



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
UNIDAD ZACATENCO**

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS

**“Efecto de Gas1 sobre la diferenciación neuronal y la
neurotoxicidad inducida por 6-OHDA”**

Tesis que presenta:

M. en C. ELIZABETH BAUTISTA RODRÍGUEZ

Para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS

En la especialidad de:

NEUROBIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

Director de Tesis:

DR. JOSÉ VÍCTOR SEGOVIA VILA

México, D.F

Julio, 2017

AGRADECIMIENTOS:

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada con el número de becario 244958 durante el proyecto de doctorado.

**Al Instituto Carlos Slim de la Salud por la Beca Carlos Slim Excelencia.
Folio: S131914074, FOLIO SP: 132055820**

AGRADECIMIENTOS:

Esta tesis doctoral, no hubiese sido posible sin la cooperación desinteresada de todas y cada una de las personas que anunciaré a continuación, Espero no dejar a nadie en el tintero, de ser así ofrezco una disculpa.

Ya que la familia es lo primero en todo y cuyas palabras no me alcanzarán para expresar todo mi agradecimiento.

A mi esposo José Luis, por su apoyo, amor y paciencia en este camino que hemos decido compartir juntos. Te amo.

A mis padres Judith y Roberto por sus enseñanzas, soporte y su ejemplo de vida. Los Amo.

A Felicitas y Moisés mi segundos padres que me brindan todo su apoyo y amor sin ningún interés. Los Amo.

Fabián y Sofía por su ayuda en todo momento, cariño, apoyo y la alegría que me brindan. Los amo.

A Iveth, Andy y Lu por enseñarme la importancia de los hermanos, por su soporte y cariño. Las Amo.

A mi tutor el Dr. José Víctor Segovia Vila por su guía, apoyo, confianza, paciencia y la oportunidad de desarrollarme como investigadora, que consolidaron mi firme compromiso con la ciencia. Mi reconocimiento como un investigador con un fuerte compromiso por su vocación.

A mis asesores por sus valiosos comentarios y observaciones al Dr. Diego Ricardo Felix Grijalva del Depto. de Biología Celular/CINVESTAV, al Dr. Daniel Martínez Fong del Depto. de FByN/CINVESTAV, al Dr. Benjamín Florán Garduño del Depto. de FByN/CINVESTAV y al Dr. Raúl Antonio Aguilar Roblero de la UNAM/IFC/División de Neurociencias.

Por el apoyo administrativo a la Dra. Ma. Eugenia Garrido Mendoza.

Por permitirme hacer parte de los experimentos en su laboratorio al Dr. Juan Antonio González-Barrios del Hospital 1° de Octubre ISSSTE.

Por el apoyo técnico y personal, convirtiéndose además de colaboradores en grandes amigos:

Q.F.B. Araceli Navarrete Alonso
Técnico Rubén Sánchez Islas
M en C. Manuel Lara Lozano
Ing. José Nicolás Aguirre Pineda
M. en C. Lizbeth Daniel García

Dr. José Miguel Chin Chan
Dr. Dulce Ávila Rodríguez
M. en C. Laura Sánchez Hernández
M. en C. Emmanuel Barbosa
Dr. Lucia Gabriela García

Mi especial agradecimiento al Dr. Natanael Zarco Salinas y la Q.F.I. Paula Vergara Zubillaga, quienes me han dado un claro ejemplo de la dedicación y amor por lo que hacen, y quienes se han convertido en amigos entrañables.

A mis amigos Aida, Ino, Eli y Jonathan, que hicieron que mi estancia en el CINVESTAV fuera placentera. Por su amistad apoyo, confianza, tiempo y cariño.

A todos mis compañeros de laboratorio que he conocido durante mi estancia en el laboratorio y de quienes aprecio sus enseñanzas.

Finalmente, esta lista sería interminable al agradecer al personal administrativo (Ale, Luz Ma y Maru), auxiliares y técnicos (Lulu, Carmen, Lidia, Aurora, José y Marisol), que sin interés alguno han ayudado a que tenga una estancia agradable en el CINVESTAV.

DEDICADO A:

A mi familia que son mi soporte y mi motor en la vida para ser cada día una mejor persona y dar lo mejor de mí en lo que hago.

Cada minuto que pasa es una oportunidad así que demos gracias y miremos hacia arriba.

ABREVIATURAS

Generales

6-OHDA: 6-hidroxidopamina

9-cis AR: ácido 9-cis retinoico

ADAM: metaloproteasas (ADAM)

ADHs o RDHs/SDRs. alcohol deshidrogenasa

AKT: Cinasa de Proteína B: cinasa de serinas y treoninas

APP: proteína precursora del Amiloide β

AR: ácido retinoico

ARTN: artemina

ATRA: ácido retinoico all-trans

Bad: antagonista de Bcl2 de la muerte celular

BMP: proteína morfogénica del hueso

CRABPs: proteínas de unión del ácido retinoico

CRBPs: proteínas de unión celular al retinol

CTN: células troncales neurales

DAT: transportador de dopamina

EGL: capa granular externa del cerebelo

ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

EP: enfermedad de Parkinson

ESCs: células madre embrionarias

Gas1: growth arrest specific 1

GDNF: factor neurotrófico derivado de glía

GFAP: proteína fibrilar acídica de glial

GFL: ligandos de la familia de GDNF

GFP: proteína verde fluorescente

GFR α : receptor alfa de la familia de los ligandos de GDNF

GPI: grupo glicosil-fosfatidilinositol

GSK3: glucógeno sintasa cinasa 3

iPCs: células pluripotentes inducidas

LCR: líquido cefalorraquídeo

LPS: lipopolisacárido
MAO: monoamino oxidasa
MAP2: proteína asociada a los microtúbulos 2
MYC: factor de transcripción Myc
N1E115: células de neuroblastoma de ratón
Nardilisina: N-Arg di-básica convertasa
NAT: transportador de recaptura de noradrenalina
NIH/3T3: línea celular de fibroblastos de ratón
NMDA: N-metil-D-aspartato
NRTN: Neurturina
NSE: enolasa específica neuronal
PI3K: cinasa de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato
PP2A: proteína fosfatasa 2A (PP2A)
PSEN 1: presenilina 1
pSer9-GSK3 β : fosforilación en la serina 9 de GSK3 β
PSPN: persefina
Ptc: patched
pTyr-GSK3 β : fosforilación en la tirosina 216 de GSK3 β
RALDHs: retinaldehído deshidrogenasa
RAREs: secuencias consenso de DNA conocidas como elementos de respuesta al ácido retinoico
RARs: receptores nucleares de AR
RE: retículo endoplásmico
RNS: especies reactivas de nitrógeno
ROS: especies reactivas de oxígeno
RXRs: receptores X de retinoides
SFB: suero fetal bovino
SH ANT-GAS1: células de neuroblastoma que no expresan Gas1
SH-GAS1: células de neuroblastoma que sobreexpresan Gas1 completo
Shh: sonic hedgehog
SH-SY5Y: células de neuroblastoma humano

SH-tGAS1: células de neuroblastoma que sobreexpresan Gas1 carente del ancla GPI

Smo: smoothed

SNC: sistema nervioso central

SOD: superóxido dismutasa

TCF/LEF: factor derivado de células-T (TCF) y factor de unión al potenciador linfoide (*lymphoid enhancer-binding factor* o LEF).

TH: tirosina hidroxilasa

VMAT: transportador vesicular de monaminas

WNT: proteína wingless

RESUMEN

Gas1 es una proteína pleiotrópica que induce apoptosis en células tumorales y tiene un papel fundamental durante el desarrollo, ya que promueve la diferenciación miogénica y la proliferación celular en el cerebelo. Sin embargo, su caracterización neuroquímica y función fisiológica en el cerebro no ha sido aun totalmente elucidada. Recientemente, se ha reportado la presencia de dos formas de Gas1, una unida a la membrana por GPI y la otra secretada por células. Previamente nuestro grupo mostró que Gas1 se expresa en diferentes áreas del cerebro adulto. Inicialmente, reportamos los niveles de ARNm y proteína de Gas1 en diferentes regiones del cerebro y analizamos su expresión en neuronas glutamatérgicas (VGLUT2⁺), GABAérgicas (GAD67⁺) y dopaminérgicas (TH⁺). Los resultados muestran que Gas1 se expresa en neuronas GABAérgicas y glutamatérgicas presentes en el hipocampo, tálamo, núcleo fastigial, capa molecular y Purkinje del cerebelo, así como en neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra. Sin embargo, se detectaron bajos niveles de Gas1 en neuronas granulares del cerebelo. En este contexto, también se muestra que Gas1 se expresa y libera de las neuronas en cultivo primario de células de Purkinje, del hipocampo, y de líneas celulares neuronales (SH-SY5Y y N1E115 células diferenciadas), pero no de las células granulares del cerebelo. Adicionalmente, utilizando células SH-SY5Y diferenciadas con ácido retinoico (AR) como un modelo de diferenciación neuronal, encontramos que Gas1 indujo la formación de neuritas a través de la inhibición de GSK3 β y aumentó los niveles de tirosina hidroxilasa (TH). Con base en lo anterior y utilizando células SH-SY5Y diferenciadas con AR y tratadas con 6-OHDA como modelo *in vitro* de la enfermedad de Parkinson (EP), encontramos que Gas1 indujo neuroprotección contra el daño inducido por 6-OHDA. Esto mediante la inhibición de GSK3 β , estabilización de los niveles de β -catenina, aumento de los niveles de TH y SOD1, y disminución de los niveles de óxido nítrico. En conjunto estos resultados muestran que Gas1 regula de manera paracrina la señalización en el cerebro, promueve la formación de neuritas y la diferenciación dopaminérgica. Asimismo con base en lo anterior se mostró su efecto neuroprotector ante el daño inducido por la 6-OHDA señalándolo como un posible agente terapéutico para el tratamiento de la EP.

ABSTRACT

Gas1 is a pleiotropic protein that induces apoptosis of tumor cells and has important roles in development promoting myogenic differentiation and cell proliferation in the cerebellum, however, the characterization of both the neurochemical localization and physiological functions of Gas1 remains largely unknown. Recently, it has been reported the presence of two forms of Gas1, one attached to the membrane by GPI and the other secreted by cells. Previously, we showed that Gas1 is expressed in different areas of the adult mouse brain. Here, we report the levels of Gas1 mRNA and protein in different brain regions and analyzed its expression in glutamatergic (VGLUT2⁺), GABAergic (GAD₆₇⁺) and dopaminergic (TH⁺) neurons. We found that Gas1 is expressed in GABAergic and glutamatergic neurons in the Purkinje-molecular layer of the cerebellum, hippocampus, thalamus, and fastigial nucleus, as well as in dopaminergic neurons of the substantia nigra. However, low levels of Gas1 were detected in the granular neurons of cerebellum. In this regard we detected the expression and release of Gas1 in primary culture of neurons of Purkinje and hippocampal cells as well as in neuronal cell lines (SH-SY5Y and N1E115 differentiated cells) but not from cerebellar granular cells. Additionally, using SH-SY5Y cells differentiated with retinoic acid (RA) as a neuronal model, we found that Gas1 induced the formation of neurite through the inhibition of GSK3 β and increased the levels of tyrosine hydroxylase (TH). Based on the above and using SH-SY5Y cells differentiated with RA and treated with 6-OHDA as *in-vitro* model of the Parkinson's disease (PD). We found that Gas1 induced neuroprotection against damage induced by 6-OHDA, through of the inhibition of GSK3 β , stabilizing the levels of β -catenin, increasing the levels of TH and SOD1, and decreasing the levels of nitric oxide. Taken together, these results show that Gas1 regulates paracrine signaling, promotes the formation of neurites and dopaminergic differentiation. Likewise, based on the above, we reported its neuroprotective effect against the 6-OHDA-induced damage and we suggest that Gas1 could be a potential therapeutic agent for treatment of the PD.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	14
1. Gas1 (Growth arrest specific 1)	
1.1 Regulación transcripcional y estructura proteica de Gas1	14
1.2 Expresión de Gas1	15
1.3 Funciones de Gas1	16
1.3.1 Gas1 inhibe la señalización inducida por GDNF	19
1.3.2 Gas1 estimula la vía de señalización de Shh	20
2. Ácido retinoico	
2.1 Síntesis	21
2.2 Mecanismo de acción del ácido retinoico	21
2.3 Diferenciación neuronal del AR acciones genómicas y no genómicas	23
3. Enfermedad de Parkinson	
3.1 Características y cambios bioquímicos de la EP	25
3.2 6-hidroxidopamina (6-OHDA) modelo experimental de la EP	26
3.3 Efectos neuroprotectores de los inhibidores de GSK3 β	27
II. JUSTIFICACIÓN	34
III. HIPÓTESIS	34
IV. OBJETIVO GENERAL	35
4.1 Objetivos particulares	35
V. MATERIALES Y METODOS	36
5.1 Sujetos experimentales	36
5.2 Cultivo celular	36
5.3 Tratamiento con 6-OHDA	37
5.4 Ensayos de viabilidad celular: MTT y de Azul de tripano	37
5.5 Cultivo primario	38
5.6 Generación de la línea estable SH-GAS1 y producción de proteína recombinante Gas1 (SH-tGAS1)	38
5.7 Inmunofluorescencia.....	39
5.8 Inmunocitoquímica y conteo de neuritas	39

5.9	Microscopia confocal	41
5.10	Extracción de RNA y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)	41
5.11	Extracción de RNA y PCR tiempo real	41
5.12	ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas)	42
5.13	Microdisección de las capas del cerebelo	42
5.14	<i>Western blot</i>	42
5.15	Niveles de óxido nítrico (NO)	43
5.16	Análisis estadístico	43
VI.	RESULTADOS	44
6.1	Gas1 se expresa en diferentes órganos del ratón adulto	44
6.2	Gas1 se expresa en diferentes regiones del SNC de ratón adulto, siendo el cerebelo la región con los mayores niveles	45
6.3	Gas1 se expresa en el cuerpo celular de las neuronas GABAérgicas y glutamatérgicas tanto del giro dentado como en el cuerno de Amón.....	46
6.4	Gas1 se expresa en el cuerpo celular pero no en el neuropilo de neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas del tálamo.....	48
6.5	En el cerebelo, Gas1 se expresa en el cuerpo celular de las neuronas GABAérgicas y en las neuronas glutamatérgicas del núcleo fastigial pero no está presente en células glutamatérgicas de la capa granular	48
6.6	La capa de células Purkinje-molecular presenta altos niveles de Gas1 mientras que la capa de células granulares del cerebelo tiene bajos niveles	57
6.7	Gas1 es secretado por neuronas de Purkinje y del hipocampo pero no de células granulares del cerebelo	58
6.8	Los niveles de Gas1 se incrementa durante el proceso de diferenciación de la células SH-SY5Y inducida con AR	61
6.9	El silenciamiento de Gas1 disminuye la formación de neuritas inducidas por el AR en células SH-SY5Y	62
6.10	Gas1 soluble induce la formación de neuritas a través de la inhibición de GSK3 β	63

6.11	Gas1 aumenta los niveles de TH en células SH-SY5Y diferenciadas con AR y se expresa en células dopaminérgicas de la SNpc	64
6.12	El promotor de <i>gas1</i> humano, ratón y rata presenta sitios RARE y TCF/LEF	66
6.13	Búsqueda de los motivos funcionales de Gas1	67
6.14	Determinación de la concentración efectiva 50 de 6-OHDA.....	70
6.15	Desarrollo y caracterización de las células SH GAS1	72
6.16	Gas1 promueve la supervivencia celular de las células SH-SY5Y tratadas con 6-OHDA y diferenciadas con AR	74
6.17	Gas1 promueve la supervivencia celular a través de la inhibición de GSK3 β e incremento de β -catenina total	75
6.18	Gas1 incrementa los niveles de tirosina hidroxilasa	
6.19	Gas1 incrementa los niveles de superóxido dismutasa 1 (SOD1) en células SH-SY5Y diferenciadas y tratadas con 6-OHDA	77
6.20	Gas1 incrementa los niveles de óxido nítrico pero atenúa los niveles que induce la 6-OHDA en las células SH-SY5Y diferenciadas.....	78
VII.	DISCUSIÓN	79
VIII.	CONCLUSIONES	86
IX.	PERSPECTIVAS	87
X.	BIBLIOGRAFÍA	88
XI.	ANEXOS	102

I. INTRODUCCION

1. Gas1 (Growth arrest specific 1)

1.1 Regulación transcripcional y estructura protéica de Gas1

El balance entre el estado proliferativo y el quiescente de las células es regulado por diversos factores extrínsecos e intrínsecos. Las células pueden salir del ciclo celular y entrar a una fase no proliferativa conocida como fase G0. En esta fase se identificó la expresión de seis genes conocidos como *gas* (*growth arrest-specific*) [130]. De esta, el mRNA de *gas1* es el más abundante en células NIH/3T3 en fase G0 inducida por la privación de suero o por alta densidad celular [20, 35, 130]. Los genes *Gas1* humano y de ratón están localizados en el brazo largo del cromosoma 9 y 13, los cuales presenta un 77.04% de homología entre ellos [23, 34]. El gen *gas1* posee un solo exón, sugiriendo que probablemente fue originado por retrotraposición [61]. Hay pocos estudios acerca de la regulación transcripcional de *gas1*, sin embargo, se ha reportado que Menin [59], c-Myc [85] y Src [58] reprimen la transcripción de *gas1*, mientras que C/EBP [116] Wt1 [73] y el ácido retinoico (AR) [41, 150] inducen su transcripción. Adicionalmente se ha reportado la interacción de cuatro miRNAs con el mRNA humano de *GAS1*. miR-34a-5p, -148a-3p, -130b-5p and -183-5p [60, 67]. miR-34a-5p reprime la expresión de *GAS1* promoviendo así la supervivencia por la disminución en los niveles de la caspasa 3 activa en células de carcinoma papilar de tiroides [96, 156]. Además miR-148a suprime la expresión de *GAS1* en células estelares hepáticas [90].

El gen *GAS1* humano codifica para una proteína precursora de 345 aminoácidos, de aproximadamente 45 kDa [35]. En su extremo N-terminal tiene un péptido señal para su direccionamiento a la membrana celular y en el C-terminal tiene un pro-péptido que es removido cuando sufre una modificación lipídica (Ser 318), que permite su anclaje a la membrana a través de un grupo glicosil-fosfatidilinositol (GPI) [34, 35]. La forma madura de Gas1 tiene un peso molecular de 37 kDa, diversos estudios sugieren que la región amino posee la actividad funcional ya que la región que abarca del aminoácido 182 al 234 es esencial para inducir la detención del ciclo celular, mientras que la pérdida de su ancla GPI o bien el fragmento C-terminal no afectan su función [34, 125, 137].

Por otro lado, Gas1 tiene aproximadamente un 25% de homología estructural con los GFR α s (*del inglés, GDNF family of receptors alpha*). La homología estructural entre Gas1 y los GFR α s comprende aproximadamente 220 residuos que contienen dos repetidos en tándem y 10 residuos de cisteínas que participan en la formación de puentes disulfuro (Fig. 1) [17, 131]. Dichas características sugieren que Gas1 puede ser un miembro de la familia de los GFR α s. Cabe añadir que ambas proteínas están ancladas a la membrana a través de un grupo GPI, el cual puede ser escindido para dar lugar a las formas solubles [143]. Recientemente se ha reportado que la desintegrina y las metaloproteasas (ADAM) 10 y 17 son responsables del corte del ancla GPI de Gas1 en las células mesangiales [143]. Además se ha reportado la presencia de una forma soluble de Gas1 en diferentes fluidos corporales como el líquido cefalorraquídeo (LCR), orina y sangre [7, 143].

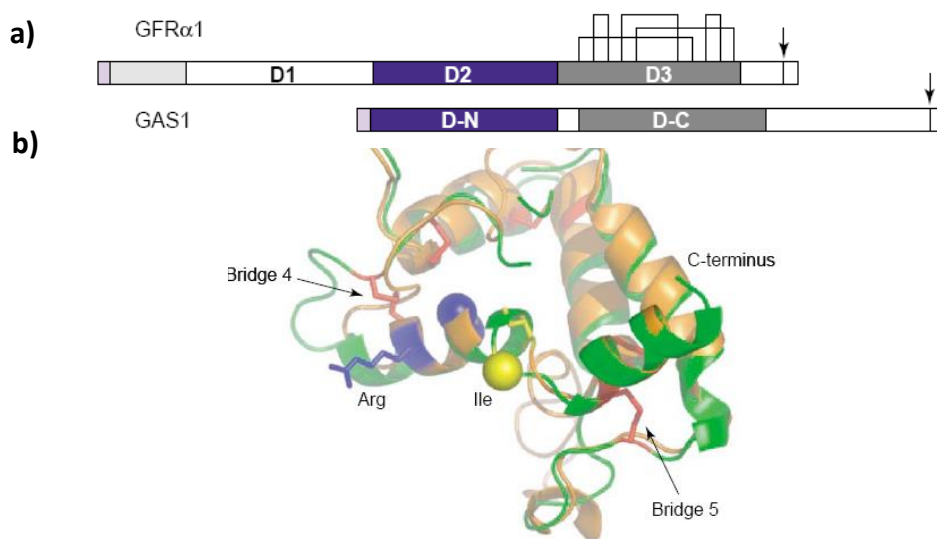


Figura 1. Organización esquemática de los dominios de Gas1 y GFR α 1. **a)** Las flechas indican el sitio aceptor de serina para GPI y una corta región hidrofóbica en el C-terminal esencial para dicho anclaje. Las líneas muestran los cinco puentes disulfuro que se encuentran en el dominio D3 de GFR α 1. **b)** Se muestra el empalme del modelo estructural del dominio D-N de Gas1 (naranja) y D3 de GFR α 1 (verde). En rojo se muestran los puentes disulfuro. (Modificado de Schueler-Furman et al., 2006).

1.2 Expresión de Gas1

Gas1 se expresa en estados tempranos del desarrollo en el tronco primitivo, somitas, corazón, extremidades, vesícula óptica, riñón, músculo, gónadas, cerebro y placenta [34, 83, 84, 92]. Su expresión es fundamental ya que los ratones *knockout* para *gas1* mueren inmediatamente después de nacer y desarrollan diversos defectos asociados con la

disminución en la señalización de Shh, lo cual genera una reducción en el tamaño del cerebelo, falta de pigmentación en la retina, alteraciones en el tracto gastrointestinal y microformas de holoprosencefalia [13, 101, 132, 133]. Durante el desarrollo, Gas1 induce tanto efectos proliferativos como pro-apoptóticos, ya que promueve la muerte del tejido interdigital [91] y la proliferación de células progenitoras granulares del cerebelo [70]. Por otro lado, el proyecto del atlas humano de la Fundación Knut y Alice Wallenberg ha demostrado los niveles de expresión de mRNA y proteína de Gas1 en diferentes órganos humanos tales como hígado, musculo, tejido endocrino, páncreas, tracto gastrointestinal y cerebro. Este proyecto también ha mostrado la expresión de Gas1 en diferentes líneas celulares y aparentemente muestra resultados que indican una regulación a la baja de los niveles de Gas1 en tejidos cancerígenos como linfomas y carcinoma de células escamosas (<http://www.proteinatlas.org/>). En este sentido los bajos niveles de *GAS1* se han propuesto como indicadores de diagnóstico del cáncer de próstata [122].

Por otro lado, la expresión de Gas1 durante el desarrollo embrionario del cerebro de ratón es amplio, abarcando zonas proliferativas como la zona subventricular, el giro dentado del hipocampo, la corriente migratoria rostral y en la capa granular externa del cerebelo (EGL), en esta última región promueve la proliferación celular ya que actúa como un co-receptor de Sonic hedgehog (Shh) [70]. Por su parte el Instituto Allen mediante hibridación *in situ* ha demostrado la presencia de Gas1 en diferentes regiones del cerebro de ratón y humano (<http://www.brain-map.org/>). En este sentido, previamente nuestro grupo describió que Gas1 se expresa principalmente en neuronas y de manera más restringida en células gliales del cerebro de ratón adulto [154], sin embargo aún falta determinar el fenotipo neuroquímico específico en donde se expresa y su función en neuronas.

1.3 Funciones de Gas1

Gas1 es una proteína pleiotrópica con diferentes blancos moleculares y que ejerce sus efectos dependiendo del contexto celular y fisiológico donde se exprese. Inicialmente se describió a Gas1 como un regulador negativo del ciclo celular ya que inhibe la síntesis de DNA durante la transición de la fase G0 a S [35]. Adicionalmente, se sugirió que Gas1 inhibía la proliferación mediante la actividad de p53 y Rb, sin embargo, su co-expresión no genera efectos aditivos, ya que por sí solo Gas1 induce muerte celular [10]. Debido a esto

se ha propuesto como un posible gen supresor de tumores ya que está localizado en una región cromosómica frecuentemente mutada en cáncer de vejiga y mielomas malignos [16, 135]. Partiendo de estos hechos se ha evaluado el potencial terapéutico de Gas1 mediante su expresión ectópica para disminuir la tasa de proliferación celular descontrolada de diversas líneas celulares cancerosas como adenocarcinoma pulmonar (A549) [18], células de glioma murino C6 [93, 94], células de glioma humano U373 [10], células de mama MDA-MB-231 [72] y en cultivo primario de células de glioblastoma multiforme humano entre otros [38]. Más aún la forma secretable de Gas1 (es decir, en ausencia de su ancla GPI) puede inhibir el crecimiento de tumores subcutáneos implantados en ratones inmunosuprimidos [72, 93, 94] e incluso disminuir la angiogénesis en células de cáncer de mama MDA-MB-231 (Fig. 2) [72]. Dichos efectos antitumorales se deben en la gran medida a la capacidad de Gas1 para inhibir a Akt e inducir la activación de la vía intrínseca de la apoptosis (Fig. 2) [155].

Asimismo, se ha demostrado que Gas1 es un supresor de metástasis de células de cáncer de mama 67NR y células de melanoma B16-F0 [57]. En relación a lo anterior, datos previos han mostrado que Gas1 inhibe la migración de células de cáncer de mama mediante la inhibición de ERK y de manera independiente de la vía de señalización que induce Ret (Fig. 2) [72]. Por otro lado, se sabe que la unión y el bloqueo de algunas integrinas disminuyen la migración e invasividad de las células tumorales y por ende la metástasis [126]. Considerando lo anterior se ha propuesto la posible interacción entre el dominio RGD de Gas1 e integrinas ya que un estudio previo demostró que la integrina $\alpha 5 \beta 1$ (en ausencia de unión a la fibronectina) disminuye la proliferación de células HT29 de carcinoma de colon por inducción de la transcripción de *GAS1* (Fig. 2) [145]. Sin embargo, hasta el momento no hay evidencia de la interacción entre el dominio RGD de Gas1 y la migración celular.

Por otra parte, se ha propuesto a Gas1 como un coadyuvante en el tratamiento del cáncer ya que la sobreexpresión de *GAS1* en células de adenocarcinoma humano (A594) incrementa la sensibilidad al tratamiento con cisplatino, el cual inhibe la proliferación y la apoptosis [152, 158]. Además, la regulación a la baja de *GAS1* promueve la resistencia a

epirubicina en células de cáncer gástrico por la pérdida en la regulación del eflujo de drogas y de la apoptosis [159]. En este sentido se informó que *GAS1* podría ser un biomarcador importante para el pronóstico de cáncer gástrico y de tiroides, ya que la expresión reducida o negativa de *GAS1* se asocia con menor tiempo de supervivencia [68, 147].

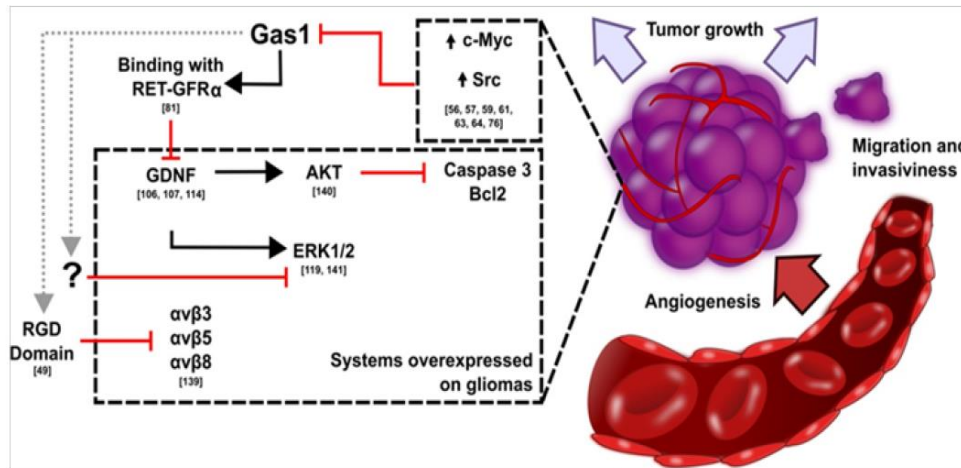


Figura 2. Vías de señalización activadas y blancos moleculares de Gas1 relacionados con su efecto antitumoral. (Segovia et al., 2016).

A pesar de los reportes que sugieren que *Gas1* es un gen supresor de tumores, el *knockout* para *Gas1* (*Gas1*^{-/-}) no desarrolla hiperplasias [13, 133] indicando un papel fisiológico importante. Diversos reportes muestran que Gas1 realiza diferentes funciones dependiendo del contexto celular donde se expresa. Por ejemplo en el riñón Gas1 es un inhibidor de la proliferación de las células mesangiales [143], tiene un efecto antiinflamatorio en la glomerulonefritis y promueve la proliferación de los progenitores de la nefrona a través de la activación de FGF/WT1 [73]. Interesantemente, se reportó que la VE-cadherina induce la expresión Gas1 para inhibir la apoptosis sin afectar el crecimiento de las células endoteliales [136]. Además, Gas1 es un gen blanco de C/EBP durante el desarrollo folicular, la ovulación y la leutinización [116]. Referente a procesos de diferenciación, Gas1 induce la diferenciación de los mioblastos a través de la activación de p38MAPK [86]. Con respecto a las funciones de Gas1 en el sistema nervioso central (SNC), se ha reportado que regula negativamente el tráfico intracelular de APP (Proteína precursora del Amiloide β) [26, 27]. Así como con la inducción de efectos pro-apoptóticos en diversos modelos neurotóxicos [104, 149, 155] y contrastantemente, con la estimulación

de la proliferación durante el desarrollo embrionario del cerebelo [70]. Dichos efectos opuestos, se deben a la capacidad de Gas1 para estimular la vía de señalización de Shh e inhibir la vía de señalización inducida por GDNF [70, 155].

1.3.1 Gas1 inhibe la señalización inducida por GDNF

Debido a la similitud estructural entre Gas1 y los GFR α s se ha propuesto una relación funcional entre ellos [17, 131]. Estudios de coimmunoprecipitación en extractos de cerebros de ratones (embrionarios de 14 d) demuestran la interacción de Gas1 con la proteína Ret un co-receptor con actividad tirosina cinasa que media la vía de señalización del GDNF [17]. La familia de ligandos del GDNF (GFLs) consta de cuatro miembros: GDNF (del inglés, *glial cell line-derived neurotrophic factor*), neurturina, artemina y persefina [3].

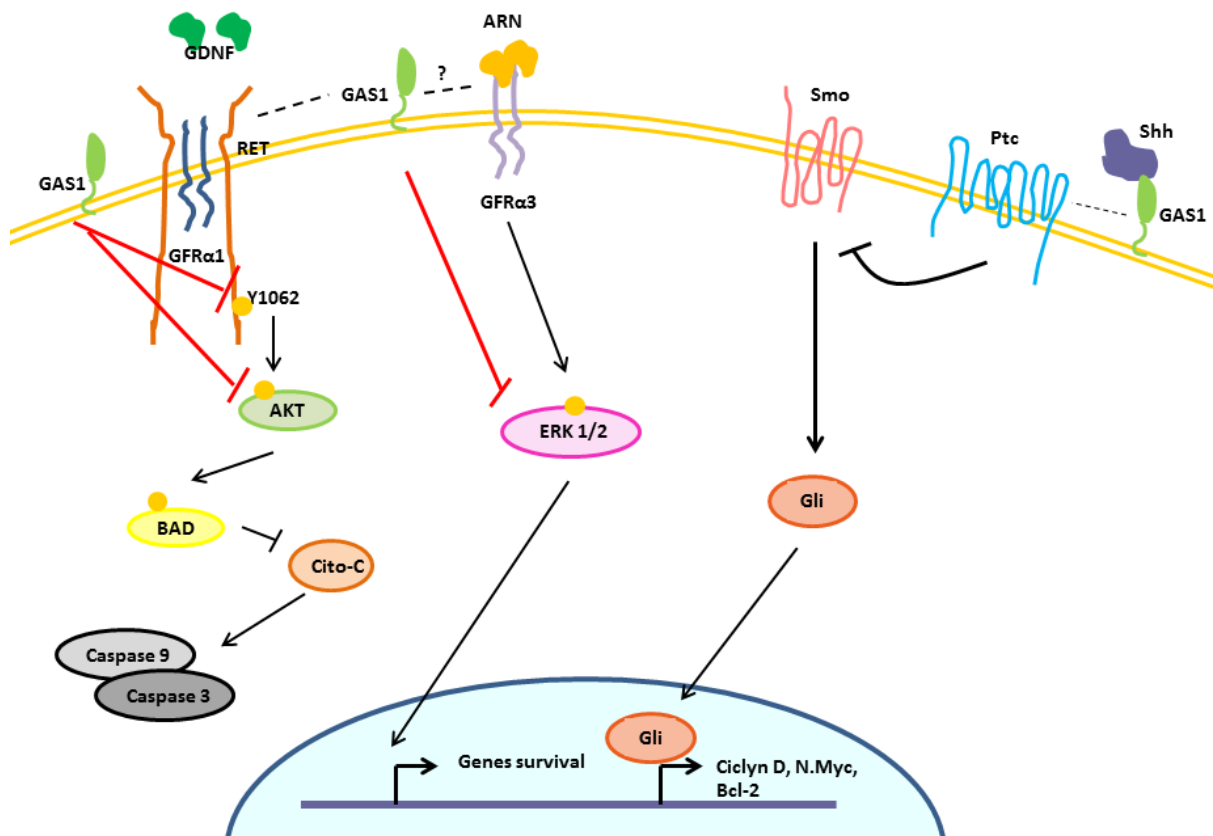


Figura 3. Descripción gráfica de las interacciones y efectos de Gas1 con diferentes vías de señalización. Las flechas negras indican regulación positiva o activación; Las líneas discontinuas indican interacción mientras que las líneas rojas inhibición.

Estructuralmente los GFLs están relacionados aunque comparten solo un 40% de identidad en la secuencia de aminoácidos. Todos los miembros de la familia del GDNF utilizan al co-receptor Ret para inducir sus efectos. La unión de los GFLs a Ret no es directa sino que está mediada por los GFR α s. Así, la especificidad de unión es la siguiente: GDNF se une a GFR α 1, neurturina a GFR α 2, artemina a GFR α 3 y persefina a GFR α 4, aunque un mismo ligando puede unirse a otro GFR α , pero con menor afinidad [3]. Cuando los GFLs se unen a su correspondiente GFR α atraen a Ret a las balsas lipídicas para su dimerización y transfosforilación en residuos de tirosina específicos de su dominio intracelular [3, 129], induciendo diferentes cascadas de señalización, relacionadas con supervivencia, diferenciación, morfogénesis, y plasticidad sináptica [129].

En células SH-SY5Y privadas de suero o en presencia de sustancias excitotóxicas, GAS1 disminuye la fosforilación de la tirosina 1062 de Ret e inhibe la activación de Akt [13, 140, 155], facilitando la desfosforilación de Bad (activo) el cual se transloca a la mitocondria y participa en la liberación del citocromo C, que junto con Apaf-1 y la caspasa 9 forman el apoptosoma que a su vez activará a la caspasa 3 ejecutora de la muerte celular por apoptosis (Fig. 3) [148, 155].

1.3.2 Gas1 estimula la vía de señalización de Shh

Shh es un morfógeno secretable implicado en el desarrollo de diversos tejidos y órganos, incluido el SNC. El receptor de Shh es Patched (Ptc) el cual inhibe constitutivamente a Smoothened (Smo), un receptor acoplado a la proteína G $\alpha_{i/o}$ de la familia frizzled³³. La unión de Shh a Ptc produce la desinhibición de Smo y la translocación al núcleo de los factores de transcripción Gli (Fig. 3), induciendo efectos mitogénicos, de diferenciación o supervivencia³⁴. Boc, Cdo y Gas1 pueden unirse a Shh para promover su señalización. De modo que las células progenitoras de neuronas granulares del cerebelo que carece de Boc, Cdo y Gas1 pierden completamente la capacidad de proliferación dependiente de Shh²⁷.

2. Ácido retinoico

2.1 Síntesis

El ácido retinoico (AR) es un isoprenoide, derivado liposoluble de la vitamina A (retinol), el cual es sintetizado en dos pasos: el primero es la oxidación reversible del retinol a retinal realizado por la alcohol deshidrogenasa (ADHs o RDHs/SDRs) y el segundo consiste en la oxidación del retinal para formar el AR, mediante la acción de la retinaldehído deshidrogenasa (RALDHs; Fig. 4A). Por lo tanto el AR es la forma oxidada del retinol, siendo el ácido retinoico all-trans (ATRA) y el ácido 9-cis retinoico (9-cis AR) sus isómeros. Cabe mencionar que algunos retinoides no son funcionales y solo actúan como moléculas de almacenamiento inactivas, precursores metabólicos o derivados de las formas activas. La conversión de retinol a retinal se realiza en todos los tejidos, sin embargo la síntesis de AR se restringe a los sitios donde se expresa la enzima RALDHs. Finalmente, el AR puede ser degradado por tres enzimas de la familia citocromo P450, CYP26A1, CYP26B1 y CYP26 (Fig. 4A) [39]. Por otro lado, la concentración de AR es regulada por la unión a proteínas de unión del ácido retinoico (CRABPs) o por la unión del retinol a las proteínas de unión celular al retinol (CRBPs), ambas proteínas son inducibles ante la concentración de AR (Fig. 4 B).

2.2 Mecanismo de acción

El ácido retinoico ejerce sus efectos a través de su unión a los receptores nucleares de AR (RARs: α , β y γ) los cuales forman heterodímeros con los receptores X de retinoides (RXRs: α , β y γ) [97, 98]. Este complejo a su vez se une a secuencias consenso de DNA conocidas como elementos de respuesta al ácido retinoico (RAREs; Fig. 4C), los cuales se localizan en la región promotora de los genes de respuesta al AR. Los RAREs consisten en repeticiones directas de un núcleo hexamérico de la secuencia consenso 5'-[A/T]G[G/T]TCA-3' separadas por una, dos o cinco pares de bases [8].

Los receptores RARs y RXRs tienen una región A/B amino terminal que contiene un dominio de activación transcripcional regulado por AF-1, un dominio C central correspondiente al dominio de unión al DNA (DBD) y un dominio de dimerización débil, una región D de localización nuclear y finalmente una región E que posee el dominio de

unión al ligando (LBD), una interfaz de dimerización fuerte y una región de unión a co-reguladores transcripcionales.

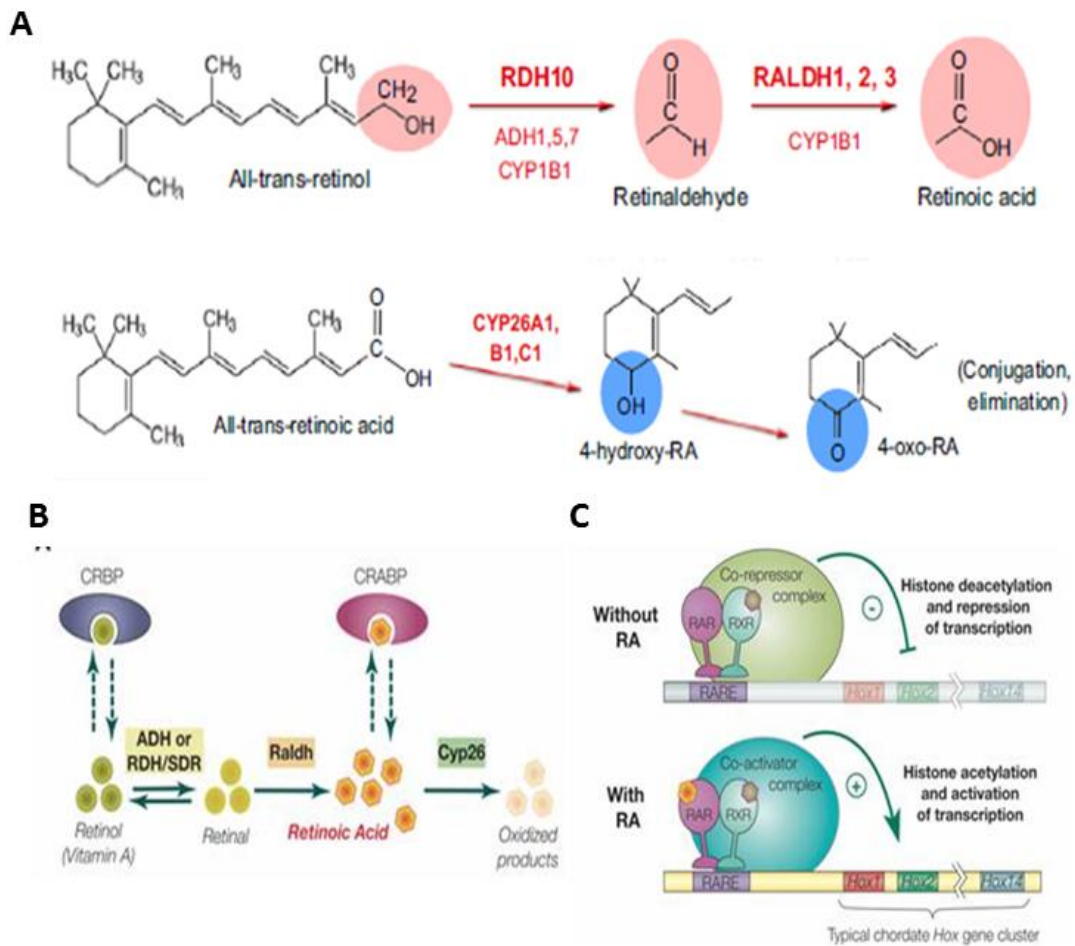


Figura 4. (A) Biosíntesis y degradación del ácido retinoico. (Modificado de Rhinn y Dolle., 2012) (B) Mecanismo de acción del ácido retinoico. Proteínas de unión a retinoides. (C) Mecanismo de acción en ausencia y presencia de ácido retinoico (Modificado de Marlétaz et al., 2006).

En ausencia de AR, el heterodímero RAR/RXR está constitutivamente unido a secuencias RAREs, en asociación con co-represores (SMRT y NcoR), que inhiben la transcripción a través de la desacetilación de las histonas aumentando así la condensación de la cromatina. La unión del AR induce cambios conformacionales en LBD para la unión de co-activadores (TIF2 y SRC-1) y la liberación de co-represores que producen la acetilación de las histonas y por lo tanto la activación de la transcripción. El AR induce la transcripción de sus propios receptores RARs y de genes implicados en su propio

metabolismo como CRBP1/2 (Rbp1/2), CRABP1 /2 y CYP26A1, así como genes de varios miembros de la familia Hox, y de factores de transcripción como HNF-3 α and Cdx1 [117]. Recientemente a través de microarreglos se han propuesto nuevos genes de repuesta al AR de los cuales se incluyen Cdkn1a, Bmp4, Cdx2, Shh, Ptc1 y Egr2, entre otros [8]. Interesantemente el AR induce la expresión de *gas1* en células de la cresta neural [150], células de carcinoma embrionario F9 [139] y en células de neuroblastoma SH-SY5Y [26], sin embargo no se comprobando si el promotor de Gas1 contiene una secuencia RARE.

2.3 Diferenciación neuronal por el AR: acciones genómicas y no genómicas

El AR regula la morfogénesis e induce la diferenciación neuronal durante el desarrollo del SNC [71, 99, 117]. La diferenciación involucra el cese de la proliferación y la entrada a la fase G0 (quiescente) del ciclo celular [97]. Se ha reportado que el RAR α induce la detención del ciclo celular a través del aumento en los niveles de p27, un regulador negativo del ciclo celular; adicionalmente el AR incrementa la expresión de los inhibidores de CDK los cuales promueven la salida de la fase G1 del ciclo celular [150]. Es importante mencionar que el AR induce la diferenciación neuronal activando la transcripción de varios genes, incluyendo los que codifican para los factores de transcripción BRN2, factor nuclear κ B (NF κ B), STRA13, SOX1, SOX6 NeuroD y neurogenina 1; moléculas de señalización celular como la proteína cinasa C ϵ (PKC ϵ), ceramida, presenilina 1 (PSEN 1), estructurales como la proteína asociada a los microtúbulos 2 (MAP2); receptores de la superficie celular como sus propios receptores y componentes de la vía canónica de WNT, entre otros [71].

Se ha reportado que durante la diferenciación neuronal se induce la señalización de FGF, se activan los canales de calcio tipo L, y se inhiben la señalización de la proteína morfogénica del hueso (BMP) [71], para subsecuentemente activar la vía de Notch y por lo tanto promover la proliferación de progenitores neuronales e inhibir su diferenciación (Fig. 5). Más tarde, la presencia del AR inhibe la expresión de *Zic3* gemina, *Foxd411* y Notch, promoviendo de esta manera la expresión de genes proneurales como neurogenina, MyT1, *Ascl2* y *Math1*, que finalmente conducen a la diferenciación neuronal (Fig. 5). La inhibición de la señalización de Notch en los progenitores neuronales es la señal clave que permite la diferenciación neuronal, mientras que la señalización sostenida de Notch

conlleva a la diferenciación astrocítica. Cabe indicar que la señalización de Notch es inhibida en precursores gliales para la generación de oligodendrocitos (Fig. 5) [95]. Interesantemente, se ha mostrado que la co-represión de Notch/Tlx1 genera la expresión de *gas1* durante la diferenciación de las células troncales embrionarias (GEO profiles; GDS2905 and GDS2906) [121]. Además previamente se reportó que la expresión de *gas1* disminuye cuando las células troncales neuronales son diferenciadas a un linaje glial [112], ambos hallazgos sugieren un papel relevante de Gas1 durante la diferenciación.

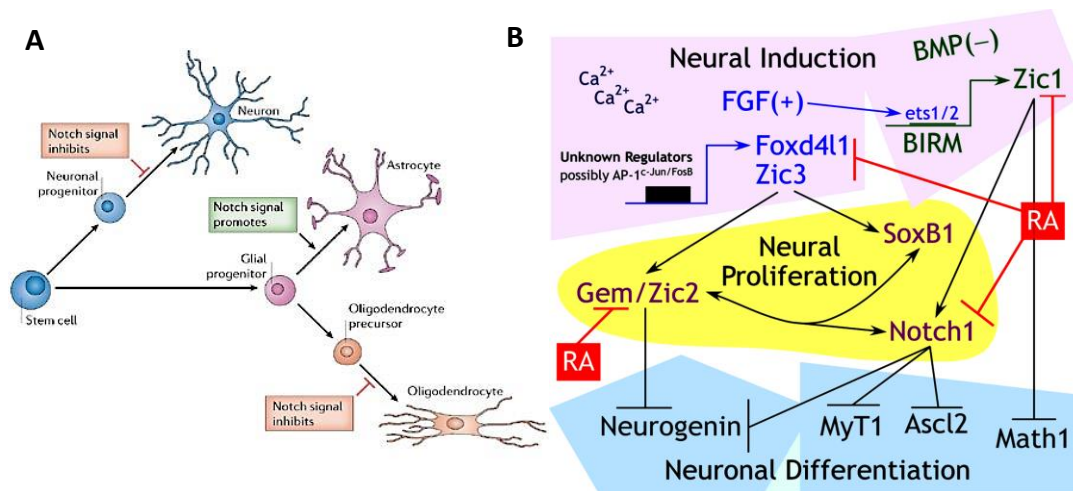


Figura 5. (A) Notch modula la diferenciación de neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. (B) Vías activadas e inhibidas durante la diferenciación neuronal. (Modificado de Janesick et al., 2015, Louvi y Artavanis-Tsakonas; 2006).

Por otro lado, muchos de los efectos del AR sobre la diferenciación neuronal han sido ampliamente estudiados usando la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y [77, 78]. El tratamiento con 10µM de AR en estas células genera la formación de procesos parecidos a neuritas que establecen contactos con células adyacentes [40]. Asimismo, el AR aumenta los niveles de proteínas características de neuronas maduras como MAP2, enolasa específica neuronal (NSE), NeuN y sinaptofisina, entre otras. Por otro lado, se ha reportado que el AR incrementa los niveles de proteínas que promueven la supervivencia celular como: Akt y ERK1/2, y de la vía de señalización de JNK [30], cabe mencionar que un aumento en la concentración de AR induce apoptosis [146]. Además, incrementa los niveles de proteínas características de neuronas maduras con fenotipo adrenérgico como el transportador vesicular de monoaminas (VMAT), del transportador de dopamina (DAT),

los subtipos 2 y 3 de los receptores dopaminérgicos (D2R y D3R) y de la tirosina hidroxilasa (TH), la cual es la enzima limitante de la síntesis de dopamina [30, 77, 78]. En este contexto, la habilidad del AR para inducir diferenciación neuronal se ha propuesto como una terapéutica contra el cáncer y como una terapia de trasplante celular o regenerativa para diferentes enfermedades neurodegenerativas. Interesantemente, se ha demostrado que las células SH-SY5Y diferenciadas con AR son más resistentes a insultos neurotóxicos como el tratamiento con 6-hidroxidopamina (6-OHDA) o MPP+ [30, 47, 75], una neurotoxina que mimetiza las características bioquímicas de la enfermedad de Parkinson (EP).

3. Enfermedad de Parkinson

3.1 Características y cambios bioquímicos

La enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno progresivo neurodegenerativo, que fue descrito por James Parkinson en 1817, consiste en un conjunto principalmente de alteraciones motoras que empiezan a ser observadas cuando aproximadamente el 70% de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc han muerto [45, 118, 119]. Aunque se ha reportado la presencia de otros síntomas no motores como depresión y deficiencias en la memoria y el lenguaje, debido a que son afectadas otras áreas cerebrales como el *locus coeruleus*, el núcleo basal de Meynert, y el hipotálamo. Los principales síntomas motores que presentan los pacientes son: temblores rítmicos en reposo, acinesia, bradicinesia, rigidez muscular e inestabilidad postural [111].

Por otra parte, la forma idiopática de esta enfermedad prevalece sobre la forma genética la cual se debe a una mutación en el gen de la α -sinucleína. La etiología de la EP idiopática o esporádica es aún desconocida, sin embargo, se ha demostrado una relación entre la muerte de las neuronas dopaminérgicas con el estrés oxidativo producto del daño mitocondrial, procesos neuroinflamatorios, excitotoxicidad, cambios epigenéticos, exposición a organofosforados, monóxido de carbono, disminución de factores neurotróficos y disfunciones proteosomales [31, 113]. Todo lo anterior contribuye a la apoptosis de las neuronas dopaminérgicas generando una disminución en los niveles de dopamina y por ende el desbalance en el circuito de los ganglios basales [14].

3.2 6-hidroxidopamina (6-OHDA), modelo experimental de la EP

La 6-OHDA es una neurotoxina que produce la muerte selectiva de las neuronas dopaminérgicas y que mimetiza las características bioquímicas de la EP tanto *in vitro* como *in vivo* [6, 15, 66, 127]. La administración de 6-OHDA en el estriado, SN o bien en la vía nigroestriatal (haz medial del cerebro) en roedores conduce a la degeneración de las terminales y/o neuronas dopaminérgicas, y en consecuencia a la pérdida de las funciones motoras [15, 152]. *In vitro* se utilizan diversas líneas celulares con características de neuronas dopaminérgicas como PC12 y SH-SY5Y [4, 77].

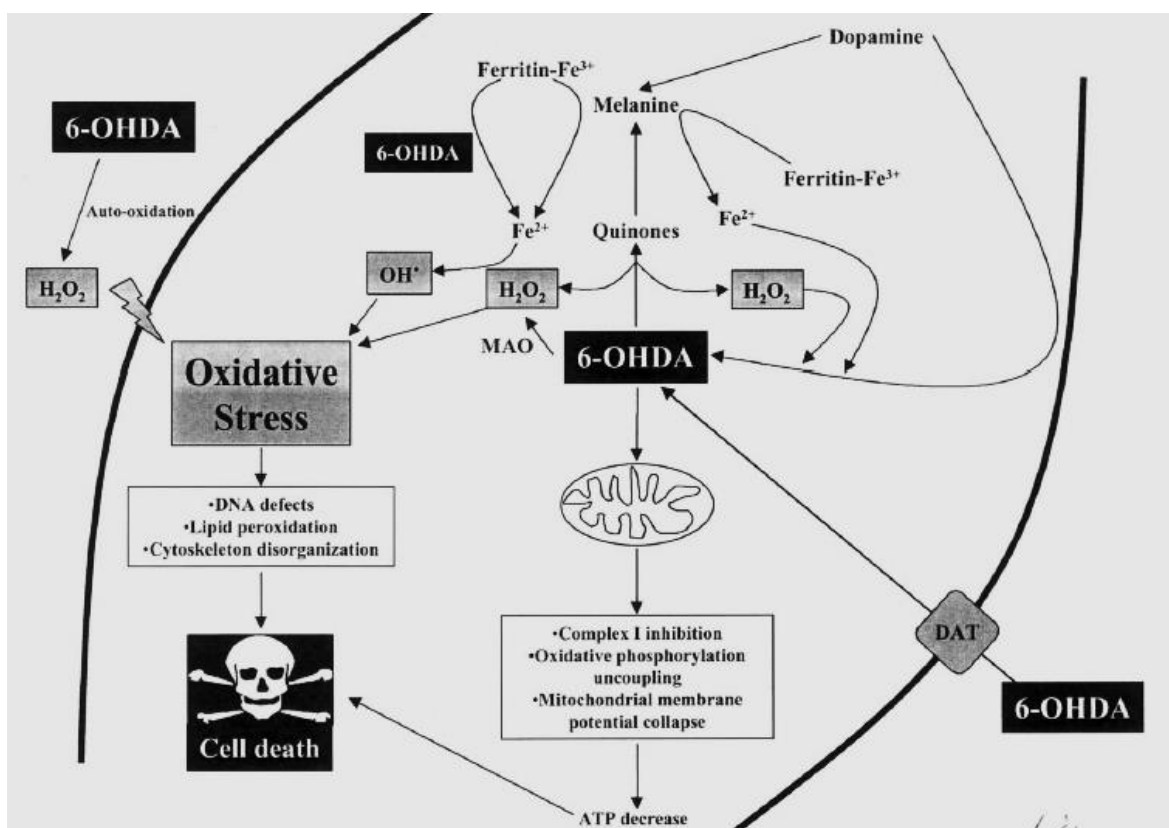


Figura 6. Representación gráfica del mecanismo propuesto de los efectos de la toxicidad de la 6-OHDA. La 6-OHDA induce muerte de las neuronas dopaminérgicas a través de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) por oxidación intra o extracelular, por producción de H₂O₂ inducida por la actividad de la MAO o por la inhibición del complejo I y IV mitocondrial, el cual también produce disminución de ATP. Modificado de Blum et al., 2001.

Debido a que la 6-OHDA presenta una estructura similar a la dopamina ingresa a la célula a través del transportador de recaptura de dopamina (DAT) o noradrenalina (NAT). Intracelularmente la 6-OHDA inhibe el complejo I y IV mitocondrial de la cadena transportadora de electrones, generando altas concentraciones de peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y derivados de radicales libres (Fig. 6). Así se ha comprobado que el incremento de enzimas antioxidantes, protegen del daño inducido por la 6-OHDA. Por otro lado, tanto la dopamina como la 6-OHDA al ser desaminadas por la monoamino oxidasa (MAO) o bien por la auto-oxidación no enzimática forman radicales libres, en ambos casos se generan especies tóxicas conocidas como quinonas (Fig. 6) [15]. Cabe señalar que las neuronas dopaminérgicas contienen altos niveles de dopamina, H_2O_2 y hierro, la reacción no enzimática entre estas sustancias puede producir la formación de 6-OHDA (Fig. 6) [15]. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS) generadas por la 6-OHDA causan daño en el DNA caracterizado por altos niveles de 8-hydroxy-2'-deoxyguanosina, lipoperoxidación, mutaciones en el DNA, desorganización del citoesqueleto, desregulación de la recaptura de glucosa y de α -aminoisobutirico [138, 153].

3.3 Efectos neuroprotectores de los inhibidores de GSK3 β

La enzima glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK3), es una serina/treonina cinasa que fue aislada del músculo esquelético de conejo en 1980 [43]. Inicialmente se reportó a GSK3 como una enzima inhibidora de la glucógeno sintasa, sin embargo, ahora se sabe que participa en múltiples procesos celulares como síntesis proteica, proliferación, diferenciación, motilidad celular, dinámica de microtúbulos y apoptosis. Existen dos isoformas: GSK3 α y GSK3 β , las cuales son codificadas por genes diferentes. Ambos genes presentan una homología del 85% en su secuencia completa y del 95% en su dominio con actividad cinasa. También se han descrito dos isoformas de GSK3 β resultantes de “*splicing*” alternativo: GSK3 β 1 y GSK3 β 2. Se sabe que la pérdida de alguna de las isoformas no es compensada por la otra, lo que sugiere que poseen funciones independientes. Además existe evidencia que muestra que la delección de GSK3 β es letal en estado embrionario, en contraste con los ratones *knockout* de GSK3 α los cuales no mueren a edad temprana. GSK3 β está constitutivamente activa y se expresa ampliamente en diversos tejidos, pero principalmente durante el desarrollo embrionario y en el cerebro adulto, siendo más abundante en las neuronas.

GSK3 β es activada por la fosforilación en su tirosina (Tyr216) localizada en su dominio cinasa e inactivada por fosforilación en la serina 9 (Ser9). Interesantemente, se han detectado polimorfismos genéticos en GSK3 β en pacientes con EP [81]. Por otra parte los agregados proteicos conocidos como cuerpos de Lewy compuestos principalmente por α -sinucleína (proteína pre-sináptica) son una característica importante de la EP. Se sabe que la α -sinucleína regula la producción de dopamina a través de su interacción con la TH [9]. La α -sinucleína es un sustrato de fosforilación de GSK-3 β . La inhibición de GSK-3 β disminuye la expresión de α -sinucleína y previene de la muerte celular inducida por el MPP⁺ [79].

Por lo tanto, la inhibición de GSK-3 β puede ser neuroprotectora para las neuronas dopaminérgicas al atenuar la toxicidad producida por la sobreexpresión de la α -sinucleína. Otros estudios muestran una relación directa entre la activación de GSK3 β y la muerte neuronal dopaminérgica inducida por estrés oxidativo [28, 63, 115]. Por ejemplo como la inyección de 6-OHDA en la SN induce la activación de GSK3 β y de la caspasa 3 en neuronas dopaminérgicas [63]. Además, la 6-OHDA inhibe transitoriamente a GSK3 β y posteriormente induce su fosforilación en la Tyr216 en células SH-SY5Y [28]. Por otra parte, GSK3 β en su forma activa induce la degradación de diferentes proteínas incluida la ciclina D [28]. Interesantemente la 6-OHDA disminuye los niveles de la ciclina D1 en células SH-SY5Y y PC12 indicando activación de GSK3 β [28]. En contraste se ha reportado que la disminución en los niveles de GSK3 β usando un shRNA de interferencia produce un incremento de la viabilidad celular por disminución de la activación de las caspasas 3 y 9 [89].

GSK3 β se encuentra principalmente en el citosol, pero también en la mitocondria y en el núcleo, en todos estos orgánulos su activación facilita condiciones pro-apoptóticas implicadas en la EP (Fig. 7). Por ejemplo; la GSK3 β mitocondrial inhibe al complejo I aumentando la producción de ROS y favoreciendo la formación de poros de transición de permeabilidad mitocondrial. Por su parte, la GSK3 β citosólica fosforila a las proteínas α -sinucleína y Tau generando su agregación [87], además aumenta los niveles de la proteína pro-apoptótica Bax (Fig. 7) [87]. Asimismo, GSK3 β promueve la respuesta inflamatoria

por activación de la microglía e incremento en la producción de citocinas inflamatorias (Fig. 7).

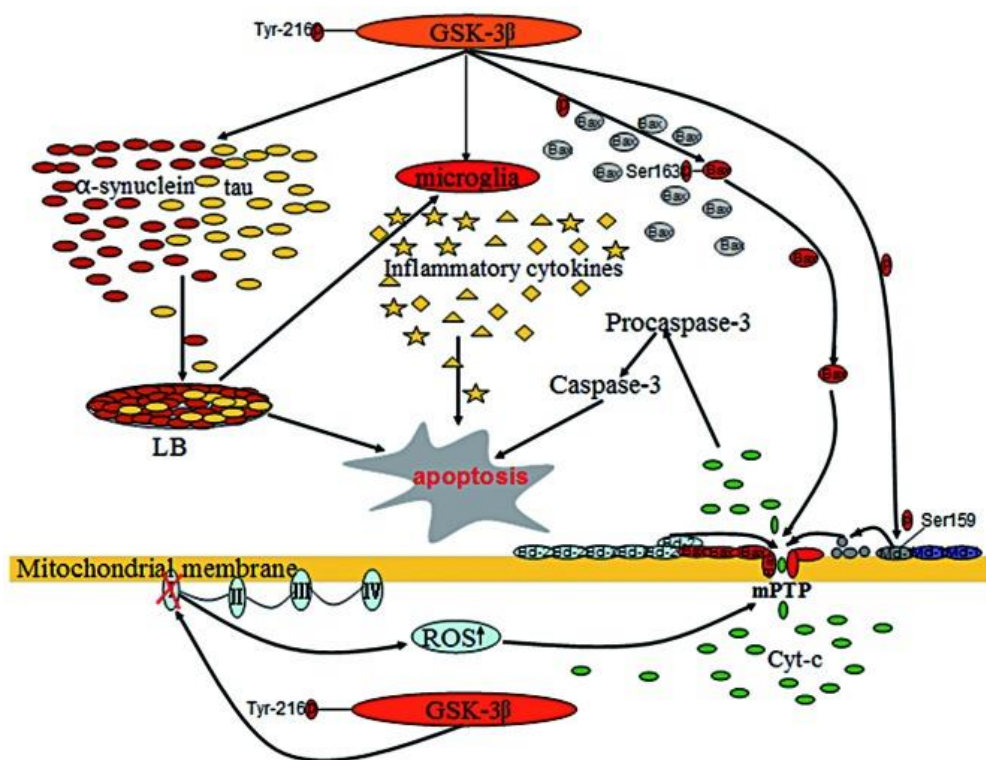


Figura 7. Mecanismo propuesto de los efectos de la toxicidad de la GSK3β. Modificado de Li et al., 2014.

Considerando los datos anteriores se ha propuesto como estrategia terapéutica el uso de inhibidores de GSK3β. Así, se ha comprobado que el pre-tratamiento con inhibidores de GSK3β como el litio, kenpaullona o TDZD-8 disminuyen la muerte neuronal inducida por la 6-OHDA, MPP o rotenona [28, 76, 115]. El inconveniente con el uso de algunos de estos inhibidores es su inespecificidad y por lo tanto sus efectos sobre otras cinasas. Sin embargo, se ha probado que otros inhibidores específicos como indirubin-3'-oxima y AR-A014418 atenúan la apoptosis, restauran los niveles de dopamina en el estriado y por ende disminuyen el deterioro conductual causado por el MPTP [151].

Es fundamental la búsqueda de inhibidores de GSK3β para generar nuevas opciones terapéuticas para la EP, por ello es importante el estudio de las vías que regulan tanto su inhibición como su activación. Por ejemplo, las formas activas de Akt, S6K o MAPKs

inducen la inactivación de GSK3 β (Fig. 8 y 10) [21, 103]. Por su parte, el litio fosforila e inhibe a GSK3 β a través de la disrupción del complejo Akt/ β -arrestina/proteína fosfatasa 2A (PP2A). En contraste, la 6-OHDA activa a GSK3 β a través de activación de PP2A y desfosforilación de Akt (Fig. 8 y 10) [28].

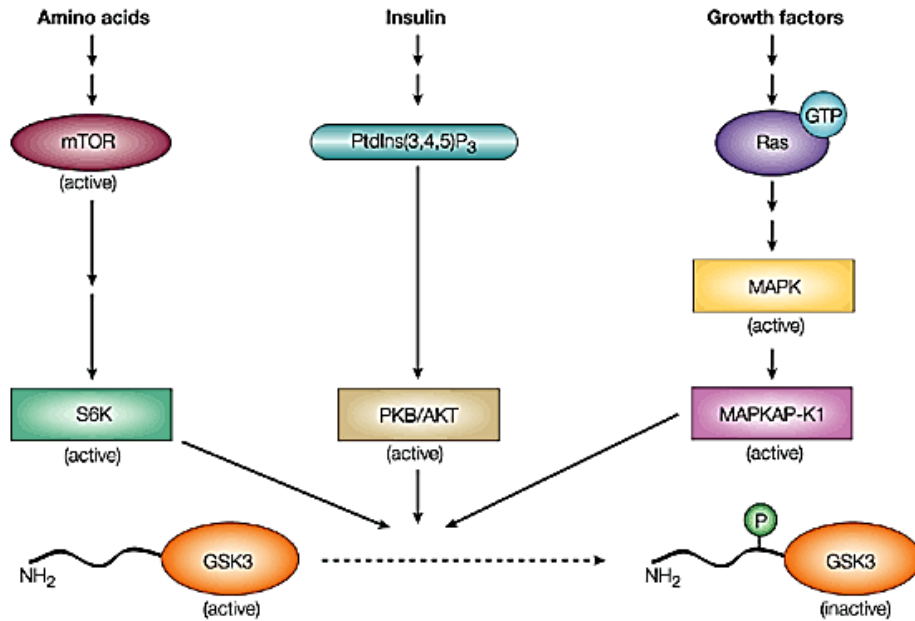


Figura 8. Proteínas que inhiben a GSK3 β . Los aminoácidos inducen la activación de la proteína cinasa mTOR, que a su vez activa a la proteína ribosomal S6 cinasa (S6K), la cual fosforila a la Ser9 de GSK3 inhibiendo su actividad. Por su parte, los factores de crecimiento producen la conversión de Ras en su estado activo (unido a GTP), el cual a su vez induce la activación de la cascada de la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK). La proteína cinasa 1 activada por MAPK (MAPKAP-K1, también llamada RSK) inhibe a GSK3. Dependiendo del estado fisiológico de la célula, otros factores de crecimiento o la insulina pueden inhibir a GSK3 a través de PKB/Akt (Modificado de Cohen et al., 2001).

Por otro lado, GSK3 β es un componente clave de la vía de señalización de WNT (Fig. 9-10). En ausencia de ligando, GSK3 β en su estado activo forma un complejo con APC, Axina y otras proteínas que facilitan la fosforilación de la β -catenina en la serina 45 por CK1 y en las Ser 33/37/41 por GSK3 β . Esto genera la ubiquitinación de la β -catenina y su posterior degradación en el proteosoma (Fig. 9) [42]. En presencia de ligando, WNT se une a un receptor de la familia Frizzled y a un co-receptor de la familia LRP5/6 lo cual induce el desensamble del complejo APC/Axina/CK1/GSK3 β conduciendo a la

estabilización de la β -catenina y su translocación al núcleo donde interactúa con genes de respuesta de la familia TCF/LEF (Fig. 9-10) [42].

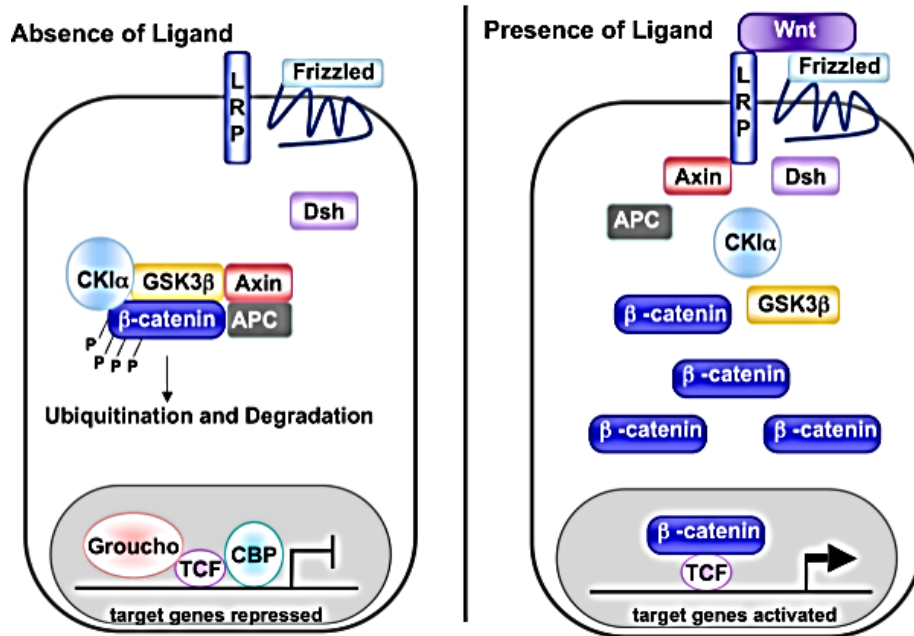


Figura 9. Vía de señalización canónica de Wnt. Izquierda, en ausencia del ligando, el complejo GSK3 β /Axin/APC/CKI α ubiquitina a la β -catenina induciendo su degradación. En estas condiciones TCF reprime la transcripción por interacción con el represor Groucho (TLE1 en humanos), el cual induce la desacetilación de histonas y la compactación de la cromatina. Derecha, Wnt se une al receptor Frizzled y LRP para entonces asociarse con parte del complejo de destrucción el cual ya no puede inducir la ubiquitinación de la β -catenina, por lo tanto esta se transloca al núcleo. En tanto, la β -catenina nuclear forma un complejo con TCF desplazando a Groucho y recluta a co-activadores de la transcripción (Modificado de Eisenmann et al., 2005).

GSK3 también ha sido relacionada con la vía de señalización de Notch. Notch es un receptor transmembranal cuya activación mediada por ligando genera su escisión proteolítica por presenilina, liberando el dominio intracelular de Notch (NICD) el cual se transloca al núcleo donde se une a RBP-Jk para activar la transcripción de genes diana que bloquean la diferenciación neuronal por represión de la transcripción de genes pro-neurales, de esta forma Notch promueve la proliferación de las células troncales neurales (CTN) [22].

Se ha demostrado que GSK3 fosforila al dominio intracelular de Notch para inhibir su degradación, sin embargo, otros estudios muestran que promueve su degradación, estos

datos contradictorios aún no han sido aclarados [22]. Se sabe que la baja actividad de GSK3 y la alta señalización de Notch se correlacionan con una mayor tasa de proliferación de las CTN [22], es decir que probablemente la fosforilación que realiza GSK3 en Notch es para inducir su degradación, aunque esto queda por demostrarse.

Por otro lado, GSK3 es un inhibidor de la vía de señalización de Shh (Fig. 10). Como previamente se mencionó en ausencia de Shh, Ptc inhibe constitutivamente a Smo, el cual media sus efectos mediante las proteínas Gli de las cuales Gli1 y Gli2 son activadores transcripcionales, mientras que Gli3 es un represor (Fig. 3). En ausencia de Shh, GSK3 y CK1 fosforilan y facilitan la formación del complejo Gli/Cos2/Fused, esto genera a su vez la ubiquitinación y proteólisis de Gli, produciendo así una forma truncada de Gli carente del dominio de activación C-terminal. En presencia de ligando el complejo Gli/Cos2/Fused se desensambla, inhibiendo la fosforilación y el procesamiento de Gli [22].

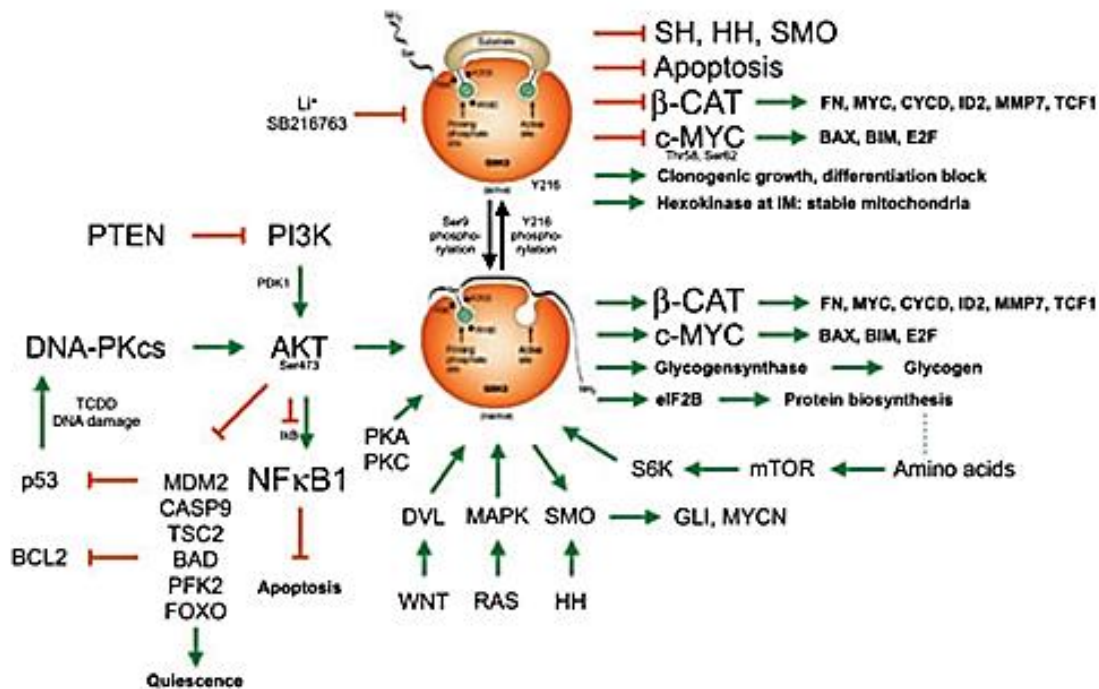


Figura 10. Algunas proteínas blanco de GSK3β. GSK3 es una molécula clave involucrada en varias vías de señalización como: PKA, PKC, RAS / RAF, Akt, WNT, HH (Shh) y mTOR. GSK3 es normalmente inactivada por la fosforilación específica en el residuo serina 9, de esta forma por ejemplo permite la actividad transcripcional de la β-catenina y de eIF2B. Por su parte GSK3 en su estado activo (pTyr216) bloquea la señalización HH (Shh), la apoptosis, la diferenciación y las acciones transcripcionales mediadas por MYC. (Modificado de Marschalek et al., 2010) [100].

A pesar de que GSK3 β en su estado activo promueve la proliferación, se sabe que existe una baja actividad de GSK3 β y una alta actividad de Notch para inducir la proliferación e inhibir la diferenciación de las células troncales neurales [65, 82]. Debido a lo anterior se optó por la adición de inhibidores de GSK3 β en protocolos de diferenciación de células troncales y de las células troncales neurales. Más allá de esto se ha demostrado que la adición de inhibidores de GSK3 β induce la diferenciación dopaminérgica [19, 80, 142].

II. JUSTIFICACIÓN

Gas1 ejerce diferentes funciones dependiendo del contexto celular en que se exprese, produciendo detención del ciclo celular, muerte celular, proliferación o diferenciación, debido a su capacidad de inhibir la síntesis del DNA, bloquear la vía de señalización de GDNF, estimular la vía de Shh o de p38MAPK, respectivamente. Datos previos indican una relación entre Gas1, la diferenciación con AR y la muerte neuronal inducida por agentes neurotóxicos como MPTP o NMDA. Sin embargo, hasta el momento existe poca evidencia de las funciones de Gas1 sobre la diferenciación neuronal y la neurotoxicidad. Por lo tanto, inicialmente el presente estudio se enfocó en la caracterización neuroquímica de la expresión de Gas1 en regiones del cerebro donde previamente se han descrito efectos así como en regiones que presentan altos niveles de Gas1 y cuya organización permite visualizar su presencia en el cuerpo celular o en el neuropilo. Posteriormente, se detectó a Gas1 soluble en cultivos primarios de neuronas, para subsecuentemente analizar sus efectos sobre la formación de neuritas utilizando células SH-SY5Y diferenciadas con AR. Con base en los resultados de los experimentos anteriores se decidió analizar el efecto neuroprotector de Gas1 ante el insulto neurotóxico inducido por la 6-OHDA en células SH-SY5Y diferenciadas con AR.

III. HIPÓTESIS

Gas1 se expresa en neuronas GABAérgicas, glutamérgicas y dopaminérgicas, induce el crecimiento neurítico y protege de la muerte a las células SH-SY5Y tratadas con 6-OHDA y diferenciadas con AR.

IV. OBJETIVO GENERAL

Analizar la expresión de Gas1 en neuronas así como determinar su función en la diferenciación neuronal y sus efectos sobre la neurotoxicidad inducida por la 6-OHDA como modelo de la EP.

4.1 Objetivos particulares

1. Determinar los niveles de mRNA y proteína Gas1 en diferentes regiones del SNC.
2. Determinar la expresión de Gas1 en neuronas GABAérgicas, glutamatérgicas y dopaminérgicas del hipocampo, tálamo, cerebelo y de la SNpc.
3. Determinar la expresión y liberación de Gas1 en cultivos primarios de células de hipocampo, células granulares y células de Purkinje.
4. Determinar la función de Gas1 en la diferenciación neuronal de las células SH-SY5Y diferenciadas con AR.
5. Analizar los efectos de Gas1 sobre la neurotoxicidad inducida por 6-OHDA en células SH-SY5Y diferenciadas con AR.

V. MATERIALES Y METODOS

5.1 Sujetos experimentales

Los experimentos en animales se realizaron de acuerdo a la NOM-062-ZOO-1999 (SAGARPA) y a la normativa interna del CINVESTAV. Ratones machos CD1 de 8-10 semanas de edad se mantuvieron con acceso *ad libitum* a comida y agua. Para los ensayos de RT-qPCR, RT-PCR, ELISA y *western blot*, los ratones fueron sacrificados, posteriormente los órganos y las diferentes regiones cerebrales (cerebelo: Cb, bulbo olfatorio: OB, corteza: Cx, hipocampo: Hip, tálamo: Tal y las capas granulares y Purkinje-Molecular) se disecaron con la ayuda de un estereoscopio y sobre una caja Petri. Los tejidos se preservaron a -80°C hasta su procesamiento. Para la inmunofluorescencia, los ratones se sacrificaron con una sobredosis de pentobarbital (50 mg/Kg, i.p.) y se perfundieron por vía intracardiaca con 150 mL de solución salina al 0.9%, y 150 mL de p-formaldehído al 4% en PBS (pH: 7.4). El cerebro fue extraído de la cavidad craneal y se incubó durante 24 h, en p-formaldehído al 4%, para después colocarlo en gradientes de sacarosa al 10, 20 y 30% con un periodo de incubación de 12 h cada uno. Después se realizaron cortes coronales en sentido antero-posterior de 30 µm en un micrótopo, los cuales se almacenaron a 4°C para después ser procesados. Brevemente, para los cultivos primarios se utilizaron cerebros de ratones CD1 de 5 a 8 d de edad. El Cb e Hip se disecaron y mantuvieron en solución de Hank's (HBSS) con 100U/mL de penicilina y 100mg/mL de estreptomina para ser procesados inmediatamente.

5.2 Cultivo celular

Las líneas celulares NIH/3T3, SH-SY5Y, SH ANT-GAS1, SH-GAS1 y N1E115 fueron cultivadas en medio DMEM HG (alta glucosa; Life Technologies, Carlsbad CA) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado (SFB), 2mM de L-glutamina, 50U/mL de penicilina y 50mg/mL de estreptomina (Life Technologies, Carlsbad CA). Todos los cultivos se mantuvieron a 37°C/5% de CO₂/95% de aire y 100% de humedad relativa. Las células NIH/3T3 fueron utilizadas como control de la expresión de Gas1, por lo tanto se cultivaron en medio DMEM HG suplementado con 30% de SFB (bajo estas condiciones no expresan Gas1). Para la detección de Gas1 las células NIH/3T3 fueron cultivadas con 0.5% de suero por 24h. Para determinar los efectos de Gas1 sobre la

formación de neuritas y la diferenciación neuronal, células SH-SY5Y, SH ANT-GAS1 y SH-GAS1 fueron diferenciadas con 10 μ M de AR mientras que las células N1E115 con 20 μ M de AR (Sigma Aldrich, St Louis, MO) en DMEM HG con 0.5% de SFB por 3, 5, 7 y 14 d dependiendo del experimento. Las células SH-SY5Y y N1E115 son líneas celulares con morfología epitelial adherente que forma procesos parecidos a neuritas cuando se incuban con 10 10 μ M de AR. Las células SH ANT-GAS1 es una línea estable que expresa una secuencia antisentido para Gas1 es decir no expresa Gas1 y que previamente fue generada en nuestro laboratorio [155]. En contrataste la línea celular SH-GAS1 sobreexpresa Gas1 de forma regulable por la adición de tetraciclina [93].

5.3 Tratamiento con 6-OHDA

Con el propósito de mostrar los efectos de Gas1 ante el daño inducido por la 6-OHDA usamos las líneas celulares SH-SY5Y, SH ANT-GAS1 y SH-GAS1. Previo a la exposición a la 6-OHDA, las células SH-GAS1 fueron incubadas con tetraciclina (1mg/mL) por 24h para inducir la expresión de Gas1. Todas las líneas celulares fueron tratadas con 80 μ M de 6-OHDA (Sigma Aldrich, St Louis, MO). La 6-OHDA se diluyó en 0.1% de ácido ascórbico para evitar su oxidación. Terminado el tiempo de incubación con la 6-OHDA las células fueron procesadas para medir la actividad mitocondrial por la técnica de MTT, la permeabilidad celular por la técnica de azul de tripano, niveles de óxido nítrico o procesadas para *western blot*.

5.4 Ensayos de viabilidad celular: MTT y de Azul de tripano

Para determinar la viabilidad celular, empleamos las técnicas de exclusión de azul de tripano y MTT (Sigma Aldrich, St Louis, MO). En ambos ensayos las células se sembraron en cajas de 24 pozos a una densidad de 1x10⁵ células/pozo. Para el ensayo de MTT, las células fueron incubadas por 2h con 5mg/mL de MTT, terminado el tiempo de incubación se midió la cantidad de formazán formado a una longitud de onda de 540nm en un lector de ELISA (Bio Rad: iMark TM). Para el ensayo de azul de tripano las células fueron tripsinizadas (0.05% de tripsina), centrifugadas (3000 rpm por 5 min) y resuspendidas 0.4% de azul de tripano/PBS, el número de células vivas y muertas (azules) se contó en una cámara de Neubauer.

5.5 Cultivo primario

Los cultivos primarios de hipocampo, células granulares y células de Purkinje se obtuvieron a partir de ratones CD-1 de 5 a 8 d de edad. Los cultivos se realizaron basados en los reportes de Ahlemeyer y cols. (2005) y Furuya y cols. (1998) con algunas modificaciones [2, 52]. Brevemente, el Hip y el Cb se disectaron y transfirieron a HBSS, suplementado con 100U/mL de penicilina y 100mg/mL de estreptomina. El tejido se disoció mecánicamente por 5 min y digirió enzimáticamente con 0.1% tripsina y 1U/mL DNase I por 15 min. La suspensión celular fue lavada con HBSS y resuspendida en DMEM F12 (Life Technologies, Carlsbad CA) suplementado con 20nM progesterona, 30nM selenito de sodio, 100µM putrescina, 3.9mM glutamina, 5µg/mL insulina y 100µg/mL transferrina (Sigma Aldrich, St Louis, MO). Las células se sembraron en cajas Petri cubiertas con poli-D-Lisina (10µg/mL). Al cultivo primario de células de Purkinje se les añadió 0.5ng/ml de hormona T3 (Sigma Aldrich, St Louis, MO). Por otro lado, el cultivo de células granulares fue cultivado en presencia de 25mM de KCl (Sigma Aldrich, St Louis, MO). Todos los cultivos primarios fueron tratados con 1µM AraC (Sigma Aldrich, St Louis, MO) por 6h para reducir la presencia de células gliales.

5.6 Generación de la línea estable SH-GAS1 y producción de proteína recombinante Gas1 (SH-tGAS1)

Previamente se obtuvo un lentivirus que contienen un vector que codifica a la proteína Gas1 en su forma completa y una isoforma carente de la secuencia de anclaje GPI (tGas1), las cuales expresan las dos formas de Gas1 de forma regulable (sistema TET-ON) [93, 94]. Las células SH-SY5Y se infectaron con los lentivirus que contienen el elemento represor (ER; MOI 5), las células se seleccionaron con blasticidina (Invitrogen; 5mg/mL). Posteriormente, las células SH-SY5Y con el ER, se infectaron con lentivirus que contienen un plásmido que codifica la secuencia completa de Gas1 (MOI: 10). Esta línea celular obtenida sobreexpresa Gas1 completo (SH-GAS1) y se utilizó en los experimentos con 6-OHDA. Por otro lado, las células SH-SY5Y con el ER se infectaron con lentivirus que contenían el vector que codifica tGas1 (MOI: 10), así se generó la línea celular SH-tGAS1 que expresa la proteína recombinante Gas1 soluble (carente del ancla GPI) que se usó en los experimentos de formación de neuritas. Ambas líneas fueron seleccionadas con Zeocina

(Invitrogen: 250mg/mL). Adicionalmente, para obtener la proteína recombinante, las células SH-tGAS1 (que sobreexpresan Gas1 soluble) fueron incubadas con 0.05% de suero y 10 μ M de AR por 24 h después el medio por 0.05% de suero y 1mg/ml de tetraciclina esto con la finalidad de inducir la expresión de tGas1. Después de 48 h se recogió el medio de células SH-tGas1, se filtró (0,22 μ m; Millipore) y se lavó cinco veces usando un centricon (Millipore Cat # UFC805008 50.000 KDa), la concentración de Gas1 se cuantificó por ELISA (Systems Cat # DY2636) y se realizaron las diluciones correspondientes para el tratamiento de las células SH-SY5Y y SH ANT-GAS1.

5.7 Inmunofluorescencia

Las secciones coronales fueron lavadas 3 veces con PBS 1X, pH 7.4 durante 10 min c/u. En seguida se permeabilizaron con PBS Tritón al 0.2% (PBST) por 30 min. Posteriormente se realizó el bloqueo de los sitios inespecíficos incubando con 1% de albúmina sérica bovina (BSA libre de IgG's) (Sigma) disuelta en PBST por 30 min, para después incubar por 48 h a 4°C, con los anticuerpos primarios: ratón anti-GAD 67 (1:1000, MAB5406, Chemicon); ratón anti-VGLUT2 (1:50, MAB5504 Chemicon); conejo anti-Gas1 (dirigido contra la secuencia: DGVPHPPPRPGSGA, ProSci) y ratón anti-TH (1:500; Sigma, Cat# T2928). Posteriormente se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes Alexa 488 y Alexa 594 (Life Technologies, Carlsbad, CA) durante 2 h. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (DAPI; Vector Laboratories). Para corroborar la expresión de Gas1 en el cerebro de ratón adulto se realizaron inmunofluorescencias utilizando un anticuerpo policlonal contra la secuencia completa de Gas1 humano producido por Santa Cruz Biotechnology (1:50, Cat: SCB, Cat # H-300, Fig. 11).

5.8 Inmunocitoquímica y conteo de neuritas

Las células SH-SY5Y y SH ANT-GAS1 fueron sembradas sobre cubreobjetos y tratadas con 10 μ M de AR por 7 d. Para determinar si la formación de las neuritas era restablecida en las células SH ANT-GAS1, estas se trataron con 0.1ng/ml de Gas1 y 10 μ M de AR por 7 d. Después las células fueron fijadas con 4% de p-formaldehído por 15min, lavadas 2 veces con PBS, incubadas con 0.2% Triton X-100/PBS y bloqueadas con 1% de BSA por 30 min a temperatura ambiente. Para la detección de neuritas las células se incubaron con un

anticuerpo primario ratón anti-tubulina β III (1:1000; Covance Cat# 801201) por 16 h. Los cubreobjetos se lavaron 3 veces con 0.2% Triton X-100/PBS e incubaron con el anticuerpo secundario cabra anti-ratón (Alexa 594; Life Technologies, Carlsbad, CA). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (DAPI; Vector Laboratories). Un total de 25 células fueron contadas en 3 campos de cada grupo, el número de neuritas fue dividido entre el número de células.

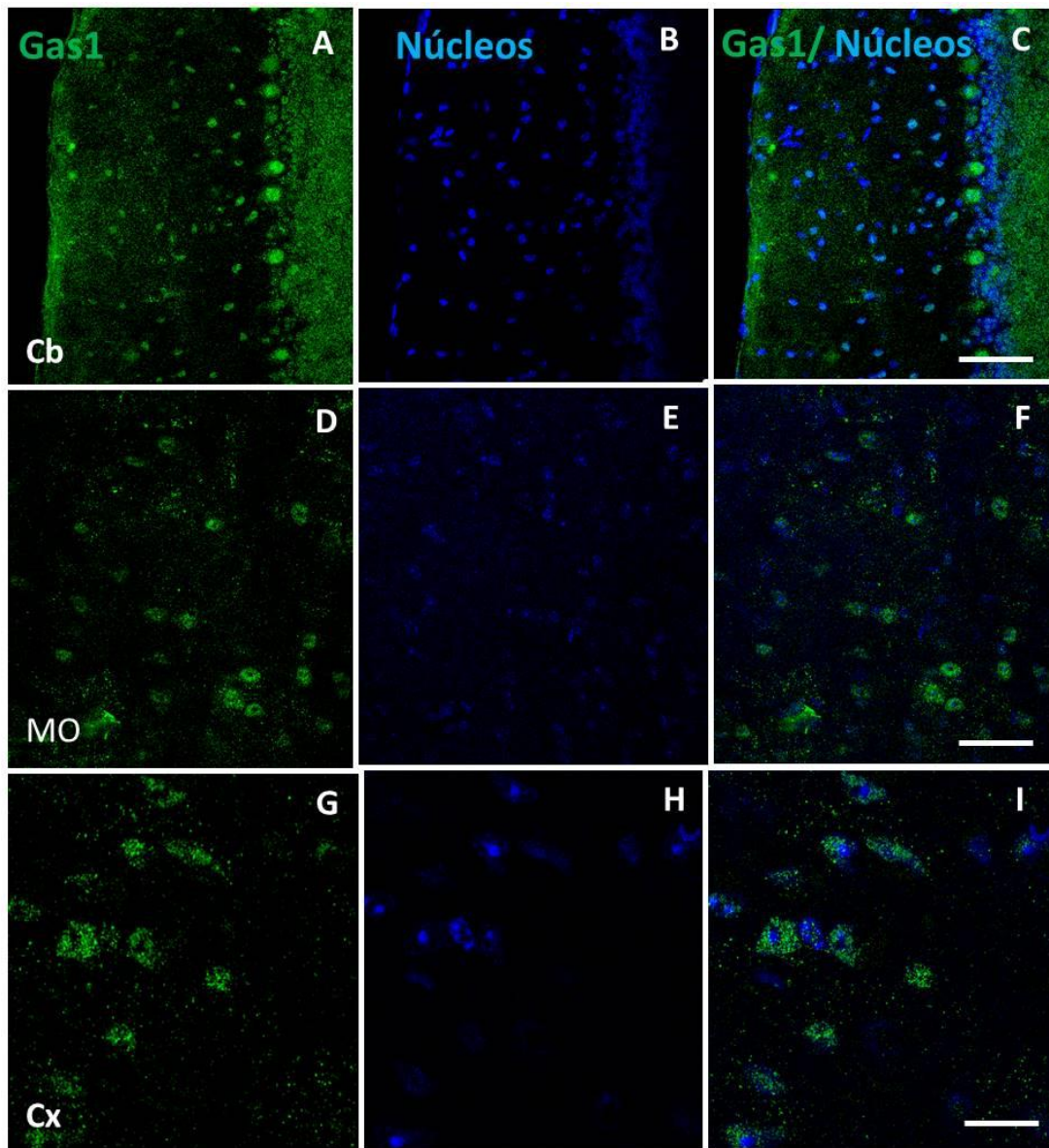


Figura 11. Gas1 se expresa en la corteza cerebelosa (Cb; A-C) médula oblongada (MO; D-F) y corteza (Cx; G-I) del cerebro del ratón adulto. Barra: (A y D) 100 μ M.

5.9 Microscopia confocal

Las imágenes se obtuvieron usando un microscopio confocal Leica TCS SP8, usando objetivos de inmersión 40X y 100X. Los intervalos de longitud de onda para cada fluoróforo fueron reducidos para evitar al máximo posibles interferencias, asimismo la adquisición fue secuencial para evitar interferencias entre canales. Las imágenes fueron analizadas en el programa LAS AF lite.

5.10 Extracción de RNA y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

El RNA total de las células NIH/3T3 o tejido de la capa de células granulares o células Purkinje-Molecular fue aislado usando TRIzol (Invitrogen). Se emplearon 5µg de RNA total y se trataron con DNAsa1 (New England Biolabs; Ipswich, MA) y M-MLV siguiendo las instrucciones del proveedor (Invitrogen). Posteriormente, 2µl del cDNA resultante se usaron para amplificar *gas1* y β -actina. Para amplificar a *gas1* los *primers* usados fueron: sentido 5'CTGTGCCTGATGGCGCTGCTGC3' y antisentido 5'ACGCAGTCGTTGAGCAG CGCC3' (amplicon: 595 pb). Las condiciones de amplificación fueron: para la etapa de desnaturalización a 95°C (1 ciclo, 5 min), seguido de 35 ciclos a 95°C (20 seg), 62°C (30s) y 72 ° C (30 seg) para la desnaturalización, la alineación y la extensión, respectivamente; con una disociación final a 72°C (1 ciclo, 5 min). Por otro lado, usamos un par de oligonucleótidos previamente descritos para amplificar β -actina (380 pb) [154].

5.11 Extracción de RNA y PCR tiempo real

El RNA total fue extraído por el método de TRIzol (Invitrogen), todas las muestras fueron tratadas con DNAsa1 (Invitrogen) y con la retrotranscriptasa SuperScript® III (Invitrogen) seguido de RNAsaH (Invitrogen). Se preparó un total de 7.5 µl de mezcla de reacción que contenía: 3.5 µL de SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 0.45 µl de dNTPs, 0.75 µl de cDNA y se ajustó el volumen con agua grado biología molecular. La reacción de PCR en tiempo real fue corrida en un equipo 7900HT Fast Real-Time PCR Thermocycler (Applied Biosystems). Los *primers* usados para amplificar a *gas1* de ratón fueron: sentido 5'-CCCTCTTCTGTGCGGTTTTTC-3' y antisentido 5'-CCCTTCTCCAAGTCCATTGG -3'; adicionalmente se usaron *primers* para amplificar a

β-actina previamente reportados [154]. Los datos fueron obtenidos usando el software SDS-2.4, las curvas de amplificación y línea base fueron ajustadas usando el método reportado por Ririe et al., 1997 [120]. Para comparar la tasa de expresión ($2^{-\Delta\Delta C_t}$), usamos la expresión de *β-actin* y *gas1* del Cb como control positivo.

5.12 ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas)

Los niveles de proteína Gas1 se midieron por ELISA usando los *kits* DuoSet ELISA de R&D Systems Cat# DY2644 y DY2636 de acuerdo a las instrucciones del proveedor. La extracción de proteínas se realizó usando un *buffer* de lisis que contenía inhibidores de proteasas (Complete; Roche Diagnostics, Indianapolis, Ind., USA). La cuantificación de proteínas se realizó por el método del ácido bicinonínico (Sigma Aldrich, St Louis, MO). Así, un total de 50 µg de proteína fue usada para la determinación de Gas1 por ELISA. Los niveles de Gas1 en el medio de cultivo de la células SH-SY5Y, N1E115, así como en los cultivos primarios de células de Purkinje, hipocampo y granulares fueron medidos sin dilución. Los datos fueron analizados y normalizados para obtener la cantidad de Gas1 humano o de ratón en nanogramos por microgramo de proteína total, los niveles de Gas1 en el supernadante (medio condicionado) son reportados en nanogramos por mililitro.

5.13 Microdissección de las capas del cerebelo

Este protocolo fue realizado con base a lo reportado por Chou y Jungalwala [32]. Ratones de 8 semanas de edad fueron sacrificados por decapitación, el cerebelo fue removido, para obtener cortes sagitales, los cuales se transfirieron a una caja Petri con HBSS y subsecuentemente lavados con agua DEPC. Se usó un estereoscopio para disecar la capa de células Purkinje-Molecular en una sola sección y la capa de células granular y sustancia blanca en otra sección.

5.14 Western blot

La extracción de proteínas de las células o tejidos fue realizado usando un *buffer* de lisis que contenía un mezcla de inhibidores de proteasas (Complete; Roche Diagnostics, Indianapolis, IND) y la cuantificación de proteínas se realizó por el método del ácido bicinonínico (Sigma Aldrich, St Louis, MO). Un total de 50 µg de proteína de cada

muestra fue separada en un gel de electroforesis de SDS-poliacrilamida y transferida a membranas de nitrocelulosa (BioRad; Hercules, CA). Las membranas fueron bloqueadas con 5% de leche libre de grasas/TBS/0.1% Tween 20 (TBST) por 2 h e incubadas por 12 h en presencia de los anticuerpos primarios: anti-Gas1, anti-pSer9 GSK3 β (1:1000, CTS Cat #5558), anti-GSK3 β (1:1000, CTS Cat #12456), anti- β -catenina (1:1000), anti-TH (1:250, SCB Cat#), anti-SOD1 (1:500,) y anti- β -actin (1:5000) [54]. Posteriormente las membranas fueron lavadas tres veces con TBS/0.1% Tween e incubadas con los anticuerpos secundarios anti-conejo o anti-ratón correspondientes acoplados a peroxidasa de rábano (Jackson ImmunoResearch). Las membranas fueron reveladas usando un *kit* Lightning Plus-ECL (PerkinElmer; Waltham, MA) y las imágenes se obtuvieron usando el biodocumentador; BioDoc-It Imaging System (UVP; Upland, CA), para después ser analizadas usando el software Image J[®].

5.15 Niveles de óxido nítrico (NO)

Para determinar los efectos de Gas1 sobre el estrés nitrosativo se midieron los niveles de NO por la técnica de Griess en el sobrenadante de las células tratadas con y sin 80 μ M de 6-OHDA. Se tomaron 150 μ L del sobrenadante fresco y se agregó a este 20 μ L de una solución que contenía N-(1-naftil) etilendiamina (1mg/mL) y ácido sulfanílico (10 mg/ml). Dicha mezcla se incubó durante 30 min a temperatura ambiente y en oscuridad, posteriormente se realizó la lectura de la muestra a una longitud de onda de 540nm. Los niveles de NO de las células SH-SY5Y fueron tomadas como el 100%.

5.16 Análisis estadístico

Los resultados se expresan como la media \pm SEM (n=3). Los análisis estadísticos se realizaron usando ANOVA de una vía seguido de un análisis *post hoc* de comparación múltiple de Tukey ($p \leq 0.05$).

VI. RESULTADOS

6.1 Gas1 se expresa en diferentes órganos del ratón adulto

En este trabajo inicialmente se cuantificaron por ELISA los niveles de Gas1 en diferentes órganos del ratón adulto de 8 semanas de edad de la cepa CD-1 (Fig. 12). Esto con el propósito de comparar los niveles de Gas1 en el cerebro con respecto a otros órganos. Los resultados muestran que páncreas, testículo y bazo son los órganos con los mayores niveles de Gas1 seguidos por el músculo, intestino delgado, pulmón y riñón, mientras que las órganos con los niveles más bajos de Gas1 son: cerebro, corazón e hígado (Fig. 12). Se usó como control células NIH/3T3 (NIH S/S) en presencia de suero como control negativo y en ausencia de suero por 96 h como control positivo de la expresión de Gas1 (Fig. 12).

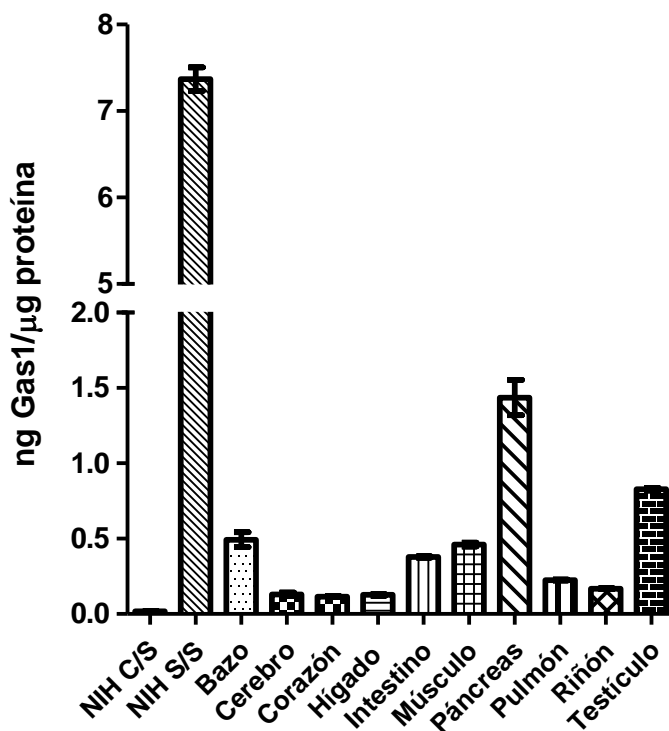


Figura 12. Gas1 se expresa en diferentes tejidos de ratón adulto. Los niveles fueron cuantificados por ELISA y se expresan como ng Gas1/μg de proteína. NIH C/S, células NIH/3T3 en proliferación; NIH S/S, células NIH/3T3 cultivadas con 0.5% de suero por 96 horas.

6.2 Gas1 se expresa en diferentes regiones del SNC de ratón adulto, siendo el cerebelo la región con los mayores niveles

En el presente trabajo, se empleó qRT-PCR y ELISA para medir los niveles de mRNA y proteína de Gas1 en diferentes regiones del cerebro adulto. El producto de PCR fue amplificado de todas las regiones examinadas, incluyendo Cb, OB, Cx, CPu, Tal e Hip después de 35 ciclos de amplificación (Fig. 13A). Se determinaron los niveles de mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) por qRT-PCR, se usó a β -actin como control de carga y al Cb como control positivo. En la figura 13B se muestran los niveles del mRNA de *gas1* en las diferentes regiones analizadas, se observa que el Cb es la región con los niveles más altos de *gas1* seguido del Hip, Tal, CPu, OB y Cx siendo esta última región la que contienen bajo número de copias del mRNA (Fig. 13B).

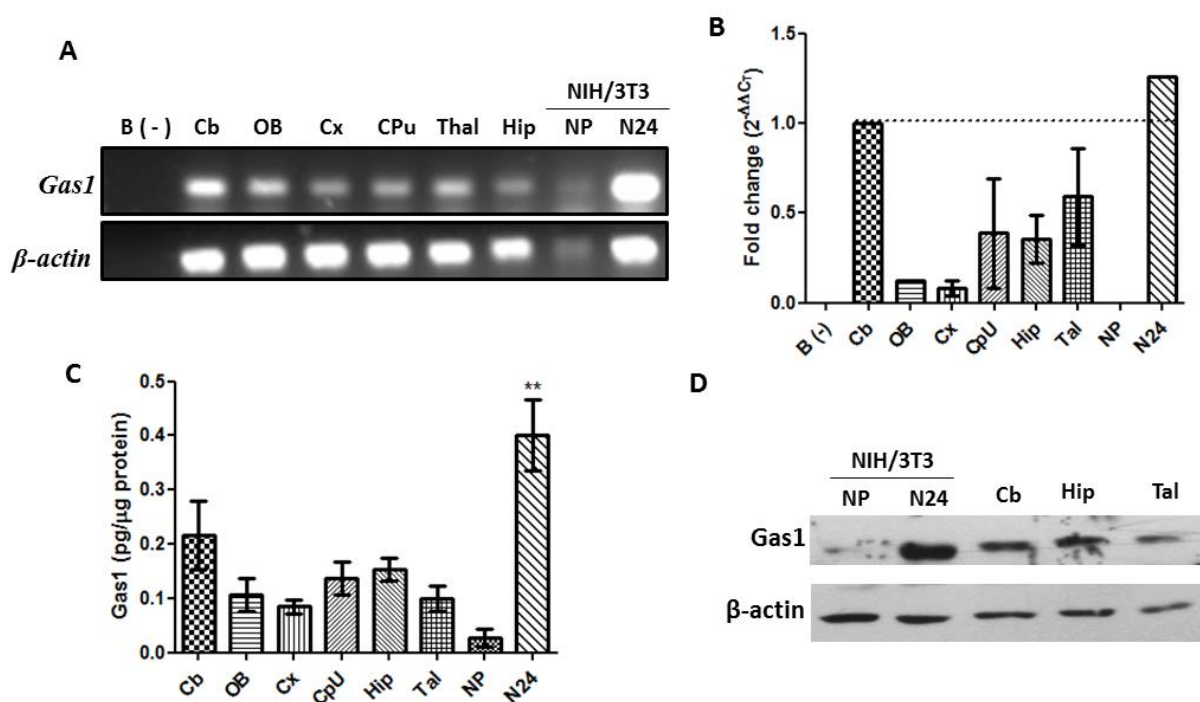


Figura 13. Gas1 se expresa en diferentes regiones de cerebro adulto de ratón. (A) Amplificación y (B) niveles de expresión del mRNA de Gas1 por qRT-PCR y niveles de (C) proteína Gas1 determinados por ELISA en diferentes regiones del cerebro adulto. (D) Detección de Gas1 por *western blot* en las estructuras correspondientes. Para qRT-PCR y *western blot*, β -actina fue usada como control de carga. B (-) reacción sin cDNA; NP, células NIH/3T3 en proliferación; N24, células NIH/3T3 cultivadas con 0.5% de suero por 24h; Cb, cerebelo; Hip, hipocampo; Tal, tálamo; Brain, cerebro adulto completo.

Como control se usaron células NIH/3T3 cultivadas en ausencia o presencia de suero. La Fig. 13 A-B muestra la presencia y los niveles de *gas1* en células NIH/3T3 cultivadas con 0.5% de SFB por 24 h (N24; Fig. 13A). Por otro lado, los resultados obtenidos por qRT-PCR son comparables a los obtenidos por ELISA (Fig. 13C), en el cual los niveles de Gas1 fueron normalizados por pg/ μ g de proteína (Fig. 13C). Con base en los resultados anteriores se corroboró la expresión de Gas1 por *western blot* en el Cb, Hip y Tal (Fig. 13 D). El siguiente objetivo fue determinar la expresión neuroquímica específica de Gas1 en regiones del cerebro adulto donde previamente se han descrito sus efectos y cuya organización permite visualizar la presencia de Gas1 en el cuerpo celular o en el neuropilo. Para detectar a Gas1 en los diferentes fenotipos, detectamos proteínas específicas de neuronas glutamatérgicas (VGLUT2⁺, transportador vesicular de glutamato 2), GABAérgicas (GAD67⁺: descarboxilasa de ácido glutámico de 67 KDa) y dopaminérgicas (TH⁺: tirosina hidroxilasa). A pesar de que el CPU tiene niveles considerables de Gas1, se decidió no incluirlo en el estudio ya que esta área recibe entrada glutamatérgica de Tal y Cx pero no posee neuronas glutamatérgicas. Las abreviaturas se explican en la Tabla I.

6.3 Gas1 se expresa en el cuerpo celular de las neuronas GABAérgicas y glutamatérgicas tanto del giro dentado como del cuerno de Amón

Para detectar a Gas1 en neuronas GABAérgicas, utilizamos un anticuerpo contra GAD₆₇, enzima que cataliza la formación de GABA a partir de la descarboxilación del L-glutamato. La isoforma GAD₆₇ es soluble y se distribuye en todo el cuerpo celular, en contraste con la isoforma GAD₆₅ la cual está anclada a la membrana de las vesículas sinápticas y se encuentra predominantemente en las terminales axónicas. Por otra parte, detectamos a Gas1 en neuronas glutamatérgicas usando un anticuerpo contra el transportador vesicular de glutamato 2 (VGLUT2) que se expresa exclusivamente en neuronas glutamatérgicas, ya que otros transportadores vesiculares como VGLUT1 y 3 se localizan en otros tipos neuronales como serotoninérgico, colinérgico e inclusive en astrocitos.

La figura 14A muestra la inmunorreactividad a Gas1 en los diferentes estratos neuronales del hipocampo incluido la capa Py (Pyramidale; subdividida en tres regiones: CA1, CA2,

CA3); Or: *stratum oriens*; SLu; *stratum lucidum*; Rad: *stratum radiatum*; LMol: *lacunosum moleculare*; Mol; *stratum moleculare*; GrDG: *stratum granulosum* del giro dentado; y PoDG: capa polimórfica conocida también como *hilus*.

El *stratum pyramidale* es la región del hipocampo que contiene los somas de las neuronas piramidales. Con base en las diferencias de tamaño y densidad con la que se agrupan estas células, se ha subdividido a esta región en distintos campos citoarquitectónicos denominados CA1, CA2 y CA3. El análisis detallado de estas regiones reveló colocalización de Gas1 con VGLUT2 (Fig. 14 E-F; 16 D-E; 17 D-E). Cabe señalar que se ha reportado escasa expresión de VGLUT2 en el hipocampo y que su expresión se restringe a algunas neuronas [48-50, 64]. Por otro lado, se detectaron células Gas1 y VGLUT2 positivas en las células de la capa granular (Fig. 15 F-G) y polimorfa (*hilus*, Fig. 15 F-I) del giro dentado. Además, en el *hilus* Gas1 se expresa en el soma y no en las terminales glutamatérgicas ubicadas en la periferia de las neuronas hiliares (Fig. 15 F-I).

Con respecto a la expresión de Gas1 en las neuronas GABAérgicas, se muestra que Gas1 no colocalizó con el plexo GABAérgico presente en las diferentes regiones de la capa piramidal de CA1 (Fig. 16 A-B), CA2 (Fig. 17 A-B) y CA3 (Fig. 14 B-C; Fig. 18 D-E) del hipocampo. Por otro lado, se detectaron células Gas1⁺-GAD₆₇⁺ en el *stratum oriens* adyacente a CA1 (Fig. 16 A-B), CA2 (Fig. 17 A-B) y CA3 (Fig. 14 B-C; Fig. 18 D-E). Cabe mencionar que las terminales de estas neuronas forman un plexo alrededor de los somas de las células piramidales adyacentes el cual no fue positivo a Gas1. Además, se observó un abundante plexo GABAérgico no inmunorreactivo a Gas1 en la capa polimorfa (*hilus*: Fig. 15 A-D) y alrededor del soma de las neuronas granulares (Fig. 15 A-B). Tanto en el *hilus* como en el borde de la capa granular se encontraron células de canasta GABAérgicas positivas a Gas1 (Fig. 15 A-D). En el *stratum lucidum* (Fig. 18D) y en el *stratum moleculare* (Fig. 18 A-B) se detectaron células Gas1-GAD₆₇⁺ con morfología horizontal y con inmunorreactividad a Gas1 únicamente en el soma.

6.4 Gas1 se expresa en el cuerpo celular pero no en el neuropilo de neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas del tálamo

Como se observa en la figura 19, Gas1 se expresa ampliamente en los núcleos talámicos. En este trabajo, se analizó dicha expresión en el núcleo reticular (Rt) y ventroposterior medial (VPM) del tálamo para determinar la distribución diferencial de Gas1 tanto en el plexo como en las neuronas GABAérgicas y glutamatérgicas. La inmunorreactividad a GAD₆₇ sólo se encontró en el núcleo Rt (Fig. 19 B), mientras que en el VPM sólo se observó en el neuropilo (Fig. 19B-C). Gas1 colocalizó con GAD₆₇ en el soma de células de núcleo Rt (Fig. 19 B) pero no en el neuropilo GABAérgico presente en el núcleo VPM (Fig. 19C). Por otra parte, el núcleo VPM contiene VGLUT2-IR abundante tanto en el cuerpo neuronal como en el neuropilo pero únicamente el cuerpo celular fue inmunorreactivo a Gas1 (Fig. 19 D-G).

6.5 En el cerebelo, Gas1 se expresa en el cuerpo celular de las neuronas GABAérgicas y en las neuronas glutamatérgicas del núcleo fastigial pero no está presente en células glutamatérgicas de la capa granular

En la corteza cerebelosa (Fig. 20 A), células Gas1⁺-GAD₆₇⁺ se observaron en la capa molecular, (células de canasta; Fig. 20 B y D), en la capa de células de Purkinje (Fig. 20 B y E) y en la capa de células granulares (células de Golgi; Fig. 20 B y F). Los cuerpos celulares de Purkinje y las dendritas, fueron fuertemente positivas a GAD₆₇, pero únicamente los cuerpos celulares fueron inmunorreactivos a Gas1 (Fig. 20 B y E). En la capa molecular, se observó GAD₆₇-IR en células de canasta (Fig. 20 B-D) dispersas cerca de las células de Purkinje y abundante inmunorreactividad punteada en el neuropilo (Fig. 20 B). Las células de canasta fueron inmunorreactivas para GAD₆₇-Gas1 en la capa molecular mientras que el neuropilo fue únicamente inmunorreactivo a GAD₆₇ (Fig. 20 B, D y E). En la capa granular se observaron células de Golgi que expresan GAD₆₇-Gas1 (Fig. 20 F). Por otro lado, se observó inmunorreactividad a VGLUT2 en las células granulares (Fig. 20 C y G) y en las fibras paralelas de la capa molecular y terminales de fibras musgosas en la capa granular (Fig. 20 C, G, H), sin embargo ni el cuerpo celular ni la terminales fueron positivas a Gas1 (Fig. 20 C y G).

Por otra parte, se analizó la expresión de Gas1 en el núcleo fastigial y la inmunofluorecencia muestra que Gas1 se expresa en el cuerpo celular de las neuronas glutamatérgicas pero no en el neuropilo (fig. 21 D y E). Las células de Purkinje envían sus axones al núcleo fastigial para hacer contacto sináptico con las células glutamatérgicas que residen en este núcleo. Las figuras 20 A y B muestran que las terminales GABAérgicas de las células de Purkinje no son positivas a Gas1.

Tabla 1. Abreviaturas de las regiones cerebrales

Abreviación	Estructura
CA1	Región CA1 del hipocampo
CA2	Región CA2 del hipocampo
CA3	Región CA3 del hipocampo
Cx	Corteza
GD	Giro dentado
Gr	Capa granular del cerebelo
GrDG	Capa granular del giro dentado
LMol	Capa <i>lacunosum moleculare</i> del hipocampo
Mol	Capa molecular del cerebelo
Or	Capa <i>oriens</i> del hipocampo
PoDG	Capa polimórfica del giro dentado (<i>hilus</i>)
Pur	Capa de células de Purkinje del cerebelo
Py	Capa piramidal del hipocampo
Rad	<i>Stratum radiatum</i> del hipocampo
Rt	Núcleo reticular del tálamo
SLu	<i>Stratum lucidum</i> del hipocampo
VPM	Núcleo ventroposteromedial del tálamo
WM	Sustancia blanca

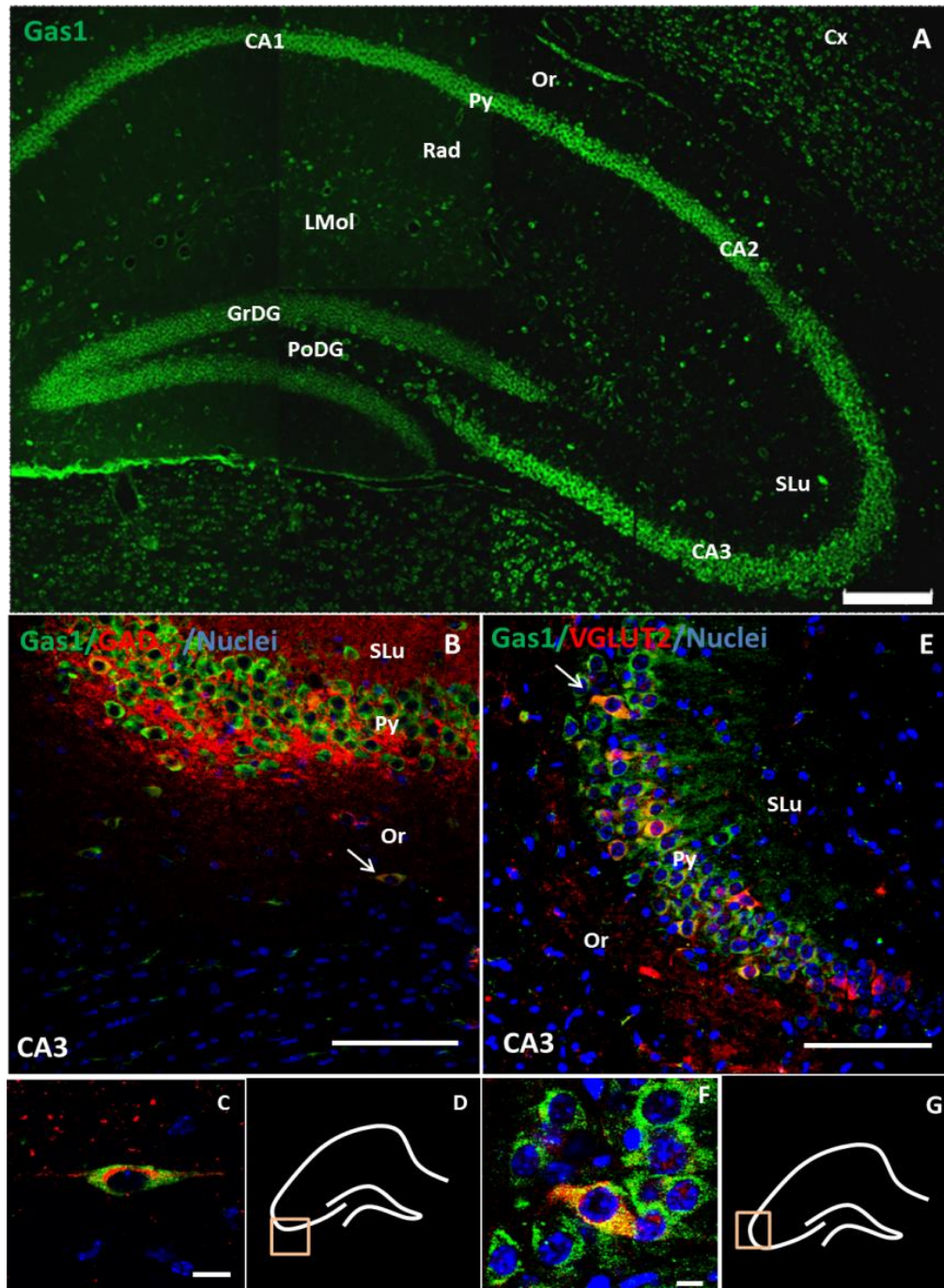


Figura 14. Gas1 se expresa en neuronas GABAérgicas y glutamatérgicas de CA3 del hipocampo. (A) Inmunohistoquímica para Gas1 (verde) en el hipocampo. (B-C) Gas1 está presente en el soma de las neuronas GABAérgicas (GAD_{67}^+ ; rojo) de estrato *oriens* y (E-F) en el soma de las neuronas glutamatérgicas piramidales ($VGLUT2^+$; rojo) de CA3. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Las células indicadas con flechas en B y E, se amplifican en C y F, respectivamente. Barra: (A) 200 μ m, (B y E) 100 μ m, (C y F) 10 μ m. D y G muestran la localización de los campos examinados. Las abreviaturas se exponen en la Tabla I.

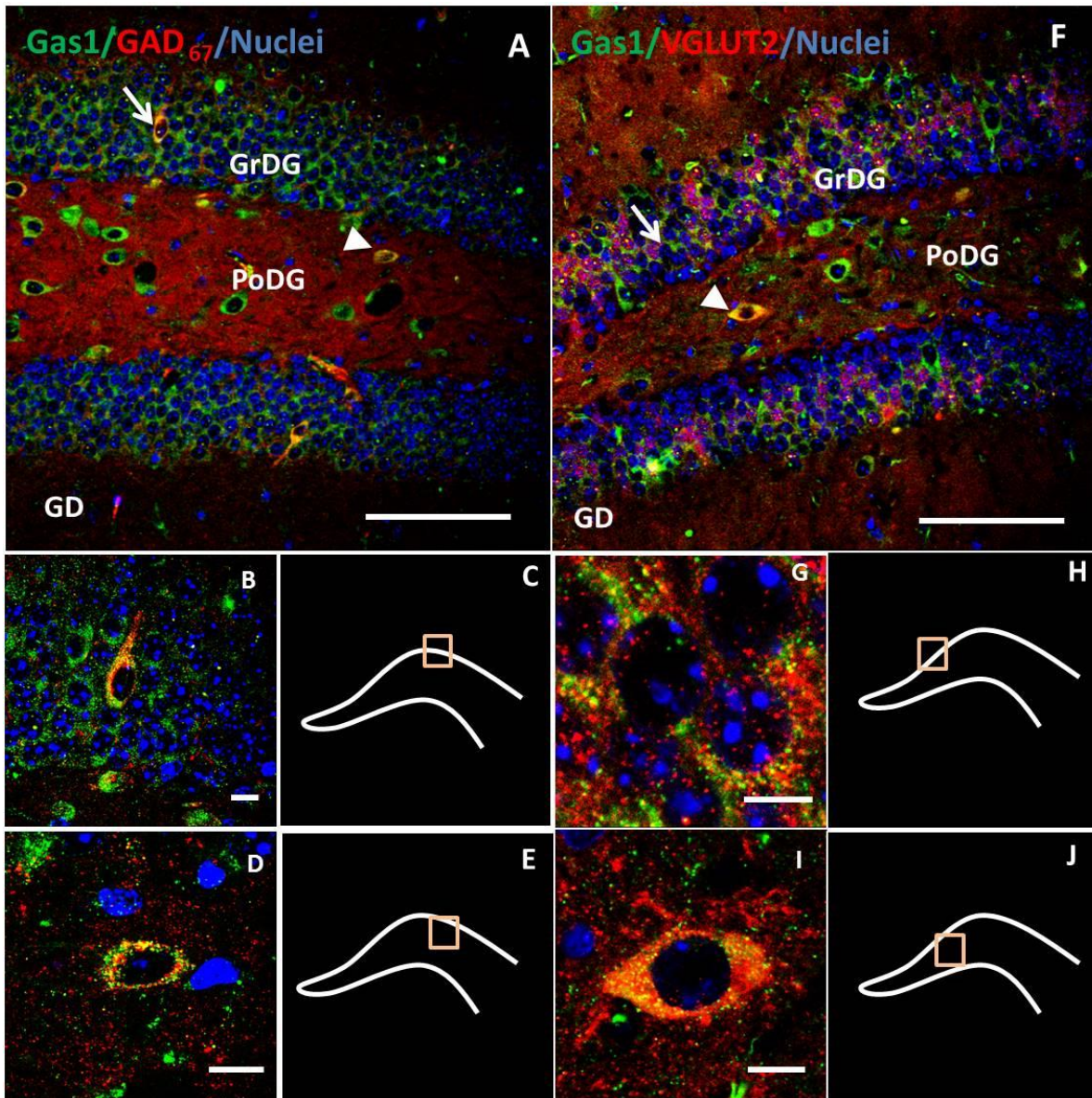


Figura 15. Gas1 se expresa en las neuronas GABAérgicas y glutamatergicas del giro dentado y del hilus (capa polimórfica) del hipocampo. (A y F) Gas1 (verde) está presente en el soma de las neuronas GABAérgicas (GAD_{67}^{+} : rojo) situadas en la capa granular (A y B) e *hilus*, aunque, (A y D) pero no en el neuropilo GABAérgico (F-G). Además, Gas1 (verde) se encuentra en las neuronas glutamatergicas ($VGLUT2^{+}$: rojo) de la capa granular e (F y G) *hilus* (F y I), pero no en el neuropilo glutamatergico (rojo). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul) Las células indicadas con flechas y puntas de flecha en A y F se amplifican en B y D y en G e I, respectivamente. Barra: (A y F) 100 μm , (B, D, G e I) 10 μm . C, E, H y J muestran la localización de los campos examinados. Las abreviaturas se exponen en la Tabla I.

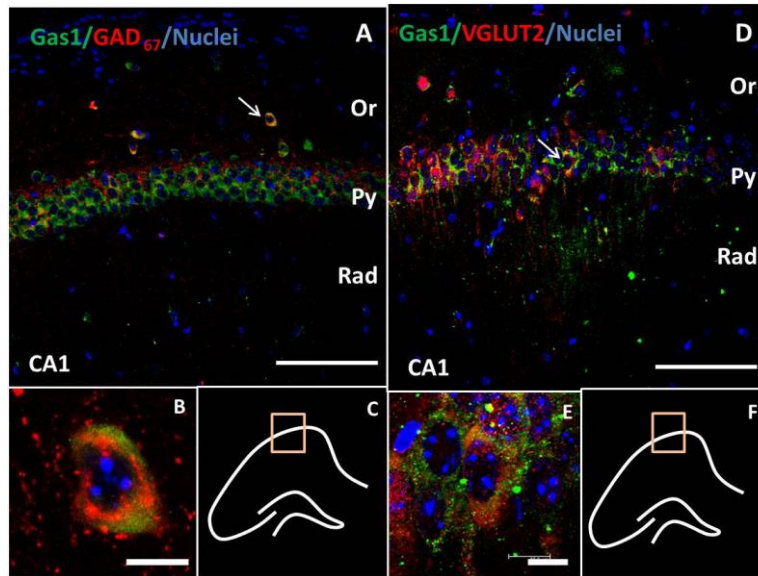


Figura 16. Gas1 co-localiza con GAD₆₇ y VGLUT2 en CA1 del hipocampo. (A-B) Gas1 se expresa en el soma de las neuronas GABAérgicas (GAD₆₇⁺: rojo) del *stratum oriens* y (D-E) y en el soma de las neuronas glutamatergicas (VGLUT2⁺: rojo) de las células piramidales de CA1 del hipocampo. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Las células indicadas por las flechas en A y D se amplifican en B y E, respectivamente. Barra: (A y D) 100 μ m, (B y E) 10 μ m. C y F representan las áreas examinadas. Las abreviaturas se exponen en la Tabla I.

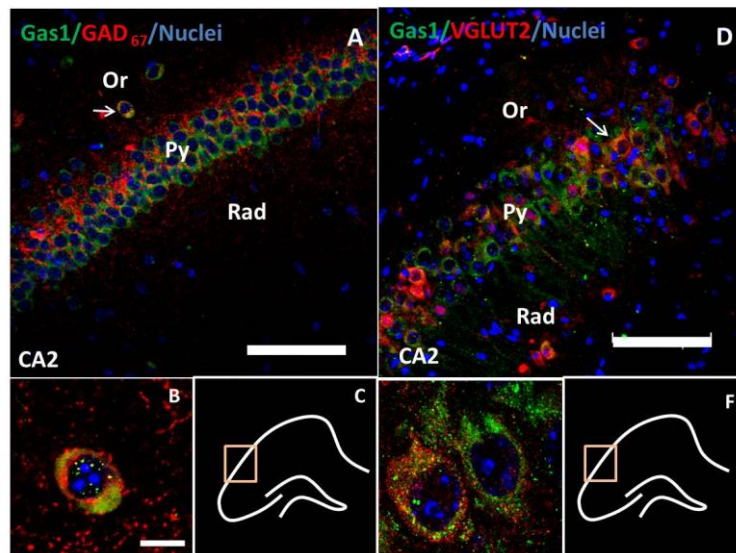


Figura 17. Gas1 se expresa en las neuronas GABAérgicas y glutamatergicas de CA2 del hipocampo. (A-B) Gas1 está presente en el soma de las neuronas GABAérgicas (GAD₆₇⁺: rojo) de *stratum oriens* y (D-E) y en el soma de las neuronas glutamatergicas (VGLUT2⁺: rojo) de las células piramidales de CA2 del hipocampo. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Las células indicadas por las flechas en A y D, se amplifican en B y E, respectivamente. Barra: (A y D) 100 μ m, (B y E) 10 μ m. C y F muestran las áreas examinadas. Las abreviaturas se exponen en la Tabla I.

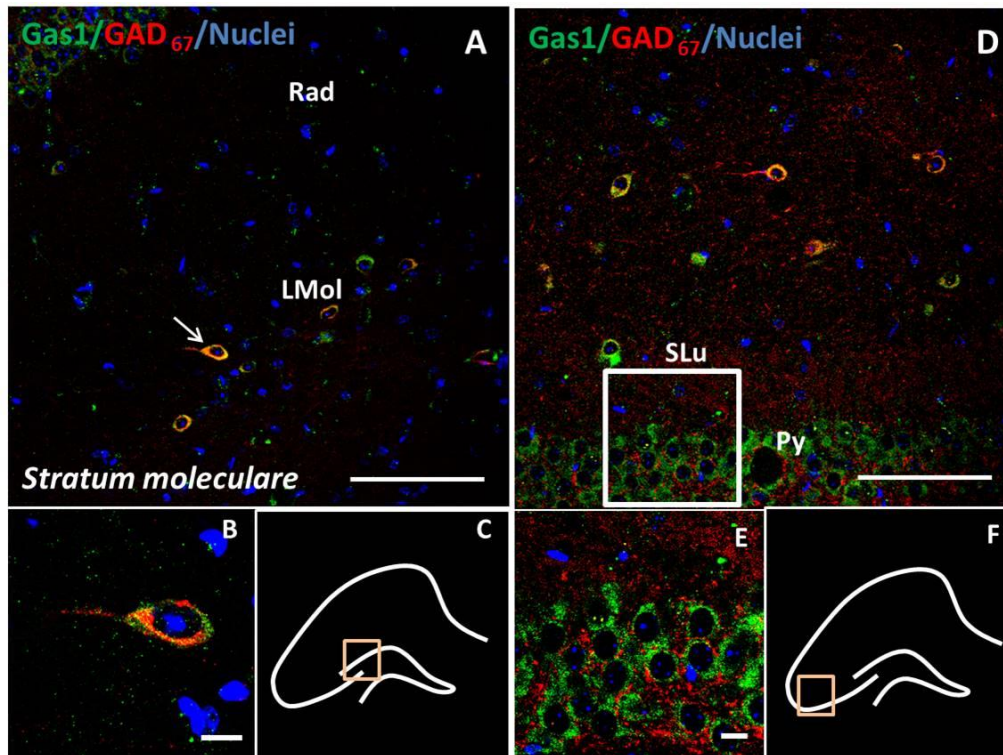


Figura 18. Gas1 se expresa en neuronas GABAérgicas de la capa molecular del hipocampo. (A-B) Gas1 expresa en el soma de neuronas GABAérgicas (GAD_{67}^+ : rojo) de la capa molecular pero no (D-E) en el neuropilo GABAérgico de la capa piramidal de CA2. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). La célula indicada por la flecha en A se amplifica en B; La inserción en B se amplifica en E. Barra: (A y D) 100 μm , (B y E) 10 μm . C y F muestran las áreas examinadas. Las abreviaturas se exponen en la Tabla I.

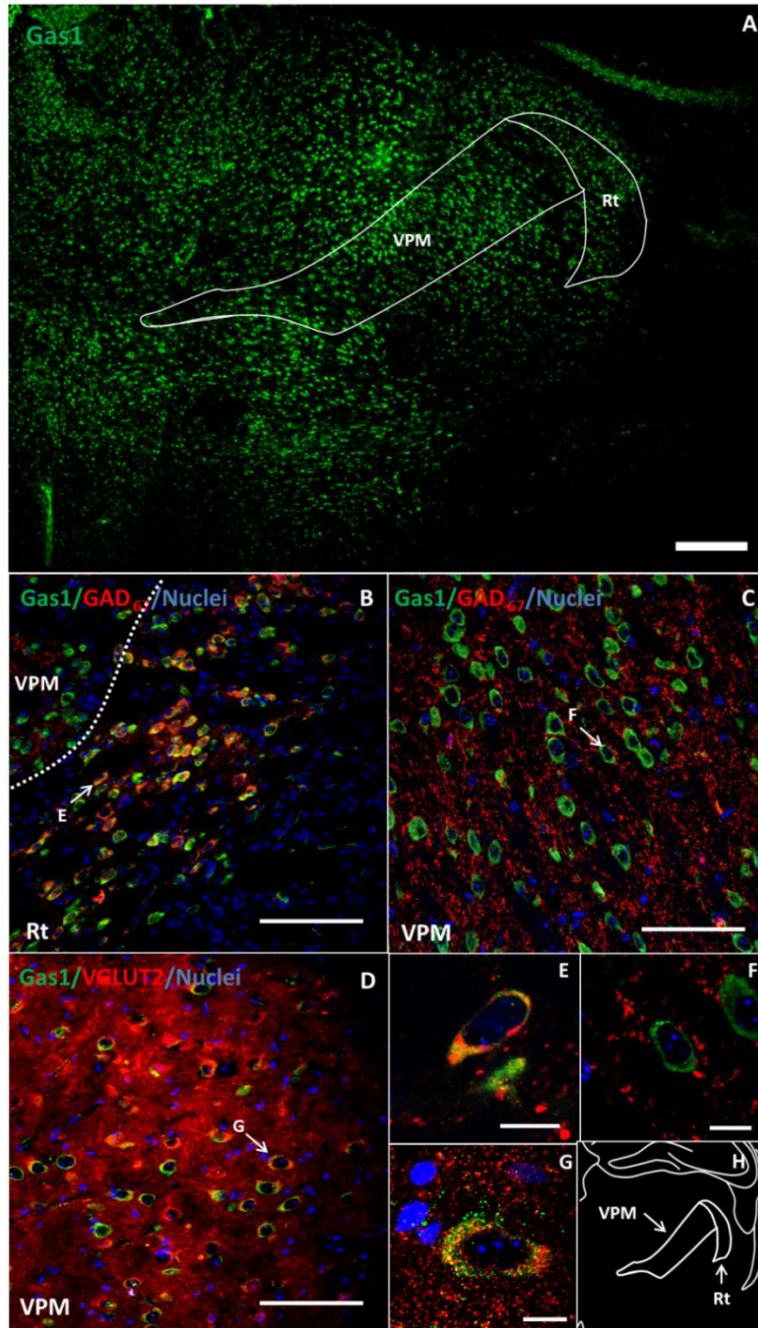


Figura 19. Gas1 se expresa en neuronas GABAérgicas y glutamatérgicas del tálamo. (A) Inmunohistoquímica para Gas1 (verde) en el tálamo. (B y E) Gas1 (verde) se expresa en el soma de las neuronas GABAérgicas (GAD_{67}^+ : rojo) del núcleo Rt (D y G) y en el soma de las neuronas glutamatérgicas ($VGLUT2^+$: rojo) del núcleo VPM. (C y F) Sin embargo, Gas1 (verde) no co-localiza con el neuropilo GABAérgico (rojo) del núcleo VPM. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Las células indicadas por las flechas en B, C y D, se amplifican en E, F y G, respectivamente. Barra: (A) 200 μm , (B, C y D) 100 μm , (E, F y G) 10 μm . H muestra la localización de los campos examinados. Las abreviaturas se exponen en la Tabla I.

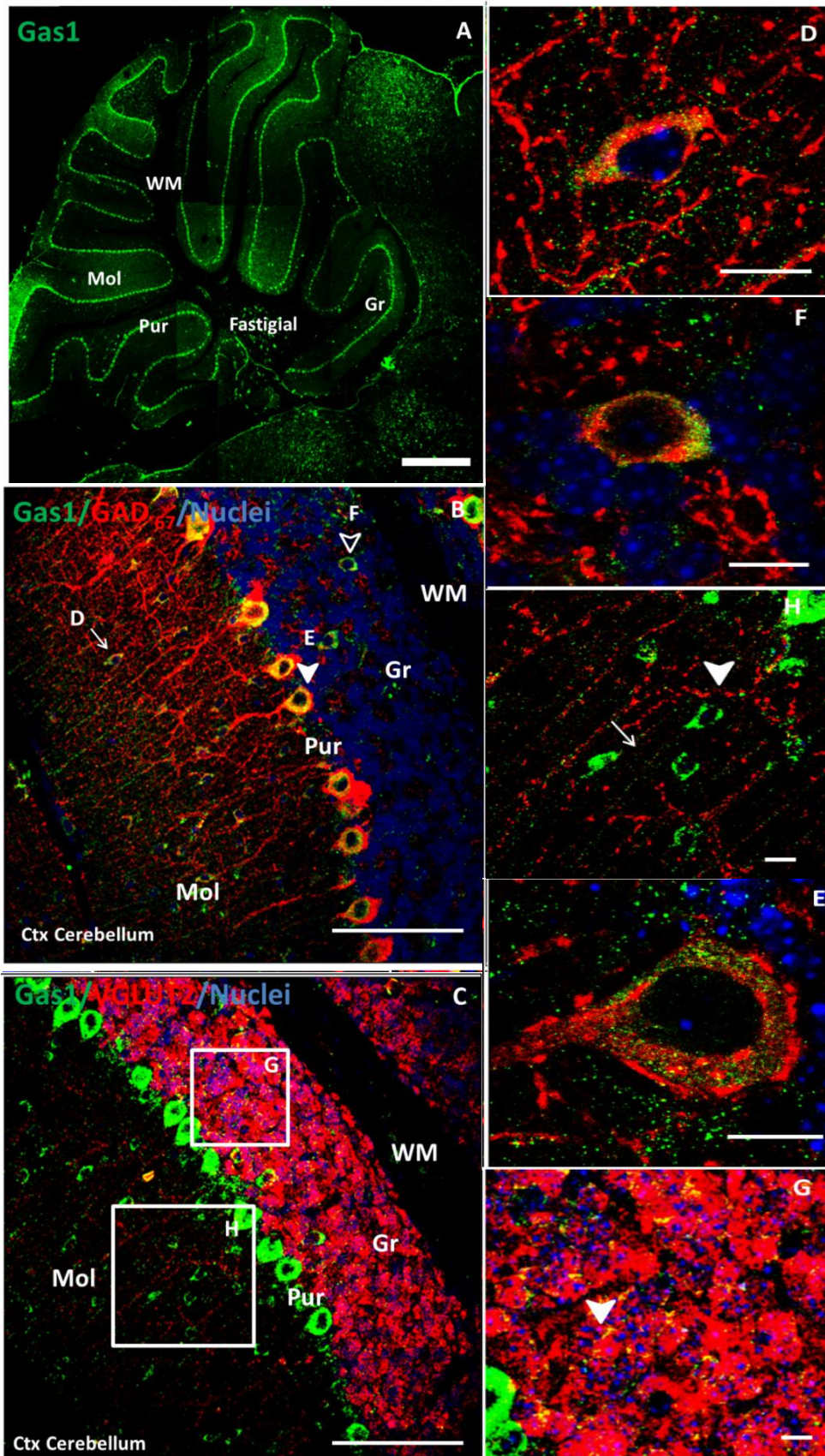


Figura 20. Expresión de Gas1 en neuronas GABAérgicas y glutamatérgicas en el cerebelo. (A) Inmunohistoquímica para la proteína Gas1 (verde) en el cerebelo. (B) Gas1 está presente en el soma de las neuronas GABAérgicas (GAD_{67}^+ ; rojas) incluyendo: (D) células de canasta de la capa molecular, (E), de Purkinje y (F) de Golgi de la capa granular. Las células indicadas con flecha, punta de flecha y punta de flecha vacía en B se amplifican en D, E y F, respectivamente. (C y G) Baja inmunorreactividad a Gas1 se observa en las células glutamatérgicas ($VGLUT2^+$; rojo) de la capa granular, indicado por la punta de flecha. (C y H) En la capa molecular Gas1 se observan como pequeñas manchas que forman estructuras similares a los procesos, indicadas por una flecha. Sin embargo, estos procesos no co-localizan con las fibras trepadoras ($VGLUT2^+$), indicadas por la punta de flecha. (A-C) En el WM, no observamos inmunorreactividad para Gas1. Los insertos superior e inferior se amplifican en G y H, respectivamente. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Barra: (A) 200 μm , (B y C) 100 μm , (D-H) 10 μm . Las abreviaturas se exponen en la Tabla I.

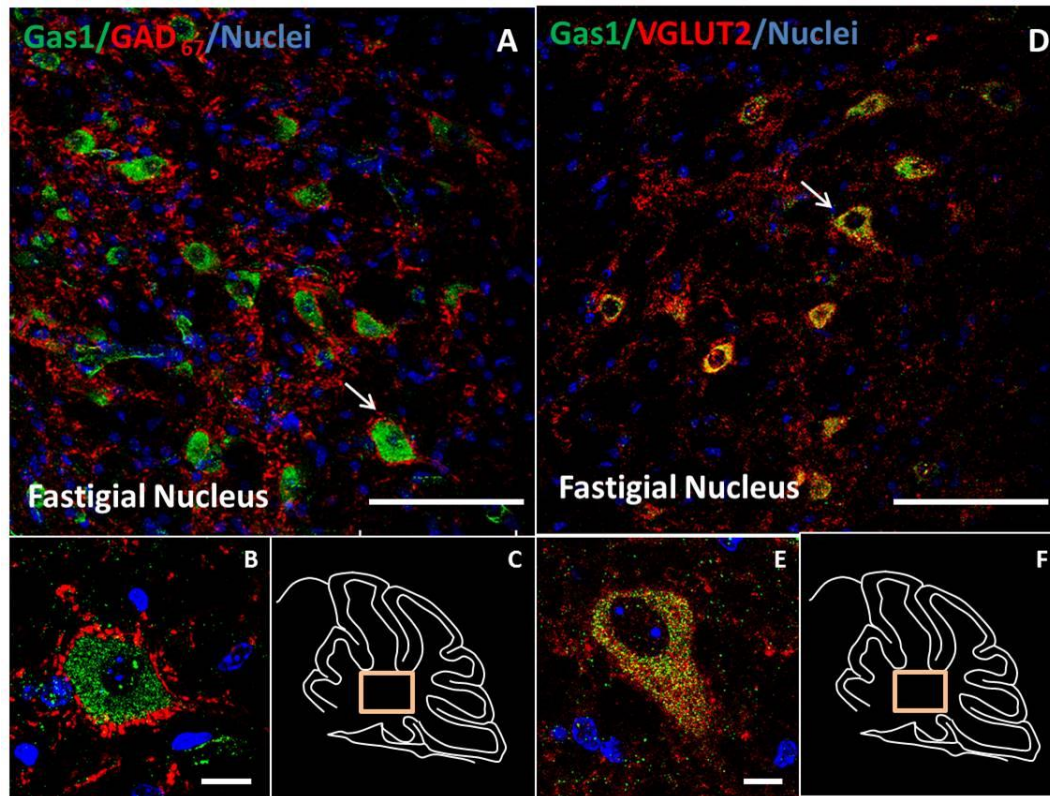


Figura 21. Gas1 se expresa en las neuronas glutamatérgicas del núcleo fastigial pero no en los terminales axonales de las células de Purkinje. (A-B) Gas1 no está presente en las terminales GABAérgicas de las neuronas de Purkinje (GAD_{67}^+). (D y E) Gas1 (verde) está presente en el soma de las neuronas glutamatérgicas ($VGLUT2^+$; rojo) del núcleo fastigial. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Las células indicadas con la flecha en A y D, se amplifican en B y E, respectivamente. Barra: (A y D) 100 μm , (B - E) 10 μm . C y F muestran las áreas examinadas. Las abreviaturas se exponen en la Tabla I.

6.6 La capa de células Purkinje-molecular presenta altos niveles de Gas1 mientras que la capa de células granulares del cerebelo tiene bajos niveles

El análisis inmunohistoquímico reveló que en el cerebelo Gas1 se expresa en neuronas GABAérgicas (presentes en la capa molecular y en células de Pukinje) pero es casi indetectable en neuronas glutamatérgicas (células granulares). Para confirmar estos resultados, se disectaron la capa de células granulares y la de Purkinje-molecular del cerebelo de ratones CD1 adultos, para analizar la presencia de mRNA por PCR de punto final y los niveles de proteína por ELISA. Como control se utilizaron células NIH/3T3 las cuales solo expresaron Gas1 cuando se cultivaron con baja concentración de SFB (Fig. 22). En la figura 22A se muestra la presencia del producto de PCR de *gas1* en células NIH/3T3 crecidas con bajo SFB, en cerebelo completo y en la capa de células Purkinje-molecular después de 35 ciclos de amplificación. Sin embargo, no se detectó *gas1* en células NIH/3T3 en proliferación ni en la capa de células granulares del cerebelo.

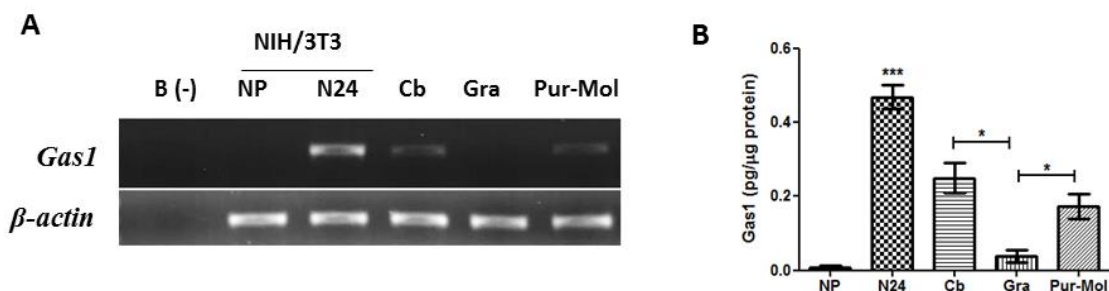


Figura 22. Gas1 no se expresa en la capa de células granulares pero si en la capa de células Purkinje-molecular del cerebelo. (A) Amplificación del mRNA de *gas1* por RT-PCR y (B) niveles de proteína Gas1 en células NIH/3T3 en proliferación (NP), NIH/3T3 cultivadas con bajo suero por 24h (N24), Cb: cerebelo; Gra: capa de células granulares y Pur-Mol: capa de células de Purkinje-Molecular por ELISA. B (-): reacción sin sDNA. Los datos se muestran como la media \pm SEM, n=3 por grupo; *P < 0.05 and *** P < 0.001.

Con respecto a los niveles de proteína Gas1, encontramos bajos niveles en la capa de células granulares comparados con la capa de células Purkinje-molecular (Fig. 22 B). Es de señalar que no se observa el producto de PCR de *gas1* en la capa de células granulares, sin embargo, se detectó proteína por ELISA (Fig. 22 A y B; Gra). Probablemente la

resolución de gel no es adecuada para detectar niveles tan bajos del mensajero y que solo fueron observados por ELISA o bien dichos niveles proteicos de Gas1 corresponden a la forma soluble de Gas1 liberada por las neuronas de Purkinje. Debido a lo anterior se decidió medir los niveles de Gas1 en el extracto total de cultivos primarios.

6.7 Gas1 es secretado por neuronas de Purkinje y del hipocampo pero no de células granulares del cerebelo

Como previamente se comentó, se ha reportado que Gas1 se libera de las células mesangiales y NIH/3T3 [7, 143]. Por lo tanto, el siguiente objetivo fue determinar si las neuronas expresan y liberan Gas1, para ello se realizaron cultivos primarios de neuronas del hipocampo, de Purkinje y granulares del cerebelo. Los cultivos primarios se caracterizaron morfológicamente y como se observa en la figura 23, en los cultivos primarios tanto las células del hipocampo (Fig. 23 A) como las células granulares (Fig. 23B) presentan una morfología alargada y procesos que hacen contactos con células adyacentes, mientras que las células de Purkinje formaron un árbol dendrítico alrededor del cuerpo celular (Fig. 23 C y D).

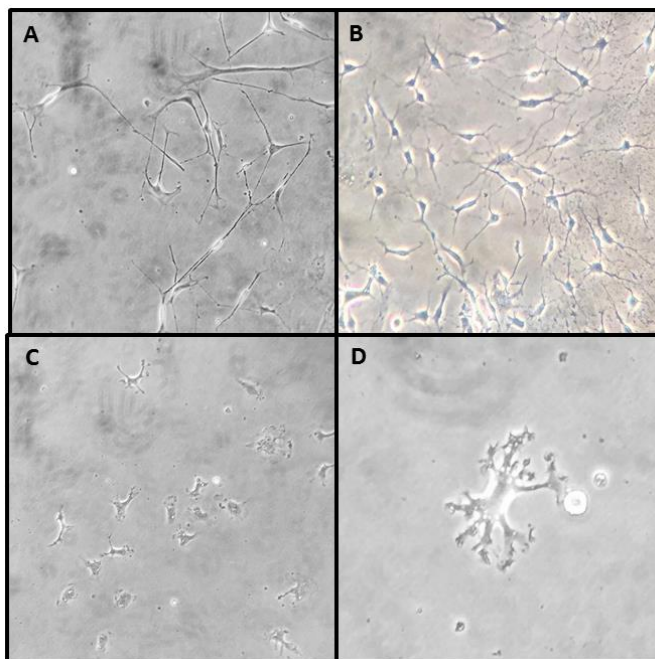


Figura 23. Imágenes de campo claro de los cultivos primarios de células del (A) Hipocampo, (B) granulares y (C-D) de Purkinje del cerebelo. A-C 40X y D 100X.

Para corroborar que los medios de cultivo utilizados generaban dicha morfología neuronal (Fig. 23), se cultivaron astrocitos en DMEM HG alta glucosa. Inicialmente, en este cultivo (sin subcultivo es decir en pasaje 0) se observaron dos morfologías celulares preponderantes, las células marcadas con una flecha en negro tienen un forma semiepitelial no refringente (Fig. 24 A), y la segunda población celular marcada con una flecha azul presenta una morfología estrellada con cuerpo celular pequeño y procesos ramificados radiales (Fig. 24 B). Estos datos sugieren que es una mezcla de oligodendrocitos y astrocitos. En el subcultivo 2 se observó una disminución de la población con abundante procesos ramificados radiales. Posteriormente se detectó la presencia de GFAP como marcador de células gliales, encontrando que el 98% de estas células fueron positivas (Fig. 24 B-C).



Figura 24. Cultivo primario de astrocitos. (A) Imagen de campo claro de cultivo primario de atrocitos. Inmunocitoquímica para la detección de la proteína GFAP. (B) control negativo (incubación sin anticuerpo primario), (C) cultivo de astrocitos positivos a GFAP. A-C 40X.

Por otro lado, se determinó la pureza del cultivo primario de neuronas del hipocampo, granulares y de Purkinje. Para identificar neuronas se empleó un anticuerpo que reconoce a la proteína NeuN, y para identificar células astrogiales un anticuerpo anti-GFAP (Fig. 25). Los resultados mostraron que aproximadamente el 85% de la células fueron positivas a NeuN, el 10% a GFAP y el 5% negativas a NeuN y GFAP.

Una vez caracterizados los cultivos primarios, a continuación se midieron los niveles de Gas1, tanto el extracto celular como en el medio condicionado, es decir el medio de cultivo donde crecieron dichas células. Como control de la expresión de Gas1 se usaron a las líneas celulares de neuroblastoma de ratón N1E115 y las células SH-SY5Y derivadas de

un neuroblastoma humano, ambas se diferenciaron por 5d con 10 μ M de AR, ya que en estas condiciones adquieren un fenotipo neuronal más definido. Los resultados muestran que Gas1 es expresado (Fig. 26 A) y liberado (Fig. 26 B) de las células N1E115, SH-SY5Y, de Purkinje y del hipocampo pero no de las células granulares del cerebelo. Los datos de Gas1 en el extracto celular se muestran en pg/ μ g de proteína y en el medio condicionado como Gas1 soluble en ng/mL. Por otra parte, con estos datos sugerimos que los niveles de Gas1 encontrados en la capa de células granulares por ELISA (microdissección; Fig. 22 B), quizás corresponden al Gas1 liberado de las células de Purkinje (Fig. 26 B).

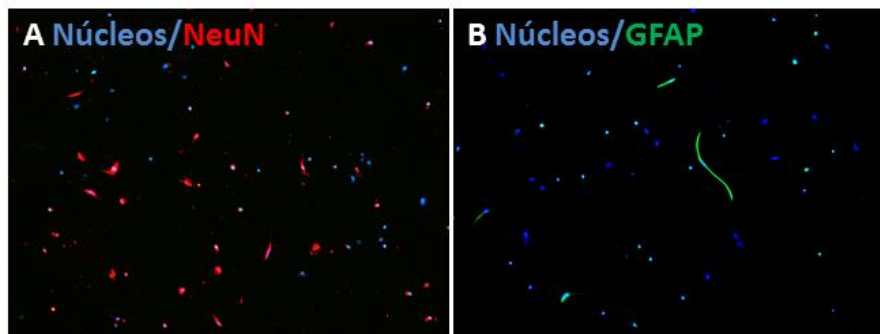


Figura 25. Cultivo primario de neuronas del hipocampo. (A) Inmunocitoquímica para la detección de la proteína NeuN. (B) y para GFAP. Núcleos teñidos con DAPI. A-B 20X

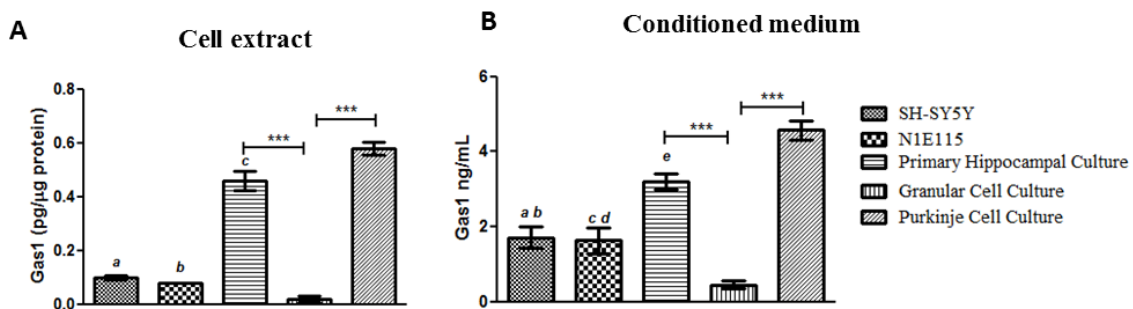


Figura 26. Gas1 se expresa y libera de cultivo primario de neuronas y de líneas celulares de neuroblastoma diferenciadas con AR. (A) Niveles de Gas1 en el extracto celular y (B) medio condicionado de cultivo primario de hipocampo, de células granulares y Purkinje del cerebelo así como de las líneas celulares: SH-SY5Y y N1E115 ambas diferenciadas con AR. Los datos se muestran como la media \pm SEM, n=3 por grupo, *** P < 0.001.

6.8 Los niveles de Gas1 se incrementa durante el proceso de diferenciación de la células SH-SY5Y inducida con AR

Durante el desarrollo embrionario y posnatal, el AR es el principal inductor de la diferenciación neuronal el cual inhibe la proliferación celular, induce la formación de neuritas y la expresión de proteínas características de neuronas maduras [1, 71, 114]. En este contexto, usando microensayos se he demostrado que *gas1* podría ser un gen de respuesta al AR, ya que este último induce la expresión de *gas1* en células de la cresta neural y presumiblemente en células SH-SY5Y [27, 150]. Por lo tanto, y considerando que Gas1 es liberado de las SH-SY5Y diferenciadas con AR (Fig. 23 B), se analizaron los niveles de Gas1 durante la diferenciación neuronal, ya que es un excelente modelo de estudio *in vitro* de la diferenciación dopaminérgica [22, 29]. Además, previamente se demostraron los efectos neurotóxicos del Hg usando este modelo [25].

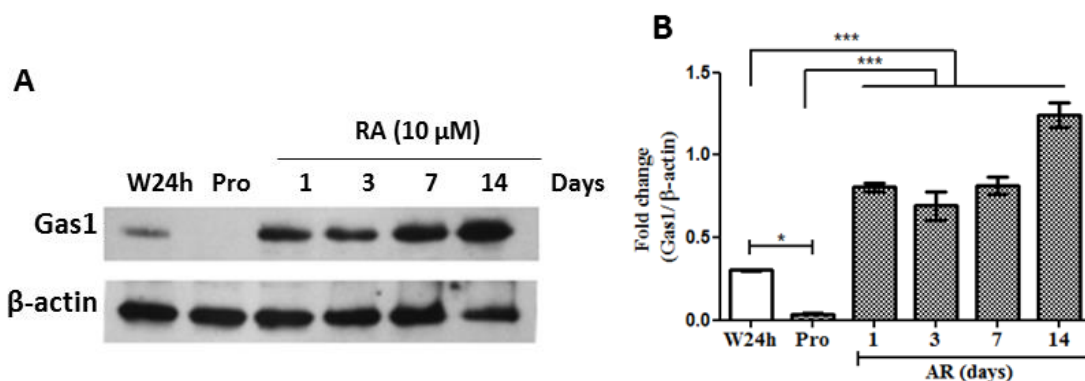


Figura 27. Los niveles de Gas1 se incrementa durante la diferenciación de las células SH-SY5Y inducida por AR. (A) Expresión de Gas1 y β -actina en células SH-SY5Y diferenciadas con AR (B) La gráfica muestra el análisis densitométrico para Gas1 después de la normalización con β -actina. W24h: células SH-SY5Y cultivadas con bajo SFB, Pro: células SH-SY5Y cultivadas con 20% de SFB, RA; ácido retinoico. Los datos se muestran como la media \pm SEM, n=3 por grupo; *P < 0.05 and *** P < 0.001.

Como reportes previos lo muestran, en este trabajo se estimó la diferenciación por la presencia de procesos parecidos a neuritas [22, 29]. Como control, usamos células SH-SY5Y cultivadas con bajo SFB (0.5%) o con 20% de SFB por 24 h (Fig. 27). Por otro lado, expusimos a las células SH-SY5Y a 10 μ M de AR durante 1, 3, 7 y 14 d para posteriormente detectar a Gas1 por *western blot*. El análisis densitométrico muestra que los

niveles de Gas1 se incrementa gradualmente a medida que el tratamiento con AR progresa (Fig. 27), estos datos son consistentes con lo reportado por Chapuis et al., [26].

6.9 El silenciamiento de Gas1 disminuye la formación de neuritas inducidas por el AR en células SH-SY5Y

La formación de procesos parecidos a neuritas y el incremento de los niveles de TH son considerados indicadores de diferenciación dopaminérgica de las células SH-SY5Y inducido por el AR [22, 29]. Por lo tanto, para determinar el papel de Gas1 en el proceso de diferenciación, contamos el número de neuritas formadas en las células SH-SY5Y después de 7 d de tratamiento con 10 μ M de AR (Fig. 28). Las neuritas se marcaron empleando un anticuerpo contra tubulina β III (Fig. 28 A).

Como se observa en la figura 28, las células SH-SY5Y en proliferación, es decir, cultivadas en ausencia de AR y con 10% de SFB, presentan escasas neuritas comparadas con las células tratadas durante 7 d con 10 μ M de AR (Fig. 28). Para determinar los efectos de Gas1 sobre la formación de neuritas, incubamos células SH ANT Gas1 las cuales no expresan Gas1 [155], con 10 μ M de AR durante 7 d. En la figura 28 se muestra que el silenciamiento de Gas1 produjo una disminución del 50% en el número de neuritas formadas con respecto a las células SH-SY5Y (Fig. 28).

Considerando que las células SH-SY5Y y las neuronas (cultivo primario) liberan Gas1, se estudió si Gas1 soluble (recombinante y carente del ancla GPI) podía revertir el efecto del silenciamiento de Gas1. Por lo tanto, células SH ANT Gas1 se incubaron con 0.1 ng/mL de Gas1 y 10 μ M de AR por 7 d. Los datos muestran que Gas1 soluble recombinante rescató la formación de neuritas en las células SH ANT Gas1 (Fig. 28). Cabe mencionar que la concentración de Gas1 utilizada no tuvo efecto sobre la viabilidad celular medida por el ensayo de MTT (Fig. 29 C). Con base en los datos obtenidos sugerimos que Gas1 ejerce diferentes efectos dependiendo de la concentración, ya que un trabajo paralelo en el laboratorio ha demostrado que una concentración de Gas1 300 veces mayor a la utilizada en este trabajo induce apoptosis en células SH-SY5Y (Sánchez et al., datos no publicados).

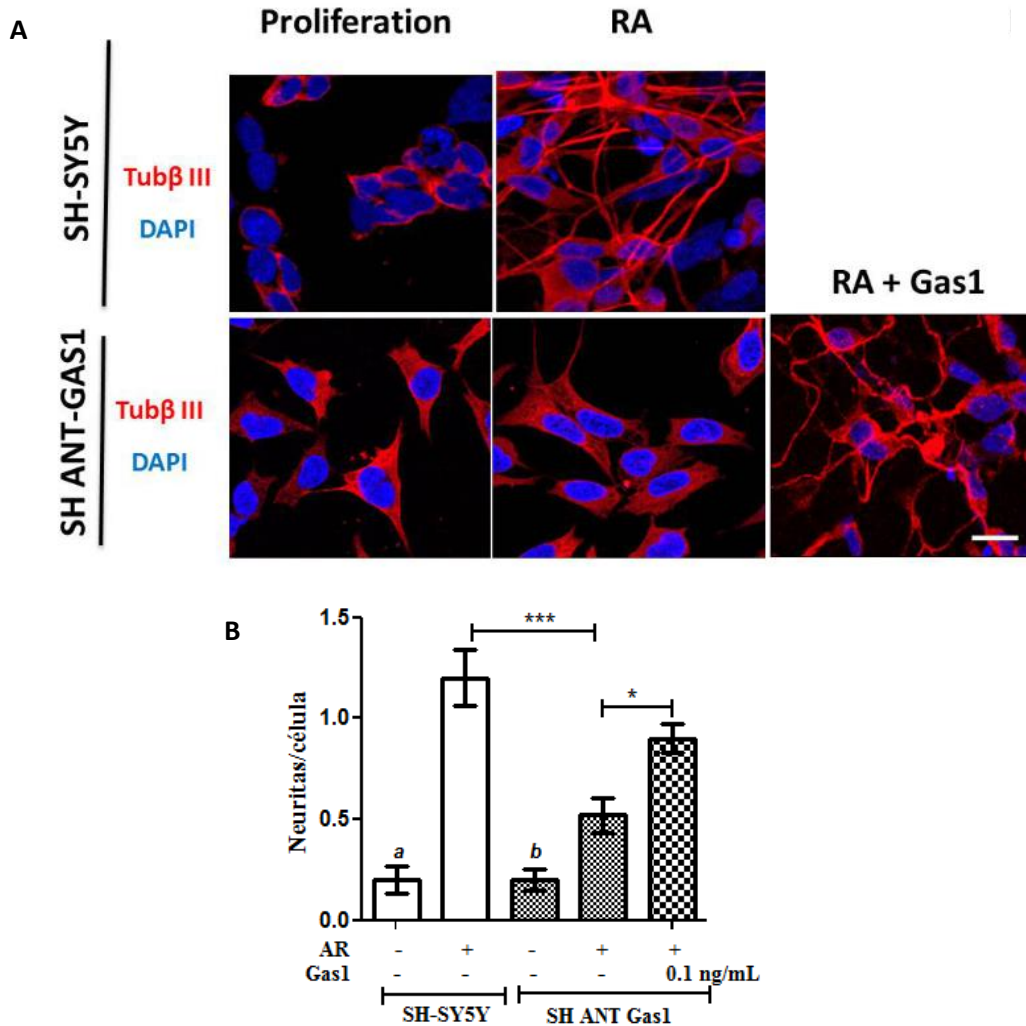


Figura 28. Gas1 promueve el crecimiento neurítico. (A) Tinción de neuritas con tubulina β -III en células SH-SY5Y y en células SH-ANT Gas1 las cuales expresan una secuencia antisentido para Gas1 (B) La gráfica muestra el número de neuritas por célula observadas en A. Los datos se muestran como la media \pm SEM, n=3 por grupo; *P \leq 0.05 y *** P \leq 0.001.

6.10 Gas1 soluble induce la formación de neuritas a través de la inhibición de GSK3 β

Por otro parte, se ha reportado ampliamente que la fosforilación en la serina 9 (pSer9-GSK3 β) de GSK3 β inhibe su actividad y que la fosforilación en la tirosina 216 (pTyr216-GSK3 β) induce su activación [21]. Con relación a la diferenciación neuronal, diversos reportes muestran que el AR promueve la formación de neuritas a través de la pSer9-GSK3 β sin afectar la pTyr216-GSK3 β en células SH-SY5Y [29, 106, 107, 109]. Con base en lo anterior se evaluó el efecto de Gas1 sobre la pSer9-GSK3 β y GSK3 β total. Se trataron

células SH-SY5Y durante 3d con AR, para después agregar al medio 0.05, 0.1 y 0.15 ng/mL de Gas1 por 24 h (Fig. 29 A). En las figuras 29A y B, se observa que Gas1 aumentó la fosforilación de GSK3 β en la serina 9 indicando que por esta vía Gas1 promueve la formación de neuritas. Asimismo, usando la técnica de MTT se mostró que las concentraciones de Gas1 recombinante usadas no tuvieron efecto sobre la viabilidad de las células SH-SY5Y diferenciadas con 10 μ M de AR por 7d (Fig. 29 C).

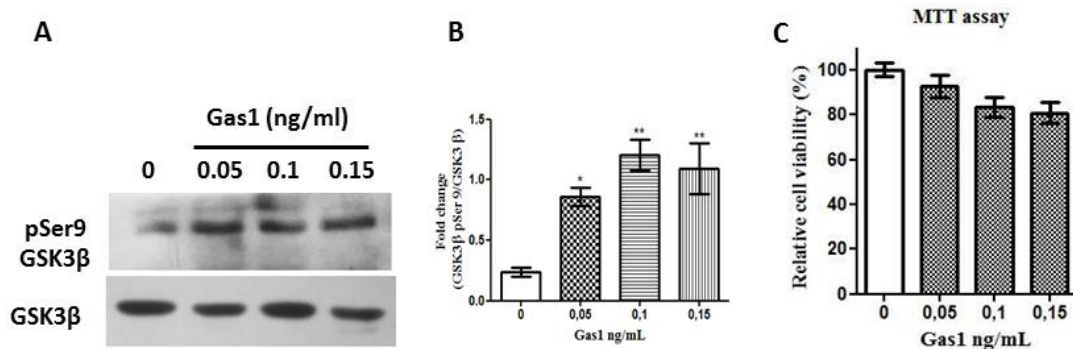


Figura 29. Gas1 recombinante inhibe a GSK3 β en células SH-SY5Y. Las células fueron tratadas con 10 μ M de AR durante tres d, posteriormente fueron incubadas con diferentes concentraciones de Gas1. (A) Se muestra un *western blot* representativo de la determinación de la expresión de pSer9-GSK3 β y GSK3 β total (B) Análisis densitométrico de pSer9-GSK3 β después de la normalización con GSK3 β total. (C) Las gráfica muestra que las concentraciones de Gas1 usadas en este experimento no tuvieron efecto sobre la viabilidad de las células SH-SY5Y diferenciadas con AR. Los datos se muestran como la media \pm SEM, n=3 por grupo; *P \leq 0.05 y ** P \leq 0.01.

6.11 Gas1 aumenta los niveles de TH en células SH-SY5Y diferenciadas con AR y se expresa en células dopaminérgicas de la SNpc

Diversos reportes muestran que la inhibición de GSK3 β promueve la diferenciación neuronal dopaminérgica, incluso inhibidores de GSK3 β son incorporados rutinariamente para inducir la diferenciación dopaminérgica de células madre embrionarias (ESCs) y de células pluripotentes inducidas (iPSCs) [19, 88]. Asimismo, se ha reportado que el AR induce la diferenciación dopaminérgica de las células SH-SY5Y, desarrollando un fenotipo neuronal predominantemente dopaminérgico y suprimiendo el perfil de expresión proteico de otros fenotipos neuronales [77]. Por consiguiente, se midieron los niveles de TH, en células SH-SY5Y tratadas con diferentes concentraciones de Gas1 y 10 μ M de AR (Fig. 30).

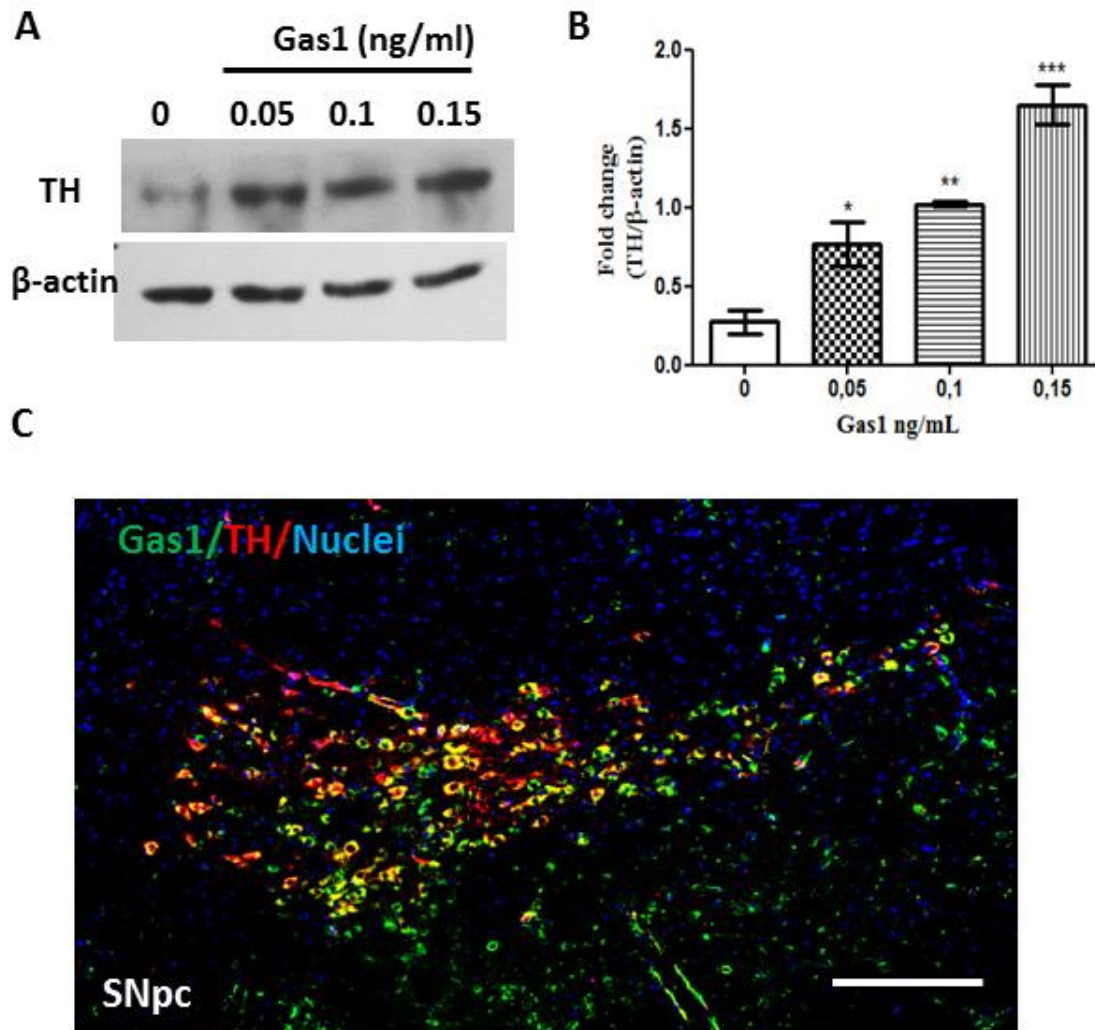


Figura 30. Gas1 aumenta los niveles de TH en células SH-SY5Y y se expresa en neuronas dopaminérgicas de la SNpc. Las células SH-SY5Y fueron tratadas con $10\mu\text{M}$ de AR durante tres d y posteriormente fueron incubadas con diferentes concentraciones de Gas1. (A) Se muestra un *western blot* representativo de la determinación de la expresión de TH y β -actina (B) La gráfica muestra el análisis densitométrico de los niveles de TH después de la normalización con β -actina. (C) Inmuhistofluorecencia para Gas1 (verde) y TH (roja) en neuronas dopaminérgicas de la SNpc de ratones CD-1 de 8 semanas de edad Núcleos teñidos con DAPI. Barra: $100\mu\text{m}$. Los datos se muestran como la media \pm SEM, $n=3$ por grupo; * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$ y *** $P \leq 0.001$.

Los datos muestran que Gas1 incrementó los niveles de TH de forma concentración dependiente (Fig. 30 B). Dado los resultados anteriores, por inmunofluorecencia detectamos la expresión de Gas1 en neuronas dopaminérgicas (TH^+) de la SNpc de ratones CD1 de 8 semanas de edad. La microfotografía de la figura 30C muestra células

inmunorreactivas a TH y Gas1; sin embargo, también se observan células únicamente inmunorreactivas a TH o a Gas1 (Fig. 30 C).

6.12 El promotor de *gas1* en humano, ratón y rata presenta sitios RARE y TCF/LEF

Hasta el momento los resultados muestran que los niveles de Gas1 incrementan en células SH-SY5Y diferenciadas con AR, en las cuales promueve la formación de neuritas e incrementa los niveles de TH, sin embargo se desconoce cual es la relación entre Gas1 y el AR. Desde el punto de vista de regulación de la transcripción, se ha reportado que el AR induce la expresión de *gas1* en células de la cresta neural [150], células de carcinoma embrionario F9 [139] y en células de neuroblastoma SH-SY5Y [26]. Por otro lado, se sabe que los efectos genómicos del AR son mediados por sus receptores RXR y RAR que se unen a secuencias RARE las cuales son secuencias consenso 5'-[A/T]G[G/T]TCA-3' presentes en los promotores proximales o distales de diversos genes.

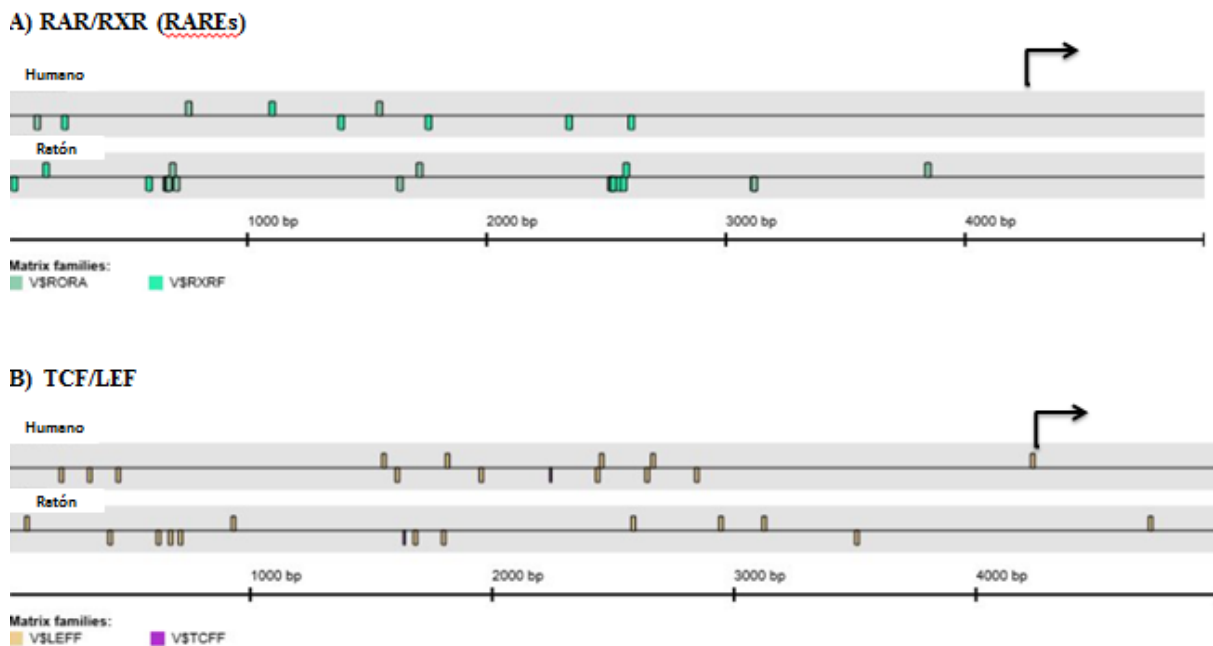


Figura 31. Predicción de sitios RARE y TCF/LEF en el promotor de *gas1* humano y de ratón. Los cuadros pequeños indican los posibles sitios (A) RAREs o (B) TCF/LEF localizados en la cadena sentido (cuadros pequeños superiores) o antisentido (cuadros inferiores) de *gas1* de humano o de ratón. La fecha negra indica el inicio de la secuencia de la región codificante.

Aunado a lo anterior, en este trabajo se muestra que los niveles de Gas1 se incrementa durante diferenciación de las células SH-SY5Y inducida por el AR. Por lo tanto, este dato apoya la idea de que *gas1* es un probable gen de respuesta a los efectos del AR, sin embargo no se ha comprobado si el promotor de Gas1 contiene secuencias RARE. Debido a lo anterior se obtuvieron las secuencias genómicas de los promotores de *gas1* humano como en el de ratón de la base de datos GenBank.

Utilizando el programa *MatInspectorprofesional* de Genomatix (<https://www.qiagenbioinformatics.com/>) se identificó la presencia de secuencias RAREs tanto en el promotor de *gas1* de humano como de ratón. El análisis abarcó 4250 pb río arriba del ATG y 750 pbs río abajo. Dado los resultados anteriores es probable que *gas1* sea regulado transcripcionalmente por el AR, sin embargo, se sugiere un estudio más detallado. Desde otro punto de vista, quizás el AR al inducir la expresión de proteínas WNT genere a su vez la expresión de *gas1*, ya que se ha reportado que WNT induce la expresión de *gas1* en las somitas [83]. Por lo tanto, ésta regulación podría producirse de la siguiente manera: una vez que el AR induzca la expresión de WNT1 este a su vez producirá la translocación al núcleo de β -catenina la cual podría unirse a sitios responsivos TCF/LEF y así regular transcripcionalmente a *gas1*. Suponiendo lo anterior se realizó la búsqueda de sitios TCF/LEF en los promotores de *gas1* humano y de ratón. La figura 31 B muestra que ambos promotores de *gas1* presentan 13 sitios TCF/LEF río arriba de la región codificante.

6.13 Búsqueda de los motivos funcionales de Gas1

Con la finalidad de demostrar una relación entre Gas1 y sus diferentes efectos sobre la diferenciación neuronal se realizó la búsqueda de motivos funcionales en la proteína Gas1de humano y de ratón. Para ello se utilizaron los servidores InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence-search>), EML (<http://elm.eu.org/>) y Minimotif Miner (<http://mnm.engr.uconn.edu/MNM/SMSSearchServlet>). En la figura 32 y tabla 2 se muestran los motivos encontrados, la secuencia detectada, función y localización celular.

DOMINIOS	SECUENCIA	COMPARTIMIENTO CELULAR
Sitio de incisión de las caspasas 3 y 7	SGSDG	Citoplasma Núcleo
N-Arg di-básica convertasa (NRD / Nardilysin)	RRL RRS	Extracelular, Aparato de Golgi Superficie celular
Sitio de reconocimiento por la ciclina D	RRLI	Citoplasma, Núcleo
Variante de motivo de unión a dominio de MATH de USP7 basada en las interacciones MDM2 y p53	PLASI PRTSG PGSSG AAASG	Núcleo
Motivo que media la interacción entre Notch y el factor de transcripción CLS	AWTP	Forma complejos con factores de transcripción: cromatina y núcleo
Motivo de unión a receptores nucleares	ILLLLL	Núcleo
Motivo RGD para interacción con proteínas de matriz extracelular como integrinas	RGD	Extracelular
Motivos reconocido por proteínas con dominios SH3 de clase I y II	PYGPGR DDGVPH DGVPHPP VPHPPRP GDLPYGP	Citoplasma Membrana plasmática Adhesión focal
Motivo de unión no covalente a SUMO	SILLLL	Núcleo
Sitio de fosforilación por CK1	SSGSDGG	Aparato de Golgi, Orgánulos secretores Extracelular
Sitio de reconocimiento de fosforilación en GSK3 β	PRTSGGG GRRSSGG	Citoplasma, Núcleo
Sitio de fosforilación por PKA	RRSSGGG	Citoplasma, Núcleo Complejo proteico dependiente de AMPc
Sitio de cinasa tales como p38MAPK	GAWTPLA	Citoplasma
Motivo de retención en el retículo endoplásmico (RE)	RRL	Membrana del retículo endoplásmico Membranas de las vesículas en el transporte vesicular Golgi- RE

Tabla 2. Dominios detectados en Gas1 de humano y de ratón

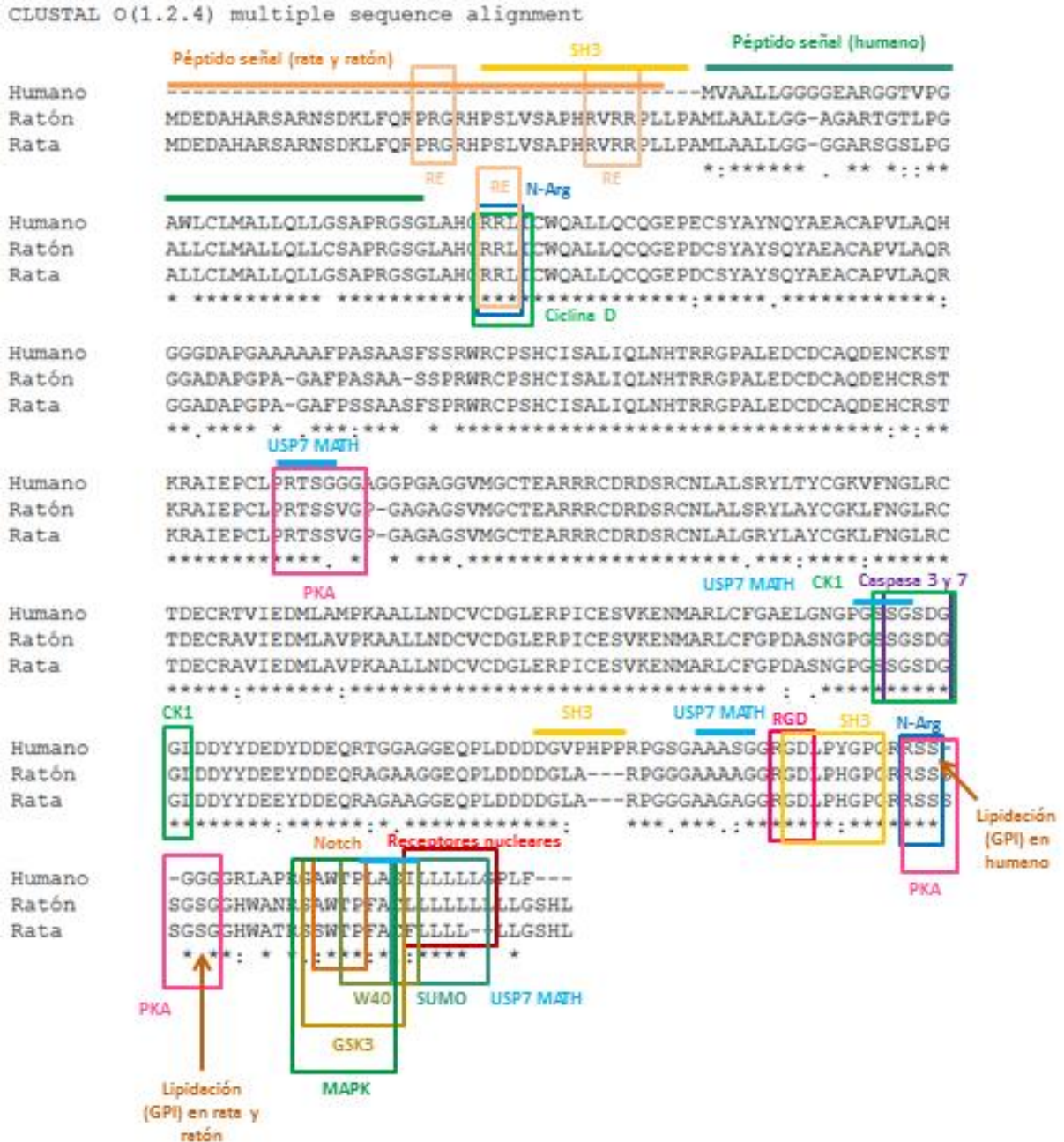


Figura 32. Alineamiento múltiple de las secuencias proteicas de Gas1 de humano y de ratón usando Clustal O y los motivos encontrados con los servidores InterPro, EML y Minomotif Miner. Los motivos, secuencias detectadas y localización celular se muestran en la tabla 2. Adicionalmente se muestran algunas modificaciones postraduccionales como el péptido señal y la modificación lipídica (obtenidas de la base de datos: uniProt) tanto en la secuencia de humano como en la de ratón.

6.14 Determinación de la concentración efectiva 50 de 6-OHDA.

Considerando que Gas1 aumentó los niveles de TH y se expresa en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc, el siguiente objetivo fue evaluar el posible efecto neuroprotector de Gas1 ante el daño inducido por la 6-OHDA, un neurotóxico utilizado como modelo experimental de la enfermedad de Parkinson. Para ello primero determinamos la concentración de 6-OHDA a utilizar en los experimentos. Se trataron células SH-SY5Y en proliferación, SH-SY5Y diferenciadas durante 4 y 7 d con AR y células SH ANT Gas1 (las cuales no expresan Gas1 bajo ninguna condición) con diferentes concentraciones de 6-OHDA durante 24 h. Posteriormente se cuantificó el porcentaje de células viables por la técnica de azul de tripano

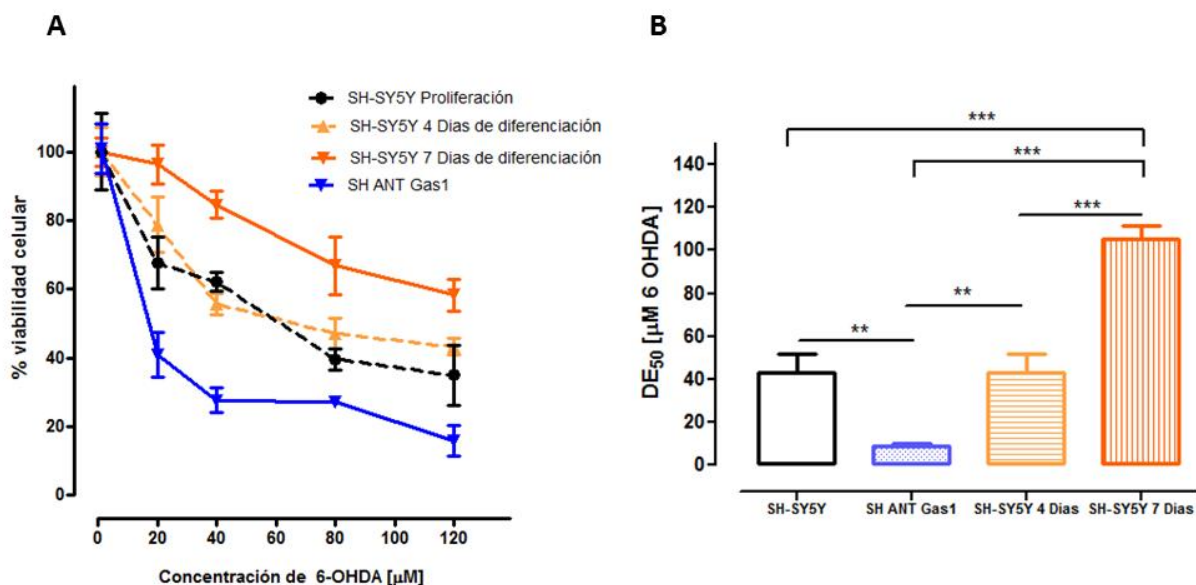


Figura 33. Efecto de diferentes concentraciones de 6-OHDA sobre la viabilidad de las células SH-SY5Y en proliferación, SH-SY5Y diferenciadas durante 4 y 7 d con AR y células SH ANT Gas1 tratadas por 7 d con AR. Las líneas celulares fueron tratadas con diferentes concentraciones de 6-OHDA durante 24 h, posteriormente se cuantificó el porcentaje de células viables por la técnica de azul de tripano. (A) Curvas dosis respuesta (B) Dosis efectiva 50. Los datos se muestran como la media \pm SEM, n=3 por grupo; *P \leq 0.05, **P \leq 0.01 y *** P \leq 0.001.

La figura 33A muestra las curvas dosis respuesta de la viabilidad celular con respecto a la concentración de 6-OHDA. De estos datos se calculó la dosis efectiva 50 de cada línea celular, es decir, la concentración de 6-OHDA que induce la pérdida del 50% de células viables (Fig. 33B). Los resultados muestran que las células SH-SY5Y no diferenciadas son más susceptibles al daño producido por la 6-OHDA con respecto a las células SH-SY5Y diferenciadas durante 4 y 7d con 10 μ M de AR (Fig. 33). Cabe señalar que las células SH-SY5Y diferenciadas expresan Gas1 mientras que las células SH-SY5Y en proliferación no lo expresan. Debido a ello incubamos células SH ANT Gas1, las cuales no expresan Gas1 con diferentes concentraciones de 6-OHDA. Interesantemente, los resultados muestran que la ausencia de Gas1 genera una mayor susceptibilidad a la 6-OHDA con respecto a todos los grupos (Fig. 33), indicando que la presencia de Gas1 genera un efecto neuroprotector. Con base en los resultados anteriores se decidió utilizar 80 μ M de 6-OHDA para los subsecuentes experimentos en células diferenciadas con AR.

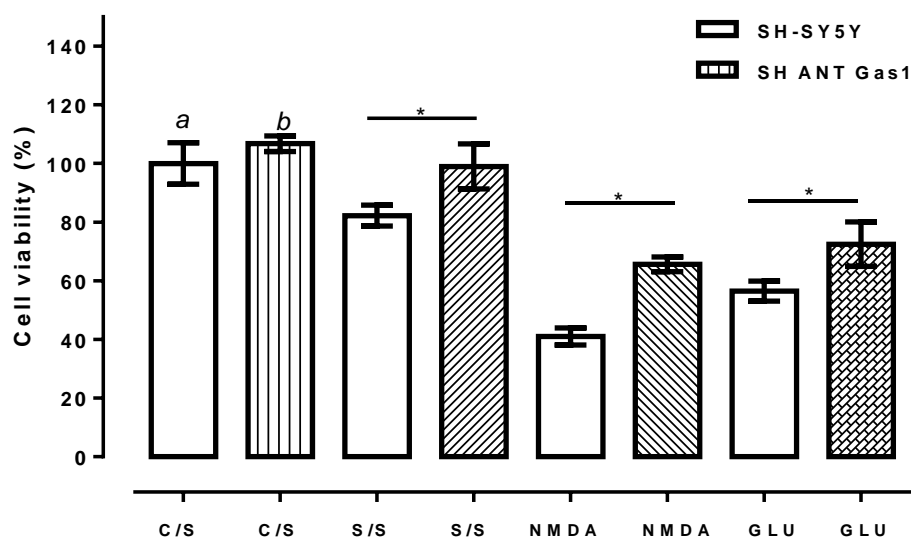


Figura 33. Viabilidad de las células SH-SY5Y y SH ANT Gas1 en proliferación (C/S), cultivadas en ausencia de suero (S/S), tratadas con 5mM de NMDA o 10mM de glutamato por 24h. El porcentaje de células viables se obtuvo por la técnica de azul de tripano. Células SH-SY5Y cultivadas en presencia (C/S) y ausencia (S/S) de suero por 24h. Los datos se muestran como la media \pm SEM, n=3 por grupo; * $P \leq 0.05$; a *** $P \leq 0.001$ indica la diferencia con respecto a los grupos SH-SY5Y S/S, SH-SY5Y y SH ANT Gas1 tratados con NMDA o GLU. b *** $P \leq 0.01$ indica la diferencia con respecto a los grupos SH-SY5Y S/S, SH-SY5Y y SH ANT Gas1 tratados con NMDA o GLU.

En paralelo, para corroborar el efecto neuroprotector de Gas1 se trataron células SH-SY5Y y SH ANT Gas1 con 5mM de NMDA, 10mM de glutamato (GLU) o se cultivaron con 0.5% de suero por 24h con la finalidad de inducir un efecto excitotóxico. Esto basado en estudios previos que muestran un efecto pro-apoptótico de Gas1 en células SH-SY5Y privadas suero [155] y en cultivos corticohipocampales tratados como NMDA [104]. En la figura 34 se observa que el porcentaje de células viables de los diferentes grupos experimentales, el cual fue obtenido por la técnica de azul de tripano. Los resultados muestran que en ausencia de suero, el tratamiento con 5mM de NMDA o 10mM de glutamato por 24 h disminuye la viabilidad de las células SH-SY5Y (Fig. 33). Interesantemente, la ausencia de Gas1 en las células SH ANT Gas1 protegió de la muerte celular inducida por la ausencia de suero o de los efectos excitotóxicos (Fig. 33). Estos datos concuerdan con lo reportado previamente [104, 155].

6.15 Desarrollo y caracterización de las células SH GAS1

Una vez validados los resultados el siguiente objetivo fue determinar la cascada de señalización que induce Gas1 ante el daño producido por la 6-OHDA. El número de células SH ANT Gas1 que se obtienen después del tratamiento con 6-OHDA es bajo, por lo tanto se optó por el desarrollo de una línea celular estable SH GAS1 la cual expresa Gas1 de forma regulable a través de un sistema de expresión TET-ON.

En el sistema TET-ON la expresión de Gas1 está regulada por un promotor que responde a la tetraciclina. Las células SH-SY5Y fueron co-infectadas con lentivirus que contenían la secuencia de expresión para un elemento represor (TetR), lentivirus con la secuencia de Gas1 bajo el control transcripcional de CMV y lentivirus con expresión regulable de la GFP (proteína verde fluorescente). En este sistema el TetR se une a una secuencia del DNA conocida como elemento de respuesta a la tetraciclina, presente en el promotor, de esta manera se impide la transcripción del transgen. La adición de tetraciclina produce un cambio conformacional en el TetR produciendo su liberación del promotor y permitiendo la expresión de Gas1 (Fig 34 A). La línea estable SH GAS1 fue seleccionada con blasticidina y zeocina, para posteriormente ser caracterizada. Para comprobar que efectivamente el sistema TET-ON estaba actuando, las células SH GAS1 se trataron con 0, 0.25, 0.05, 1, y 2 µg/mL de tetraciclina por 24 h y posteriormente se determinó la expresión

de Gas1 por *western blot* (Fig. 34 B). Como mencionamos estas células también expresan de forma regulable a la GFP (Fig. 34 C). Como se muestra en la figura 34 B-C la expresión de Gas1 es inducida por la adición de tetraciclina de forma concentración dependiente. Dicho efecto fue corroborado por inmunofluorescencia para Gas1, la figura 34C muestra en rojo a Gas1 y en verde a GFP únicamente en presencia de tetraciclina.

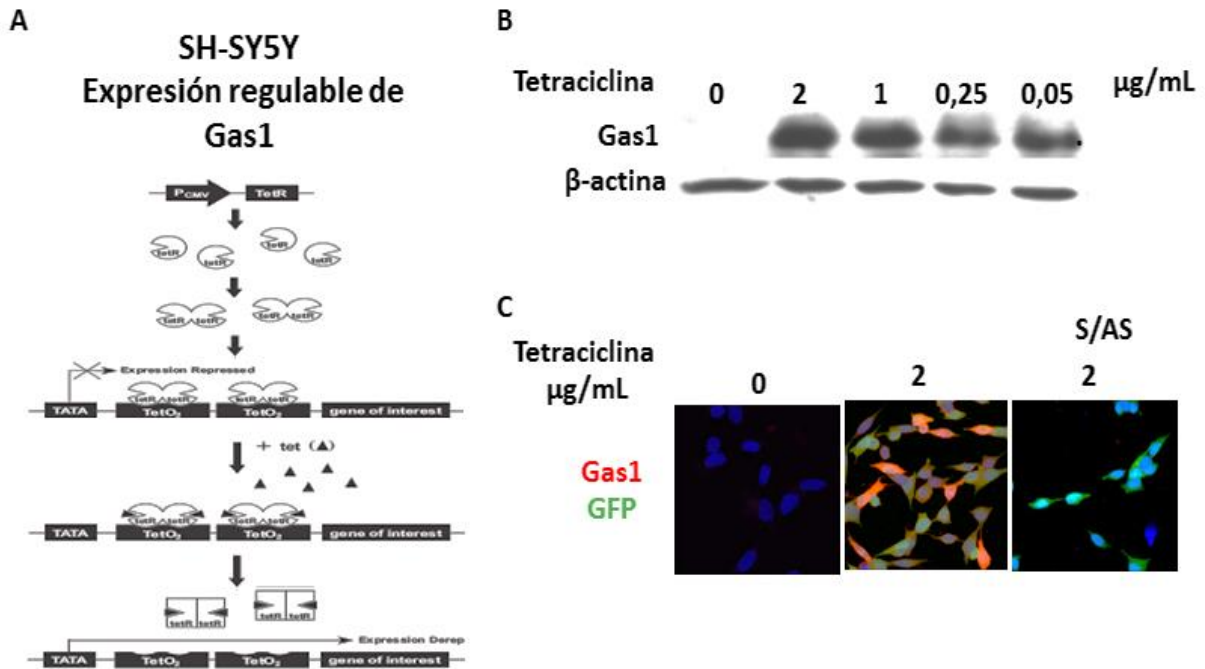


Figura 34. Caracterización del sistema de expresión regulable de Gas1. (A) Sistema TET-ON: El elemento represor (TetR) se encuentra constitutivamente unido a la región promotora regulada por tetraciclina (TetO), de esta forma se impide la transcripción de Gas1, la adición de tetraciclina genera un cambio conformacional en el elemento represor liberando su unión al DNA y por ende permitiendo la transcripción de Gas1. (B) Se muestra un *western blot* representativo de la determinación de la expresión de Gas1 y β-actina usando diferentes concentraciones de tetraciclina en células SH-SY5Y. (C) Inmunofluorescencia para Gas1 (rojo), adicionalmente en verde se muestra la expresión de GFP, los experimentos fueron realizados en presencia y ausencia de 2 µg/mL de tetraciclina. El control es en ausencia de anticuerpo primario pero en presencia de tetraciclina (S/AS). Los núcleos fueron teñidos con DAPI. A. Modificado de: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/trexsystem_man.pdf

6.16 Gas1 promueve la supervivencia celular en la línea SH-SY5Y tratadas con 6-OHDA y diferenciada con AR

Para determinar el efecto de Gas1 sobre la neurotoxicidad inducida por la 6-OHDA, las células SH-SY5Y, SH ANT GAS1 y SH-GAS1 se incubaron con 10 μ M de AR por 7 d. Posteriormente se trataron en presencia o en ausencia de 80 μ M de 6-OHDA por 24 h (Fig. 35A). Por otro lado, 24h antes del tratamiento con la 6-OHDA se indujo la expresión de Gas1 en las células SH-GAS1 con 2 μ g/mL de tetraciclina (Fig. 35A). Terminado el tratamiento con 6-OHDA se midió la viabilidad celular por la técnica de azul de tripano. Los datos muestran que la 6-OHDA disminuyó el porcentaje de células viables aproximadamente en un 50 % con respecto al control (Fig. 35 B). La sobreexpresión de Gas1 en las células SH-GAS1 atenuó la pérdida de la viabilidad inducida por la 6-OHDA y contrariamente la ausencia de Gas1 en las células SH-ANT GAS1 indujo una drástica pérdida de la viabilidad celular con respecto a los grupos control y al tratado con 6-OHDA (Fig. 35 B).

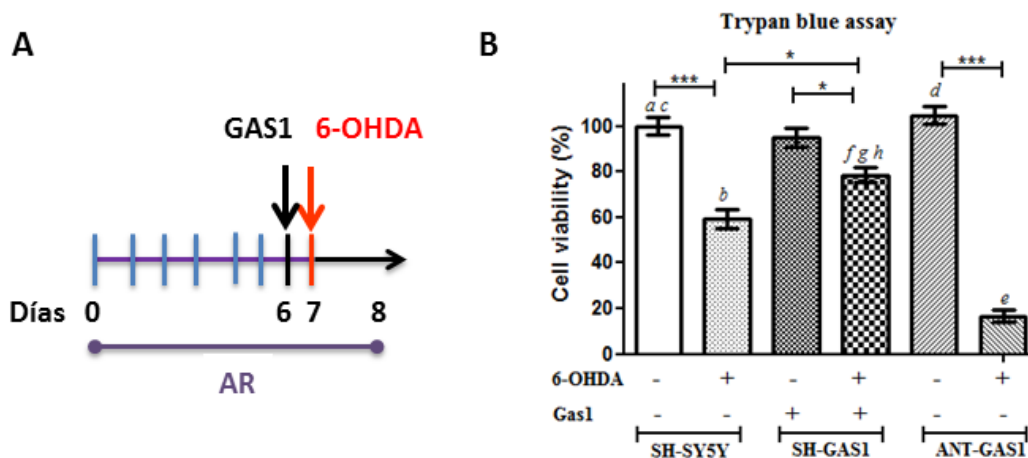


Figura 35. Efecto de Gas1 sobre la viabilidad de células SH-SY5Y, SH GAS1 y SH ANT GAS1 diferenciadas con AR y tratadas con 6-OHDA. (A) Las células SH-SY5Y fueron tratadas con AR por 8 d para inducir su estado diferenciado. Al séptimo día las células se trataron con 80 μ M de 6-OHDA. Por otro lado, 24h antes del tratamiento con la 6-OHDA se indujo la expresión de Gas1 en las células SH-GAS1 con 2 μ g/mL de tetraciclina (B) Viabilidad celular en las líneas celulares SH-SY5Y, SH-GAS1 y ANT-GAS1 tratadas con 6-OHDA. Los datos se muestran como la media \pm SEM, n=3 por grupo; * $P \leq 0.05$ y *** $P \leq 0.001$. . a: **SH control vs SHGAS1(6-OHDA+Gas1); b: ***SH-SY5Y(6-OHDA) vs SHGAS1; c: ***SH control vs ANTGAS1; d and e***: SH6OHDA vs SHANT and SHANT 6OHDA; f:***SHGAS1 vs ANT6OHDA; g and h: ***SHGAS16OHDA vs ANT and ANT 6OHDA.

6.17 Gas1 promueve la supervivencia celular a través de la inhibición de GSK3β e incremento de β-catenina total

Diversos estudios muestran que la inhibición de GSK3β, y por ende la estabilización de β-catenina en el núcleo y en el citoplasma, protegen del daño inducido por la 6-OHDA [28, 76, 115]. Por tanto, el siguiente objetivo fue determinar los niveles de pSer9-GSK3β y de la β-catenina en las células SH-SY5Y y SH-GAS1 después del tratamiento con 6-OHDA. Los resultados muestran que la 6-OHDA disminuyó los niveles de pSer9-GSK3β (Fig. 36), mientras que la sobreexpresión de Gas1 en presencia de 6-OHDA mantuvo los niveles de pSer9-GSK3β con respecto a todos los grupos experimentales incluido el grupo tratado con 6-OHDA (Fig. 36A-B).

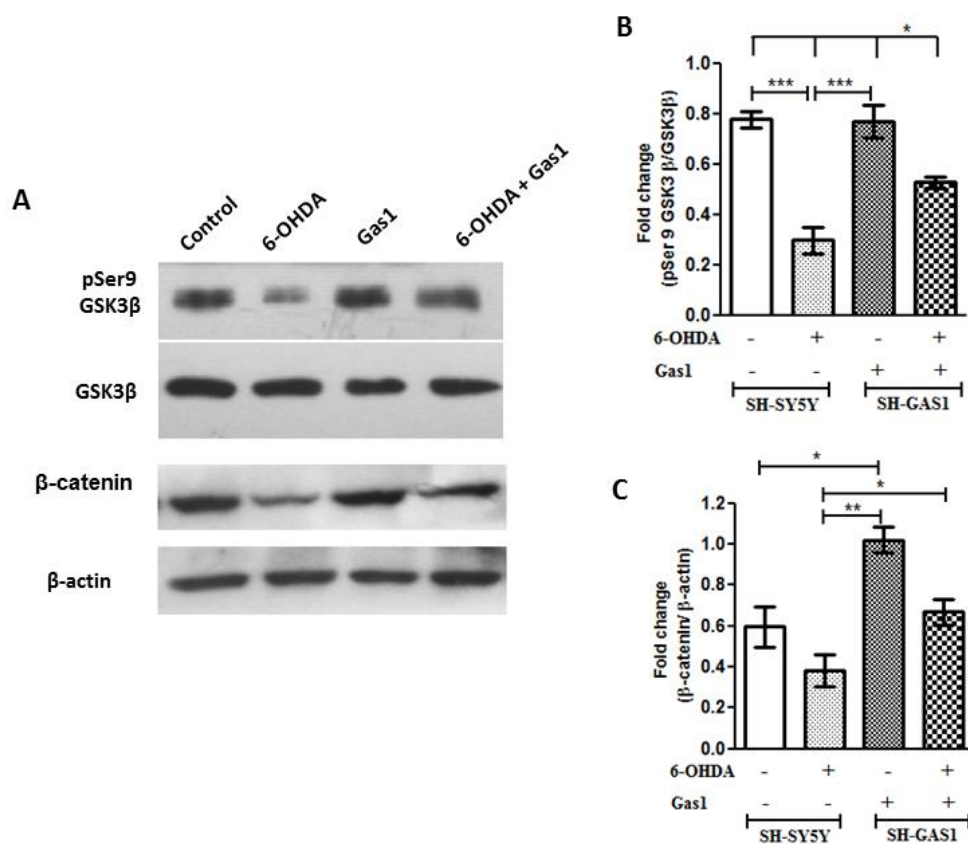


Figura 36. Efecto de Gas1 sobre los niveles de GSK3β y β-catenina en las células SH-SY5Y y SH GAS1 diferenciadas con AR control y tratadas con 80μM de 6-OHDA. (A) Se muestra un *western blot* representativo de la determinación de la expresión de pSer9-GSK3β, GSK3β total, β-catenina y β-actina. (B) La gráfica muestra el análisis densitométrico de pSer9-GSK3β después de la normalización con GSK3β total y de (C) β-catenina después de la normalización con β-actina. Los datos se muestran como la media ± SEM, n=3 por grupo; *P ≤ 0.05, **P ≤ 0.01 y ***P ≤ 0.001.

Por otro parte, la 6-OHDA no disminuyó de forma significativa los niveles de β -catenina total (Fig. 36), sin embargo, la sobreexpresión de Gas1 en las células SH GAS1 aumento los niveles de β -catenina por arriba del control. Asimismo los niveles de β -catenina se incrementaron por la sobreexpresión de Gas1 en las células SH GAS1 tratadas con 6-OHDA (Fig. 36 A y C).

6.18 Gas1 incrementa los niveles de tirosina hidroxilasa

El siguiente objetivo fue analizar los niveles de TH en las células SH-SY5Y y SH GAS1 ambas tratadas en presencia o ausencia de 80 μ M de 6-OHDA. Los resultados muestran que la 6-OHDA disminuyó aproximadamente en un 50% los niveles de TH en las células SH-SY5Y con respecto a las células SH-SY5Y control (Fig. 37). Por otro lado, la sobreexpresión de Gas1 en las células SH GAS1 incrementó los niveles de TH de forma significativa con respecto al control (Fig. 37), de esta manera la sobreexpresión de Gas1 atenuó la pérdida de los niveles de TH que induce la 6-OHDA (Fig. 37).

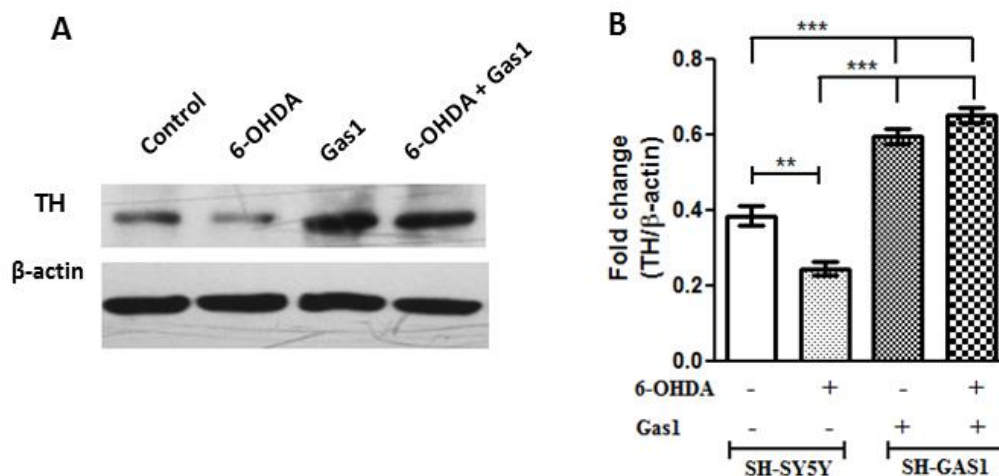


Figura 37. Efecto de Gas1 sobre los niveles de TH en las células SH-SY5Y y SH GAS1 ambas diferenciadas con AR control y tratadas con 80 μ M de 6-OHDA. (A) Se muestra un *western blot* representativo de la determinación de la expresión de TH y β -actina. (B) La gráfica muestra el análisis densitométrico de TH después de la normalización con β -actina. Los datos representan la media \pm SEM, n=3 por grupo; **P \leq 0.01 y ***P \leq 0.001.

6.19 Gas1 incrementa los niveles de superóxido dismutasa 1 (SOD1) en células SH-SY5Y diferenciadas y tratadas con 6-OHDA

Diversos estudios demuestran que la 6-OHDA al inhibir los complejos I y II mitocondriales incrementa los niveles de anión superóxido el cual es rápidamente degradado por la enzima superóxido dismutasa (SOD) para producir H_2O_2 y O_2 (Fig. 38 A) [37, 69]. Los resultados muestran que la 6-OHDA disminuyó los niveles de SOD1, mientras que la sobreexpresión de Gas1 no generó cambios significativos. Sin embargo, la sobreexpresión de Gas1 en presencia de 6-OHDA atenuó la disminución de los niveles de SOD1 (Fig. 38B-C).

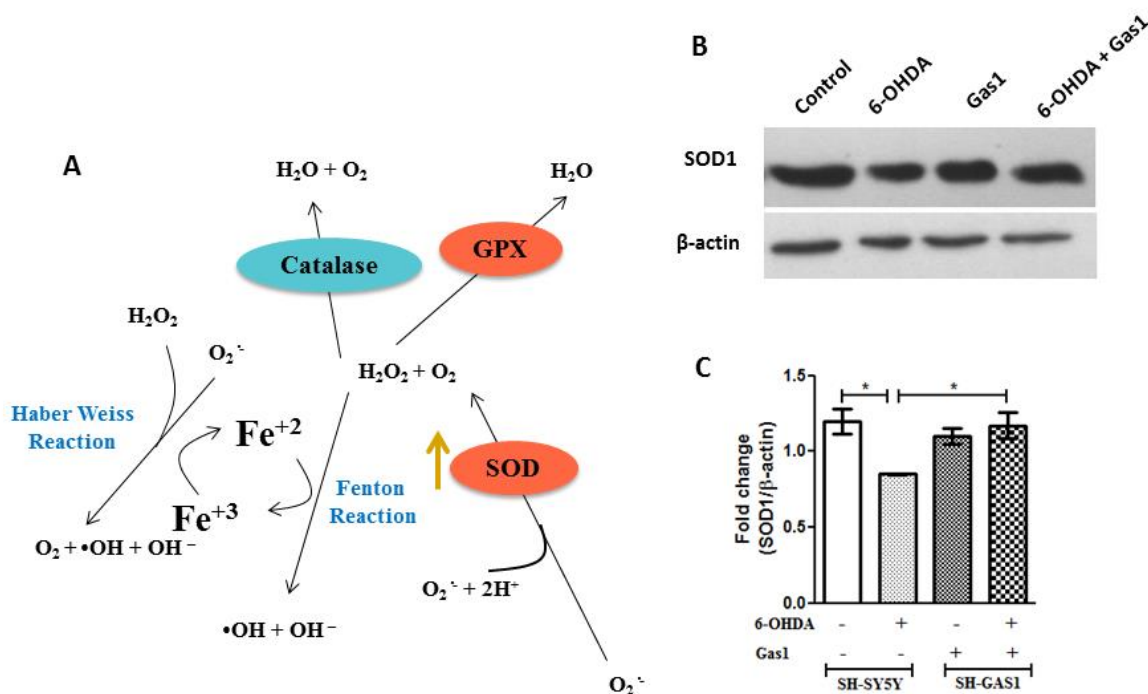


Figura 38. Efecto de la sobreexpresión de Gas1 sobre los niveles de SOD1 en células SH-SY5Y y SH GAS1 control y tratadas con 80 μ M de 6-OHDA. (A) Mecanismo de acción de enzimas antioxidantes que conllevan a la disminución de las especies reactivas de oxígeno (ROS). Al inhibir los complejos I y II mitocondriales la 6-OHDA incrementa los niveles de anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) el cual es rápidamente degradado por la enzima superóxido dismutasa (SOD) para producir peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno molecular (O_2). A partir de estos productos, el hierro potencia la producción de ROS al promover la formación de hidroxilo (OH) y radicales hidroxilo (OH^-) a través de la reacción de Fenton. Por otra parte, el hierro también cataliza la reacción de Haber-Weiss, que utiliza Fe^{3+} de la reacción de Fenton y produce O_2 , radical hidroxilo e hidroxilo. El H_2O_2 puede convertirse en H_2O a través de la acción de la catalasa y la glutatión peroxidasa (GPX). (B) Se muestra un *western blot* representativo de la determinación de la expresión de SOD1 y β -actina. (C) Análisis densitométrico de SOD1 después de la normalización con β -actina. Los datos se muestran como la media \pm SEM, n=3 por grupo; *P \leq 0.05.

6.20 Efecto de Gas1 sobre la producción de óxido nítrico

La 6-OHDA además de inducir la producción ROS también genera especies reactivas de nitrógeno (RNS), así que se cuantificaron los niveles de NO a través del reactivo de Griess. El NO es una RNS producida por las sintasas del NO (inducible y neuronal: iNOS e nNOS, respectivamente) a partir de L-arginina y O₂ (Fig. 39A). A su vez el NO genera una segunda especie conocida como peroxinitrito, el cual es un agente oxidante y nitrante de proteínas y DNA (Fig. 39 A). Los datos muestran que los niveles de NO se incrementaron en aproximadamente un 200% en las células tratadas con 6-OHDA comparadas con el control (Fig. 27). Por otra parte la sobreexpresión de Gas1 en las células SH GAS1 incrementó los niveles de NO en aproximadamente un 50% con respecto al control, pero dichos niveles son inferiores a los producidos por la 6-OHDA (Fig. 39 B).

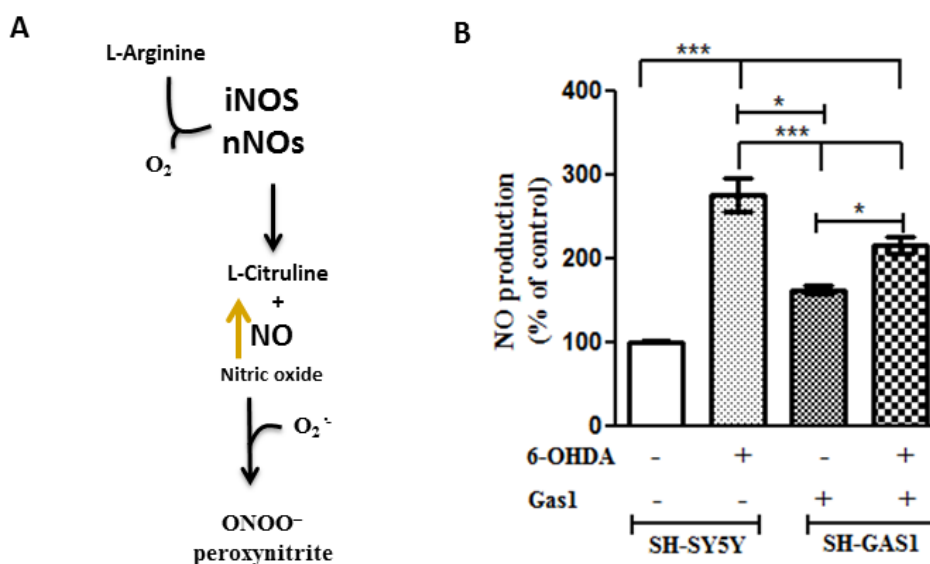


Figura 39. Efecto de Gas1 sobre la generación de óxido nítrico en células SH-SY5Y y SH GAS1 control y tratadas con 80μM de 6-OHDA. (A) El NO es producido por las sintasas de NO (NOS) inducible o neuronal. A su vez el NO puede reaccionar con el radical superóxido (O₂⁻) y producir peroxinitrito (ONOO⁻) el cual es un potente agente citotóxico. (B) Niveles de NO de las células SH-SY5Y fueron tomadas como 100% y con base en esto se realizó la normalización. Los datos se muestran como la media ± SEM, n=3 por grupo; *P ≤ 0.05 y ***P ≤ 0.001.

VII. DISCUSIÓN

Previamente, nuestro grupo reportó el patrón de expresión de Gas1 en el cerebro de ratón adulto [155]. En este trabajo se amplió esta observación y se corroboró los niveles de expresión de Gas1 en diferentes regiones del cerebro adulto. Inicialmente uno de los objetivos fue proveer una descripción detallada de la localización de Gas1 en regiones que presentan altos niveles de Gas1 y cuya organización permite detectar diferencialmente a Gas1 en el cuerpo neuronal o en el neuropilo.

Los datos muestran que Gas1 se expresa en neuronas glutamatérgicas, GABAérgicas y dopaminérgicas de cada una de las regiones estudiadas: Hip, Tal, Cb y SN. Particularmente en el Hip, Gas1 se encontró principalmente en las neuronas glutamatérgicas presentes en las capas de células granulares y piramidales, lo cual sugiere un papel relevante de Gas1 en el hipocampo. En este contexto, un reporte previo mostró un efecto pro-apoptótico de Gas1 en cultivo de neuronas corticohipocampales ante insultos excitotóxicos [104]. Estos datos son consistentes con este trabajo, ya que el silenciamiento de Gas1 protegió de la muerte de las células SH-SY5Y expuestas a 5 mM de NMDA o 10 mM de glutamato. Aunado a esto, nuestro grupo previamente reportó que Gas1 inhibe la vía de señalización activada por GDNF de manera dependiente de Ret e induce apoptosis en células SH-SY5Y cultivadas en ausencia de suero [155], los datos que fueron recientemente confirmados por Wang et al., [148]. A pesar de lo anterior, los resultados muestran la expresión de Gas1 en condiciones fisiológicas normales sugiriendo otras funciones. Es probable que Gas1 ejerza diferentes efectos dependiendo de su concentración, ya que en las mismas células SH-SY5Y se ha reportado que Gas1 controla la maduración y reduce los niveles de la proteína precursora β -amiloide (APP) [26, 27], indicando un papel relevante en la enfermedad de Alzheimer, la cual se caracteriza por la acumulación de β -amiloide. Además, se ha mostrado que Gas1 induce la diferenciación de mioblastos [86], participa en el desarrollo gastrointestinal [13] e incluso en el proceso de ovulación [116]. Por lo tanto, el mecanismo de acción de Gas1 depende del contexto celular y molecular en el que se encuentre y de su patrón de expresión espacio-temporal.

Por otro lado, de todas las áreas cerebrales analizadas, el Cb es la región que tuvo mayor concentración de Gas1, dos veces más que cualquier otra (Fig. 1). En el Cb, Gas1 está

presente en neuronas de Purkinje y glutamatérgicas de núcleo fastigial, sin embargo, se detectaron bajos niveles de Gas1 en neuronas glutamatérgicas granulares. Este hallazgo es consistente con datos previos en donde se mostró que Gas1 se expresa en las células de la capa granular externa (EGL) para promover su proliferación, pero no se expresa en las neuronas granulares migratorias en maduración [5, 70, 92]. Como se mencionó anteriormente, se encontró que las neuronas granulares expresan niveles muy bajos y no liberan Gas1 en comparación con las células de Purkinje o del hipocampo. La función de Gas1 en las células de Purkinje no ha sido reportada, sin embargo, se sabe que los ratones Gas1^{-/-} muestran una reducción en el número de células granulares y de Purkinje [92]. Durante el desarrollo, Gas1 liberado de las neuronas de Purkinje podría promover la proliferación de las células granulares tal y como lo hace Shh liberado de células de Purkinje [33]. Mientras que en adulto podría participar en el mantenimiento de la viabilidad o de detención del ciclo celular de las células granulares las cuales no expresan Gas1.

Además, los resultados mostraron que Gas1 está presente en el cuerpo neuronal y no en el neuropilo, ni en dendritas proximales o en las terminaciones axonales. Por ejemplo Gas1 se localiza en el soma de las neuronas de Purkinje pero no en sus terminales presentes en el núcleo fastigial. Cabe indicar que Gas1 es una proteína unida a la membrana celular externa a través de un grupo GPI [125, 137], aunque también se ha reportado su presencia en el retículo endoplásmico y en el aparato de Golgi, en donde modula el procesamiento del APP [26, 27]. En este sentido el análisis bioinformático mostró un motivo de retención en el retículo endoplásmico (RE). Por otra parte, recientemente se mostró que Gas1 es secretada, no por secreción vesicular si no por el corte de su ancla GPI, de células mesangiales y fibroblastos [7, 143]. Además, se ha reportado la presencia de forma soluble de Gas1 en el líquido cefalorraquídeo (LCR), plasma sanguíneo y orina [7, 143, 144]. Interesantemente, aquí se reporta que las neuronas de Purkinje, del hipocampo, células N1E115 y SH-SY5Y diferenciadas con AR secretan Gas1, sugiriendo que este modula la señalización tanto de forma autocrina como paracrina en el cerebro. Además, en este trabajo no se determinó como se produce el corte de su ancla GPI, sin embargo, un reporte previo mostró que la desintegrina y las metaloproteasas 10 y 17 (ADAM) son responsables del corte de su ancla GPI en las células mesangiales [102]. El análisis bioinformático mostró dos sitios de reconocimiento a

nardilisina (N-Arg di-básica convertasa), uno de estos sitios se encuentra muy cercano al ancla GPI. La nardilisina es una metaloproteasa localizada ampliamente en el cerebro [11]. Esta enzima se expresa en conjunto y potencia la actividad de la α -secretasa de ADAM 10 y 17. Curiosamente, se ha reportado una reducción en los niveles de expresión de estas tres enzimas en cerebros con Alzheimer y Síndrome de Down [12], sugiriendo una desregulación en la generación de los fragmentos amiloidogénicos. Por lo tanto, es posible que la nardilisina esté involucrada en el corte del ancla GPI de Gas1 en las neuronas.

Con respecto a la función de Gas1, la ausencia de su ancla GPI no afecta su función pro-apoptótica ya que previamente nuestro grupo generó una forma recombinante soluble de Gas1 carente de GPI (tGas), la cual disminuyó el crecimiento tumoral [72, 93, 94]. Las proteínas ancladas a GPI como Gas1 carecen de capacidad de señalización intrínseca, sin embargo, algunos estudios muestran que el corte y por ende el desprendimiento de las proteínas GPI de la membrana celular, se relaciona con diferentes procesos como migración, modulación de la actividad de los canales iónicos, inhibición o la estimulación del crecimiento neurítico y atracción o repulsión de axones durante la diferenciación neuronal. Dichos efectos se deben a la comunicación con células vecinas ya sea por unión con factores de crecimiento, receptores transmembranales, generando gradientes de concentración o actuando como coreceptores para modular vías de señalización [46, 56, 74, 102, 123, 124]. En este sentido quizás durante el desarrollo, Gas1 soluble liberado de las neuronas podría generar un gradiente para la formación de patrones tisulares, ya que está expresado preferencialmente en el cuerpo celular y no en dendritas proximales o terminales. Por otro parte, Gas1 soluble podría también modular la supervivencia, o muerte celular de forma paracrina al interactuar con Shh o Ret, e incluso regular la migración, ya que Gas1 tiene un dominio RGD para su interacción con integrinas [34, 35, 145]. En el presente trabajo el análisis bioinformático reveló que dicho sitio RGD está conservado tanto en la secuencia de *gas1* de ratón como en la de humano. Interesantemente, se ha reportado que el complejo de integrinas $\alpha 5 \beta 1$ induce la expresión de Gas1 [145].

Desde otra perspectiva, se he propuesto que existe cambio en la tasa de corte de las proteínas GPI en diferentes enfermedades neurodegenerativas [36, 55, 56], por lo tanto se

sugiere determinar si Gas1 puede cruzar la barrera hematoencefálica y si sus niveles cambian durante estados neuropatológicos. En este contexto, bajos niveles de Gas1 se han propuesto como indicadores de cáncer de próstata [122]. Aunque no se conocen los niveles de Gas1 soluble en condiciones neurotóxicas, se ha reportado que Gas1 se sobreexpresa en las neuronas corticohipocampales después de la exposición a NMDA, en tejido hipocampal de ratas isquémicas y en la SN después de la exposición de LPS o MPTP [104, 140].

Subsecuentemente, para determinar los posibles efectos de Gas1 en las neuronas, se evaluó su papel en el proceso de diferenciación usando como modelo de estudio a la línea celular SH-SY5Y diferenciada con AR. En primer lugar se observó que los niveles de Gas1 aumentan durante el proceso de diferenciación neuronal inducido por el AR en las células SH-SY5Y. Estos datos son consistentes con lo reportado previamente por Chapuis y cols., [26]. La entrada de las células a la fase quiescente del ciclo celular determina el inicio de la diferenciación neuronal [53]. Se ha reportado que el AR induce la expresión de Gas1 en conjunto con otros inhibidores del ciclo celular en las células de la cresta neuronal [150]. Por sí mismo, el AR induce la detención del ciclo celular [24, 44], sin embargo, es probable que Gas1 esté mediando este efecto, ya que inhibe el ciclo celular en los fibroblastos [130] y disminuye los niveles de ciclina D1, para promover la diferenciación de los mioblastos [86]. Interesantemente, el análisis bioinformático reveló un sitio de reconocimiento por la ciclina D y un sitio de fosforilación por CK1 presentes en las secuencias proteicas de Gas1 de ratón, rata y humano. Por lo tanto, Gas1 podrían potenciar el efecto del AR sobre la detención del ciclo celular (Fig. 40).

Por otro lado, quizás exista una relación entre *gas1* y el AR desde el punto de vista de regulación transcripcional, ya que se ha reportado que el AR induce la expresión de *gas1* en las células de la cresta neural [150], células de carcinoma embrionario F9 [139] y en las células de neuroblastoma SH-SY5Y [26]. Aunado a lo anterior, en este trabajo se muestra que los niveles de Gas1 se incrementan durante diferenciación de las células SH-SY5Y inducida por el AR. Asimismo, el análisis bioinformático muestra la presencia de secuencias RARE en el promotor de *gas1* (Fig. 40). Por lo tanto, estos resultados apoyan la idea de que *gas1* es un potencial gen responsivo al AR. Desde otra perspectiva, se sabe que *gas1* es inducido por

WNT en las somitas [83] y el análisis bioinformático mostró también la presencia de sitios TCF/LEF en los promotores de *gas1* humano y de ratón (Fig. 40). Por lo tanto, quizás el AR al inducir la expresión de proteínas WNT inducirá la expresión de *gas1*, por la translocación al núcleo de la β -catenina el cual podría unirse a sitios responsivos TCF/LEF presentes en el promotor de *gas1* (Fig. 40).

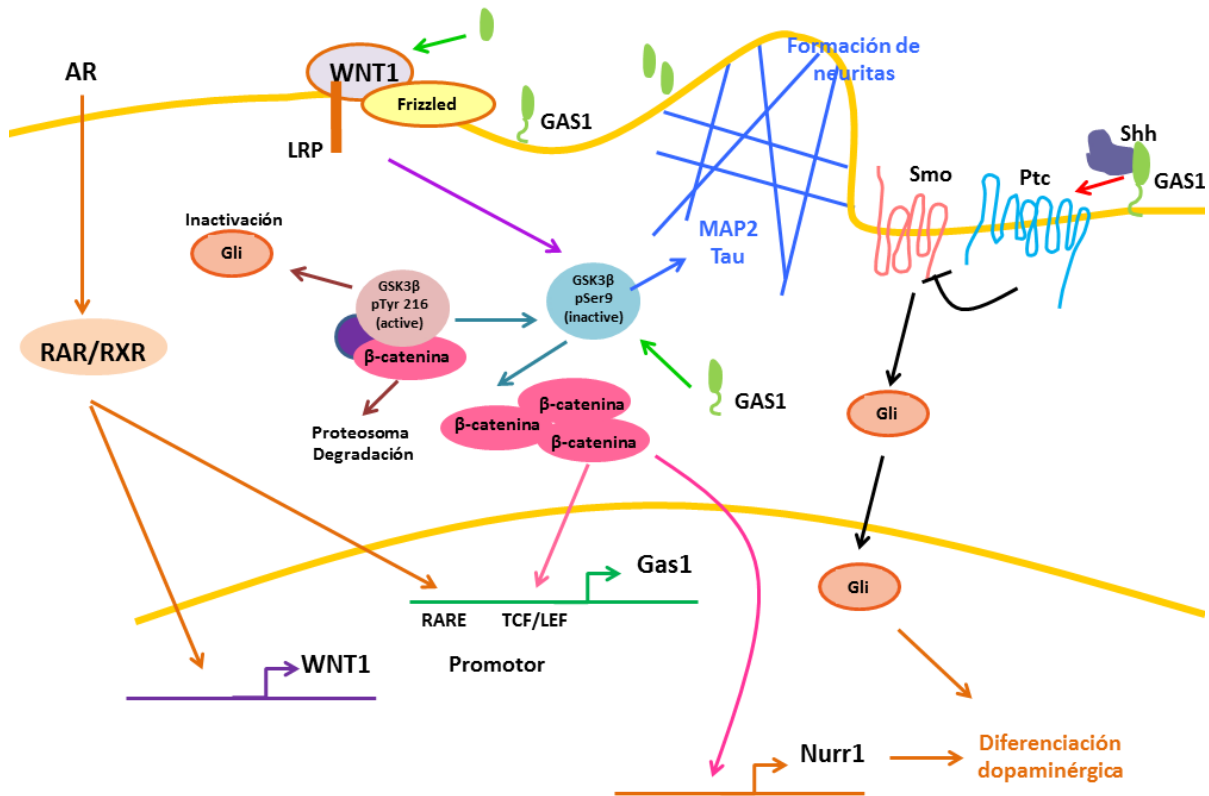


Figura 40. Interacciones y efectos de Gas1 con diferentes vías de señalización involucradas en la formación de neuritas y la diferenciación dopaminérgica.

Adicionalmente, en este trabajo se reportó que el silenciamiento de Gas1 produce una disminución en el número de neuritas inducida por el AR en las células SH-SY5Y, dicho efecto fue revertido por la adición de Gas1 recombinante al medio de cultivo, indicando un efecto paracrino y la existencia de una proteína intermediaria (Fig. 40). Además, se mostró que Gas1 indujo la formación de neuritas a través de la inhibición de GSK3 β y aumentó los niveles de TH en células SH-SY5Y diferenciadas con AR, indicando un efecto potenciador de la diferenciación neuronal. Diversos estudios muestran que la inhibición de GSK3 β induce la formación de neuritas, mediante la regulación de la dinámica de proteínas asociadas a microtúbulos tanto en cultivos primarios de neuronas como en líneas celulares (Fig. 40) [21,

106-110, 128, 134, 157]. Cabe mencionar que un estudio muestra que el litio, un inhibidor no específico de GSK3 β , bloquea la formación de neuritas [141]. Por otro lado, Gas1 podría tener importantes funciones durante la diferenciación dopaminérgica, ya que diversos reportes muestran que la inhibición de GSK3 β promueve la diferenciación neuronal dopaminérgica, incluso inhibidores de GSK3 β son incorporados rutinariamente para inducir la diferenciación dopaminérgica de células troncales embrionarias (ESCs) y de células pluripotentes inducidas (iPSCs) [19, 88].

Aunque en este estudio no identificamos cual es la molécula intermediaria o si es una interacción directa a través de la cual Gas1 inhibe a GSK3 β , sugerimos que las integrinas o las proteínas WNT podrían estar implicadas en dicho proceso, ya que se ha reportado que WNT induce la expresión de Gas1 en las somitas [83]. Interesantemente, las WNTs son glicoproteínas secretadas que también inducen la inhibición de GSK3 β (Fig. 40). Dentro de sus múltiples funciones está la de promover la diferenciación y mantenimiento de las neuronas dopaminérgicas [19, 51, 62, 105].

Con base en los efectos que produce Gas1 sobre la diferenciación dopaminérgica de las células SH-SY5Y, se analizó su posible efecto terapéutico para el tratamiento de la EP, usando el modelo de 6-OHDA. A pesar de que diversos estudios muestran el efecto proapoptótico de Gas1 [140, 148, 155], se encontró que su sobreexpresión atenuó el daño neurotóxico que induce la 6-OHDA en las células SH-SY5Y diferenciadas con AR, esto a través de la inhibición de GSK3 β y la estabilización de los niveles de β -catenina, la cual mediante su unión a sitios TCF/LEF podría inducir a la transcripción de genes que promueven la supervivencia celular (Fig. 40). Esto se apoya con estudios previos que muestran que la 6-OHDA causa efectos tóxicos al inhibir a GSK3 β (fosforilación en la Ser9) e inducir su activación (fosforilación en la Tyr 216) [28, 76, 115]. En este contexto, se ha comprobado que el “silenciamiento” o la inhibición de GSK3 β disminuye la apoptosis inducida por la 6-OHDA en células SH-SY5Y [28, 76, 115]. Por lo tanto, estos datos sugieren el uso de Gas1 o inhibidores de GSK3 β como potenciales agentes terapéuticos para el tratamiento de la EP.

Adicionalmente, se encontró que Gas1 aumentó los niveles de TH, incluso por arriba del control, evidenciando un efecto es neuroprotector ante el insulto de la 6-OHDA. Sin embargo, esto también podrían tener un efecto opuesto ya que una mayor actividad de la enzima TH conllevaría a una aumento en los niveles de dopamina, cuya autooxidación podría formar quinonas y por ende potenciar la formación de ROS [15]. Se sugiere un estudio detallado en función del tiempo para determinar si el efecto neuroprotector de Gas1 persiste. Con respecto a la producción de ROS, el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) es la primera ROS generada por la 6-OHDA, esto después de inhibir los complejos I y IV mitocondriales [15]. La enzima SOD1 es la encargada de disminuir los niveles y la reactividad de $O_2^{\cdot-}$ al catalizar la formación de H_2O_2 y O_2 . Los resultados muestran que la 6-OHDA disminuyó los niveles de SOD1 indicando acumulación de $O_2^{\cdot-}$ el cual es altamente citotóxico. Por otro lado, se observó que la sobreexpresión de Gas1 mantuvo los niveles de SOD1 después del tratamiento con 6-OHDA, lo que induciría la disminución de $O_2^{\cdot-}$ y el aumento de los niveles de H_2O_2 y O_2 , los que a su vez formarían H_2O mediante la acción de la catalasa y la GPx. Adicionalmente, encontramos que Gas1 ejerce un efecto protector a través de la disminución los niveles de NO (RNS) inducidos por la 6-OHDA. Sin embargo, la sobreexpresión de Gas1 por si sola aumentó los niveles de NO, el cual no tuvo efecto sobre la viabilidad celular. Cabe mencionar que el NO, no solo ejerce efectos citotóxicos sino que también regula la excitabilidad neuronal (potenciación a largo y corto plazo), liberación de neurotransmisores y es un factor importante para el proceso de diferenciación. Cabe señalar que las células SH-SY5Y diferenciadas con AR tienen mayores niveles de NO con respecto a las células no diferenciadas, la tolerancia a dichos niveles de NO se debe a un aumento en la expresión de enzimas antioxidantes y de proteínas que promueven la viabilidad celular como Akt y ERK1/2, es por ello que las células diferenciadas son más resistentes a insultos tóxicos. Esto es consistente con lo observado en el presente estudio, en donde las células SH-SY5Y diferenciadas con AR fueron más recientes a la muerte celular inducida por la 6OHDA con respecto a las células SH-SY5Y en proliferación.

VIII. CONCLUSIONES

No existe una relación unívoca entre la expresión de Gas1 y el fenotipo neuroquímico, ya que se expresa tanto en neuronas GABAérgicas, glutamatérgicas y dopaminérgicas. Adicionalmente, en este trabajo se reporta que Gas1 podría modular la señalización de manera paracrina en el cerebro ya que Gas1 es liberado por las neuronas. Incluso se sugiere que cambios en su liberación durante procesos neurodegenerativos, podrían ser utilizados como marcadores de diagnóstico.

Por otra parte, en el presente trabajo, se reporta que Gas1 indujo la formación de neuritas a través de la inhibición de GSK3 β , y aumentó los niveles de TH indicando un efecto potenciador sobre la diferenciación neuronal. Debido a ello se considera que durante el desarrollo, Gas1 podría ser un factor estimulante de la formación de neuronas dopaminérgicas, mediante la activación de la vía WNT/GSK3 β .

Finalmente, se mostró los efectos neuroprotectores de Gas1 sobre la neurotoxicidad inducida por la 6-OHDA, señalándolo como un potencial coadyuvante en tratamiento de la EP. Sin embargo, se sugieren más estudios dosis-respuesta para determinar si dicho efecto persiste, ya que Gas1 aumentó la concentración de TH por arriba del control, además se han reportado efectos pro-apoptóticos de Gas1 en las neuronas

IX. PERSPECTIVAS

- Analizar los efectos de la Gas1 sobre la neurotoxicidad producida por la 6-OHDA en un modelo *in-vivo*.
- Determinar la relación entre WNT y Gas1 durante la formación de neuronas dopaminérgicas.
- Realizar estudios dosis-respuesta de los efectos Gas1.
- Determinar si Gas1 es un gen responsivo al AR.
- Analizar la liberación de Gas1 en procesos neurodegenerativos.
- Determinar si Gas1 interactúa con integrinas y analizar sus efectos sobre la migración celular.

X. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Agholme L, Lindstrom T, Kagedal K, Marcusson J, Hallbeck M An in vitro model for neuroscience: differentiation of SH-SY5Y cells into cells with morphological and biochemical characteristics of mature neurons. *J Alzheimers Dis* 2010;20:1069-1082.
- [2] Ahlemeyer B, Baumgart-Vogt E Optimized protocols for the simultaneous preparation of primary neuronal cultures of the neocortex, hippocampus and cerebellum from individual newborn (P0.5) C57Bl/6J mice. *J Neurosci Methods* 2005;149:110-120.
- [3] Airaksinen MS, Saarma M The Gdnf Family: Signalling, Biological Functions and Therapeutic Value. *Nature Reviews Neuroscience* 2002;3:383-394.
- [4] Alberio T, Lopiano L, Fasano M Cellular models to investigate biochemical pathways in Parkinson's disease. *FEBS J* 2012;279:1146-1155.
- [5] Allen BL, Tenzen T, McMahon AP The Hedgehog-binding proteins Gas1 and Cdo cooperate to positively regulate Shh signaling during mouse development. *Genes & Development* 2007;21:1244-1257.
- [6] Arsikin K, Kravic-Stevovic T, Jovanovic M, Ristic B, Tovilovic G, Zogovic N, Bumbasirevic V, Trajkovic V, Harhaji-Trajkovic L Autophagy-dependent and -independent involvement of AMP-activated protein kinase in 6-hydroxydopamine toxicity to SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Biochim Biophys Acta* 2012;1822:1826-1836.
- [7] Ayala-Sarmiento AE, Estudillo E, Perez-Sanchez G, Sierra-Sanchez A, Gonzalez-Mariscal L, Martinez-Fong D, Segovia J GAS1 is present in the cerebrospinal fluid and is expressed in the choroid plexus of the adult rat. *Histochem Cell Biol* 2016;146:325-336.
- [8] Balmer JE, Blomhoff R Gene expression regulation by retinoic acid. *J Lipid Res* 2002;43:1773-1808.
- [9] Baptista MJ, O'Farrell C, Daya S, Ahmad R, Miller DW, Hardy J, Farrer MJ, Cookson MR Coordinate transcriptional regulation of dopamine synthesis genes by alpha-synuclein in human neuroblastoma cell lines. *J Neurochem* 2003;85:957-968.
- [10] Benítez JA, Arregui L, Vergara P, Segovia J Targeted-simultaneous expression of Gas1 and p53 using a bicistronic adenoviral vector in gliomas. *Cancer Gene Therapy* 2007;14:836-846.
- [11] Bernstein HG, Stricker R, Dobrowolny H, Trubner K, Bogerts B, Reiser G Histochemical evidence for wide expression of the metalloendopeptidase nardilysin in human brain neurons. *Neuroscience* 2007;146:1513-1523.

- [12] Bernstein HG, Stricker R, Lendeckel U, Bertram I, Dobrowolny H, Steiner J, Bogerts B, Reiser G Reduced neuronal co-localisation of nardilysin and the putative alpha-secretases ADAM10 and ADAM17 in Alzheimer's disease and Down syndrome brains. *Age (Dordr)* 2009;31:11-25.
- [13] Biau S, Jin S, Fan CM Gastrointestinal defects of the Gas1 mutant involve dysregulated Hedgehog and Ret signaling. *Biology Open* 2012;2:144-155.
- [14] Blandini F, Nappi G, Tassorelli C, Martignoni E Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 2000;62:63-88.
- [15] Blum D, Torch S, Lambeng N, Nissou M, Benabid AL, Sadoul R, Verna JM Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 2001;65:135-172.
- [16] Brennan SK, Wang Q, Tressler R, Harley C, Go N, Bassett E, Huff CA, Jones RJ, Matsui W Telomerase inhibition targets clonogenic multiple myeloma cells through telomere length-dependent and independent mechanisms. *PLoS One* 2010;5
- [17] Cabrera JR, Sanchez-Pulido L, Rojas AM, Valencia A, Manes S, Naranjo JR, Mellstrom B Gas1 Is Related to the Glial Cell-derived Neurotrophic Factor Family Receptors and Regulates Ret Signaling. *Journal of Biological Chemistry* 2006;281:14330-14339.
- [18] Cairo G, Ferrero M, Biondi G, Colombo MP Expression of a growth arrest specific gene (gas-1) in transformed cells. *Br J Cancer* 1992;66:27-31.
- [19] Castelo-Branco G, Rawal N, Arenas E GSK-3beta inhibition/beta-catenin stabilization in ventral midbrain precursors increases differentiation into dopamine neurons. *J Cell Sci* 2004;117:5731-5737.
- [20] Ciccarelli C, Philipson L, Sorrentino V Regulation of expression of growth arrest-specific genes in mouse fibroblasts. *Mol Cell Biol* 1990;10:1525-1529.
- [21] Cohen P, Frame S The renaissance of GSK3. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:769-776.
- [22] Cole AR (2013) Regulation of Cell Fate in the Brain by GSK3. In: Wislet-Gendebien S (ed) *Trends in Cell Signaling Pathways in Neuronal Fate Decision*. InTech, Rijeka, pp Ch. 06
- [23] Colombo MP, Martinotti A, Howard TA, Schneider C, D'Eustachio P, Seldin MF Localization of growth arrest-specific genes on mouse chromosomes 1, 7, 8, 11, 13, and 16. *Mamm Genome* 1992;2:130-134.
- [24] Cuende J, Moreno S, Bolanos JP, Almeida A Retinoic acid downregulates Rae1 leading to APC(Cdh1) activation and neuroblastoma SH-SY5Y differentiation. *Oncogene* 2008;27:3339-3344.

- [25] Chan MC, Bautista E, Alvarado-Cruz I, Quintanilla-Vega B, Segovia J Inorganic mercury prevents the differentiation of SH-SY5Y cells: Amyloid precursor protein, microtubule associated proteins and ROS as potential targets. *J Trace Elem Med Biol* 2017;
- [26] Chapuis J, Vingtdeux V, Campagne F, Davies P, Marambaud P Growth arrest-specific 1 binds to and controls the maturation and processing of the amyloid- precursor protein. *Human Molecular Genetics* 2011;20:2026-2036.
- [27] Chapuis J, Vingtdeux V, Capiralla H, Davies P, Marambaud P Gas1 interferes with AbetaPP trafficking by facilitating the accumulation of immature AbetaPP in endoplasmic reticulum-associated raft subdomains. *J Alzheimers Dis* 2012;28:127-135.
- [28] Chen G, Bower KA, Ma C, Fang S, Thiele CJ, Luo J Glycogen synthase kinase 3beta (GSK3beta) mediates 6-hydroxydopamine-induced neuronal death. *FASEB J* 2004;18:1162-1164.
- [29] Chen G, Bower KA, Xu M, Ding M, Shi X, Ke ZJ, Luo J Cyanidin-3-glucoside reverses ethanol-induced inhibition of neurite outgrowth: role of glycogen synthase kinase 3 Beta. *Neurotox Res* 2009;15:321-331.
- [30] Cheung YT, Lau WK, Yu MS, Lai CS, Yeung SC, So KF, Chang RC Effects of all-trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as in vitro model in neurotoxicity research. *Neurotoxicology* 2009;30:127-135.
- [31] Chin-Chan M, Navarro-Yepes J, Quintanilla-Vega B Environmental pollutants as risk factors for neurodegenerative disorders: Alzheimer and Parkinson diseases. *Front Cell Neurosci* 2015;9:124.
- [32] Chou DK, Jungalwala FB N-Acetylglucosaminyl transferase regulates the expression of the sulfoglucuronyl glycolipids in specific cell types in cerebellum during development. *J Biol Chem* 1996;271:28868-28874.
- [33] De Luca A, Cerrato V, Fuca E, Parmigiani E, Buffo A, Leto K Sonic hedgehog patterning during cerebellar development. *Cell Mol Life Sci* 2016;73:291-303.
- [34] Del Sal G, Collavin L, Ruaro ME, Edomi P, Saccone S, Valle GD, Schneider C Structure, function, and chromosome mapping of the growth-suppressing human homologue of the murine gas1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:1848-1852.
- [35] Del Sal G, Ruaro ME, Philipson L, Schneider C The growth arrest-specific gene, gas1, is involved in growth suppression. *Cell* 1992;70:595-607.
- [36] Derfuss T, Parikh K, Velhin S, Braun M, Mathey E, Krumbholz M, Kumpfel T, Moldenhauer A, Rader C, Sonderegger P, Pollmann W, Tiefenthaller C, Bauer J, Lassmann H, Wekerle H, Karagogeos D, Hohlfeld R, Linington C, Meinl E Contactin-2/TAG-1-directed autoimmunity is identified in multiple

sclerosis patients and mediates gray matter pathology in animals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:8302-8307.

[37] Dias V, Junn E, Mouradian MM The role of oxidative stress in Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis* 2013;3:461-491.

[38] Domínguez-Monzón G, Benítez JA, Vergara P, Lorenzana R, Segovia J Gas1 inhibits cell proliferation and induces apoptosis of human primary gliomas in the absence of Shh. *International Journal of Developmental Neuroscience* 2009;27:305-313.

[39] Duester G, Mic FA, Molotkov A Cytosolic retinoid dehydrogenases govern ubiquitous metabolism of retinol to retinaldehyde followed by tissue-specific metabolism to retinoic acid. *Chem Biol Interact* 2003;143-144:201-210.

[40] Dwane S, Durack E, Kiely PA Optimising parameters for the differentiation of SH-SY5Y cells to study cell adhesion and cell migration. *BMC Res Notes* 2013;6:366.

[41] Eifert C, Sangster-Guity N, Yu LM, Chittur SV, Perez AV, Tine JA, McCormick PJ Global gene expression profiles associated with retinoic acid-induced differentiation of embryonal carcinoma cells. *Mol Reprod Dev* 2006;73:796-824.

[42] Eisenmann DM Wnt signaling. *WormBook* 2005:1-17.

[43] Embi N, Rylatt DB, Cohen P Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. *Eur J Biochem* 1980;107:519-527.

[44] Encinas M, Iglesias M, Liu Y, Wang H, Muhaisen A, Cena V, Gallego C, Comella JX Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells. *J Neurochem* 2000;75:991-1003.

[45] Fearnley JM, Lees AJ Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain* 1991;114 (Pt 5):2283-2301.

[46] Ferraro GB, Morrison CJ, Overall CM, Strittmatter SM, Fournier AE Membrane-type matrix metalloproteinase-3 regulates neuronal responsiveness to myelin through Nogo-66 receptor 1 cleavage. *J Biol Chem* 2011;286:31418-31424.

[47] Forster JI, Koglsberger S, Trefois C, Boyd O, Baumuratov AS, Buck L, Balling R, Antony PM Characterization of Differentiated SH-SY5Y as Neuronal Screening Model Reveals Increased Oxidative Vulnerability. *J Biomol Screen* 2016;21:496-509.

- [48] Fremeau RT, Jr., Burman J, Qureshi T, Tran CH, Proctor J, Johnson J, Zhang H, Sulzer D, Copenhagen DR, Storm-Mathisen J, Reimer RJ, Chaudhry FA, Edwards RH The identification of vesicular glutamate transporter 3 suggests novel modes of signaling by glutamate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:14488-14493.
- [49] Fremeau RT, Jr., Troyer MD, Pahner I, Nygaard GO, Tran CH, Reimer RJ, Bellocchio EE, Fortin D, Storm-Mathisen J, Edwards RH The expression of vesicular glutamate transporters defines two classes of excitatory synapse. *Neuron* 2001;31:247-260.
- [50] Fujiyama F, Hioki H, Tomioka R, Taki K, Tamamaki N, Nomura S, Okamoto K, Kaneko T Changes of immunocytochemical localization of vesicular glutamate transporters in the rat visual system after the retinofugal denervation. *J Comp Neurol* 2003;465:234-249.
- [51] Fukusumi Y, Meier F, Gotz S, Matheus F, Irmeler M, Beckervordersandforth R, Faus-Kessler T, Minina E, Rauser B, Zhang J, Arenas E, Andersson E, Niehrs C, Beckers J, Simeone A, Wurst W, Prakash N Dickkopf 3 Promotes the Differentiation of a Rostrolateral Midbrain Dopaminergic Neuronal Subset In Vivo and from Pluripotent Stem Cells In Vitro in the Mouse. *J Neurosci* 2015;35:13385-13401.
- [52] Furuya S, Makino A, Hirabayashi Y An improved method for culturing cerebellar Purkinje cells with differentiated dendrites under a mixed monolayer setting. *Brain Res Brain Res Protoc* 1998;3:192-198.
- [53] Galderisi U, Jori FP, Giordano A Cell cycle regulation and neural differentiation. *Oncogene* 2003;22:5208-5219.
- [54] Garcia-Tovar CG, Perez A, Luna J, Mena R, Osorio B, Aleman V, Mondragon R, Mornet D, Rendon A, Hernandez JM Biochemical and histochemical analysis of 71 kDa dystrophin isoform (Dp71f) in rat brain. *Acta Histochem* 2001;103:209-224.
- [55] Gautam V, D'Avanzo C, Hebisch M, Kovacs DM, Kim DY BACE1 activity regulates cell surface contactin-2 levels. *Mol Neurodegener* 2014;9:4.
- [56] Gennarini G, Bizzoca A, Picocci S, Puzzo D, Corsi P, Furley AJ The role of Gpi-anchored axonal glycoproteins in neural development and neurological disorders. *Mol Cell Neurosci* 2016;
- [57] Gobeil S, Zhu X, Doillon CJ, Green MR A genome-wide shRNA screen identifies GAS1 as a novel melanoma metastasis suppressor gene. *Genes & Development* 2008;22:2932-2940.
- [58] Grossi M, La Rocca SA, Pierluigi G, Vannucchi S, Ruaro EM, Schneider C, Tato F Role of Gas1 down-regulation in mitogenic stimulation of quiescent NIH3T3 cells by v-Src. *Oncogene* 1998;17:1629-1638.

- [59] Gurung B, Feng Z, Iwamoto DV, Thiel A, Jin G, Fan CM, Ng JM, Curran T, Hua X Menin epigenetically represses Hedgehog signaling in MEN1 tumor syndrome. *Cancer Res* 2013;73:2650-2658.
- [60] Hafner M, Landthaler M, Burger L, Khorshid M, Hausser J, Berninger P, Rothballer A, Ascano M, Jr., Jungkamp AC, Munschauer M, Ulrich A, Wardle GS, Dewell S, Zavolan M, Tuschl T Transcriptome-wide identification of RNA-binding protein and microRNA target sites by PAR-CLIP. *Cell* 2010;141:129-141.
- [61] Hättinen T, Holm L, Airaksinen MS Loss of neurturin in frog—Comparative genomics study of GDNF family ligand-receptor pairs. *Molecular and Cellular Neuroscience* 2007;34:155-167.
- [62] Hernandez-Baltazar D, Mendoza-Garrido ME, Martinez-Fong D Activation of GSK-3beta and caspase-3 occurs in Nigral dopamine neurons during the development of apoptosis activated by a striatal injection of 6-hydroxydopamine. *PLoS One* 2013;8:e70951.
- [63] Hernandez-Baltazar D, Zavala-Flores LM, Villanueva-Olivo A The 6-hydroxydopamine model and parkinsonian pathophysiology: Novel findings in an older model. *Neurologia* 2015;
- [64] Herzog E, Bellenchi GC, Gras C, Bernard V, Ravassard P, Bedet C, Gasnier B, Giros B, El Mestikawy S The existence of a second vesicular glutamate transporter specifies subpopulations of glutamatergic neurons. *J Neurosci* 2001;21:RC181.
- [65] Holowacz T, Alexson TO, Coles BL, Doble BW, Kelly KF, Woodgett JR, Van Der Kooy D The responses of neural stem cells to the level of GSK-3 depend on the tissue of origin. *Biol Open* 2013;2:812-821.
- [66] Holtz WA, Turetzky JM, Jong YJ, O'Malley KL Oxidative stress-triggered unfolded protein response is upstream of intrinsic cell death evoked by parkinsonian mimetics. *J Neurochem* 2006;99:54-69.
- [67] Hsu SD, Tseng YT, Shrestha S, Lin YL, Khaleel A, Chou CH, Chu CF, Huang HY, Lin CM, Ho SY, Jian TY, Lin FM, Chang TH, Weng SL, Liao KW, Liao IE, Liu CC, Huang HD miRTarBase update 2014: an information resource for experimentally validated miRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res* 2014;42:D78-85.
- [68] Huang Y, Prasad M, Lemon WJ, Hampel H, Wright FA, Kornacker K, LiVolsi V, Frankel W, Kloos RT, Eng C, Pellegata NS, de la Chapelle A Gene expression in papillary thyroid carcinoma reveals highly consistent profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:15044-15049.
- [69] Hwang O Role of oxidative stress in Parkinson's disease. *Exp Neurobiol* 2013;22:11-17.

- [70] Izzi L, Lévesque M, Morin S, Laniel D, Wilkes Brian C, Mille F, Krauss Robert S, McMahon Andrew P, Allen Benjamin L, Charron F Boc and Gas1 Each Form Distinct Shh Receptor Complexes with Ptch1 and Are Required for Shh-Mediated Cell Proliferation. *Developmental Cell* 2011;20:788-801.
- [71] Janesick A, Wu SC, Blumberg B Retinoic acid signaling and neuronal differentiation. *Cell Mol Life Sci* 2015;72:1559-1576.
- [72] Jiménez A, López-Ornelas A, Estudillo E, González-Mariscal L, González RO, Segovia J A soluble form of GAS1 inhibits tumor growth and angiogenesis in a triple negative breast cancer model. *Experimental Cell Research* 2014;327:307-317.
- [73] Kann M, Bae E, Lenz MO, Li L, Trannguyen B, Schumacher VA, Taglienti ME, Bordeianou L, Hartwig S, Rinschen MM, Schermer B, Benzing T, Fan CM, Kreidberg JA WT1 targets Gas1 to maintain nephron progenitor cells by modulating FGF signals. *Development* 2015;142:1254-1266.
- [74] Kaplan MR, Cho MH, Ullian EM, Isom LL, Levinson SR, Barres BA Differential control of clustering of the sodium channels Na(v)1.2 and Na(v)1.6 at developing CNS nodes of Ranvier. *Neuron* 2001;30:105-119.
- [75] Khwanraj K, Phruksaniyom C, Madlah S, Dharmasaroja P Differential Expression of Tyrosine Hydroxylase Protein and Apoptosis-Related Genes in Differentiated and Undifferentiated SH-SY5Y Neuroblastoma Cells Treated with MPP(.). *Neurol Res Int* 2015;2015:734703.
- [76] King TD, Bijur GN, Jope RS Caspase-3 activation induced by inhibition of mitochondrial complex I is facilitated by glycogen synthase kinase-3beta and attenuated by lithium. *Brain Res* 2001;919:106-114.
- [77] Korecka JA, van Kesteren RE, Blaas E, Spitzer SO, Kamstra JH, Smit AB, Swaab DF, Verhaagen J, Bossers K Phenotypic characterization of retinoic acid differentiated SH-SY5Y cells by transcriptional profiling. *PLoS One* 2013;8:e63862.
- [78] Kovalevich J, Langford D Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. *Methods Mol Biol* 2013;1078:9-21.
- [79] Kozikowski AP, Gaisina IN, Petukhov PA, Sridhar J, King LT, Blond SY, Duka T, Rusnak M, Sidhu A Highly potent and specific GSK-3beta inhibitors that block tau phosphorylation and decrease alpha-synuclein protein expression in a cellular model of Parkinson's disease. *ChemMedChem* 2006;1:256-266.
- [80] Kriks S, Shim JW, Piao J, Ganat YM, Wakeman DR, Xie Z, Carrillo-Reid L, Auyeung G, Antonacci C, Buch A, Yang L, Beal MF, Surmeier DJ, Kordower JH, Tabar V, Studer L Dopamine neurons derived

from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease. *Nature* 2011;480:547-551.

[81] Kwok JB, Hallupp M, Loy CT, Chan DK, Woo J, Mellick GD, Buchanan DD, Silburn PA, Halliday GM, Schofield PR GSK3B polymorphisms alter transcription and splicing in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2005;58:829-839.

[82] Kwon C, Cheng P, King IN, Andersen P, Shenje L, Nigam V, Srivastava D Notch post-translationally regulates beta-catenin protein in stem and progenitor cells. *Nat Cell Biol* 2011;13:1244-1251.

[83] Lee CS, Buttitta L, Fan CM Evidence that the WNT-inducible growth arrest-specific gene 1 encodes an antagonist of sonic hedgehog signaling in the somite. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2001;98:11347-11352.

[84] Lee KK, Leung AK, Tang MK, Cai DQ, Schneider C, Brancolini C, Chow PH Functions of the growth arrest specific 1 gene in the development of the mouse embryo. *Dev Biol* 2001;234:188-203.

[85] Lee TC, Li L, Philipson L, Ziff EB Myc represses transcription of the growth arrest gene gas1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:12886-12891.

[86] Leem Y-E, Han J-W, Lee H-J, Ha H-L, Kwon Y-L, Ho S-M, Kim B-G, Tran P, Bae G-U, Kang J-S Gas1 cooperates with Cdo and promotes myogenic differentiation via activation of p38MAPK. *Cellular Signalling* 2011;23:2021-2029.

[87] Li DW, Liu ZQ, Chen W, Yao M, Li GR Association of glycogen synthase kinase-3beta with Parkinson's disease (review). *Mol Med Rep* 2014;9:2043-2050.

[88] Li W, Li K, Wei W, Ding S Chemical approaches to stem cell biology and therapeutics. *Cell Stem Cell* 2013;13:270-283.

[89] Li Y, Luo F, Wei L, Liu Z, Xu P Knockdown of glycogen synthase kinase 3 beta attenuates 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in SH-SY5Y cells. *Neurosci Lett* 2011;487:41-46.

[90] Liu XY, He YJ, Yang QH, Huang W, Liu ZH, Ye GR, Tang SH, Shu JC Induction of autophagy and apoptosis by miR-148a through the sonic hedgehog signaling pathway in hepatic stellate cells. *Am J Cancer Res* 2015;5:2569-2589.

[91] Liu Y, Liu C, Yamada Y, Fan CM Growth arrest specific gene 1 acts as a region-specific mediator of the Fgf10/Fgf8 regulatory loop in the limb. *Development* 2002;129:5289-5300.

[92] Liu Y, May NR, Fan C-M Growth Arrest Specific Gene 1 Is a Positive Growth Regulator for the Cerebellum. *Developmental Biology* 2001;236:30-45.

- [93] López-Ornelas A, Mejía-Castillo T, Vergara P, Segovia J Lentiviral transfer of an inducible transgene expressing a soluble form of Gas1 causes glioma cell arrest, apoptosis and inhibits tumor growth. *Cancer Gene Therapy* 2010;18:87-99.
- [94] López-Ornelas A, Vergara P, Segovia J Neural stem cells producing an inducible and soluble form of Gas1 target and inhibit intracranial glioma growth. *Cytotherapy* 2014;16:1011-1023.
- [95] Louvi A, Artavanis-Tsakonas S Notch signalling in vertebrate neural development. *Nat Rev Neurosci* 2006;7:93-102.
- [96] Ma H, Wei Y, Leng Y, Li S, Gao L, Hu H, Chen L, Wang F, Xiao H, Zhu C, Liang C TGF-beta1-induced expression of Id-1 is associated with tumor progression in gastric cancer. *Med Oncol* 2014;31:19.
- [97] Mark M, Ghyselinck NB, Chambon P Function of retinoic acid receptors during embryonic development. *Nucl Recept Signal* 2009;7:e002.
- [98] Mark M, Ghyselinck NB, Chambon P Function of retinoid nuclear receptors: lessons from genetic and pharmacological dissections of the retinoic acid signaling pathway during mouse embryogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2006;46:451-480.
- [99] Marletaz F, Holland LZ, Laudet V, Schubert M Retinoic acid signaling and the evolution of chordates. *Int J Biol Sci* 2006;2:38-47.
- [100] Marschalek R Mixed lineage leukemia: roles in human malignancies and potential therapy. *FEBS J* 2010;277:1822-1831.
- [101] Martinelli DC, Fan CM A Sonic Hedgehog Missense Mutation Associated with Holoprosencephaly Causes Defective Binding to GAS1. *Journal of Biological Chemistry* 2009;284:19169-19172.
- [102] Matas-Rico E, van Veen M, Moolenaar WH Neuronal differentiation through GPI-anchor cleavage. *Cell Cycle* 2016:1-2.
- [103] Maurer U, Preiss F, Brauns-Schubert P, Schlicher L, Charvet C GSK-3 - at the crossroads of cell death and survival. *J Cell Sci* 2014;127:1369-1378.
- [104] Mellstrom B Gas1 Is Induced during and Participates in Excitotoxic Neuronal Death. *Molecular and Cellular Neuroscience* 2002;19:417-429.
- [105] Metcalfe C, Bienz M Inhibition of GSK3 by Wnt signalling--two contrasting models. *J Cell Sci* 2011;124:3537-3544.

- [106] Munoz-Montano JR, Lim F, Moreno FJ, Avila J, Diaz-Nido J Glycogen Synthase Kinase-3 Modulates Neurite Outgrowth in Cultured Neurons: Possible Implications for Neurite Pathology in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 1999;1:361-378.
- [107] Munoz-Montano JR, Moreno FJ, Avila J, Diaz-Nido J Downregulation of glycogen synthase kinase-3beta (GSK-3beta) protein expression during neuroblastoma IMR-32 cell differentiation. *J Neurosci Res* 1999;55:278-285.
- [108] Munoz-Montano JR, Moreno FJ, Avila J, Diaz-Nido J Lithium inhibits Alzheimer's disease-like tau protein phosphorylation in neurons. *FEBS Lett* 1997;411:183-188.
- [109] Nciri R, Boujbiha MA, Jbahi S, Allagui MS, Elfeki A, Vincent C, Croute F Cytoskeleton involvement in lithium-induced SH-SY5Y neuritogenesis and the role of glycogen synthase kinase 3beta. *Aging Clin Exp Res* 2015;27:255-263.
- [110] Nciri R, Bouroga E, Jbahi S, Allagui MS, Elfeki A, Vincent C, Croute F Chronic neuroprotective effects of low concentration lithium on SH-SY5Y cells: possible involvement of stress proteins and gene expression. *Neural Regen Res* 2014;9:735-740.
- [111] O'Suilleabhain PE, Sung V, Hernandez C, Lacritz L, Dewey RB, Jr., Bottiglieri T, Diaz-Arrastia R Elevated plasma homocysteine level in patients with Parkinson disease: motor, affective, and cognitive associations. *Arch Neurol* 2004;61:865-868.
- [112] Obayashi S, Tabunoki H, Kim SU, Satoh J-i Gene Expression Profiling of Human Neural Progenitor Cells Following the Serum-Induced Astrocyte Differentiation. *Cellular and Molecular Neurobiology* 2009;29:423-438.
- [113] Obeso JA, Rodriguez-Oroz MC, Goetz CG, Marin C, Kordower JH, Rodriguez M, Hirsch EC, Farrer M, Schapira AH, Halliday G Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle. *Nat Med* 2010;16:653-661.
- [114] Okada Y, Shimazaki T, Sobue G, Okano H Retinoic-acid-concentration-dependent acquisition of neural cell identity during in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells. *Dev Biol* 2004;275:124-142.
- [115] Petit-Paitel A, Brau F, Cazareth J, Chabry J Involvement of cytosolic and mitochondrial GSK-3beta in mitochondrial dysfunction and neuronal cell death of MPTP/MPP-treated neurons. *PLoS One* 2009;4:e5491.
- [116] Ren YA, Liu Z, Mullany LK, Fan CM, Richards JS Growth Arrest Specific-1 (GAS1) Is a C/EBP Target Gene That Functions in Ovulation and Corpus Luteum Formation in Mice. *Biol Reprod* 2016;94:44.

- [117] Rhinn M, Dolle P Retinoic acid signalling during development. *Development* 2012;139:843-858.
- [118] Rinne JO, Rummukainen J, Paljarvi L, Rinne UK Dementia in Parkinson's disease is related to neuronal loss in the medial substantia nigra. *Ann Neurol* 1989;26:47-50.
- [119] Rinne JO, Rummukainen J, Paljarvi L, Sako E, Molsa P, Rinne UK Neuronal loss in the substantia nigra in patients with Alzheimer's disease and Parkinson's disease in relation to extrapyramidal symptoms and dementia. *Prog Clin Biol Res* 1989;317:325-332.
- [120] Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 1997;245:154-160.
- [121] Riz I, Hawley TS, Luu TV, Lee NH, Hawley RG TLX1 and NOTCH coregulate transcription in T cell acute lymphoblastic leukemia cells. *Mol Cancer* 2010;9:181.
- [122] Rizzi F, Belloni L, Crafa P, Lazzaretti M, Remondini D, Ferretti S, Cortellini P, Corti A, Bettuzzi S A novel gene signature for molecular diagnosis of human prostate cancer by RT-qPCR. *PLoS One* 2008;3:e3617.
- [123] Rosen CL, Lisanti MP, Salzer JL Expression of unique sets of GPI-linked proteins by different primary neurons in vitro. *J Cell Biol* 1992;117:617-627.
- [124] Rougon G, Olive S, Durbec P, Faivre-Sarrailh C, Gennarini G Functional studies and cellular distribution of the F3 GPI-anchored adhesion molecule. *Braz J Med Biol Res* 1994;27:409-414.
- [125] Ruaro ME, Stebel M, Vatta P, Marzinotto S, Schneider C Analysis of the domain requirement in Gas1 growth suppressing activity. *FEBS Lett* 2000;481:159-163.
- [126] Russo MA, Paolillo M, Sanchez-Hernandez Y, Curti D, Ciusani E, Serra M, Colombo L, Schinelli S A small-molecule RGD-integrin antagonist inhibits cell adhesion, cell migration and induces anoikis in glioblastoma cells. *Int J Oncol* 2013;42:83-92.
- [127] Saito Y, Nishio K, Ogawa Y, Kinumi T, Yoshida Y, Masuo Y, Niki E Molecular mechanisms of 6-hydroxydopamine-induced cytotoxicity in PC12 cells: involvement of hydrogen peroxide-dependent and -independent action. *Free Radic Biol Med* 2007;42:675-685.
- [128] Salcedo-Tello P, Ortiz-Matamoros A, Arias C GSK3 Function in the Brain during Development, Neuronal Plasticity, and Neurodegeneration. *Int J Alzheimers Dis* 2011;2011:189728.
- [129] Sariola H, Saarma M Novel functions and signalling pathways for GDNF. *J Cell Sci* 2003;116:3855-3862.

- [130] Schneider C, King RM, Philipson L Genes specifically expressed at growth arrest of mammalian cells. *Cell* 1988;54:787-793.
- [131] Schueler-Furman O, Glick E, Segovia J, Linial M Is GAS1 a co-receptor for the GDNF family of ligands? *Trends in Pharmacological Sciences* 2006;27:72-77.
- [132] Seppala M, Depew MJ, Martinelli DC, Fan C-M, Sharpe PT, Cobourne MT Gas1 is a modifier for holoprosencephaly and genetically interacts with sonic hedgehog. *Journal of Clinical Investigation* 2007;117:1575-1584.
- [133] Seppala M, Xavier GM, Fan CM, Cobourne MT Boc modifies the spectrum of holoprosencephaly in the absence of Gas1 function. *Biology Open* 2014;3:728-740.
- [134] Shah SM, Patel CH, Feng AS, Kollmar R Lithium alters the morphology of neurites regenerating from cultured adult spiral ganglion neurons. *Hear Res* 2013;304:137-144.
- [135] Simoneau AR, Spruck CH, 3rd, Gonzalez-Zulueta M, Gonzalgo ML, Chan MF, Tsai YC, Dean M, Steven K, Horn T, Jones PA Evidence for two tumor suppressor loci associated with proximal chromosome 9p to q and distal chromosome 9q in bladder cancer and the initial screening for GAS1 and PTC mutations. *Cancer Res* 1996;56:5039-5043.
- [136] Spagnuolo R Gas1 is induced by VE-cadherin and vascular endothelial growth factor and inhibits endothelial cell apoptosis. *Blood* 2004;103:3005-3012.
- [137] Stebel M, Vatta P, Ruaro ME, Del Sal G, Parton RG, Schneider C The growth suppressing gas1 product is a GPI-linked protein. *FEBS Lett* 2000;481:152-158.
- [138] Storch A, Kaftan A, Burkhardt K, Schwarz J 6-Hydroxydopamine toxicity towards human SH-SY5Y dopaminergic neuroblastoma cells: independent of mitochondrial energy metabolism. *J Neural Transm (Vienna)* 2000;107:281-293.
- [139] Su D, Gudas LJ Gene expression profiling elucidates a specific role for RARgamma in the retinoic acid-induced differentiation of F9 teratocarcinoma stem cells. *Biochem Pharmacol* 2008;75:1129-1160.
- [140] Sun XL, Chen BY, Zhao HK, Cheng YY, Zheng MH, Duan L, Jiang W, Chen LW Gas1 up-regulation is inducible and contributes to cell apoptosis in reactive astrocytes in the substantia nigra of LPS and MPTP models. *J Neuroinflammation* 2016;13:180.
- [141] Takahashi M, Yasutake K, Tomizawa K Lithium inhibits neurite growth and tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3beta-dependent phosphorylation of juvenile tau in cultured hippocampal neurons. *J Neurochem* 1999;73:2073-2083.

- [142] Tang M, Villaescusa JC, Luo SX, Guitarte C, Lei S, Miyamoto Y, Taketo MM, Arenas E, Huang EJ Interactions of Wnt/beta-catenin signaling and sonic hedgehog regulate the neurogenesis of ventral midbrain dopamine neurons. *J Neurosci* 2010;30:9280-9291.
- [143] van Roeyen CR, Zok S, Pruessmeyer J, Boor P, Nagayama Y, Fleckenstein S, Cohen CD, Eitner F, Grone HJ, Ostendorf T, Ludwig A, Floege J Growth arrest-specific protein 1 is a novel endogenous inhibitor of glomerular cell activation and proliferation. *Kidney Int* 2013;83:251-263.
- [144] van Roeyen CRC, Zok S, Pruessmeyer J, Boor P, Nagayama Y, Fleckenstein S, Cohen CD, Eitner F, Gröne H-J, Ostendorf T, Ludwig A, Floege J Growth arrest-specific protein 1 is a novel endogenous inhibitor of glomerular cell activation and proliferation. *Kidney International* 2012;83:251-263.
- [145] Varner JA, Emerson DA, Juliano RL Integrin alpha 5 beta 1 expression negatively regulates cell growth: reversal by attachment to fibronectin. *Mol Biol Cell* 1995;6:725-740.
- [146] Voigt A, Zintl F Effects of retinoic acid on proliferation, apoptosis, cytotoxicity, migration, and invasion of neuroblastoma cells. *Med Pediatr Oncol* 2003;40:205-213.
- [147] Wang H, Zhou X, Zhang Y, Zhu H, Zhao L, Fan L, Wang Y, Gang Y, Wu K, Liu Z, Fan D Growth arrest-specific gene 1 is downregulated and inhibits tumor growth in gastric cancer. *FEBS J* 2012;279:3652-3664.
- [148] Wang K, Zhu X, Zhang K, Zhou F, Zhu L Gas1 Knockdown Increases the Neuroprotective Effect of Glial Cell-Derived Neurotrophic Factor Against Glutamate-Induced Cell Injury in Human SH-SY5Y Neuroblastoma Cells. *Cell Mol Neurobiol* 2016;36:603-611.
- [149] Wang K, Zhu X, Zhang K, Zhou F, Zhu L Gas1 Knockdown Increases the Neuroprotective Effect of Glial Cell-Derived Neurotrophic Factor Against Glutamate-Induced Cell Injury in Human SH-SY5Y Neuroblastoma Cells. *Cellular and Molecular Neurobiology* 2015;
- [150] Wang L, Mear JP, Kuan CY, Colbert MC Retinoic acid induces CDK inhibitors and growth arrest specific (Gas) genes in neural crest cells. *Dev Growth Differ* 2005;47:119-130.
- [151] Wang W, Yang Y, Ying C, Li W, Ruan H, Zhu X, You Y, Han Y, Chen R, Wang Y, Li M Inhibition of glycogen synthase kinase-3beta protects dopaminergic neurons from MPTP toxicity. *Neuropharmacology* 2007;52:1678-1684.
- [152] Xue YQ, Ma BF, Zhao LR, Tatom JB, Li B, Jiang LX, Klein RL, Duan WM AAV9-mediated erythropoietin gene delivery into the brain protects nigral dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease. *Gene Ther* 2010;17:83-94.
- [153] Yasuhara T, Hara K, Sethi KD, Morgan JC, Borlongan CV Increased 8-OHdG levels in the urine, serum, and substantia nigra of hemiparkinsonian rats. *Brain Res* 2007;1133:49-52.

- [154] Zarco N, Bautista E, Cuellar M, Vergara P, Flores-Rodriguez P, Aguilar-Roblero R, Segovia J Growth Arrest Specific 1 (GAS1) Is Abundantly Expressed in the Adult Mouse Central Nervous System. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 2013;61:731-748.
- [155] Zarco N, González-Ramírez R, González RO, Segovia J GAS1 induces cell death through an intrinsic apoptotic pathway. *Apoptosis* 2012;17:627-635.
- [156] Zhang L, He S, Guo S, Xie W, Xin R, Yu H, Yang F, Qiu J, Zhang D, Zhou S, Zhang K Down-regulation of miR-34a alleviates mesangial proliferation in vitro and glomerular hypertrophy in early diabetic nephropathy mice by targeting GAS1. *Journal of Diabetes and its Complications* 2014;28:259-264.
- [157] Zhang W, Smith A, Liu JP, Cheung NS, Zhou S, Liu K, Li QT, Duan W GSK3beta modulates PACAP-induced neuritogenesis in PC12 cells by acting downstream of Rap1 in a caveolae-dependent manner. *Cell Signal* 2009;21:237-245.
- [158] Zhang YW, Zheng Y, Wang JZ, Lu XX, Wang Z, Chen LB, Guan XX, Tong JD Integrated analysis of DNA methylation and mRNA expression profiling reveals candidate genes associated with cisplatin resistance in non-small cell lung cancer. *Epigenetics* 2014;9:896-909.
- [159] Zhao L, Pan Y, Gang Y, Wang H, Jin H, Tie J, Xia L, Zhang Y, He L, Yao L, Qiao T, Li T, Liu Z, Fan D Identification of GAS1 as an epirubicin resistance-related gene in human gastric cancer cells with a partially randomized small interfering RNA library. *J Biol Chem* 2009;284:26273-26285.