neuronales y gliales (Rodríguez Diez *et al.* 2012, 2013). Aquí, mostramos que las células de neuroblastoma humano son capaces de expresar componentes cruciales de la

cascada autocrina inflamatoria en ausencia de células gliales cuando están expuestas a la 6-OHDA. Nuestros resultados sugieren que este modelo *in vitro* es adecuado para el estudio de eventos exclusivos de señalización neuronal involucrados en la respuesta a la toxicidad de 6-OHDA y relacionados con la respuesta inflamatoria.

Las fosfolipasas son una clase de enzimas implicadas en la regulación de procesos esenciales para el mantenimiento de la funcionalidad y arquitectura celulares a través del clivaje de glicerofosfolípidos y la generación de segundos mensajeros. Estas funciones incluyen su participación en procesos fisiológicos como el ciclo celular, la diferenciación, la remodelación de los lípidos y la homeostasis de membrana. Por ello es que su desregulación se ha relacionado a diversos estados patológicos como la aterosclerosis, la neurodegeneración y la alergia (Müller *et al.* 2017; Nolin *et al.* 2019; Sun *et al.* 2004; Vasquez *et al.* 2018; Violette *et al.* 1990). En condiciones de EO, la activación de fosfolipasas promueve la generación de varios mensajeros lipídicos que cumplen roles esenciales en las funciones celulares mediante la modulación de varios mecanismos moleculares (Dennis 2015b). Por esta razón, se hace un esfuerzo considerable en la caracterización y profundización de los eventos celulares mediados por fosfolipasas y sus productos con el objetivo de buscar estrategias terapéuticas específicas para varios tratamientos de enfermedades (Fan *et al.* 2018; Schaeffer *et al.* 2009).

En nuestro caso, observamos que junto con la liberación de AG ejercida por acción de las PLA2, la 6-OHDA pudo desencadenar un aumento en la producción de PA, que fue cuantificado como la formación de PEth por el ensayo de transfostaditilación, donde el PEth se produce únicamente por la actividad de la PLD en presencia de alcoholes primarios (etanol) y es un reflejo preciso de los valores de PA generados por esta enzima. La PLD1 y

PLD2 son enzimas muy importantes por su participación en la producción de PA luego de diferentes estímulos celulares. Hasta hoy en día la vía de las PLD se conoce por su activación por agentes como el estrés, los factores de crecimiento y la insulina. El PA es un lípido bioactivo que gobierna una gran cantidad de funciones celulares a través de la regulación de proteínas involucradas en el metabolismo celular, el crecimiento y la progresión del ciclo celular. PLD/PA regula diferentes pasos del tráfico de vesículas, incluida la activación de redes de señalización, la gemación de vesículas desde el *trans*-Golgi y la fusión de vesículas. La generación de PA dependiente de PLD, seguida de una activación de PI4P5K, aumenta los niveles de PIP<sub>2</sub>, necesarios para la exocitosis. La PAP puede convertir el PA en DAG, que en sí mismo es un lípido altamente fusogénico. Junto con Akt y las formas atípicas de PKC  $\zeta$  y  $\lambda$ , la PLD participa en la regulación del transporte de glucosa dependiente de insulina; en particular, regula la translocación de los transportadores de glucosa (Glut) desde el retículo endoplásmico a la membrana plasmática (Farese 2002).

Además, se considera que la PLD es un efector clave para la determinación del destino celular relacionado con la supervivencia/apoptosis. En este sentido, estudios genéticos y farmacológicos recientes han propuesto a las PLD como blancos de interés para el tratamiento de enfermedades humanas, contándose entre estas diversos trastornos neurodegenerativos (H. A. Brown *et al.* 2017). Aquí mostramos que la exposición a 6-OHDA desencadena la generación de PA mediada por PLD en células de neuroblastoma humano. La inhibición farmacológica de PLD1 o PLD2 indica que ambas enzimas están involucradas en la promoción del daño neuronal (Conde *et al.* 2018; Mateos *et al.* 2014). Además, el PA producido por PLD1 y PLD2 está implicado en la localización nuclear de la subunidad p65 de NF- $\kappa$ B. Nuestros resultados sugieren que el aumento de PA provocado por 6-OHDA a

través de la activación de PLD1 y PLD2 gobierna los mecanismos de transducción de señales que determinan la translocación de NF- $\kappa$ B desde el citosol al núcleo, promoviendo así el estricto requisito previo para la regulación transcripcional. El tratamiento con el inhibidor de la PLD1 y la 6-OHDA en los ensayos de viabilidad sugiere que la señalización de PLD1 regula a NF- $\kappa$ B, lo que podría estar relacionado con la activación transcripcional de genes relacionados con la muerte celular. Sin embargo, solo la inhibición de PLD2 pudo bloquear el aumento en los niveles de ARNm de COX-2 inducidos por la 6-OHDA. Estos resultados sugieren que el PA que es producido por PLD1 y PLD2 puede gobernar la localización subcelular de NF- $\kappa$ B y que este lípido bioactivo participa no solo en la regulación de la respuesta inflamatoria (vía PLD2) sino también en la promoción de la muerte celular (vía PLD1). El papel diferencial de ambas isoenzimas de PLD probablemente esté relacionado con su diferente localización subcelular y, en consecuencia, el efecto que produce el PA en los diferentes compartimentos (Freyberg *et al.* 2001; Hancock 2007a). Que el PA pueda resultar tóxico para la célula cuando es producido en exceso también ha sido confirmado por estudios en donde fue particularmente difícil generar líneas celulares estables que expresen PLD exógena, posiblemente como consecuencia de la toxicidad del PA (Freyberg *et al.* 2001).

Por lo tanto, el PA derivado de PLD estaría siendo parte del conjunto de señales pro-inflamatorias desencadenadas por la 6-OHDA. Sin embargo, también encontramos un papel protector de la iPLA2 (enzima involucrada en la resolución del proceso inflamatorio) contra la lesión de 6-OHDA. Esto nos permite hipotetizar que un equilibrio entre las señales pro-inflamatorias y anti-inflamatorias debería finalmente determinar el destino celular durante los eventos de neurotoxicidad.



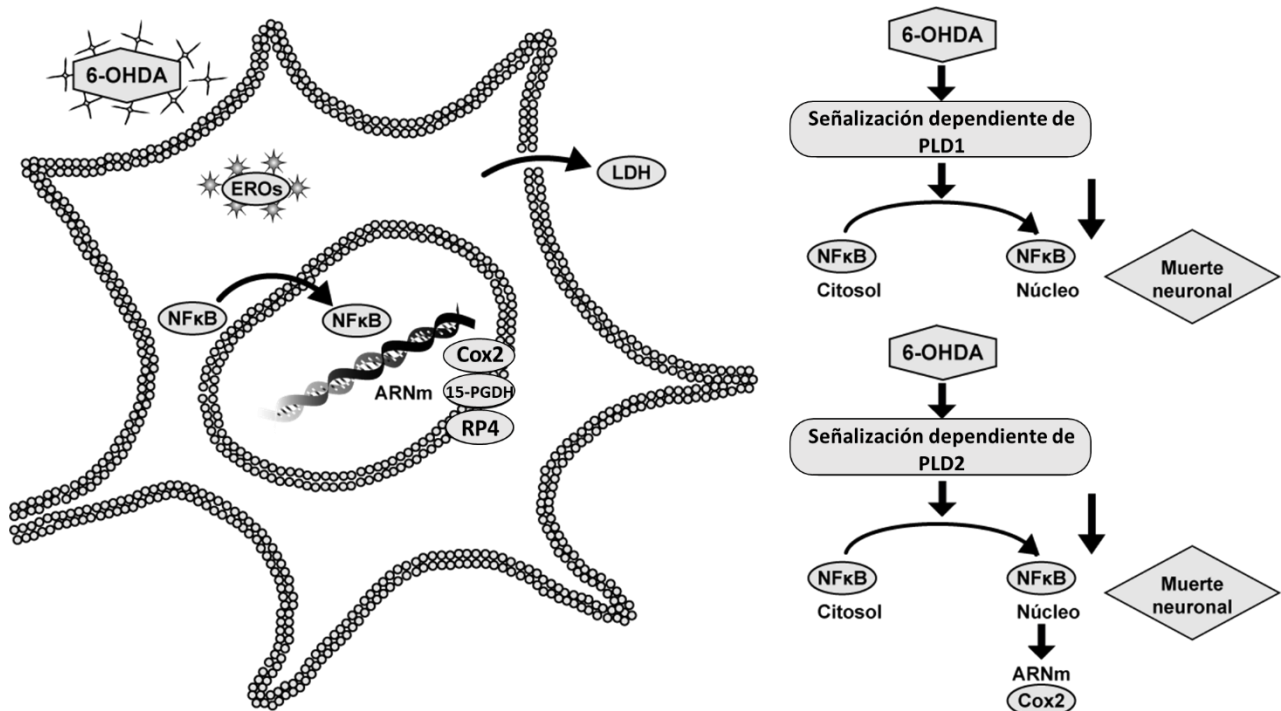
Por otro lado, el estímulo de 6-OHDA produjo un incremento en la concentración intracelular de DAG. Estos DAG que son generados por la PLC y PLD presentan una composición de AG distinta que los diferencia en su funcionalidad. Se cree que el PA, el producto inicial de la PLD, luego de actuar como un segundo mensajero, es convertido a DAG, atenuando la señal. En nuestros ensayos, esto parece haber quedado demostrado de manera clara cuando, al inhibir la PAP por el DL-propranolol, la muerte de las neuronas fue mayor, indicando que esa falta de derivación del PA hacia el DAG sería la responsable de mantener el efecto neurotóxico de la 6-OHDA a través de una producción de PA. Por otro lado, únicamente los DAG poli-insaturados generados por PLC y los PA saturados/mono-insaturados sirven como señalizadores bajo condiciones fisiológicas y de estrés (Pettitt *et al.* 1997).

El aumento de los DAG obtenidos en nuestros resultados puede estar relacionado con la activación de PLD, ya que las dos isoformas de PLD son activadas por PKC, la cual necesita DAG para su funcionamiento (Gomez-Cambronero 2014).

Finalmente, que los niveles de fosforilación de ERK1/2 se mantuvieran iguales y no hubiera cambios en los valores de viabilidad, nos indica que el papel de la activación de PLD no juega un rol fundamental en esta vía. Esto nos señala que esta vía es más propia y conservada donde se descubrió inicialmente, a saber, en la formación de vesículas producidas por la unión de insulina a sus receptores tirosina quinasa, donde la PLD produce el PA que permite el reclutamiento de Raf-1 habilitando el proceso de endocitosis y posterior activación de la vía de MAPK (Hancock 2007; Rizzo *et al.* 1999). Al parecer, en nuestro caso, la 6-OHDA estaría activando la PLD por otro mecanismo que no involucra a MAPK. La otra vía a la cual se ha asociado a la PLD es la vía canónica PLD/Akt/mTOR, vinculada principalmente a procesos de supervivencia celular. Descrita inicialmente en hepatocitos, se ha observado que

el estímulo con insulina en estas células resulta en la activación de PLD corriente arriba de PI3K y Akt (Babenko y Kharchenko 2015). En nuestros experimentos, encontramos que la 6-OHDA activa la vía de señalización PI3K/Akt y que la inhibición de la misma conduce a una menor muerte neuronal en presencia de la neurotoxina que en su ausencia, todo lo cual indica que esta vía tendría un rol importante en la toxicidad de la de 6-OHDA, algo semejante a lo que observamos en el rol de PLD. Estos resultados nos señalan que, además de la actividad PLD/PA, en la regulación de la muerte neuronal también estaría actuando la vía PI3K/Akt.

En conjunto, nuestros resultados proporcionan una evidencia no descrita previamente acerca de los mecanismos subyacentes a la respuesta neuronal al neurotóxico 6-OHDA en un modelo *in vitro*. Estos resultados podrían ser el punto de partida para la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas para la modulación de NF-κB basadas en la señalización de PA para el tratamiento de procesos inflamatorios relacionados con enfermedades neurodegenerativas.



**Figura 53. Esquema que muestra los eventos concatenados que ocurren en células de neuroblastoma humano expuestas a 6-OHDA.** 6-OHDA: 6-hidroxidopamina, 15-PGDH: 15-prostaglandina deshidrogenasa, COX-2: ciclooxigenasa-2, RP4: receptor de prostaglandinas, LDH: lactato deshidrogenasa, NFκB: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas, PLD: fosfolipasa D, EROs: especies reactivas de oxígeno.

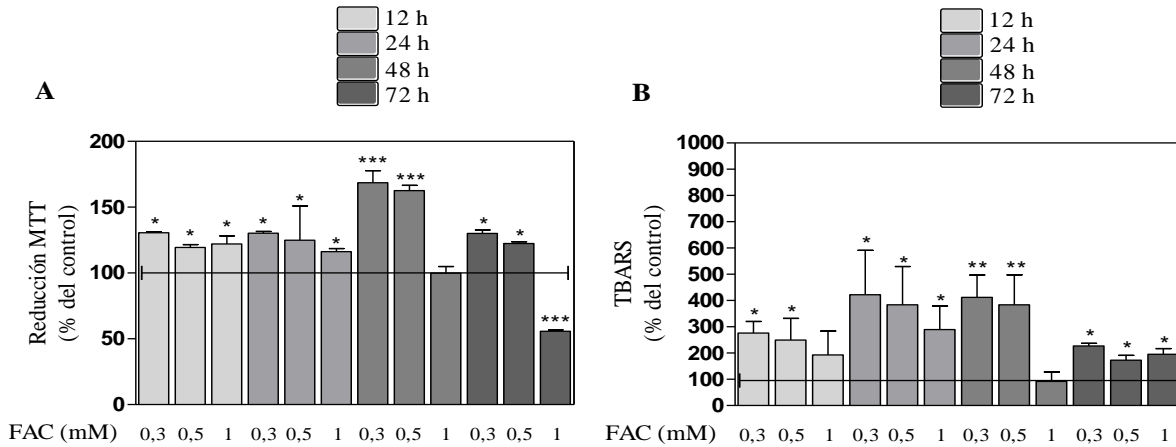
## RESULTADOS-CAPÍTULO II

### 1. Caracterización de la respuesta neuronal inducida por FAC

Para evaluar la injuria producida por la exposición a Fe, se trabajó con la línea celular IMR-32 y con un compuesto coordinado del metal, el FAC. En una primera instancia, se evaluó la funcionalidad mitocondrial en células expuestas a FAC. Para ello, las células se incubaron en presencia de distintas concentraciones de FAC (0,3-1 mM) y durante diferentes tiempos (12-72 h), para luego evaluar la reducción del MTT. Como se observa en la **Figura 28A**, el FAC produjo un incremento en la viabilidad mitocondrial prácticamente en todas las condiciones (con 12 h de exposición a FAC 0,3 mM: 130 %, FAC 0,5 mM: 119 %, FAC 1 mM: 122 %; a las 24 h de exposición a FAC 0,3 mM: 130 %, FAC 0,5 mM: 124 %, FAC 1 mM: 116 %; con 48 h de incubación con FAC 0,3 mM: 168 %, FAC 0,5 mM: 162 %, FAC 1 mM: 99 %; a las 72 h de exposición a FAC 0,3 mM: 130 %, 0,5 mM: 122 %) en relación al control (100 %). Solo a partir de las 72 h, la exposición a FAC 1 mM disminuyó la viabilidad en las mitocondrias a casi la mitad (55 %) respecto de los valores del control.

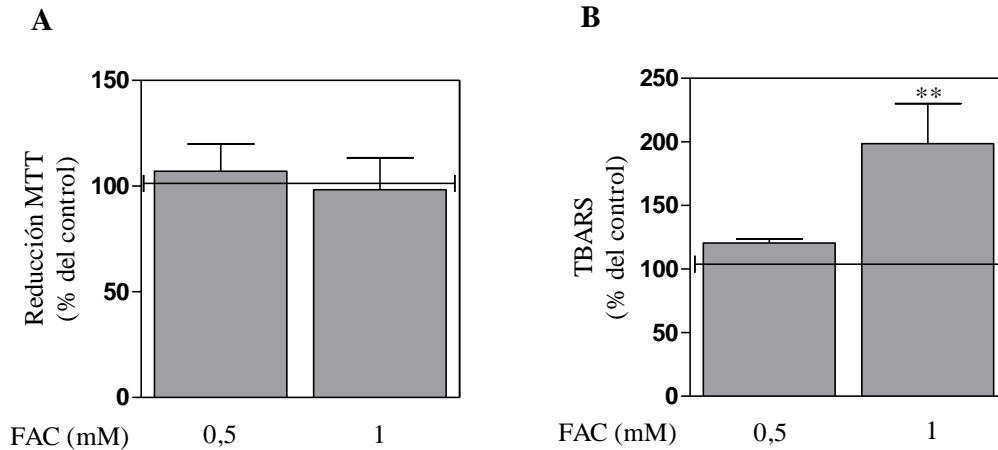
La exposición a Fe también ha sido relacionada con un incremento en la producción de peróxidos lipídicos. Por lo tanto, para evaluar este efecto en el modelo experimental en estudio, las células se incubaron con diferentes concentraciones de FAC (0,3-1 mM) durante distintos períodos de tiempo (12-72 h) para luego determinar los niveles de TBARS (**Figura 28B**). Luego de 12 h de incubación, los valores de TBARS superaron el valor de las condiciones control (FAC 0,3 mM: 276 %, FAC 0,5 mM: 249 %, FAC 1 mM: 192 %), alcanzando el máximo incremento a las 24 h, llegando en promedio a prácticamente triplicarse en relación a las condiciones control (0,3 mM: 421 %, 0,5 mM: 383 %, 1 mM: 289 %). No obstante, este aumento continuó siendo significativo para todos los tiempos de

incubación (con 48 h de exposición a FAC 0,3 mM: 412 %, FAC 0,5 mM: 383 %, FAC 1 mM: 91 %; a las 72 h de exposición a FAC 0,3 mM: 226 %, FAC 0,5 mM: 172 %, FAC 1 mM: 195 %) indicando que la exposición a FAC fue capaz de generar un insulto oxidativo constante.



**Figura 28. Caracterización del daño oxidativo inducido por FAC.** Determinación de la reducción del MTT (A) y evaluación de los peróxidos lipídicos por el ensayo de TBARS (B) en neuronas IMR-32 expuestas a distintas concentraciones de FAC (0,3; 0,5 y 1 mM) durante distintos tiempos de incubación (12-72 h). El test de ANOVA a una vía reveló diferencias significativas. \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001.

Para validar los resultados obtenidos en la línea celular IMR-32 de origen humano, también se evaluó el efecto de la exposición a FAC en neuronas dopaminérgicas N27 de rata. La exposición a FAC por 24 h no produjo cambios en la viabilidad neuronal (FAC 0,5 mM: 107 %, FAC 1 mM: 98 %) (Figura 29A), aunque sí incrementos en los niveles de peróxidos lipídicos (FAC 1 mM: 239 %), con respecto a la condición control (Figura 29B).



**Figura 29. Caracterización del daño oxidativo inducido por FAC.** Determinación de la reducción de MTT (A) y de los niveles de peroxidación lipídica mediante la técnica de TBARS (B) en neuronas dopaminérgicas N27 expuestas a FAC (0,5 y 1 mM) durante 24 h. El test t de Student reveló diferencias significativas. \*\*  $p < 0,01$ .

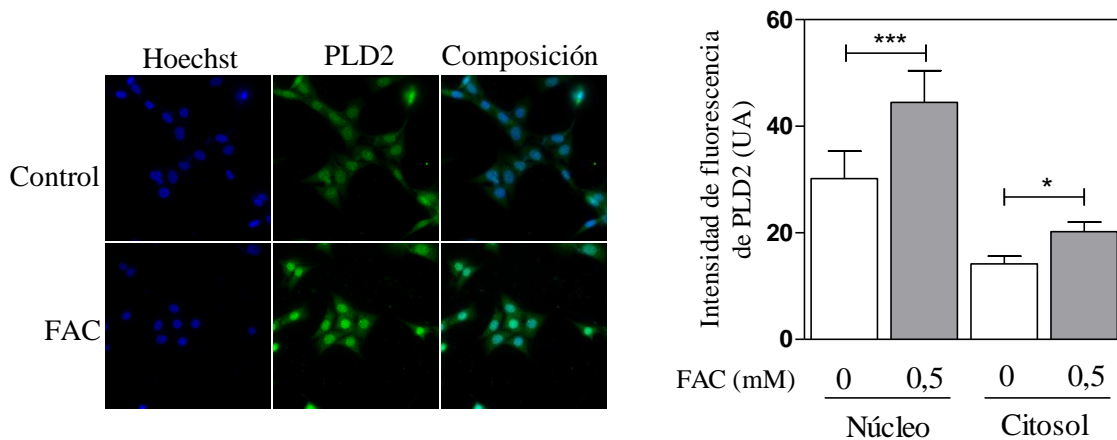
En base a los resultados obtenidos, y con el objetivo de evaluar la respuesta celular al incremento de peróxidos lipídicos, se seleccionó la condición de exposición a 0,5 mM y 1 mM de FAC por 24 h para las células IMR-32 de neuroblastoma humano y dopaminérgicas N27, respectivamente.

## 2. Activación y roles de las fosfolipasas en respuesta a la injuria oxidativa desencadenada por FAC

Si bien la exposición a FAC fue capaz de incrementar los niveles de peroxidación lipídica, esto no provocó una mayor susceptibilidad mitocondrial. Por este motivo, continuamos nuestro estudio en este modelo experimental, ya que el mismo representó una buena herramienta para evaluar las respuestas adaptativas a la injuria oxidativa. Esto nos llevó a hipotetizar que en la respuesta al daño oxidativo mediado por el FAC podrían estar involucradas las vías de remodelación de fosfolípidos de manera de mantener la homeostasis

lipídica. Para establecer un paralelismo con los datos obtenidos en el capítulo I de esta tesis, y de acuerdo al objetivo general de la misma, evaluamos a continuación el rol de la PLD2 en este paradigma experimental. La decisión de evaluar la isoforma 2 de la PLD se basó en los resultados obtenidos en el capítulo I, donde demostramos que este isotipo está involucrado en la cascada NF- $\kappa$ B/COX-2/PLA2.

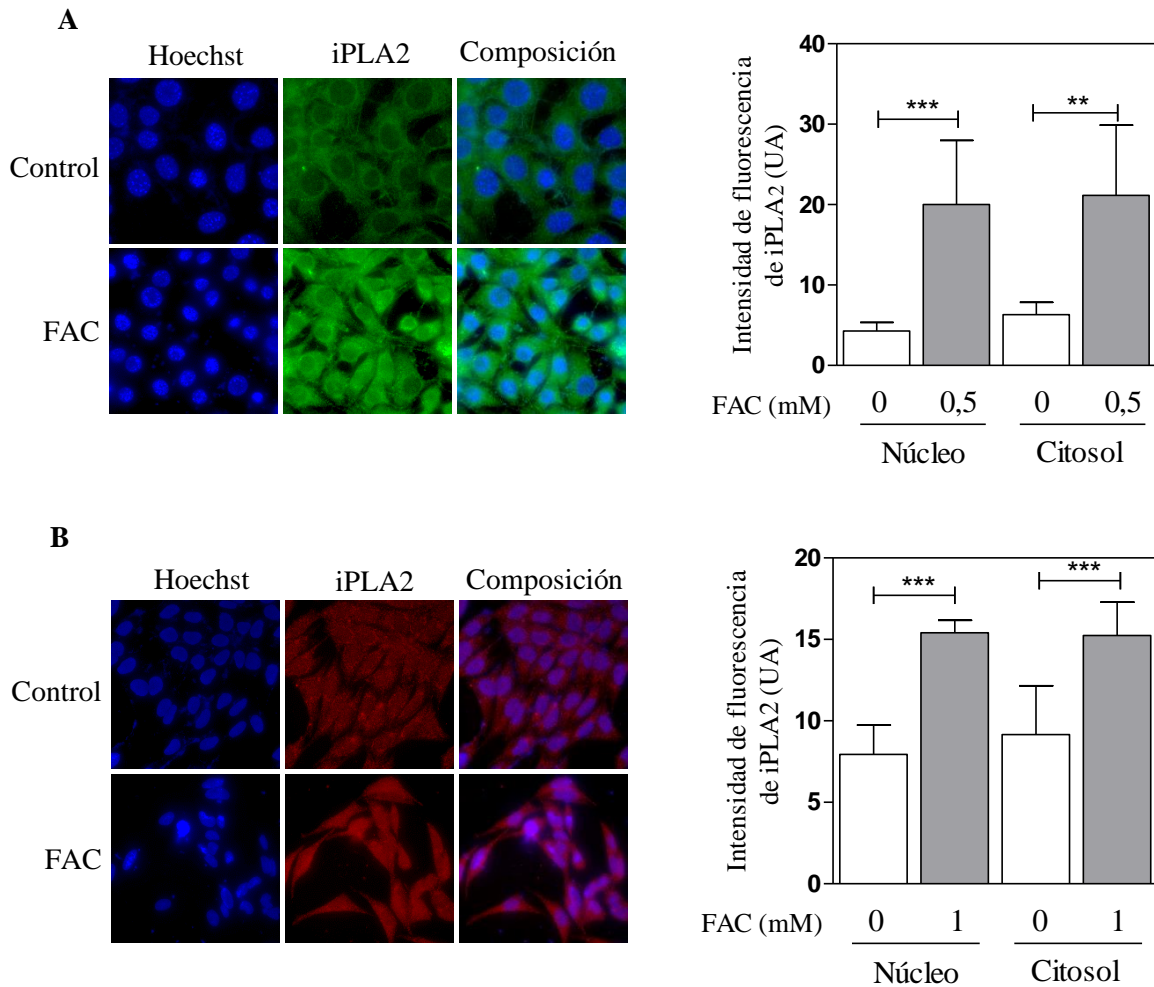
Primeramente, se evaluó la expresión de la PLD2 frente a la exposición al FAC por inmunocitoquímica. En respuesta a FAC 0,5 mM, se observó una mayor intensidad de fluorescencia de la PLD2 tanto en el citosol (142 %) como en el núcleo (147 %), lo que indicaría un aumento de la expresión de la enzima con respecto al control (**Figura 30**).



**Figura 30.** Evaluación de la expresión de la enzima PLD2 en el daño oxidativo inducido por FAC en las neuronas IMR-32. Se evaluó la expresión de esta proteína mediante inmunocitoquímica. El test de ANOVA a una vía reveló diferencias significativas. \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

A continuación, evaluamos la expresión de iPLA2 grupo VI (una de las principales isoenzimas de la PLA2 implicada en la remodelación de membrana), para determinar si la misma participaba en la respuesta al estrés desencadenado por Fe. Las imágenes de inmunofluorescencia obtenidas luego de exponer las células 24 h a 0,5 mM de FAC mostraron un incremento del 183 % en la expresión de iPLA2 con respecto a los controles

(Figura 31A). El aumento de la expresión de la iPLA2 también se pudo corroborar en las neuronas dopaminérgicas N27 (Figura 31B).



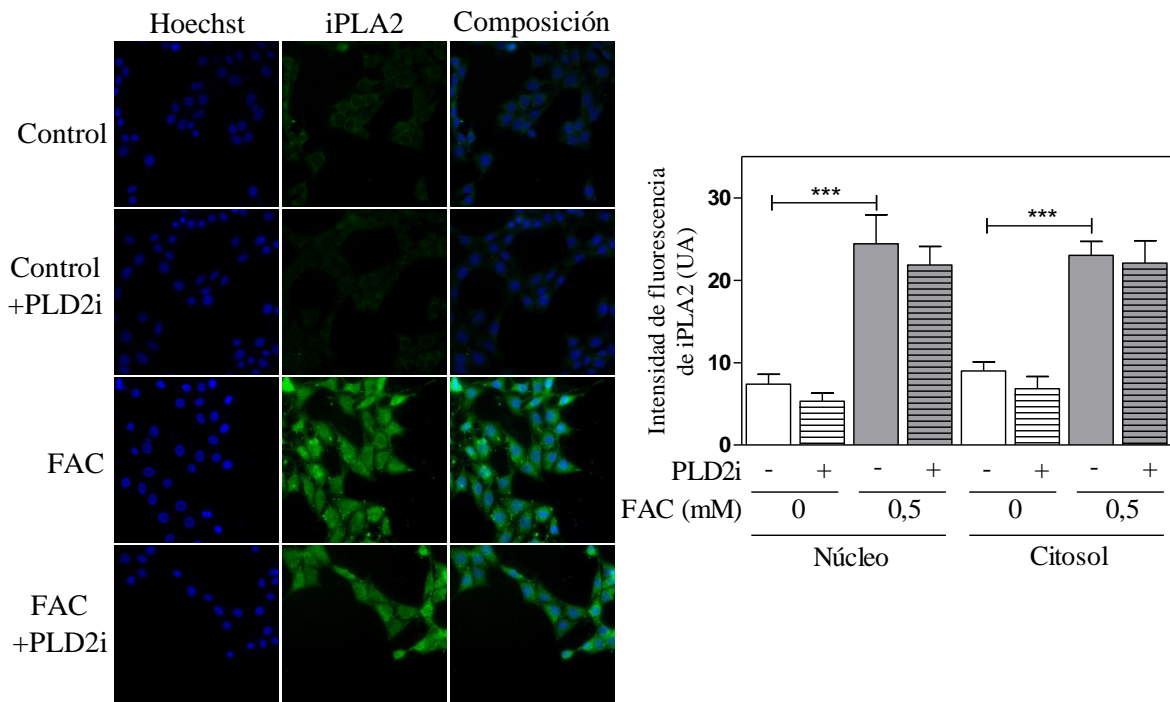
**Figura 31. Evaluación de la expresión de la iPLA2 grupo VI en neuronas IMR-32 y N27.** Esta evaluación se realizó por microscopía de fluorescencia en neuronas expuestas al insulto oxidativo mediado por FAC 0,5 mM en las neuronas IMR-32 (A) y 1 mM para las N27 (B) durante 24 h. El test de ANOVA a una vía reveló diferencias significativas. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

Con el propósito de evaluar si el PA producido por la PLD2 estaba implicado en la regulación de la iPLA2, como en el caso de la respuesta frente a 6-OHDA, utilizamos el inhibidor farmacológico de PLD2 (CAY10594) para evaluar la expresión de la iPLA2 grupo VI en

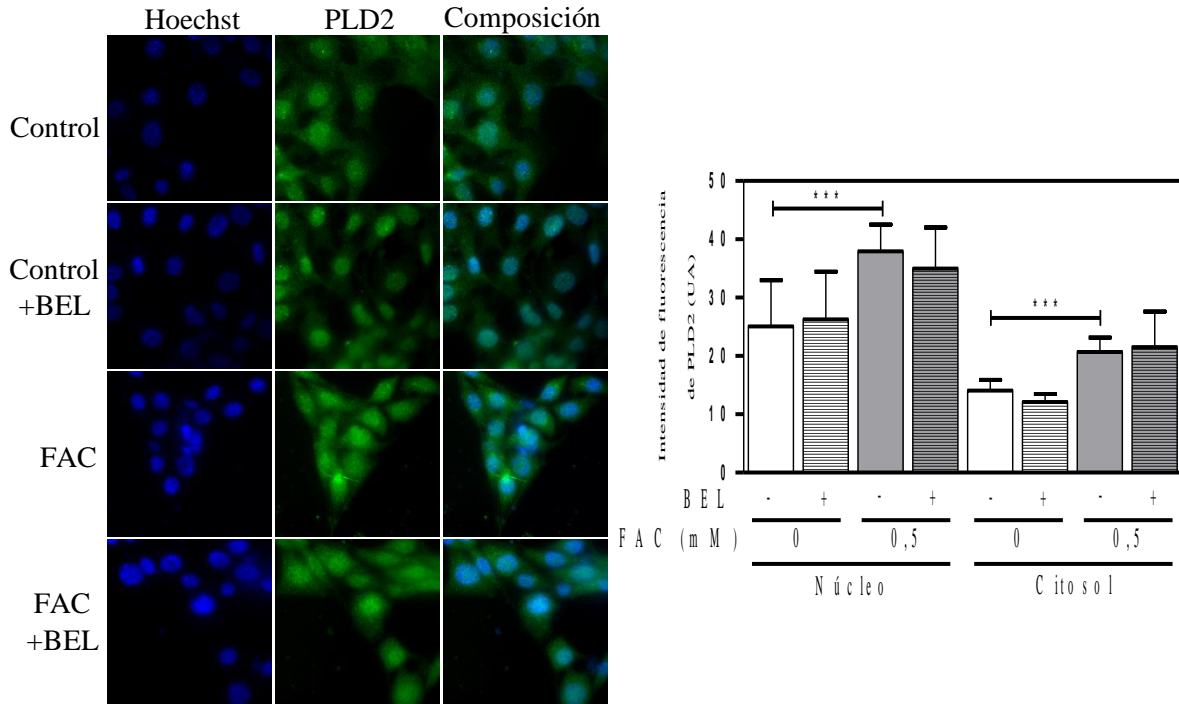


respuesta a la exposición a FAC. La figura muestra que la inhibición de la PLD2 no generó cambios en el nivel de expresión de la iPLA2 (**Figura 32**).

De manera recíproca, se analizó por inmunofluorescencia la expresión de PLD2 en presencia del inhibidor farmacológico de la iPLA2 (BEL). El objetivo de esto último fue determinar la posible participación de la iPLA2 en la regulación de la expresión de la PLD2. La exposición a FAC produjo un incremento en los niveles de expresión de PLD2 (**Figura 33**), al igual que lo observado en la **Figura 30**. Sin embargo, esta expresión no sufrió ningún cambio cuando se incubó con BEL, lo que nos señala, que no parece haber una regulación recíproca y/o directa entre los niveles de expresión de ambas enzimas.



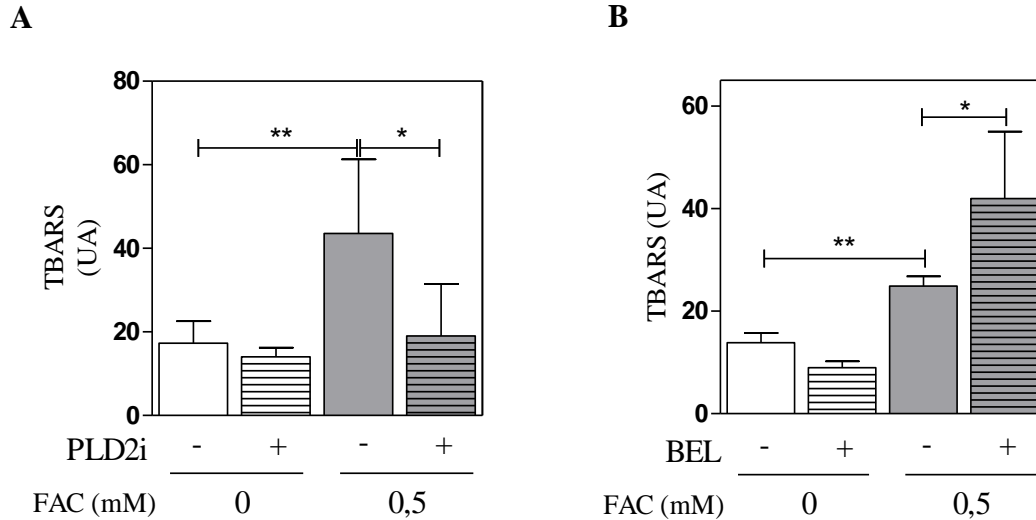
**Figura 32. Evaluación de la expresión de la iPLA2 en presencia del inhibidor de PLD2.** Las células IMR-32 fueron expuestas al inhibidor de la enzima PLD2 (CAY10594, 5  $\mu$ M) 30 minutos antes de la exposición al FAC 0,5 mM, dejándose incubar durante 24 h. El test de ANOVA doble (FAC x PLD2i) no detectó una interacción significativa. \*\*\*  $p < 0.001$ .



**Figura 33. Expresión de la PLD2.** Las células IMR-32 fueron expuestas al inhibidor de la enzima iPLA2 (BEL, 10  $\mu$ M) 30 minutos antes de la exposición al FAC 0,5 mM, dejándose incubar durante 24 h. El test de ANOVA doble (FAC x BEL) no detectó una interacción significativa. \*\*\*  $p < 0.001$ .

A su vez, para evaluar el rol de la PLD2 e iPLA2 en el paradigma oxidativo inducido por FAC, utilizamos los inhibidores farmacológicos específicos para ambas enzimas y, a continuación, cuantificamos la producción de peróxidos lipídicos.

La **Figura 34A** señala que al inhibir la PLD2 los peróxidos lipídicos se redujeron significativamente en un 57 % en presencia del FAC. Por otro lado, la exposición conjunta a FAC y BEL, el inhibidor farmacológico de iPLA2, produjo un incremento en los niveles de peróxidos lipídicos, que fue un 120 % mayor con respecto a las células incubadas únicamente con FAC (**Figura 34B**).



**Figura 34. Evaluación de la participación de la PLD2 e iPLA2 grupo VI en la injuria oxidativa inducida por FAC.** Esta evaluación se llevó a cabo en neuronas IMR-32 previamente expuestas al inhibidor de ambas isoformas (CAY10594, 5  $\mu$ M (A); BEL, 10  $\mu$ M (B)) o su vehículo (DMSO) durante 30 minutos, seguido del tratamiento con FAC (0,5 mM) durante 24 h. A partir de estos tratamientos se midieron los peróxidos lipídicos por el ensayo de TBARS. El test de ANOVA doble (FAC x PLD2i/FAC x BEL) detectó una interacción significativa. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

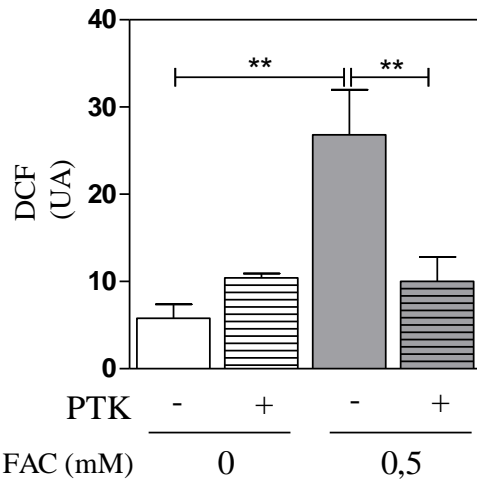
El uso de BEL señala el rol neuroprotector de la iPLA2 en el daño oxidativo, ya que su inhibición aumentó la cantidad de peróxidos lipídicos producidos por la célula en este estado de desbalance redox, en contraposición a lo que ocurre con la PLD2. Estos resultados se corresponden, además, con aquellos expuestos en el capítulo I, en donde la inhibición de iPLA2, produjo una mayor muerte neuronal, un efecto contrario al de ambas isoformas de la PLD.

El EO también puede desencadenar la activación de la cPLA2. La cPLA2 libera mayoritariamente AA (20:4n-6), que a través de la vía de COX-2 es metabolizado a eicosanoides (prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos). Por lo tanto, para indagar si la cPLA2 cumplía algún rol en la respuesta a la exposición a FAC, se utilizó el inhibidor farmacológico de la cPLA2 a concentraciones que también provocaban la inhibición de

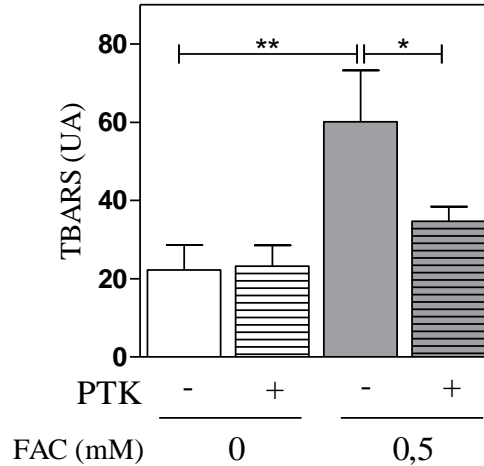
iPLA2 (45  $\mu$ M, PTK). Como se observa en la **Figura 35A** la producción de EROs, al inhibir ambas enzimas, fue un 60 % menor en relación a la exposición a FAC solo.

La inhibición de la actividad de cPLA2 en conjunto con la de iPLA2 en presencia de FAC dio como resultado menores niveles de peróxidos lipídicos, 113 % menor en comparación con la condición sin el inhibidor (**Figura 35B**). Esto nos permite deducir que el efecto global de inhibir ambas isoformas de la PLA2 promovería el daño oxidativo al igual que la PLD2, todos resultados en concordancia con lo concluido para el daño con 6-OHDA en el capítulo

I. **A**



**B**

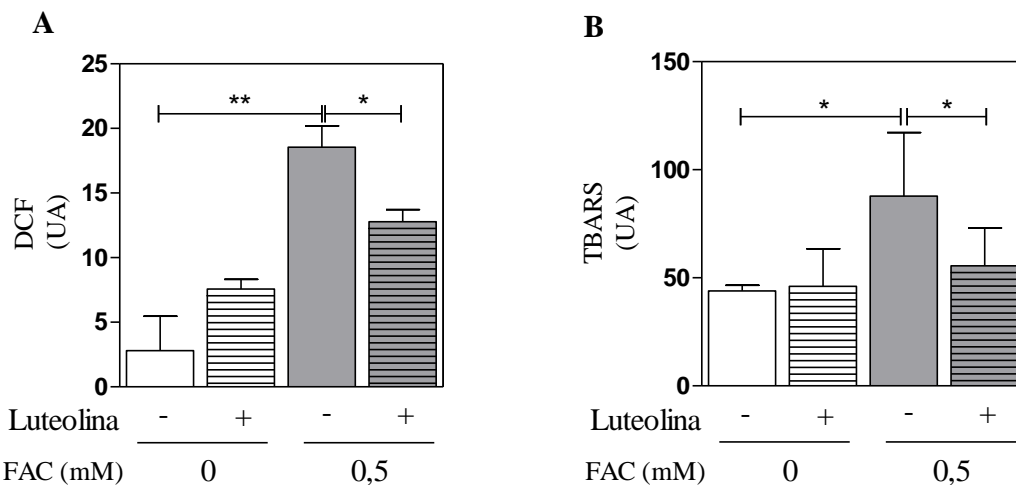


**Figura 35. Evaluación de la participación de la cPLA2 e iPLA2 en la injuria oxidativa inducida por FAC.**

Se llevó a cabo en neuronas IMR-32 previamente expuestas al inhibidor de cPLA2 e iPLA2 (PTK, 45  $\mu$ M) o su vehículo (DMSO) durante 30 minutos, seguido del tratamiento con FAC (0,5 mM) durante 24 h. A partir de estos tratamientos, se midieron las EROs a través del ensayo de la DCDHF-DA (**A**) y los peróxidos lipídicos por el ensayo de TBARS (**B**). El test de ANOVA doble (FAC x PTK) detectó una interacción significativa. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

El AA liberado por cPLA2 también puede ser sustrato de la LOX-15, que cataliza la adición de una molécula de  $O_2$  en el carbono de la posición 15 para generar lipoxinas. Utilizando luteolina, un compuesto natural con propiedades antioxidantes e inhibitorias de LOX-15,

evaluamos la respuesta celular a la exposición a FAC (B. McMahon y Godson 2004). La presencia de luteolina fue capaz de disminuir las EROs en presencia de FAC, hecho que podría estar asociado a la supresión de la actividad de LOX-15 (**Figura 36A**). El nivel de peróxidos lipídicos siguió la misma tendencia que se observó en la medición de EROs (**Figura 36B**). De esta manera, la vía de la cPLA2, probablemente ligada a la acción conjunta de la LOX-15, estaría participando en el incremento del EO a través del aumento de las EROs inducido por la exposición al Fe.

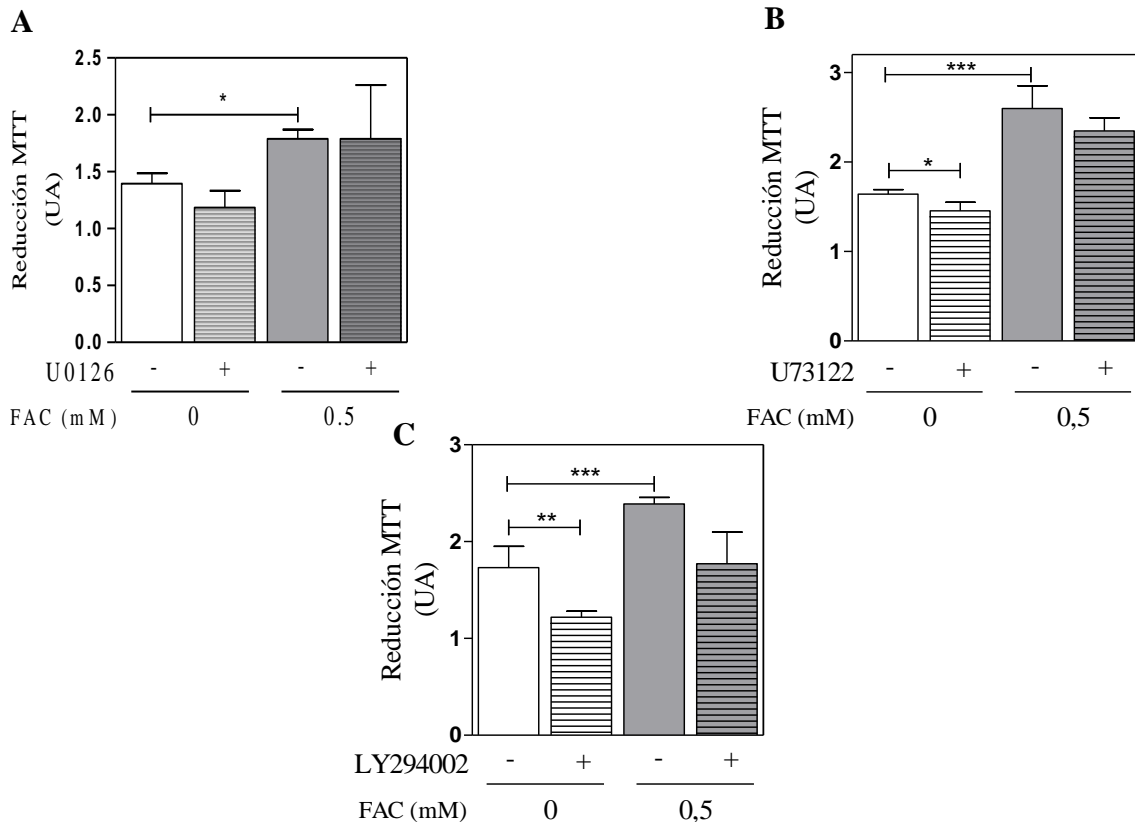


**Figura 36. Evaluación de la participación de la LOX-15 en la injuria oxidativa inducida por FAC.** Esta evaluación se llevó a cabo en neuronas IMR-32 previamente expuestas al inhibidor de la LOX-15 (luteolina, 40  $\mu$ M) o su vehículo (DMSO) durante 25 minutos, seguido del tratamiento con FAC (0,5 mM) durante 24 h. A partir de estos tratamientos, se midieron las EROs por el ensayo de la DCDHF-DA (**A**) y los peróxidos lipídicos por el ensayo de TBARS (**B**). El test de ANOVA doble (FAC x luteolina) detectó una interacción significativa. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

Con el objetivo de profundizar el estudio de la neurotoxicidad mediada por Fe y evaluar si esta implicaba vías de señalización involucradas en la supervivencia y proliferación similares a las que se activaban frente a la 6-OHDA, utilizamos, a continuación, algunos inhibidores

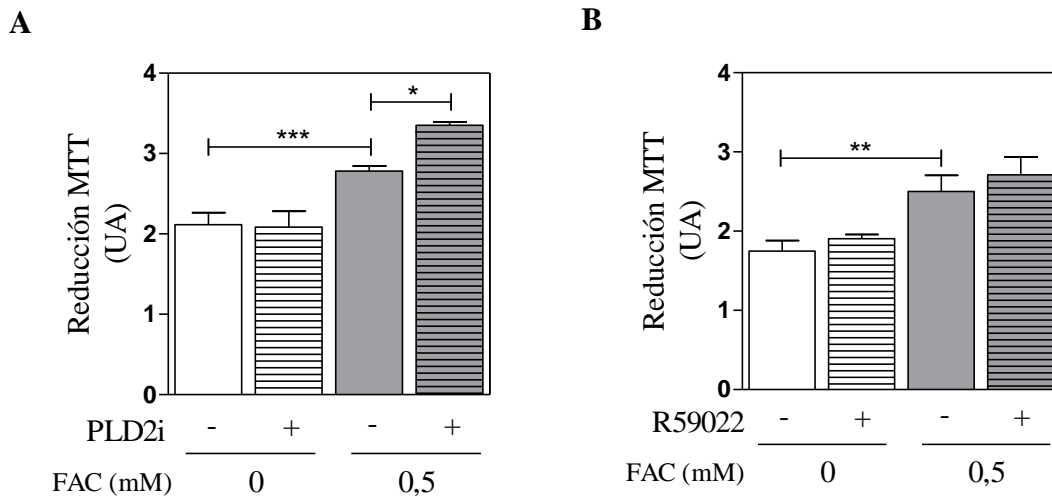
descritos en el capítulo I de esta tesis y realizamos los correspondientes ensayos de viabilidad mitocondrial por la técnica de MTT, al igual que en el capítulo anterior.

Primero, estudiamos aquellas vías canónicas relacionadas con los procesos de proliferación y crecimiento (MAPK) y supervivencia (PI3K/Akt). La incubación con el inhibidor U0126, demostró que la inhibición de MAPK no afectaba la funcionalidad mitocondrial, demostrando así que esta vía no se encuentra activada en los procesos oxidativos generados por FAC (**Figura 37A**). Esto, además, fue corroborado cuando fue inhibida la PLC (U73122), cuya activación involucra la producción de DAG, que a su vez activa a c-Raf/MEK/ERK a través de su unión con Ras. En efecto, la inhibición de la PLC no alteró la viabilidad mitocondrial en presencia de FAC (**Figura 37B**). Con respecto a la vía PI3K/Akt, su inhibición en presencia de FAC no provocó cambios significativos en la viabilidad mitocondrial (**Figura 37C**).



**Figura 37. Efectos de la inhibición de las MAPK, PLC y PI3K en la viabilidad celular.** Se realizó el ensayo de reducción de MTT tras haber inhibido las MAPK con 10  $\mu$ M de U0126 (A), la PLC con 10  $\mu$ M de U73122 (B) y la PI3K con 10  $\mu$ M de LY294002 (C). El test de ANOVA doble (FAC x U0126/FAC x U73122/FAC x LY294002) no detectó una interacción significativa.

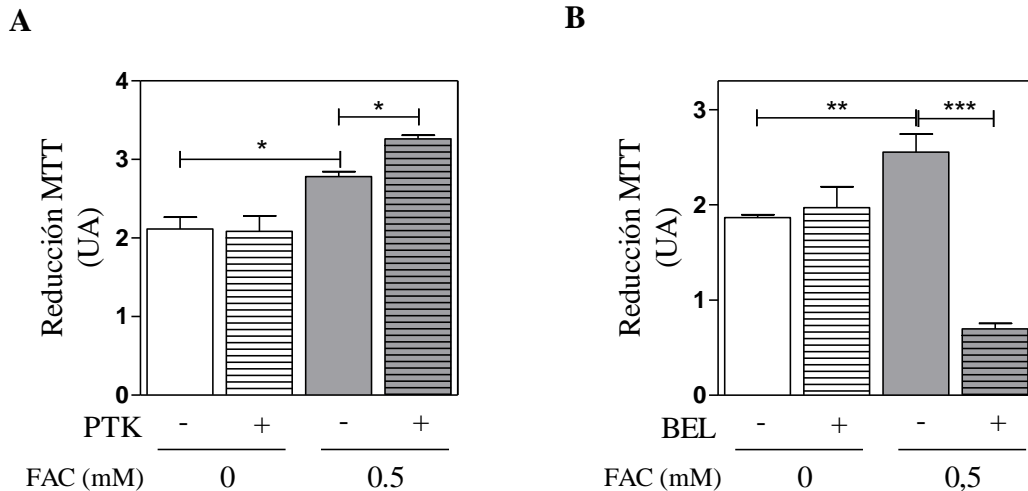
La inhibición de la PLD2 en presencia de FAC indujo un aumento en la viabilidad mitocondrial (**Figura 38A**). Sin embargo, la inhibición de las DAGK, involucradas también en la formación de PA a partir de la fosforilación del DAG, no produjo cambios significativos (**Figura 38B**). Estos datos evidencian que en el daño inducido por el FAC hay una participación del PA a cargo de esta isoforma, algo semejante a lo observado en el capítulo I, en donde demostramos la participación de las dos isoformas como responsables de la promoción del daño inducido por la 6-OHDA.



**Figura 38. Efecto de la inhibición de la producción de PA sobre la viabilidad celular.** Ensayo de reducción de MTT tras la inhibición de la enzima PLD2 con 5  $\mu$ M de CAY10594(A) y las enzimas DAGK con 5  $\mu$ M de R59022 (B). El test de ANOVA doble (FAC x CAY10594) detectó una interacción significativa. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

La viabilidad mitocondrial también mantuvo una clara dependencia de la actividad de las PLA2 frente a la injuria por 6-OHDA. Por este motivo decidimos estudiarla y evaluar su

participación en la viabilidad mitocondrial en presencia de FAC. La inhibición conjunta de la cPLA2 e iPLA2 por PTK generó un aumento en la funcionalidad mitocondrial respecto de la condición con FAC solo (**Figura 39A**). Además, encontramos un importante rol de la iPLA2 en el mantenimiento de la viabilidad mitocondrial, dada la pérdida *cuasi* completa de la funcionalidad mitocondrial en presencia de BEL (**Figura 39B**). Esto indica que la célula depende muy estrechamente del funcionamiento correcto del subtipo iPLA2.



**Figura 39. Efecto de la inhibición de cPLA2 e iPLA2 sobre la viabilidad celular.** Ensayo de reducción de MTT tras la inhibición de la enzima cPLA2 con 45  $\mu$ M de PTK(A) e iPLA2 grupo VI con 10  $\mu$ M de BEL (B). El test de ANOVA doble (FAC x PTK/FAC x BEL) detectó una interacción significativa. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

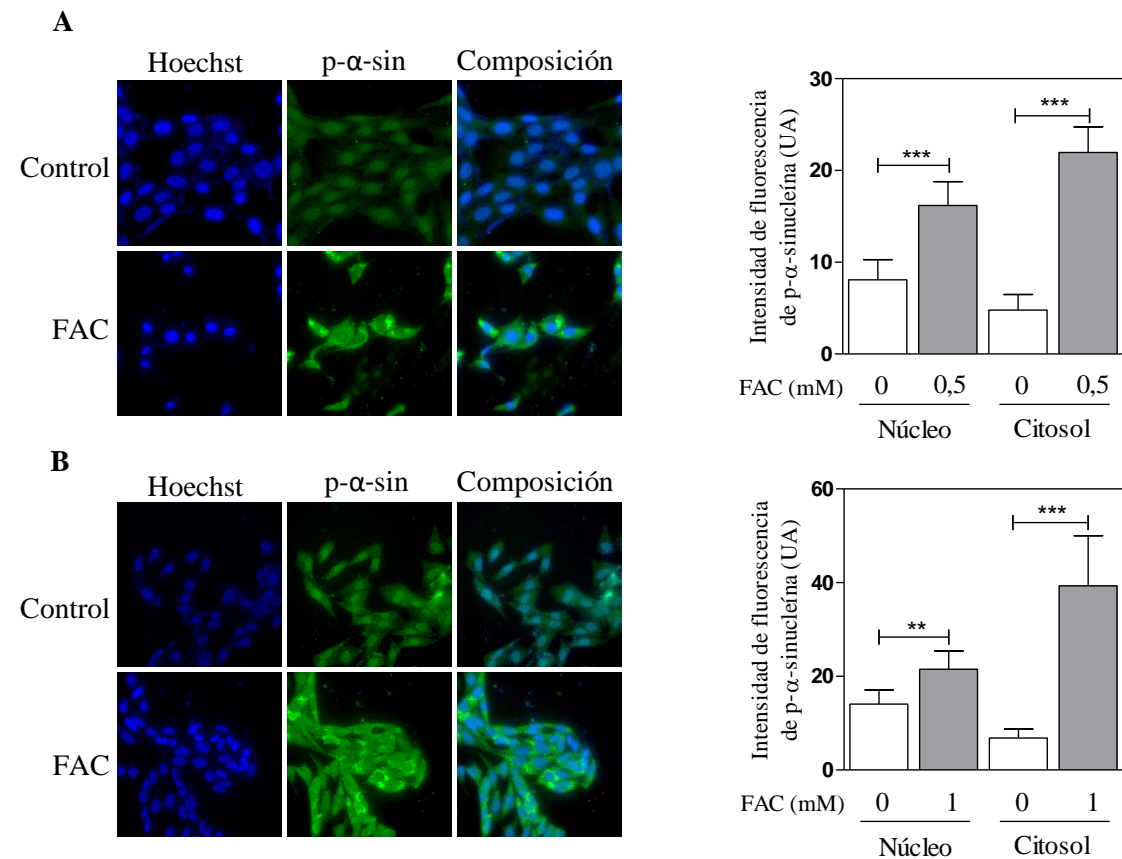
Estos resultados obtenidos demuestran que las vías implicadas en los mecanismos de respuesta a ambos agentes injuriantes (6-OHDA y FAC) son comunes y probablemente constituyan un elemento de respuesta canónico al EO.

### 3. Modulación de la fosforilación de $\alpha$ -sinucleína

Estudios *in vitro* han demostrado que la exposición a ciertos metales podría producir cambios en la conformación de la  $\alpha$ -sinucleína (D. R. Brown 2007), acelerando su fosforilación. Considerando el rol preponderante que juega el Fe y su relación con la dopamina en el



metabolismo oxidativo en la EP, nos pareció adecuado investigar la relación entre la exposición a FAC y la fosforilación de la  $\alpha$ -sinucleína. Por ende, se evaluó la fosforilación en Ser 129 de esta proteína. Luego de 24 h de exposición a 0,5 mM de FAC, la fosforilación de la  $\alpha$ -sinucleína fue claramente afectada (**Figura 40A**), mostrando un perfil inverso al observado en los controles, ya que en estos, los mayores niveles de fosforilación se observaban en el compartimento nuclear, mientras que en presencia de FAC existía un mayor nivel de fosforilación en el compartimento citosólico. No obstante el cambio en la localización, la cuantificación muestra que los niveles totales de fosforilación fueron mucho mayores en las células que estaban expuestas al FAC, con un incremento del 63 % en el núcleo y 188 % en el citosol. Estos resultados también fueron corroborados en las neuronas N27 en presencia de 1 mM de FAC durante 24 h, con incrementos en núcleo y en el citosol también significativos (**Figura 40B**). Estos hallazgos indican claramente que la exposición a FAC induce la fosforilación de la  $\alpha$ -sinucleína.



**Figura 40. Fosforilación de la proteína  $\alpha$ -sinucleína en presencia de FAC.** Evaluación realizada en neuronas expuestas a insulto oxidativo mediado por FAC durante 24 h. **(A)** Fosforilación de la proteína  $\alpha$ -sinucleína en neuronas IMR-32, analizada por microscopía de fluorescencia. **(B)** Fosforilación de la proteína  $\alpha$ -sinucleína en neuronas N27, analizada por microscopía de fluorescencia. El test de ANOVA a una vía reveló diferencias significativas. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

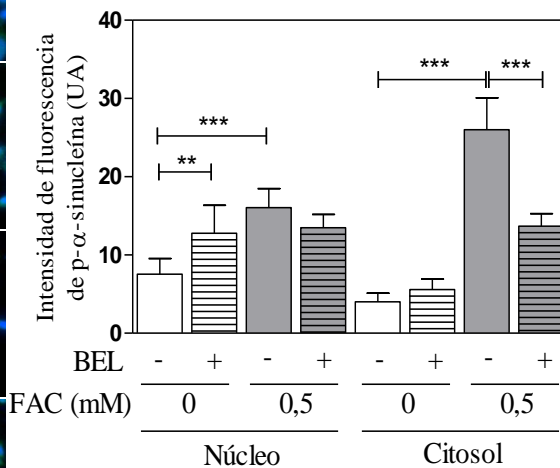
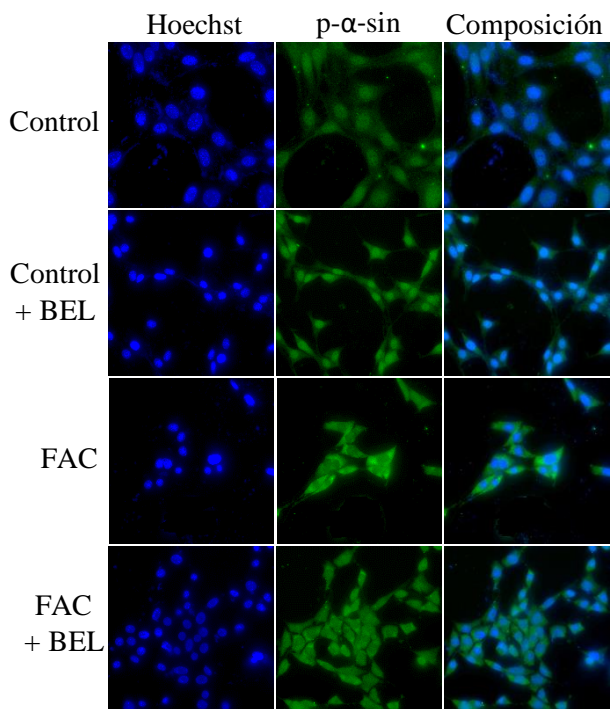
La participación de la cPLA2, iPLA2 y la PLD2 en respuesta a la injuria oxidativa disparada por Fe pareciera ocurrir a través de distintos mecanismos. Por consiguiente, a fin de identificar si la activación de estas enzimas estaba involucrada en el cambio de la fosforilación del residuo Ser 129 de la  $\alpha$ -sinucleína, se evaluaron los niveles de p- $\alpha$ -sinucleína en presencia de FAC y de los inhibidores correspondientes a cada una de estas enzimas (BEL, PTK, CAY10594).

En neuronas expuestas a 0,5 mM de FAC, la inhibición de iPLA2 previno el aumento de la fosforilación de  $\alpha$ -sinucleína (**Figura 41A**). La disminución en la fosforilación de la  $\alpha$ -sinucleína también se observó cuando se inhibieron la cPLA2 e iPLA2 con 45  $\mu$ M de PTK, con un descenso tanto en el núcleo (43 %) como en el citosol (52 %) (**Figura 41B**).

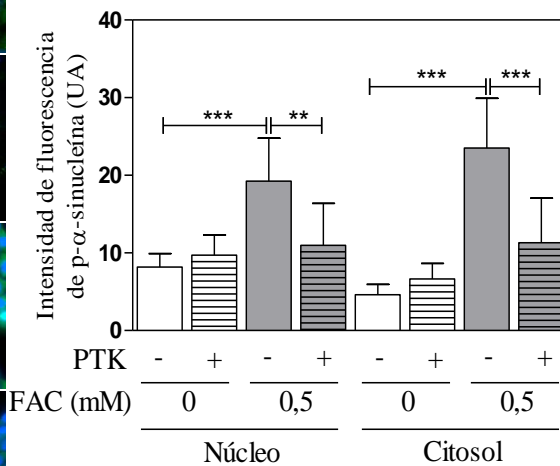
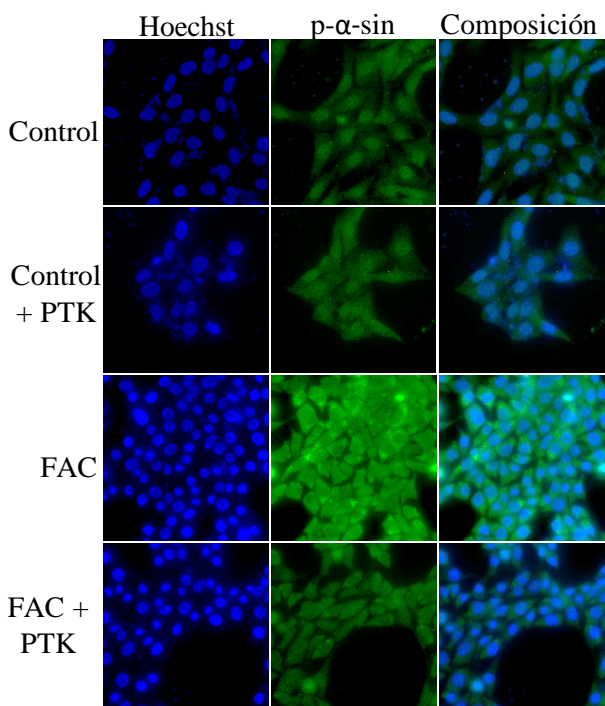
Estos resultados pusieron de relieve algunas diferencias entre la inhibición de las dos PLA2. Primero, que la inhibición de iPLA2 en presencia de FAC produjo una menor intensidad de la fosforilación de  $\alpha$ -sinucleína en el citosol (con un 48 % menor a la fosforilación observada en neuronas expuestas al FAC únicamente) (**Figura 41A**), mientras que cuando la inhibición se efectuaba sobre la cPLA2 e iPLA2, este descenso en los niveles de fosforilación ocurría tanto en los compartimentos citosólicos y nucleares. Por otra parte, a diferencia de la inhibición conjunta de la cPLA2 e iPLA2, la inhibición de la enzima iPLA2 en ausencia de

FAC significó una distribución diferente, con un mayor porcentaje de la fosforilación de la  $\alpha$ -sinucleína en el núcleo en comparación con los controles tratados con vehículo.

**A**



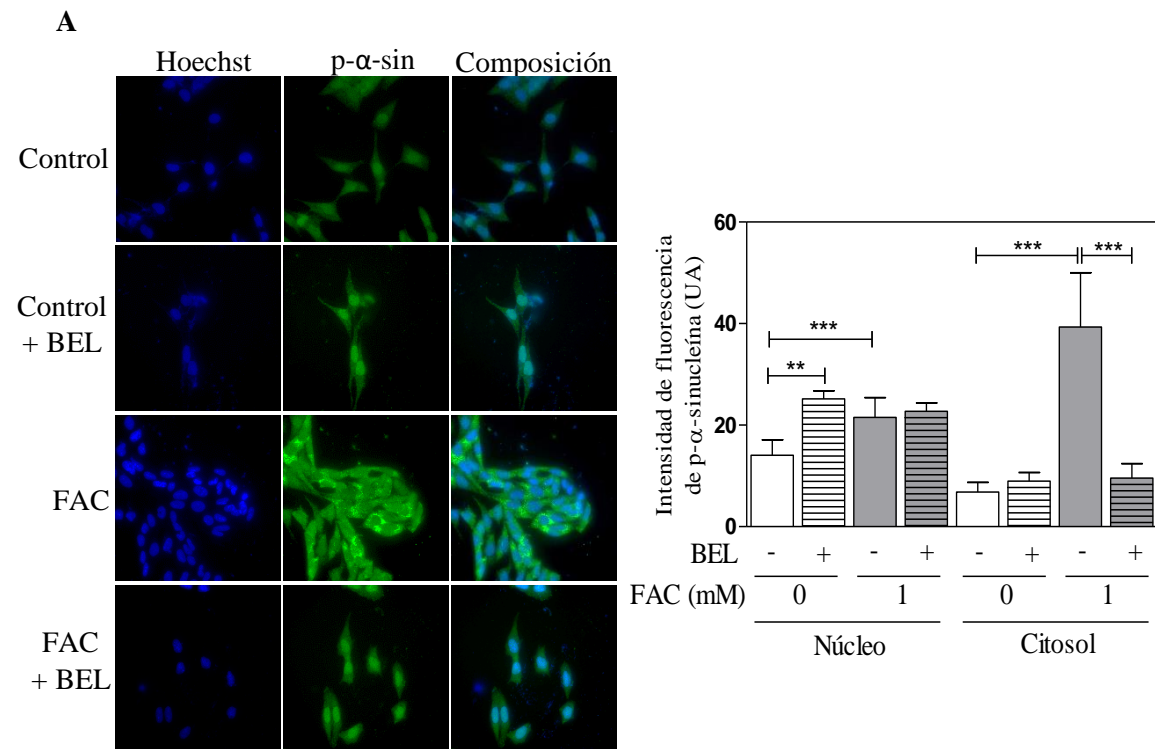
**B**

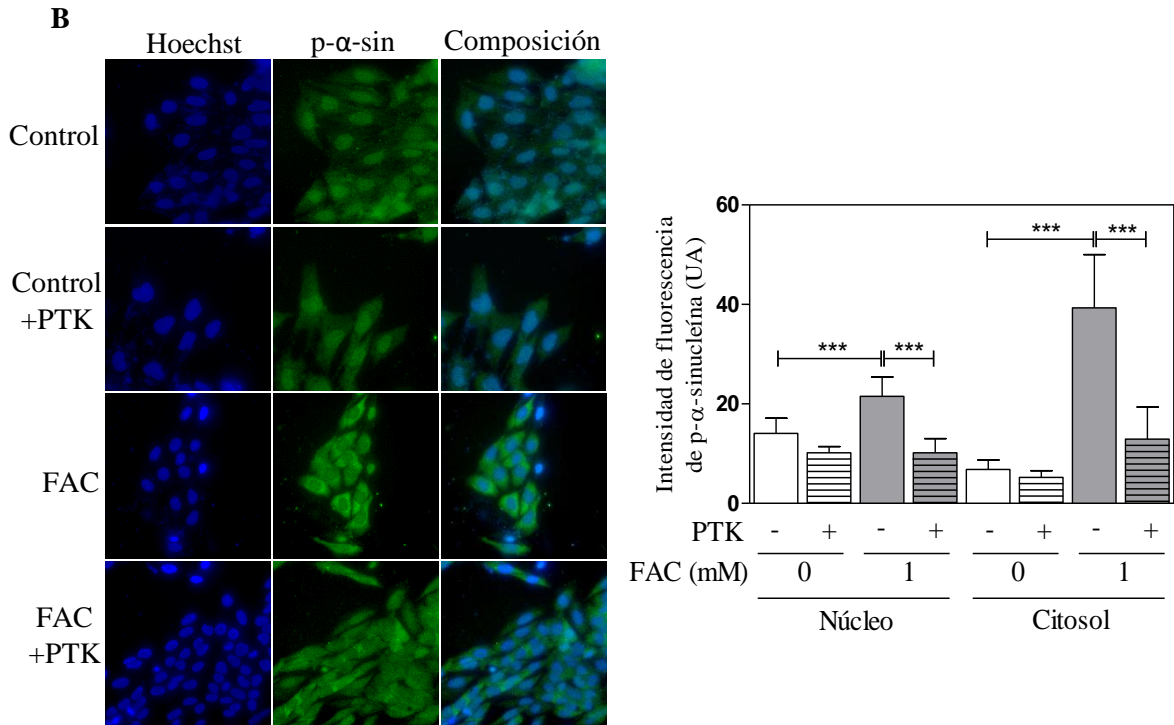


**Figura 41. Fosforilación de la  $\alpha$ -sinucleína en presencia de FAC e inhibidores de iPLA2.** Las células IMR-32 fueron expuestas al inhibidor de la enzima iPLA2 grupo VI (BEL, 10  $\mu$ M) (A) y de la cPLA2 e iPLA2 grupo VI (PTK, 45  $\mu$ M) (B) 30 minutos antes de la exposición al FAC 0,5 mM, dejándose incubar durante 24 h. El test de ANOVA doble (FAC x BEL/FAC x PTK) detectó una interacción significativa. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

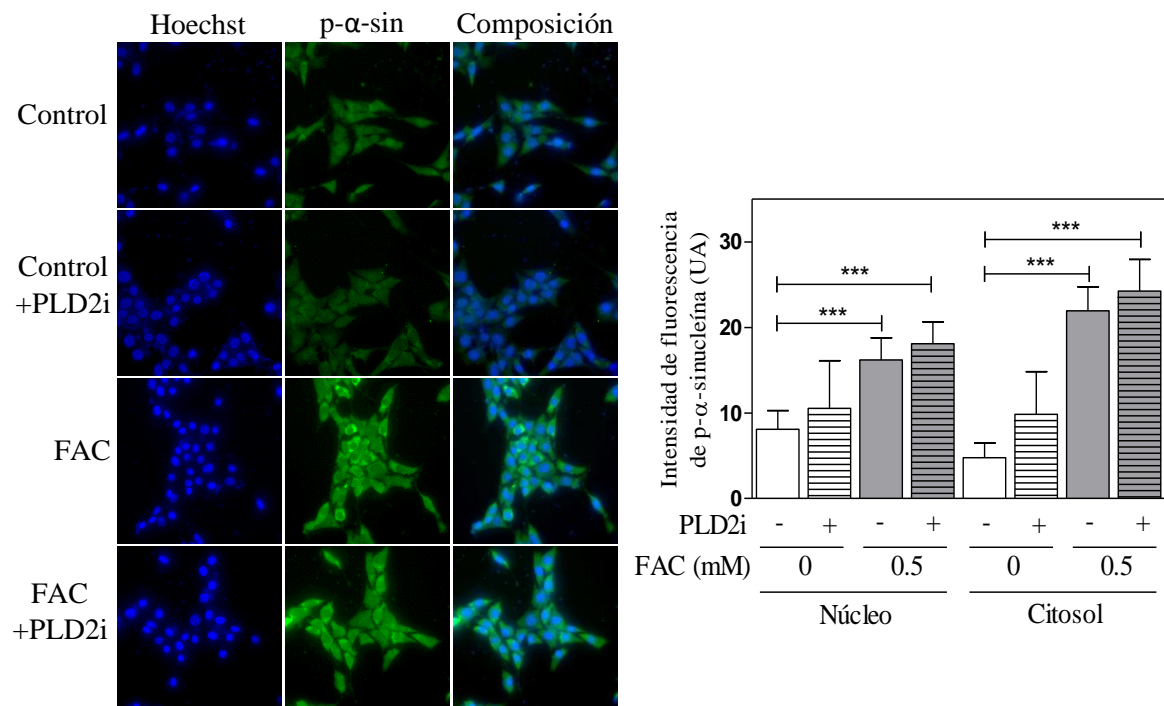
La inhibición de las enzimas iPLA2, y cPLA2 e iPLA2 en las neuronas N27 expuestas a FAC 1 mM produjo resultados similares a lo observado en las células IMR-32 con respecto a los niveles de fosforilación de la  $\alpha$ -sinucleína. (Figura 42A y B).

Con respecto a la isoforma 2 de la PLD, la inhibición con 5  $\mu$ M de CAY10594, no logró alterar el aumento observado en la fosforilación de  $\alpha$ -sinucleína observado en presencia de FAC (Figura 43).





**Figura 42. Fosforilación de la  $\alpha$ -sinucleína en presencia de FAC y de BEL y PTK en neuronas N27.** Las células N27 fueron expuestas al inhibidor de la enzima iPLA2 grupo VI (BEL, 10  $\mu$ M) (A) y de la cPLA2 e iPLA2 (PTK, 45  $\mu$ M) (B) 30 minutos antes de la exposición al FAC 1 mM, dejándose incubar durante 24 h. El test de ANOVA doble (FAC x BEL/FAC x PTK) detectó una interacción significativa. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

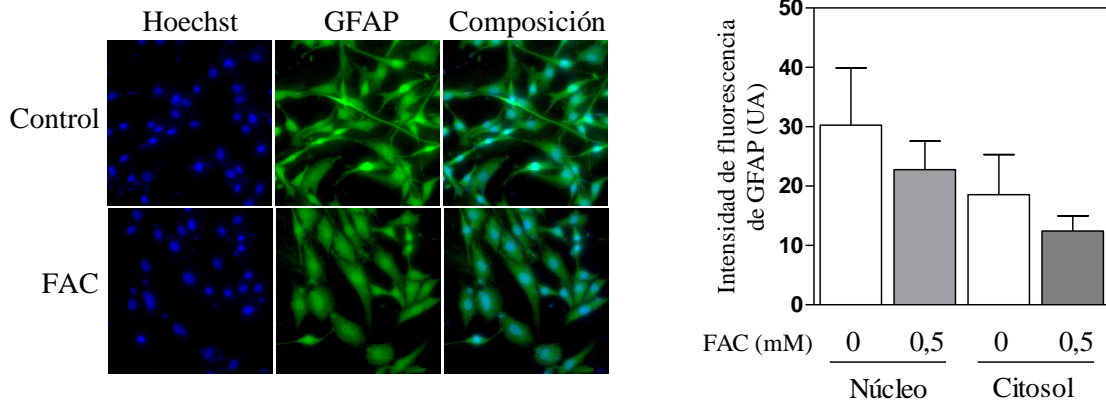


**Figura 43. Fosforilación de la  $\alpha$ -sinucleína en presencia de FAC e inhibidor de PLD2.** Las células IMR-32 fueron expuestas al inhibidor de la enzima PLD2 30 minutos antes de la exposición a FAC 0,5 mM durante 24 h. El test de ANOVA doble (FAC x PLD2i) no detectó una interacción significativa. \*\*\*  $p < 0,001$ .

#### **4. Efectos de medios condicionados de células astrogiales expuestas al FAC sobre cultivos neuronales**

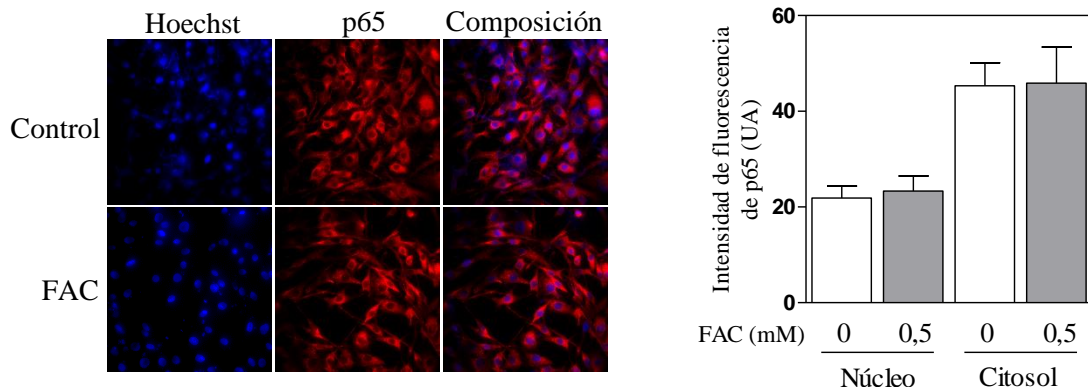
Dado que uno de los aspectos claves de la neuroinflamación en la patofisiología de la EP es la presencia de astrocitos reactivos, profundizamos nuestro estudio sobre la injuria neuronal inducida por Fe a través del uso de medios condicionados provenientes de células astrogiales expuestas a FAC. El objetivo de esta estrategia experimental fue estudiar la señalización cruzada entre las neuronas y los astrocitos.

En primer lugar, caracterizamos la respuesta astrocítica al Fe, a través de marcadores de astrogliosis propios de estas células y disparadores de la respuesta antioxidante. Empezamos evaluando la expresión de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) en los astrocitos. La GFAP es una proteína correspondiente a los filamentos intermedios del citoesqueleto, con un diámetro de 8-9 nm y que está presente principalmente en los astrocitos. La GFAP parece no tener una contribución especial en el sistema nervioso en condiciones normales, pero juega un papel vital en la formación de la cicatriz glial y la activación de los astrocitos (Eng *et al.* 2000; Pekny *et al.* 1995; Pekny y Pekna 2004). Es sabido que esta última inhibe la respuesta inflamatoria después de una injuria, limitando efectivamente el daño mediante la circunscripción a una región controlada (Faulkner *et al.* 2004). Cuando los astrocitos fueron tratados con FAC 0,5 mM, los niveles de expresión de GFAP fueron similares a los de la condición control (**Figura 44**).



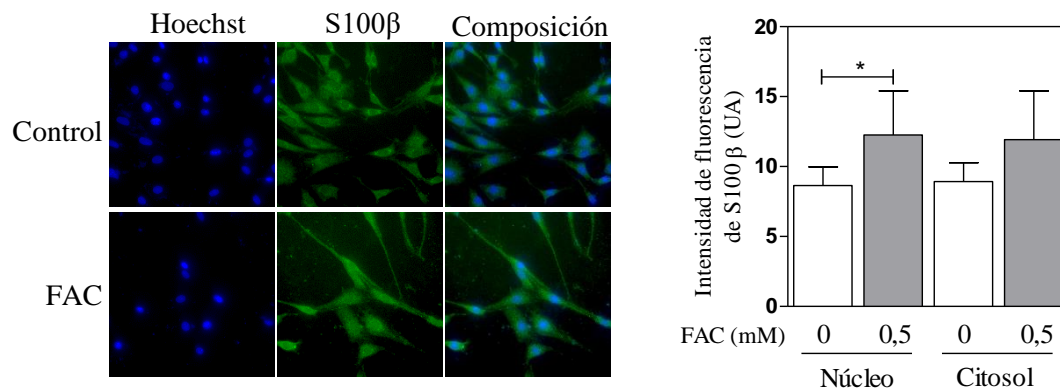
**Figura 44. Evaluación de la expresión de GFAP en el estímulo inducido por FAC.** Marcación con el anticuerpo fluorescente dirigido contra la proteína GFAP, y cuantificación de la expresión cuando las células C6 de astrocitos fueron expuestas a FAC 0,5 mM o su vehículo durante 24 h. El test de ANOVA a una vía no reveló diferencias significativas.

A continuación, decidimos estudiar otro tipo de proteína implicada en la activación de los astrocitos. Para ello evaluamos la expresión de p65, la subunidad mayor de NF- $\kappa$ B, un factor de transcripción responsable de regular genes pro-inflamatorios cuya expresión en los astrocitos es patognomónica de la activación de este tipo celular. De acuerdo con la **Figura 45**, no existe un incremento en la señal de la subunidad p65, ni se observan cambios en su localización subcelular tras la incubación en presencia de FAC.



**Figura 45. Evaluación de la expresión de la subunidad p65 del NF- $\kappa$ B en astrocitos C6.** Esta evaluación se realizó por microscopía de fluorescencia en neuronas expuestas al insulto oxidativo mediado por FAC (0,5 mM) durante 24 h. El test de ANOVA a una vía no reveló diferencias significativas.

Siguiendo con la caracterización de la respuesta al FAC en la expresión de distintos marcadores inherentes a los astrocitos, evaluamos la expresión de la proteína derivada de la glía S100 $\beta$ , la cual puede actuar como un mitógeno o un factor neurotrófico, estimulando la proliferación de las células de la glía o la diferenciación de las neuronas inmaduras cuando es liberada por la astrogliá (Reeves *et al.* 1994). En este caso, al exponer los astrocitos a FAC 0,5 mM, pudimos detectar que el núcleo contaba con un nivel mayor de expresión de S100 $\beta$  que en las células sin tratar (40 % más en relación al control) (**Figura 46**). Esto podría indicar que el Fe estaría estimulando una respuesta proliferativa para los astrocitos.

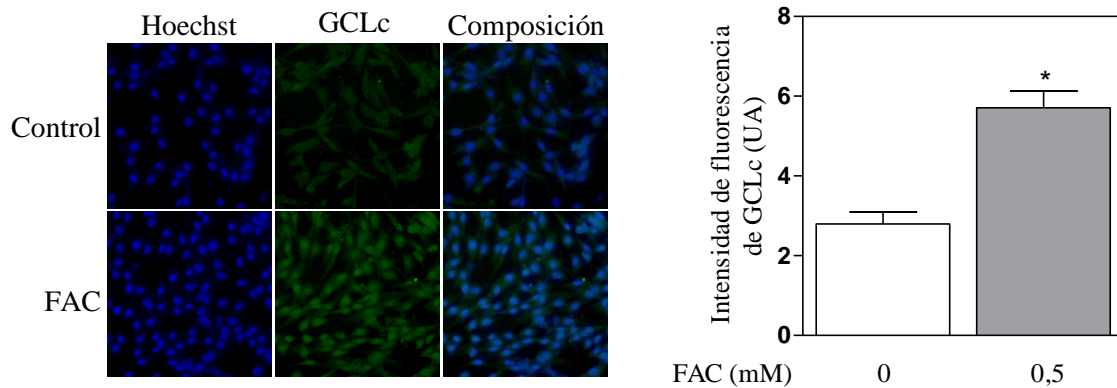


**Figura 46.** Evaluación de la expresión de la proteína marcadora de la glía S100 $\beta$  en astrocitos C6. Esta evaluación se realizó por microscopía de fluorescencia en neuronas expuestas con FAC (0,5 mM) durante 24 h. El test de ANOVA a una vía reveló diferencias significativas. \*  $p < 0,05$ .

*In vivo*, los diferentes tipos de células del cerebro permanecen en un estrecho contacto entre sí. Entre los astrocitos y las neuronas, se produce un intenso intercambio metabólico. Se ha demostrado que en presencia de células astrogliales las neuronas están protegidas contra el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fundamentalmente por la participación del GSH. Cabe señalar que las neuronas sintetizan GSH a partir de un precursor, el dipéptido  $\gamma$ -glutamilcisteína ( $\gamma$ GluCis), el cual es provisto por los astrocitos. Por este motivo, evaluamos la presencia de la enzima  $\gamma$ -glutamilcisteína ligasa (GCL) en astrocitos. Esta enzima es la encargada de sintetizar el

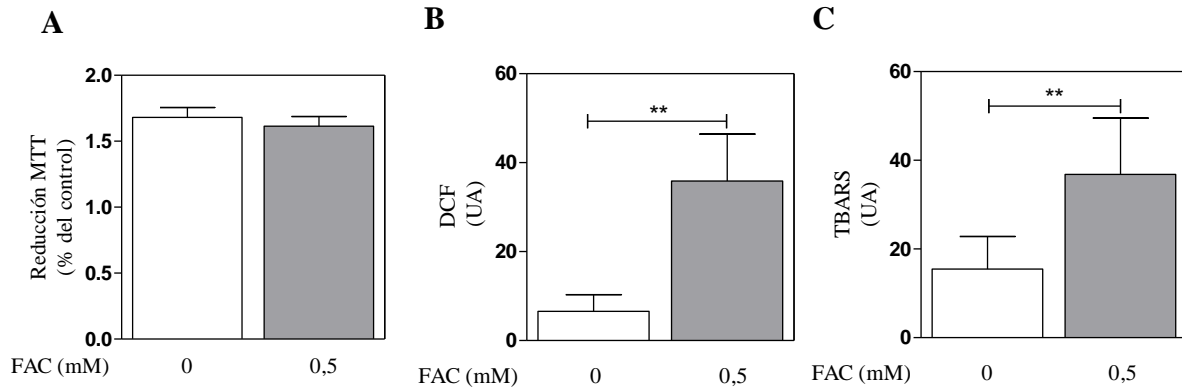


dipéptido que finalmente es provisto a las neuronas. Cabe señalar que este dipéptido puede ser incorporado directamente a las neuronas o bien puede ser clivado (en el espacio intercelular) en sus dos aminoácidos constitutivos, los cuales son incorporados por los transportadores EAAC1 y  $Xc^-$  (Johnson *et al.* 2012). En nuestros experimentos, observamos que la exposición de los astrocitos a FAC 0,5 mM durante 24 h produjo un aumento de un 104 % en los niveles de expresión de esta enzima (**Figura 47**).



**Figura 47. Efecto del FAC en la expresión de GCLc en células C6 de astrocitos.** Las células fueron incubadas 24 h con FAC 0,5 mM, y a continuación se procedió a evaluar los niveles de expresión de la subunidad catalítica de la enzima GCL. Para ello, mediante inmunocitoquímica, se marcó la enzima con un anticuerpo secundario específico unido a un fluoróforo verde y se visualizó la señal en un microscopio de fluorescencia. El test t de Student reveló diferencias significativas. \*  $p < 0,05$ .

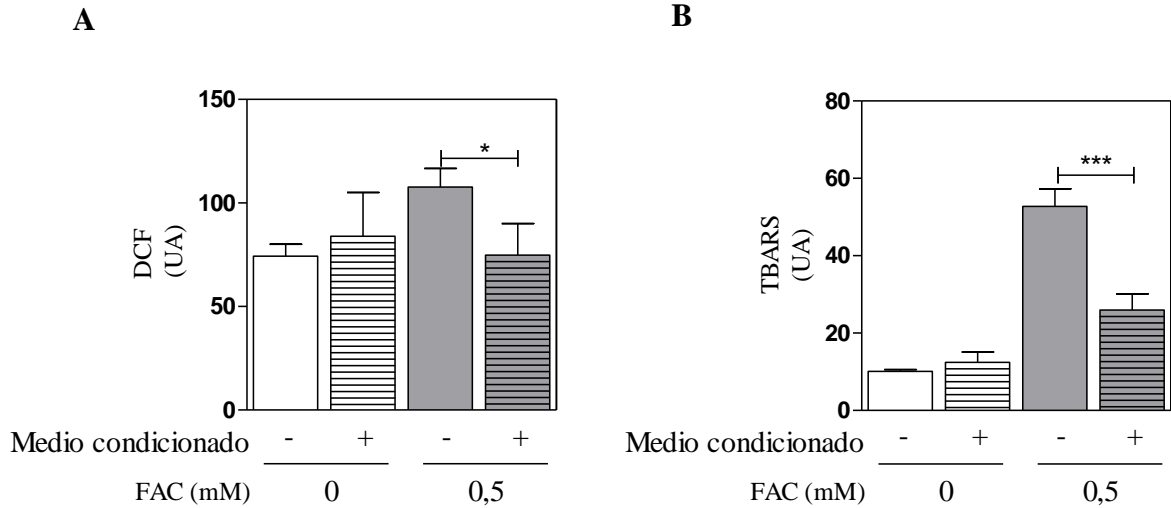
Para evaluar la viabilidad mitocondrial, expusimos a estas células gliales a FAC 0,5 mM durante 24 h. No se observaron cambios entre la condición control y la tratada con FAC (**Figura 48A**). Al igual que con lo efectuado en las neuronas, evaluamos la formación de EROs a través del ensayo de la DCDHF-DA y la formación de peróxidos lipídicos por el ensayo de TBARS. Los astrocitos mostraron una respuesta similar a las neuronas, dada por el incremento tanto de las EROs (**Figura 48B**) como de los peróxidos lipídicos (**Figura 48C**), en un 445 % y un 139 % en relación al control, respectivamente.



**Figura 48. Caracterización del daño oxidativo inducido por FAC.** Determinación de la reducción de MTT (A), formación de EROs por el ensayo de la DCDHF-DA (B) y niveles de peroxidación lipídica mediante la técnica de TBARS (C) en células astrocíticas C6 expuestas a FAC 0,5 mM durante 24 h. El test t de Student reveló diferencias significativas. \*\*  $p < 0,01$ .

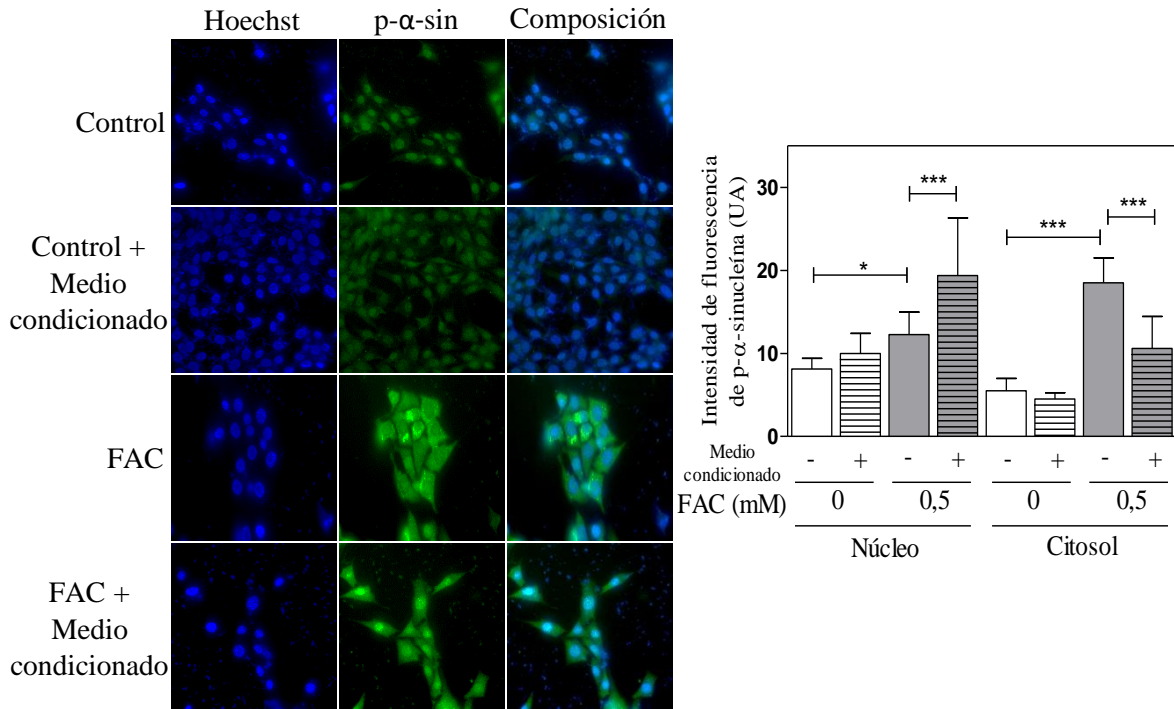
Para determinar el efecto que producirían los astrocitos incubados con FAC sobre las neuronas, decidimos incubar las neuronas en presencia del medio proveniente de astrocitos expuestos durante 24 h a FAC (medio condicionado de astrocitos) y comparar con neuronas a las cuales no se les adicionó este medio, pero que sí fueron incubadas 24 h con FAC. El mismo procedimiento fue efectuado en las situaciones control, difiriendo en que el medio condicionado, en vez de recibir FAC, fue incubado con su vehículo, lo mismo que los controles en los que no se agregó el medio condicionado. Luego del tratamiento referido, procedimos a evaluar los marcadores de daño oxidativo anteriormente descritos.

Lo que se observó fue que la exposición de las neuronas al medio condicionado proveniente de los astrocitos C6 previamente tratados con FAC 0,5 mM durante 24 h disminuyó significativamente los niveles de EROs en un 29 % (**Figura 49A**) y de peróxidos lipídicos en un 50 % (**Figura 49B**) en relación a los grupos de neuronas que no recibieron este tratamiento, sino que fueron incubadas 24 h con FAC agregado en el medio neuronal en el cual fueron sembradas.



**Figura 49. Efecto del medio condicionado de astrocitos C6 en la injuria oxidativa de las neuronas IMR-32.** Determinación de los peróxidos lipídicos por medio del ensayo de TBARS (A) y las sustancias oxidantes con la sonda DCDHF-DA (B) luego de la exposición de las neuronas con o sin medios condicionados de astrocitos en presencia y ausencia de FAC 0,5 mM, luego de 24 h de exposición. El test de ANOVA doble (FAC x medio condicionado) detectó una interacción significativa. \*  $p < 0,05$ .

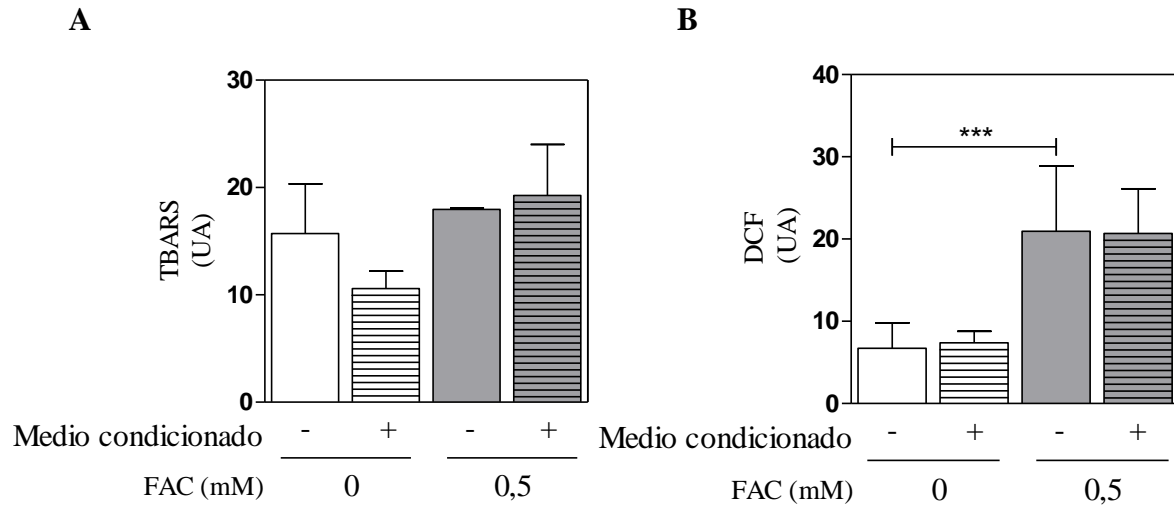
Para continuar el estudio sobre el rol del medio condicionado de los astrocitos con FAC en las células IMR-32, decidimos evaluar cómo se hallaban los niveles de fosforilación de  $\alpha$ -sinucleína. Cabe destacar que la fosforilación de la  $\alpha$ -sinucleína en su residuo 129 es necesaria para su degradación y recambio en respuesta a una acumulación perjudicial para la célula. Los estudios de inmunocitoquímica revelaron que cuando las neuronas IMR-32 fueron expuestas durante 24 h al medio condicionado de los astrocitos en presencia de FAC, los niveles de fosforilación en el residuo Ser 129 fueron reducidos en un 37 % en el compartimiento citosólico, en comparación con las neuronas incubadas con FAC únicamente (**Figura 50**). Por otro lado, en el núcleo se observó un aumento del 105 % en la fosforilación, cuando se agregaban los medios condicionados con FAC.



**Figura 50. Evaluación del efecto de los medios condicionados de astrocitos en la fosforilación de  $\alpha$ -sinucleína de las neuronas.** Las neuronas IMR-32 fueron incubadas en presencia o ausencia de medios provenientes de las células C6 de astrocitos, en presencia o ausencia de FAC, y se determinaron los niveles de fosforilación de la  $\alpha$ -sinucleína por microscopía de fluorescencia. El test de ANOVA doble (FAC x medio condicionado) detectó una interacción significativa. \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

Para finalizar, quisimos corroborar la respuesta al EO frente a los medios condicionados utilizando neuronas N27, porque tanto estas neuronas como las células astrocitarias, son provenientes de rata, y de esta manera asegurarnos una mayor confiabilidad y seguridad en la interpretación de los resultados. A partir de esto, nos enfocamos principalmente en estudiar como marcador de daño oxidativo el grado de peroxidación lipídica en la célula. La exposición de las neuronas N27 al medio condicionado de astrocitos incubados con FAC 0,5 mM durante 24 h no produjo cambios en los niveles de peróxidos lipídicos neuronales (**Figura 51A**). Por otro lado, tampoco se observaron diferencias significativas en los niveles de EROs ni de peróxidos lipídicos en las neuronas incubadas con el medio condicionado

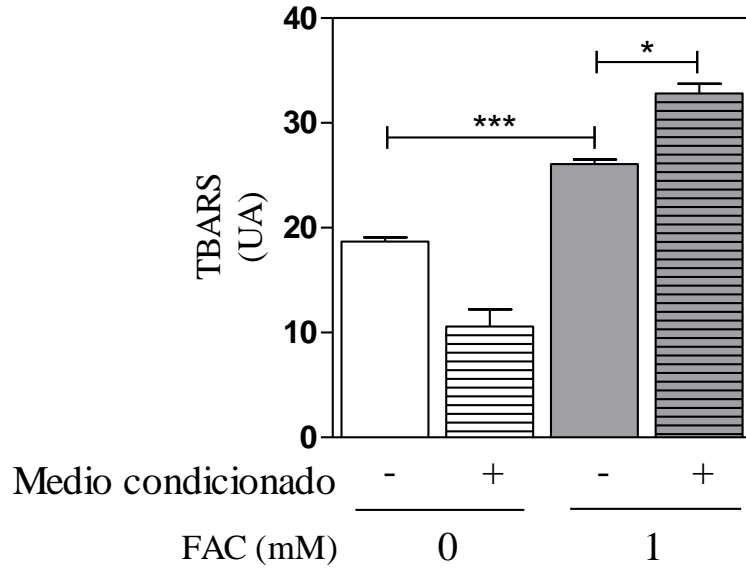
proveniente de astrocitos incubados con FAC en relación a los grupos de neuronas incubadas con FAC que no recibieron este tratamiento (**Figura 51B**).



**Figura 51. Efecto del medio condicionado de astrocitos C6 en la injuria oxidativa de las neuronas N27.**

Determinación de los peróxidos lipídicos por medio del ensayo de TBARS (**A**) y las sustancias oxidantes con la sonda DCDHF-DA (**B**) luego de la exposición de las neuronas con o sin medios condicionados de astrocitos en presencia y ausencia de FAC 0,5 mM, luego de 24 h de exposición. El test de ANOVA doble (FAC x medio condicionado) no detectó una interacción significativa. \*  $p < 0,05$ .

Dado que esta concentración no parecía afectar a las neuronas N27, decidimos incubar los astrocitos en presencia de FAC 1 mM, concentración que utilizamos para efectuar los experimentos con estas células. La exposición de las neuronas N27 a medios condicionados de astrocitos incubados con FAC 1 mM generó un incremento en los niveles de peróxidos lipídicos (176 %), con respecto a las células N27 incubadas con FAC en ausencia del medio condicionado de astrocitos (139 %) (**Figura 52**). Esto nos sugiere que la respuesta que ocasiona el FAC en los astrocitos es otro factor que contribuye a aumentar el EO presente en las neuronas.



**Figura 52. Efecto del medio condicionado de astrocitos C6 en la injuria oxidativa de las neuronas N27.**

Determinación de los peróxidos lipídicos por medio del ensayo de TBARS luego de la exposición de las neuronas con o sin medios condicionados de astrocitos en presencia y ausencia de FAC 1 mM, luego de 24 h de exposición. El test de ANOVA doble (FAC x medio condicionado) detectó una interacción significativa. \*  $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

Por otra parte, es importante mencionar que los astrocitos de la línea C6 son derivados de rata al igual que las neuronas dopaminérgicas N27. Esto podría implicar que las diferencias observadas en la respuesta a los medios condicionados entre las neuronas IMR-32 y la N27 podría deberse a factores intrínsecos de cada especie. Es por ello que para terminar de dilucidar estos mecanismos son necesarios experimentos adicionales.

## DISCUSIÓN-CAPÍTULO II

La disfunción de la homeostasis de iones metálicos (Fe, Cu, Zn) acompañada de EO es un factor clave en la etiopatogenia de las enfermedades neurodegenerativas tales como la EP (Dexter *et al.* 1989). La acumulación de Fe se ha observado en cerebros de pacientes con EP, donde hay un incremento específico de este metal en la SNpc y en el globo pálido lateral (J. Y. Wang *et al.* 2016). Este metal, cuando está en exceso, si no es almacenado por la ferritina en su estado libre, se convierte en un catalizador potente para la formación de especies oxidantes y, de esta manera, incrementa el EO, con el consecuente daño a distintos componentes celulares (Ward *et al.* 2014). En relación a esto, se ha encontrado en la SNpc de pacientes con EP que el núcleo de ferritina que une Fe es mucho más denso, con mayor cantidad de estos iones metálicos unidos a esta proteína, con respecto a sujetos sanos. Esto sugeriría un mecanismo de protección celular frente al EO debido a la acumulación de Fe (Zecca *et al.* 2001).

En nuestro estudio *in vitro*, cuando las células IMR-32 fueron expuestas a concentraciones crecientes de FAC (0,3-1 mM) por diferentes períodos de tiempo no presentaron daño mitocondrial. Al contrario, en la mayoría de los tratamientos las células fueron capaces de responder a esta sobrecarga de Fe con un incremento en la funcionalidad mitocondrial. Resultados similares fueron observados en otros estudios utilizando células de diferente linaje, como las del epitelio pigmentario de la retina, expuestas al mismo compuesto (Voloboueva *et al.* 2007). No obstante, los niveles de peróxidos lipídicos registraron un aumento en la mayoría de las condiciones, indicando que la exposición a FAC dispara un fenómeno pro-oxidante sin alteración de la viabilidad mitocondrial. Similares observaciones se obtuvieron en neuronas dopaminérgicas N27 al ser expuestas a FAC. Esto representa una

diferencia con las observaciones realizadas para la 6-OHDA (capítulo I), ya que el daño que causa esta neurotoxina es más exacerbado y provoca deterioro en la funcionalidad mitocondrial.

El cerebro presenta altas concentraciones de AG poli-insaturados tales como el AA y el DHA que, al presentar mayor número de dobles ligaduras, son más susceptibles a la peroxidación lipídica, constituyendo un factor importante para la integridad de las membranas celulares. Un mecanismo de reparación clave es el recambio de los AG peroxidados que están esterificados en los fosfolípidos de manera de mantener las características fisicoquímicas de las membranas. La liberación de los AG peroxidados es catalizada por diferentes isoenzimas de la PLA2. La iPLA2 VI participa en la liberación de AG poli-insaturados, entre ellos el DHA (22:6n-3), uno de los mayoritarios en cerebro (Schwab *et al.* 2007; Strokin *et al.* 2003, 2007), pudiendo ser su activación una respuesta neuroprotectora frente al incremento de EO. En nuestro modelo experimental, la exposición a FAC produjo un aumento en la expresión de iPLA2. Es sabido que mutaciones en esta enzima desencadenan un conjunto de trastornos, dentro de lo que se conoce con el nombre de enfermedades de neurodegeneración asociada a fosfolipasa iPLA2VI, que están vinculadas a una acumulación de Fe en el cerebro, produciendo síntomas de tipo Parkinsoniano, en donde cada mutación desencadena un fenotipo particular en cuanto a rasgos inherentes de deficiencia motora (Guo *et al.* 2018). Además, esta isoforma es considerada un factor importante en la EP, ya que la pérdida de su función ha sido asociada con una forma temprana de Parkinsonismo. Esta última cursa con un claro deterioro motor y cognitivo, resultado de una pérdida de la capacidad de la iPLA2 en proteger a las mitocondrias contra estímulos apoptóticos en las neuronas dopaminérgicas,



sumado a una mayor expresión de los transportadores de Fe presentes en la membrana plasmática (Beck *et al.* 2015; Grazia *et al.* 2017; Gui *et al.* 2013).

Otra de nuestras observaciones es el aumento de los niveles de oxidantes celulares y peróxidos lipídicos frente a la inhibición farmacológica de la iPLA2. Esto indicaría que esta enzima, a través de la liberación de AG, en mayor parte DHA, promueve mecanismos de neuroprotección. Los derivados lipídicos que se producen por la metabolización del DHA se llaman, en su conjunto, docosanoides (Bazan *et al.* 2011). Estos metabolitos, no solo antagonizan el efecto de los eicosanoides, sino que cumplen la función de regular negativamente la expresión de citoquinas pro-inflamatorias, así como también modular el tráfico de leucocitos (Schwab *et al.* 2007). Entre las actividades anti-inflamatorias del DHA podemos encontrar la inhibición de la actividad y la expresión de la COX-2 y del NF- $\kappa$ B, entre otras (Soon *et al.* 2009). Asimismo, se ha observado que la suplementación con DHA en modelos experimentales de EP protege a las neuronas dopaminérgicas a través de la inhibición de mecanismos inflamatorios (Cansev *et al.* 2008).

Por otro lado, encontramos que el uso del inhibidor PTK a concentraciones capaces de inhibir tanto la cPLA2 como la iPLA2 contrarresta la generación de oxidantes celulares y peróxidos lipídicos en nuestro modelo experimental en presencia de FAC. Sin embargo, la contrastación de los resultados obtenidos con BEL nos permite deducir que la iPLA2 cumpliría un rol opuesto al de la cPLA2. Cabe señalar que, como mencionamos en el capítulo anterior, la vía de la cPLA2 produce precursores de importantes mediadores lipídicos pro-inflamatorios como las prostaglandinas (A. A. Farooqui *et al.* 2007). En relación a esto, la activación de la cPLA2 por la exposición a FAC podría aumentar la biodisponibilidad de AA y preparar el escenario para una mayor producción de EROs, como se ha visto en otros modelos de la EP

y conforme a lo reportado sobre el mecanismo de acción de esta enzima (C. Kim *et al.* 2008; Lee *et al.* 2010). Los efectos de la luteolina, inhibidor de LOX-15, fueron similares a los ocasionados por la inhibición de la cPLA2. Esto estaría indicando que la producción de los hidroperóxidos lipídicos formados a partir de los AG poli-insaturados estaría siendo inhibida a través de este compuesto. Estos resultados estarían en concordancia con reportes previos, los cuales demuestran que la activación de la LOX-15 está asociada con un aumento en los niveles de peróxidos lipídicos y, por ende, a la muerte celular por apoptosis en neuronas expuestas a toxicidad por glutamato o por inactivación de la enzima glutatión peroxidasa 4 (Seiler *et al.* 2008; Tobaben *et al.* 2011). No podemos dejar de mencionar que la luteolina es un potente antioxidante y por lo tanto sus efectos en nuestro sistema experimental podrían ser debidos a esta propiedad también.

Para complementar los resultados obtenidos con las PLA2 y establecer una correlación con los hallazgos del capítulo I, también caracterizamos las vías de producción de PA en respuesta a la exposición a FAC. La presencia de FAC causó un aumento en la expresión de la PLD2, enzima que en nuestro modelo experimental demostró un rol citotóxico, con participación en la generación de peróxidos lipídicos celulares, no solo en presencia de FAC, sino también en presencia de 6-OHDA (capítulo I). La actividad citotóxica de la PLD2 ha sido demostrada en relación a otras enfermedades neurodegenerativas que, de manera similar a la EP, cursan con la participación esencial de proteínas amiloidogénicas en su etiopatogenia (Oliveira *et al.* 2010).

Seguidamente, evaluamos la posible interrelación entre la PLD2 y la iPLA2. Algunos estudios han aportado datos que indicarían que, al menos de manera indirecta, podría ocurrir una regulación estrecha entre ambas. Nuestros resultados demuestran que la inhibición

farmacológica de PLD2 no afecta la expresión de la iPLA2 inducida por FAC y, del mismo modo, la inhibición de la iPLA2 no provoca cambios en la expresión de PLD2. Por ello, concluimos que ambas enzimas tienen roles independientes una de la otra en la respuesta al EO inducido por FAC.

El Fe también ha sido descrito como un modulador de la  $\alpha$ -sinucleína. La acumulación y agregación patológica de esta proteína es uno de los signos patognomónicos de la EP. Una característica de la  $\alpha$ -sinucleína es que está sujeta a la fosforilación de residuos serina, treonina y tirosina en su extremo C-terminal (Fujiwara *et al.* 2002; Negro *et al.* 2002; Okochi *et al.* 2000; Pronin *et al.* 2000). A su vez, esta misma región es donde esta proteína interacciona con los iones metálicos, además de otras proteínas y ligandos (D. R. Brown 2007; Giasson *et al.* 2003; Hoyer *et al.* 2004). Diversos estudios en cerebros humanos postmortem han revelado que la  $\alpha$ -sinucleína de los cuerpos de Lewy se encuentra hiperfosforilada en el residuo Ser 129. La fosforilación en este sitio también es observada en estadios previos a la formación de los cuerpos de Lewy, aparentemente relacionada con el avance de la enfermedad (Anderson *et al.* 2006; Saito *et al.* 2003). Otros datos obtenidos tanto *in vitro* como *in vivo* apoyan la hipótesis de un efecto inhibitorio de la fosforilación en Ser 129 sobre la unión de la  $\alpha$ -sinucleína a la membrana (Kuwahara *et al.* 2012). Para investigar la posible participación de las cPLA2 e iPLA2 en la regulación de la fosforilación de  $\alpha$ -sinucleína, utilizamos los inhibidores previamente mencionados y evaluamos la modificación post-traduccional del residuo Ser 129 de la  $\alpha$ -sinucleína. Así demostramos que la inhibición de ambas isoformas de PLA2 causa una disminución en la fosforilación de la  $\alpha$ -sinucleína en presencia de FAC. Estos resultados fueron confirmados tanto en las neuronas

IMR-32 como en las N27, hecho que sugiere la conservación de la respuesta en tipos neuronales diferentes.

Cabe señalar que la inhibición de iPLA2 *per se*, sin el agregado de FAC, es capaz de aumentar significativamente la presencia de la forma fosforilada de la  $\alpha$ -sinucleína en el núcleo, mientras que la inhibición de la cPLA2 no altera de manera significativa los niveles de fosforilación de la  $\alpha$ -sinucleína con respecto a los controles. Sin embargo, tanto la inhibición de cPLA2 como la de iPLA2 en presencia de FAC produce una disminución de la forma fosforilada de la  $\alpha$ -sinucleína en el citosol. Estos resultados señalan que ambas isoformas contribuyen a la fosforilación desencadenada por FAC. Esto nos indica que los mayores niveles de fosforilación de la  $\alpha$ -sinucleína requieren tanto del estímulo de Fe como de la acción de la cPLA2 e iPLA2 y que posiblemente estén relacionadas con la liberación de AG.

Dado que la fosforilación de la  $\alpha$ -sinucleína en el residuo Ser 129 se considera un mecanismo de etiquetado, destinado a enviar a esta proteína a la degradación proteosomal y lisosomal (Machiya *et al.* 2010), nuestros resultados sugieren que la fosforilación de la  $\alpha$ -sinucleína en el citosol mediada por las enzimas cPLA2 e iPLA2 podría entonces jugar un rol neuroprotector, conduciendo a la  $\alpha$ -sinucleína a la degradación proteosomal y/o lisosomal mediada por la vía del autofagosoma. En esta misma línea de hallazgos, se ha determinado que la sobre-expresión de la polo-quinasa 2 (PLK2), enzima que cataliza la fosforilación de  $\alpha$ -sinucleína en el residuo Ser 129, induce una mayor degradación de la  $\alpha$ -sinucleína por la vía lisosoma-autofagosoma (Oueslati *et al.* 2013). Por otra parte, otros trabajos sostienen que la fosforilación en ensayos *in vitro* inhibe la fibrillogénesis y que los oligómeros y las fibrillas son buenos sustratos para la acción de diversas quinasas, en especial PLK2, pero también otras como las caseína quinasas y las quinasas receptoras acopladas a proteína G, sugiriendo

que este evento podría ocurrir después de la formación de los cuerpos de Lewy (Paleologou *et al.* 2008; Waxman y Giasson 2011). Es plausible que la fosforilación en el residuo Ser129 sea un proceso activo de defensa contra la agregación de la  $\alpha$ -sinucleína. Sin embargo, otros estudios han sugerido que el reclutamiento de la forma fosforilada de  $\alpha$ -sinucleína en el núcleo estaría relacionada con la reparación del ADN y una menor toxicidad que la forma citosólica (Pinho *et al.* 2019; Schaser *et al.* 2019).

También se ha destacado la importancia de los AG en relación a la capacidad que tienen de inducir cambios en la fosforilación, así como distintos agregados oligoméricos de la  $\alpha$ -sinucleína, generando un cambio en sus propiedades estructurales y funcionales (Fecchio *et al.* 2018). En efecto, ensayos *in vitro* han demostrado que el DHA, y en menor medida el AA, son capaces de inducir la oligomerización de la  $\alpha$ -sinucleína. Además, el DHA es capaz de gobernar los estados conformacionales de la  $\alpha$ -sinucleína, alterando la relación entre la forma libre y asociada a membrana, por la capacidad de este AG de favorecer la estructura de  $\alpha$ -hélice (Alza *et al.* 2019). También se ha demostrado que la suplementación con DHA en células de oligodendroglía es capaz de producir un incremento en la fosforilación del residuo Ser 129 de la  $\alpha$ -sinucleína, asociando esta modificación post-traducciona con una mayor propensión a la agregación de la proteína (Riedel *et al.* 2011). Esto es congruente, en parte, con los resultados obtenidos respecto al rol de la cPLA2 e iPLA2 en la fosforilación de la  $\alpha$ -sinucleína y su posible contribución a los cambios conformacionales que pudieran existir en nuestro modelo.

Por otro lado, la actividad de la PLD2 no parece ser directamente responsable de los cambios en la fosforilación de la  $\alpha$ -sinucleína. No obstante, en un trabajo publicado por nuestro laboratorio en la línea celular IMR-32 con sobreexpresión estable de la  $\alpha$ -sinucleína, se pudo

observar una menor expresión de PLD1, lo que indica también que existe una dependencia entre esta isoforma y la proteína mencionada (Conde *et al.* 2018).

Por otra parte, los niveles de Fe de los astrocitos se han visto incrementados en ciertas neuropatologías como la aceruloplasminemia, a nivel de los pies astrocitarios perivasculares, mientras que en la EP en la región de la SNpc se ha encontrado una elevada astrogliosis (Rouault 2013; Sofroniew y Vinters 2010). En nuestros experimentos, el efecto del exceso del Fe, al igual que lo observado en las neuronas, no produjo un franco daño mitocondrial en los astrocitos, aunque sí un incremento considerable en las especies oxidantes y peróxidos lipídicos. Al evaluar un marcador específico de la astrogliá reactiva, como el GFAP, no encontramos cambios con respecto a las condiciones control. Tampoco hubo cambios en la translocación nuclear de la subunidad p65 del factor de transcripción NF- $\kappa$ B. Sin embargo, detectamos un aumento del factor neurotrófico S100 $\beta$  en respuesta al Fe. El factor S100 $\beta$  es, además, secretado por los astrocitos, o puede incluso liberarse de las células dañadas y detectarse en el espacio extracelular o en el torrente sanguíneo. Durante la última década, S100 $\beta$  se ha considerado como un candidato a ser biomarcador periférico de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica y de la lesión al SNC. Los niveles elevados de S100 $\beta$  reflejan con precisión la presencia de afecciones neuropatológicas que incluyen lesiones traumáticas en la cabeza o enfermedades neurodegenerativas (Michetti *et al.* 2012). Por lo tanto, este aumento de S100 $\beta$  en respuesta al Fe representa un dato que consideramos muy valioso, ya que podría estar indicando una respuesta de activación astrocítica.

Por otro lado, pudimos observar en respuesta al Fe un aumento en los niveles de expresión de la GCL, la enzima limitante en la síntesis de GSH, en células C6. El GSH sintetizado podría ser liberado por los astrocitos y, previo clivaje en el espacio extracelular, ingresar a

las neuronas por los transportadores EAAC1 en la forma de cisteína o como el dipéptido cisteína-glicina (Johnson *et al.* 2012). Además, el Fe en su forma libre dentro de las neuronas es capaz de causar una disminución de los niveles de GSH, principalmente por el daño oxidativo que realiza a través de la reacción de Fenton, obligando a este tripéptido a ser utilizado en mayor medida por las enzimas detoxificadoras como la GPx y a neutralizar las proteínas dañadas por medio de la S-glutationilación, un mecanismo protector de la célula, que impide una oxidación excesiva del residuo cisteína de las proteínas mediante la formación de puentes disulfuro entre la proteína y el GSH (Johnson *et al.* 2012; Ndayisaba *et al.* 2019; Uranga *et al.* 2013).

La incubación durante 24 h de las neuronas IMR-32 con los medios condicionados provenientes de astrocitos ocasionó una disminución en los niveles de las especies oxidantes y peróxidos lipídicos, con respecto a las neuronas expuestas al Fe. Este efecto neuroprotector de los astrocitos podría estar relacionado con la producción de GSH y su liberación al medio extracelular. Esto es coincidente con los hallazgos de Cao y colaboradores que han observado que los medios condicionados provenientes de astrocitos generan una protección de las neuronas contra el daño oxidativo producido por rotenona, a través de una recuperación en los niveles de GSH (Cao *et al.* 2007). Las neuronas expuestas a los medios condicionados con Fe mostraron, además, una menor fosforilación de  $\alpha$ -sinucleína en el citosol, lo cual indica en cierta medida que la batería de mediadores moleculares que liberan los astrocitos podría provocar un restablecimiento de la proteostasis de las formas de  $\alpha$ -sinucleína que pudieran haberse mal plegado y etiquetado para su degradación, o que la expresión se hubiera atenuado (Febbraro *et al.* 2012; Kupersmidt *et al.* 2012).

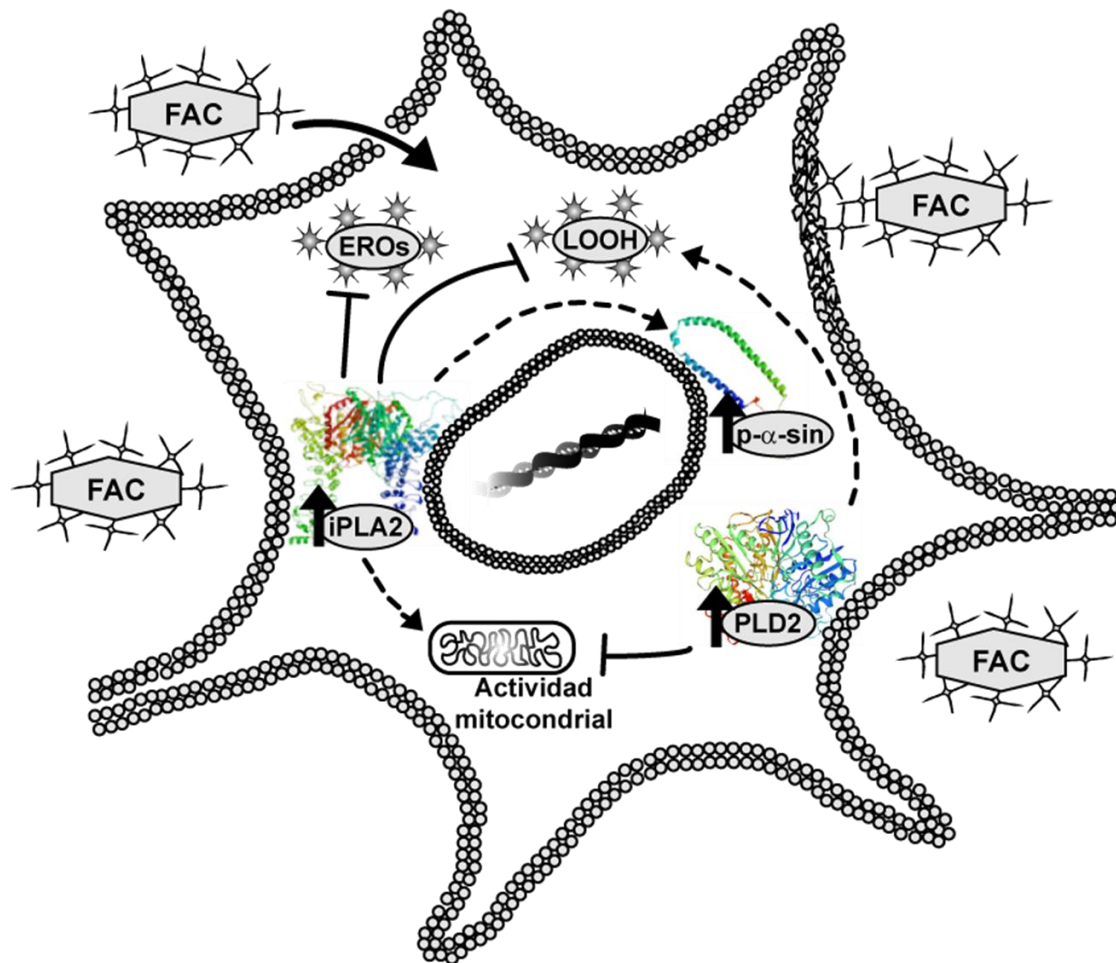
Finalmente, cuando quisimos estudiar el efecto de los medios condicionados de astrocitos en las neuronas dopaminérgicas N27, observamos que los resultados que se produjeron fueron totalmente opuestos. En este caso, cuando incubamos el medio condicionado de los astrocitos en presencia de 1 mM de FAC en neuronas de la misma especie (rata), los niveles de los peróxidos lipídicos aumentaron con respecto a aquellas neuronas cuyo medio no se recambió por el de los astrocitos. Estos resultados, contrarios a los reportados en las células IMR-32, podrían estar indicando el hecho de que tal vez existan proteínas liberadas por los astrocitos que ejercerían una respuesta dependiente de especie en las neuronas N27.

Gran parte de los estudios que demuestran el rol neuroprotector del medio condicionado de los astrocitos señalan que este es mediado por el suministro de la molécula antioxidante GSH, así como la cisteína, que constituye el precursor para la síntesis de este tripéptido (Cao *et al.* 2007; X. F. Wang y Cynader 2000). Por ejemplo, en neuronas expuestas a toxicidad por etanol, la recuperación en los valores de viabilidad, luego de la exposición de medios condicionados de astrocitos, es posible gracias al mantenimiento de los niveles de GSH en estas células (Lamarche *et al.* 2004). Además, se ha demostrado que neuronas expuestas a privación de glucosa por falta de oxígeno, un modelo de isquemia *in vitro*, se recuperan debido al GSH que es suministrado por el medio condicionado de astrocitos o cuando se co-cultivan ambos tipos celulares (Griffin *et al.* 2005). Sin embargo, estos estudios, a diferencia de los realizados en esta tesis, no parten de un daño o un estímulo en los astrocitos.

Concluyendo, podemos decir que el Fe provoca un estado de EO a través de un franco incremento de los peróxidos lipídicos y EROs, con aumento de la expresión de fosfolipasas tales como la iPLA2 y PLD2 y un incremento en la fosforilación de la  $\alpha$ -sinucleína en el



residuo Ser 129. Nuestros resultados destacan un novedoso rol de la iPLA2 frente al EO inducido por Fe en relación a la biología de la  $\alpha$ -sinucleína.



**Figura 54.** Esquema que representa la acción del Fe mediada por el compuesto FAC. Nuestro modelo propuesto postula que el FAC induciría un aumento de Fe, el cual sería responsable de producir un estado de EO, generado por el incremento de EROs y peróxidos lipídicos, jugando un papel importante, en este incremento, la PLD2. A su vez la acción de la iPLA2, sería neuroprotectora, atenuando la formación de las sustancias oxidantes y peróxidos lipídicos, junto con un aumento en la fosforilación de la  $\alpha$ -sinucleína. A su vez, el correcto funcionamiento de las mitocondrias depende de la enzima iPLA2, mientras que la PLD2 regularía de forma negativa la actividad mitocondrial, pudiendo ser en parte responsable, a través de su aumento de expresión, del incremento del EO desencadenado por FAC. FAC: citrato amonio férrico, EROs: especies reactivas de oxígeno, LOOH: peróxidos lipídicos, iPLA2: fosfolipasa A2 independiente de calcio, PLD2: fosfolipasa D2, p- $\alpha$ -sin: fosfo- $\alpha$ -sinucleína, flecha truncada: inhibición, flecha con rayas: estimulación. Las

estructuras tridimensionales, que corresponden a la de las proteínas señaladas, fueron extraídas de los siguientes sitios web: [string-db.org](http://string-db.org) y [swissmodel.expasy.org](http://swissmodel.expasy.org)

## CONCLUSIONES

Utilizando distintos modelos celulares que mimetizan condiciones presentes en el ambiente neuronal en la EP, en este trabajo de tesis logramos demostrar que:

- La exposición neuronal a 6-OHDA conduce al aumento de la producción de PA debido a la activación de las isoformas clásicas PLD1 y PLD2.
- La activación de ambas isoformas de la PLD está asociada con la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B y con la pérdida de viabilidad celular inducida por 6-OHDA.
- La activación de la PLD2 inducida por la exposición a 6-OHDA está relacionada con el aumento de expresión de COX-2.
- La exposición a FAC induce el aumento de la expresión de iPLA2 y de la PLD2 en células de neuroblastoma humano y en neuronas dopaminérgicas de rata.
- La iPLA2 cumple un rol neuroprotector contra el EO y, además, modula la fosforilación de la  $\alpha$ -sinucleína inducida por la exposición a Fe.

## CONCLUSIÓN GENERAL

- Nuestros hallazgos aportan evidencias acerca de roles novedales para las isoformas de PLD y PLA2 en los procesos neurodegenerativos relacionados con la EP.

## REFERENCIAS

- Abou-Sleiman, P. M., Muqit, M. M. K., & Wood, N. W. (2006). Expanding insights of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Nature Reviews Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/nrn1868>
- Abramov, A. Y., Smulders-Srinivasan, T. K., Kirby, D. M., Acin-Perez, R., Enriquez, J. A., Lightowlers, R. N., *et al.* (2010). Mechanism of neurodegeneration of neurons with mitochondrial DNA mutations. *Brain*. <https://doi.org/10.1093/brain/awq015>
- Ackermann, E. J., Conde-Frieboes, K., & Dennis, E. A. (1995). Inhibition of macrophage Ca<sup>2+</sup>-independent phospholipase A<sub>2</sub> by bromoenol lactone and trifluoromethyl ketones. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.1.445>
- Adamczyk, A., Kaźmierczak, A., & Strosznajder, J. B. (2006).  $\alpha$ -Synuclein and its neurotoxic fragment inhibit dopamine uptake into rat striatal synaptosomes. Relationship to nitric oxide. *Neurochemistry International*. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2006.01.025>
- Ahn, B. H., Rhim, H., Shi Yeon Kim, Y. M. S., Lee, M. Y., Choi, J. Y., Wolozin, B., *et al.* (2002).  $\alpha$ -synuclein interacts with phospholipase D isozymes and inhibits pervanadate-induced phospholipase d activation in human embryonic kidney-293 cells. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110414200>
- Aizawa, F., Nishinaka, T., Yamashita, T., Nakamoto, K., Koyama, Y., Kasuya, F., & Tokuyama, S. (2016). Astrocytes Release Polyunsaturated Fatty Acids by Lipopolysaccharide Stimuli. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. <https://doi.org/10.1248/bpb.b15-01037>
- Akbar, M., Calderon, F., Wen, Z., & Kim, H. Y. (2005). Docosahexaenoic acid: A positive modulator of Akt signaling in neuronal survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502903102>
- Aloulou, A., Ali, Y. Ben, Bezzine, S., Gargouri, Y., & Gelb, M. H. (2012). Phospholipases: An overview. *Methods in Molecular Biology*. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-600-5\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-600-5_4)
- Alza, N. P., Iglesias González, P. A., Conde, M. A., Uranga, R. M., & Salvador, G. A. (2019). Lipids at the crossroad of  $\alpha$ -synuclein function and dysfunction: Biological and pathological implications. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00175>
- Anderson, J. P., Walker, D. E., Goldstein, J. M., De Laat, R., Banducci, K., Caccavello, R. J., *et al.* (2006). Phosphorylation of Ser-129 is the dominant pathological modification of  $\alpha$ -synuclein in familial and sporadic lewy body disease. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M600933200>
- Andrade da Costa, B. L. da S., Kang, K. D., Rittenhouse, K. D., & Osborne, N. N. (2009). The localization of PGE<sub>2</sub> receptor subtypes in rat retinal cultures and the neuroprotective effect of the EP<sub>2</sub> agonist butaprost. *Neurochemistry International*. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2009.02.015>

- Andreasson, K. (2010). Emerging roles of PGE2 receptors in models of neurological disease. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*.  
<https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2009.04.003>
- Andrews, N. C. (2008). Forging a field: The golden age of iron biology. *Blood*.  
<https://doi.org/10.1182/blood-2007-12-077388>
- Auluck, P. K., Caraveo, G., & Lindquist, S. (2010).  $\alpha$ -Synuclein: Membrane Interactions and Toxicity in Parkinson's Disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.042308.113313>
- Babenko, N. A., & Kharchenko, V. S. (2015). Modulation of Insulin Sensitivity of Hepatocytes by the Pharmacological Downregulation of Phospholipase D. *International Journal of Endocrinology*. <https://doi.org/10.1155/2015/794838>
- Balsinde, J., & Balboa, M. A. (2005). Cellular regulation and proposed biological functions of group VIA calcium-independent phospholipase A2 in activated cells. *Cellular Signalling*. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2005.03.002>
- Bazan, N. G., Molina, M. F., & Gordon, W. C. (2011). Docosahexaenoic acid signalolipidomics in nutrition: Significance in aging, neuroinflammation, macular degeneration, Alzheimer's, and other neurodegenerative diseases. *Annual Review of Nutrition*. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.012809.104635>
- Beck, G., Shinzawa, K., Hayakawa, H., Baba, K., Yasuda, T., Sumi-Akamaru, H., *et al.* (2015). Deficiency of calcium-independent phospholipase A2 beta induces brain iron accumulation through upregulation of divalent metal transporter 1. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141629>
- Belfield, C., Queenan, C., Rao, H., Kitamura, K., & Walworth, N. C. (2014). The oxidative stress responsive transcription factor Pap1 confers DNA damage resistance on checkpoint-deficient fission yeast cells. *PLoS ONE*.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089936>
- Berg, D., Gerlach, M., Youdim, M. B. H., Double, K. L., Zecca, L., Riederer, P., & Becker, G. (2001). Brain iron pathways and their relevance to Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00608.x>
- Bernheimer, H., Birkmayer, W., Hornykiewicz, O., Jellinger, K., & Seitelberger, F. (1973). Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington Clinical, morphological and neurochemical correlations. *Journal of the Neurological Sciences*.  
[https://doi.org/10.1016/0022-510X\(73\)90175-5](https://doi.org/10.1016/0022-510X(73)90175-5)
- Blandini, F., & Armentero, M. T. (2012). Animal models of Parkinson's disease. *FEBS Journal*. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08491.x>
- Blesa, J., Phani, S., Jackson-Lewis, V., & Przedborski, S. (2012). Classic and new animal models of Parkinson's disease. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*.  
<https://doi.org/10.1155/2012/845618>
- Block, M. L., Zecca, L., & Hong, J. S. (2007). Microglia-mediated neurotoxicity: Uncovering the molecular mechanisms. *Nature Reviews Neuroscience*.

<https://doi.org/10.1038/nrn2038>

- Blum, D., Torch, S., Lambeng, N., Nissou, M. F., Benabid, A. L., Sadoul, R., & Verna, J. M. (2001). Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: Contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology*. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(01\)00003-X](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(01)00003-X)
- Blum, D., Torch, S., Nissou, M. F., Benabid, A. L., & Verna, J. M. (2000). Extracellular toxicity of 6-hydroxydopamine on PC12 cells. *Neuroscience Letters*. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(00\)00948-4](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(00)00948-4)
- Bové, J., & Perier, C. (2012). Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. *Neuroscience*. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.10.057>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brichta, L., & Greengard, P. (2014). Molecular determinants of selective dopaminergic vulnerability in Parkinson's disease: An update. *Frontiers in Neuroanatomy*. <https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00152>
- Brown, D. R. (2007). Interactions between metals and  $\alpha$ -synuclein - Function or artefact? *FEBS Journal*. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05917.x>
- Brown, H. A., Thomas, P. G., & Lindsley, C. W. (2017). Targeting phospholipase D in cancer, infection and neurodegenerative disorders. *Nature Reviews Drug Discovery*. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.252>
- Calon, F., & Cole, G. (2007). Neuroprotective action of omega-3 polyunsaturated fatty acids against neurodegenerative diseases: Evidence from animal studies. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2007.10.019>
- Campos, S. S., Diez, G. R., Oresti, G. M., & Salvador, G. A. (2015). Dopaminergic neurons respond to iron-induced oxidative stress by modulating lipid acylation and deacylation cycles. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130726>
- Cansev, M., Ulus, I. H., Wang, L., Maher, T. J., & Wurtman, R. J. (2008). Restorative effects of uridine plus docosahexaenoic acid in a rat model of Parkinson's disease. *Neuroscience Research*. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2008.07.005>
- Cao, Q., Wei, L. R., Lu, L. L., Zhao, C. L., Zhao, H. Y., & Yang, H. (2007). Astrocytes protect MN9D neuronal cells against rotenone-induced oxidative stress by a glutathione-dependent mechanism. *Sheng li xue bao : [Acta physiologica Sinica]*.
- Cazzolli, R., Shemon, A. N., Fang, M. Q., & Hughes, W. E. (2006). Phospholipid signalling through phospholipase D and phosphatidic acid. *IUBMB Life*. <https://doi.org/10.1080/15216540600871142>
- Charli, A., Jin, H., Anantharam, V., Kanthasamy, A., & Kanthasamy, A. G. (2016). Alterations in mitochondrial dynamics induced by tebufenpyrad and pyridaben in a

- dopaminergic neuronal cell culture model. *NeuroToxicology*.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuro.2015.06.007>
- Chen, L., & Xie, J. (2018). Dopamine in Parkinson's Disease: Precise Supplementation with Motor Planning. *Neuroscience Bulletin*. <https://doi.org/10.1007/s12264-018-0245-3>
- Chernomordik, L. V., & Kozlov, M. M. (2003). Protein-Lipid Interplay in Fusion and Fission of Biological Membranes. *Annual Review of Biochemistry*.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161504>
- Chernomordik, L. V., & Kozlov, M. M. (2005). Membrane hemifusion: Crossing a chasm in two leaps. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.10.015>
- Chinta, S. J., & Andersen, J. K. (2008). Redox imbalance in Parkinson's disease. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2008.02.005>
- Cocco, L., Follo, M. Y., Manzoli, L., & Suh, P. G. (2015). Phosphoinositide-specific phospholipase C in health and disease. *Journal of Lipid Research*.  
<https://doi.org/10.1194/jlr.R057984>
- Collins, L. M., Toulouse, A., Connor, T. J., & Nolan, Y. M. (2012). Contributions of central and systemic inflammation to the pathophysiology of Parkinson's disease. *Neuropharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.01.028>
- Conde, M. A., Alza, N. P., Iglesias González, P. A., Scodelaro Bilbao, P. G., Sánchez Campos, S., Uranga, R. M., & Salvador, G. A. (2018). Phospholipase D1 downregulation by  $\alpha$ -synuclein: Implications for neurodegeneration in Parkinson's disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.03.006>
- Corrigan, F., Mander, K. A., Leonard, A. V., & Vink, R. (2016). Neurogenic inflammation after traumatic brain injury and its potentiation of classical inflammation. *Journal of Neuroinflammation*. <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0738-9>
- Corso, T. D., & Dudás, B. (2014). Biochemistry of catecholamines. In *The Central Catecholaminergic System: Anatomy, Functions and Disorders*.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.bi.40.070171.002341>
- Crichton, R. (2001). *Inorganic Biochemistry of Iron Metabolism*. *Inorganic Biochemistry of Iron Metabolism*. <https://doi.org/10.1002/0470845791>
- Davies, P., Moualla, D., & Brown, D. R. (2011). Alpha-synuclein is a cellular ferrireductase. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015814>
- Davis, J. B., & Maher, P. (1994). Protein kinase C activation inhibits glutamate-induced cytotoxicity in a neuronal cell line. *Brain Research*. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)90334-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)90334-4)
- Delon, C., Manifava, M., Wood, E., Thompson, D., Krugmann, S., Pyne, S., & Ktistakis, N. T. (2004). Sphingosine kinase 1 is an intracellular effector of phosphatidic acid.

- Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M405771200>
- Dennis, E. A. (2015a). Introduction to Thematic Review Series: Phospholipases: Central Role in Lipid Signaling and Disease. *Journal of Lipid Research*. <https://doi.org/10.1194/jlr.e061101>
- Dennis, E. A. (2015b). Introduction to thematic review series: Phospholipases: Central role in lipid signaling and disease. *Journal of Lipid Research*. <https://doi.org/10.1194/jlr.E061101>
- Desagher, S., Glowinski, J., & Premont, J. (1996). Astrocytes protect neurons from hydrogen peroxide toxicity. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.16-08-02553.1996>
- Dev, S., & Babitt, J. L. (2017). Overview of iron metabolism in health and disease. *Hemodialysis International*. <https://doi.org/10.1111/hdi.12542>
- Dexter, D. T., Wells, F. R., Lee, A. J., Agid, F., Agid, Y., Jenner, P., & Marsden, C. D. (1989). Increased Nigral Iron Content and Alterations in Other Metal Ions Occurring in Brain in Parkinson's Disease. *Journal of Neurochemistry*. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1989.tb07264.x>
- Dias, V., Junn, E., & Mouradian, M. M. (2013). The role of oxidative stress in parkinson's disease. *Journal of Parkinson's Disease*. <https://doi.org/10.3233/JPD-130230>
- Dignani, J. D., Lebovitz, R. M., & Roeder, R. G. (1983). Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/11.5.1475>
- Eder, A. M., Sasagawa, T., Mao, M., Aoki, J., & Mills, G. B. (2000). Constitutive and lysophosphatidic acid (LPA)-induced LPA production: Role of phospholipase D and phospholipase A2. *Clinical Cancer Research*.
- Elbaz, A., Carcaillon, L., Kab, S., & Moisan, F. (2016). Epidemiology of Parkinson's disease. *Revue Neurologique*. [https://doi.org/10.5005/jp/books/14125\\_4](https://doi.org/10.5005/jp/books/14125_4)
- Emoto, M., Klarlund, J. K., Waters, S. B., Hu, V., Buxton, J. M., Chawla, A., & Czech, M. P. (2000). A role for phospholipase D in GLUT4 glucose transporter translocation. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.10.7144>
- Eng, L. F., Ghirnikar, R. S., & Lee, Y. L. (2000). Glial Fibrillary Acidic Protein: GFAP-Thirty-One Years (1969-2000). *Neurochemical Research*. <https://doi.org/10.1023/A:1007677003387>
- Fan, H., Wang, S., Zhao, Q., & Qin, Z. (2018). Computational Exploration of Natural Compounds to Target Cytosolic Phospholipase A 2 Protein: A Novel Therapeutic Target for Spinal Cord Injury. *Current Computer-Aided Drug Design*. <https://doi.org/10.2174/1573409914666180123100714>
- Farese, R. V. (2002). Function and dysfunction of aPKC isoforms for glucose transport in insulin-sensitive and insulin-resistant states. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00045.2002>



- Farooqui, A. A., & Horrocks, L. A. (2004). Brain phospholipases A2: A perspective on the history. In *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*.  
<https://doi.org/10.1016/j.plefa.2004.03.004>
- Farooqui, A. A., & Horrocks, L. A. (2006). Phospholipase A2-generated lipid mediators in the brain: The good, the bad, and the ugly. *Neuroscientist*.  
<https://doi.org/10.1177/1073858405285923>
- Farooqui, A. A., Horrocks, L. A., & Farooqui, T. (2007). Modulation of inflammation in brain: A matter of fat. *Journal of Neurochemistry*. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04371.x>
- Farooqui, A. A., Ong, W. Y., & Horrocks, L. A. (2006). Inhibitors of brain phospholipase A2 activity: Their neuropharmacological effects and therapeutic importance for the treatment of neurologic disorders. *Pharmacological Reviews*.  
<https://doi.org/10.1124/pr.58.3.7>
- Farooqui, A. A., Ong, W. Y., Horrocks, L. A., & Farooqui, T. (2000). Brain cytosolic phospholipase A2: Localization, role, and involvement in neurological diseases. *Neuroscientist*. <https://doi.org/10.1177/107385840000600308>
- Farooqui, A. A., Yang, H.-C., Rosenberger, T. A., & Horrocks, L. A. (2002). Phospholipase A2 and Its Role in Brain Tissue. *Journal of Neurochemistry*.  
<https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.69030889.x>
- Farooqui, T., & Farooqui, A. A. (2011). Lipid-mediated oxidative stress and inflammation in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Parkinson's Disease*.  
<https://doi.org/10.4061/2011/247467>
- Faulkner, J. R., Herrmann, J. E., Woo, M. J., Tansey, K. E., Doan, N. B., & Sofroniew, M. V. (2004). Reactive Astrocytes Protect Tissue and Preserve Function after Spinal Cord Injury. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3547-03.2004>
- Febbraro, F., Giorgi, M., Caldarola, S., Loreni, F., & Romero-Ramos, M. (2012).  $\alpha$ -Synuclein expression is modulated at the translational level by iron. *NeuroReport*.  
<https://doi.org/10.1097/WNR.0b013e328354a1f0>
- Fecchio, C., Palazzi, L., & Polverino de Laureto, P. (2018).  $\alpha$ -Synuclein and polyunsaturated fatty acids: Molecular basis of the interaction and implication in neurodegeneration. *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules23071531>
- Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of biological chemistry*.  
<https://doi.org/10.3989/scimar.2005.69n187>
- Freyberg, Z., Sweeney, D., Siddhanta, A., Bourgoin, S., Frohman, M., & Shields, D. (2001). Intracellular Localization of Phospholipase D1 in Mammalian Cells. *Molecular Biology of the Cell*. <https://doi.org/10.1091/mbc.12.4.943>
- Friedlich, A. L., Tanzi, R. E., & Rogers, J. T. (2007). The 5'-untranslated region of Parkinson's disease  $\alpha$ -synuclein messengerRNA contains a predicted iron responsive element [1]. *Molecular Psychiatry*. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001937>

- Fujiwara, H., Hasegawa, M., Dohmae, N., Kawashima, A., Masliah, E., Goldberg, M. S., *et al.* (2002).  $\alpha$ -synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nature Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/ncb748>
- Ganz, T. (2013). Systemic iron homeostasis. *Physiological Reviews*. <https://doi.org/10.1152/physrev.00008.2013>
- Gelman, N., Gorell, J. M., Barker, P. B., Savage, R. M., Spickler, E. M., Windham, J. P., & Knight, R. A. (1999). MR imaging of human brain at 3.0 T: Preliminary report on transverse relaxation rates and relation to estimated iron content. *Radiology*. <https://doi.org/10.1148/radiology.210.3.r99fe41759>
- Giasson, B. I., Forman, M. S., Higuchi, M., Golbe, L. I., Graves, C. L., Kotzbauer, P. T., *et al.* (2003). Initiation and synergistic fibrillization of tau and alpha-synuclein. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1082324>
- Goedert, M., Spillantini, M. G., Del Tredici, K., & Braak, H. (2013). 100 years of Lewy pathology. *Nature Reviews Neurology*. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2012.242>
- Gomez-Cambronero, J. (2014). Phospholipase D in cell signaling: From a myriad of cell functions to cancer growth and metastasis. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.R114.574152>
- Gómez-Soler, M., Cordobilla, B., Morató, X., Fernández-Dueñas, V., Domingo, J. C., & Ciruela, F. (2018). Triglyceride form of docosahexaenoic acid mediates neuroprotection in experimental parkinsonism. *Frontiers in Neuroscience*. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00604>
- González-Hernández, T., Barroso-Chinea, P., De La Cruz Muros, I., Del Mar Pérez-Delgado, M., & Rodríguez, M. (2004). Expression of dopamine and vesicular monoamine transporters and differential vulnerability of mesostriatal dopaminergic neurons. *Journal of Comparative Neurology*. <https://doi.org/10.1002/cne.20323>
- Gorbatyuk, O. S., Li, S., Nha Nguyen, F., Manfredsson, F. P., Kondrikova, G., Sullivan, L. F., *et al.* (2010).  $\alpha$ -synuclein expression in rat substantia nigra suppresses phospholipase D2 toxicity and nigral neurodegeneration. *Molecular Therapy*. <https://doi.org/10.1038/mt.2010.137>
- Grange, M., Sette, C., Cuomo, M., Conti, M., Lagarde, M., Prigent, A. F., & Némoy, G. (2000). The cAMP-specific phosphodiesterase PDE4D3 is regulated by phosphatidic acid binding. Consequences for cAMP signaling pathway and characterization of a phosphatidic acid binding site. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006329200>
- Grazia, I., Claudio, G., Giovanna, C., Maria, C. D., Roberta, Z., Valentina, P., *et al.* (2017). A new PLA2G6 mutation in a family with infantile neuroaxonal dystrophy. *Journal of the Neurological Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2017.08.3260>
- Griffin, S., Clark, J. B., & Canevari, L. (2005). Astrocyte-neurone communication following oxygen-glucose deprivation. *Journal of Neurochemistry*. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03418.x>

- Gui, Y. X., Xu, Z. P., Wen-Lv, Liu, H. M., Zhao, J. J., & Hu, X. Y. (2013). Four novel rare mutations of PLA2G6 in Chinese population with Parkinson's disease. *Parkinsonism and Related Disorders*. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2012.07.016>
- Guo, Y., Tang, B., & Guo, J. (2018). PLA2G6-Associated Neurodegeneration (PLAN): Review of Clinical Phenotypes and Genotypes. *Frontiers in Neurology*. <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.01100>
- Gupta, M., Notter, M. F. D., Felten, S., & Gash, D. M. (1985). Differentiation characteristics of human neuroblastoma cells in the presence of growth modulators and antimetabolic drugs. *Developmental Brain Research*. [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(85\)90227-5](https://doi.org/10.1016/0165-3806(85)90227-5)
- Hagemeyer, J., Geurts, J. J. G., & Zivadinov, R. (2012). Brain iron accumulation in aging and neurodegenerative disorders. *Expert Review of Neurotherapeutics*. <https://doi.org/10.1586/ern.12.128>
- Hallett, P. J., Engelder, S., & Isacson, O. (2019). Lipid and immune abnormalities causing age-dependent neurodegeneration and Parkinson's disease. *Journal of Neuroinflammation*. <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1532-2>
- Hallgren, B., & Sourander, P. (1958). THE EFFECT OF AGE ON THE NON-HAEMIN IRON IN THE HUMAN BRAIN. *Journal of Neurochemistry*. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1958.tb12607.x>
- Hamaguchi, K., Kuwata, H., Yoshihara, K., Masuda, S., Shimbara, S., Oh-Ishi, S., *et al.* (2003). Induction of distinct sets of secretory phospholipase A2 in rodents during inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2003.10.004>
- Hammond, S. L., Safe, S., & Tjalkens, R. B. (2015). A novel synthetic activator of Nurr1 induces dopaminergic gene expression and protects against 6-hydroxydopamine neurotoxicity in vitro. *Neuroscience Letters*. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.09.015>
- Hancock, J. F. (2007a). PA promoted to manager. *Nature Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/ncb0607-615>
- Hancock, J. F. (2007b). PA promoted to manager. *Nature Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/ncb0607-615>
- Harischandra, D. S., Jin, H., Anantharam, V., Kanthasamy, A., & Kanthasamy, A. G. (2015).  $\alpha$ -Synuclein protects against manganese neurotoxic insult during the early stages of exposure in a dopaminergic cell model of Parkinson's disease. *Toxicological Sciences*. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfu247>
- Heird, W. C., & Lapillonne, A. (2005). THE ROLE OF ESSENTIAL FATTY ACIDS IN DEVELOPMENT. *Annual Review of Nutrition*. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.24.012003.132254>
- Hernandez-Baltazar, D., Mendoza-Garrido, M. E., & Martinez-Fong, D. (2013). Activation of GSK-3 $\beta$  and Caspase-3 Occurs in Nigral Dopamine Neurons during the

- Development of Apoptosis Activated by a Striatal Injection of 6-Hydroxydopamine. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070951>
- Hernando, S., Requejo, C., Herran, E., Ruiz-Ortega, J. A., Morera-Herrerias, T., Lafuente, J. V., *et al.* (2019). Beneficial effects of n-3 polyunsaturated fatty acids administration in a partial lesion model of Parkinson's disease: The role of glia and NRF2 regulation. *Neurobiology of Disease*. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2018.10.001>
- Herrera, A. J., Castaño, A., Venero, J. L., Cano, J., & Machado, A. (2000). The single intranigral injection of LPS as a new model for studying the selective effects of inflammatory reactions on dopaminergic system. *Neurobiology of Disease*. <https://doi.org/10.1006/nbdi.2000.0289>
- Hill, J. M., & Switzer, R. C. (1984). The regional distribution and cellular localization of iron in the rat brain. *Neuroscience*. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(84\)90046-0](https://doi.org/10.1016/0306-4522(84)90046-0)
- Hirabayashi, T., & Shimizu, T. (2000). Localization and regulation of cytosolic phospholipase A2. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*. [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(00\)00115-3](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(00)00115-3)
- Hirashima, Y., Farooqui, A. A., Mills, J. S., & Horrocks, L. A. (1992). Identification and Purification of Calcium-Independent Phospholipase A2 from Bovine Brain Cytosol. *Journal of Neurochemistry*. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1992.tb09426.x>
- Hoyer, W., Cherny, D., Subramaniam, V., & Jovin, T. M. (2004). Impact of the acidic C-terminal region comprising amino acids 109-140 on  $\alpha$ -synuclein aggregation in vitro. *Biochemistry*. <https://doi.org/10.1021/bi048453u>
- Huang, P., Altshuler, Y. M., Hou, J. C., Pessin, J. E., & Frohman, M. A. (2005). Insulin-stimulated plasma membrane fusion of Glut4 glucose transporter-containing vesicles is regulated by phospholipase D1. *Molecular Biology of the Cell*. <https://doi.org/10.1091/mbc.E04-12-1124>
- Hubbard, V. M., Valdor, R., Macian, F., & Cuervo, A. M. (2012). Selective autophagy in the maintenance of cellular homeostasis in aging organisms. *Biogerontology*. <https://doi.org/10.1007/s10522-011-9331-x>
- Iravani, M. M., Leung, C. C. M., Sadeghian, M., Haddon, C. O., Rose, S., & Jenner, P. (2005). The acute and the long-term effects of nigral lipopolysaccharide administration on dopaminergic dysfunction and glial cell activation. *European Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04220.x>
- Iravani, M. M., Sadeghian, M., Leung, C. C. M., Jenner, P., & Rose, S. (2012). Lipopolysaccharide-induced nigral inflammation leads to increased IL-1 $\beta$  tissue content and expression of astrocytic glial cell line-derived neurotrophic factor. *Neuroscience Letters*. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2012.01.022>
- Izumi, Y., Sawada, H., Sakka, N., Yamamoto, N., Kume, T., Katsuki, H., *et al.* (2005). p-quinone mediates 6-hydroxydopamine-induced dopaminergic neuronal death and ferrous iron accelerates the conversion of p-quinone into melanin extracellularly. *Journal of Neuroscience Research*. <https://doi.org/10.1002/jnr.20382>

- Janmey, P. A., & Lindberg, U. (2004). Cytoskeletal regulation: Rich in lipids. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/nrm1434>
- Jenco, J. M., Rawlingson, A., Daniels, B., & Morris, A. J. (1998). Regulation of phospholipase D2: Selective inhibition of mammalian phospholipase D isoenzymes by  $\alpha$ - and  $\beta$ -synucleins. *Biochemistry*. <https://doi.org/10.1021/bi972776r>
- Joensuu, M., Wallis, T. P., Saber, S. H., & Meunier, F. A. (2019). Phospholipases in neuronal function: A role in learning and memory? *Journal of Neurochemistry*. <https://doi.org/10.1111/jnc.14918>
- Johnson, W. M., Wilson-Delfosse, A. L., & Mieyal, J. J. (2012). Dysregulation of glutathione homeostasis in neurodegenerative diseases. *Nutrients*. <https://doi.org/10.3390/nu4101399>
- Jones, J. A., Rawles, R., & Hannun, Y. A. (2005). Identification of a novel phosphatidic acid binding domain in protein phosphatase-1. *Biochemistry*. <https://doi.org/10.1021/bi0505159>
- Juárez Olguín, H., Calderón Guzmán, D., Hernández García, E., & Barragán Mejía, G. (2016). The role of dopamine and its dysfunction as a consequence of oxidative stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. <https://doi.org/10.1155/2016/9730467>
- Kang, H. H., Kim, I. K., Lee, H. in, Joo, H., Lim, J. U., Lee, J., *et al.* (2017). Chronic intermittent hypoxia induces liver fibrosis in mice with diet-induced obesity via TLR4/MyD88/MAPK/NF- $\kappa$ B signaling pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.06.047>
- Kastner, A., Hirsch, E. C., Lejeune, O., Javoy-Agid, F., Rascol, O., & Agid, Y. (1992). Is the Vulnerability of Neurons in the Substantia Nigra of Patients with Parkinson's Disease Related to Their Neuromelanin Content? *Journal of Neurochemistry*. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1992.tb08350.x>
- Kaur, D., & Andersen, J. (2004). Does cellular iron dysregulation play a causative role in Parkinson's disease? *Ageing Research Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2004.01.003>
- Keller, H., Dreyer, C., Medin, J., Mahfoudi, A., Ozato, K., & Wahli, W. (1993). Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.6.2160>
- Kereszturi, E., Kiraly, O., Barta, C., Molnar, N., Sasvari-Szekely, M., & Csapo, Z. (2006). No direct effect of the -521 C/T polymorphism in the human dopamine D4 receptor gene promoter on transcriptional activity. *BMC Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-7-18>
- Killeen, M. J., Linder, M., Pontoniere, P., & Crea, R. (2014). NF- $\kappa$ B signaling and chronic inflammatory diseases: Exploring the potential of natural products to drive new therapeutic opportunities. *Drug Discovery Today*.

- <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2013.11.002>
- Kim, C., Kim, J. Y., & Kim, J. H. (2008). Cytosolic phospholipase A2, lipoxygenase metabolites, and reactive oxygen species. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2008.41.8.555>
- Kim, D., Jun, K. S., Lee, S. B., Kang, N. G., Min, D. S., Kim, Y. H., *et al.* (1997). Phospholipase C isozymes selectively couple to specific neurotransmitter receptors. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/38508>
- Kin, K., Yasuhara, T., Kameda, M., & Date, I. (2019). Animal models for Parkinson's disease research: Trends in the 2000s. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms20215402>
- Kochumon, S., Wilson, A., Chandy, B., Shenouda, S., Tuomilehto, J., Sindhu, S., & Ahmad, R. (2018). Palmitate Activates CCL4 Expression in Human Monocytic Cells via TLR4/MyD88 Dependent Activation of NF- $\kappa$ B/MAPK/ PI3K Signaling Systems. *Cellular Physiology and Biochemistry*. <https://doi.org/10.1159/000488824>
- Koeppen, A. H. (1995). The history of iron in the brain. *Journal of the Neurological Sciences*. [https://doi.org/10.1016/0022-510X\(95\)00202-D](https://doi.org/10.1016/0022-510X(95)00202-D)
- Kolko, M., Christoffersen, N. R., Barreiro, S. G., Miller, M. L., Pizza, A. J., & Bazan, N. G. (2006). Characterization and location of secretory phospholipase A2 groups IIE, V, and X in the rat brain. *Journal of Neuroscience Research*. <https://doi.org/10.1002/jnr.20773>
- Kooijman, E. E., Chupin, V., de Kruijff, B., & Burger, K. N. J. (2003). Modulation of membrane curvature by phosphatidic acid and lysophosphatidic acid. *Traffic*. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2003.00086.x>
- Kordower, J. H., Olanow, C. W., Dodiya, H. B., Chu, Y., Beach, T. G., Adler, C. H., *et al.* (2013). Disease duration and the integrity of the nigrostriatal system in Parkinson's disease. *Brain*. <https://doi.org/10.1093/brain/awt192>
- Koutsilieris, E., Kornhuber, J., Degen, H. J., Lesch, K. P., Sopper, S., Ter Meulen, V., & Riederer, P. (1996a). U-373 MG glioblastoma and IMR-32 neuroblastoma cell lines express the dopamine and vesicular monoamine transporters. *Journal of Neuroscience Research*. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4547\(19960801\)45:3<269::AID-JNR8>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19960801)45:3<269::AID-JNR8>3.0.CO;2-B)
- Koutsilieris, E., Kornhuber, J., Degen, H. J., Lesch, K. P., Sopper, S., Ter Meulen, V., & Riederer, P. (1996b). U-373 MG glioblastoma and IMR-32 neuroblastoma cell lines express the dopamine and vesicular monoamine transporters. *Journal of Neuroscience Research*. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4547\(19960801\)45:3<269::AID-JNR8>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19960801)45:3<269::AID-JNR8>3.0.CO;2-B)
- Kraytsberg, Y., Kudryavtseva, E., McKee, A. C., Geula, C., Kowall, N. W., & Khrapko, K. (2006). Mitochondrial DNA deletions are abundant and cause functional impairment in aged human substantia nigra neurons. *Nature Genetics*. <https://doi.org/10.1038/ng1778>

- Kuda, O. (2017). Bioactive metabolites of docosahexaenoic acid. *Biochimie*.  
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.01.002>
- Kupershmidt, L., Amit, T., Bar-Am, O., Youdim, M. B. H., & Weinreb, O. (2012). The novel multi-target iron chelating-radical scavenging compound M30 possesses beneficial effects on major hallmarks of Alzheimer's disease. *Antioxidants and Redox Signaling*. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4279>
- Kuwahara, T., Tonegawa, R., Ito, G., Mitani, S., & Iwatsubo, T. (2012). Phosphorylation of  $\alpha$ -synuclein protein at ser-129 reduces neuronal dysfunction by lowering its membrane binding property in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Biological Chemistry*.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.237131>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lamarche, F., Signorini-Allibe, N., Gonthier, B., & Barret, L. (2004). Influence of vitamin E, sodium selenite, and astrocyte-conditioned medium on neuronal survival after chronic exposure to ethanol. *Alcohol*. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2004.09.001>
- Lee, H. J., Bazinet, R. P., Rapoport, S. I., & Bhattacharjee, A. K. (2010). Brain arachidonic acid cascade enzymes are upregulated in a rat model of unilateral parkinson disease. *Neurochemical Research*. <https://doi.org/10.1007/s11064-009-0106-6>
- Li, J., Yang, J., Zhao, P., Li, S., Zhang, R., Zhang, X., *et al.* (2012). Neuromelanin enhances the toxicity of  $\alpha$ -synuclein in SK-N-SH cells. *Journal of Neural Transmission*. <https://doi.org/10.1007/s00702-011-0753-z>
- Liscovitch, M., Czarny, M., Fiucci, G., & Tang, X. (2000). Phospholipase D: Molecular and cell biology of a novel gene family. *Biochemical Journal*.  
<https://doi.org/10.1042/0264-6021:3450401>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*.  
<https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Ljungdahl, Å., Hökfelt, T., Jonsson, G., & Sachs, C. (1971). Autoradiographic demonstration of uptake and accumulation of 3H-6-hydroxydopamine in adrenergic nerves. *Experientia*. <https://doi.org/10.1007/BF02138157>
- Lukiw, W. J., Cui, J. G., Marcheselli, V. L., Bodker, M., Botkjaer, A., Gotlinger, K., *et al.* (2005). A role for docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 in neural cell survival and Alzheimer disease. *Journal of Clinical Investigation*.  
<https://doi.org/10.1172/JCI25420>
- Machiya, Y., Hara, S., Arawaka, S., Fukushima, S., Sato, H., Sakamoto, M., *et al.* (2010). Phosphorylated  $\alpha$ -Synuclein at Ser-129 is targeted to the proteasome pathway in a ubiquitin-independent manner. *Journal of Biological Chemistry*.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M110.141952>
- Magalingam, K. B., Radhakrishnan, A., & Haleagrahara, N. (2014). Protective effects of flavonol isoquercitrin, against 6-hydroxy dopamine (6-OHDA) - Induced toxicity in

- PC12 cells. *BMC Research Notes*. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-49>
- Mancuso, D. J., Jenkins, C. M., & Gross, R. W. (2000). The genomic organization, complete mRNA sequence, cloning, and expression of a novel human intracellular membrane-associated calcium-independent phospholipase A2. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.14.9937>
- Manning, B. D., & Toker, A. (2017). AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.04.001>
- Marcheselli, V. L., Hong, S., Lukiw, W. J., Tian, X. H., Gronert, K., Musto, A., *et al.* (2003). Novel Docosanoids Inhibit Brain Ischemia-Reperfusion-mediated Leukocyte Infiltration and Pro-inflammatory Gene Expression. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M305841200>
- Massari, C. M., Castro, A. A., Dal-Cim, T., Lanznaster, D., & Tasca, C. I. (2016). In vitro 6-hydroxydopamine-induced toxicity in striatal, cerebrocortical and hippocampal slices is attenuated by atorvastatin and MK-801. *Toxicology in Vitro*. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.09.015>
- Masuda-Suzukake, M., Nonaka, T., Hosokawa, M., Oikawa, T., Arai, T., Akiyama, H., *et al.* (2013). Prion-like spreading of pathological  $\alpha$ -synuclein in brain. *Brain*. <https://doi.org/10.1093/brain/awt037>
- Mateos, M. V., Kamerbeek, C. B., Giusto, N. M., & Salvador, G. A. (2014). The phospholipase D pathway mediates the inflammatory response of the retinal pigment epithelium. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2014.08.016>
- McLaughlin, D., Tsirimonaki, E., Vallianatos, G., Sakellaridis, N., Chatzistamatiou, T., Stavropoulou-Gioka, C., *et al.* (2006). Stable expression of a neuronal dopaminergic progenitor phenotype in cell lines derived from human amniotic fluid cells. *Journal of Neuroscience Research*. <https://doi.org/10.1002/jnr.20828>
- McMahon, B., & Godson, C. (2004). Lipoxins: Endogenous regulators of inflammation. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00224.2003>
- McMahon, H. T., & Gallop, J. L. (2005). Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature04396>
- McNaught, K. S. P., & Jenner, P. (1999). Altered glial function causes neuronal death and increases neuronal susceptibility to 1-methyl-4-phenylpyridinium- and 6-hydroxydopamine-induced toxicity in astrocytic/ventral mesencephalic co-cultures. *Journal of Neurochemistry*. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1999.0732469.x>
- McNaught, K. S. P., Mytilin, C., JnoBaptiste, R., Yabut, J., Shashidharan, P., Jenner, P., & Olanow, C. W. (2002). Impairment of the ubiquitin-proteasome system causes dopaminergic cell death and inclusion body formation in ventral mesencephalic cultures. *Journal of Neurochemistry*. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.00821.x>



- Mendez-Gomez, H. R., Singh, J., Meyers, C., Chen, W., Gorbatyuk, O. S., & Muzyczka, N. (2018). The Lipase Activity of Phospholipase D2 is Responsible for Nigral Neurodegeneration in a Rat Model of Parkinson's Disease. *Neuroscience*. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.02.047>
- Mendez, J. S., & Finn, B. W. (1975). Use of 6 hydroxydopamine to create lesions in catecholamine neurons in rats. *Journal of Neurosurgery*. <https://doi.org/10.3171/jns.1975.42.2.0166>
- Michel, P. P., & Hefti, F. (1990a). Toxicity of 6-hydroxydopamine and dopamine for dopaminergic neurons in culture. *Journal of Neuroscience Research*. <https://doi.org/10.1002/jnr.490260405>
- Michel, P. P., & Hefti, F. (1990b). Toxicity of 6-hydroxydopamine and dopamine for dopaminergic neurons in culture. *Journal of Neuroscience Research*. <https://doi.org/10.1002/jnr.490260405>
- Michetti, F., Corvino, V., Geloso, M. C., Lattanzi, W., Bernardini, C., Serpero, L., & Gazzolo, D. (2012). The S100B protein in biological fluids: More than a lifelong biomarker of brain distress. *Journal of Neurochemistry*. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07612.x>
- Milatovic, D., Montine, T. J., & Aschner, M. (2011). Prostanoid signaling: Dual role for prostaglandin E2 in neurotoxicity. *NeuroToxicology*. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2011.02.004>
- Ming, Y., Zhu, X., Tuma-Kellner, S., Ganzha, A., Liebisch, G., Gan-Schreier, H., & Chamulitrat, W. (2019). iPla2 $\beta$  Deficiency Suppresses Hepatic ER UPR, Fxr, and Phospholipids in Mice Fed with MCD Diet, Resulting in Exacerbated Hepatic Bile Acids and Biliary Cell Proliferation. *Cells*. <https://doi.org/10.3390/cells8080879>
- Molloy, G. Y., Rattray, M., & Williams, R. J. (1998). Genes encoding multiple forms of phospholipase A2 are expressed in rat brain. *Neuroscience Letters*. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(98\)00838-6](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(98)00838-6)
- Müller, C., Hardt, M., Schwudke, D., Neuman, B. W., Pleschka, S., & Ziebuhr, J. (2017). Inhibition of cytosolic phospholipase A2 $\alpha$  impairs an early step of coronavirus replication in cell culture. *Journal of Virology*. <https://doi.org/10.1128/jvi.01463-17>
- Ndayisaba, A., Kaindlstorfer, C., & Wenning, G. K. (2019). Iron in neurodegeneration - Cause or consequence? *Frontiers in Neuroscience*. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00180>
- Negro, A., Brunati, A. M., Donella-Deana, A., Massimino, M. L., & Pinna, L. A. (2002). Multiple phosphorylation of alpha-synuclein by protein tyrosine kinase Syk prevents eosin-induced aggregation. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. <https://doi.org/10.1096/fj.01-0517fje>
- Nolin, J. D., Murphy, R. C., Gelb, M. H., Altemeier, W. A., Henderson, W. R., & Hallstrand, T. S. (2019). Function of secreted phospholipase A 2 group-X in asthma and allergic disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of*

- Lipids*. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.11.009>
- Okochi, M., Walter, J., Koyama, A., Nakajo, S., Baba, M., Iwatsubo, T., *et al.* (2000). Constitutive phosphorylation of the Parkinson's disease associated alpha-synuclein [In Process Citation]. *J Biol Chem*.
- Olivares, D., Huang, X., Branden, L., Greig, N. H., & Rogers, J. T. (2009). Physiological and pathological role of alpha-synuclein in parkinson's disease through iron mediated oxidative stress; the role of a putative iron-responsive element. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms10031226>
- Oliveira, T. G., Chan, R. B., Tian, H., Laredo, M., Shui, G., Staniszewski, A., *et al.* (2010). Phospholipase D2 ablation ameliorates Alzheimer's disease-linked synaptic dysfunction and cognitive deficits. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3317-10.2010>
- Osborn, L., Kunkel, S., & Nabel, G. J. (1989). Tumor necrosis factor  $\alpha$  and interleukin 1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor  $\kappa$ B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.7.2336>
- Oueslati, A., Schneider, B. L., Aebischer, P., & Lashuel, H. A. (2013). Polo-like kinase 2 regulates selective autophagic synuclein clearance and suppresses its toxicity in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1309991110>
- Paleologou, K. E., Schmid, A. W., Rospigliosi, C. C., Kim, H. Y., Lamberto, G. R., Fredenburg, R. A., *et al.* (2008). Phosphorylation at Ser-129 but not the phosphomimics S129E/D inhibits the fibrillation of  $\alpha$ -synuclein. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800747200>
- Pantopoulos, K., Porwal, S. K., Tartakoff, A., & Devireddy, L. (2012). Mechanisms of mammalian iron homeostasis. *Biochemistry*. <https://doi.org/10.1021/bi300752r>
- Paul, S., Ghosh, S., Mandal, S., Sau, S., & Pal, M. (2018). NRF2 transcriptionally activates the heat shock factor 1 promoter under oxidative stress and affects survival and migration potential of MCF7 cells. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.003376>
- Pearce, R. K. B., Owen, A., Daniel, S., Jenner, P., & Marsden, C. D. (1997). Alterations in the distribution of glutathione in the substantia nigra in Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission*. <https://doi.org/10.1007/BF01291884>
- Pekny, M., Levéen, P., Pekna, M., Eliasson, C., Berthold, C. H., Westermarck, B., & Betsholtz, C. (1995). Mice lacking glial fibrillary acidic protein display astrocytes devoid of intermediate filaments but develop and reproduce normally. *EMBO Journal*. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb07147.x>
- Pekny, M., & Pekna, M. (2004). Astrocyte intermediate filaments in CNS pathologies and regeneration. *Journal of Pathology*. <https://doi.org/10.1002/path.1645>
- Pettitt, T. R., Martin, A., Horton, T., Liossis, C., Lord, J. M., & Wakelam, M. J. O. (1997).

- Diacylglycerol and phosphatidate generated by phospholipases C and D, respectively, have distinct fatty acid compositions and functions: Phospholipase D-derived diacylglycerol does not activate protein kinase C in porcine aortic endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.28.17354>
- Pickard, R. T., Striffler, B. A., Kramer, R. M., & Sharp, J. D. (1999). Molecular cloning of two new human paralogs of 85-kDa cytosolic phospholipase A2. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.13.8823>
- Pinho, R., Paiva, I., Jerčić, K. G., Fonseca-Ornelas, L., Gerhardt, E., Fahlbusch, C., *et al.* (2019). Nuclear localization and phosphorylation modulate pathological effects of alpha-synuclein. *Human Molecular Genetics*. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy326>
- Plum, S., Steinbach, S., Attems, J., Keers, S., Riederer, P., Gerlach, M., *et al.* (2016). Proteomic characterization of neuromelanin granules isolated from human substantia nigra by laser-microdissection. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/srep37139>
- Pronin, A. N., Morris, A. J., Surguchov, A., & Benovic, J. L. (2000). Synucleins are a novel class of substrates for G protein-coupled receptor kinases. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003542200>
- Qian, L., Flood, P. M., & Hong, J. S. (2010). Neuroinflammation is a key player in Parkinson's disease and a prime target for therapy. *Journal of Neural Transmission*. <https://doi.org/10.1007/s00702-010-0428-1>
- Raben, D. M., & Barber, C. N. (2017). Phosphatidic acid and neurotransmission. *Advances in Biological Regulation*. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2016.09.004>
- Raicevic, N., Mladenovic, A., Perovic, M., Harhaji, L., Miljkovic, D., & Trajkovic, V. (2005). Iron protects astrocytes from 6-hydroxydopamine toxicity. *Neuropharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2004.12.003>
- Rajput, A. H., Sitte, H. H., Rajput, A., Fenton, M. E., Pifl, C., & Hornykiewicz, O. (2008). Globus pallidus dopamine and Parkinson motor subtypes: Clinical and brain biochemical correlation. *Neurology*. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000285082.18969.3a>
- Ramanadham, S., Ali, T., Ashley, J. W., Bone, R. N., Hancock, W. D., & Lei, X. (2015). Calcium-independent phospholipases A 2 and their roles in biological processes and diseases. *Journal of Lipid Research*. <https://doi.org/10.1194/jlr.r058701>
- Rao, J. S., Ertley, R. N., DeMar, J. C., Rapoport, S. I., Bazinet, R. P., & Lee, H. J. (2007). Dietary n-3 PUFA deprivation alters expression of enzymes of the arachidonic and docosahexaenoic acid cascades in rat frontal cortex. *Molecular Psychiatry*. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001887>
- Reeves, R. H., Yao, J., Crowley, M. R., Buck, S., Zhang, X., Yarowsky, P., *et al.* (1994). Astrocytosis and axonal proliferation in the hippocampus of S100b transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.12.5359>
- Richards, M. L., & Sadee, W. (1986). Human neuroblastoma cell lines as models of

- catechol uptake. *Brain Research*. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(86\)91228-X](https://doi.org/10.1016/0006-8993(86)91228-X)
- Riedel, M., Goldbaum, O., Wille, M., & Richter-Landsberg, C. (2011). Membrane lipid modification by docosahexaenoic acid (DHA) promotes the formation of  $\alpha$ -synuclein inclusion bodies immunopositive for SUMO-1 in oligodendroglial cells after oxidative stress. *Journal of Molecular Neuroscience*. <https://doi.org/10.1007/s12031-010-9439-5>
- Rivera-Mancía, S., Pérez-Neri, I., Ríos, C., Tristán-López, L., Rivera-Espinosa, L., & Montes, S. (2010). The transition metals copper and iron in neurodegenerative diseases. *Chemico-Biological Interactions*. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.04.010>
- Rizzo, M. A., Shome, K., Vasudevan, C., Stolz, D. B., Sung, T. C., Frohman, M. A., *et al.* (1999). Phospholipase D and its product, phosphatidic acid, mediate agonist-dependent Raf-1 translocation to the plasma membrane and the activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.2.1131>
- Robichaud, P. P., & Surette, M. E. (2015). Polyunsaturated fatty acid-phospholipid remodeling and inflammation. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*. <https://doi.org/10.1097/MED.000000000000138>
- Rodríguez Diez, G., Sánchez Campos, S., Giusto, N. M., & Salvador, G. A. (2013). Specific roles for Group V secretory PLA2 in retinal iron-induced oxidative stress. Implications for age-related macular degeneration. *Experimental Eye Research*. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2013.05.019>
- Rodríguez Diez, G., Uranga, R. M., Mateos, M. V., Giusto, N. M., & Salvador, G. A. (2012). Differential participation of phospholipase A2 isoforms during iron-induced retinal toxicity. Implications for age-related macular degeneration. *Neurochemistry International*. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2012.06.012>
- Ross, R. A., Biedler, J. L., Spengler, B. A., & Reis, D. J. (1981). Neurotransmitter-synthesizing enzymes in 14 human neuroblastoma cell lines. *Cellular and Molecular Neurobiology*. <https://doi.org/10.1007/BF00710685>
- Rouault, T. A. (2013). Iron metabolism in the CNS: Implications for neurodegenerative diseases. *Nature Reviews Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/nrn3453>
- Rouser, G., Fleischer, S., & Yamamoto, A. (1970). Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids*. <https://doi.org/10.1007/BF02531316>
- Saggu, R., Schumacher, T., Gerich, F., Rakers, C., Tai, K., Delekate, A., & Petzold, G. C. (2016). Astroglial NF- $\kappa$ B contributes to white matter damage and cognitive impairment in a mouse model of vascular dementia. *Acta neuropathologica communications*. <https://doi.org/10.1186/s40478-016-0350-3>
- Saito, Y., Kawashima, A., Ruberu, N. N., Fujiwara, H., Koyama, S., Sawabe, M., *et al.* (2003). Accumulation of Phosphorylated  $\alpha$ -Synuclein in Aging Human Brain. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. <https://doi.org/10.1093/jnen/62.6.644>
- Sakai, H., Moriura, Y., Notomi, T., Kawawaki, J., Ohnishi, K., & Kuno, M. (2010).

- Phospholipase C-dependent Ca<sup>2+</sup>-sensing pathways leading to endocytosis and inhibition of the plasma membrane vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase in osteoclasts. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00486.2009>
- Sala, A., Proschak, E., Steinhilber, D., & Rovati, G. E. (2018). Two-pronged approach to anti-inflammatory therapy through the modulation of the arachidonic acid cascade. *Biochemical Pharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.10.007>
- Salari, S., & Bagheri, M. (2019). In vivo, in vitro and pharmacologic models of Parkinson's disease. *Physiological Research*. <https://doi.org/10.33549/physiolres.933895>
- Salem, N., Litman, B., Kim, H. Y., & Gawrisch, K. (2001). Mechanisms of action of docosahexaenoic acid in the nervous system. *Lipids*. <https://doi.org/10.1007/s11745-001-0805-6>
- Salvador, G. A., & Giusto, N. M. (1998). Characterization of phospholipase D activity in bovine photoreceptor membranes. *Lipids*. <https://doi.org/10.1007/s11745-998-0281-z>
- Salvador, Gabriela A., & Oteiza, P. I. (2011). Iron overload triggers redox-sensitive signals in human IMR-32 neuroblastoma cells. *NeuroToxicology*. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2010.11.006>
- Schaeffer, E. L., Forlenza, O. V., & Gattaz, W. F. (2009). Phospholipase A2 activation as a therapeutic approach for cognitive enhancement in early-stage Alzheimer disease. *Psychopharmacology*. <https://doi.org/10.1007/s00213-008-1351-0>
- Schaser, A. J., Osterberg, V. R., Dent, S. E., Stackhouse, T. L., Wakeham, C. M., Boutros, S. W., *et al.* (2019). Alpha-synuclein is a DNA binding protein that modulates DNA repair with implications for Lewy body disorders. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47227-z>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., *et al.* (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Schwab, J. M., Chiang, N., Arita, M., & Serhan, C. N. (2007). Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature05877>
- Seiler, A., Schneider, M., Förster, H., Roth, S., Wirth, E. K., Culmsee, C., *et al.* (2008). Glutathione Peroxidase 4 Senses and Translates Oxidative Stress into 12/15-Lipoxygenase Dependent- and AIF-Mediated Cell Death. *Cell Metabolism*. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.07.005>
- Seung Kim, H. F., Weeber, E. J., Sweatt, J. D., Stoll, A. L., & Marangell, L. B. (2001). Inhibitory effects of omega-3 fatty acids on protein kinase C activity in vitro. *Molecular Psychiatry*. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4000837>
- Sharon, R., Bar-Joseph, I., Frosch, M. P., Walsh, D. M., Hamilton, J. A., & Selkoe, D. J.

- (2003). The formation of highly soluble oligomers of  $\alpha$ -synuclein is regulated by fatty acids and enhanced in Parkinson's disease. *Neuron*. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00024-2](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00024-2)
- Shen, Z. Y., Sun, Q., Xia, Z. Y., Meng, Q. T., Lei, S. Q., Zhao, B., *et al.* (2016). Overexpression of DJ-1 reduces oxidative stress and attenuates hypoxia/reoxygenation injury in NRK-52E cells exposed to high glucose. *International Journal of Molecular Medicine*. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2016.2680>
- Shih, R.-H., Wang, C.-Y., & Yang, C.-M. (2015). NF-kappaB Signaling Pathways in Neurological Inflammation: A Mini Review. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2015.00077>
- Simola, N., Morelli, M., & Carta, A. R. (2007). The 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Neurotoxicity Research*. <https://doi.org/10.1007/BF03033565>
- Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: Biology and pathology. *Acta Neuropathologica*. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0619-8>
- Song, N., Jiang, H., Wang, J., & Xie, J. X. (2007). Divalent metal transporter 1 up-regulation is involved in the 6-hydroxydopamine-induced ferrous iron influx. *Journal of Neuroscience Research*. <https://doi.org/10.1002/jnr.21430>
- Soon, A. L., Hye, J. K., Ki, C. C., Jong, C. B., Ji, K. P., Jeong, K. S., *et al.* (2009). DHA and EPA down-regulate COX-2 expression through suppression of NF- $\kappa$ B activity in LPS-treated human umbilical vein endothelial cells. *Korean Journal of Physiology and Pharmacology*. <https://doi.org/10.4196/kjpp.2009.13.4.301>
- Stanic, D., Finkelstein, D. I., Bourke, D. W., Drago, J., & Horne, M. K. (2003). Timecourse of striatal re-innervation following lesions of dopaminergic SNpc neurons of the rat. *European Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02800.x>
- Storch, A., Kaftan, A., Burkhardt, K., & Schwarz, J. (2003). 6-Hydroxydopamine toxicity towards human SH-SY5Y dopaminergic neuroblastoma cells: independent of mitochondrial energy metabolism. *Journal of Neural Transmission*. <https://doi.org/10.1007/s007020050023>
- Stott, S. R. W., & Barker, R. A. (2014). Time course of dopamine neuron loss and glial response in the 6-OHDA striatal mouse model of Parkinson's disease. *European Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1111/ejn.12459>
- Strokin, M., Sergeeva, M., & Reiser, G. (2003). Docosahexaenoic acid and arachidonic acid release in rat brain astrocytes is mediated by two separate isoforms of phospholipase A 2 and is differently regulated by cyclic AMP and Ca 2+. *British Journal of Pharmacology*. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705326>
- Strokin, M., Sergeeva, M., & Reiser, G. (2007). Prostaglandin synthesis in rat brain astrocytes is under the control of the n-3 docosahexaenoic acid, released by group VIB calcium-independent phospholipase A2. *Journal of Neurochemistry*. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04663.x>
- Sullivan, E. V., Adalsteinsson, E., Rohlfing, T., & Pfefferbaum, A. (2009). Relevance of

- iron deposition in deep gray matter brain structures to cognitive and motor performance in healthy elderly men and women: Exploratory findings. *Brain Imaging and Behavior*. <https://doi.org/10.1007/s11682-008-9059-7>
- Sun, G. Y., Xu, J., Jensen, M. D., & Simonyi, A. (2004). Phospholipase A2 in the central nervous system: Implications for neurodegenerative diseases. *Journal of Lipid Research*. <https://doi.org/10.1194/jlr.R300016-JLR200>
- Surmeier, D. J., Guzman, J. N., Sanchez-Padilla, J., & Goldberg, J. A. (2011). The origins of oxidant stress in parkinson's disease and therapeutic strategies. *Antioxidants and Redox Signaling*. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3521>
- Thompson, J. M., London, E. D., & Johnson, J. E. (1982). Ultrastructural, functional and biochemical characteristics of mouse and human neuroblastoma cell lines. *Neuroscience*. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(82\)90038-0](https://doi.org/10.1016/0306-4522(82)90038-0)
- Tobaben, S., Grohm, J., Seiler, A., Conrad, M., Plesnila, N., & Culmsee, C. (2011). Bid-mediated mitochondrial damage is a key mechanism in glutamate-induced oxidative stress and AIF-dependent cell death in immortalized HT-22 hippocampal neurons. *Cell Death and Differentiation*. <https://doi.org/10.1038/cdd.2010.92>
- Trexler, A. J., & Taraska, J. W. (2017). Regulation of insulin exocytosis by calcium-dependent protein kinase C in beta cells. *Cell Calcium*. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2017.07.008>
- Tumilowicz, J. J., Nichols, W. W., Cholon, J. J., & Greene, A. E. (1970). Definition of a continuous human cell line derived from neuroblastoma. *Cancer Research*.
- Tysnes, O. B., & Storstein, A. (2017). Epidemiology of Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission*. <https://doi.org/10.1007/s00702-017-1686-y>
- Uemura, N., Yagi, H., Uemura, M. T., Hatanaka, Y., Yamakado, H., & Takahashi, R. (2018). Inoculation of  $\alpha$ -synuclein preformed fibrils into the mouse gastrointestinal tract induces Lewy body-like aggregates in the brainstem via the vagus nerve. *Molecular Neurodegeneration*. <https://doi.org/10.1186/s13024-018-0257-5>
- Uranga, R. M., Alza, N. P., Conde, M. A., Antollini, S. S., & Salvador, G. A. (2017). Phosphoinositides: Two-Path Signaling in Neuronal Response to Oligomeric Amyloid  $\beta$  Peptide. *Molecular Neurobiology*. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-9885-3>
- Uranga, R. M., Katz, S., & Salvador, G. A. (2013). Enhanced phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt signaling has pleiotropic targets in hippocampal neurons exposed to iron-induced oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.457622>
- Vasquez, A. M., Mouchlis, V. D., & Dennis, E. A. (2018). Review of four major distinct types of human phospholipase A2. *Advances in Biological Regulation*. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2017.10.009>
- Venero, J. L., Revuelta, M., Cano, J., & Machado, A. (2002). Time Course Changes in the Dopaminergic Nigrostriatal System Following Transection of the Medial Forebrain Bundle: Detection of Oxidatively Modified Proteins in Substantia Nigra. *Journal of*

- Neurochemistry*. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.68062458.x>
- Violette, S. M., King, I., Browning, J. L., Pepinsky, R. B., Wallner, B. P., & Sartorelli, A. C. (1990). Role of lipocortin I in the glucocorticoid induction of the terminal differentiation of a human squamous carcinoma. *Journal of Cellular Physiology*. <https://doi.org/10.1002/jcp.1041420110>
- Voloboueva, L. A., Killilea, D. W., Atamna, H., & Ames, B. N. (2007). N-tert-butyl hydroxylamine, a mitochondrial antioxidant, protects human retinal pigment epithelial cells from iron overload: relevance to macular degeneration. *The FASEB Journal*. <https://doi.org/10.1096/fj.07-8396com>
- Volpicelli-Daley, L., & Brundin, P. (2018). Prion-like propagation of pathology in Parkinson disease. In *Handbook of Clinical Neurology*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63945-5.00017-9>
- Walsh, S., Finn, D. P., & Dowd, E. (2011). Time-course of nigrostriatal neurodegeneration and neuroinflammation in the 6-hydroxydopamine-induced axonal and terminal lesion models of Parkinson's disease in the rat. *Neuroscience*. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.12.005>
- Wang, Z. Bin, Liu, J. Y., Xu, X. J., Mao, X. Y., Zhang, W., Zhou, H. H., & Liu, Z. Q. (2019). Neurodegeneration with brain iron accumulation: Insights into the mitochondria dysregulation. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109068>
- Wang, J. Y., Zhuang, Q. Q., Zhu, L. B., Zhu, H., Li, T., Li, R., *et al.* (2016). Meta-analysis of brain iron levels of Parkinson's disease patients determined by postmortem and MRI measurements. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/srep36669>
- Wang, W. J., Li, Q. Q., Xu, J. Da, Cao, X. X., Li, H. X., Tang, F., *et al.* (2008). Over-expression of Ubiquitin carboxy terminal hydrolase-L1 induces apoptosis in breast cancer cells. *International Journal of Oncology*. [https://doi.org/10.3892/ijo\\_00000092](https://doi.org/10.3892/ijo_00000092)
- Wang, X. F., & Cynader, M. S. (2000). Astrocytes provide cysteine to neurons by releasing glutathione. *Journal of Neurochemistry*. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0741434.x>
- Ward, R. J., Zucca, F. A., Duyn, J. H., Crichton, R. R., & Zecca, L. (2014). The role of iron in brain ageing and neurodegenerative disorders. *The Lancet Neurology*. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70117-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70117-6)
- Waxman, E. A., & Giasson, B. I. (2011). Characterization of kinases involved in the phosphorylation of aggregated  $\alpha$ -synuclein. *Journal of Neuroscience Research*. <https://doi.org/10.1002/jnr.22537>
- Wong, S. W., Kwon, M. J., Choi, A. M. K., Kim, H. P., Nakahira, K., & Hwang, D. H. (2009). Fatty acids modulate toll-like receptor 4 activation through regulation of receptor dimerization and recruitment into lipid rafts in a reactive oxygen species-dependent manner. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.044065>



- Xie, X. N., Yu, J., Zhang, L. H., Luo, Z. Y., Ouyang, D. S., Zheng, L. J., *et al.* (2019). Relationship between polymorphisms of the lipid metabolism-related gene PLA2G16 and risk of colorectal cancer in the Chinese population. *Functional and Integrative Genomics*. <https://doi.org/10.1007/s10142-018-0642-8>
- Xu, F., Song, Y., & Guo, A. (2019). Anti-apoptotic effects of docosahexaenoic acid in il-1 $\beta$ -induced human chondrosarcoma cell death through involvement of the mapk signaling pathway. *Cytogenetic and Genome Research*. <https://doi.org/10.1159/000500290>
- Zaręba, M., Bober, A., Korytowski, W., Zecca, L., & Sarna, T. (1995). The effect of a synthetic neuromelanin on yield of free hydroxyl radicals generated in model systems. *BBA - Molecular Basis of Disease*. [https://doi.org/10.1016/0925-4439\(95\)00058-C](https://doi.org/10.1016/0925-4439(95)00058-C)
- Zecca, L., Gallorini, M., Schünemann, V., Trautwein, A. X., Gerlach, M., Riederer, P., *et al.* (2001). Iron, neuromelanin and ferritin content in the substantia nigra of normal subjects at different ages: Consequences for iron storage and neurodegenerative processes. *Journal of Neurochemistry*. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00186.x>
- Zecca, L., Youdim, M. B. H., Riederer, P., Connor, J. R., & Crichton, R. R. (2004). Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nature Reviews Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/nrn1537>
- Zhang, Q., Lenardo, M. J., & Baltimore, D. (2017). 30 Years of NF- $\kappa$ B: A Blossoming of Relevance to Human Pathobiology. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.12.012>

**PUBLICACIONES ORIGINADAS DE ESTA TESIS****Publicaciones en revistas científicas:**

- Conde, M.A.; Alza, N.P.; **Iglesias González, P.A.**; Scodelaro Bilbao, P.G.; Sánchez Campos, S.; Uranga, R.M.; Salvador, G.A. (2018) “Phospholipase D1 downregulation by  $\alpha$ -synuclein: Implications for neurodegeneration in Parkinson's disease”. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids*, Junio 2018. ISSN 1388-1981 (impreso), 1388-1981 (electrónico). doi: 10.1016/j.bbalip.2018.03.006.
- Alza, N.P.; **Iglesias González, P.A.**; Conde, M.A.; Uranga, R.M.; Salvador, G.A. (2019) “Lipids at the crossroad of  $\alpha$ -synuclein function and dysfunction: Biological and pathological implications”. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, Mayo 2019. ISSN: 1662-5102 (impreso), 1662-5102 (electrónico). doi: 10.3389/fncel.2019.00175.
- **Iglesias González, P.A.**; Conde, M.A.; González-Pardo V.; Uranga, R.M.; Salvador, G.A. (2019) “*In vitro* 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity: new insights on NF-kB modulation”. *Toxicology in vitro*, Octubre 2019. ISSN: 0887-2333 (impreso), 0887-2333 (electrónico). doi: 10.1016/j.tiv.2019.06.019.

**ABREVIATURAS**

[ <sup>3</sup> H]AO	[ <sup>3</sup> H]ácido oleico
[ <sup>3</sup> H]DA	[ <sup>3</sup> H]dopamina
AA	Ácido araquidónico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AG	Ácido graso
ARN	Ácido ribonucleico
ARNi	ARN de interferencia
ATB	Ácido tiobarbitúrico
COX	Ciclooxigenasa
cPLA2	Fosfolipasa A2 citosólica
DAG	Diacilglicerol
DAGK	Diacilglicerol quinasas
DCDHF-DA	Diclorodihidrofluoresceína diacetato
DHA	Ácido docosahexaenoico
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTP	Desoxirribonucleótido trifosfato
DTT	Ditiotreitol
EA	Enfermedad de Alzheimer
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EO	Estrés oxidativo
EP	Enfermedad de Parkinson
ERK1/2	Quinasas reguladas por señal extracelular 1 y 2

EROs	Especies reactivas de oxígeno
FAC	Citrato amonio férrico
FAHN	Neurodegeneración asociada a hidroxilasa-2 de ácidos grasos
Fe	Hierro
Fe <sup>2+</sup>	Hierro en estado ferroso
Fe <sup>3+</sup>	Hierro en estado férrico
FC	Fracción citosólica (Fraccionamiento subcelular)
FN	Fracción nuclear (Fraccionamiento subcelular)
γGluCis	γ glutamil cisteína
GBA	Glucocerebrosidasa
GCL	γ glutamylcisteína ligasa
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GLUT	Transportador de glucosa
GSH	Glutación reducido
HCl	Ácido clorhídrico
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazinetansulfónico
hnRNP	Ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares
HRP	Peroxidasa de rábano
ICQ	Inmunocitoquímica
IκB	Inhibidor de kappa B
IP3	Inositol trifosfato
iPLA2	Fosfolipasa A2 independiente de calcio
IRE	Elementos de respuesta al hierro

KRD	Enfermedad de Kufor-Rakeb
LDH	Lactato deshidrogenasa
LOX	Lipooxigenasa
LPA	Ácido lisofosfatídico
LPC	Lisofosfatidilcolina
LRRK2	Quinasa 2 repetida rica en leucina
MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
MDA	Malondialdehído
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3, 6 tetrahidropiridina
mTOR	Diana de rapamicina en células de mamífero
MTT	Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio
NAHC	Trastornos de neurodegeneración con acumulación de Fe en el cerebro
NF- $\kappa$ B	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NP-40	Nonidet P-40
NPD1	Neuroprotectina D1
PA	Ácido fosfatídico
PAP-1	Fosfohidrolasa 1 del PA
PAP-2	Fosfohidrolasa 2 del PA
PBS	<i>Buffer</i> fosfato salino
PC	Fosfatidilcolina
PKD-1	Quinasa dependiente de fosfoinositol-1
PE	Fosfatidiletanolamina

PEth	Fosfatidiletanol
PI	Fosfatidilinositol
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinasa
PI4P5K tipo I	Fosfatidilinositol 4-fosfato 5-quinasa
PIP2	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
PINK1	PTEN inducible por quinasa 1
PKAN	Neurodegeneración asociada a pantotenato-quinasa
PKC	Proteína quinasa C
PLA1	Fosfolipasa A1
PLA2	Fosfolipasa A2
PLAN	Neurodegeneración Asociada a la Fosfolipasa A2G6
PLC	Fosfolipasa C
PLD	Fosfolipasa D
PLD1	Isoforma 1 de PLD
PLD2	Isoforma 2 de PLD
PLK2	Polo-quinasa 2
PlsEtn-PLA2	Fosfolipasa selectiva para plasmalógenos
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonio
PP-1	Proteína fosfatasa-1
PVDF	Difluoruro de polivinilideno
RP	Receptores E-prostanoides
RP4	Receptor 4 de prostaglandina E2
RvD2	Resolvina D2

S6K1	Quinasa 1 S6
SAB	Seroalbúmina bovina
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio
SFB	Suero fetal bovino
SNC	Sistema nervioso central
SNpc	<i>Substantia nigra pars compacta</i>
SOD	Superóxido dismutasa
SPHK1	Esfingosina quinasa 1
sPLA2	Fosfolipasa A2 secretoria dependientes de calcio
TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TBS-T	<i>Buffer</i> Tris salino con <i>tween 20</i>
TCA	Ácido tricloroacético
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina
TH	Tirosina hidroxilasa
Tris	2-amino-2-hidroximetil-propan-1,3-diol
UCH-L1	Ubiquitina carboxil terminal hidrolasa L1
O <sub>2</sub> <sup>•</sup>	Radical superóxido
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
ONOO <sup>•</sup>	Radical peroxinitrito
OH <sup>•</sup>	Radical oxhidrilo
5'UTR	Región 5' no traducida
6-OHDA	6-hidroxi-dopamina

15-PGDH      15-prostaglandina deshidrogenasa