

Pontificia Universidad Javeriana

Facultad de Ciencias

Departamento de Nutrición y Bioquímica

Doctorado en Ciencias Biológicas



**Mecanismos de protección frente a rotenona por PDGF-BB en un modelo
astrocitario**

Estudiante

Ricardo Julián Cabezas Pérez

Tutor

George Emílio Sampaio Barreto Ph.D

Co-tutora

Janneth González Ph.D

Presentada como requisito parcial para optar al título de

Doctor en Ciencias Biológicas

Bogotá D.C.

2017

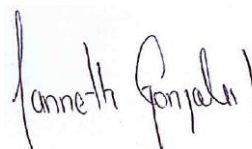
Mecanismos de protección frente rotenona por PDGF-BB en un modelo astrocitario

Ricardo Julián Cabezas Pérez



Dr. George E. Barreto

Tutor



Dra. Janneth Gonzalez

Co-tutora



Dra. Sonia Luz Albarracín



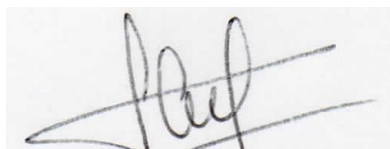
Dr. Carlos Javier Almeciga



Dr. Jhon Jairo Sutachán



Dr. Orlando Torres Fernández



Dra. Liliana Francis Turner

Mecanismos de protección frente rotenona por PDGF-BB en un modelo astrocitario

Ricardo Julián Cabezas Pérez

Alba Alicia Trespalacios

Directora Posgrado

Facultad de Ciencias

Concepcion Judith Puerta Bula

Decana

Facultad de Ciencias

NOTA DE ADVERTENCIA

“La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia.”

Artículo 23 de la resolución N° 13 de julio de 1946.

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor George Barreto y a la Doctora Janneth Gonzalez, por haberme dado la oportunidad de entrar a su grupo de investigación. Agradezco mucho su apoyo y paciencia durante todo el proceso del doctorado.

Agradezco a mis padres por su apoyo incondicional durante estos años de lucha. Sus consejos han sido muy importantes para mí.

Agradezco a los miembros del grupo de terapia celular y molecular en especial a Adri, Sara, Angélica (Angie) Pinzón, Juliana, Cristián, Jairo, Charles Richard, Juan Carlos, Eliana y los profesores Jhon y Sonia.

Muchas gracias a Nelson Vega quien ha sido un apoyo muy grande durante varios años en mi doctorado, y a Marco Fidel-Avila, mi compa con quien pasamos por tantas historias.

Agradezco especialmente a los miembros del grupo Integrative Cell Signalling del Luxembourg Centre for System Biomedicine , en especial a los Doctores Alexander Skupin y Alexey Kolodkin, Kamil Grzyb, Mahsa Moien y Olga Kondroitieva. Fueron sumamente valiosos los aportes del Doctor Alexey Kolodkin durante la preparación del modelo computacional, junto con su retroalimentación constante.

También a muchas personas del LCSB, que hicieron de mi estadía en Luxemburgo una experiencia maravillosa, en especial a Jiali Wang, Federico Baldini, Ursula Heinz-Marroquín, Charan Oberoi, Jorge Mario y Fermin, Pejo Balasz, Diana Mistreanu, Seongje Kim y muchos otros.

Muchas gracias a las Doctoras Adriana Umaña, Karina Vargas y Juan José Badilla por el apoyo en la parte del PCR.

Agradezco igualmente a las Doctoras Biviana Barreto Bailon y María José Contreras por la Corrección del documento y a Paula Esquinas de la fundación Santa Fé.

Hay muchas personas que me apoyaron emocionalmente a lo largo de estos años tanto de la Javeriana como de otros lugares. Son demasiadas pero quisiera mencionar a María Juliana Rodríguez, Sergio Morales, Marjorie Ocoro, Aura Rengifo, Angélica Arenas, Alejandra Prado, Ricardo Arias, Juanita Rodríguez, Sotelo, Diana Ahumada, Umberto Pérez, Manuel Guevara, Leonardo Violi, Rute, el doctor Ramón Dos Santos, Támara. También agradezco a toda mi familia.

También agradezco al Departamento Administrativo de Ciencia Tecnología e Innovación Colciencias por el apoyo financiero (Beca de Doctorados Nacionales, Convocatoria 528).

TABLA DE CONTENIDO

Lista de símbolos y abreviaturas.....	13
1. RESUMEN.....	18
1.2.ABSTRACT.....	20
2. Planteamiento del problema de investigación y justificación.....	22
3. Marco Teórico.....	27
3.1. Funciones astrocitarias: interacciones entre neuronas y astrocitos.....	27
3.2. El modelo de rotenona en la enfermedad de Parkinson.....	30
3.3. Factores de crecimiento y neuroprotección.....	33
3.4. Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF).....	34
3.5. Mecanismos de protección asociados al PDGF-BB.....	36
3.6. Efectos del PDGF-BB asociados a la morfología celular y activación de RhoA.....	40
3.7. Neuroglobina y factores de crecimiento.....	41
3.8. Modelos matemáticos computacionales y aplicaciones biológicas.....	43
3.9. Modelos computacionales en el estudio de enfermedades neurodegenerativas	44
3.10. Modelos computacionales mitocondriales.....	45
3.11. Modelos computacionales cinéticos.....	46
4. Objetivos e hipótesis	49
4.1. Hipótesis de investigación.....	49
4.2. Objetivos	49
4.2.1. Objetivo general	49
4.2.2. Objetivos específicos	49
5. Métodos experimentales y computacionales.....	50
5.1. Línea celular T98G.....	50
5.1.1. Línea celular HEK.....	50
5.2. Tratamientos farmacológicos.....	51
5.3. Determinación de la activación astrocitaria.....	51
5.4. Análisis ultraestructural a través de microscopio electrónico de transmisión.	51
5.5. Viabilidad y fragmentación nuclear	52

5.6. Determinación de especies reactivas de oxígeno (ERO)..	54
Evaluación radical superóxido.....	54
Evaluación radical peróxido.....	54
Evaluación peroxidación lipídica.....	54
Evaluación de hidroxilación de ácidos nucleicos.....	55
Evaluación de nitración de aminoácidos tirosina.....	55
5.7. Determinación de calcio intracelular.....	55
5.7.1. Determinación de niveles de Ca ²⁺	55
citoplasmático.....	
5.7.2. Determinación de niveles de Ca ²⁺ de RE y	56
mitocondrial.....	
5.8. Determinación del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$)	56
5.9. Estimación de la masa mitocondrial.....	57
5.10. Estimación de la intensidad media de fluorescencia.....	57
5.11. Determinación y cuantificación de proteínas por Western blot.....	58
5.12. Inmunofluorescencia.....	59
5.13. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa qRT-PCR.....	61
5.14. Silenciamiento de neuroglobina.....	62
5.15. Análisis estadístico.....	62
5.16. Modelo Computacional de la protección mitocondrial por parte del	
PDGF-BB.....	63
5.17. Descripción y parámetros del modelo.....	64
5.18. Validación experimental del modelo computacional.....	79
6. Diseño experimental.....	79
6.1. Diseño experimental 1.....	79
6.2. Diseño experimental 2.....	82
6.3. Diseño experimental 3.....	87
6.4. Diseño experimental 4.....	89
7. Resultados.....	93
7.1. Efectos del PDGF-BB en la viabilidad, proliferación y reactividad glial del	

Modelo astrocitario.....	93
7.1.1. Efectos de la rotenona y el PDGF-BB en la viabilidad de las células astrocitarias.....	94
7.1.2. Efectos del PDGF-BB sobre los cambios morfológicos inducidos por la Rotenona.....	98
7.1.3. El PDGF-BB disminuyó la expresión de los marcadores de activación astrocitaria	100
7.2. Efectos del PDGF-BB sobre las propiedades mitocondriales del modelo astrocitario.....	102
7.2.1. El PDGF-BB redujo los niveles de ERO en células estimuladas con rotenona.....	103
7.2.2. El PDGF-BB ejerce una protección parcial sobre el $\Delta\psi_m$ en células tratadas con rotenona.....	106
7.2.3. El PDGF-BB redujo los efectos de la rotenona sobre la masa mitocondrial.	106
7.2.4. Efectos del PDGF-BB y la rotenona sobre los cambios ultraestructurales de las células astrocitarias.....	108
7.2.5. Efectos del PDGF-BB sobre la concentración del calcio intracelular en el modelo astrocitario.....	110
7.3. Mecanismos de protección activados por el PDGF-BB en células astrocitarias frente al insulto por rotenona.....	113
7.3.1. Activación de la vía PI3K/AKT/NF- κ B por PDGF-BB.....	114
7.3.2. El PDGF aumenta la activación de NF- κ B y la expresión de neuroglobina..	116
7.3.3. Efecto del silenciamiento de Ngb1 en los efectos protectores del PDGF-BB.....	119
7.4. Generación de un modelo computacional de la protección mitocondrial por PDGF-BB frente a rotenona.....	124
7.4.1. Construcción del modelo computacional.....	125
7.4.2. Predicciones del modelo computacional.....	128
7.4.3. Validación parcial del modelo computacional en una línea celular HEK...	138

8. Discusión.....	142
9. Conclusiones.....	159
10. Perspectivas y aplicaciones.....	161
11. Bibliografía.....	163
12. Anexos.....	191

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Anticuerpos primarios utilizados en las determinaciones de proteínas por western blot e inmunocitoquímica.....	60
Tabla 2. Anticuerpos secundarios utilizados en las determinaciones de proteínas por western blot e inmunocitoquímica.....	60
Tabla 3. Primers utilizados en la amplificación por qPCR donde se muestra la secuencia forward y reverse.....	61
Tabla 4. Especies presentes en el modelo computacional.....	65
Tabla 5. Reacciones del modelo computacional.....	67
Tabla 6. Ecuaciones del modelo computacional.....	69
Tabla 7. Funciones cinéticas no convencionales utilizadas en el modelo computacional.....	72
Tabla 8. Grupos experimentales de estudio.....	80
Tabla 9. Principales especies afectadas para el análisis de sensibilidad de la reacción 16.....	129
Tabla 10. Principales especies afectadas para el análisis de sensibilidad de la reacción 22.....	130
Tabla 11. Principales especies afectadas para el análisis de sensibilidad de la reacción 20.....	132
Tabla 12. Principales especies afectadas para el análisis de sensibilidad de la Reacción 2.....	134
Tabla 13. Principales especies afectadas para el análisis de sensibilidad de la reacción 23.....	135
Tabla 14. Principales especies afectadas para el análisis de sensibilidad de la reacción 24.....	137

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Efectos mitocondriales en la EP.....	24
Figura 2. Funciones astrocitarias.....	29
Figura 3. Rotenona y otros modelos experimentales en la enfermedad de Parkinson	32
Figura 4. Mecanismos de señalización activados por el PDGF-BB.....	39
Figura 5. Figura representativa para el diseño experimental 1.....	82
Figura 6. Figura representativa para el diseño experimental 2.....	86
Figura 7. Figura representativa para el diseño experimental 3.....	89
Figura 8. Diagrama de flujo representativo de la metodología para la construcción y validación del modelo computacional.....	92
Figura 9. Efecto de la dosis de rotenona en la supervivencia de las células T98G.....	95
Figura 10. Efectos del pretratamiento de PDGF-BB a diferentes concentraciones sobre dosis experimental de 50 μ M de rotenona.....	95
Figura 11. Determinación de las mejores condiciones de protección por parte del PDGF-BB.....	96
Figura 12. Efectos del PDGF-BB sobre la viabilidad de células T98G tratadas con Rotenona.....	97
Figura 13. Efectos morfológicos del PDGF-BB.....	99
Figura 14. Efectos del PDGF-BB en marcadores de reactividad astrocitaria.....	101
Figura 15. Efectos del PDGF-BB en la producción de ERO 1.....	104
Figura 16. Efectos del PDGF-BB en la producción de ERO 2.....	105
Figura 17. Efectos del PDGF-BB en propiedades mitocondriales del modelo astrocitario.....	107
Figura 18. PDGF-BB Protege la ultraestructura mitocondrial contra el daño de rotenona.....	109
Figura 19. Efectos del PDGF-BB en la concentración de calcio intracelular y la expresión de GRP78.....	111
Figura 20. Proteínas activadas por PDGF-BB durante el insulto con rotenona.....	115
Figura 21. Curva de activación del NF- κ B (p65) en función al tiempo.....	116
Figura 22. El PDGF-BB aumenta la activación de NF- κ B y la expresión de	

Neuroglobina.....	118
Figura 23. Efectos del silenciamiento de Ngb1 sobre la viabilidad, en células T98G .	119
Figura 24. Efectos del silenciamiento de Ngb1 sobre el $\Delta\psi_m$ en células T98G.....	120
Figura 25. Efectos del silenciamiento de Ngb1 sobre la producción de ERO determinados por DHE.....	121
Figura 26. Efectos del silenciamiento de Ngb1 sobre la producción de de ERO determinados por DCFA en células T98G.....	122
Figura 27. Representación gráfica del modelo computacional.....	127
Figura 28. Predicciones del modelo computacional para la activación de NF- κ B por los distintos tratamientos.....	128
Figura 29. Predicciones del modelo computacional para la producción de ERO de acuerdo a los distintos tratamientos.....	130
Figura 30. Predicciones del modelo computacional para los cambios en el $\Delta\psi_m$ para los distintos tratamientos.....	131
Figura 31. Predicciones del modelo computacional para el mantenimiento de mitocondrias funcionales para cada tratamiento.....	132
Figura 32. Predicciones del modelo computacional para cambios en la expresión de neuroglobina.....	135
Figura 33. Predicciones del modelo computacional para los efectos del silenciamiento con RNAi.....	137
Figura 34. El PDGF-BB incrementa la translocación de NF- κ B en células HEK....	139
Figura 35. El PDGF-BB mantiene el potencial de membrana mitocondrial en células HEK.....	139
Figura 36. El PDGF-BB mantiene la viabilidad frente a insulto por rotenona en células HEK.....	140
Figura 37. Modelo de los distintos mecanismos del PDGF-BB y la rotenona estudiados en la presente investigación.....	158

Lista de símbolos y abreviaturas

%v/v Porcentaje volumen/volumen

g gramos

h horas

min minutos

ml mililitros

ng nanogramos

nm nanómetros

nM nanomolar

°C Grados centígrados

μl microlitros

μM micromolar

Abreviaturas

6-OHDA: 6-hidroxidopamina

8-OHdG: 8-Hidroxiguanosina

$\Delta\Psi_m$: Potencial de membrana interna mitocondrial

aa: Aminoácidos

Abs: Absorbancia

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ANOVA: Análisis de Varianza

APS: Persulfato de amonio

ATCC: American tissue cell culture

ATF6 α : factor de transcripción 6 α

ATP: Adenosin trifosfato

BAD: Bcl-2-associated death promoter

BAX: Bcl-2-associated X protein

BCA: Ácido bicinconínico

Bcl2: B-cell lymphoma 2, proteína reguladora de muerte celular

Bcl-xL: B-cell lymphoma-extra large

BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro

BSA: Bovine serum albumin - Albúmina sérica bovina

CAMKII: calmodulina kinasa 2

cCbl: Casitas B-lineage lymphoma- proteína adaptadora

CCCP: Carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona

c-fos: Fos proto-oncogene protein

c-jun: Jun proto-oncogene proteín

CREB: Camp response element-binding

DAG: Diacilglicerol

DCFA: Diclorofluoresceina diacetato

DHE: Dihidroetidina

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium -Medio Eagle modificado por Dulbecco

DMSO: Dimetil sulfóxido

EAAT: Transportador de aminoácidos excitatorios

EDTA: Ácido etilendiamino tetraacético

EGF: Epidermal growth factor

ELK-1: ETS domain-containing protein 1

ERK ½: Extracellular-signal-regulated kinase (isoformas 1 y 2)

ERO: Especies reactivas de oxígeno.

FGF: Factor de crecimiento fibroblástico

GABA: ácido γ -aminobutírico

GDNF: Factor neurotrófico derivado de células gliales

GFAP: Proteína Glial Fibrilar Ácida

GLAST: Transportador de glutamato-aspartato

GPx1: Glutation peroxidasa 1

GRP78/Bip: 78 kDa glucose-regulated protein

GSH: Glutación

GSK3 β : Glycogen synthase kinase 3 beta

H2O_{dd}: Agua ultrapura, destilada, desionizada

HGF: Hepatocyte growth factor

HBSS: Hanks' balanced salt solution

HIF-1 α : Hypoxia-inducible factor 1- α

HNE: 4-hydroxy-2-nonenal

Hsp: Heat shock protein- proteínas de choque térmico

IF: Inmunofluorescencia

IG: Dominio inmunoglobulina

IGF-I: Factor de crecimiento derivado de insulina tipo I

I κ B: Inhibitor of κ b

IKK α : I κ b kinase α

IL-1 β : Interleucina 1 Beta

IL-6: Interleucina 6

InsP3R: Receptor inositol (1,4,5)-trifosfato

IP: Ioduro de propidio

IP2: Fosfatidil inositol bifosfato

Ire1 α : Enzima dependiente de inositol 1 α

JNK: C-jun N-terminal kinase

LTA: ácido lipoteicoico

LTP: Potenciación de largos tiempos

MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase- protein quinasa activada por mitógenos

mRNA: RNA mensajero

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

MTT: Metil tiazol tetrazolium

NAO: Nonyl acridine orange

NF- κ B: Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NGF: Factor de Crecimiento Neural

NMDA: N-metil-D-aspartato

NO: Óxido Nítrico

Nrf2: Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2

PBS: Tampón fosfato salino

PDGF: Platelet Derived Growth Factor- Factor de Crecimiento derivado de Plaquetas

PDGFR: Receptor del Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PDK: Phosphoinositide Dependent protein Kinase

PI(4,5)P₂: Phosphatidyl Inositol 4,5-biphosphate

PI3K: Phospho Inositide 3-kinase -Fosfatidil inositol 3 quinasa

PKA: Proteína quinasa A

PKB: Proteína quinasa B

PKC: Proteína quinasa C

PLC γ : Fosfolipasa C gamma

Rac: subfamilia de GTPasas Rho.

RE: Retículo endoplasmático

Rho: Familia Rho de GTPasas

RNA: Ribonucleic acid

ROCK: Rho-associated protein kinase

ROS: Reactive oxygen species

SDS: Dodecil sulfato de sodio

SEM: Error estándar de la media

SFB: Suero fetal bovino

SH2: Src-homology 2 domain

SNC: Sistema nervioso central

SOD: Superóxido dismutasa

SP1: specificity protein 1, factor de transcripción

STAT: signal transducer and activator of transcription

TEMED: Tetrametilenetilendiamida

TGFβ1: Factor de crecimiento transformante-β1

TNF: Factor de necrosis tumoral

TMRM: Tetrametil rodamina éster metílico

TRIS: Tris(hidroximetil)aminometano

UA: Unidades arbitrarias

VDAC: Canal aniónico dependiente de voltaje

VEGF Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular

Veh: Vehículo

Wb: Western blot

1. RESUMEN

Los astrocitos cumplen un importante papel neuroprotector en las diversas patologías neurodegenerativas del sistema nervioso central (SNC) ya que le brindan a las neuronas soporte trófico, metabólico y antioxidativo, debido a que poseen concentraciones elevadas de la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa, el glutatión (GSH) y distintos factores de crecimiento como el BDNF, GDNF y PDGF. En situaciones donde los astrocitos no ejecutan tales funciones, como es el caso de la producción exacerbada de especies reactivas de oxígeno (ERO) y el daño mitocondrial, sobreviene inevitablemente la muerte neuronal. Estudios recientes sugieren que la alteración de las funciones astrocitarias se encuentra involucrada en la progresión de diversas enfermedades como Parkinson, Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica y otras. La producción de ERO conduce a la disfunción mitocondrial en los tejidos del sistema nervioso, acompañada por muerte neuronal excitotóxica y cambios morfológicos en las células del SNC, como son la activación astrocitaria y la inhibición de la regeneración neuronal en el sitio de la lesión. Diversos estudios han mostrado que las neuronas poseen una mayor susceptibilidad al daño oxidativo que los astrocitos, ya que estas poseen un menor número de mecanismos antioxidantes, siendo por lo tanto más propensas a la muerte celular. Por esta razón, los modelos *in vitro* relativos a la protección de las funciones astrocitarias antes mencionadas han sido considerados como una excelente aproximación en el estudio de las lesiones y enfermedades cerebrales. En este aspecto, se ha demostrado que el uso de factores de crecimiento como el BDNF, el FGF, el GDNF y el VEGF promueven actividades protectoras en neuronas y en células gliales en eventos como la excitotoxicidad, la producción de ERO, y la protección mitocondrial tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*, incluyendo procesos neurodegenerativos como el Parkinson. Igualmente, el factor de crecimiento derivado de plaquetas, isoforma B (PDGF-BB), el cual expresa su receptor (PDGFR- β), en distintos tipos celulares del SNC incluyendo los astrocitos, ha demostrado ejercer un efecto neuroprotector en demencia, modelos murinos de Parkinson, en insulto oxidativo por peróxido de hidrogeno y en protección excitotóxica de neuronas.

Con el objetivo de dilucidar los posibles efectos protectores del PDGF-BB en células astrocitarias frente al insulto oxidativo de la rotenona, fueron investigados en el presente estudio los diversos efectos ejercidos por este factor de crecimiento en la protección celular astrocitaria, utilizando herramientas tanto experimentales como computacionales. Nuestros resultados mostraron que el PDGF-BB incrementaba la viabilidad astrocitaria frente al daño de rotenona, además de proteger la morfología y el potencial de membrana mitocondrial, redujo la producción de ERO y la concentración del calcio intracelular. Adicionalmente, se encontró que el PDGF-BB activaba la vía PI3K/AKT, e incrementaba la expresión de proteínas protectoras como neuroglobina y GRP78. De manera similar se encontró que al silenciar la neuroglobina mediante un siRNA, se disminuían los efectos protectores del PDGF-BB en el mantenimiento del potencial de membrana mitocondrial y la producción de especies reactivas de oxígeno, sugiriendo que la neuroglobina se encuentra implicada en estas propiedades protectoras del PDGF-BB.

Por último, se desarrolló un modelo computacional reducido en el que se estudiaron los principales mecanismos de protección ejercidos por el PDGF-BB, tales como la disminución en la producción de ERO, el mantenimiento del potencial de membrana mitocondrial y el mantenimiento de la funcionalidad mitocondrial. Este modelo además permitió mostrar el comportamiento de estos parámetros de manera dinámica en el tiempo, complementando de esta manera nuestros resultados experimentales. En resumen nuestros resultados mostraron que el PDGF-BB protege a las células astrocitarias contra el daño oxidativo de la rotenona a través de múltiples mecanismos.

1.2. ABSTRACT

Astrocytes play an important neuroprotective role in the various neurodegenerative pathologies of the central nervous system (CNS) as they provide the neurons with trophic, metabolic and antioxidative support, because these cells have high activities of superoxide dismutase (SOD), catalase, Glutathione (GSH) and various growth factors such as BDNF, GDNF and PDGF. In situations where astrocytes do not perform those functions, such as the exacerbated production of reactive oxygen species (ROS) and mitochondrial damage, neuronal death inevitably ensues. Recent studies suggest that altered astrocyte functions are involved in the progression of various diseases such as Parkinson, Alzheimer, amyotrophic lateral sclerosis and others. The production of ROS leads to mitochondrial dysfunction in the brain tissues, accompanied by excitotoxic neuronal death and morphological changes in CNS cells, such as astrocytic activation and inhibition of neuronal regeneration at the site of the injury. Several studies have shown that neurons have a greater susceptibility to oxidative damage than astrocytes, since they have a lower level of antioxidant mechanisms and are therefore more prone to cell death. For this reason, the *in vitro* models related to the protection of the afore mentioned astrocyte functions have been considered as an excellent approximation in the study of brain injuries and diseases. In this regard, the use of growth factors such as BDNF, FGF, GDNF, and VEGF has been shown to promote protective activities in neurons and glial cells in events such as excitotoxicity, ROS production, and mitochondrial protection in both *in vitro* and *in vivo* models, including neurodegenerative processes such as Parkinson. Likewise, platelet-derived growth factor B (PDGF-BB), which expresses its receptor (PDGFR- β), in different CNS cell types including astrocytes, has been shown to exert a neuroprotective effect on dementia, murine models of Parkinson, in oxidative insult by hydrogen peroxide and in excitotoxic protection of neurons.

In order to elucidate the possible protective effects of PDGF-BB on astrocytic cells against the neurotoxic model of rotenone, we investigated in this study the different effects exerted by this growth factor on astrocyte cell protection to determine the possible modulation of the protective mechanisms against the neurotoxic model of rotenone using experimental and computational tools. Our results showed that PDGF-BB increased astrocytic viability versus rotenone insult, in addition to protecting morphology and mitochondrial membrane

potential, reduced ROS production and intracellular calcium concentration. Additionally, it was found that PDGF-BB activated the PI3K / AKT pathway, and increased the expression of protective proteins such as neuroglobin and GRP78. Similarly, it was observed that by silencing neuroglobin using an siRNA, the protective effects of PDGF-BB on the maintenance of mitochondrial membrane potential and the production of reactive oxygen species were decreased, suggesting that neuroglobin was involved in these protective properties of the PDGF-BB.

Finally, a reduced computational model was developed in which the main protective mechanisms exerted by PDGF-BB were assessed such as the decrease in the production of reactive oxygen species (ROS), the maintenance of mitochondrial membrane potential and the maintenance of mitochondrial functionality. This model also showed the behavior of these parameters dynamically over time, thus complementing our experimental results. In summary our results showed that PDGF-BB is protecting astrocyte cells against the oxidative damage of rotenone through multiple mechanisms.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN Y JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades neurodegenerativas son uno de los principales problemas de salud pública en el mundo. Se ha estimado que para el año 2020 existirán alrededor de 40 millones de personas afectadas en el mundo por patologías como Alzheimer, enfermedad de Parkinson (EP), epilepsia, esclerosis múltiple y accidentes cerebrovasculares. Igualmente, se espera que para el 2030, la mortalidad por enfermedades neurodegenerativas llegue al 12.22% del total (WHO, 2006; Hyder et al., 2007). Por su parte, en Colombia, la EP es la segunda enfermedad neurodegenerativa con mayor prevalencia después del Alzheimer, estimándose que para el 2014 había alrededor de 230.000 pacientes con esta enfermedad lo cual equivale a 4,7 personas por cada 1000 habitantes (Pradilla 2003; Castro-Toro y Buritica, 2014).

La EP se manifiesta con una heterogeneidad de síntomas tales como temblor, bradicinesia, hipertonía muscular, inestabilidad postural y alteraciones cognoscitivas y del lenguaje, que afectan gravemente la calidad de vida de los pacientes que la padecen (Castro-Toro y Buritica, 2014). Estos síntomas son producto de la degeneración selectiva de las neuronas dopaminérgicas (DA) de la *substantia nigra pars compacta* (Figura 1), que resulta en una disminución exacerbada en los niveles de dopamina (Liu et al., 2003; Nutt et al., 2005; Halliday y Stevens, 2011).

Actualmente se piensa que las principales causas implicadas en la aparición de la EP son tanto de tipo genético y/o idiopático (Pradilla, 2003; Castro-Toro y Buritica, 2014). Por un lado se han identificado varios genes involucrados en la aparición de esta enfermedad como el *PARK8*, *PARK2*, *PARK7 (DJ-1)*, *PINK1*, y *SNCA* los cuales codifican para proteínas como la parkina y a la α -sinucleína, que se acumulan en placas o cuerpos de Lewy en las neuronas dopaminérgicas (Liu et al., 2003). Es importante mencionar que varias de estas proteínas como LRRK2, PINK1 y PARK7 (DJ-1) están implicadas en la regulación de funciones mitocondriales (Figura 1) que se ven afectadas durante el desarrollo de la EP, tales como el mantenimiento del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) y la

sobreproducción de ERO (Knott et al., 2008; Wang et al., 2011). Igualmente, se ha sugerido que la respuesta a proteínas desplegadas (UPR) se encuentra involucrada en el desarrollo de la EP (Gorbatyuk et al., 2012; Hashida et al., 2012; Varma y Sen, 2015). En este caso, se piensa que los niveles incrementados de ERO (Especies reactivas de oxígeno) y la disrupción en los niveles de calcio que ocurren durante el desarrollo de la EP produce el incremento en la acumulación de proteínas mal plegadas, entre ellas la α -sinucleína, lo cual a su vez induce la activación de proteínas reguladoras de la UPR como son la quinasa PERK, la enzima dependiente de inositol 1α (Ire1 α), el factor de transcripción 6α (ATF6 α), y la chaperona GRP78/Bip (Wang et al., 2009; Gorbatyuk et al., 2012; Hashida et al., 2012; Varma y Sen 2015).

Por otro lado, varios estudios han demostrado que la producción y acumulación de factores citotóxicos producen alteraciones neurodegenerativas en las neuronas (Betarbet et al., 2000; Menza et al., 2010; Berry et al., 2010; Wachter et al., 2010). La neurotoxicidad se ha atribuido a altos niveles de ERO, óxido nítrico, IL-1 β , IL-6, y TNF α las cuales pueden afectar a los procesos energéticos mitocondriales de las neuronas dopaminérgicas, activando vías apoptóticas (Figura 1) a través de citocromo C y caspasa 3 (Menza et al., 2010).

Igualmente se han visto implicados factores ambientales y ocupacionales relacionados con una mayor prevalencia en la aparición de la EP, tales como la exposición a pesticidas y herbicidas (entre ellos la rotenona y el paraquat) por parte de trabajadores agrícolas, interacciones genético ambientales, factores dietarios como el consumo de grasas poliinsaturadas, UPR o la composición del microbioma intestinal. (Betarbet et al., 2000; Castro-Toro y Buritica, 2014; Kligelhoefner y Reichmann, 2015).

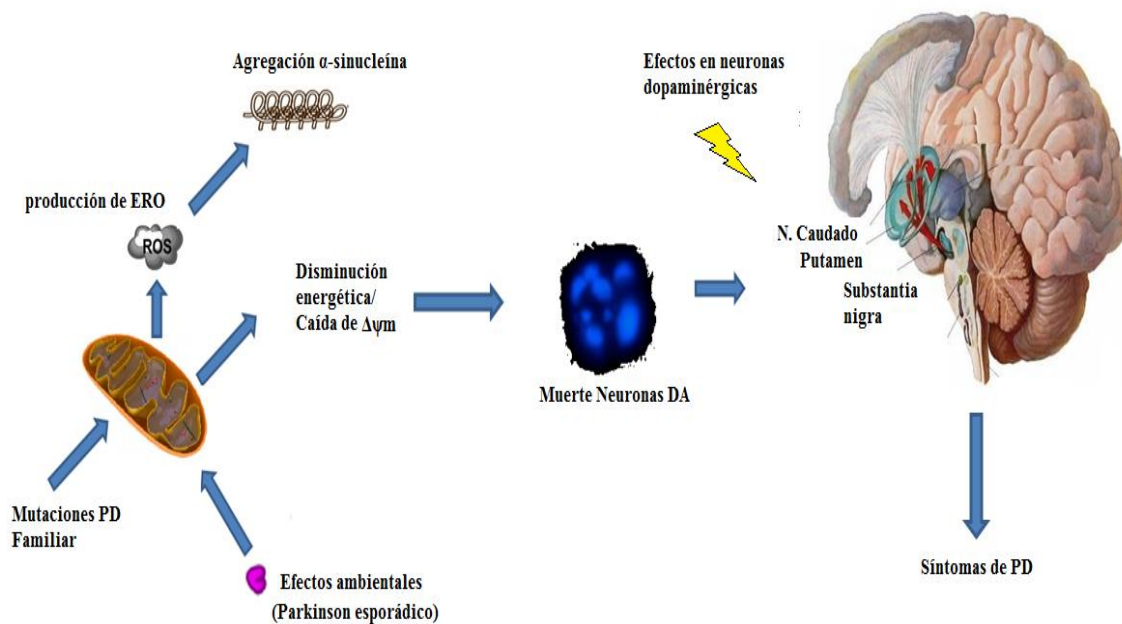


Figura 1. Efectos mitocondriales en la EP. Durante el desarrollo de esta enfermedad, se presentan alteraciones en proteínas mitocondriales como la parkin (PARK2) o PINK1, debidas a mutaciones o efectos ambientales, las cuales generan daños mitocondriales que conducen a incrementos en la producción de ERO, caída en el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi m$), formación de agregados de α -sinucleína y activación de mecanismos apoptóticos en las DA, que conducen a la activación de síntomas asociados con la EP (Modificado de <http://www.news-medical.net/health/Parkinsons-Disease-Pathophysiology.aspx>).

Por otra parte, los tratamientos farmacológicos actuales contra la EP, tales como la levodopa, la carbidopa, los agonistas de receptores de dopamina e inhibidores de la COMT (catecol-*O*-metiltransferasa) o de la MAO-B (Monoaminoxidasa) y la estimulación cerebral profunda (ECP) son sintomáticos y se enfocan en mantener o prolongar la funcionalidad del paciente, sin interferir en la progresión de la enfermedad (Agid, 1998; Hauser et al., 2006; Bronstein et al., 2011; Post et al., 2011). Igualmente estos tratamientos farmacológicos conllevan complicaciones motoras en un 50-90% de los casos junto con una pérdida en su eficacia al cabo de 2 a 5 años (Hauser et al., 2006). Por esta razón, ha sido necesario buscar nuevos tratamientos y metodologías para esta patología incluyendo el uso de simvastatina y otros agentes no esteroideos, sobreexpresión de proteínas chaperonas como la GRP78 para disminuir el mal plegamiento y la toxicidad por α -sinucleína, el

transplante de células madre mesenquimales y la utilización de factores de crecimiento entre otras (Correia et al., 2005; Yacoubian y Standaert, 2009; Gorbatyuk et al., 2012; Zachrisson et al., 2015).

Distintos factores de crecimiento como el FGF (Factor de crecimiento de Fibroblastos), el BDNF (Factor neurotrófico de cerebro), el VEGF (Factor de crecimiento endotelial vascular), NGF (Factor de crecimiento nervioso) y el PDGF (Factor de crecimiento derivado de plaquetas) han sido utilizados en diversos modelos de neuroprotección incluyendo líneas celulares, modelos animales y pruebas clínicas. Se ha observado que estos factores de crecimiento protegen neuronas y células gliales contra insultos excitotóxicos y oxidativos a través de la producción de enzimas antioxidantes, chaperonas, activación de vías celulares de supervivencia y protección mitocondrial (Mattson, 2008; Falk 2009; Ramaswamy et al., 2009; Yacoubian y Standaert, 2009; Henriques et al., 2010; Zachrisson et al., 2011; Zachrisson et al., 2015). Pero por otro lado, varios de estos factores de crecimiento (como el BDNF y el NGF), al ser utilizados en pruebas clínicas mostraron efectos secundarios nocivos tales como náuseas y dolores extremos (Weissmiller y Wu, 2012).

En el caso del PDGF, se ha mostrado que sus diferentes isoformas poseen efectos neuroprotectores frente a daños isquémicos en neuronas piramidales de rata, el insulto con NMDA (N-metil-D-aspartato) en retina de modelos murinos, la 6-OHDA en neuronas, la toxina TAT del VIH (Iihara, 1997; Tang et al., 2010; Zachrisson et al., 2011; Peng et al., 2012). Igualmente, pruebas clínicas recientes han mostrado que la infusión intracerebroventricular con distintas dosis de PDGF-BB no producía efectos adversos en pacientes (Zachrisson et al., 2015). Estos resultados sugieren que el PDGF-BB posee importantes efectos promisorios en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas incluyendo la EP.

Si bien en la EP las neuronas dopaminérgicas son las principales células afectadas, numerosos estudios han mostrado la participación de las células gliales (microglía, astrocitos y oligodendroglía) en el desarrollo de los eventos inflamatorios y en los procesos

degenerativos que acompañan a esta enfermedad (McGeer et al., 2008; Mena et al., 2008; Swarnkar et al., 2012; Ahmed et al., 2013; More et al., 2013). Se ha visto por ejemplo, un incremento en la reactividad astrocitaria en cerebros de pacientes post-mortem con EP (Hirsch et al., 2005), junto con incrementos en la liberación de interferón- γ y factores neurotróficos por parte de astrocitos, niveles elevados de glutatona peroxidasa (GPx) e incrementos en la endocitosis de α -sinucleína por parte de los astrocitos (Chung et al., 2016; Bruck et al., 2016). Estos estudios demuestran una alteración en las funciones astrocitarias normales durante el desarrollo de patologías como la EP, que pueden conducir a un incremento en el deterioro neuronal y la aparición de los síntomas que acompañan a la enfermedad.

Teniendo en cuenta que las funciones astrocitarias como el soporte trófico, metabólico y la producción de factores neurotróficos y antioxidantes son indispensables para la supervivencia neuronal, existe la posibilidad de que las estrategias y metodologías que incrementan la protección de las funciones astrocitarias podrían generar de manera directa e indirecta una mayor protección neuronal que a su vez conllevaría una disminución en la aparición de los síntomas asociados a las enfermedades neurodegenerativas.

Tomando en cuenta lo anterior, el presente estudio se fundamentó en la búsqueda de nuevas metodologías de protección astrocitaria, utilizando el PDGF-BB frente a un daño oxidativo inducido por la toxina rotenona. Igualmente, se buscó aportar evidencia sobre los mecanismos específicos de protección y la activación de nuevas moléculas protectoras como neuroglobina (ngb) y GRP78 por parte del PDGF-BB, procurando potenciar el diseño de estrategias terapéuticas dirigidas a frenar el daño oxidativo mitocondrial en EP. Como parte de nuestros resultados hemos publicado los artículos originales "*PDGF-BB protects mitochondria from rotenone in T98G cells*"; en la revista Neurotoxicity Research (FI: 3.14) (4):355-67 y "*PDGF-BB preserves mitochondrial morphology, attenuates ROS production and upregulates neuroglobin in an astrocytic model under rotenone insult*" en la revista Molecular Neurobiology (FI: 5.39) junto con varios artículos de revisión y capítulos de libro (ver Anexos).

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Funciones astrocitarias: interacciones entre neuronas y astrocitos

Los astrocitos son el tipo de célula más común en el cerebro de los mamíferos, y conforman la glía junto con los oligodendrocitos y las células microgliales (Chen y Swanson, 2003). Estas células están organizadas en una red sincitial fuertemente comunicada entre sí y a su vez, con otras células como pericitos, células endoteliales y neuronas (Bushong et al., 2002). Los astrocitos (Figura 2) son fundamentales para procesos tales como el desarrollo y/o mantenimiento de la barrera hematoencefálica, la promoción del acoplamiento neurovascular, atracción de las células a través de la liberación de quimiocinas, liberación de gliotransmisores, regulación de niveles de calcio, liberación y transporte de glutamato por señalización de calcio a través de los transportadores GLAST y EAAT, el mantenimiento del metabolismo general del cerebro, el control del pH cerebral, la captación de GABA (ácido γ -aminobutírico) por transportadores específicos y la producción de enzimas antioxidantes (Volterra y Meldolesi, 2005; Hamby y Sofroniew, 2010; Kimelberg y Nedergaard 2010; Parpura et al., 2011).

Durante el daño cerebral (por ejemplo, la inducción de estrés oxidativo), estos procesos se ven transitoria o permanentemente afectados y el consiguiente impacto en las células neuronales puede llevar a condiciones patológicas y enfermedades neurodegenerativas tales como isquemia, Alzheimer y EP (Hamby y Sofroniew, 2010; Kimelberg y Nedergaard, 2010). En este aspecto es importante resaltar que las neuronas son más susceptibles a lesiones que los astrocitos, ya que poseen una menor capacidad antioxidante y requieren en gran medida del acoplamiento metabólico con los astrocitos para combatir el estrés oxidativo (Hamby y Sofroniew, 2010). Tanto en circunstancias normales y después de una lesión cerebral, los astrocitos le dan soporte a las neuronas proporcionando protección antioxidante, factores neurotróficos, sustratos para el metabolismo neuronal y la recaptación de glutamato (Barreto et al., 2011; Greve y Zink, 2009). Aunque los astrocitos son generalmente más resistentes que las neuronas lesionadas por eventos traumáticos o

degenerativos, estos también pueden sufrir un daño severo, lo cual aumenta la muerte neuronal (Greve y Zink, 2009).

Los astrocitos responden a todo tipo de insultos cerebrales (infecciones, traumatismos, isquemia, estrés oxidativo, enfermedades neurodegenerativas) por un proceso denominado astrogliosis reactiva. Este proceso implica cambios tanto morfológicos como moleculares (Figura 2) incluyendo incrementos en la expresión de GFAP (Proteína Ácida Fibrilar Glial), vimentina, nestina y RhoA, la captación de glutamato, protección contra el estrés oxidativo mediante la producción de glutatión, neuroprotección por la liberación de adenosina, la degradación de los péptidos beta-amiloides, la regulación de la barrera hematoencefálica, la formación de cicatrices gliales. Es importante resaltar que en algunos casos, los astrocitos reactivos pueden liberar citoquinas inflamatorias, incluyendo el factor de necrosis tumoral (TNF) y la producción de ERO (Sugaya et al., 1998; Fitch y Silver, 2008; Duffy et al., 2009; Jarlestedt et al., 2010; Hamby y Sofroniew, 2010; Kang y Hebert, 2011).

En el caso de la EP, hay información conflictiva respecto al papel de la astrogliosis durante el desarrollo de la enfermedad. Algunos estudios reportan que un incremento en el número de astrocitos reactivos es una indicación de que estos son de gran importancia en la reparación de neuronas dopaminérgicas (Chen et al., 2005; Episcopo et al., 2013), mientras que otros estudios muestran que la presencia de astrocitos reactivos en tejidos postmortem de pacientes con EP es bastante baja (Song et al., 2009; Tong et al., 2015), lo que sugiere que la acumulación excesiva de α -sinucleína podría suprimir la protección ejercida por los astrocitos. Por lo tanto es necesario realizar estudios adicionales sobre la activación astrocitaria en el contexto del desarrollo de la EP.

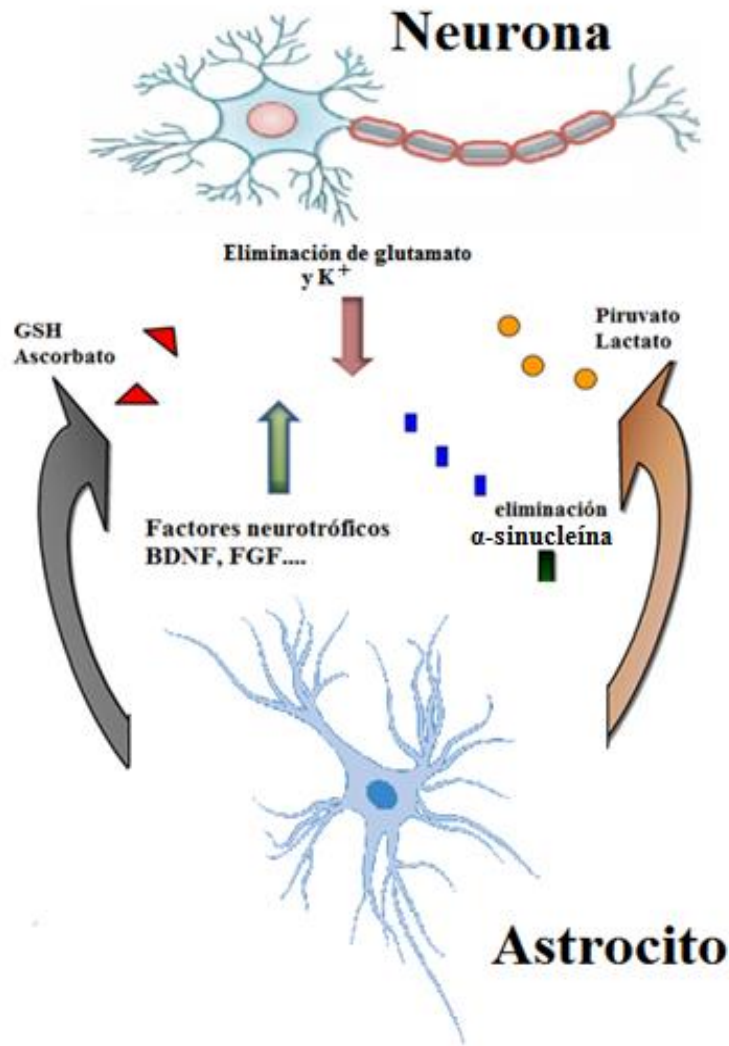


Figura 2. Funciones astrocitarias. Los astrocitos son indispensables para el mantenimiento de las funciones neuronales, ya que cumplen un papel importante en la eliminación de sustancias tóxicas como el glutamato, el potasio (K^+), o la α -sinucleína en exceso, además de proveer a la neurona con metabolitos de importancia energética como lactato y piruvato, factores neurotróficos como BDNF y FGF y sustancias antioxidantes como glutatona (GSH) y ascorbato (Modificado de Barreto et al., 2011).

Por otra parte, se han utilizado distintas toxinas biológicas o ambientales, especialmente herbicidas y pesticidas como la rotenona, el Paraquat o el MPTP en modelos de la EP, ya que estas pueden inducir tanto reactividad astrocitaria y microgliosis, como muerte neuronal, disfunción mitocondrial, producción de estrés oxidativo y fragmentación nuclear (Niranjan et al., 2010; Samantaray et al., 2007; de Oliveira et al., 2009; Zhu et al., 2009), procesos que se asemejan a lo que ocurre durante los estadios iniciales de la enfermedad de Parkinson (Betarbet et al., 2000).

3.2. El modelo de rotenona en la enfermedad de Parkinson

La rotenona es uno de los principales compuestos aislados de plantas que funciona como insecticida. Estructuralmente se trata de un flavonoide, altamente lipofílico, que se extrae de las raíces de plantas del género *Derris* y *Lonchocarpus* de la familia Leguminosae (Isman, 2006; Robertson y Smith-Vaniz, 2008). Su principal modo de acción es a través de la inhibición del transporte de electrones en el complejo I mitocondrial, bloqueando la producción de ATP y en consecuencia afectando el metabolismo celular (Betarbet et al., 2000; Heinz et al., 2017). Esta inhibición de la cadena respiratoria mitocondrial conduce a un aumento en la producción de ERO, tales como peróxido de hidrógeno y del radical superóxido junto con peroxidación de la membrana celular (Li et al., 2003; Bashkatova et al., 2004; Cabezas et al., 2012; Swarnkar et al., 2012; Heinz et al., 2017).

Entre los efectos celulares y moleculares ocasionados por la rotenona se encuentra la degeneración selectiva del sistema nigrostriatal dopaminérgico, activación de astrogliya y microglia, formación y acumulación de una forma alterada de las proteínas α -sinucleína y tau asociada con daños de neuronas motoras, estrés de retículo endoplasmático, UPR, sobreexpresión de chaperonas como la GRP78, alteraciones en la formación axonal asociadas con disminución en la actividad de Cdc42 y Rac y activación de vías apoptóticas mediadas por BAD y por las caspasas 3 y 9 (Betarbet et al., 2000; Watabe et al., 2004;

Hoglinger et al., 2005; Isman 2006; Liu et al., 2003; Ogawa et al., 2005; Chen et al., 2008; Sanchez et al., 2008; Tiwari et al., 2011). Igualmente, se ha determinado que la rotenona puede actuar de manera independiente de sus efectos inhibitorios sobre el complejo I, por ejemplo al afectar la estabilidad de los microtúbulos, inhibiendo la expresión de la conexina 43 en astrocitos, afectando la homeostásis del calcio, produciendo daños de respuesta del ADN, o causando respuestas inflamatorias y efectos disruptivos sobre el ciclo celular (Sherer et al., 2003; Zhang et al., 2011; Cabeza-arvelaiz y Schiestl, 2012).

Como modelo neurodegenerativo, la rotenona ha sido utilizada exitosamente en estudios *in vitro* e *in vivo* de la EP, debido a la similitud entre los efectos celulares y moleculares producidos por esta toxina y los síntomas de esta enfermedad (Betarbet et al., 2000; de Oliveira et al., 2009, 2010; Tanner et al., 2011). La rotenona ha sido utilizada en líneas celulares como la SH-SY5Y (humana neuronal), modelos animales y evidencia epidemiológica (De Oliveira et al., 2010; Betarbet et al., 2000; Liu et al., 2003; Tanner et al., 2011). Al respecto se ha mostrado que en ratones y ratas, la administración continua de rotenona reproduce algunas de las características de la EP, incluyendo la degeneración selectiva de las neuronas dopaminérgicas, disfunción mitocondrial e incremento en producción de ERO, la activación astrocitaria y de microglia, formación de inclusiones citoplasmáticas neuronales y trastornos motores (Betarbet et al., 2000; Greenamyre et al., 2010; Höglinger et al., 2005; Liu et al., 2003; Ogawa et al., 2005; Pan-Motojo et al., 2010; Perier y Vila, 2012). Por último, en un estudio del Instituto de Salud de los Estados Unidos (NIH), se encontró que las personas con exposición al pesticida rotenona tienen 2,5 veces más probabilidades de desarrollar la EP que quienes no lo han empleado (Tanner et al., 2011), siendo importante el uso de guantes y otras medidas de protección para impedir la exposición a este pesticida (Furlong et al., 2015). En conjunto estos datos sugieren la relevancia del modelo de daño tóxico por rotenona en el estudio de enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson. Junto con la rotenona han sido utilizado otros compuestos en el estudio experimental de la EP en modelos tanto celulares como animales (Figura 3), tales como la 6-OHDA (6-hidroxidopamina), el pesticida Paraquat (N,N'-dimethyl-4,4'-bipyridinium dichloride) y el MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina), un metabolito secundario producido a partir de la síntesis de heroína

(Bové et al., 2005; McGeer y McGeer, 2008; Sonsalla et al., 2008; Berry et al., 2010; Wachter et al., 2010).

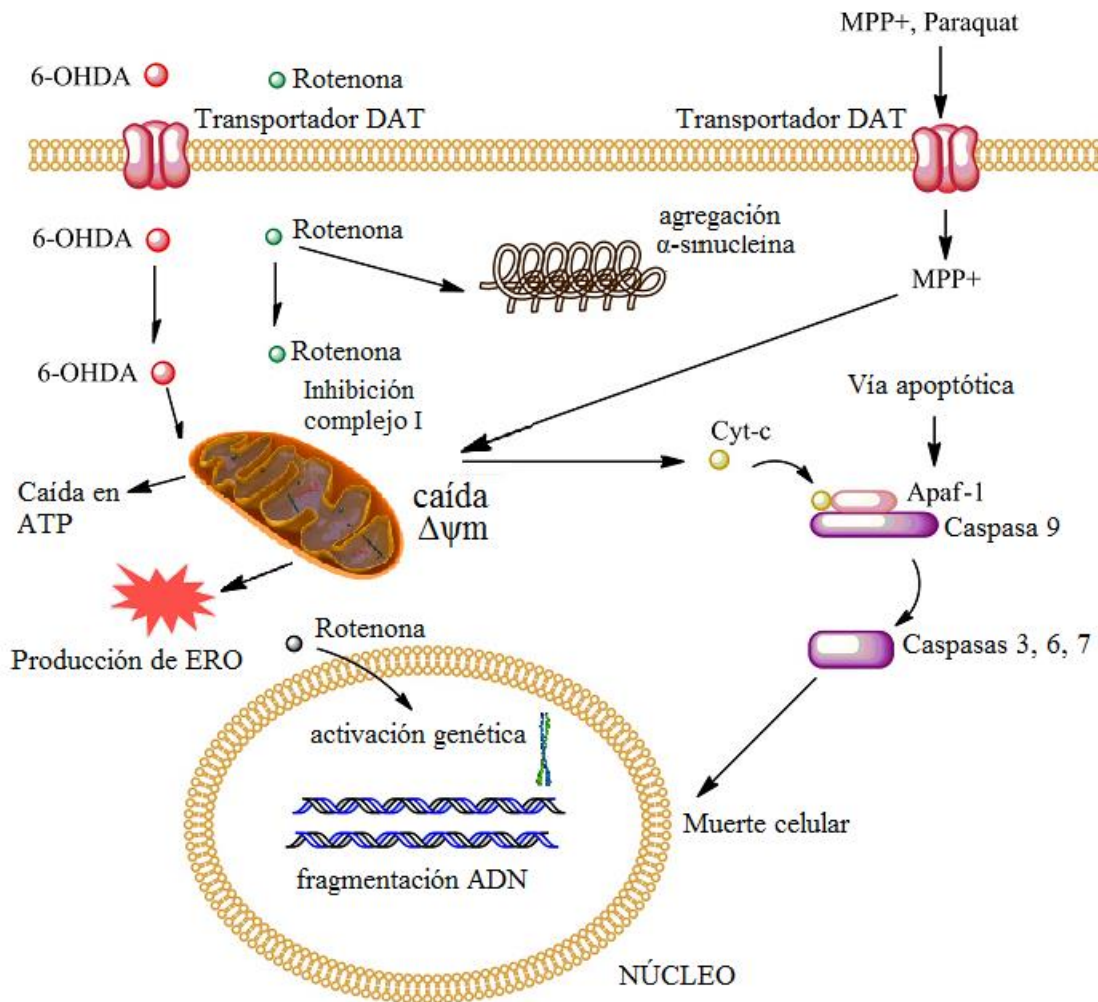


Figura 3. Rotenona y otros modelos experimentales en la enfermedad de Parkinson. Diversas tóxicas se han utilizado como modelos experimentales en la EP incluyendo plaguicidas como el paraquat o la rotenona y neurotoxinas como la 6- hidroxidopamina (6-OHDA) y el MPP⁺. El Paraquat, la 6-OHDA y el MPP⁺ utilizan el transportador de dopamina (DA) para ingresar a las neuronas dopaminérgicas, mientras que la rotenona debido a su estructura lipofílica no requiere de este transportador. Estas toxinas pueden inducir alteraciones celulares y moleculares como la inhibición del complejo I mitocondrial, formación de agregados de α -sinucleína, disminución en la producción de ATP, generación de ERO y la liberación de moléculas pro-apoptóticas, tales como el citocromo C el cual activa la caspasa 9 y desencadena la activación apoptótica de neuronas dopaminérgicas por activación de las caspasas 3, 6 y 7 (Modificado de Cabezas et al., 2012).

3.3. Factores de crecimiento y neuroprotección

Varios factores neurotróficos han demostrado proteger a las neuronas y a las células gliales contra la excitotoxicidad y otros procesos neurodegenerativos. Por ejemplo, el BDNF protege a las neuronas contra la excitotoxicidad mediante la activación del factor de transcripción NF- κ B, que induce la expresión de enzimas antioxidantes tales como Mn-SOD y proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 y el inhibidor de las proteínas pro-apoptóticas (IAP; Lee et al., 1997; Mattson, 2008). Igualmente, la administración del BDNF ha demostrado proteger a las neuronas de la *substantia nigra* contra la toxicidad ejercida por la 6-OHDA o el pesticida MPTP en modelos parkinsonianos de ratones y primates (Ramaswamy et al., 2009).

Otro estudio ha mostrado que el VEGF aumenta su expresión en cerebro de rata después de un tratamiento con 40 nM de rotenona y produciendo un incremento de la supervivencia neuronal tras este daño (Falk et al., 2009). El Factor de Crecimiento de Fibroblastos Básico (bFGF) protege a las neuronas corticales y del hipocampo contra la toxicidad del glutamato mediante el cambio de la expresión de los receptores de NMDA y de enzimas antioxidantes como la SOD y la glutatión reductasa (Mattson, 2008). Igualmente (Hsuan et al., 2006) , se ha reportado que el pretratamiento con bFGF atenúa la muerte por apoptosis inducida por rotenona en células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y), mediante la activación de ERK1/2 y PI3K (Fosfatidil inositol 3-quinasa). Por otra parte, el Factor Neurotrófico Derivado de células Gliales (GDNF), secretado por astrocitos, aumenta la resistencia dopaminérgica neuronal a la toxicidad por 6-OHDA, lo que indica un papel de este factor de crecimiento en la neuroprotección (Safi et al., 2011). Por otra parte, los factores de crecimiento similares a la insulina (IGFs) pueden proteger a las neuronas contra la excitotoxicidad tanto en modelos *in vitro* como *in vivo* por activación de la vía de señalización PI3K /Akt (Aberg et al., 2006; Mattson, 2008; Pang et al., 2010). En este aspecto se ha reportado que el IGF-I afecta al metabolismo de glucosa en los astrocitos y las neuronas en el cerebro adulto a través del incremento en la expresión de los transportadores GLUT3 y 4, aumentando así la absorción de glucosa que puede tener efectos neuroprotectores y antiapoptóticos (Aberg et al., 2006).

Igualmente, estudios recientes han utilizado trasplantes de neuronas dopaminérgicas o de células precursoras gliales en regiones lesionadas del cerebro para aumentar la expresión de factores de crecimiento como BDNF, GDNF e IGF, ejerciendo de esta forma un efecto restaurativo (Hauser, 2011; Jankovic y Poewe, 2012; Proschel et al., 2014). Por ejemplo, un estudio reciente de Proschel y colaboradores (2014) mostró que el trasplante de células precursoras gliales en ratas lesionadas con 6-OHDA provocaba la recuperación de las neuronas DA del cuerpo estriado junto con un incremento de los niveles de GSH, GDNF y BDNF. De manera similar, en nuestro grupo de investigación, se ha empleado el medio condicionado de células madre mesenquimales en la protección oxidativa por privación de glucosa en células astrocitarias T98G, ya que este medio posee gran número de factores de crecimiento como VEGF, FGF, HGF e IGF (Torrente et al., 2013; Baez et al., 2017).

3.4. Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)

El PDGF-BB es un importante factor mitogénico producido por distintos tipos celulares como plaquetas, megacariocitos, fibroblastos, células del músculo liso, neuronas, oligodendrocitos y astrocitos (Krupinski et al., 1997; Board y Jayson, 2005; Kang, 2007; Trojanowska, 2008; Yu et al., 2001, 2003; Funa y Sasahara, 2014). Se ha encontrado que el PDGF-BB induce el desarrollo embrionario y vascular, la curación de heridas *in vivo* además de regular procesos de quimiotaxis, supervivencia, apoptosis y transformación celular *in vitro* (Yu et al., 2003; Andrae, 2008).

El PDGF es un dímero de aproximadamente 30 kDa perteneciente a la familia del PDGF/VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascular) y hasta el momento se han identificado cinco composiciones diméricas o isoformas: PDGF-AA, -BB, -AB, -CC y -DD (Andrae, 2008; Yu et al., 2003). Las cinco isoformas diméricas de PDGF muestran diferente habilidad para unirse y activar los dos receptores tipo tirosina-quinasa del PDGF: PDGFR α y PDGFR β (Heldin et al., 1998; Heldin y Westermark, 1999; Fredriksson et al., 2004). Como es el caso de la mayoría de receptores tipo tirosina quinasa, la unión del ligando y la posterior dimerización de las subunidades promueve la fosforilación recíproca

de los residuos de tirosina en el dominio intracelular (Andrae, 2008). Los receptores tirosina quinasa PDGFR α y PDGFR β poseen una estructura común con cinco dominios extracelulares de tipo inmunoglobulina (IG) y un dominio intracelular tirosina quinasa. Esta estructura es compartida con otros receptores tales como c-Kit, c-Fms y Flt (Kazlauskas et al., 1989; Andrae, 2008). Una vez fosforilado el receptor, pueden activarse varias vías de señalización como la proteína mitógeno quinasa activada (MAPK), PI3K (fosfatidilinositol 3 -quinasa), la vía Wnt, y de la fosfolipasa C (PLC) Adicionalmente, se ha reportado que los distintos ligandos del PDGF, pueden inducir la activación de factores de transcripción tales como Nrf2 (Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2), STAT, ELK-1, c-jun/c-fos, HIF-1 α ,NF- κ B (Heldin et al., 1999; Romashkova y Makarov, 1999; Kang, 2007; Andrae, 2008; Shin et al., 2009; Iqbal et al., 2012; Ashino et al., 2013).

Se ha establecido que los receptores PDGFR α y PDGFR β cumplen funciones distintas en el organismo tras su activación (Andrae et al., 2008; Shim et al., 2010). El PDGFR α se ha visto involucrado en el control de la gastrulación y el desarrollo de órganos como el pulmón, los intestinos, la piel, los testículos, y el riñón, mientras que la señalización por PDGFR β cumple funciones importantes en la hematopoyesis temprana y la formación de vasos sanguíneos (Shim et al., 2010). La evidencia actual muestra que se pueden generar tanto homodímeros como heterodímeros AB, los cuales se unen con afinidad diferencial a los receptores del sistema PDGF (Andrae, 2008). Los dímeros PDGF-AA y PDGF-CC se unen al PDGFR α mientras que el PDGF-BB muestra una mayor afinidad por el PDGFR β , si bien también puede unirse con el PDGFR α , ya que este receptor posee una mayor promiscuidad estructural (Andrae, 2008 ; Torrente et al., 2015).

3.5. Mecanismos de protección asociados al PDGF-BB

Dentro de los mecanismos de señalización implicados en efectos protectores del PDGF-BB se ha sugerido la activación de vías antiapoptóticas y de supervivencia, tales como MAPK, PI3K-AKT, JNK y NF- κ B (Romashkova y Makarov, 1999; Wang et al., 2010; Zheng et al., 2010). Al respecto, se ha mostrado que la activación de estas vías de señalización son dependientes del influjo de calcio al interior de la célula, el cual afecta la fosforilación de proteínas neuroprotectoras como GSK3 β y β -catenina (Zhu et al., 2009; Peng et al., 2012). Igualmente, se ha sugerido que el PDGF-BB puede activar mecanismos implicados en la modificación del citoesqueleto y la migración celular mediante la activación del fosfatidilinositol 3,4,5, el cual activa la proteína Rac GTPasa de la familia Rho, que se encuentra involucrada en la modificación del citoesqueleto de actina y cambios morfológicos (Nobes et al., 1995; Li et al., 2010; Ball et al., 2012). Adicionalmente, se ha reportado que el tratamiento con PDGF-AB en fibroblastos lesionados incrementa el volumen mitocondrial y el área superficial de las crestas, sugiriendo que el PDGF-AB puede inducir cambios ultraestructurales relacionados con un incremento en los requerimientos energéticos, como los que se producen durante la recuperación frente a las lesiones (Gosslau et al., 2001). Otro mecanismo de señalización activado por los ligandos del PDGF está mediado por los activadores transcripcionales STATs, los cuales son importantes en procesos como proliferación, diferenciación, supervivencia y transformación celular (Simon et al., 2001; Kang, 2007). La activación de STATs 1, 3 y 6 por parte de los ligandos del PDGF se ha visto en células vasculares musculares, en procesos tales como la remodelación de vías aéreas en pacientes con asma (Simon et al., 2001). Esta activación al parecer es dependiente de la producción de H₂O₂, como resultado de la activación de la enzima transmembranal NOX (NADPH oxidase/Dual oxidase enzyme), la cual es independiente de la producción de ERO por parte de la mitocondria (Simon et al., 2001; Kang, 2007). Sin embargo, no ha sido establecida la implicación de las distintas isoformas del PDGF en la producción de ERO en sistema nervioso, ni cuáles serían los efectos durante este proceso. Es posible que la producción de peróxido de hidrógeno por parte de los ligandos del PDGF posea efectos benéficos, por ser este un segundo mensajero intermediario en las vías de señalización activadas por los STATs, y en

la regulación de proteínas fosfatasa corriente abajo (Thannickal et al., 2000; Simon et al., 2001; Kang, 2007). Igualmente se ha sugerido que PDGF-BB puede activar el factor de transcripción NF- κ B mediante la regulación de la vía PI3K/AKT en procesos como el control del crecimiento celular, diferenciación, apoptosis y respuesta al estrés, disminuyendo la expresión de genes como MMP-9 (Metaloproteínasa de matriz 9) y VEGF (Romashkova y Makarov, 1999; Wang et al., 2010).

Por su parte, la activación de PI3K/AKT conduce a la inactivación de la quinasa GSK3 β , la cual en su forma inactivada impide la degradación de β -catenina, incrementando su acumulación en el citoplasma y causando su translocación hacia el núcleo, donde puede contribuir a la activación de genes asociados con la supervivencia celular (Peng et al., 2012). Adicionalmente, la β -catenina se encuentra relacionada con la homeostasis mitocondrial, la regulación de producción de ATP y la oxidación de lípidos (Lehwald et al., 2012; Arrázola et al., 2015). Estas funciones de la β -catenina son dependientes de condiciones nutricionales y el estrés oxidativo (Lehwald et al., 2012). Igualmente, Avila-Gómez y colaboradores (2010) mostraron que el IGF-I protege a linfocitos humanos mediante la activación de PI-3K/AKT, la regulación de p53 y el mantenimiento del $\Delta\Psi_m$ (Avila-Gómez et al., 2010). Teniendo en cuenta que el IGF-I induce la activación de β -catenina mediante PI-3K/AKT (Desbois-Mouthon, 2001), podría ocurrir que esta activación conllevara una subsecuente protección mitocondrial. No se ha examinado sin embargo, la posibilidad de que otros factores de crecimiento tales como PDGF-BB pudieran activar este mecanismo de protección mitocondrial. De manera alternativa, se ha mostrado que PI3K/AKT ejerce una regulación negativa sobre los factores de transcripción FOXO (Forkhead transcription factors), los cuales están involucrados en la supervivencia celular, la regulación del estrés oxidativo y la polarización de la membrana mitocondrial (Burgering et al., 2003; Kato et al., 2006), sugiriendo la importancia de la vía PI3K/AKT en estos mecanismos celulares (Figura 4).

También se ha observado que las distintas isoformas de PDGF poseen importantes funciones neuroprotectoras y regenerativas en varios modelos de investigación (Iihara et al., 1997; Krupinski et al., 1997; Tang et al., 2010; Zachrisson et al., 2011; Peng et al., 2012;

Zachrisson et al., 2015). Por ejemplo, se han observado incrementos en los ligandos PDGF-AA y PDGF-BB y en los receptores PDGFR α y PDGFR β en muestras cerebrales de pacientes con isquemia (Krupinski et al., 1997; Sakata et al., 1998). Igualmente se mostró que dosis de 120-240 ng/mL de PDGF-BB en condiciones de pretratamiento disminuían la muerte de neuronas piramidales en ratas durante daños isquémicos (Iihara et al., 1997).

Igualmente, se mostró que la administración intracerebral de PDGF-BB disminuía el área de lesión por sobreestimulación con NMDA en ratas neonatales (Egawa-Tsuzuki et al., 2004). Por otra parte, se ha sugerido que el PDGF-CC podía proteger células neuronales murinas contra muerte apoptótica inducida por distintos tipos de toxinas incluyendo 6-OHDA y tóxina TAT del VIH (Tang et al., 2010; Peng et al., 2012). En años más recientes, Zachrisson y colaboradores (2011) sugirieron efectos restaurativos por parte del PDGF-BB en neuronas dopaminérgicas de ratas lesionadas con 6-OHDA y MPTP, si bien las pruebas clínicas en humanos por parte del mismo grupo (Zachrisson et al., 2015) no produjeron resultados concluyentes. Los anteriores estudios sugieren que los factores de crecimiento de la familia PDGF, y en especial el PDGF-BB, poseen importantes propiedades neuroprotectoras. Sin embargo, son pocos los estudios relativos a los efectos que pudiera ejercer este factor de crecimiento sobre otros tipos celulares como los astrocitos en el contexto de modelos neurodegenerativos.

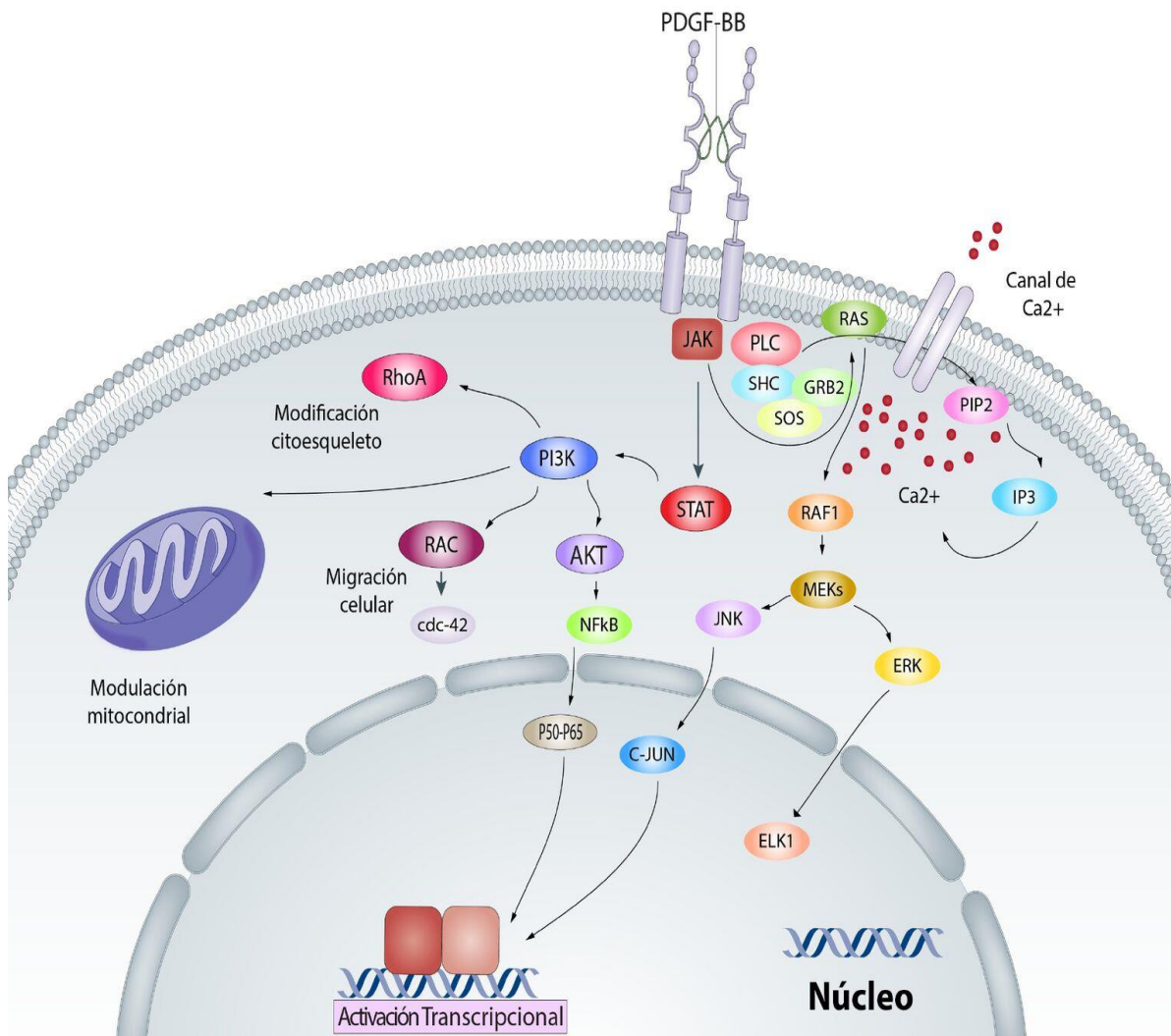


Figura 4. Mecanismos de señalización activados por el PDGF-BB. El PDGF-BB tras la unión a su receptor PDGFR β activa varias vías de señalización implicadas en distintas funciones, incluyendo PI3K/AKT, MAPK, JNK y JAK/STAT, las cuales activan procesos como modificaciones del citoesqueleto, supervivencia y proliferación celular, activación transcripcional de distintas moléculas incluyendo enzimas antioxidantes y modulación de propiedades mitocondriales (Modificado de Andrae, 2008).

3.6. Efectos del PDGF-BB asociados a la morfología celular y activación de RhoA

Otro aspecto importante del PDGF-BB es el referente a la modulación ejercida por este factor de crecimiento sobre los cambios morfológicos de las células. Al respecto se ha mostrado que el PDGF-BB induce formación de lamelipodios e incremento de la motilidad en fibroblastos mediado por rearrreglos en las fibras de actina, siendo estos procesos dependientes de la quinasa PI3K (Hedberg, et al., 1993; Ruusala et al., 1998). También se ha visto que la expresión del receptor PDGFR β es necesario para el desarrollo de la cresta neural embrionaria, el desarrollo y diferenciación astrocitaria y la morfogénesis y plasticidad de espinas dendríticas (Svitkina et al., 2010; Funa y Sasahara, 2014) Igualmente se ha mostrado que factores de crecimiento como el PDGF-BB y el VEGF inducen la activación de la proteína RhoA en células endoteliales, durante el proceso de angiogénesis (Nobes et al., 1995; van Nieuw et al., 2003).

La proteína RhoA es una GTPasa implicada en la regulación del citoesqueleto de actina durante la formación de fibras de estrés, mediante la activación de diferentes mecanismos. Así mismo se encuentra implicada en procesos como morfogénesis celular, adhesión, migración y progresión del ciclo celular y fosforilación de filamentos intermedios como la GFAP, tanto en eventos normales como en patologías tumorales y neurodegenerativas (Kosako et al., 1997; Jaffe y Hall, 2005). Se ha mostrado igualmente que la RhoA puede ser activada por distintos mecanismos incluyendo la fosforilación de PI(4,5)P₂ por PI3K (Hanna y El-Sibai, 2013). Al respecto, se ha mostrado que la inhibición de PI3K por wortmanina, impide la activación de Rho y Rac en fibroblastos (Nobes et al., 1995; Hanna y El-Sibai, 2013), mediada por EGF (Factor de crecimiento epidérmico).

En el SNC, la RhoA y sus proteínas efectoras muestran una amplia distribución, tanto en neuronas como en células gliales. Al respecto, estudios han encontrado que durante lesiones de la columna, la activación de la vía de señalización mediada por RhoA se encuentra asociada a una menor regeneración axonal por la activación dependiente de moléculas anti-regenerativas presentes en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos, tales como efrina, sema3, Nogo, MAG, Omgp y otras (Duffy et al., 2009). Igualmente se ha

mostrado que la inhibición de RhoA o de su principal quinasa efectora ROCK II, por parte de moléculas como la transferasa C3 de *Clostridium botulinum*, la molécula derivada de piridina Y-27632 o la droga experimental Cethrin®, han mostrado resultados prometedores en el tratamiento de lesiones de la médula espinal (Ramakers y Moolenaar, 1998; Duffy et al., 2009). En el caso de los astrocitos, la inactivación de RhoA por la transferasa C3 de *Clostridium*, induce cambios irreversibles en el citoesqueleto generando una morfología astrocitaria estrellada, asociada con el desensamblaje de los filamentos de actina e intermedios (Ramakers y Moolenaar, 1998). Igualmente, se ha señalado que el incremento en especies reactivas como peróxidos y óxido nítrico causa la activación de Rho/ROCK en modelos vasculares (Noma et al., 2007; Kagiya et al., 2010). En este aspecto Fujimura y Usuki (2012) encontraron que la exposición a dosis de 100 nM de rotenona o mercurio inorgánico ejercían una inhibición sobre la expresión de la proteína CDC42 y Rac1 sin afectar la expresión de RhoA, junto con degeneración axonal cerebro cortical y muerte celular. Igualmente, se ha demostrado que la inhibición farmacológica de la quinasa ROCK disminuye la fosforilación de ERK1/2, incluso tras estimulación con PDGF-BB en células de glioblastoma (Zohrabian et al., 2009). Estos resultados sugieren que tanto la producción de ERO, la rotenona y el PDGF-BB podrían interactuar con las vías de señalización activadas por Rho o CDC42 y afectar los procesos de regeneración neuronal y astrocitaria siendo por lo tanto un importante objeto de estudio.

3.7. Neuroglobina y factores de crecimiento

En los últimos años, la proteína neuroglobina (Ngb) ha sido estudiada tanto en neuronas como en astrocitos, debido a sus múltiples funciones relevantes para la neuroprotección en patologías como isquemia focal, Alzheimer, apoplejía y lesión traumática cerebral (Emara et al., 2009; Chen et al., 2015; Avila-Rodríguez et al., 2016; Baez et al., 2016; Xie y Yang, 2016). Esta proteína de 150 aa y 18 kDa posee un grupo hemo, el cual le permite transportar y almacenar oxígeno en distintos órganos como la retina o el cerebro (Pesce et al., 2003). Si bien se ha sugerido que esta proteína posee otras funciones tales como señalización en hipoxia, NADH oxidasa, la eliminación de ERO, regulación de los niveles

de calcio y la regulación mitocondrial (Brittain, 2012; Baez et al., 2016; Amri et al., 2017). A nivel genético se ha visto que el promotor del gen de la neuroglobina puede ser regulado por factores de transcripción como HIF-1 α (hypoxia-inducible factor 1- α) SP1, CREB y NF- κ B, los cuales están relacionados con respuesta celular frente a la hipoxia (Liu et al., 2012). Sin embargo, la función más estudiada de la neuroglobina ha sido la de adaptación a la hipoxia la cual ha sido estudiada en diversos modelos animales y líneas celulares (Burmester y Hankeln, 2009; De Marinis et al., 2013; Baez et al., 2016). En este aspecto, se conoce que en condiciones de normoxia la neuroglobina está ligada al oxígeno, mientras que en condiciones de hipoxia esta proteína adopta una estructura hexacoordinada del grupo hemo. Esta estructura hexacoordinada podría permitir una rápida transferencia de electrones entre la neuroglobina ferrosa y el citocromo férrico durante hipoxia, de tal forma que al reducir rápidamente el citocromo C férrico, se mantendrían niveles no apoptóticos de citocromo C ferroso, que disminuirían la activación apoptótica y por lo tanto podrían ser potencialmente neuroprotectores (Trent et al., 2001; Kakar et al., 2010; De Marinis et al., 2013). Así mismo, se ha mostrado que la sobreexpresión de neuroglobina podría incrementar la señalización antiapoptótica y la disminución de problemas motores en modelos transgénicos de ratones en condiciones de hipoxia e isquemia (Van Leuven et al., 2013; Taylor et al., 2014).

Por otra parte, se ha mostrado que la neuroglobina puede ser translocada a las mitocondrias, donde interactúa con proteínas como las subunidades Atp1b1 y Atp1b3 de la Na⁺/K⁺ ATPasa, el citocromo1 (Cyc1), Etf α (Electron-transfer-flavoprotein, alpha polypeptide) y el VDAC (Canal aniónico dependiente de voltaje), lo que sugiere su importancia en la protección mitocondrial (Yu et al., 2012, 2013). Igualmente, se ha sugerido que la neuroglobina podría regular los niveles de calcio mitocondrial en células SH-SY5Y de neuroblastoma humano, lo cual también podría estar relacionado con una disminución en la activación de vías apoptóticas (Antao et al., 2010; Brittain, 2012).

Diversos factores y compuestos se han visto involucrados en la regulación de la expresión de neuroglobina, entre ellos la hipoxia y la isquemia, la privación de glucosa, el 17- β -estradiol, la tibolona y el VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular, Yu et al., 2012,

De Marinis et al., 2013; Avila-Rodriguez et al., 2016). En este último caso, se demostró que el VEGF estimulaba la expresión de Ngb1 en cultivos neuronales corticales de ratones embrionarios a través de la activación del receptor VEGFR2 / Flk1 (Jin et al., 2012). También se mostró que tanto el factor de crecimiento transformante- β 1 (TGF β 1) como el PDGF-BB aumentaban la expresión de la proteína citoglobina en las células estrelladas hepáticas (Nakatani et al., 2004), lo cual sugiere que las globinas son reguladas por factores de crecimiento y plantea que la neuroglobina puede ser importante en las funciones de estos factores.

3.8. Modelos matemáticos computacionales y aplicaciones biológicas

En los últimos años, se ha incrementado el uso de métodos computacionales para el estudio de problemas biológicos, incluyendo el estudio de las células y patologías del sistema nervioso, por medio del uso de modelos matemáticos, biología de sistemas, bases de datos y tecnologías "ómicas" (genómica, proteómica, metabolómica etc), para la generación de modelos *in silico* que permitan la predicción de comportamientos de interés para el investigador (Palsson, 2009). Uno de los aspectos más importantes en el desarrollo de los modelos computacionales biológicos es la construcción de un modelo matemático (Allman y Rhodes, 2004) que pueda representar las interacciones entre los distintos componentes del sistema biológico que se piensa modelar (iones, moléculas, macromoléculas etc). Gran parte de los modelos matemáticos para biología están basados en ecuaciones diferenciales ordinarias (ODEs), las cuales reflejan los efectos de variación en el tiempo de procesos biológicos, como el comportamiento de enzimas, o la activación de vías de señalización (Ji et al., 2016). Los modelos basados en ODEs utilizan por lo general 3 tipos distintos de funciones cinéticas como son la cinética de Michaelis-Menten, la función de Hill o la ley de acción de masas (Resat et al., 2009; Ji et al., 2017), las cuales describen el comportamiento de reacciones enzimáticas, modelos de señalización basados en la activación o inhibición de proteínas y las interacciones moleculares basadas en la probabilidad de colisión de los reactantes (Ji et al., 2016).

3.9. Modelos computacionales en el estudio de enfermedades neurodegenerativas

Numerosos modelos neuronales y de células gliales basados en ODEs han sido desarrollados en los últimos años (Cakir et al., 2007; Gibson et al., 2008; Han et al., 2014; Sertbas et al., 2014), incluyendo aproximaciones metabólicas, redes de interacción astrocito-neurona, datos proteómicos y transcripcionales y modelos reducidos de actividad dopaminérgica neuronal. Por ejemplo, Cakir y colaboradores (2007) establecieron una reconstrucción metabólica computacional de las interacciones energéticas entre astrocito y neurona durante hipoxia cerebral. Este modelo, centrado en reacciones fundamentales como el ciclo de glutamato y el transporte de aminoácidos, contaba con 217 reacciones y 216 metabolitos (Cakir et al., 2007). Posteriormente, se generó un modelo de interacciones metabólicas astrocito-neurona, a partir de datos transcripcionales de enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer y Parkinson (Sertbas et al., 2014), que incluía un total de 630 reacciones controladas por 570 genes. Por otra parte, se han generado modelos computacionales astrocitarios relativos a la difusión de las ondas de calcio, las cuales son importantes en la comunicación astrocitaria y la liberación de gliotransmisores (Gibson et al., 2008). Por último, es importante mencionar que también se han generado modelos cinéticos reducidos, como el de Nakano y colaboradores (2010) en el que se explora la regulación de potenciales de largo plazo (LTP) por medio de calcio y dopamina en neuronas corticales. El modelo consta de 72 reacciones, principalmente basadas en la vías de señalización de receptores glutamatérgicos y dopaminérgicos, importantes en la plasticidad sináptica. En conjunto estos estudios han permitido la generación de modelos neuronales y gliales cada vez más precisos y detallados, que servirán de base para la generación de nuevas aproximaciones computacionales de distintas patologías neurodegenerativas como la EP.

3.10. Modelos computacionales mitocondriales

Debido a la importancia que poseen las funciones mitocondriales tanto en condiciones fisiológicas como durante el desarrollo de procesos neurodegenerativos, no es de extrañar que se hayan desarrollado numerosos modelos computacionales, basados en un enfoque tanto de biología de sistemas como en modelos más reducidos, para el estudio de las funciones mitocondriales (Smith y Robinson, 2011; Kowald et al, 2012; Cabeza-Arbelaiz et al., 2012; Ignatenko et al., 2014). Por ejemplo, Smith y Robinson (2011) generaron un modelo computacional mitocondrial de células cardíacas humanas, basado en datos proteómicos que contaba con 253 reacciones y 245 metabolitos, empleado exitosamente en la simulación de desórdenes del ciclo del ácido tricarbóxico y diabetes. Adicionalmente, Kowald y colaboradores (2012), desarrollaron un modelo mitocondrial computacional del hongo *Podospora anserina*, bajo condiciones de estrés oxidativo que permitió generar un acercamiento relativo a los procesos moleculares asociados al envejecimiento biológico. Estos modelos computacionales mitocondriales pueden ser complementados con datos transcripcionales, tales como los obtenidos por Cabeza-Arbelaiz y colaboradores (2012), en los cuales se encontró que el tratamiento crónico con rotenona afectaba de manera diferencial la expresión de 134 genes neuronales, asociados con procesos como apoptosis, fosforilación oxidativa, depolimerización de microtúbulos y disfunción mitocondrial que también están presentes durante el desarrollo de la EP. Por otra parte, también se han desarrollado modelos mitocondriales reducidos o de aproximación modular y cinética de la mitocondria, los cuales se enfocan en un conjunto pequeño de reacciones tales como el balance redox, procesos de mitofagia, vías glicolíticas o producción de ATP (Cortassa y Aon, 2012; Gauthier et al., 2013; Dalle Pezze et al., 2014; Ignatenko et al., 2014). Una ventaja que poseen estos modelos, debido a su menor tamaño es que existe una mayor facilidad de verificar experimentalmente las predicciones computacionales producidas, utilizando técnicas convencionales de biología molecular y celular como Western blots, microscopía de fluorescencia, citometría de flujos, etc (Cortassa y Aon, 2012; Dalle Pezze et al., 2014). En conjunto el desarrollo de estos modelos computacionales, ha sugerido la relevancia que poseen como herramientas efectivas en el estudio de nuevos blancos

terapéuticos de protección mitocondrial y una mayor comprensión sobre el desarrollo de patologías neurodegenerativas.

3.11. Modelos computacionales cinéticos

Junto a las reconstrucciones metabólicas tradicionales anteriormente mencionadas, las cuales incorporan cientos o miles de reacciones (Cakir et al., 2007; Sertbas et al., 2014; Martín-Jiménez, 2017), se han desarrollado otros modelos que permiten simular la fluctuación espacio-temporal de las biomoléculas en redes bioquímicas de acuerdo a las cinéticas de la reacción (Resat et al., 2009). Dado el gran tamaño y la complejidad de los sistemas biológicos, los cuales a veces poseen cientos o miles de objetos con miles de reacciones en diferentes escalas temporales, es difícil lograr generar un modelo cinético que posea un amplio número de elementos (Ignatenko et al., 2014). Igualmente, las redes biológicas tienen interacciones intrincadas tales como loops de retroalimentación, bifurcaciones y oscilaciones que producen comportamientos dinámicos particulares, en los que es posible que algunas especies con bajo número de copias, den lugar a fluctuaciones significativas que muchas veces son estocásticas, como es el caso de la regulación transcripcional o la expresión genética (Gillespie, 1977; Resat et al., 2009). Sin embargo, es posible en algunas circunstancias reducir las dimensiones y los elementos de la tarea biológica a analizar y desarrollar un modelo que posea los más importantes subsistemas o reacciones de esta tarea y que por lo tanto pueda reflejar los comportamientos que posean el mayor impacto para el sistema biológico (Surovtsova et al., 2012). De acuerdo a lo anterior, las simulaciones cinéticas, incluyen los siguientes pasos (Resat et al., 2009), basados en algoritmos como los de Gillespie (1977) o Gibson y Bruck (2000):

1. Identificación del problema cinético, las variables de entrada y salida (input/output) junto con los intermediarios. Tabulación de las especies con sus propiedades físicas.
2. Formulación del modelo, con base a las ecuaciones de tasa de reacción (RRE), en las que se define el cambio de las concentraciones de las especies en función del tiempo y la locación.

3. Escogencia de un método determinístico, estocástico o híbrido (Hoops et al., 2006), para determinar los tiempos de reacción de las distintas ecuaciones del sistema.
4. Simulación: integración de las RRE y las distintas escalas de tiempo de las reacciones, ya que en los sistemas químicos y biológicos hay un amplio rango de escalas temporales algunas de las cuales pueden ser de muchos órdenes de magnitud mayores que otras. Los paquetes de software mencionados más abajo utilizan distintos métodos para dar una solución adecuada a estas simulaciones.
5. Análisis de trayectoria: Los cursos temporales obtenidos durante las simulaciones son catalogados y combinados para generar las distribuciones estadísticas de las cantidades predichas, tales como las concentraciones de especies monitoreadas experimentalmente.
6. Análisis de sensibilidad: Es un análisis de perturbaciones de cambios de parámetros en el modelo. Este análisis permite calcular como un objetivo de interés (por ejemplo el cambio de una especie, o una tasa de reacción), cambia a medida que el flujo de una reacción específica de interés varía en magnitud. Este análisis también ayuda a entender las reacciones entre las variables de entrada (input) y salida (output) en el modelo, a buscar errores del modelo y simplificar partes redundantes de la estructura del modelo (Becker et al., 2007; Surovsova et al., 2012). Los análisis de sensibilidad pueden ser de tipo local o global (Kent et al., 2013). En el primer caso, todos los parámetros del sistema excepto uno se mantienen en sus valores iniciales mientras que un parámetro de prueba sufre perturbaciones infinitesimales en el tiempo. Los análisis de sensibilidad global por otra parte son más extensos y robustos e implican el cálculo de coeficientes de sensibilidad para un rango de valores de los parámetros, (denominado espacio de parámetros), revelando mayores detalles del comportamiento general del modelo, por lo cuál su costo computacional es mayor (Kent et al., 2013). Adicionalmente los análisis de sensibilidad se utilizan como una forma de valorar que tan robusto es el modelo (Kent et al., 2013). Un sistema robusto es *resiliente* a perturbaciones relativamente pequeñas en los valores de los parámetros, lo cuál se verá reflejado en coeficientes de sensibilidad de baja magnitud, en contraposición a un sistema sensible, en los cuales,

perturbaciones pequeñas, tendrán un gran efecto sobre el sistema (Westerhoff, 2007; Kent et al., 2009).

Varios paquetes de software han sido desarrollados como GEPASI, Virtual Cell, Dizzy, Basis, Dynetica, Cell Designer y COPASI, los cuales permiten realizar simulaciones dinámicas estocásticas o deterministas, basadas en ecuaciones diferenciales ordinarias (ODEs), o ecuaciones algebraicas diferenciales (DAEs) que indican las tasas de reacción de las distintas especies en el sistema (Alves et al., 2006; Surovtsova et al., 2012). La plataforma COPASI (Hoops et al., 2006), permite la integración de ecuaciones diferenciales ordinarias (ODEs) y modelos estocásticos utilizando una metodología híbrida además de computación de estados estables (*steady states*) y análisis estequiométricos en un ambiente amigable con el usuario de interface gráfica o una versión de línea de comandos.

Adicionalmente, el programa COPASI, permite calcular procesos en el tiempo (*time courses*), usando enfoques deterministas o estocásticos de acuerdo al interés del usuario.

Se han generado diversos modelos en esta plataforma incluyendo un modelo de la activación de EGFR en cáncer, procesos mitofágicos, el transporte de verapamil a través del transportador P de glicoproteínas, cinética de la conversión de sacarosa a oligosacáridos y producción de ERO entre otros (Orton et al., 2009; Ledwitch et al., 2016; Kolodkin et al., 2012; Kent et al., 2012; Dalle Pezze et al., 2014; Ignatenko et al., 2014; Khandekar et al., 2014).

4. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

4.1. Hipótesis de Investigación

Nuestra hipótesis de investigación es que el PDGF-BB ejerce su protección contra los efectos tóxicos de la rotenona, mediante el incremento en la expresión de proteínas como la neuroglobina y la activación de la quinasa PI3K que podrían estar modulando varios mecanismos, tanto relativos a la protección contra el estrés oxidativo y las funciones mitocondriales como a efectos de regulación morfológica y de supervivencia en células astrocitarias.

4.2. Objetivos

4.2.1. Objetivo General

Determinar los mecanismos celulares y moleculares de protección que puedan estar siendo regulados por PDGF-BB en células astrocíticas frente al daño por rotenona.

4.2.2. Objetivos Específicos

4.2.2.1. Determinar el efecto de PDGF-BB sobre la viabilidad celular, y activación glial en la línea celular T98G tras el tratamiento con rotenona.

4.2.2.2. Establecer el efecto del PDGF-BB sobre las funciones mitocondriales en células tratadas con rotenona.

4.2.2.3. Establecer si los efectos del PDGF-BB modulan la expresión de neuroglobina y la vía PI3K/AKT/NF- κ B.

4.2.2.4. Generar un modelo cinético computacional que integre los principales procesos modulados por el PDGF-BB en la protección frente a rotenona

5. MÉTODOS EXPERIMENTALES Y COMPUTACIONALES

5.1. Línea Celular T98G

En este estudio fue utilizada la línea celular de glioblastoma humano, T98G (ATCC CRL-1690) como modelo celular astrocitario. La línea T98G ha sido utilizada en numerosos estudios (de Joannon, et al., 2000, Yue, et al., 2008, Torrente et al., 2013; Cabezas, et al., 2015) y se ha demostrado que comparte similitudes estructurales y funcionales con astrocitos primarios, tales como la GFAP, HLA-I y CD68 (Short et al., 2007; Yue et al., 2008). Las células se mantuvieron bajo crecimiento exponencial en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Lonza, Walkersville, EE.UU.), que contenía 10% de suero bovino fetal (Lonza, Walkersville, EE.UU.), y penicilina 10 U / 10 mg de estreptomycin / 25 ng anfotericina (Lonza, Walkersville, EE.UU.). Los cultivos se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada que contiene 5% de dióxido de carbono. El medio se cambió tres veces por semana.

5.1.1. Línea celular HEK

Se utilizó igualmente la línea celular de transcripción de NF- κ B / 293 / GFP-LucTM, la cual fue sembrada en medio de cultivo DMEM (Lonza), suplementado con suero bovino fetal al 10% (SBF) y antibióticos (penicilina / estreptomycin y anfotericina, Lonza) a 37°C y en una atmósfera humidificada que contiene 5% de CO₂. Esta línea celular permite determinar la activación de la señal de NF- κ B *in vitro* mediante la detección de la fluorescencia de GFP (proteína verde fluorescente), así como la luciferasa para ensayos de reportación de activación de transcripción cuantitativa (https://www.systembio.com/downloads/TR860_Web_Manual.pdf). Se realizaron ensayos preliminares con dosis de 2 μ M de TNF- α para garantizar la activación de la señal fluorescente de la GFP en estas células. Se sembraron inicialmente 20000 células en placas de 12 pozos, y se permitió que crecieran por 24h antes de realizar la privación del SBF por 24h. Posteriormente se aplicaron los siguientes tratamientos farmacológicos: : I) PDGF,

200 ng/ml (Sigma-Aldrich); II) Rotenona 1 μ M (Sigma Aldrich); III) PDGF, 200 ng/ml por 24 h + Rotenona 1 μ M (24h); IV) Medio DMEM libre de suero como control.

5.2. Tratamientos farmacológicos

Se permitió que las células T98G alcanzaran una confluencia cercana al 60%. Luego, las células fueron privadas de medio DMEM con suero por 24 h. Pasado este tiempo, las células se incubaron de acuerdo al protocolo experimental con : I) PDGF, 200 ng/ml (Sigma-Aldrich); II) Rotenona 50 μ M (Sigma Aldrich); III) PDGF, 200 ng/ml por 24 h + Rotenona 50 μ M (24h); IV) Medio DMEM libre de suero como control.

5.3. Determinación de la activación astrocitaria

La activación astrocitaria se determinó mediante la evaluación de la expresión aumentada de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), vimentina y RhoA por inmunocitoquímica y por Western Blot. Igualmente, se midieron los cambios en el área celular para los distintos tratamientos, utilizando ImageJ. Las células fueron seleccionadas de modo aleatorio utilizando una escala generada automáticamente (disponible en <http://www.random.org/integers>). Adquisición de imágenes: Imágenes de células positivas para la GFAP, Vimentina o RhoA fueron tomadas en campos en donde no hubiera solapamiento de células en las diferentes condiciones experimentales. Las imágenes fueron procesadas utilizando el programa ImageJ (USA National Institute of Health <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Eligiendo células de manera aleatoria en un aumento de 20X.

5.4. Análisis ultraestructural a través de microscopio electrónico de transmisión

Las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 1% en tampón cacodilato a 0,1M, pH 7.4, por 2 h. Para tinciones del tipo osmio-uranio, las células fueron teñidas con acetato acuoso de uranil al 1% durante la noche. En seguida las células fueron deshidratadas en concentraciones ascendientes de etanol, seguido por acetona, e incrustadas

en un bloque de resina durcupan (ACM). Los cortes finos fueron co-teñidos con citrato de plomo antes del análisis en microscopio electrónico.

Las células se centrifugaron en tubos de microcentrífuga 13 rpm, temperatura ambiente, 3 min, fijadas en tampón fosfato 2,5% de glutaraldehído pH 7,4 durante 10 h a 4°C. Después de un enjuague en tampón fosfato, las células se fijaron en tetróxido de osmio al 1% pH 7,4 Durante 1 h a 4 °C y después de un enjuague, precontraste con acetato de uranilo durante 1 h a temperatura ambiente. Después de la deshidratación en alcohol graduado, las células se incrustaron en Spurr resina. Los bloques se seccionaron en un micrótopo con un cuchillo de diamante. El espesor de la sección se estimó a partir de color de interferencia de plata y el método de pequeño-pliegue (Weibel, 1979) a 60 80 nm. Las secciones se recogieron en rejillas de cobre de malla 300, se tiñeron dos veces con acetato de uranilo y citrato de plomo y se examinaron mediante microscopía electrónica EM 1400 Plus, Jeol, Japón a 80 kV. Las micrografías electrónicas se tomaron a dos aumentos primarios 4400 X y 10 000 X.

El análisis estereológico se llevó a cabo de acuerdo con Gossiau et al., (2001) con algunas modificaciones. En resumen, el área mitocondrial, número de crestas mitocondriales y número de vacuolas de los diferentes tratamientos se evaluaron a partir de veinte fotografías. La cuantificación de la lesión mitocondrial del análisis cuantitativo se muestra como medio \pm SD para el tamaño mitocondrial, número de crestas y "vacuolización" del citoplasma.

5.5. Viabilidad y fragmentación nuclear

La viabilidad fue determinada mediante la técnica de MTT (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) (Sigma, St Louis, Missouri, EE.UU.) y de Ioduro de propidio (IP) (Sigma aldrich). Para las determinaciones de viabilidad mediante MTT, las células se sembraron en placas de 96 pozos en medio de cultivo DMEM que contenía 10% de SFB a una densidad de siembra de 10.000 células/pozo incubándose durante 1-2 días hasta alcanzar confluencia de alrededor del 60%. Posteriormente, las células se trataron de acuerdo a los diferentes paradigmas experimentales expuestos en la sección 5.2. La viabilidad se evaluó mediante la adición de solución de MTT a la concentración

final de 5 mg/ml, durante 4 h a 37 °C. Luego, las células se lisaron mediante la adición de 100 uL de dimetil sulfóxido (DMSO). Se midió la absorbancia de los cristales de formazan producidos usando un espectrofotómetro con lector de placas (Fluostar Omega) a una longitud de onda de 595 nm. Los resultados se expresaron como porcentaje de viabilidad respecto a las células control (células en medio DMEM privadas de SFB) cuya absorbancia se consideró como el 100% de viabilidad. Se realizaron 3 experimentos independientes cada uno con seis réplicas técnicas por cada condición.

Para la determinación de la viabilidad por IP, las células fueron sembradas en placas de 24 pozos en medio de cultivo DMEM con SFB al 10% en densidad de siembra de 30.000 células por pozo, se incubaron durante 1-2 días hasta alcanzar una confluencia de 60%. A continuación, las células se sometieron a los respectivos tratamientos y protocolos experimentales. Posteriormente, las células fueron lavadas 2 veces en PBS y se separaron con tripsina (tripsina / EDTA 500 mg / L; Lonza, Walkersville, EE.UU.). A continuación, las células se tiñeron con una solución de IP de 10 µg/ml durante 10 min. Posteriormente las células positivas para IP fueron cuantificadas mediante microscopía de fluorescencia de acuerdo al protocolo de la sección 5.10 . Cada ensayo se realizó con un mínimo de tres réplicas para cada condición.

La fragmentación y condensación nuclear se determinaron mediante tinción de Hoechst 33258 (5 mg/ml; Invitrogen). Después de la exposición a los distintos tratamientos, las células se lavaron tres veces en solución salina tamponada con fosfato PBS y se fijaron durante 20 min a temperatura ambiente en una solución de formaldehído al 4% . Posteriormente, las células se lavaron y se marcaron con Hoechst 33258 (5 mg/ml; Invitrogen) durante 15 min. Se observaron los núcleos celulares y se fotografiaron en un microscopio invertido de fluorescencia (Microscopio Olympus IX-53). Se determinó el número de núcleos fragmentados y condensados en al menos ocho áreas seleccionadas al azar (0.03 mm²) de cada grupo experimental. Los datos se expresaron como un porcentaje de núcleos fragmentados y condensados con relación con al valor control (DMEM). La tinción de Hoechst, también se utilizó como contramarcaje en los experimentos de inmunocitoquímica.

5.6. Determinación especies reactivas de oxígeno (ERO)

Evaluación radical superóxido.

La producción de ERO se evaluó por citometría de flujo y microscopía de fluorescencia. Las células se sembraron a una densidad de 75.000 células por pozo en placas de 12 pozos en medio de cultivo DMEM que contenía 10% de SFB y luego fueron tratados de acuerdo a cada paradigma experimental al día siguiente. Una vez concluidos los tratamientos, las células fueron tratadas en la oscuridad durante 30 mins a 37 °C con dihidroetidina 10 mM (DHE; Sigma) para evaluar el radical superóxido -O_2 . Luego, las células se lavaron en PBS y se desprendieron con tripsina (Tripsina/EDTA 500 mg/L: 200 mg/L; Lonza, Walkersville, EE.UU.) para análisis por citometría de flujo o se mantuvieron en la placa para ser evaluadas por microscopía de fluorescencia.

Evaluación radical peróxido

La producción de este radical se evaluó mediante tinción con Diclorofluoresceína diacetato (DCFA-DA). La producción de intermediarios reactivos de oxígeno se realizó con la sonda inespecífica Diclorofluoresceína a una concentración final de 0.1 μM . Una vez finalizado el protocolo experimental las células se incubaron durante 30 min, posteriormente se separaron con tripsina o se dejaron en la placa de acuerdo a la cuantificación mediante microscopía de fluorescencia.

Evaluación peroxidación lipídica.

La producción de peroxidación lipídica este radical se evaluó mediante tinción con Anti-4 Hydroxynonenal antibody (abcam, Spickett, 2013) a una concentración final de 0.5 μM . Una vez finalizado el protocolo experimental las células se incubaron durante 30 min, posteriormente se separaron con tripsina o se dejaron en la placa de acuerdo a la cuantificación mediante microscopía de fluorescencia.

Evaluación de hidroxilación de ácidos nucleicos

La producción de ácidos nucleicos hidroxilados, se evaluó mediante tinción con Anti-8 Hydroxyguanosine antibody (8-OHdG, abcam), a una concentración final de 0.1 μM (Cheng et al., 1992). Una vez finalizado el protocolo experimental las células se incubaron durante 30 min, posteriormente se separaron las células con tripsina o se dejaron en la placa de acuerdo a la cuantificación mediante microscopía de fluorescencia.

Evaluación de nitración de aminoácidos tirosina.

La reacción de nitración del aminoácido tirosina, indicativo de una modificación postraduccional en las proteínas, se evaluó mediante tinción con Anti-3-Nitrotyrosine antibody (abcam), a una concentración final de 0.5 μM (Ahsan, 2013). Una vez finalizado el protocolo experimental las células se incubaron durante 30 min, posteriormente se separaron las células con tripsina o se dejaron en la placa para los experimentos de microscopía de fluorescencia.

5.7. Determinación de calcio intracelular

5.7.1. Determinación de niveles de Ca^{2+} citoplasmático.

Posterior a los tratamientos experimentales, la determinación de los cambios en los niveles de calcio citoplasmático, se efectuó mediante el uso de la sonda Fluo-4-AM (Molecular Probes- Thermofisher). Las células se incubaron con la sonda a una concentración final de 2 μM . Se permitió que la sonda fuera activada por el calcio citoplasmático durante 20 min e inmediatamente fueron lavadas brevemente con PBS. Posteriormente, las células fueron leídas por espectrofotometría (lector de placas Fluostar Omega).

5.7.2. Determinación de niveles de Ca^{2+} de RE y mitocondrial

Las mediciones de calcio del retículo endoplasmático se realizó de la siguiente manera: las células fueron expuestas a 2 μM del colorante de baja afinidad Mag-Fura-2-AM, una sonda con gran afinidad por el RE, en un tampón que contiene 120 mM de NaCl, 5.4 mM de KCl, 0.8 mM de MgCl_2 , 2 mM de CaCl_2 , 15mM de glucosa, y 20 mM de HEPES, pH 7.3 por 45 min a una temperatura de 37 grados centígrados (Monteith, 2000). Para determinar los cambios en los niveles de calcio mitocondrial, las células fueron incubadas con 5 μM Rhod-2-acetil ester (Rhod-2-AM), un indicador de calcio mitocondrial, por 60 min a 37 grados centígrados (Davidson y Duchon, 2012). Las membranas celulares fueron selectivamente permeabilizadas mediante la aplicación de 10 μM de digitonina en el tampón intracelular (125 mM de KCl, 25 mM de NaCl, 10 mM de HEPES, y 0.1 mM de MgCl_2 , pH 7.3) que contiene 170 nM de calcio libre (secuestrado en 5 mM de EGTA) y 3 mM de ATP. Las señales de Mag-Fura-2 se recolectaron en relación 340nm/380nm por la duración del experimento a temperatura ambiente, en espectrofotómetro (Fluostar Omega).

5.8. Determinación del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi\text{m}$)

El $\Delta\psi\text{m}$ se evaluó mediante la tinción de tetrametil rodamina éster metílico (TMRM). Las células se sembraron a una densidad de 75.000 células por pozo en placas de 12 o 24 pozos utilizando los tratamientos antes expuestos (Rotenona, PDGF, PDGF + Rotenona, etc). Las células se tiñeron en la oscuridad con 500 nM de TMRM, y se incubaron a 37°C durante 20 min. Luego las células se lavaron con PBS y fueron cuantificadas por microscopía de fluorescencia (posterior análisis de imágenes). Como control experimental, se utilizó el desacoplador mitocondrial carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona CCCP (Sigma-Aldrich). Esto permitió disipar el potencial de membrana y definir la línea base para el análisis del $\Delta\psi\text{m}$.

5.9. Estimación de la masa mitocondrial

Se evaluó la masa mitocondrial utilizando Nonyl Acridine Orange (NAO), un colorante catiónico fluorescente secuestrado por mitocondrias activas (Oliva et al., 2011). Después de 24 horas de tratamiento, las células se tiñeron en la oscuridad con 5 μ M de NAO a 37 °C durante 20 min. A continuación, las células se lavaron 2 veces con PBS y fueron observadas por microscopía de fluorescencia. Como control experimental, se utilizó 500 μ M de rotenona para crear un disturbio en la membrana mitocondrial y aumentar la oxidación de cardiolipina. El volumen mitocondrial se evaluó adicionalmente mediante citometría de flujo en un citómetro GuavaR EasyCyte™ (Millipore).

5.10. Estimación de la intensidad media de fluorescencia

El uso de fluorocromos permite que la cuantificación de los parámetros de interés pueda realizarse mediante citometría de flujo o mediante microscopía de fluorescencia. Los dos tipos de análisis se complementan y permiten obtener mayor información del experimento. En el caso de la microscopía de fluorescencia, la cuantificación y análisis implica la captura de imágenes que posteriormente se analizan mediante un software (por ejemplo ImageJ) el cual permite calcular la intensidad media de fluorescencia (IMF) de las células. Para la determinación de la IMF, las células fueron fotografiadas mediante la cámara Motic moticam CMOS de 10 megapíxeles (Bankhead, 2013) dejando un tiempo de exposición de 150 ms. Posterior a la captura de las imágenes, éstas fueron analizadas utilizando el software ImageJ versión 1.47 (Bankhead, 2013). Las microfotografías se cargaron en el software y se preprocesaron para restar el fondo, mediante el método de sustracción de fondo del software. Posteriormente, se dibujó un recuadro alrededor de la célula y se midió el valor de fluorescencia medio y la densidad integrada utilizando la herramienta measure. A continuación se dibujó un recuadro cerca de la célula a evaluar para cuantificar el fondo. Al menos 20 células fueron seleccionadas al azar (utilizando un generador de números aleatorios <https://www.random.org/integers/>) utilizando una cuadrícula numerada en cada microfotografía. Se determinó el valor de fluorescencia media de las 20 celdas en 8 microfotografías para cada tratamiento. Las células se analizaron en un área de 0,03

mm². No hubo variaciones en las condiciones del procesamiento de imágenes (velocidad ISO, compensación y tiempo de exposición intensidad de flash) para evitar falsos positivos. Los controles negativos de las distintas tinciones se encuentran en la figura anexa 9.

5.11. Determinación y cuantificación de proteínas por Western blot

Para la determinación de proteínas, las células destinadas para tal fin fueron lisadas y se solubilizaron en tampón RIPA (Thermo Scientific, cat. 89900), que contiene 1 mM de fluoruro de sodio, 10 mM de pirofosfato de sodio, 200 mM de fluoruro de metilfenil-sulfonilo PMSF, 10 mM ortovanadato de sodio y cóctel inhibidor de proteasas Halt Thermo 1X (CAT- 78425). Los lisados se centrifugaron a 10.000 rpm a 4 °C durante 10 min, utilizándose una alícuota de las proteínas solubilizadas para la cuantificación de proteínas mediante el método del ácido bicinconínico (kit BCA-1 Sigma-Aldrich) antes de ser desnaturalizadas por calentamiento durante 5 min. Las proteínas solubilizadas se resolvieron en gel de electroforesis al 12% SDS-PAGE a 90 V durante 90 min a 25 °C. Después se transfirieron electroforéticamente a membranas de PVDF (polyvinylidene difluoride, Thermo cat.88518) durante 90 min a 350 mA y 4 °C. Luego las membranas de PVDF se bloquearon durante 1 hora a 25°C con 5% (w/v) de BSA y 0,1% (w/v) de Tween-20 en tampón Tris salino pH 7,4. A continuación las membranas se incubaron durante la noche a 4 °C con el anticuerpo primario. Posterior a lavados sucesivos la membrana se incubó en anticuerpo secundario durante 40 min. Posteriormente, las membranas se revelaron mediante el método de quimioluminiscencia utilizando el kit West Pico Substrate SuperSignal™ (Life Technologies). También se utilizaron anticuerpos secundarios marcados con infrarrojo (infraredlabeled secondary antibody) anti-cabra o anti-ratón (IRDye 800, Li-Cor Biosciences) los cuales se añadieron al anticuerpo primario. Este complejo se detecto utilizadno el sistema Odyssey de imágenes infrarrojas (Li-Cor; Lincoln, NE). Las imágenes se analizaron utilizando el software Odyssey application version 1.2 (Li-Cor) para obtener las sensibilidades integradas.

Los análisis densitométricos se realizaron utilizando el software ImageJ versión 1.48p. Se utilizó el método de histograma para analizar y normalizar los datos (Tan y Ng 2008; Lukemiller, 2010). El análisis se realizó con películas escaneadas con bajo tiempo de exposición, evitando lecturas producto de la saturación de la señal. A continuación se utilizó el software ImageJ para realizar el análisis densitométrico. Inicialmente se dibuja un área rectangular alrededor de cada una de las bandas en la imagen. Una vez seleccionadas todas las bandas se generaron los histogramas que indicaron la intensidad de cada una de las bandas usando el algoritmo de análisis de gel en el software. Posteriormente, dibujamos una línea en la parte superior del histograma para cuantificar el área bajo la curva. Finalmente mediante el uso de una hoja de cálculo Excel, se estimó la relación entre cada banda con su correspondiente control de carga.

5.12. Inmunofluorescencia

Algunas proteínas fueron evaluadas por inmunofluorescencia como método de validación y para obtener más información de la proteína en relación al modelo. Las células se cultivaron en placas multipozo de 24 pozos. Al final de los tratamientos experimentales, las células se lavaron 2 veces en PBS y se fijaron con 4% de paraformaldehído durante 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se permeabilizaron durante 3 min con 0,1% de Triton X-100 en tampón Tris salino (TBS) con 2% de BSA. Una vez permeabilizadas las células, se lavaron con PBS, se bloquearon con 2% de BSA+TBS y se incubaron durante la noche a 4°C con anticuerpo primario. Posteriormente, las células se lavaron tres veces durante 5 min con TBS y se incubaron durante 45 mins a temperatura ambiente con anticuerpo secundario acoplado a DyLight-488 a la concentración establecida. Finalmente las células fueron lavadas tres veces con TBS, se tiñeron con Hoechst 33258 para marcar los núcleos y se fotografiaron en el microscopio invertido de fluorescencia Olympus IX-53. La cuantificación se realizó mediante el software ImageJ con el método descrito en la sección 5.10. Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados se enumeran en las Tablas 1 y 2.

Anticuerpo Primario	Especie	Dilución	Casa comercial
AKT	conejo	1:1000	Thermo Scientific
fosfo-AKT pThr308	conejo	1:1000	Thermo Scientific
ERK/MAPK	conejo	1:1000	Thermo Scientific
antirabbit Phospho- p44 MAPK1,3 / ERK2,1 pThr202+Tyr204	conejo	1:1000	Thermo Scientific
NF- κ B p65	conejo	1:1000	Thermo Scientific
NF- κ B p105 / p50	conejo	1:1000	Thermo Scientific
GFAP	ratón	1:1000	Thermo Scientific
Vimentina	ratón	1:1000	Sigma
RhoA	Conejo	1:1000	Thermo Scientific
Catalasa	conejo	1:1000	Thermo Scientific
GPX1	conejo	1:1000	Thermo Scientific
Hidroxinonenal	Conejo	1:1000	Abcam
3-Nitrotyrosine	Ratón	1:1000	Abcam
8-Hydroxyguanosine	conejo	1:1000	Abcam
Neuroglobina	ratón	1:50	Abcam
GRP78/ Bip	conejo	1:1000	Abcam
Actina	ratón	1:3000	Thermo Scientific
GAPDH	conejo	1:1000	Sigma

Tabla 1. Anticuerpos primarios utilizados en las determinaciones de proteínas por western blot e inmunocitoquímica.

Anticuerpo secundario	Especie	Dilución	Casa comercial
conjugated-488	Ratón	1:1000	Thermo Scientific

Dylight			
Conjugated-594	Conejo	1:1000	Abcam
IRDye 800	Ratón	1:30000	Li-Cor Biosciences
IRDye 800	Conejo	1:30000	Li-Cor Biosciences

Tabla 2. Anticuerpos secundarios utilizados en las determinaciones de proteínas por WB e inmunocitoquímica.

5.13. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa qRT-PCR

La qPCR permite evaluar los niveles relativos de expresión de un gen de interés. Para tal fin el ARN total fue extraído por medio del kit de ilustra RNAspin Mini kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido). Luego de la extracción, se realizó la síntesis de cADN utilizando la transcriptasa reversa M-MLV (Promega, Madison, WI, EE.UU.), la reacción se llevó a cabo en el termociclador Mastercycler Eppendorf. Después de la transcripción reversa, el cADN fue diluido de acuerdo a lo establecido en un proceso previo de estandarización (Melting point curve). A estas diluciones del cADN se añadió SYBR Green Mix Master (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.) y los *primers* de interés. A continuación, las mezclas de reacción fueron amplificadas en el equipo ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems), estableciendo los parámetros convencionales (40 ciclos de cambio de temperatura: 95°C durante 15 segundos y luego 60 °C durante un minuto). Los *primers* fueron diseñados con el software Primer Express (Applied Biosystems) y sintetizados por Invitrogen (Life technology). Para garantizar la calidad de los datos, las muestras fueron corridas por duplicado. Los datos se representaron usando el método comparativo Ct, utilizando GAPDH como housekeeping (biosystems 2011).

Gen blanco	Secuencia Forward	Secuencia Reverse	Casa comercial
			1

NGb1	5' GAGCAGACTCACCCACTG	5' TGGAAGACCTGCCTCACTG 3'	Eurobio Abcys
GAPD H	5'CATCAATGGAAATCCCATC A 3'	5'TTCTCCATGGTGGTGAAGA C 3'	Eurobio Abcys

Tabla 3. Primers utilizados en la amplificación por qPCR, donde se muestra la secuencia forward y reverse.

5.14. Silenciamiento de neuroglobina

Con el objeto de comprobar el efecto de la neuroglobina sobre la protección ejercida por el PDGF-BB se realizó un silenciamiento del gen Ngb1 utilizando un RNA interferente. Inicialmente, las células fueron transfectadas en condiciones libres de SFB, y utilizando un ácido ribonucleico interferente Stealth RNAi™ contra el gen Ngb1 (siNgb; Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) contra una secuencia no interferente (mismatch), de acuerdo con las instrucciones del fabricante y utilizando oligofectamina (Invitrogen) como reactivo de transfección. La secuencia utilizada para realizar el silenciamiento del gen Ngb1 (Scramble) fue: 5'-CGUGAUUGAUGCUGCAGUGACCAAU-3', y la secuencia control no interferente para Ngb1 fue: 5'-UGUGAUUUUAUGGUGCAGUAACCAAC-3'. Al momento de la transfección se mezclaron la oligofectamina y los oligonucleótidos junto con OptiMem, luego esta mezcla fue incubada durante 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente, esta mezcla se añadió al medio de cultivo y las células. Luego de una incubación de 4 horas a 37°C fue añadido medio adicional con suero fetal bovino 3X (30%). Al día siguiente se realizaron los protocolos experimentales relacionados. Como control adicional al experimento, se extrajeron proteínas totales y se verificó el silenciamiento de la neuroglobina, mediante análisis de western blot.

5.15. Análisis estadístico

De manera inicial se realizaron pruebas de normalidad sobre los datos para garantizar que cumplieran con los supuestos de la prueba estadística propuesta. Por ejemplo, en el caso de

los datos examinados por ANOVA se utilizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk para evaluar la normalidad de los datos y la prueba de Bartlett para verificar la homogeneidad de varianzas. Cuando se cumplían estos supuestos, se utilizaba una prueba ANOVA unidireccional para evaluar si existían diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, junto con las pruebas t de Student no apareadas de dos colas con corrección de SD y Bonferroni a un nivel alfa (por ejemplo, 0.05). Sin embargo, si los supuestos no se cumplían, se realizaron pruebas no paramétricas de suma de rangos de Kruskal-Wallis, para comparar los valores medios entre los grupos. Las comparaciones de pares para las variables no paramétricas se realizaron utilizando la prueba post-hoc de Conover con el ajuste de Bonferroni de los valores p y la prueba de Tukey-Kramer HSD (Tukey HSD) cuando los datos tenían tamaños de muestra desiguales. En este estudio consideramos que un valor de $p < 0.05$ era estadísticamente significativo. Los datos se muestran como gráficas de caja (para comparar gráficamente la distribución y variabilidad de los datos entre grupos, como en el caso de los datos de microscopía electrónica) o diagramas de barras (presentados como la media \pm SEM de 3 experimentos independientes). Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el entorno informático R versión 3.1.2 (R Core Team, 2016) y los paquetes GoodmanKruskal (Pearson, 2016), PMCMR (Pohlert, 2014), DTK (Lau, 2013) y Graphpad Prism 5.0 (<https://www.graphpad.com/guides/prism/6/>). Los datos fueron visualizados utilizando los paquetes R ggplot2 (Wickham, 2009) y cowplot (Wilke, 2016), junto con Graphpad Prism 5.0.

5.16. Modelo computacional de la protección mitocondrial por parte del PDGF-BB

Con el fin de complementar los resultados experimentales relativos a los efectos ejercidos por el PDGF-BB sobre los efectos de la rotenona en las distintas propiedades celulares estudiadas, se generó un modelo computacional cinético en la plataforma COPASI (Hoops et al., 2006), que permitió predecir el comportamiento de distintos elementos de manera dinámica a través del tiempo (24 h). Se partió de un modelo de regulación de ERO desarrollado por Ignatenko et al., 2014, en el cual se estudiaba el efecto del daño mitocondrial en la producción de ERO, encaminado al estudio de eventos patológicos como enfermedades neurodegenerativas y cáncer, el cual constaba de 15 reacciones y 19 especies,

distribuidas en 4 módulos o bloques de mecanismos regulatorios frente a la producción de ERO, como mitofagia, maquinaria antioxidante, regulación de NF- κ B y regulación de Nrf2Keap1, basados principalmente en una cinética de acción de masas (Ignatenko et al., 2014; Romashkova y Makarov 1999). El modelo desarrollado para este estudio consta de 30 especies (Tabla 4) y 25 reacciones (Tabla 5) que utilizan igualmente la cinética de acción de masas y la cinética de flujo constante, junto con algunas nuevas funciones derivadas de la cinética de acción de masas las cuales habían sido generadas previamente para el modelo de Ignatenko et al., (2014), como: Alexey_1S_1A_irrev, Healthy mit, R1S-2act y 1s-1act-1inh-rev.

En el presente modelo se tuvieron en cuenta varios de los metabolitos y reacciones que participan en la vía de señalización del PDGF-BB y que habían sido estudiados experimentalmente en las células astrocitarias T98G, tales como la activación del NF- κ B, enzimas antioxidantes y neuroglobina (Ngb). Igualmente se tuvieron en cuenta procesos asociados a la EP, tales como la disminución en la producción de ATP, cambios en el $\Delta\psi_m$ y la funcionalidad mitocondrial, efectos en la producción de ERO y silenciamiento de la neuroglobina por medio de un RNAi. Estas reacciones a su vez fueron categorizadas en 4 módulos funcionales para facilitar su descripción en el texto los cuales fueron: un módulo de señalización, un módulo de reacciones asociadas a Nrf2, un módulo mitocondrial y un módulo de reacciones asociadas a la neuroglobina. Igualmente, cada uno de estos módulos se encontraba participando en reacciones estrechamente relacionadas entre sí, como la producción de ATP y NADH, o la activación de una vía de señalización (por ejemplo la activación de NF- κ B por IKK).

El modelo junto con las ODE utilizadas se encuentran como archivo anexos en formato XML y c. para Wordpad.

5.17. Descripción y parámetros del modelo

Como se mencionó anteriormente, se llevó a cabo el diseño de un modelo dinámico de la protección mitocondrial del PDGF-BB en la plataforma COPASI (Hoops et al., 2006), a partir de un modelo previo desarrollado por Ignatenko y colaboradores (2014). Igualmente,

se realizó un diagrama del modelo en el programa Cell designer, para su visualización (Funahashi et al., 2003) en el cual se presentan las reacciones del modelo, junto con su direccionalidad (Figura Anexa 8).

En la Tabla 4 se describen las reacciones utilizadas para el modelo y en la tabla 5, se describen las ecuaciones asociadas a estas reacciones.

ATP(0)	997.702 [nM]
ADP(0)	2.29 [nM]
Antioxidants	1050 [nM]
BCLX1(0)	0 [nM]
Damaged mitochondria(0)	37.9 [nM]
Degradation(0)	0 [nM]
H ₂ O (0)	1[nM]
Healthy Mitochondria (0)	142 [nM]
Hi	499.22 [nM]
S (Sustrato)	1 [nM]
Ho	1500.78[nM]
IkBA	1[nM]
IkBa-NFkB	9.2 [nM]
Ikk	100[nM]
Ikk-p	0 [nM]
Keap1Act	94.13[nM]
Keap1Inact	5.87[nM]
NAD	905.13[nM]
NADH+	114.132[nM]
NFkB	0.0009[nM]
Nrf2Act	10,51121[nM]
Nrf2Inact	89 [nM]
O ₂	1[nM]
p62	523.603 [nM]
PDGF	0.5[nM]
ROS	25.3 [nM]
Rotenone	0,0

Neuroglobin	2.67149893 [nM]
RNAi	0.0

Tabla 4. Especies presentes en el modelo computacional.

Número	Reacción	Función cinética	Nombre de la Reacción
1	"re 1 S" + ATP -> "HEALTHY MITH" + ADP; "HEALTHY MITH"	Healthy mit	Producción de ATP por mitocondrias funcionales
2	"HEALTHY MITH" -> "DAMAGED MITOCH"; ROS NEURO	R1S-2act	Paso de mitocondrias funcionales a mitocondrias deterioradas por ERO
3	"DAMAGED MITOCH" + p62 -> deg	Acción de masas	Degradación de mitocondrias deterioradas
4	ROS -> deg; Antiox NEURO	R1S-2act	Degradación de ERO por antioxidantes y neuroglobina
5	"re 1 S" -> p62; Nrf2Act	Alexey_1S_1A_irrev	Formación de p62 por activación de Nrf2
6	p62 -> deg	Acción de masas	Degradación de p62
7	"re 1 S" -> Antiox; Nrf2Act	Alexey_1S_1A_irrev	Formación de moléculas antioxidantes por Nrf2
8	Antiox -> deg	Acción de masas	Degradación de antioxidantes
9	Keap1Act = Keap1Inact; ROS	S1Act1Rev	Paso de keap1 activado a inactivado
10	Nrf2Act -> Nrf2Inact; Keap1Act PDGF	1s-1act-1inh-rev	Activación de Nrf2 por PDGF
11	"re 1 S" -> Bclxl; NfkB	Alexey_1S_1A_irrev	Generación de Bclxl por NF-κB
12	Bclxl -> deg	Acción de masas	Degradación de Bclxl
13	"DAMAGED MITOCH" -> "HEALTHY MITH"; Bclxl	Alexey_1S_1A_irrev	Reconversión de mitocondrias dañadas a funcionales
14	IkBa-NFκB -> NfkB; Ikk-P	Alexey_1S_1A_irrev	Activación de NF-κB por eliminación de IkBA
15	NfkB -> IkBa-NFκB; IkBA	Alexey_1S_1A_irrev	Inhibición de NF-κB por IkBA
16	Ikk -> Ikk-P; PDGF	Alexey_1S_1A_irrev	Activación de Ikk dependiente de PDGF
17	Ikk-P -> Ikk	Acción de masas	Activación de IKK
18	ATP -> ADP	Acción de masas	Formación de ATP
19	HO + ADP = HI + ATP; "HEALTHY MITH"	ATPsynth	Formación de ATP a travez de transporte de proteones
20	O2 + HI + NADH+ = H2O + HO + NAD; "HEALTHY MITH"	3s1act	Metabolismo oxidativo de la rotenona
21	NAD -> NADH+	Acción de masas	Formación de NADH
22	NADH+ -> ROS + NAD; ROTENONE	FUNCTIONNADH	Balance de mitocondrias funcionales/deterioradas

	"HEALTHY MITH" "DAMAGED MITOCH"		
23	"S -> NEURO; PDGF	Alexey_1S_1A_irrev	Generación de neuroglobina
24	NEURO -> deg; RNAi	Alexey_1S_1A_irrev	Degradación de neuroglobina por RNAi
25	NEURO->deg	Acción de masas	Degradación de la neuroglobina en función al tiempo

Tabla 5. Reacciones del modelo computacional. Se presentan las reacciones desarrolladas para el modelo computacional en COPASI, junto con el nombre descriptivo y la función cinética asociada. Cada una de estas reacciones se encuentra asociada a su ecuación correspondiente descrita en la tabla siguiente.

Ecuaciones	Descripcion	Parámetros	Referencia
v₁	Functional Mitochondria ATP production $k_1 \cdot S \cdot ATP(t) \cdot MitochFunctional(t) / (MitochFunctional(t) + 1)$ [nM/min]	$k_1 = 0.001 \text{ min}^{-1}$	Sies, 1997; Ignatenko et al., 2014
v₂	ROS-induced Mitochondrial damage: $k_1 \cdot MitochFunctional \cdot ROS^2(t)$	$k_1 = 0,0147 \text{ min}^{-1}$	Ignatenko et al., 2014
v₃	$k_1 \cdot MitochDamage(t) \cdot p62(t)$	$k_1 = 0.05 \text{ min}^{-1}$	Ignatenko et al., 2014
v₄	ROS degradation $k_1 \cdot ROS(t) \cdot Antiox(t)$	$k_1 = 5l / (mol \cdot \text{min}) =$	Sies, 1997; Ignatenko et al., 2014
v₅	p62 activation $k_1 \cdot Nrf2Act(t) \cdot S(t)$	$k_1 = 500l / (mol \cdot \text{min})$	Ignatenko et al., 2014
v₆	P62 degradation $k_1 \cdot S(t)$	$k_1 = 0.5 \text{ min}^{-1}$	Ignatenko et al., 2014
v₇	Antioxidant generation $k_1 \cdot Nrf2Act(t) \cdot S(t)$	$k_1 = 1l / (mol \cdot \text{min})$	Morgan and Liu, 2011 Ignatenko et al., 2014
v₈	Antioxidant degradation $k_1 \cdot S(t)$	$k_1 = 0.01 \text{ min}^{-1}$	Prieto, 2014 Ignatenko et al., 2014

v₉	Keap1 balance $k_1 \cdot Keap1Act(t) \cdot ROS(t) - kb \cdot Keap1Inact(t)$	$k_1 = 1l/(mol \cdot min)$	Ignatenko et al., 2014
v₁₀	Nrf2 balance $Nrf2Act(t) \cdot Keap1Act(t) \cdot k_1 / 1 + PDGF \cdot kinh - kb \cdot Nrf2Inact$	$k_1 = 0.1l/(mol \cdot min)$	Morgan and Liu, 2011 Ignatenko et al., 2014 Cabezas et al., 2017
v₁₁	Bclxl activation $k_1 \cdot NFkB(t) \cdot S(t)$	$k_1 = 0.0001l/(mol \cdot min)$	Ignatenko et al., 2014
v₁₂	Bclxl degradation $k_1 \cdot S(t)$	$k_1 = 0.1 \text{ min}^{-1}$	Ignatenko et al., 2014
v₁₃	Mitochondrial balance $k_1 \cdot Bclxl(t) \cdot S(t)$	$k_1 = 0.0005l/(mol \cdot min)$	Ignatenko et al., 2014
v₁₄	NFkB activation $k_1 \cdot ikk - p(t) \cdot S(t)$	$k_1 = 0.1l/(mol \cdot min)$	Morgan and Liu 2011; Ignatenko et al., 2014
v₁₅	NFkB inactivation $k_1 \cdot ikBA(t) \cdot S(t)$	$k_1 = 0.1l/(mol \cdot min)$	Morgan and Liu, 2011; Ignatenko et al., 2014
v₁₆	PDGF activation of NFkB $k_1 \cdot PDGF(t) \cdot S(t)$	$k_1 = 0.1l/(mol \cdot min)$	Romashkova and Makarov, 1999
v₁₇	ikk balance	$k_1 = 0.1 \text{ min}^{-1}$	Morgan and

	$k_1 \cdot IKK - p(t)$		Liu, 2011; Ignatenko et al., 2014
v₁₈	ATP balance $k_1 \cdot ATP(t)$	$k_1 = 100 \text{ min}^{-1}$	Ignatenko et al., 2014
v₁₉	ATP synthesis $Ho(t) \cdot ADP(t) \cdot HealthyMith(t) - Hi(t) \cdot ATP(t)$	$k = 0.01 \text{ min}^{-1}$	Ignatenko et al., 2014, estimación de parámetros
v₂₀	Oxygen metabolism $k_1 \cdot O2(t) \cdot Hi(t) \cdot NADH + (t) \cdot HealthyMith - H2O(t) \cdot Ho(t) \cdot NAD(t) \cdot kb$	$k_1 = 1l^3 / (\text{mol}^{3-\text{min}})$	Ignatenko et al., 2014
v₂₁	NADH balance $k_1 \cdot NAD(t)$	$k_1 = 100 \text{ min}^{-1}$	Ignatenko et al., 2014
v₂₂	Mitochondrial damage of rotenone $S \cdot (Rotenone(t) \cdot Krot + HealthyMith \cdot Khealth + Damage \cdot kdamage)$	$krot = 120l / (\text{mol} \cdot \text{min})$	Kubli and Gustafsson, 2012 Ignatenko et al., 2014
v₂₃	Neuroglobin generation: $d([NEURO].V)/dt = V \cdot (k_{neuro} [PDGF][S])$	$k = 0.05343 \text{ min}^{-1}$	Estimación de parámetros de acuerdo a Cabezas et al., 2017
v₂₄	$d([DEG].V)/dt = V(k_f[Neuro])$	$K = 0.1 \text{ min}^{-1}$	Cucatto et al., 2011
v₂₅	$d([NEURO].V)/dt = -V(I[Neuro]).$	$k = 0.01 \text{ min}^{-1}$	Estimacion de parámetros de

			acuerdo a Cabezas et al., 2017
--	--	--	--------------------------------

Tabla 6. Ecuaciones del modelo computacional. Ecuaciones asociadas a las reacciones descritas en la tabla 5. Estas ecuaciones son explicadas en los párrafos siguientes.

Las reacciones desarrolladas en este modelo buscaron integrar distintos aspectos funcionales de los principales efectos regulatorios por parte del PDGF-BB y la rotenona, observados en la parte experimental de nuestro estudio. Teniendo en cuenta estas premisas se desarrollaron 25 reacciones (Tabla 5) que simulan los puntos principales de nuestros resultados experimentales. En la Tabla 6 se describen las ecuaciones asociadas a las reacciones de nuestro modelo computacional. Al respecto, nuestro modelo asume de manera similar a Ignatenko et al., (2014), que el principal productor de ERO, son las mitocondrias dañadas, lo cual se muestra en las reacciones 1 y 2. Por otra parte, las funciones cinéticas no convencionales, utilizadas en el presente modelo, son las siguientes (Tabla 7):

Nombre de función	Formula	Explicación
Alexey_1S_1A_irrev :	$K_f * Act * S$	Multiplicación de una especie activadora por una constante y un sustrato.
Healthy mit:	$K * S1 * S2 * act / act + 1$	Utiliza dos sustratos : S y ATP, siendo la concentración de las mitocondrias saludables [Healthy Mit] el modificador o activador.

1s-1act-1inh-rev	$(S \cdot Act \cdot kAct / (1 + inh \cdot kinh)) - kb \cdot P$	Utiliza 2 modificadores Keap1 y PDGF para causar la activación de Nrf2.
R1S-2act	$(kact1 \cdot Act1 + kact2 \cdot Act2) \cdot S$	Utiliza 2 activadores, en este caso neuroglobina (Neuro) y concentración de antioxidantes (Antiox) durante la degradación de ERO (ROS)

Tabla 7. Funciones cinéticas no convencionales utilizadas en el modelo computacional. Se presentan las funciones cinéticas no convencionales junto con su formula y una breve descripción.

A continuación se exponen las reacciones utilizadas en el modelo computacional:

Módulo mitocondrial

1. Producción de ATP a partir de mitocondrias funcionales (Functional Mitochondria ATP production):

$$k_1 \cdot S \cdot ATP(t) \cdot MitochFunctional(t) / (MitochFunctional(t) + 1) \text{ [nM/min]}$$

Esta primera ecuación indica que la producción de ATP es dependiente de las mitocondrias funcionales

2. Daño de mitocondrias funcionales por parte de ERO

$$k_1 \cdot MitochFunctional \cdot ROS^2(t)$$

Las mitocondrias dañadas o deterioradas son una fracción de las mitocondrias totales (o también una proporción entre mitocondrias saludables/ mitocondrias dañadas), que tiene como resultado el incremento en la producción de ERO (ROS).

$$R_{sp} = \frac{R}{D + H} \quad (\text{Ignatenko et al., 2014})$$

Donde R es la concentración de ROS, D representa las mitocondrias dañadas y H las mitocondrias funcionales.

Por otra parte, en el modelo computacional la rotenona incrementa la producción de ERO (ROS) de acuerdo a la ecuación 22:

22. Daño mitocondrial por parte de la rotenona (Mitochondrial damage of rotenone), proceso en parte atribuible a la activación mitofágica por parte de la rotenona (Chu et al., 2013).

$$S \cdot (\text{Rotenone}(t) \cdot Krot + \text{HealthyMith} \cdot Khealth + \text{Damage} \cdot kdamage)$$

La rotenona en nuestro modelo esta produciendo un daño mitocondrial, que disminuye la proporción de mitocondrias funcionales en el modelo.

La síntesis de ATP está dada por la ecuación:

$$19. Ho(t) \cdot ADP(t) \cdot \text{HealthyMith}(t) - Hi(t) \cdot ATP(t)$$

En la cual la producción de ATP está determinada por el buen funcionamiento mitocondrial y el transporte de protones externos (Ho).

Sin embargo debe existir un balance entre ATP y ADP en función al tiempo

18. Balance de ATP (ATP balance):

$$k_1 \cdot ATP(t)$$

Por otra parte, el metabolismo oxidativo mitocondrial está dado por la ecuación:

$$20. \quad k_1 \cdot O2(t) \cdot Hi(t) \cdot NADH + (t) \cdot \text{HealthyMith} \\ - H2O(t) \cdot Ho(t) \cdot NAD(t) \cdot kb$$

El balance del cofactor NADH, importante en el transporte de electrones mitocondrial está dado por la ecuación 21.

21. Balance de NADH (NADH balance):

$$k_1 \cdot NAD(t)$$

La degradación de especies reactivas de oxígeno está determinada por la producción de antioxidantes (antiox) según la ecuación 4.

4. Degradación de ERO (ROS degradation)

$$k_1 \cdot ROS(t) \cdot Antiox(t)$$

Módulo de reacciones asociadas a Nrf2:

En este modelo, los antioxidantes (Antiox) son inducidos por el factor de transcripción Nrf2 (Ignatenko et al., 2014; Nguyen et al., 2009), el cual es un importante regulador del estrés oxidativo junto con KEAP1 siendo también activado por PDGF-BB (Ashino et al., 2013). Por otra parte se ha visto que Nrf2, regula la expresión de genes antioxidantes como NQO1, GST, SOD, CAT, TRX, GPx, y GSR (Dong et al., 2008). La regulación de la vía Nrf2-keap está dada por las ecuaciones 7, 8, 9 y 10:

7. Generación de antioxidantes (Antioxidant generation):

$$k_1 \cdot Nrf2Act(t) \cdot S(t)$$

8. Los antioxidantes (S) se degradan en función del tiempo (Antioxidant degradation):

$$k_1 \cdot S(t)$$

El factor de transcripción Nrf2, es activado por Keap, el cual puede pasar de un estado activo (Keap1Act) a un estado inactivo (Keap1Inact):

9. Keap balance

$$k_1 \cdot Keap1Act(t) \cdot ROS(t) - kb \cdot Keap1Inact(t)$$

10. Nrf2 balance

$$Nrf2Act(t) \cdot Keap1Act(t) \cdot k_1 / 1 + PDGF \cdot kinh - kb \cdot Nrf2Inact$$

El daño mitocondrial está siendo regulado por p62, una proteína implicada en la dinámica mitocondrial (formación/degradación) y la cuál es activada por Nrf2 (Ivankovic et al., 2015), tal como se expone en las ecuaciones 3 , 5 y 6 :

3. $k_1 \cdot MitochDamage(t) \cdot p62(t)$: recuperación del daño mitochondrial en function a la activación de p62.

5. $k_1 \cdot Nrf2Act(t) \cdot S(t)$: Activación de Nrf2 en function al tiempo.

6. Degradación de p62 (p62 degradation):

$$k_1 \cdot S(t)$$

Módulo de señalización:

Varias ecuaciones (14-17) se encuentran asociadas a la activación del NF-κB y de varias proteínas que controlan esta función (IKK e IKBA; Napetschnig y Wu, 2013).

14. Activación del NF-κB , por fosforilación de IKK (NFκB activation):

$$k_1 \cdot ikk - p(t) \cdot S(t)$$

15. Inactivación de NF-κB por union a IKBA (NFκB inactivation):

$$k_1 \cdot ikBA(t) \cdot S(t)$$

17. Balance del IKK en función al tiempo y al balance entre forma fosforilada (p) y no fosforilada (ikk balance):

$$k_1 \cdot IKK - p(t)$$

En nuestro modelo, el PDGF-BB induce la activación de NF-κB (Romashkova y Makarov 1999) , como modificador (eg. A mayor concentración de PDGF-BB se tendrá una mayor activación de NF- κB), al actuar sobre el IKK:

16. $ikk \rightarrow Ikk-P$; PDGF

Por otra parte y en concordancia con Ignatenko (2014) y Romashkova y Makarov (1999), el efecto de la activación del NF- κ B sería antiapoptótico y estaría induciendo la activación del gen antiapoptótico Bclxl y su posterior degradación en función al tiempo (ecuaciones 11 y 12):

11. Activación de Bclxl dependiente de NF κ B (Bclxl activation):

$$k_1 \cdot NF\kappa B(t) \cdot S(t)$$

12. Degradación de Bclxl en función al tiempo (Bclxl degradation):

$$k_1 \cdot S(t) \text{ donde S es Bclxl.}$$

Igualmente, en el modelo de Ignatenko y colaboradores (2014), se considera que la proteína Bclxl influye sobre el balance mitocondrial, ya que es activado por el NF- κ B ((Barkett y Gilmore, 1999), de acuerdo a la ecuación 13:

13. El balance mitocondrial (Mitochondrial Balance), depende de la actividad de Bclxl en function al tiempo:

$$k_1 \cdot Bclxl(t) \cdot S(t)$$

Módulo de reacciones asociadas a la neuroglobina:

La activación de neuroglobina por PDGF-BB está determinada por la ecuación 23:

$$23. \frac{d([NEURO].V)/dt = V.(k_{neuro} [PDGF][S])$$

En la cuál, la formación de la Neuroglobina a partir de un sustrato (S), es dependiente del PDGF-BB, de acuerdo a lo que se encontró en nuestros resultados experimentales:



La disminución en la expresión de la neuroglobina es determinada por la ecuación 24:

$$24. \frac{d([DEG].V)/dt = V(k_f[Neuro]) \text{ donde la degradación de la neuroglobina es dependiente del RNAi.}$$

NEURO -> DEG; RNAi (reacción 24)

En esta reacción se asume que el RNAi induce la degradación de las moléculas de neuroglobina por medio de la función de acción de masas (Cucatto et al., 2011).

25. Degradación de neuroglobina en función al tiempo:

$$d([NEURO].V)/dt = -V(I[Neuro]).$$

NEURO -> DEG;

Por ultimo, el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) se encuentra determinado por la concentración de protones externos (H_o) sobre la concentración interna (H_i):

$$[\text{potential}] = [H_o]/[H_i].$$

Como se vió anteriormente, esta concentración de protones es dependiente de la funcionalidad mitocondrial (Healthy Mith), determinadas por las reacciones 21 y 22.

Las simulaciones para los cursos temporales se llevaron a cabo utilizando 144 intervalos de 10 min, durante 1440 min (24 h), utilizando el método determinístico LSODA (que permite resolver reacciones reversibles), para integración de ODEs, con una tolerancia relativa de $1 \cdot 10^6$ y un número máximo de pasos de 10000. Adicionalmente la plataforma COPASI, utilizó las matrices LAPACK/Blas para las rutinas de matrices y vectores (Hoops et al., 2006). Finalmente, se realizó un análisis de sensibilidad local del modelo (Surovtsova et al., 2012) en la plataforma COPASI, utilizando la tarea *sensitivities*, junto con la subtarea (*subtask*) *Time series*, calculando el efecto de un objeto simple (es decir un único factor de modificación) sobre variables como reacciones individuales específicas o cambios en las concentraciones de las especies del modelo. De esta forma, se estudiaron los efectos del la rotenona, el PDGF, la concentración de antioxidantes, Neuroglobina y ERO, sobre las variables anteriormente mencionadas del modelo y que serán detalladas en la sección 7.4.2 de los resultados. Para este análisis se utilizó un factor delta (Factor de corrección) de 0.001 y un delta mínimo de 10^{-12} . Los resultados del análisis de sensibilidad permitieron

identificar cuales de estos parámetros se veían más afectados por los efectos de las especies de interés antes mencionados.

5.18. Validación experimental del modelo computacional

El modelo computacional fue parcialmente validado utilizando una línea celular NF- κ B / 293 / GFP-LucTM, la cual posee un reportero transcripcional fluorescente para NF- κ B. Se utilizaron las condiciones de cultivo y los tratamientos previamente especificados (Sección 5.1.1). Estos experimentos se explican en detalle en la sección 6.4, experimento 4.2.

6. DISEÑO EXPERIMENTAL

A continuación se presentará la estrategia experimental que se llevó a cabo, para cumplir con los objetivos propuestos. En esta sección se muestra objetivo por objetivo, la hipótesis derivada y la propuesta experimental que se ejecutó para validar el planteamiento y aportar evidencia.

6.1. Diseño experimental 1

6.1.1 Objetivo 1. Determinar el efecto de PDGF-BB sobre la viabilidad y proliferación en la línea celular T98G tras el tratamiento con rotenona.

Hipótesis 1. La administración de PDGF-BB reduce los daños en células expuestas a rotenona.

Experimento 1.1. Inicialmente se evaluaron los efectos nocivos de la rotenona sobre la línea celular T98G de glioblastoma (Figura 5). Se utilizó el método MTT para determinar el IC₅₀ de la rotenona sobre esta línea celular. Con la determinación del IC₅₀ en el experimento anterior, se procedió a evaluar el efecto del PDGF-BB en la supervivencia celular, utilizando dosis diferenciales de este factor de crecimiento y evaluando las mejores condiciones de protección que serán detalladas en los siguientes párrafos. La concentración y los tiempos de estimulación del PDGF-BB en los cuales se observó una mejor preservación de la viabilidad en las células T98G fueron determinados evaluando

diferentes concentraciones del factor de crecimiento (50 a 200 ng/mL) en células estresadas con la IC₅₀ de rotenona encontrada por MTT. Se evaluó igualmente el efecto sobre la viabilidad y la fragmentación nuclear ejercida por la rotenona y el PDGF-BB, utilizando tinción nuclear de Hoetsch, junto con IP, mediante microscopía de fluorescencia. Con anterioridad se ha reportado con éxito el uso de estas metodologías para experimentos con rotenona (de Oliveira et al., 2010; Swarnkar et al., 2012). Se utilizaron 4 grupos experimentales en todos los experimentos: un Control (células en medio DMEM sin SBF), células tratadas con PDGF-BB, células tratadas con Rotenona y células tratadas con PDGF-BB y rotenona (Tabla 7). Es importante mencionar que la privación del SBF del medio de cultivo DMEM garantizaba la ausencia de PDGF y otros factores de crecimiento que pudieran estar afectando los resultados experimentales (Franke et al., 2014).

Grupo Experimental	Control no estimulado	PDGF-BB	Rotenona	PDGF-BB + Rotenona
1	+	-	-	-
2	-	+	-	-
3	-	-	+	-
4	-	-	-	+

Tabla 8. Grupos experimentales de estudio.

Evaluación de condiciones experimentales:

Como se había mencionado, en una primera instancia, se estudiaron las siguientes condiciones experimentales a partir de las cuales se establecieron los parámetros de tiempo y concentración para PDGF-BB y la rotenona para los experimentos subsiguientes. Las condiciones evaluadas fueron:

Pre-tratamiento con PDGF-BB: El pre-condicionamiento de las células con PDGF-BB antes del daño con rotenona puede ejercer un incremento en mecanismos de defensa y activación genética que puede proteger contra el insulto oxidativo de la rotenona .

Cotratamiento con PDGF-BB: Las células fueron tratadas de forma simultánea con la dosis IC_{50} de rotenona y una dosis protectora de PDGF-BB.

Post-tratamiento con PDGF-BB: Las células fueron tratadas inicialmente con la dosis IC_{50} de rotenona y posteriormente con PDGF-BB. El post-tratamiento tiene un gran interés clínico, puesto que la administración farmacológica es utilizada posteriormente a la aparición del daño cerebral.

En nuestros experimentos iniciales se observó que las mejores condiciones de protección frente a rotenona eran las de un pretratamiento con PDGF-BB (200 ng/mL) por 24 horas, seguidas de el insulto con rotenona (50 μ M) por 24 h. Por lo tanto estas fueron las condiciones experimentales empleadas en todos los objetivos del estudio tal y como se detalla en la Figura 11 en la sección de resultados.

Hipótesis 2. La administración de PDGF-BB reduce la activación astrocitaria en células expuestas a rotenona

Experimento 1.2. Determinación de la expresión de GFAP, vimentina y Rhoa en células astrocitarias sometidas a daño oxidativo con rotenona

La activación astrocitaria se ve caracterizada por un aumento en la expresión de proteínas ligadas al citoesqueleto astrocitario, como la GFAP, la vimentina y la RhoA, así como cambios importantes en la morfología (Schnitzer et al., 1981; Kosako et al., 1997; Hamby y Sofroniew, 2010). Es posible que los tratamientos con PDGF-BB disminuyan la activación astrocitaria ejercida por la rotenona, ya que se ha comprobado que diversos factores de crecimiento ejercen actividades protectoras en neuronas y astrocitos (Hsuan et al., 2006; Mattson, 2008; Safi et al., 2011; Lladó et al., 2013). Igualmente Lladó y colaboradores(2013) reportaron que el VEGF disminuía la reactividad en astrocitos

murinos mediante la activación de las vías PI3K/AKT y ERK, sugiriendo la importancia de los factores de crecimiento en la regulación de la activación astrocitaria (Lladó et al., 2013). En el **Exp. 1.2.** se determinó la activación astrocitaria mediante la evaluación de la expresión de las proteínas del citoesqueleto GFAP, vimentina y RhoA por inmunocitoquímica y por Western Blot para los tratamientos establecidos en el **Exp. 1.1.** Igualmente, los cambios morfológicos fueron analizados utilizando la herramienta informática 2.5 ImageJ plug-in (Karperien, A., Frac Lac for ImageJ, versión 2.5. <http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins/fraclac/FLHelp/Introduction.htm>, 1999-2007), según como fue detallado en la sección de metodología.

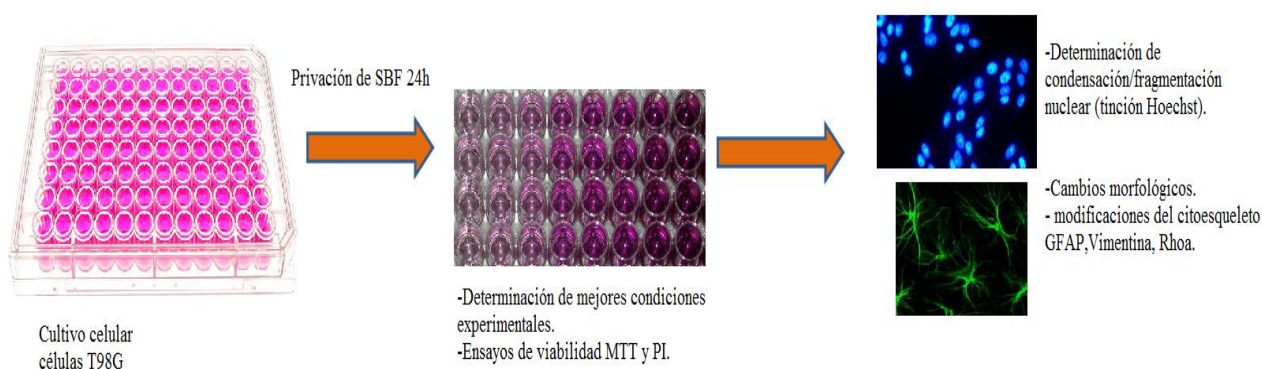


Figura 5. Figura representativa para el diseño experimental 1. Ver los métodos experimentales para ampliar la información sobre los parámetros de evaluación.

6.2. Diseño experimental 2.

6.2.1 Objetivo 2. Establecer el efecto del PDGF-BB sobre las funciones mitocondriales en células tratadas con rotenona.

Hipótesis 4. El PDGF-BB disminuye la producción de especies reactivas de oxígeno en las células tratadas con rotenona.

Experimento 2.1. Determinar los efectos del PDGF-BB en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) en células tratadas con rotenona.

Dentro de los principales efectos celulares ejercidos por la rotenona, se encuentra la producción de ERO y ERN tales como radicales superóxido, peróxido de hidrógeno y nitritos, los cuales son producidos principalmente en la mitocondria luego de la inhibición de los complejos de transporte de electrones I o III (Li et al., 2003; Swarnkar et al., 2012). Estudios anteriores han investigado el uso de compuestos antioxidantes como extractos vegetales, melatonina o factores de crecimiento como el IGF-I en la protección contra los efectos oxidativos de la rotenona (Avila et al., 2010; Falk et al., 2009; De Oliveira et al., 2010; Swarnkar et al., 2012). En el presente estudio se evaluó si el PDGF-BB disminuía la producción de ERO en células tratadas con rotenona. Adicionalmente, se realizaron experimentos por western blot para determinar el efecto del PDGF-BB sobre la expresión de enzimas antioxidantes celulares como la glutatión peroxidasa (GPx1) y la catalasa, utilizando las condiciones previamente determinadas en el **Exp. 1.1**. Para determinar la producción de ERO, se midió la fluorescencia de los compuestos hidroetidina (Het), diclofluoresceina diacetato, hidroxinonenal (HNE), 8 Hidroxiguanosina y 3 Nitrotirosina por microscopia de fluorescencia. La expresión de las enzimas antioxidantes SOD y GPx1 se realizó mediante la técnica de Western Blot para determinar el efecto del PDGF-BB y de la rotenona sobre estas enzimas de protección celular (Figura 6).

Hipótesis 5. El PDGF-BB mantiene el potencial de membrana mitocondrial en células tratadas con rotenona.

Experimento 2.2. Determinar el efecto del PDGF-BB sobre el mantenimiento del potencial de membrana mitocondrial.

El $\Delta\psi_m$ es un importante parámetro de la función mitocondrial la cual se ha visto afectada por dosis de rotenona en estudios anteriores (Avila-Gómez et al., 2010). En este mismo estudio se encontró que el pretratamiento con el factor de crecimiento IGF-I mantenía el $\Delta\psi_m$ en células tratadas con 250 μM de rotenona por 24 h, posiblemente por la activación de β -catenina (Avila et al., 2010; Desbois-Mouthon., 2001). Para la valoración de los cambios en el $\Delta\psi_m$, las células fueron incubadas con la sonda TMRM (0.5 $\mu\text{g/ml}$) por 20

min y evaluadas mediante citometría de flujo o microscopía confocal. La sonda TMRM se ha utilizado con éxito para la medición del $\Delta\psi_m$ ya que posee una menor unión a la mitocondria y produce una menor inhibición de la cadena de transporte de electrones que otras sondas (Scaduto et al., 1999; Perry et al., 2011). Para la determinación de la masa mitocondrial se utilizó el fluorocromo Naranja de acridina 10-Nonil Bromuro NAO (50 nM), el cual es secuestrado por mitocondrias activas (Oliva et al., 2011), mediante citometría de flujo y microscopía de fluorescencia. El fluorocromo NAO se une a cardiolipina y se excita a 490 nm. El procedimiento experimental se resume en la Figura 6.

Hipótesis 6. El PDGF-BB disminuye la concentración de calcio intracelular presente en células tratadas con rotenona.

Experimento 2.3. Evaluar los efectos de la rotenona y el PDGF-BB en la modulación del calcio intracelular.

El calcio intracelular regula importantes eventos fisiológicos tales como la fusión vesicular, la producción de energía, y procesos apoptóticos y de supervivencia (Clapham, 2007). Varios organelos se encargan de mantener la homeostasis intracelular del calcio, tales como el retículo endoplasmático, el complejo de Golgi y las mitocondrias (Clapham, 2007). Sin embargo, durante procesos de estrés celular, la producción de ERO, puede alterar la homeostasis del calcio, desencadenando procesos de necrosis, muerte celular y autofagia (Rizutto et al., 2012). En el caso de la rotenona, se ha sugerido que el tratamiento con este compuesto puede inducir efectores apoptóticos como caspasa-3 que se encuentran correlacionados con incrementos en los niveles intracelulares de Ca^{2+} mitocondrial (Swarnkar et al., 2012). Por otro lado, diversos estudios han sugerido que la señalización del PDGF-BB se encuentra regulada en parte por la concentración del calcio intracelular, tanto en condiciones normales como patológicas (Powis et al., 1990; Ridefelt et al., 1995; Pinzani, 2002; Peng et al., 2012). Al respecto se ha investigado que el PDGF-BB por unión a su receptor, activa la fosfolipasa C causando la formación de inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG), que incrementa la movilización de Ca^{2+} desde compartimientos intracelulares y conduce a la activación de la proteína quinasa C (Powis et al., 1990;

Ridefelt et al., 1995). Adicionalmente, en la línea de neuroblastoma SH-SY5Y se ha mostrado que el PDGF-CC protege contra la toxina TAT del VIH, por activación de los canales TRPC (Transient Receptor Potential Canonical Channel 1), que modulan la vía de proteínas cascada abajo como GSK3 β (Peng et al., 2012). Resulta por lo tanto interesante evaluar el efecto del PDGF-BB sobre las concentraciones de calcio en este modelo oxidativo en células astrocitarias. Es posible que el PDGF-BB al activar vías antiapoptóticas o de supervivencia pueda regular la concentración de calcio presente en compartimientos como el RE o la mitocondria, inhibiendo de esta manera los efectos apoptóticos de la rotenona.

La determinación de las concentraciones celulares de calcio se realizó por espectrofotometría en lector de placas (Fluostar Omega), mediante las sondas Fluo-4-AM para citoplasma, Fluo Rhod-2-acetil Ester para mitocondria y Mag-Fura-2-AM para retículo endoplasmático. Se espera encontrar que el tratamiento con el PDGF-BB podría tener un efecto modulador sobre las concentraciones de calcio, el cual podría estar involucrado en la protección contra la rotenona (Figura 6).

Finalmente, fueron evaluados por inmunofluorescencia, los cambios en la expresión de la proteína chaperona GRP78/bip en los distintos tratamientos. La proteína GRP78 además de sus funciones como chaperona molecular, cumple un importante papel en la regulación del calcio intracelular, especialmente a nivel del calcio del RE (Wang et al., 2009; Ouyang et al., 2011). Por otra parte se ha visto que esta proteína se encuentra desregulada en la EP y en modelos experimentales de esta enfermedad, incluyendo la rotenona (Hashida et al., 2012; Varma y Sen. 2015; Goswami et al., 2016).

Hipótesis 7. La ultraestructura de las membranas mitocondriales y citoplasmáticas está mejor preservada en células tratadas con PDGF-BB

Experimento 2.4. Establecer el efecto del PDGF-BB sobre los cambios ultraestructurales en células tratadas con rotenona.

Exp. 2.4. En este experimento se analizó la ultraestructura celular y mitocondrial de células tratadas con PDGF-BB y sometidas a un insulto con rotenona (Figura 6). El aumento considerable en la producción de radicales libres junto con el aumento en las concentraciones de calcio y la pérdida del $\Delta\psi_m$ podrían estar asociados a cambios en las ultraestructuras celulares y mitocondriales. Por lo tanto, se investigó si el PDGF-BB preserva la ultraestructura celular en células tratadas con rotenona. Como se mencionó previamente en el marco teórico, se ha reportado que el tratamiento con PDGF-AB en fibroblastos lesionados incrementa el volumen mitocondrial y el área superficial de las crestas (Gosslau et al., 2001). Sin embargo, no se conocen los efectos ultraestructurales que puedan tener el PDGF-BB en astrocitos durante lesión con rotenona.

Para la evaluación de la ultraestructura mitocondrial, se procedió a fijar las células en cada tratamiento representativo y los distintos tratamientos fueron visualizados mediante microscopía electrónica tal como fue descrito anteriormente en la parte de la metodología. El procesamiento de las muestra y el análisis de los datos fue realizado en colaboración con Paula Esquinas, de la Fundación Santa Fé (Bogotá, Colombia).

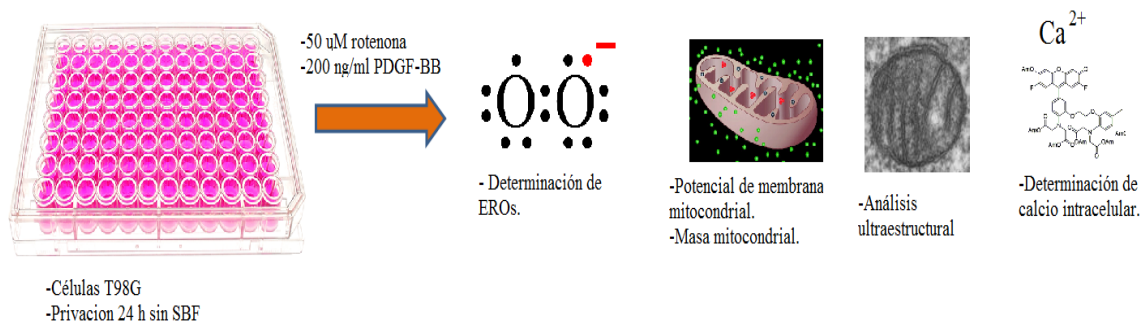


Figura 6. Figura representativa para el diseño experimental 2. Ver los métodos experimentales para ampliar la información sobre los parámetros de evaluación.

6.3. Diseño experimental 3.

6.3.1 Objetivo 3. Establecer si los efectos del PDGF-BB modulan la expresión de neuroglobina y la vía PI3K/AKT/NF- κ B. Hipótesis 10. Las funciones protectoras del PDGF-BB determinadas en los experimentos anteriores son moduladas por el eje de señalización PI3K/AKT y la activación de factores de transcripción como NF- κ B y proteínas como neuroglobina.

Experimento 3.1. Evaluar los efectos de la rotenona y el PDGF-BB en la vía de señalización PI3K/AKT/NF- κ B y neuroglobina.

Como se mencionó en los párrafos anteriores el PDGF-BB, tras la unión a su receptor PDGFR β , puede activar numerosas vías de señalización implicadas en funciones protectoras o reguladoras de mecanismos antiapoptóticos y de supervivencia.

La mayor parte de estos mecanismos de señalización han sido estudiados en neuronas o en líneas celulares neuronales como la SH-SY5Y (Zheng et al., 2010; Peng et al., 2012). Sin embargo, son pocos los trabajos realizados en astrocitos o en células de linaje astrocitario que busquen evaluar los efectos protectores de factores de crecimiento como el PDGF-BB. En el presente trabajo se buscó determinar cuáles de estos mecanismos de señalización son los más relevantes en la protección astrocitaria en la línea celular T98G.

Entre los mecanismos de estudio se evaluaron las cascadas mediadas por PI3K/AKT, MAPK y el factor de transcripción NF- κ B, los cuáles son mecanismos fundamentales activados por PDGF-BB (Andrae, 2008; Zheng et al., 2010; Peng et al., 2012), y se han visto relacionados con activación de mecanismos de proliferación, detención de la apoptosis y protección contra toxinas exógenas (Zheng et al., 2010; Peng et al., 2012). Como se mencionó en los párrafos precedentes, PI3K regula a su vez numerosos efectores y factores de transcripción que tienen relevancia en la protección celular tales como la quinasa GSK3 β , β -catenina, NF- κ B, Nrf2 y otros con posible interés para la protección frente a insultos oxidativos y mantenimiento del potencial mitocondrial (Romashkova y

Makarov, 1999; Desbois-Mouthon, 2001; Wang et al., 2010; Peng et al., 2012; Ashino et al. 2013; Cong et al., 2013). Por último, un estudio en un modelo neuronal, sugería que al estimular las células con una dosis de 10 μ M de rotenona se incrementaba la expresión y fosforilación de AKT y ERK (Varma et al., 2007), por lo cual, fue también interesante evaluar el efecto de la rotenona sobre la vía PI3K/AKT en nuestro modelo astrocitario de células T98G.

Inicialmente se evaluó la expresión y activación de las proteínas AKT, p-AKT, ERK NF- κ B y neuroglobina por Western Blot, utilizando las condiciones experimentales determinadas en el **Exp 1.1**, ya que en estas condiciones se observaron los mejores efectos en la protección de la viabilidad, reducción de ERO y conservación de la morfología celular y ultraestructural (Figura 7).

Hipótesis 12. La inhibición de la neuroglobina disminuye los efectos de protección mediados por el PDGF-BB frente a insulto por rotenona.

Experimento. 3.2. Inhibición de la neuroglobina con siRNA y determinación de parámetros funcionales.

Teniendo en cuenta que el PDGF-BB activa numerosas vías de señalización, resulta también interesante estudiar algunos de las proteínas asociadas a la protección frente a insulto oxidativo, especialmente aquellos relacionados con regulación del estrés oxidativo producido por la rotenona. Entre estos, se encuentra la neuroglobina, la cual como se mencionó con anterioridad se ha visto implicada en múltiples funciones en neuronas y astrocitos, incluyendo la eliminación de ERO y regulación mitocondrial (Brittain, 2012; Baez et al., 2016; Amri et al., 2017). En estudios anteriores de nuestro grupo (Avila-Rodríguez et al., 2015) se encontró que la neuroglobina incrementaba su expresión tras el estímulo con el esteroide sintético tibolona en un modelo astrocitario de privación de glucosa. Igualmente los resultados de este estudio mostraron que el silenciamiento de la neuroglobina mediante un RNAi prevenían las funciones protectoras de la tibolona en el mantenimiento del $\Delta\psi_m$ y la producción de ERO en el modelo astrocitario. Por otra parte,

se ha sugerido que a nivel genético la neuroglobina es activada por el factor de transcripción NF- κ B (Liu et al., 2012) durante hipoxia en cerebro. En los experimentos anteriores se sugirió que el PDGF-BB podría igualmente estar modulando la activación del NF- κ B, por lo que sería posible que a su vez el PDGF-BB, pudiese activar la proteína neuroglobina. Previamente también se mostró que el VEGF estimulaba la expresión de Ngb1 en neuronas de ratones (Jin et al., 2012), lo cual sugiere que otros factores de crecimiento también podrían estar implicados en la regulación de esta proteína. Silenciamos el gen de neuroglobina (NGB1) utilizando un RNAi Stealth, y procedimos a aplicar los protocolos experimentales 1.1 2.1 y 2.2 para determinar el efecto de la neuroglobina en la viabilidad, producción de ERO y $\Delta\psi_m$ en el modelo astrocitario de PDGF-BB y rotenona. De esta forma se determinó si las funciones protectoras del PDGF-BB fueron afectadas tras la inhibición de la neuroglobina (Figura 7).

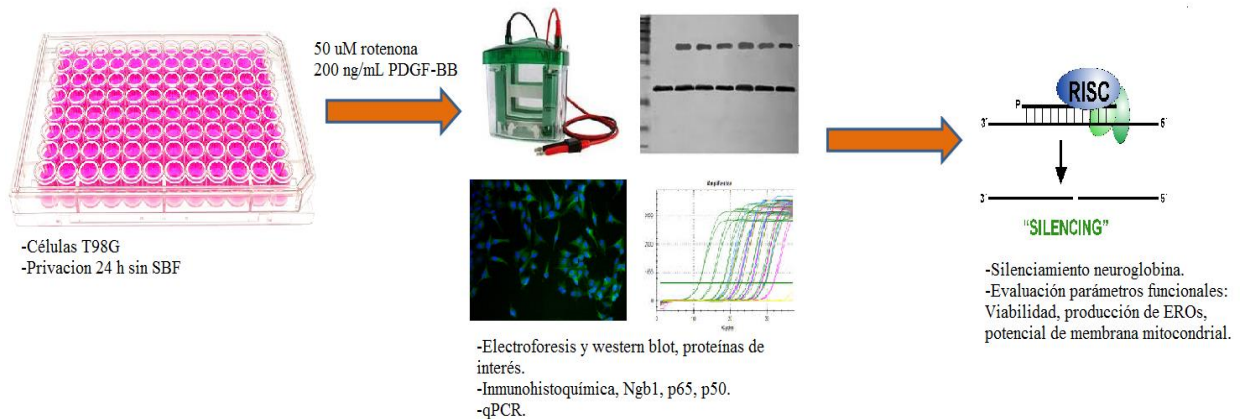


Figura 7. Figura representativa para el diseño experimental 3. Ver los métodos experimentales para ampliar la información sobre los parámetros de evaluación.

6.4. Diseño experimental 4.

Objetivo 4: Establecer un sistema computacional que permita apoyar los resultados experimentales en el modelo de protección del PDGF-BB frente a rotenona.

Experimento 4. 1. Generar un modelo computacional de la protección del PDGF-BB contra rotenona de las funciones mitocondriales.

Como se mencionó con anterioridad en la sección de la metodología, se generó un modelo computacional en la plataforma COPASI (Hoops et al., 2006) de las funciones protectoras del PDGF-BB. El modelo basado en el trabajo previo de Ignatenko et al., 2014, consta de 30 especies (Tabla 4) y 25 reacciones (Tabla 5) y ecuaciones diferenciales (ODEs), distribuidas en 4 módulos, relativos a mecanismos de protección activados por PDGF junto a procesos mitocondriales, activación antioxidante y reacciones de neuroglobina. Varios de estos procesos fueron estudiados por métodos experimentales durante el desarrollo de la tesis. Como se mencionó con anterioridad, la selección de los metabolitos y reacciones obedeció a criterios soportados por la literatura (Romashkova y Makarov, 1999; Cucatto et al., 2011; Morgan y Liu, 2011; Kubli y Gustafsson, 2012; Ignatenko et al., 2014), junto con los resultados experimentales encontrados durante nuestro estudio con células T98G (Cabezas et al., 2015). Igualmente se tuvo en cuenta la evidencia experimental previa relativa a la activación y translocación de NF- κ B por PDGF-B a través de la vía de señalización PI3k / Akt, en fibroblastos humanos primarios, (Romashkva y Makarov, 1999), que podría ser un proceso similar al que fue observado en nuestro modelo astrocitario T98G, frente al insulto por rotenona.

Inicialmente se generaron las condiciones para un análisis del modelo en estado estable (*steady state*), en el cual se encuentran las soluciones a las ecuaciones ODE del modelo, independientes de la variable tiempo cuando las tasas de cambio son iguales a 0, lo cuál también permite inferir la estabilidad del modelo. Este modelo en estado estable, el cual se asume no perturbado en el tiempo, puede solucionarse de acuerdo a la siguiente ecuación (Ignatenko et al., 2014):

$$\dot{x}_i(t) = 0.$$

A partir de los parámetros iniciales caracterizados para el *steady state* se realizó un curso temporal por 24h para las distintas condiciones de interés (modelo no estimulado, estimulación con PDGF, estimulación con Rotenona, y estimulación de PDGF + Rotenona),

utilizando intervalos de medición (*time steps*) cada 10 min, en los cuales las concentraciones para las distintas especies deben cumplir que:

$$x_i(t) \geq 0 \text{ para cualquier momento } t.$$

Por lo tanto fueron descartados aquellos resultados donde las concentraciones de las especies (x) eran negativos, por carecer de un significado biológico.(Ignatenko et al., 2014). Se utilizó un tiempo de 24 h para la simulación del modelo ya que este fue el tiempo experimental empleado previamente con células T98G (Cabezas et al., 2015 y 2017).

Los siguientes parámetros del modelo fueron analizados, debido a su gran importancia para la parte experimental:

- Expresión de NF- κ B
- Producción de ERO
- Potencial de membrana mitocondrial
- mantenimiento de mitocondrias funcionales
- Expresión y silenciamiento de la neuroglobina

También se generó un diagrama del modelo donde se muestran los distintos módulos junto a sus reacciones correspondientes. Por último, se realizó un análisis de sensibilidad local en la plataforma COPASI, para determinar cómo la modificación de los parámetros de interés (PDGF, Rotenona, Neuroglobina, etc), afectaban a las reacciones y especies del modelo (Figura 8).

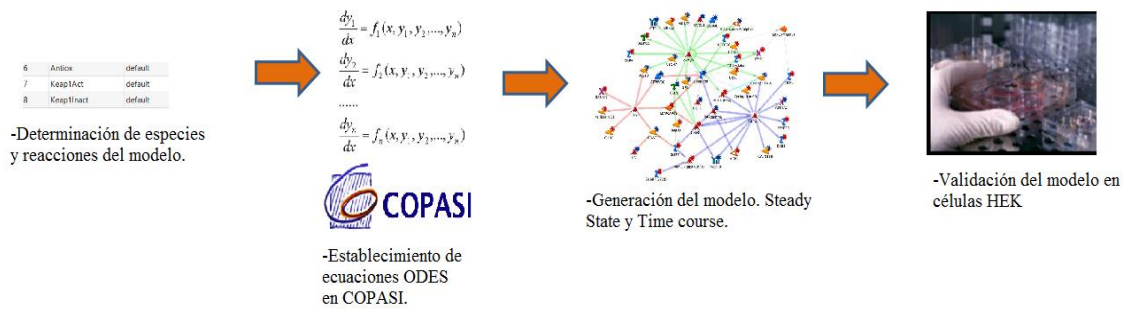


Figura 8. Diagrama de flujo representativo de la metodología para la construcción y validación del modelo computacional

Experimento 4.2. Validación experimental de algunos parámetros del modelo.

Posteriormente se validaron 3 parámetros (producción de ERO, $\Delta\psi_m$ y viabilidad) de este modelo utilizando la línea celular HEK NF- κ B / 293 / GFP-LucTM la cual es reportera para la translocación de NF- κ B mediante la activación de fluorescencia para GFP (Figura 8). Las células HEK fueron privadas de SBF por 24h previamente a los tratamientos. Para estas células se utilizó una dosis de 1 μ M de rotenona, ya que en los ensayos preliminares se observó que la dosis de 50 μ M resultó ser excesiva para que las células sobrevivieran 24h. Sin embargo, se utilizó la misma dosis de 200 ng/mL de PDGF-BB de los experimentos en células T98G. Como tratamiento control se utilizaron células HEK privadas de SBF por 24h.

Los experimentos se realizaron en un microscopio de fluorescencia (Nikon eclipse Ti microscope—ex/em 530/592 nm), haciendo una captura de imágenes cada 10 min para cada uno de los tratamientos (Control, PDGF 200 ng/mL, PDGF (200 ng/mL) + Rotenona (1 μ M) , y Rotenona (1 μ M), durante un curso temporal de 16 horas y analizando un total de 20 células por tratamiento/tiempo. Los resultados fueron analizados con MATLAB (r2013b), utilizando un script de análisis estadístico.

7. RESULTADOS

7.1. Efectos del PDGF-BB en la viabilidad y activación glial del modelo astrocitario

7.1.1. Efectos de la rotenona y el PDGF-BB en la viabilidad de las células astrocitarias

El isoflavonoide rotenona se ha utilizado en diversos modelos animales y celulares de neurodegeneración, ya que aumenta la producción de ERO y sirve como un inhibidor no competitivo de alta afinidad del complejo I mitocondrial, afectando la generación de ATP y la viabilidad celular (Greenamyre et al., 1999). Estudios previos han demostrado que la rotenona induce respuestas apoptóticas en las células dopaminérgicas mesencefálicas, los linfocitos y la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y (Avila-Gómez et al., 2010 y de Oliveira et al., 2009).

Inicialmente, se establecieron las condiciones óptimas experimentales de lesión, mediante ensayos de viabilidad realizados con la técnica de MTT (Figuras 9 a 12 A) y con IP (Figura 12B). Se realizó una curva de dosis/respuesta a 24 h con rotenona y se encontró que una dosis de 50 μ M causaba un porcentaje de muerte celular cercana al 50 % (IC_{50}) en la línea celular T98G (Figura 9). Estudios anteriores (Avila-Gómez et al., 2010; Swankar et al., 2012) igualmente han utilizado un insulto de rotenona por 24 h, si bien las dosis varían fuertemente (de concentraciones de 1 μ M a 250 μ M) de acuerdo a la línea celular utilizada. Al realizar un ensayo de viabilidad por 48 h, se encontró que la dosis de 50 μ M de rotenona reducía la viabilidad celular cerca del 58% (Figura Anexa 1).

A continuación, se buscaron las mejores condiciones de protección para PDGF-BB frente a rotenona. Se hicieron inicialmente ensayos en condiciones de cotratamiento, pretratamiento (Figura 10) y postratamiento (Figura 11) y se encontró que las mejores condiciones de protección estaban dadas por un pretratamiento de 200 ng / ml de PDGF-BB por 24 horas antes del insulto con rotenona (Figura 11 y 12A). El pretratamiento con PDGF-BB durante 24 horas aumentó la viabilidad de las células alrededor de un 39% en comparación con las células tratadas solo con rotenona (Figura 10). Este resultado se confirmó posteriormente al evaluar la captación de IP (50 ng / ml) en células T98G tratadas con rotenona y PDGF-BB (Figura 12B). La rotenona aumento significativamente la captación de IP cuando se comparó con células pretratadas con PDGF-BB ($p < 0.0001$; $44,3 \pm 12,14\%$ frente a $131,8 \pm 16,92\%$). Con base en estos resultados preliminares se utilizaron estos

parámetros de tiempos y concentraciones de rotenona y PDGF-BB en los experimentos siguientes.

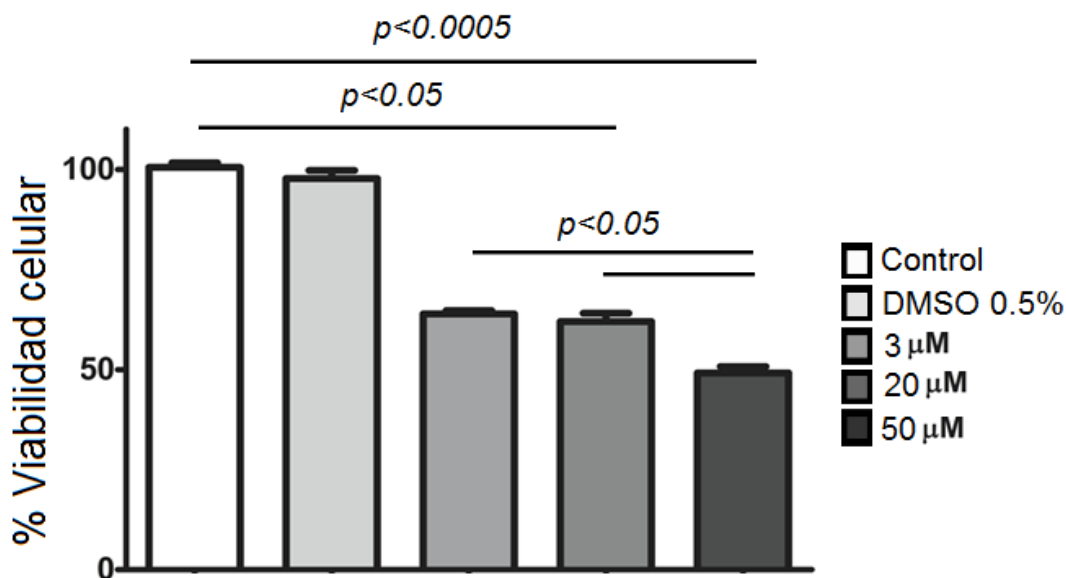


Figura 9. Efecto de la dosis de rotenona en la supervivencia de las células T98G. A las 24 horas, la IC_{50} calculada fue de 50 μ M. El vehículo (DMSO al 0,5% v / v) no mostró diferencias significativas en la viabilidad celular en comparación con el control (células cultivadas en medio DMEM privadas de SBF) , por lo tanto en todos los experimentos siguientes la condición control consistió en células cultivadas en DMEM sin SBF. $p < 0.05$, 3 y 20 μ M de rotenona frente a control; $p < 0.0005$, 50 μ M de rotenona frente a control; $p < 0.05$, rotenona 50 μ M frente a 3 y 20 μ M de rotenona.

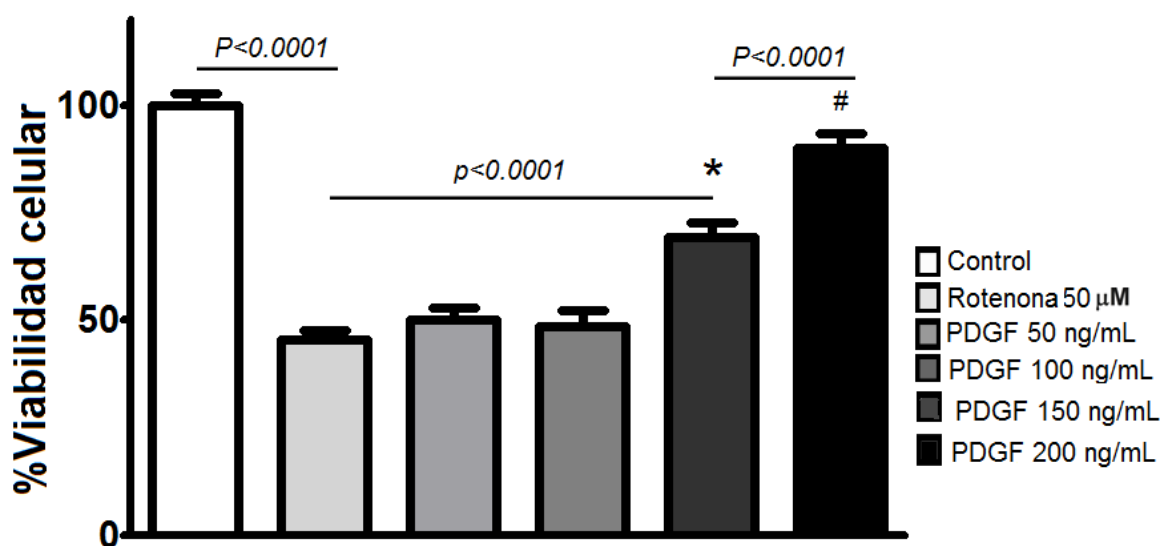


Figura 10. Efectos del pretratamiento de PDGF-BB a diferentes concentraciones sobre la dosis experimental de 50 μ M de rotenona. Los datos se representan como media \pm SEM de 3 experimentos independientes. Los valores medios \pm SEM son los siguientes: Las dosis de pretratamiento PDGF-BB de 50 y 100 ng / mL no mostraron un efecto significativo en la protección de la viabilidad celular frente a la rotenona. PDGF-BB a 150 ng / ml ($16,31 \pm 3,40\%$, * $p < 0.0125$ frente a control) y 200 ng / ml ($39,74 \pm 3,50\%$; # $p < 0.05$ frente a control) indujo un aumento en la viabilidad celular cuando se comparó con células tratadas con rotenona ($p < 0.0001$ frente a 200 ng / ml de PDGF-BB). Sin embargo, el pretratamiento de PDGF-BB con 200 ng / ml mostró una mejor protección contra daño inducido por rotenona, y esta concentración se usó por lo tanto en los siguientes experimentos.

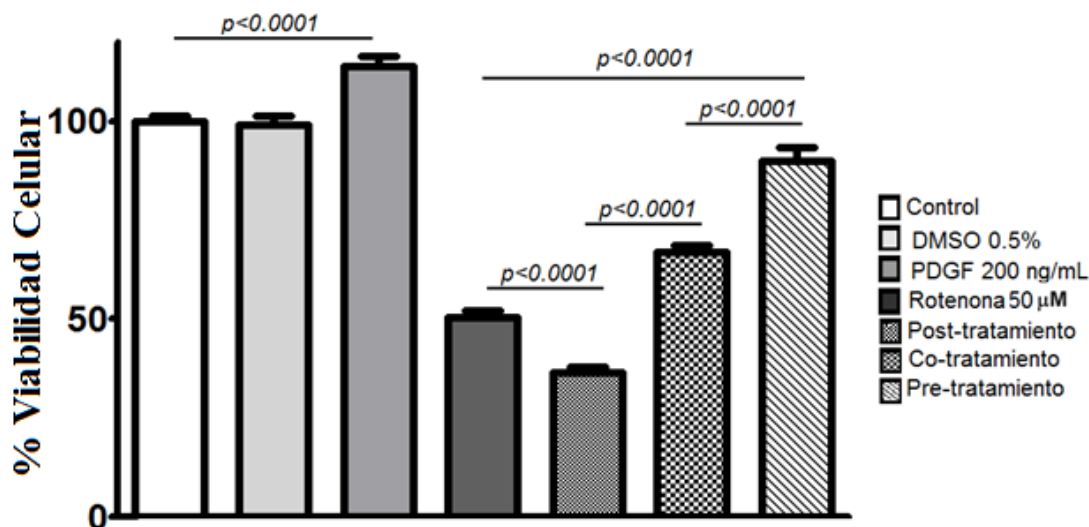


Figura 11. Determinación de las mejores condiciones de protección por parte del PDGF-BB. El co-tratamiento entre PDGF y rotenona tuvo una recuperación de 17% en la viabilidad mientras que el pre-tratamiento por 24 h tuvo una recuperación de 39%. No se encontraron diferencias entre el Control y el vehículo de DMSO 0.5%. No se encontraron efectos de recuperación en la viabilidad celular durante el post-tratamiento. Control y DMSO 0.5% vs PDGF 200 ng/mL, $p < 0.0001$; Rotenona 50 μ M vs post-tratamiento $p < 0.0001$; posttratamiento vs co-tratamiento, $p < 0.0001$, Pre-tratamiento vs co-tratamiento, $p < 0.0001$. Pretratamiento vs rotenona, $p < 0.0001$.

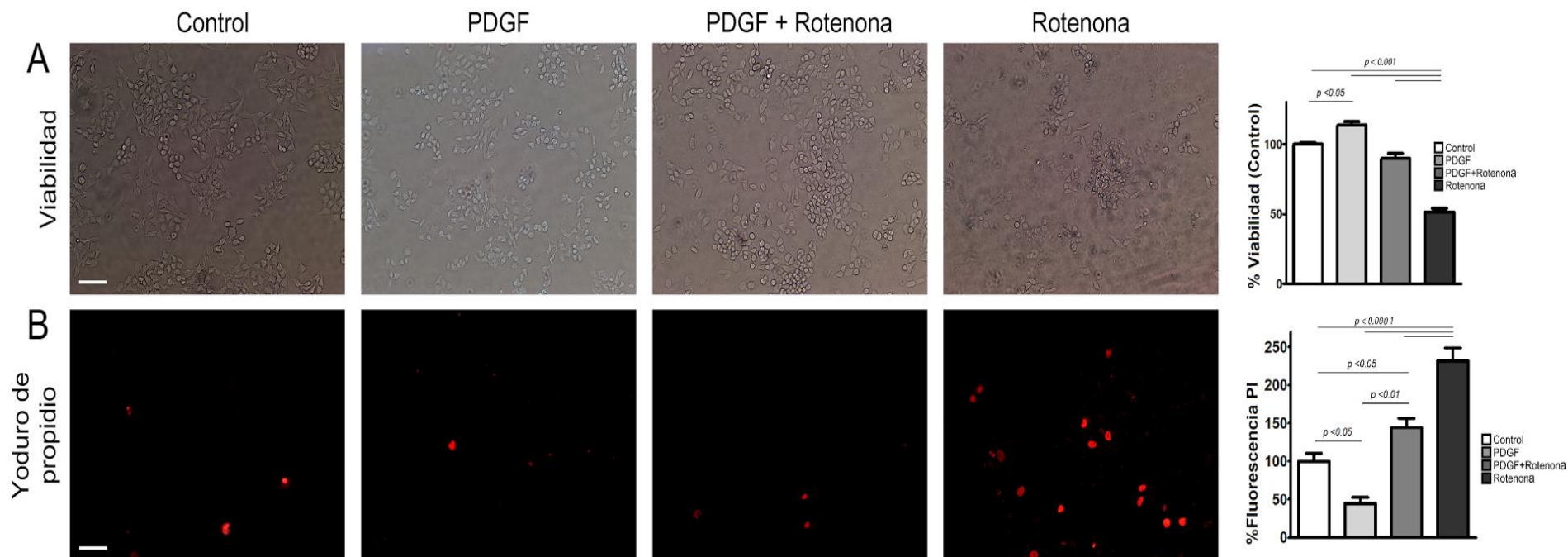


Figura 12. Efectos del PDGF-BB sobre la viabilidad de células T98G tratadas con rotenona. **A.** PDGF-BB protege la viabilidad celular contra el daño por rotenona. Control, PDGF, PDGF + Rotenona vs Rotenona, $p < 0.001$; Control vs PDGF, $p < 0.05$. **B.** Tinción de yoduro de propidio (IP) para viabilidad. Los datos se expresan como porcentaje de células que expresan IP cuando se tratan con PDGF-BB, rotenona o control. Control, PDGF, PDGF + Rotenona vs Rotenona, $p < 0.0001$; Control vs PDGF, $p < 0.05$; Control vs PDGF + Rotenona, $p < 0.05$; PDGF vs PDGF + Rotenona, $p < 0.01$. Los datos se presentan como media \pm SEM de tres experimentos individuales. Barra de escala 50 μ m.

7.1.2. Efectos del PDGF-BB sobre los cambios morfológicos inducidos por la rotenona

Estudios anteriores han reportado una correlación entre la viabilidad celular y los cambios en la morfología celular (Avila-Rodríguez et al., 2014; Xiong et al., 2006), lo que también indica que el estrés oxidativo aumentado puede inducir importantes cambios morfológicos. En una siguiente serie de experimentos, se evaluó si el PDGF-BB era capaz de preservar la morfología celular bajo estrés oxidativo con rotenona. Se observó una contracción del cuerpo y de los procesos celulares cuando las células fueron expuestas a rotenona (Figura 13A). Es importante destacar que las células tratadas con PDGF-BB dieron como resultado un área media celular preservada en comparación con las células expuestas sólo a rotenona ($480 \pm 26.09 \mu\text{m}^2$ frente a $364.20 \pm 17.47 \mu\text{m}^2$, $p < 0.001$). Además, no se observó diferencia significativa en las células tratadas con PDGF-BB con respecto a los controles ($p < 0.05$). Estos resultados sugieren que el pretratamiento con PDGF-BB protegió a las células de los cambios morfológicos inducidos por la rotenona (Figura 13A y figura anexa 2).

Para investigar más a fondo los mecanismos de protección encontrados en las evidencias anteriores, se evaluó el efecto de PDGF-BB sobre la condensación y fragmentación nuclear luego del insulto con rotenona utilizando la tinción de Hoechst 33258. Estudios previos han sugerido que la rotenona induce condensación y fragmentación nuclear en diferentes modelos celulares, siendo este evento el primer indicativo del proceso apoptótico en las células del sistema nervioso (Swarnkar et al., 2012; Watabe y Nakaki, 2004). La Figura 13B muestra que las 24 horas de insulto con rotenona aumentaron la condensación nuclear y la fragmentación en células T98G en comparación con el control ($p < 0.001$). Por el contrario, el PDGF-BB atenuó significativamente el número de núcleos fragmentados en comparación con la rotenona ($p < 0.001$, PDGF + Rotenona vs Rotenona, 3.89% vs 14.26%, respectivamente, Figura 13B). No se encontraron diferencias significativas entre el PDGF-BB y el control.

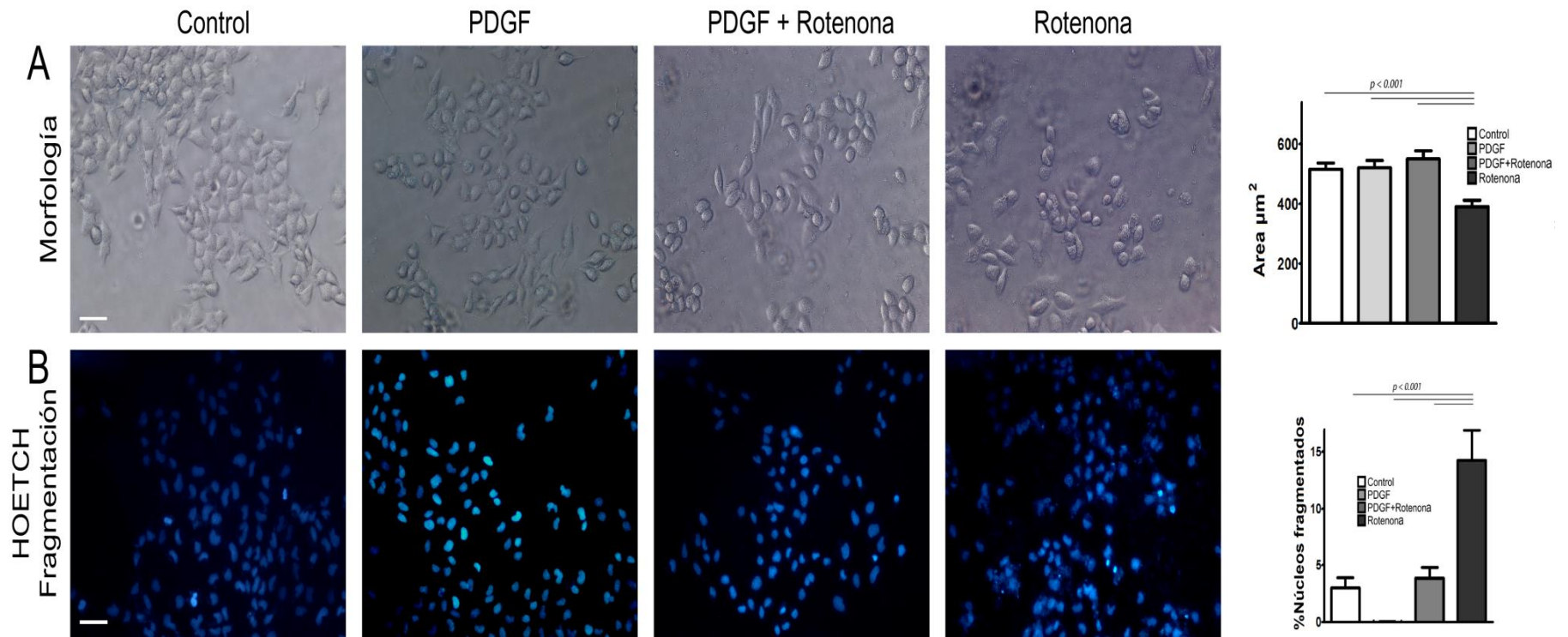


Figura 13. Efectos morfológicos del PDGF-BB. **A.** Efectos protectores del PDGF-BB sobre la morfología celular. El gráfico de barras muestra los cambios en el área celular (μm^2). Control, PDGF, PDGF + Rotenona vs Rotenona, $p < 0.001$. **B.** El PDGF-BB disminuyó el número de núcleos condensados después del insulto con rotenona, determinados por tinción de Hoechst. Control, PDGF, PDGF + Rotenona vs Rotenona, $p < 0.001$. Los datos se presentan como media \pm SEM de tres experimentos individuales. Barra de escala 50 μm .

7.1.3. El PDGF-BB disminuyó la expresión de los marcadores de activación astrocitaria

Estudios anteriores han demostrado que una característica importante del daño oxidativo en astrocitos es el aumento en la expresión de marcadores de activación astrocitaria como la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), el filamento intermedio vimentina y la pequeña proteína GTPasa RhoA (Jaffe et al., 2005; Duffy et al., 2009; Swarnkar et al., 2012; Brenner et al., 2014; Rocha et al., 2015). Por estas razones, a continuación se evaluó el efecto de PDGF-BB sobre la activación astrocitaria en células tratadas con rotenona.

Se observó que aunque la rotenona incrementaba significativamente la expresión de GFAP ($p < 0.001$, Control vs Rotenona, Figura 14A), el pretratamiento con PDGF-BB redujo la expresión de GFAP en astrocitos estresados con rotenona ($p < 0.001$, PDGF + Rotenona vs Rotenona, Figura 14A). La expresión de la proteína GFAP también se cuantificó por western blots, con resultados similares (Figura Anexa 8). Nuestros resultados también demostraron que el PDGF-BB disminuyó tanto la expresión de vimentina ($p < 0.001$, PDGF + Rotenona vs Rotenona; Figura 14B) como de la GTPasa RhoA ($p < 0.001$, PDGF + Rotenona vs Rotenona; Figura 14C), lo que sugiere que el PDGF-BB atenúa la activación de astrocitos debido al daño oxidativo por rotenona.

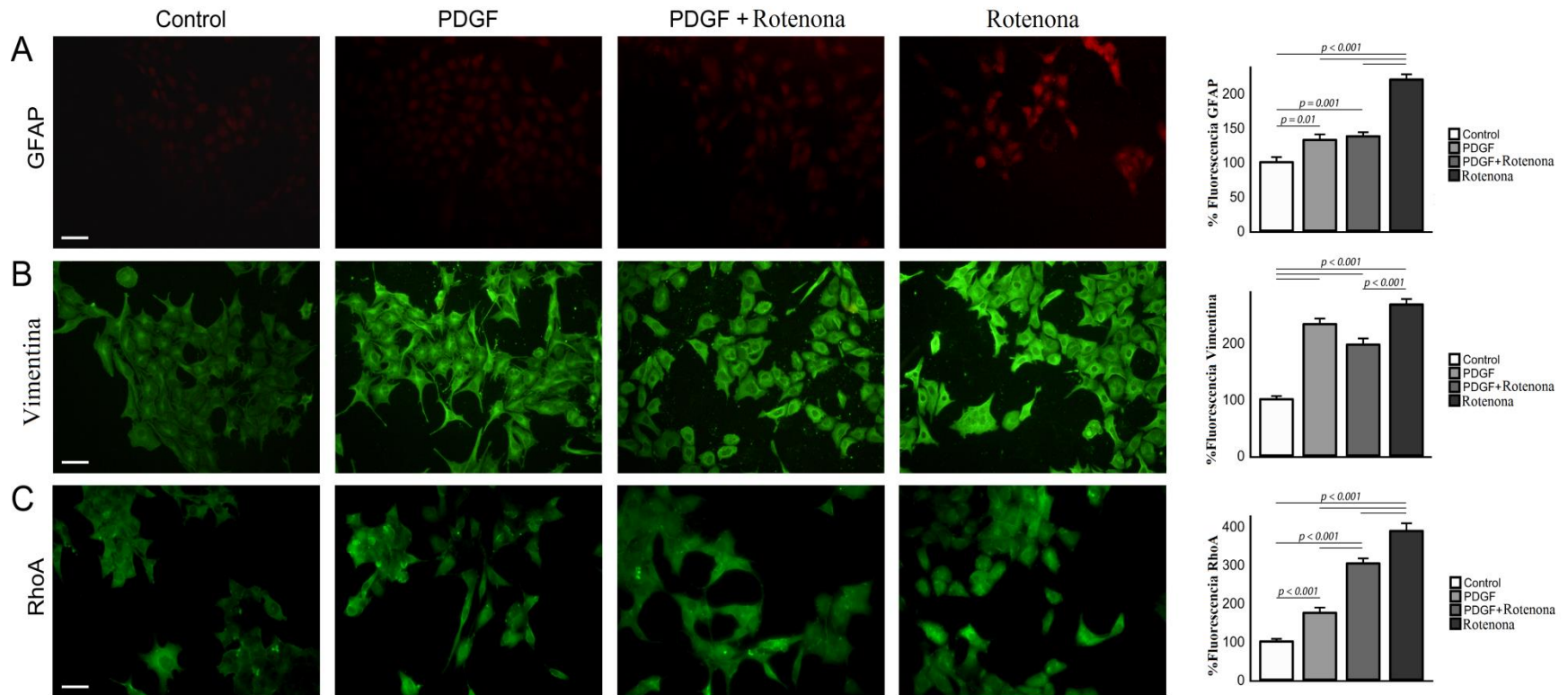


Figura 14. Efectos del PDGF-BB en marcadores de reactividad astrocitaria. **A.** Rotenona aumentó considerablemente la expresión de GFAP (Rotenona vs Control, $p < 0.001$), pero PDGF-BB disminuyó la expresión de GFAP en células T98G (PDGF + Rotenona vs Rotenona, $p < 0.001$); Control vs PDGF, $p = 0.01$; Control vs PDGF + Rotenona, $p = 0.001$; PDGF vs Rotenona, $p < 0.001$. **B.** Rotenona aumentó la expresión de Vimentina (Control vs Rotenona, $p < 0.001$); sin embargo, el PDGF-BB disminuyó este efecto (PDGF + Rotenona vs Rotenona, $p < 0.001$); Control vs PDGF, $p < 0.001$; Control vs PDGF + Rotenona, $p < 0.001$; **C.** La rotenona aumentó la expresión de la GTPasa RhoA (Rotenona vs Control, $p < 0.001$) y el PDGF-BB atenuó su expresión (PDGF + Rotenona vs Rotenona, $p < 0.001$); Control vs PDGF, $p < 0.001$; Control vs PDGF + Rotenona, $p < 0.001$; PDGF vs PDGF + Rotenona, $p < 0.001$ y PDGF vs Rotenona, $p < 0.001$. Todos los resultados se muestran como media \pm SEM de tres experimentos individuales. Barra de escala 50 μ m.

7.2.Efectos del PDGF-BB sobre las propiedades mitocondriales del modelo astrocitario

7.2.1. El PDGF-BB redujo los niveles de ERO en células tratadas con rotenona

Uno de los principales daños ejercidos por la rotenona es un aumento en la producción de ERO, especialmente aniones superóxido y peróxidos (Dick, 2006). La rotenona indujo un aumento significativo del 46,40% en la producción de ERO medida por DHE ($p < 0.001$, Figura 15A). Por otra parte, el pretratamiento con PDGF-BB (PDGF+Rotenona) mantuvo los niveles de superóxido en un nivel similar al observado en el control (98,72% frente al 100%, respectivamente, Figura 15A).

Para evaluar adicionalmente el mecanismo de protección del PDGF-BB, se determinaron los cambios ejercidos por este factor de crecimiento en el peróxido de hidrógeno midiendo la fluorescencia de DCFA. La rotenona indujo un aumento significativo en la producción de peróxido de 75% ($p < 0.001$) en comparación con el control. Sin embargo, el PDGF-BB redujo la fluorescencia del peróxido ($p < 0.001$, PDGF + Rotenona vs Rotenona, Figura 15B), lo cual corrobora el efecto protector del PDGF-BB sobre la producción de esta especie reactiva.

Como se reportó anteriormente (Cabezas et al., 2015), nuestros resultados mostraron que el PDGF-BB atenuó el daño oxidativo inducido por la rotenona en células T98G. Por estas razones, examinamos a continuación el efecto de la rotenona y el PDGF-BB sobre la peroxidación lipídica, las modificaciones de las proteínas mediadas por peroxinitrito y el daño oxidativo de ácidos nucleicos. La rotenona indujo un aumento significativo ($p < 0.001$ vs Control, Figura 16A) de la peroxidación lipídica medida por tinción 4-hidroxinonenal (HNE). Por otra parte, el pretratamiento con PDGF-BB disminuyó significativamente este proceso ($p < 0.001$, PDGF + Rotenona vs Rotenona, Figura 16A). Además, el PDGF-BB disminuyó significativamente la oxidación de ácidos nucleicos inducida por rotenona medida mediante fluorescencia con 8-OHdG ($p < 0.001$ vs Control, Figura 16B). También se observó que el PDGF-BB redujo las modificaciones oxidativas de proteínas mediadas por peroxinitrito inducidas por la rotenona ($p < 0.001$ vs Control, Figura 16C). Estos resultados corroboran los efectos protectores del PDGF-BB en la producción de ERO de nuestra investigación previa (Cabezas et al., 2015).

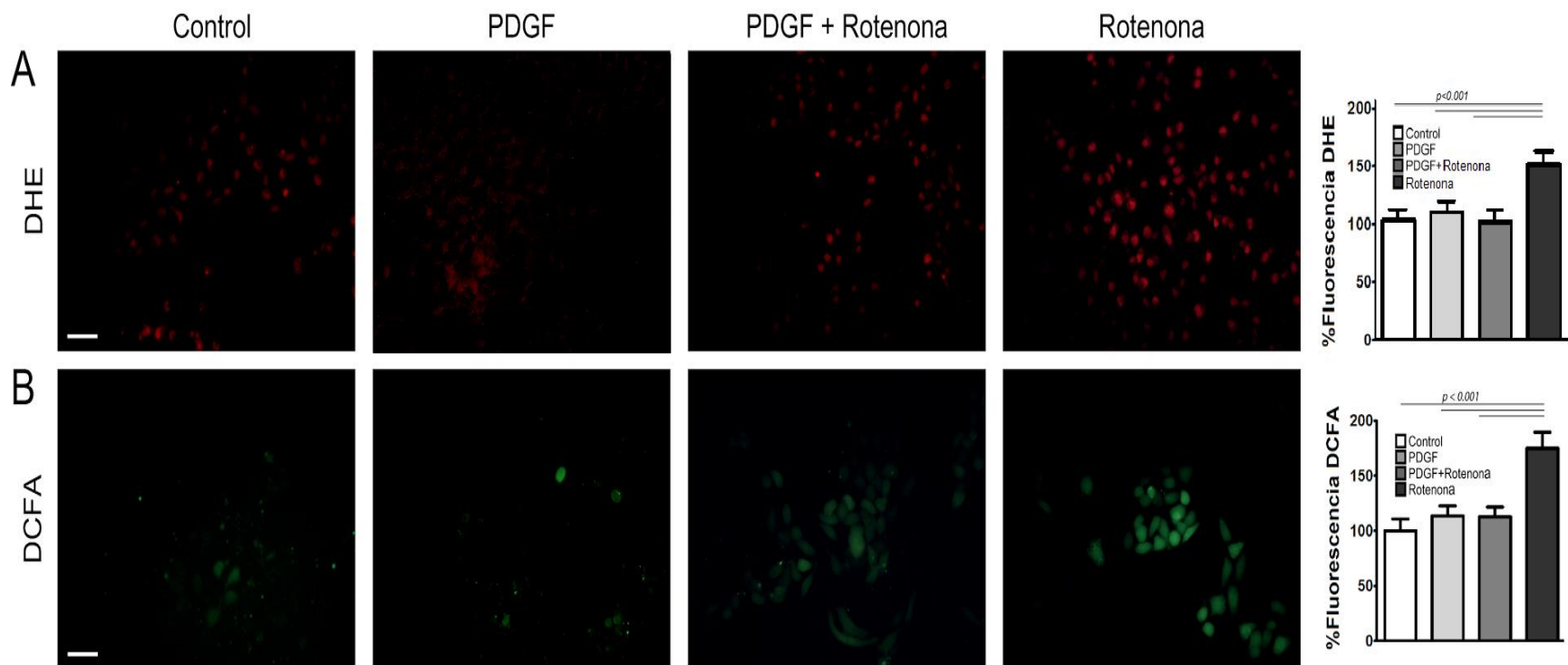


Figura 15. Efectos del PDGF-BB en la producción de ERO 1. **A.** El pretratamiento con PDGF-BB disminuye la producción de radicales superóxido. Control, PDGF, PDGF + Rotenona vs Rotenona, $p < 0.001$. **B.** El pretratamiento con PDGF-BB disminuye la producción de radicales peróxido. Control, PDGF y PDGF + Rotenona vs Rotenona, $p < 0.001$. Los datos se presentan como media \pm SEM de tres experimentos individuales. Barra de escala 50 μ m.

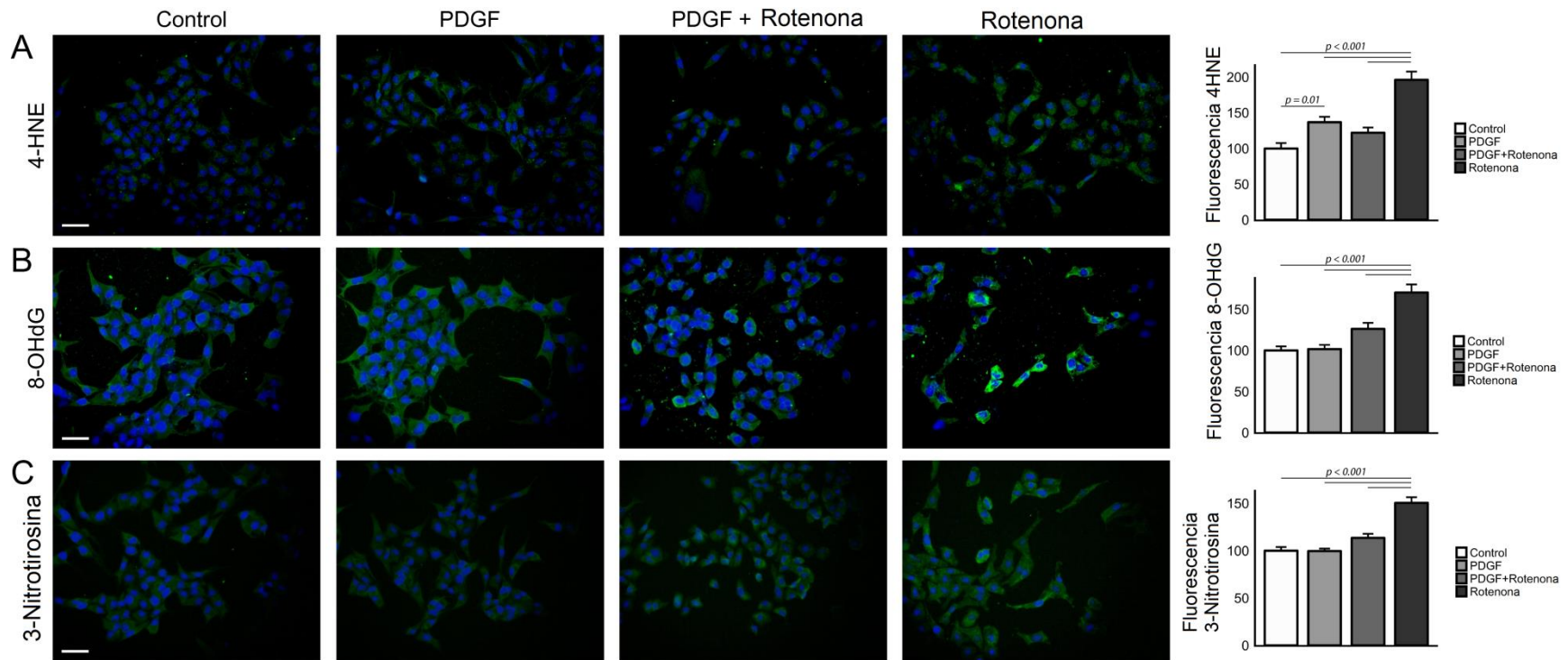


Figura 16. Efectos del PDGF-BB en la producción de ERO 2. **A.** El pretratamiento con PDGF disminuyó significativamente la peroxidación lipídica inducida por rotenona medida por HNE (PDGF + Rotenona, vs Rotenona, $p < 0.001$); Control vs PDGF, $p = 0.01$; Control vs Rotenona, $p < 0.001$ y PDGF vs Rotenona, $p < 0.001$. **B.** PDGF-BB redujo significativamente la oxidación de ácidos nucleicos inducida por rotenona cuantificada por 8-OHdG (PDGF + Rotenona vs Rotenona, $p < 0.001$); Control y PDGF vs Rotenona, $p < 0,001$ **C.** De manera similar, el PDGF-BB atenuó las modificaciones de nitración de proteínas medidas por 3-Nitrotirosina. (PDGF + Rotenona vs Rotenona, $p < 0.001$); Control y PDGF vs Rotenona, $p < 0.001$. Los datos se presentan como media \pm SEM de tres experimentos individuales. Barra de escala 50 μ m.

7.2.2. El PDGF-BB ejerce una protección parcial sobre el $\Delta\psi_m$ en células tratadas con rotenona

El $\Delta\psi_m$ se evaluó mediante la tinción de TMRM, una técnica que nos permitió evaluar la proporción de células con pérdida del $\Delta\psi_m$. La Figura 17A muestra que después de 24 horas las células T98G tratadas con rotenona mostraron una disminución drástica en el $\Delta\psi_m$ en comparación con el control ($42.57 \pm 4.02\%$ frente al Control 100%, $p < 0.001$; Figura 17A). Por otra parte, el pretratamiento con PDGF-BB preservó parcialmente el $\Delta\psi_m$ ($62.00 \pm 4.80\%$, vs Control $p < 0.05$), lo que sugiere un efecto de PDGF-BB sobre la protección del $\Delta\psi_m$.

7.2.3. El PDGF-BB redujo los efectos de la rotenona sobre la masa mitocondrial

En el siguiente experimento se evaluó la masa mitocondrial por medio de NAO, ya que este es un agente ampliamente utilizado para la evaluación de los cambios en la peroxidación lipídica mitocondrial durante procesos apoptóticos (Oliva et al., 2011), y podría proporcionar información adicional sobre el efecto del PDGF-BB sobre la preservación mitocondrial. Después de 24 horas de insulto con rotenona, se observó una gran reducción de la fluorescencia NAO en comparación con el pretratamiento de PDGF-BB ($61.73 \pm 3.89\%$ vs $31.10 \pm 5.84\%$, $p < 0.001$, Figura 17B). Este efecto fue confirmado posteriormente por citometría de flujo para NAO (Figura Anexa 3).

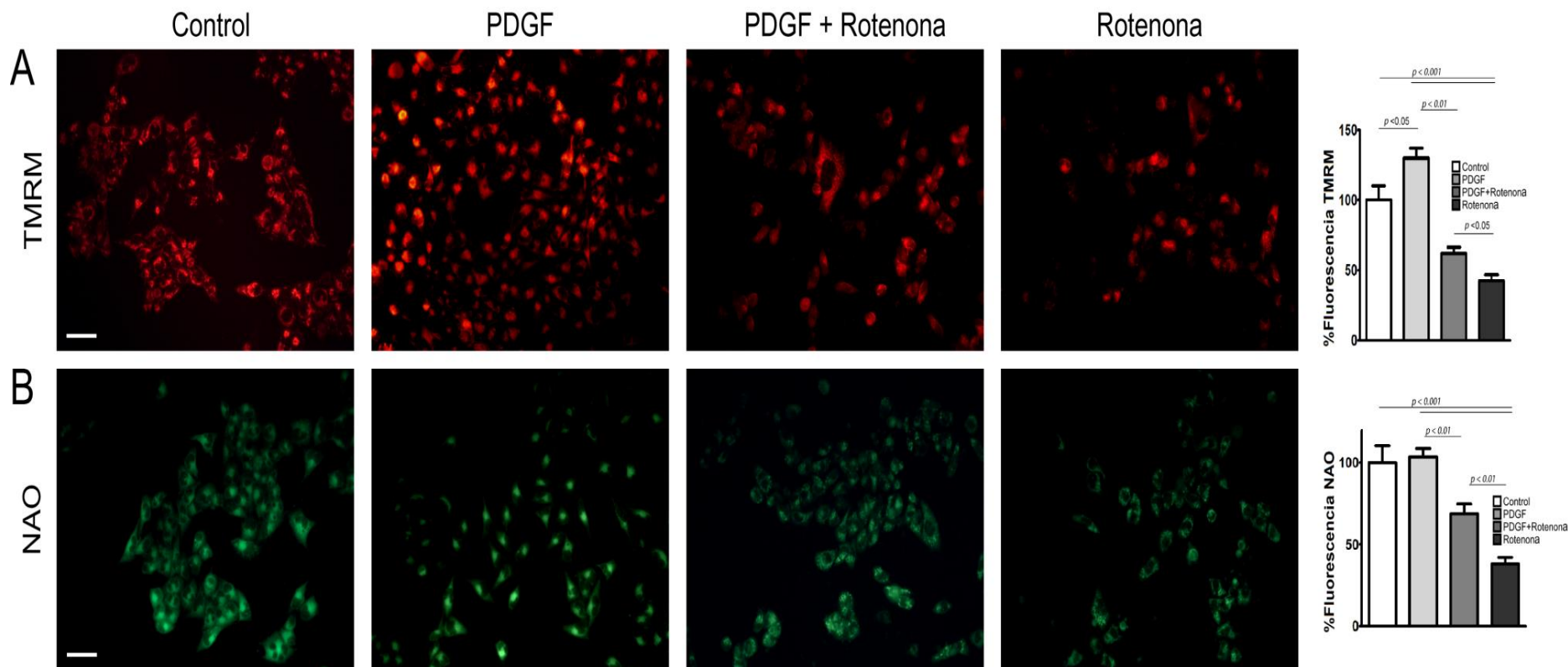


Figura 17. Efectos del PDGF-BB en propiedades mitocondriales en células T98G. **A.** El PDGF-BB mantiene parcialmente el $\Delta\psi/m$ en células T98G. (PDGF + Rotenona vs Rotenona, $p < 0.05$) PDGF-BB vs. rotenona; $p < 0.0001$, rotenona vs. control. $p < 0.0001$, PDGF-BB vs. Control, $p < 0.05$. **B.** El PDGF-BB mantiene la masa mitocondrial en células T98G (PDGF + Rotenona vs Rotenona, $p < 0.01$), mientras que la rotenona disminuye la masa mitocondrial ($p < 0.001$ vs Control). PDGF vs Rotenona, $p < 0.001$. PDGF vs PDGF + Rotenona, $p < 0.01$. Barra de escala 50 μm .

7.2.4. Efectos del PDGF-BB y la rotenona sobre los cambios ultraestructurales de las células astrocitarias

Dado que la rotenona produce principalmente daño oxidativo al inhibir el complejo I de la cadena de transporte de electrones (Betarbet et al., 2000), en el siguiente experimento (Figura 18) se evaluó el efecto de la rotenona y del PDGF-BB sobre la ultraestructura mitocondrial. En la Figura 18A, se presentan micrografías electrónicas representativas de células bajo diferentes tratamientos. La rotenona disminuyó significativamente el área mitocondrial ($p < 0.0001$, Figura 18B), sin cambiar el número de crestas (Figura 18C) e indujo un mayor número de vacuolas citoplasmáticas ($p < 0.0001$, Figura 18D). Estas vacuolas representan mitocondrias hinchadas identificadas por su membrana de doble capa (Meaney et al., 2004; Arismendi-Morillo, 2011). Por otra parte la rotenona incremento la presencia de autofagosomas, los cuales fueron determinados por la aparición de la estructura característica de membrana que contiene las mitocondrias comprimidas, a menudo con pérdida de crestas visibles, así como otro material denso de electrones (Di Malta et al., 2011). También se observó la pérdida de la membrana mitocondrial externa en varias de las mitocondrias observadas. Es importante resaltar que la membrana nuclear estaba intacta, si bien hay una disminución en el tamaño del núcleo. En el pretratamiento con PDGF-BB, se encontró un menor número de vacuolas autofágicas ($p < 0.0001$, PDGF + Rotenona vs Rotenona; Figura 18D). Igualmente, el PDGF-BB mantuvo el área mitocondrial cerca de los valores del control y atenuó significativamente el número de vacuolas en las células astrocitarias bajo tratamiento con rotenona.

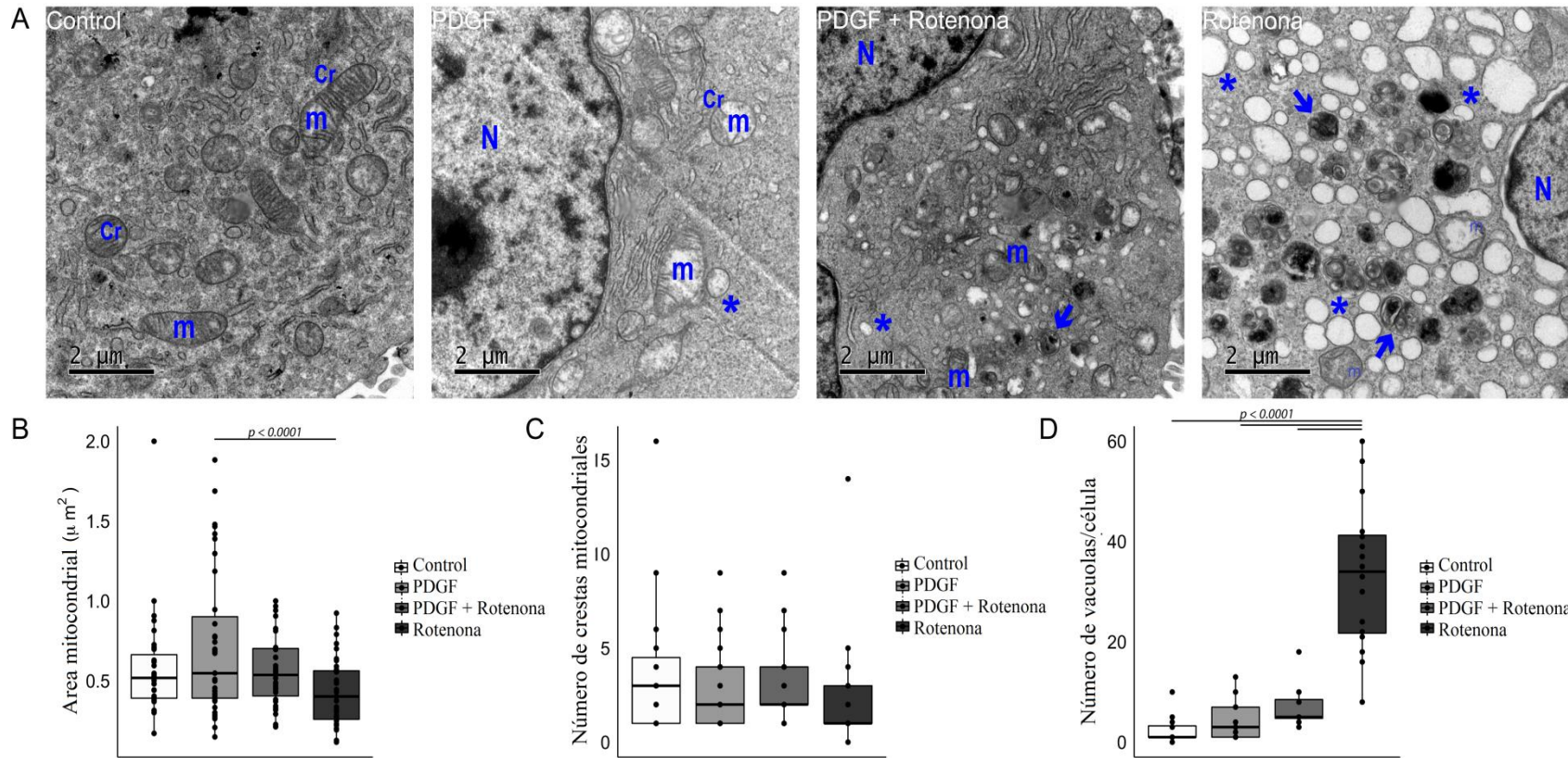


Figura 18. PDGF-BB protege la ultraestructura mitocondrial contra el daño de rotenona. Panel A. Micrografías electrónicas representativas de células con diferentes tratamientos. **B.** La rotenona disminuye significativamente el área mitocondrial en comparación con el tratamiento previo con PDGF-BB (PDGF vs Rotenona, $p < 0.0001$) **C.** No hubo cambios significativos en las crestas mitocondriales para los diferentes tratamientos **D.** El tratamiento con rotenona aumenta significativamente las vacuolas citosólicas ($p < 0.0001$ vs Control) y las figuras autofágicas (puntas de flecha), pero el pretratamiento con PDGF-BB previene el daño estructural de rotenona (PDGF + Rotenona vs Rotenona, $p < 0.0001$); PDGF vs Rotenona, $p < 0.0001$. Cr = crestas, m = mitocondrias, N = núcleo, * = vacuola autofágica.

7.2.5. Efectos del PDGF-BB sobre la concentración del calcio intracelular en el modelo astrocitario

Como se mencionó con anterioridad, el calcio intracelular regula importantes eventos fisiológicos tales como la fusión vesicular, la producción de energía, y procesos apoptóticos (Clapham, 2007). En este aspecto se ha mostrado que tanto la rotenona como el PDGF-BB podrían estar modulando de manera diferencial las concentraciones de calcio intracelular durante distintas funciones, incluyendo la apoptosis o la señalización de vías de protección como la PI3K/AKT entre otras (Powis et al., 1990; Ridefelt et al., 1995; Pinzani, 2002; Peng et al., 2012; Swarnkar et al., 2012).

La determinación de las concentraciones celulares de calcio se realizó utilizando las sondas Fluo-4-AM para calcio citoplasmático, Fluo Rhod-2-acetil Ester para calcio mitocondrial y Mag-Fura-2-AM para calcio de retículo endoplasmático y midiendo su absorbancia en un lector de placas. En estos experimentos se encontró que la rotenona incrementaba la concentración de calcio citoplásmico en comparación con los otros tratamientos ($p < 0.05$ vs PDGF + Rotenona, Figura 19A). Respecto al calcio mitocondrial no se encontraron diferencias entre el pretratamiento (PDGF + Rotenona) y la rotenona y en ambos casos había concentraciones elevadas comparadas con el control ($p < 0.0001$ y $p < 0.0106$ respectivamente, Figura 19B). Por otra parte, en el caso del calcio de RE, se encontró que la rotenona incrementa la concentración respecto al control ($p < 0.05$, Figura 19C), mientras que el pretratamiento con PDGF-BB disminuyó este efecto ($p < 0.0001$, PDGF + Rotenona vs Rotenona, Figura 19C). Estos resultados sugieren que el PDGF-BB efectivamente modula las concentraciones intracelulares de calcio durante el insulto oxidativo con rotenona.

Posteriormente, se determinó el efecto del PDGF-BB sobre la expresión de la proteína GRP78/Bip, la cual cumple varias funciones tales como proteína chaperona, reguladora del UPR (unfolded protein response), y modulador de la concentración de calcio en RE

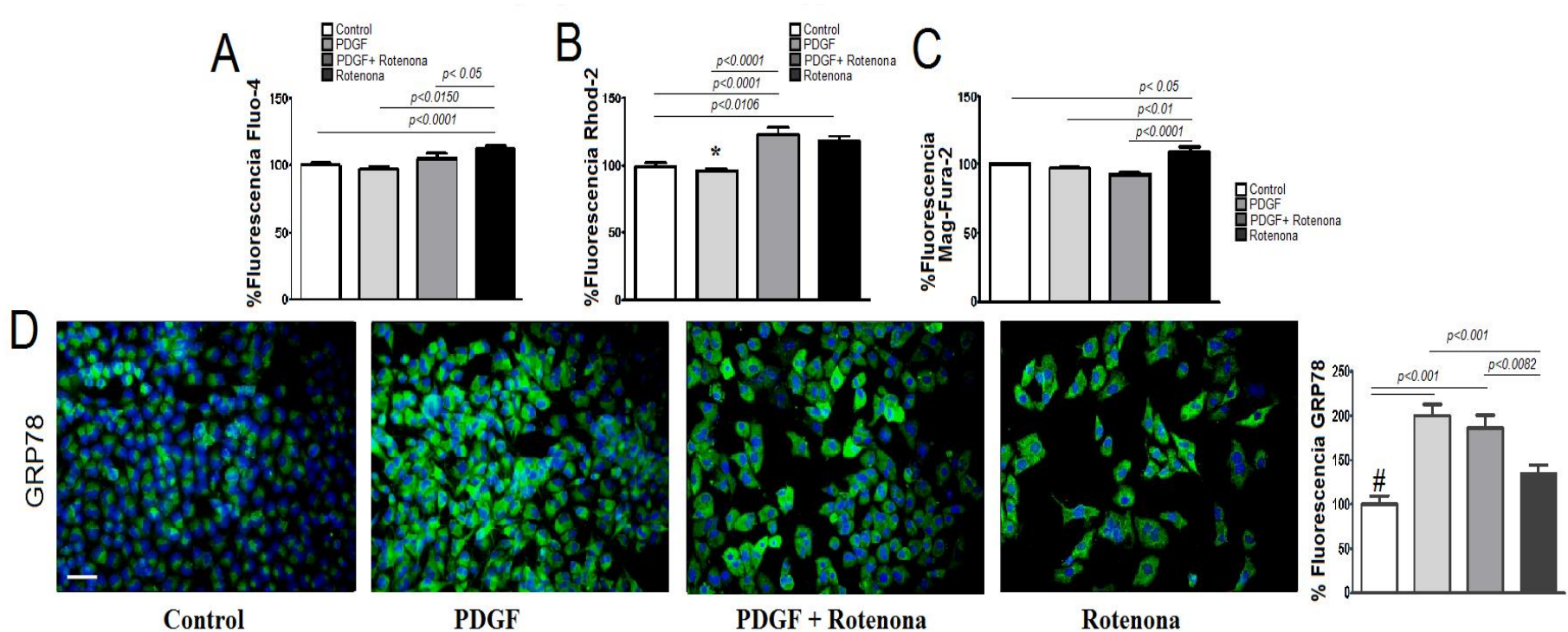


Figura 19. Efectos del PDGF-BB en la concentración de calcio intracelular y la expresión de GRP78. **A.** Efectos del PDGF-BB sobre concentración de calcio citosólico. Control vs Rotenona, $p < 0.0001$, PDGF vs Rotenona, $p < 0.0150$; PDGF + Rotenona vs Rotenona, $p < 0.05$. **B.** Efectos del PDGF-BB en la concentración de calcio mitocondrial. Control vs Rotenona, $p < 0.0106$; Control vs PDGF + Rotenona, $p < 0.0001$; * PDGF vs Rotenona, $p < 0.0001$; PDGF vs PDGF + Rotenona, $p < 0.0001$. **C.** Efectos del PDGF-BB en la concentración de calcio de Reticulo endoplasmático. **Panel D.** El PDGF-BB incrementa la expresión de la proteína GRP78/Bip. Control vs PDGF y PDGF + Rotenona $p < 0.001$; # Control vs Rotenona, $p < 0.05$; PDGF vs Rotenona, $p < 0.001$ y PDGF + Rotenona vs Rotenona, $p < 0.0082$. Barra de escala 50 μm .

(Zhang et al., 2010; Ouyang et al., 2011). En este aspecto nuestros resultados mostraron que tanto el PDGF-BB como el pretratamiento (PDGF + Rotenona) incrementaban la expresión de GRP78 en las células T98G ($p < 0.001$, Figura 19D). Si bien, el PDGF-BB induce una mayor expresión de GRP78 que la de rotenona ($p < 0.0082$; PDGF + Rotenona vs Rotenona y $p < 0.001$, PDGF vs Rotenona). Estos resultados sugieren que la modulación del calcio mediada por PDGF-BB podría darse en parte por un incremento en la expresión de la proteína GRP78.

7.3. Mecanismos de protección activados por el PDGF-BB en células astrocitarias frente al insulto por rotenona

7.3.1. Activación de la vía PI3K/AKT/NF- κ B por PDGF-BB

A continuación se estudiaron algunos de los mecanismos activados por PDGF-BB. Inicialmente se verificó la expresión del receptor PDGFR β en las células T98G para los distintos tratamientos (Figura Anexa 7). Posteriormente, se observó que en los tiempos de estudio de 24h, el PDGF-BB incrementaba la fosforilación de AKT ($p = 0.05$, Figura 20A), la cual hace parte de la vía de protección PI3K/AKT; por otra parte no se encontró que la rotenona incrementara la fosforilación de esta proteína. Posteriormente se estudio la vía MAPK la cuál es importante en la supervivencia y proliferación celular. En este caso ningún tratamiento incrementó de manera estadísticamente significativa ($p < 0.05$) la fosforilación de las proteínas ERK 1/2, si bien tanto el PDGF como PDGF + Rotenona tuvieron un pequeño incremento respecto al control no estimulado ($p = 0.1$; Figura 20B). Por otra parte se estudió la expresión de la subunidad p65 del factor de transcripción NF- κ B, el cual ha sido vinculado como parte de la cascada de señalización de PI3K/AKT. Se encontró que el pretratamiento con PDGF-BB incrementó la expresión de p65 ($p = 0.04$, PDGF + Rotenona vs Rotenona, Figura 20C), a diferencia de la rotenona, la cual no incrementó la expresión de esta proteína.

Adicionalmente se estudió el efecto del PDGF-BB sobre la expresión de proteínas antioxidantes de importancia astrocitaria como son GPx1 y Catalasa. En el caso de GPx1 el PDGF-BB mantuvo los niveles de expresión de esta proteína cercanos a los del Control. Por otra parte, el tratamiento con rotenona disminuyó significativamente la expresión ($p < 0.001$ vs Control, Figura 20D). Sin embargo, el pretratamiento con PDGF-BB logró mantener parcialmente la expresión de esta proteína en comparación con la rotenona ($p < 0.001$, PDGF + Rotenona vs Rotenona, Figura 20D). Por último, en el caso de la catalasa, ningún tratamiento tuvo un efecto significativo sobre su expresión (Figura 20E). Estos resultados sugieren que los mecanismos de protección por parte del PDGF-BB frente a rotenona, incluyen la activación de la vía PI3K/AKT y la expresión de GPx1.

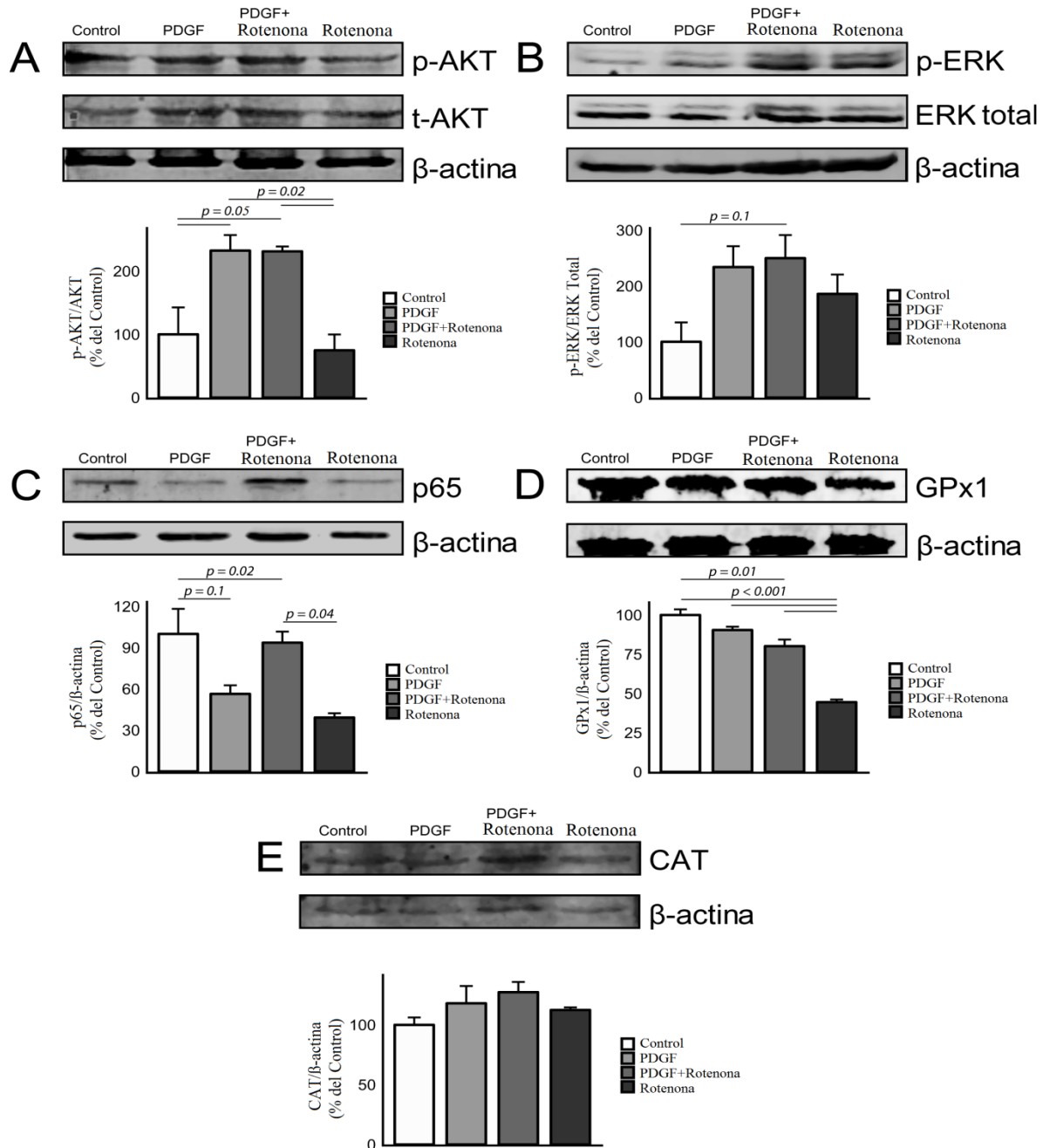


Figura 20. Proteínas activadas por PDGF-BB durante el insulto con rotenona. Mecanismos protectores activados por PDGF-BB frente a rotenona. **A.** PDGF-BB y PDGF + Rotenona aumentaron significativamente la fosforilación de AKT (PDGF, PDGF + Rotenona vs Rotenona, $p = 0.02$); Control vs PDGF y PDGF + Rotenona, $p = 0.05$. **B.** No se observó un aumento significativo en la fosforilación de ERK **C.** El pretratamiento (PDGF + Rotenona) generó un aumento en la expresión de p65 total ($p = 0.04$ frente a rotenona); Control vs PDGF + Rotenona, $p = 0.02$. **D.** La rotenona disminuyó significativamente la expresión de GPx1 ($p < 0.001$ vs Control); Control vs PDGF + Rotenona, $p = 0.01$; PDGF vs Rotenona, $p < 0.001$ y PDGF + Rotenona vs Rotenona, $p < 0.001$. **E.** No se encontró un efecto sobre la expresión de catalasa. Todos los datos de estas cifras se presentan como media \pm SEM de tres experimentos individuales.

7.3.2. El PDGF aumenta la activación de NF-κB y la expresión de neuroglobina

Teniendo en cuenta que el PDGF-BB incrementaba la expresión de NF-κB en comparación con los otros tratamientos, se realizó una curva de tiempo de la translocación de la subunidad p65 del NF-κB por inmunocitoquímica para determinar los cambios en la expresión de esta proteína a lo largo del tiempo (2-24 h, Figura 21). En este experimento se analizó la colocalización entre el p65 translocado al núcleo y la contratinción de Hoescht (Trask, 2012). Se encontró que el PDGF-BB inducía un incremento significativo en este efecto a partir de las 12 h, y llegando a un máximo a las 24 h. Por otra parte la rotenona no incrementó la expresión de p65 a lo largo de estas 24 h con respecto al control.

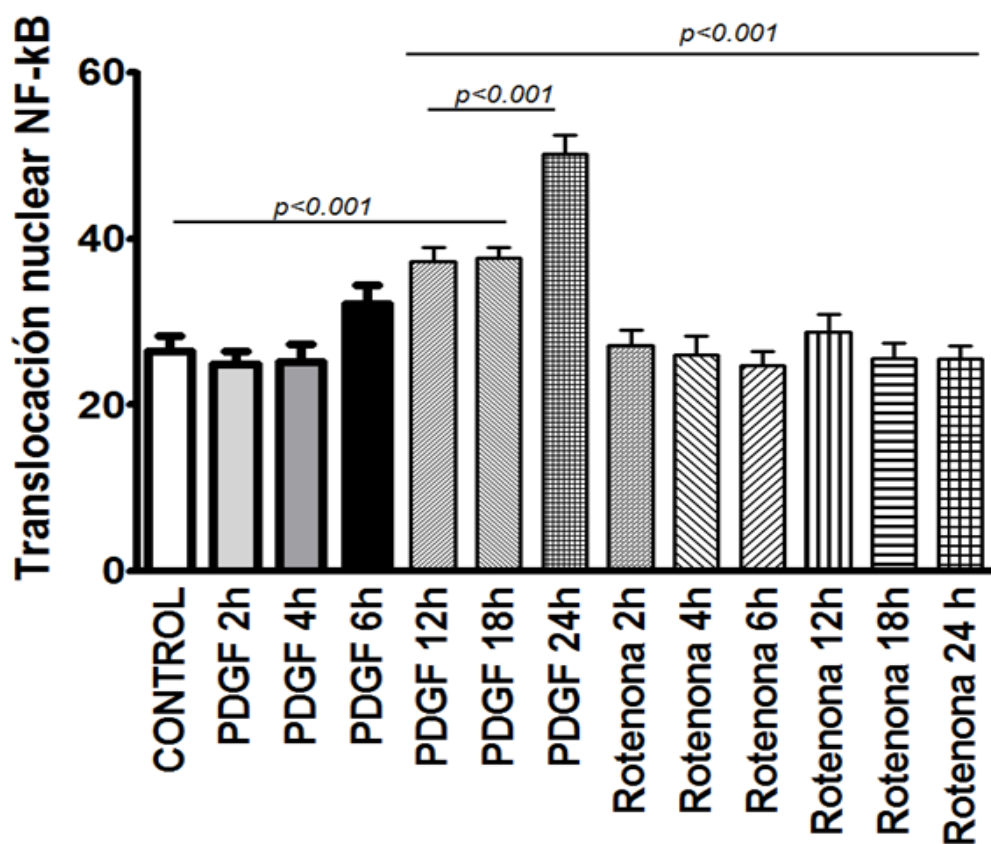


Figura 21. Curva de activación del NF-κB (p65) en función al tiempo. Se midió la translocación nuclear de la subunidad p65 del NF-κB, de 2 a 24h para los tratamientos de rotenona y PDGF-BB. El PDGF-BB incrementa la activación del NF-κB a partir de 6h y alcanzando un máximo alrededor de 24 h. La rotenona no activa la translocación de NF-κB. Control, PDGF 2, 4 y 6h vs PDGF 12y

18h $p < 0.001$; PDGF 12h y 18 h vs PDGF 24 h, $p < 0.001$; PDGF 12, 18 y 24 h vs Rotenona 2-24h, $p < 0.001$.

En un experimento posterior por inmunocitoquímica se analizaron (de manera similar al experimento anterior) los cambios en translocación de las subunidades p50 y p65 del NF- κ B y la expresión de la neuroglobina (Ngb1) de acuerdo a los distintos tratamientos. Nuestros resultados mostraron que PDGF-BB aumentó la translocación nuclear de las subunidades p65 ($p = 0.001$, Figura 22A) y p50 ($p < 0.001$, Figura 22B) del NF- κ B a diferencia del tratamiento con rotenona. Además, el PDGF-BB solo y el pretratamiento (PDGF+Rotenona) aumentaron la expresión de Ngb1 ($p < 0.001$ vs control, Figura 22C), mientras que la rotenona no incrementó la expresión de Ngb1. Este resultado fue corroborado por qRT-PCR (Figura Anexa. 4).

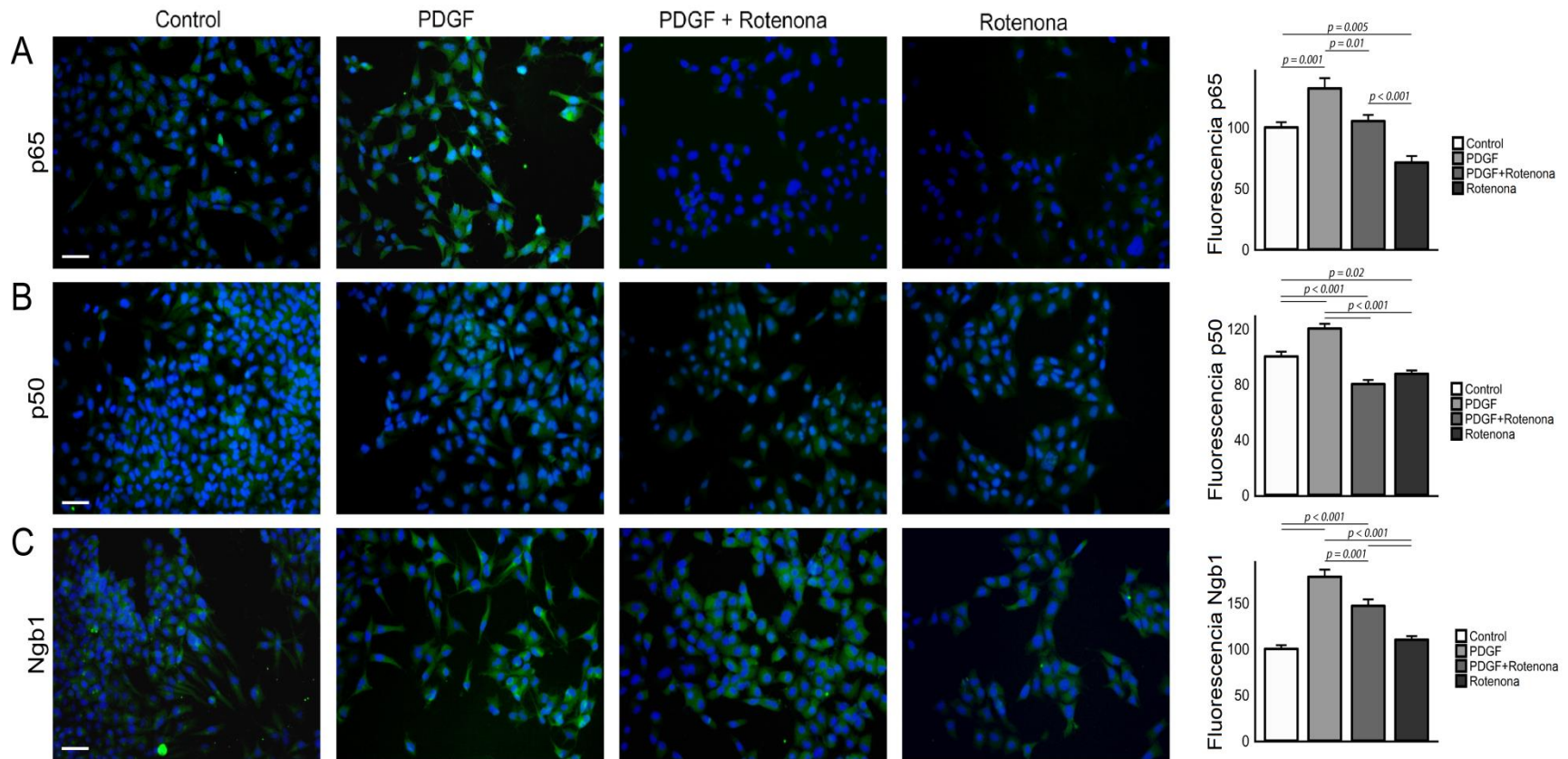


Figura 22. El PDGF aumenta la activación de NF- κ B y la expresión de Neuroglobina. **A.** El PDGF-BB incrementa significativamente la translocación nuclear de la subunidad p65 de NF- κ B ($p = 0.001$ frente a Control); Control vs Rotenona, $p = 0.005$; PDGF vs PDGF + Rotenona, $p = 0.01$; PDGF + Rotenona vs Rotenona, $p < 0.001$. **B.** PDGF-BB aumentó la translocación nuclear de las subunidad p50 de NF- κ B ($p < 0.001$ frente a Control); Control vs PDGF + Rotenona, $p < 0.001$; Control vs Rotenona, $p = 0.02$; PDGF vs PDGF + Rotenona, $p < 0.001$ y PDGF vs rotenona, $p < 0.001$. **C.** PDGF-BB y PDGF-BB + Rotenona aumentaron significativamente la expresión de Ngf1 (PDGF y PDGF + Rotenona vs Control, $p < 0.001$). PDGF vs PDGF + Rotenona, $p = 0.001$; PDGF vs Rotenona, $p < 0.001$; PDGF + Rotenona vs Rotenona, $p < 0.001$. Todos los datos se muestran como media \pm SEM de tres experimentos individuales. Barra de escala 50 μ m.

7.3.3. Efecto del silenciamiento de Ngb1 en los efectos protectores del PDGF-BB

Finalmente, para determinar si la neuroglobina estaba involucrada en las acciones protectoras de PDGF-BB, se bloqueó el gen Ngb1 usando un siRNA como se ha descrito previamente (Avila-Rodriguez et al., 2016; Baez et al., 2017) utilizándose una secuencia inespecífica (Scramble) como control. El silenciamiento de Ngb1 tuvo un efecto significativo sobre el pretratamiento control (Scramble) con PDGF-BB ($p < 0.05$, PDGF + Rotenona + Scramble vs PDGF + Rotenona + Ngb siRNA) pero no se encontraron efectos significativos sobre la viabilidad celular entre los otros tratamientos pareados (células con secuencia Scramble vs células silenciadas para Ngb1, Figura 23).

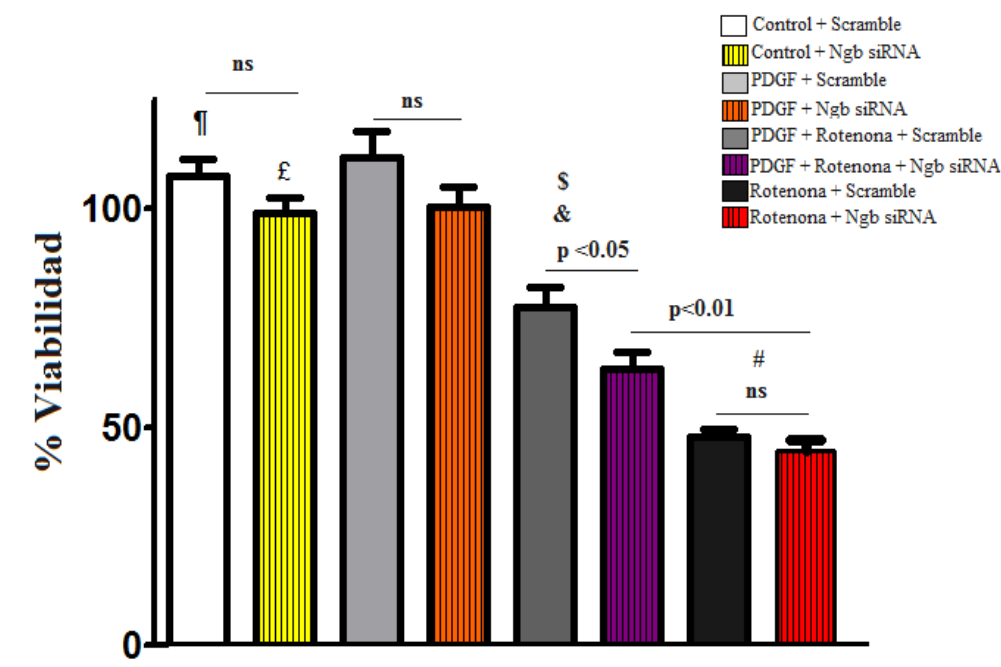


Figura 23. Efectos del silenciamiento de Ngb1 sobre la viabilidad en células T98G. Los resultados muestran que una ligera caída de la viabilidad en el pretratamiento con siRNA para Ngb1 en comparación con el pretratamiento con secuencia scramble ($p < 0.05$, PDGF + Rotenona + Scramble vs PDGF + Rotenona + Ngb siRNA), sin embargo no hay efectos significativos sobre la viabilidad en los otros pares de tratamientos. ¶ Control + Scramble vs Rotenona + Scramble, $p < 0.0001$; £ Control + Ngb siRNA vs Rotenona + siRNA, $p < 0.0001$; \$ PDGF + Rotenona + Scramble vs Rotenona + Scramble, $p < 0.0001$. \$ PDGF + Rotenona + Scramble vs Rotenona + Ngb siRNA, $p < 0.0001$. # Rotenona + Scramble y Rotenona + Ngb siRNA vs PDGF + Scramble, $p < 0.0001$.

En el siguiente experimento, se evaluó el efecto del silenciamiento de Ngb1 sobre los cambios en el $\Delta\psi_m$ (Figura 24). Se encontró que el silenciamiento para esta proteína disminuyó los efectos protectores del PDGF-BB sobre el mantenimiento del $\Delta\psi_m$ ($p < 0.05$ PDGF + Rotenona + Scramble vs PDGF + Rotenona + Ngb siRNA), viéndose efectos similares en otros pares de tratamientos.

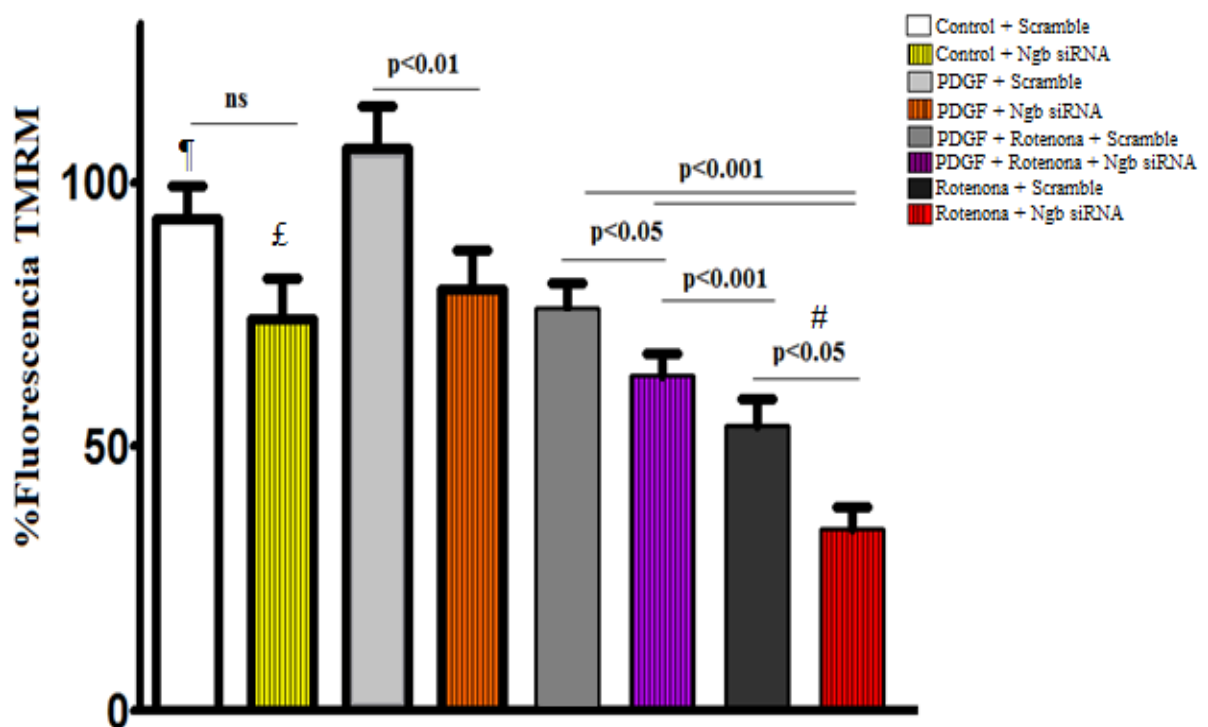


Figura 24. Efectos del silenciamiento de Ngb1 sobre el $\Delta\psi_m$ en células T98G. El silenciamiento de Ngb1 tuvo efectos perjudiciales en el $\Delta\psi_m$, disminuyendo el efecto protector del pretratamiento de PDGF-BB sobre este parámetro ($p < 0.05$; PDGF + Rotenona + Scramble vs PDGF + Rotenona + Ngb siRNA). PDGF + Scramble vs PDGF + Ngb siRNA, $p < 0.01$; Rotenona + Scramble vs Rotenona + Ngb siRNA, $p < 0.05$; PDGF + Rotenona + Scramble vs Rotenona + Ngb siRNA, $p < 0.001$; PDGF + Rotenona + Ngb siRNA vs Rotenona + Ngb siRNA, $p < 0.001$; ¶ Control + Scramble vs Rotenona + Scramble, $p < 0.0001$; £ Control + Ngb siRNA vs Rotenona + siRNA, $p < 0.0001$; # Rotenona + Scramble y Rotenona + Ngb siRNA vs PDGF + Scramble, $p < 0.0001$. PDGF + Rotenona + Scramble vs Rotenona + Ngb siRNA, $p < 0.001$.

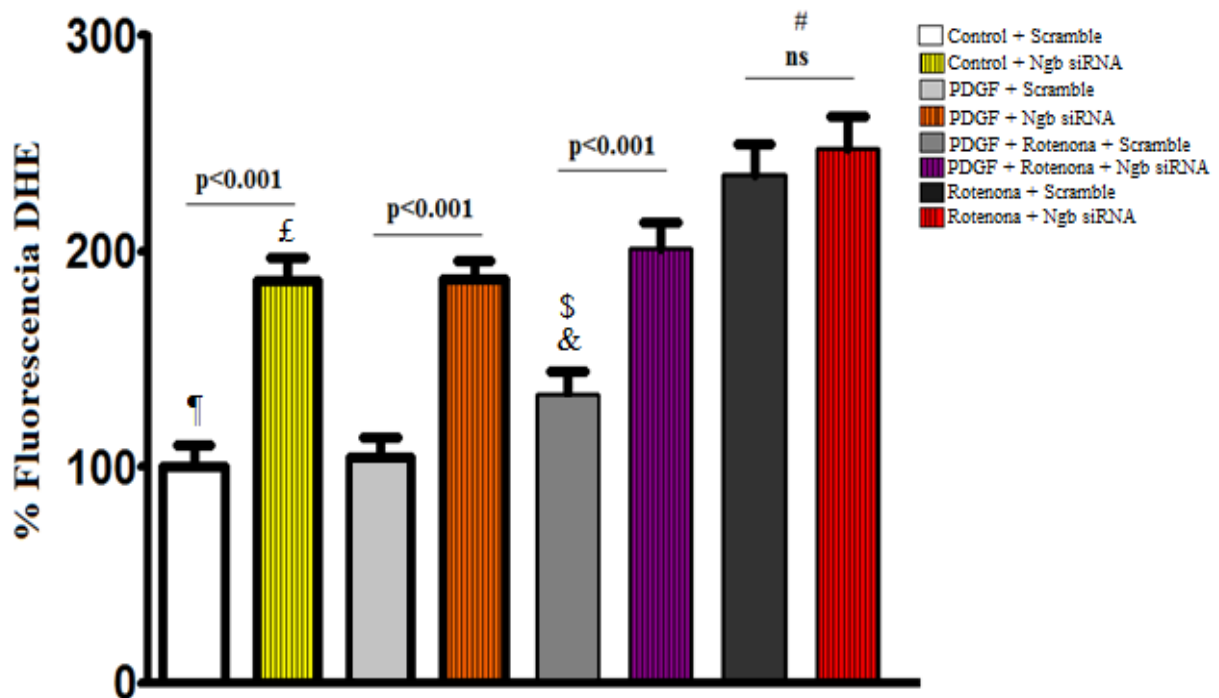


Figura 25. Efectos del silenciamiento de Ngb1 sobre la producción de ERO determinados por DHE. El silenciamiento del gen Ngb1 aumentó la producción de superóxido ($p < 0.001$, PDGF + Rotenona + Scramble vs PDGF + Rotenona + Ngb siRNA). Control + Scramble vs Control + Ngb siRNA, $p < 0.001$; PDGF + Scramble vs PDGF + Ngb siRNA, $p < 0.001$; # Rotenona + Scramble y Rotenona + Ngb siRNA vs PDGF + Scramble, $p < 0.0001$; ¶ Control + Scramble vs Rotenona + Scramble, $p < 0.0001$; £ Control + Ngb siRNA vs Rotenona + siRNA, $p < 0.0001$; \$ PDGF + Rotenona + Scramble vs Rotenona + Scramble, $p < 0.0001$. & PDGF + Rotenona + Scramble vs Rotenona + Ngb siRNA, $p < 0.0001$.

Igualmente se vieron efectos sobre la producción de ERO. El silenciamiento de Ngb1 incrementó significativamente la producción de especie superóxido ($p < 0.001$, PDGF + Rotenona + Scramble vs PDGF + Rotenona + Ngb siRNA, Figura 25) y los niveles de peróxido ($p < 0.001$, PDGF + Rotenona + Scramble vs PDGF + Rotenona + Ngb siRNA Figura 26). Estos resultados sugieren que el silenciamiento para Ngb1 posee un efecto sobre el $\Delta\psi_m$ y la producción de ERO en los distintos tratamientos evaluados en células T98G.

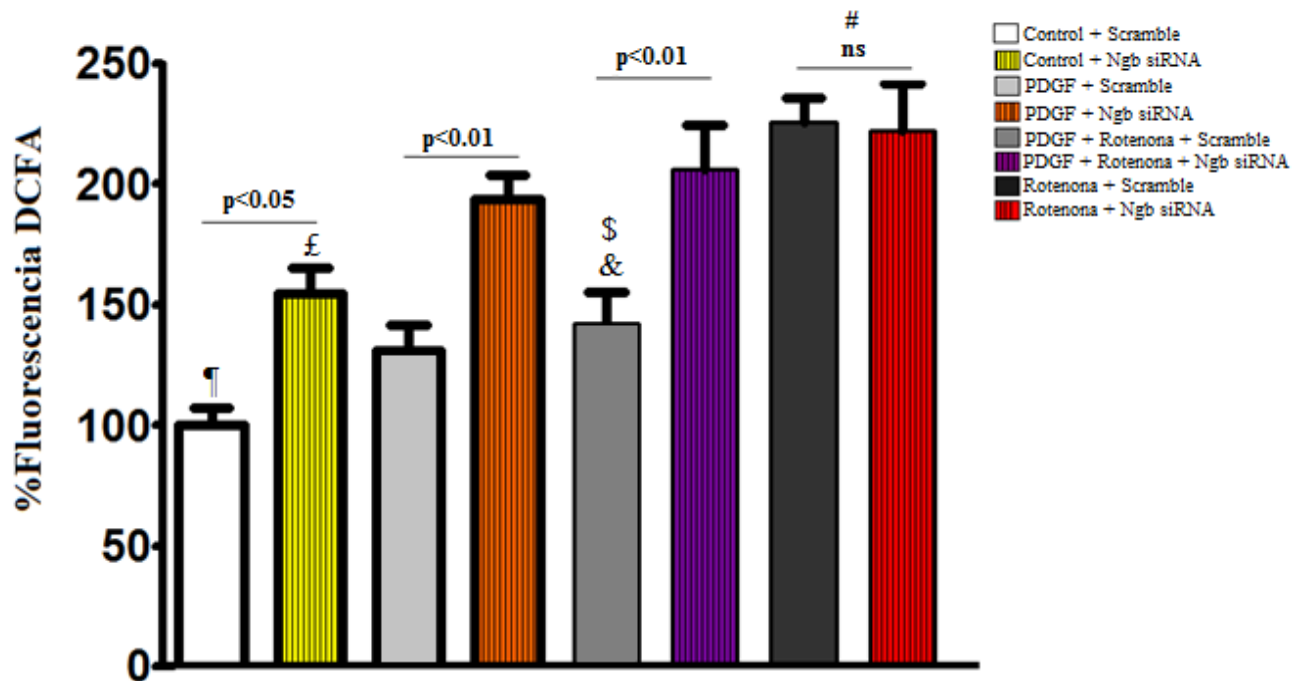


Figura 26. Efectos del silenciamiento de Ngb1 sobre la producción de de ERO determinados por DCFA en células T98G. El silenciamiento del gen Ngb1 incrementó la producción de peróxido determinado por DCFA, $p<0.01$, PDGF + Rotenona + Scramble vs PDGF + Rotenona + Ngb siRNA. Control + Scramble vs Control + Ngb siRNA, $p<0.05$; PDGF + Scramble vs PDGF + Ngb siRNA, $p<0.01$; # Rotenona + Scramble y Rotenona + Ngb siRNA vs PDGF + Scramble, $p<0.0001$; ¶ Control + Scramble vs Rotenona + Scramble, $p<0.0001$; £Control + Ngb siRNA vs Rotenona + siRNA, $p<0.0001$; \$ PDGF + Rotenona + Scramble vs Rotenona + Scramble, $p<0.0001$. & PDGF + Rotenona + Scramble vs Rotenona + Ngb siRNA, $p<0.0001$

Los anteriores resultados fueron publicados en las revistas Neurotoxicity Research (*PDGF-BB protects mitochondria from rotenone in T98G cells*) y en la revista Molecular Neurobiology (*PDGF-BB preserves mitochondrial morphology, attenuates ROS production and upregulates neuroglobin in an astrocytic model under rotenone insult*) Ver anexos.

7.4. Generación de un modelo computacional de la protección mitocondrial por PDGF-BB frente a rotenona

7.4.1. Construcción del modelo computacional

De manera complementaria a los estudios experimentales realizados en células astrocitarias, se construyó un modelo cinético en la plataforma COPASI en el cuál se modelaron varios de los procesos del PDGF-BB en la protección frente a rotenona, con base en nuestros estudios experimentales en células T98G (Cabezas et al., 2015) y a partir de un modelo anterior sobre el control de ERO (Ignatenko et al., 2014), del cuál fueron tomadas varias de las reacciones y especies utilizadas en el presente modelo (ver Tabla 5).

El modelo computacional (Figura 27), se encuentra constituido por 4 módulos interdependientes de reacciones (descritas en la Tabla 5). A continuación se describen estos módulos:

A) Un módulo de señalización, el cuál integra de manera simplificada la unión del PDGF-BB a su receptor PDGFR β y la subsecuente activación de IKK (Ikk), IKBA (IkBA) y el NF- κ B, el cual a su vez puede activar la proteína antiapoptótica Bclxl (Barkett y Gilmore, 1999).

B) Un módulo de reacciones asociadas a Nrf2, el cual es un factor de transcripción importante en la regulación del estrés oxidativo y la biogénesis mitocondrial en la EP y el cual también puede ser activado por PDGF-BB (Dong et al., 2008; Li y Kong, 2009; Nguyen et al., 2009 ; Ashino et al., 2013; Ivankovic et al., 2015).

C) Un módulo mitocondrial reducido, en el cual se presentan de manera resumida algunas funciones mitocondriales de interés incluyendo los procesos de mitofagia (Chu et al., 2013), producción de ATP, flujo de protones (Potential, generación de $\Delta\psi_m$), reacción redox de NADH y NAD y producción de ERO, el cuál se ve incrementado por la acción de la rotenona. Como se explicó en la sección 5.17 de la metodología, nuestro modelo asume que la principal causa de la producción de ERO es un incremento en el daño mitocondrial,

por lo cual a mayor daño mitocondrial, se tendrá una mayor producción de ERO. Por otra parte, en condiciones basales (Control), se espera tener un número constante de mitocondrias funcionales, con baja degradación en el tiempo (Ignatenko et al., 2014).

D) Un módulo de reacciones asociadas a neuroglobina: En este módulo se plantea la posible activación de neuroglobina (Neuro) por parte de PDGF-BB y su silenciamiento por parte de un RNAi, tal como sugieren nuestros resultados experimentales (Secciones 7.3.2 y 7.3.3).

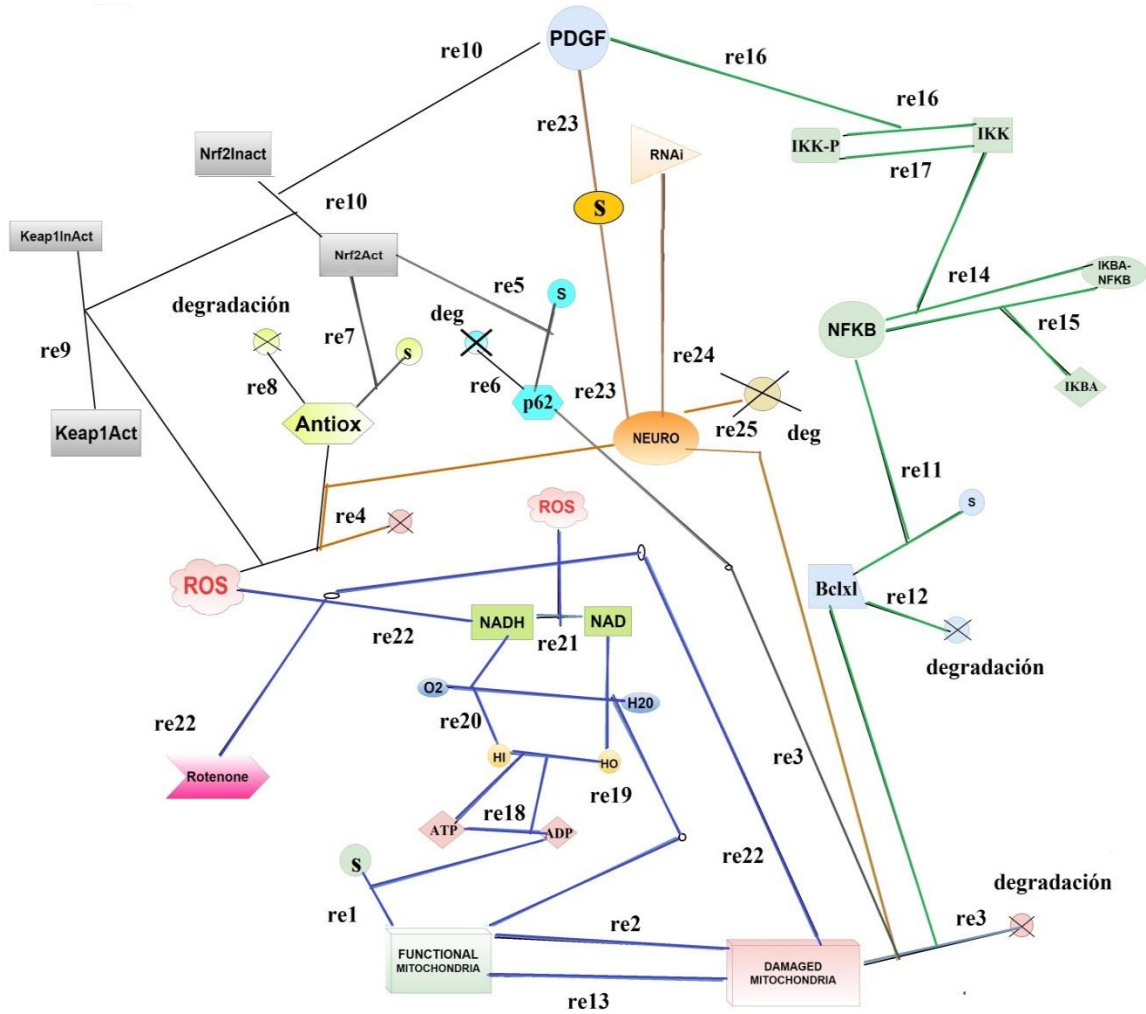


Figura 27. Representación gráfica del modelo. El modelo integra la señalización del PDGF-BB con la activación de NF- κ B y Bclxl (líneas verdes) con un módulo de respuesta antioxidante Nrf2/Keap1 (líneas grises), que activa p62, importante en la reconversión de mitocondrias no funcionales (Damaged mitochondria) a mitocondrias funcionales (Functional mitochondria). Por otra parte, el PDGF-BB incrementa la expresión de la neuroglobina (NEURO, líneas naranja) que regula la producción de ERO (ROS) y ejerce igualmente una modulación sobre las mitocondrias no funcionales y las reacciones oxidativas de la mitocondria (línea azules). deg: reacciones de degradación de especies.

7.4.2. Predicciones del modelo computacional

A continuación se realizaron los cursos temporales (*time courses*) del modelo, por 24h horas en intervalos de 10 min, para las condiciones de Control, PDGF, Rotenona y PDGF + Rotenona. Para esta última condición se simuló inicialmente el efecto por 24 h para PDGF y posteriormente se corrió un curso temporal de 24 h para rotenona, lo que se aproximaba al efecto de las condiciones experimentales. Los resultados encontrados fueron los siguientes:

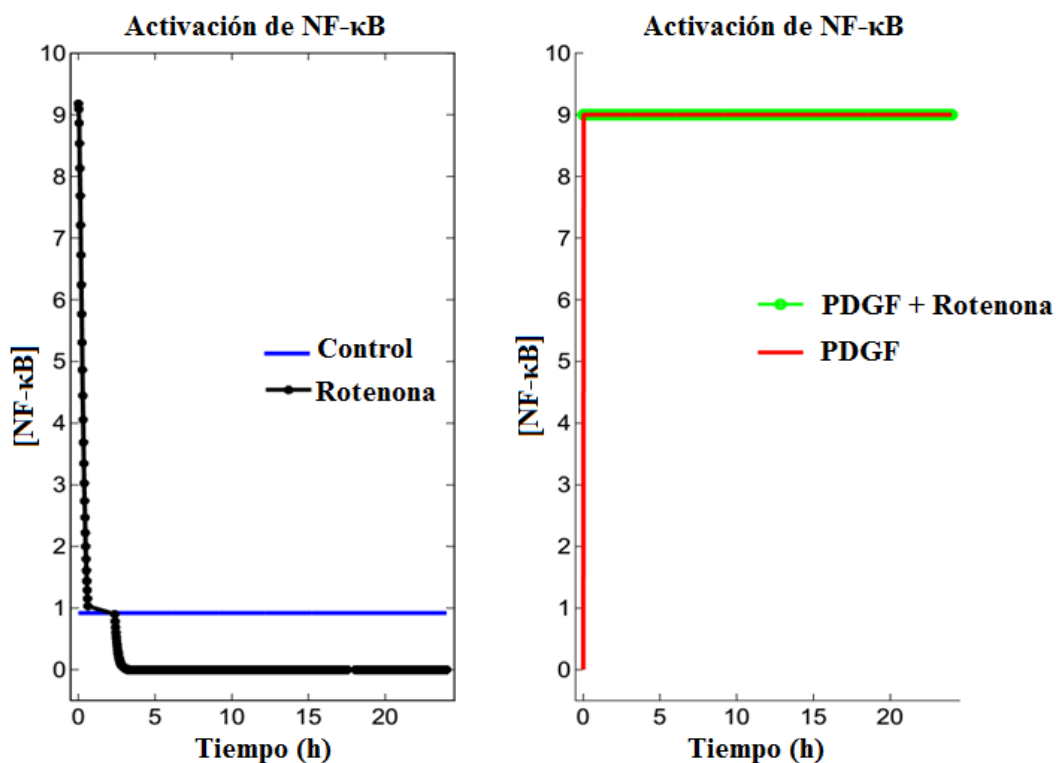


Figura 28. Predicciones del modelo computacional para la activación de NF-κB por los distintos tratamientos.

La Figura 28, muestra los resultados de la predicción del modelo computacional relativos a la activación del NF-κB por los distintos tratamientos. El modelo predice que el PDGF-BB

y el pretratamiento incrementan la activación del NF- κ B mientras que la rotenona disminuye esta activación durante las 24 horas de la simulación.

Posteriormente se realizó un análisis de sensibilidad para la reacción 14, (IkBa-NF κ B \rightarrow NF κ B; Ikk-P) relativa a la activación de NF- κ B, por liberación de IkBA. Esta reacción a su vez, es dependiente de las concentraciones de PDGF-BB de acuerdo a la reacción 16 (Ikk \rightarrow Ikk-P; PDGF). El análisis de sensibilidad (Tabla 9) muestra que las principales especies afectadas por esta reacción son: Bclxl y Nfkb de forma positiva y el complejo IkBa-NF- κ B de manera negativa, lo cual es congruente con el proceso de activación de NF- κ B de acuerdo a las reacciones del modelo.

[Bclxl]	0.00998912
[IkBa-NF κ B]	-0.989022
[Nfkb]	0.00998912
[Ikk]	0

Tabla 9. Principales especies afectadas para el análisis de sensibilidad de la reacción 16.

La Figura 29 muestra las predicciones del modelo para la producción de ERO para los distintos tratamientos. La rotenona incrementa fuertemente la producción de ERO, llegando a un pico de 25 nM a 10 horas y luego estabilizándose alrededor de 15 nM. En comparación con el PDGF-BB y PDGF + Rotenona que mantenían unas concentraciones de ERO similares al control (aproximadamente 1 nM). Se realizó posteriormente un análisis de sensibilidad para la reacción 22, la cual se encuentra involucrada en la generación de ERO (ROS en el modelo), dependientes de las reacciones redox de NADH⁺ (NADH⁺ \rightarrow ROS + NAD; ROTENONE "HEALTHY MITH" "DAMAGED MITOCH"). El análisis de sensibilidad (Tabla 10), muestra que los principales parámetros afectados fueron de manera positiva, las concentraciones de ADP y protones de la membrana interna mitocondrial

([HI]), mientras que las especies más afectadas de manera negativa, fueron: el potencial $\Delta\psi_m$ (potential), el NADH^+ y la concentración de protones externa de la mitocondria [HO]. Estos resultados son coherentes con lo esperado para la producción de ERO y sugieren una importante perturbación en las reacciones mitocondriales, dependientes del incremento en la producción de ERO.

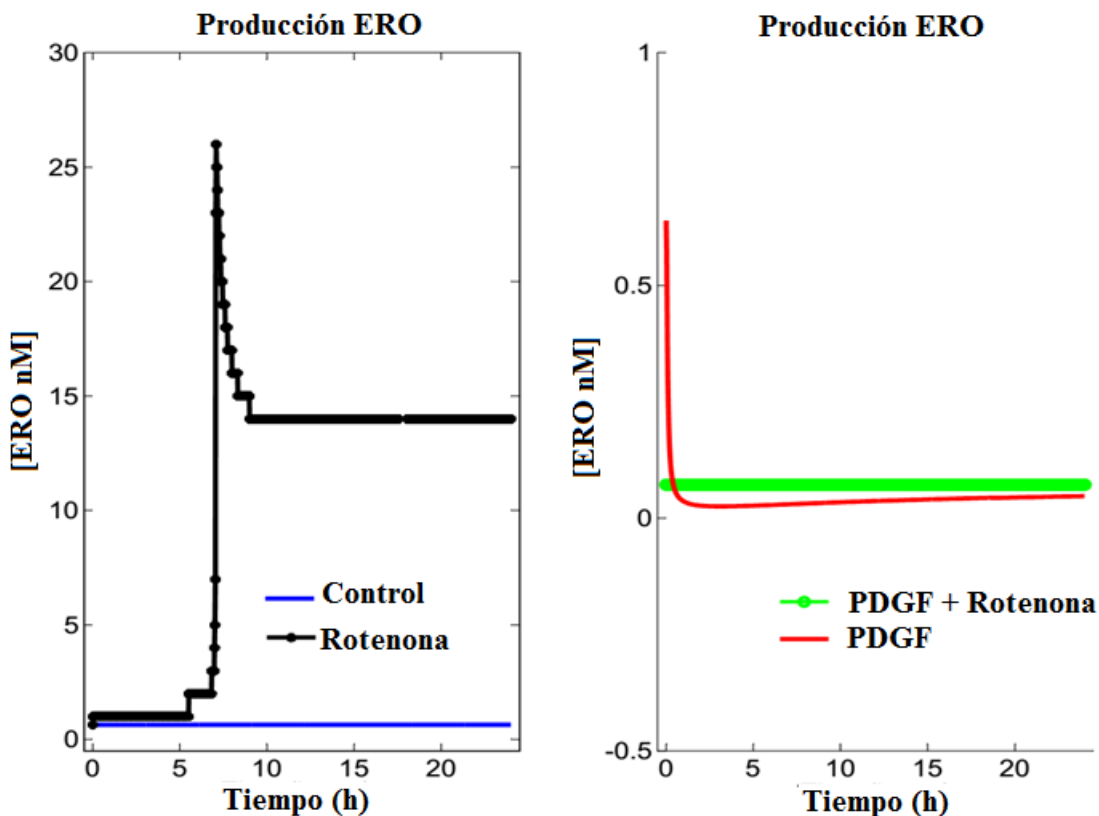


Figura 29. Predicciones del modelo computacional para la producción de ERO, de acuerdo a los distintos tratamientos.

[HEALTHY MITH]	-0.0126079
[DAMAGED MITOCH]	-0.0042801
[ROS]	0.0122873

[p62]	0.00325746
[Antiox]	0.00326278
[ATP]	-0.0009743
[ADP]	0.996827
[HI]	0.789781
[HO]	-0.195789
[NADH+]	-0.956931
[NAD]	0.0152149
[POTENTIAL]	-0.984792

Tabla 10. Principales especies afectadas para el análisis de sensibilidad de la reacción 22.

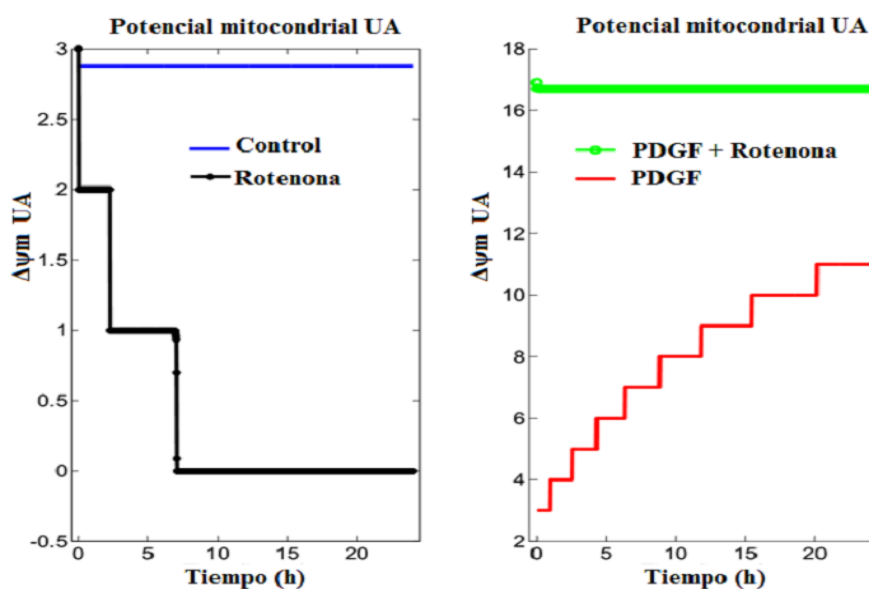


Figura 30. Predicciones del modelo computacional para los cambios en el $\Delta\psi_m$ para los distintos tratamientos.

La Figura 30 muestra las predicciones para los cambios en el $\Delta\psi_m$ determinado por la función $[Ho]/[Hi]$ del modelo computacional. El modelo predice que la rotenona causa una fuerte reducción en el $\Delta\psi_m$ (de 3 a 0 unidades arbitrarias, UA) en comparación con el

control (3 unidades arbitrarias), mientras que el PDGF-BB y el pretratamiento (PDGF + Rotenona) , mantienen e incrementan este potencial en comparación con el control (10 y 17 unidades arbitrarias). En nuestro modelo el potencial está definido como un *assignment* o tarea, definido por la expresión: $[\text{potential}] = [\text{Ho}]/[\text{Hi}]$. Podría analizarse este potencial mediante la reacción 20 relativa al transporte de electrones mitocondrial ($\text{O}_2 + \text{HI} + \text{NADH}^+ = \text{H}_2\text{O} + \text{HO} + \text{NAD}$; "HEALTHY MITH") en la cual están presentes tanto la concentración de protones externos como los internos (HI) de la mitocondria. El análisis de sensibilidad (Tabla 11), muestra que la concentración de protones internos ([HI]) está siendo fuertemente afectada de manera positiva por esta reacción, mientras que tanto el $\Delta\psi_m$ (potential) como la concentración de protones externos ([HO]) están siendo afectados de manera negativa por esta reacción. Otros parámetros que afectan el $\Delta\psi_m$ de una manera indirecta en el modelo, son las concentraciones de rotenona, PDGF y Neuroglobina, junto con el daño mitocondrial, de acuerdo a lo observado en las figuras 30 y 33.

[HEALTHY MITH]	-0.0885857
[DAMAGED MITOCH]	-0.0006838
[ATP]	-0.240791
[ADP]	0.240791
[HI]	509.706
[HO]	-509.706
[POTENTIAL]	-114.547

Tabla 11. Principales especies afectadas para el análisis de sensibilidad de la reacción 20.

Por su parte la Figura 31 muestra cambios en mitocondrias funcionales las cuales han sufrido un menor daño por parte de ERO tal como se mencionó en la descripción del modelo. El modelo predice una drástica reducción en las mitocondrias funcionales, las cuales descienden a valores cercanos a 0, tras el tratamiento con rotenona en comparación

con las condiciones control, mientras que tanto el PDGF-BB como las condiciones de pretratamiento (PDGF + Rotenona), mantienen la concentración de mitocondrias funcionales. Esta reducción en las mitocondrias funcionales se encuentra relacionada a una disminución en la viabilidad celular y la activación de procesos apoptóticos como los observados en neurodegeneración (Swankar et al., 2012; Van Houten et al., 2016).

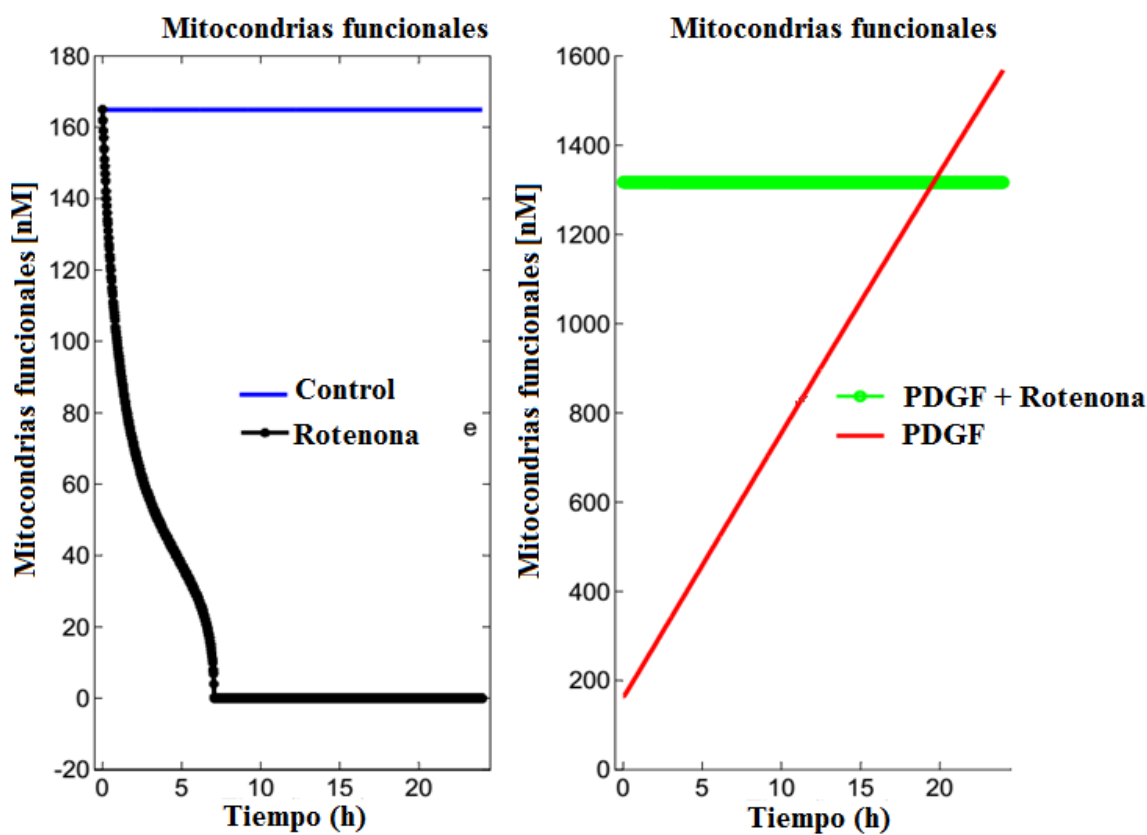


Figura 31. Predicciones del modelo computacional para el mantenimiento de mitocondrias funcionales para cada tratamiento.

Dado que la concentración de mitocondrias funcionales en el modelo está determinada principalmente por la reacción 2 ("HEALTHY MITH" -> "DAMAGED MITOCH"; ROS ROTENONE), se realizó un análisis de sensibilidad (Tabla 12) para determinar el efecto de esta reacción sobre otros parámetros. Como se mencionó con anterioridad, esta reacción es dependiente de la producción de ERO (ROS) y Rotenona en el modelo. Los resultados sugieren que los principales parámetros afectados de manera positiva (verde) fueron las mitocondrias no funcionales (Damaged Mitoch) , los protones de la membrana interna

([HI]) y el NADH+, mientras que los parámetros más afectados de forma negativa fueron mitocondrias funcionales (Healthy Mith), el potencial (potential), la concentración de protones externa de la mitocondria ([HO]) y el NAD, lo cuál resulta consistente con la perturbación mitocondrial ejercida por la rotenona sobre la funcionalidad mitocondrial.

[HEALTHY MITH]	-0.606954
[DAMAGED MITOCH]	0.151874
[HI]	0.471141
[HO]	-0.0021354
[NADH+]	0.132347
[NAD]	-0.00163634
[POTENTIAL]	-0.473053

Tabla 12. Principales especies afectadas para el análisis de sensibilidad de la reacción 2.

En la Figura 32, se muestran las predicciones del modelo para los cambios en la expresión de neuroglobina estimulados con los distintos tratamientos. El modelo predice que el PDGF-BB y el pretratamiento con PDGF-BB (PDGF +Rotenona) incrementan la expresión de esta proteína en comparación con la rotenona y el grupo control, lo cual sugiere que efectivamente el PDGF-BB posee un efecto sobre la expresión de Ngb.

En este caso, la reacción 23 ($\text{S} \rightarrow \text{NEURO}$; PDGF) es la implicada en el proceso de formación de neuroglobina. El análisis de sensibilidad de esta reacción (Tabla 13) muestra que los principales parámetros afectados de forma positiva fueron la concentración de neuroglobina, el $\Delta\psi_m$ y la concentración de mitocondrias funcionales. Por otra parte, los principales parámetros afectados de manera negativa fueron las mitocondrias no funcionales (Damaged Mitoch), y Keap1 activado. En este caso, el incremento en la concentración de la neuroglobina posee efectos positivos en parámetros como el potencial y las mitocondrias funcionales, lo cual es consistente con las reacciones en las que se encuentra involucrada la neuroglobina.

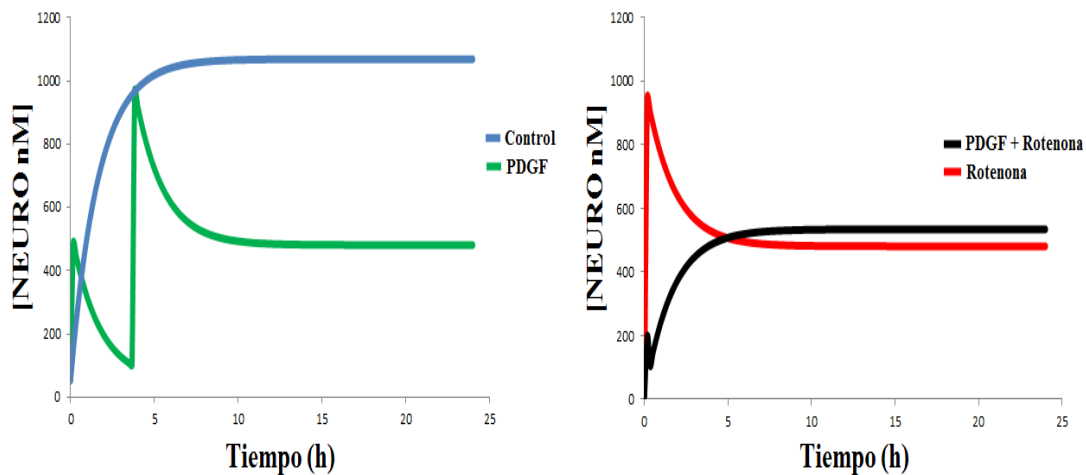


Figura 32. Predicciones del modelo computacional para cambios en la expresión de neuroglobina.

[HEALTHY MITH]	0.825013
[DAMAGED MITOCH]	-0.220515
[Antiox]	-0.0178228
[Keap1Act]	0.0412843
[Keap1Inact]	-0.0260291
[Nrf2Act]	-0.017804
[Nrf2Inact]	0.0234818

[NAD]	0.00222047
[NEURO]	0.999994
[POTENTIAL]	0.643053

Tabla 13. Principales especies afectadas para el análisis de sensibilidad de la reacción 23.

En la figura 33A, se muestran los cambios en la expresión de la neuroglobina al incrementar la concentración de RNAi, en la cual se puede observar que al incrementar de 0 a 10 unidades las concentraciones del RNAi disminuye en más de un 90% la expresión de la neuroglobina en el tiempo. En la figura 33B se muestra el efecto del incremento de las concentraciones de RNAi sobre el $\Delta\psi_m$ al incrementar de 0 a 10 nM las concentraciones del RNAi donde se observa que una concentración de 10 nM causa una caída relativa del 45% en el $\Delta\psi_m$, sugiriendo que la neuroglobina es importante en el mantenimiento de este parámetro, tal como ha sido descrito de manera experimental anteriormente (Avila-Rodriguez et al., 2016; Baez et al., 2017). Respecto al efecto del RNAi, la reacción 24 establece una degradación en la formación de neuroglobina dependiente de la concentración de RNAi ("S -> NEURO; PDGF), por lo cual al incrementar la concentración del RNAi se verá más afectada la formación de neuroglobina y procesos dependientes de esta molécula. El análisis de sensibilidad (Tabla 14) muestra que las especies más afectadas por esta reacción de manera positiva fueron la generación de ADP y protones mitocondriales de la membrana interna [HI], mientras que las especies más afectadas de manera negativa fueron la formación de neuroglobina, la formación de mitocondrias saludables (Healthy Mith) y el $\Delta\psi_m$, lo cual es congruente con las reacciones en las que se encuentra involucrada esta molécula.

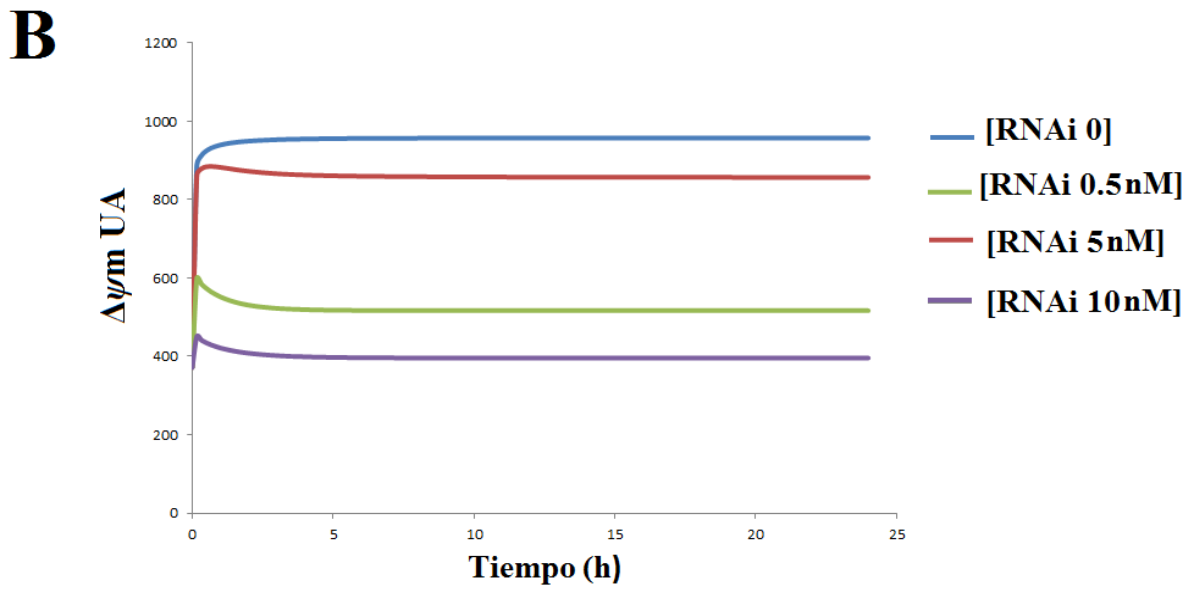
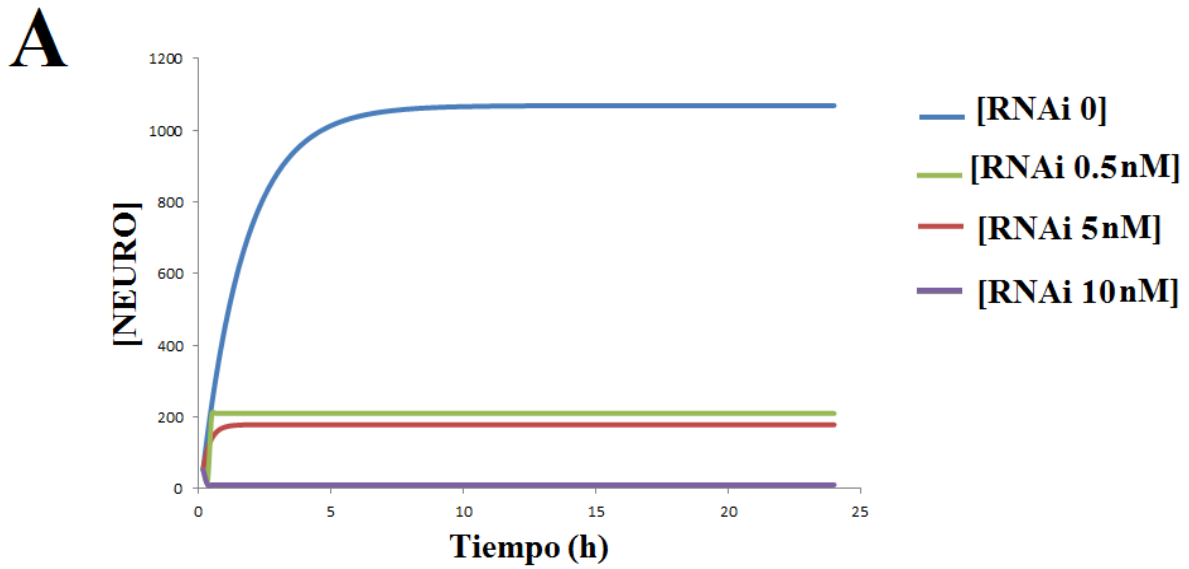


Figura 33. Predicciones del modelo computacional para los efectos del silenciamiento con RNAi A. Cambios en la expresión de NgB (NEURO) en función de las concentraciones de RNAi contra neuroglobina B. Efecto del RNAi contra neuroglobina sobre el $\Delta\psi_m$.

[HEALTHY MITH]	-0.640359
[DAMAGED]	-0.00395385

MITOCH]	
[ROS]	0.000703808
[ADP]	127.761
[HI]	0.511243
[HO]	-0.126739
[NEURO]	-0.98912
[POTENTIAL]	-0.637655

Tabla 14. Principales especies afectadas para el análisis de sensibilidad de la reacción 24.

En las figuras anexas (11-15) se muestran análisis de sensibilidad adicionales relativos al efecto de varias de las especies del modelo (PDGF, Rotenona, Neuroglobina, Antioxidantes ERO) sobre los cambios de la concentración de otras especies.

7.4.3. Validación parcial del modelo computacional en una línea celular HEK

Finalmente el modelo computacional fue parcialmente validado en una línea celular HEK (NF- κ B / 293 / GFP-LucTM). Esta línea, permite determinar la activación de la señal de NF- κ B *in vitro*, mediante la detección de la fluorescencia por GFP o luciferasa para ensayos de reporte de activación de transcripción cuantitativa. Estos experimentos fueron realizados en colaboración con el grupo Integrative Cell signalling del Luxembourg Centre for Systems Biomedicine.

Respecto a las células HEK, fue necesario cambiar la concentración de rotenona utilizada (1 μ M) ya que la dosis de 50 μ M resultaba completamente letal para estas células. Se siguió el protocolo utilizado para células T98G, mencionado anteriormente. Tras una privación de 24 horas, las células fueron estimuladas con 200 ng/mL de PDGF-BB. Posteriormente las células fueron insultadas con rotenona (1 μ M) y fueron tomadas las secuencias fotográficas en microscopio de fluorescencia (1 imagen cada 10 min, por las

siguientes 16 h). Durante la sesión fotográfica las células permanecieron en un ambiente de CO_2 al 5% a una temperatura de 37^0C . Se realizaron ensayos para la expresión del $\text{NF-}\kappa\text{B}$, $\Delta\psi\text{m}$ determinado por tinción con TMRM y ensayos de viabilidad por IP.

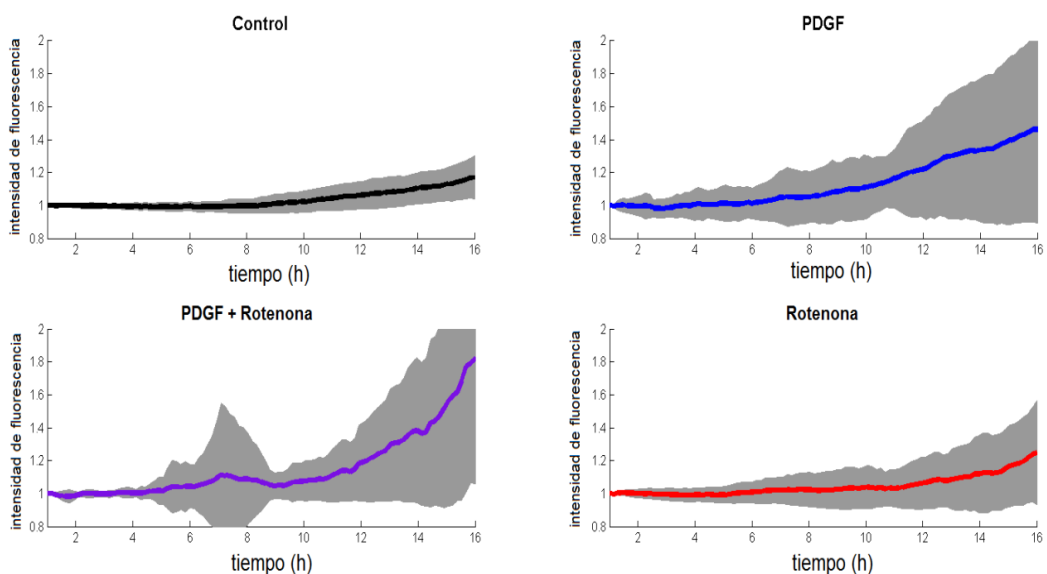


Figura 34. El PDGF-BB incrementa la translocación de $\text{NF-}\kappa\text{B}$ en células HEK. Gráficos representativos generados por MATLAB. En sombreado gris la \pm SEM de 20 células diferentes a lo largo de 16 horas.

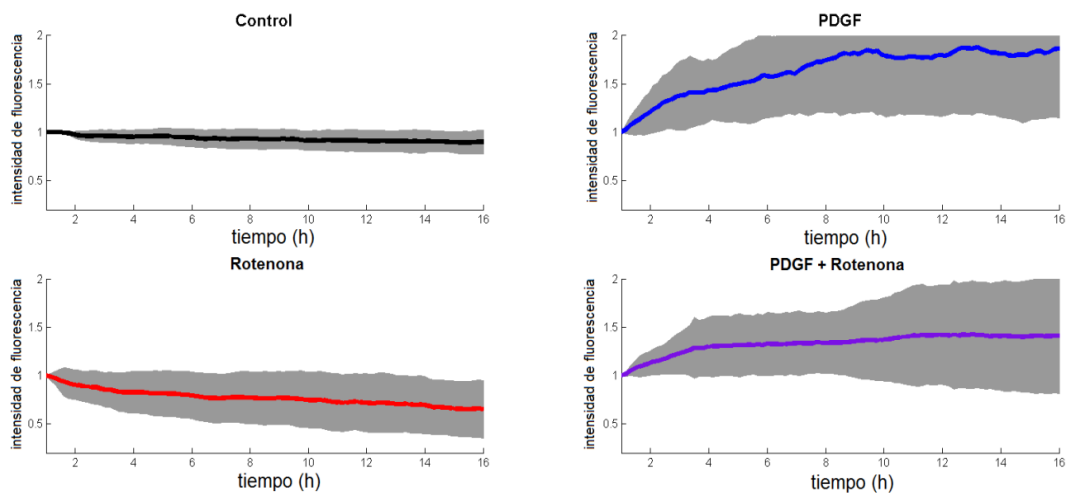


Figura 35. El PDGF-BB mantiene el $\Delta\psi_m$ en células HEK. Tinción con TMRM durante las 16 horas de la medición. La rotenona disminuye el $\Delta\psi_m$ en comparación con el control. Gráficos representativos generados por MATLAB. En sombreado gris la +/- SEM de 20 células diferentes a lo largo de 16 horas.

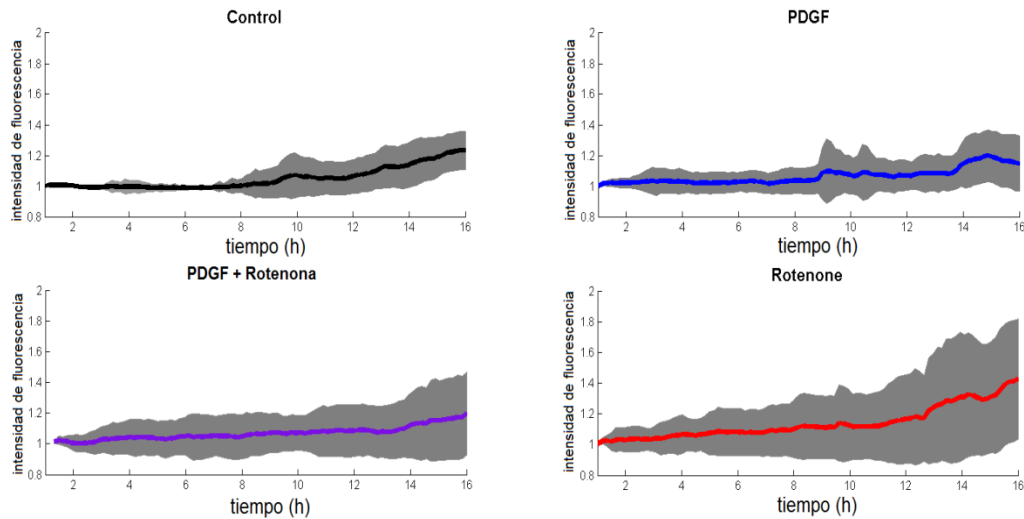


Figura 36. El PDGF-BB mantiene la viabilidad frente a insulto por rotenona en células HEK. La rotenona incrementa la fluorescencia por IP, mientras que el PDGF-BB se mantiene cerca a valores control. Gráficos representativos generados por MATLAB. En sombreado gris la +/- SEM de 20 células diferentes a lo largo de 16 horas.

Los resultados (Figura 34) sugieren que tanto el PDGF-BB y el pretratamiento con PDGF-BB (PDGF + Rotenona), incrementan la activación del NF- κ B. Mientras que la rotenona se mantiene en niveles similares al control al cabo de 16 h. Como se puede observar, estos resultados poseen un comportamiento similar a lo que se observó en el modelo computacional (Figura 28), en los cuales el PDGF-BB y el PDGF+ Rotenona, pero no la Rotenona sola incrementan la activación de NF- κ B.

De la misma manera, tanto el PDGF-BB como el pre-tratamiento con PDGF-BB (PDGF-BB +Rotenona) muestran un incremento en el $\Delta\psi_m$ determinado por tinción con TMRM (Figura 35), mientras que la rotenona disminuye el potencial comparada con el control. Estos resultados son similares a los obtenidos en el modelo computacional de COPASI, y

también poseen un comportamiento similar a lo que fue observado en las células astrocitarias T98G.

Por último, al tratar las células con IP, se encontró que la rotenona ejerce un ligero incremento (25%) en la fluorescencia por esta tinción en comparación con los otros tratamientos, manteniendo una tendencia a incrementarse en tiempos posteriores, sugiriendo que la rotenona afecta la viabilidad de esta línea celular (Figura 36).

Estos resultados con células HEK NF- κ B / 293 / GFP-LucTM estuvieron en concordancia con los resultados obtenidos en células astrocitarias T98G en los cuales el insulto con rotenona incrementó la absorción de IP por parte de las células, mientras que el PDGF-BB disminuyó este efecto, sugiriendo una protección sobre la viabilidad celular.

8. DISCUSIÓN

Efectos del PDGF-BB en la viabilidad y activación astrocitaria

Inicialmente, buscamos evaluar en nuestro estudio, el efecto del PDGF-BB sobre la viabilidad y activación astrocitaria durante el insulto con rotenona. La rotenona se ha utilizado ampliamente en modelos neurotóxicos, ya que provoca procesos moleculares y celulares similares a los observados en enfermedades neurodegenerativas como la EP (Cabezas et al., 2012; de Oliveira et al., 2011; Greenamyre et al., 2003; Valverde et al., 2008). La rotenona tiene un efecto directo sobre las funciones mitocondriales, incluyendo una interferencia con la cadena de transporte de electrones, la pérdida del $\Delta\psi_m$ y la generación de ATP (Greenamyre et al., 2003; Sarafian et al., 2010; Simpkins et al., 2010).

A su vez la rotenona causa la liberación del citocromo C desde la membrana mitocondrial interna activando efectores apoptóticos como Bid, Bax, caspasa 3 y 9 en neuronas (Gyulxhandanyan et al., 2003; Tiwari et al., 2011; Wang et al., 2011). De manera similar, nuestros experimentos mostraron que la rotenona a una concentración de 50 μM afectaban drásticamente (alredor del 50%) la viabilidad celular, la condensación nuclear y la absorción de IP en células T98G tras 24 h de insulto (Figuras 9-13), similar a lo reportado en otras líneas celulares tanto del sistema nervioso como de otros órganos (Betarbet et al., 2000; Avila-Gómez et al., 2010; Swarnkar et al., 2012; Heinz et al., 2017). Es importante hacer notar que las distintas líneas celulares estudiadas reportan una gran variabilidad en las dosis y tiempos de rotenona utilizados desde rangos del orden picomolar hasta micromolar, junto con tiempos de insulto que van de pocos minutos a 24 o más horas (Betarbet et al., 2000; Greenamyre et al., 2003; Valverde et al., 2008; Avila-Gómez et al., 2010; Swankar et al., 2012; Barreca et al., 2017; Heinz et al., 2017), sugiriendo una gran diversidad de resiliencia frente a este insulto por parte de las distintas líneas celulares.

Estudios anteriores han evaluado la eficacia de distintos factores de crecimiento sobre la neuroprotección en distintos modelos celulares, animales o pruebas clínicas, ya que estos

son importantes para la homeostasis, diferenciación y supervivencia de las células del SNC (Lee et al., 1997; Mattson et al., 1997; Falk et al., 2009; Avila-Gómez et al., 2010; Safi et al., 2012; Zachrisson et al., 2015). Factores de crecimiento como el BDNF y el bFGF han demostrado proteger las neuronas contra la excitotoxicidad a través de la expresión aumentada de enzimas antioxidantes tales como Mn-SOD y glutatión reductasa (Lee et al., 1997). Además, estudios previos han demostrado que las diferentes isoformas del PDGF pueden proteger a las células neuronales contra diferentes insultos como H₂O₂, VIH TAT toxina y 6-OHDA (Tang et al., 2010; Zhu et al., 2009). A pesar de que se han realizado numerosos estudios sobre la protección neuronal inducida por estos compuestos, son muy pocas las investigaciones realizadas sobre los mecanismos protectores de factores de crecimiento en células no neuronales como los astrocitos (Swankar et al., 2012; Cabezas et al., 2015; Amri et al., 2017). En el presente trabajo evaluamos los efectos del PDGF-BB en las líneas celulares T98G y HEK NF- κ B / 293 / GFP-LucTM, las cuales expresan receptores para PDGF (Fatatis y Miller, 1999; Potapova et al., 1996; Yu et al., 2001). En este aspecto se ha demostrado previamente que la línea celular T98G tiene una expresión más alta de PDGFR β que PDGFR α (Fatatis y Miller, 1999; Potapova et al., 1996; Yu et al., 2001), lo que sugiere que el PDGF-BB tiene un efecto importante en esta línea celular al activar principalmente por PDGFR β . Por su parte en la línea HEK se han observado respuestas oscilatorias de calcio tras estimulación con PDGF-BB (Fatatis y Miller, 1999).

Nuestros resultados mostraron que el pretratamiento (PDGF + Rotenona) con PDGF-BB ejercía una recuperación de alrededor del 39% sobre la viabilidad de las células tratadas con rotenona a 24h (Figura 11) al igual que una disminución significativa en la absorción de IP (Figura 12B) y la fragmentación nuclear determinada por Hoescht (Figura 13B), los cuales son parámetros importantes en el buen funcionamiento de la célula y la inducción de apoptosis (Ormerod et al., 1993; Cain, et al., 1996). Igualmente el PDGF-BB eliminó el efecto ejercido por la rotenona sobre la disminución del área celular (Figura 13A), el cual ha sido utilizado con anterioridad como un indicativo morfológico de daño celular apoptótico, ejercido por la rotenona en otros modelos celulares (Wang et al., 2002; Hou et al., 2015).

Posteriormente evaluamos los efectos del PDGF-BB sobre las proteínas del citoesqueleto implicadas en la activación astrocitaria, que incluye la regulación de moléculas como GFAP, vimentina y RhoA (Guasch et al., 2003; Brabeck et al., 2004; Sofroniew, 2009; Leung et al., 2010). El proceso de activación astrocitaria puede ser desencadenado por hipoxia, privación de glucosa, péptido β -amiloide y aumento de la producción de ROS durante las patologías cerebrales (Sofroniew y Vinters, 2010). Nuestros resultados mostraron que la rotenona incrementaba significativamente la expresión de GFAP, Vimentina y RhoA, mientras que el pretratamiento con PDGF-BB disminuía estos efectos (Figura 14), lo que sugiere la importancia de PDGF-BB en la reducción de la reactividad astrocitaria inducida por ERO. En este aspecto, se ha demostrado que la rotenona puede inducir un fenotipo de activación astrocitaria caracterizado por el incremento en la expresión de GFAP seguido por muerte celular apoptótica en la línea celular C6 de astrocitos de rata (Swankar et al., 2012). Además, se ha demostrado que tanto Rac1 como RhoA de la familia GTPasas de Ras median la formación de procesos en cultivos de astrocitos hipocampales de rata (Kalman et al., 1999), sugiriendo la importancia de estas proteínas para la morfología astrocitaria. Por otra parte, se ha demostrado que el PDGF-BB puede activar mecanismos implicados en la modificación del citoesqueleto y la migración celular, incluyendo el desarrollo del SNC (Hedberg, et al., 1993; Ruusala et al., 1998; Zohrabian et al., 2009; Funa y Sasahara, 2014). Estos procesos pueden ocurrir por la movilización del fosfatidil inositol 3,4,5, y la consecuente activación de la proteína rac GTPasa de la familia Rho, que está implicada en la modificación del citoesqueleto de actina y cambios morfológicos (Nobes et al., 1995; Li et al., 2010), lo que sugiere la importancia del PDGF-BB en la regulación morfológica frente al insulto por rotenona.

Efectos del PDGF-BB sobre las propiedades mitocondriales

Las mitocondrias son organelos críticos para la supervivencia celular y el desarrollo normal, ya que proporcionan energía a la célula, son esenciales en la producción de ERO y

los principales reguladores de la muerte apoptótica (Simpkins et al., 2010). Por otra parte, el mantenimiento de las propiedades mitocondriales en las neuronas y los astrocitos es de importancia central durante la lesión cerebral y la neurodegeneración (Greenpeace et al., 2010; Barreto et al., 2011). Además, se ha observado que el deterioro de las funciones mitocondriales astrocíticas, como la disminución de la producción de ATP o el $\Delta\psi_m$, aumenta el daño neuronal en los modelos de cocultivo (Cao et al., 2007; Voloboueba et al., 2007; Barreto et al., 2011), lo que sugiere la importancia del mantenimiento de las mitocondrias astrocitarias para la neuroprotección. Sin embargo, pocos estudios han demostrado la importancia del PDGF-BB y otros factores de crecimiento en la regulación mitocondrial. El presente estudio demostró que el pretratamiento con PDGF-BB redujo la producción de superóxido y peróxido inducida por rotenona en células T98G cuantificadas por DHE y DCFA-DA (Figura 15). Igualmente, se examinó el efecto de la rotenona y PDGF-BB sobre la peroxidación de lípidos, modificaciones de proteínas por peroxinitrito y daños oxidativos sobre ácidos nucleicos (Figura 16). La rotenona indujo un aumento significativo en la producción de estas ERO de manera similar a lo que había sido reportado por estudios anteriores (Betarbet et al., 2000; Bashkatova et al., 2004; Avila-Gómez et al., 2010; Greenamyre et al., 2010). Por otra parte nuestros resultados sugieren que el PDGF-BB disminuyó los efectos de la rotenona en la producción de ERO (Figuras 15 y 16). Estudios anteriores en modelos neuronales también han demostrado que 24 horas de pretratamiento con PDGF-BB ejercen una protección significativa contra diferentes insultos como el peróxido de hidrógeno, la privación de glucosa y la muerte por excitotoxicidad en neuronas cultivadas (Cheng y Mattson 1995; Tseng y Dichter 2005; Zheng et al., 2010). Por ejemplo, ha sido demostrado que el acondicionamiento con PDGF-BB inducía la fosforilación de PDGFR β , seguido por una activación de efectores downstream como PI3K / AKT y MAPK, el aumento de enzimas antioxidantes como catalasa, glutatión peroxidasa y GSH y un aumento de la expresión de genes antiapoptóticos como Bcl-xL y Bax.

El mantenimiento del $\Delta\psi_m$ es también esencial para la supervivencia celular y la producción de ATP, y su despolarización se ha visto asociada con procesos patológicos incluyendo la EP o la privación de glucosa, de manera similar a lo observado durante el

insulto con rotenona (Avila-Rodríguez et al., 2014; Barreto et al., 2011; Greenamyre et al., 2010; Perier y Vila, 2012). Nuestros hallazgos también indicaron que el PDGF-BB prevenía la despolarización del $\Delta\psi_m$ frente al insulto por rotenona en el modelo astrocitario (Figura 17A). De manera similar, en estudios anteriores de nuestro grupo de investigación, se mostró que el medio condicionado mesenquimal podía proteger el $\Delta\psi_m$, en un modelo de privación de glucosa en células astrocitarias T98G, sugiriendo que los factores de crecimiento pueden proteger el funcionamiento mitocondrial durante insultos oxidativos (Baez et al., 2017). Por último, Avila-Gómez y cols. (2010) demostraron que el pretratamiento con IGF-I durante 24 horas protegía los linfocitos contra la rotenona mediante la activación de PI3K / Akt / β -catenina, la regulación negativa de la p53 y el mantenimiento del potencial mitocondrial, lo que sugiere una posible interacción con la vía PI3K / AKT y la protección de la función mitocondrial. Es posible que un mecanismo similar pueda jugar un papel en la protección observada de $\Delta\psi_m$ por PDGF-BB en nuestros hallazgos. Sin embargo, otros experimentos son necesarios para abordar este punto.

Igualmente, nuestros resultados por NAO (Figura 17B) demostraron que el PDGF-BB protegió las células T98G contra la pérdida de masa mitocondrial inducida por rotenona. La masa mitocondrial es un indicativo del buen funcionamiento mitocondrial, tanto en cultivos primarios como en líneas celulares (Puleston et al., 2015). Previamente, se ha observado que la coenzima Q10 (CoQ₁₀), aumenta la masa mitocondrial en astrocitos de nervio óptico de rata durante insultos oxidativos lo cual produce un incremento en su función bioenergética (Noh et al., 2013). En este aspecto, es importante resaltar que varios estudios han sugerido que las alteraciones en la morfología mitocondrial y el equilibrio bioenergético están asociados a enfermedades como la diabetes tipo 2, las enfermedades de Huntington y EP, lo que demuestra la importancia de la preservación mitocondrial en el desarrollo de neuropatologías (Arduino et al., 2011; 2013, Perier y Vila, 2012)

Nuestros resultados también demostraron que el PDGF-BB ejerce una protección sobre ultraestructura mitocondrial contra el daño oxidativo por rotenona (Figura 18). En este aspecto, se ha mostrado que los astrocitos corticales tratados con rotenona (25 μ M)

disminuían la longitud mitocondrial y aumentado la concentración mitocondrial de Ca^{2+} y ERO (Deheshi et al., 2015). Por otro lado, el PDGF-BB previene estos efectos dañinos, lo que sugiere que este factor de crecimiento mantiene la organización ultraestructural de la mitocondria. De manera similar, un estudio previo de Gossiau y colaboradores (2001) mostró que el PDGF-AB aumentó el volumen y la superficie de las crestas mitocondriales en los fibroblastos lesionados determinados por microscopía electrónica, lo que sugiere un efecto del PDGF-AB sobre la preservación de estos parámetros.

Esta protección de la ultraestructura mitocondrial mediada por el PDGF-BB, refuerza los resultados anteriores referentes al mantenimiento del $\Delta\psi_m$ y la masa mitocondrial por parte de este factor de crecimiento. De manera similar, en un estudio previo (Wiedemann et al., 2006) se observó que una forma truncada del receptor TrkB del BDNF co-localiza con mitocondrias en astrocitos humanos y de rata, lo que sugiere que el BDNF tiene funciones protectoras en la mitocondria (Wiedemann et al., 2006). Es posible que otros factores de crecimiento como el PDGF-BB también posean una interacción directa sobre la mitocondria, si bien son necesarios más experimentos al respecto.

Efectos del PDGF-BB y de la rotenona sobre la modulación de las concentraciones de calcio intracelular

La regulación de las concentraciones del calcio intracelular es de importancia fundamental para el metabolismo astrocitario (Aguilhon et al., 2008; Volterra et al., 2014; Deheshi et al., 2015; Bazargani y Attwell, 2016). En este aspecto, la liberación de gliotransmisores como glutamato, ATP, D-serina y GABA es dependiente de las fluctuaciones de calcio intracelular astrocitario (Volterra et al., 2014; Bazargani y Attwell, 2016). Otros procesos astrocitarios en los que participa el calcio, incluyen el transporte de Glutamato y GABA, mediados por canales TRPA1 (Transient receptor potential ankyrin 1), liberación de iones Cl^- y K^+ y la modulación de la plasticidad y transmisión sináptica (Verkhratsky y Kirchhoff, 2007; Volterra et al., 2014; Bazargani y Attwell; 2016). Igualmente el calcio controla la señalización apoptótica en distintos tipos celulares incluyendo los astrocitos a través de los cambios de su concentración intracelular en organelos como la mitocondria y

el RE (Pinton et al., 2008), por lo que la desregulación en la concentración de esta especie iónica puede conllevar la muerte celular, tras lesiones o insultos como la sobreproducción de ERO (Pinton et al., 2008; Swankar et al., 2012).

De la misma forma, se ha observado que las concentraciones de calcio intracelular se encuentran desreguladas en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, Esclerosis lateral amiotrófica (ALS), Ataxias cerebrospinales y EP (Bezprozvanny, 2009). En este aspecto varios estudios han mostrado cambios en las concentraciones de calcio en neuronas dependientes de la edad tales como: la reducción de calcio citosólico, activación de calcineurona y calpainas, incrementos en liberación de Ca^{2+} de depósitos intracelulares a través de receptores inositol (1,4,5)-trifosfato (InsP3R) y receptores de rianodina e incrementos en la frecuencia basal para la inducción de potenciación de largos tiempos (LTP). Igualmente, en enfermedades como la EP, se ha encontrado que la acumulación de α -sinucleína, puede generar porosidades en membranas lípidas diseñadas experimentalmente e inducir la entrada desregulada de calcio en las neuronas (Bezprozvanny, 2009; Danzer et al., 2009).

En nuestros resultados observamos que efectivamente la rotenona incrementaba las concentraciones de calcio intracelular en citoplasma, retículo endoplasmático y mitocondria (Figura 19). En concordancia con nuestros resultados, estudios anteriores han mostrado que la rotenona incrementa los niveles de calcio en células neuronales, junto con la expresión de calmodulina kinasa 2 (CAMKII), caspasa 3 y la inducción de apoptosis, lo que podría sugerir un importante papel en la regulación de la homeostasis y muerte celular por parte de la rotenona (Wang y Xu, 2005; Swarnkar et al., 2012). Por su parte el pretratamiento con PDGF-BB generó una disminución significativa en las concentraciones de calcio citoplásmico y de retículo endoplasmático (Figura 19A y 19C). Es posible que la regulación de calcio intracelular contribuya a la supervivencia de las células astrocitarias tratadas con rotenona, ya que en astrocitos se ha observado que la deficiencia energética durante procesos patológicos se encuentra asociada a incrementos en las concentraciones del calcio intracelular junto con la pérdida del $\Delta\psi_m$ y la producción excesiva de ERO

(Wang et al., 2015). Es interesante notar que diversos estudios han señalado la regulación del calcio por parte de PDGF-BB en eventos como proliferación celular, diferenciación de oligodendrocitos, fosforilación de AKT y otras vías de señalización, regulación de canales dependientes de voltaje y fisión mitocondrial en neuronas y células vasculares (Hart et al., 1989; Powis et al., 1990; Ridefelt et al., 1995; Pinzani, 2002; Peng et al., 2012; Farrer et al., 2013). Sin embargo, son pocos los estudios sobre los efectos que pudiera tener este factor de crecimiento sobre el metabolismo del calcio en astrocitos. Al respecto, Wang y colaboradores (2010b) mostraron que la activación de Ca^{2+} y CAMKII por parte de ácido lipoteicóico (LTA) causaba la activación del receptor $\text{PDGFR}\beta$, junto con la vía PI3K/AKT-JNK en procesos de migración astrocitaria frente a insultos bacterianos en células astrocitarias de rata (RBA-1).

Igualmente, nuestros resultados mostraron un incremento en la expresión de la proteína GRP78 por parte del PDGF-BB (Figura 19D). La proteína de choque térmico (Hsp) GRP78/Bip posee un gran número de funciones en neuroprotección, incluyendo la regulación del calcio intracelular, modulación del estrés de retículo endoplasmático, y supervivencia celular (Ouyang et al., 2011; Avila et al., 2013). Al respecto se ha sugerido que esta proteína es importante en la protección astrocitaria tras eventos isquémicos, ya que reduce el flujo de calcio entre el RE y la mitocondria, en cultivos primarios de astrocitos de ratón; además de preservar el $\Delta\psi_m$, reducir la producción de ERO y mantener la respiración celular (Ouyang et al., 2011), por lo que puede a su vez incrementar la supervivencia astrocitaria durante eventos de lesión. Se ha sugerido que el factor de crecimiento IGF-I regula la expresión de esta proteína en fibroblastos embrionarios de ratón a través de la vía PI3K/AKT/MTORC1 en procesos regulatorios del RE (Pfaffenbach et al., 2012). Es posible que el PDGF-BB pueda regular la expresión de GRP78 por un mecanismo similar en nuestro modelo astrocitario, pero son necesarios nuevos experimentos para determinar los efectos del PDGF-BB sobre esta proteína. Nuestros resultados también sugieren que el PDGF-BB incrementa la expresión de esta proteína (Figura 19D), lo cual podría relacionarse con la disminución observada del calcio de RE determinada por Mag-Fura-2-AM. Finalmente, es posible que el PDGF-BB también pueda regular las concentraciones de calcio a través de incrementos de los niveles de expresión en

la neuroglobina, la cual se ha sugerido podría regular la liberación de calcio del RE por inhibición de canales de calcio regulados por IP₃ (Inositol 1,4,5-trifosfato) en el RE (Fago et al., 2008; Brittain et al., 2012), sin embargo sería necesario realizar experimentos adicionales de silenciamiento de la neuroglobina para determinar los efectos de esta proteína sobre cambios de la concentración de calcio intracelular.

Proteínas downstream activadas por PDGF durante el insulto oxidativo con rotenona

Como se mencionó en la parte introductoria, gran número de vías de señalización son activadas por el PDGF-BB tras la unión al receptor PDGFR β incluyendo MAPK, PI3K-AKT, PLC- γ , JAK STAT y JNK (Romashkova y Makarov, 1999; Andrae, 2008; Wang et al., 2010; Zheng et al., 2010). Nuestros resultados demostraron que tanto el PDGF-BB como el pretratamiento con ese factor de crecimiento aumentaron la fosforilación de AKT y por lo tanto la activación de la vía de señalización PI3K / AKT (Figura 20A), la cuál es importante en la proliferación, supervivencia y defensa antioxidante (Andrae, 2008; de Oliveira et al., 2015). Este hallazgo sugiere que el PDGF-BB activa la supervivencia y las vías antioxidantes contra el daño causado por rotenona mediado por PI3K / AKT. En este aspecto tanto el PDGF-BB como otros factores de crecimiento como bFGF y EGF han mostrado que regulan positivamente la expresión de enzimas antioxidantes como SOD2, Catalasa, peroxidasa y GPx a través de PI3K / AKT (Cheng y Mattson, 1995; Koken et al., 2006; Na et al., 2008; Zheng et al., 2010; de Oliveira et al., 2015). Por otro lado, el tratamiento con rotenona disminuyó la activación de AKT en nuestro modelo astrocítico (Figura 20A). Anteriormente se demostró que las mutaciones en la proteína reguladora mitocondrial PINK1 (PTK inducida por quinasa putativa1) redujo la fosforilación de AKT y el $\Delta\psi_m$ en astrocitos de ratón, lo que sugiere que una función alterada de AKT podría estar relacionada con daño mitocondrial (Choi et al., 2013). Además, se demostró que el tratamiento con rotenona disminuía la expresión de GPx1 en mayor medida que los otros tratamientos, mientras que el PDGF-BB mantenía la expresión cerca de los niveles control (Figura 20D). Es importante señalar que el pretratamiento con PDGF-BB (PDGF + Rotenona) protegió parcialmente la disminución en la expresión de GPx1 mediada por

rotenona, lo que sugiere que el PDGF-BB tuvo un efecto en la expresión de esta enzima frente al daño oxidativo mediado por la rotenona. Igualmente, un estudio previo de nuestro grupo había mostrado que el daño oxidativo ejercido por privación de glucosa disminuyó la expresión de GPx1 en un modelo astrocítico (Baez et al., 2017), lo que sugiere que el daño oxidativo por rotenona podría afectar la disponibilidad de esta enzima por un mecanismo similar. Por otra parte, fue interesante encontrar que ni la rotenona ni el PDGF-BB incrementaron la expresión de la enzima catalasa en nuestras células T98G (Figura 20E). Un estudio anterior en fracciones mitocondriales de células nigroestriales de rata había mostrado que dosis de rotenona de 100 μ M inducía un incremento en la actividad de catalasa (Saravanan et al., 2006), si bien los modelos y las concentraciones utilizadas son diferentes a las nuestras.

Otro conjunto de resultados se centró en los cambios de expresión y translocación del NF- κ B en nuestro modelo astrocitario. Nuestros resultados por inmunocitoquímica sugirieron que el PDGF-BB aumentaba la translocación nuclear de las subunidades p50 y p65 del NF- κ B (Figuras 21 y 22) mientras que la rotenona no incrementaba este efecto, sugiriendo que el PDGF-BB podría ejercer sus funciones en parte a través de NF- κ B. Este factor de transcripción posee múltiples funciones en el sistema nervioso, incluyendo el crecimiento axónico, la supervivencia celular, la protección contra el estrés oxidativo, la producción de SOD2, la expresión genética de citocinas y factores de crecimiento y la regulación de procesos inflamatorios. (Mattson et al., 2000; Maehara et al., 2001; Mattson, 2005; Kalschmidt y Kalschmidt, 2009). En este aspecto, se ha demostrado que los efectos del NF- κ B son fuertemente dependientes de condiciones tales como el tipo de célula, el efecto de la estimulación o el contexto celular (Mattson y Camandola, 2001; Mincheva-Tasheva y Soler, 2013). Previamente se describió que el EGF, el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y el PDGF activan NF- κ B en diferentes procesos celulares, con efectos variados (Romashkova y Makarov, 1999; Habib et al., 2000; Zelenai et al., 2000; Muller et al., 2002). Por ejemplo, se informó que PDGF-BB activaba NF- κ B a través de la vía de señalización Ras / PI3K / AKT durante procesos de supervivencia en fibroblastos primarios (Romashkova y Makarov, 1999). Además, se demostró que el EGF activaba al NF- κ B en astrocitos corticales de ratas con el fin de aumentar la expresión del transportador de

glutamato (GLT-1, Zelenai et al., 2000), que es de gran importancia para la eliminación de glutamato astrocítico. También es importante mencionar que algunos compuestos como el flavonol quercetina y la rotenona, han mostrado la capacidad de bloquear la activación de NF- κ B en la línea celular de fibrosarcoma L929. (Schulze-Osthoff et al., 1993; Epinat y Gilmore, 1999) probablemente debido a su interferencia con el sistema de transporte de electrones mitocondrial (Schulze-Osthoff et al., 1993). Es posible que nuestro modelo astrocítico presente un mecanismo similar con respecto a la activación de NF- κ B. Sin embargo, son necesarios más experimentos para esclarecer esta cuestión.

Junto con el PDGF-BB, es bastante probable que otros factores de transcripción sean activados durante la protección oxidativa frente a la rotenona. Entre estos podrían encontrarse STAT 1 y 3 los cuales incrementan su expresión durante estrés oxidativo y se han visto activados por PDGF-BB (Simon et al., 2002; Dikdan et al., 2004). Igualmente el factor de transcripción Nrf2 se ha estudiado como uno de los más importantes mecanismos de defensa contra el estrés oxidativo o electrofílico, especialmente durante procesos neurodegenerativos tanto en neuronas como astrocitos (Kraft et al., 2004; Nguyen et al., 2009), siendo activado también por el PDGF-BB (Ashino et al., 2013), en procesos vasculares. Es importante hacer notar que el Nrf2 también hace parte de las redes de señalización activadas por el modelo computacional desarrollado para el presente trabajo de investigación, y su activación incrementa el contenido antioxidante en el modelo. Sin embargo, es necesario realizar nuevos estudios experimentales, relacionados con la activación de otros factores de transcripción como STAT1, y Nrf2 por parte del PDGF-BB en el contexto de nuestro modelo astrocitario para verificar estos efectos.

Nuestros resultados también mostraron que el PDGF-BB, pero no la rotenona, incrementaba significativamente la expresión de Ngb1 (Figura 22C). La expresión y función de la neuroglobina (Ngb1) han sido objeto de varios estudios en neuronas y astrocitos (Emara et al., 2009; Chen et al., 2015; Avila-Rodriguez et al., 2016; Baez et al., 2016; Xie y Yang, 2016; Amri et al., 2017). Debido a sus múltiples funciones en la hipoxia, el transporte de oxígeno, la eliminación de ERO y la regulación mitocondrial (Brittain, 2012; Baez et al., 2016; Amri et al., 2017). En los astrocitos, se ha sugerido que la

neuroglobina puede influir en la homeostasis del oxígeno, y la protección contra el daño por peróxido de hidrógeno a través de la activación de AKT y la prevención de la activación de la caspasa 3 y la apoptosis (Amri et al., 2017). Se ha demostrado previamente que 20-100 ng / ml de VEGF estimuló la expresión de neuroglobina en cultivos cerebrocorticales neuronales de ratón mediante la activación del receptor VEGFR2 / Flk1 y posiblemente mediante la activación del factor de transcripción MAPK y HIF-1 α (Xie y Yang, 2016). Además, un trabajo reciente de nuestro grupo (Baez et al., 2017) también demostró que el medio condicionado de células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo humano (hMSCA-CM), el cual contiene una gran variedad de factores de crecimiento tales como bFGF, EGF BDNF Y NGF (Skalnikova, 2013) incrementó la expresión de Ngb1 en células T98G bajo privación de glucosa. Del mismo modo, diferentes estudios han reportado que el gen Ngb puede ser regulado por factores de transcripción HIF-1 α , SP1, SP3 y NF- κ B (Haines et al., 2012; Liu et al., 2012, 2013). Por lo tanto, es posible que el PDGF-BB incremente la expresión de Ngb1 mediante la activación de NF- κ B en nuestro modelo de estudio.

De manera interesante, nuestros resultados mostraron que el silenciamiento de Ngb1 disminuyó la protección del PDGF-BB observada contra la producción de ERO por y el mantenimiento de $\Delta\psi_m$ frente a rotenona, si bien no tuvo un efecto importante en la viabilidad celular (Figuras 23-26). Como se ha mencionado, Ngb1 y otras globinas relacionadas tienen funciones protectoras importantes incluyendo el transporte de oxígeno, la desintoxicación de ERO / ERN, la inhibición de la apoptosis y la regulación de las funciones mitocondriales (Brittain 2012; Acáz-Fonseca et al., 2015). En este aspecto, nuestros resultados sugieren que la Ngb1 podría ser una proteína importante para los mecanismos de protección regulados por el PDGF-BB en nuestro modelo astrocitario, lo cual es congruente con lo observado en estudios anteriores, donde se muestra que el silenciamiento de la Ngb1 tiene efectos negativos sobre el mantenimiento del $\Delta\psi_m$ y la protección frente a insultos oxidativos en células astrocitarias y neuronas (Ye et al., 2009; Avila-Rodríguez et al., 2016; Baez et al., 2017). Sin embargo, son necesarios experimentos adicionales para desentrañar esta cuestión en su totalidad.

Modelo Computacional de la protección del PDGF-BB contra rotenona en las funciones mitocondriales

El uso de modelos computacionales cinéticos ha permitido predecir el comportamiento de interacciones complejas en el tiempo, como las que ocurren en las células durante procesos patológicos diversos, incluyendo la senescencia mitocondrial, la regulación de producción de ERO, o los mecanismos de señalización de factores de crecimiento (Orton et al., 2009; Dalle Pezze et al., 2014; Ledwitch et al., 2016, Kent et al., 2012, Ignatenko et al., 2014, Khandekar et al., 2014). Varios de estos modelos, a pesar de poseer un número reducido de reacciones y ecuaciones, han predicho resultados de importancia, que pueden ser validados por métodos experimentales básicos, como microscopia de fluorescencia, WB, citometría de flujo y ensayos farmacológicos sencillos (Orton et al., 2009; Dalle Pezze et al., 2014; Ledwitch et al., 2016).

En comparación con otros modelos computacionales mitocondriales o de vías de señalización es relevante señalar en primer lugar el uso de otras plataformas computacionales distintas a COPASI como son MATLAB, MatCont, GENESIS/Kinetikit simulator, entre otras (Nakano et al., 2010; Dalle Pezze et al., 2014; Yuan et al., 2011), con parámetros y estímulos distintos a los utilizados en el presente modelo. Modelos detallados de los complejos mitocondriales o de la cadena de transporte de electrones, han incluido un mayor número de moléculas intermediarias en el proceso, varios estados fisiológicos de acuerdo a distintos sustratos, junto con parámetros biofísicos, basados en estudios experimentales (Cortassa et al., 2003; Gauthier et al. 2013; Kembro et al., 2013). Por otra parte el modelo de Yuan y colaboradores (2011), se trataba de un modelo cinético y probabilístico de la regulación de la señalización activada por PDGFR junto a proteínas de anclaje como SHP2, downstream como PI3K, PDK y cCbl, en el cual no se investigan efectos postraduccionales o metabólicos, que eran de interés en nuestro proyecto de investigación.

Si bien nuestro modelo mitocondrial es limitado en cuanto a sus predicciones, presenta novedades importantes como es la integración de módulos de señalización como los del PDGF-BB y la neuroglobina, junto a módulos de reacciones mitocondriales, en los cuales la señalización mediada por estas moléculas afectaba algunas reacciones mitocondriales del modelo, como la producción de ERO y la modulación del $\Delta\psi_m$. En contraste, el modelo matemático de Ignatenko et al., 2014 solo exploraba los efectos regulatorios sobre la producción de ERO, centrándose principalmente en la integración de el módulo Nrf2/Keap de respuesta antioxidante y la activación de Bclxl por parte de NF- κ B. Nuestro modelo, además de integrar los mecanismos de activación del NF- κ B a la vía de señalización del PDGF-BB (Romashkova y Makarov, 1999), incluye otros mecanismos de protección (como la neuroglobina y su regulación por RNAi), junto a la modulación ejercida por la rotenona sobre la funcionalidad mitocondrial y consecuente producción de ERO. Igualmente, las nuevas reacciones de nuestro modelo, tuvieron un soporte experimental en los resultados obtenidos en la línea celular T98G (Cabezas et al., 2015; Cabezas et al., 2017), junto con una validación parcial de las predicciones, en la línea HEK NF- κ B / 293 / GFP-LucTM.

Así mismo, resulta interesante la predicción computacional relativa a los cambios en la concentración de mitocondrias funcionales. En este resultado se observa que la rotenona ejerce un fuerte daño sobre las mitocondrias funcionales (Figura 31) acompañado por un fuerte incremento en la producción de ERO (Figura 29) y disminución en el $\Delta\psi_m$ (Figura 30). De manera similar los resultados experimentales por microscopía electrónica también mostraron que la rotenona a 24h ejercía un fuerte daño en la ultraestructura de las células T98G, al incrementar los cuerpos autofágicos y las vacuolas citosólicas, disminuyendo el área mitodondrial y afectando fuertemente la estructura de la membrana y el material electrodenso de las mitocondrias. Estos efectos se vieron parcialmente contrarrestados por el pretratamiento con PDGF-BB tal como predice el modelo computacional y los resultados experimentales. Por último, nuestros resultados relativos a la modulación de las mitocondrias funcionales y mitocondrias no funcionales, fueron similares a los reportados por Dalle Pezze y colaboradores (2014), relativos a la biogénesis y mitofagia en fibroblastos, en el cual, distintos insultos (irradiación de ADN e inhibición de mTOR)

afectaban la capacidad celular de reconversión mitocondrial, entre mitocondrias dañadas y mitocondrias funcionales.

El modelo computacional también predijo que los efectos mitocondriales eran parcialmente dependientes de la activación de neuroglobina por parte del PDGF-BB (Figuras 32 y 33) y que al realizar un silenciamiento de esta proteína en nuestro modelo, disminuía el $\Delta\psi_m$ incluso bajo estimulación con PDGF, lo cual estuvo en concordancia con nuestros resultados experimentales (Figura 24).

Los análisis de sensibilidad son utilizados para medir el impacto de cada parámetro del modelo sobre sus variables y establecer la robustez de el modelo (Kent et al., 2013). Los análisis de sensibilidad local realizados sobre algunos de los parámetros del modelo, mostraron las principales perturbaciones ejercidas por algunas especies de interés de nuestro modelo como el PDGF, Rotenona y Neuroglobina sobre varias de las reacciones del modelo en las que estaban participando. Igualmente al realizar variaciones discretas sobre variables como la concentración de RNAi de la neuroglobina, se observaron cambios proporcionales en variables como el $\Delta\psi_m$. Sin embargo en el futuro será necesario realizar otros tipos de análisis, como control metabólico (*metabolic control analysis*) u optimizaciones de las variables, para garantizar la resiliencia del modelo.

La validación parcial de este modelo en células HEK NF- κ B / 293 / GFP-LucTM (Figuras 34 a 36), confirmó algunos de los efectos observados por parte del PDGF-BB en las células T98G (activación de NF- κ B, mantenimiento del $\Delta\psi_m$ frente al insulto por rotenona y protección de la viabilidad frente a este insulto) sugiriendo que los efectos del PDGF-BB observados en la línea astrocitaria pueden ser extrapolados a otros modelos celulares como el caso de la línea HEK, la cual ha sido utilizada previamente como un modelo neuronal, debido a que posee características como propagación de virus neurotrópicos y proteínas como TAU, sinaptogénesis, respuesta a agonistas implicados en señalización neuronal y canales específicos voltaje dependientes (Shaw et al., 2002; Calafate et al., 2015; Stepanenko et al., 2015). Resultó interesante observar, que tanto en la línea T98G, la línea HEK y el modelo computacional, el PDGF-BB pero no la rotenona, incrementaba la

activación del NF- κ B, lo que sugiere la gran relevancia que posee este factor de transcripción en las funciones mediadas por PDGF-BB.

En conclusión, nuestros resultados demostraron los efectos protectores de PDGF-BB en el modelo astrocitario de células T98G contra el estrés oxidativo inducido por rotenona. Igualmente se demostró tanto por métodos experimentales como computacionales que el PDGF-BB mejoró la protección mitocondrial a nivel funcional y ultraestructural, mediante la activación de proteínas como la neuroglobina, la GPx1 y el NF- κ B, sugiriendo que las vías de señalización del PDGF-BB pueden tener un efecto sobre la preservación de este organelo. Igualmente, el PDGF-BB, estaría ejerciendo una regulación del calcio intracelular en el citoplasma y el RE, posiblemente a través de un incremento en la expresión de la chaperona GRP78/Bip. Estos resultados se resumen en la Figura 37. En el futuro será necesario realizar experimentos adicionales en cultivos primarios astrocitarios o en modelos *in vivo* para confirmar los hallazgos obtenidos en este trabajo. Por otra parte es importante establecer cuáles son las moléculas con las que interactúa la neuroglobina durante sus efectos de protección mitocondrial, y cuál sería el papel del PDGF-BB en estos aspectos.

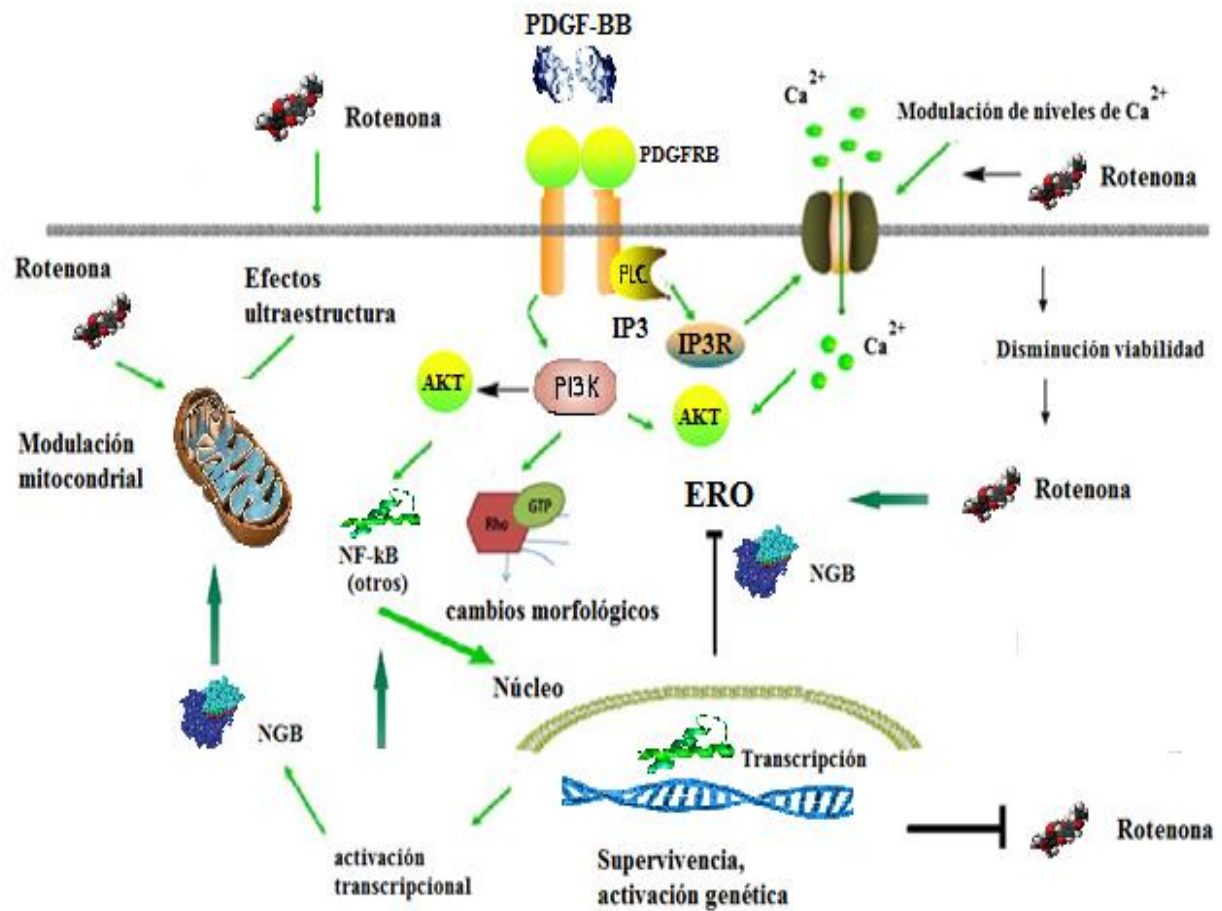


Figura 37. Modelo de los distintos mecanismos del PDGF-BB y la rotenona estudiados a lo largo de la presente investigación. El PDGF-BB disminuye los efectos dañinos de la rotenona en distintos niveles, incluyendo una disminución en la captación de calcio intracelular, disminución en la producción de ERO, modulación de cambios morfológicos, protección mitocondrial y activación de factores de transcripción como NF- κ B que activan la expresión de moléculas como la neuroglobina. Por su parte la Neuroglobina (NGB) ejerce procesos a nivel de la protección mitocondrial y oxidativa. (Modificado de Peng et al., 2012).

9. CONCLUSIONES

Con el desarrollo del presente estudio es posible concluir que se lograron los siguientes aportes al conocimiento:

1. Se comprobó que la rotenona ejerce múltiples efectos nocivos sobre parámetros esenciales para la supervivencia y el buen funcionamiento de las células astrocitarias T98G. Estos parámetros de concentración y tiempo para el insulto de la rotenona, sirvieron como base posterior para evaluar los efectos de protección por parte del PDGF-BB.
2. Nuestros resultados sugieren que el PDGF-BB posee efectos de protección mitocondrial a través del mantenimiento del $\Delta\psi_m$ y la reducción de las especies reactivas de oxígeno (ERO), lo cuál da como resultado un incremento en la viabilidad celular.
3. Igualmente se comprobó que los efectos protectores mediados por el PDGF-BB incluyen la modulación de los niveles de calcio intracelulares, especialmente en RE y citoplasma, lo que sugiere una interrelación entre varios de los componentes del sistema (calcio, ERO, $\Delta\psi_m$, proteínas etc) en los mecanismos de protección mediados por el PDGF-BB .
4. El mecanismo de acción del PDGF-BB parece estar mediado principalmente por la vía de señalización PI3K/AKT/NF- κ B, ya que el PDGF-BB, pero no la rotenona, tiene un efecto en la expresión y activación de estas proteínas en nuestro modelo de estudio.
5. Los resultados sugieren un papel importante de la proteína neuroglobina, la cual tiene efectos tanto antioxidantes como de modulación mitocondrial. Al parecer el PDGF-BB incrementa la expresión de esta proteína, lo cual explicaría en parte los efectos de protección mitocondrial por parte del PDGF-BB.

6. El principal hallazgo del presente estudio es la activación de neuroglobina por parte del PDGF-BB en el modelo astrocitario. Es posible que esta activación se produzca a través del factor de transcripción NF- κ B el cual estaría regulando la expresión de la neuroglobina, y ejerciendo un efecto principalmente protector en las funciones astrocitarias.

7. El modelo computacional fue una herramienta efectiva que permitió extrapolar las distintas interacciones entre el PDGF-BB, la rotenona y varios de los elementos del estudio en las células astrocitarias T98G, que fueron de interés para la evaluación de condiciones de protección celular en nuestros experimentos. Igualmente, este modelo fue parcialmente validado en una línea celular HEK, lo cual sugiere que tanto el PDGF-BB como la rotenona poseen efectos similares en distintos modelos celulares.

10. PERSPECTIVAS Y APLICACIONES

El presente trabajo ha generado un gran número de interrogantes que pueden ser respondidos mediante trabajos de investigación posteriores. Algunos de estos interrogantes incluyen:

-En un modelo de cocultivo astrocito-neurona, ¿Cómo se vería beneficiada la neurona gracias a la protección por parte del PDGF-BB?

-¿Cuáles genes podrían estar siendo activados por NF- κ B, tras la estimulación con el PDGF-BB, en el contexto de nuestro modelo astrocitario?

-¿El NF- κ B u otros factores de transcripción podrían estar interactuando directamente con la neuroglobina durante la protección mitocondrial?

-¿Qué otras moléculas estarían asociadas a los procesos de protección mitocondrial?

-¿Pueden otros ligandos del PDGF como el PDGF-CC o el PDGF-DD tener efectos de protección similares a los observados en este trabajo?

-¿Cuales serían los efectos potenciales del PDGF-BB y otros factores de crecimiento respecto a las acumulaciones patológicas de α -sinucleína o la producción de otras moléculas tales como citoquinas proinflamatorias?

-¿Por qué no hay activación de NF- κ B, por parte de la rotenona, tanto en T98G como en la línea celular HEK?

-¿Qué tan factible podría ser el uso de PDGF-BB u otros factores de crecimiento en la protección astrocitaria en modelos animales o estudios clínicos en humanos? ¿Son reproducibles estos resultados en un modelo animal?

-Resulta importante expandir el número de reacciones y especies del modelo computacional, para explorar los efectos de otros componentes moleculares y metabólicos en la regulación mitocondrial astrocitaria, como son el calcio o proteínas chaperonas, junto con un mayor número de moléculas de la vía de señalización PI3K/AKT. Por otra parte una validación experimental más refinada de los resultados computacionales puede servir para mejorar las predicciones del modelo y postular blancos terapéuticos de interés en enfermedades neurodegenerativas.

11. BIBLIOGRAFIA

Aberg, ND., Brywe, KG., J., Isgaard (2006). "Aspects of growth hormone and insulin-like growth factor-I related to neuroprotection, regeneration, and functional plasticity in the adult brain." *Scient. World J.* 6: 53–80.

Adelson, JD., Barreto, GE., Xu, L., Kim, T., Brott, BK., YB., Ouyang (2012). "Neuroprotection from stroke in the absence of MHCI or PirB." *Neuron* 73(6): 1100-1107.

Agulhon C, Petravicz J, McMullen AB, Sweger EJ, Minton SK, Taves SR, Casper KB, Fiacco TA, McCarthy KD (2008). "What is the role of astrocyte calcium in neurophysiology?" *Neuron* 59:932-46.

Ahmed, Z., Asi, Y. T., Lees, A. J., Revesz, T. & Holton, J. L (2013). "Identification and quantification of oligodendrocyte precursor cells in multiple system atrophy, progressive supranuclear palsy and Parkinson's disease." *Brain Pathol.* 23, 263-273.

Ahsan H (2013). "3-Nitrotyrosine: a biomarker of nitrogen free radical species modified proteins in systemic autoimmunogenic conditions." *Human Immunology.* 74(10):1392–1399. doi: 10.1016/j.humimm.2013.06.009

Allman ES, Rhodes JA (2004). "Mathematical models in biology, an introduction." Cambridge University Press.

Alves R., Antunes F., Salvador A. (2006). "Tools for kinetic modeling of biochemical networks." *Nat. Biotech.* 24, 667–672. 10.1038/nbt0606-667

Amri F, Ghouili I, Amri M, Carrier A, Masmoudi-Kouki O (2017). "Neuroglobin protects astroglial cells from hydrogen peroxide-induced oxidative stress and apoptotic cell death." *Journal of Neurochemistry.* doi:10.1111/jnc.13876.

Andrae, J., Gallini, R., C., Betsholtz (2008). "Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine." *Genes Dev.*22(10): 1276-1312.

Arismendi-Morillo G (2011). "Electron microscopy morphology of the mitochondrial network in gliomas and their vascular microenvironment." (*BBA-Bioenergetics* 1807, 602–608.

Arduino DM, Esteves AR, Silva DF, Martins-Branco D, Santos D, Pimentel DF, Cardoso SM. (2011). "Therapeutic intervention at cellular quality control systems in Alzheimer's and Parkinson's diseases." *Curr Pharm Des* 17:3446-3459 doi:BSP/CPD/E-Pub/000711

Arrázola MS, Silva-Alvarez C, Inestrosa NC (2015). "How the Wnt signaling pathway protects from neurodegeneration: the mitochondrial scenario." *Front Cell Neurosci.* 9:166.10.3389/fncel.2015.00166

Antao S.T., Duong T.T., Aran R., Witting P.K (2010). "Neuroglobin over-expression in cultured human neuronal cells protects against hydrogen peroxide insult via activating phosphoinositide-3 kinase and opening the mitochondrial K-ATP channel." *Antioxid. Redox. Signal.* 13:769–781. doi: 10.1089/ars.2009.2977.

Ashino, T., Yamamoto, M., Yoshida, T., S., Numazawa (2013). "Redox-sensitive transcription factor Nrf2 regulates vascular smooth muscle cell migration and neointimal hyperplasia." *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 33(4):760-768.

Aung, H. H., Tsoukalas, A., Rutledge, J. C., and Tagkopoulos, I. (2014) . "A systems biology analysis of brain microvascular endothelial cell lipotoxicity." *BMC Syst. Biol.* 8:80. doi: 10.1186/1752-0509-8-80

Avila-Gomez, IC., Velez-Pardo, C., M., Jimenez-Del-Rio (2010). "Effects of insulin-like growth factor-1 on rotenone-induced apoptosis in human lymphocyte cells," *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology.*106 (1): 53–61.

Avila Rodriguez M, Garcia-Segura LM, Cabezas R, Torrente D, Capani F, Gonzalez J, Barreto GE (2014). "Tibolone protects T98G cells from glucose deprivation." *J Steroid Biochem Mol Biol* 144PB:294-303 doi:S0960-0760(14)00133-210.1016/j.jsbmb.2014.07.009

Avila-Rodriguez M., Garcia-Segura L. M., Hidalgo-Ianussa O., Baez E., Gonzalez J. and Barreto G. E. (2016). "Tibolone protects astrocytic cells from glucose deprivation through a mechanism involving estrogen receptor beta and the upregulation of neuroglobin expression." *Mol. Cell. Endocrinol.*433,35–46

Baez E., Echeverria V., Cabezas R., Avila-Rodriguez M., Garcia-Segura L.M., Barreto G.E (2016) "Protection by Neuroglobin Expression in Brain Pathologies." *Front. Neurol.* 7:146. doi: 10.3389/fneur.2016.00146.

Baez-Jurado E, Vega GG, Aliev G, Tarasov VV, Esquinas P, Echeverria V, Barreto GE (2017). "Blockade of Neuroglobin Reduces Protection of Conditioned Medium from Human Mesenchymal Stem Cells in Human Astrocyte Model (T98G) Under a Scratch Assay." *Molecular Neurobiology*:1-16

Ball, SG., Shuttleworth, A., CM., York (2012). "Inhibition of platelet derived growth factor receptor signaling regulates Oct4 and Nanog expression, cell shape, and mesenchymal stem cell potency." *Stem Cells.*30(3): 548-560.

Bambrick, L., Kristian, T., G., Fiskum (2004). "Astrocyte mitochondrial mechanisms of ischemic brain injury and neuroprotection." *Neurochemical Research* 29(3): 601-608.

Bankhead P (2013). "Analyzing fluorescence microscopy images with ImageJ." Nikon Imaging Center. Heidelberg University, Queen's University Belfast,

Barkett M., Gilmore T. D (1999). "Control of apoptosis by Rel/NF- κ B transcription factors ." *Oncogene*. 18(49):6910–6924. doi: 10.1038/sj.onc.1203238

Barreca D, Currò M, Bellocco E, Ficarra S, Laganà G, Tellone E, Laura Giunta M, Visalli G, Caccamo D, Galtieri A, Ientile R (2017). "Neuroprotective effects of phloretin and its glycosylated derivative on rotenone-induced toxicity in human SH-SY5Y neuronal-like cells." *Biofactors*. doi: 10.1002/biof.1358.

Barreto GE, Gonzalez J, Torres Y, Morales L. (2011). "Astrocytic-neuronal crosstalk: implications for neuroprotection from brain injury." *Neurosci Res* 71:107-113 doi:S0168-0102(11)00160-X 10.1016/j.neures.2011.06.004

Bashkatova, V., Alam, M., Vanin, A., WJ., Schmidt (2004). "Chronic administration of rotenone increases levels of nitric oxide and lipid peroxidation products in rat brain." *Exp Neurol* 186(2):235-41.

Baydas, G., Ozer, M., Yasar, A., Kos, ST., M., Tuzcu (2006). "Melatonin prevents oxidative stress and inhibits reactive gliosis induced by hyperhomocysteinemia in rats." *Biochemistry (Mosc)*. 71.(Suppl 1): S91-S95.

Bazargani N. & Attwell D (2016). "Astrocyte calcium signaling: the third wave." *Nat. Neurosci*. 19, 182–189.

Becker SO, Caliendo M (2007) "Sensitivity analysis for average treatment effects." *The STATA Journal*, 7 (1): 71-83.

Berry C, La Vecchia C, Nicotera P. (2010). "Paraquat and Parkinson's disease." *Cell Death and Differentiation*; 17(7) 1115-1125.

Betarbet, R., Sherer, TB., MacKenzie, G., Garcia-Osuna, M., Panov, AV., JT., Greenamyre (2000). "Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease." *Nat Neurosci*3:1301–1316.

Bezprozvanny I (2009). Calcium signaling and neurodegenerative diseases. *Trends Mol Med*. 2009;15:89–100.

Bezzi, P.,A., Volterra (2011). "Astrocytes: powering memory." *Cell* 144(5): 644-645.

Board, R., GC., Jayson (2005) "Platelet-derived growth factor receptor (PDGFR): a target for anticancer therapeutics." *Drug Resist Updat*8:75-83.

Bové J, Prou D, Perier C, Przedborski S. (2005) "Toxin-induced models of Parkinson's disease." *NeuroRX: the journal of the American society for experimental Neurotherapeutics*; 2(3) 484–494

Brabeck C., Beschoner R., Conrad S., Mittelbronn M., Bekure K., Meyermann R., et al. . (2004). "Lesional expression of RhoA and RhoB following traumatic brain injury in humans." *J. Neurotrauma*21, 697–706. 10.1089/0897715041269597

Brittain T. (2012) "The anti-apoptotic role of neuroglobin." *Cells*. 20121:1133–1155. doi: 10.3390/cells1041133

Bronstein JM, Tagliati M, Alterman RL, Lozano AM, Volkmann J, Stefani A, et al., (2011) "Deep Brain Stimulation for Parkinson Disease An Expert Consensus and Review of Key Issues." *Arch Neurol*. 68(2):165–171. doi: 10.1001/archneurol.2010.260

Burgering, BM.,RH., Medema (2003). "Decisions on life and death: FOXO Forkhead transcription factors are in command when PKB/Akt is off duty." *J Leukoc Biol*.73(6): 689-701.

Burmester T, Hankeln T. (2009) "What is the function of neuroglobin?" *J Exp Biol*212:1423–8. doi:10.1242/jeb.000729

Bushong,EA., Martone, ME., Jones, YZ., MH., Ellisman (2002). "Protoplasmic astrocytes in CA1stratum radiatum occupy separate anatomical domains." *J Neurosci*. 22(1) 183-192.

Bryan, BA., Dennstedt, E., Mitchell, DC., Walshe, TE., Noma, K., Loureiro, R., Saint-Geniez, M., Campaigniac, JP., Liao, JK., PA., D'Amore (2010). "RhoA/ROCK signaling is essential for multiple aspects of VEGF-mediated angiogenesis." *FASEB J*.24(9):3186-3195.

Cabeza-Arvelaiz, Y., RH., Schiestl (2012). "Transcriptome analysis of a rotenone model of parkinsonism reveals complex I-tied and untied toxicity mechanisms common to neurodegenerative diseases." *PLoS One*7(9): e44700.

Cabezas, R., El-Bachá, R., González, J., G., Barreto (2012). "Mitochondrial functions in astrocytes: neuroprotective implications from oxidative damage by rotenone." *NeurosciRes*.74(2): 80-90.

Cabezas R, Avila M, Gonzalez J, El-Bacha RS, Baez E, Garcia-Segura LM, et al. (2014) "Astrocytic modulation of blood brain barrier: perspectives on Parkinson's disease." *Frontiers in cellular neuroscience*. 2014;8:211 Epub 2014/08/20. Doi

Cabezas R, Avila MF, Gonzalez J, El-Bacha RS, Barreto GE (2015). "PDGF-BB protects mitochondria from rotenone in T98G cells." *Neurotox Res*, 27:355–67.10.1007/s12640-014-9509-5

Cabezas R, Vega-Vela NE, González-Sanmiguel J, González J, Esquinas P, Echeverria V, Barreto GE (2017). "PDGF-BB Preserves Mitochondrial Morphology, Attenuates ROS Production, and Upregulates Neuroglobin in an Astrocytic Model Under Rotenone Insult." *Mol Neurobiol*. doi: 10.1007/s12035-017-0567-6.

Cain, K., S. H. Inayat-Hussain, C. Couet, H. M. Qin and F. A. Oberhammer (1996). "A novel method for detecting apoptosis shows that hepatocytes undergo a time dependent increase in DNA cleavage and chromatin condensation which is augmented after TGF-beta 1 treatment." *Cytometry* 23(4): 312-321.

Calafate S., Buist A., Miskiewicz K., Vijayan V., Daneels G., de Strooper B., de Wit J., Verstreken P., and Moechars D (2015). "Synaptic contacts enhance cell-to-cell Tau pathology propagation." *Cell Rep*. 11, 1176–1183.

Cakir, T., Alsan, S., Saybaşili, H., Akin, A., and Ulgen, K. O (2007). "Reconstruction and flux analysis of coupling between metabolic pathways of astrocytes and neurons: application to cerebral hypoxia." *Theor. Biol. Med. Model*. 4:48. doi: 10.1186/1742-4682-4-48

Cao Q, Wei LR, Lu LL, Zhao CL, Zhao HY, Yang H (2007). "Astrocytes protect MN9D neuronal cells against rotenone-induced oxidative stress by a glutathione-dependent mechanism." *Sheng Li Xue Bao* 59:253-259

Castro-Toro A, Buritica OF (2014). "Enfermedad de parkinson: criterios diagnósticos, factores de riesgo y de progresión y escalas de valoración del estadio clínico." *Acta Neurol Colomb*. 30(4): 300-306.

Chaturvedi RK, Beal MF (2013). "Mitochondria targeted therapeutic approaches in Parkinson's and Huntington's diseases." *Mol Cell Neurosci* 55:101-114 doi:S1044-7431(12)00210-210.1016/j.mcn.2012.11.011

Chen, Y., RA., Swanson (2003). "Astrocytes and brain injury." *J. Cereb. Blood Flow Metab*. 23: 137–149.

Chen L. W., Yung K. L., Chan Y. S. (2005). "Reactive astrocytes as potential manipulation targets in novel cell replacement therapy of Parkinson's disease." *Curr. Drug Targets* 6, 821–833. 10.2174/138945005774574506

Chen, YY., Chen, G., Fan, Z., Luo, J., Z., Ke (2008). "GSK3beta and endoplasmic reticul

um stress mediate rotenone-induced death of SK-N-MC neuroblastoma cells." *Biochem Pharmacol.*76: 128-138.

Chen X, Liu Y, Zhang L, Zhu P, Zhu H, Yang Y, Guan P (2015). "Long-term neuroglobin expression of human astrocytes following brain trauma." *Neuroscience letters* 606:194-199. doi:10.1016/j.neulet.2015.09.002

Chen LW (2016). "Astrocyte, reactive astrocytes and self-regulative apoptosis in the neuroinflammation". *Neuroimmunol Neuroinflammation* 3:167-9. DOI: 10.20517/2347-8659.2016.31

Cheng KC, Cahill DS, Kasai H, et al. (1992) "8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G---T and A---C substitutions." *J Biol Chem.* 267(1):166–172.

Cheng B, Mattson MP (1995) "PDGFs protect hippocampal neurons against energy deprivation and oxidative injury: evidence for induction of antioxidant pathways-" *J Neurosci* 15:7095-7104

Choi I, Kim J, Jeong HK, Kim B, Jou I, Park SM, Chen L, Kang UJ, Zhuang X, Joe Eh (2013). "PINK1 deficiency attenuates astrocyte proliferation through mitochondrial dysfunction, reduced AKT and increased p38 MAPK activation, and downregulation of EGFR." *Glia* 61 (5):800-812

Chu CT, Ji J, Dagda RK, Jiang JF, Tyurina YY, Kapralov AA, et al (2013). "Cardiolipin externalization to the outer mitochondrial membrane acts as an elimination signal for mitophagy in neuronal cells." *Nat Cell Biol.* 15:1197–205.10.1038/ncb2837

Chung, Y., Ko., HW., Bok., E., Park, ES., Huh, SH., Nam, JH., BK., Jin (2010). "The role of neuroinflammation on the pathogenesis of Parkinson's disease." *BMB reports.*43(4):225-232.

Clapham, D. (2007). "Calcium signaling." *Cell*131(6): 1047-1058.

Cong, ZX., Wang, HD., Wang, JW., Zhou, Y., Pan, H., Zhang, DD., L., Zhu (2013). "ERK and PI3K signaling cascades induce Nrf2 activation and regulate cell viability partly through Nrf2 in human glioblastoma cells." *Oncol Rep.* 30(2):715-22.

Correia A. S., Anisimov S. V., Li J.-Y., Brundin P. (2005). "Stem cell-based therapy for Parkinson's disease." *Ann. Med.* 37, 487–498. 10.1080/0785389050032796

Cortassa S., Aon M. A., Marbán E., Winslow R. L. & O'Rourke B (2003). "An integrated model of cardiac mitochondrial energy metabolism and calcium dynamics." *Biophys J* 84, 2734–55.

Cortassa S., Aon M. A (2012). "Computational modeling of mitochondrial function." *Methods Mol. Biol.*810, 311–326

Cuccato G, Polynikis A, Siciliano V, Graziano M, di Bernardo M, di Bernardo D (2011) "Modeling RNA interference in mammalian cells." *BMC Syst Biol* 5: 19

Dalle Pezze P, Nelson G, Otten E, Korolchuk V, Kirkwood T, von Zglinicki T, et al (2014). "Dynamic Modelling of Pathways to Cellular Senescence Reveals Strategies for Targeted Interventions." *PLOS Comput Biol.* 10(8):1–20. doi: 10.1371/journal.pcbi.1003728

Danzer K. M., Haasen D., Karow A. R., et al (2007). Different species of α -synuclein oligomers induce calcium influx and seeding. *The Journal of Neuroscience.* (34):9220–9232. doi: 10.1523/jneurosci.2617-07.2007

Davidson SM, Duchen MR (2012). "Imaging mitochondrial calcium signalling with fluorescent probes and single or two photon confocal microscopy." *Methods Mol. Biol.*, 810, 219–234

De Joannon, AC., Mancini, F., Landolfi, C., Soldo, L., Leta, A., Ruggieri, A., Mangano, G., Polenzani, L., Pinza, M., C., Milanese (2000). "Adenosine triphosphate affects interleukin -1beta release by T98G glioblastoma cells through a purinoceptor-independent mechanism." *Neurosci Lett.* 285(3): 218-222.

De Marinis E, Acaz-Fonseca E, Arevalo MA, Ascenzi P, Fiocchetti M, Marino M, et al (2013). "17beta-oestradiol anti-inflammatory effects in primary astrocytes require oestrogen receptor beta-mediated neuroglobin up-regulation." *J Neuroendocrinol.* 25:260–70. doi:10.1111/jne.12007

de Oliveria, DM., Barreto, G., De Andrade, DV., Saraceno, E., Aon-Bertolino, L., Capani, F., Dos Santos El Bachá, R., LD., Giraldez (2009). "Cytoprotective effect of *Valeriana officinalis* extract on an in vitro experimental model of Parkinson disease." *Neurochem Res.*34(2): 215-.220.

de Oliveira DM, Barreto G, Galeano P, Romero JI, Holubiec MI, Badorrey MS, Capani F, Alvarez LD. (2011) "Paullinia cupana Mart. var. *Sorbilis* protects human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cell line against rotenone-induced cytotoxicity." *Hum Exp Toxicol* 30:1382-1391 doi:096032711038983710.1177/0960327110389837

Deheshi S, Dabiri B, Fan S, Tsang M, Rintoul GL (2015). "Changes in mitochondrial morphology induced by calcium or rotenone in primary astrocytes occur predominantly through ROS-mediated remodeling." *J Neurochem* 133(5):684–699. doi:10.1111/jnc.13090

Desbois-Mouthon C, Cadoret, A., Blivet-VanEggelpoël, MJ., Bertrand, F., Cherqui G, Perret, C., J., Capeau (2001). "Insulin and IGF-1 stimulate the beta-catenin pathway through two signalling cascades involving GSK-3beta inhibition and Ras activation." *Oncogene.*20(2):252–259.Dhillon, AS., Tarbutton, GL., Levin, JL., Plotkin, GM., Lowry,

LK, Nalbome, JT., S., Shepherd (2008). "Pesticide/environmental exposures and parkinson's disease in East Texas." *J Agromedicine*. 13(1): 37-48.

Di Malta C, Fryer JD, Settembre C, Ballabio A (2012) "Astrocyte dysfunction triggers neurodegeneration in a lysosomal storage disorder." *Proc Natl Acad Sci USA* 109: E2334–E2342

Dick FD (2006). "Parkinson's disease and pesticide exposures." *Br Med Bull* 79-80:219-231
doi:10.1093/bmb/ldl018

Dikdan GS, Saba SC, Dela Torre AN, Roth J, Wang S, Koneru B (2004). "Role of oxidative stress in the increased activation of signal transducers and activators of transcription-3 in the fatty livers of obese Zucker rats." *Surgery*. 136(3):677–685.

Dinuzzo, MS., Mangia, B., Maraviglia, C., F., Giove (2012). "The role of astrocytic glycogen in supporting the energetics of neuronal activity." *Neurochem Res*.37(11): 2432-2438.

Dong J, Sulik KK, Chen SY.(2008) "Nrf2-mediated transcriptional induction of antioxidant response in mouse embryos exposed to ethanol in vivo: implications for the prevention of fetal alcohol spectrum disorders." *Antioxidants & redox signaling*. 10:2023–2033

Dringen, R. (2000). "Metabolism and functions of glutathione in brain." *Progress in Neurobiology*.62(6): 649-671

Duffy, P., Schmandke, AC., Sigworth, J., Shuh, N., Cafferty,WBJ., SM., Strittmatter (2009). "Rho-Associated kinase II (ROCKII) limits axonal growth after trauma within the adult mouse spinal cord." *J Neurosci*.29(48): 15266-15276.

Egawa-Tsuzuki, T., Ohno, M., Tanaka, N., Takeuchi, Y., Uramoto, H., Faigle, R., Funa, K., Ishii, Y., M., Sasahara. (2004). "The PDGF B-chain is involved in the ontogenic susceptibility of the developing rat brain to NMDA toxicity." *Exp Neurol* 186: 89–98.

Emara M, Salloum N, Allalunis-Turner J (2009). "Expression and hypoxic up-regulation of neuroglobin in human glioblastoma cells." *Molecular oncology* 3 (1):45-53.
doi:10.1016/j.molonc.2008.11.002

Epinat J-C, Gilmore TD (1999): "Diverse agents act at multiple levels to inhibit the Rel/NF- κ B signal transduction pathway." *Oncogene* 18 (49):6896-6909.doi:10.1038/sj.onc.1203218

Episcopo FL, Tirolo C, Testa N, Caniglia S, Morale MC, Marchetti B (2013). "Reactive astrocytes are key players in nigrostriatal dopaminergic neurorepair in the MPTP mouse model of Parkinson's disease: focus on endogenous neurorestoration." *Curr Aging Sci*. 2013;6(1):45–55. doi: 10.2174/1874609811306010007.

Fago A., Mathews A.J., Brittain T. A (2008): "Role for neuroglobin: resetting the trigger level for apoptosis in neuronal and retinal cells." *IUBMB Life*. 60:398–401

Falk, T., Zhang, S., S., Sherman. (2009) "Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) is up-regulated and exogenous VEGF-B is neuroprotective in a culture model of Parkinson's disease. *Mol Neurodegener.*4:49

Farrer RG, Farrer JR, DeVries GH. (2013) "Platelet-derived growth factor-BB activates calcium/calmodulin-dependent and -independent mechanisms that mediate Akt phosphorylation in the neurofibromin-deficient human Schwann cell line ST88-14." *J Biol Chem.* 288:11066–11073.

Fatatis A, Miller RJ (1999). "Cell cycle control of PDGF-induced Ca^{2+} signaling through modulation of sphingolipid metabolism." *FASEB J*, 13: 1291-301.

Fitch, MT., J., Silver (2008). "CNS injury, glial scars, and inflammation: Inhibitory extracellular matrices and regeneration failure." *Exp. Neurol.*209: 294–301

Franke J., Abs V., Zizzadoro C., Abraham G (2014). Comparative study of the effects of fetal bovine serum *versus* horse serum on growth and differentiation of primary equine bronchial fibroblasts. *BMC Vet. Res.* 10:119. doi: 10.1186/1746-6148-10-119.

Fredriksson, L., Li, H., U., Eriksson (2004). "The PDGF family: four gene products form five dimeric isoforms." *Cytokine Growth Factor Rev.*15:197-204.

Fujimura, M., F., Usuki (2012). "Differing effects of toxicants (methylmercury, inorganic mercury, lead, amyloid β and rotenone) on cultured rat cerebrocortical neurons: Differential expression of Rho proteins associated with neurotoxicity." *Toxicol Sci.* 126(2): 506-514.

Funa K, Sasahara M. (2014). "The roles of PDGF in development and during neurogenesis in the normal and diseased nervous system." *J Neuroimmune Pharmacol.* 2014;9:168–181

Funahashi, A., Tanimura, N., Morohashi, M., and Kitano, H. (2003). "CellDesigner: a process diagram editor for gene-regulatory and biochemical networks," *BIOSILICO*, 1:159-162.

Furlong M, Tanner CM, Goldman SM, Bhudhikanok GS, Blair A, Chade A, et al (2015). "Protective glove use and hygiene habits modify the associations of specific pesticides with Parkinson's disease." *Environment International.* 75:144–150.

Gasque P et al. (1996) "Identification and characterization of complement C3 receptors on human astrocytes." *J Immunol* 156:2247-2255

Gauthier LD, Greenstein JL, O'Rourke B, Winslow RL (2013). "An Integrated Mitochondrial ROS Production and Scavenging Model: Implications for Heart Failure." *Biophysical Journal.* 105(12):2832—2842. doi: 10.1016/j.bpj.2013.11.007

Gibson, M. A., and J. Bruck (2000). "Efficient exact stochastic simulation of chemical

systems with many species and many channels." *Journal of Physical Chemistry A* 104 (9): 1876-1889

Gibson W. G., Farnell L., Bennett M. R. (2008). "A quantitative model of ATP-mediated calcium wave propagation in astrocyte networks, in *Mathematical Modeling of Biological Systems*", Vol. 2, Epidemiology, Evolution and Ecology, Immunology, Neural Systems and the Brain, and Innovative Mathematical Methods, eds Deutsch A., de la Parra R. B., de Boer R. J., Diekmann O., Jagers P., Kisdi E., Kretzschmar M., Lansky P., Metz H., editors. (Boston, MA: Birkhäuser Boston;), 193–204.

Giffard R, Ouyang Y (2004). "Effect of overexpression of protective genes on mitochondrial function of stressed astrocytes." *J Bioenerg Biomembr* 36:313-315 doi:10.1023/B:JOB.0000041760.23917.e1490847

Gillespie DT. (1977). "Exact stochastic simulation of coupled chemical-reactions." *Journal of Physical Chemistry*. 81:2340–2361

Giordano, G., Kavanagh, TJ., LG., Costa (2009). "Mouse cerebellar astrocytes protect cerebellar granule neurons against toxicity of the polybrominated diphenyl ether (PBDE) mixture DE-71." *Neurotoxicology* 30: 326–329.

Gorbatyuk, M. S., A. Shabashvili, W. Chen, C. Meyers, L. F. Sullivan, M. Salganik, J. H. Lin, A. S. Lewin, N. Muzyczka & O. S. Gorbatyuk (2012). "Glucose Regulated Protein 78 Diminishes α -Synuclein Neurotoxicity in a Rat Model of Parkinson Disease." *Molecular Therapy*, 20, 1327-1337.

Gossiau, A., Dittrich, W., Willig, A., PP., Jaros (2001). "Cytological effects of platelet-derived growth factor on mitochondrial ultrastructure in fibroblasts." *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 128 (2): 241-9.

Goswami P., Gupta S., Biswas J., Joshi N., Swarnkar S., Nath C., Singh S. (2016) "Endoplasmic reticulum stress plays a key role in rotenone-induced apoptotic death of neurons." *Mol. Neurobiol*. doi: 10.1007/s12035-014-9001-5.

Greenamyre, JT., Cannon, JR., Drolet, R., PG., Mastroberardino (2010). "Lessons from the rotenone model of Parkinson's disease." *Trends in Pharmacol Sci*. 31(4): 141-142.

Greve, MW., BJ., Zink (2009). "Pathophysiology of traumatic brain injury." *Mount Sinai Journal of Medicine*. 76(2) 97-104.

Guasch RM, Tomas M, Minambres R, Valles S, Renau-Piqueras J, Guerri C (2003) "RhoA and lysophosphatidic acid are involved in the actin cytoskeleton reorganization of astrocytes exposed to ethanol." *Journal of neuroscience research* 72 (4):487-502

Gyulkhandanyan AV, Feeney CJ, Pennefather PS (2003). "Modulation of mitochondrial

membrane potential and reactive oxygen species production by copper in astrocytes." *J Neurochem* 87:448-460 doi:2029

Habib AA, Chatterjee S, Park S-K, Ratan RR, Lefebvre S, Vartanian T (2001). "The Epidermal Growth Factor Receptor Engages Receptor Interacting Protein and Nuclear Factor- κ B (NF- κ B)-inducing Kinase to Activate NF- κ B IDENTIFICATION OF A NOVEL RECEPTOR-TYROSINE KINASE SIGNALOSOME." *Journal of Biological Chemistry* 276 (12):8865-8874. doi:10.1074/jbc.M008458200

Haines B, Demaria M, Mao X, Xie L, Campisi J, Jin K, Greenberg DA (2012) "Hypoxia-inducible factor-1 and neuroglobin expression." *Neuroscience letters* 514 (2):137-140. doi:10.1016/j.neulet.2012.01.080

Halliday GM, Stevens CH (2011) . "Glia: initiators and progressors of pathology in Parkinson's disease." *Movement Disorders* 2011; 26(1) 6-17.

Hamby, ME., M., Sofroniew (2010) "Reactive Astrocytes as therapeutic targets for CNS disorders." *Neurotherapeutics*7(4): 494-506.

Han D, Moon S, Kim Y, Min H, Kim Y. (2014). "Characterization of the membrane proteome and N-glycoproteome in BV-2 mouse microglia by liquid chromatography-tandem mass spectrometry." *BMC Genomics*. 2014 Feb 4;15:95. doi: 10.1186/1471-2164-15-95.

Hanna, S, M., El-Sibai (2013). "Signaling networks of Rho GTPases in cell motility." *Cell Signal*.25(10):1955-1961.

Hart IK, Richardson WD, Bolsover SR, Raff MC (1989) "PDGF and Intracellular Signaling in the Timing of Oligodendrocyte Differentiation." *J Cell Biol.* 109:3411–3417.

Hashida K, Kitao Y, Sudo H, Awa Y, Maeda S (2012). "ATF6 α promotes astroglial activation and neuronal survival in a chronic mouse model of parkinson's disease." *Plos One*. 7:e47950. doi: 10.1371/journal.pone.0047950

Hauser RA, Mc Dermontt MD, Messing S. (2006) "Factors associated with the development of motor fluctuations and dyskinesias in Parkinson disease." *Arch Neurol* Dec, 631 (12): 1756-60

Hauser, RA (2011). "Future treatments for Parkinsons disease: surfing the PD pipeline." *Int. J. Neurosci.* 121(Suppl. 2), 53–62. doi: 10.3109/00207454.2011.620195

Hedberg, KM., Bengtsson, T., Safiejko-Mrocza, B., Bell, PB., M., Lindroth(1993). "PDGF and neomycin induce similar changes in the actin cytoskeleton in human fibroblasts." *Cell Motil Cytoskeleton*. 24(2): 139-149.

Heinz S, Freyberger A, Lawrenz B, Schladt L, Schmuck G, Ellinger-Ziegelbauer H. (2017). "Mechanistic Investigations of the Mitochondrial Complex I Inhibitor Rotenone in the Context of Pharmacological and Safety Evaluation." *Sci Rep*. 7:45465. doi: 10.1038/srep45465.

Heldin, CH., Ostman, A., L., Rönstrand (1998). "Signal transduction via platelet-derived growth factor receptors." *Biochim.Biophys.Acta*1378: F79–F113.

Heldin, CH., B., Westermark (1999). "Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor." *Physiol Rev*.79:1283-1316.

Henriques A., Pitzer C., Schneider A. (2010). "Neurotrophic growth factors for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis: Where do we stand?" *Front. Neurosci*. 4:32 10.3389/fnins.2010.00032

Hirsch, EC., Breidert, T., Rousset, E., Hunot, S., Hartmann, A., PP., Michel (2003). "The role of glial reaction and inflammation in Parkinson's disease." *Ann NY Acad Sci*.991: 214-228.

Hirsch E. C., Hunot S., Hartmann A. Neuroinflammatory processes in Parkinson's disease. *Parkinsonism and Related Disorders*. 2005;11, supplement 1:S9–S15. doi: 10.1016/j.parkreldis.2004.10.01

Hoffmann, C., Shepelev, M., J., Chernoff (2004). "The genetics of Pak." *Journal of cell science*.117(Pt 19):4343-4354.

Hoglinger, GU., Lannuzel, A., Khondiker, ME., Michel, PP., Duyckaerts, C., J., Feger. (2005). "The mitochondrial complex I inhibitor rotenone triggers a cerebral tauopathy." *J Neurochem*.95(4): 930-939.

Hoops S, et al (2006). "COPASI a COMplex PATHway SIMulator." *Bioinformatics*. 22:3067–3074. doi: 10.1093/bioinformatics/btl485

Hossain, MZ., Ao, P., AL., Boynton (1998). "Platelet-derived growth factor-induced disruption of gap junctional communication and phosphorylation of connexin43 involves protein kinase C and mitogen-activated protein kinase." *J. Cell.Physiol*.176: 332–341.

Hou L., Xiong N., Liu L., et al. (2015). "Lithium protects dopaminergic cells from rotenone toxicity via autophagy enhancement." *BMC Neuroscience* 16, article 82 doi: 10.1186/s12868-015-0222-y.

Hsuan, S.L., Klintworth, H.M., Z., Xia (2006). "Basic fibroblast growth factor protects against rotenone-induced dopaminergic cell death through activation of extracellular signal-regulated kinases 1/2 and phosphatidylinositol-3 kinase pathways." *J Neurosci.*26(17): 4481-91.

Hyduke, D. R., Lewis, N. E., and Palsson, B. Ø (2013). "Analysis of omicsdata with genome-scale models of metabolism." *Mol. Biosyst.* 9, 167–174.doi: 10.1039/c2mb25453k

Iantomasi, T., Degl'Innocenti, D., MT., Vincenzini (1999). "Increased glutathione synthesis associated with platelet-derived growthfactor stimulation of NIH3T3 fibroblasts." *Biochimica et Biophysica Acta.*1452(3): 303-312.

Ignatenko A, Kolodkin A, Brady N, Peters B, Balling R (2014). "Comparison of ODE-based models for reactive oxygen species regulation system." *Proceedings of ICCSA.* Normandie University, Le Havre, France-June 23-26, 2014.

Iihara K, Hashimoto N, Tsukahara T, Sakata M, Yanamoto H, Taniguchi T (1997). "Platelet-derived growth factor-BB, but not -AA, prevents delayed neuronal death after forebrain ischemia in rats." *J Cereb Blood Flow Metab.* (10):1097-106.

Iqbal, S., Zhang, S., Driss, A., Liu, ZR., Kim, HR., Wang, Y., Ritenour, C., Zhau, HE., Kucuk, O., Chung, LW., D., Wu (2012). "PDGF upregulates Mcl-1 through activation of betacatenin and HIF-1alpha-dependent signaling in human prostate cancer cells." *PLoS One.*7(1):e30764

Isman, MB. (2006). "Botanical insecticides, deterrents, and repellents inmodern agriculture and an increasingly regulated world." *Annu. Rev. Entomol.*51:45–66

Ivankovic D., Chau K. Y., Schapira A. H. & Gegg M. E (2015). "Mitochondrial and lysosomal biogenesis are activated following PINK1/parkin-mediated mitophagy." *J Neurochem*, doi: 10.1111/jnc.13412

Jaffe, AB., A., Hall (2005) "Rho GTPases: biochemistry and biology." *Annu Rev Cell Dev Biol.* 21:247-269.

Jankovic, J., and Poewe, W. (2012). "Therapies in Parkinson's disease." *Curr. Opin. Neurol.* 25, 433–447. doi: 10.1097/WCO.0b013e3283542fc2

Jarlestedt, K., Rousset, C.I., Faiz, M., Wilhelmsson, U., Stahlberg, A., Sourkova, H., Pekna, M., Mallard, C., Hagberg, H., M., Pekny (2010). "Attenuation of reactive gliosis does not affect infarct volume in neonatal hypoxic-ischemic brain injury in mice." *PLoS One* 5(4): e10397.

Ji, Z, Yan K, Li W, Hu H, Zhu X (2017). "Mathematical and Computational Modeling in Complex Biological Systems." *Biomed Res Int.* 2017;2017:5958321. doi: 10.1155/2017/5958321.

Kagiyama S., Matsumura K., Goto K., Otsubo T., M., Iida (2010). "Role of Rho kinase and oxidative stress in cardiac fibrosis induced by aldosterone and salt in angiotensin type 1a receptor knockout mice." *Regulatory Peptides.* 160 (1-3): 133-139.

Kakar S, Hoffman FG, Storz JF, Fabian M, Hargrove MS.(2010). "Structure and reactivity of hexacoordinate hemoglobins". *Biophys Chem* ; 152:1-14; PMID:20933319; <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpc.2010.08.008>

Kalman D, Gomperts SN, Hardy S, Kitamura M, Bishop JM (1999). "Ras family GTPases control growth of astrocyte processes". *Molecular biology of the cell* 10 (5):1665-1683

Kaltschmidt B, Kaltschmidt C (2009). "NF- κ B in the nervous system". *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1, a001271. doi: 10.1101/cshperspect.a001271

Kang, SW (2007). "Two axes in platelet-derived growth factor signaling: tyrosine phosphorylation and reactive oxygen species." *Cell Mol Life Sci.* 64:533-541.

Kang, W., JM., Hebert (2011). "Signaling pathways in reactive astrocytes, a genetic perspective." *Molecular Neurobiology.* 43(3): 147-154.

Kato, M., Yuan, H., Xu, ZG., Lanting, L., Li, SL., Wang, M., Hu, MC., Reddy, MA., R., Natarajan (2006). "Role of the Akt/FoxO3a pathway in TGF-beta1-mediated mesangial cell dysfunction: a novel mechanism related to diabetic kidney disease." *J Am Soc Nephrol.* 17(12):3325-35.

Kazlauskas, A., JA., Cooper (1989). "Autophosphorylation of the PDGF receptor in the kinase insert region regulates interactions with cell proteins." *Cell* 58:1121-1133.

Karperien, A., Frac Lac for ImageJ, versión 2.5. <http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins/fraclac/FLHelp/Introduction.htm>. 1999-2007

Kembro J. M., Aon M. A., Winslow R. L., O'Rourke B., Cortassa S. (2013). "Integrating mitochondrial energetics, redox and ROS metabolic networks: a two-compartment model." *Biophys. J.* 104 332-343. 10.1016/j.bpj.2012.11.3808

Kent E, Hoops S, Mendes P (2012) "Condor-COPASI: high-throughput computing for biochemical networks." *BMC Syst Biol* 6: 91 doi: 10.1186/1752-0509-6-91

Kent E, Neumann S, Kummer U, Mendes P (2013) "What can we learn from global sensitivity analysis of biochemical systems?" PLoS One 8 (11): e79244 doi: 10.1371/journal.pone.0079244

Khandekar DC, Palai T, Agarwal A, Bhattacharya PK (2014). "Kinetics of sucrose conversion to fructo-oligosaccharides using enzyme (invertase) under free condition." Bioprocess Biosyst Eng. 37(12):2529–2537. doi: 10.1007/s00449-014-1230-5

Kimelberg, HK., M., Nedergaard (2010). "Functions of astrocytes and their potential as therapeutic targets." Neurotherapeutics.7(4): 338-353.

Klingelhoefer L., Reichmann H. (2015). "Pathogenesis of Parkinson disease—the gut-brain axis and environmental factors". Nat. Rev. Neurol. 11, 625–636. 10.1038/nrneurol.2015.19
Koken T, Erkasap N, Serteser M, Kahraman A (2006). "Epidermal growth factor increases tissue antioxidant enzyme activities in ethanol-induced gastric injury in rat". J Physiol Biochem. 62:237–243.

Knott AB, Bossy-Wetzel E (2008). "Impairing the mitochondrial fission and fusion balance: a new mechanism of neurodegeneration". Annals of the New York Academy of Sciences; 1147 283-292.

Kolodkin A, Simeonidis E, Balling R, Westerhoff HV (2012). "Understanding complexity in neurodegenerative diseases: in silico reconstruction of emergence." Front Physiol. 3:291

Kosako, H., Amano, M., Yanagida, M., Tanabe, K., Nishi, Y., Kaibuchi, K., M., Inagaki (1997). "Phosphorylation of glial fibrillary acidic protein at the same sites by cleavage furrow kinase and Rho-associated kinase." J Biol Chem. 272(16): 10333-10336.

Kowald A, A. Hamann, S. Zintel, S. Ullrich, E. Klipp, and H.D. Osiewacz (2012) "A systems biological analysis links ROS metabolism to mitochondrial protein quality control", *Mechanisms of Ageing and Development*, vol. 133, pp. 331-337, 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mad.2012.03.008>

Kraft, A. D., Johnson, D. A., and Johnson, J. A. (2004). "Nuclear factor E2-related factor 2-dependent antioxidant response element activation by tert-butylhydroquinone and sulforaphane occurring preferentially in astrocytes conditions neurons against oxidative insult". J. Neurosci. 24 1101–1112

Krupinski J, Issa R, Bujny T, Slevin M, Kumar P, Kumar S, Kaluza J (1997) "A putative role for platelet-derived growth factor in angiogenesis and neuroprotection after ischemic stroke in humans". Stroke 28:564-573

Kubli DA , Gustafsson AB (2012). "Mitochondria and Mitophagy.The Yin and Yang of Cell Death Control", *Circulation Research*, vol. 111, pp. 1208-1221.

Lee, S., Williamson, J., Lothman, EW., Szele, FG., Chesselet, MF., Von Hagen, S., Sapolsky, RM., Mattson, MP., S., Christakos (1997). "Early induction of mRNA for calbindin-D28k and BDNF but not NT-3 in rat hippocampus after kainic acid treatment." *Brain Res. Mol. Brain Res.*47: 183–194.

Ledwith KV, Gibbs ME, Barnes RW, Roberts AG (2016). "Cooperativity between verapamil and ATP bound to the efflux transporter P-glycoprotein." *Biochem Pharmacol.* 118:96-108. doi: 10.1016/j.bcp.2016.08.013. Epub 2016 Aug 13.

Lehwald, N., Tao, GZ., Jang, KY., Papandreou, I, B., Liu (2012) "b-catenin regulates hepatic mitochondrial function and energy balance in livers of mice." *Gastroenterology*143: 754–764.

Li, N., Ragheb, K., Lawler, G., Sturgis, J., Rajwa, B., Melendez,JA., J., Robinson (2003). "Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production." *J Biol Chem.*278(10):8516-25.

W. Li and A. N. Kong (2009), "Molecular mechanisms of Nrf2-mediated antioxidant response", *Mol Carcinog*, vol. 48(2), 91-104.

Li, L., Li, J., Wang, JY., Yang, CQ., Jia, ML., W., Jiang (2010). "Role of RhoA in platelet-derived growth factor-BB-induced migration of rat hepatic stellate cells." *Chin Med J.*123(18):2502-2509.

Liu, B., Gao HM.,JS., Hong (2003). "Parkinson's Disease and Exposure to Infectious Agents and Pesticides and the Occurrence of Brain Injuries: Role of Neuroinflammation." *Environmental Health Perspectives.*111(8): 1065-1073.

Liu N, Yu Z, Xiang S, Zhao S, Tjarnlund-Wolf A, Xing C, Zhang J, Wang X (2012). "Transcriptional regulation mechanisms of hypoxia-induced neuroglobin gene expression". *Biochem J.* 2012;443:153–164.

Liu N, Yu Z, Li Y, Yuan J, Zhang J, Xiang S, Wang X (2013). "Transcriptional regulation of mouse neuroglobin gene by cyclic AMP responsive element binding protein (CREB) in N2a cells". *Neuroscience Letters* 534:333-337. doi:10.1016/j.neulet.2012.11.025

Lukemiller. (2010). "Analyzing gels and western blots with ImageJ." 2017, from <http://lukemiller.org/index.php/2010/11/analyzing-gels-and-western-blots-with-image-j/>.

Lladó, J., Tolosa, L., G., Olmos (2013) "Cellular and molecular mechanisms involved in the neuroprotective effects of VEGF on motoneurons." *Front Cell Neurosci.*7:181.

Martín-Jiménez CA, Salazar-Barreto D, Barreto GE, González J (2017). "Genome-Scale Reconstruction of the Human Astrocyte Metabolic Network". *Front Aging Neurosci.* 2017 Feb 13;9:23. doi: 10.3389/fnagi.2017.00023. eCollection 2017.

Mattson MP, Camandola S (2001). "NF- κ B in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders." *J Clin Invest.* 107:247–254

Mattson, MP., Goodman, Y., Luo, H., Fu, W., K., Furukawa (1997). "Activation of NF- κ B protects hippocampal neurons against oxidative stress-induced apoptosis: evidence for induction of manganese superoxide dismutase and suppression of peroxynitrite production and protein tyrosine nitration." *J Neurosci Res.* 49(6):681-97

Mattson, MP.(2005). "NF- κ B in the survival and plasticity of neurons." *Neurochem. Res.*30: 883–893

Mattson, MP. (2008) "Glutamate and neurotrophic factors in neuronal plasticity and disease." *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1144: 97-112

McGeer, P. L. & McGeer, E. G (2008). "Glial reactions in Parkinson's disease". *Mov. Disord.* 23, 474-483

Meaney M, Fairweather I, Brennan GP, Forbes AB (2004). "Transmission electron microscope study of the ultrastructural changes induced in the tegument and gut of *Fasciola hepatica* following in vivo drug treatment with clorsulon." *Parasitol. Res.* 92:232–24

Mena, M. A. & Garcia de Yebenes, J (2008). "Glial cells as players in parkinsonism: the "good," the "bad," and the "mysterious" glia." *Neuroscientist* 14, 544-560.

Menza, M., et al. The Role of Inflammatory Cytokines in Cognition and Other Non-Motor Symptoms of Parkinson's Disease. *Psychosomatics*, 2010. 51(6): p. 474-479

Mincheva-Tasheva S, Soler RM (2013) NF- κ B signaling pathways role in nervous system physiology and pathology. *The Neuroscientist* 19 (2):175-194. doi:10.1177/1073858412444007

Monteith G (2000). "Seeing is believing: Recent trends in the measurement of Ca²⁺ in subcellular domains and intracellular organelles." *Immunology and Cell Biology.* 78:403–407

More, S. V., Kumar, H., Kim, I. S., Song, S. Y. & Choi, D. K (2013). "Cellular and molecular mediators of neuroinflammation in the pathogenesis of Parkinson's disease." *Mediators Inflamm.* 2013, 952375 (2013).

Morgan MJ, Liu Z (2011). "Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling." *Cell Res.*, vol. 21(1), pp. 103-115.

Müller M, Morotti A, Ponzetto C (2002). "Activation of NF- κ B Is Essential for Hepatocyte Growth Factor-Mediated Proliferation and Tubulogenesis." *Molecular and Cellular Biology* 22 (4):1060-1072. doi:10.1128/MCB.22.4.1060-1072.2002

Nakano T, Doi T, Yoshimoto J, Doya K. A kinetic model of dopamine- and calcium-dependent striatal synaptic plasticity (2010). *PLoS Comput Biol.*;6(2):e1000670 PubMed Central PMCID: PMC2820521. doi: 10.1371/journal.pcbi.1000670

Nakatani K. et al. (2004) "Cytoglobin/STAP, its unique localization in splanchnic fibroblast-like cells and function in organ fibrogenesis." *Lab Invest.* 84, 91–101

Napetschnig J., Wu H. (2013). "Molecular basis of NF- κ B signaling." *Annu. Rev. Biophys.* 42 443–468. 10.1146/annurev-biophys-083012-130338

Nedergaard, M., U., Dirnagl (2005). "Role of glial cells in cerebral ischemia." *Glia*50(4): 281-286.

Nguyen, T., Nioi, P. & Pickett, C. B (2009). "The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress." *J Biol Chem* 284, 13291–13295, doi: 10.1074/jbc.R900010200.

Niranjan, R., Nath, C., R., Shukla (2010). "The mechanism of action of MPTP-induced neuroinflammation and its modulation by melatonin in rat astrocytoma cells, C6." *Free Radic Res.*44(11): 1304-1316.

Nobes, CD., Hawkins, P., Stephens, L., A., Hall (1995). "Activation of the small GTP-binding proteins rho and rac by growth factor receptors." *Journal of Cell Science* 108: 225-233.

Noh YH, Kim KY, Shim MS, et al (2013). "Inhibition of oxidative stress by coenzyme Q10 increases mitochondrial mass and improves bioenergetic function in optic nerve head astrocytes". *Cell Death Dis.*2013;4:e820. doi: 10.1038/cddis.2013.341

Noma, K., Goto, C., Nishioka, K., Jitsuiki, D., Umemura, T., Ueda, K., Kimura, M., Nakagawa, K., Oshima, T., Chayama, K., Yoshizumi, M., Liao, JK., Y., Higashi (2007). "Roles of rho-associated kinase and oxidative stress in the pathogenesis of aortic stiffness." *J Am Coll Cardiol.* 49(6): 698-705.

Nutt JG, Wooten GF (2005). "Clinical practice. Diagnosis and initial management of Parkinson's disease." *The New England Journal of Medicine*, 353(10) 1021-1027.

Ogawa, N., Asanuma, M., Miyazaki, I., Diaz-Corrales, F., K., Miyoshi (2005). "L-DOPA treatment from the viewpoint of neuroprotection." *J Neurol.*252(suppl 4):23-31.

Oliva CR, Moellering DR, Gillespie GY, Griguer CE (2011). "Acquisition of chemoresistance in gliomas is associated with increased mitochondrial coupling and decreased ROS production." *PLoS One* 6:e24665 doi:10.1371/journal.pone.0024665PONE-D-11-14137

Ormerod, M. G., X. M. Sun, D. Brown, R. T. Snowden and G. M. Cohen (1993). "Quantification of apoptosis and necrosis by flow cytometry." *Acta Oncol* 32(4): 417-424.

Orton RJ, Adriaens ME, Gormand A, Sturm OE, Kolch W, Gilbert DR (2009). "Computational modelling of cancerous mutations in the EGFR/ERK signalling pathway." *BMC Systems Biology* . 3:100–100. doi: 10.1186/1752-0509-3-100

Ouyang,YB., Xu, LJ., Emery, JF., Lee, AS., RG., Giffard (2011). "Overexpressing GRP78 influences Ca²⁺ handling and function of mitochondria in astrocytes after ischemia-like stress." *Mitochondrion*. 11(2): 279-286.

Palsson, B. (2009). "Metabolic systems biology." *FEBS Lett*. 583, 3900–3904.doi: 10.1016/j.febslet.2009.09.031

Pan-Montojo, F., Anichtchik, O., Dening, Y., Knels, L., Pursche, S., R., Jung (2010). "Progression of Parkinson's disease pathology is reproduced by intragastric administration of rotenone in mice." *PLoS One*.5(1): e8762

Pang, Y., Zheng, B., Campbell, LR., Fan, LW., Cai, Z., PG., Rhodes(2010). "IGF-1 can either protect against or increase LPS-induced damage in the developing rat brain." *Pediatr. Res*.67: 579–584.

Parpura, V., Grubisic, V., A., Verkhratsky (2011). "Ca²⁺ sources for the exocytotic release of glutamate from astrocytes." *Biochim.Biophys. Acta*1813: 984–1018.

Pearson, G., Robinson, F., Beers, Gibson, T., Xu, BE., Karandikar, M, Berman, K., MH., Cobb(2001). "Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions" *Endocr Rev*. 22(2):153-83.

Peng, F., Yao, H., Kaan, H., S., Buch(2012). "Platelet-Derived Growth Factor CC-Mediated Neuroprotection against HIV Tat Involves TRPC-Mediated Inactivation of GSK 3beta." *PLoS One*. 7(10): e47572.

Perier C, Vila M (2012) "Mitochondrial biology and Parkinson's disease." *Cold Spring Harb Perspect Med* 2:a009332 doi:10.1101/cshperspect.a009332a009332

Perry SW, Norman JP, Barbieri J, Brown EB, Gelbard HA (2011). "Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. *BioTechniques*." 50(2):98–115. doi: 10.2144/000113610

Pesce A., Dewilde S., Nardini M., Moens L., Ascenzi P., Hankeln T., Burmester T., Bolognesi M (2003). "Human brain neuroglobin structure reveals a distinct mode of controlling oxygen affinity." *Structure*. 11:1087–1095. doi: 10.1016/S0969-2126(03)00166-7

Pfaffenbach K. T. et al. GRP78/BiP is a novel downstream target of IGF-1 receptor mediated signaling. *J Cell Physiol*. 227, 3803–11 (2012).

Pinton P, Giorgi C, Siviero R, Zecchini E, Rizzuto R (2008). "Calcium and apoptosis: Er-mitochondria Ca^{2+} transfer in the control of apoptosis." *Oncogene*. 27:6407–18.

Pinzani, M. (2002). "PDGF and signal transduction in hepatic stellate cells." *Front Biosci*. 7 : d1720-d1726.

Post B, Muslimovic D, Van Geloven N, Speelman JD, Schmand B, De Haan RJ (2011) "Progression and prognostic factors of motor impairment, disability and quality of life in newly diagnosed Parkinson's disease." *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*. 26(3):449–456

Potapova O., Fakhrai H., Baird S., Mercola D (1996). "Platelet-derived growth factor-B/v-sis confers a tumorigenic and metastatic phenotype to human T98G glioblastoma cells." *Cancer Res*. 56:280–286.

Powis, G., Seewald, MJ., Sehgal, I., Iaizzo, PA., RA., Olsen (1990). "Platelet-derived growth factor stimulates non-mitochondrial Ca^{2+} uptake and inhibits mitogen-induced Ca^{2+} signaling in Swiss 3T3 fibroblasts." *J Biol Chem*. 265(18):10266-10273.

Pradilla, G., et al (2003). "Estudio neuroepidemiológico nacional (EPINEURO) colombiano." *Rev Panam Salud Pública*, 14(2), p. 104-111

Prieto MA, Rodríguez-Amado I, Vásquez JA, Anders Y, Murado MA (2014). "A standardized kinetic model to evaluate the antioxidant activity responses. The β -Carotene method as a case study." *Grupo de Reciclado e Valorización de Materiais Residuais (REVAL). Instituto de Investigações Mariñas*

Proschel, C., Stripay, J. L., Shih, C. H., Munger, J. C., and Noble, M. D. (2014). "Delayed transplantation of precursor cell-derived astrocytes provides multiple benefits in a rat model of Parkinsons." *EMBO Mol. Med*. 6, 504–518. doi: 10. 1002/emmm.201302878

Puleston D (2015). "Detection of Mitochondrial Mass, Damage, and Reactive Oxygen Species by Flow Cytometry." *Cold Spring Harb Protoc*. 2015(9):pdb.prot086298. pmid:26330624.

Ramakers, GJ., W., Moolenaar(1998). "Regulation of astrocyte morphology by RhoA and lysophosphatidic acid." *Exp Cell Res*.245(2): 252-262.

Ramão, A., Gimenez, M., Laure, HJ., Izumi, C., Vida, RC., Oba-Shinjo, S., Marie, SK, JC., Rosa (2012). "Changes in the expression of proteins associated with aerobic glycolysis and cell migration are involved intumorigenic ability of two glioma cell lines." *Proteome Sci*. 10(1):53.

Ramaswamy, S., J., Kordower (2009). "Are growth factors the answer?" *Parkinsonism and Related Disorders* 15(Suppl 3): S176-S180.

Rappold, PM., K., Tieu (2010). "Astrocytes and therapeutics for Parkinson's disease." *Neurotherapeutics*.7(4): 413–423.

Resat H, Petzold L, Pettigrew MF (2009) "Kinetic modeling of biological systems." *Methods Mol Biol*541: 311–335. doi: 10.1007/978-1-59745-243-4_14

Ridefelt, P., Yokote, K., Claesson-Welsh, L., A., Siegbahn (1995). "PDGF-BB triggered cytoplasmic calcium responses in cells with endogenous or stably transfected PDGF beta-receptors." *Growth Factors*. 12(3):191-201.

Rizzuto, R., De Stefani, D., Raffaello, A., C., Mammucari (2012). "Mitochondria as sensors and regulators of calcium signaling." *Nat Rev Mol Cell Biol*.13(9):566-578

Robertson, DR., W., Smith-Vaniz (2008). "Rotenone: An essential but demonized tool for assessing marine fish diversity." *Bioscience*58(2): 165-170.

Romashkova, JA., SS., Makarov (1999). "NF- κ B is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling." *Nature*. 401(6748):86-90.

Ruusala, A., Sundberg, C., Arvidsson, AK., Rupp-Thureson, E., Heldin, CH., L., Claesson-Welsh (1998). "Platelet-derived growth factor (PDGF)-induced actin rearrangement is deregulated in cells expressing a mutant Y778F PDGF beta-receptor." *J Cell Sci*.111(Pt 1):111-20.

Safi, R., Gardaneh, M., Panahi, Y., Maghsoudi, N., Zaefizadeh, M., E., Gharib, (2011). "Optimized quantities of GDNF overexpressed by engineered astrocytes are critical for protection of neuroblastoma cells against 6-OHDA toxicity." *The Journal of Molecular Neuroscience*.46(3) 654-665.

Sakata M., Yanamoto H., Hashimoto N., Iihara K., Tsukahara T. Taniguchi T. and Kikuchi H. (1998) "Induction of infarct tolerance by platelet-derived growth factor against reversible focal ischemia." *Brain Res*.784, 250–255

Samantaray, S., Knaryan, VH., Guyton, MK., Matzelle, DD., Ray, SK., NL., Banik (2007) "The parkinsonian neurotoxin rotenone activates calpain and caspase-3 leading to motoneuron degeneration in spinal cord of Lewis rats." *Neuroscience*.146(2): 741-755

Sarafian TA, Montes C, Imura T, Qi J, Coppola G, Geschwind DH, Sofroniew MV (2010) "Disruption of astrocyte STAT3 signaling decreases mitochondrial function and increases oxidative stress in vitro." *PLoS One* 5:e9532 doi:10.1371/journal.pone.0009532

Saravanan K.S., Sindhu K.M., Mohanakumar K.P (2007). "Melatonin protects against rotenone-induced oxidative stress in a hemiparkinsonian rat model." *J. Pineal Res.* 42:247–253. doi: 10.1111/j.1600-079X.2006.00412.x

Scaduto RC Jr, Grotyohann LW (1999). "Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives." *Biophys J.* 1999; 76:469–477.

Schnitzer J, Franke WW, Schachner M (1981). "Immunocytochemical demonstration of vimentin in astrocytes and ependymal cells of developing and adult mouse nervous system." *J. Cell Biol.* 90:435–447.

Sertbaş, M., Ulgen, K. & Cakır, T (2014). "Systematic analysis of transcription-level effects of neurodegenerative diseases on human brain metabolism by a newly reconstructed brain specific metabolic network." *FEBS Open Bio.* 4, 542–53.

Sherer, TB., Betarbet, R., Testa, CM., Seo, BB., Richardson, JR., Kim, JH., Miller, GW., Yagi, T., Matsuno-Yagi, A., JT., Greenamyre (2003). "Mechanism of toxicity in rotenone models of Parkinson's disease." *J Neurosci.*23:10756–10764.

Simon AR, Takahashi S, Severgnini M, Fanburg BL, Cochran BH (2002). "Role of the JAK-STAT pathway in PDGF-stimulated proliferation of human airway smooth muscle cells." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*2002;282:L1296–1304

Skalnikova HK (2013) "Proteomic techniques for characterisation of mesenchymal stem cell secretome." *Biochimie* 95 (12):2196-2211

Sanchez, M., Gastaldi, L., Remedi, M., Cáceres, A., C., Landa (2008). "Rotenone-induced toxicity is mediated by Rho-GTPases in hippocampal neurons." *Toxicol Sci.*104(2):352-361.

Schulze-Osthoff K, Beyaert R, Vandevoorde V, Haegeman G, Fiers W (1993) "Depletion of the mitochondrial electron transport abrogates the cytotoxic and gene-inductive effects of TNF." *The EMBO Journal* 12 (8):3095-3104

Shaw G., Morse S., Ararat M., Graham F. L (2002). "Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells." *FASEB J.* 16, 869–871. 10.1096/fj.01-0995fj

Shin, HW., Park, SY., Lee, KB., Shin, E., Nam, SW., Lee, JY., JJ., Jang (2009). "Transcriptional profiling and Wnt signaling activation in proliferation of human hepatic stellate cells induced by PDGF-BB." *Korean J Hepatol.*15(4):486-495.

Shim,AH., Liu, H., Focia, PJ., Chen, X., Lin, PC., X., He (2010). "Structures of a platelet-derived growth factor/propeptide complex and a platelet-derived growth factor/receptor complex." *ProcNatlAcad Sci USA.* 107(25): 11307-11312.

Short, S. C., C. Martindale, S. Bourne, G. Brand, M. Woodcock and P. Johnston (2007). "DNA repair after irradiation in glioma cells and normal human astrocytes." *Neuro Oncol* 9(4): 404-411.

Simpkins JW, Yi KD, Yang SH, Dykens JA (2010) "Mitochondrial mechanisms of estrogen neuroprotection." *Biochim Biophys Acta* 1800:1113-1120 doi:S0304-4165(09)00321-310.1016/j.bbagen.2009.11.013

Sies, H. (1997). "Oxidative stress: Oxidants and antioxidants", *Experimental physiology*, vol. 82(2), pp. 291-5.

Simon, AR., Takajashi, S., Fanburg, BL., BH., Cochran (2001). "Role of the JAK-STAT pathway in PDGF-stimulated proliferation of human airway smooth muscle cells." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 282(6): L1296-L1304.

Smith A, Robinson AJ (2011) "A metabolic model of the mitochondrion and its use in modelling diseases of the tricarboxylic acid cycle". *BMC Systems Biology* 20115:102 <https://doi.org/10.1186/1752-0509-5-102>

Sofroniew, MV. (2000). "Astrocyte failure as a cause of CNS dysfunction." *Mol. Psychiatry*. 5: 230–232.

Sofroniew, MV.(2009). "Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation." *Trends Neurosci*. 32: 638–647.

Sofroniew, MV., H, Vinters H (2010). "Astrocytes: biology and pathology." *ActaNeuropathol*. 119(628): 7–35.

Song YJ, Halliday GM, Holton JL, Lashley T, O'Sullivan SS, McCann H, et al (2009) "Degeneration in different parkinsonian syndromes relates to astrocyte type and astrocyte protein expression." *J Neuropathol Exp Neurol*. 68:1073–83

Sonsalla PK, Zeevalk GD, German DC (2008). "Chronic intraventricular administration of 1-methyl-4-phenylpyridinium as a progressive model of Parkinson's disease." *Parkinsonism & Related Disorders*, 14(Suppl 2): S116-S118.

Spickett C. M (2011). "The lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal: advances in chemistry and analysis." *Redox Biology*. 1(1):145–152. doi: 10.1016/j.redox.2013.01.007

Stein, G.(1979). "T98G: an anchorage-independent human tumor cell line that exhibits stationary phase G1 arrest in vitro." *J Cell Physiol*. 99(1):43-54.

Stepanenko A.A., Dmitrenko V.V (2015). "HEK293 in cell biology and cancer research: phenotype, karyotype, tumorigenicity, and stress-induced genome-phenotype evolution." *Gene*. 569:182–190

Sugaya, K., Chou, S., Xu, S.J., M., McKinney, (1998). "Indicators of glial activation and brain oxidative stress after intraventricular infusion of endotoxin." *Brain Res. Mol. Brain Res.* 58: 1–9.

Surovtsova I, Simus N, Hübner K, Sahle S, Kummer U (2012). "Simplification of biochemical models: a general approach based on the analysis of the impact of individual species and reactions on the systems dynamics." *BMC Syst Biol.* 6(1):14

Svitkina T, Lin WH, Webb DJ, Yasuda R, Wayman GA, Van Aelst L, Soderling SH (2010). "Regulation of the postsynaptic cytoskeleton: roles in development, plasticity, and disorders." *J Neurosci.*30:14937–14942

Swarnkar, S., Singh S., Goswami, P., Mathur, R., Patro, I.K., C., Nath (2012). "Astrocyte activation: a key step in rotenone induced cytotoxicity and DNA damage. *Neurochem Res.* 37(10): 2178-2189.

Tan, H. Y. and T. W. Ng (2008). "Accurate step wedge calibration for densitometry of electrophoresis gels." *Optics Communications* 281(10): 3013-3017

Tang Z et al. (2010) "Survival effect of PDGF-CC rescues neurons from apoptosis in both brain and retina by regulating GSK3beta phosphorylation." *J Exp Med* 207:867-880 doi:jem.2009170410.1084/jem.20091704

Tanner, CM. et al. (2011). "Rotenone, Paraquat and Parkinson's Disease." *Environmental Health Perspectives.* 119 (6): 866-872.

Taylor JM, Kelley B, Gregory EJ, Berman NEJ. (2014) "Neuroglobin overexpression improves sensorimotor outcomes in a mouse model of traumatic brain injury." *Neurosci Lett*577:125–9. doi:10.1016/j.neulet.2014.03.012

Thannickal, VJ., BL., Fanbourg (2000). "Reactive oxygen species in cell signaling." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 279(6): L1005-1028.

Tiwari, M., Lopez-Cruzan, M., Morgan, WW., B., Herman (2011). "Loss of caspase-2 dependent apoptosis induces autophagy after mitochondrial oxidative stress in primary cultures of young adult cortical neurons." *J. Biol. Chem.* 286: 8493–8506.

Tong J, Ang LC, Williams B, et al (2015). "Low levels of astroglial markers in Parkinson's disease: relationship to alpha-synuclein accumulation." *Neurobiol Dis.* 82:243–253.

Torrente D, Avila M, Cabezas R, Morales L, Gonzalez J, Samudio I, Barreto GE (2013) "Paracrine factors of human mesenchymal stem cells increase wound closure and reduce

reactive oxygen species production in a traumatic brain injury *in vitro* model." *Hum Exp Toxicol* 33:673-684 doi:096032711350965910.1177/0960327113509659

Torrente D, Cabezas R, Avila M, Sanchez Y, Morales L, Ashraf GM, Barreto GE, Gonzalez J, Aliev G (2015). "Mechanisms of PDGFRalpha promiscuity and PDGFRbeta specificity in association with PDGFB." *Front Biosci (Elite Ed)*. 7:434-46.

Trask, J (2012). "Nuclear factor Kappa B (NF-kB) translocation assay development and validation for high content screening. Assay Guidance manual. The Hamner Institutes for Health Sciences.

Trent JT 3rd, Watts RA, Hargrove MS (2001). "Human neuroglobin, a hexacoordinate hemoglobin that reversibly binds oxygen." *J Biol Chem*. 276(32):30106-10.

Trojanowska, M (2008). "Role of PDGF in fibrotic diseases and systemic sclerosis." *Rheumatology (Oxford)* 47(Suppl 5): v2-v4.

Tseng HC, Dichter MA (2005) "Platelet-derived growth factor-BB pretreatment attenuates excitotoxic death in cultured hippocampal neurons." *Neurobiol Dis* 19:77-83 doi:S0969-9961(04)00280-310.1016/j.nbd.2004.11.007

Van Houten B., Hunter S. E. & Meyer JN (2016). "Mitochondrial DNA damage induced autophagy, cell death, and disease." *Front Biosci* 21, 42–54.

Van Leuven W, Van Dam D, Moens L, De Deyn PP, Dewilde S (2013) . "A behavioral study of neuroglobin-overexpressing mice under normoxic and hypoxic conditions." *Biochim Biophys Acta*.1834:1764–71. doi:10.1016/j.bbapap.2013.04.015

van Nieuw Amerongen, GP., Koolwijk, P., Versteilen, A., VW., van Hinsbergh (2003). "Involvement of RhoA/Rho kinase signaling in VEGF-induced endothelial cell migration and angiogenesis *in vitro*." *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 23(2):211-217.

Varma, H., Cheng, R., Voisine, C, Hart, AC., BR., Stockwell (2007). "Inhibitors of metabolism rescue cell death in Huntington's disease models." *Proc Natl Acad Sci USA*. 104(36): 14525-14530.

Varma D, Sen D (2015) "Role of the unfolded protein response in the pathogenesis of Parkinson's disease." *Acta Neurobiologiae Experimentalis*. 75(1):1–26.

Verkhatsky, A. & Kirchhoff, F (2007). "NMDA receptors in glia." *Neuroscientist* 13, 28–37.

Volterra, A., J., Meldolesi (2005). "Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues." *Nat. Rev.* 6(639): 626–640.

Volterra A, Liaudet N, Savtchouk I (2014) "Astrocyte Ca²⁺ signalling: an unexpected complexity." *Nat Rev Neurosci* 15:327–335. 10.1038/nrn3725

Wachter B, Schurger S, Rolinger J, von Ameln-Mayerhofer A, Berg D, Wagner HJ, et al. (2010) "Effect of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) on proliferation of glial cells in the rat cortex and striatum: evidence for de-differentiation of resident astrocytes." *Cell and Tissue Research*. 342(2) 147-60.

Wang, X., Qin, ZH., Leng, Y., Wang, Y., Jin, X., Chase, TN., MC., Bennett (2002). "Prostaglandin A1 inhibits rotenone-induced apoptosis in SH-SY5Y cells." *J. Neurochem.* 83: 1094–1102.

Wang XJ, Xu JX (2005). "Possible involvement of Ca²⁺ signaling in rotenone-induced apoptosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells." *Neurosci Lett*. 376:127–132

Wang M, Wey S, Zhang Y, Ye R, Lee AS (2009). "Role of the unfolded protein response regulator GRP78/BiP in development, cancer, and neurological disorders." *Antioxid Redox Signal*. 11(9):2307–2316. doi: 10.1089/ars.2009.2485

Wang, Z., Ahmad, A., Li, Y., Kong, D., Azmi, AS., Banerjee, S., FH., Sarkar (2010). "Emerging roles of PDGF-D signaling pathway in tumor development and progression." *Biochim Biophys Acta*. 1806(1): 122-130.

Wang H.H., Hsieh H.L., Yang C.M (2010b). "Calmodulin kinase II-dependent transactivation of PDGF receptors mediates astrocytic MMP-9 expression and cell motility induced by lipoteichoic acid." *J Neuroinflammation*. 7:84

Wang H. L., Chou A. H., Wu A. S., Chen S. Y., Weng Y. H., Kao Y. C., et al. . (2011). "PARK6 PINK1 mutants are defective in maintaining mitochondrial membrane potential and inhibiting ROS formation of substantia nigra dopaminergic neurons." *Biochim. Biophys. Acta* 1812, 674–684. 10.1016/j.bbadis.2011.03.007

Wang, X., J. Ji, H. Zhang, Z. Fan, L. Zhang, L. Shi, F. Zhou, W. R. Chen, H. Wang and X. Wang (2015). "Stimulation of dendritic cells by DAMPs in ALA-PDT treated SCC tumor cells." *Oncotarget* 6(42): 44688-44702.

Watabe M, Nakaki T (2004). "Rotenone induces apoptosis via activation of bad in human dopaminergic SH-SY5Y cells." *J Pharmacol Exp Ther* 311:948-953 doi:10.1124/jpet.104.071381jpet.104.071381

Weissmiller AM, Wu C (2012). "Current advances in using neurotrophic factors to treat neurodegenerative disorders." *Transl Neurodegener.* 1(1):14. doi: 10.1186/2047-9158-1-14.

Westerhoff HV (2007) "Multi-factorial disease and robustness: Where Systems Biology makes a difference." *FEBS Journal* 274: 342

Xie L-k, Yang S-h (2016) "Brain globins in physiology and pathology". *Medical Gas Research* 6 (3):154-163. doi:10.4103/2045-9912.191361

Xiong, X., Barreto, GE., Xu, L., Ouyang, YB., Xie, X., RG., Giffard (2011). "Increased brain injury and worsened neurological outcome in interleukin-4 knockout mice after transient focal cerebral ischemia." *Stroke* 42(7): 2026-2032.

Yacoubian, T., D., Standaert (2009). "Targets for Neuroprotection in Parkinson's Disease." *Biochim Biophys Acta.* 1792(7): 676–687.

Yang, L., Lin, C., Sun, SY., Shaoy, S., ZR., Liu (2007). "A double tyrosine phosphorylation of P68 RNA helicase confers resistance to TRAIL-induced apoptosis." *Oncogene* 26:6082-6092.

Yang, Y., Hou, L., Li, Y., Ni, J., L., Liu (2013). "Neuronal necrosis and spreading death in a *Drosophila* genetic model." *Cell death Dis.* 4:e723.

Yao, J., Morioka, T., T., Oite (2000). "PDGF regulates gap junction communication and connexin43 phosphorylation by PI 3-kinase in mesangial cells." *Kidney Int.* 57(5): 1915-1926.

Ye SQ, Zhou XY, Lai XJ, Zheng L, Chen XQ (2009). "Silencing neuroglobin enhances neuronal vulnerability to oxidative injury by down-regulating 14-3-3gamma." *Acta Pharmacol Sin.* 30:913–918

Yu, JC., Lokker, NA., Hollenbach, S., Apatira, M., Li, J., Betz, A., Sedlock, S., Oda, Y., Nomoto, K., Matsuno, S., Ide, E., Tsukuda, N., A., Giese (2001). "Efficacy of the novel selective platelet-derived growth factor receptor antagonist CT52923 on cellular proliferation, migration, and suppression of neointima following vascular injury." *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 298:1172–1178.

Yu, J., Ustach, C., Kim, HR., (2003). "Platelet-derived growth factor signaling and human cancer." *J Biochem Mol Biol.* 36:49-59.

Yu Z, Xu J, Liu N, Wang Y, Li X, Pallast S, et al (2012) "Mitochondrial distribution of neuroglobin and its response to oxygen–glucose deprivation in primary-cultured mouse cortical neurons." *Neuroscience* 218:235–42. doi:10.1016/j.neuroscience.2012.05.054

Yu Z, Poppe JL, Wang X (2013). "Mitochondrial mechanisms of neuroglobin's neuroprotection." *Oxid Med Cell Longev.* 756989–756989. doi:10.1155/2013/756989

Yuan, Q, Pang J, Maw S, Trairatphisan P, Wiesing M, Sauter T (2011). "A Study of the PDGF signaling pathway with PRISM". *Third International Workshop on Computational*

Models for Cell Processes (CompMod 2011) EPTCS 67, 2011, pp. 65–81, doi:10.4204/EPTCS.67.7

Yue, G., Shi, G., Azaro, MA., Yang, Q., Hu, G., Luo, M., Yin, K., Nagele, RG., Yang, JM., H., (2008). "Lipopolysaccharide (LPS) potentiates hydrogen peroxide toxicity in T98G astrocytoma cells by suppression of anti-oxidative and growth factor gene expression". *BMC Genomics*. 9: 608.

Zachrisson O, Zhao M, Andersson A, et al. (2011) "Restorative effects of platelet derived growth factor-BB in rodent models of Parkinson's disease." *J Parkinsons Dis*.1:49–63.

Zelenaia O, Schlag BD, Gochenauer GE, Ganel R, Song W, Beesley JS, Grinspan JB, Rothstein JD, Robinson MB (2000). "Epidermal growth factor receptor agonists increase expression of glutamate transporter GLT-1 in astrocytes through pathways dependent on phosphatidylinositol 3-kinase and transcription factor NF- κ B." *Mol Pharmacol*. 57:667–678.

Zhang, LH., X., Zhang (2010). "Roles of GRP78 in physiology and cancer." *J. Cell Biochem*. 110: 1299–1305.

Zhang, S., Liang, R., Zhou, F., Huang, X., Ding, JH, Hu, G. (2011). "Reversal of rotenone-induced dysfunction of astrocytic connexin 43 by opening mitochondrial ATP-sensitive potassium channels." *Cell Mol Neurobiol*. 31(1): 117-127.

Zheng, L., Ishii Y., Tokunaga, A., Hamashima, T., Shen, J., QL., Zhao (2010). "Neuroprotective effects of PDGF against oxidative stress and the signaling pathway involved." *J Neurosci Res*. 88(6): 1273-1284.

Zhu, X., Yao, H., Peng, F., Callen, S., S., Buch (2009). "PDGF-mediated protection of SH-SY5Y cells against Tat toxin involves regulation of extracellular glutamate and intracellular calcium." *Toxicol Appl Pharmacol*. 240(2): 286-291.

Zohrabian, VM., Forzani, B., Chau, Z., Murali, R., M., Jhanwar-Uniyal (2009). "Rho/ROCK and MAPK signaling pathways are involved in glioblastoma cell migration and proliferation." *Anticancer Res*. 29(1):119-123.

Anexos

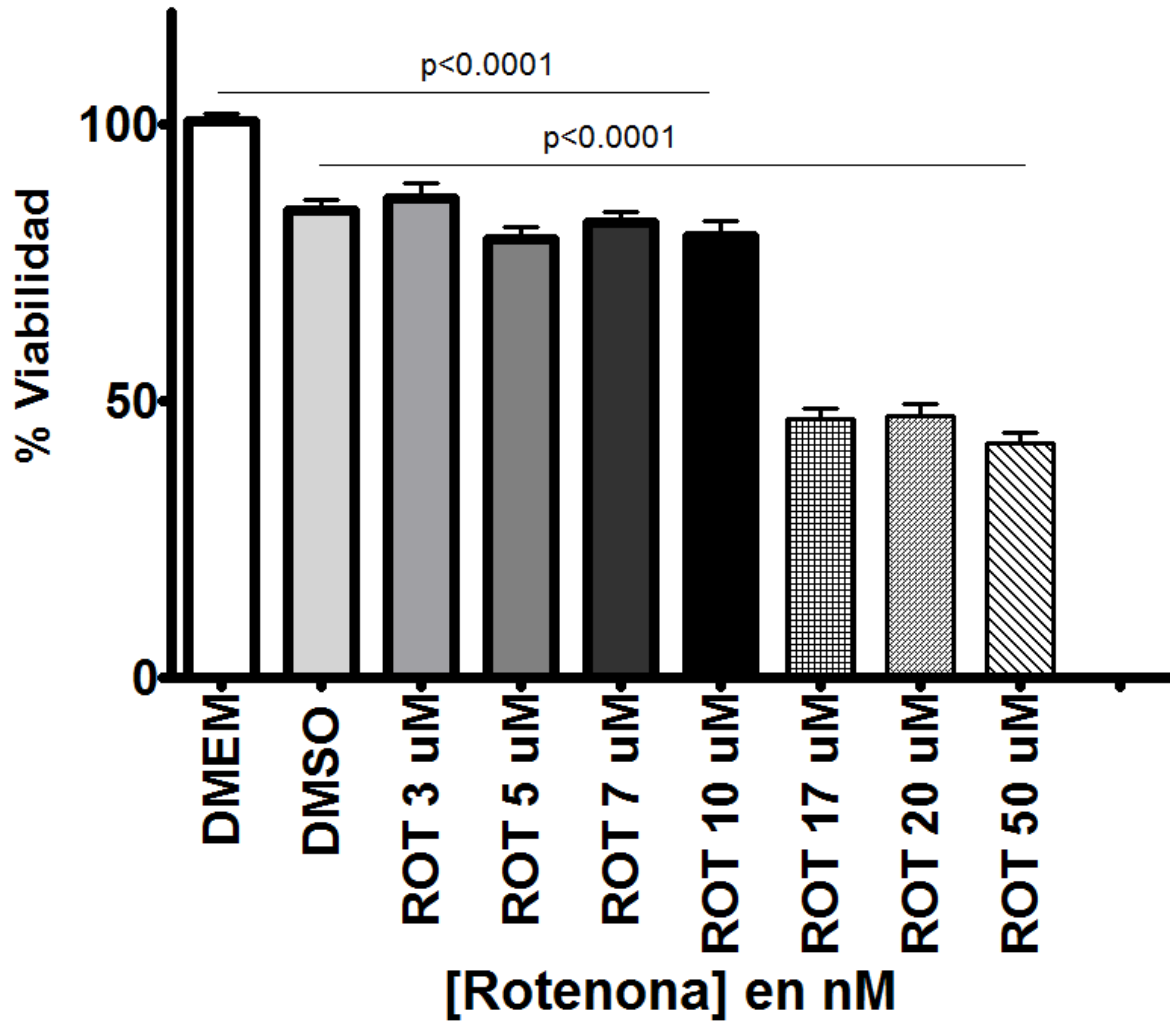


Figura Anexa 1. Curva de viabilidad para 48 h con rotenona. 50 uM de rotenona por 48 h, redujo la viabilidad en un 58%.

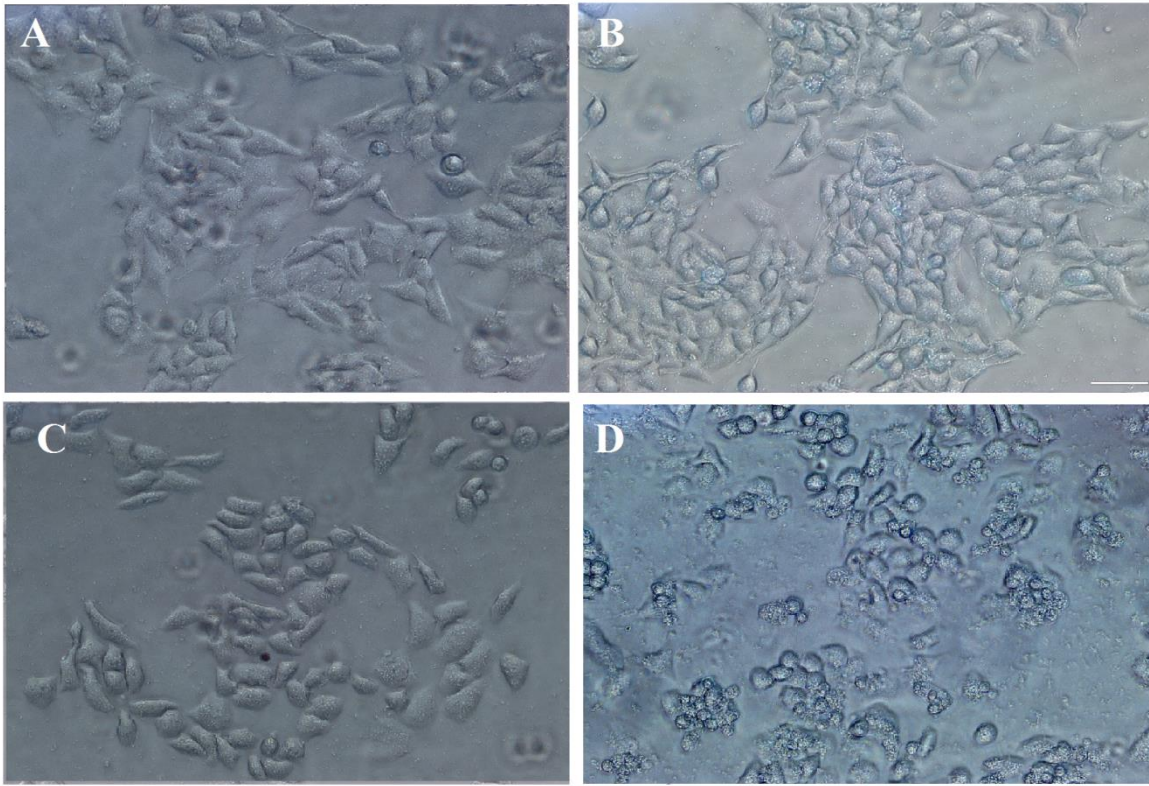


Figura Anexa 2. Efectos del PDGF y la rotenona sobre la morfología (20X). Imágenes representativas de los efectos de los distintos tratamientos sobre los cambios morfológicos en un aumento mayor. **A.** Control **B.** PDGF-BB **C.** PDGF + Rotenona **D.** Rotenona. Barra de escala 50 μm .

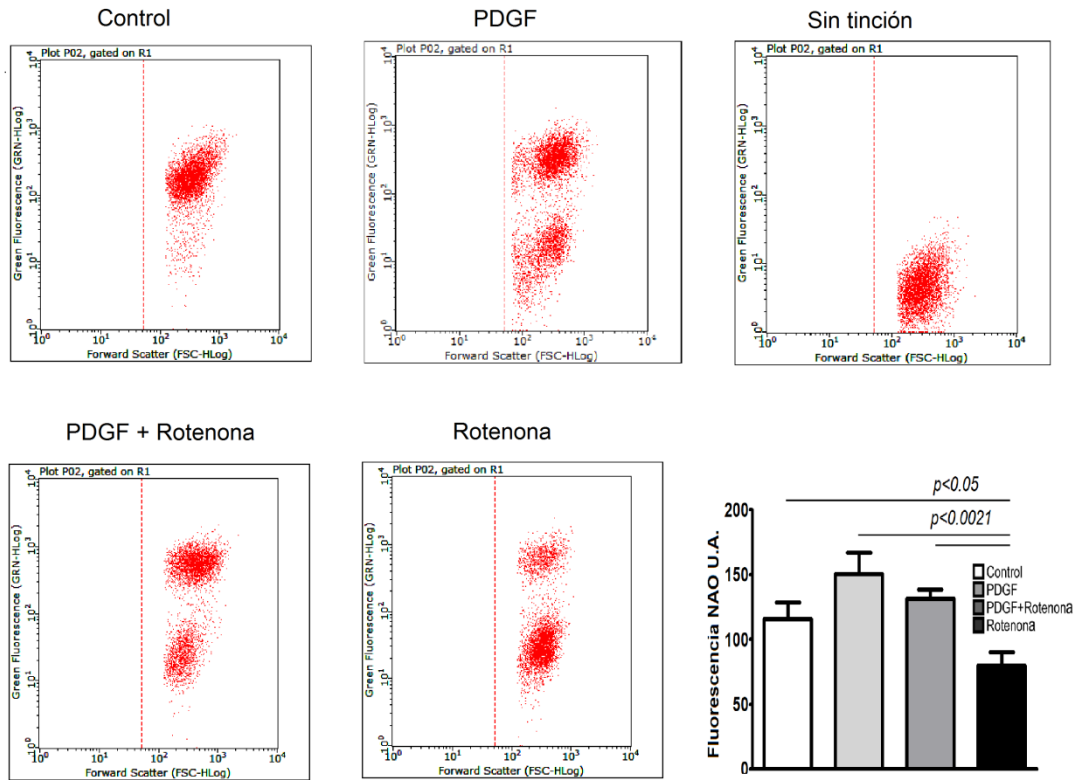


Figura anexa 3. Plots representativos de citometría de flujo para NAO. El gráfico de barras muestra el valor de la fluorescencia NAO en unidades arbitrarias. La rotenona disminuye significativamente (Control vs Rotenona, $p < 0.05$) el volumen mitocondrial. El tratamiento con PDGF-BB preserva el volumen mitocondrial frente a insulto por rotenona (PDGF vs Rotenona, $p < 0.0021$).

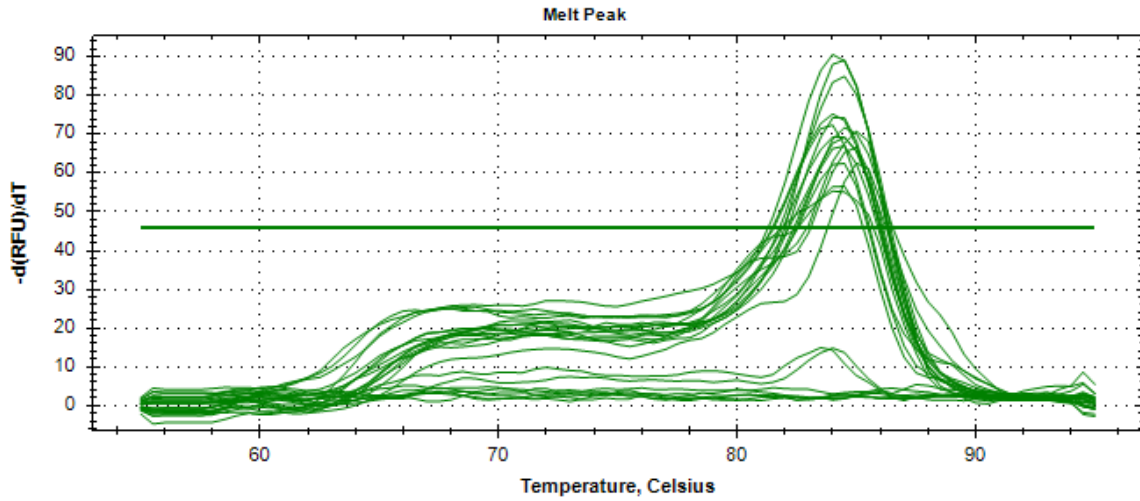


Figura anexa 4. Curva de fusión para gen *ngb* en programa Bio-Rad CFX Manager 3.1. En los resultados es de destacar que muestras con tratamiento idéntico fueron reproducibles en el análisis a nivel de réplica biológica adicionalmente el coeficiente de variación en replicados técnicos no superó el 3.6%.

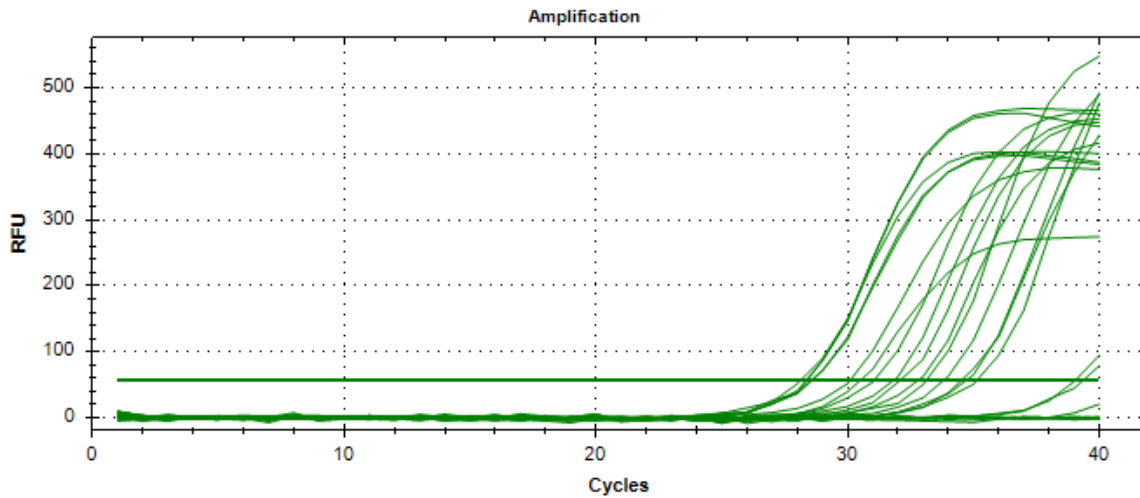


Figura anexa 5. Curvas de amplificación de *ngbl* para los distintos tratamientos.

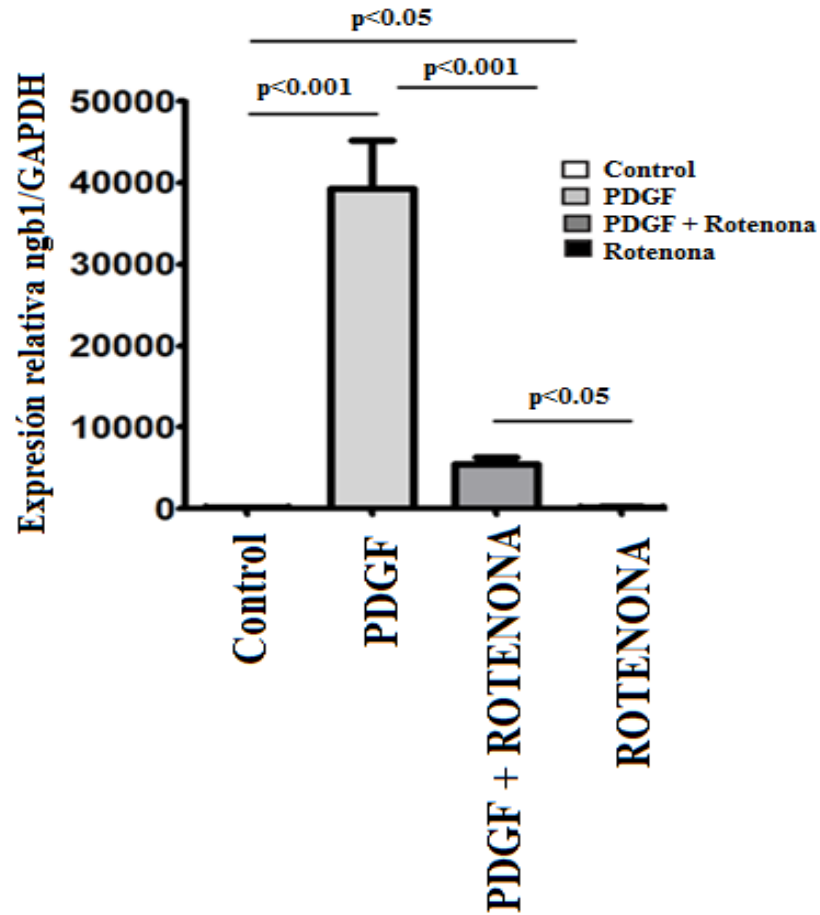


Figura anexa 6. Niveles de *ngb1* en células T98G, normalizados contra GAPDH. El PDGF-BB y el pretratamiento (PDGF + Rotenona) aumentan significativamente la expresión de *Ngb1* (PDGF-BB vs Control, $p < 0.001$ y PDGF-BB + Rotenona vs Control, $p < 0.05$), pero no rotenona ($p < 0.05$).

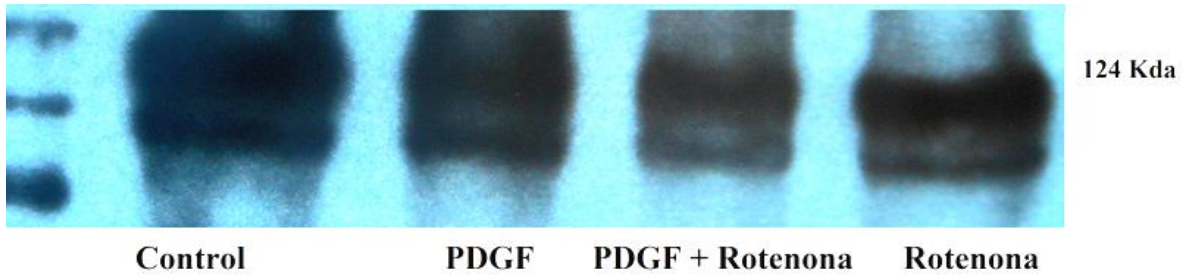


Figura anexa 7. Expresión del receptor PDGFR β de GFAP en células T98G por Western blot para los distintos tratamientos.

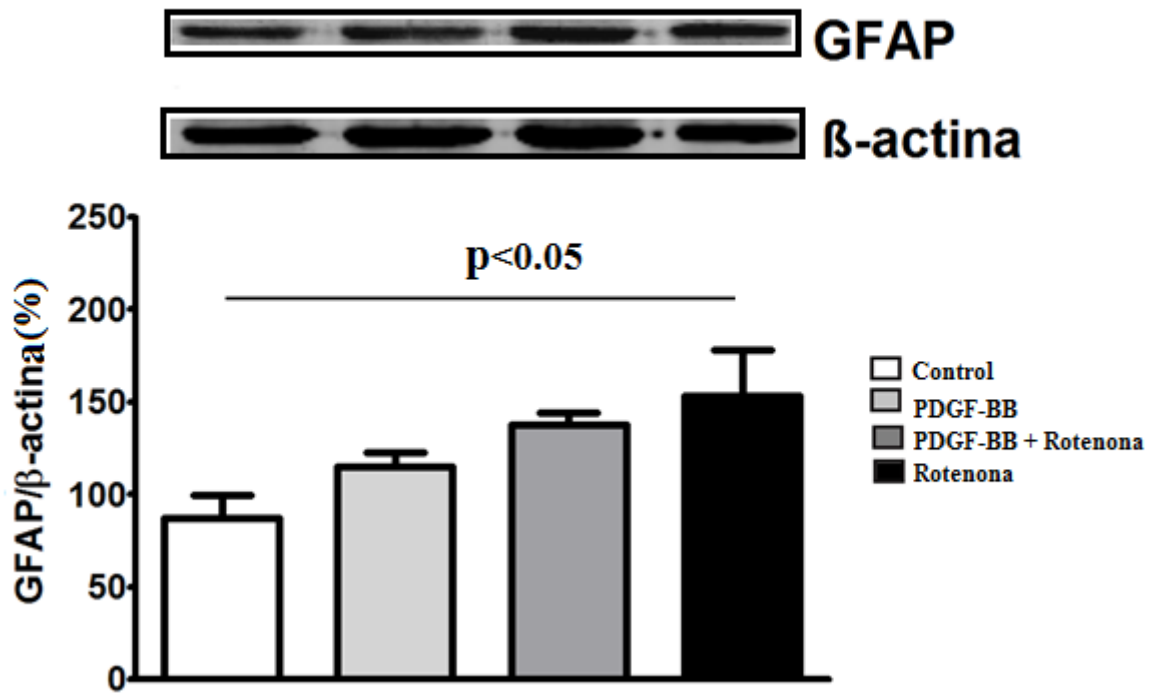


Figura anexa 8. Cuantificación de GFAP en células T98G por Western blot. La rotenona incrementa la expresión de GFAP en células T98G (Rotenona vs Control, $p < 0.05$).

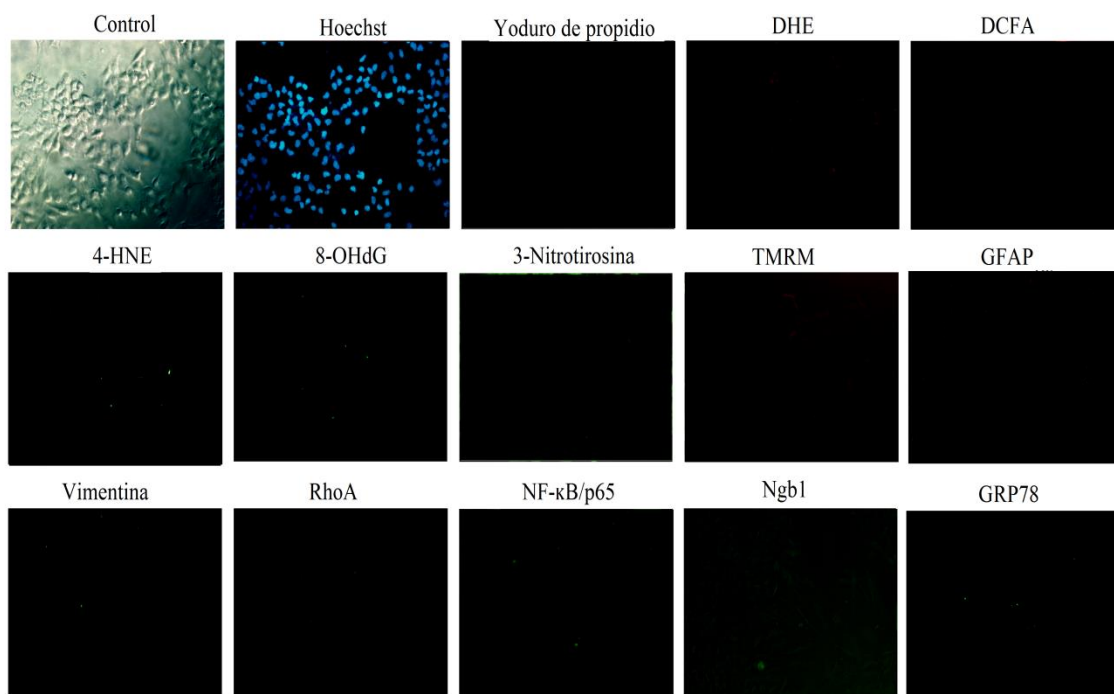


Figura anexa 9. Controles negativos para las diferentes tinciones y anticuerpos utilizados.

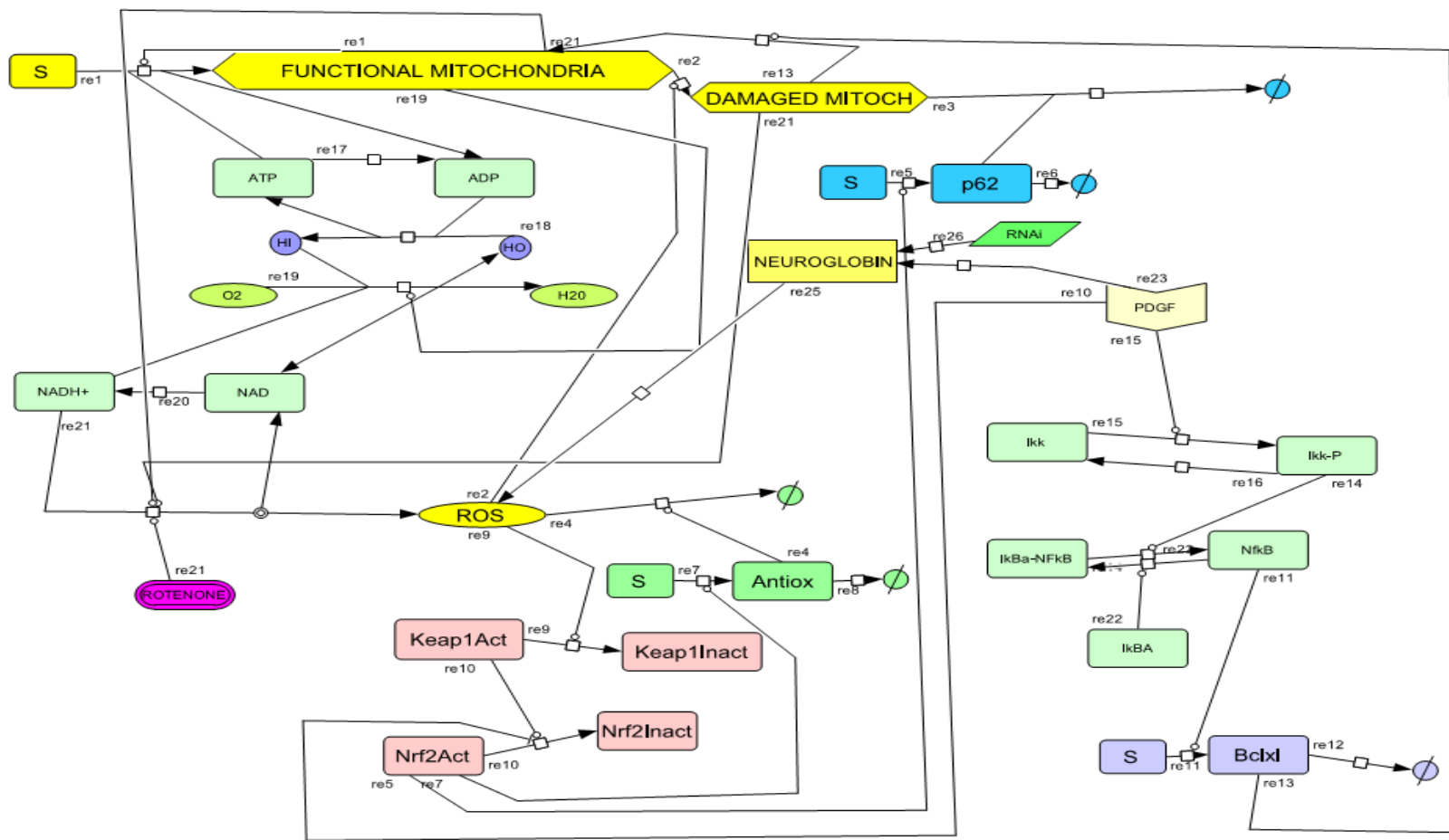


Figura Anexa 10. Representación gráfica del modelo computacional generado en el programa Cell Designer junto con las reacciones utilizadas.

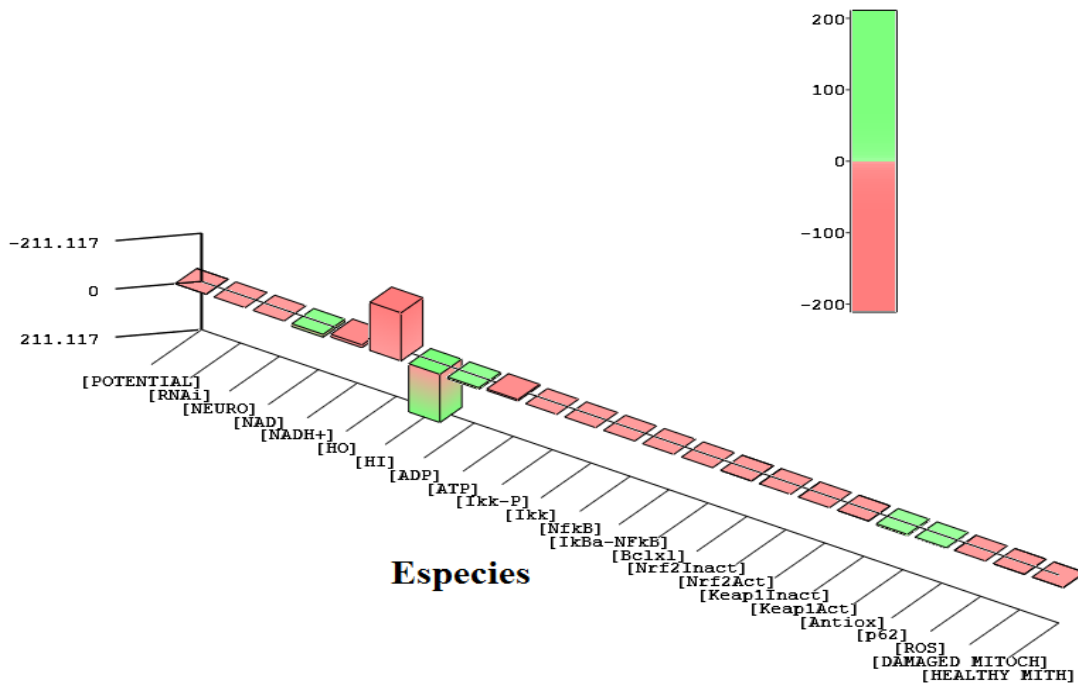


Figura Anexa 11. Análisis de sensibilidad para rotenona. La gráfica representa los cambios ejercidos por el incremento en las concentraciones de rotenona sobre las otras especies (verde incrementos en las concentraciones, rojo disminución en las concentraciones). La barra de escala representa la sensibilidad positiva (verde) o negativa (roja) normalizada respecto al efecto de la rotenona.

[HEALTHY MITH]	-0.251027
[DAMAGED MITOCH]	-0.409087
[ROS]	0.722712
[p62]	2.96967
[Antiox]	5.87909
[Keap1Act]	-0.0661349
[Keap1Inact]	0.0661349
[Nrf2Act]	0.059242
[Nrf2Inact]	-0.059242
[Bclx1]	8.36153e-16
[IkBa-NFkB]	-1.45661e-10
[NFkB]	1.46205e-10
[Ikk]	1.13687e-09
[Ikk-P]	-1.14111e-09
[ATP]	-6.72958
[ADP]	6.72958
[HI]	211.117
[HO]	-211.117
[NADH+]	-12.3298
[NAD]	12.3298
[NEURO]	3.42879e-19
[RNAi]	0
[POTENTIAL]	-0.324531

Tabla Anexa 1. Valores numéricos del análisis de sensibilidad, para las modificaciones ejercidas con rotenona.

El análisis de sensibilidad sugiere que las principales especies afectadas de manera positiva (verde) por la rotenona son: incrementos en la concentración de ERO (ROS), concentración de antioxidantes ADP, protones internos mitocondriales ([HI]) y NAD. Por su parte, la rotenona afecta de manera negativa al $\Delta\psi_m$ [potential], la concentración de ATP, NAD y la concentración interna de protones [HO]. Estos resultados son congruentes con las reacciones y mecanismos afectados por la rotenona en el modelo computacional. Igualmente estos resultados son similares a lo que se observó experimentalmente en la línea astrocitaria T98G.

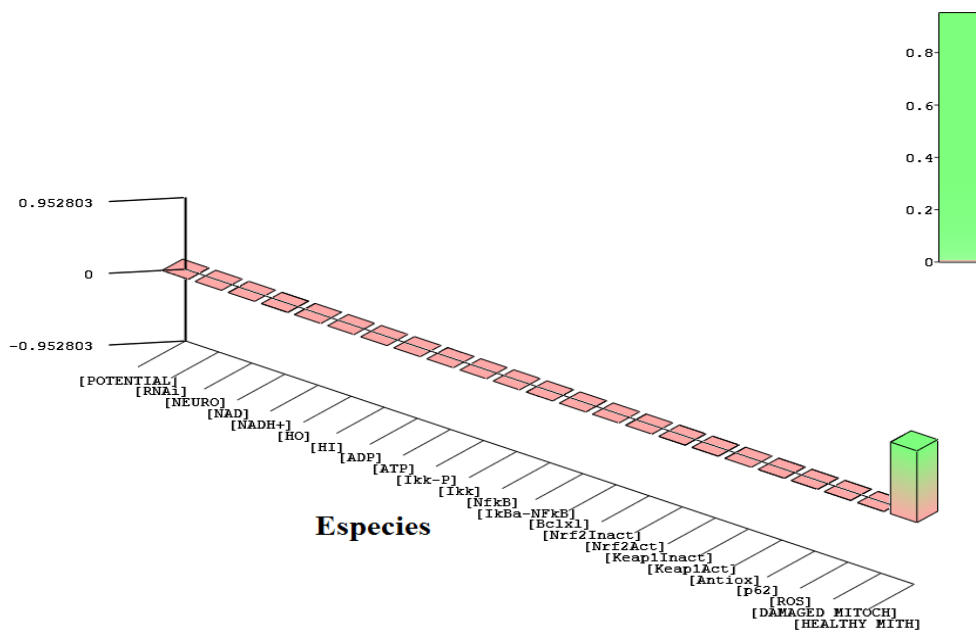


Figura Anexa 12. Análisis de sensibilidad para el PDGF-BB en el modelo computacional. La gráfica representa los cambios ejercidos por el PDGF-BB en las distintas especies del sistema (verde, incremento en concentración), rojo disminución en la concentración de una especie en el modelo. La barra de escala representa la sensibilidad positiva (verde) o negativa (roja) normalizada respecto al efecto del PDGF.

[HEALTHY MITH]	0.952803
[DAMAGED MITOCH]	0.000112385
[ROS]	9.41633e-06
[p62]	0.00042047
[Antiox]	0.00101193
[Keap1Act]	-1.91988e-05
[Keap1Inact]	1.91988e-05
[Nrf2Act]	9.18739e-06
[Nrf2Inact]	-9.18739e-06
[Bclxl]	1.94803e-17
[IkkBa-NFkB]	5.71423e-16
[Nfkb]	0
[Ikk]	-1.97401e-15
[Ikk-P]	0
[ATP]	2.2648e-09
[ADP]	-2.26471e-09
[HI]	-1.4867e-08
[HO]	1.48672e-08
[NADH+]	-0.000874134
[NAD]	0.000874134
[NEURO]	-1.87124e-06
[RNAi]	0
[POTENTIAL]	1.97542e-06

Tabla Anexa 2. Valores numéricos del análisis de sensibilidad para las modificaciones ejercidas con rotenona.

El análisis de sensibilidad sugiere que las principales especies afectadas de manera positiva por el PDGF son: la producción de antioxidantes, la concentración en mitocondrias funcionales (Healthy Mith), y p62. Se afecta ligeramente de manera negativa el NADH⁺ y Neuroglobina (NEURO) entre otros parámetros. Estos resultados son congruentes con los efectos producidos por el PDGF en el modelo computacional, los cuales también se pueden relacionar con lo observado en los experimentos con T98G.

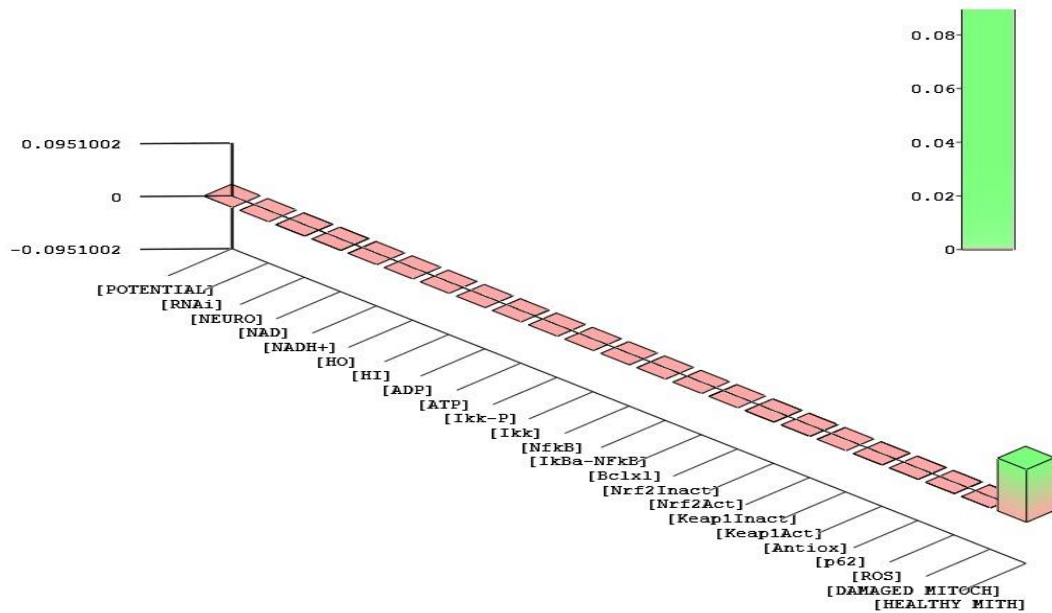


Figura Anexa 13. Análisis de sensibilidad para la concentración de antioxidantes en el modelo computacional. La gráfica representa los cambios ejercidos por la concentración de antioxidantes sobre las otras especies (verde, incremento en concentración), rojo disminución en la concentración de una especie en el modelo. La barra de escala representa la sensibilidad positiva (verde) o negativa (roja) normalizada respecto al efecto de la concentración de antioxidantes.

[HEALTHY MITH]	0.952803
[DAMAGED MITOCH]	0.000112385
[ROS]	9.41633e-06
[p62]	0.00042047
[Antiox]	0.00101193
[Keap1Act]	-1.91988e-05
[Keap1Inact]	1.91988e-05
[Nrf2Act]	9.18739e-06
[Nrf2Inact]	-9.18739e-06
[Bclxl]	1.94803e-17
[IkbA-NFkB]	5.71423e-16
[Nfkb]	0
[Ikk]	-1.97401e-15
[Ikk-P]	0
[ATP]	2.2648e-09
[ADP]	-2.26471e-09
[HI]	-1.4867e-08
[HO]	1.48672e-08
[NADH+]	-0.000874134
[NAD]	0.000874134
[NEURO]	-1.87124e-06
[RNAi]	0
[POTENTIAL]	1.97542e-06

Tabla Anexa 3. Valores numéricos del análisis de sensibilidad para las modificaciones ejercidas por la concentración de antioxidantes [Antiox] .

El análisis de sensibilidad sugiere que el principal efecto al incrementar la concentración de antioxidantes es un notable efecto positivo (verde) sobre la concentración de mitocondrias funcionales (Healthy Mith). Estos resultados son congruentes con las reacciones del modelo computacional, puesto que al incrementar la concentración de los antioxidantes (Antiox), el modelo reduce la concentración de ERO (ROS) y por ende la de las mitocondrias no funcionales (Damaged Mitoch), que se ve reflejado en el incremento consiguiente de las mitocondrias funcionales (Healthy Mith).

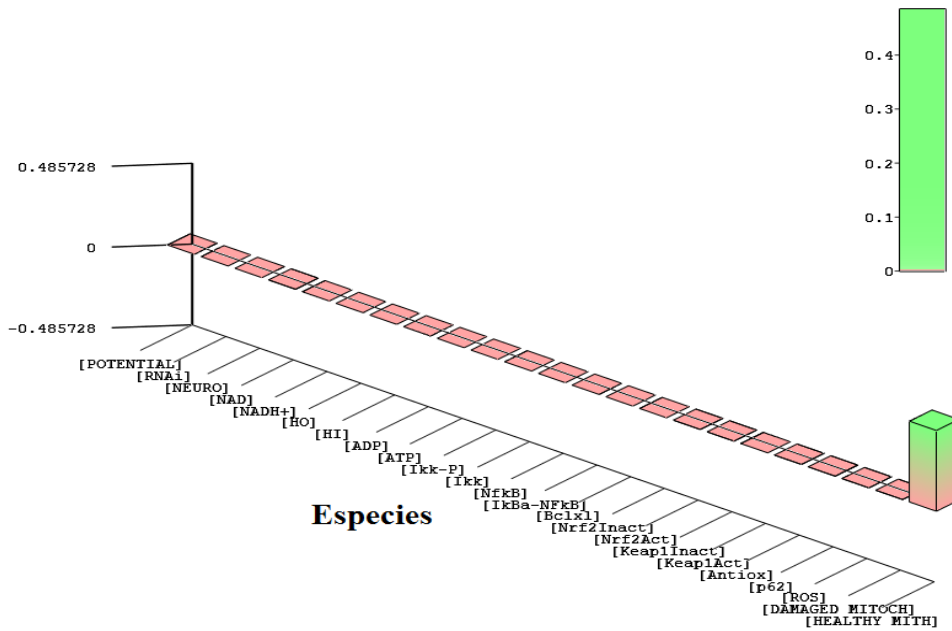


Figura Anexa 14. Análisis de sensibilidad para los efectos de neuroglobina (Neuro) en el modelo computacional. La gráfica representa los cambios ejercidos por la neuroglobina sobre las otras especies del sistema, en condiciones de fuerte estimulación con PDGF (200 nM) y bajas concentraciones de RNAi (verde, incremento en concentración), rojo disminución en la concentración de las especies en el modelo. El principal parámetro afectado es la concentración de mitocondrias funcionales (Healthy Mith), en el cual se observa un fuerte incremento en la concentración de esta especie [0.84802]. La barra de escala representa la sensibilidad positiva (verde) o negativa (roja) normalizada respecto al efecto de Neuroglobina.

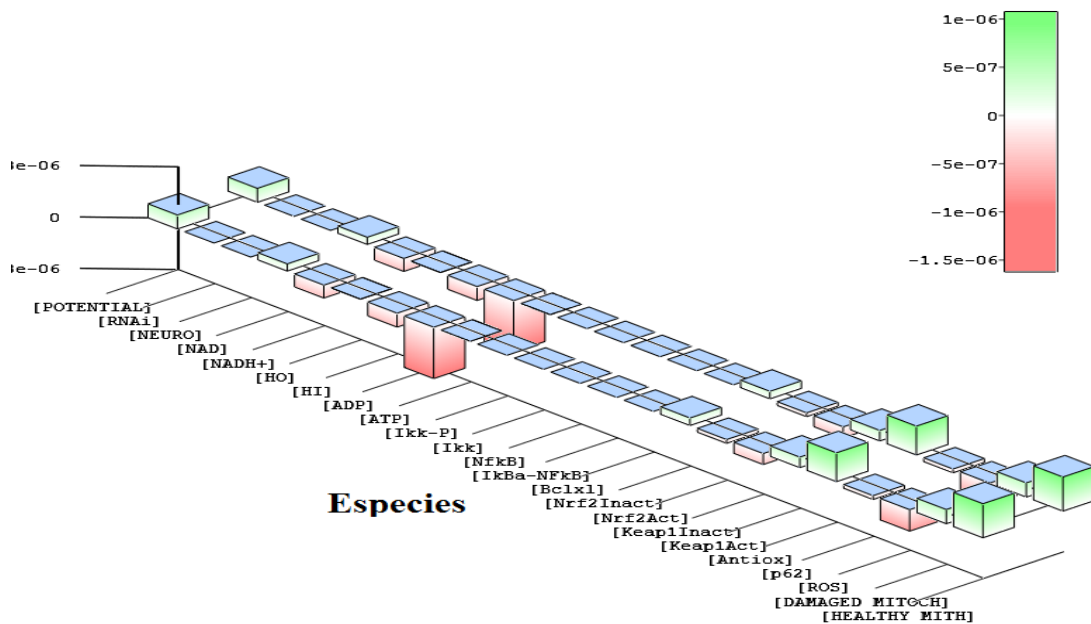


Figura Anexa 15. Análisis de sensibilidad para los efectos de neuroglobina (Neuro) en el modelo computacional: Efecto del RNAi. La gráfica representa los cambios ejercidos por la neuroglobina sobre las otras especies del sistema, en condiciones de fuerte estimulación con PDGF (200 nM) y un incremento en las concentraciones del RNAi (0 a 20 nM). En verde se muestran incrementos en la concentración de especies y en rojo disminución en la concentración de las especies. La barra de escala representa la sensibilidad positiva (verde) o negativa (roja) normalizada respecto al efecto de Neuroglobina.

[HEALTHY MITH]	1.07749e-06
[DAMAGED MITOCH]	4.48637e-07
[ROS]	-6.76114e-07
[p62]	-1.20436e-07
[Antiox]	9.11355e-07
[Keap1Act]	3.30574e-07
[Keap1Inact]	-3.45943e-07
[Nrf2Act]	-1.20031e-07
[Nrf2Inact]	2.37077e-07
[Bclxl]	0
[IkBa-NFkB]	1.51904e-13
[Nfkb]	0
[Ikk]	3.34732e-13
[Ikk-P]	0
[ATP]	1.05729e-11
[ADP]	-1.62293e-06
[HI]	-4.40223e-07
[HO]	1.46961e-09
[NADH+]	-4.08592e-07
[NAD]	2.27287e-07
[NEURO]	1.67063e-13
[RNAi]	0
[POTENTIAL]	4.41693e-07

Tabla Anexa 4. Valores numéricos del análisis de sensibilidad, para las modificaciones ejercidas por la neuroglobina [NEURO] en las distintas especies del modelo, durante un incremento del RNAi (0 a 20 nM), de acuerdo a la Figura Anexa 13. El análisis de sensibilidad sugiere que al incrementar el RNAi, disminuye de manera notable, el efecto de la neuroglobina sobre la concentración de mitocondrias saludables (Healthy Mith), disminuyendo la concentración en más de un 90% ($[1.077749 \times 10^{-6}]$) respecto a los valores de la Figura Anexa 12. Estos resultados son congruentes con las reacciones del modelo computacional, ya que la neuroglobina [Neuro] está involucrada en incrementos de las concentraciones de las mitocondrias funcionales (Healthy Mith).

ARTICULOS PUBLICADOS DERIVADOS DE LOS RESULTADOS

PDGF-BB Protects Mitochondria from Rotenone in T98G Cells

Ricardo Cabezas · Marcos Fidel Avila ·
Janneth González · Ramon Santos El-Bachá ·
George E. Barreto

Received: 20 October 2014 / Revised: 27 November 2014 / Accepted: 8 December 2014
© Springer Science+Business Media New York 2014

Abstract Rotenone is one of the most-studied neurotoxic substances as it induces oxidative stress processes both in cellular and animal models. Rotenone affects ATP generation, reactive oxygen species (ROS) production, and mitochondrial membrane potential in neurons and astrocyte-like cells. Previous epidemiologic studies have supported the role of neurotrophic factors such as BDNF and GDNF in neuroprotection mainly in neurons; however, only very few studies have focused on the importance of astrocytic protection in neurodegenerative models. In the present study, we assessed the neuroprotective effects of PDGF-BB against toxicity induced by rotenone in the astrocytic-like model of T98G human glioblastoma cell line. Our results demonstrated that pretreatment with PDGF-BB for 24 h increased cell viability, preserved nuclear morphology and mitochondrial membrane potential following stimulation with rotenone, and reduced ROS production nearly to control conditions. These observations were accompanied by important morphological changes induced by rotenone and that PDGF-BB was able to preserve cellular morphology under this toxic stimuli. These findings indicated that PDGF-BB protects mitochondrial functions, and may serve as a potential therapeutic strategy in rotenone-induced oxidative damage in astrocytes.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s12640-014-9509-5) contains supplementary material, which is available to authorized users.

R. Cabezas · M. F. Avila · J. González · G. E. Barreto (✉)
Departamento de Nutrición y Bioquímica, Facultad de Ciencias,
Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia
e-mail: gsampaio@javeriana.edu.co

R. S. El-Bachá
Departamento de Biofunção, Universidade Federal da Bahia,
Salvador, Bahia, Brazil

Keywords Rotenone · PDGF-BB · Mitochondria ·
Reactive oxygen species · Neuroprotection

Introduction

Rotenone is one of the most-studied neurotoxic substances used as a model for Parkinson disease (PD) and oxidative stress events in cellular and animal models (Betarbet et al. 2000; Greenamyre et al. 2003). This neurotoxin is a naturally occurring isoflavonoid produced in the leaves, roots, and rhizomes of tropical legumes from the genera *Derris*, *Lonchocarpus*, and *Tephrosia*. Rotenone serves as a high-affinity noncompetitive inhibitor of complex I, thus affecting ATP generation (Cabezas et al. 2012; Gyulkhandanyan et al. 2003). Previous epidemiological studies have supported the hypothesis that prolonged exposure to pesticides such as rotenone or paraquat is a risk factor for PD (Betarbet et al. 2000; Greenamyre et al. 2003; Tanner et al. 2011). For example, a recent case-control study from the NIH, which reviewed 110 PD cases and 358 controls, observed that PD incidence was increased 2.5 times in individuals while comparing the reported use of rotenone with nonusers (Tanner et al. 2011). Another study in agricultural workers from East Texas identified a significant increased risk (OR = 10.9) of PD with the continuous use of rotenone (Dhillon et al. 2008). Similarly, different groups have demonstrated that continuous systemic administration of rotenone to rats and mice reproduces key features of PD, including selective degeneration of the nigrostriatal dopaminergic system, microglial activation, formation of cytoplasmic inclusions in neurons, movement disorders, mitochondrial membrane potential lost, and mitochondrial damage (Betarbet et al. 2000; Greenamyre et al. 2003, 2010; Hoglinger et al. 2005; Ogawa et al. 2005).

Astrocytes play an important role in the maintenance of neuronal homeostasis by regulating neuronal function and metabolism (Barreto et al. 2011; Cabezas et al. 2012; Hamby and Sofroniew 2010; Volterra and Meldolesi 2005). Astrocytes are important sources of GSH (glutathione) and growth factors such as BDNF and GDNF, and are important for neuronal protection during neurodegenerative processes including traumatic brain injury, ischemia, and PD (Avila Rodriguez et al. 2014; Barreto et al. 2011; Cabezas et al. 2012, 2014; Giffard and Ouyang 2004; Hirsch et al. 2003; Torrente et al. 2013). A previous study indicated that astrocytes co-cultured with neurons increase neuronal viability during rotenone damage (Cao et al. 2007). In this context, astrocytic protection is of great importance for neuronal survival both during normal and pathological conditions. However, there is little information about rotenone effects on astrocytes and astrocytic-like models, such as T98G cells (glioblastoma). Previous studies have shown that different rotenone doses increase glial reactivity and ROS (reactive oxygen species) generation (Swarnkar et al. 2012), suggesting the importance of astrocytic protection during ROS processes such as that in PD development.

In the present study, we assessed the role of platelet-derived growth factor isoform B (PDGF-BB) in astrocytes treated with rotenone. PDGF-BB is widely expressed in different CNS tissues including neurons and astrocytes (Andrae et al. 2008; Krupinski et al. 1997). PDGF-BB is a dimeric protein of approximately 30 kDa, which belongs to the family of the PDGF/VEGF growth factor (vascular endothelial). At the moment, there are five identified compositions or dimeric isoforms: PDGF-AA, -BB, -AB, -CC, and -DD, and these isoforms show different abilities to bind and activate both tyrosine-kinase receptors for PDGF, PDGFR α , and PDGFR β (Andrae et al. 2008). Different isoforms of PDGF have been shown to exert a neuroprotective effect in dementia and oxidative insult in neurons against hydrogen peroxide (Peng et al. 2012; Zheng et al. 2010; Zhu et al. 2009). However, its potential neuroprotective effect in astrocytes, and its role in the regulation of rotenone-induced oxidative mechanisms have not been determined yet. In our experiments, we used human cell line T98G, as it has been broadly used in astrocytes research since they share many features with primary astrocytes and have been successfully used in our research group (Avila Rodriguez et al. 2014; de Joannon et al. 2000; Gasque et al. 1996; Stein 1979; Torrente et al. 2013).

Materials and Methods

Cell Culture

T98G cell line (human glioblastoma) was used as cell model system, where the stock was maintained under exponential

growth in DMEM (Lonza) culture medium, supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS) and antibiotics (penicillin/streptomycin and amphotericin; Lonza) at 37 °C and in a humidified atmosphere containing 5 % CO₂.

Drug Treatment

Cells were seeded in multiwell plates and allowed to grow for 24 h. Afterward, culture medium was serum deprived for 24-h prior drug treatment. Firstly, cells were incubated in DMEM without serum and treated with increasing concentrations of rotenone (Sigma-Aldrich, R8875) in 0.5 % DMSO (vehicle) for 24 and 48 h in order to obtain the optimum time and dose conditions in our experimental paradigm. In the following experiments, a concentration of 50 μ M rotenone for 24 h was selected (Supplementary Fig. 1). We observed that 0.5 % DMSO did not affect cell viability; therefore, subsequent experiments were carried out in DMEM as a control. In a second experiment, the best conditions of PDGF-BB treatment were chosen (Supplementary Fig. 2). In the following experiments, 200 ng/ml PDGF-BB (Sigma, P3201) was used prior to rotenone treatment.

Cell Viability and Nuclear Fragmentation

The effect of rotenone and PDGF-BB on T98G cell proliferation or viability was tested using MTT ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay (Sigma, St Louis, MO, USA). Cells were seeded into 96-well plates in the DMEM culture medium containing 10 % bovine fetal serum at a seeding density of 10,000 cells per well. Afterward, cells were serum deprived for 24 h, and finally treated according to different experimental paradigms. Viability and/or proliferation were assessed at 24 and 48 h following treatments by adding MTT solution for 3 h, and the absorbance was read at 490 nm. Each assay was performed with a minimum of six replicate wells for each condition. In addition, cells were stained with propidium iodide (PI, 50 μ g/ml).

To visualize nuclear morphology, cells were washed twice with 1 mM PBS after the treatments and then fixed in 4 % paraformaldehyde for 10 min. Cells were permeabilized with 1 % Triton X-100, diluted in PBS with 2.5 % serum, for 20 min at room temperature (RT), and stored at -20 °C. The cells were then stained with 2.5 mg/ml DNA dye Hoechst 33258 in PBS for 20 min at RT and analyzed by fluorescence microscopy (Olympus IX53 microscope—ex/em 340/510 nm) using a 20X objective. Viable healthy human astrocytic T98G cells nuclei were uniformly stained. The number of cells that showed nuclear fragmentation nuclei was determined in at least eight randomly selected areas (0.03 mm²) from each experimental group. The experiment was repeated three times. Data were expressed as a percentage of nuclear fragmented cells

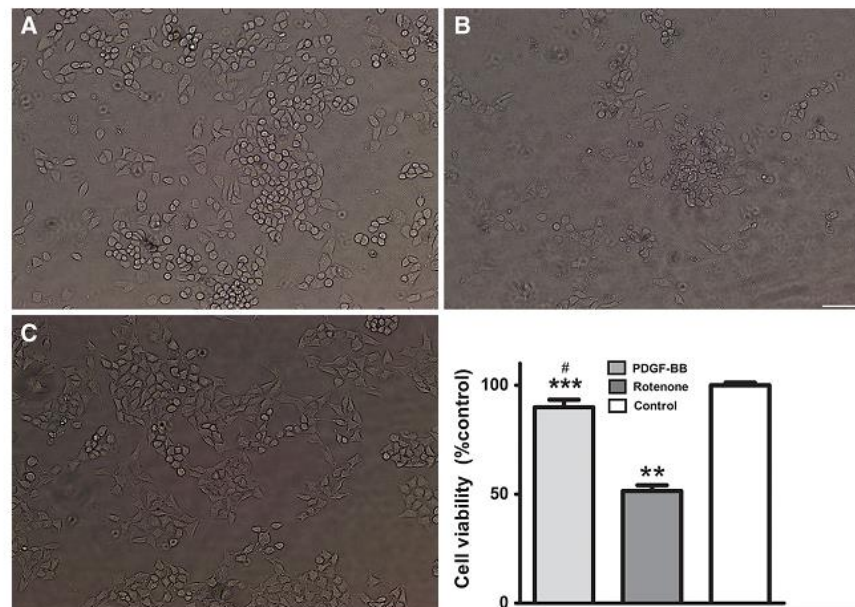


Fig. 1 Protective effects of PDGF-BB against rotenone damage. Data are expressed as percentage of control. **a** 200 ng/ml of PDGF-BB pretreatment showed a high recovery against **b** rotenone-induced

effect on cell viability in comparison to **c** control. *** $p < 0.0001$, PDGF-BB versus rotenone; ** $p < 0.0001$, rotenone versus control; # $p < 0.05$, PDGF-BB versus control. Scale bar 50 μm

relative to the value in control cultures. The percentage of condensed/fragmented nuclei was determined on six replicates for each condition and normalized to controls.

Morphometric Analysis

The images were analyzed and processed using Image J software, version 1.47v. Black and white images were analyzed to assess cell area. Cells were selected randomly using a scale generated automatically (available at <http://www.random.org/integers>). The number of cells was estimated using the fractionator/dissector method by manually counting the number of cells in an area of 0.03 mm². Cell area was calculated by randomly selecting cells from the images. Data were acquired from at least six independent cultures with a minimum of 20 cells for each condition.

Image Mean Fluorescence Calculation

The calculation of Mean fluorescence of the images was assessed using ImageJ version 1.47v (Bankhead 2013) as follows: the images were opened in the software and pre-processed eliminating the background; subsequently, cells were randomly chosen via a numbered grid assigned. 20

cells were randomly selected to Mean Fluorescence calculation, and the average of eight images for each treatment were statistically analyzed. Using the Measure algorithm of ImageJ and selecting each cell manually via ROI's Management, the data were grouped and subsequently analyzed. There were no variations in the conditions of the imaged process, such as gain of the mercury lamp, time of exposure, and fluorochrome bleach. Each assay was performed with a minimum of six replicate wells for each condition. The area of each randomly selected cell was calculated using ImageJ, so the scale to calibrate ImageJ software was settled, by measuring a known distance; subsequently, the thresholds of the images were adjusted to analyze particles using the ImageJ algorithm to generate the data (range of particle size: 100–1,000 nm²). Cells were counted in an area of 0.03 mm². The mean cell area was calculated for each experimental group in at least six independent cultures ($N = 6$) run in triplicate with a minimum of 20 cells being analyzed for each condition.

Determination of Reactive Oxygen Species (ROS)

Reactive oxygen species production was evaluated by fluorescence microscopy as previously described (Avila

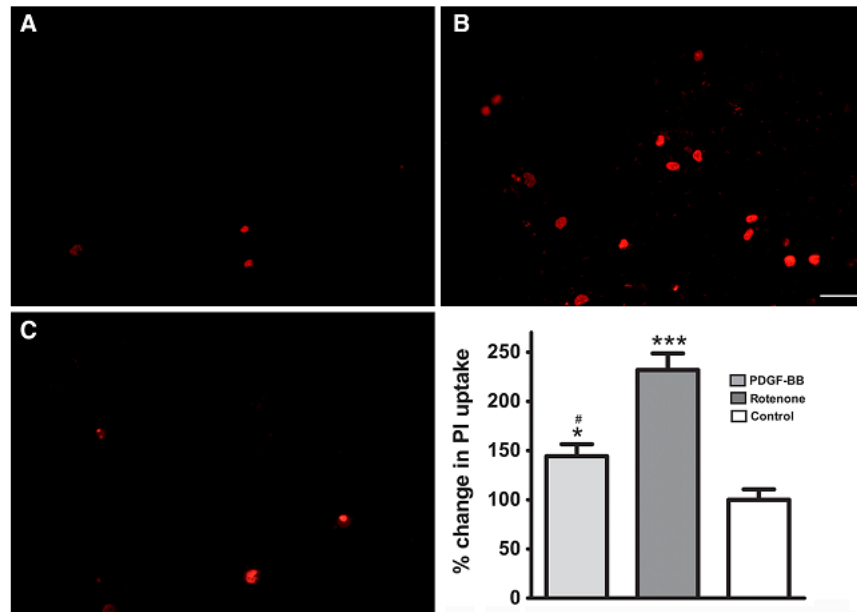


Fig. 2 PDGF-BB pretreatment protects cell viability against rotenone damage by PI staining. Data are expressed as percentage of cells expressing PI when are treated with **a** PDGF-BB pretreatment,

b rotenone or **c** control. * $p < 0.0001$, PDGF-BB versus rotenone; *** $p < 0.0001$, rotenone versus control; # $p < 0.05$, PDGF-BB versus control. Scale bar 50 μm

Rodriguez et al. 2014). In brief, cells were seeded at a density of 25,000 cells per well into 24-wellplates in DMEM culture medium containing 10 % FBS and then were treated according to each experimental paradigm after 24 h of serum deprivation. To measure the effect of PDGF-BB and rotenone on superoxide (O_2^-) and oxygen peroxide (H_2O_2) production, cells were treated in the dark at 37 °C for 30 min with 10 mM dihydroethidium (DHE; Sigma) or 1 mM 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA), respectively. Then, cells were washed twice with PBS and photographed in an Olympus I53X fluorescence microscope. The images were processed with ImageJ software, and the mean fluorescence intensity was determined as described above for fluorescence microscopy. Each assay was performed with a minimum of six replicates for each condition. The experiment was repeated three times.

Determination of Mitochondrial Membrane Potential

Mitochondrial membrane potential was evaluated using tetramethyl rhodamine methyl ester (TMRM). TMRM is a cell-permeate, cationic fluorescent dye sequestered by

active mitochondria. After 24 h of established treatments, cells were loaded in the dark with 500 nM TMRM at 37 °C for 20 min. Thereafter, cells were washed with PBS to eliminate all the unsequestered dye, and imaged as described above. As experimental control, we used the protonophoric uncoupler carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazine (CCCP; Sigma-Aldrich; 10 mM) to dissipate the membrane potential and define the baseline for the analysis of mitochondrial potential.

Determination of Mitochondrial Volume

Mitochondrial mass was evaluated using Nonyl Acridine Orange (NAO), a cell permeate, cationic fluorescent dye sequestered by active mitochondria (Oliva et al. 2011). After 24 h of treatments, cells were loaded in the dark with 5 μM NAO at 37 °C for 20 min. Thereafter, cells were washed with PBS to eliminate all the unsequestered dye. As experimental control, we used 500 μM rotenone to create a disturbance in mitochondrial membrane and increase the cardiolipin oxidation. Mitochondrial volume was further evaluated by flow cytometry in a GuavaR Easy Cyte™ (Millipore) cytometer.

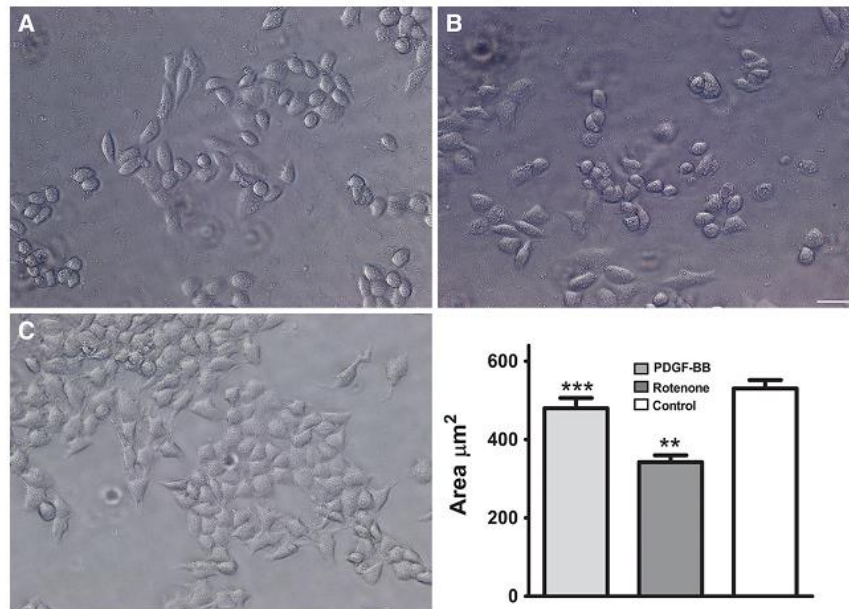


Fig. 3 Protective effects of PDGF-BB pretreatment on cellular morphology. *Bar graph* shows the changes in cell area (μm^2) for the different treatments. **a** PDGF-BB pretreatment significantly

preserved the cell mean area compared with **b** rotenone-treated cells. *** $p < 0.0001$, PDGF-BB versus rotenone; ** $p < 0.0001$, rotenone versus control. *Scale bar* 50 μm

Statistical Analysis

Data obtained from this study were tested for normal distribution by Kolmogorov–Smirnov test and homogeneity of variance by Levene’s test. Then, data were examined by analysis of variance, followed by Dunnett’s post hoc test for comparisons between controls and treatments and Tukey’s post hoc test for multiple comparisons between the means of treatments and time points. Data are presented as mean \pm SEM. A statistically significant difference was defined at $p < 0.05$.

Results

PDGF-BB Increased Cell Viability Against Rotenone Injury in T98G Cells

The isoflavonoid rotenone has been used in various animals and cellular models of neurodegeneration, as it increases ROS production and serves as a high-affinity noncompetitive inhibitor of complex I, thus affecting ATP generation and cell viability (Greenamyre et al.

2003, 2010). Previous studies have shown that rotenone induces apoptotic responses in mesencephalic dopaminergic cells, lymphocytes, and the neuroblastoma cell line SH-SY5Y (Avila-Gomez et al. 2010; de Oliveria et al. 2009, 2011).

Initially, we established the optimum experimental conditions of rotenone injury. Our findings indicated that the IC₅₀ of rotenone was 50 μM at 24 h (Supplementary Fig. 1). Similarly, we found that the best protective conditions for PDGF-BB against rotenone damage were observed when the compound at 200 ng/ml was administered 24 h prior to rotenone insult (Supplementary Fig. 2). PDGF-BB pretreatment for 24 h increased the cell viability by 39 % in comparison with cells treated with rotenone alone (Fig. 1). This result was later confirmed by assessing PI uptake (50 ng/ml) in T98G cells treated with both rotenone and PDGF-BB (Fig. 2). Rotenone caused a significant increase in PI uptake when compared with cells treated with PDGF-BB (131.8 ± 16.92 vs. 44.3 ± 12.14 %; $p < 0.0001$). Based on these preliminary results, we used these parameters (rotenone and PDGF-BB concentrations and time of administration) in the next experiments.

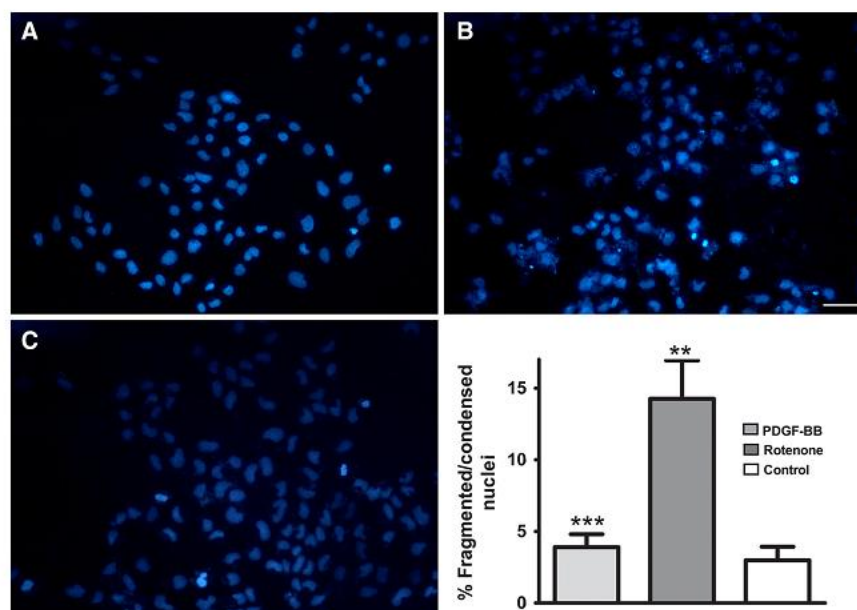


Fig. 4 PDGF-BB pretreatment decreased the number of condensed nuclei following rotenone insult. **a** PDGF-BB pretreatment significantly reduced the number of condensed and fragmented nuclei

compared with **b** rotenone-treated cells. $***p < 0.0001$, PDGF-BB versus rotenone; $**p < 0.0001$, rotenone versus control. Scale bar 50 μm

PDGF-BB Decreased Morphological Changes Induced by Rotenone

Previous studies have reported a positive correlation between cell viability and morphology (Avila Rodriguez et al. 2014; Xiong et al. 2006), also indicating that augmented oxidative stress may induce important morphological changes. Next we evaluated whether PDGF-BB was able to preserve cell morphology under inflammatory oxidative stress with rotenone. We observed a qualitative shrinkage of the cell body and processes when cells are exposed to rotenone (Fig. 3). Importantly, PDGF-BB-pretreated cells resulted in a preserved cellular mean area in comparison with cells exposed to rotenone only (480 ± 26.09 vs. $364.20 \pm 17.47 \mu\text{m}^2$; $p < 0.0001$). Furthermore, no significant difference was observed in cells treated with PDGF-BB in respect of controls ($p > 0.05$). These results suggested that PDGF-BB effectively preserved cell morphology against rotenone.

To further investigate the mechanisms of protection found in the previous evidences, we assessed the effect of PDGF-BB on nuclear condensation and fragmentation under rotenone treatment by Hoechst 33258 staining. Previous studies have suggested that rotenone induced the nuclear condensation and fragmentation in different cell models, this event being

described as the first indication of apoptotic process in the nervous system cells (Swarnkar et al. 2012; Watabe and Nakaki 2004). Figure 4 shows that 24 h of rotenone treatment increased the nuclear condensation and fragmentation in T98G cells compared with control ($p < 0.0001$). In contrast, PDGF-BB pretreatment significantly attenuated the number of fragmented nuclei compared with rotenone only (3.89 vs. 14.26 %, respectively; $p < 0.0001$). No significant difference was detected between PDGF-BB and control ($p > 0.05$).

PDGF-BB Reduced ROS Levels in Cells Stimulated with Rotenone

One of the main damage exerted by rotenone is an increase in the production of ROS, especially superoxide anions and peroxides (Dick 2006). Rotenone induced a significant increase of 46.40 % on ROS production measured by DHE ($p = 0.0013$). On the other hand, PDGF-BB pretreatment maintained superoxide production in a level similar to that observed in control (98.72 vs. 100 %, respectively; Fig. 5).

To further assess the protective mechanism of PDGF-BB, we determined the changes exerted by this growth factor on hydrogen peroxides by measuring DCFH-DA fluorescence. Rotenone induced a significant increase on

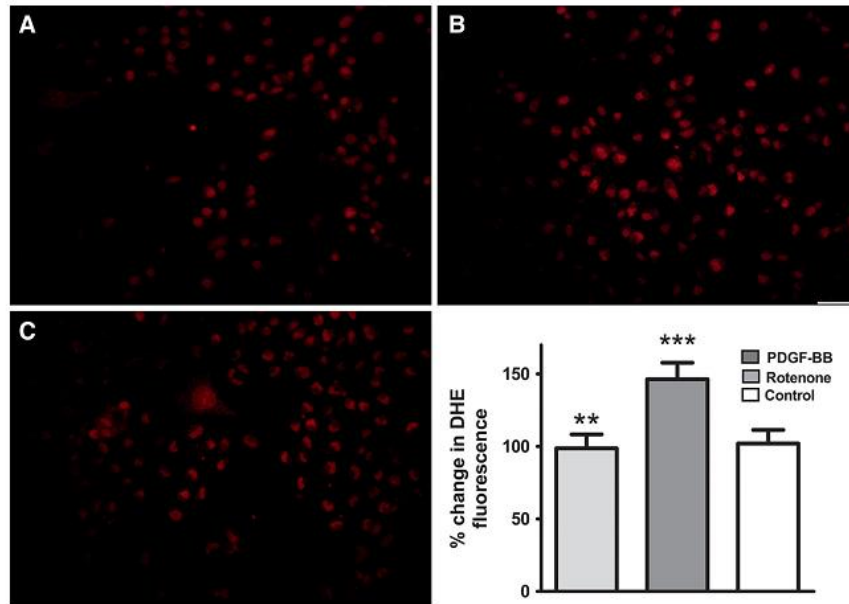


Fig. 5 PDGF-BB pretreatment reduced ROS production against rotenone. The bar graphs show the mean values of DHE fluorescence of cells treated with **a** PDGF-BB, **b** rotenone **c** and control.

** $p < 0.0013$, PDGF-BB versus rotenone; *** $p < 0.0014$, rotenone versus control. Scale bar 50 μm

peroxide production of 75 % ($p < 0.0001$) compared with control. PDGF-BB pretreatment, however, reduced peroxide fluorescence ($p < 0.0001$, Fig. 6), further corroborating the protective effect of PDGF-BB on ROS production.

PDGF-BB Partially Reversed the Mitochondrial Membrane Potential $\Delta\psi_m$ Decrease in Rotenone-Insulted Cells

The mitochondrial membrane potential $\Delta\psi_m$ was evaluated using TMRM staining, a technique that let us to assess the proportion of cells with loss of the $\Delta\psi_m$. Figure 7 shows that after 24-h rotenone treatment, T98G cells had a drastic drop on the $\Delta\psi_m$ compared with control (42.57 ± 4.02 vs. 100 %, respectively; $p < 0.0001$). PDGF-BB pretreatment partially preserved $\Delta\psi_m$ (62.00 ± 4.80 %, $p < 0.05$), suggesting an effect of PDGF-BB on mitochondrial potential membrane protection.

PDGF-BB Reduced Rotenone-Damaging Effects on Mitochondrial Volume

Finally, we aimed to evaluate the mitochondrial volume using NAO, as this is a widely used agent for the

assessment of changes in mitochondrial lipid peroxidation during apoptotic processes, and could provide additional information regarding the effect of PDGF-BB pretreatment on mitochondrial preservation (Oliva et al. 2011). After 24-h rotenone insult, we observed a great reduction on NAO fluorescence compared with PDGF-BB (61.73 ± 3.89 vs. 31.10 ± 5.84 %, $p < 0.0001$; Fig. 8). This effect was later confirmed by flow cytometry for NAO (Fig. 9). This result provides further confirmation of PDGF-BB effect on mitochondrial protection.

Discussion

The importance of growth factors in neuroprotection has been widely assessed in previous research mainly in neuronal models, as they are important for CNS homeostasis, differentiation, and survival (Falk et al. 2009; Lee et al. 1997; Mattson et al. 1997; Safi et al. 2012). Growth factors such as BDNF and bFGF have shown to protect neurons against excitotoxicity through the increased expression of antioxidant enzymes such as Mn-SOD and glutathione reductase (Lee et al. 1997; Mattson et al. 1997). Furthermore, previous studies have demonstrated that different

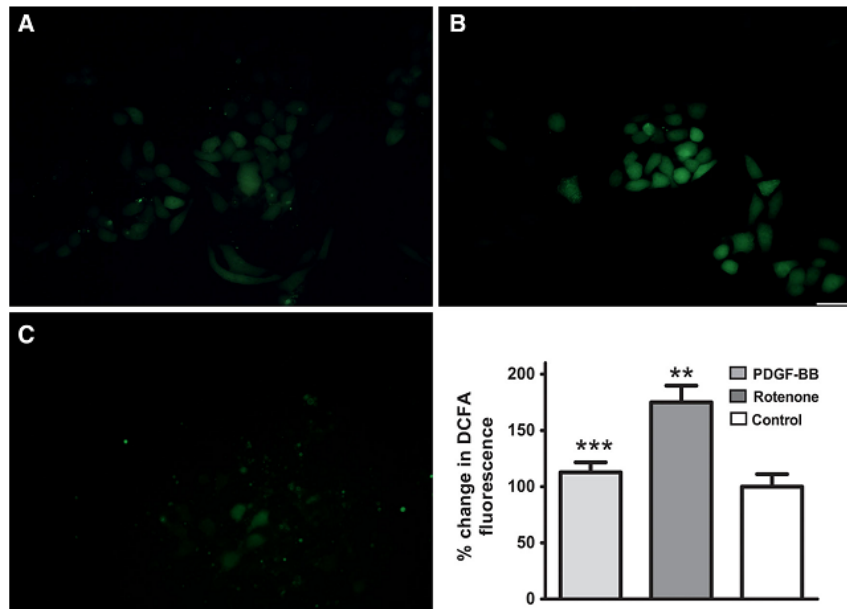


Fig. 6 PDGF-BB pretreatment attenuated peroxide production after rotenone treatment. *Bar graph* shows the values of DCF fluorescence when cells are exposed to **a** PDGF-BB, **b** rotenone, and

c controls. *** $p < 0.0001$, PDGF-BB versus rotenone; ** $p < 0.0001$, rotenone versus control. *Scale bar* 50 μm

PDGF isoforms can protect neuronal cells against different insults such as H_2O_2 , VIH TAT toxin, and 6-OHDA (Tang et al. 2010; Zheng et al. 2010; Zhu et al. 2009). Despite the vast data on neuronal protection induced by these compounds, very few studies have focused on the protective mechanisms of growth factors in non-neuronal cells such as astrocytes. Astrocytes are important for the physiological regulation of neurons through the release of growth factors like NGF and bFGF, antioxidant molecules such as glutathione, and clearance of toxic α -synuclein, and glutamate. However, these astrocytic functions become greatly affected during the development of neurodegenerative diseases, thus resulting in an increased neuronal death (Barreto et al. 2011; Rappold and Tieu 2010), suggesting the importance of astrocyte protection during neurodegeneration. In the present study, we used the astrocyte-like model T98G glioblastoma cells, and assessed some effects of PDGF-BB on mitochondrial functions following rotenone treatment. This is the first study to assess the role of PDGF-BB on astrocytes-like cells under rotenone-induced oxidative stress. Our results indicated that PDGF-BB decreased the neurotoxic effects of rotenone on T98G cell death, nuclear fragmentation, free radicals' production,

mitochondrial membrane's potential, and morphology and suggest that glial cells may participate in the neuroprotective actions of PDGF-BB. This important effect of PDGF-BB in astrocytic protection is in agreement with the neuroprotective role of trophic factors, such as BDNF and bFGF, thus demonstrating the importance of growth factors in non-neuronal cellular protection (Lee et al. 1997; Mattson et al. 1997).

Rotenone has been widely used in neurotoxic models as it causes molecular and cellular processes similar to those observed in neurodegenerative disease like PD (Cabezas et al. 2012; de Oliveria et al. 2009, 2011; Greenamyre et al. 2003; Valverde et al. 2008). Rotenone has a direct effect on mitochondrial functions, including an interference with the electron transport chain, loss of mitochondrial membrane's potential, and ATP generation (Greenamyre et al. 2003; Sarafian et al. 2010; Simpkins et al. 2010). These cellular processes in turn cause the release of cytochrome C from the inner mitochondrial membrane, thus activating apoptotic effectors such as Bid, Bax, caspase 3, and 9 in neurons (Gyulkhandanyan et al. 2003; Swarnkar et al. 2012; Tiwari et al. 2011; Wang et al. 2011). Similarly, our experiments showed that 50 μM rotenone drastically affected cell

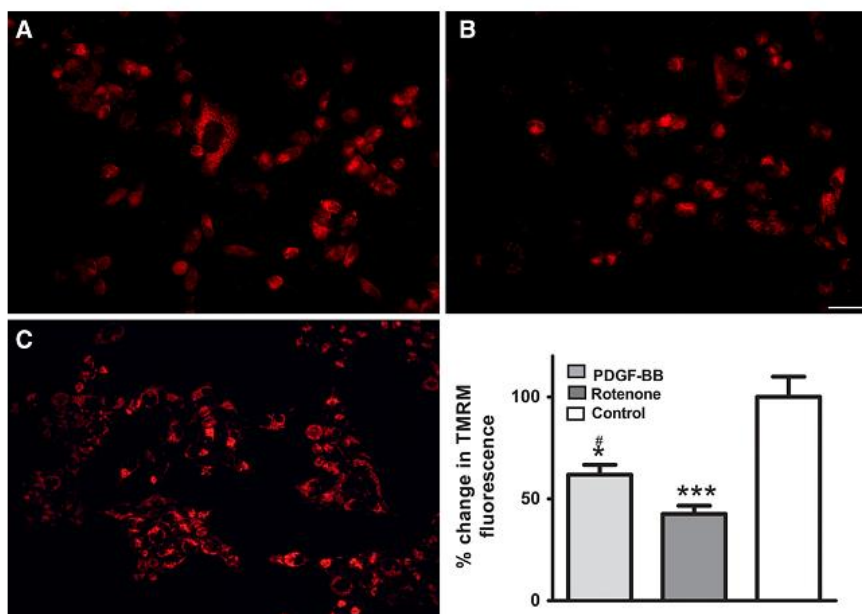


Fig. 7 PDGF-BB pretreatment partially preserved mitochondrial membrane potential in cells stimulated with rotenone. *Bar graph* shows the values of TMRM fluorescence of cells treated with

a PDGF-BB, **b** rotenone, and **c** controls. * $p < 0.05$, PDGF-BB versus rotenone; *** $p < 0.0001$, rotenone versus control. # $p < 0.0001$, PDGF-BB versus control. *Scale bar* 50 μ m

viability and PI uptake in T98G cells, thus confirming previous reports.

Our results suggest that PDGF-BB diminished the damaging effects of rotenone by preserving several functions in the cell, including viability, ROS production, and maintenance of mitochondrial functions. Importantly, PDGF-BB protective responses were more effective during pretreatment conditions. Previous studies in neuronal models have also shown that 24-h pretreatment with PDGF-BB exerts a significant protection against different insults such as hydrogen peroxide, glucose deprivation, and cytotoxic death in cultured neurons (Cheng and Mattson 1995; Tseng and Dichter 2005; Zheng et al. 2010). PDGF-BB preconditioning was shown to induce PDGFRB phosphorylation, followed by an activation of downstream effectors like PI3K/AKT and MAPK, an increase in antioxidant enzymes like catalase and glutathione peroxidase and increased expression of antiapoptotic genes like Bcl-xL and Bax (Cheng and Mattson 1995; Zheng et al. 2010). Our results have also shown that PDGF-BB protected against the morphological shrinking produced by rotenone insult, which may be strongly related with the observed changes in cell viability (Xiong et al. 2006). In this aspect, PDGF-BB has been involved

in cellular morphological regulation through the activation of actin fibers and GTP protein RhoA both in fibroblasts and endothelial cells (Ruusala et al. 1998), suggesting an effect of PDGF-BB on the maintenance of cellular morphology under rotenone insult. It is possible that PDGF-BB effects on T98G cells may signal through activation of PDGFR β , as previous studies indicated that this cell line has a higher expression of PDGFR β compared with PDGFR α isoform (Lokker et al. 2002; Potapova et al. 1996).

Mitochondria are critical organelles for cell survival and normal development, as they provide energy to the cell; are essential in ROS production; and are key regulators of apoptotic death (Simpkins et al. 2010). Moreover, the maintenance of mitochondrial properties in both neurons and astrocytes is of central importance during brain injury and neurodegeneration (Barreto et al. 2011; Greenamyre et al. 2003, 2010). The impairment of astrocytic mitochondrial functions, such as a decrease in ATP production or mitochondrial potential, has been correlated to increased neuronal damage in co-cultured models (Barreto et al. 2011; Voloboueva et al. 2007), thus demonstrating the importance of astrocytic mitochondrial maintenance during neuroprotection.

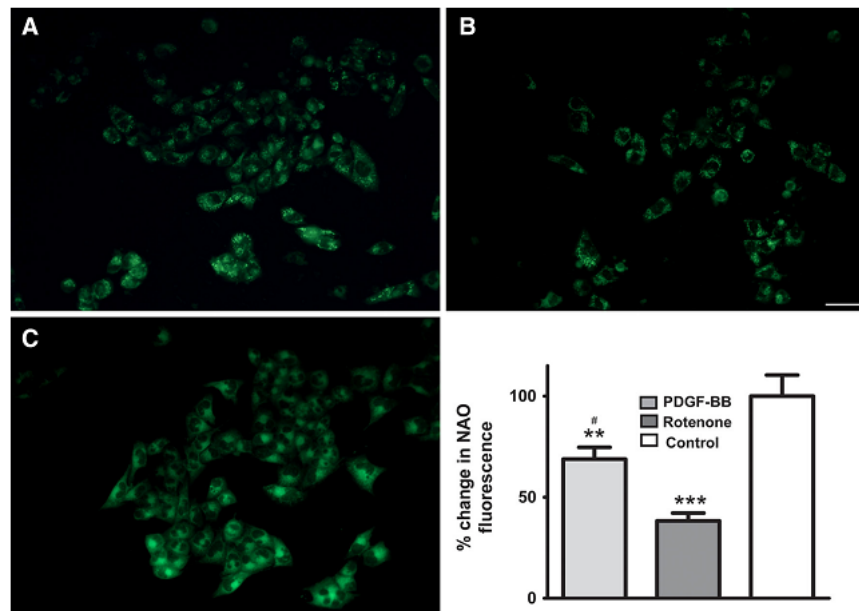


Fig. 8 PDGF-BB pretreatment preserved mitochondrial volume against rotenone. The *bar graph* shows the values of NAO fluorescence in cells pretreated with **a** PDGF-BB pretreatment

followed by **b** rotenone stimuli. $^{**}p < 0.05$, PDGF-BB versus rotenone; $^{***}p < 0.0001$, rotenone versus control; $^{\#}p < 0.05$, PDGF-BB versus control. *Scale bar* 50 μm

Few studies have shown the importance of PDGF-BB and other growth factors in mitochondrial regulation. The present study showed that PDGF-BB pretreatment reduced both superoxide and peroxide production induced by rotenone in T98G cells as quantified by DHE and DCFA-DA. Similarly, it has been shown that PDGF-BB suppresses peroxide accumulation in neurons and rescues cell viability against H_2O_2 , possibly through PI3K and MAPK activation followed by an increase in catalase, glutathione peroxidase, and GSH content (Cheng and Mattson 1995; Iantomasi et al. 1999; Zheng et al. 2010). The maintenance of $\Delta\psi_m$ is also essential for cell survival and ATP production, and its depolarization has been associated with damaging processes such as PD and metabolic injuries like glucose deprivation, similar to what is observed during rotenone insult (Avila Rodriguez et al. 2014; Barreto et al. 2011; Greenamyre et al. 2010; Perier and Vila 2012). Our findings also indicated that PDGF-BB protected the $\Delta\psi_m$ depolarization against rotenone in our astrocytic-like model. Similarly, Avila-Gomez et al. (2010) demonstrated that IGF-I pretreatment for 24 h protected the lymphocytes against rotenone by activation of PI-3K/Akt/ β -catenin, downregulation of p53 regulation, and maintenance of mitochondrial potential, suggesting a possible interaction

with the PI3K/AKT pathway and protection of mitochondrial function. It is possible that a similar mechanism may be playing a role in the observed protection of $\Delta\psi_m$ by PDGF-BB in our findings. However, further experiments are required to address this point. Similarly, our results by NAO demonstrated that PDGF-BB protected T98G cells against mitochondrial mass loss induced by rotenone. In this aspect, a previous study by Gossiau et al. (2001) have reported that PDGF-AB increased mitochondrial volume and surface area of mitochondrial cristae in injured fibroblasts determined by electron microscopy, suggesting an effect of PDGF-AB on mitochondrial preservation. Interestingly, various studies have reported that alterations in mitochondrial morphology and bioenergetic balance are associated to diseases such as type 2 diabetes, Huntington, and Parkinson diseases, demonstrating the importance of mitochondrial preservation in the development of neuropathologies (Arduino et al. 2011; Chaturvedi and Beal 2013; Perier and Vila 2012).

In conclusion, our results demonstrated the protective effects of PDGF-BB in the astrocytic-like model against rotenone-induced oxidative stress. PDGF-BB was also shown to improve mitochondrial protection, thus indicating that PDGF-BB signaling pathways may have an effect on

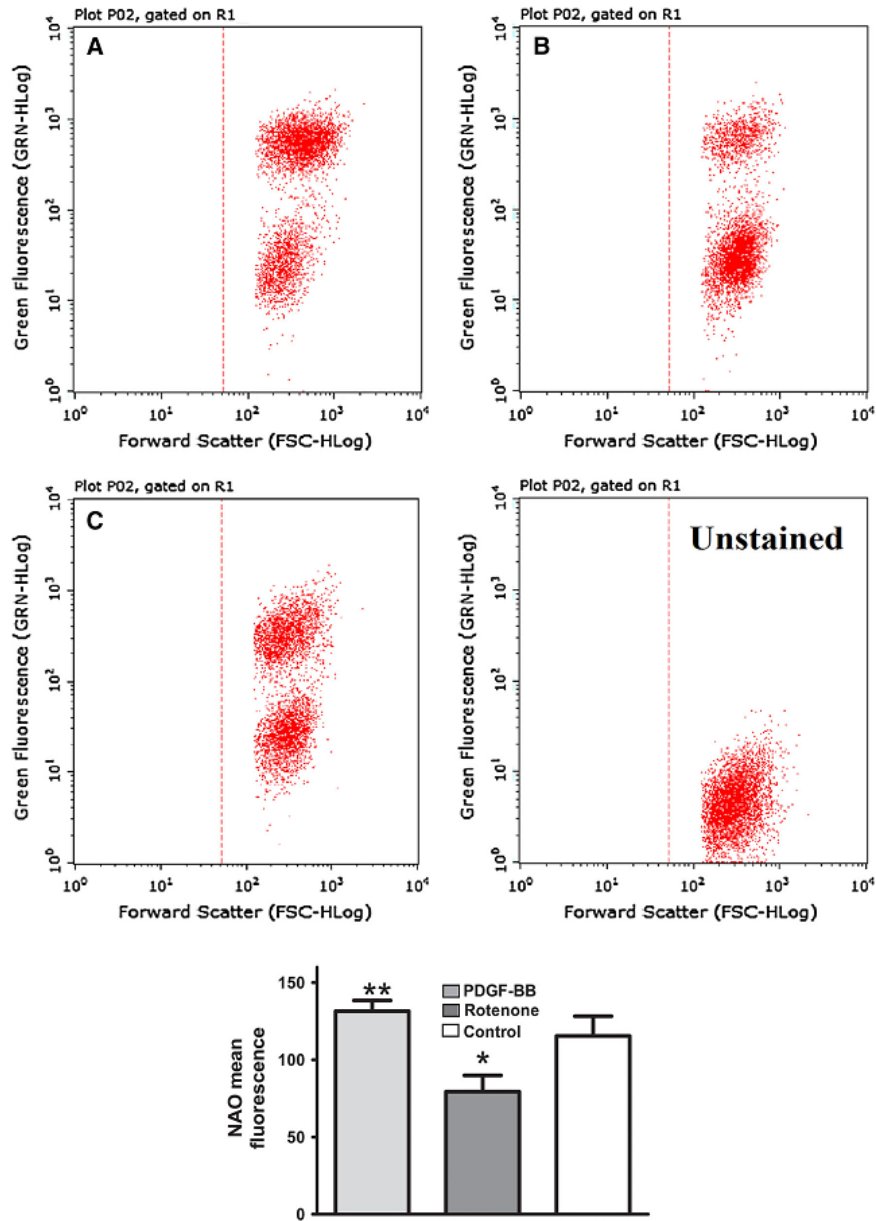


Fig. 9 Representative flow cytometry plots of NAO fluorescence. Cells were exposed to **a** PDGF-BB pretreatment, **b** rotenone, and **c** as control. The *bar graph* shows the value of NAO fluorescence in arbitrary units. ** $p < 0.01$, PDGF-BB versus rotenone; * $p < 0.05$, rotenone versus control

mitochondrial preservation. However, further experiments are needed to confirm this hypothesis using different models such as astrocyte primary cultures.

Acknowledgments This work was supported partially under grants #PUJ IDs 5024 and 5608 to GEB and Colciencias project (convocatoria 528) to RC.

Conflict of interest The authors declare no conflict of interest.

References

- Andrae J, Gallini R, Betsholtz C (2008) Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev* 22:1276–1312. doi:10.1101/gad.1653708
- Arduino DM, Esteves AR, Silva DF, Martins-Branco D, Santos D, Pimentel DF, Cardoso SM (2011) Therapeutic intervention at cellular quality control systems in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Curr Pharm Des* 17:3446–3459
- Avila Rodriguez M, Garcia-Segura LM, Cabezas R, Torrente D, Capani F, Gonzalez J, Barreto GE (2014) Tibolone protects T98G cells from glucose deprivation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 144PB:294–303. doi:10.1016/j.jsbmb.2014.07.009
- Avila-Gomez IC, Velez-Pardo C, Jimenez-Del-Rio M (2010) Effects of insulin-like growth factor-1 on rotenone-induced apoptosis in human lymphocyte cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 106:53–61. doi:10.1111/j.1742-7843.2009.00472.x
- Bankhead P (2013) Analyzing fluorescence microscopy images with ImageJ. Nikon Imaging Center, Heidelberg University, Queen's University Belfast
- Barreto GE, Gonzalez J, Torres Y, Morales L (2011) Astrocytic-neuronal crosstalk: implications for neuroprotection from brain injury. *Neurosci Res* 71:107–113. doi:10.1016/j.neures.2011.06.004
- Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT (2000) Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci* 3:1301–1306. doi:10.1038/81834
- Cabezas R, El-Bacha RS, Gonzalez J, Barreto GE (2012) Mitochondrial functions in astrocytes: neuroprotective implications from oxidative damage by rotenone. *Neurosci Res* 74:80–90. doi:10.1016/j.neures.2012.07.008
- Cabezas R et al (2014) Astrocytic modulation of blood brain barrier: perspectives on Parkinson's disease. *Front Cell Neurosci* 8:211. doi:10.3389/fncel.2014.00211
- Cao Q, Wei LR, Lu LL, Zhao CL, Zhao HY, Yang H (2007) Astrocytes protect MN9D neuronal cells against rotenone-induced oxidative stress by a glutathione-dependent mechanism. *Sheng Li Xue Bao* 59:253–259
- Chaturvedi RK, Beal MF (2013) Mitochondria targeted therapeutic approaches in Parkinson's and Huntington's diseases. *Mol Cell Neurosci* 55:101–114. doi:10.1016/j.mcn.2012.11.011
- Cheng B, Mattson MP (1995) PDGFs protect hippocampal neurons against energy deprivation and oxidative injury: evidence for induction of antioxidant pathways. *J Neurosci* 15:7095–7104
- de Joannon AC et al (2000) Adenosine triphosphate affects interleukin-1 β release by T98G glioblastoma cells through a purinoceptor-independent mechanism. *Neurosci Lett* 285:218–222
- de Oliveira DM et al (2011) *Paullinia cupana* Mart. var. *sorbilis* protects human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cell line against rotenone-induced cytotoxicity. *Hum Exp Toxicol* 30:1382–1391. doi:10.1177/0960327110389837
- de Oliveria DM et al (2009) Cytoprotective effect of *Valeriana officinalis* extract on an in vitro experimental model of Parkinson disease. *Neurochem Res* 34:215–220. doi:10.1007/s11064-008-9749-y
- Dhillon AS, Tarbuton GL, Levin JL, Plotkin GM, Lowry LK, Nalbone JT, Shepherd S (2008) Pesticide/environmental exposures and Parkinson's disease in East Texas. *J Agromedicine* 13:37–48. doi:10.1080/10599240801986215
- Dick FD (2006) Parkinson's disease and pesticide exposures. *Br Med Bull* 79–80:219–231. doi:10.1093/bmb/ldl018
- Falk T, Zhang S, Sherman SJ (2009) Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) is up-regulated and exogenous VEGF-B is neuroprotective in a culture model of Parkinson's disease. *Mol Neurodegener* 4:49. doi:10.1186/1750-1326-4-49
- Gasque P et al (1996) Identification and characterization of complement C3 receptors on human astrocytes. *J Immunol* 156:2247–2255
- Giffard R, Ouyang Y (2004) Effect of overexpression of protective genes on mitochondrial function of stressed astrocytes. *J Bioenerg Biomembr* 36:313–315. doi:10.1023/B:JOB.0000041760.23917.e1490847
- Gosslau A, Dittrich W, Willig A, Jaros PP (2001) Cytological effects of platelet-derived growth factor on mitochondrial ultrastructure in fibroblasts. *Comp Biochem Physiol A* 128:241–249
- Greenamyre JT, Betarbet R, Sherer TB (2003) The rotenone model of Parkinson's disease: genes, environment and mitochondria Parkinsonism. *Relat Disord* 9(Suppl 2):S59–S64
- Greenamyre JT, Cannon JR, Drolet R, Mastroberardino PG (2010) Lessons from the rotenone model of Parkinson's disease. *Trends Pharmacol Sci* 31:141–142; author reply 142–143. doi:10.1016/j.tips.2009.12.006
- Gyulkhandanyan AV, Feeney CJ, Pennefather PS (2003) Modulation of mitochondrial membrane potential and reactive oxygen species production by copper in astrocytes. *J Neurochem* 87:448–460
- Hamby ME, Sofroniew MV (2010) Reactive astrocytes as therapeutic targets for CNS disorders. *Neurotherapeutics* 7:494–506. doi:10.1016/j.nurt.2010.07.003
- Hirsch EC, Breidert T, Rousselet E, Hunot S, Hartmann A, Michel PP (2003) The role of glial reaction and inflammation in Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 991:214–228
- Hoglinger GU et al (2005) The mitochondrial complex I inhibitor rotenone triggers a cerebral tauopathy. *J Neurochem* 95:930–939. doi:10.1111/j.1471-4159.2005.03493.x
- Iantomasi T, Favilli F, Degl'Innocenti D, Vincenzini MT (1999) Increased glutathione synthesis associated with platelet-derived growth factor stimulation of NIH3T3 fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 1452:303–312
- Krupinski J, Issa R, Bujny T, Slevin M, Kumar P, Kumar S, Kaluza J (1997) A putative role for platelet-derived growth factor in angiogenesis and neuroprotection after ischemic stroke in humans *Stroke* 28:564–573
- Lee S et al (1997) Early induction of mRNA for calbindin-D28k and BDNF but not NT-3 in rat hippocampus after kainic acid treatment. *Brain Res Mol Brain Res* 47:183–194
- Lokker NA, Sullivan CM, Hollenbach SJ, Israel MA, Giese NA (2002) Platelet-derived growth factor (PDGF) autocrine signaling regulates survival and mitogenic pathways in glioblastoma cells: evidence that the novel PDGF-C and PDGF-D ligands may play a role in the development of brain tumors. *Cancer Res* 62:3729–3735
- Mattson MP, Goodman Y, Luo H, Fu W, Furukawa K (1997) Activation of NF-kappaB protects hippocampal neurons against oxidative stress-induced apoptosis: evidence for induction of manganese superoxide dismutase and suppression of peroxynitrite production and protein tyrosine nitration. *J Neurosci Res*

- 49:681–697. doi:10.1002/(SICI)1097-4547(19970915)49:6<681: AID-JNR3>3.0.CO;2-3
- Ogawa N, Asanuma M, Miyazaki I, Diaz-Corrales FJ, Miyoshi K (2005) L-DOPA treatment from the viewpoint of neuroprotection. Possible mechanism of specific and progressive dopaminergic neuronal death in Parkinson's disease. *J Neurol* 252(Suppl 4):IV23–IV31. doi:10.1007/s00415-005-4006-7
- Oliva CR, Moellering DR, Gillespie GY, Griguer CE (2011) Acquisition of chemoresistance in gliomas is associated with increased mitochondrial coupling and decreased ROS production. *PLoS ONE* 6:e24665. doi:10.1371/journal.pone.0024665PONE-D-11-14137
- Peng F, Yao H, Akturk HK, Buch S (2012) Platelet-derived growth factor CC-mediated neuroprotection against HIV Tat involves TRPC-mediated inactivation of GSK 3beta. *PLoS ONE* 7:e47572. doi:10.1371/journal.pone.0047572PONE-D-12-19628
- Perier C, Vila M (2012) Mitochondrial biology and Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2:a009332. doi:10.1101/cshperspect.a009332a009332
- Potapova O, Fakhrai H, Mercola D (1996) Growth factor PDGF-B/sis confers a tumorigenic phenotype to human tumor cells bearing PDGF receptors but not to cells devoid of receptors: evidence for an autocrine, but not a paracrine, mechanism. *Int J Cancer* 66:669–677. doi:10.1002/(SICI)1097-0215(19960529
- Rappold PM, Tieu K (2010) Astrocytes and therapeutics for Parkinson's disease. *Neurotherapeutics* 7:413–423. doi:10.1016/j.nurt.2010.07.001
- Ruusala A, Sundberg C, Arvidsson AK, Rupp-Thureson E, Heldin CH, Claesson-Welsh L (1998) Platelet-derived growth factor (PDGF)-induced actin rearrangement is deregulated in cells expressing a mutant Y778F PDGF beta-receptor. *J Cell Sci* 111(Pt 1):111–120
- Safi R, Gardaneh M, Panahi Y, Maghsoudi N, Zaefizadeh M, Gharib E (2012) Optimized quantities of GDNF overexpressed by engineered astrocytes are critical for protection of neuroblastoma cells against 6-OHDA toxicity. *J Mol Neurosci* 46:654–665. doi:10.1007/s12031-011-9654-8
- Sarafian TA, Montes C, Imura T, Qi J, Coppola G, Geschwind DH, Sofroniew MV (2010) Disruption of astrocyte STAT3 signaling decreases mitochondrial function and increases oxidative stress in vitro. *PLoS ONE* 5:e9532. doi:10.1371/journal.pone.0009532
- Simpkins JW, Yi KD, Yang SH, Dykens JA (2010) Mitochondrial mechanisms of estrogen neuroprotection. *Biochim Biophys Acta* 1800:1113–1120. doi:10.1016/j.bbagen.2009.11.013
- Stein GH (1979) T98G: an anchorage-independent human tumor cell line that exhibits stationary phase G1 arrest in vitro. *J Cell Physiol* 99:43–54. doi:10.1002/jcp.1040990107
- Swarnkar S, Singh S, Goswami P, Mathur R, Patro IK, Nath C (2012) Astrocyte activation: a key step in rotenone induced cytotoxicity and DNA damage. *Neurochem Res* 37:2178–2189. doi:10.1007/s11064-012-0841-y
- Tang Z et al (2010) Survival effect of PDGF-CC rescues neurons from apoptosis in both brain and retina by regulating GSK3beta phosphorylation. *J Exp Med* 207:867–880. doi:10.1084/jem.20091704
- Tanner CM et al (2011) Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. *Environ Health Perspect* 119:866–872. doi:10.1289/ehp.1002839
- Tiwari M, Lopez-Cruzan M, Morgan WW, Herman B (2011) Loss of caspase-2-dependent apoptosis induces autophagy after mitochondrial oxidative stress in primary cultures of young adult cortical neurons. *J Biol Chem* 286:8493–8506. doi:10.1074/jbc.M110.163824
- Torrente D, Avila M, Cabezas R, Morales L, Gonzalez J, Samudio I, Barreto GE (2013) Paracrine factors of human mesenchymal stem cells increase wound closure and reduce reactive oxygen species production in a traumatic brain injury in vitro model. *Hum Exp Toxicol* 33:673–684. doi:10.1177/0960327113509659
- Tseng HC, Dichter MA (2005) Platelet-derived growth factor-BB pretreatment attenuates excitotoxic death in cultured hippocampal neurons. *Neurobiol Dis* 19:77–83. doi:10.1016/j.nbd.2004.11.007
- Valverde GDAD, Madureira de Oliveria D, Barreto G, Bertolino LA, Saraceno E, Capani F, Giraldez LD (2008) Effects of the extract of *Anemopaegma mirandum* (Catuaba) on Rotenone-induced apoptosis in human neuroblastomas SH-SY5Y cells. *Brain Res* 1198:188–196. doi:10.1016/j.brainres.2008.01.006
- Voloboueva LA, Suh SW, Swanson RA, Giffard RG (2007) Inhibition of mitochondrial function in astrocytes: implications for neuroprotection. *J Neurochem* 102:1383–1394. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.4634.x
- Volterra A, Meldolesi J (2005) Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci* 6:626–640. doi:10.1038/nrn1722
- Wang HL et al (2011) PARK6 PINK1 mutants are defective in maintaining mitochondrial membrane potential and inhibiting ROS formation of substantia nigra dopaminergic neurons. *Biochim Biophys Acta* 1812:674–684. doi:10.1016/j.bbadis.2011.03.007
- Watabe M, Nakaki T (2004) Rotenone induces apoptosis via activation of bad in human dopaminergic SH-SY5Y cells. *J Pharmacol Exp Ther* 311:948–953. doi:10.1124/jpet.104.071381jpet.104.071381
- Xiong J, Dai W, Chen L, Liu G, Liu M, Zhang Z, Xiao H (2006) New method for studying the relationship between morphological parameters and cell viability. In: *Proceedings of SPIE*. doi:10.1117/12.676524
- Zheng L et al (2010) Neuroprotective effects of PDGF against oxidative stress and the signaling pathway involved. *J Neurosci Res* 88:1273–1284. doi:10.1002/jnr.22302
- Zhu X, Yao H, Peng F, Callen S, Buch S (2009) PDGF-mediated protection of SH-SY5Y cells against Tat toxin involves regulation of extracellular glutamate and intracellular calcium. *Toxicol Appl Pharmacol* 240:286–291. doi:10.1016/j.taap.2009.06.020



PDGF-BB Preserves Mitochondrial Morphology, Attenuates ROS Production, and Upregulates Neuroglobin in an Astrocytic Model Under Rotenone Insult

Ricardo Cabezas¹ · Nelson E. Vega-Vela¹ · Juliana González-Sanmiguel¹ · Janneth González¹ · Paula Esquinas² · Valentina Echeverría³ · George E. Barreto^{1,4}

Received: 1 March 2017 / Accepted: 19 April 2017
© Springer Science+Business Media New York 2017

Abstract Platelet-derived growth factor, subtype BB (PDGF-BB) is a mitogenic growth factor produced in different cell types such as platelets, fibroblasts, neurons, and astrocytes. Previous reports have shown that different PDGF isoforms exert a neuroprotective effect in neurons and astrocytes against multiple degenerative insults. Previously, we showed that pretreatment with PDGF-BB for 24 h increased cell viability, preserved nuclear morphology and mitochondrial membrane potential following stimulation with rotenone, and reduced free radical production nearly to control conditions. In the present study, we explored the potential mechanisms associated with PDGF-BB protection against oxidative damage. Our results showed that PDGF-BB protected astrocytic cells through multiple responses, including decrease in the expression of cytoskeleton proteins, attenuated free radicals (reactive oxygen species (ROS)) production, preservation of mitochondrial ultrastructure, and improved expression of neuroglobin (Ngb1). In summary, these findings point out that PDGF-BB protects astrocytic cells by a reduction in ROS production and activation of antioxidant mechanisms.

Keywords PDGF-BB · Reactive oxygen species · Mitochondria · Astrocytes · Neuroglobin · Rotenone

Introduction

Platelet-derived growth factor, subtype BB (PDGF-BB) is a dimeric growth factor of 30 kDa, which belongs to the family of the PDGF/vascular endothelial growth factor (VEGF). This growth factor is an important mitogenic factor produced in different cell types such as platelets, megakaryocytes, fibroblasts, smooth muscle cells, neurons, and astrocytes [1–4]. PDGF-BB exerts its functions through the activation of PDGFR β tyrosine kinase receptor, which is widely expressed in the brain, including neurons and astrocytes [5, 6]. Various signaling pathways are activated by PDGF-BB, including PI3K/AKT, MAPK, JAK/STAT, and PLC- γ , which are related with antiapoptotic and proliferative mechanisms, tissue development, induction of antioxidative proteins, and mitochondrial protection [5–9]. Indeed, previous reports have shown that different isoforms of PDGF have been shown to exert a neuroprotective effect in dementia and oxidative insult in neurons against hydrogen peroxide, and that PDGF isoforms might be secreted during pathological states [6, 9], ischemic events in rat [10], restoration of dopaminergic neurotransmission in 6-hydroxydopamine-lesioned rats [11], and mitochondrial protection against rotenone [12].

The isoflavone rotenone acts as an inhibitor of mitochondrial electron transport chain complex I [13, 14]; seriously affects many mitochondrial properties such as production of reactive oxygen species (ROS), RhoA signaling and microtubules depolymerization, loss of mitochondrial membrane potential, and ATP generation that consequently triggers apoptotic death specially in dopaminergic neurons; and has been extensively used as a Parkinson's disease model both in cells

✉ George E. Barreto
gsampaio@javeriana.edu.co; gesbarreto@gmail.com

¹ Departamento de Nutrición y Bioquímica, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C., Colombia

² Doctorado Ciencias Salud Animal, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C., Colombia

³ Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad San Sebastián, Lientur, Concepción, Chile

⁴ Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad Autónoma de Chile, Santiago, Chile

and animals [13–16]. Interestingly, a previous work by our lab using T98G astrocytic cell line [12] showed that PDGF-BB pretreatment for 24 h maintained cell viability, preserved mitochondrial membrane potential following stimulation with rotenone, and reduced ROS production nearly to control conditions, suggesting an important effect in mitochondrial protection mediated by PDGF-BB. Moreover, it has been shown that PDGF and other growth factors modulate the expression of various antioxidant enzymes and proteins like superoxide dismutase (SOD2), catalase, glutathione peroxidase (GPx1), and neuroglobin (Ngb1) during oxidative damage [17–21], demonstrating the importance of growth factors in the protection of neuronal and non-neuronal cells from the central nervous system (CNS). Taking into account the great importance of astrocytes for the maintenance of neuronal metabolic functions, it is important to explore new protective methodologies for both neuronal and glial cells. In the present study, we assessed the functions of PDGF-BB on astrocytic cells under rotenone and the associated mitochondrial protective mechanisms, including the activation of promising protective molecules such as NF- κ B and neuroglobin.

Materials and Methods

Cell Culture

T98G cell line [22] was used as an astrocytic cell model as previously reported [23, 24]. The stock was maintained under exponential growth in DMEM (Lonza) culture medium, supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and antibiotics (penicillin/streptomycin and amphotericin; Lonza) at 37 °C and in a humidified atmosphere containing 5% CO₂, as previously reported [12].

Drug Treatment

Cells were seeded in multi-well plates and allowed to grow for 24 h. Afterwards, culture medium was serum deprived for 24 h prior to drug treatment. Cells then were incubated in DMEM without serum and treated with 50 μ M rotenone (Sigma-Aldrich, R8875) in 0.5% DMSO (vehicle) for 24 h; PDGF-BB (Sigma, P3201) in a 200 ng/mL was used prior to rotenone treatment. This treatment scheme was already standardized by our group, as these concentrations were found to present the best protective conditions against rotenone damage [12]. Cells deprived of FBS for 24 h were used as control.

Electron Microscopy

Cells were centrifuged in microcentrifuge tubes at 13 rpm, room temperature, for 3 min, and fixed in phosphate-buffered 2.5% glutaraldehyde pH 7.4 for 10 h at 4 °C. After

a rinse in phosphate buffer, the cells were postfixed in 1% osmium tetroxide pH 7.4 for 1 h at 4 °C and after a rinse, precontrasted with uranyl acetate for 1 h at room temperature. After dehydration in graded alcohol, the cells were embedded in Spurr resin. The blocks were sectioned on a microtome with a diamond knife. The section thickness was estimated from silver interference color and the small-fold method [25] to be 60–80 nm. The sections were picked up on 300-mesh copper grids, double-stained with uranyl acetate and lead citrate, and examined by electron microscopy (JEM 1400 Plus, Jeol, Japan) at 80 kV. Electron micrographs were taken at two primary magnifications 4400 \times and 10,000 \times .

Stereological analysis was carried out according to Gossiau et al. [7] with some modifications. Briefly, mitochondrial area, cristae number, and vacuole number of the different treatments were evaluated from 20 photographs. Quantification of mitochondrial injury of the quantitative analysis is shown as means \pm SD for mitochondrial size, number of cristae, and “vacuolization” of the cytoplasm.

Cell Viability

The effect of rotenone and PDGF-BB on T98G cell proliferation or viability was tested using MTT ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay (Sigma, St. Louis, MO, USA). Cells were seeded into 96-well plates in the DMEM culture medium containing 10% bovine fetal serum at a seeding density of 10,000 cells per well. Afterwards, cells were serum deprived for 24 h and finally treated according to different experimental paradigms. Viability and/or proliferation were assessed at 24 h following treatments by adding MTT solution for 3 h, and the absorbance was read at 490 nm. Each assay was performed with a minimum of six replicate wells for each condition.

Immunohistochemistry and Western Blots

The following antibodies were used: anti-rabbit AKT antibody (Thermo Scientific, PA1-22099; diluted 1:1000), anti-rabbit phospho-AKT pThr308 antibody (Thermo Scientific, PA1-540; diluted 1:1000), anti-rabbit ERK/MAPK antibody (Thermo Scientific, PA1-4703; diluted 1:1000), anti-rabbit phospho-p44 MAPK1,3/ERK2,1 pThr202 + Tyr204 antibody (Thermo Scientific, PA1-4607; diluted 1:1000), anti-rabbit NF- κ B p65 antibody (Abcam, ab16502; diluted 1:1000), anti-rabbit NF- κ B p105/p50 antibody (Thermo Scientific, PA1-14282; diluted 1:1000), anti-rabbit RhoA (Thermo Scientific, OSR00266W; diluted 1:1000), anti-mouse vimentin antibody (Sigma, V6389; diluted 1:1000), anti-rabbit GPX1 (Thermo Scientific, PA5-30593; diluted 1:1000), anti-rabbit catalase antibody (Thermo Scientific PA5-29183; diluted 1:1000), anti-mouse neuroglobin (Ngb1) antibody (Abcam, ab37258; diluted 1:50), anti-rabbit 4-

hydroxynonenal antibody (Abcam, ab46545; diluted 1:1000), anti-mouse 3-nitrotyrosine antibody (Abcam, ab61392; diluted 1:1000), anti-rabbit 8-hydroxyguanosine antibody [15A3] (Abcam, ab62623; diluted 1:1000), and anti-mouse β -actin (Thermo Fisher MA5-15739; diluted 1:3000).

For vimentin, RhoA, GFAP, NF- κ B p65, NF- κ B p105/p50, 8-hydroxyguanosine, 3-nitrotyrosine, and neuroglobin (Ngb1) immunofluorescence, cells were cultured on 24-well plates, and at the end of the treatment, cells were washed in PBS and fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min at room temperature. Subsequently, cells were permeabilized for 3 min in 0.1% Triton X-100 in Tris buffer saline (TBS) with 2% BSA. Once permeabilized, cells were washed with PBS, blocked with 2% BSA, and incubated overnight at 4 °C with antibodies at previously mentioned dilutions. Then, cells were washed three times for 5 min with TBS and incubated for 45 min at room temperature with either DyLight conjugated-488 anti-mouse secondary antibody or DyLight conjugated-594 anti-rabbit diluted 1:1000 according to the primary antibody. Cells were then washed three times, stained with Hoechst 33258 to label nuclei, and photographed in a fluorescence Olympus IX-53 inverted microscope.

For p65, GFAP, GPX1, catalase, ERK, p-ERK, AKT, and p-AKT protein determination, cells were lysed and solubilized in RIPA buffer (Thermo Scientific, cat. 89900), containing 1 mM sodium fluoride, 10 mM sodium pyrophosphate, 200 mM PMSF, 10 mM sodium orthovanadate, and Thermo Halt protease inhibitor cocktail 1X (cat. 78425). The lysates were centrifuged at 10,000 rpm at 4 °C for 10 min and finally boiled for 5 min. Solubilized proteins were resolved by 12% SDS PAGE at 90 V for 90 min at 25 °C and then electrophoretically transferred to Thermo PVDF membranes (cat. 88518) for 90 min at 350 mA and 4 °C. A sample of solubilized proteins was used for protein quantification by bicinchoninic acid method (Sigma-Aldrich cat. BCA-1 kit). Thereafter, PVDF membranes were blocked for 1 h at 25 °C with 5% (w/v) BSA and 0.1% (w/v) Tween-20 in Tris buffer saline pH 7.4. Membranes were incubated overnight at 4 °C with anti-mouse Ngb1 antibody (Abcam® ab37258) with final dilution 1:50, and anti-mouse AKT, p-AKT, p65 NF- κ B, ERK, p-ERK, and anti-mouse GFAP antibody with final dilution 1:1000. The PVDF membranes were then incubated with anti-mouse monoclonal anti-actin antibody (Sigma-Aldrich, 1:2000) to normalize total lysate. Subsequently, infrared-labeled secondary antibody (anti-goat or anti-mouse IRDye 800 (Li-Cor Biosciences)) was added to bind to the primary antibody. The bound complex was detected using the Odyssey infrared imaging system (Li-Cor; Lincoln, NE). The images were analyzed using the Odyssey application software, version 1.2 (Li-Cor) to obtain the integrated intensities. We used the histogram method to analyze and standardize the densitometric data, and also based on previous reports to refine the methodology [26, 27]. Briefly, we draw a rectangular area

around each band in the image. Once selected all the bands, we generated the histograms indicating the intensity of each of band by using the gel analysis in the ImageJ software. Subsequently, we draw a line across the top of the histogram to further quantify the area of the histogram [26, 27]. Using an Excel sheet, we calculated the relation between each band with its corresponding loading control. Ngb1 expression and mRNA levels were also assessed by immunofluorescence and qRT-PCR as detailed below.

Determination of Reactive Oxygen Species

Reactive oxygen species production was evaluated by fluorescence microscopy as previously described [17]. Briefly, cells were seeded at a density of 25,000 cells per well into 24-well plates in DMEM culture medium containing 10% FBS and then were treated according to each experimental paradigm after 24 h of serum deprivation. To measure the effect of PDGF-BB and rotenone on superoxide ($O_2^{\cdot-}$) and oxygen peroxide (H_2O_2) production, cells were treated in the dark at 37 °C for 30 min with 10 mM dihydroethidium (DHE; Sigma) or 1 mM 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA), respectively. Additionally, cells were incubated with anti-rabbit 4-hydroxynonenal antibody (Abcam, ab46545; diluted 1:1000), anti-mouse 3-nitrotyrosine antibody (Abcam, ab61392; diluted 1:1000), and anti-rabbit 8-hydroxyguanosine antibody [15A3] (Abcam, ab62623; diluted 1:1000) following the immunohistochemistry protocol previously described above.

Cells were washed twice with PBS and photographed in an Olympus I53X fluorescence microscope. The images were processed with the ImageJ software, and the mean fluorescence intensity was determined as described above for fluorescence microscopy. Each assay was performed with a minimum of six replicates for each condition. The experiment was repeated three times.

Image Mean Fluorescence Calculation

The calculation of mean fluorescence of the images was assessed using ImageJ version 1.47v [28] as follows: the images were opened in the software and pre-processed eliminating the background. Subsequently, cells were randomly chosen via a numbered grid assigned. Twenty cells were randomly selected to mean fluorescence calculation, and the average of eight images for each treatment was statistically analyzed. Using the Measure algorithm of ImageJ and selecting each cell manually via ROI's Management, the data were grouped and subsequently analyzed. There were no variations in the conditions of the image processed, as gain of the mercury lamp, time of exposure, and fluorochrome bleach. Each assay was performed with a minimum of six replicate wells for each condition. The area of each randomly selected cell was

calculated using ImageJ, so it was settled the scale to calibrate the ImageJ software, and measured a known distance; subsequently, the threshold of the images was adjusted to analyze particles using the ImageJ algorithm to generate the data (range of particle size 100–1000 μm^2). Cells were counted in an area of 0.03 mm^2 . The mean cell area was calculated for each experimental group in at least six independent cultures ($N = 6$) run in triplicate, with a minimum of 20 cells analyzed for each condition.

Statistical Analyses

Normality tests were conducted on data to guarantee that they met the assumptions of the proposed statistical test; for example, in the ANOVA case, we used the Shapiro-Wilk normality test to evaluate the normality of residuals and the Bartlett's test for homoscedasticity. If the assumptions were not violated, one-way ANOVA was used to assess whether there was a statistically significant difference between groups, and unpaired two-tailed Student's *t* tests with non-pooled SD and Bonferroni correction on the alpha level (i.e., 0.05) for univariate pairwise comparisons. However, if the assumptions were violated, non-parametric tests were carried out to compare mean values among groups through a Kruskal-Wallis rank sum test. Pairwise comparisons for non-parametric variables were performed using the Conover's post-hoc test with Bonferroni adjustment of *p* values, and Tukey-Kramer HSD (Tukey HSD) test when data had unequal sample sizes. In this study, we

considered a *p* value <0.05 to be statistically significant. The data are shown as box plots (to compare graphically the distribution and variability of data between groups) or bar plots (presented as mean \pm SEM). Statistical analyses were performed using the computing environment R version 3.1.2 [29], and the packages GoodmanKruskal [30], PMCMR [31], and DTK [32]. Data visualization was achieved using the R packages ggplot2 [33] and cowplot [34].

Results

PDGF-BB Reduced ROS Levels in Cells Stimulated with Rotenone

First, we examined the effect of rotenone and PDGF-BB on lipid peroxidation, peroxynitrite-mediated protein modifications, and nucleic acid oxidative damage. Rotenone alone induced a significant increase on lipid peroxidation measured by 4-hydroxynonenal staining ($p < 0.001$, Fig. 1a). On the other hand, pretreatment with PDGF-BB for 24 h significantly diminished lipid peroxidation ($p < 0.001$) in rotenone-treated cells. Moreover, PDGF-BB significantly decreased rotenone-induced nucleic acid oxidation measured by 8-OHdG fluorescence ($p < 0.001$, Fig. 1b) and attenuated the peroxynitrite-mediated protein modifications induced by rotenone ($p < 0.001$, Fig. 1c).

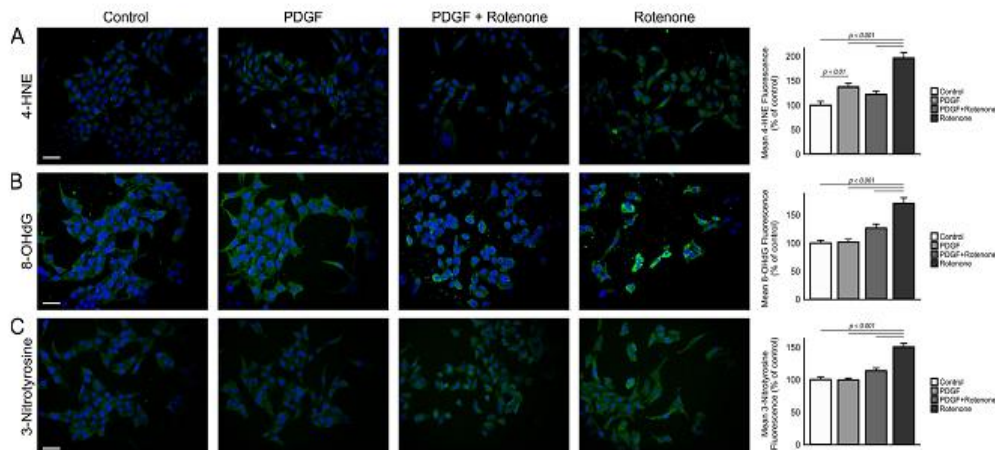


Fig. 1 PDGF-BB reduced ROS damage by rotenone. **a** PDGF-BB pretreatment significantly diminished rotenone-induced lipid peroxidation measured by 4-HNE (PDGF + rotenone vs rotenone, $p < 0.001$; control vs PDGF, $p = 0.01$; control vs rotenone, $p < 0.001$; and PDGF vs rotenone, $p < 0.001$). **b** PDGF-BB significantly decreased rotenone-induced nucleic acid oxidation measured by 8-OHdG (PDGF + rotenone vs

rotenone, $p < 0.001$); control vs rotenone, $p < 0.001$; and PDGF vs rotenone, $p < 0.001$ **c** Similarly, PDGF-BB attenuated the peroxynitrite-mediated protein modifications by rotenone (PDGF + rotenone vs rotenone, $p < 0.001$); control vs rotenone, $p < 0.001$; and PDGF vs rotenone, $p < 0.001$. All data in these figures are presented as mean \pm SEM of three individual experiments. Scale bar 50 μm

PDGF-BB Decreased the Expression of Cytoskeleton Markers

We next evaluated the effect of PDGF-BB on astroglial cytoskeleton proteins induced by rotenone. We observed that although rotenone significantly increased the expression of GFAP ($p < 0.001$, Fig. 2a), PDGF-BB was able to reduce GFAP levels in astrocytic cells stressed with rotenone ($p < 0.001$, Fig. 2a). Our results also demonstrated that PDGF-BB diminished both the expressions of vimentin ($p < 0.001$, Fig. 2a) and RhoA small GTPase ($p < 0.001$, Fig. 2c), which are associated with cytoskeleton regulation, suggesting that PDGF-BB is attenuating the activation of astrocytes upon oxidative damage by rotenone.

PDGF-BB Decreased Ultrastructural Damage Induced by Rotenone

In the following experiment, we assessed the effect of both rotenone and PDGF-BB over mitochondrial ultrastructure. In Fig. 3a, we showed representative electron micrographs of cells under different treatments. Interestingly, rotenone alone significantly decreased mitochondrial area ($p < 0.0001$, Fig. 3b), without changing cristae number (Fig. 3c), and induced an increased number of vacuoles ($p < 0.0001$, Fig. 3d). These vacuoles represented swollen mitochondria identified by their double-layer membrane.

Moreover, upon rotenone treatment, late autophagic vacuole or autolysosome stage was identified by the appearance of the characteristic membrane-bound structure containing the compressed mitochondria, often with loss of visible cristae, as well as other electron-dense, often membrane-bound, material. Outer mitochondrial membrane was disrupted in many mitochondria. Of note, nuclear membrane was intact, although mitochondria were highly affected. In pretreatment, early autophagic vacuole and mitochondria were highly distended with destruction of the inner mitochondrial matrix. Nevertheless, PDGF-BB maintained mitochondrial area near to control levels and significantly attenuated the number of vacuoles in astrocytic cells under rotenone treatment.

PI3K/AKT Activation and Downstream Proteins Activated by PDGF-BB During Rotenone Damage

Next, we explored some of the mechanisms activated by PDGF-BB. Although PDGF-BB increased p-AKT phosphorylation ($p = 0.02$ vs rotenone; $p = 0.05$ vs control, Fig. 4a) in rotenone-treated cells, ERK expression appeared not to be significantly affected by neither PDGF-BB nor rotenone (Fig. 4b). Moreover, PDGF-BB induced the expression of both p65 ($p = 0.04$, Fig. 4c) and GPx1 protein levels ($p < 0.001$, Fig. 4d) when compared with rotenone alone, without affecting catalase levels (Fig. 4e).

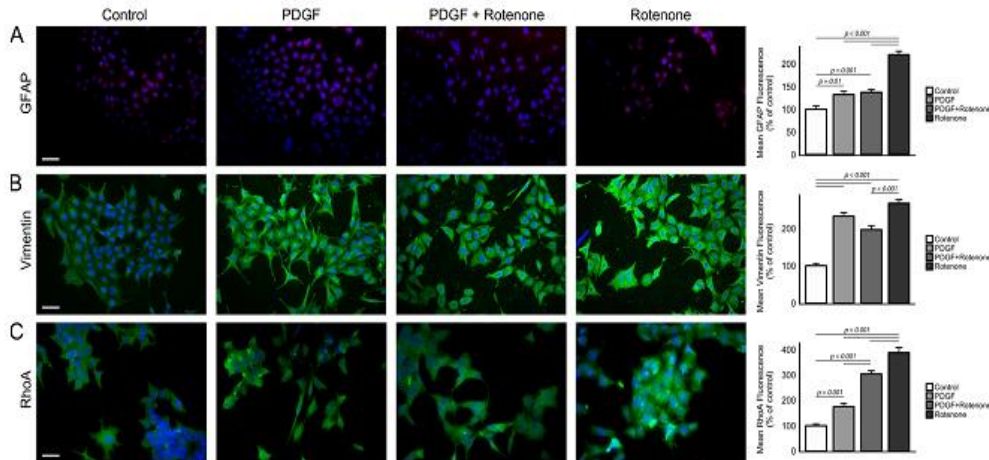


Fig. 2 PDGF-BB decreased the effect of rotenone on proteins associated with astrocytes activation. **a** Rotenone greatly increased the expression of GFAP (rotenone vs control, $p < 0.001$), but PDGF-BB is preventing rotenone induction of GFAP in T98G cells (PDGF + rotenone vs rotenone, $p < 0.001$; control vs PDGF, $p = 0.01$; control vs PDGF + rotenone, $p = 0.001$; and PDGF vs rotenone, $p < 0.001$). **b** Rotenone alone increased the expression of vimentin (control vs rotenone, $p < 0.001$); however, PDGF-BB decreased this effect (PDGF + rotenone vs rotenone,

$p < 0.001$); control vs PDGF, $p < 0.001$; and control vs PDGF + rotenone, $p < 0.001$. **c** Rotenone increased the expression of RhoA small GTPase (rotenone vs control, $p < 0.001$) and PDGF-BB attenuated its expression (PDGF + rotenone vs rotenone, $p < 0.001$); control vs PDGF, $p < 0.001$; control vs PDGF + rotenone, $p < 0.001$; PDGF vs PDGF + rotenone, $p < 0.001$; and PDGF vs rotenone, $p < 0.001$). All figures are presented as mean \pm SEM of three individual experiments. Scale bar 50 μ m

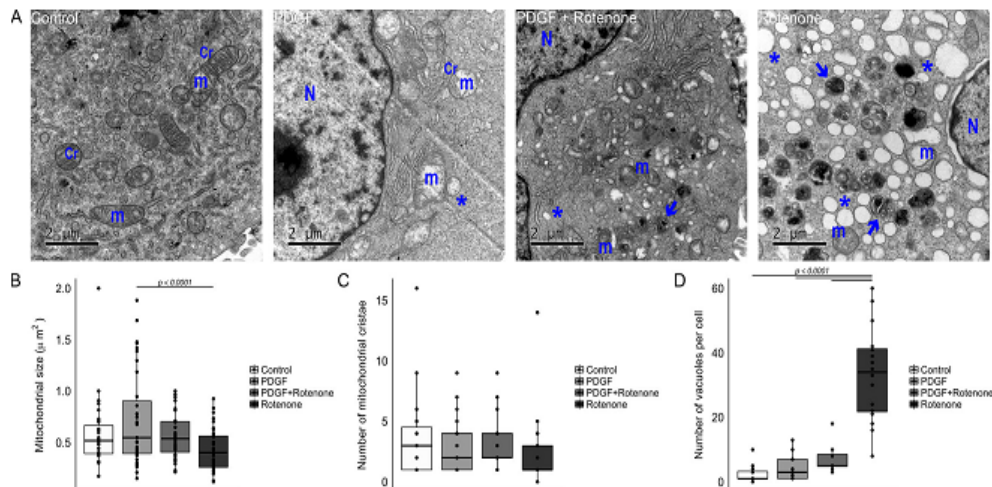


Fig. 3 PDGF-BB protects mitochondrial ultrastructure against rotenone damage. **a** Representative electron micrographs of cells with different treatments. The box plots show quantitative analysis of parameters analyzed from the micrographs. **b** Rotenone significantly decreased mitochondrial area compared with PDGF-BB (PDGF vs rotenone, $p < 0.0001$). **c** No significant changes on mitochondrial cristae numbers

for the different treatments were observed. **d** Rotenone treatment significantly increased cytosolic vacuoles (rotenone vs control, $p < 0.0001$), but PDGF-BB prevented rotenone-induced ultrastructural damage (PDGF and PDGF + rotenone vs rotenone, $p < 0.0001$). *Cr* cristae, *m* mitochondria, *N* nucleus, * autophagic vacuole

PDGF Increased NF- κ B Activation and Neuroglobin Expression

Next, we explored the potential activation of PDGF downstream proteins that could be related with the previously observed protective mechanisms. Our results showed that PDGF-BB increased the nuclear translocation of both p65 ($p < 0.001$, Fig. 5a) and p50 NF- κ B ($p < 0.001$, Fig. 5b) in cells stimulated with rotenone (PDGF + rotenone). Furthermore, PDGF-BB alone and PDGF-BB + rotenone induced the expression of Ngbl ($p < 0.001$, Fig. 5c) in comparison to cells treated with rotenone alone.

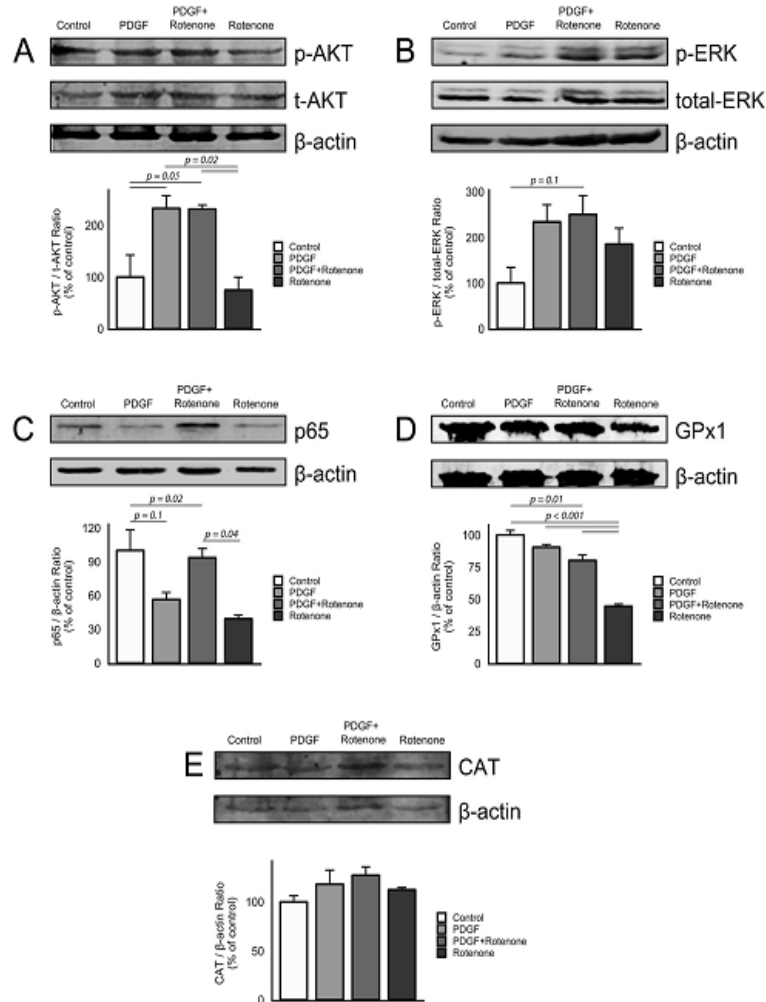
Discussion

Several growth factors have shown to be important in CNS protection, as assessed in cellular and animal models and clinical trials [11, 12, 35–39]. Growth factors such as brain-derived neurotrophic factor (BDNF), vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor (bFGF), insulin-like growth factor (IGF), and PDGF have reported to protect neurons and non-neuronal cells through various mechanisms including the increase in the expression of antioxidant enzymes like catalase, glutathione reductase, and Mn-SOD; inactivation of apoptotic mechanisms; regulation of reactive gliosis; and maintenance of mitochondrial membrane potential [9, 39–42]. In this aspect, the use of growth factors targeting astrocytic protection could improve

both the homeostasis and metabolic functions of astrocytes, and enhance neuronal survival during brain pathologies such as Alzheimer and Parkinson [11, 43]. In the present study, our results showed that PDGF-BB protected the astrocytic T98G cells against the oxidative effects of rotenone by several mechanisms, including the decrease in ROS production (Fig. 1), improvement of antioxidant defenses (Fig. 2), and maintenance of ultrastructural features (Fig. 3).

We evaluated the effects of PDGF-BB on cytoskeletal proteins involved in astrocytic activation, which includes the up-regulation of molecules such as GFAP, vimentin, and RhoA [44–49]. This process can be triggered by hypoxia, glucose deprivation, β -amyloid peptide, and increased ROS production during brain pathologies [50]. In this aspect, it has been shown that rotenone insult can induce a reactive phenotype and apoptotic cell death in astrocytic C6 cell line [16]. Moreover, it has been shown that both Rac1 and RhoA from the Ras family GTPases mediate the formation of astrocytic processes in rat hippocampal astrocytic cultures [51]. Interestingly, our results demonstrated that PDGF-BB decreased the expression of GFAP, vimentin, and RhoA in rotenone-treated astrocytes (Fig. 2), suggesting the importance of PDGF-BB in the reduction of activated astrocytes induced by ROS. On the other hand, it has been suggested that PDGF-BB can activate mechanisms involved in cytoskeletal modification and cell migration. These processes may happen to occur by the activation of phosphatidylinositol 3,4,5, thus activating the Rac GTPase protein of the Rho family, which is involved in the modification of the actin

Fig. 4 Protective mechanisms activated by PDGF-BB against rotenone damage. **a** PDGF-BB and PDGF + rotenone significantly increased AKT phosphorylation (PDGF, PDGF + rotenone vs rotenone, $p = 0.02$); control vs PDGF and PDGF + rotenone, $p = 0.05$. **b** No significant increase in ERK phosphorylation was observed, despite the experimental challenge. **c** PDGF + rotenone showed an increase in total p65 expression ($p = 0.04$ vs rotenone); control vs PDGF + rotenone, $p = 0.02$. **d** Rotenone significantly decreased the expression of GPx1 ($p < 0.001$ vs control); control vs PDGF + rotenone, $p = 0.01$; PDGF vs rotenone, $p < 0.001$; and PDGF + rotenone vs rotenone, $p < 0.001$. **e** There was no effect on the expression of catalase. All data in these figures are presented as mean \pm SEM of three individual experiments. Neither rotenone nor PDGF-BB altered the expression of catalase



cytoskeleton and morphological changes [52–54], suggesting the role played by PDGF in morphological regulation.

Our results also demonstrated that PDGF-BB protected mitochondrial ultrastructure against oxidative damage by rotenone (Fig. 3). In this aspect, it has been reported that rotenone-treated (25 μ M) rat cortical astrocytes had decreased mitochondrial length and increased mitochondrial Ca^{2+} and ROS concentration [55]. On the other hand, PDGF-BB is greatly diminishing these features, suggesting that this growth factor maintains the mitochondrial ultrastructural organization. Interestingly, this result agrees with our previous study [12], which showed a PDGF-BB-dependent protection of mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$), and mitochondrial volume in rotenone-treated astrocytic cells. Moreover, an electron microscopy by Gossiau et al. [7] reported that PDGF-AB

increased mitochondrial volume and surface area of mitochondrial cristae in injured fibroblasts, demonstrating that PDGF-AB enhanced the mitochondrial energetic structures during wound healing. Finally, it was observed that a truncated form of BDNF TrkB receptor colocalizes with mitochondria in human and rat astrocytes, suggesting that BDNF has mitochondrial protective functions [56]. However, to our knowledge, this is the first study to address the effect of PDGF-BB on astrocytic cell ultrastructure.

We also show that both PDGF-BB and PDGF-BB + rotenone increased the phosphorylation of AKT and the activation of the PI3K/AKT signaling pathway (Fig. 4a), which is important in proliferation, survival, and antioxidant defense [5, 57]. This finding suggests that PDGF-BB activates survival and antioxidant pathways against rotenone damage mediated

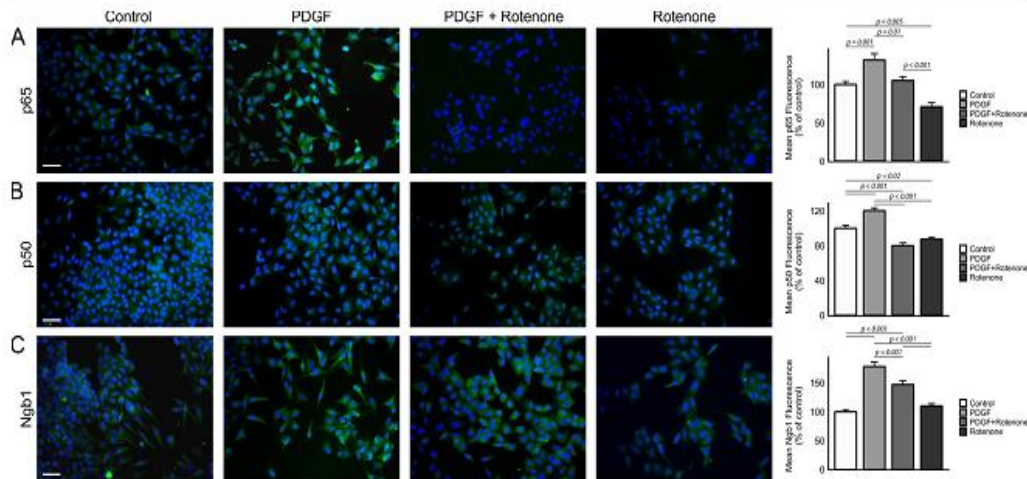


Fig. 5 PDGF increased NF- κ B activation and neuroglobin expression. **a** PDGF-BB is significantly increasing NF- κ B p65 nuclear translocation ($p = 0.001$ vs control); control vs rotenone, $p = 0.005$; PDGF vs PDGF + rotenone, $p = 0.01$; and PDGF + rotenone vs rotenone, $p < 0.001$. **b** PDGF-BB increased NF- κ B p50 nuclear translocation ($p < 0.001$ vs control); control vs PDGF + rotenone, $p < 0.001$; control vs rotenone, $p = 0.02$; PDGF vs PDGF + rotenone, $p < 0.001$; and PDGF

vs rotenone, $p < 0.001$. **c** PDGF-BB and PDGF-BB + rotenone significantly increased Ngb1 expression (PDGF and PDGF + rotenone vs control, $p < 0.001$); PDGF vs PDGF + rotenone, $p = 0.001$; PDGF vs rotenone, $p < 0.001$; and PDGF + rotenone vs rotenone, $p < 0.001$. All data in these figures are presented as mean \pm SEM of three individual experiments. Scale bar 50 μ m

by PI3K/AKT. In this aspect, PDGF-BB and other growth factors like bFGF and EGF have reported to upregulate the expression of antioxidant enzymes like SOD2, catalase, peroxidase, and GPx1 through PI3K/AKT ([9, 57–60]). Importantly, the activation of downstream pathways such as PI3K/AKT is important for inducing the expression of antioxidant enzymes. On the other hand, rotenone treatment decreased the activation of AKT in our astrocytic model (Fig. 4a). Previously, it was shown that mutations in the mitochondrial regulator protein PTEN-induced putative kinase 1 (PINK1) reduced the phosphorylation of AKT and the mitochondrial membrane potential in mouse astrocytes, suggesting that an altered function of AKT could be related with mitochondrial damage [61]. Moreover, rotenone treatment was reported to decrease the expression of GPx1 and that PDGF-BB preserved the expression of this enzyme (Fig. 4d). Similarly, an oxidative damage exerted by glucose deprivation was shown to decrease the expression of GPx1 in an astrocytic model [62], suggesting that oxidative damage may affect the availability of this enzyme.

Interestingly, our results by immunohistochemistry and Western blot suggested that PDGF-BB, but not rotenone, increased the nuclear translocation of NF- κ B p65 and p50 subunits (Fig. 5a, b), suggesting that PDGF-BB might affect NF- κ B nuclear translocation. For instance, transcription factor NF- κ B has multiple effects in the nervous system, including axonal growth, cell survival, protection against oxidative stress, production of SOD2 and mitochondrial antioxidants, genetic expression of cytokines and growth factors, and

regulation of inflammatory processes [19, 20, 37, 63]. Indeed, it has been shown that NF- κ B effects are highly dependent on conditions such as cell type, pathway of the stimuli, or the cellular context [64, 65]. In this aspect, it was previously shown that epidermal growth factor (EGF), hepatocyte growth factor (HGF), and PDGF activate NF- κ B in different processes [8, 66–68]. For example, PDGF-BB was reported to activate NF- κ B through Ras/PI3K/AKT signaling pathway during survival processes in primary fibroblasts [8]. Additionally, EGF was shown to activate NF- κ B in cortical rat astrocytes in order to increase the expression of glutamate transporter (GLT-1, [68]), which is of great importance for astrocytic glutamate clearance. On the other hand, it is noteworthy that certain compounds including quercetin and rotenone are able to block the activation of NF- κ B in fibrosarcoma L929 cell line [69, 70] probably due to its interference with the mitochondrial electron transport system [70]. It is possible that our astrocytic model presents a similar mechanism regarding NF- κ B activation. However, further experiments will be needed in order to address this issue.

It is noteworthy that PDGF-BB significantly increased Ngb1 expression (Fig. 5c). Neuroglobin (Ngb1) has been recently assessed in neurons and astrocytes [17, 18, 71–74] due to its multiple functions in hypoxia, oxygen transport, ROS scavenging, and mitochondrial regulation [71, 72, 75]. In astrocytes, it has been suggested that neuroglobin can influence oxygen homeostasis, and protection against hydrogen peroxide insult through the activation of AKT and preventing the activation of caspase 3 and apoptosis [18, 71]. It was previously

shown that 20–100 ng/mL of vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulated neuroglobin expression in mouse neuronal cerebrocortical cultures through the activation of VEGFR2/Flk1 receptor and possibly via activation of MAPK and HIF-1 α transcription factor [76]. Moreover, a recent work from our group [62] also showed that the conditioned medium from human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (hMSCA-CM), which contains a great variety of growth factors such as bFGF, EGF, BDNF, and NGF [77], upregulated the Ngb1 expression in glucose-deprived astrocytes. Likewise, different studies have reported that Ngb and other globins genes can be regulated by HIF-1 α , SP1, SP3, and NF- κ B transcription factors [78–81]. Therefore, it is possible that PDGF-BB might increase Ngb1 expression through the activation of NF- κ B in our astrocytic model. It is also possible that the observed protection in mitochondrial morphology and ROS production against rotenone insult could be due in part to the Ngb1 activation by PDGF-BB. In this aspect, our results suggest that Ngb1 could be an important protein for PDGF-BB mitochondrial protective mechanisms. However, further experiments are needed in order to fully address this issue.

In conclusion, our results demonstrated the protective effects of PDGF-BB in the T98G astrocytic cell line against rotenone-induced oxidative stress. PDGF-BB was shown to activate PI3K/AKT, modulate the expression of cytoskeletal proteins, and reduce the mitochondrial damage exerted by rotenone. Furthermore, our results also suggest that PDGF-BB signaling activation may have an effect on mitochondrial preservation through the activation of downstream proteins such as neuroglobin. However, further experiments are needed to confirm the involvement of this protein in the protective effects mediated by PDGF-BB and its effects on mitochondria.

Acknowledgments This work was supported in part by PUJ grant IDs 5623 and 5575 to GEB and 5619 to JG, and Colciencias Convocatoria 528 to RC.

Author's Contribution RC and GEB conceived the design of the study; RC, JGS, and PE carried out the study design; RC and NEV-V analyzed data and prepared figures; JG, VE, and GEB discussed and corrected draft versions. All authors (RC, NEV-V, JGS, JG, PE, VE, and GEB) have read and approved the final manuscript.

Compliance with Ethical Standards

Competing Interests The authors declare that they have no conflict of interest.

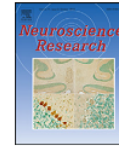
References

- Board R, Jayson GC (2005) Platelet-derived growth factor receptor (PDGFR): a target for anticancer therapeutics. *Drug Resist Updat* 8(1):75–83. doi:10.1016/j.drug.2005.03.004
- De Andrade DVG, de Oliveria DM, Barreto G, Bertolino L-A, Saraceno E, Capani F, Giraldez LD (2008) Effects of the extract of *Anemopaegma mirandum* (Catuaba) on rotenone-induced apoptosis in human neuroblastomas SH-SY5Y cells. *Brain Res* 1198:188–196. doi:10.1016/j.brainres.2008.01.006
- Kang SW (2007) Two axes in platelet-derived growth factor signaling: tyrosine phosphorylation and reactive oxygen species. *Cell Mol Life Sci* 64(5):533–541. doi:10.1007/s00018-007-6437-z
- Trojanowska M (2008) Role of PDGF in fibrotic diseases and systemic sclerosis. *Rheumatology* 47(suppl 5):v2–v4. doi:10.1093/rheumatology/ken265
- Andrac J, Gallini R, Betsholtz C (2008) Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev* 22(10):1276–1312. doi:10.1101/gad.1653708
- Peng F, Yao H, Akturk HK, Buch S (2012) Platelet-derived growth factor CC-mediated neuroprotection against HIV Tat involves TRPC-mediated inactivation of GSK 3beta. *PLoS One* 7(10):e47572. doi:10.1371/journal.pone.0047572
- Gossiau A, Dittrich W, Willig A, Jaros PP (2001) Cytological effects of platelet-derived growth factor on mitochondrial ultrastructure in fibroblasts. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 128(2):241–249. doi:10.1016/S1095-6433(00)00303-2
- Romashkova JA, Makarov SS (1999) NF- κ B is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature* 401(6748):86–90. doi:10.1038/43474
- Zheng L, Ishii Y, Tokunaga A, Hamashima T, Shen J, Zhao Q-L, Ishizawa S, Fujimori T et al (2010) Neuroprotective effects of PDGF against oxidative stress and the signaling pathway involved. *J Neurosci Res* 88(6):1273–1284. doi:10.1002/jnr.22302
- Egawa-Tsuzuki T, Ohno M, Tanaka N, Takeuchi Y, Uramoto H, Faigle R, Funa K, Ishii Y et al (2004) The PDGF B-chain is involved in the ontogenic susceptibility of the developing rat brain to NMDA toxicity. *Exp Neurol* 186(1):89–98. doi:10.1016/j.expneurol.2003.11.001
- Zachrisson O, Zhao M, Andersson A, Danneberg K, Häggblad J, Isacson R, Nielsen E, Patrone C et al (2011) Restorative effects of platelet derived growth factor-BB in rodent models of Parkinson's disease. *J Park Dis* 1(1):49–63. doi:10.3233/JPD-2011-0003
- Cabezas R, Avila MF, González J, El-Bachá RS, Barreto GE (2015) PDGF-BB protects mitochondria from rotenone in T98G cells. *Neurotox Res* 27(4):355–367. doi:10.1007/s12640-014-9509-5
- Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT (2000) Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci* 3(12):1301–1306. doi:10.1038/81834
- Greenamyre JT, Cannon JR, Drolet R, Mastroberardino P-G (2010) Lessons from the rotenone model of Parkinson's disease. *Trends Pharmacol Sci* 31(4):141–142. doi:10.1016/j.tips.2009.12.006
- Cabezas R, El-Bachá RS, González J, Barreto GE (2012) Mitochondrial functions in astrocytes: neuroprotective implications from oxidative damage by rotenone. *Neurosci Res* 74(2):80–90. doi:10.1016/j.neures.2012.07.008
- Swarnkar S, Singh S, Goswami P, Mathur R, Patro IK, Nath C (2012) Astrocyte activation: a key step in rotenone induced cytotoxicity and DNA damage. *Neurochem Res* 37(10):2178–2189. doi:10.1007/s11064-012-0841-y
- Avila-Rodriguez M, Garcia-Segura LM, Hidalgo-Ianussa O, Baez E, Gonzalez J, Barreto GE (2016) Tibolone protects astrocytic cells from glucose deprivation through a mechanism involving estrogen receptor beta and the upregulation of neuroglobin expression. *Mol Cell Endocrinol* 433:35–46. doi:10.1016/j.mce.2016.05.024
- Chen X, Liu Y, Zhang L, Zhu P, Zhu H, Yang Y, Guan P (2015) Long-term neuroglobin expression of human astrocytes following brain trauma. *Neurosci Lett* 606:194–199. doi:10.1016/j.neulet.2015.09.002

19. Maehara K, Oh-Hashi K, Isobe K-I (2001) Early growth-responsive-1-dependent manganese superoxide dismutase gene transcription mediated by platelet-derived growth factor. *FASEB J* 15(11):2025–2026. doi:10.1096/fj.00-0909fj
20. Mattson MP (2005a) NF- κ B in the survival and plasticity of neurons. *Neurochem Res* 30(6–7):883–893. doi:10.1007/s11064-005-6961-x
21. Sampath D, Jackson GR, Werrbach-Perez K, Perez-Polo JR (1994) Effects of nerve growth factor on glutathione peroxidase and catalase in PC 12 cells. *J Neurochem* 62(6):2476–2479. doi:10.1046/j.1471-4159.1994.62062476.x
22. Stein GH (1979) T98G: an anchorage-independent human tumor cell line that exhibits stationary phase G1 arrest in vitro. *J Cell Physiol* 99(1):43–54. doi:10.1002/jcp.1040990107
23. de Joannon AC, Mancini F, Landolfi C, Soldo L, Leta A, Ruggieri A, Mangano G, Polenzani L et al (2000) Adenosine triphosphate affects interleukin-1 β release by T98G glioblastoma cells through a purinoceptor-independent mechanism. *Neurosci Lett* 285(3):218–222
24. Gasque P, Chan P, Mauger C, Schouff M-T, Singhrao S, Dierich MP, Morgan BP, Fontaine M (1996) Identification and characterization of complement C3 receptors on human astrocytes. *J Immunol* 156(6):2247–2255
25. Weibel ER (1979) Stereological methods. Vol. 1. Practical methods for biological morphology. By Ewald R. Weibel, vol 1. *J Microsc*, vol 1. Academic Press, London. doi:10.1111/j.1365-2818.1981.tb01205.x
26. Gassmann M, Grenacher B, Rohde B, Vogel J (2009) Quantifying Western blots: pitfalls of densitometry. *Electrophoresis* 30(11):1845–1855. doi:10.1002/elps.200800720
27. Taylor SC, Berkelman T, Yadav G, Hammond M (2013) A defined methodology for reliable quantification of Western blot data. *Mol Biotechnol* 55(3):217–226. doi:10.1007/s12033-013-9672-6
28. Bankhead P (2013) Analyzing fluorescence microscopy images with ImageJ. *Image J* 1:195
29. R CT (2016) R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna
30. Pearson R (2016) Goodman Kruskal: association analysis for categorical variables. R package version 0.0.2. R package
31. Pohlert T (2014) The pairwise multiple comparison of mean ranks package (PMCMR). R package:2004–2006
32. Lau MK (2013) Dunnett-Tukey-Kramer pairwise multiple comparison test adjusted for unequal variances and unequal sample sizes. Package DTK, 3.5. R package
33. Wickham H (2009) ggplot2: elegant graphics for data analysis. Springer, New York 1 (2):3
34. Wilke CO (2016) Cowplot: streamlined plot theme and plot annotations for 'ggplot2'. R package version 0.7.0. R package
35. Falk T, Zhang S, Sherman SJ (2009) Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) is up-regulated and exogenous VEGF-B is neuroprotective in a culture model of Parkinson's disease. *Mol Neurodegener* 4(1):49. doi:10.1186/1750-1326-4-49
36. Hsuan S-L, Klintworth HM, Xia Z (2006) Basic fibroblast growth factor protects against rotenone-induced dopaminergic cell death through activation of extracellular signal-regulated kinases 1/2 and phosphatidylinositol-3 kinase pathways. *J Neurosci* 26(17):4481–4491. doi:10.1523/JNEUROSCI.4922-05.2006
37. Mattson MP, Goodman Y, Luo H, Fu W, Furukawa K (1997) Activation of NF- κ B protects hippocampal neurons against oxidative stress-induced apoptosis: evidence for induction of manganese superoxide dismutase and suppression of peroxynitrite production and protein tyrosine nitration. *J Neurosci Res* 49(6):681–697. doi:10.1002/(SICI)1097-4547(19970915)49:6<681::AID-JNR3>3.0.CO;2-3
38. Paul G, Zachrisson O, Varrone A, Almqvist P, Jerling M, Lind G, Rehnström S, Linderöth B et al (2015) Safety and tolerability of intracerebroventricular PDGF-BB in Parkinson's disease patients. *J Clin Invest* 125(3):1339–1346. doi:10.1172/JCI79635
39. Safi R, Gardaneh M, Panahi Y, Maghsoudi N, Zaefizadeh M, Gharib E (2012) Optimized quantities of GDNF overexpressed by engineered astrocytes are critical for protection of neuroblastoma cells against 6-OHDA toxicity. *J Mol Neurosci* 46(3):654–665. doi:10.1007/s12031-011-9654-8
40. Avila-Gomez IC, Velez-Pardo C, Jimenez-Del-Rio M (2010) Effects of insulin-like growth factor-1 on rotenone-induced apoptosis in human lymphocyte cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 106(1):53–61. doi:10.1111/j.1742-7843.2009.00472.x
41. Kang K, Lee SW, Han JE, Choi JW, Song MR (2014) The complex morphology of reactive astrocytes controlled by fibroblast growth factor signaling. *Glia* 62(8):1328–1344. doi:10.1002/glia.22684
42. Tang Z, Arjunan P, Lee C, Li Y, Kumar A, Hou X, Wang B, Wardega P et al (2010) Survival effect of PDGF-CC rescues neurons from apoptosis in both brain and retina by regulating GSK3 β phosphorylation. *J Exp Med*. doi:10.1084/jem.20091704
43. Arevalo M-A, Azcoitia I, Garcia-Segura LM (2015) The neuroprotective actions of oestradiol and oestrogen receptors. *Nat Rev Neurosci* 16(1):17–29. doi:10.1038/nrn3856
44. Guasch RM, Tomas M, Minambres R, Valles S, Renau-Piqueras J, Guerri C (2003) RhoA and lysophosphatidic acid are involved in the actin cytoskeleton reorganization of astrocytes exposed to ethanol. *J Neurosci Res* 72(4):487–502
45. Leung YKJ, Pankhurst M, Dunlop SA, Ray S, Dittmann J, Eaton ED, Palumaa P, Sillard R et al (2010) Metallothionein induces a regenerative reactive astrocyte phenotype via JAK/STAT and RhoA signalling pathways. *Exp Neurol* 221(1):98–106. doi:10.1016/j.expneurol.2009.10.006
46. Silver J, Miller JH (2004) Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci* 5(2):146–156. doi:10.1038/nrn1326
47. Sofroniew MV (2009) Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci* 32(12):638–647. doi:10.1016/j.tins.2009.08.002
48. Mattii L, Sabbatini AR, Ippolito C, Pardini C, Vaglini F (2015) RhoA inhibition by C3 prevents dopaminergic neuronal degeneration in rotenone induced neurotoxicity. *Ital J Anat Embryol* 120(1):174
49. Rocha DN, Ferraz-Nogueira JP, Barrias CC, Relvas JB, Pêgo AP (2015) Extracellular environment contribution to astrogliosis—lessons learned from a tissue engineered 3D model of the glial scar. *Front Cell Neurosci* 9:377. doi:10.3389/fncel.2015.00377
50. Sofroniew MV, Vinters HV (2010) Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119(1):7–35. doi:10.1007/s00401-009-0619-8
51. Kalman D, Gomperts SN, Hardy S, Kitamura M, Bishop JM (1999) Ras family GTPases control growth of astrocyte processes. *Mol Biol Cell* 10(5):1665–1683
52. Ball SG, Shuttleworth A, Kielty CM (2012) Inhibition of platelet-derived growth factor receptor signaling regulates Oct4 and Nanog expression, cell shape, and mesenchymal stem cell potency. *Stem Cells* 30(3):548–560. doi:10.1002/stem.1015
53. Li L, Li J, Wang J-Y, Yang C-q, M-I J, Jiang W (2010) Role of RhoA in platelet-derived growth factor-BB-induced migration of rat hepatic stellate cells. *Chin Med J (Engl)* 123(18):2502. doi:10.3760/cma.j.issn.0366-6999.2010.18.002
54. Nobes CD, Hawkins P, Stephens L, Hall A (1995) Activation of the small GTP-binding proteins rho and rac by growth factor receptors. *J Cell Sci* 108(1):225
55. Dehesi S, Dabiri B, Fan S, Tsang M, Rintoul GL (2015) Changes in mitochondrial morphology induced by calcium or rotenone in primary astrocytes occur predominantly through ROS-mediated remodeling. *J Neurochem* 133(5):684–699. doi:10.1111/jnc.13090
56. Wiedemann FR, Siemen D, Mawrin C, Horn TF, Dietzmann K (2006) The neurotrophin receptor TrkB is colocalized to mitochondrial membranes. *Int J Biochem Cell Biol* 38(4):610–620

57. de Oliveira MR, Ferreira GC, Schuck PF, Dal Bosco SM (2015) Role for the PI3K/Akt/Nrf2 signaling pathway in the protective effects of carnosic acid against methylglyoxal-induced neurotoxicity in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Chem Biol Interact* 242:396–406. doi:10.1016/j.cbi.2015.11.003
58. Cheng B, Mattson MP (1995) PDGFs protect hippocampal neurons against energy deprivation and oxidative injury: evidence for induction of antioxidant pathways. *J Neurosci* 15(11):7095–7104
59. Koken T, Erkasap N, Serteser M, Kahraman A (2006) Epidermal growth factor increases tissue antioxidant enzyme activities in ethanol-induced gastric injury in rat. *J Physiol Biochem* 62(4):237–243. doi:10.1007/BF03165752
60. Na H-K, Kim E-H, Jung J-H, Lee H-H, Hyun J-W, Surh Y-J (2008) (-)-Epigallocatechin gallate induces Nrf2-mediated antioxidant enzyme expression via activation of PI3K and ERK in human mammary epithelial cells. *Arch Biochem Biophys* 476(2):171–177. doi:10.1016/j.abb.2008.04.003
61. Choi I, Kim J, Jeong HK, Kim B, Jou I, Park SM, Chen L, Kang UJ et al (2013) PINK1 deficiency attenuates astrocyte proliferation through mitochondrial dysfunction, reduced AKT and increased p38 MAPK activation, and downregulation of EGFR. *Glia* 61(5):800–812
62. Baez-Jurado E, Vega GG, Aliev G, Tarasov VV, Esquinas P, Echeverria V, Barreto GE (2017) Blockade of neuroglobin reduces protection of conditioned medium from human mesenchymal stem cells in human astrocyte model (T98G) under a scratch assay. *Mol Neurobiol*:1–16
63. Kaltschmidt B, Kaltschmidt C (2009) NF- κ B in the nervous system. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1(3):a001271. doi:10.1101/cshperspect.a001271
64. Mattson MP, Camandola S (2001) NF- κ B in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *J Clin Invest* 107(3):247–254. doi:10.1172/JCI11916
65. Mincheva-Tasheva S, Soler RM (2013) NF- κ B signaling pathways role in nervous system physiology and pathology. *Neuroscientist* 19(2):175–194. doi:10.1177/1073858412444007
66. Habib AA, Chatterjee S, Park S-K, Ratan RR, Lefebvre S, Vartanian T (2001) The epidermal growth factor receptor engages receptor interacting protein and nuclear factor- κ B (NF- κ B)-inducing kinase to activate NF- κ B: identification of a novel receptor-tyrosine kinase signalosome. *J Biol Chem* 276(12):8865–8874. doi:10.1074/jbc.M008458200
67. Müller M, Morotti A, Ponzetto C (2002) Activation of NF- κ B is essential for hepatocyte growth factor-mediated proliferation and tubulogenesis. *Mol Cell Biol* 22(4):1060–1072. doi:10.1128/MCB.22.4.1060-1072.2002
68. Zelenia O, Schlag BD, Goehener GE, Ganel R, Song W, Beesley JS, Grinspan JB, Rothstein JD et al (2000) Epidermal growth factor receptor agonists increase expression of glutamate transporter GLT-1 in astrocytes through pathways dependent on phosphatidylinositol 3-kinase and transcription factor NF- κ B. *Mol Pharmacol* 57(4):667–678. doi:10.1124/mol.57.4.667
69. Epinat J-C, Gilmore TD (1999) Diverse agents act at multiple levels to inhibit the Rel/NF- κ B signal transduction pathway. *Oncogene* 18(49):6896–6909. doi:10.1038/sj.onc.1203218
70. Schulze-Osthoff K, Beyaert R, Vandevoorde V, Haegeman G, Fiers W (1993) Depletion of the mitochondrial electron transport abolishes the cytotoxic and gene-inductive effects of TNF. *EMBO J* 12(8):3095–3104
71. Amri F, Ghoulil I, Amri M, Carrier A, Masmoudi-Kouki O (2017) Neuroglobin protects astroglial cells from hydrogen peroxide-induced oxidative stress and apoptotic cell death. *J Neurochem*. doi:10.1111/jnc.13876
72. Baez E, Echeverria V, Cabezas R, Ávila-Rodríguez M, Garcia-Segura LM, Barreto GE (2016) Protection by neuroglobin expression in brain pathologies. *Front Neurol* 7(146). doi:10.3389/fneur.2016.00146
73. Emará M, Salloum N, Allalunis-Turner J (2009) Expression and hypoxic up-regulation of neuroglobin in human glioblastoma cells. *Mol Oncol* 3(1):45–53. doi:10.1016/j.molonc.2008.11.002
74. Xie L-k, Yang S-h (2016) Brain globins in physiology and pathology. *Med Gas Res* 6(3):154–163. doi:10.4103/2045-9912.191361
75. Brittain T (2012) The anti-apoptotic role of neuroglobin. *Cell* 1(4):1133–1155. doi:10.3390/cells1041133
76. Jin K, Mao X, Xie L, Greenberg DA (2012) Interactions between vascular endothelial growth factor and neuroglobin. *Neurosci Lett* 519(1):47–50. doi:10.1016/j.neulet.2012.05.018
77. Skalnikova HK (2013) Proteomic techniques for characterisation of mesenchymal stem cell secretome. *Biochimie* 95(12):2196–2211
78. Haines B, Demaria M, Mao X, Xie L, Campisi J, Jin K, Greenberg DA (2012) Hypoxia-inducible factor-1 and neuroglobin expression. *Neurosci Lett* 514(2):137–140. doi:10.1016/j.neulet.2012.01.080
79. Liu N, Yu Z, Li Y, Yuan J, Zhang J, Xiang S, Wang X (2013) Transcriptional regulation of mouse neuroglobin gene by cyclic AMP responsive element binding protein (CREB) in N2a cells. *Neurosci Lett* 534:333–337. doi:10.1016/j.neulet.2012.11.025
80. Liu N, Yu Z, Xiang S, Zhao S, Tjärnlund-Wolf A, Xing C, Zhang J, Wang X (2012) Transcriptional regulation mechanisms of hypoxia-induced neuroglobin gene expression. *Biochem J* 443(1):153–164. doi:10.1042/BJ20111856
81. Nakatani K, Okuyama H, Shimahara Y, Saeki S, Kim D-H, Nakajima Y, Seki S, Kawada N et al (2004) Cytoglobin/STAP, its unique localization in splanchnic fibroblast-like cells and function in organ fibrogenesis. *Lab Invest* 84(1):91–101. doi:10.1038/sj.labinvest.3700013

**ARTICULOS PUBLICADOS
ASOCIADOS AL TEMA DE
INVESTIGACIÓN**



Review article

Mitochondrial functions in astrocytes: Neuroprotective implications from oxidative damage by rotenone

Ricardo Cabezas^a, Ramon Santos El-Bachá^b, Janneth González^a, George E. Barreto^{a,*}^a Departamento de Nutrición y Bioquímica, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia^b Departamento de Biofunção, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 April 2012

Received in revised form 25 July 2012

Accepted 26 July 2012

Available online 10 August 2012

Keywords:

Astrocytes

Oxidative stress

Mitochondria

Rotenone

Neuroprotection

ABSTRACT

Mitochondria are critical for cell survival and normal development, as they provide energy to the cell, buffer intracellular calcium, and regulate apoptosis. They are also major targets of oxidative stress, which causes bioenergetics failure in astrocytes through the activation of different mechanisms and production of oxidative molecules. This review provides an insightful overview of the recent discoveries and strategies for mitochondrial protection in astrocytes. We also discuss the importance of rotenone as an experimental approach for assessing oxidative stress in the brain and delineate some molecular strategies that enhance mitochondrial function in astrocytes as a promising strategy against brain damage.

© 2012 Elsevier Ireland Ltd and the Japan Neuroscience Society. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	81
2. Oxidative stress in the brain	81
2.1. Mitochondrial functions in the brain	81
2.2. Complex I and inhibitors	82
3. Rotenone as a model of mitochondrial toxicity	82
4. Oxidative stress in astrocytes	83
4.1. Astrocytic functions	83
4.2. Mitochondrial impairment in astrocytes	84
5. Molecular strategies for mitochondrial protection	85
5.1. Transcription factor activation: NF-κB and oxidative stress	85
5.2. Superoxide dismutases and mitochondrial function	85
5.3. Glutathione	86
5.4. Mitochondrial chaperones and oxidative stress	86
5.5. Growth factors	87
5.6. Prospective roles of PDGF-BB in oxidative stress	87
6. Conclusions	87
Acknowledgment	87
References	87

* Corresponding author. Tel.: +57 1 320 8320x4096.

E-mail address: gsampaio@javeriana.edu.co (G.E. Barreto).



Astrocytic modulation of blood brain barrier: perspectives on Parkinson's disease

Ricardo Cabezas¹, Marcos Ávila¹, Janneth Gonzalez¹, Ramon Santos El-Bachá², Eliana Báez¹, Luis Miguel García-Segura³, Juan Camilo Jurado Coronel¹, Francisco Capani⁴, Gloria Patricia Cardona-Gomez⁵ and George E. Barreto^{1*}

¹ Departamento de Nutrición y Bioquímica, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia

² Departamento de Biofunção, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil

³ Instituto Cajal, CSIC, Madrid, Spain

⁴ Laboratorio de Citoarquitectura y Plasticidad Neuronal, Facultad de Medicina, Instituto de Investigaciones cardiológicas Prof. Dr. Alberto C. Taquini (ININCA), UBA-CONICET, Buenos Aires, Argentina

⁵ Cellular and Molecular Neurobiology Area, Group of Neuroscience of Antioquia, Faculty of Medicine, SIU, University of Antioquia UdeA, Medellín, Colombia

Edited by:

Rubem C. A. Guedes, Universidade Federal de Pernambuco, Brazil

Reviewed by:

Hajime Hirase, RIKEN - Brain

Science Institute, Japan

Ping Liu, University of Connecticut

Health Center, USA

*Correspondence:

George E. Barreto, Departamento de Nutrición y Bioquímica, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Edif. Carlos Ortiz, Oficina 107, Cra 7 40-62, Bogotá, D.C., Colombia
e-mail: gsampaio@javeriana.edu.co

The blood–brain barrier (BBB) is a tightly regulated interface in the Central Nervous System (CNS) that regulates the exchange of molecules in and out from the brain thus maintaining the CNS homeostasis. It is mainly composed of endothelial cells (ECs), pericytes and astrocytes that create a neurovascular unit (NVU) with the adjacent neurons. Astrocytes are essential for the formation and maintenance of the BBB by providing secreted factors that lead to the adequate association between the cells of the BBB and the formation of strong tight junctions. Under neurological disorders, such as chronic cerebral ischemia, brain trauma, Epilepsy, Alzheimer and Parkinson's Diseases, a disruption of the BBB takes place, involving a loss in the permeability of the barrier and phenotypical changes in both the ECs and astrocytes. In this aspect, it has been established that the process of reactive gliosis is a common feature of astrocytes during BBB disruption, which has a detrimental effect on the barrier function and a subsequent damage in neuronal survival. In this review we discuss the implications of astrocyte functions in the protection of the BBB, and in the development of Parkinson's disease (PD) and related disorders. Additionally, we highlight the current and future strategies in astrocyte protection aimed at the development of restorative therapies for the BBB in pathological conditions.

Keywords: BBB, astrocytes, reactive astrogliosis, endothelial cells, Parkinson disease

INTRODUCTION

The Blood Brain Barrier (BBB) is an essential regulatory component of the neural interface with the brain vasculature. It exerts a tightly regulation in the movement of ions, molecules and cells between the neural cells and the blood (Daneman, 2012; Wong et al., 2013), thus maintaining the ionic homeostasis, hormonal and transmitter levels and transport of nutrients in the brain (Luissint et al., 2012). In this aspect, BBB is important for the separation of neurotransmitters pools and neuroactive agents that regulate brain microenvironment (Abbott et al., 2006). Furthermore, the BBB supplies the brain with different nutrients, exerts a restriction of ionic substances between the blood and the brain through specific ion transporters, regulates the ISF (interstitial fluid), prevents the formation of additional injuries during diseases and cerebrovascular accidents and is an important barrier for the brain transport and metabolization of drugs (Abbott et al., 2006; Daneman, 2012; Wong et al., 2013).

The BBB is composed by brain capillary endothelial cells (ECs), with a specific phenotype located in a strong association with astrocytic endfeet processes and mesenchymal-like

cells pericytes. Importantly, the BBB is characterized by the presence of tight junctions between ECs, and the expression of specific polarized transport systems (Luissint et al., 2012). On the other hand, astrocytes through their endfeet establish the link between the endothelial blood flux and neurons, and are important regulators in the formation and maintenance of the BBB (Alvarez et al., 2013). BBB dysfunction has been associated with pathological conditions and diseases including cerebral ischemia, brain trauma, glioblastoma, stroke, multiple sclerosis, epilepsy, Alzheimer and Parkinson's Disease (PD; Haseloff et al., 2005; Daneman, 2012; Alvarez et al., 2013).

PD is a progressive neurodegenerative disorder caused by neuronal death in substantia nigra (SN), degeneration of dopaminergic neurotransmission, and the presence of α -synuclein and protein inclusions in neuronal cells, also known as Lewy bodies (Nutt and Wooten, 2005; Halliday and Stevens, 2011). Main symptoms of Parkinson include asymmetrical bradikinesia, rigidity, resting tremor and postural instability (Fernandez, 2012; Singer, 2012). Initiation and progression of PD is dependent upon cellular events, such as failures in the

Growth Factors and Astrocytes Metabolism: Possible Roles for Platelet Derived Growth Factor

Ricardo Cabezas¹, Marco Avila-Rodriguez¹, Nelson Enrique Vega-Vela¹, Valentina Echeverria^{2,3}, Janneth González¹, Oscar Alejandro Hidalgo¹, Altair Brito Santos⁴, Gjumrakch Aliev^{5,6,7,*} and George E. Barreto^{1,8,*}



Gjumrakch Aliev

¹Departamento de Nutrición y Bioquímica, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C., Colombia; ²Department of Molecular Medicine, Morsani College of Medicine, University of South Florida, Tampa, FL, 33647, USA; ³Universidad San Sebastián, Lientur 1457, Concepción, 4030000, Chile; ⁴Department of Biological Sciences, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Brazil; ⁵"GALLY" International Biomedical Research Consulting LLC, San Antonio, TX, 78229, USA; ⁶School of Health Science and Healthcare Administration, The University of Atlanta, Johns Creek, GA, 30097, USA; ⁷Institute of Physiologically Active Compounds Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, 142432, Russia; ⁸Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad Autónoma de Chile, Santiago, Chile



George E. Barreto

Abstract: Astrocytes exert multiple functions in the brain such as the development of blood-brain barrier characteristics, the promotion of neurovascular coupling, attraction of cells through the release of chemokines, clearance of toxic substances and generation of antioxidant molecules and growth factors. In this aspect, astrocytes secrete several growth factors (BDNF, GDNF, NGF, and others) that are fundamental for cell viability, oxidant protection, genetic expression and modulation of metabolic functions. The platelet derived growth factor (PDGF), which is expressed by many SNC cells, including astrocytes, is an important molecule that has shown neuroprotective potential, improvement of wound healing, regulation of calcium metabolism and mitochondrial function. Here we explore some of these astrocyte-driven functions of growth factors and their possible therapeutic uses in the context of neurodegeneration.

Keywords: Astrocyte, growth factors, metabolism, mitochondria, neuroprotection, platelet derived growth factor.

INTRODUCTION

Numerous growth factors have a major impact in the maintenance of brain functions both during normal and in pathological conditions. Growth factor functions are mainly mediated through growth factor receptor activation and they include cell differentiation, neurotransmitter regulation. Central Nervous System (CNS) development, cognitive functions, neuroprotection and also the metabolic regulation of the brain [1-4]. In this aspect, previous studies have shown the importance of growth factors in the regulation of important metabolic functions such as oxidative damage, maintenance of mitochondrial membrane potential, glucose and calcium influx in the brain [1, 5-7].

Although growth factors in the brain are produced by neurons, oligodendrocytes or microglia [4, 8], their release

by astrocytes is of primordial importance for the maintenance of neuronal functions [9, 10]. Astrocytes are an important source of BDNF (Brain derived neurotrophic factor), GDNF (Glial cell line derived neurotrophic factor), NGF (nerve growth factor), PDGF (Platelet derived growth factor) and others with prospective neuroprotective functions in the brain [4, 10, 11]. In the present review, we explore the importance of growth factors in astrocytic metabolic regulation, and highlight the effect of PDGF as a potential therapeutic approach.

ASTROCYTE FUNCTIONS

Astrocytes are part of the glial cells along with oligodendrocytes and microglia [12]. These cells have a great range of functions that include Blood Brain Barrier (BBB) maintenance, uptake of glutamate and g-aminobutyric acid (GABA) by specific transporters, production of antioxidant compounds like glutathione (GSH) and superoxide dismutases (SOD) and growth factors that enhance neuronal viability, both in normal and in pathological conditions [13-17]. This cell type is characterized by a stellate morphology with various processes and ramifications, and by the expression of the

*Address correspondence to this author at the "GALLY" International Biomedical Research Consulting LLC, San Antonio, TX 78229, USA; Tel: +440-263-7461; E-mail: aliev03@gmail.com (Gjumrakch Aliev); Departamento de Nutrición y Bioquímica, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C., Colombia; Tel: +57 1 320 8320 (ext 4096); E-mail: gsampaio@javeriana.edu.co (George E. Barreto)



Novel Approaches in Astrocyte Protection: from Experimental Methods to Computational Approaches

Daniel Garzón¹ · Ricardo Cabezas¹ · Nelson Vega¹ · Marcos Ávila-Rodríguez¹ · Janneth Gonzalez¹ · Rosa Margarita Gómez² · Valentina Echeverría^{3,4} · Gjumrakch Aliev^{5,6} · George E. Barreto^{1,7}

Received: 11 December 2015 / Accepted: 13 January 2016 / Published online: 23 January 2016
© Springer Science+Business Media New York 2016

Abstract Astrocytes are important for normal brain functioning. Astrocytes are metabolic regulators of the brain that exert many functions such as the preservation of blood–brain barrier (BBB) function, clearance of toxic substances, and generation of antioxidant molecules and growth factors. These functions are fundamental to sustain the function and survival of neurons and other brain cells. For these reasons, the protection of astrocytes has become relevant for the prevention of neuronal death during brain pathologies such as Parkinson’s disease, Alzheimer’s disease, stroke, and other neurodegenerative conditions. Currently, different strategies are being used to protect the main astrocytic functions during neurological diseases, including the use of growth factors, steroid derivatives, mesenchymal stem cell paracrine factors, nicotine derivatives, and computational biology tools. Moreover, the combined use of

experimental approaches with bioinformatics tools such as the ones obtained through system biology has allowed a broader knowledge in astrocytic protection both in normal and pathological conditions. In the present review, we highlight some of these recent paradigms in assessing astrocyte protection using experimental and computational approaches and discuss how they could be used for the study of restorative therapies for the brain in pathological conditions.

Keywords Astrocytes · Neurosteroids · Growth factors · Mesenchymal stem factors · Nicotine · Computational biology

Introduction

In the last few years, astrocytes have gained a broad attention, as they exert multiple functions for maintenance of the brain homeostasis and neuronal protection. These cells are important metabolic regulators of the brain, both during normal conditions and disease. In this aspect, astrocytes are important in the formation of the blood–brain barrier (BBB) (Hamby and Sofroniew 2010; Cabezas et al. 2014; Posada-Duque et al. 2014), the clearance of toxic substances such as glutamate excess and K⁺ spatial buffering, and the release of trophic growth factors for neurons and other brain cells (Volterra and Meldolesi 2005; Kimelberg and Nedergaard 2010; Barreto et al. 2011a; Parpura et al. 2011; Cabezas et al. 2012). These functions are based in an intimate morphological and molecular relationship between astrocytes and neurons through the astrocytic endfeet and the generation of the “tripartite synapse,” where the presynaptic and postsynaptic members are in close association with surrounding astrocytes (Perea et al. 2009; Perez-Alvarez and Araque 2013; Coulter and Steinhauser 2015). Moreover, the astrocyte–neuron interaction is crucial for correct brain functioning, as astrocytes

Daniel Garzón and Ricardo Cabezas contributed equally to this work.

✉ George E. Barreto
gesbarreto@gmail.com

¹ Departamento de Nutrición y Bioquímica, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C., Colombia

² Grupo de Neurociencias, Universidad La Sabana, Chía, Cundinamarca, Colombia

³ Department of Molecular Medicine, Morsani College of Medicine, University of South Florida, Tampa, FL 33647, USA

⁴ Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad San Sebastián, Lientur, 1457 Concepción, Chile

⁵ “GALLY” International Biomedical Research Consulting LLC, San Antonio, TX 78229, USA

⁶ School of Health Science and Healthcare Administration, University of Atlanta, E. Johns Crossing, #175, Johns Creek, GA 30097, USA

⁷ Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad Autónoma de Chile, Santiago, Chile

Mechanisms of PDGFRalpha promiscuity and PDGFRbeta specificity in association with PDGFB

Daniel Torrente¹, Ricardo Cabezas¹, Marcos Avila¹, Yuly Sanchez¹, Ludis Morales¹, Ghulam Md Ashraf², George E. Barreto¹, Janneth Gonzalez¹, Gjumrakch Aliev^{3,4}

¹Departamento de Nutricion y Bioquimica, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogota D.C., Colombia. Carrera 7ª # 43-82, Carlos Ortiz Bldg, S. J.; Lab. 107/108, ²King Fahd Medical Research Center, King Abdulaziz University, P. O. Box 80216, Jeddah, Saudi Arabia 21589, ³GALLY International Biomedical Research Consulting LLC., 7733 Louis Pasteur Drive, #330, San Antonio, TX, USA 78229, ⁴School of Health Science and Healthcare Administration, University of Atlanta, E. Johns Crossing, #175, Johns Creek, GA, USA 30097

TABLE OF CONTENTS

1. Abstract
2. Introduction
3. Materials and methods
 - 3.1. Sequence Alignment
 - 3.2. Molecular modeling and validation
 - 3.3. Protein-protein docking simulation
 - 3.4. Docking validation by molecular dynamics simulation
 - 3.5. Docking interface analysis
4. Results
 - 4.1. Protein-protein docking
 - 4.2. PDGFA-Ralpha complex: interface description
 - 4.3. PDGB-Ralpha complex: interface description
5. Discussion
6. Acknowledgements
7. References

1. ABSTRACT

Platelet-derived growth factor receptor alpha (PDGFRalpha) interacts with PDGFs A, B, C and AB, while PDGFRbeta binds to PDGFs B and D, thus suggesting that PDGFRalpha is more promiscuous than PDGFRbeta. The structural analysis of PDGFRalpha-PDGFA and PDGFRalpha-PDGFB complexes, and a molecular explanation for the promiscuity of PDGFRalpha and the specificity of PDGFRbeta remain unclear. In the present study, we modeled the three extracellular domains of PDGFRalpha using a previous crystallographic structure of PDGFRbeta as a template. Additionally, we analyzed the interacting residues of PDGFRalpha-PDGFA and PDGFRalpha-PDGFB complexes using docking simulations. The validation of the resulting complexes was evaluated by molecular dynamics simulations. Our results show that changes of non-aromatic amino acids in PDGFRalpha to aromatic amino acids in PDGFRbeta (I139F, P267F and N204Y) may be involved in the promiscuity of PDGFRalpha. These results may be used as an input for a better peptide design targeting diseases related with the malfunction of PDGF system such as cancer and atherosclerosis.

2. INTRODUCTION

Platelet-derived growth factors (PDGFs A, B, C, and D) are the key mitogens for connective tissue cells like smooth muscle cells and fibroblasts, and enhance wound healing and maintain connective tissue homeostasis in adulthood (1,2) and critically regulate embryonic development (3-6). On the other hand, healing process mediated by PDGF overexpression can occur due to inflammation or chronic injury that leads to fibrosis of pathological tissues (7). Previous studies reported that aberrant expressions of PDGF and its receptor (PDGFR) are often associated with a variety of diseases including atherosclerosis, cancer, fibroproliferative diseases of lungs, kidneys and joints (8,9).

PDGF as a mitogen is composed of a family of five dimeric PDGF ligands, PDGF's A, B, C, D, and AB with two tyrosine kinase receptors, the PDGF alpha and beta (Ralpha and Rbeta) (10). The A and B chains of PDGFs are synthesized as precursors and undergo proteolytic processing after dimerization. Ralpha and Rbeta possess 60% amino acid identity, with eight conserved cysteine residues (11). Ralpha promiscuity may rely on its ability to bind PDGF's A, B, and C (12), whereas Rbeta might



Protection by Neuroglobin Expression in Brain Pathologies

Eliana Baez¹, Valentina Echeverría², Ricardo Cabezas¹, Marco Ávila-Rodríguez¹, Luis Miguel García-Segura^{3*} and George E. Barreto^{1,4*}

¹Departamento de Nutrición y Bioquímica, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C., Colombia, ²Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad San Sebastián, Concepción, Chile, ³Instituto Cajal, CSIC, Madrid, Spain, ⁴Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad Autónoma de Chile, Santiago, Chile

OPEN ACCESS

Edited by:

Firas H. Kobeissy,
University of Florida, USA

Reviewed by:

Bridgette D. Semple,
University of Melbourne, Australia
Hala Darwish,
American University of Beirut,
Lebanon

*Correspondence:

Luis Miguel García-Segura
lmgsc@cajal.csic.es;
George E. Barreto
gsampaio@javeriana.edu.co

Specialty section:

This article was submitted
to Neurotrauma,
a section of the journal
Frontiers in Neurology

Received: 09 June 2016

Accepted: 29 August 2016

Published: 12 September 2016

Citation:

Baez E, Echeverría V, Cabezas R,
Ávila-Rodríguez M, García-Segura LM
and Barreto GE (2016) Protection by
Neuroglobin Expression in Brain
Pathologies.
Front. Neurol. 7:146.
doi: 10.3389/fneur.2016.00146

Astrocytes play an important role in physiological, metabolic, and structural functions, and when impaired, they can be involved in various pathologies including Alzheimer, focal ischemic stroke, and traumatic brain injury. These disorders involve an imbalance in the blood flow and nutrients such as glucose and lactate, leading to biochemical and molecular changes that cause neuronal damage, which is followed by loss of cognitive and motor functions. Previous studies have shown that astrocytes are more resilient than neurons during brain insults as a consequence of their more effective antioxidant systems, transporters, and enzymes, which made them less susceptible to excitotoxicity. In addition, astrocytes synthesize and release different protective molecules for neurons, including neuroglobin, a member of the globin family of proteins. After brain injury, neuroglobin expression is induced in astrocytes. Since neuroglobin promotes neuronal survival, its increased expression in astrocytes after brain injury may represent an endogenous neuroprotective mechanism. Here, we review the role of neuroglobin in the central nervous system, its relationship with different pathologies, and the role of different factors that regulate its expression in astrocytes.

Keywords: astrocytes, neuroglobin, mitochondria, neuroprotection, brain injury

INTRODUCTION

The brain has about 170 billion cells (1), which consume an average of 516 kcal of energy per day, representing 22% of total energy demand of an organism (2). This energy demand is required to carry out essential functions such as synaptic transmission, uptake and metabolism of neurotransmitters, and maintenance of ion gradients (3). For this reason, it is of pivotal importance to maintain optimal conditions of the intra- and extracellular environment targeting nerve cells needs. However, in diseases such as ischemic and traumatic brain injuries, an energy imbalance induced by the interruption of blood flow leads to metabolic stress, ionic disturbance, and activation of a complex cascade of biochemical and molecular events that can cause neuronal death (4). Moreover, there are other diseases such as hypoglycemia and diabetes, in which a misbalance in glucose levels can trigger brain damage (5, 6). In this context, traumatic brain injury has become a global public health problem, and it is the leading cause of death in individuals under 45 years of age and recurrent in young people, adolescents, and elders (7). Brain trauma induces cognitive and motor dysfunction (8). In a study reported by Quijano et al., cognitive abilities were assessed in subjects who suffered moderate head trauma and a control non-injured group. The results revealed significant differences in orientation, attention, memory, language, reading, and writing abilities (9). Despite the enormous efforts and

PRESENTACIONES EN CONGRESOS

Cabezas Ricardo, Avila Marco Fidel, El Bachá Ramón Dos Santos, Barreto G. PDGF-BB Protection against rotenone in an astrocytic model. School of Neuroinformatics and Computational Neuroscience 2014 Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá. 27 de Octubre-7 de Noviembre. Presentación Oral

Cabezas Ricardo, Avila Marco Fidel, Barreto George, Janneth González. Protección mitocondrial por PDGF-BB en un modelo astrocitario. X Congreso Nacional / XI Seminario Internacional de Neurociencias. Universidad Tecnológica de Pereira. 26-28 de Mayo de 2016. Poster.

Cabezas Ricardo, Barreto George, Janneth González. Computational Modeling of the PDGF signaling pathway to study rotenone-induced mitochondrial injury in astrocytes. International School of Bioinformatics and computational neuroscience. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá. Octubre 5-8 de 2016. Presentación Oral.

ANEXO 2

CARTA DE AUTORIZACIÓN DE LOS AUTORES
(Licencia de uso)

Bogotá, D.C., 8 / 19 / 2017

Señores
Biblioteca Alfonso Borrero Cabal S.J.
Pontificia Universidad Javeriana
Cuidad

Los suscritos:
Ricardo Julián Cabezas Pérez, con C.C. No 80.093915
_____, con C.C. No _____
_____, con C.C. No _____

En mi (nuestra) calidad de autor (es) exclusivo (s) de la obra titulada:
Mecanismos de protección frente a rotomona por PDF-BB en un modelo
astrotarbia

(por favor señale con una "x" las opciones que apliquen)

Tesis doctoral Trabajo de grado Premio o distinción: Si No

cual: _____
presentado y aprobado en el año 2017, por medio del presente escrito autorizo (autorizamos) a la Pontificia Universidad Javeriana para que, en desarrollo de la presente licencia de uso parcial, pueda ejercer sobre mi (nuestra) obra las atribuciones que se indican a continuación, teniendo en cuenta que en cualquier caso, la finalidad perseguida será facilitar, difundir y promover el aprendizaje, la enseñanza y la investigación.

En consecuencia, las atribuciones de usos temporales y parciales que por virtud de la presente licencia se autorizan a la Pontificia Universidad Javeriana, a los usuarios de la Biblioteca Alfonso Borrero Cabal S.J., así como a los usuarios de las redes, bases de datos y demás sitios web con los que la Universidad tenga perfeccionado un convenio, son:

AUTORIZO (AUTORIZAMOS)	SI	NO
1. La conservación de los ejemplares necesarios en la sala de tesis y trabajos de grado de la Biblioteca.	X	
2. La consulta física (sólo en las instalaciones de la Biblioteca)	X	
3. La consulta electrónica - on line (a través del catálogo Biblos y el Repositorio Institucional)	X	
4. La reproducción por cualquier formato conocido o por conocer	X	
5. La comunicación pública por cualquier procedimiento o medio físico o electrónico, así como su puesta a disposición en Internet	X	
6. La inclusión en bases de datos y en sitios web sean éstos onerosos o gratuitos, existiendo con ellos previo convenio perfeccionado con la Pontificia Universidad Javeriana para efectos de satisfacer los fines previstos. En este evento, tales sitios y sus usuarios tendrán las mismas facultades que las aquí concedidas con las mismas limitaciones y condiciones	X	

De acuerdo con la naturaleza del uso concedido, la presente licencia parcial se otorga a título gratuito por el máximo tiempo legal colombiano, con el propósito de que en dicho lapso mi (nuestra) obra sea explotada en las condiciones aquí estipuladas y para los fines indicados, respetando siempre la titularidad de los derechos patrimoniales y morales correspondientes, de

acuerdo con los usos honrados, de manera proporcional y justificada a la finalidad perseguida, sin ánimo de lucro ni de comercialización.

De manera complementaria, garantizo (garantizamos) en mi (nuestra) calidad de estudiante (s) y por ende autor (es) exclusivo (s), que la Tesis o Trabajo de Grado en cuestión, es producto de mi (nuestra) plena autoría, de mi (nuestro) esfuerzo personal intelectual, como consecuencia de mi (nuestra) creación original particular y, por tanto, soy (somos) el (los) único (s) titular (es) de la misma. Además, aseguro (aseguramos) que no contiene citas, ni transcripciones de otras obras protegidas, por fuera de los límites autorizados por la ley, según los usos honrados, y en proporción a los fines previstos; ni tampoco contempla declaraciones difamatorias contra terceros; respetando el derecho a la imagen, intimidad, buen nombre y demás derechos constitucionales. Adicionalmente, manifiesto (manifestamos) que no se incluyeron expresiones contrarias al orden público ni a las buenas costumbres. En consecuencia, la responsabilidad directa en la elaboración, presentación, investigación y, en general, contenidos de la Tesis o Trabajo de Grado es de mi (nuestro) competencia exclusiva, eximiendo de toda responsabilidad a la Pontificia Universidad Javeriana por tales aspectos.

Sin perjuicio de los usos y atribuciones otorgadas en virtud de este documento, continuaré (continuaremos) conservando los correspondientes derechos patrimoniales sin modificación o restricción alguna, puesto que de acuerdo con la legislación colombiana aplicable, el presente es un acuerdo jurídico que en ningún caso conlleva la enajenación de los derechos patrimoniales derivados del régimen del Derecho de Autor.

De conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, "Los derechos morales sobre el trabajo son propiedad de los autores", los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables. En consecuencia, la Pontificia Universidad Javeriana está en la obligación de RESPETARLOS Y HACERLOS RESPETAR, para lo cual tomará las medidas correspondientes para garantizar su observancia.

NOTA: Información Confidencial:

Esta Tesis o Trabajo de Grado contiene información privilegiada, estratégica, secreta, confidencial y demás similar, o hace parte de una investigación que se adelanta y cuyos resultados finales no se han publicado. Si No

En caso afirmativo expresamente indicaré (indicaremos), en carta adjunta, tal situación con el fin de que se mantenga la restricción de acceso.

NOMBRE COMPLETO	No. del documento de identidad	FIRMA
Ricardo Julián Cabezas Pérez	80.042.915	Ricardo J. Cabezas

FACULTAD: Ciencias
PROGRAMA ACADÉMICO: Doctorado Ciencias Biológicas

ANEXO 3
BIBLIOTECA ALFONSO BORRERO CABAL, S.J.
DESCRIPCIÓN DE LA TESIS O DEL TRABAJO DE GRADO
FORMULARIO

TÍTULO COMPLETO DE LA TESIS DOCTORAL O TRABAJO DE GRADO						
SUBTÍTULO, SI LO TIENE						
AUTOR O AUTORES						
Apellidos Completos			Nombres Completos			
Cabezas Pérez			Ricardo Julian			
DIRECTOR (ES) TESIS O DEL TRABAJO DE GRADO						
Apellidos Completos			Nombres Completos			
Sampaio Barreto Gonzalez			George Emilio Janeth			
FACULTAD						
Ciencias						
PROGRAMA ACADÉMICO						
Tipo de programa (seleccione con "x")						
Pregrado	Especialización	Maestría	Doctorado			
			X			
Nombre del programa académico						
Doctorado Ciencias Biológicas						
Nombres y apellidos del director del programa académico						
TRABAJO PARA OPTAR AL TÍTULO DE:						
Doctor en Ciencias Biológicas						
PREMIO O DISTINCIÓN (En caso de ser LAUREADAS o tener una mención especial):						
CIUDAD		AÑO DE PRESENTACIÓN DE LA TESIS O DEL TRABAJO DE GRADO			NÚMERO DE PÁGINAS	
Bogotá		2017			244	
TIPO DE ILUSTRACIONES (seleccione con "x")						
Dibujos	Pinturas	Tablas, gráficos y diagramas	Planos	Mapas	Fotografías	Partituras
		X			X	
SOFTWARE REQUERIDO O ESPECIALIZADO PARA LA LECTURA DEL DOCUMENTO						
Nota: En caso de que el software (programa especializado requerido) no se encuentre licenciado por la Universidad a través de la Biblioteca (previa consulta al estudiante), el texto de la Tesis o Trabajo de Grado quedará solamente en formato PDF.						

MATERIAL ACOMPAÑANTE					
TIPO	DURACIÓN (minutos)	CANTIDAD	FORMATO		
			CD	DVD	Otro ¿Cuál?
Vídeo					
Audio					
Multimedia					
Producción electrónica					
Otro ¿Cuál?		1			Modelo computacional COPASI
DESCRIPTORES O PALABRAS CLAVE EN ESPAÑOL E INGLÉS Son los términos que definen los temas que identifican el contenido. (En caso de duda para designar estos descriptores, se recomienda consultar con la Sección de Desarrollo de Colecciones de la Biblioteca Alfonso Borrero Cabal S.J en el correo biblioteca@javeriana.edu.co , donde se les orientará).					
ESPAÑOL		INGLÉS			
Astrocitos		Astrocytes			
PDGF-BB		PDGF-BB			
Rotenona		Rotenone.			
Parkinson		Parkinson disease			
estrés oxidativo		oxidative stress			
RESUMEN DEL CONTENIDO EN ESPAÑOL E INGLÉS (Máximo 250 palabras - 1530 caracteres)					
<p>En la presente tesis de doctorado, se estudiaron los efectos protectores del PDGF-BB (Factor de crecimiento derivado de plaquetas isoforma B) sobre el daño oxidativo y mitocondrial ejercido por la toxina rotenona, en un modelo astrocitario (línea celular T98G). Se utilizaron distintas herramientas experimentales y computacionales para estudiar efectos como producción de especies reactivas de oxígeno (EROs), cambio en el potencial de membrana mitocondrial, cambios en la ultraestructura, efectos sobre la viabilidad celular y efectos en la expresión de proteínas como GRP78 y neuroglobina. Se determinó el efecto protector del PDGF-BB en astrocitos, sugiriendo su posible aplicación en la enfermedad de Parkinson.</p>					

English Abstract

In the present PhD Thesis, we studied the protective effects of PDGF-BB (Platelet Derived Growth Factor B), on oxidative and mitochondrial damage exerted by rotenone, in an astrocytic model (T98G cell line). We used both experimental and computational methods for study molecular effects such as reactive oxygen species (ROS) production, changes in mitochondrial membrane potential, ultrastructural effects, changes in cell viability, and changes in the expression of proteins like GRP78 and neuroglobin (ngb). We establish the protective effects of PDGF-B in astrocytes, suggesting prospective applications for Parkinson Disease.