



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR**

**TESIS  
DOCTOR EN BIOQUIMICA**

**“Estudio y caracterización de la fosfolipasa C específica para  
fosfatidilcolina (PC-PLC) en el sistema nervioso central”**

**Melina Valeria Mateos**

**BAHIA BLANCA**

**ARGENTINA**

**2008**

**DIRECTORAS DE TESIS:**

**Dra. Norma María Giusto**

**Dra. Gabriela Alejandra Salvador**

## PREFACIO

“Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Bioquímica, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Laboratorio de Lípidos y Transducción de Señales del Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBIBB), dependiente de la Universidad Nacional del Sur y del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) durante el período comprendido entre el 7 de septiembre de 2004 y el 24 de noviembre de 2008, bajo la dirección de la Dra. Norma M. Giusto, Profesora Emérita de la Universidad Nacional del Sur e Investigadora Principal del CONICET, y la codirección de la Dra. Gabriela A. Salvador, Asistente de la cátedra de Química Biológica e Investigadora Adjunta del CONICET”.

La presente tesis fue financiada con subsidios otorgados por el CONICET (PIP 5539), por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 15-20352, PICT 01-14527) y por la Universidad Nacional del Sur (24/B137). A dichas instituciones, así como también al INIBIBB, les agradezco el apoyo económico brindado para la concreción de este trabajo de tesis.

24 de noviembre de 2008.

Melina Valeria Mateos

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA, BIOQUÍMICA Y FARMACIA

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR  
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el ...../...../..... , mereciendo  
la calificación de .....(.....)

## AGRADECIMIENTOS

A mi directora, la Dra. Norma Giusto, por guiarme todos estos años, por sus consejos científicos y su ejemplo de humildad y generosidad. Por sus constantes palabras de aliento y reconocimiento.

A mi codirectora, la Dra. Gabriela Salvador, por enseñarme todo lo referido al trabajo en el laboratorio, codo a codo en la mesada y al pie del contador de radioactividad. Por todo el esfuerzo y la dedicación invertidos en esta tesis.

A mis compañeros y amigos del INIBIBB y del laboratorio de lípidos, por su apoyo constante y los gratos momentos compartidos a diario.

A mis ex compañeros de la cátedra de Bioanalítica II y a los actuales de la cátedra de Farmacología I. En especial a Gustavo López, por darme la primera oportunidad de hacer docencia.

A mi familia; mis padres, mis hermanos y mi abuela Ada; por la confianza, el apoyo y la colaboración de siempre.

A Nacho, por todos estos años compartidos y por ser mis ganas de seguir día a día.

El hallazgo más valioso que me llevo de estos cinco años de trabajo lamentablemente nunca será publicado en una revista internacional de alto impacto científico. Este descubrimiento lo conforman todas aquellas personas que colaboraron de distintas maneras, me brindaron su amistad y me ayudaron a concretar esta tesis. A todas ellas, que afortunadamente son muchas, les estoy profundamente agradecida.

Melina

*"El arte es yo; la ciencia es nosotros".*

*Claude Bernard, médico y fisiólogo Francés (1813-1878)*

A los millones de Argentinos anónimos, que quizás sin saberlo y sin poder acceder a ella, hacen posible con sus impuestos la educación pública y gratuita y trabajos de investigación como el presente.

---

	Pág.
<b>RESUMEN.</b>	1
<b>ABSTRACT.</b>	5
<b>INTRODUCCIÓN.</b>	8
<b>OBJETIVOS.</b>	37
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.</b>	38
1. Modelo experimental.	38
2. Obtención de la corteza cerebral y de la fracción sinaptosomal.	38
3. Obtención de la membrana plasmática sinaptosomal (SPM).	41
3.1. Obtención de la fracción SPM.	41
3.2. Determinación de la pureza de la fracción SPM.	43
4. Obtención de la fracción de membrana resistente a detergentes (DRMs).	43
5. Ensayos enzimáticos.	46
5.1. Medición de la actividad de la PC-PLC y la PLA.	46
5.2. Medición de la actividad de la PLD.	47
5.3. Medición de la actividad de la SMS.	47
6. Ensayos de Western blot (WB).	47
7. Análisis lipídico.	48
7.1. Extracción de los lípidos.	48
7.2. Resolución y visualización de los lípidos.	49
7.2.1. Lípidos neutros.	49
7.2.2. Lípidos polares.	50
7.3. Determinación de colesterol.	52
8. Métodos analíticos.	53
8.1. Determinación del fósforo fosfolipídico.	53

---

8.2. Determinación de las proteínas.	53
8.3. Medición de la radioactividad por centelleo líquido.	54
9. Caracterización y determinación de los parámetros cinéticos de la PC-PLC.	54
9.1. Efecto de los agentes tensioactivos en la generación de DAG.	54
9.2. Determinación de la contribución de las vías de la PC-PLC y de la PLD/PAP2 en la generación de DAG.	55
9.3. Efecto de los iones $\text{Ca}^{2+}$ y $\text{Mg}^{2+}$ en la generación de DAG.	55
9.4. Determinación de los parámetros cinéticos de la actividad PC-PLC.	56
9.5. Determinación de la PC-PLC por WB.	56
9.6. Localización de la actividad de la PC-PLC en la fracción SPM.	56
9.7. Caracterización de las DRMs.	57
9.7.1. Caracterización lipídica.	57
9.7.2. Determinación del perfil proteico.	57
9.7.3. Determinación del gangliósido GM1 por la técnica de Slot blot.	58
9.7.4. Medición de la generación de DAG en las DRMs.	58
9.8. Premarcación de los fosfolípidos y los lípidos neutros de los Syn.	58
10. Modelo de estrés oxidativo.	59
10.1. Incubación de los sinaptosomas.	59
10.2. Evaluación del efecto deletéreo del $\text{Fe}^{2+}$ .	60
10.2.1. Medición de la peroxidación lipídica.	60
10.2.2. Evaluación de la función mitocondrial.	61
10.2.3. Evaluación de la integridad de la membrana plasmática.	61
10.3. Evaluación del rol de las vías metabolizadoras de DAG.	62
10.4. Evaluación del rol de las PKCs.	62
10.5. Evaluación del rol de la vía de la PI3K.	62
10.6. Inhibición de tirosinas quinasas.	62

---

10.7. Efecto de la injuria oxidativa en la hidrólisis de la PC en los Syn de ratas seniles.	63
11. Análisis estadísticos.	63
<b>CAPÍTULO I. "Caracterización de la actividad de la PC-PLC en las terminales sinápticas de la corteza cerebral de rata"</b>	64
<b>Resultados.</b>	65
I.1. Efecto de los agentes tensioactivos en la generación de DAG a partir de la PC.	65
I.2. Efecto de los iones $Ca^{2+}$ y $Mg^{2+}$ en la generación del DAG.	67
I.3. Contribución de las vías de la PC-PLC y de la PLD/PAP2 en la generación de DAG a partir de la PC.	68
I.3.1. Contribución de las vías de la PC-PLC y de la PLD en los sinaptosomas de ratas adultas.	68
▪ Evaluación de la reacción de transfosfatidilación catalizada por la PLD.	69
▪ Efecto del DL-propranolol.	71
▪ Efecto del D609.	72
▪ Medición de la actividad de la esfingomielina sintasa (SMS).	74
I.3.2. Actividad de las vías de la PC-PLC y de la PLD en los sinaptosomas de ratas seniles.	74
I.4. Determinación de los parámetros cinéticos de la PC.	75
I.5. Detección de la PC-PLC por WB en los Syn de ratas adultas y seniles.	77
I.6. Localización de la actividad PC-PLC en la membrana plasmática sinaptosomal.	78
I.7. Localización de la actividad de la PC-PLC en dominios de membrana resistentes a detergentes (DRMs).	81
I.7.1. Caracterización lipídica de las DRMs de Syn de ratas adultas y seniles.	81
▪ Composición fosfolipídica y contenido de SM.	81
▪ Contenido de colesterol.	86
▪ Contenido de GM1.	87
I.7.2. Caracterización proteica de las DRMs.	88
I.7.3. Generación de DAG a partir de la PC en la fracción DRM.	90

---

I.8. Premarcación de los fosfolípidos y los lípidos neutros.	92
<b>Discusión de los resultados.</b>	95
<b>CAPÍTULO II. "Efecto del estrés oxidativo inducido por el FeSO<sub>4</sub> en la hidrólisis de la fosfatidilcolina".</b>	109
<b>Resultados.</b>	110
II.1. Evaluación del efecto deletéreo en el sistema.	110
II.1.1. Evaluación de la viabilidad mitocondrial.	110
II.1.2. Evaluación de la integridad de la membrana plasmática.	111
II.1.3. Medición de la peroxidación lipídica.	112
II.2. Hidrólisis de la PC en las terminales sinápticas expuestas al FeSO <sub>4</sub> .	115
II.3. Participación de las vías de la PC-PLC y de la PLD en la generación de DAG inducida por el FeSO <sub>4</sub> .	116
II.4. Participación de las vías metabolizadoras del DAG.	119
II.5. Evaluación del rol de la PKC en la generación del DAG.	120
II.6. Inhibición de las tirosinas quinasas.	121
II.7. Participación de la vía de la PI3K en la generación de DAG a partir de la PC.	123
II.8. Efecto de la inhibición de las vías generadoras de DAG en la viabilidad sinaptosomal.	124
II.8.1. Efecto del etanol y del D609 sobre la funcionalidad mitocondrial.	124
II.8.2. Efecto del etanol y del D609 en la integridad de la membrana plasmática sinaptosomal.	125
II.8.3. Efecto del D609 sobre la peroxidación lipídica.	126
II.9. Hidrólisis de la PC en los Syn de ratas seniles expuestos al estrés oxidativo.	128
II.9.1. Generación de DAG y AGL.	128
II.9.2. Actividad de la PC-PLC en los Syn de animales seniles.	129
II.9.3. Rol de las vías metabolizadoras del DAG en individuos seniles.	130
II.9.4. Evaluación de la peroxidación lipídica.	132
<b>Discusión de los resultados.</b>	133

<b>CONCLUSIONES.</b>	145
<b>REFERENCIAS.</b>	148
<b>PUBLICACIONES ORIGINADAS DE ESTA TESIS.</b>	164
<b>ABREVIATURAS.</b>	165

## RESUMEN

La fosfatidilcolina (PC) es uno de los glicerofosfolípidos más abundantes en las membranas celulares y es además fuente de segundos mensajeros lipídicos tales como el diacilglicerol (DAG), el ácido fosfatídico (PA), el ácido araquidónico (AA) y la lisofosfatidilcolina (LPC). Por su parte, el DAG es capaz de mediar eventos celulares claves a través de la regulación de diversas proteínas entre las que encontramos: las proteínas quinasas C (PKC), las proteínas quinasas D (PKD), las quimerinas, las proteínas liberadoras de nucleótidos de guanina de Ras (RasGRPs), las Munc13s y las DAG quinasas (DAGK). Estos efectores del DAG participan en funciones celulares como la fusión y el tráfico de las membranas, la inflamación, la proliferación, la diferenciación y la muerte celular.

La generación de DAG por hidrólisis de la PC se produce en respuesta a diversos estímulos celulares y es catalizada principalmente por la acción de dos vías enzimáticas: por la activación de la fosfolipasa D (PLD) (enzima que genera PA, el cual es hidrolizado a DAG por la acción de una fosfatasa de ácido fosfatídico tipo 2 o PAP2) y por la reacción catalizada por la fosfolipasa C específica para PC (PC-PLC) la cual genera DAG y fosfocolina.

Los principales objetivos de la presente tesis doctoral fueron demostrar la presencia de la vía de la PC-PLC en las terminales sinápticas (sinaptosomas) de la corteza cerebral de rata y estudiar el efecto del estrés oxidativo en la generación de DAG a partir de la PC.

Los resultados de esta tesis fueron divididos en dos capítulos, en la primera parte estudiamos la presencia de la PC-PLC en los sinaptosomas de ratas adultas y seniles y realizamos la caracterización de esta actividad enzimática. En los sinaptosomas (Syn) de ratas adultas los agentes tensioactivos Triton X-100 y deoxicolato de sodio (DOC) estimularon la formación del DAG observándose la máxima generación en presencia de Triton X-100 al 0,1%, concentración que incrementó la generación de DAG en un 330%

con respecto al control. Por otra parte, el agregado de los iones  $\text{Ca}^{2+}$  (2 mM) y  $\text{Mg}^{2+}$  (1 mM) exógenos inhibió la formación de DAG en un 73% y en un 50% respectivamente.

En presencia de etanol (2%) evaluamos la reacción de transfosfatidilación catalizada por la PLD por la cual se genera fosfatidiletanol (PEth) en lugar de PA. Dado que la PAP2 no puede hidrolizar el PEth al incluir este alcohol primario en la reacción enzimática pudimos medir la generación de DAG que proviene exclusivamente de la vía de la PC-PLC. Mediante la utilización de etanol, del inhibidor de la PC-PLC (D609) y del DL-propranolol como inhibidor de la PAP2, demostramos que ambas vías enzimáticas (PC-PLC y PLD) participan en la generación de DAG. Luego de 20 min de incubación la vía de la PLD aportó el 40% del DAG generado mientras que la PC-PLC fue responsable del 60% del DAG generado. Este mismo aporte porcentual se observó en los sinaptosomas provenientes de ratas seniles.

Los ensayos cinéticos realizados en presencia de etanol permitieron determinar la constante aparente de Michaelis-Menten ( $K_M$ ) y velocidad máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ ) para la PC-PLC sinaptosomal, las cuales fueron de 350  $\mu\text{M}$  y 3.7 nmol DAG x (mg proteína x h)<sup>-1</sup> respectivamente. Ensayos de Western blot utilizando un suero policlonal anti-PC-PLC de *Bacillus cereus* evidenciaron la presencia de dos bandas muy próximas, de un peso molecular cercano a 66 kDa, tanto en las terminales sinápticas de ratas adultas como de ratas seniles.

La generación de DAG se evaluó en la fracción de membrana plasmática sinaptosomal (SPM), en esta fracción la formación de DAG fue un 73% mayor respecto a la generación en los sinaptosomas mientras que en la fracción soluble la hidrólisis de la PC a DAG fue prácticamente indetectable. Mediante la utilización de etanol demostramos que la actividad específica de la PC-PLC es un 80% mayor en la fracción SPM que en los Syn.

Estudiamos también la hidrólisis de la PC en la fracción de membrana resistente a detergentes (DRMs). Esta fracción (aislada por el tratamiento de los Syn de ratas adultas y seniles con Triton X-100 1% a 4°C) presentó características de "rafts" de membrana, ya que se encontró enriquecida en esfingomielina y colesterol, así como también en

proteínas marcadoras de rafts como la caveolina y c-Src. La fracción DRM presentó además un perfil proteico diferencial al de los Syn y un enriquecimiento en la isoforma PLD1, mientras que ensayos de Slot blot mostraron que la PC-PLC se localiza en ambas fracciones.

También en las DRMs se observó la generación de DAG por hidrólisis de la PC, sin embargo la presencia de etanol en el ensayo no disminuyó la formación de DAG. Estos resultados indicaron que, a pesar de encontrarse enriquecida en la isoforma PLD1, no se detectó actividad de la PLD en la fracción resistente a detergentes. Por el contrario, la actividad de la PC-PLC fue aproximadamente un 60% mayor en las DRMs con respecto a los Syn.

En la segunda parte de la tesis estudiamos el efecto del estrés oxidativo inducido por  $\text{Fe}^{2+}$  en la hidrólisis de la PC. La incubación de los Syn de ratas adultas con  $\text{FeSO}_4$  ( $50\mu\text{M}$ ) generó un marcado aumento en la peroxidación lipídica que se observó a partir de tiempos cortos de incubación. También se afectó la funcionalidad mitocondrial y la integridad de la membrana plasmática, aunque estos dos parámetros se vieron afectados luego de 60 min de incubación con el agente inductor de la injuria oxidativa.

El tratamiento de los Syn de ratas adultas con el hierro provocó una mayor generación de DAG por hidrólisis de la PC, este aumento fue del 77, 50 y 65% luego de 5, 30 y 60 min de preincubación respectivamente. En forma contraria, la generación de ácidos grasos libres (AGL) se inhibió en un 50% luego de 5 y de 60 min de preincubación con el hierro. Evaluando la generación de DAG en presencia de etanol (actividad de la PC-PLC) y la formación de PEth como marcador de la actividad de la PLD, demostramos que ambas vías enzimáticas contribuyen a la formación de DAG bajo condiciones de estrés oxidativo. El mismo efecto en la generación de DAG y AGL se observó en las terminales sinápticas de ratas seniles. Tampoco se observaron diferencias en los niveles de peroxidación lipídica en los Syn de ratas seniles con respecto a las adultas.

La generación de DAG en los Syn de ratas adultas fue independiente de la activación de la vía de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) y de la actividad de tirosinas quinasas. Por otra parte, la inhibición de la fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol

4, 5-bifosfato (PIP<sub>2</sub>-PLC) disminuyó significativamente la generación de DAG en los Syn expuestos al Fe<sup>2+</sup>, sin embargo este efecto no fue mediado por la actividad de las PKCs.

La inhibición de las vías metabolizadoras, DAGK y DAG lipasa (DAGL), tampoco modificó los niveles de DAG generados tanto en la condición control como en la experimental, esto se observó en los Syn de ratas adultas y seniles.

En conclusión, nuestros resultados demostraron por primera vez la presencia de la PC-PLC en las terminales sinápticas de la corteza cerebral de rata. Nuestros hallazgos constituyen el primer indicio acerca de la activación de las vías de la PC-PLC y de la PLD en condiciones de estrés oxidativo en las terminales sinápticas, representando el punto de partida para el estudio del rol de estas vías de generación de segundos mensajeros lipídicos en los procesos neurodegenerativos.

## ABSTRACT

Phosphatidylcholine (PC) is one of the most abundant glycerophospholipids in cellular membranes and is also the source of second lipid messengers such as diacylglycerol (DAG), phosphatidic acid (PA), arachidonic acid (AA) and lyso phosphatidylcholine (LPC). DAG can mediate key cellular events through the regulation of several proteins such as protein kinase C (PKC), protein kinase D (PKD), chimaerins, Ras guanine-releasing protein (RasGRP), Munc13 and DAG kinase (DAGK). These DAG-regulated proteins participate in cellular functions such as membrane fusion and traffic, inflammation, proliferation, differentiation and cell death.

In response to several stimuli, DAG generation through PC hydrolysis can be catalyzed mainly by two enzyme pathways, namely by means of the activation of phospholipase D (PLD, which yields PA which is, in turn, hydrolyzed to DAG by a phosphatidic acid phosphatase type 2 or PAP2) or by means of the action of a PC-specific phospholipase C (PC-PLC) that generates DAG and phosphocholine.

In view of the above, the main objectives of this thesis were to demonstrate the presence of the PC-PLC pathway in rat cerebral cortex synaptic endings (synaptosomes) and to study the effect of oxidative stress on DAG generation from PC.

The results collected were divided into two chapters. Chapter I focuses on the presence of PC-PLC in synaptosomes from adult and aged rats and it includes the characterization of this enzyme activity. It was observed that in synaptosomes (Syn) from adult rats the tensioactive agents Triton X-100 and sodium deoxycholate (DOC) stimulated DAG generation which was highest in the presence of 0.1 % Triton X-100. This concentration enhanced DAG formation by 330% with respect to the control condition. Furthermore, the addition of  $\text{Ca}^{2+}$  (2 mM) and  $\text{Mg}^{2+}$  (1 mM) decreased DAG generation by 73% and 50%, respectively.

In the presence of ethanol (2%) we evaluated the transphosphatidylation reaction produced by PLD which generates phosphatidylethanol (PEth) instead of PA. Under this condition DAG generation was evaluated exclusively from PC-PLC because PEth cannot

be hydrolyzed by PAP2. The use of ethanol, PC-PLC inhibitor (D609) and DL-propranolol as PAP2 inhibitor, allowed us to demonstrate that both enzyme pathways (PC-PLC and PLD) participate in DAG generation. After 20 min of incubation PLD pathway generated 40% of total DAG whereas PC PLC generated the remaining 60%. The same contribution was observed in synaptosomes from aged rats.

Kinetic studies carried out in the presence of ethanol showed a  $K_M$  and  $V_{max}$  values for the synaptosomal PC-PLC of 350  $\mu$ M and 3.7 nmol DAG  $\times$  (mg protein  $\times$  h)<sup>-1</sup>, respectively. Western blot analysis using an anti-PC-PLC polyclonal antibody raised against *Bacillus cereus* PC-PLC showed two bands with a molecular weight close to 66 kDa in synaptic endings from adult and aged rats.

DAG generation was evaluated in the synaptosomal plasma membrane fraction (SPM). In this fraction DAG generation was increased by 73% with respect to that in synaptosomes. In addition, PC hydrolysis to DAG was negligible in the soluble fraction. By using ethanol it was possible to demonstrate that PC-PLC specific activity was increased by 80% in the SPM fraction with respect to Syn.

We also studied PC hydrolysis in the detergent resistant membrane fraction (DRMs). This fraction, which was isolated by treating Syn of adult and aged rats with 1% Triton X-100 at 4°C, evidenced characteristics similar to those of rafts, as it was enriched in sphingomyelin and cholesterol as well as in raft marker proteins such as caveolin and c-Src. The DRM fraction also showed a different protein profile from that of Syn. DRMs were also enriched in PLD1 while Slot blot assays showed that PC-PLC was located in Syn and DRM fractions.

DAG formation from PC was also observed in DRMs. However, in this fraction the presence of ethanol did not decrease DAG formation. These results indicated that, despite being enriched in PLD1, PLD activity was not detected in DRM fraction. In contrast, PC-PLC activity was 60% higher in DRMs with respect to Syn.

Chapter II of this thesis deals with the effect of Fe<sup>2+</sup>-induced oxidative stress on PC hydrolysis. The incubation of adult rat Syn with FeSO<sub>4</sub> (50 $\mu$ M) generated a marked increase in lipid peroxidation which could be observed after short incubation times.

Mitochondrial viability and plasma membrane integrity were also affected although these parameters were affected with the oxidative stress inductor after 60 min of incubation.

In adult rats Syn DAG generation was stimulated by FeSO<sub>4</sub> (50 μM) after 5, 30 and 60 min of incubation by 77, 50 and 65%, respectively. On the other hand, free fatty acid (FFA) generation was inhibited by 50% after 5 and 60 min of incubation with iron. By measuring DAG generation in the presence of ethanol and PEth formation as a marker of PLD activity, we demonstrated that both enzyme pathways contribute to DAG formation under oxidative stress conditions. The same effect on DAG and FFA formation was observed in synaptic endings from aged rats. No differences in lipid peroxidation levels were observed in aged rats Syn with respect to adult rats.

DAG generation in Syn from adult rats was independent of tyrosine kinases activity and of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) pathway. On the other hand, the inhibition of phosphatidylinositol bisphosphate-specific phospholipase C (PIP<sub>2</sub>-PLC) decreased DAG formation in Syn exposed to Fe<sup>2+</sup>. However this effect was not mediated by PKC.

The inhibition of metabolizing pathways (DAGK and DAG lipase) did not modify DAG levels generated under control and experimental conditions; this was observed in Syn from adult and aged rats.

In conclusion our results demonstrated for the first time the presence of PC-PLC in rat cerebral cortex synaptic endings. Taken together, our findings constitute the first evidence of PC-PLC and PLC activation in Syn under oxidative stress conditions and represent the starting point for further studies aimed at understanding the role of lipid second messengers in neurodegenerative events.

## INTRODUCCIÓN

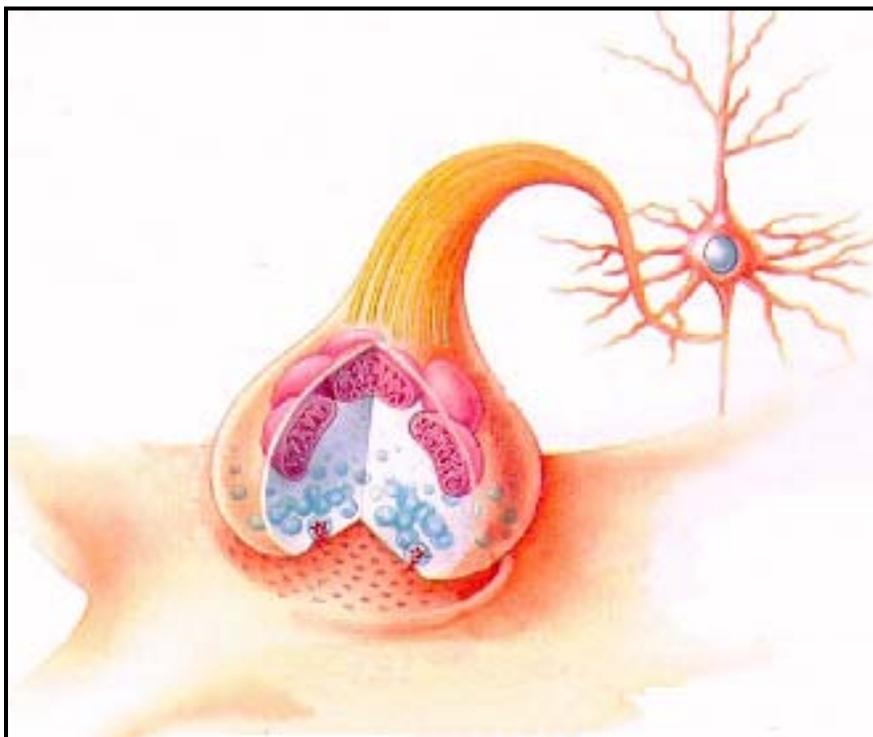
El sistema nervioso es una compleja red de comunicaciones que regula la totalidad de las funciones vitales de un organismo permitiendo que interactúe de la forma más apropiada con el medio ambiente. El cerebro forma parte del sistema nervioso central (SNC) y entre sus vastas funciones se incluyen la detección sensorial, el procesamiento y la interpretación de la información y la memoria, así como el control del comportamiento, del movimiento y de todas las emociones humanas.

El sistema nervioso está constituido por dos grandes tipos de células, las neuronas y las células gliales que cumplen funciones de sostén e inmunológicas. La neurona es la unidad funcional del este sistema, estas células tienen la capacidad de interconectarse unas a otras, ya sea para inhibirse o excitarse y retransmitir el impulso nervioso.

Las neuronas son las células más polimórficas del organismo, sin embargo la imagen típica de una neurona es la de una célula con un soma de forma estrellada, con las dendritas emergiendo de un polo y el fino axón del polo opuesto. El axón es una prolongación larga y única, cuya principal función es llevar el impulso nervioso hacia otra neurona u órgano receptor, mientras que las dendritas son prolongaciones más cortas encargadas de recibir los impulsos provenientes de otras neuronas.

Al sitio de comunicación entre dos neuronas se lo conoce como sinapsis, las cuales pueden ser eléctricas o químicas. Las sinapsis químicas se caracterizan por presentar las membranas de las terminales presináptica y postsináptica separadas por una hendidura (espacio intercelular de 20-30 nm de ancho) y contener en la terminal presináptica abundantes mitocondrias y vesículas sinápticas que contienen los neurotransmisores (Figura 1). En las sinapsis los procesos de señalización celular se encuentran altamente concentrados. Estos procesos de transducción de señales son fundamentales tanto para la comunicación celular como para la regulación de la supervivencia y la plasticidad de las neuronas (Galve-Roperh y col., 2008; Dresbach y col., 2008; Kammermeier, 2008; Shen y col., 2008).

Entre el 50 y el 60% de la masa cerebral está constituida por los fosfolípidos, el colesterol y los glicolípidos. Estos lípidos son responsables de la estabilidad, de la fluidez y de la permeabilidad de las membranas neuronales. Por su parte, las membranas celulares no constituyen una mera barrera que delimita el interior y el exterior celular, sino que los lípidos que las conforman son participantes indispensables en numerosos eventos de señalización celular (Eyster, 2007). Además, ciertas propiedades de las membranas, como la fluidez y la permeabilidad, se relacionan estrechamente con la insaturación de los ácidos grasos que forman parte de los fosfolípidos siendo factores críticos para el correcto funcionamiento de las proteínas integrales de membrana, de las enzimas, de los receptores y de los canales iónicos. (Farooqui y col., 2000; Swapna y col., 2006). Algunos fosfolípidos se unen fuertemente a proteínas de membrana y esta unión es necesaria para la integración de las proteínas a la bicapa lipídica (Farooqui y col., 2007). El cerebro además, contiene lípidos complejos, entre los que se incluyen los gangliósidos, los cerebrósidos y los sulfátidos.



**Figura 1: Esquema representativo de una sinapsis química.**

La fosfatidilcolina (PC) es el fosfolípido más abundante de las membranas celulares, tanto de células eucariotas así como también de algunas células procariotas, constituyendo entre el 40 y el 50% de los fosfolípidos totales. La fosfatidiletanolamina (PE) es el segundo fosfolípido en abundancia en las células de mamíferos representando entre el 20 y el 50% del total mientras que la fosfatidilserina (PS) constituye entre el 2 y el 10%. Otros fosfolípidos menores en abundancia también forman parte de las membranas celulares, tales como la esfingomielina (SM), el fosfatidilinositol (PI), los polifosfoinsítidos (PPI) y la cardiolipina (CL) específica de las mitocondrias (Farooqui y col., 2000; Vance, 2008).

Cada una de las hemicapas que conforman la membrana plasmática presentan además una composición fosfolipídica asimétrica, mientras que el 80% de la PS y la PE se encuentran normalmente en la hemicapa interna la hemicapa externa se encuentra enriquecida en PC y SM (Eyster, 2007; Vance, 2008).

En la década pasada la PS de las membranas cobró un interés particular debido a que en fases tempranas de la apoptosis este fosfolípido es externalizado y esta exposición en la superficie constituye una de las señales por las cuales las células apoptóticas son reconocidas y removidas por los fagocitos (Fadok y col., 1992; Fadok y col., 2001; Balasubramanian y col., 2007). La exposición de la PS en la superficie no es exclusiva de células apoptóticas, ya que la externalización de PS en plaquetas activadas desencadena la coagulación sanguínea y este fosfolípido también se expone en la superficie de las células espermáticas durante la maduración (Vance, 2008). Otra importante función de la PS es actuar como cofactor de diversas proteínas claves en la señalización celular, entre las que se incluyen las proteínas quinasas C (PKC) (Nishizuka, 1992).

Dentro de los esfingolípidos, se ha demostrado que la esfingosina ejerce efectos pleiotrópicos sobre proteínas quinasas y participa en la regulación del citoesqueleto, de la endocitosis, del ciclo celular y de la apoptosis. La ceramida (Cer) es también un importante mediador de la apoptosis y la esfingosina-1-fosfato juega roles cruciales en la

supervivencia celular, la migración celular y en la inflamación (Obeid y col., 1993; Venable y col., 1995; Hla, 2004; Hannun y Obeid, 2008).

Por su parte, alteraciones en la homeostasis de la PC pueden ocurrir en diversas patologías como la formación de placas ateromatosas y en situaciones de isquemia. La reducción en la síntesis de PC, por la inhibición de las enzimas de su biosíntesis o por deficiencia de colina, puede llevar a la muerte celular por apoptosis, demostrando que la PC juega un rol crucial en la estructura de la membrana plasmática y en la viabilidad celular (Cui y col., 1996; Cui y Houweling, 2002).

La síntesis de novo de PC a partir de colina por la vía de la CDP-colina está presente en todas las células de mamífero. Esta vía, descrita por Kennedy, consiste en tres pasos: en el primer paso la colina quinasa (CK) convierte la colina en fosfocolina, una segunda reacción es llevada a cabo por la CTP: fosfocolina citidiltransferasa (CT) que convierte el CTP y la fosfocolina en CDP-colina, esta reacción es el paso limitante en la síntesis de PC. El tercer y último paso consiste en la conversión de DAG y CDP-colina en PC, esta reacción es catalizada por la CDP-colina: diacilglicerol colinafosfotransferasa (CPT) (Kennedy, 1961; Cui y Houweling, 2002; Fernandez-Tome y col., 2002). Existe una vía adicional de síntesis de PC por metilación de la PE la cual está presente predominantemente en hepatocitos y es catalizada por las dos isoformas de la fosfatidiletanolamina N-metiltransferasa (PEMT 1 y 2) (Cui y Houweling, 2002).

La PC actúa también como lípido precursor en la biosíntesis de otros fosfolípidos (como la SM y la PS) y es además una importante fuente de segundos mensajeros lipídicos tales como el diacilglicerol (DAG), el ácido fosfatídico (PA), el ácido araquidónico (AA) y la lisofosfatidilcolina (LPC) (Billah y Anthes, 1990; Exton, 1994; Cui y Houweling, 2002). La generación de estos segundos mensajeros a partir de la PC se debe a la acción de fosfolipasas, enzimas cuya activación puede ser disparada por diversos estímulos como factores de crecimiento, citoquinas, neurotransmisores, hormonas y otras señales extracelulares (Wakelam y col., 1993; Foster y Xu, 2003; Adibhatla y Hatcher, 2005).

Las enzimas de la biosíntesis de la PC pueden utilizar los productos generados en la hidrólisis de este fosfolípido, es por ello que los mecanismos involucrados en el

metabolismo de la PC, tanto en la degradación como en la síntesis, deben estar absolutamente sincronizados y regulados para asegurar una adecuada renovación de la PC en las membranas biológicas.

### EL DIACILGLICEROL COMO SEGUNDO MENSAJERO LIPÍDICO.

Aunque con propósitos metabólicos se debe mantener un nivel adecuado de DAG en las membranas, numerosas señales externas resultan en la inmediata generación de este lípido. Es por ello que para lograr una respuesta apropiada diversas proteínas participan en la producción, en la respuesta y en la metabolización del DAG. Como consecuencia, estímulos extracelulares resultan en cambios transitorios de "pools" específicos de DAG, determinando la especificidad, la intensidad y la duración del estímulo celular.

#### *Vías enzimáticas generadoras de DAG:*

En sus estudios pioneros a principios de los años 50, Hokin y Hokin observaron un rápido recambio de los fosfolípidos de inositol en cortes pancreáticos estimulados con acetilcolina (Hokin y Hokin, 1953). Sin embargo, la importancia de este hallazgo resurgió varios años después cuando el DAG y el inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) fueron implicados respectivamente en la regulación de la PKC y en la liberación de Ca<sup>2+</sup> intracelular, regulando diversas respuestas celulares (Nishizuka, 1992).

La "vía clásica" de generación de DAG más extensamente estudiada ha sido la vía de la fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol 4, 5-bifosfato (PIP<sub>2</sub>-PLC). La activación de la PIP<sub>2</sub>-PLC origina un incremento rápido, pero transitorio, en los niveles de DAG e IP<sub>3</sub>. Esto origina un aumento simultáneo de Ca<sup>2+</sup> intracelular y la activación y translocación a la membrana de isoformas de PKC dependientes de Ca<sup>2+</sup> y DAG (PKC $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ). Por otra parte, cuando el DAG proviene de la hidrólisis de PC el aumento de este segundo mensajero es más sostenido en el tiempo y ocurre sin incremento en los niveles de Ca<sup>2+</sup> intracelular. Esta generación sostenida de DAG está relacionada con la activación

de isoformas de PKC independientes de  $\text{Ca}^{2+}$  (PKC $\delta$  y  $\epsilon$ ) en respuestas celulares como la proliferación y la diferenciación (Exton, 1994; Wakelam, 1998).

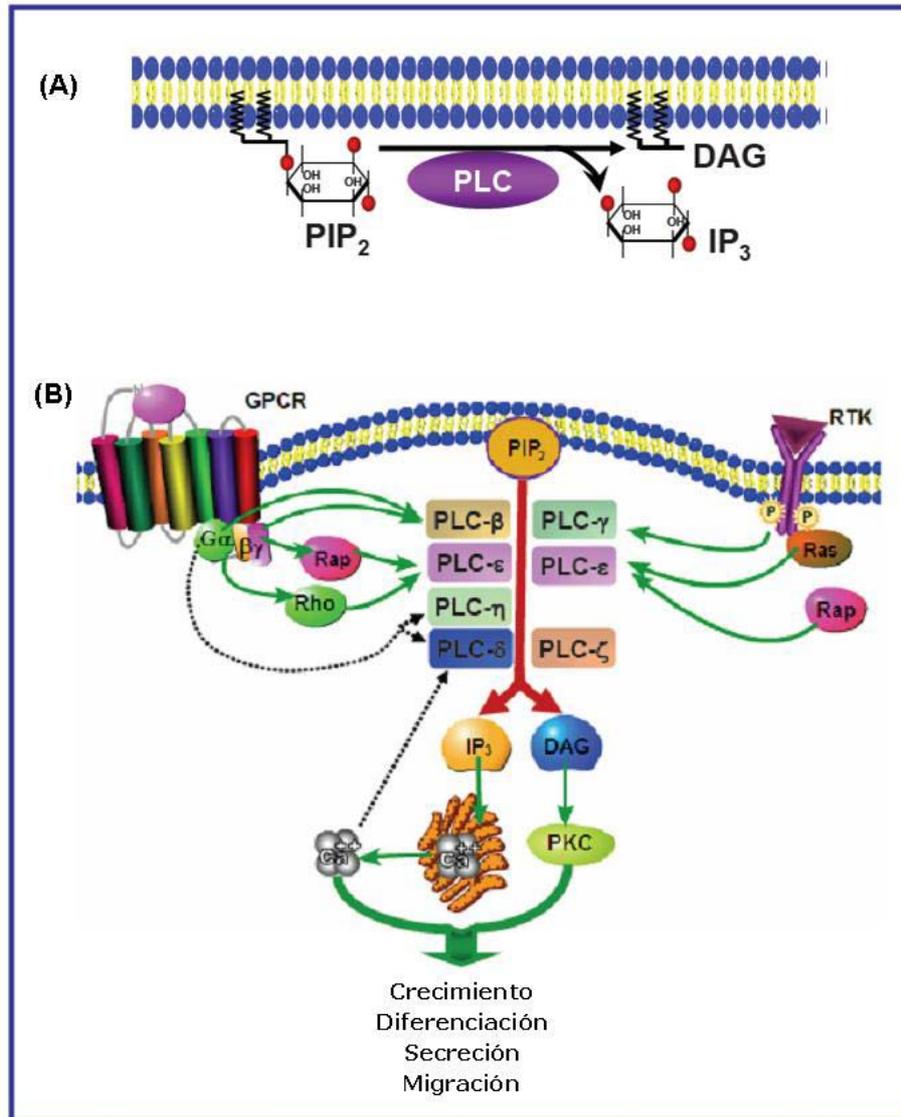
Hasta la fecha se han identificado 14 isoenzimas de **PIP<sub>2</sub>-PLC**, las cuales se han clasificado en 6 subfamilias en base a su secuencia primaria y a los mecanismos de activación (Carrasco y Merida, 2007). Los dominios catalíticos, X e Y, son dos regiones de aminoácidos altamente conservados, localizados entre dominios EF hands y un dominio C2 (ambos implicados en la unión a  $\text{Ca}^{2+}$ ). El dominio PH (de homología a pleckstrina) de las PIP<sub>2</sub>-PLCs une PIP<sub>2</sub> permitiendo la localización de la enzima en la membrana y también es capaz de unir fosfatidilinositol 3, 4, 5-trifosfato (PIP<sub>3</sub>), por lo cual media la activación y translocación de la PLC dependiente de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K). Todas las isoformas de PIP<sub>2</sub>-PLC poseen un dominio C2, el cual contiene 3 a 4 sitios de unión a  $\text{Ca}^{2+}$ , este dominio aumenta la actividad enzimática formando un complejo enzima-PS-  $\text{Ca}^{2+}$  (Suh y col., 2008).

La subfamilia PIP<sub>2</sub>-PLC $\beta$  está formada por cuatro isoenzimas ( $\beta$ 1-4), la isoforma  $\beta$ 1 la mas ampliamente expresada, especialmente en regiones específicas del cerebro (Suh y col., 2008). Se han identificado dos isoformas de PIP<sub>2</sub>-PLC $\gamma$  (PLC $\gamma$ 1 y PLC $\gamma$ 2), estas enzimas se caracterizan por presentar una región altamente estructurada (PLC $\gamma$ -specific array,  $\gamma$ SA), implicada en la activación de las PLC $\gamma$  por receptores con actividad tirosina quinasa (RTKs) (Katan, 1998; Suh y col., 2008).

Por su parte, las PLC $\delta$ s son consideradas las isoenzimas más básicas dada la simplicidad de su estructura y son además las más sensibles al  $\text{Ca}^{2+}$  y la PIP<sub>2</sub>-PLC $\zeta$ , ha sido identificada como la PLC específica de esperma (Allen y col., 1997; Suh y col., 2008).

La PIP<sub>2</sub>-PLC $\epsilon$  es la isoenzima de mayor tamaño identificada hasta el momento, esta isoforma presenta dos dominios RA localizados en la región C-terminal que median la interacción con proteínas G pequeñas como Ras y Rap (Kelley y col., 2001; Bunney y Katan, 2006). En el año 2005 se identificaron dos nuevas isoformas de PIP<sub>2</sub>-PLC (PLC $\eta$ 1 y PLC $\eta$ 2) (Hwang y col., 2005; Zhou y col., 2005; Nakahara y col., 2005). Sorprendentemente, mientras que la mayoría de las PIP<sub>2</sub>-PLCs se localizan en el citosol y

translocan a la membrana plasmática tras un estímulo celular, la PLC $\eta$ 2 se localiza predominantemente en la membrana aún en ausencia de un estímulo extracelular (Suh y col., 2008).

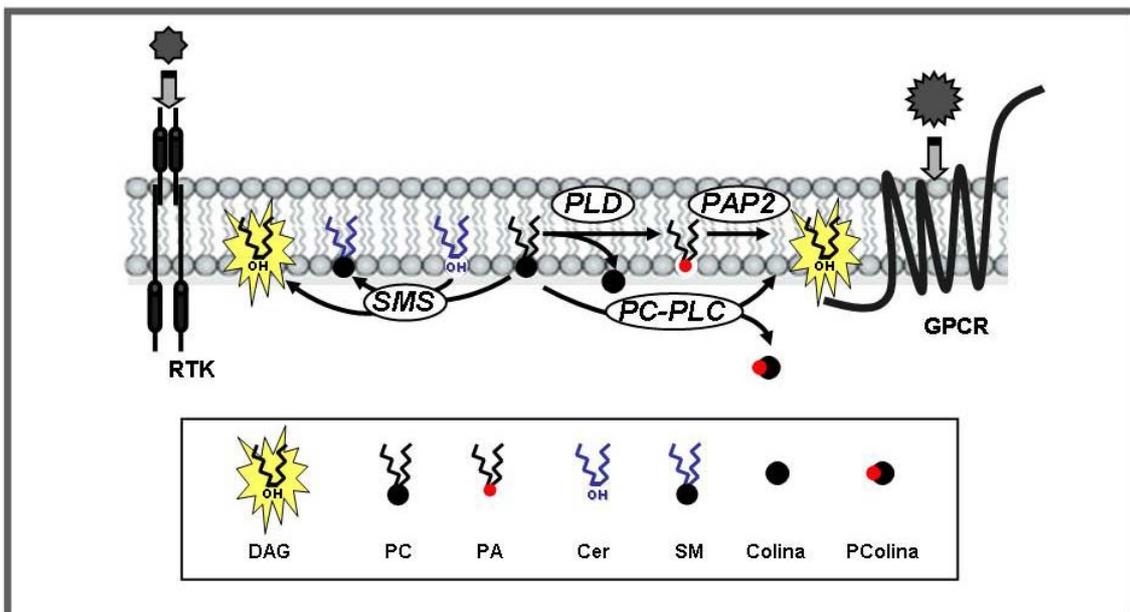


**Figura 2: (A) Esquema de la hidrólisis de PIP<sub>2</sub> catalizada por la PIP<sub>2</sub>-PLC. (B) Vías de señalización relacionadas con la activación de las isoformas de PIP<sub>2</sub>-PLC. (Adaptado de Suh y col., 2008).**

Habitualmente, ante un estímulo celular mediado por un agonista el incremento en los niveles de DAG depende de la activación de más de una vía de señalización (Wakelam, 1998). En adición a la "vía clásica" previamente mencionada, el DAG también puede ser generado a partir de la hidrólisis de PC.

En las células de mamífero el ácido graso esterificado en la posición 1 del glicerol es generalmente saturado, mientras que el que se encuentra en la posición 2 es de saturación más variable. Las especies moleculares de DAG provenientes de PC son saturadas/monoinsaturadas, mientras que el DAG generado por la hidrólisis del PIP<sub>2</sub> por la acción de una PIP<sub>2</sub>-PLC contiene especies moleculares de ácidos grasos generalmente poliinsaturados en la posición 2, principalmente ácido araquidónico 20:4 (AA).

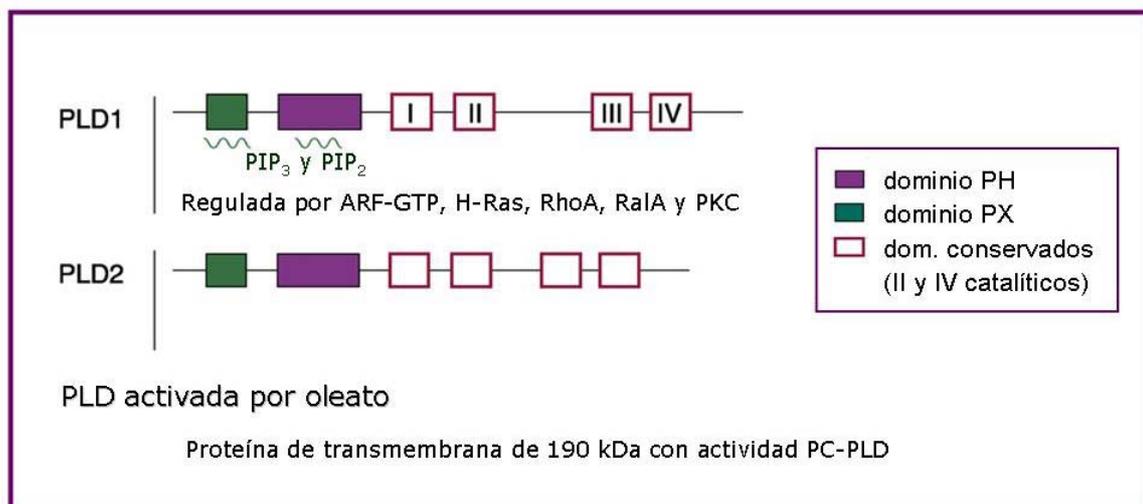
En respuesta a diversos estímulos la PC puede ser clivada por la activación de la fosfolipasa D (PLD) formando PA que, por la acción subsiguiente de una fosfatasa de ácido fosfatídico tipo 2 (PAP2), es hidrolizado a DAG. Otras dos vías enzimáticas son capaces de generar DAG a partir de PC: la fosfolipasa C específica para PC (PC-PLC), que hidroliza la PC a DAG y fosfocolina (PColina), y la esfingomielina sintasa (SMS) cuya actividad transfiere el grupo fosfocolina de la PC a la ceramida (Cer) generando SM y DAG (Billah y Anthes, 1990; Exton, 1994; Cui y Houweling, 2002; Albi y col., 2005). Se ha especulado que la activación de estas vías generadoras de DAG, que no conducen a un aumento del Ca<sup>2+</sup> intracelular, participarían en la activación de PKCs independientes de Ca<sup>2+</sup>, a diferencia de la vía PIP<sub>2</sub>-PLC (Klein, 2005).



**Figura 3: Vías enzimáticas de generación de DAG a partir de la hidrólisis de la PC.**

Como se mencionó anteriormente, la hidrólisis de la PC catalizada por la PLD produce PA y colina libre. En mamíferos se han reportado dos genes (ambos con variantes de "splicing") que codifican para dos isoformas de la **PLD**: PLD1 y PLD2 (Hammond y col., 1997; Colley y col., 1997; Steed y col., 1998). El sitio activo de estas enzimas está compuesto por dos dominios catalíticos HKD, los cuales se encuentran particularmente bien conservados tanto en las PLDs de eucariotas como en las bacterianas. Un residuo histidina perteneciente a este dominio forma un intermediario transitorio fosfatidil-enzima, el cual es atacado por una molécula de agua activada para catalizar la hidrólisis de PC. Además, estas proteínas poseen un dominio PH (implicado en la unión a  $PIP_2$  y a  $PIP_3$ ) y un dominio PX (de homología a phox). Ambas isoformas presentan un requerimiento prácticamente absoluto de  $PIP_2$  (Exton, 2002).

Una tercera PLD ha sido purificada aunque aún no se la ha caracterizado molecularmente. Esta PLD presenta un mayor peso molecular (190 kDa) y es activada por oleato en altas concentraciones (Hattori y Kanfer, 1985; Klein, 2005; Carrasco y Merida, 2007).



**Figura 4: Estructura de las isoformas de PLD en mamíferos. El recuadro indica los dominios catalíticos y regulatorios presentes en cada isoforma.** (Adaptado de Carrasco y Mérida, 2007).

Aunque existe una homología considerable entre los genes, los subtipos de PLD 1 y 2 presentan diferencias significativas en cuanto a su distribución subcelular y regulación. La PLD1 es una proteína de 120 kDa, localizada en la región perinuclear y en

el Golgi, que prácticamente no posee actividad basal y que es regulada por la PKC $\alpha$  y por proteínas G pequeñas tales como ARF y Rho. En cambio, la PLD2 tiene un peso molecular de 100 kDa, se localiza principalmente en la membrana plasmática y presenta una alta actividad basal en comparación con la isoforma PLD1 (Liscovitch y col., 2000; Exton, 2002; Foster y Xu, 2003; Klein, 2005).

Las isoformas de la PLD están presentes tanto en las neuronas (independientemente de su neurotransmisor) como en los astrocitos y los oligodendrocitos. En ratas adultas, la PLD1 se expresa en áreas del cerebro ricas en neuronas colinérgicas y en células gliales como los oligodendrocitos, mientras que la PLD2 se expresa altamente en los astrocitos (Klein, 2005).

El hecho que las GTPasas de la familia Rho jueguen un rol importante en el direccionamiento del crecimiento axonal y, a su vez, actúen como reguladores de la PLD1, llevó al estudio de la participación de esta isoforma de la PLD en la formación y crecimiento de neuritas. También se estudió el rol de la PLD2 en este proceso ya que se había demostrado su capacidad para asociarse a proteínas del citoesqueleto (Klein, 2005). Se reportó que el crecimiento de las neuritas en células de hipocampo estimuladas con el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) es dependiente del citoesqueleto y ocurre en paralelo a la activación de la PLD (Sung y col., 2001). Por otra parte, el crecimiento de neuritas en células PC12 diferenciadas con el factor de crecimiento neuronal (NGF) es dependiente de la PLD2, en este modelo la PLD2 parece actuar corriente abajo de la activación de ERK (Watanabe y col., 2004).

Otro rol fundamental de la PLD en el sistema nervioso central es su participación en los procesos de exo y endocitosis, dado que el PA promueve la distorsión de la bicapa lipídica estimulando la fusión de membranas (Scales y Scheller, 1999; Zeniou-Meyer y col., 2008). Además, las interacciones ARF-PLD1 controlan pasos específicos en el tráfico vesicular y en la fusión de membranas (Liscovitch y col., 2000; Freyberg y col., 2003).

Algunos estudios también han postulado a la PLD como un regulador de los niveles de colina y de la síntesis de acetilcolina en las neuronas colinérgicas (Klein y col.,

1995; Klein, 2005). Tanto la sobreexpresión de la PLD1 como de la PLD2 aumentó la síntesis de acetilcolina en células colinérgicas murinas SN56 (Zhao y col., 2001).

La importancia de los roles descritos para la PLD y el hecho de que no se hayan generado hasta la fecha ratones deficientes en PLD, indican que existe un requerimiento esencial de esta enzima en el desarrollo y en la supervivencia celular.

Por otra parte, la conversión de PA a DAG por acción de las **PAPs** es importante tanto para la síntesis de los glicerofosfolípidos como en los mecanismos de transducción de señales. La desfosforilación de PA relacionada con la síntesis de lípidos es llevada a cabo por la isoforma PAP1, esta actividad enzimática es dependiente de  $Mg^{2+}$ , sensible a N-etilmaleimida (NEM) y se localiza en el citosol y en el retículo endoplásmico. Por otra parte, la PAP tipo 2 es la hidrolasa responsable de convertir el PA generado por la PLD en DAG durante eventos de señalización celular. Esta isoforma se localiza en la membrana plasmática y, a diferencia de la tipo 1, su actividad es independiente de  $Mg^{2+}$  e insensible a la inhibición por NEM (Roberts y col., 1998). Ambos subtipos de PAP están presentes en la corteza cerebral así como en otros tejidos de rata (Fleming y Yeaman, 1995).

Estudios más recientes concluyeron que la actividad enzimática correspondiente a la PAP2 es ejercida por una familia de isoenzimas con especificidad por varios lípidos fosfatos como el PA, el LPA, la esfingosina-1-fosfato y la ceramida-1-fosfato entre otros. Estas enzimas son ahora conocidas como lípido fosfato fosfatasas (**LPPs**). Las LPPs son proteínas integrales de membrana y se han descrito 3 isoformas en mamíferos: LPP1 (PAP2a), LPP2 (PAP2c) y LPP3 (PAP2b) las cuales poseen una mayor eficiencia catalítica para LPA, PA y esfingosina-1-fosfato respectivamente (Brindley, 2004; Pyne y col., 2004; Pyne y col., 2005; Carrasco y Merida, 2007). La distribución tisular de estas enzimas difiere entre las distintas isoformas, siendo la LPP2 mayormente expresada en el cerebro, el páncreas y la placenta mientras que la expresión de las isoformas 1 y 3 es más amplia (Pyne y col., 2004).

La **SMS** es la última enzima involucrada en la biosíntesis de SM transfiriendo el grupo fosfocolina de la PC en el hidroxilo de la ceramida formando SM y DAG (Li y col., 2007). En mamíferos se han identificado dos isoformas de SMS (SMS1 Y SMS2). Estas

isoformas no difieren significativamente en cuanto a su bioquímica aunque si lo hacen en su localización subcelular, mientras que la SMS1 se localiza en Golgi la SMS2 se localiza en Golgi y en membrana plasmática (Huitema y col., 2004; Yamaoka y col., 2004; Tafesse y col., 2006; Tafesse y col., 2007). Además, ambas SMSs son capaces de actuar como colinofosfotransferasas bidireccionalmente, es decir, son capaces de convertir la PC y la Cer en SM y DAG y viceversa (Huitema y col., 2004).

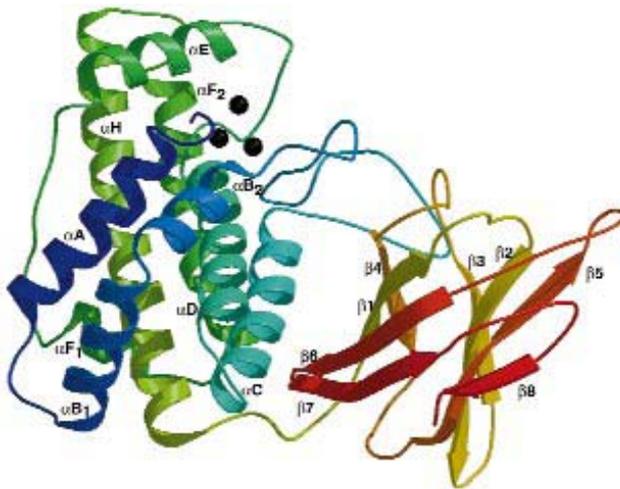
Una vía de generación de DAG muy poco explorada al momento es la vía de la **PC-PLC**. El rol y la estructura de esta enzima han sido bien estudiados en células procariontas. Las PC-PLCs bacterianas mejor caracterizadas se encuentran en bacterias Gram-positivas, donde juegan roles diversos en la biología y la patogénesis de *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* y *Clostridium perfringens* entre otras (Stonehouse y col., 2002). La bacteria *L. monocytogenes* es un patógeno intracelular capaz de infectar diversos tipos celulares en mamíferos. En esta cepa la PC-PLC es fundamental para la diseminación célula a célula de la bacteria. En *L. monocytogenes* la enzima es dependiente de zinc y es secretada como una proenzima inactiva que debe ser clivada por una proteasa presumiblemente del huésped (Zuckert y col., 1998).

La PC-PLC de *C. perfringens* (o  $\alpha$ -toxina) es la principal causa de la gangrena gaseosa originada por la infección con este patógeno (Awad y col., 1995). En *B. cereus* se demostró la estructura monomérica de la PC-PLC y su peso molecular de 25 kDa, en esta cepa la enzima contiene tres iones zinc en su sitio catalítico (Benfield y col., 2007).

La  $\alpha$ -toxina del *C. perfringens* fue la primera toxina bacteriana en ser identificada como una enzima (Macfarlane y Knight, 1941). La PC-PLC de *C. perfringens* también es una metalofosfolipasa que contiene tres iones zinc en su sitio activo y posee un dominio C-terminal de 120 aminoácidos, el cual podría ser determinante para la toxicidad ya que este dominio no está presente en la PC-PLC de *B. cereus*, la cual no actúa como toxina. Los residuos involucrados en la coordinación de los iones  $Zn^{2+}$  están conservados en las PC-PLCs de *C. perfringens* y de *B. cereus* y existe similitud estructural en el dominio N-terminal de ambas enzimas. Por su parte, el dominio C-terminal de la  $\alpha$ -toxina del *C. perfringens* presenta similitud estructural con el dominio C2 de proteínas eucariotas de

señalización, el ión  $\text{Ca}^{2+}$  puede unirse a estos dominios generando un cambio conformacional de la proteína. Estos dominios constituye la primera evidencia en procariontas de la presencia de motivos con similitud estructural a los dominios C2 (Naylor y col., 1998).

La estructura tridimensional de la PC-PLC de *C. perfringens* determinada por cristalografía de rayos X mostró que el dominio N-terminal de la  $\alpha$ -toxina (compuesto de  $\alpha$ -hélices, residuos 1-246) contiene el sitio activo de la enzima mientras que el dominio C-terminal (residuos 256 a 370, compuesto de hojas  $\beta$  plegadas) ha sido implicado en la unión a la membrana. Un dominio flexible (residuos 256-370) conecta los dominios N y C terminales (Naylor y col., 1998).



**Figura 5: Estructura tridimensional de la  $\alpha$ -toxina de *C. perfringens*.** Las esferas negras indican la posición de los iones  $\text{Zn}^{2+}$  en el sitio activo de la enzima. (Reproducido de Naylor y col., 1998).

Si bien en mamíferos la PC-PLC no ha sido aún clonada, la generación de DAG y fosfocolina a partir de PC ha sido demostrada desde principio de los años 80 en diversos tejidos de rata, en sinaptosomas de cerebro de ratón y en el plasma seminal de toro (Hostetler y Hall, 1980; Matsuzawa y Hostetler, 1980; Sheikhnejad y Srivastava, 1986; Yavin y col., 1989). También fue caracterizada la actividad de la PC-PLC en las plaquetas de rata (Randell y col., 1992).

En células B de linfoma murino (células A20) la apoptosis desencadenada por anticuerpos anti-Fas induce la activación de la PC-PLC (Han y col., 1999; Kim y col., 2001). La actividad de la PC-PLC en estas células fue evidenciada tanto por el aumento en el DAG como por el aumento de fosfocolina. La activación de esta enzima indujo la

translocación de PKC a la membrana y la actividad de la PLD resultó estimulada con el agregado de PC-PLC exógena y PMA (como activador de la PKC). Además, la inhibición de la PC-PLC endógena bloqueó completamente la activación de PLD inducida por los anticuerpos anti-Fas, sin observarse ningún efecto sobre la activación de PLD inducida por el PMA. Estos resultados demostraron que la PC-PLC es la responsable de transmitir la señal iniciada por Fas a la PKC y, a través de ésta quinasa, a la PLD (Han y col., 1999; Kim y col., 2001).

El aumento de DAG catalizado por la PC-PLC también fue estudiado en fibroblastos expuestos a la acción del PDGF (van Dijk y col., 1997; Ramoni y col., 2004). En células NIH3T3 quiescentes, mediante la utilización de un anticuerpo policlonal anti-PC-PLC de *B. cereus*, se observó la localización de la enzima en la región perinuclear. Sin embargo, luego de la estimulación de las células con insulina, ésteres de forbol o PDGF se observó una relocalización de la PC-PLC en otros compartimentos citoplasmáticos y en la membrana celular. Más aún, la estimulación con estos mitógenos indujo una mayor expresión de la enzima y un aumento de la actividad PC-PLC tanto en la membrana como en el núcleo (Ramoni y col., 2004). En los fibroblastos preincubados con el inhibidor de la PC-PLC (D609) no se observó la redistribución de la enzima y estas células fueron incapaces de salir de la fase G<sub>0</sub> al menos por 24 horas, sugiriendo que la localización de la PC-PLC en el núcleo es esencial para la respuesta proliferativa iniciada por el PDGF (Ramoni y col., 2004).

La activación de la PC-PLC se reportó también en núcleos de células de neuroblastoma humano (LA-N-1) previamente tratadas con el éster de forbol TPA. El tratamiento de estas células con TPA estimuló la incorporación de colina en la PC nuclear, sugiriendo que el DAG producido era reutilizado como sustrato para la síntesis de PC. Por su parte, la inhibición de la PC-PLC bloqueó completamente la incorporación de colina en la PC, lo cual indica que esta enzima juega un rol clave en la regulación de la síntesis de este fosfolípido en el núcleo (Antony y col., 2001).

De la misma manera, la PC-PLC es necesaria para inducir la activación de la vía MAPK (proteína quinasa activada por mitógenos) en respuesta al PDGF en fibroblastos

Rat-1 (van Dijk y col., 1997). Asimismo, en células de astrocitoma humano (1321N1) la activación de la vía MAPK inducida por el tromboxano A<sub>2</sub> es mediada por la PC-PLC y una PKC (Kobayashi y col., 2000).

También en fibroblastos se postuló que la PC-PLC participa en la mitogénesis inducida por factores de crecimiento actuando corriente abajo de Ras, ya que la expresión de una mutante dominante negativa de Ras bloqueó la proliferación celular y la hidrólisis de PC inducida por factores de crecimiento (Cai y col., 1992). Un trabajo posterior del mismo grupo demostró que la PC-PLC actúa corriente arriba de Raf en la cascada de activación de las MAPKs. En este trabajo la sobreexpresión de la PC-PLC bacteriana o el agregado de enzima bacteriana de forma exógena indujeron la activación de Raf, sin embargo, no pudieron contrarrestar los efectos negativos de la expresión de una mutante dominante negativa de Raf. En concordancia, la inhibición de la enzima se correlacionó con la inhibición de Raf (Cai y col., 1993).

Por otra parte, en macrófagos alveolares humanos se reportó que el lipopolisacárido bacteriano (LPS) induce la fosforilación de ERK a través de la activación secuencial de la PC-PLC, la hidrólisis de SM y la activación de PKCζ. La activación de la PC-PLC por el LPS se relaciona con importantes funciones de los macrófagos, dado que la inhibición de la enzima interfiere en estas células la producción de citoquinas proinflamatorias (Monick y col., 1999). Un estudio posterior también en macrófagos postuló que la endotoxina bacteriana induce la activación de las MAPKs JNK y p38, y esta activación es mediada por la PC-PLC. De la misma manera, en este trabajo la inhibición de la PC-PLC atenuó la producción de citoquinas proinflamatorias (Cuschieri y col., 2006).

En la mayoría de los hallazgos publicados se utilizó el D609 para inhibir la actividad PC-PLC. Esta sal de xantato (con actividad antiviral y antitumoral) fue ampliamente aceptada como inhibidor de la PC-PLC (Muller-Decker, 1989; Amtmann, 1996; Ramoni y col., 2004) y se ha propuesto que actuaría como un inhibidor competitivo de la enzima (Amtmann, 1996; Gonzalez-Roura y col., 2002).

Se ha reportado también que la inhibición de la PC-PLC disminuye marcadamente la viabilidad de cultivos primarios de células neuronales de ratón. Por otra parte, en neuronas corticales de rata el ácido lipoteicoico (componente de la pared celular de bacterias Gram-positivas) es capaz de estimular a la PC-PLC y a la PIP<sub>2</sub>-PLC para inducir la activación de PKC $\epsilon$  y ERK (Lv y col., 2006; Wu y col., 2006).

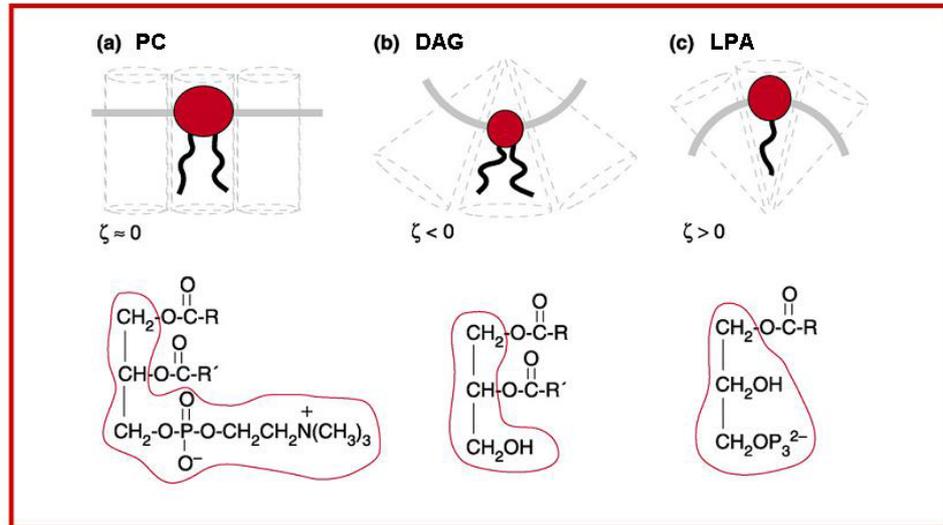
Un trabajo reciente reportó que la actividad de la PC-PLC es 3 veces mayor en lisados de células epiteliales de cáncer de ovario con respecto a la actividad en células no tumorales, reforzando la importancia que reviste el estudio de esta enzima en la proliferación celular (Spadaro y col., 2008).

#### *Propiedades del DAG en las membranas biológicas.*

La composición de ácidos grasos y la presencia o no de grupos polares en la estructura de los lípidos determina las propiedades fisicoquímicas de los mismos. El espacio requerido por la región polar y por la no polar de un lípido determina la forma geométrica del mismo, lo cual afecta la curvatura de la membrana. El concepto de curvatura espontánea ( $\zeta$ ) define la forma de una monocapa lipídica compuesta por un único lípido. Cuando el espacio ocupado por la cabeza polar y la región apolar son similares la molécula presenta una forma cilíndrica con una curvatura espontánea igual a cero ( $\zeta=0$ ) lo cual genera estructuras lamelares, tal es el caso de la PC. La forma de cono de lípidos con una cabeza polar pequeña, como el PA o el DAG, origina curvaturas negativas en la monocapa ( $\zeta<0$ ) y la formación de micelas invertidas. Por el contrario, los lípidos con forma de cono invertido con una gran región polar y una región apolar pequeña, tal como la LPC ó el LPA, inducen curvaturas positivas ( $\zeta>0$ ) y la formación de micelas. Asimismo la curvatura espontánea también depende del largo y la saturación de los ácidos grasos esterificados (Carrasco y Merida, 2007).

El DAG juega importantes roles tanto en la estructura como en la dinámica de las membranas biológicas. Cuando se concentra en pequeñas regiones de la membrana, la curvatura negativa del DAG y su falta de carga induce regiones inestables y asimétricas

en la bicapa lipídica. El DAG participa en los procesos de fusión y fisión de membranas y es además un intermediario fundamental en la biosíntesis de triglicéridos y fosfolípidos como la PC, la PE y la CL (Carrasco y Merida, 2007).



**Figura 6: Disposición geométrica y curvatura de la membrana inducida por distintos lípidos.**

(Reproducido de Carrasco y Mérida, 2007).

#### Proteínas de respuesta al DAG:

Las PKCs fueron las primeras proteínas en las cuales se describió la capacidad reguladora del DAG. Desde este descubrimiento, llevado a cabo por el grupo de Nishizuka a principio de los años 80 (Takai y col., 1979; Kishimoto y col., 1980), hasta la fecha se han descrito otras cinco familias de proteínas capaces de ser moduladas por el DAG distintas de las PKCs: las proteínas quinasas D (PKD), las quimerinas, las proteínas liberadoras de nucleótidos de guanina de Ras (RasGRPs), las Munc13s y las DAG quinasas (DAGKs). Todas estas proteínas se caracterizan por la presencia en su secuencia de al menos un dominio conservado 1 (C1), con diferentes especificidades y afinidades por el DAG (Wang, 2006).

Durante mucho tiempo se consideró que el principal efecto del DAG en las proteínas que responden a este lípido era mediar la translocación a la membrana plasmática a través de la interacción del lípido con el dominio C1 de la proteína. Sin

embargo, descubrimientos más recientes han ampliado este concepto incluyendo dentro de las funciones del DAG mediadas por el dominio C1 la modulación de la actividad proteica y la localización de las proteínas en dominios específicos de la membrana. El rango de especificidad y afinidad de los dominios C1 aumenta la complejidad de las respuestas al DAG y facilita la discriminación entre diferentes "pooles" de este lípido por parte de las proteínas blanco (Hall y col., 2005; Carrasco y Merida, 2007).

Las **PKCs** constituyen una familia de 10 serina/treonina quinasas las cuales están implicadas en una gran diversidad de eventos celulares, tales como la proliferación y la muerte celular, la diferenciación, la expresión génica, la transformación celular y la inflamación (Oliva y col., 2005; Gould y Newton, 2008). La activación de estas quinasas ocurre tanto en respuesta a la activación de receptores tirosinas- quinasa (RTKs) como a la activación de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) (Griner y Kazanietz, 2007).

En mamíferos existen 10 isoformas las cuales se clasifican en tres subfamilias (convencionales, "novels" y atípicas) en base a los dominios que las componen y que en definitiva determinan el requerimiento de cofactores de cada isoenzima. Los dominios básicos son el C1 y el C2 (sensor de  $\text{Ca}^{2+}$ ), los dominios C1 localizados en la región regulatoria N-terminal contienen el sitio de unión a DAG y los ésteres de forbol (análogos no hidrolizables del ligando endógeno) se unen a este mismo sitio activando la enzima (Newton, 2003).

Las PKCs convencionales (cPKC:  $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II y  $\gamma$ ) contienen dominios C1 (C1A y C1B) y C2 funcionales y responden al DAG y al  $\text{Ca}^{2+}$ , las PKCs "novels" (nPKC:  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$  y  $\theta$ ) contienen dos dominios C1 funcionales y un dominio C2 no funcional, por lo que estas isoformas solo responden al DAG (Griner y Kazanietz, 2007). En cambio, las PKCs atípicas (aPKC:  $\zeta$  y  $\lambda$ ) poseen un dominio C1 no funcional y no poseen dominio C2, en consecuencia estas isoformas no responden ni a DAG ni a  $\text{Ca}^{2+}$  (Newton, 2003; Griner y Kazanietz, 2007). Los términos "típico" y "atípicos" son actualmente utilizados para referirse a dominios C1 que unen o no ésteres de forbol/DAG respectivamente (Colon-Gonzalez y Kazanietz, 2006).

A pesar de presentar una alta homología, las distintas isoformas de PKC son diferencialmente reguladas por fosforilaciones en serina/treonina y también por autofosforilaciones e interacciones proteína-proteína que son requeridas para la maduración, la activación y la estabilidad de la enzima (Oliva y col., 2005; Griner y Kazanietz, 2007). Las PKCs se mantienen en su conformación inactiva por la unión de una secuencia pseudosustrato autoinhibitoria al sitio activo de la enzima. El dominio C1 es el responsable de la activación alostérica de la enzima luego de la unión del ligando lipídico y el modelo aceptado de la activación de PKC propone que la unión del DAG al dominio C1 causa la translocación de la enzima a la membrana y también aumenta la afinidad por PS y, en las cPKCs, el  $\text{Ca}^{2+}$  también facilita la translocación aumentando la afinidad del dominio C2 por membranas aniónicas. La interacción con la membrana provee la energía necesaria para la liberación de la secuencia pseudosustrato del sitio activo, mientras que para las PKCs atípicas la única regulación claramente establecida es el requerimiento de la fosforilación por la quinasa dependiente de fosfoinosítidos PDK-1 (Newton, 2003; Oliva y col., 2005).

Las **PKDs** también son una familia de serina/treonina quinasas. Cuatro miembros de esta familia han sido identificados: PKD1 (que incluye la PKD de ratón y su homólogo humano PKC $\mu$ ), PKD2 y PKD3 (originalmente llamada PKC $\nu$ ), siendo PKD1 la más caracterizada (Wang, 2006).

Las PKDs contienen dos dominios C1, un dominio PH y un dominio catalítico serina/treonina quinasa. Las distintas isoformas de PKD han sido implicadas en la proliferación, la supervivencia celular, la migración y el tráfico de membrana (Rykx y col., 2003; Oliva y col., 2005; Rozengurt, 2007). El DAG regula a PKD de dos maneras distintas: regula la localización de PKD a través de su unión al dominio C1 e induce la activación de la enzima a través de fosforilaciones dependientes de PKC (Waldron y Rozengurt, 2003; Wang, 2006; Rozengurt, 2007).

Otras proteínas de respuesta al DAG son las **Unc13/Munc13**, Unc13 de *Caenorhabditis elegans* y sus homólogos en mamíferos (Munc13s). Estas proteínas contienen dominios C1 y C2 y se han identificado tres isoformas (Munc13 1-3), las

isoformas 1 y 3 se expresan principalmente en el cerebro, mientras que la expresión de Munc13-2 es ubicua (Colon-Gonzalez y Kazanietz, 2006).

En las neuronas las proteínas Munc13 promueven la formación de complejos de proteínas SNARE implicados en la secreción de vesículas, lo cual es un proceso esencial para la liberación de neurotransmisores (Oliva y col., 2005). Se ha observado que las neuronas de ratones knockout para Munc13-1 son incapaces de formar vesículas sinápticas maduras, además esta proteína ha sido identificada como el principal receptor de DAG y ésteres de forbol en neuronas de hipocampo (Augustin y col., 1999; Rhee y col., 2002).

Por su parte, las **quimerinas** son proteínas activadoras de la actividad GTPasa (GAPs), las cuales aceleran la actividad GTPasa intrínseca de las proteínas G pequeñas llevando a la inactivación de las mismas. Las quimerinas son únicas entre otras proteínas GAPs en dos aspectos: bioquímicamente son las únicas con actividad GAP específicamente para la proteína G pequeña Rac y estructuralmente contienen un dominio C1. Fueron llamadas de esta manera porque originalmente se las definió como una quimera entre el dominio C1 de las PKCs y el dominio GAP de la proteína BCR (Yang y Kazanietz, 2007).

Existen cuatro miembros en la familia de las quimerinas:  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$  y  $\beta 2$ . Las quimerinas  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  se expresan mayoritariamente en cerebro, la isoforma  $\beta 2$  en cerebelo y la  $\beta 1$  en testículo. Las quimerinas  $\alpha 2$  y  $\beta 2$  poseen además un dominio SH2 N-terminal de unión a fosfotirosina (Yang y Kazanietz, 2007).

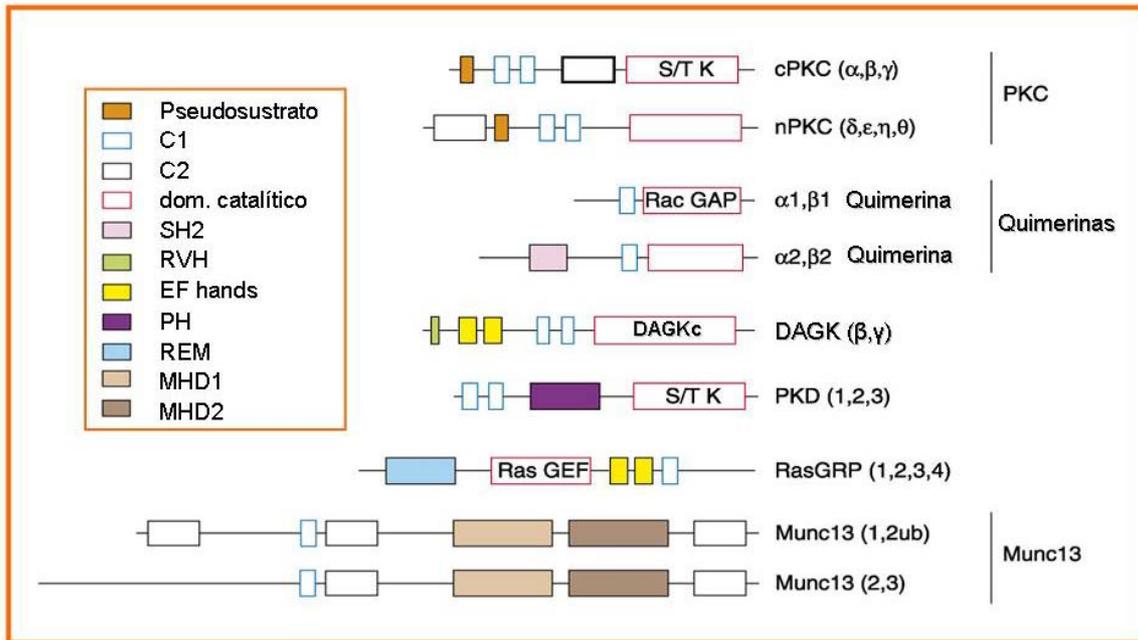
Estudios recientes identificaron a la  $\beta 2$  quimerina como un efector del receptor del factor de crecimiento epidermal (EGF) en células COS-1. El EGF origina la translocación de  $\beta 2$ -quimerina desde el citoplasma hacia la membrana y su asociación con Rac. Estos hallazgos proveen evidencia sobre la divergencia en las vías de señalización mediadas por el DAG corriente abajo de la activación de RTKs, independientemente de los mecanismos mediados por las PKCs (Wang, 2006; Wang y col., 2006).

Los GPCRs también pueden modular la actividad de las quimerinas, la estimulación del receptor muscarínico de acetilcolina (mAChR1) recluta a  $\alpha 1$ -quimerina a la membrana plasmática en neuronas de hipocampo en cultivo, este efecto ocurre en segundos y es enteramente dependiente de la generación de DAG y del dominio C1 de la quimerina (Buttery y col., 2006). Se reportó también que  $\alpha 1$ -quimerina está presente en dendritas y en espinas neuríticas de neuronas de hipocampo en cultivo y que se une al receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA) en forma dependiente de ésteres de forbol (Van, V y col., 2005).

Dado que las quimerinas se expresan altamente en cerebro, se especula que jugarían roles importantes regulando las respuestas mediadas por Rac en el sistema nervioso central (Yang y Kazanietz, 2007).

Las **RasGRPs** (RasGRP 1-4) contienen en el extremo N-terminal un dominio de factor intercambiador de nucleótidos de guanina (GEF) para Ras seguido de dos dominios EF hands y un dominio C1 C-terminal. Estas proteínas intercambian GDP por GTP en las proteínas G pequeñas Ras y Rap1 facilitando su activación. Las RasGRPs han sido implicadas en la regulación de la diferenciación celular, en la proliferación, en la señalización en células T y B y en la transformación celular (Oliva y col., 2005). Además, las PKCs pueden fosforilar directamente a las RasGRPs y estimular de esta forma su actividad, demostrando nuevamente la existencia de una importante interrelación entre los receptores de DAG (Teixeira y col., 2003).

Finalmente, el DAG es también capaz de regular directamente la actividad de los canales **TRPC** (canales receptores de potencial transitorio) tipo 2 y 3. Estos canales, permeables tanto al  $\text{Na}^+$  como al  $\text{Ca}^{2+}$ , se expresan en diversos tipos celulares y modifican el potencial de membrana en respuesta a la activación de receptores acoplados a PLCs. Se ha demostrado que el DAG ejerce un efecto activador directo, el cual es independiente de la actividad de PKC y del  $\text{Ca}^{2+}$ , sobre los TRPC2 y 3 (Lucas y col., 2003; Soboloff y col., 2007).



**Figura 7: Estructura de las proteínas de respuesta al DAG.** El recuadro indica los dominios catalíticos y regulatorios presentes en las distintas proteínas. (Adaptado de Carrasco y Mérida, 2007).

#### Vías metabolizadoras del DAG:

Considerando las numerosas vías metabólicas en las cuales está implicado el DAG, es fundamental un control riguroso de la producción y de la metabolización de este lípido bioactivo.

Alteraciones en los mecanismos que gobiernan la producción y la metabolización del DAG resultan en la localización o en la activación aberrante de las proteínas que son reguladas por este segundo mensajero lipídico, originando condiciones patológicas.

El efecto adverso de una producción aumentada y sostenida de DAG resulta bien ilustrado por el efecto tumorigénico de los ésteres de forbol. Estos análogos de DAG se unen a los dominios C1 de las proteínas blanco pero son metabolizados muy lentamente y se ha postulado que la inducción de tumores sería el resultado de una activación sostenida de las proteínas capaces de responder a estos compuestos (Carrasco y Merida, 2007).

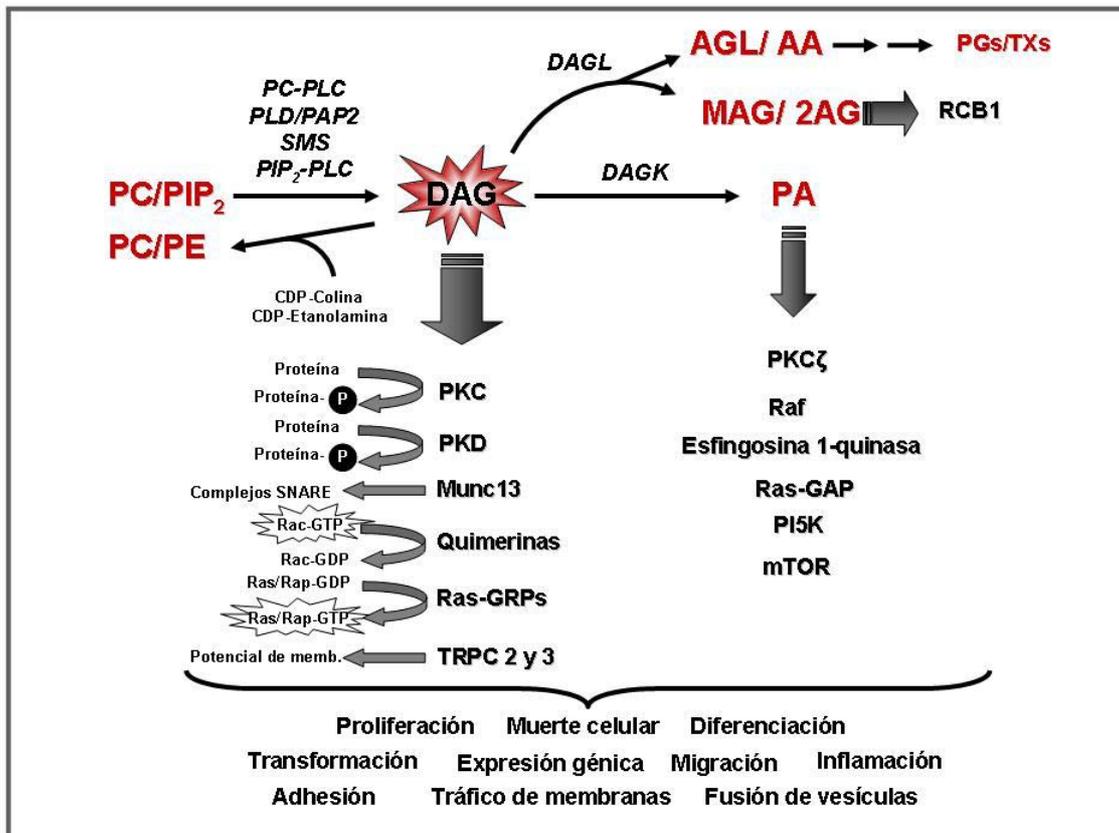
El DAG puede ser metabolizado de tres maneras: mediante la hidrólisis de uno de sus ácidos grasos esterificados, por la reacción con CDP-colina o CDP-etanolamina para formar PC y PE, y por la fosforilación de su grupo hidroxilo para formar PA.

Las DAG lipasas (**DAGLs**) hidrolizan el ácido graso en la posición 1 ó 2 generando monoacilglicerol (MAG), en cerebro han sido clonadas y caracterizadas dos isoformas ( $\alpha$  y  $\beta$ ) (Bisogno y col., 2003). La actividad de estas enzimas se relaciona con importantes funciones como la coagulación y la inflamación ya que producen la liberación de ácido araquidónico, precursor de prostaglandinas y tromboxanos (Smith y col., 1991; Boyce, 2008). En el sistema nervioso, la actividad de las DAGLs es importante para la generación del endocanabinoide 2-araquidonoil-glicerol (2-AG) en la neurona postsináptica, el cual actúa sobre el receptor CB1 en la membrana presináptica causando la supresión de la liberación de transmisores (Yoshida y col., 2006).

En la mayoría de los casos la conversión del DAG a PA por la acción de las **DAGKs** es la principal forma de metabolización de este segundo mensajero lipídico. Hasta la fecha se han identificado 10 isoformas de DAGKs en mamíferos, todas estas isoformas poseen un dominio catalítico similar con un sitio consenso de unión a ATP, pero se clasifican en 5 grupos en base a sus dominios regulatorios. Además del dominio catalítico, todas las DAGKs poseen regiones ricas en cisteína homólogas a los dominios C1A y C1B de las PKCs, sin embargo estos dominios carecen de ciertos residuos consenso necesarios para unir ésteres de forbol (Topham, 2006; Merida y col., 2008).

La actividad de las DAGKs remueve al DAG como molécula señal, sin embargo, el PA producto de la reacción también actúa como segundo mensajero. El PA estimula la síntesis de DNA siendo potencialmente mitogénico y colabora en reclutar a la membrana proteínas como Raf y la esfingosina 1-quinasa. También está involucrado en la modulación de diversas enzimas, entre ellas la PI 5-quinasa (PI5K), Ras-GAP, PKC $\zeta$  y la NADPH oxidasa (Klein, 2005; Topham, 2006). Asimismo, se reportó que el PA es un componente crítico de los eventos celulares mediados por mTOR (mammalian target of rapamycin), tales como el crecimiento y la proliferación (Fang y col., 2001). En consecuencia, las DAGKs no solo apagan las señales intracelulares mediadas por el DAG,

sino que también pueden iniciar otros eventos de señalización mediados por el PA, producto de su actividad enzimática.



**Figura 8:** Esquema resumen de las vías de generación y de metabolización del DAG, de las proteínas de respuesta al DAG y al PA y de los eventos celulares mediados por estos lípidos bioactivos.

## EL SISTEMA NERVIOSO Y EL ESTRÉS OXIDATIVO.

Entre todos los órganos del cuerpo, el cerebro es particularmente vulnerable al daño oxidativo debido a su gran consumo de oxígeno y a sus altos niveles de ácidos grasos poliinsaturados y de metales de transición en relación a otros órganos. Además, el cerebro presenta niveles relativamente bajos de sustancias antioxidantes (Sen y col., 2006; Butterfield y col., 2007). El estrés oxidativo juega un rol crucial en la patogénesis de un gran número de enfermedades, incluyendo el cáncer, la isquemia y los desórdenes

neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer (EA) y la enfermedad de Parkinson (EP).

La producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) se mantiene en equilibrio por la presencia de los compuestos antioxidantes, entre los que se incluyen las vitaminas E y C, el glutatión y enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa y la glutatión reductasa. Muchos factores; incluidos la radiación, ciertas drogas y enfermedades; pueden alterar el equilibrio oxidativo-antioxidativo en el cerebro. Es por ello que entender los mecanismos que regulan el estado oxidativo, y los eventos intracelulares desatados por las situaciones de estrés oxidativo, es de vital importancia para el tratamiento y la prevención de las enfermedades neurodegenerativas (Butterfield y col., 2007; Sun y col., 2007; Castellani y col., 2007).

El hierro, tanto como el oxígeno, es un elemento esencial para el metabolismo celular. Sin embargo, puede causar citotoxicidad cuando existen disfunciones en su homeostasis, tanto por su deficiencia como por su exceso (Castellani y col., 2007). La presencia del ión ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) en un ambiente rico en oxígeno puede generar una producción excesiva de radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ROS) como peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y el ión superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), que llevan en última instancia a la oxidación de proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos (Butterfield y col., 2007). El daño oxidativo producido en estas moléculas origina disfunciones a distintos niveles celulares, tales como alteraciones en el funcionamiento de ATPasas, de transportadores de glucosa y glutamato, disfunción mitocondrial y aumento de la permeabilidad de la membrana plasmática.

La captación de hierro en el cerebro es estrictamente controlada por el receptor de transferrina en las células endoteliales de los plexos coroideos y el receptor de lactoferrina de las neuronas (Kawamata y col., 1993; Leveugle y col., 1994; Moos, 1996). La homeostasis celular del hierro se logra a través del control de la síntesis de diversas proteínas involucradas en el movimiento, almacenamiento y utilización del mismo. Los RNA mensajeros de alguna de estas proteínas contienen secuencias específicas llamadas elementos de respuesta al hierro (IREs). Estos elementos

interactúan con proteínas citoplasmáticas reguladoras del hierro (IRPs), las cuales son los reguladores claves de la homeostasis intracelular del ión (Pinero y col., 2001; Patton y col., 2005).

El depósito de hierro en el cerebro se ha observado durante el proceso normal de envejecimiento, a este proceso se le asocia un desbalance progresivo entre las defensas antioxidantes (como el glutatión, el ascorbato y la vitamina E) y la concentración intracelular de ROS, llevando a la declinación de los procesos cognitivos. Asimismo, se observa un aumento de hierro en el sistema nervioso central en ciertas enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson, la enfermedad de Alzheimer y la esclerosis múltiple (Stankiewicz y col., 2007; Droge y Schipper, 2007).

También las especies reactivas de nitrógeno (RNS), como el óxido nítrico (NO) producido por la óxido nítrico sintasa (NOS), son moléculas importantes en el sistema nervioso central. El NO es producido tanto por las neuronas como por las células gliales y, aunque es un importante mediador fisiológico en condiciones normales, la producción excesiva resulta perjudicial para las células. El NO puede reaccionar con el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), formando el anión peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), el cual es un potente oxidante que también puede causar daño en las membranas lipídicas y formar aductos (Acarin y col., 2005).

La enfermedad de Alzheimer se caracteriza clínicamente por la disminución de habilidades cognitivas y de la memoria. Esta patología está asociada a la pérdida progresiva de neuronas y sinapsis, siendo una de las principales causas de demencia senil (Mattson, 1997; McGrath y col., 2001; Butterfield y col., 2007; Mandel y col., 2007). Es característico de esta enfermedad la presencia de placas seniles extracelulares, formadas por agregados del péptido insoluble  $\beta$  amiloide ( $A\beta$ ), así como de ovillos neurofibrilares intracelulares compuestos de la proteína tau del citoesqueleto hiperfosforilada (Mandel y col., 2007).

El  $A\beta$  (un péptido de 40 a 42 aminoácidos) deriva del clivaje proteolítico de una proteína integral de membrana, conocida como proteína precursora de amiloide (APP), por la acción combinada de una  $\beta$  y una  $\gamma$  secretasas. Este proceso puede ocurrir

normalmente en condiciones fisiológicas, siendo la formación anormal de este péptido considerada una de las principales causas en el desarrollo y la progresión de la enfermedad. El depósito de amiloide origina una inflamación crónica y la generación de estrés oxidativo con la subsiguiente oxidación de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Perluigi y col., 2006). El péptido A $\beta$  puede existir como monómeros, oligómeros o fibrillas. Los fragmentos 1-40 y 1-42 constituyen la mayoría del A $\beta$  presente en los cerebros humanos, siendo el 1-42 el más tóxico tanto *in vivo* como *in vitro* (Atwood y col., 2003; Butterfield y col., 2007; Reid y col., 2007).

Se ha reportado que metales divalentes como el Fe<sup>2+</sup>, el Cu<sup>2+</sup> y el Zn<sup>2+</sup> son capaces de inducir la agregación del A $\beta$  en fibrillas neurotóxicas en el neocórtex (Bush, 2002; Atwood y col., 2003) y estudios postmortem realizados por rayos X en cerebros de pacientes con Alzheimer demostraron la presencia de estos metales en las placas seniles (Lovell y col., 1998). Además, en cerebros provenientes de pacientes con Alzheimer se observó una acumulación específica de hierro en ciertas áreas demostrando que existen zonas más vulnerables a la neurodegeneración, tales como el hipocampo y la corteza cerebral (Bostanci y Bagirici, 2007).

Por otra parte, la enfermedad de Parkinson se caracteriza por una degeneración selectiva de neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra, resultado en disfunciones motoras irreversibles. Afecta principalmente a personas mayores de 45 años y se caracteriza por rigidez, lentitud en los movimientos voluntarios (bradicinesia) y temblor en el reposo (Jiang y col., 2007; Xu y col., 2008).

Diversos estudios han sugerido una posible relación entre la enfermedad de Parkinson y un metabolismo del hierro alterado en el cerebro (Youdim y col., 2005; Lee y col., 2006; Xu y col., 2008). Además, en cerebros postmortem de pacientes con esta enfermedad se encontró una acumulación excesiva de hierro en la sustancia nigra (Kaur y Andersen, 2002; Lee y col., 2006). Si bien no se ha esclarecido completamente cuales son las causas de la neurodegeneración, es muy probable que la injuria oxidativa producida por los altos niveles de hierro sea un factor determinante de la muerte neuronal en esta patología (Berg y Youdim, 2006; Jiang y col., 2007; Xu y col., 2008).

Muchas veces los procesos degenerativos propios de estas patologías comienzan en las sinapsis, sitio donde los procesos de señalización celular se encuentran altamente concentrados y participan en la regulación de la supervivencia y en la plasticidad de las neuronas (Guo y Mattson, 2000). Trabajos previos demostraron que la incubación de los sinaptosomas en presencia de  $\text{FeSO}_4$  constituye un modelo apropiado de estrés oxidativo (Keller y col., 1997; Guo y Mattson, 2000). Estos autores reportaron que el  $\text{Fe}^{2+}$  (50  $\mu\text{M}$ ) reduce la viabilidad mitocondrial, la captación de la glucosa y del glutamato y promueve la peroxidación lipídica. Además, los efectos producidos por el hierro fueron de la misma magnitud que los producidos por el  $\text{A}\beta$  (50  $\mu\text{M}$ ).

El vasto número de eventos celulares regulados por proteínas que responden al DAG demuestran la importancia de las vías generadoras de este lípido bioactivo a partir de los fosfolípidos de las membranas, tanto en células nerviosas como en células de otros tejidos.

Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio demostraron la presencia de la PLD, y su regulación por insulina, en la corteza cerebral y en el cerebelo de rata (Salvador y col., 2002; Pasquare y col., 2004; Salvador y col., 2005).

Asimismo, aunque se carecen de datos en cuanto a su estructura, peso molecular e isoformas, los antecedentes antes mencionados evidencian la presencia de la PC-PLC en mamíferos. Sin embargo, son escasos los trabajos que han estudiado su rol en el sistema nervioso central y en células neuronales. Es por ello que en esta tesis doctoral se estudió la presencia de la vía de la PC-PLC en las terminales sinápticas de la corteza cerebral de rata y se realizó la caracterización de esta vía con el fin de hallar las condiciones experimentales óptimas para ensayar la actividad de la enzima y determinar su localización en la terminal sináptica.

Además, en la segunda parte de la tesis se estudió el efecto de la injuria oxidativa inducida por el  $\text{FeSO}_4$  en las vías de generación de DAG a partir de PC ya que, a pesar de los numerosos trabajos que describen los eventos intracelulares inducidos por el estrés oxidativo, muy poco se conoce sobre el rol de las vías de señalización que involucran segundos mensajeros lipídicos.

La presente tesis doctoral tiene como objetivo global contribuir al conocimiento de los eventos moleculares que median las vías de señalización lipídicas, en particular aquellas derivadas de la PC en el sistema nervioso central.

## OBJETIVOS

- Evaluar la generación de DAG a partir de la PC en las terminales sinápticas de la corteza cerebral de ratas adultas y seniles.
- Demostrar la presencia de la PC-PLC en los sinaptosomas, caracterizar esta nueva vía de generación de DAG y determinar sus parámetros cinéticos.
- Identificar, mediante el uso de inhibidores y de ensayos de Western blot, las vías enzimáticas que contribuyen a la generación de DAG a partir de la hidrólisis de la PC.
- Estudiar la localización de las vías generadoras de DAG en la fracción de membrana sinaptosomal y en dominios especializados de la misma.
- Caracterizar el daño producido en los sinaptosomas por el estrés oxidativo, utilizando como inductor el  $\text{FeSO}_4$ .
- Evaluar el efecto de la injuria oxidativa sobre la hidrólisis de la PC en los sinaptosomas de ratas adultas y seniles, particularmente el efecto sobre las vías de generación de DAG.
- Determinar el rol de las vías de metabolización del DAG y la interrelación entre las vías generadoras de este segundo mensajero y otros mecanismos de señalización que involucran la activación de tirosinas y serina/treonina quinasas.

## MATERIALES Y METODOS

### 1. MODELO EXPERIMENTAL.

Para la realización de la presente tesis doctoral se utilizaron como modelo experimental terminales sinápticas o sinaptosomas (Syn) obtenidos de la corteza cerebral (CC) de la rata.

Las cortezas cerebrales fueron obtenidas de ratas de la cepa Wistar adultas (4 meses) y seniles (28 meses) las cuales fueron criadas en el bioterio del INIBIBB, en condiciones ambientales constantes (temperatura de 24 °C y ciclos de luz y oscuridad de 12 hs) y alimentadas con una dieta estándar *ad libitum* hasta el momento del sacrificio. El sacrificio de los animales se realizó por decapitación.

### 2. OBTENCIÓN DE LA CORTEZA CEREBRAL Y DE LA FRACCIÓN SINAPTOSOMAL.

Inmediatamente después de la decapitación (2 min aproximadamente) se extrajo el cerebro de los animales y la corteza cerebral fue disecada rápidamente de la sustancia blanca, estos procedimientos se llevaron a cabo a una temperatura de 4°C.

Los sinaptosomas se obtuvieron por un método de centrifugación diferencial descrito por Cotman con algunas modificaciones (Cotman, 1974; Salvador y col., 2002). Una vez obtenida la corteza cerebral esta se homogeneizó al 20% (p/v) en un medio de homogenización (BH: sacarosa 0,32 M, EDTA 1 mM, HEPES 10 mM, pH 7,4) en presencia de inhibidores de proteasas (DTT 1 mM, leupeptina 2 µg/ml, aprotinina 1 µg/ml, pepstatina 1 µg/ml y PMSF 0,1 mM). Se utilizó un homogenizador tipo Potter-Elvehjem con vástago de teflón (clearance 0,13-0,18 mm), realizándose 10 toques ascendentes y descendentes a 700 rpm. Luego este homogenado fue diluido al 10% en el mismo medio.

El homogenado total (HT) se centrifugó a 1.800 x g durante 7,5 min a 4°C para obtener la fracción nuclear (FN) la cual se descartó. Se utilizó un rotor JA-21 y una

centrífuga Beckman J2-21. El sobrenadante post nuclear (SPN) se centrifugó a 14.000 x *g* durante 20 min a 4°C para obtener la fracción mitocondrial cruda (FMit). El sobrenadante post mitocondrial (SPMit) se descartó mientras que a la FMit se le realizó un lavado con 5 ml de buffer de homogenización. La FMit lavada se resuspendió en 3 ml del mismo medio y se sembró sobre un gradiente discontinuo de Ficoll formado por 6 ml de Ficoll 13% y 6 ml de Ficoll 8,5% (las soluciones de Ficoll fueron preparadas en el mismo medio de aislamiento). El gradiente se centrifugó a 85.500 x *g* durante 30 min a 4°C en un rotor SW 28.1 utilizando una ultracentrífuga Beckman L5-50. La fracción sinaptosomal se obtuvo entre las dos densidades de Ficoll. En la interfase del medio de aislamiento y el Ficoll 8,5% se encontró la banda de mielina mientras que las mitocondrias se hallaron en el pellet. A continuación la banda de Syn fue aislada, diluida en el medio de aislamiento (al menos 4 veces) y centrifugada a 33.000 x *g* durante 20 min a 4°C. El pellet obtenido se resuspendió en distintos buffers según el objetivo y se utilizó para los ensayos enzimáticos y de viabilidad a realizar. El protocolo de obtención de los Syn se esquematiza en la Figura 9.

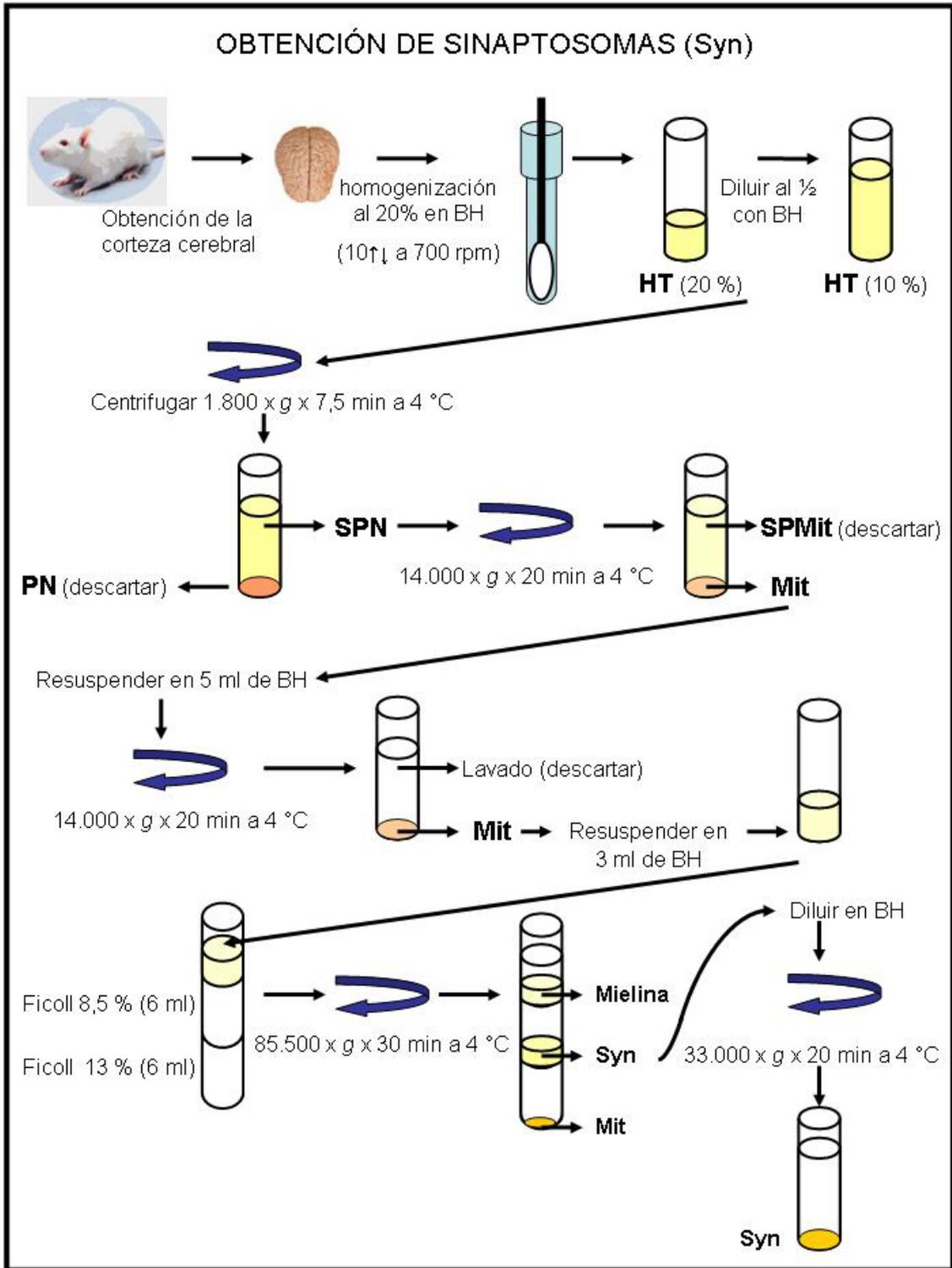
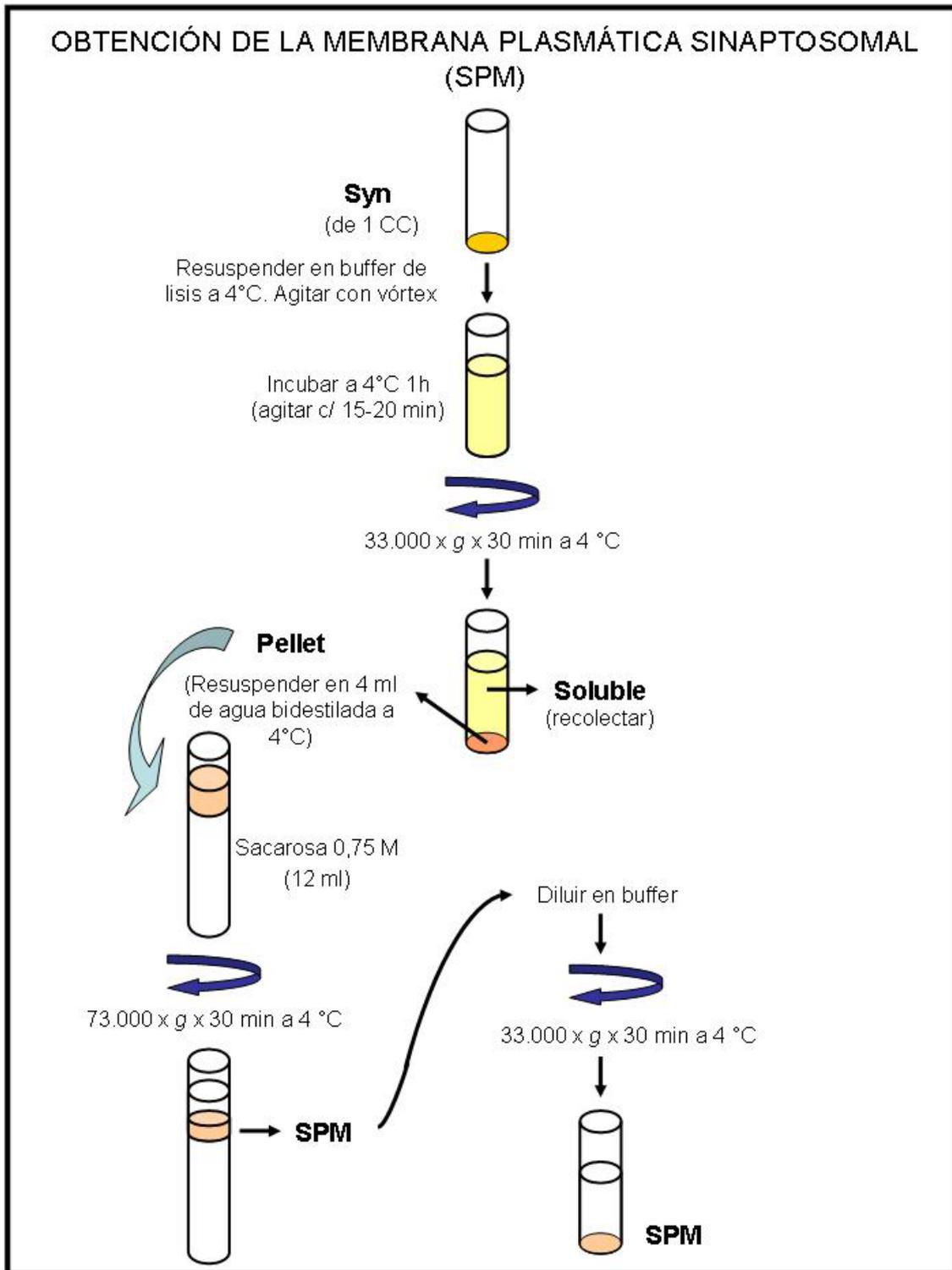


Figura 9: Protocolo de obtención de los Syn de CC de rata.

### 3. OBTENCIÓN DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA SINAPTOSOMAL (SPM).

#### 3.1. Obtención.

La obtención de la fracción SPM se realizó en base a un protocolo descrito por Igbavboa con algunas modificaciones (Igbavboa y col., 1996; Mateos y col., 2006): la fracción sinaptosomal proveniente de una CC se resuspendió en 4 ml de medio de lisis previamente enfriado a 4°C (Tris 5 mM, pH 8,5) conteniendo inhibidores de proteasas (DTT 1 mM, leupeptina 2 µg/ml, aprotinina 1 µg/ml, pepstatina 1 µg/ml y PMSF 0,1 mM). Esta suspensión fue agitada vigorosamente mediante la utilización de vórtex e incubada a 4°C por 1 h, repitiendo la agitación cada 15-20 min. Luego de la hora de incubación en frío la suspensión se centrifugó a 33.000 x *g* durante 30 min utilizando un rotor JA-21 y una centrífuga Beckman J2-21. A continuación la fracción soluble (Sol) de los sinaptosomas lisados fue recolectada y el pellet obtenido se resuspendió en 4 ml de agua ultrapura previamente enfriada a 4°C. Posteriormente esta suspensión fue sembrada sobre 12 ml de una solución de sacarosa 0,75 M conteniendo HEPES 10 mM, EDTA 0,25 mM (pH 7,4) y se centrifugó a 73.000 x *g* durante 30 min a 4°C en un rotor SW 28.1 utilizando una ultracentrífuga Beckman L5-50. Luego de la centrifugación la fracción SPM se obtiene en la interfase, ésta es recolectada y centrifugada a 33,000 x *g* durante 30 min. El pellet obtenido fue resuspendido en un medio Tris 0,1 M (pH 7,4) y utilizado para los ensayos enzimáticos y para la determinación de la pureza de la fracción. El protocolo se esquematiza en la Figura 10.



**Figura 10: Protocolo de obtención de la fracción de membrana plasmática sinaptosomal (SPM).**

### 3. 2. Determinación de la pureza de la fracción SPM.

La pureza de la fracción SPM se determinó midiendo la actividad de la enzima 5'nucleotidasa, enzima marcadora de membrana plasmática, en las fracciones de HT, Syn, SPM y Sol. Se utilizó el método previamente descrito por Widnell y Unkeless con algunas modificaciones (Widnell y Unkeless, 1968), este método mide la liberación de fosfato inorgánico utilizando como sustrato adenosina monofosfato (AMP).

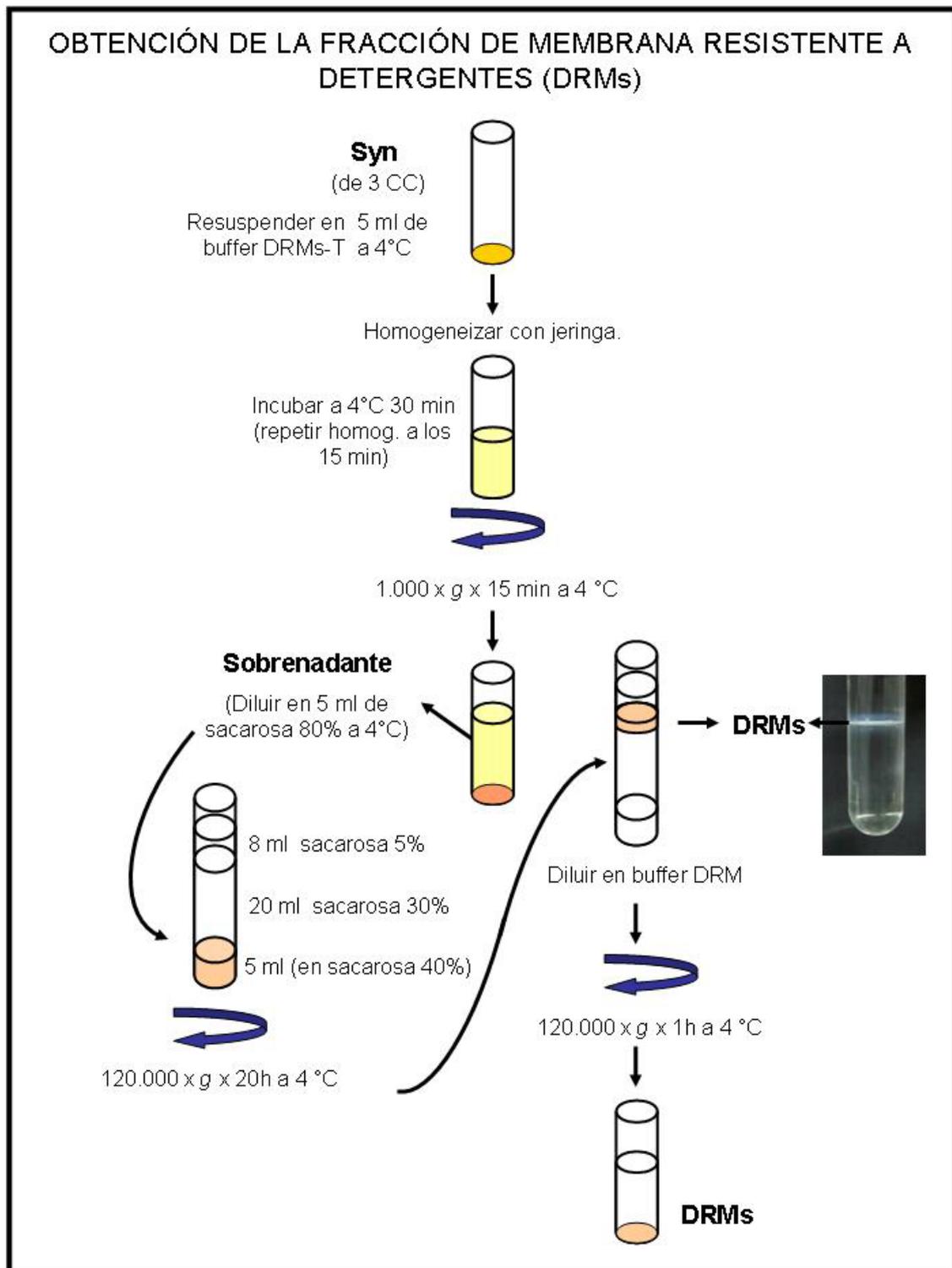
Para la reacción se tomaron alícuotas (conteniendo 50 µg de proteínas) de las distintas fracciones resuspendidas en el buffer Tris 0,1 M (pH 7,4) y se les agregó buffer Tris 0,1 M (pH 8,5) cantidad suficiente para 100 µl. A continuación se agregaron 500 µl del reactivo sustrato (AMP 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, Tris 0,1 M pH 8,5) y las muestras fueron incubadas a 37°C por 20 min. Luego de la incubación se agregó 1,4 ml del reactivo de coloración (1 parte de ácido ascórbico 10% en 6 partes de molibdato de amonio 0,42% en ácido sulfúrico 1 N, preparado el mismo día). El color se desarrolla incubando las muestras por 1 h a 37°C y la absorbancia se leyó a 820 nm en un espectrofotómetro. El blanco de reacción enzimática se realizó reemplazando la alícuota de membrana por buffer Tris (100 µl buffer + 500 µl reactivo sustrato + 1,4 ml reactivo de color). Paralelamente se realizó una curva estándar utilizando una solución patrón de fosfato diácido de potasio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 8 µg/ml, se tomaron alícuotas tales de lograr concentraciones de 0 (Blanco de reacción), 2, 10, 20, 100 y 200 µM y se agregó H<sub>2</sub>O cantidad suficiente para (csp) 600 µl más 1,4 ml de reactivo de color. Los resultados se expresaron como nmoles Pi x (mg proteína x h)<sup>-1</sup>.

### 4. OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN DE MEMBRANA RESISTENTE A DETERGENTES (DRMs) DE LOS Syn DE CC.

La obtención de la fracción de membrana resistente a detergentes (DRMs) o "Rafts" se realizó en base a los protocolos descritos por Brown y Rose y por Molander-Melin (Brown y Rose, 1992; Molander-Melin y col., 2005) con algunas adaptaciones a nuestro modelo experimental: el pellet sinaptosomal obtenido de 3 cortezas cerebrales

(aproximadamente 27-30 mg proteína) fue resuspendido en 5 ml de buffer DRMs-T (Tris 10 mM, NaCl 70 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, EDTA 0,5 mM, Triton X-100 1%, pH 7,4) a 4°C, conteniendo inhibidores de proteasas (DTT 1 mM, leupeptina 2 µg/ml, aprotinina 1 µg/ml, pepstatina 1 µg/ml y PMSF 0,1 mM). Las membranas resuspendidas fueron homogeneizadas utilizando una jeringa (haciendo pasar la resuspensión al menos 5 veces por una aguja 21G x 1<sup>1</sup>/<sub>2</sub>" ) y se incubaron a 4°C por 30 min repitiendo la homogenización a los 15 min. Luego se centrifugó a 1.000 x *g* por 15 min a 4°C (utilizando un rotor JA-21 en una centrífuga Beckman J2-21) y el sobrenadante obtenido se diluyó en igual volumen de sacarosa 80% a 4°C conteniendo inhibidores de proteasas (volumen final 10 ml). Este volumen se dividió en dos, se colocaron 5 ml en el fondo de un tubo de centrífuga en el cual se forma un gradiente discontinuo de sacarosa colocando 20 ml de sacarosa 30% y 8 ml de sacarosa 5%, ambas soluciones a 4°C. Las soluciones de sacarosa se prepararon en buffer DRM (Tris 10 mM, NaCl 70 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, EDTA 0,5 mM, pH 7,4). A continuación el gradiente se centrifugó a 120.000 x *g* durante 20 h a 4°C (utilizando un rotor SW 28 en una ultracentrífuga Beckman Optima LK-90). Luego de la centrifugación la fracción DRM se observó como una banda visible flotando entre las soluciones de sacarosa de 5 y 30%, esta banda visible se aisló con pipeta pasteur, se lavó con buffer DRM para eliminar la sacarosa y se pelleteó centrifugando a 120.000 x *g* durante 1 h a 4°C (utilizando un rotor SW 28 en una ultracentrífuga Beckman Optima LK-90).

El pellet obtenido se resuspendió en buffer TBM (Tris 20 mM, NaCl 120 mM, KCl 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, NaHCO<sub>3</sub> 5 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,2 mM, glucosa 10 mM, pH 7,2) para realizar los ensayos enzimáticos, la determinación de proteínas, los ensayos de western blot y la caracterización lipídica. El protocolo de obtención de las DRMs se esquematiza en la Figura 11.



**Figura 11: Protocolo de obtención de la fracción de membrana resistente a detergentes (DRMs).**

## 5. ENSAYOS ENZIMATICOS.

### 5.1. Medición de la actividad de la PC-PLC y la PLA.

- Sustrato Utilizado: para la medición de estas actividades enzimáticas se utilizó como sustrato radiactivo 1-[<sup>14</sup>C] palmitoil-2-[<sup>14</sup>C] palmitoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (dipalmitoil fosfatidilcolina [<sup>14</sup>C]-DPPC) (111 mCi/mmol), New England Nuclear-Dupont, Boston, MA, USA.
- Ensayo enzimático: la hidrólisis de la PC catalizada por las enzimas PC-PLC y PLA se evaluó utilizando microdispersiones formadas por [<sup>14</sup>C]-DPPC y DPPC no radiomarcada. Para la preparación de las microdispersiones el sustrato (frío y radiomarcado) se secó bajo atmósfera de N<sub>2</sub>, luego se resuspendió en un volumen adecuado de éter etílico para favorecer una dispersión homogénea del lípido y se volvió a llevar a sequedad bajo N<sub>2</sub>. A continuación se resuspendió en un medio Tris 0,1 M (pH 7,2-7,4) conteniendo 0,2% de Triton X-100 y se agitó vigorosamente utilizando vórtex durante 5 minutos. Finalmente la emulsión se sonicó durante 15 segundos (Branson digital sonifier).

Las microdispersiones lipídicas fueron preparadas de manera de lograr para cada ensayo con una concentración de 45.000 dpm y 0,125 mM de [<sup>14</sup>C]-DPPC y DPPC respectivamente, en un volumen final de reacción de 200 µl. Las membranas (Syn, SPM ó DRMs) se agregaron en 100 µl. La concentración de proteínas en el volumen final fue de 150 µg y la de Triton X-100 de 0,1%. Los tubos se incubaron en baño a 37°C por 5 o 20 min y las reacciones enzimáticas se frenaron por el agregado de 5 ml de cloroformo: metanol (C:M) (2:1, v/v). Los blancos de reacción enzimática se prepararon de la misma manera excepto que las membranas fueron hervidas por 5 minutos antes de ser usadas. Posteriormente los lípidos fueron aislados y resueltos por cromatografía en capa fina (TLC). Los resultados se expresaron como dpm de DAG x (mg proteína x 20 min)<sup>-1</sup> ó dpm DAG/ mg proteína cuando se evaluó la generación de DAG en función del tiempo.

### 5. 2. Medición de la actividad de la PLD.

- Sustrato Utilizado: se utilizó el sustrato especificado en el punto 5. 1.
- Ensayo enzimático: la actividad de la PLD se evaluó midiendo la reacción de transfosfatidilación catalizada por esta enzima. En presencia de alcoholes primarios como el etanol la PLD cataliza no solo la hidrólisis de PC a PA sino también una reacción de transfosfatidilación generando fosfatidilalcoholes, en este caso fosfatidiletanol (PEth) (Kobayashi y Kanfer, 1987; Nozawa, 2002). El ensayo enzimático se realizó de manera similar al ensayo descrito para la PC-PLC y la PLA con la única diferencia que se llevó a cabo en presencia de etanol al 2%. El alcohol fue agregado minutos antes de comenzar la reacción enzimática en el tubo de reacción, sin incubación previa. Los tubos se incubaron en baño a 37°C por 5 o 20 min y la reacción enzimática se frenó por el agregado de 5 ml de C:M (2:1, v/v). Posteriormente los lípidos fueron aislados y separados por TLC. Los resultados se expresaron como dpm PEth x (mg proteína x 20 min)<sup>-1</sup> ó dpm PEth/mg proteína cuando se evaluó la generación de PEth en función del tiempo.

### 5. 3. Medición de la actividad de la SMS.

- Sustrato utilizado: 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfo[metil-<sup>3</sup>H]colina ([<sup>3</sup>H-colina] DPPC) (43 Ci/mmol), de New England Nuclear-Dupont, Boston, MA, USA.
- Ensayo: se realizó un ensayo similar al descrito en el punto 5. 1 pero se utilizó como sustrato una microdispersión lipídica de [<sup>3</sup>H-colina] DPPC. Los tubos se incubaron en baño a 37°C por 5 o 20 min y la reacción enzimática se frenó por el agregado de 5 ml de C:M (2:1, v/v). Posteriormente los lípidos fueron aislados y separados por cromatografía en capa fina.

## 6. ENSAYOS DE WESTERN BLOT (WB).

Para los ensayos de WB las distintas fracciones de membrana (Syn y DRMs) fueron resuspendidas, se les agregó un volumen adecuado de buffer Laemmli 4X (Tris

0,25 M, SDS 8%, glicerol 40%, 2-mercaptoetanol 20%, pH 6,8) y se hirvieron durante 3 min. Luego las proteínas se resolvieron por SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio) (Laemmli, 1970) en un gel de poliacrilamida al 10%. La corrida se realizó a voltaje variable y amperaje constante de 30 mA durante aproximadamente 1 h. A continuación se transfirieron a una membrana de PVDF utilizando un Mini Trans-Blot cell electroblotter (BIO-RAD Life Science Group, California) por 1 h a 350 mA y voltaje variable. La cantidad de proteínas (en  $\mu\text{g}$ ) sembrada en el gel y el bloqueo de la membrana de PVDF variaron según el anticuerpo utilizado, lo cual se detallará para cada caso en particular en las leyendas de las figuras correspondientes. Luego de la incubación con los anticuerpos primarios y secundarios las inmunoreacciones se detectaron utilizando un ensayo de quimioluminiscencia utilizando el ECL Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare) y placas autorradiográficas (Kodak).

## 7. ANÁLISIS LIPÍDICO.

### 7.1. Extracción de los lípidos.

Para determinar la composición fosfolipídica de los Syn y de las DRMs la extracción de los lípidos de las membranas se realizó por el método descrito por Bligh y Dyer (Bligh y Dyer, 1959). Las membranas se resuspendieron en buffer y se les agregó un volumen adecuado de C:M (1:2, v/v) para llegar a la proporción cloroformo: metanol: agua (1:2:0.8, v/v), solo en los casos en que fue necesario se agregó un volumen conocido de metanol para evitar que el tejido flotara. Luego de 24 h (tiempo que dejamos transcurrir para la extracción) se agregó cloroformo y agua ultrapura para lograr la proporción cloroformo: metanol: agua (2:2:1.8, v/v), en el caso que se hubiese agregado metanol se debe reconstituir previamente la proporción (1:2:0.8, v/v). Seguidamente los tubos fueron agitados utilizando vórtex y centrifugados a  $900 \times g$  por 5 min. Luego de la centrifugación se obtuvieron dos fases, una fase superior acuosa y una fase orgánica inferior quedando las proteínas desnaturalizadas en la interfase. La fase superior y las proteínas se descartaron mientras que la fase orgánica se lavó con un

volumen igual al descartado de fase superior teórica compuesta por cloroformo: metanol: KCl 0.1 M (3:47:48, v/v). Finalmente la fase orgánica se llevó a sequedad bajo atmósfera de  $N_2$  y se resuspendió en un volumen adecuado de C:M (2:1, v/v).

Luego de realizados los ensayos enzimáticos los lípidos se extrajeron por el método de Folch (Folch y col., 1957). Las reacciones enzimáticas se frenaron por el agregado de 5,5 ml de C:M (2:1, v/v), luego se realizó una partición con 0,2 volúmenes de  $CaCl_2$  0,05% y los tubos se centrifugaron a  $900 \times g$  durante 5 min. Luego de la centrifugación se obtuvieron dos fases, la fase superior y las proteínas desnaturizadas en la interfase se descartaron. La fase orgánica se llevó a sequedad bajo atmósfera de  $N_2$  y se resuspendió en un volumen adecuado de C:M (2:1, v/v).

## *7.2. Resolución y visualización de lípidos.*

Los lípidos se separaron por cromatografía en capa fina (TLC) como se detalla a continuación y se visualizaron por la exposición de las placas a vapores de yodo. La radioactividad en las manchas de interés se determinó por centelleo líquido como se describe en el punto 8.3.

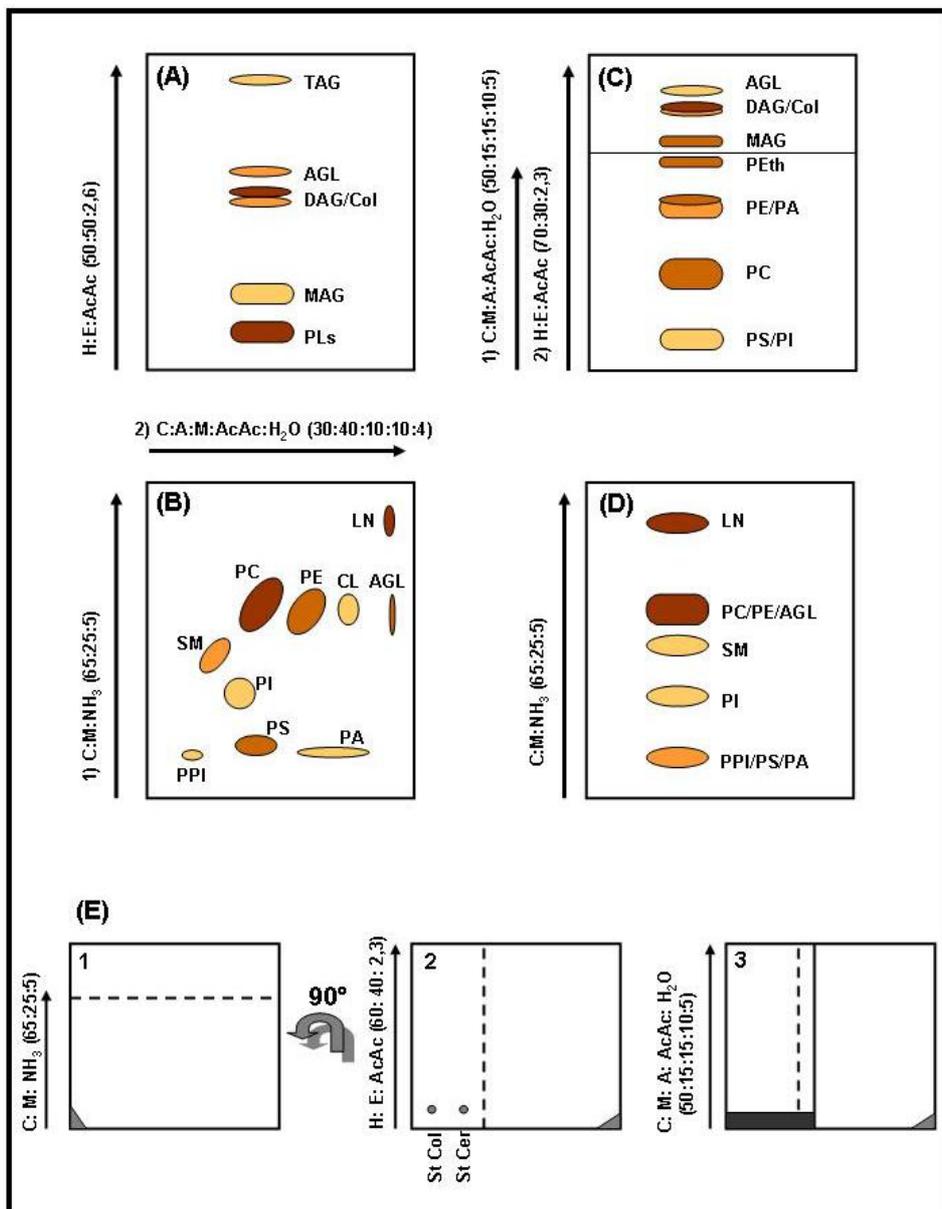
### *7.2.1. Lípidos neutros (LN).*

Para la separación de los lípidos neutros se utilizaron placas de sílica gel G (Kieselgel 60 G, Merck) previamente activadas a  $100^\circ C$  durante 50 min. El sistema de solventes utilizado fue hexano: éter etílico: ácido acético (50:50:2.6, v/v) y las placas se dejaron sobrecorrer por 5 min. Con este sistema de solventes la PC y todos los fosfolípidos quedan retenidos en el origen de siembra, las manchas correspondientes a MAG, DAG y ácidos grasos libres (AGL) se identificaron mediante la utilización de estándares. Para una mejor visualización de las manchas de las muestras se agregó una mezcla de estándares de MAG, DAG y AGL previo a la TLC. (Ver Figura 11A y Figura 12).

### 7. 2. 2. Lípidos polares.

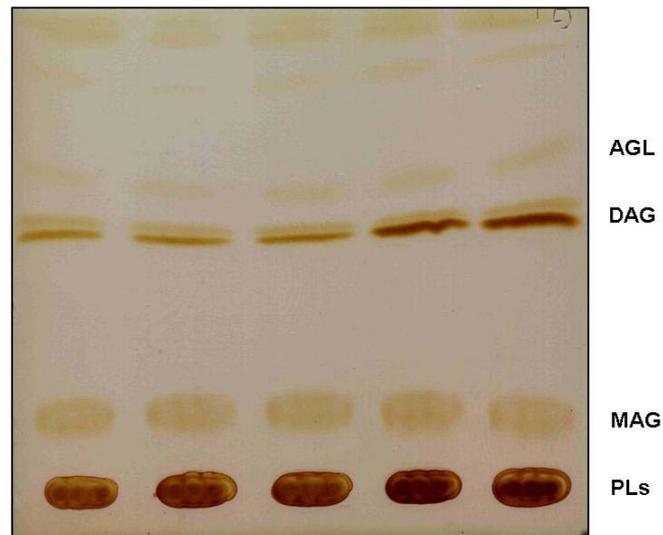
- Separación de los fosfolípidos (PLs): para la separación de los distintos fosfolípidos entre sí se utilizaron placas de sílica gel H (Kieselgel 60 H, Merck) preparadas con acetato de Mg al 3% y se realizó una cromatografía bidimensional. Las placas fueron activadas a 100°C durante 50 min. En la primera dimensión el sistema de solventes utilizado fue cloroformo: metanol: amoníaco (65:25:5, v/v) mientras que en la segunda dimensión se utilizó cloroformo: acetona: metanol: ácido acético: agua (30:40:10:10:4, v/v) (Rouser y col., 1970). La resolución de los PLs se esquematiza en la Figura 11B. Entre la primera y la segunda corrida las placas fueron secadas utilizando una corriente de aire frío.
- Separación del PEth y PA: para el aislamiento del PEth se utilizaron también placas de sílica gel H. En primer lugar se utilizó el sistema de solventes descrito por Kobayashi (Kobayashi y Kanfer, 1987) compuesto por cloroformo: metanol: acetona: ácido acético: agua (50:15:15:10:5, v/v), con este sistema se desarrollaron las placas hasta un 75% de su altura total. A continuación las placas se recromatografiaron con hexano: éter etílico: ácido acético (70:30:2.3, v/v). Las manchas correspondientes a PEth y PA se identificaron mediante la siembra de estándares en la placa. Para una mejor visualización de la mancha correspondiente se agregó PEth como estándar interno previamente a realizar la TLC (Figura 11C).
- Separación de la esfingomielina (SM): para resolver SM del resto de los PL se utilizaron placas de sílica gel H y el sistema de solventes cloroformo: metanol: amoníaco (65:25:5, v/v). Las manchas correspondientes a SM se identificaron mediante la utilización de un estándar de SM (Figura 11D).
- El sistema de solventes utilizado en la primera dimensión de la resolución de los fosfolípidos, cloroformo: metanol: amoníaco (65:25:5, v/v), no resuelve los lípidos neutros entre sí los cuales migran con el frente del solvente. Es por ello que, previamente al segundo sistema de solventes utilizado para la resolución de los fosfolípidos, se pueden resolver los lípidos neutros utilizando una mezcla de solventes

más apolares, la cual no va a afectar la resolución de los fosfolípidos. Para ello se corrió el primer sistema de solventes hasta un 75% del largo total de la placa, luego la placa se giró 90°, se sembraron estándares (st) de Cer y Col y se corrió el sistema de solventes hexano: éter etílico: ácido acético (60: 40: 2,3, v/v). Seguidamente se retiró una fracción de sílica y se dividió en dos la placa, para evitar que el tercer sistema de solventes (cloroformo: metanol: acetona: ácido acético: H<sub>2</sub>O, 50:15:15:10:5, v/v) arrastre los lípidos neutros ya resueltos (Ver Figura 12 E). Este sistema fue previamente descrito por Martin y colaboradores (Martin y col., 2005).



**Figura 12: Esquema de la resolución de los lípidos neutros y polares por TLC.**

(C: cloroformo, M: metanol, AcAc: ácido acético, A: acetona, E: éter etílico, H: hexano)



**Figura 13: Fotografía de una placa de TLC para la resolución monodimensional de lípidos neutros.** El sistema de solventes utilizado fue H:E:AcAc (50:50:2,6).

### 7.3. Determinación del colesterol

La determinación de colesterol (total: libre más esterificado) en los extractos lipídicos de Syn y DRMs se realizó utilizando el kit Colestat enzimático AA (laboratorios Wiener, Rosario, Argentina). Este método enzimático se basa en una serie de reacciones enzimáticas:

- a) la enzima colesterol esterasa hidroliza los ésteres de colesterol generando colesterol más AGL.
- b) la enzima colesterol oxidasa oxida el colesterol a colesteno-3-ona más  $H_2O_2$ .
- c) el  $H_2O_2$  más la 4-aminofenazona más un aceptor por la acción de una peroxidasa forman una quinonimina roja la cual se determina a 505 nm.

Se tomaron alícuotas de los extractos lipídicos (5  $\mu$ g Pi) y se llevaron a sequedad bajo  $N_2$ . Luego se agregaron 100  $\mu$ l de alcohol isopropílico y se agitaron vigorosamente con vórtex durante 10 min, a partir de esta extracción se siguieron las instrucciones del fabricante.

## 8. METODOS ANALÍTICOS.

### 8. 1. Determinación del fósforo fosfolípídico.

La determinación de fósforo fosfolípídico se realizó por el método descrito por Rouser (Rouser y col., 1970). Se tomaron alícuotas de los extractos lipídicos y también se realizó la determinación en las manchas correspondientes a los distintos fosfolípidos aislados por TLC. Este método se basa en la medición del fosfato inorgánico que se libera por digestión de la materia orgánica (fosfolípidos) en presencia de ácido perclórico. Por la adición de molibdato de amonio se forma fosfomolibdato de amonio y éste es reducido por el ácido ascórbico a una mezcla de óxidos de molibdato de valencia menor a 7 que poseen un color estable azul, el cual se determina espectrofotométricamente a 800 nm. El color se desarrolla calentando las muestras con los reactivos durante 5 min en baño de agua hirviente. Los valores de absorbancia se leyeron contra el blanco de reacción y los  $\mu\text{g}$  de fósforo inorgánico (Pi) se calcularon mediante la realización de una curva estándar utilizando un estándar de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

### 8. 2. Determinación de proteínas.

La cuantificación de proteínas se llevó a cabo empleando el kit RC DC protein assay (Bio-Rad) el cual está basado en el método de Lowry (Lowry y col., 1951). Las proteínas fueron solubilizadas en dodecilsulfato de sodio (SDS) 10% (concentración final de SDS 5%, compatible con el método) y se siguieron las instrucciones del kit. El método de Lowry es un método colorimétrico el cual consta de dos etapas: en la primera iones  $\text{Cu}^{2+}$  en medio alcalino forman un complejo con el nitrógeno de los enlaces peptídicos, estos complejos  $\text{Cu}^{2+}$ -proteína tiene un color azul claro y provocan el desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína exponiendo los residuos fenólicos de las tirosinas y los triptofanos. En la segunda etapa de la reacción el reactivo de Folin-Ciocalteau (ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo) es reducido por los grupos fenólicos dando un color azul intenso. Luego de 15 min a temperatura ambiente

se realizaron las lecturas de absorbancia a 750 nm. Paralelamente se realizó una curva de calibrado utilizando como estándar seroalbúmina bovina (BSA) 2 mg/ml.

### 8.3. Medición de la radioactividad por centelleo líquido.

Las manchas correspondientes a los lípidos de interés resueltos por TLC se rasparon y transfirieron a viales donde se agregaron 300 µl de agua con el fin de desactivar la sílica. A continuación se agregaron 5,5 ml de líquido de centelleo formado por Preblended dry fluor 2a70 4% (98% PPO y 2% bis-MSB, Research Products International Corp. USA) en tolueno: Triton X-100 (4:1, v/v). La determinación de radioactividad se realizó con un contador de centelleo líquido Wallak Oy, modelo 1214 Rackbeta.

## 9. CARACTERIZACION Y DETERMINACION DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS DE LA PC-PLC EN LOS SYN DE CC.

### 9.1. Efecto de agentes tensioactivos sobre la generación del DAG.

Cuando se evaluó el efecto de detergentes en la generación de DAG a partir de PC, los Syn fueron resuspendidos en un buffer Tris 0,1 M (pH 7,4) y se prepararon microdispersiones lipídicas con diferentes concentraciones de Triton X-100 o Deoxicolato de sodio (DOC). En el volumen final de reacción las concentraciones finales de detergentes utilizadas fueron las siguientes: Triton X-100 (0,05; 0,075; 0,1 y 0,5%) y DOC (0,05 y 0,1%). El resto de las condiciones de ensayo fueron iguales a las descritas en el punto 5. 1. (45.000 dpm y 0,125 mM de DPPC y 150 µg de proteínas). Los tubos se incubaron a 37°C por 20 min y la reacción enzimática se frenó por el agregado de 5 ml de C:M (2:1, v/v). Como control se preparó una microdispersión del sustrato en ausencia de detergente. Este fue el único caso en que se varió la concentración de detergente utilizada, los demás experimentos fueron realizados con Triton X-100 al 0,1%. Los resultados se expresaron como dpm DAG x (mg proteína x 20 min)<sup>-1</sup>.

### *9. 2. Determinación de la contribución de las vías PC-PLC y PLD/PAP2 a la generación de DAG en los Syn de CC.*

Para determinar la contribución de las dos principales vías enzimáticas generadoras de DAG a partir de la PC (PC-PLC y PLD/PAP2) se utilizó etanol al 2% como estrategia para desviar la generación de PA, catalizada por la PLD, a la formación de PEth. En presencia de etanol 2% se evaluó la generación de DAG y también la formación de PEth a los 5 y 20 min de reacción enzimática. También se utilizó DL-propranolol 1,5 mM como inhibidor de la PAP2, para ello los Syn se preincubaron 20 min a 4°C en presencia de dicho inhibidor.

Con el fin de corroborar el aporte de la PC-PLC se utilizó el compuesto D609 (Sigma-Aldrich) como inhibidor de la vía. Los Syn fueron preincubados a 4°C por 20 min con concentraciones crecientes de D609 (50, 200, 300 y 500 µg/ml) antes de iniciar la reacción enzimática.

### *9. 3. Efecto de los iones $Ca^{2+}$ y $Mg^{2+}$ sobre la generación de DAG.*

Cuando se evaluó el efecto de los cationes divalentes calcio y magnesio en la generación de DAG los Syn fueron resuspendidos en el buffer Tris 0,1 M (pH 7,4) y se prepararon soluciones madres de  $CaCl_2$  (20 mM) y  $MgCl_2$  (10 mM). De dichas soluciones madre se agregó un volumen adecuado para lograr una concentración de  $Ca^{2+}$  2 mM y  $Mg^{2+}$  1 mM en el volumen final de reacción (200 µl). También se realizó una condición en la cual se agregó EDTA en una concentración de 5 mM, este compuesto actúa como quelante del calcio y magnesio. Una cuarta condición ensayada consistió en el agregado de  $Mg^{2+}$  1 mM y ATP 250 µM, en estas condiciones se favorece la actividad de proteínas quinasas. La reacción enzimática se llevó a cabo durante 20 min a 37°C y los resultados fueron comparados con la condición basal, es decir con concentraciones endógenas de calcio, magnesio y ATP.

#### 9. 4. Determinación de los parámetros cinéticos $K_M$ y $V_{m\acute{a}x}$ de la PC-PLC.

Para determinar los parámetros cinéticos los Syn fueron resuspendidos en buffer Tris 0,1 M (pH 7,4). Se prepararon 8 microdispersiones distintas para lograr en el volumen final de ensayo de 200  $\mu$ l (100  $\mu$ l de membrana + 100  $\mu$ l de microdispersión) concentraciones finales de DPPC de 50, 75, 125, 200, 300, 500, 700 y 900  $\mu$ M. En estos experimentos se utilizaron 150.000 dpm de [ $^{14}$ C]-DPPC por ensayo, Triton X-100 0,1% y etanol 2% para evitar la generación de DAG por la vía PLD/PAP2. Los parámetros  $K_M$  y  $V_{m\acute{a}x}$  se determinaron utilizando el gráfico de Lineweaver-Burk y los resultados fueron expresados en  $\mu$ M y nmoles DAG x (mg proteína x h) $^{-1}$ , respectivamente.

#### 9. 5. Determinación de la PC-PLC por WB.

En la detección de la PC-PLC sinaptosomal por WB se sembraron 60  $\mu$ g de proteínas de Syn de ratas adultas y seniles. Las membranas de PVDF se bloquearon por 2 h a temperatura ambiente utilizando leche descremada al 5% en buffer TBS-T (Tris 20 mM pH 7,5, NaCl 150 Mm, Tween-20 0,1%). Se utilizó como anticuerpo primario un suero policlonal de conejo dirigido contra la PC-PLC de *Bacillus cereus* obtenido en conejos (Rabbit) en una concentración 1:100 en leche descremada al 5% en TBS-T durante 18 h (overnight) a 4°C. Este anticuerpo fue gentil y desinteresadamente donado por el Dr. Howard Goldfine de la Universidad de Pensilvania, Filadelfia, USA. A continuación se incubó con el anticuerpo secundario anti-rabbit conjugado con una peroxidasa (HRP) (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz, CA, USA) por 2 h a temperatura ambiente en una concentración de 1:1.000 en leche descremada al 5% en TBS-T. Como control positivo para el anticuerpo se utilizó la proteína bacteriana.

#### 9. 6. Localización de la actividad PC-PLC en la fracción SPM.

Con el objetivo de determinar la localización de la actividad PC-PLC se evaluó la generación de DAG a partir de PC en las fracciones SPM y soluble de los sinaptosomas de CC. El ensayo enzimático se realizó como se describió en el punto 5. 1. y las fracciones

SPM y Sol fueron utilizadas como fuente enzimática. El tiempo de reacción enzimática fue de 20 min a 37°C y los resultados se compararon con la generación de DAG obtenida en Syn íntegros.

En la fracción SPM se utilizó etanol 2% como estrategia para desviar la generación de DAG proveniente de la vía PLD/PAP2 y también se evaluó el efecto del inhibidor de la DAGL, RHC80267 30  $\mu$ M (Pasquare y col., 2006). La madre de RHC80267 se preparó en dimetilsulfóxido (DMSO) por lo cual se realizó un control con DMSO en la concentración final obtenida en el ensayo con RHC80267 (0,01%). Los inhibidores utilizados fueron adquiridos en Sigma-Aldrich.

### *9. 7. Caracterización de las DRMs.*

#### *9. 7. 1. Caracterización lipídica.*

En las DRMs se determinó el contenido de SM, PC, PE, PS, PI y colesterol. Para ello los distintos fosfolípidos fueron resueltos por TLC y se cuantificó el fósforo fosfolipídico (ver puntos 7. 2. 2 y 8.1 de esta sección). El colesterol se determinó como se detalló en el punto 7. 3.

#### *9. 7. 2. Determinación del perfil proteico.*

Para observar el perfil proteico se resolvieron 25  $\mu$ g de proteínas provenientes de Syn y de DRMs por SDS-PAGE tal como se describió en el punto 6. A continuación, para visualizar las bandas proteicas, el gel se tiñó utilizando una solución del colorante Coomassie Brilliant Blue y se secó utilizando un secador de geles modelo 583 de Bio Rad.

Por la técnica de WB se estudió la presencia de caveolina, c-Src y PLD1, tanto en la fracción DRM como en los Syn. Para ello se utilizaron los siguientes anticuerpos: anti-caveolina (policlonal de conejo, BD Biosciences); anti-c-Src (monoclonal de ratón, Santa Cruz Biotechnology) y anti-PLD1 (policlonal de conejo, Cell Signaling). Las condiciones

en las cuales se determinó la presencia de cada una de estas proteínas se detallan en la leyenda de las figuras correspondientes.

*9. 7. 3. Determinación del gangliósido GM1 y de la PC-PLC por la técnica de Slot blot.*

Se transfirieron 3 µg de proteínas de los Syn y las DRMs a una membrana de nitrocelulosa por la técnica de Slot blot utilizando el equipo Bio-Dot SF (Bio-Rad). Para determinar la presencia de GM1 las membranas se incubaron con la subunidad B de la toxina colérica conjugada a la peroxidada (CTB-HRP) (Sigma-Aldrich) por 1 h a temperatura ambiente en una dilución 1:30.000 en buffer TBS-BSA 0,1%. La unión específica toxina-GM1 se evidenció utilizando el reactivo ECL Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare) y placas autorradiográficas (Kodak). Para determinar la presencia de la PC-PLC las membranas fueron incubadas en las condiciones descritas en el punto 9. 5.

*9. 7. 4. Medición de la generación de DAG en las DRMs.*

Para evaluar la hidrólisis de PC las DRMs fueron resuspendidas en buffer TBM en un volumen adecuado para lograr una concentración de 1,5 mg proteínas/ml. La generación de DAG a partir de PC se evaluó en la fracción DRM tal como se describió en el punto 5. 1. con la única diferencia que el total de dpm por ensayo fue de 120.000. La generación de DAG se midió en ausencia y en presencia de etanol 2%.

*9. 8. Premarcación de los fosfolípidos y los lípidos neutros en los Syn.*

Los Syn correspondientes a media corteza cerebral fueron incubados por 1 h a 37°C con 30 µCi de [<sup>3</sup>H]-glicerol o 10 µCi de [<sup>3</sup>H]-ácido araquidónico ([<sup>3</sup>H]-AA) en 1 ml de medio HBM (HEPES 20 mM pH 7,4, NaCl 120 mM; KCl 5 mM, NaHCO<sub>3</sub> 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,2 mM, glucosa 10 mM). El [<sup>3</sup>H]-ácido araquidónico se vehiculizó en BSA

libre de ácidos grasos al 0,1%. Luego de la incubación los Syn se centrifugaron a 33.000 x g por 20 min a 4°C y se realizó la extracción de los lípidos con 15 ml de C:M (2:1, v/v).

El extracto lipídico de los Syn incubados con [<sup>3</sup>H]-glicerol se particionó con 0,2 volúmenes de KCl 0,1 M conteniendo glicerol 0,1% y se realizaron 4 lavados del extracto con C: M: KCl 0,1 M-glicerol 0,1% (3:47:48, v/v). El extracto de los Syn incubados con [<sup>3</sup>H]-ácido araquidónico se particionó con 0,2 volúmenes de KCl 0,1 M y se realizaron 4 lavados con C: M: KCl 0,1 M (3:47:48, v/v). Finalmente los lípidos neutros y los distintos fosfolípidos (correspondientes a 20 µg de fósforo fosfolipídico u 800 µg de proteínas) se resolvieron tal como se detalló en los puntos 7.2.1 y 7.2.2 y se cuantificó la radioactividad incorporada en cada lípido como se describió en el punto 8.3.

## 10. MODELO DE ESTRÉS OXIDATIVO.

### 10. 1. Incubación de los sinaptosomas y evaluación de la hidrólisis de la PC bajo condiciones de estrés oxidativo.

Los sinaptosomas obtenidos de ratas adultas fueron resuspendidos en el medio TBM en un volumen adecuado para lograr una concentración de 1,5 mg proteínas/ml. Los Syn fueron sometidos a estrés oxidativo mediante la preincubación con FeSO<sub>4</sub> 50 µM por 5, 30 y 60 min a 37°C bajo una atmósfera de composición O<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> (95:5, v/v). Paralelamente se realizó la incubación de Syn con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM por 5, 60 y 120 min.

Luego de esta preincubación se evaluó la hidrólisis de PC en 20 min a 37°C como se describió en los puntos 5.1 y 5.2. Los resultados se compararon con la condición control en la cual se agregó agua ultrapura en lugar de Fe<sup>2+</sup> ó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Las soluciones madres de hierro y de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fueron preparadas inmediatamente antes de usar en H<sub>2</sub>O ultrapura. De la madre de Fe<sup>2+</sup> (10 mM) se prepararon submadres tal que el volumen a agregar fuera igual al 5% del volumen final de incubación. Las submadres de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se prepararon a partir de una solución de 10 volúmenes la cual fue abierta inmediatamente antes de usar, también en este caso el volumen a agregar fue del 5% del volumen final.

## 10. 2. Evaluación del efecto deletéreo del $Fe^{2+}$ .

### 10. 2. 1. Medición de la peroxidación lipídica.

- Método espectrofotométrico: La peroxidación lipídica inducida por el hierro se evaluó midiendo la generación de sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) según el protocolo descrito por Adamczyk y colaboradores (Adamczyk y col., 2006). Luego de la incubación de los sinaptosomas (1,5 mg proteína/ml) por 5, 30 y 60 min en presencia de  $Fe^{2+}$  (50  $\mu$ M) o de vehículo, se tomaron alícuotas de 0,5 ml y se les agregó 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) 30%. A continuación se agregó 0,1 ml de HCl 5N y 1 ml de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,75% (preparado en agua ultrapura). Los tubos se taparon y se llevaron a un baño de agua hirviente por 15 min. Finalmente las muestras se centrifugaron a 1.000 x g por 10 min y se leyó la absorbancia de los sobrenadantes a 535 nm en espectrofotómetro. También se evaluó la generación de TBARS en las condiciones D609 (250  $\mu$ g/ml),  $Fe^{2+}$  (50  $\mu$ M) más D609 (250  $\mu$ g/ml) y  $H_2O_2$  (1 mM). Los resultados se expresaron como unidades de absorbancia a 535 nm por mg de proteína (Abs 535 nm (U arbitrarias)/mg proteína) y se compararon con los obtenidos en la condición control.
- Método fluorimétrico: paralelamente se evaluó la generación de TBARS por el método descrito por Keller (Keller y col., 1996). Luego de la incubación de los sinaptosomas (1,5 mg proteína/ml) por 5, 30 y 60 min en las condiciones descritas para el método espectrofotométrico se tomaron alícuotas de 0,5 ml y se les agregó 0,5 ml de ácido tricloroacético (TCA) 10%. A continuación se agregó 0,25 ml de TBA 0,335% preparado en ácido acético: agua (1:1, v/v). Los tubos se taparon y se llevaron a baño de agua hirviente por 30 min, una vez enfriados se les agregó 1 ml de butanol y se centrifugaron a 1.000 x g durante 5 min. La fase superior orgánica se trasvasó a otro tubo y se leyó la fluorescencia mediante la utilización de un fluorímetro excitando a 518 nm y midiendo la emisión a 588 nm. Los resultados se expresaron como Unidades de fluorescencia/mg proteína.

### 10. 2. 2. Evaluación de la función mitocondrial.

La función mitocondrial se evaluó midiendo la reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) a cristales de formazán, la cual depende de la actividad de las deshidrogenadas mitocondriales. La reducción del MTT se evaluó en sinaptosomas incubados por 5 y 60 min en la condición control y en presencia de  $\text{Fe}^{2+}$  50  $\mu\text{M}$ . También se evaluó el efecto del D609 (250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y del etanol (2%) en la viabilidad mitocondrial en sinaptosomas incubados en la condición control y en sinaptosomas sometidos al estrés oxidativo.

El MTT se disolvió en buffer fosfato salino (PBS) estéril en una concentración de 5 mg/ml, a 10  $\mu\text{l}$  de esta solución se agregaron 100  $\mu\text{l}$  de Syn y se incubaron por 2 h a 37°C en oscuridad. Luego de la incubación se agregaron 200  $\mu\text{l}$  de SDS 20% (pH 4,7) y se mezcló vigorosamente para disolver los cristales de formazán. El grado de reducción del MTT se midió espectrofotométricamente a 570 nm restando el valor de absorbancia a 650 nm. Los resultados se expresaron como unidades arbitrarias y se compararon con los valores obtenidos en la condición control.

### 10. 2. 3. Evaluación de la integridad de la membrana sinaptosomal. Ensayo de liberación de la enzima lactato deshidrogenasa.

El daño producido en la membrana plasmática sinaptosomal por la injuria oxidativa se evaluó midiendo la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) al medio de incubación. Así mismo se evaluó el efecto de la coincubación del vehículo o del  $\text{Fe}^{2+}$  (50  $\mu\text{M}$ ) con D609 (250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y con etanol (2%). Luego de la incubación por 5 o 60 min en las condiciones previamente descritas los Syn se centrifugaron a 33.000 g por 20 min a 4°C y se determinó la actividad LDH en el sobrenadante.

La determinación de la actividad de la LDH se evaluó espectrofotométricamente utilizando el kit LDH-P UV AA (laboratorios Wiener), este método cinético se basa en medir a 340 nm la conversión del dinucleótido nicotinamida adenina reducido (NADH) a la forma oxidada ( $\text{NAD}^+$ ). Los resultados se expresaron como unidades por litro (U/L).

### 10. 3. Evaluación del rol de las vías metabolizadoras del DAG.

Para evaluar el rol de las vías metabolizadoras de DAG las incubaciones con  $\text{Fe}^{2+}$  50  $\mu\text{M}$  o con el vehículo se llevaron a cabo en presencia de inhibidores de distintas vías metabólicas. Se utilizó el inhibidor de la DAGL RHC80267 (30  $\mu\text{M}$ ), el inhibidor de la DAGK R59022 (20  $\mu\text{M}$ ) y el inhibidor de la  $\text{PIP}_2$ -PLC U73122 (10  $\mu\text{M}$ ). Las concentraciones utilizadas fueron previamente chequeadas en nuestro laboratorio y todos los inhibidores utilizados fueron adquiridos en Sigma-Aldrich.

### 10. 4. Evaluación del rol de las PKCs.

Para evaluar el rol de las PKCs los Syn fueron preincubados por 10 min a 37°C con PMA (forbol 12-miristato 13-acetato) 1  $\mu\text{M}$  (análogo no hidrolizable del DAG y activador de PKC) y con distintos inhibidores de PKC: staurosporina 100 nM, bisindolilmaleimida (BIM) 10  $\mu\text{M}$  y queleritrina 5  $\mu\text{M}$ . Luego de esta preincubación los Syn fueron incubados con  $\text{Fe}^{2+}$  50  $\mu\text{M}$  o con el vehículo por 5 y 60 min.

### 10. 5. Evaluación del rol de la vía de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K).

Con el objetivo de estudiar la interrelación entre la vía PI3K y las vías metabolizadoras de PC los sinaptosomas se incubaron por 5 min con  $\text{Fe}^{2+}$  50  $\mu\text{M}$  o con el vehículo en presencia del inhibidor de la PI3K, LY294002 (10  $\mu\text{M}$ ).

### 10. 6. Inhibición de tirosinas quinasas.

Para evaluar el efecto de la fosforilación en tirosinas en la hidrólisis de la PC las incubaciones en la condición control y experimental se llevaron a cabo en presencia de dos inhibidores de tirosinas quinasas. Los Syn en presencia de  $\text{Fe}^{2+}$  o vehículo se co-incubaron con genisteína (100  $\mu\text{M}$ ) por 5 y 60 min. También se evaluó el efecto de la coincubación con herbimicina A (10  $\mu\text{M}$ ) por 60 min.

10. 7. Efecto de la injuria oxidativa en la hidrólisis de la PC en los Syn de ratas seniles.

El efecto de la injuria oxidativa en la hidrólisis de la PC también se evaluó en los sinaptosomas obtenidos de la corteza cerebral de ratas seniles. Las incubaciones de los Syn se realizaron como se describió en el punto 10. 1. Las actividades PC-PLC, PLD y PLA se evaluaron como se describió en los puntos 5. 1 y 5. 2 y la generación de TBARS se realizó como se detalló en el punto 10. 2. 1. Los resultados se compararon con los obtenidos en los sinaptosomas de la corteza cerebral de ratas adultas.

## 11. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.

La significatividad de los datos obtenidos se analizó utilizando el test *t* de Student o ANOVA según correspondiera. Valores de *p* menores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos. Cada experimento se repitió un mínimo de tres veces utilizando un pool de al menos tres animales, realizándose las determinaciones por duplicado en cada ocasión. Los datos graficados corresponden a la media ± SD de seis muestras (\*\**p* < 0,001; \*\**p* < 0,01; \**p* < 0,05).

CAPÍTULO I:  
"CARACTERIZACIÓN DE LA  
PC-PLC EN LAS TERMINALES SINÁPTICAS DE LA  
CORTEZA CEREBRAL DE RATA".

## RESULTADOS

En la primera etapa de trabajo de esta tesis doctoral estudiamos por primera vez la presencia de la PC-PLC en los sinaptosomas de la corteza cerebral de rata y realizamos la caracterización de esta actividad enzimática. Los sinaptosomas o terminales sinápticas (obtenidos como se describió en la sección Materiales y Métodos) contienen mitocondrias y pueden mantenerse metabólicamente activos por seis horas luego de su obtención, dependiendo de las condiciones de incubación.

Con el fin de hallar las condiciones óptimas para ensayar la actividad de la PC-PLC se midió la generación de [ $^{14}\text{C}$ ]-DAG a partir de la [ $^{14}\text{C}$ ]-DPPC en función del tiempo, en presencia de distintas concentraciones de agentes tensioactivos (deoxicolato de sodio y Triton X-100) y se estudió el efecto de los cationes divalentes  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ . Asimismo, se estudió el aporte porcentual de la actividad de la PC-PLC a la generación de DAG en las terminales sinápticas de la corteza cerebral, discriminándose entre el DAG proveniente de la vía PLC de aquel generado por la vía de la PLD, y se describieron los parámetros cinéticos  $K_M$  y  $V_{m\acute{a}x}$  para la PC-PLC.

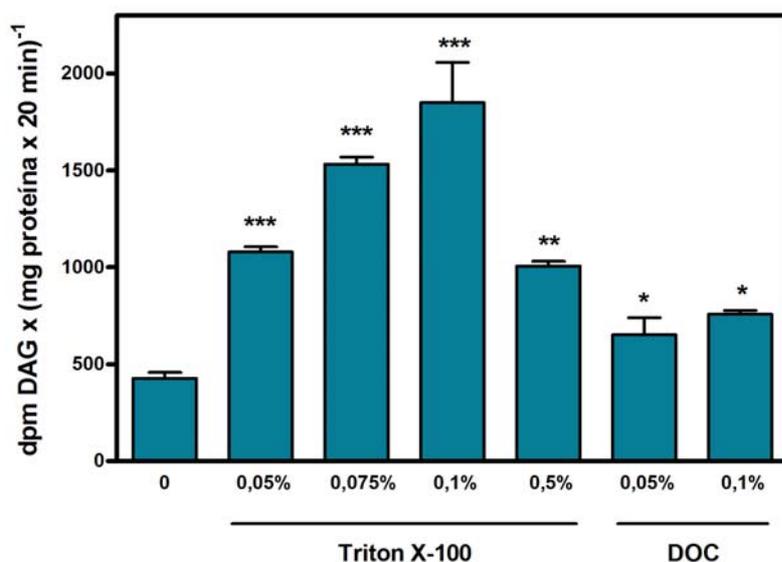
Se estudió también la localización de esta fosfolipasa en la membrana plasmática sinaptosomal y en dominios especializados de la membrana.

### 1.1. EFECTO DE LOS AGENTES TENSIOACTIVOS EN LA GENERACIÓN DE DAG A PARTIR DE LA PC.

Diversos detergentes se han utilizado para evaluar la actividad de las fosfolipasas debido a que pueden favorecer la accesibilidad al sustrato y aumentar la disponibilidad de los sitios activos de la enzima, favoreciendo la medición de estas actividades enzimáticas.

La generación de DAG a partir de la PC se estudió en presencia de distintas concentraciones del detergente no iónico Triton X-100 y de deoxicolato de sodio (DOC) utilizando como sustrato dipalmitoil fosfatidilcolina radiomarcada ([ $^{14}\text{C}$ ]-DPPC) y DPPC no

marcada como se describe en detalle en la sección Materiales y Métodos. El efecto de estos agentes tensioactivos en la generación de DAG se muestra en la Figura 14. Cabe señalar que previo a la realización del ensayo se evaluó la eficiencia de la incorporación de la  $[^{14}\text{C}]$ -DPPC en las microdispersiones de sustrato para cada condición, la cual fue cercana al 100% en todos los casos.



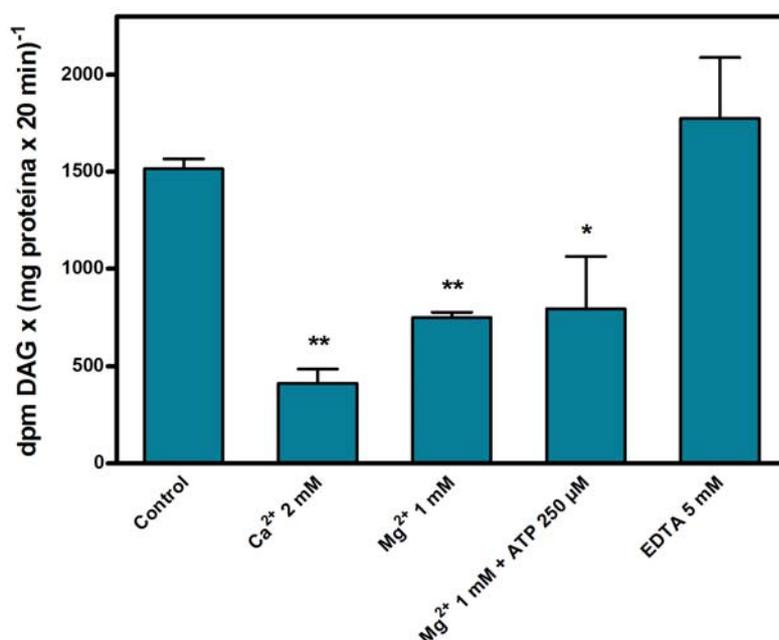
**Figura 14. Efecto de agentes tensioactivos en la generación de DAG a partir de la PC.** Los Syn (150  $\mu\text{g}$  de proteína) se incubaron en buffer Tris 0,1 M (pH 7,2-7,4) en presencia de distintas concentraciones de Triton X-100 y DOC. La reacción enzimática se llevó a cabo por 20 min a 37°C, las microdispersiones del sustrato fueron preparadas de forma tal de lograr 45.000 dpm de  $[^{14}\text{C}]$ -DPPC y 0,125 mM de DPPC por ensayo como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como dpm DAG x (mg proteína x 20 min)<sup>-1</sup> y se compararon con la condición control. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

El Triton X-100, a todas las concentraciones ensayadas, estimuló la formación de DAG con respecto a la condición control (donde se midió la formación de DAG en ausencia de detergentes). La mayor generación de DAG se produjo en presencia de Triton X-100 0,1%. A esta concentración la formación de DAG se incrementó en un 330% respecto a la condición control. Sin embargo, en presencia de la mayor concentración ensayada para este detergente (0,5%) el efecto estimulador fue menor, ya que la formación de DAG se incrementó sólo en un 135% con respecto al control.

Por su parte, el DOC en las concentraciones de 0,05 y 0,1% solo incrementó la formación de DAG en un 50 y 70% con respecto a la condición control, respectivamente. En base a estos resultados los siguientes experimentos se realizaron en presencia de Triton X-100 en una concentración de 0,1%.

## 1.2. EFECTO DE LOS IONES $Ca^{2+}$ Y $Mg^{2+}$ EN LA GENERACIÓN DEL DAG.

Para hallar las condiciones óptimas de ensayo y caracterizar la actividad de la PC-PLC se estudió el efecto de cationes divalentes sobre la generación de DAG a partir de la PC (Figura 15).



**Figura 15. Efecto de los iones  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$  en la generación de DAG a partir de la PC.** Los Syn se resuspendieron en buffer Tris 0,1 M (pH 7,2-7,4) y se evaluó la generación de DAG en presencia de los iones endógenos (condición control), de EDTA 5 mM o luego del agregado de  $Ca^{2+}$  2 mM y  $Mg^{2+}$  1 mM. La reacción enzimática se llevó a cabo durante 20 min a 37°C, en presencia de 45.000 dpm de [<sup>14</sup>C]-DPPC, 0,125 mM de DPPC y Triton X-100 0,1%. Los resultados se expresan como dpm DAG x (mg proteína x 20 min)<sup>-1</sup> y se compararon con el control. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

El agregado de  $Ca^{2+}$  2 mM al buffer de ensayo inhibió la formación de DAG en un 73% mientras que el  $Mg^{2+}$  1 mM la inhibió en un 50%. En la condición donde se agregó  $Mg^{2+}$  1 mM y ATP 250 μM (condición que favorece la actividad de proteínas quinasas) también fue inhibida la formación de DAG en un 50%. Cabe destacar que el agregado de

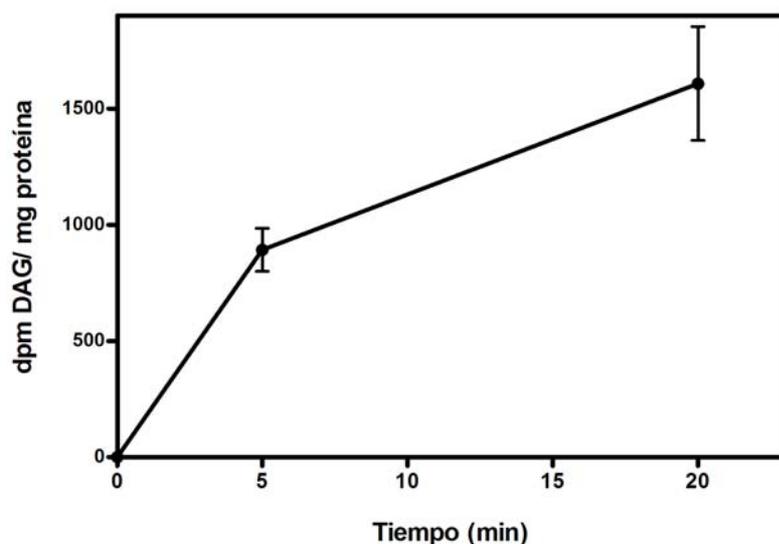
EDTA 5 mM (quelante de calcio y magnesio) no modificó la generación de DAG con respecto a la condición control.

Basándonos en los resultados obtenidos los ensayos realizados para la caracterización de la actividad de la PC-PLC fueron llevados a cabo en presencia de Triton X-100 al 0,1% y sin el agregado de cationes exógenos. Todos los ensayos fueron realizados al pH fisiológico 7,2-7,4.

### 1.3. CONTRIBUCIÓN DE LAS VÍAS DE LA PC-PLC Y DE LA PLD/PAP2 EN LA GENERACIÓN DE DAG A PARTIR DE LA PC.

#### 1.3.1. Contribución de la PC-PLC y de la PLD en sinaptosomas obtenidos de la corteza cerebral de ratas adultas.

La Figura 16 muestra la generación de DAG a partir de PC en los Syn de ratas adultas (4 meses) luego de 5 y de 20 min de incubación con el sustrato radiomarcado. La formación de DAG en 20 min de reacción enzimática fue 0,8 veces superior a la generación observada en 5 min de incubación con el sustrato radiomarcado.

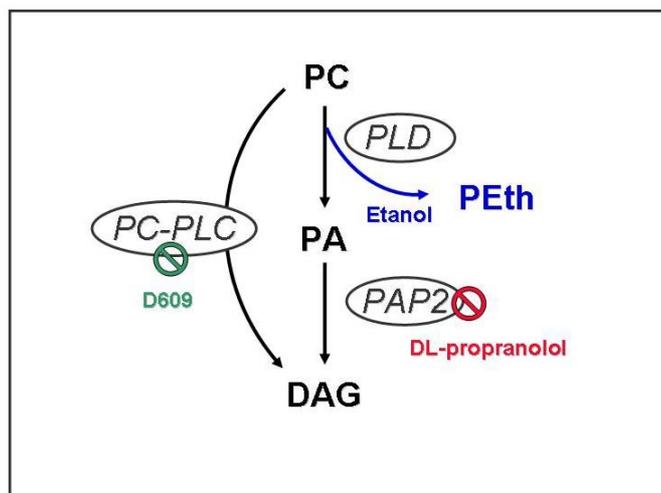


**Figura 16. Generación de DAG en función del tiempo.** Los Syn (150  $\mu$ g de proteína) se incubaron en buffer Tris 0,1 M (pH 7,2-7,4) a 37°C en presencia de 45.000 dpm de [ $^{14}$ C]-DPPC, DPPC 0,125 mM y una concentración final de Triton X-100 de 0,1%. Se evaluó la formación de [ $^{14}$ C]-DAG a los 5 y a los 20 min. Los resultados se expresan como dpm DAG/mg proteína.

Como se mencionó anteriormente, la PC de las membranas puede ser hidrolizada por la PLD generando colina y PA, el cual seguidamente puede ser desfosforilado a DAG por la acción de la PAP2. Asimismo, la acción de la PLC específica para PC también es capaz de generar DAG a partir de PC (junto con la liberación de fosfocolina). Debido a los dos posibles orígenes enzimáticos del DAG, fueron necesarias diversas estrategias experimentales para discriminar el aporte porcentual de ambas vías enzimáticas.

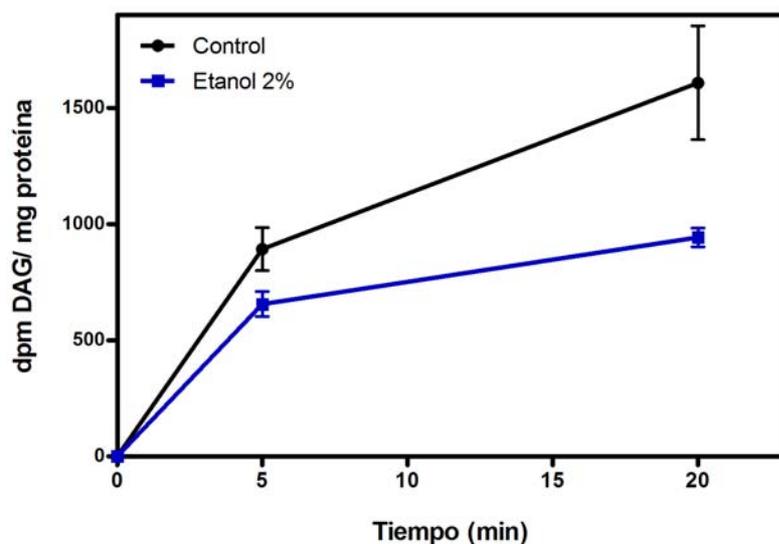
▪ *Evaluación de la reacción de transfosfatidilación catalizada por la PLD.*

En presencia de alcoholes primarios (como el etanol o el 1-butanol) la PLD no solo cataliza la hidrólisis de PC a PA sino que también cataliza una reacción de transfosfatidilación, generando fosfatidilalcoholes por esterificación del PA con dichos alcoholes (Kobayashi y Kanfer, 1987; Nozawa, 2002). Por lo tanto, cuando se incluye etanol (2%) en el ensayo enzimático la formación de PA se desvía hacia la formación de fosfatidiletanol (PEth). Dado a que el PEth no puede ser desfosforilado por la PAP2, en presencia de etanol la generación de DAG a partir de PC proviene exclusivamente de la vía de la PC-PLC (Figura 17).



**Figura 17. Inhibidores de las vías de generación de DAG a partir de PC.** El etanol desvía la formación de PA catalizada por la PLD hacia la formación de PEth, el DL-propranolol actúa como inhibidor de la PAP2 y el D609 inhibe la actividad de la PC-PLC.

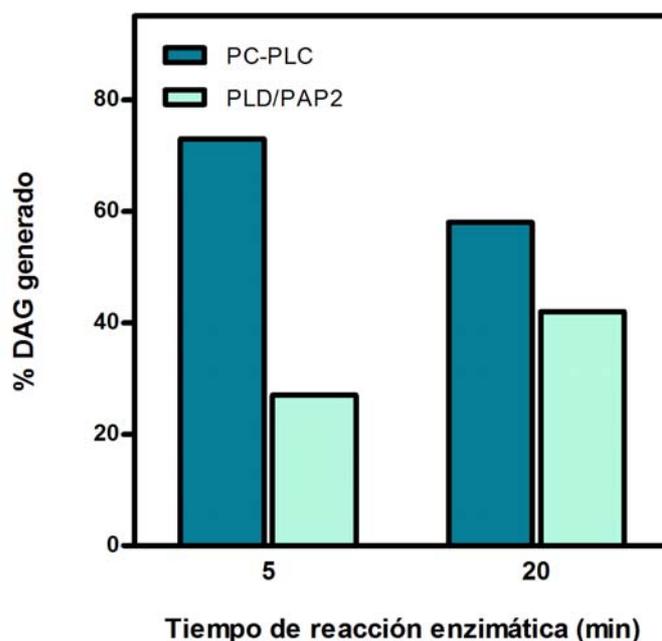
La Figura 18 muestra la formación de DAG en función del tiempo, en presencia de etanol 2% y en ausencia de dicho alcohol (condición control).



**Figura 18. Efecto del etanol en la generación de DAG a partir de la PC.** Los Syn se incubaron en las mismas condiciones descritas en la Figura 16. Se evaluó la generación de DAG en función del tiempo, en la condición control y en presencia de etanol 2%. Los resultados se

La presencia de etanol en una concentración del 2% durante la reacción enzimática inhibió la generación de DAG en un 27% a los 5 min de incubación y en un 42% a los 20 min.

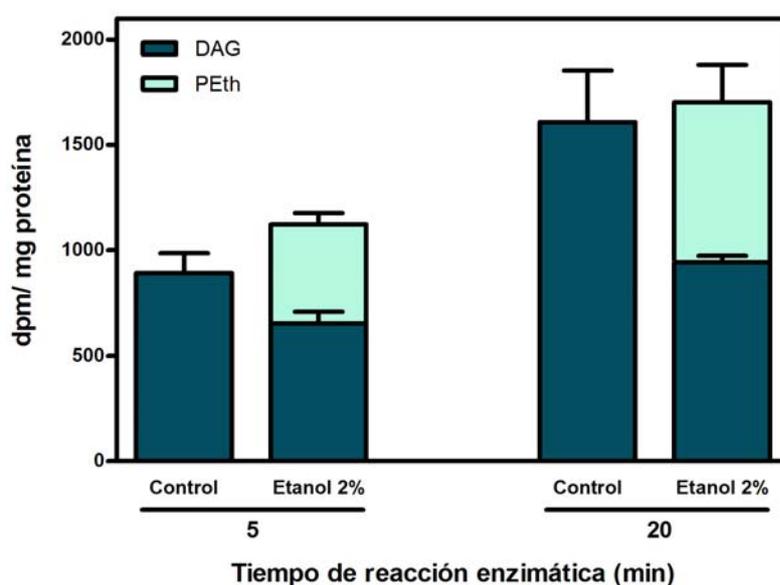
A partir de estos resultados se calculó el aporte porcentual de las vías de la PC-PLC y de la PLD/PAP2 (Figura 19).



**Figura 19. Aporte porcentual de las vías de la PC-PLC y de la PLD a la generación de DAG a partir de la PC.** En base a los resultados obtenidos en la Figura 18 se calculó el aporte porcentual de la PC-PLC y de la PLD a la generación de DAG, a los 5 y a los 20 min de reacción enzimática. Los resultados se expresan como % del DAG generado.

En 5 min de incubación el 73% del DAG provino de la vía de la PC-PLC y la vía de la PLD/PAP2 generó el 27% restante, mientras que luego de 20 min de reacción enzimática la vía de la PC-PLC generó el 58% del DAG total y la vía de la PLD el 42%.

Se evaluó también en los Syn la generación de PEth (marcador de la actividad PLD) tanto en 5 como en 20 min de incubación con el sustrato radiomarcado. La Figura 20 muestra que en presencia de etanol los niveles de DAG más PEth fueron del mismo orden que los niveles de DAG generados en la condición control, demostrando que efectivamente la formación de PA estaba siendo desviada hacia la formación de PEth.

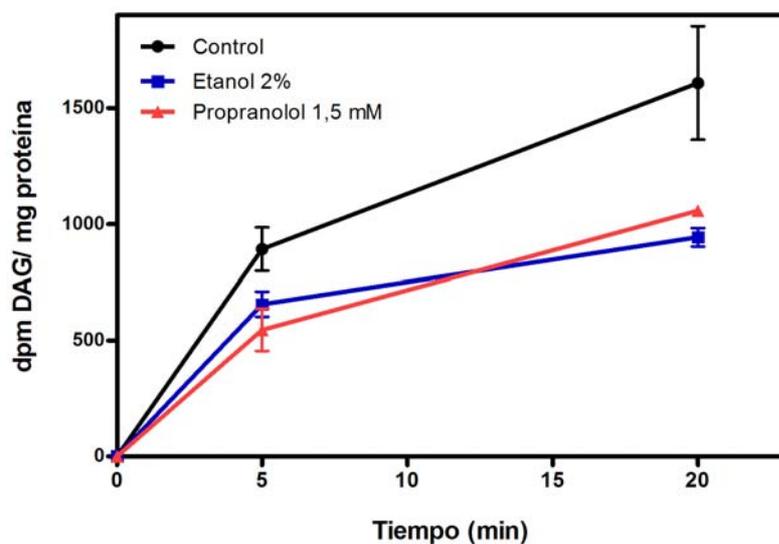


**Figura 20. Niveles de DAG y PEth generados a partir de la PC.** Los Syn se incubaron en las condiciones descritas en la Figura 18. Se evaluó la generación de DAG en la condición control y la formación de DAG más PEth en los Syn incubados en presencia de etanol 2%. Los resultados se expresan como dpm/mg proteína.

▪ **Efecto del DL-propranolol:**

El paso final en la producción de DAG por la vía de la PLD es la desfosforilación del ácido fosfatídico por la acción de la PAP2. Para estudiar el rol de la PAP2 en la generación de DAG a partir de la PC los Syn fueron preincubados con DL-propranolol. Este antagonista  $\beta$ -adrenérgico es capaz de inhibir la actividad de la PAP cuando se lo utiliza en altas dosis, independientemente de su actividad sobre los receptores  $\beta$ -

adrenérgicos (Billah y col., 1989; Meier y col., 1998; Albert y col., 2005) (Ver Figura 17).



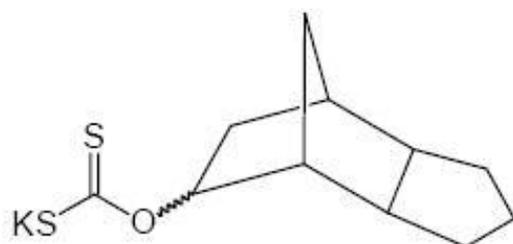
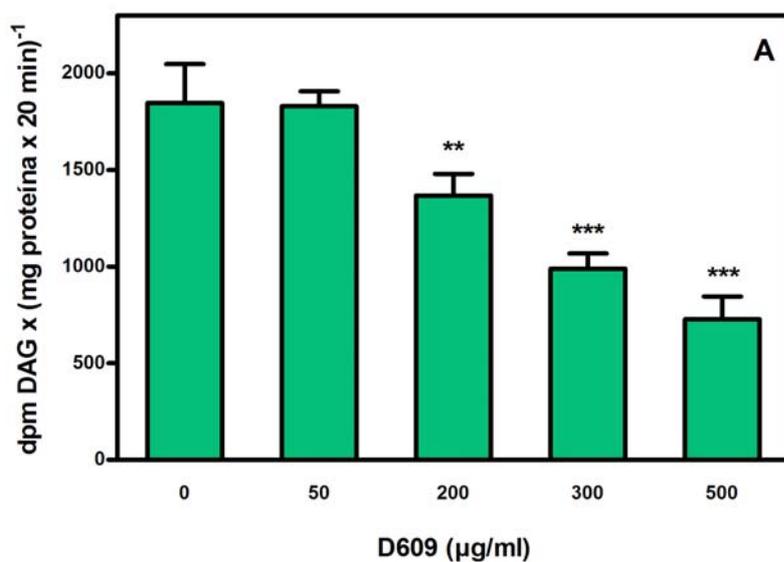
**Figura 21. Comparación del efecto del etanol y del DL-propranolol en la generación de DAG.** Los Syn se incubaron en las condiciones descritas en la Figura 16. Se evaluó la generación de DAG en función del tiempo en la condición control, en presencia de etanol 2% y de DL-propranolol 1,5 mM. Los resultados se expresan como dpm DAG/mg proteína.

El DL-propranolol (1,5 mM) inhibió la generación de DAG luego de 5 y de 20 min de incubación. Esta disminución en la generación de DAG coincidió con los niveles de DAG generados en presencia de etanol 2% (Figura 21). Los resultados obtenidos con el propranolol confirmaron el aporte porcentual de la vía PLD/PAP2 calculado en base a los resultados con etanol.

#### ▪ Efecto del D609:

Con el fin de corroborar el aporte de la vía de la PC-PLC a la generación de DAG se estudió el efecto del D609. Este compuesto (con propiedades antivirales y antitumorales) inhibe la actividad de la PC-PLC (Muller-Decker, 1989; Antony y col., 2001; Ramoni y col., 2004), más específicamente se postuló que actúa como un inhibidor competitivo de la enzima (Amtmann, 1996; Gonzalez-Roura y col., 2002) (Ver Figura 17).

Para estudiar el efecto de este inhibidor los sinaptosomas fueron preincubados 20 min a 4°C con concentraciones crecientes de D609 y luego se midió la generación de DAG a partir de la PC en 20 min de incubación con el sustrato radiomarcado a 37°C.



**Figura 22. (A) Efecto del D609 en la generación de DAG a partir de PC.** Los Syn se resuspendieron en buffer Tris 0,1 M (pH 7,2-7,4) y se preincubaron por 20 min a 4°C con concentraciones crecientes de D609. La reacción enzimática se llevó a cabo a 37°C por 20 min en las condiciones descriptas en la Figura 16. Los resultados se expresan como dpm DAG x (mg proteína x 20 min)<sup>-1</sup> y se compararon con la condición control (D609 0 µg/ µl). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . **(B) Estructura del D609.**

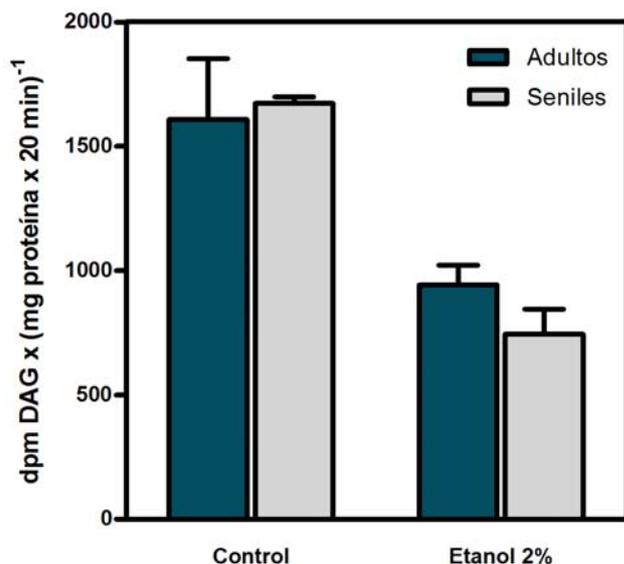
El D609 inhibió la formación de DAG en forma dependiente de la concentración: la concentración de 50  $\mu\text{g/ml}$  no ejerció efecto alguno sobre la generación de DAG con respecto al control, sin embargo, 200, 300 y 500  $\mu\text{g/ml}$  de D609 inhibieron la formación de DAG en un 26%, 46% y 61% respectivamente (Figura 22). La inhibición obtenida con la máxima concentración ensayada de D609 (61% con D609 500  $\mu\text{g/ml}$ ) coincide con el aporte de la vía de la PC-PLC calculado en base a los resultados obtenidos con etanol 2%.

▪ *Medición de la actividad de la esfingomielina sintasa (SMS):*

La SMS es una enzima involucrada en el metabolismo de la esfingomielina y la ceramida. Esta enzima transfiere el grupo fosfocolina de la PC a la ceramida generando SM y DAG (Villani y col., 2008; Dmitrieva y col., 2008). Aunque la formación de DAG por la SMS es un proceso lento, cuya cinética difiere de la generación de DAG proveniente de vías rápidas como las de la PLD y la PC-PLC, se decidió estudiar la actividad SMS en Syn debido a que esta enzima también puede ser inhibida por el D609 (Luberto y Hannun, 1998; Meng y col., 2004; Albi y col., 2008). Para este objetivo se utilizó [ $^3\text{H}$ -colina]-DPPC como sustrato radioactivo (manteniendo el resto de las condiciones de ensayo) y se midió la formación de SM radioactiva. En estas condiciones de ensayo no se observó formación de SM a partir de PC confirmando que la actividad de la SMS no contribuye a la formación de DAG a partir de la PC en nuestras condiciones experimentales.

1. 3. 2. *Actividad de las vías de la PC-PLC y de la PLD en los Syn de ratas seniles.*

La formación de DAG a partir de la PC en los Syn de ratas seniles (28 meses) se evaluó en la condición control y utilizando etanol 2%, tal como se realizó en los Syn de ratas adultas.



**Figura 23. Generación de DAG a partir de PC en los Syn de ratas seniles.** Los Syn de ratas seniles fueron incubados en las condiciones descritas en la Figura 16. Se evaluó la generación de DAG en 20 minutos de incubación, en la condición control y en presencia de etanol 2%. Los resultados se expresan como dpm DAG x (mg proteína x 20 min)<sup>-1</sup> y se compararon con los obtenidos en los Syn de ratas adultas.

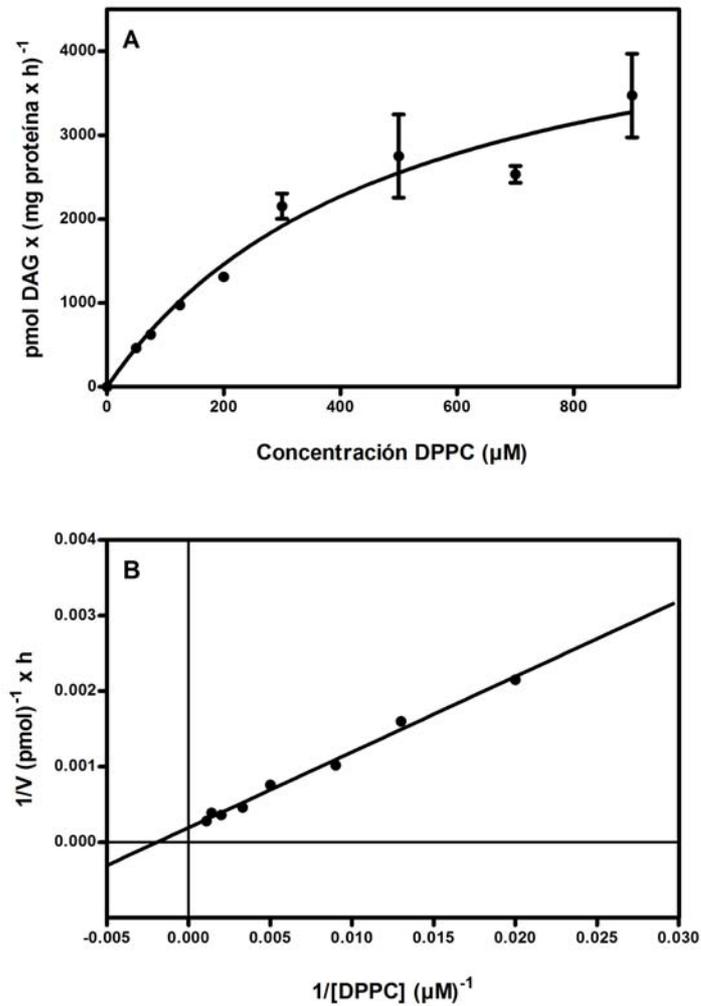
La generación de DAG a partir de PC en terminales sinápticas no se vio modificada con la edad de los animales. Tampoco se modificaron los niveles de DAG generados en presencia de etanol 2% indicando que el envejecimiento no modifica significativamente la actividad de las vías de la PC-PLC y de la PLD, con respecto a lo observado en animales adultos en nuestro modelo experimental (Figura 23).

#### 1.4. DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS $K_M$ Y $V_{m\acute{a}x}$ DE LA PC-PLC.

Para determinar los parámetros cinéticos  $K_M$  y  $V_{m\acute{a}x}$  (constante aparente de Michaelis-Menten y velocidad máxima) de la PC-PLC se midió la hidrólisis de PC en presencia de etanol 2% y concentraciones crecientes del sustrato exógeno DPPC (50, 75, 125, 200, 300, 500, 700 y 900  $\mu\text{M}$ ).

La generación de DAG se incrementó en forma lineal hasta una concentración de 200  $\mu\text{M}$  de DPPC, a concentraciones superiores la actividad de la PC-PLC mostró un comportamiento de saturación (Figura 24A).

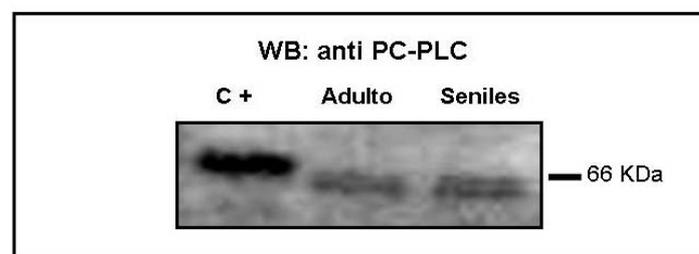
Para calcular los parámetros  $K_M$  y  $V_{m\acute{a}x}$  se realizó el gráfico de Lineweaver-Burk, y se pudo determinar que bajo nuestras condiciones experimentales la  $K_M$  de la PC-PLC es de 350  $\mu\text{M}$  y su  $V_{m\acute{a}x}$  de 3.7 nmol DAG x (mg proteína x h)<sup>-1</sup> (Figura 24B).



**Figura 24. Determinación de la  $K_M$  y de la  $V_{m\acute{a}x}$  de la PC-PLC.** (A) Los Syn se resuspendieron en buffer Tris 0,1 M (pH 7,2-7,4) y la reacción enzimática se llevó a cabo a 37°C por 20 min, en presencia de etanol 2%, Triton X-100 0,1%, 150.000 dpm de [<sup>14</sup>C]-DPPC y concentraciones crecientes de DPPC. Los resultados se expresan como dpm DAG x (mg proteína x h)<sup>-1</sup>. (B) Gráfico de Lineweaver-Burk realizado a partir de los datos obtenidos en la Figura 24A.

### 1.5. DETECCIÓN DE LA PC-PLC POR WB EN LAS TERMINALES SINÁPTICAS DE RATAS ADULTAS Y SENILES.

Con el fin de determinar inmunológicamente la presencia de la PC-PLC en las terminales sinápticas se utilizó un anticuerpo primario (Ac) anti-PC-PLC (suero policlonal de conejo dirigido contra la PC-PLC de *Bacillus cereus*). En 1986 Clark y colaboradores demostraron que los anticuerpos dirigidos contra la enzima de *B. cereus* también reaccionaba específicamente con una proteína con actividad PC-PLC de células de mamífero (Clark y col., 1986).



**Figura 25. Detección de la PC-PLC sinaptosomal por WB.** Las proteínas sinaptosomales (60 µg) se resolvieron por SDS-PAGE en un gel al 10% y se transfirieron a una membrana de PVDF. La membrana una vez bloqueada se incubó con un suero policlonal de conejo anti-PC-PLC de *B. cereus* (dilución 1: 100, 18 h a 4°C). Luego se incubó 2 h a T ambiente con el Ac secundario acoplado a la peroxidasa (dilución 1: 1.000). En la calle 1 se sembró como control positivo PC-PLC de *C. perfringens*, en la calle 2 los Syn de ratas adultas y en la calle 3 los Syn de animales seniles.

Luego de incubar con el Ac secundario se evidenciaron las inmunoreacciones y se observaron dos bandas muy próximas correspondientes a un peso molecular cercano a 66 kDa, tanto en los sinaptosomas de ratas adultas como en los sinaptosomas de ratas seniles (Figura 25). Como control positivo del Ac primario se sembró la proteína PC-PLC de *Clostridium perfringens* dado que el dominio N-terminal de esta proteína presenta similitud estructural con la proteína de *B. cereus* (Naylor y col., 1998).

## I. 6. LOCALIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA PC-PLC EN LA MEMBRANA PLASMÁTICA SINAPTOSOMAL.

Con el objetivo de determinar la localización de la PC-PLC en las fracciones constituyentes de los Syn los mismos fueron lisados y sometidos a un proceso de centrifugación diferencial para obtener la fracción de la membrana plasmática sinaptosomal (SPM) y la fracción soluble (Sol), tal como se describió en el punto 3.1. de la sección Materiales y Métodos.

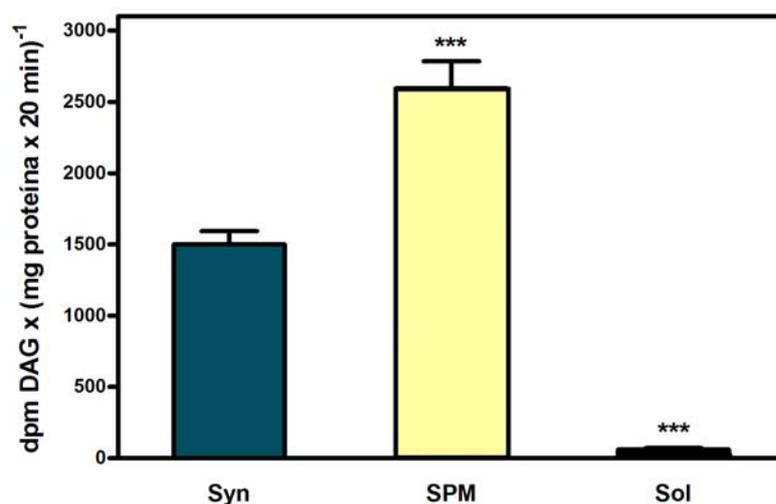
La pureza de la fracción de la membrana sinaptosomal se evaluó midiendo la actividad de la enzima 5'nucleotidasa, enzima marcadora de membrana plasmática (Depierre y Karnovsky, 1973; Schimmel y col., 1973). La actividad de esta enzima se ensayó en el homogenado total (HT), en los Syn, y en las fracciones Sol y SPM.

Fracción subcelular	mg proteína/gr. CC	Actividad 5'nucleotidasa	Act./Act. en HT
HT	145,8	352 ± 56	1
Syn	12,02	684 ± 96	1,94
SPM	2,56	1.500 ± 2,4	4,26
Sol	8,7	40 ± 16	0,11

**Tabla 1. Distribución de las proteínas y de la actividad de la 5'nucleotidasa en las distintas fracciones subcelulares.** Las fracciones subcelulares HT, Syn, SPM y Sol fueron obtenidas tal como se describió en Materiales y Métodos. En cada una de las fracciones se evaluó la actividad de la 5'nucleotidasa y el contenido de proteínas como se describió en la sección de Materiales y Métodos. La actividad de la 5'nucleotidasa se expresa en nmol Pi x (mg proteína x h)<sup>-1</sup>.

El enriquecimiento en membrana plasmática de las fracciones subcelulares se evaluó comparando los valores de la actividad de la enzima 5'nucleotidasa con respecto a los hallados en el HT. La Tabla 1 muestra que esta actividad enzimática fue 0,94 veces mayor en los Syn y 3,26 veces mayor en la fracción SPM con respecto al HT. Por el contrario la actividad en la fracción soluble fue mucho menor con respecto a la detectada en el HT.

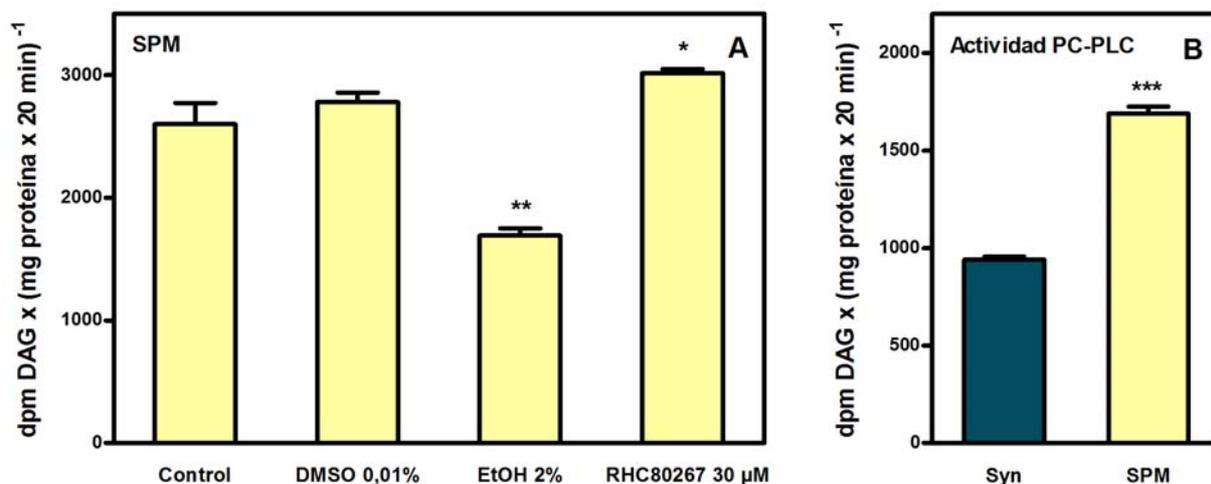
Para determinar la localización de la PC-PLC se evaluó la generación de DAG a partir de la PC en las fracciones sinaptosomal, SPM y Sol obtenidos a partir de la CC de ratas adultas (Figura 26).



**Figura 26. Generación de DAG en las distintas fracciones subcelulares.** Se evaluó la formación de DAG a partir de la PC en los Syn de ratas adultas y en las fracciones SPM y Sol. Alícuotas de las distintas fracciones fueron incubadas por 20 min a 37°C en las condiciones descritas en la Figura 16. Los resultados se expresan como dpm DAG x (mg proteína x 20 min)<sup>-1</sup> y se compararon con los obtenidos en los Syn. \*\*\*  $p < 0,001$ .

En la fracción SPM la generación de DAG fue un 73% mayor respecto a los niveles encontrados en los sinaptosomas enteros, mientras que en la fracción soluble la generación de DAG fue prácticamente indetectable.

Para evaluar el aporte de la vía de la PLD a la generación de DAG en la fracción de membrana, el ensayo enzimático se llevó a cabo en presencia de etanol 2%. Asimismo, dado que la DAG lipasa (DAGL) es una enzima muy activa la cual también se localiza en la membrana plasmática, se decidió evaluar el efecto de la inhibición de esta vía de degradación del DAG en la fracción SPM para lo cual se utilizó un inhibidor específico de dicha enzima (RHC80267 30  $\mu\text{M}$ ).



**Figura 27. (A) Efecto del etanol y de la inhibición de la DAGL en la generación de DAG en la fracción de membrana sinaptosomal.** Alícuotas de la fracción SPM (150 μg de proteína) la generación de DAG se evaluó por 20 min a 37°C en las condiciones descritas en la Figura 16 (condición control) y en presencia de etanol 2%, DMSO 0,01% y RHC80267 30 μM. **(B) Actividad de la PC-PLC en los Syn y en la fracción SPM.** La actividad de la PC-PLC se evaluó en los Syn y en la fracción SPM en las condiciones descritas en la Figura 16 y en presencia de etanol 2%. Los resultados se expresan como dpm DAG x (mg proteína x 20 min)<sup>-1</sup> y se compararon con la condición control. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

Cuando la formación de PA por la PLD fue desviada hacia la formación de PEth la generación de DAG en la fracción SPM se inhibió en un 35%, este resultado demuestra que en la fracción de membrana el 65% del DAG generado provino de la actividad PC-PLC y el 35% restante de la vía de la PLD (Figura 27A). En presencia del RHC80267 la formación de DAG se incrementó sólo en un 16% con respecto a la situación control (Figura 27A). Simultáneamente se realizó un control con DMSO al 0,01% (concentración en la cual se vehiculizó el RHC80267), esta concentración de DMSO no modificó los niveles de DAG generados en la fracción SPM.

La actividad específica de la PC-PLC (medida en presencia de etanol al 2%) fue un 80% mayor en la fracción SPM con respecto a la actividad en los sinaptosomas (Figura 27B).

## 1.7. LOCALIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA PC-PLC EN DOMINIOS DE MEMBRANA RESISTENTES A DETERGENTES (DRMs) TIPO "RAFTS".

Los dominios de membrana tipo "rafts" o balsas consisten en dominios pequeños (10-200 nm) enriquecidos en colesterol y esfingolípidos, los cuales son capaces de actuar como plataformas para procesos celulares como la adhesión, la endocitosis y la señalización celular. Tanto los lípidos como las proteínas contribuyen a la generación de estos microdominios, por lo cual se ha adoptado el término "dominios de membrana" en lugar de "dominios lipídicos" (Simons y Toomre, 2000; van y Lisman, 2002; Helms y Zurzolo, 2004; Pike, 2006). El aislamiento de estos microdominios se basa en su propiedad química de ser resistente al tratamiento con Triton X-100 en frío (Brown y Rose, 1992). Los lípidos y las proteínas asociados a estas membranas resistentes a detergentes (DRMs) se presume han estado asociadas a los "rafts" en la células intactas (London y Brown, 2000). Este método de aislamiento, a pesar de sus limitaciones, ha sido ampliamente utilizado para el estudio de estos microdominios.

Las DRMs se obtuvieron, como se describió en el punto 4 de Materiales y Métodos, por el método de extracción con Triton X-100 en frío seguido de una centrifugación en gradiente de densidad, a partir de los pellets sinaptosomales provenientes de la corteza cerebral de ratas adultas y seniles. Se obtuvo una fracción liviana de membrana resistente al detergente, como una banda visible, la cual permaneció flotando en la interfase de las soluciones de sacarosa de 5 y 30%.

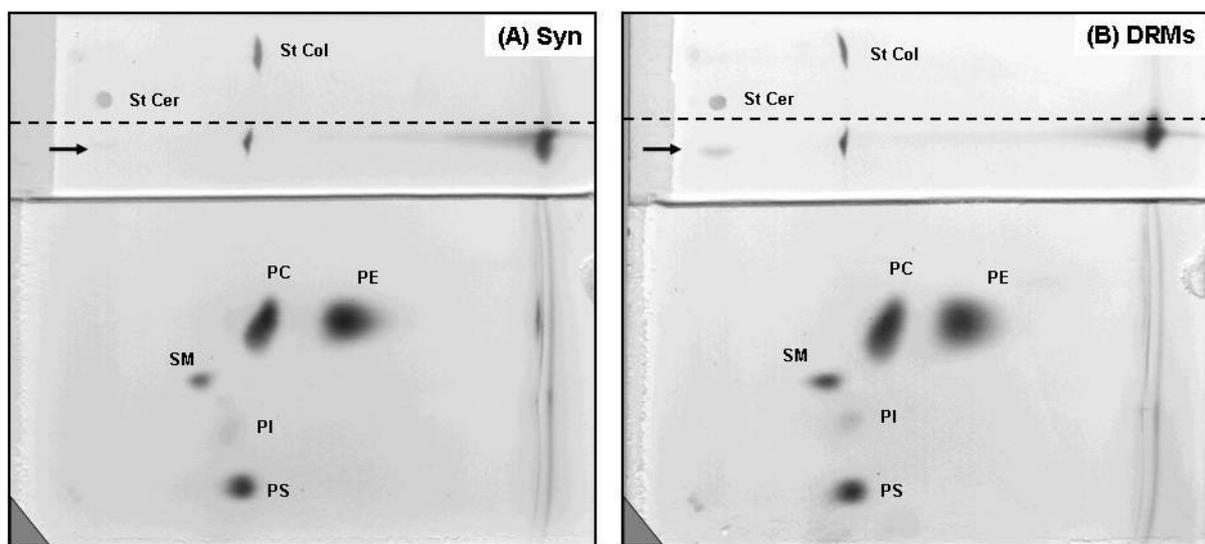
### 1.7.1. Caracterización lipídica de las DRMs de Syn de ratas adultas y seniles.

#### ▪ Composición fosfolipídica y contenido de SM.

En primer lugar se determinó la composición fosfolipídica de las DRMs y de los Syn provenientes tanto de ratas adultas como seniles. Para ello se extrajeron y se resolvieron los lípidos polares como se detalló en los puntos 7.1 y 7.2.2. de Materiales y Métodos. En la siguiente Figura se muestra la resolución de los lípidos de los Syn (Figura

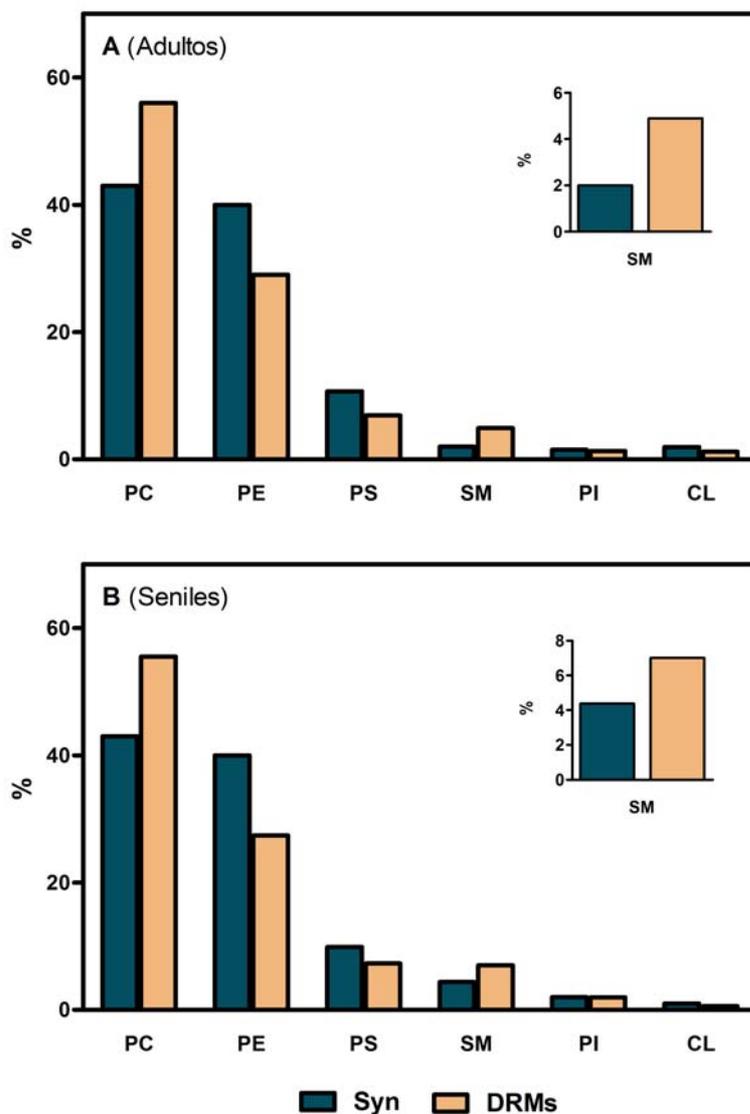
28A) y de las DRMs (Figura 28B) utilizando la estrategia experimental detallada en Materiales y Métodos, que permite resolver los fosfolípidos y los lípidos neutros en la misma placa.

Observamos que en la fracción DRM se distingue una mancha que migra con un Rf similar al estándar de ceramida (indicada con una flecha), esta mancha no se observa en los Syn. También puede apreciarse a simple vista que la mancha correspondiente a SM es mayor en la fracción DRM.



**Figura 28. Resolución de lípidos neutros y polares en los sinaptosomas y en la fracción resistente a detergentes.** Los fosfolípidos y los lípidos neutros de la fracción sinaptosomal (A) y de las DRMs (B) se resolvieron como se detalla en la sección Materiales y Métodos y se visualizaron por exposición a vapores de  $I_2$ .

Seguidamente se cuantificó el contenido de fósforo en las manchas correspondientes a PC, PE, PS, SM, PI, PPI, PA y CL.

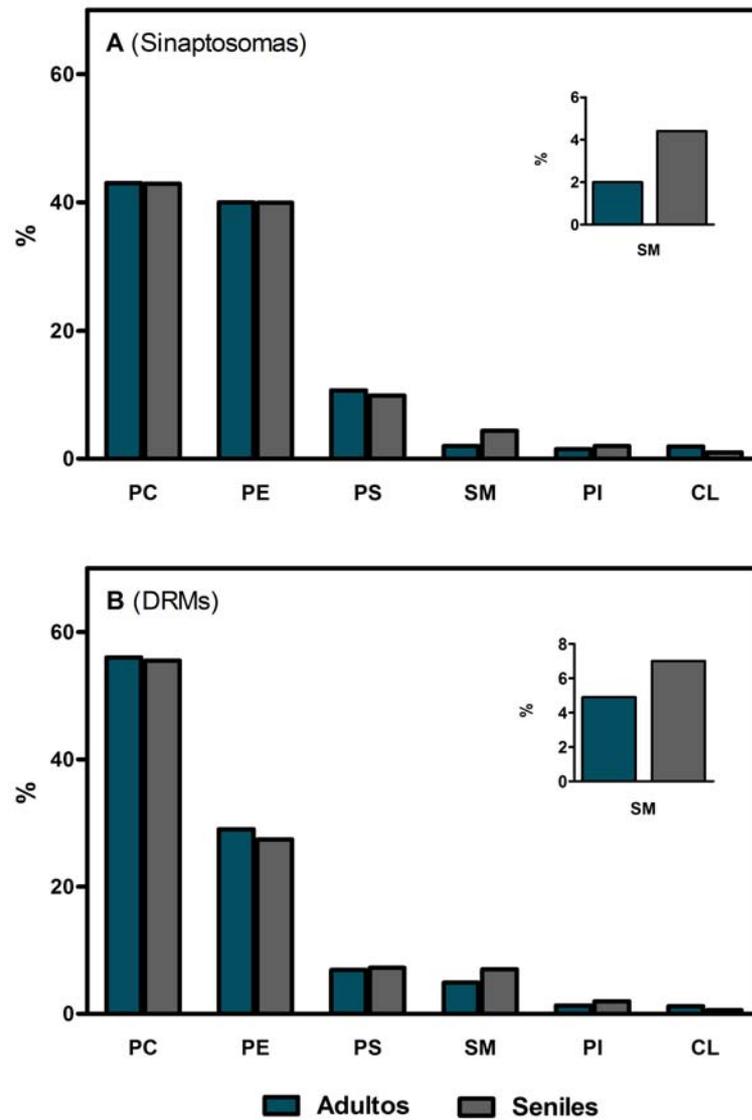


**Figura 29. Composición fosfolipídica de los Syn y las DRMs de animales adultos y seniles.** Luego de la extracción lipídica los lípidos polares de las fracciones Syn y DRM (15  $\mu$ g de Pi total) fueron aislados por TLC tal como se describió en Materiales y Métodos y se cuantificó el Pi correspondiente a cada fosfolípido. Los resultados se expresan como % de fosfolípidos totales. (A) Comparación de la composición fosfolipídica de los Syn y las DRMs de ratas adultas. (B) Comparación de la composición fosfolipídica de los Syn y las DRMs de ratas seniles.

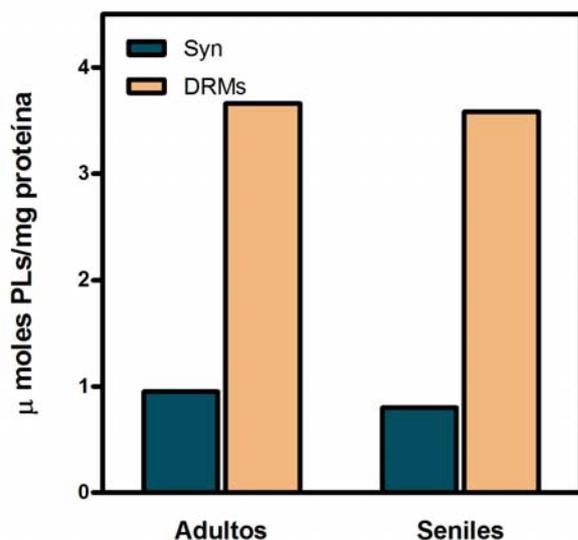
Las Figuras 29 A y B muestran que las DRMs se encontraron enriquecidas en PC y SM con respecto a los sinaptosomas mientras que el contenido de PE y PS disminuyó. Esto se observó tanto en las membranas provenientes de ratas adultas (Figura 29A) como de ratas seniles (Figura 29B). La PC representó un 43% de los fosfolípidos totales en los Syn mientras que en las DRMs correspondió a un 56%. Asimismo, el contenido de SM aumentó con respecto a los Syn 1,45 veces en las DRMs de animales adultos y 0,6 veces en las DRMs de ratas seniles. Por el contrario, el contenido de PE representó un 40% en los Syn y un 28% en las DRMs y la PS un 10% en los Syn y un 7% en la fracción de membrana resistente a detergente. El contenido de CL también disminuyó en la fracción DRM, lo cual resulta lógico dado que este lípido es marcador mitocondrial. Cabe señalar que la sensibilidad del método utilizado no permitió cuantificar (por la cantidad de fósforo total sembrada en la TLC) los fosfolípidos minoritarios, como el PA y los PPI.

Se comparó también el efecto del envejecimiento en la composición fosfolipídica de los sinaptosomas (Figura 30A) y de las DRMs (Figura 30B). Observamos que el porcentaje de los distintos fosfolípidos no varió significativamente con el envejecimiento, tanto en los Syn como en las DRMs. La única excepción la constituye la SM, cuyo porcentaje se incrementó en ambas fracciones obtenidas de los animales seniles. El contenido de SM aumentó 1,2 veces en los Syn de ratas seniles con respecto a los Syn de ratas adultas (Figura 30A) y 0,45 veces en las DRMs de animales seniles respecto a la misma fracción obtenida de animales adultos (Figura 30B).

La relación  $\mu$ moles de fosfolípidos (PLs) por mg de proteína fue 2,85 veces mayor en las DRMs de animales adultos con respecto a los Syn, y 3,47 veces mayor en las membranas de ratas seniles (Figura 31 A y B). El aumento en dicha relación en la fracción DRM indica que estas membranas presentan un alto enriquecimiento en fosfolípidos, dato característico de este tipo de estructuras.



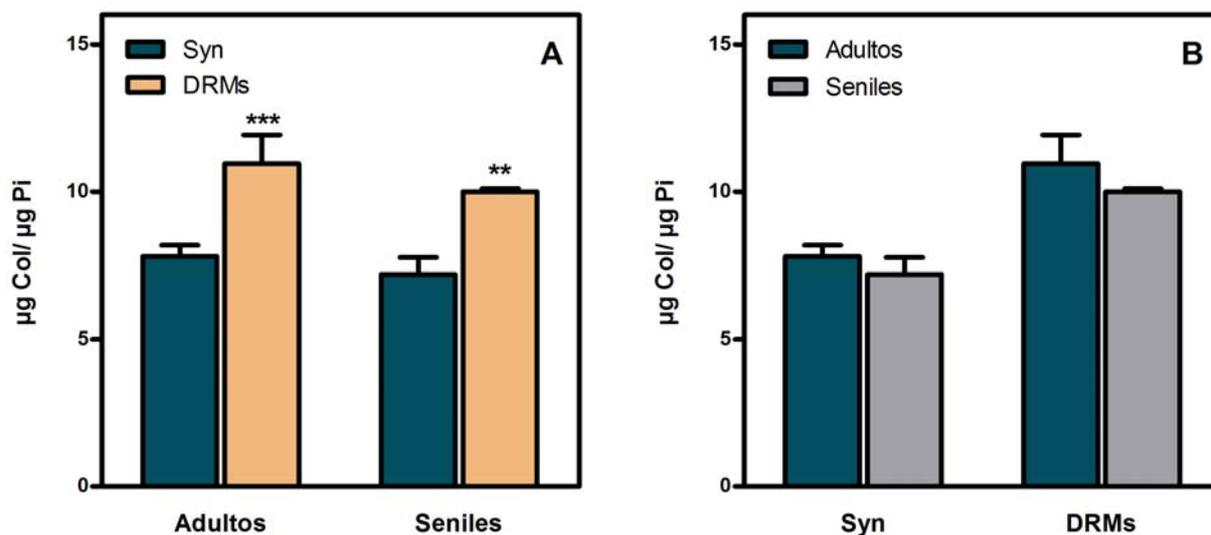
**Figura 30. Efecto del envejecimiento en la composición fosfolípídica de los sinaptosomas y las DRMs.** La determinación de la composición fosfolípídica se realizó como se describió en la Figura 29. Los resultados se expresan como % de fosfolípidos totales. (A) Comparación de la composición fosfolípídica de los Syn de ratas adultas y seniles. (B) Comparación de la composición fosfolípídica de las DRMs de ratas adultas y seniles.



**Figura 31. Relación entre el contenido de fosfolípidos y de proteínas de las fracciones Syn y DRMs.** En las fracciones sinaptosomales y DRMs de animales adultos y seniles se determinó el contenido de fósforo fosfolipídico y de proteínas como se detalla en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como  $\mu$ moles PLs/mg de proteínas.

▪ *Contenido de Colesterol.*

El contenido de colesterol en las DRMs y en los Syn (provenientes de animales adultos y seniles) se determinó por un método enzimático detallado en el punto 7.3 de la sección Materiales y Métodos (Figura 32).

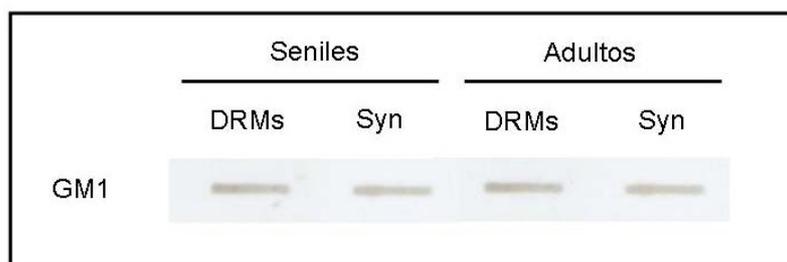


**Figura 32. Determinación de colesterol en Syn y en DRMs.** Se determinó el contenido de Col en alícuotas de extractos lipídicos ( $5 \mu\text{g Pi}$ ) de Syn y de DRMs por el método enzimático detallado en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como  $\mu\text{g Col}/\mu\text{g Pi}$ . (A) Comparación del contenido de Col entre Syn y DRMs.  $**p < 0,01$ ;  $***p < 0,001$ . (B) Comparación del contenido de Col entre animales adultos y seniles.

La fracción resistente a detergente se encontró enriquecida en un 40% en colesterol con respecto a los sinaptosomas, tanto en animales adultos como en seniles (Figura 32A). El contenido de colesterol en los Syn y en las DRMs fue el mismo en membranas provenientes de animales adultos y seniles (Figura 32B). Estos resultados demuestran que el envejecimiento no ejerce ningún efecto en el contenido de este esterol, tanto en los Syn como en las DRMs.

▪ *Contenido de GM1.*

Los gangliósidos son glicoesfingolípidos que contienen ácido siálico en su estructura. La detección del gangliósido GM1 como marcador de "rafts" ha sido ampliamente utilizado (Simons y Toomre, 2000; Molander-Melin y col., 2005; Janich y Corbeil, 2007; Hofman y col., 2008; Ariga y col., 2008). Para evaluar el contenido de GM1 en los Syn y en las DRMs se realizó un Slot blot utilizando la subunidad B de la toxina colérica conjugada a la peroxidada (CTB-HRP), ya que esta subunidad de la toxina reconoce con gran afinidad al gangliósido GM1 (Figura 33).

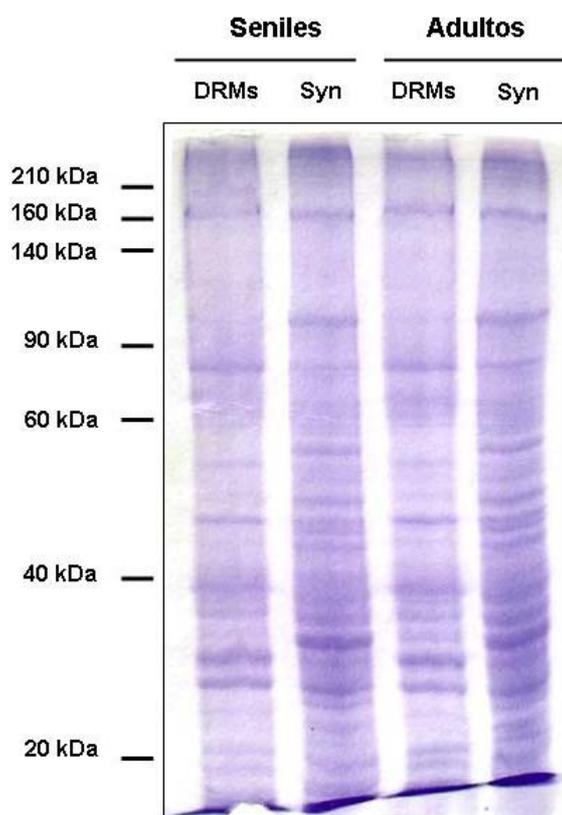


**Figura 33. Determinación de GM1 en Syn y DRMs.** Alícuotas de Syn y DRMs de animales adultos y seniles (correspondientes a 3  $\mu$ g de proteína) se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se incubó con CTB-HRP (dilución 1: 30.000) por 1 h a T ambiente como se describe en Materiales y Métodos.

Se observó que en las DRMs y en los Syn el contenido de GM1 es muy similar, tanto en las membranas provenientes de animales adultos como de animales envejecidos (Figura 33).

### 1.7.2. Caracterización proteica de las DRMs.

En primer lugar y con el objetivo de observar el perfil proteico de los sinaptosomas y de las DRMs se realizó un SDS-PAGE seguido de una tinción del gel con una solución del colorante Coomassie Brilliant Blue.

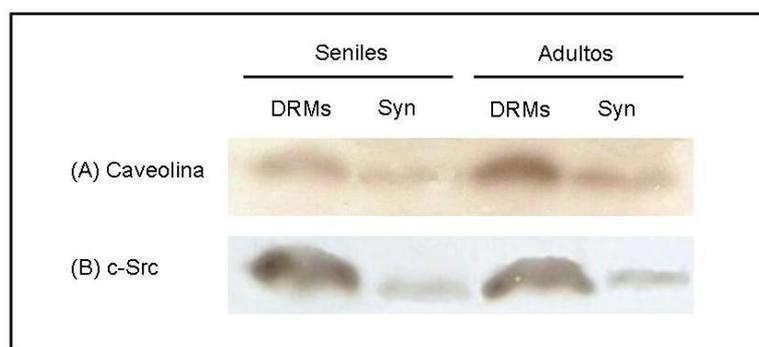


**Figura 34. Determinación del perfil proteico de los Syn y las DRMs.** Las proteínas de los Syn y las DRMs de animales adultos y seniles (25  $\mu$ g) se resolvieron por SDS-PAGE al 10%. Las bandas proteicas se visualizaron por la tinción del gel con una solución de Coomassie Brilliant Blue.

En la tinción del gel se observó que los Syn y las DRMs presentan un perfil diferencial de bandas (Figura 34). En las fracciones DRM de animales adultos y seniles se observó un enriquecimiento con respecto a los Syn en bandas de aproximadamente 85, 50, 55 kDa y dos bandas muy próximas cercanas a 30 kDa. Por el contrario, se observó la ausencia en las DRMs de una banda de 95-100 kDa y una de 35 kDa presentes en los Syn.

Dentro de los microdominios de membrana se pueden distinguir diferentes subtipos en base a su composición de lípidos y proteínas. Las caveolas son un subtipo de microdominio de 50 a 80 nm de diámetro, las cuales también están enriquecidas en SM y colesterol y forman invaginaciones que median procesos de endocitosis dependientes de rafts y de diferentes vías de señalización. La caveolina-1 es una proteína palmitoilada de 22 kDa que constituye el principal componente de las caveolas y su expresión es esencial para la formación de las vesículas (Pelkmans y Helenius, 2002; Cohen y col., 2004; Michel y Bakovic, 2007; Lajoie y Nabi, 2007).

Para caracterizar el perfil proteico de las DRMs se realizaron ensayos de Western blot y se investigó la presencia de caveolina en la fracción DRM obtenida de sinaptosomas de ratas adultas y seniles. También se evaluó la presencia de c-Src en las DRMs y en los Syn de ratas adultas y seniles, dado que esta proteína tirosina quinasa se localiza en los microdominios tipo rafts (Lee y col., 2002; Van y Leo, 2002; Resh, 2008; de Diesbach y col., 2008). Además se investigó la presencia de la isoforma PLD1 tanto en las DRMs como en los sinaptosomas de ratas adultas y seniles.

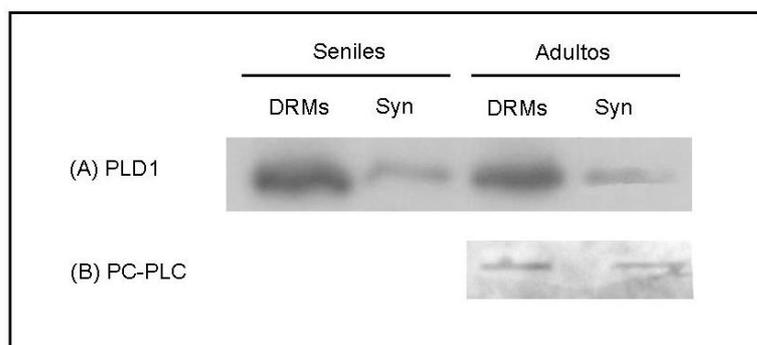


**Figura 35. Detección de caveolina y c-Src por Western blot.** Las proteínas de los Syn y las DRMs de animales adultos y seniles (25  $\mu$ g) se resolvieron por SDS-PAGE al 10% y se transfirieron a una membrana de PVDF. (A) Detección de caveolina: Ac primario (policlonal de conejo, dilución 1: 1.000) 2 h a T ambiente, Ac secundario (1: 5.000) 2 h a T ambiente. (B) Detección de c-Src: Ac primario (monoclonal, dilución 1: 1.000) 18 h a 4°C, Ac secundario (1: 2.000) 2 h a T ambiente.

Observamos que las DRMs, provenientes tanto de animales adultos como de seniles, se encuentran enriquecidas en caveolina con respecto a la fracción sinaptosomal

(Figura 35A). Asimismo, las DRMs de animales adultos y seniles se vieron enriquecidas en la proteína c-Src respecto a los Syn (Figura 35B).

Para investigar la presencia de las vías de señalización dependientes de la PC en las DRMs se determinó la presencia de la isoforma PLD1 y de la PC-PLC en dicha fracción. La presencia de la isoforma PLD1 se estudió en los Syn y en las DRMS de ratas adultas y seniles mediante un ensayo de Western blot, mientras que para estudiar la localización de la PC-PLC se realizó un Slot blot en los Syn y las DRMs de ratas adultas.

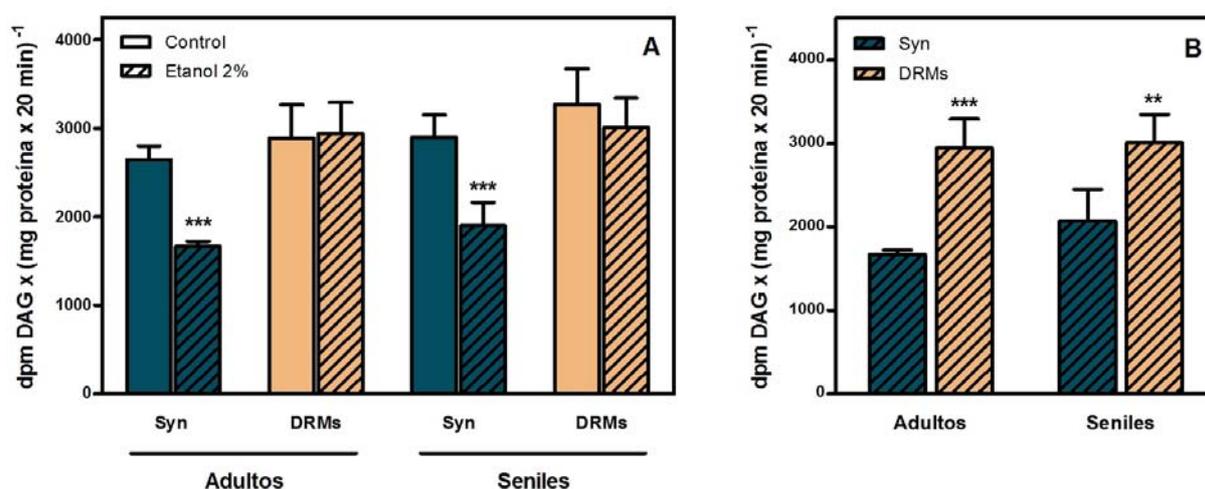


**Figura 36. (A) Detección de la PLD1 por WB.** Las proteínas de los Syn y las DRMs de animales adultos y seniles (25  $\mu$ g) se resolvieron por SDS-PAGE al 10% y se transfirieron a una membrana de PVDF. Seguidamente se incubó con el Ac primario (policlonal de conejo, dilución 1: 300) 18 h a 4°C, y con el Ac secundario (1: 2.000) 2 h a T ambiente. **(B) Detección de la PC-PLC por Slot blot.** Alícuotas de Syn y DRMs de animales adultos (correspondientes a 3  $\mu$ g de proteína) se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa como se describe en Materiales y Métodos. La membrana se incubó con el Ac primario (policlonal de conejo, 1: 100) por 18 h a 4°C y el Ac secundario (1: 1.000) por 2 h a T ambiente.

La PLD1 se encontró enriquecida en la fracción DRM de animales adultos y seniles con respecto a los Syn (Figura 36A) mientras que la PC-PLC se encontró tanto en los Syn como en las DRMs de animales adultos (Figura 36B).

### 1.7.3. Generación de DAG a partir de la PC en la fracción DRM.

Una vez realizada la caracterización lipídica y proteica de la fracción DRM se evaluó la generación de DAG a partir de PC en dicha fracción. La generación de DAG se midió en DRMs provenientes de animales adultos y seniles, en presencia y ausencia de etanol. Los resultados se compararon con la generación de DAG en los Syn.



**Figura 37. Generación de DAG a partir de PC en la fracción DRM.** (A) Los Syn y las DRMs se resuspendieron en buffer TBM y se evaluó la generación de DAG en la condición control y en presencia de etanol 2%. La reacción enzimática se llevó a cabo por 20 min a 37°C en presencia de 120.000 dpm [<sup>14</sup>C]-DPPC, DPPC 0,125 mM y una concentración final de Triton X-100 de 0,1%. (B) Actividad de la PC-PLC medida en presencia de etanol 2%. Los resultados se expresan como dpm DAG x (mg proteína x 20 min)<sup>-1</sup>. \*\**p*<0,01; \*\*\**p*<0,001.

Los niveles de DAG generados en las DRMs bajo la condición control fueron iguales a los generados en los sinaptosomas. Sin embargo, en las membranas resistentes a detergentes de animales adultos y seniles, la presencia de etanol 2% no disminuyó la formación de DAG (Figura 37A). Estos resultados indican que en la fracción DRM, bajo nuestras condiciones experimentales, la reacción de transfosfatidilación catalizada por la PLD no es llevada a cabo. Por su parte, la actividad específica de la PC-PLC (medida en presencia de etanol) se incrementó aproximadamente en un 60% en las DRMs de las ratas adultas y seniles, con respecto a la actividad en los sinaptosomas (Figura 37B).

Además, los niveles de DAG generados en la fracción DRM de animales adultos y seniles fueron iguales, indicando que en animales seniles tampoco afectó la formación de DAG a partir de PC en estos microdominios de la membrana.

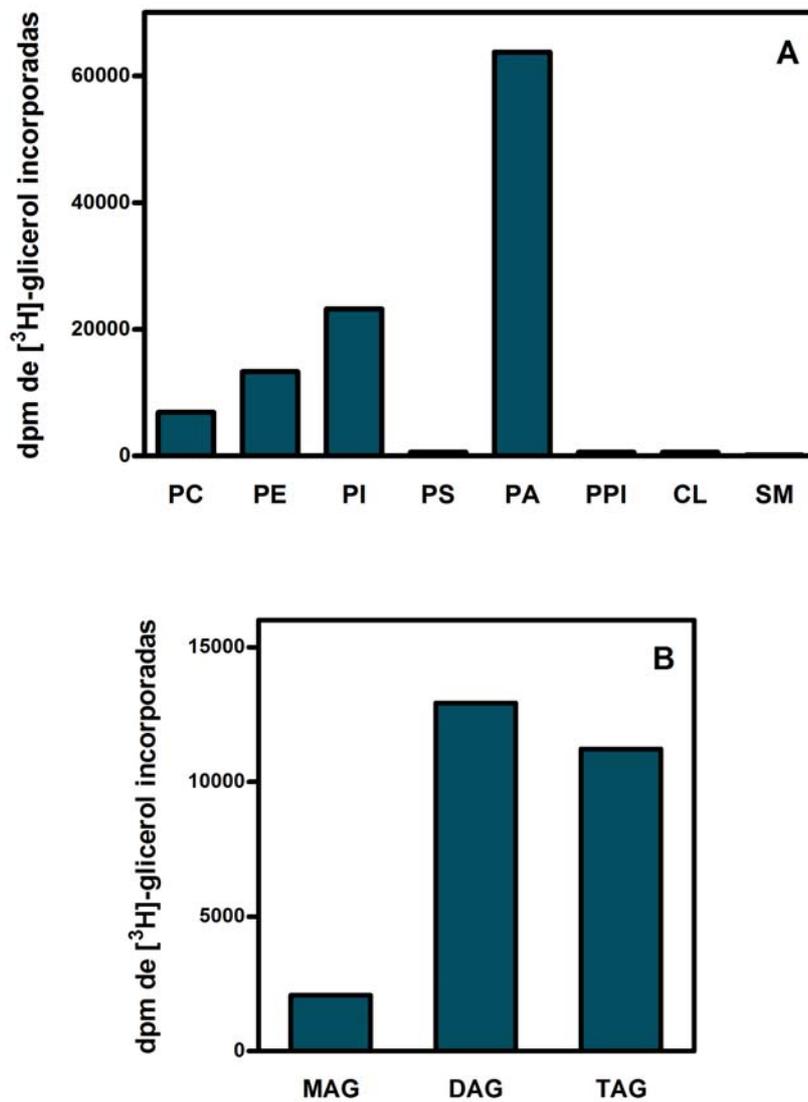
## 1.8. PREMARCACIÓN DE LOS FOSFOLÍPIDOS Y LOS LÍPIDOS NEUTROS DE LOS Syn.

Para evaluar la síntesis de novo de glicerofosfolípidos en los sinaptosomas de ratas adultas, éstos fueron resuspendidos en medio HBM e incubados con [ $^3\text{H}$ ]-glicerol. Luego se cuantificó la radioactividad incorporada en los distintos fosfolípidos (Figura 38A) y también en los lípidos neutros (Figura 38B).

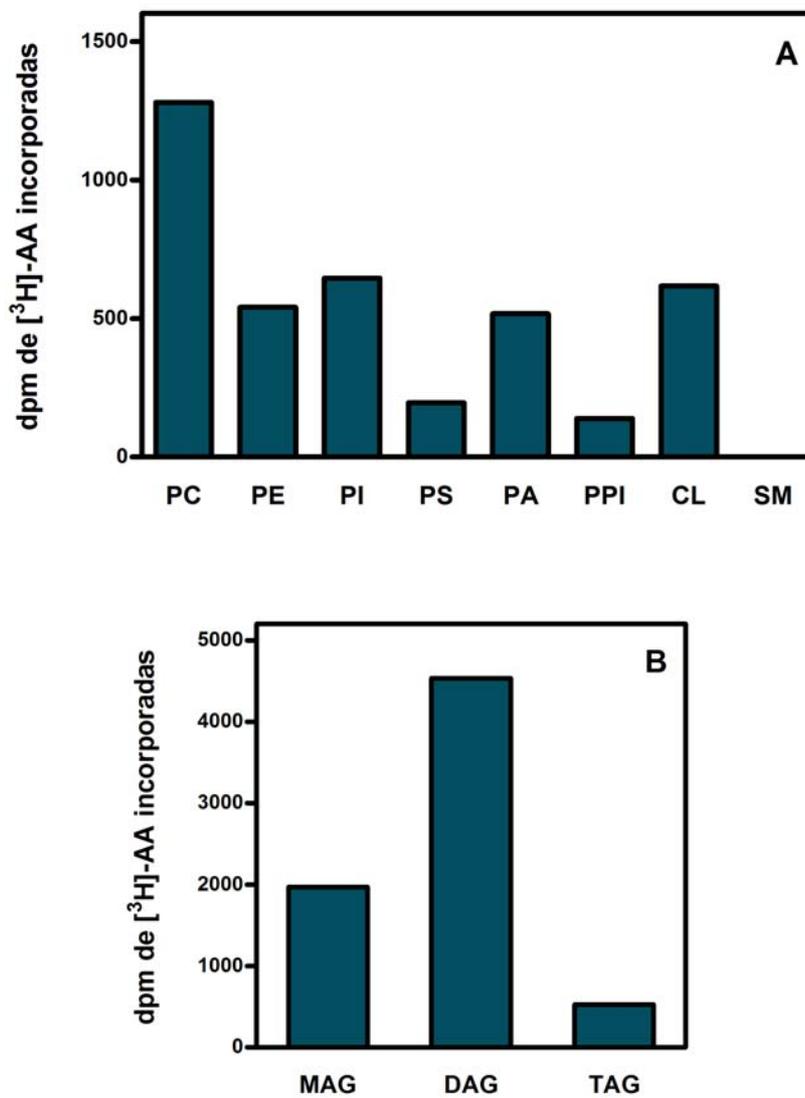
Entre los fosfolípidos, la mayor incorporación de [ $^3\text{H}$ ]-glicerol se observó en el PA, lo cual era esperado dado que el PA es el precursor clave para la síntesis de lípidos y fosfolípidos. Al PA le siguieron en la incorporación de [ $^3\text{H}$ ]-glicerol el PI, la PE y la PC, mientras que la incorporación en PS, PPI y CL fue prácticamente indetectable (Figura 38A). Entre los lípidos neutros la mayor incorporación se observó en el DAG seguido del TAG y en menor medida en el MAG (Figura 38B).

Los sinaptosomas también fueron premarcados con [ $^3\text{H}$ ]-AA (Figura 39). La incorporación de ácido araquidónico en los lípidos evidencia la actividad de enzimas involucradas en la acilación y transacilación de lípidos, esta incorporación fue mucho mayor en los lípidos neutros con respecto a la premarcación de los glicerofosfolípidos. En cuanto a los fosfolípidos, la mayor premarcación se observó en la PC, seguida de la PE, la CL, el PI y el PA mientras que la incorporación en PS y PPI fue menor e indetectable en la SM (Figura 39A). Con respecto a los lípidos neutros la mayor incorporación de [ $^3\text{H}$ ]-AA se observó en el DAG, seguido del MAG y en menor medida en el TAG (Figura 39B).

Si bien la eficiencia de la incorporación es muy baja (1,15% para el [ $^3\text{H}$ ]-glicerol y 0,2% para el [ $^3\text{H}$ ]-AA) estos resultados demuestran que los sinaptosomas son metabólicamente activos en la síntesis de lípidos neutros y glicerofosfolípidos. Sin embargo, la baja eficiencia en la incorporación sumada a la alta premarcación del DAG con respecto a la PC, hicieron que no fuera posible utilizar los sinaptosomas premarcados para evaluar la hidrólisis de la fosfatidilcolina.



**Figura 38. Premarcación de los sinaptosomas con [<sup>3</sup>H]-glicerol.** Los Syn de CC de ratas adultas se resuspendieron (4,5 mg de proteínas) en medio HBM y se incubaron con 30  $\mu$ Ci de [<sup>3</sup>H]-glicerol por 1 h a 37°C. Se realizó la extracción lipídica, se resolvieron los lípidos neutros y los polares correspondientes a 0,8 mg de proteínas y se cuantificó la radioactividad incorporadas en cada uno de ellos como se describió en Materiales y Métodos. (A) Premarcación de glicerofosfolípidos. (B) Premarcación de lípidos neutros. Los resultados se expresan como dpm de [<sup>3</sup>H]-glicerol incorporadas.



**Figura 39. Premarcación de los sinaptosomas con [<sup>3</sup>H]-AA.** Los Syn de CC de ratas adultas se resuspendieron (4,5 mg de proteínas) en medio HBM y se incubaron con 10  $\mu$ Ci de [<sup>3</sup>H]-AA por 1 h a 37°C. Se realizó la extracción lipídica, se resolvieron los lípidos neutros y los polares correspondientes a 0,8 mg de proteínas y se cuantificó la radioactividad incorporadas en cada uno de ellos como se describió en Materiales y Métodos. (A) Premarcación de glicerofosfolípidos. (B) Premarcación de lípidos neutros. Los resultados se expresan como dpm de [<sup>3</sup>H]-AA incorporadas.

## DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS DEL CAPÍTULO I

El DAG como segundo mensajero fue descubierto a partir de su papel en la activación de la PKC (Nishizuka, 1986; Nishizuka, 1988). Entre las vías enzimáticas capaces de generar este segundo mensajero se encuentran aquellas que lo generan a partir de la hidrólisis de la PC, como la vía de la PLD y la vía de la PC-PLC, siendo esta última uno de los mecanismos de señalización menos caracterizados en las células de mamíferos.

Por su parte, se reportó que la expresión de las PLDs en el cerebro está ontogenéticamente regulada y, en la rata, el rápido aumento de la actividad de la PLD en el período post natal es paralelo a la sinaptogénesis y a la mielinogénesis (Klein, 2005). También se demostró que la estimulación de los receptores adrenérgicos induce la activación de la PLD en cultivos primarios de células astrogliales (Gonzalez y col., 1996; Kotter y Klein, 1999). Otros estudios reportaron la activación de la PLD por factores de crecimiento en células gliales y en células PC12 derivadas de feocromocitoma de rata (Zhang y col., 2004; Watanabe y col., 2004). Además, también en células PC12, la PLD es capaz de ejercer efectos antiapoptóticas a través de la inhibición de la esfingomielinasa (Nozawa, 2002).

Sin duda, el rol de la PC-PLC en mamíferos ha sido mayoritariamente estudiado en células del sistema inmune, tales como células B provenientes de linfomas murinos en donde se demostró que la actividad de la PC-PLC es necesaria para la activación del transductor de señal y activador de transcripción 6 (STAT6) frente a la estimulación con la interleuquina 4 (IL-4) (Zamorano y col., 2003). En monocitos la activación del receptor de la IL-4 origina un aumento en los niveles de DAG y de fosfocolina, producto de la actividad de la PC-PLC (Ho y col., 1994). También en células "natural killers" (NK), activadas por la IL-2, Ramoni y colaboradores demostraron la colocalización de la PC-PLC con los gránulos de perforinas y su rol fundamental en la citotoxicidad mediada por estas células (Ramoni y col., 2001; Spadaro y col., 2006; Cecchetti y col., 2007).

Nuevos roles de la PC-PLC han sido descriptos recientemente en macrófagos, por ejemplo la participación de esta enzima en la secreción de la citoquina CCL2 en respuesta a la proteína gp120 del virus HIV-1, mientras que en macrófagos alveolares la PC-PLC regula la producción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) y de la IL-1 $\beta$  en la respuesta inflamatoria inducida por la sílica (Liu y col., 2007; Fantuzzi y col., 2008).

A pesar de estos antecedentes reportados en las células del sistema inmune, muy pocos son los estudios que se han realizado para dilucidar el rol de la PC-PLC en los procesos de transducción de señales en el sistema nervioso. Es por ello que el objetivo de la primera parte de esta tesis fue demostrar la presencia de la PC-PLC en las terminales sinápticas de la corteza cerebral de rata, así como también realizar la caracterización de esta actividad enzimática utilizando como sustrato [ $^{14}$ C]-DPPC.

Los primeros experimentos realizados fueron diseñados con el fin de encontrar las condiciones óptimas de ensayo para medir la generación de [ $^{14}$ C]-DAG a partir de [ $^{14}$ C]-DPPC. En primer lugar se evaluó el efecto de dos agentes tensioactivos en la generación de DAG. La utilización de detergentes en la medición de la actividad de fosfolipasas favorece la accesibilidad al sustrato y aumenta la disponibilidad de sitios activos de las enzimas, haciendo posible la medición de estas actividades enzimáticas.

Se emplearon distintas concentraciones de dos detergentes con distintas propiedades: se utilizó el Triton X-100 (detergente no iónico, no desnaturizante, que no altera las uniones proteína-proteína) y el DOC (detergente aniónico). Todas las concentraciones del Triton X-100 ensayadas fueron superiores a la concentración micelar crítica (CMC) de dicho detergente mientras que las concentraciones del DOC fueron inferiores a la CMC del mismo, dado que al pH de trabajo a concentraciones superiores al 0,1% se observaba la gelificación del DOC.

Ambos detergentes estimularon la generación de DAG con respecto a la condición control (sin detergente). La máxima formación de DAG se obtuvo con Triton X-100 0,1%, en esta condición (10 veces superior a la CMC) la formación de este lípido neutro se incrementó en un 330% respecto a la condición control. El aumento en la generación del DAG en presencia de los detergentes podría deberse a una mayor exposición de las

enzimas o a una mayor solubilización del sustrato, favoreciendo la accesibilidad de las enzimas al mismo. No podemos descartar una posible acción directa del detergente sobre las enzimas. Asimismo, la activación producida por los agentes tensioactivos podría estar reflejando el carácter de proteína intrínseca de membrana de la o las enzimas responsables de la generación del DAG.

Nuestros hallazgos concuerdan con lo reportado por otros autores: Randell y colaboradores en 1992 realizaron la caracterización de la PC-PLC en las plaquetas de rata, ellos demostraron la estimulación en la producción de fosfocolina por agentes tensioactivos. Sin embargo, en las plaquetas de rata, la mayor producción de fosfocolina se obtuvo con DOC en una concentración del 0,01% (Randell y col., 1992). Por su parte, Albi y colaboradores utilizaron el Triton X-100 al 0,1% para medir la actividad de la PC-PLC en células de melanoma murino BL6 (Albi y col., 2005).

Con respecto a la actividad de la PLD, Kanoh y colaboradores demostraron que en el cerebro de la rata la actividad de esta enzima no era detectable en ausencia de detergentes, mientras que el Triton X-100 incrementaba marcadamente su actividad. La máxima actividad enzimática en estos experimentos se obtuvo con Triton X-100 entre el 0,1 y el 0,2% mientras que otros detergentes ensayados (como el DOC, el CHAPS y el Lubrol-PX) sólo estimularon levemente la actividad de la PLD (Kanoh y col., 1991). De la misma manera, la detección de actividad de la PLD en cultivos de neuronas de la corteza frontal de rata solo fue posible en presencia de Triton X-100. También en este caso la concentración de Triton con la cual se consiguió la máxima actividad de la PLD fue del 0,1%, mientras que concentraciones mayores del mismo agente tensioactivo la disminuyeron (Nishida y col., 1992).

En segundo lugar se evaluó el efecto de los iones  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  sobre la generación del DAG a partir de la PC. Cuando se incluyó un quelante de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  (EDTA 5 mM) en la reacción enzimática los niveles de DAG fueron iguales a los generados en la condición control (en la cual están presentes niveles endógenos de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ ). Sin embargo, el agregado de concentraciones exógenas de ambos cationes inhibió fuertemente la formación de DAG. Al agregar  $\text{Ca}^{2+}$  (2 mM) la formación de DAG

disminuyó un 73% mientras que ante el agregado de  $Mg^{2+}$  (1mM) la disminución en la generación de este lípido fue de un 50%. El mismo % de inhibición (50%) se obtuvo al agregar  $Mg^{2+}$  1mM más ATP 250  $\mu$ M. En esta última condición ensayada ( $Mg^{2+}$  1mM más ATP 250  $\mu$ M) se favorece la actividad de proteínas quinasas, por lo cual la generación del DAG no parecería estar regulada por la actividad de estas proteínas.

Estos resultados concuerdan con dos trabajos previos realizados en el cerebro y en las neuronas corticales de rata. En dichos trabajos los autores demostraron que la actividad de la PLD, medida en presencia de Triton X-100, era inhibida por el  $Ca^{2+}$  y el  $Mg^{2+}$  en forma dependiente de la dosis (Kanoh y col., 1991; Nishida y col., 1992).

Por el contrario, nuestros resultados difieren de los obtenidos por Randell en las plaquetas de rata, donde se observó que la generación de fosfocolina a partir de PC se producía activamente en un amplio rango de concentraciones de  $Ca^{2+}$  (entre 25 nM a 25 mM) y era inhibida fuertemente por el agregado de EDTA (Randell y col., 1992). Más recientemente se reportó que en macrófagos la activación de la PC-PLC inducida por la sílica es dependiente del  $Ca^{2+}$ , ya que los niveles de fosfocolina generados disminuyen cuando las células son tratadas con el quelante del calcio intracelular BAPTA (Liu y col., 2007). Estas diferencias en cuanto al requerimiento de  $Ca^{2+}$  podrían estar indicando la existencia de distintas isoformas de la PC-PLC en mamíferos, las cuales serían reguladas de forma diferente por este catión divalente.

Si bien no se realizaron curvas de pH para determinar el pH óptimo en nuestro sistema experimental, la caracterización de la PC-PLC en plaquetas de rata y en plasma seminal de toro reveló en ambos casos un pH óptimo de la enzima de 7,2 (Sheikhnejad y Srivastava, 1986; Randell y col., 1992).

Tal como se mencionó previamente, tres vías enzimáticas son capaces de hidrolizar la PC para generar DAG. Este segundo mensajero lipídico puede ser generado por la vía de la PLD, por la acción de la PC-PLC y también por la actividad de la SMS. Debido a los múltiples posibles orígenes del DAG, fue necesario utilizar diversas estrategias experimentales para discriminar el aporte de cada una de estas vías enzimáticas.

En primer lugar se utilizó etanol como marcador de la actividad de la PLD, en presencia de este alcohol primario la PLD cataliza una reacción de transfosfatidilación formando el fosfatidilalcohol PEth. En presencia de etanol 2% se evita la formación de DAG por la vía de la PLD, dado que el PEth no puede ser hidrolizado por la PAP2 (Kobayashi y Kanfer, 1987; Nozawa, 2002; Salvador y col., 2005). La propiedad de catalizar la reacción de transfosfatidilación, única de la PLD, hace del etanol (y de otros alcoholes primarios) una herramienta sumamente confiable y específica para discriminar el origen del DAG producto de la hidrólisis de PC.

Cuando se incluyó etanol en el ensayo enzimático la generación de DAG disminuyó un 27% y un 42% luego de 5 y 20 min de incubación respectivamente. Estos resultados demuestran que en 5 min de reacción enzimática el 73% del DAG generado proviene de la vía PC-PLC mientras que la vía PLD/PAP2 genera el 27% restante. Luego de 20 min de reacción enzimática la vía de la PC-PLC genera el 58% del DAG total y la vía de la PLD/PAP2 el 42%. Estas diferencias en el porcentaje de aporte de las vías enzimáticas en función del tiempo de incubación podrían estar indicando una posible activación de la vía PC-PLC corriente arriba de la activación de la vía de la PLD/PAP2. La activación de la PLD mediada por la PC-PLC ha sido reportada previamente en células B de linfoma murino luego de la activación de Fas y en células tiroideas activadas con la hormona tirotrófina (Han y col., 1999; Kim y col., 2002). En ambos sistemas se demostró que la activación de la PLD era mediada por la translocación de isoformas de la PKC a la membrana, PKC $\beta$  I y II en las células B y PKC $\alpha$  en las células tiroideas, y esta translocación era dependiente de la actividad de la PC-PLC.

Para corroborar la presencia de la actividad de la PLD en los sinaptosomas de rata se midió también la generación de PEth, el cual indica específica e inequívocamente la actividad de esta enzima. Cuando se sumaron los niveles de DAG y de PEth generados en presencia de etanol, éstos fueron iguales a los niveles de DAG generados en la condición control, tanto a los 5 como a los 20 min de incubación. Esta concordancia demuestra que en presencia de etanol la formación de PA por la PLD está siendo desviada de manera efectiva hacia la formación de PEth.

Con el fin de confirmar el aporte de la vía de la PLD/PAP2, los sinaptosomas fueron preincubados con DL-propranolol. Este antagonista  $\beta$ -adrenérgico, como droga anfifílica catiónica, es capaz de inhibir la actividad de la PAP cuando se lo utiliza en altas dosis independientemente de su actividad como antagonista adrenérgico (Billah y Anthes, 1990; Meier y col., 1998; Albert y col., 2005). La inhibición en la generación de DAG producida por el propranolol coincidió con la disminución observada en presencia de etanol, por lo tanto este resultado confirma el aporte porcentual de la vía PLD/PAP2 calculado en base a los experimentos realizados en presencia de etanol.

Como tercera estrategia para discriminar entre las vías generadoras del DAG se estudió el efecto del D609. Este compuesto es una sal de xantato que posee propiedades antivirales y antitumorales, y ha sido aceptado y utilizado como inhibidor de la PC-PLC en diversos sistemas tales como células de astrocitoma, macrófagos y "Natural Killers" entre otros (Kobayashi y col., 2000; Cuschieri y col., 2006; Cecchetti y col., 2007; Liu y col., 2007). En nuestro modelo experimental el D609 inhibió la generación de DAG en forma dependiente de la dosis. La máxima concentración ensayada (500  $\mu\text{g/ml}$ ) disminuyó la formación de DAG en un 61% luego de 20 min de incubación con el sustrato radiomarcado. Este resultado indica que luego de 20 min de incubación el 61% del DAG es producto de la PC-PLC, lo cual coincide con el aporte porcentual de esta vía enzimática calculado en base a los resultados con etanol.

Cabe señalar que las concentraciones de D609, que resultaron efectivas para inhibir la generación de DAG en nuestro sistema experimental, fueron mayores a las utilizadas en los sistemas celulares. En dichos modelos celulares la PC había sido previamente radiomarcada y de esta manera no se modificaba el pool endógeno de este fosfolípido (Kobayashi y col., 2000; Liu y col., 2007). Es muy probable que la diferencia en la concentración de D609 necesaria para inhibir la generación de DAG en nuestro sistema se deba a la presencia del Triton X-100 en el ensayo enzimático. Además, el agregado del sustrato exógeno puede influir en la concentración de D609 necesaria para inhibir a la enzima, dado que este compuesto fue postulado como un inhibidor competitivo de la PC-PLC (Amtmann, 1996). Por lo tanto, al agregar DPPC exógena se

requiere una mayor concentración del inhibidor para desplazar al sustrato natural de la enzima.

Se ha reportado que el D609 es capaz de inhibir también la actividad de la SMS (Luberto y Hannun, 1998; Luberto y col., 2000; Riboni y col., 2001; Albi y col., 2005). La generación de DAG por la SMS es una reacción cinéticamente más lenta en comparación con las vías de la PC-PLC y de la PLD. Además, para medir la actividad de la SMS es necesario aumentar los niveles de ceramida en la membrana (ya sea mediante la utilización de C<sub>2</sub>-ceramida o por el tratamiento con esfingomielinasa). Si bien bajo nuestras condiciones experimentales no parecía probable que la SMS estuviera aportando significativamente a la formación del DAG en los sinaptosomas, se decidió corroborar esta hipótesis ensayando la actividad de la SMS. Para ello se evaluó la formación de SM utilizando [<sup>3</sup>H-colina]-DPPC como sustrato y, efectivamente, bajo nuestras condiciones experimentales no observamos generación de SM. Si bien se ha reportado que ambas isoformas de SMS regulan los niveles de SM y ceramida, otros autores demostraron que la inhibición de estas enzimas por la técnica del RNA de interferencia no produce cambios significativos en los niveles de DAG y PC (Li y col., 2007; Villani y col., 2008).

Teniendo en cuenta nuestros resultados podemos concluir que en las terminales sinápticas de la corteza cerebral de ratas adultas, la generación de DAG a partir de la hidrólisis de la PC es catalizada por la acción de la PC-PLC y por la vía de la PLD, siendo el aporte de estas vías de un 73 y 27% luego de 5 min de incubación y de un 60 y 40 % luego de 20 min de reacción respectivamente. El mismo aporte porcentual de las vías se observó luego de 20 min de incubación cuando se evaluó la hidrólisis de la PC en los sinaptosomas de la corteza cerebral de ratas seniles, utilizando al etanol como marcador de la PLD.

Resultados previos de nuestro laboratorio demostraron un aumento en la actividad de la PLD (medida como liberación de colina tritiada) en los Syn de la corteza cerebral de ratas seniles con respecto a la actividad en las terminales sinápticas de ratas adultas. Sin embargo, este aumento en la liberación de colina se observó en ausencia de

detergentes y en presencia de oleato de sodio y de PIP<sub>2</sub>, mientras que en ausencia de PIP<sub>2</sub> exógeno no se observaron variaciones en la actividad de la PLD como resultado del envejecimiento (Salvador y col., 2002). Además, la evaluación de la actividad de la PLD en presencia de PIP<sub>2</sub> se incrementó en presencia de GTPγS y del agregado de la fracción citosólica que contiene factores como ARF y otras proteínas G pequeñas (Salvador y col., 2002). Los resultados de este trabajo previo indicaban una mayor actividad de la PLD1 y de la isoforma dependiente de oleato en los Syn de ratas seniles, mientras que bajo nuestras condiciones experimentales es probable que la generación de PEth sea producto principalmente de la actividad de la PLD2, dado que esta isoforma presenta una mayor actividad basal y que se evaluó la reacción de transfosfatidilación sin el agregado de PIP<sub>2</sub>.

Los ensayos cinéticos en presencia de etanol permitieron determinar la constante aparente de Michaelis-Menten ( $K_M$ ) y la velocidad máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ ) para la PC-PLC sinaptosomal, parámetros que fueron calculados a partir del gráfico de Lineweaver-Burk. Los valores de  $K_M$  y  $V_{m\acute{a}x}$  fueron de 350  $\mu\text{M}$  y 3.7  $\text{nmol DAG} \times (\text{mg prote\acute{i}na} \times \text{h})^{-1}$  respectivamente. El único reporte previo acerca de los parámetros cinéticos de la PC-PLC fue publicado por Sheikhnejad y Srivastava en 1986, en este trabajo los autores aislaron y caracterizaron la PC-PLC del plasma seminal de toro. Sin embargo, a diferencia de nuestros ensayos, estos autores utilizaron para determinar los parámetros cinéticos la enzima purificada y dioleoil-PC como sustrato y el  $K_M$  y la  $V_{m\acute{a}x}$  determinados fueron de 100  $\mu\text{M}$  y 18  $\mu\text{moles} \times (\text{mg de enzima} \times \text{min})^{-1}$  (Sheikhnejad y Srivastava, 1986).

Aunque la estructura de la PC-PLC en células eucariotas no se conoce todavía, Clark y colaboradores en 1986 demostraron que los anticuerpos dirigidos contra la enzima de *Bacillus cereus* también reaccionaba específicamente con una proteína con actividad PC-PLC presente en monocitos humanos. Mediante la utilización de este anticuerpo para realizar una cromatografía de afinidad estos autores pudieron purificar una enzima con actividad de fosfolipasa C, que prefería como sustrato a la PC y que presentaba un peso molecular de 40 kDa determinado por WB (Clark y col., 1986).

La detección inmunológica de la PC-PLC en nuestro sistema experimental se llevó a cabo por ensayos de SDS-PAGE-Western Blot (WB) utilizando un suero policlonal anti-PC-PLC dirigido contra la enzima de *Bacillus cereus*. Mediante la utilización de este suero policlonal pudimos observar en los sinaptosomas la presencia de dos bandas muy próximas de un peso molecular cercano a 66 kDa, tanto en las terminales sinápticas de ratas adultas como de ratas seniles. Resultados similares fueron obtenidos en fibroblastos NIH 3T3 y en subpoblaciones de linfocitos B periféricos. En estas células se observó una banda de 66 kDa utilizando también un Ac policlonal anti-PC-PLC de *B. cereus* (Podo y col., 1996; Ramoni y col., 2001; Spadaro y col., 2006). Sin embargo, resultados publicados por este mismo grupo de trabajo revelaron la presencia de 2 bandas correspondientes a 66 y a 40 kDa en células NK y en células monocíticas U937 (Ramoni y col., 2001).

Por otra parte, ensayos de WB realizados con la PC-PLC purificada del plasma seminal de toro demostraron la presencia de dos bandas de 55 y 69 kDa. Cabe señalar que en este caso los autores utilizaron un Ac policlonal dirigido contra la misma PC-PLC purificada del plasma seminal. Dado que las cromatografías de exclusión molecular revelaron un peso molecular de 125 kDa, propusieron que la PC-PLC del plasma seminal de toro sería una proteína dimérica, con un peso molecular de 125 kDa conformada por dos subunidades de 55 y 69 kDa respectivamente (Sheikhnejad y Srivastava, 1986).

Las diferencias en cuanto al peso molecular y al requerimiento de los iones  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  refuerzan la teoría de la existencia de diferentes isoformas de la PC-PLC en mamíferos, con diferente localización subcelular y con la capacidad de mediar diferentes respuestas celulares.

La fuerte activación en la generación del DAG frente a los agentes tensioactivos sugería el carácter de proteína de membrana de las enzimas responsables de la formación de este lípido neutro. Por otra parte, es ampliamente reconocida la localización de la isoforma PLD2 en la membrana plasmática (Liscovitch y col., 2000; Exton, 2002; Foster y Xu, 2003). En base a estos antecedentes se decidió estudiar la actividad de la PC-PLC en las fracciones constituyentes de los sinaptosomas. Para ello se

aislaron la fracción de membrana (SPM) y el soluble (Sol) y se evaluó la generación de DAG en dichas fracciones.

Nuestros resultados evidenciaron que en la fracción SPM la generación de DAG fue un 73% mayor respecto a la generación en sinaptosomas mientras que en la fracción soluble la hidrólisis de la PC a DAG fue prácticamente indetectable. Mediante la utilización de etanol determinamos que en las SPM el 65% del DAG generado provino de la actividad de la PC-PLC y el 35% de la vía de la PLD. Por su parte, la inhibición de la DAGL en la fracción de membrana solamente incrementó los niveles de DAG en un 16% respecto al control.

La localización de la PC-PLC en la membrana plasmática fue reportada también en células NK así como también en otros compartimentos citoplasmáticos, la activación de estas células por la IL-2 induce una mayor translocación de la enzima hacia la membrana celular (Ramoni y col., 2001; Spadaro y col., 2006). En fibroblastos NIH 3T3 la PC-PLC presenta una localización perinuclear, sin embargo, ante el estímulo mitogénico del PDGF se produce la translocación de la enzima hacia la membrana plasmática y hacia el núcleo (Ramoni y col., 2004). Por lo tanto, se ha propuesto que la PC-PLC podría cumplir distintas funciones en base a su localización celular, tal como ocurre con otras fosfolipasas. A su vez, la localización celular parece depender de la activación de la enzima ya que el tratamiento con el D609 inhibe la translocación inducida por la IL-2 y el PDGF (Ramoni y col., 2001; Ramoni y col., 2004; Spadaro y col., 2006).

Estudiamos también la generación de DAG a partir de la PC en la fracción de membrana resistente a detergentes. Estas membranas fueron obtenidas por el tratamiento de los Syn de ratas adultas y seniles con Triton X-100 al 1% y a 4°C. Se ha postulado que las membranas obtenidas por este procedimiento representan a los microdominios tipo "rafts" presentes en las células intactas (London y Brown, 2000).

Se han denominado como "rafts" o balsas lipídicas a pequeños dominios de la membrana, los cuales están enriquecidos en colesterol, esfingolípidos y ciertas proteínas residentes entre las que se incluyen las proteínas ancladas por glicofosfatidilinositol

(GPI). Estos microdominios son capaces de compartimentalizar diversos procesos celulares, tales como la adhesión celular, el tráfico intracelular y los eventos de transducción de señales, ya que facilitan la formación de complejos proteicos y la activación de vías de señalización específicas (Simons y Toomre, 2000; Helms y Zurzolo, 2004; Pike, 2006).

Además de la SM y el Col, en estos microdominios se encuentran especies moleculares mayormente saturadas de PC y el gangliósido GM1, el cual ha sido utilizado como marcador de rafts (Michel y Bakovic, 2007). La composición lipídica de estos microdominios, la alta saturación de los ácidos grasos, y el enriquecimiento en colesterol hacen que se encuentren en un estado líquido ordenado.

Las caveolas se han clasificado dentro de estos dominios tipo rafts. Estos microdominios constituyen invaginaciones (enriquecidas no solo en SM y Col sino también en la proteína caveolina) que participan en procesos de endocitosis (Cohen y col., 2004; Michel y Bakovic, 2007; Lajoie y Nabi, 2007).

En las DRMs obtenidas de los Syn de ratas adultas el enriquecimiento en SM fue de un 145 % con respecto al contenido en los sinaptosomas, mientras que en membranas provenientes de animales seniles el contenido de SM fue un 60% mayor en las DRMs respecto a los Syn. Las DRMs, tanto de animales adultos como seniles, se encontraron enriquecidas en un 40% en colesterol respecto a los sinaptosomas. Además, las DRMs presentaron un mayor % de PC mientras que el contenido de PE y PS disminuyó respecto a los Syn. Una distribución similar de los fosfolípidos se observó en las DRMs obtenidas de los segmentos externos de bastones retinianos obtenidos de ojos bovinos (Martin y col., 2005).

El envejecimiento no modificó la composición fosfolipídica ni el contenido de colesterol de los Syn, tampoco se observaron variaciones en la composición de los DRMs. La excepción la constituyó la SM, la cual representó un mayor porcentaje tanto en los Syn como en las DRMs de animales seniles con respecto a los adultos.

Tampoco se detectaron diferencias en cuanto al contenido de GM1 en las DRMs y en los Syn. Esto indica que en nuestro modelo experimental el GM1 no constituye un

buen marcador de dominios tipo rafts, posiblemente debido al alto contenido de este gangliósido en las membranas del sistema nervioso en comparación con otras membranas celulares (Molander-Melin y col., 2005).

Nuestros resultados concuerdan con hallazgos previos de nuestro laboratorio los cuales reportaron que en la corteza cerebral de rata no se observan cambios significativos con el envejecimiento, ni en el contenido de los distintos glicerofosfolípidos ni en el contenido de colesterol, aunque si existen cambios en la composición de ácidos grasos de los fosfolípidos (Lopez y col., 1995; Giusto y col., 2002). Por otro lado, también se había reportado el aumento en los niveles de SM en los hemisferios cerebrales de ratas seniles con respecto a los niveles en ratas adultas (Giusto y col., 1992).

Cuando se determinó el perfil proteico de las DRMs y de los sinaptosomas, observamos que las DRMs de ratas adultas y seniles presentan un perfil de proteínas distinto al de los sinaptosomas. Particularmente las DRMs de ratas adultas y seniles se encontraron enriquecidas en las proteínas marcadoras de rafts caveolina y c-Src, así como también en la isoforma PLD1. Por su parte, los ensayos de Slot blot mostraron que la PC-PLC se localiza en ambas fracciones.

La caracterización tanto lipídica como proteica de la fracción DRM demostró que estas membranas presentan características inequívocas propias de los dominios de membrana tipo rafts. En las DRMs también se observó la generación de DAG a partir de la PC, sin embargo la formación de este mensajero lipídico no disminuyó en presencia de etanol lo que indica que en nuestras condiciones experimentales no se pudo detectar la actividad de la PLD en estas membranas. Por el contrario, la actividad específica de la PC-PLC (medida como generación de DAG en presencia de etanol) fue aproximadamente un 60% mayor en las DRMs de animales adultos y seniles con respecto a los Syn.

La localización de la isoforma PLD1 en los dominios de membranas resistentes a detergentes y en las caveolas fue previamente reportada en células sanguíneas mononucleares (Diaz y col., 2002; Diaz y col., 2005), en fibroblastos de embrión de rata (células 3Y1) y en células de riñón COS-7 (Kim y col., 1999; Kim y col., 2000). Ambas

isoformas de PLD (PLD1 y 2) se hallaron en dominios enriquecidos en caveolina de fibroblastos NIH 3T3 (Xu y col., 2000), mientras que solo la PLD2 se encontró en estos microdominios aislados de queratinocitos humanos (Czarny y col., 1999; Czarny y col., 2000).

Si bien en nuestro modelo experimental la PLD1 se encontró enriquecida en las DRMs, no pudimos evidenciar su actividad en estos dominios lo cual puede deberse, entre varias razones, a la ausencia de cofactores indispensables como proteínas G pequeñas. También se ha propuesto que la localización de la PLD1 en los rafts sería un mecanismo estratégico para disminuir su actividad, ya que la disrupción de estos dominios por el tratamiento con metil- $\beta$  ciclodextrina induce la exclusión de la PLD1 de estos dominios y su activación (Diaz y col., 2002).

Asimismo, se ha demostrado que la caveolina es capaz de comportarse como una proteína de andamiaje e interactuar directamente con diversas proteínas de señalización, como Src, proteínas G, PKC $\alpha$  y el receptor de EGF (Okamoto y col., 1998). Kim y colaboradores demostraron que la PLD1 purificada del cerebro de rata se une específicamente a la caveolina-1. En este mismo trabajo se reportó que la caveolina es capaz de inhibir la actividad basal de la PLD así como también la actividad de la PLD dependiente de PKC $\alpha$  interfiriendo en la interacción de esta quinasa con la PLD (Kim y col., 1999).

Los ensayos de Slot blot y la generación de DAG en presencia de etanol demostraron la localización de la PC-PLC en las DRMs. Este hallazgo constituye la primera evidencia de la localización de esta enzima en dominios de membrana tipo rafts en el sistema nervioso central. El único reporte previo acerca de la presencia de la PC-PLC en dominios de membrana resistente a detergentes fue realizado en células NK (Cecchetti y col., 2007).

En resumen, nuestros hallazgos representan la primera evidencia experimental sobre la presencia de la vía de la PC-PLC en las terminales sinápticas de la corteza cerebral de ratas adultas y seniles. Las actividades de la PC-PLC junto a la PLD son las responsables de la generación del DAG a partir de la hidrólisis de la PC en los

sinaptosomas. Asimismo pudimos demostrar que la actividad de la PC-PLC se localiza en la membrana plasmática sinaptosomal, así como también en dominios especializados de la membrana.

## CAPÍTULO II:

"EFECTO DEL ESTRÉS OXIDATIVO INDUCIDO POR EL  
 $FeSO_4$  EN LA HIDRÓLISIS DE LA FOSFATIDILCOLINA"

## RESULTADOS

Experimentos realizados en nuestro laboratorio demostraron que la exposición de las terminales sinápticas al  $\text{FeSO}_4$  (50  $\mu\text{M}$ ) constituye un modelo apropiado para el estudio de los efectos del estrés oxidativo en el sistema nervioso (Uranga y col., 2007). El objetivo de la segunda parte de esta tesis doctoral fue estudiar el efecto de la injuria oxidativa inducida por  $\text{FeSO}_4$  (50  $\mu\text{M}$ ) sobre las vías de transducción de señales que involucran segundos mensajeros lipídicos a partir de la PC.

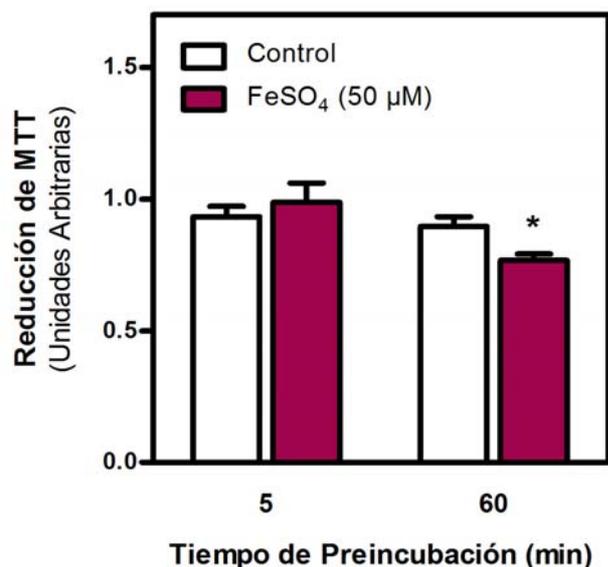
### II. 1. EVALUACIÓN DEL EFECTO DELETÉREO DEL $\text{FeSO}_4$ EN EL SISTEMA.

En primer lugar se evaluó el efecto deletéreo del  $\text{Fe}^{2+}$  en los Syn bajo nuestras condiciones experimentales. El daño producido por la sobrecarga de  $\text{FeSO}_4$  se evaluó midiendo la funcionalidad mitocondrial, determinando la integridad de la membrana plasmática sinaptosomal y evaluando el nivel de peroxidación lipídica. Para realizar dichos ensayos los sinaptosomas fueron resuspendidos en buffer TBM e incubados por distintos tiempos en ausencia (control) o presencia de  $\text{FeSO}_4$  50 $\mu\text{M}$  bajo una corriente de  $\text{O}_2:\text{CO}_2$  (95:5, v/v).

#### II. 1. 1. Evaluación de la viabilidad mitocondrial.

La capacidad funcional de las mitocondrias se evaluó mediante el ensayo del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT). Este ensayo se basa en medir la reducción metabólica del MTT realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa a un compuesto insoluble de color azul (cristales de formazán), permitiendo determinar la capacidad reductora mitocondrial de los sinaptosomas tratados. Por lo tanto, cuanto mayor es la actividad reductora mitocondrial, mayor es la reducción del MTT a cristales de formazán.

La reducción del MTT se evaluó en los sinaptosomas incubados en la condición control y en los sinaptosomas expuestos al inductor de estrés oxidativo, luego de 5 y de 60 min de tratamiento.

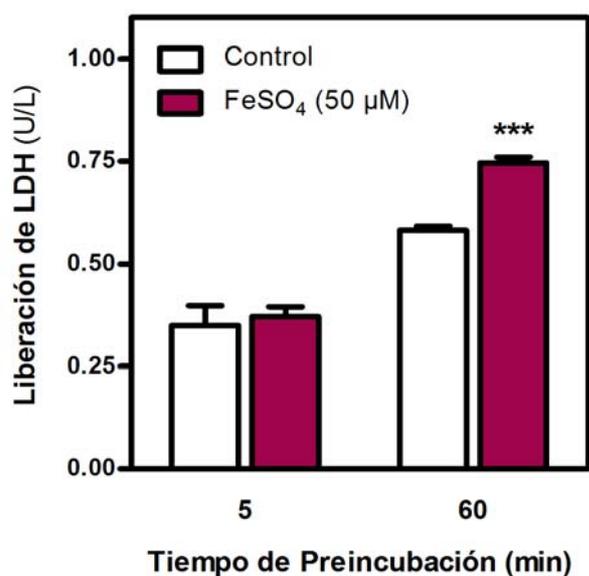


**Figura 40. Evaluación de la funcionalidad mitocondrial.** Los Syn de ratas adultas se resuspendieron en buffer TBM y se preincubaron por 5 y 60 min a 37°C en la condición control (vehículo) o en presencia de FeSO<sub>4</sub> (50 µM). Luego de la preincubación se evaluó la reducción del MTT a cristales de formazán como se detalla en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como unidades arbitrarias y se compararon con el control. \* $p < 0,05$ .

El tratamiento por 5 min con el FeSO<sub>4</sub> no afectó la capacidad reductora de las mitocondrias mientras que luego de 60 min de preincubación en presencia del Fe<sup>2+</sup> disminuyó significativamente (14%) la reducción del MTT (Figura 40).

### II. 1. 2. Evaluación de la integridad de la membrana plasmática.

El daño producido en la membrana plasmática sinaptosomal por la injuria oxidativa se evaluó midiendo la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) al medio de incubación, luego de 5 y de 60 min de preincubación en presencia de FeSO<sub>4</sub> 50 µM o en la condición control. El tratamiento con el Fe<sup>2+</sup> por 5 min no afectó la integridad de la membrana plasmática, sin embargo la liberación de LDH al medio se incrementó en un 28% con respecto a la condición control luego de 60 min de preincubación en presencia de Fe<sup>2+</sup> (Figura 41).



**Figura 41. Evaluación de la integridad de la membrana plasmática.**

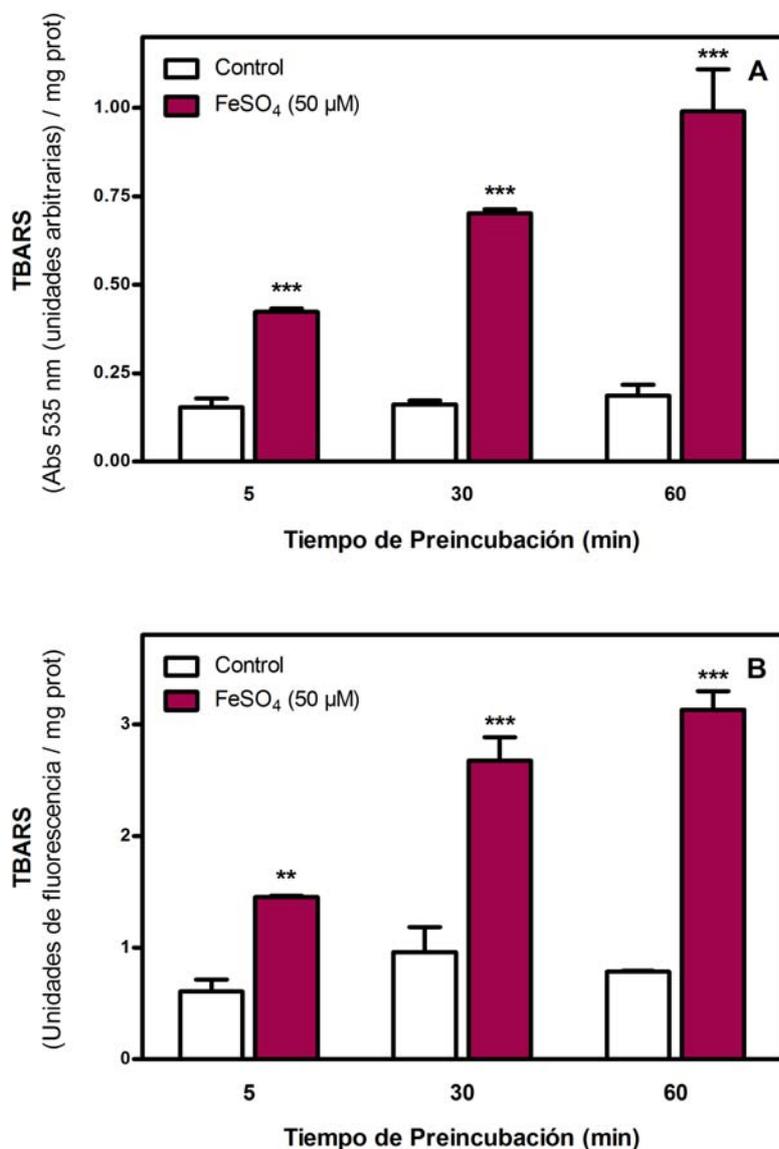
Los Syn de ratas adultas se preincubaron en las condiciones descritas en la Figura 40. Luego de la preincubación se evaluó la actividad de la LDH en el medio de incubación como se detalla en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como unidades por litro (U/L) y se compararon con la condición control. \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 11. 1. 3. Medición de la peroxidación lipídica.

La peroxidación lipídica inducida por el hierro se evaluó midiendo la generación de sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico (TBARS). En éste método, el ácido tiobarbitúrico (TBA) reacciona con el malondialdehído (MDA), un producto secundario de la peroxidación de lípidos, para generar un color rojo el cual se puede detectar espectroscópicamente.

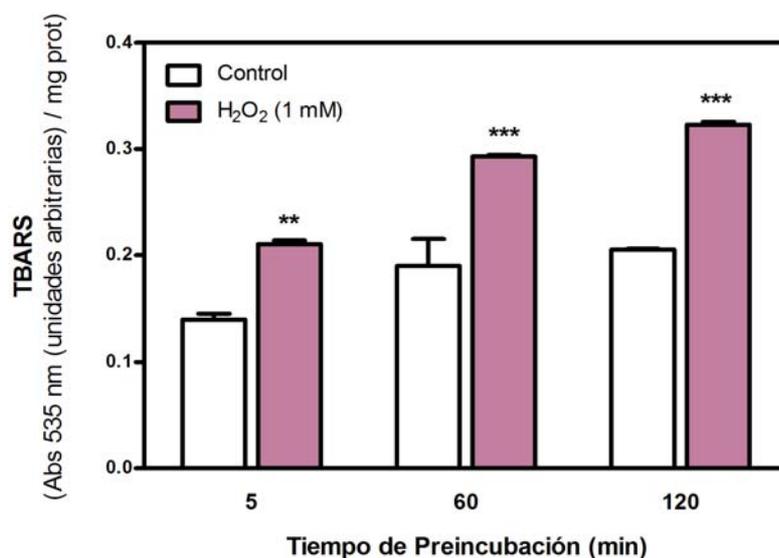
La formación de TBARS se midió por dos métodos realizados en paralelo, uno espectrofotométrico y otro fluorimétrico. Cuando se utilizó el método espectrofotométrico la formación de TBARS se incrementó 1,8; 3,3 y 4,5 veces con respecto al control luego de 5, 30 y 60 min de incubación con  $\text{Fe}^{2+}$  respectivamente (Figura 42A).

Resultados similares se obtuvieron con el método fluorimétrico, el  $\text{Fe}^{2+}$  incrementó la formación de TBARS 1,4; 1,8 y 3 veces respecto a la condición control (Figura 42B).



**Figura 42. Evaluación de la peroxidación lipídica inducida por el FeSO<sub>4</sub>.** Los Syn de ratas adultas se preincubaron en las condiciones descritas en la Figura 40 por 5, 30 y 60 min. Luego de la preincubación se evaluó la generación de TBARS como se describe en Materiales y Métodos. (A) Medición de TBARS por el método espectrofotométrico. Los resultados se expresan como unidades arbitrarias/ mg proteína y se compararon con la condición control. \*\*\*  $p < 0,001$ . (B) Medición de TBARS por el método fluorimétrico. Los resultados se expresan como unidades de fluorescencia/mg proteína y se compararon con la condición control. \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

Para comparar la peroxidación lipídica generada por el  $\text{FeSO}_4$  con la generada por otro inductor de estrés oxidativo, la generación de TBARS también se evaluó en sinaptosomas expuestos al  $\text{H}_2\text{O}_2$  1 mM utilizando el método espectrofotométrico (Figura 43).

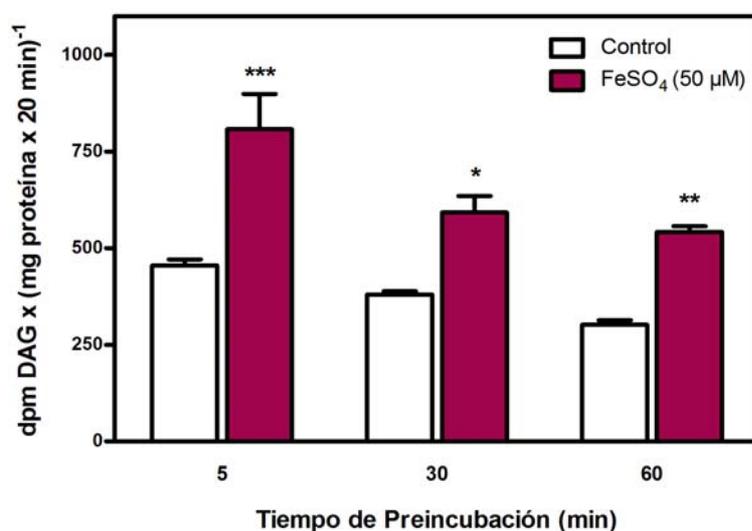


**Figura 43. Evaluación de la peroxidación lipídica inducida por el  $\text{H}_2\text{O}_2$ .** Los Syn de ratas adultas se preincubaron por 5, 60 y 120 min a 37°C en la condición control (vehículo) o en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1 mM). Luego de la preincubación se evaluó la generación de TBARS por el método espectrofotométrico. Los resultados se expresan como unidades arbitrarias/ mg proteína y se compararon con la condición control. \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

Mientras que la preincubación de los Syn con  $\text{Fe}^{2+}$  incrementó la generación de TBARS en 1,8 y 4,5 veces con respecto al control a los 5 y a los 60 min, el tratamiento de los Syn con  $\text{H}_2\text{O}_2$  1 mM incrementó la formación de TBARS 0,5 veces con respecto al control a los 5 y a 60 min e incluso a tiempos mayores de preincubación (120 min). Estos resultados indican que el  $\text{FeSO}_4$  es un inductor de la peroxidación lipídica mucho más potente que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  y su efecto deletéreo sobre los lípidos de las membranas se incrementa con el tiempo de preincubación.

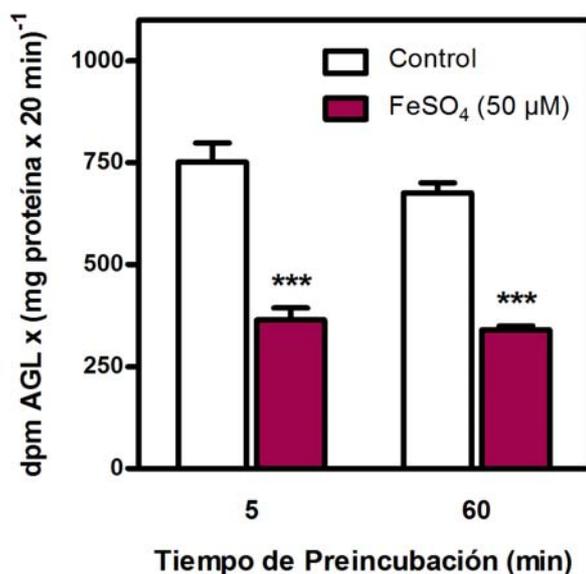
## II. 2. HIDRÓLISIS DE LA PC EN LAS TERMINALES SINÁPTICAS EXPUESTAS AL $\text{FeSO}_4$ .

Para evaluar la hidrólisis de la PC bajo condiciones de estrés oxidativo los sinaptosomas provenientes de la corteza cerebral de ratas adultas se resuspendieron en medio TBM y se incubaron con  $\text{FeSO}_4$  ( $50 \mu\text{M}$ ) o vehículo (condición control) por distintos tiempos. A continuación se midió la generación de DAG y AGL a partir de la PC.



**Figura 44. Generación de DAG a partir de PC en los Syn expuestos al estrés oxidativo.** Los Syn de ratas adultas se preincubaron por 5, 30 y 60 min a  $37^\circ\text{C}$  en la condición control (vehículo) o en presencia de  $\text{FeSO}_4$  ( $50 \mu\text{M}$ ). La hidrólisis de la PC se evaluó en presencia de 45.000 dpm de  $[^{14}\text{C}]$ -DPPC, 0,125 mM de DPPC y Triton X-100 0,1%. La reacción enzimática se llevó a cabo durante 20 min a  $37^\circ\text{C}$  y los resultados se expresan como dpm DAG x (mg proteína x 20 min)<sup>-1</sup> y se compararon con el control. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

La exposición de los Syn al hierro incrementó la generación de DAG a partir de la PC con respecto a la condición control en un 77, 50 y 65% luego de 5, 30 y 60 min de preincubación respectivamente (Figura 44). Por el contrario, la generación de AGL se inhibió en un 50% respecto al control luego de 5 y 60 min de preincubación con el hierro (Figura 45).

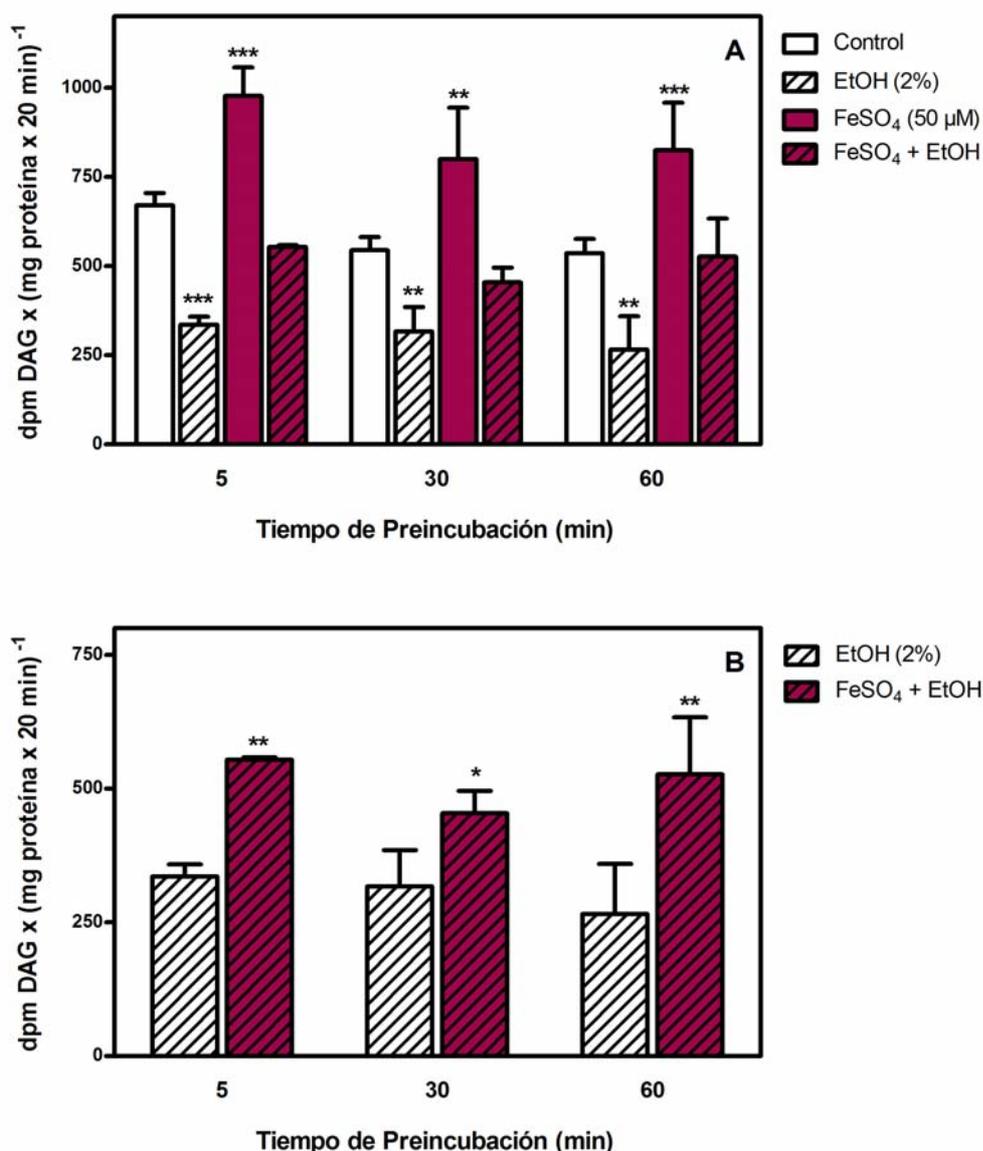


**Figura 45. Generación de AGL a partir de PC en los Syn expuestos al estrés oxidativo.** Los Syn de ratas adultas se preincubaron por 5 y 60 min a 37°C en la condición control (vehículo) o en presencia de FeSO<sub>4</sub> (50 μM). La hidrólisis de la PC se evaluó como se describe en la Figura 44. Los resultados se expresan como dpm AGL x (mg proteína x 20 min)<sup>-1</sup> y se compararon con el control. \*\*\* $p < 0,001$ .

### II. 3. PARTICIPACIÓN DE LAS VÍAS DE LA PC-PLC Y DE LA PLD EN LA GENERACIÓN DE DAG INDUCIDA POR EL Fe<sup>2+</sup>.

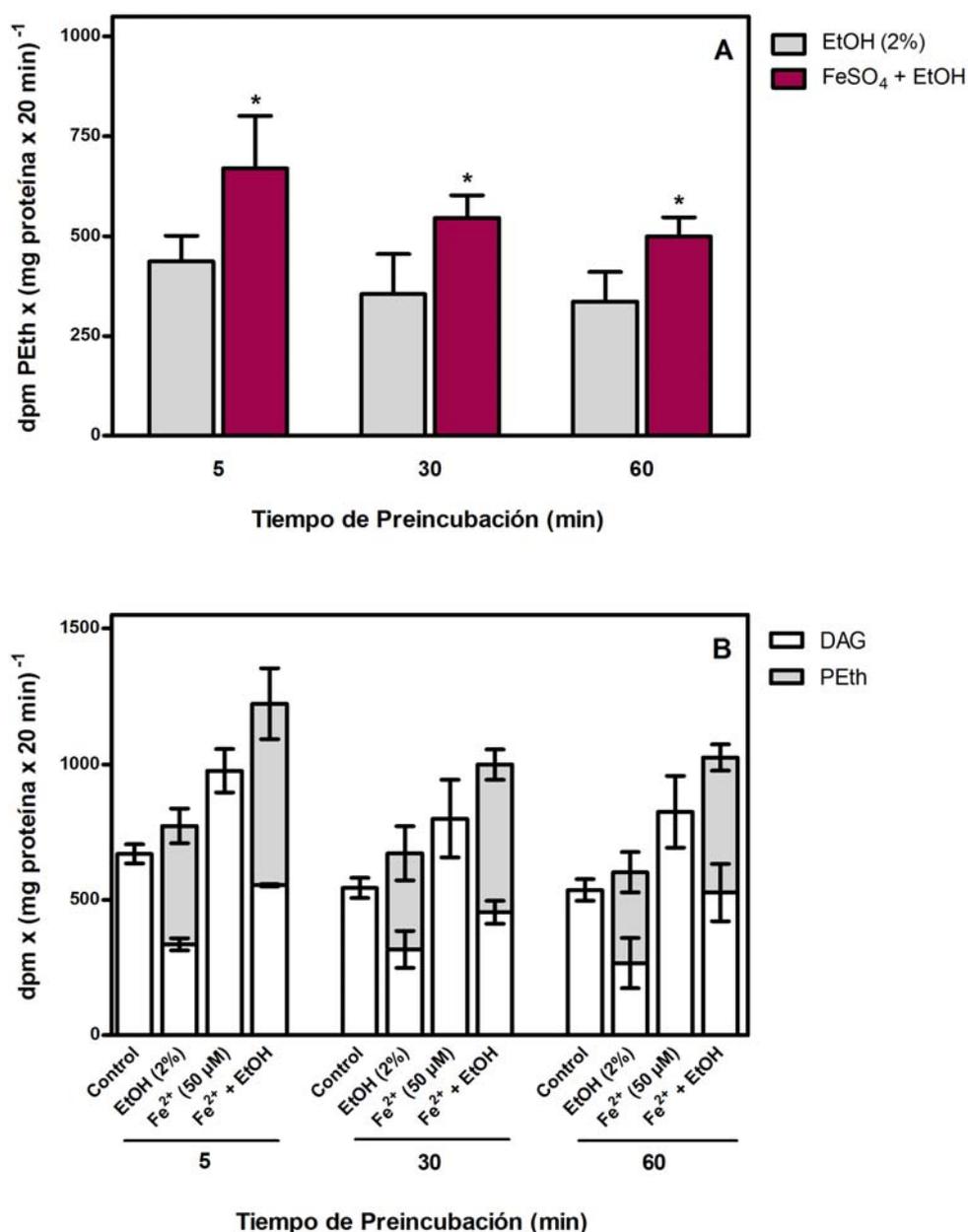
Con el fin de discriminar el origen enzimático del aumento en la generación de DAG bajo condiciones de estrés oxidativo, se incluyó etanol (2%) en el ensayo. Como se detalló en el capítulo I, el agregado de etanol en el ensayo enzimático desvía la formación de PA, producto de la actividad de la PLD, hacia la formación de PEth.

La Figura 46A muestra la generación de DAG a partir de PC en ausencia o presencia de etanol 2%, en Syn incubados con o sin FeSO<sub>4</sub> (50 μM). La actividad PC-PLC (medida como la generación de DAG en presencia de etanol) se incrementó en un 65, 43 y 100% respecto al control luego de 5, 30 y 60 min de preincubación en condiciones oxidativas respectivamente (Figura 46B).



**Figura 46. Efecto del etanol en la generación de DAG en condiciones de injuria oxidativa.** Los Syn de ratas adultas se preincubaron por 5, 30 y 60 min en la condición control (vehículo) o en presencia de FeSO<sub>4</sub> (50 μM). La generación de DAG a partir de la PC se evaluó en presencia y ausencia de etanol (2%) como se describe en la Figura 44 incluyendo 60.000 dpm de [<sup>14</sup>C]-DPPC por ensayo. (A) Generación de DAG en ausencia y presencia de etanol. (B) Actividad de la PC-PLC medida en presencia de etanol 2%. Los resultados se expresan como dpm DAG x (mg proteína x 20 min)<sup>-1</sup>. \**p* < 0,05, \*\**p* < 0,01, \*\*\**p* < 0,001.

Paralelamente se evaluó la actividad de la PLD midiendo la generación de PEth en las mismas condiciones experimentales.



**Figura 47. Generación de PEth en condiciones de injuria oxidativa.** Los Syn de ratas adultas se preincubaron por 5, 30 y 60 min en la condición control o en presencia de FeSO<sub>4</sub> (50 μM). La generación de PEth se evaluó en presencia de etanol (2%) como se describe en la Figura 44 incluyendo 60.000 dpm de [<sup>14</sup>C]-DPPC por ensayo. (A) Generación de PEth. Los resultados se expresan como dpm PEth x (mg proteína x 20 min)<sup>-1</sup> y se compararon con el control (etanol 2%). \**p* < 0,05. (B) Sumatoria de los niveles de DAG y de PEth en las distintas condiciones experimentales. Los resultados se expresan como dpm x (mg proteína x 20 min)<sup>-1</sup>.

La Figura 47A muestra que la formación de PEth se incrementó en un 50% respecto al control luego de 5, 30 y 60 min de exposición al hierro. Este aumento en la formación de PEth demuestra que la PLD también se activa en la condición de estrés oxidativo inducido por  $\text{Fe}^{2+}$ . La Figura 47B muestra que, en presencia de etanol, los niveles de DAG sumados a los niveles de PEth concuerdan con los niveles totales de DAG generados en la condición sin etanol. Esta concordancia se observa tanto en la condición control como en los Syn preincubados con hierro.

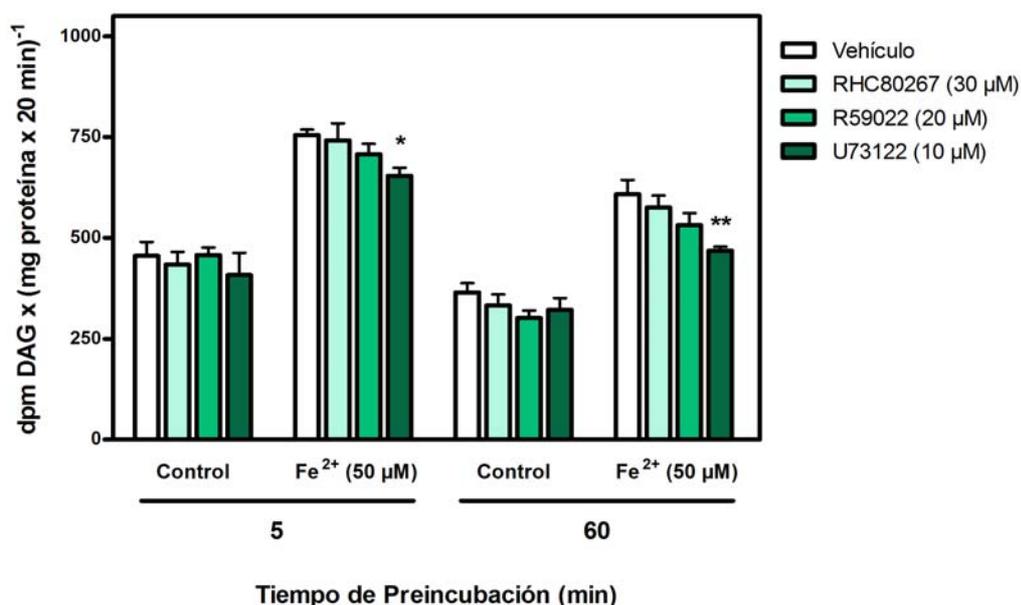
Nuestros resultados demuestran que durante la injuria oxidativa se activan vías de degradación de la PC en las terminales sinápticas.

#### II. 4. PARTICIPACIÓN DE LAS VÍAS METABOLIZADORAS DEL DAG.

Al ser el DAG un potente segundo mensajero lipídico sus niveles celulares son estrictamente regulados por enzimas que lo metabolizan, ya sea hacia MAG por la actividad de la DAGL o hacia la formación de ácido fosfatídico por la acción de la DAGK. Para determinar la participación de estas enzimas metabolizadoras del DAG, el ensayo enzimático se llevó a cabo en presencia de inhibidores específicos de estas vías: se utilizó RHC80267 (30  $\mu\text{M}$ ) como inhibidor de la DAGL y R59022 (20  $\mu\text{M}$ ) para inhibir a la DAGK. Además, se evaluó el efecto de la inhibición de la vía de la  $\text{PIP}_2$ -PLC coincubando los Syn con U73122 (10  $\mu\text{M}$ ). El efecto de estos inhibidores se evaluó tanto en la condición de injuria oxidativa como en la condición control.

El nivel de DAG generado no se vio modificado en presencia de los inhibidores de la DAGL y de la DAGK, ni en la condición control ni en la condición expuesta al  $\text{Fe}^{2+}$ , independientemente del tiempo de incubación (Figura 48).

Los niveles de DAG generados en la condición control no fueron modificados por la coincubación con U73122 (inhibidor de la  $\text{PIP}_2$ -PLC). Sin embargo, la inhibición de la  $\text{PIP}_2$ -PLC disminuyó los niveles de DAG generados en los sinaptosomas expuestos al  $\text{Fe}^{2+}$ . Esta disminución fue de un 11% y de un 23% luego de 5 y 60 min de coincubación con el oxidante y el U73122, respectivamente (Figura 48).



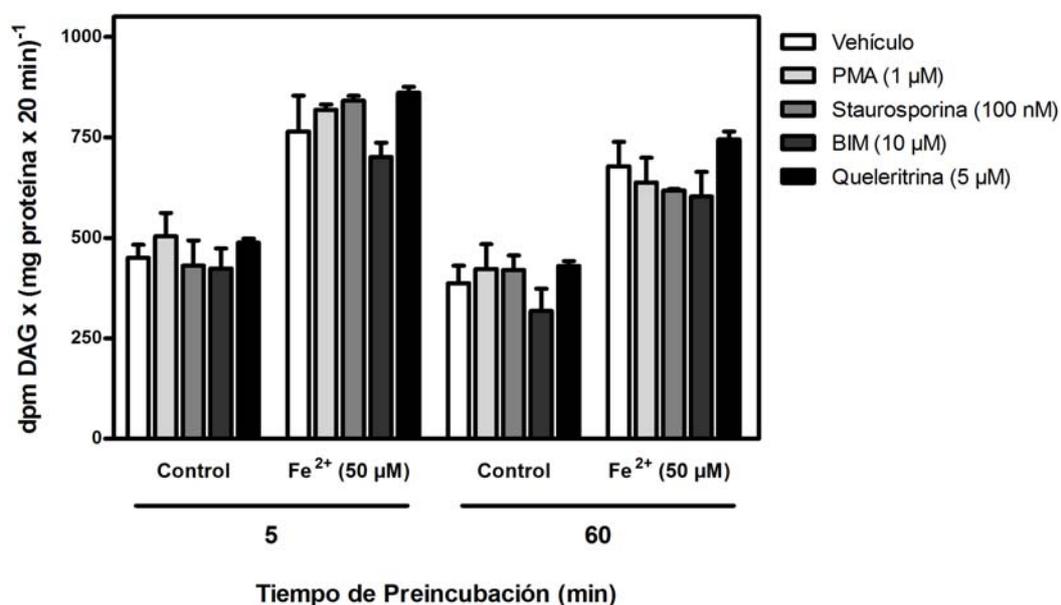
**Figura 48. Inhibición de las vías metabolizadoras del DAG y de la PIP<sub>2</sub>-PLC.** Los Syn de ratas adultas tratados por 5 y 60 min en la condición control o en presencia de FeSO<sub>4</sub> (50 μM), se coincubaron con RHC80267 (30 μM), R59022 (20 μM), U73122 (10 μM) o vehículo. La generación de DAG se evaluó como se describe en la Figura 44. Los resultados se expresan como dpm DAG x (mg proteína x 20 min)<sup>-1</sup> y se compararon con los obtenidos en la condición incubada con el vehículo. \**p* < 0,05, \*\**p* < 0,01.

## II. 5. EVALUACIÓN DEL ROL DE LA PKC EN LA GENERACIÓN DE DAG.

La disminución en la generación de DAG inducida por el inhibidor de la PIP<sub>2</sub>-PLC (U73122) sugería una posible participación de proteínas quinasas C en la hidrólisis de la PC, dado que las PKCs son uno de los efectores corriente abajo de la activación de la PIP<sub>2</sub>-PLC. Es por ello que se evaluó el rol de la PKC en la generación de DAG, para ello la hidrólisis de la PC se midió en presencia de PMA 1 μM (éster de forbol activador de PKC) y de distintos inhibidores de PKC (staurosporina 100 nM, bisindolilmaleimida (BIM) 10 μM y queleritrina 5 μM). El efecto de estos reguladores de PKC se evaluó a los 5 y a los 60 min, tanto en la condición control como en Syn incubados en presencia de hierro.

La Figura 49 muestra que la incubación con PMA o con los distintos inhibidores de PKC no modificó los niveles de DAG generados, ni en la condición control ni en los Syn expuestos a la injuria oxidativa. Estos resultados indican que la disminución en la

producción del DAG a partir de PC observada en presencia del inhibidor de la PIP<sub>2</sub>-PLC no es un evento mediado por PKC.



**Figura 49. Evaluación del rol de la PKC en la generación de DAG.** Los Syn de ratas adultas tratados por 5 y 60 min en la condición control o en presencia de FeSO<sub>4</sub> (50 μM), se coincubaron con PMA (1 μM), staurosporina (100 nM), BIM (10 μM), queleritrina (5 μM) o vehículo. La generación de DAG se evaluó como se describe en la Figura 44. Los resultados se expresan como dpm DAG x (mg proteína x 20 min)<sup>-1</sup> y se compararon con los obtenidos en la condición incubada con el vehículo. \**p* < 0,05, \*\**p* < 0,01.

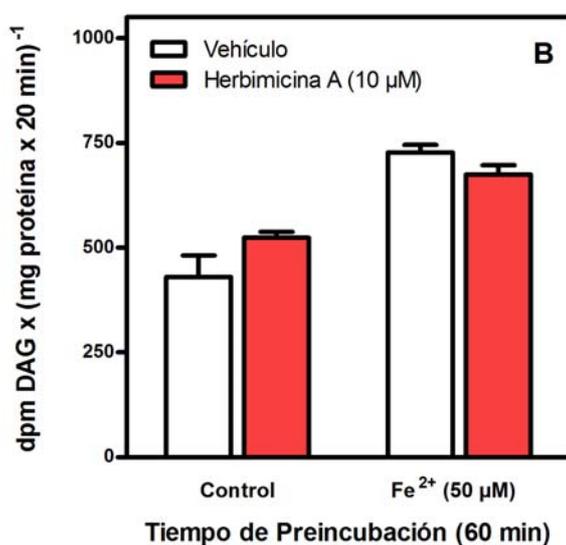
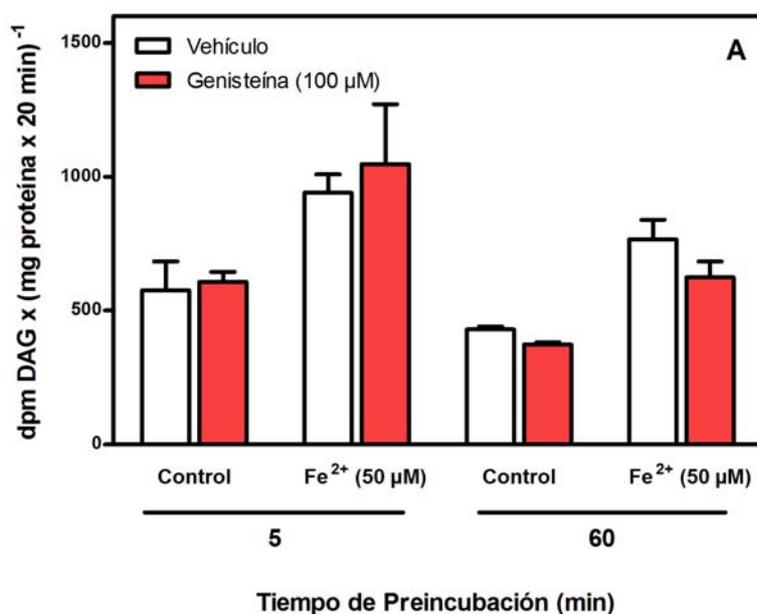
## II. 6. INHIBICIÓN DE TIROSINAS QUINASAS.

La fosforilación en tirosinas es un evento temprano que aparece en situaciones de estrés oxidativo (Lu y col., 2002; Kaul y col., 2005; Haorah y col., 2007). Asimismo, resultados previos de nuestro laboratorio demostraron que la fosforilación en tirosinas se incrementa en las terminales sinápticas expuestas al FeSO<sub>4</sub> (Uranga y col., 2007).

Para evaluar el efecto de la fosforilación en tirosinas en la hidrólisis de PC las incubaciones en la condición control y experimental se llevaron a cabo en presencia de los inhibidores de tirosinas quinasas, genisteína (Figura 50A) y herbimicina A (Figura 50B).

La coincubación por 5 o por 60 min con genisteína, tanto con el vehículo como con el Fe<sup>2+</sup>, no modificó la generación de DAG a partir de PC. Tampoco se modificaron

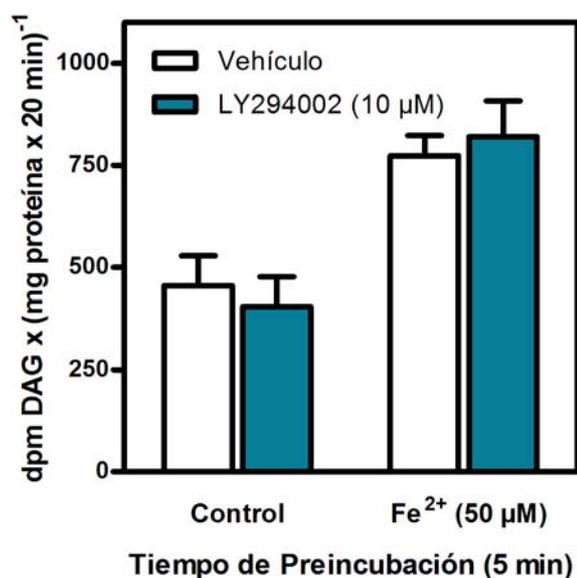
los niveles de DAG por la coincubación con herbimicina A durante 60 min. Estos resultados indican que la formación de DAG, tanto en la condición control como en Syn sometidos al estrés oxidativo, sería un evento independiente de la fosforilación en tirosinas.



**Figura 50. Evaluación del rol de las tirosinas quinasas en la generación de DAG.** (A) Efecto de la genisteína. Los Syn de ratas adultas tratados por 5 y 60 min en la condición control o en presencia de FeSO<sub>4</sub> (50 μM), se coincubaron con genisteína (100 μM) o con el vehículo. (B) Efecto de la herbimicina A. Los Syn de ratas adultas tratados por 60 min en la condición control o en presencia de FeSO<sub>4</sub> (50 μM), se coincubaron con herbimicina A (10 μM) o con el vehículo. En ambos casos la generación de DAG se evaluó como se describe en la Figura 44. Los resultados se expresan como dpm DAG x (mg proteína x 20 min)<sup>-1</sup> y se compararon con los obtenidos en la condición incubada con el vehículo.

## II. 7. PARTICIPACIÓN DE LA VÍA DE LA PI3K EN LA GENERACIÓN DE DAG A PARTIR DE LA PC.

En las terminales sinápticas de la corteza cerebral de rata el estrés oxidativo inducido por  $\text{FeSO}_4$  estimula la actividad de la PI3K. Este estímulo se observó luego de tiempos cortos de incubación con el agente inductor de estrés oxidativo (Uranga y col., 2007). Con el fin de estudiar la interrelación entre la vía PI3K y las vías generadoras de DAG a partir de la PC, los sinaptosomas se incubaron por 5 min con  $\text{Fe}^{2+}$  50  $\mu\text{M}$  o con el vehículo en presencia del inhibidor de la PI3K, LY294002 (10  $\mu\text{M}$ ). Sin embargo, la generación de DAG inducida luego de 5 min de incubación con el  $\text{Fe}^{2+}$  no se modificó por la inhibición de la vía de la PI3K (Figura 51).

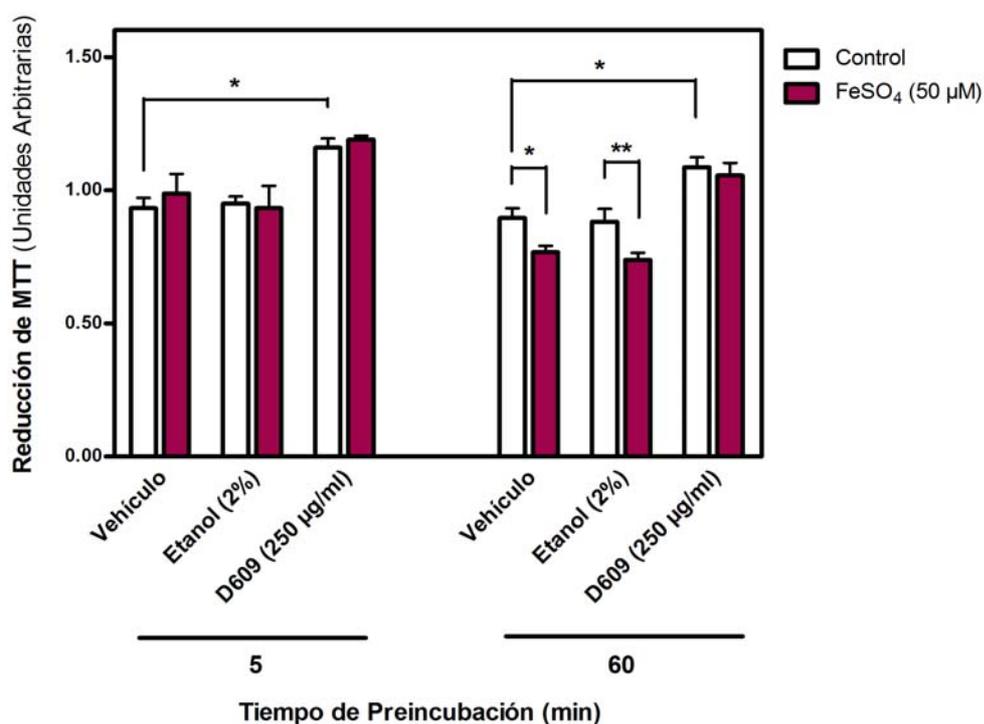


**Figura 51. Inhibición de la PI3K.** Los Syn de ratas adultas tratados por 5 min en la condición control o en presencia de  $\text{FeSO}_4$  (50  $\mu\text{M}$ ), se coincubaron con LY294002 (10  $\mu\text{M}$ ) o con el vehículo. La generación de DAG se evaluó como se describe en la Figura 44. Los resultados se expresan como dpm DAG x (mg proteína x 20 min)<sup>-1</sup> y se compararon con los obtenidos en la condición incubada con el vehículo.

## II. 8. EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LAS VÍAS GENERADORAS DE DAG EN LA VIABILIDAD SINAPTOSOMAL.

### II. 8. 1. Efecto del etanol y del D609 sobre la funcionalidad mitocondrial.

Para evaluar el rol de la PLD y de la PC-PLC en la viabilidad mitocondrial, la reducción del MTT se ensayó en presencia de etanol (2%) y de D609 (250  $\mu\text{g/ml}$ ).

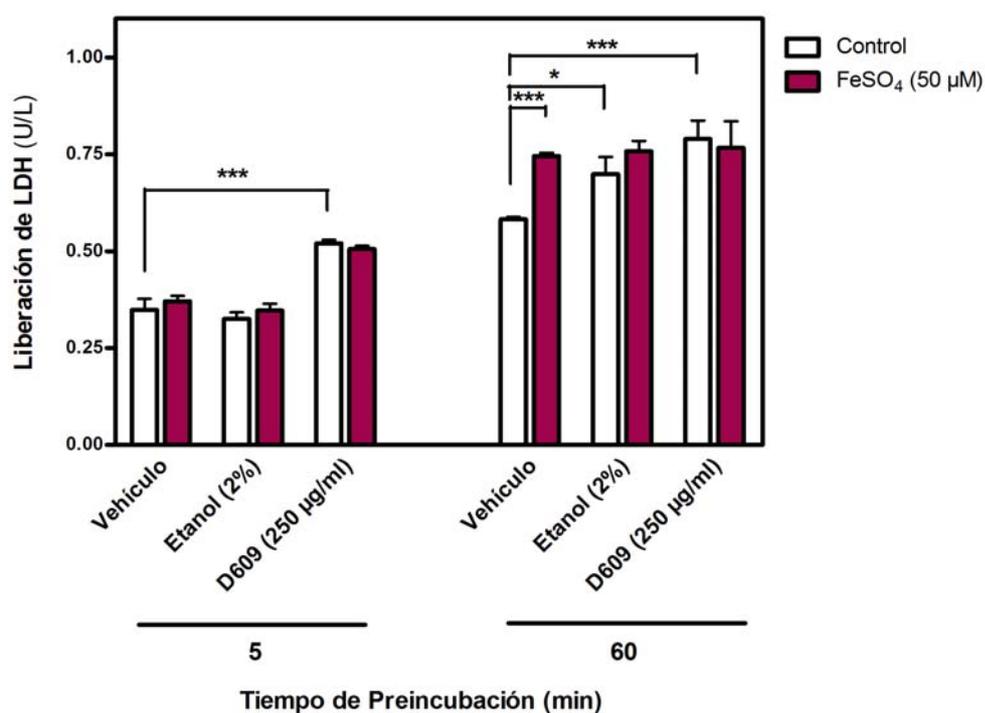


**Figura 52. Efecto del etanol y del D609 en la viabilidad mitocondrial.** Los Syn de ratas adultas tratados por 5 y 60 min en la condición control o en presencia de  $\text{FeSO}_4$  (50  $\mu\text{M}$ ), se coincubaron con etanol (2%), con D609 (250  $\mu\text{g/ml}$ ) o con el vehículo. La reducción del MTT se evaluó como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como unidades arbitrarias. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

La coincubación con etanol no modificó la viabilidad mitocondrial en la condición control, así como tampoco modificó la reducción del MTT luego de la incubación con  $\text{Fe}^{2+}$ . Por su parte, el D609 provocó un aumento en la reducción del MTT en todas las condiciones ensayadas (Figura 52).

### 11. 8. 2. Efecto del etanol y del D609 en la integridad de la membrana plasmática sinaptosomal.

La liberación de LDH también se monitoreó en presencia de etanol para evaluar el rol de la vía de la PLD y del inhibidor de la PC-PLC, D609 (Figura 53).



**Figura 53. Efecto del etanol y del D609 en la integridad de la membrana sinaptosomal.** Los Syn de ratas adultas tratados por 5 y 60 min en la condición control o en presencia de FeSO<sub>4</sub> (50 µM), se coincubaron con etanol (2%), con D609 (250 µg/ml) o con el vehículo. La liberación de LDH al medio se evaluó como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como U/L. \**p* < 0,05, \*\*\**p* < 0,001.

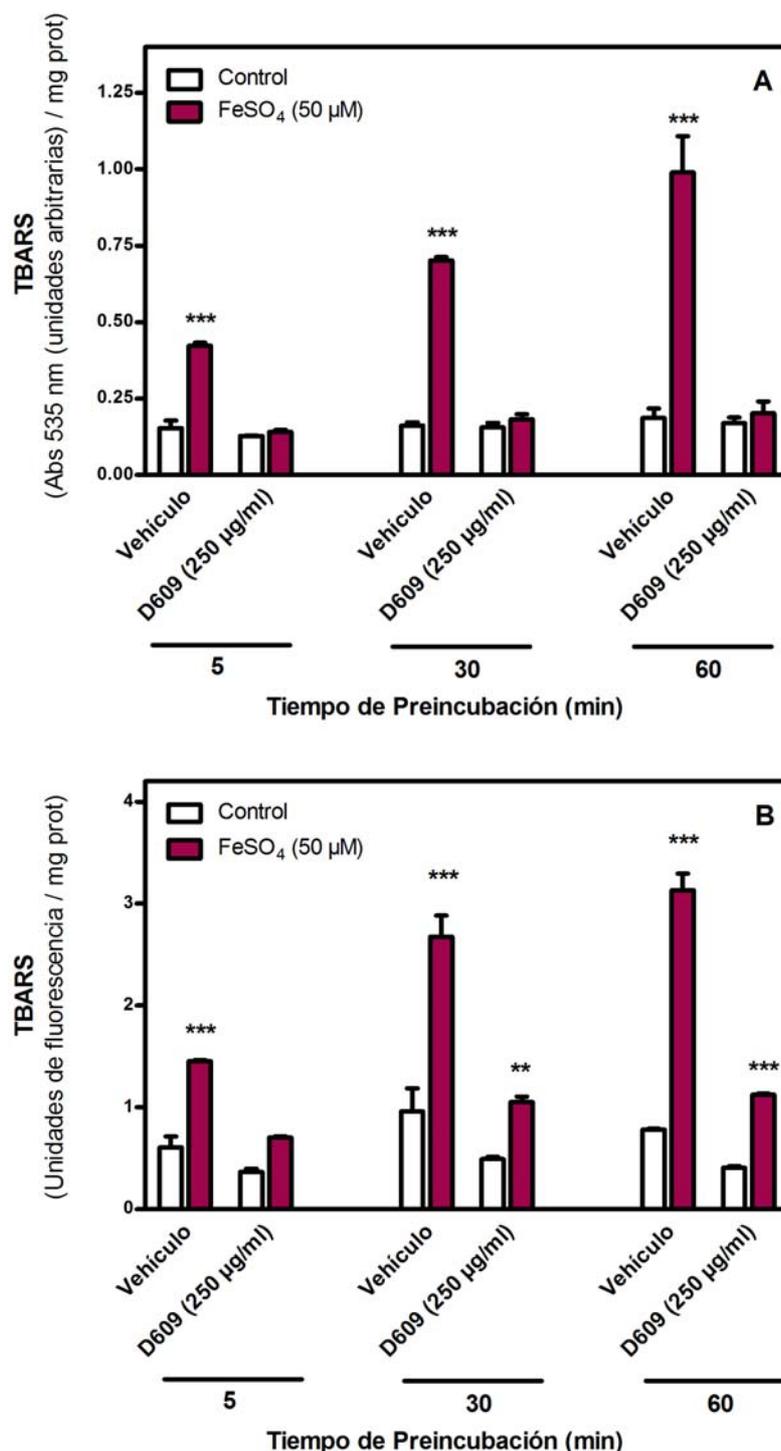
La presencia del alcohol primario no modificó la liberación de LDH luego de 5 min de incubación, sin embargo, luego de 60 min de incubación en presencia de etanol la liberación de LDH en la condición control se incrementó al mismo nivel que el observado en la condición de injuria oxidativa. Inesperadamente, el D609 por sí solo provocó un aumento en la liberación de LDH con respecto al control en todas las condiciones ensayadas.

### 11. 8. 3. Efecto del D609 sobre la peroxidación lipídica.

Se reportó que el D609, además de actuar como inhibidor de la PC-PLC, posee propiedades antioxidantes siendo capaz de imitar la acción del glutatión (Lauderback y col., 2003; Sultana y col., 2004; Joshi y col., 2005). En base a estos antecedentes se decidió investigar el efecto del D609 en la peroxidación lipídica generada por la preincubación con  $\text{FeSO}_4$ , para lo cual los Syn fueron coincubados con el inhibidor de la PC-PLC en la condición de estrés oxidativo y en la condición control. La generación de TBARS en las distintas condiciones se evaluó por los dos métodos previamente descritos, espectrofotométrico (Figura 54A) y fluorimétrico (Figura 54B).

Cuando se evaluó la generación de TBARS por el método espectrofotométrico observamos que la peroxidación lipídica inducida por la preincubación con  $\text{Fe}^{2+}$  por distintos tiempos (5, 30 y 60 min) fue completamente inhibida en presencia de D609 (250  $\mu\text{g/ml}$ ) (Figura 54A).

Al evaluar el nivel de peroxidación lipídica utilizando el método fluorimétrico se obtuvieron los mismos resultados (Figura 54B). Este método además, probablemente por tener mayor sensibilidad, permitió observar que el D609 inhibe la formación basal de TBARS en la condición control no expuesta al oxidante.



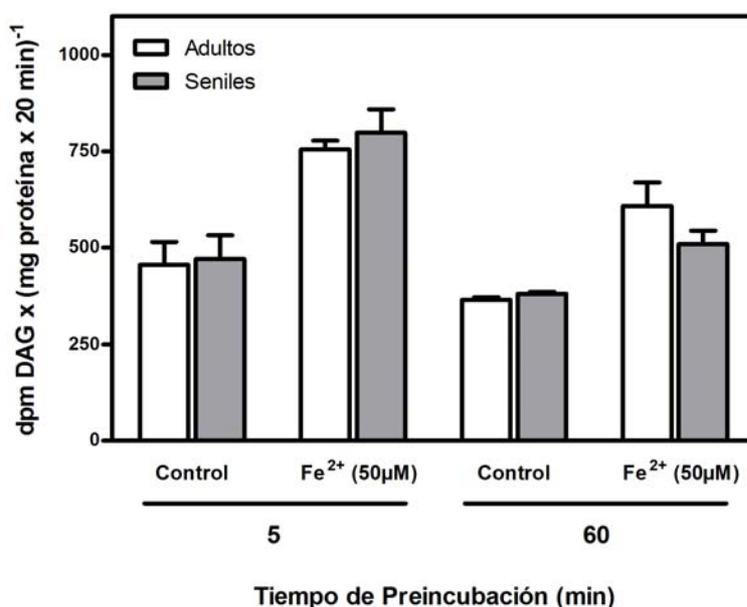
**Figura 54. Efecto del D609 en la peroxidación lipídica.** Los Syn de ratas adultas tratados por 5, 30 y 60 min en la condición control o en presencia de FeSO<sub>4</sub> (50 μM), se coincubaron con D609 (250 μg/ml) o con el vehículo y se evaluó la generación de TBARS. (A) Medición de TBARS por el método espectrofotométrico. Los resultados se expresan como unidades arbitrarias/mg proteína y se compararon con la condición control. (B) Medición de TBARS por el método fluorimétrico. Los resultados se expresan como unidades de fluorescencia/mg proteína y se compararon con el control. \*\**p* < 0,01, \*\*\**p* < 0,001.

## II.9. HIDRÓLISIS DE LA PC EN LOS SYN DE RATAS SENILES EXPUESTOS AL ESTRÉS OXIDATIVO.

La hidrólisis de la PC bajo condiciones de estrés oxidativo se evaluó en los sinaptosomas obtenidos a partir de la corteza cerebral de ratas seniles y los resultados fueron comparados con los obtenidos en las terminales sinápticas de ratas adultas.

### II.9.1. Generación de DAG y AGL.

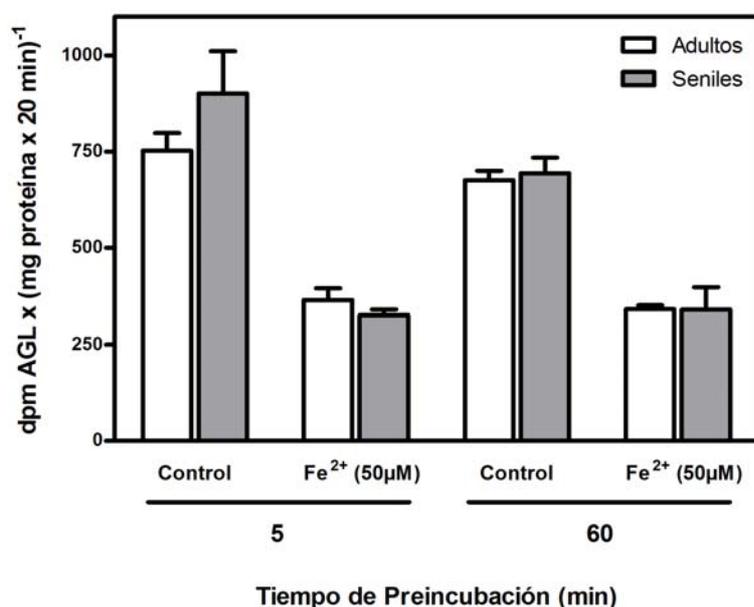
En los Syn de ratas seniles se evaluó la generación de DAG (Figura 55) y AGL (Figura 56) a partir de la hidrólisis de la PC.



**Figura 55. Generación de DAG a partir de la PC en los Syn de ratas seniles expuestos al estrés oxidativo.** Los Syn de ratas seniles se preincubaron por 5 y 60 min a 37°C en la condición control (vehículo) o en presencia de FeSO<sub>4</sub> (50 μM). La reacción enzimática se llevó a cabo como se describió en la Figura 44 y los resultados se expresan como dpm DAG x (mg proteína x 20 min)<sup>-1</sup> y se compararon con los obtenidos en Syn de ratas adultas incubados en las mismas condiciones.

En la condición control los niveles de DAG generados en los Syn de ratas seniles fueron iguales a los generados en los Syn de ratas adultas. La exposición al FeSO<sub>4</sub> (50 μM) por 5 y 60 min incrementó la generación de DAG a partir de la PC en los Syn de

ratas seniles y este incremento fue igual al observado en los Syn de ratas adultas (Figura 55).

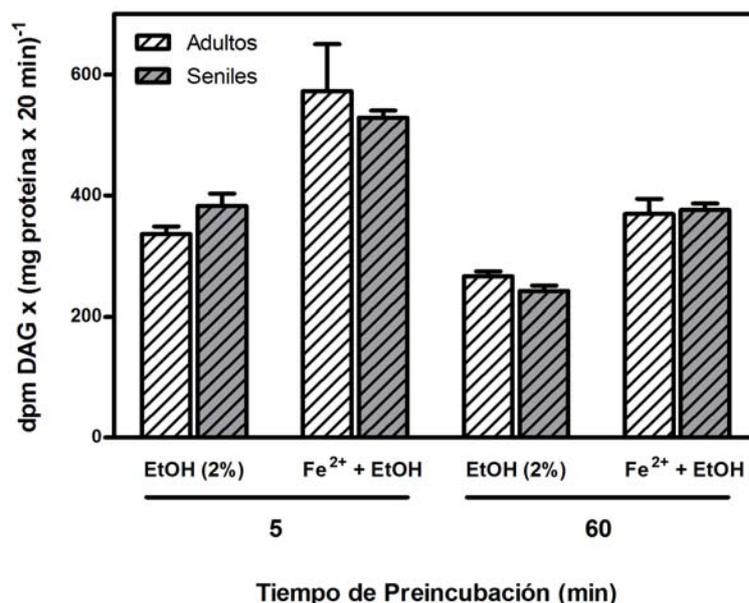


**Figura 56. Generación de AGL a partir de la PC en los Syn de ratas seniles expuestos al estrés oxidativo.** Los Syn de ratas seniles se preincubaron por 5 y 60 min a 37°C en la condición control (vehículo) o en presencia de FeSO<sub>4</sub> (50 μM). La hidrólisis de [<sup>14</sup>C]-DPPC se evaluó como se describe en la Figura 44. Los resultados se expresan como dpm AGL x (mg proteína x 20 min)<sup>-1</sup> y se compararon los obtenidos en Syn de ratas adultas incubados en las mismas condiciones.

La generación de AGL se vio inhibida en los Syn de ratas seniles luego de 5 y 60 min de preincubación con Fe<sup>2+</sup>. También en este caso los niveles de AGL generados en los Syn de ratas seniles fueron iguales a los generados en las ratas adultas, tanto en la condición control como en la condición experimental (Figura 56).

### 11.9.2. Actividad de la PC-PLC en los Syn de animales seniles.

La actividad de la vía de la PC-PLC se evaluó en los Syn de ratas seniles incluyendo etanol 2% en el ensayo enzimático.

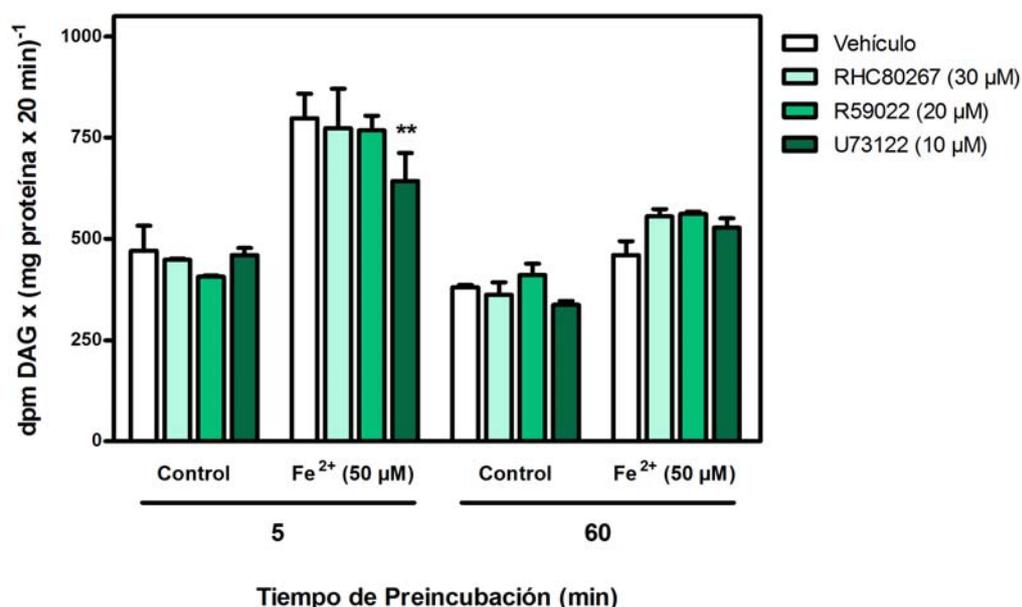


**Figura 57. Actividad de la PC-PLC en los Syn de ratas seniles expuestas al estrés oxidativo.** Los Syn de ratas seniles se preincubaron por 5 y 60 min a 37°C en la condición control (vehículo) o en presencia de FeSO<sub>4</sub> (50 μM). La reacción enzimática se llevó a cabo en presencia de etanol 2% como se describe en la Figura 46 incluyendo 60.000 dpm de [<sup>14</sup>C]-DPPC por ensayo. Los resultados se expresan como dpm DAG x (mg proteína x 20 min)<sup>-1</sup> y se compararon con los obtenidos en los Syn de ratas adultas incubados en las mismas condiciones.

La preincubación por 5 y 60 min con FeSO<sub>4</sub> (50 μM) estimuló la generación de DAG por la vía de la PC-PLC en los Syn de ratas seniles. Este incremento en la formación de DAG fue igual al observado en los Syn de ratas adultas sometidos a las mismas condiciones experimentales (Figura 57).

### 11.9.3. Rol de las vías de metabolización del DAG en individuos seniles.

Para determinar la participación de las enzimas metabolizadoras de DAG en los sinaptosomas provenientes de ratas seniles, el ensayo enzimático se llevó a cabo en presencia de RHC80267 (30 μM) (inhibidor de la DAGL) y R59022 (20 μM) (inhibidor de la DAGK). Para evaluar el efecto de la inhibición de la vía de la PIP<sub>2</sub>-PLC los Syn se coincubaron con U73122 (10 μM). El efecto de estos inhibidores se evaluó tanto en la condición de injuria oxidativa como en la condición control.



**Figura 58. Inhibición de las vías metabolizadoras del DAG y de la PIP<sub>2</sub>-PLC en los Syn de ratas seniles.** Los Syn de ratas seniles, tratados por 5 y 60 min en la condición control o en presencia de FeSO<sub>4</sub> (50 μM), se coincubaron con RHC80267 (30 μM), R59022 (20 μM), U73122 (10 μM) o vehículo. La generación de DAG se evaluó como se describe en la Figura 44. Los resultados se expresan como dpm DAG x (mg proteína x 20 min)<sup>-1</sup> y se compararon con los obtenidos en la condición incubada con el vehículo. \*\**p* < 0,01.

La coincubación con los inhibidores de la DAGL y de la DAGK no modificó los niveles de DAG generados en los Syn de ratas seniles, esto se observó tanto en la condición control como en la condición expuesta al Fe<sup>2+</sup>, independientemente del tiempo de incubación (Figura 58). La coincubación con U73122 no modificó los niveles de DAG generados en la condición control mientras que en la condición experimental (expuesta al Fe<sup>2+</sup>) inhibió la generación de DAG en un 20 % luego de 5 min de preincubación con el oxidante (Figura 58). A diferencia de lo observado en los Syn de ratas adultas, en las terminales sinápticas de ratas seniles la inhibición de la PIP<sub>2</sub>-PLC no modificó la generación de DAG luego de 60 min de preincubación con el Fe<sup>2+</sup>.

#### 11.9. 4. Evaluación de la peroxidación lipídica.

La peroxidación lipídica inducida por la incubación con  $\text{FeSO}_4$  50  $\mu\text{M}$  en los Syn de ratas seniles se evaluó midiendo la generación de TBARS. El nivel de peroxidación lipídica se midió por el método espectrofotométrico y los resultados se compararon con los obtenidos en los Syn de ratas adultas.

Generación de TBARS Abs 535 nm (unidades arbitrarias)/mg proteína						
	5 min preincubación		30 min preincubación		60 min preincubación	
	Control	$\text{FeSO}_4$ (50 $\mu\text{M}$ )	Control	$\text{FeSO}_4$ (50 $\mu\text{M}$ )	Control	$\text{FeSO}_4$ (50 $\mu\text{M}$ )
<b>Adultos</b>	0.153 $\pm$ 0.025	0.331 $\pm$ 0.106	0.162 $\pm$ 0.011	0.621 $\pm$ 0.087	0.187 $\pm$ 0.031	0.866 $\pm$ 0.159
<b>Seniles</b>	0.146 $\pm$ 0.003 (ns)	0.390 $\pm$ 0.059 (ns)	0.185 $\pm$ 0.017 (ns)	0.651 $\pm$ 0.021 (ns)	0.233 $\pm$ 0.093 (ns)	0.871 $\pm$ 0.009 (ns)

**Tabla 2. Evaluación de la peroxidación lipídica inducida por el  $\text{FeSO}_4$  en los Syn de ratas seniles.**

Los Syn de ratas seniles fueron preincubados por 5, 30 y 60 min en la condición control o en presencia de  $\text{FeSO}_4$  (50  $\mu\text{M}$ ) y se evaluó la generación de TBARS por el método espectrofotométrico. Los resultados se expresan como unidades arbitrarias/mg proteína y se compararon con los obtenidos en los Syn de ratas adultas incubados en las mismas condiciones experimentales.

La Tabla 2 muestra que en los Syn de ratas seniles la exposición al  $\text{Fe}^{2+}$  induce fuertemente la generación de TBARS luego de 5, 30 y 60 min de preincubación. Este aumento en la peroxidación lipídica fue de la misma magnitud al observado en los Syn de ratas adultas expuestos al mismo tratamiento experimental.

## DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS DEL CAPÍTULO II

El hierro libre es altamente tóxico debido a su capacidad de generar radicales libres. El ión ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ), en particular, en presencia de oxígeno molecular o de peróxido de hidrógeno genera moléculas altamente tóxicas tales como los radicales hidroxilo ( $\text{OH}^{\bullet}$ ) y superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ). Es por ello que el efecto del  $\text{Fe}^{2+}$  es similar al del péptido A $\beta$ , dado que ambos son capaces de inducir daño neuronal promoviendo la peroxidación lipídica, alteraciones en el funcionamiento de ATPasas y de transportadores de glucosa y glutamato, así como también la disfunción mitocondrial (Butterfield y col., 1999; Andersen, 2004; Berg y Youdim, 2006).

En la segunda etapa de esta tesis doctoral nuestro objetivo fue estudiar el efecto del estrés oxidativo inducido por la sobrecarga de  $\text{FeSO}_4$  en la generación de segundos mensajeros lipídicos derivados de la PC, en las terminales sinápticas de la corteza cerebral de ratas adultas y seniles.

Para evaluar el daño producido en nuestro modelo experimental por la incubación con el  $\text{Fe}^{2+}$  se midieron tres parámetros: la funcionalidad mitocondrial (medida como la capacidad de reducir el MTT a cristales de formazán), la integridad de la membrana plasmática sinaptosomal (evaluando la liberación de LDH al medio) y el grado de la peroxidación lipídica (midiendo la generación de TBARS). La funcionalidad mitocondrial y la integridad de la membrana se vieron alteradas luego de 1 h de incubación de los sinaptosomas con el oxidante, mientras que la formación de TBARS se incrementó sensiblemente a partir los 5 min de incubación. Estos resultados confirmaron que la incubación con  $\text{Fe}^{2+}$  constituye un modelo apropiado para generar daño oxidativo en los sinaptosomas, tal como se había propuesto previamente por otros autores (Keller y col., 1997; Guo y Mattson, 2000). Entre los indicadores del daño evaluados en nuestro sistema, observamos que el primero en evidenciarse fue la peroxidación de los lípidos de la membrana.

Nuestros resultados demostraron por primera vez que el daño oxidativo, inducido por  $\text{FeSO}_4$ , estimula fuertemente la generación de DAG a partir de la PC, tanto en las

terminales sinápticas de la corteza cerebral de ratas adultas como en los sinaptosomas de ratas seniles. Mediante la utilización del etanol como marcador de la actividad de la PLD, demostramos que tanto la vía de la PC-PLC como la vía de la PLD participan en la generación del DAG inducida bajo condiciones de estrés oxidativo.

Con anterioridad a nuestros hallazgos prácticamente no existían reportes acerca de la activación de la PC-PLC en condiciones de injuria oxidativa en sistema nervioso central y son muy escasos los antecedentes publicados en otros sistemas. En la línea celular de hipocampo de ratón (HT22) se reportó la participación de la actividad PC-PLC en la muerte celular inducida por glutamato. En esta forma de muerte celular conocida como "toxicidad oxidativa del glutamato" las concentraciones elevadas de glutamato interfieren con la captación de cisteína a través del antiportador de cisteína/glutamato lo que lleva a la depleción intracelular de glutatión (Li y col., 1998).

Recientemente Zhao y colaboradores relacionaron la formación de DAG por la vía de la PC-PLC y la generación de especies reactivas de oxígeno en la diferenciación de células del blastodisco de pollo a células endoteliales vasculares (Zhao y col., 2007). En macrófagos alveolares se demostró que la sílica induce la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con la subsiguiente activación de la PC-PLC (Liu y col., 2007). Por otra parte, se ha reportado que el inhibidor de la enzima y antioxidante, D609, es capaz de proteger a las neuronas en cultivo y a los sinaptosomas del daño oxidativo producido por el A $\beta$  (Sultana y col., 2004; Perluigi y col., 2006).

A diferencia de la PC-PLC, la activación de la PLD ha sido estudiada en situaciones de estrés oxidativo y se encontró una actividad aumentada de esta enzima en los cerebros post mortem de pacientes con la enfermedad de Alzheimer (Kanfer y col., 1996). En células de neuroblastoma humano se reportó que el péptido A $\beta$  (25-35) induce la activación de la PLD, esta activación fue independiente del Ca<sup>2+</sup> pero dependiente de la fosforilación en tirosinas y de la actividad de la PKC (Singh y col., 1998). También en neuronas de hipocampo de rata el péptido A $\beta$  (1-40) indujo la activación de la PLD, la cual fue acompañada de un aumento en la liberación de LDH (Cox y Cohen, 1997) mientras que en células PC12 la actividad de la PLD se estimuló por

el tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Ito y col., 1997; Oh y col., 2000). Sin embargo, no se conoce aun con certeza si la activación de la PLD es parte de la cascada patológica del Alzheimer o si constituye una vía de rescate celular.

Las sinucleínas son proteínas que se encuentran en las terminales nerviosas, cuya función exacta es aun desconocida, aunque se las ha encontrado en las placas seniles y en los cuerpos de Lewis (inclusiones intracitoplasmáticas en las neuronas) propios del Parkinson. Se ha reportado que estas proteínas son capaces de interactuar y de inhibir a la PLD2 y se ha especulado que las interacciones sinucleínas-PLD podrían contribuir a la patogénesis del Parkinson afectando el tráfico de vesículas y el normal funcionamiento de las sinapsis dopaminérgicas (Jenco y col., 1998; Ahn y col., 2002; Klein, 2005).

Asimismo, se demostró que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> estimula a la PLD en astrocitos de cerebro de rata (Servitja y col., 2000). Luego de la isquemia cerebral también se reportó un aumento masivo en la expresión de la PLD1 en astrocitos reactivos de hipocampo, este aumento en la actividad de la PLD aparentemente acompaña la astrogliosis y la remodelación del tejido luego de la injuria lo que sugiere un posible rol neuroprotectivo de la enzima en los astrocitos (Lee y col., 2000; Klein, 2005).

La participación de la PLD en situaciones de injuria oxidativa también se describió en cardiomiocitos (Banno y col., 2005; Tappia y col., 2006), así como también en células de músculo liso vascular y en células endoteliales de aorta (Corl y col., 2003; Kim y col., 2004). Sin embargo, nuestros resultados constituyen la primera evidencia de la activación de la PLD en respuesta al estrés oxidativo en la terminal sináptica de la corteza cerebral de la rata.

Por otra parte, la activación de las fosfolipasas A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) por el estrés oxidativo también es considerada una de las principales causas subyacentes en patologías como la enfermedad de Alzheimer, la isquemia cerebral y la esclerosis múltiple (Sun y col., 2004; Muralikrishna y Hatcher, 2006; Cunningham y col., 2006; Sun y col., 2007). Estas enzimas clivan el ácido graso esterificado en la posición sn-2 de los glicerofosfolípidos para generar ácidos grasos libres y lisofosfolípidos. Esta reacción es de particular importancia cuando el ácido graso liberado es el araquidónico, dado que éste puede ser

metabolizado por las ciclooxigenasas y las lipooxigenasas generando eicosanoides bioactivos como las prostaglandinas, los leucotrienos y los tromboxanos. Además, los lisofosfolípidos también son biológicamente activos y de gran importancia en los mecanismos de señalización celular (Muralikrishna y Hatcher, 2006).

Cerca de veinte isoformas de la PLA<sub>2</sub> han sido identificadas en varios tejidos de mamíferos. Estas enzimas, ubicuas en neuronas y en células gliales, han sido clasificadas en tres familias según su requerimiento de Ca<sup>2+</sup>: las independientes de Ca<sup>2+</sup> (iPLA<sub>2</sub>) y entre las PLA<sub>2</sub> dependientes de Ca<sup>2+</sup> se encuentran las citosólicas (cPLA<sub>2</sub>) y las extracelulares o secretadas (sPLA<sub>2</sub>) (Muralikrishna y Hatcher, 2006). Las cPLA<sub>2</sub> requieren Ca<sup>2+</sup> para su translocación a la membrana y poseen preferencia por fosfolípidos que contiene AA mientras que las iPLA<sub>2</sub> no presentan especificidad por ninguna especie molecular de los diferentes fosfolípidos (Caro y Cederbaum, 2003).

Se demostró que las PLA<sub>2</sub> citosólicas pueden ser activadas por compuestos oxidantes como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o la menadiona (Samanta y col., 1998; Xu y col., 2003). También se reportó la activación de la PLA<sub>2</sub> en células piramidales de hipocampo sometidas a situaciones de privación de glucosa y de oxígeno. Mediante la utilización de inhibidores para las diferentes PLA<sub>2</sub>, se demostró que la isoforma responsable de este aumento de actividad en las células de hipocampo era una cPLA<sub>2</sub> (Arai y col., 2001). En modelos de isquemia cerebral global se reportó que tanto la actividad como la expresión de las cPLA<sub>2</sub> aumentan significativamente luego de 20 min, así como también aumenta su actividad en neuronas corticales expuestas al fragmento 1-42 del péptido Aβ (Saluja y col., 1997; Shelat y col., 2008).

Sin embargo, en nuestro modelo experimental la liberación de ácidos grasos libres se vio significativamente inhibida en los sinaptosomas expuestos al Fe<sup>2+</sup>. Nuestro resultado difiere del reportado en otros sistemas y esto podría deberse a la inhibición de una fosfolipasa A independiente de calcio en las condiciones de estrés oxidativo. Otro factor determinante podría ser la naturaleza saturada del sustrato utilizado para los ensayos enzimáticos, la DPPC. Este tipo de sustrato solo nos permite evaluar la actividad de las isoformas de PLA con afinidad por fosfolípidos de composición saturada.

Entre los eventos de aparición temprana en los procesos que involucran estrés oxidativo se encuentra la fosforilación en tirosinas de diversas proteínas. Se ha reportado que la activación de tirosinas quinasas por especies reactivas de oxígeno aumenta la fosforilación en tirosinas de proteínas constituyentes de las uniones estrechas entre células endoteliales que componen la barrera hematoencefálica. Además, la injuria oxidativa (a través de la activación de estas quinasas) induce la actividad de las metaloproteinasas y estos eventos culminan con la pérdida de la funcionalidad de la barrera hematoencefálica (Haorah y col., 2007). Por otra parte, en la línea celular de neuronas dopaminérgica N27, el  $H_2O_2$  induce la fosforilación en el residuo tirosina 311 (Tyr-311) de la proteína PKC $\delta$ . La fosforilación en este residuo es esencial para el clivaje proteolítico y la activación de dicha quinasa (Kaul y col., 2005).

Por otra parte, en células del hipocampo expuestas al producto de la peroxidación lipídica 4-hidroxi-2,3-nonenal (HNE), se observó un marcado aumento en la actividad de canales de  $Ca^{2+}$  activados por voltaje y la fosforilación en residuos tirosinas de las subunidades del mismo. Además, las corrientes de  $Ca^{2+}$  fueron también inducidas por el tratamiento con inhibidores de tirosinas fosfatasas y parcialmente disminuidas por inhibidores de tirosinas quinasas (Lu y col., 2002). Asimismo, se demostró que muchos eventos de estrés oxidativo que involucran la activación de la PLD son dependientes de la actividad de las tirosinas quinasas (Ito y col., 1997; Singh y col., 1998; Kim y col., 2004) aunque la inhibición de estas enzimas en las células PC12 tratadas con  $H_2O_2$  produjo una disminución leve en la actividad de la PLD (Oh y col., 2000).

Resultados de nuestro laboratorio demostraron que el tratamiento de los sinaptosomas con  $FeSO_4$  produce un marcado aumento en la fosforilación en tirosinas de diversas proteínas sinaptosomales luego de 1 h de incubación con el agente oxidante. Además se observó la activación de la vía de la PI3K/Akt luego de tiempos cortos de incubación, también en forma dependiente de la fosforilación en tirosinas (Uranga y col., 2007).

Todos estos antecedentes demuestran el rol central de la fosforilación en residuos tirosinas en eventos que involucran la generación de especies reactivas de oxígeno. Sin

embargo, la generación de DAG en nuestro modelo experimental no fue modificada por la coincubación con inhibidores de tirosinas quinasas (genisteína y herbimicina A) ni por el inhibidor de la enzima PI3K (LY294002). Estos resultados indican que la activación de las vías de la PC-PLC y de la PLD en nuestras condiciones experimentales se produce por un mecanismo diferente e independiente, tanto de la activación de tirosinas quinasas como de la enzima PI3K y su efector corriente abajo, Akt.

Cabe señalar que para estudiar la activación de la PI3K por el tratamiento con el  $Fe^{2+}$  la incubación de los sinaptosomas se llevó a cabo en un medio que contenía calcio exógeno. En tales condiciones se observó un mayor daño producido por el hierro a nivel mitocondrial y de la membrana, incluso a tiempos cortos de incubación (Uranga y col., 2007). Es posible que la presencia de  $Ca^{2+}$  desencadene diferentes mecanismos de injuria oxidativa frente al  $Fe^{2+}$ . En consecuencia, la ausencia de este catión en nuestro medio de incubación podría explicar el menor daño observado a nivel mitocondrial con respecto al daño reportado en presencia de calcio, ya que la desregulación del calcio es uno de los mecanismos subyacentes en la disfunción mitocondrial y en los eventos de neurodegeneración (Mattson, 2007; Bawa y Abbott, 2008; Wojda y col., 2008; Bull y col., 2008; Vosler y col., 2008).

Asimismo, la inhibición de las enzimas DAGL y DAGK tampoco modificó la generación de DAG a partir de PC, sugiriendo que la injuria oxidativa no ejerce ningún efecto sobre las vías que catabolizan la degradación del DAG y la fosforilación del mismo, al menos bajo nuestras condiciones experimentales. Por el contrario, la inhibición de la  $PIP_2$ -PLC disminuyó la formación de DAG en los sinaptosomas expuestos al hierro. Este resultado sugiere la participación de la  $PIP_2$ -PLC como un efector corriente arriba en la activación de las vías de la PC-PLC y/o de la PLD en condiciones de daño oxidativo.

Siendo la PKC el efector corriente abajo de la activación de la  $PIP_2$ -PLC más estudiado, se evaluó el efecto de la activación y de la inhibición de estas quinasas. Sin embargo, los niveles de DAG no se modificaron por la coincubación con PMA o con los distintos inhibidores de PKC.

En la mayoría de los antecedentes publicados la activación de la PLD en situaciones de estrés oxidativo (por el tratamiento con el péptido A $\beta$  o con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) fue dependiente de la actividad de la PKC (Singh y col., 1998; Min y col., 1998; Servitja y col., 2000; Oh y col., 2000; Kim y col., 2004). Por el contrario, otros estudios demostraron que la activación de la PLD inducida por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en células PC12 y en células endoteliales no fue dependiente de PKC (Natarajan y col., 1993b; Ito y col., 1997). Además, en las células endoteliales la activación de la PLD fue independiente tanto del calcio intracelular como del extracelular, ya que el tratamiento con EGTA o BAPTA (quelantes de Ca<sup>2+</sup> extra e intracelulares, respectivamente) no modificó la generación de PEth inducida por el peróxido (Natarajan y col., 1993b). También la activación de esta fosfolipasa fue independiente del Ca<sup>2+</sup> en las células de neuroblastoma humano incubadas con el péptido A $\beta$  (25-35) (Singh y col., 1998).

Las diferencias en los mecanismos que llevan a la activación de la PLD en condiciones de estrés oxidativo (como la dependencia o no de la fosforilación en tirosinas y de la actividad de la PKC, así como también el requerimiento o no de calcio), demuestran que las vías de señalización involucradas en la activación de esta fosfolipasa pueden variar dependiendo del tipo celular y del inductor de la injuria oxidativa en estudio.

Nuestros resultados mostraron que en las terminales sinápticas expuestas al Fe<sup>2+</sup> en nuestras condiciones experimentales se genera rápidamente un gran nivel de peroxidación lipídica. Por otra parte, los efectos deletéreos en la función mitocondrial y en la integridad de la membrana plasmática se observaron tras períodos mayores de tratamiento con el hierro. Ambas vías generadoras de DAG a partir de la PC fueron estimuladas por el Fe<sup>2+</sup> luego de tiempos cortos de incubación y permanecieron activadas al menos por 60 min, cuando el efecto dañino del hierro se evidenciaba ya a nivel mitocondrial y por la pérdida de la integridad de la membrana.

Los ácidos grasos poliinsaturados son las moléculas biológicas más susceptibles al estrés oxidativo y su degradación por efecto de los radicales libres se denomina peroxidación lipídica. Este proceso consta de una serie de reacciones en cadena. La

primera etapa es la de iniciación, la cual requiere de una molécula suficientemente reactiva como para extraer un átomo de hidrógeno. Los metales divalentes como el  $\text{Fe}^{2+}$  o el  $\text{Cu}^{2+}$  en presencia de oxígeno son capaces de generar especies reactivas de oxígeno (ROS) como el radical hidroxilo ( $\text{OH}^{\bullet}$ ), el cual es altamente reactivo y puede actuar como iniciador en la peroxidación de los lípidos. Este radical inicia la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas produciendo un radical lipídico ( $\text{R}^{\bullet}$ ), el cual a su vez puede reaccionar con el oxígeno molecular para formar un radical peroxilo orgánico ( $\text{ROO}^{\bullet}$ ).

Los radicales  $\text{ROO}^{\bullet}$  inician la fase de propagación al extraer un hidrógeno de un ácido graso adyacente, generando un lípido hidroperóxido ( $\text{ROOH}$ ) y otro radical  $\text{R}^{\bullet}$  que continúa una reacción en cadena de peroxidación. La peroxidación lipídica también puede ser iniciada por especies reactivas de nitrógeno (RNS) tales como el peroxinitrito ( $\text{ONOO}^{\bullet}$ ).

A la fase de propagación le sucede la fase de terminación, en la cual se produce la combinación de los productos iniciales (radicales lipídicos) para dar lugar a compuestos aldehídicos no radicales, tales como el malondialdehído (MDA), el HNE y la acroleína. Estos aldehídos se pueden unir covalentemente a las proteínas alterando su función. Además, la oxidación de los lípidos disrumpe la organización de la membrana, causando cambios en la fluidez y en la permeabilidad, inhibiendo procesos metabólicos y alterando el transporte de iones. Todos estos procesos causados por la peroxidación de los lípidos pueden culminar en la muerte celular.

En nuestro modelo experimental el D609 fue capaz de inhibir completamente la peroxidación lipídica inducida por la incubación con el  $\text{Fe}^{2+}$ . Cuando se midió la generación de TBARS por el método fluorimétrico (el cual es más sensible que la medición realizada con espectrofotómetro), este inhibidor también disminuyó levemente la peroxidación producida en la condición control, lo que indica que en la condición no incubada con el agente oxidante existe una leve oxidación basal de los lípidos.

Trabajos previos han reportado las propiedades antioxidantes del D609. Los xantatos imitan la acción del glutatión (GSH) eliminando radicales hidroxilos y peróxidos

mediante la formación de uniones disulfuro (dixantogenatos). Los xantatos también pueden reaccionar con los productos electrofílicos de la peroxidación lipídica como la acroleína y, además, una vez formado el dixantogenato éste puede ser reducido por la glutatión reductasa formándose nuevamente el xantato activo (Lauderback y col., 2003).

Se demostró que el D609 es capaz de proteger a las neuronas de hipocampo en cultivo del estrés oxidativo inducido por el péptido A $\beta$ , disminuyendo la producción de radicales libres, la formación de HNE y la oxidación de proteínas. La forma metilada del D609 (incapaz de formar la unión disulfuro) no protege a las neuronas del daño producido por el A $\beta$ , lo que demuestra que el D609 ejerce su rol protector modulando el nivel de estrés oxidativo (Sultana y col., 2004). Asimismo, este inhibidor administrado intraperitonealmente es capaz de proteger de la injuria oxidativa inducida por el péptido A $\beta$  y por el Fe<sup>2+</sup> en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las terminales sinápticas y en las mitocondrias de cerebros de animales que fueron previamente inyectados con el D609 (Joshi y col., 2005; Perluigi y col., 2006; Ansari y col., 2006). Además, este xantato es capaz de disminuir el daño oxidativo inducido por la radiación gama (Zhou y col., 2001). Nuestros resultados confirmaron las propiedades antioxidantes de este compuesto, es por ello que la utilización del D609 en nuestro modelo experimental no es apropiada para dilucidar el rol de la PC-PLC.

Se evaluó también el efecto del D609 sobre la viabilidad mitocondrial y sobre la integridad de la membrana plasmática de los sinaptosomas, tanto en la condición expuesta al estrés oxidativo como en la condición control. El D609 previno el daño mitocondrial producido por el Fe<sup>2+</sup> luego de 60 min de incubación. Además, incluso bajo la condición control, este xantato aumenta la capacidad reductora de las mitocondrias con respecto a los sinaptosomas coincubados con vehículo. Estos resultados concuerdan con la capacidad antioxidante antes mencionada de este compuesto. Por el contrario, los experimentos de liberación de LDH demostraron que el D609 (al menos en la concentración utilizada en nuestros ensayos) provoca un aumento en la permeabilidad de la membrana plasmática, tanto en la condición control como en los Syn expuestos al Fe<sup>2+</sup>. En vista de los efectos producidos por el D609 a nivel de la mitocondria y de la

membrana plasmática, resulta muy difícil establecer el rol de este compuesto en la viabilidad sinaptosomal. Un trabajo recientemente publicado, demostró que el D609 es capaz de inhibir también a las PLA<sub>2</sub> citosólicas purificadas de bazo bovino (Kang y col., 2008).

Muchos trabajos publicados le han atribuido propiedades antiapoptóticas o antiinflamatorias a la PC-PLC basándose únicamente en efectos observados con el D609 (Zamorano y col., 2003; Du y col., 2003; Cheng y col., 2006; Liu y col., 2006). Sin embargo, nuestros resultados demuestran que la sola utilización del D609 como inhibidor de la PC-PLC, sin medir paralelamente la actividad enzimática, puede conducir a conclusiones erróneas debido a las múltiples acciones que ejerce este compuesto a nivel celular sumado a los efectos inhibitorios de este xantato sobre otras enzimas.

Por otra parte, la incubación en presencia etanol (para inhibir la formación de DAG por la vía de la PLD) no fue capaz de evitar el daño de la función mitocondrial producido por el hierro. Sin embargo, la incubación de los sinaptosomas durante 60 min con este alcohol aumenta la permeabilidad de la membrana sinaptosomal. Es interesante destacar que, ya sea en ausencia o en presencia de Fe<sup>2+</sup>, en las preincubaciones por 60 min en condiciones que disminuyen parcialmente la formación de DAG (con etanol o con D609) la permeabilidad de la membrana sinaptosomal se vio aumentada.

Se estudió también el efecto del estrés oxidativo inducido por el hierro en las terminales sinápticas de ratas seniles. Cuando se evaluó la hidrólisis de la PC en los sinaptosomas de animales seniles se obtuvieron los mismos resultados observados en individuos adultos, la formación de DAG se vio estimulada por el Fe<sup>2+</sup> en la misma proporción que en los sinaptosomas de las ratas adultas y la generación de AGL se inhibió también a los mismos niveles observados en animales adultos. Sin embargo, la inhibición de la PIP<sub>2</sub>-PLC en individuos adultos disminuyó significativamente la formación de DAG luego de 5 y de 60 min de incubación con el Fe<sup>2+</sup>, mientras que en individuos seniles el tratamiento con el U73122 solo disminuyó los niveles de DAG luego de 5 min de incubación con el hierro. Estos resultados indican que, si bien el efecto final de la injuria oxidativa en la hidrólisis de la PC es equivalente en los sinaptosomas de las ratas

adultas y seniles, existen diferencias en la regulación de estas vías enzimáticas generadoras de DAG a partir de la PC por parte de la vía de la PIP<sub>2</sub>-PLC.

Los niveles de peroxidación lipídica inducidos por el tratamiento con el hierro también fueron iguales en las terminales sinápticas de las dos poblaciones. Resultados previos de nuestro laboratorio demostraron que en la corteza cerebral el contenido de ácidos grasos poliinsaturados disminuía solo levemente en las ratas seniles (Lopez y col., 1995), esto haría a los Syn de la CC de ratas seniles y adultas igualmente susceptibles a la peroxidación lipídica frente a un inductor de la peroxidación tan potente como el Fe<sup>2+</sup>. Este hecho no quita la posibilidad que los sinaptosomas de las ratas seniles sean más susceptibles al daño oxidativo en otros niveles, como la funcionalidad mitocondrial o la integridad de la membrana plasmática, parámetros que no fueron evaluados en los sinaptosomas de ratas seniles bajo nuestras condiciones experimentales.

Con el análisis de los resultados de esta segunda parte de la tesis surge la hipótesis que el factor determinante en la activación de las vías generadoras de DAG a partir de la PC podría ser la peroxidación lipídica, ya que el gran incremento en la generación de DAG ocurre en paralelo a los altos niveles de peroxidación lipídica medidos como la generación de TBARS. Un mecanismo posible sería la unión covalente de los productos de la peroxidación lipídica (como el HNE y el MDA) a las enzimas, lo cual podría originar un cambio en la estructura y la consiguiente activación o inhibición de la actividad enzimática.

En diversos sistemas se ha demostrado que los productos de la peroxidación lipídica pueden modificar la estructura y la actividad de las proteínas siendo una de las causas de la disfunción celular a varios niveles. En células endoteliales se reportó que el hidroperóxido del ácido linoleico era capaz de activar a la PLD e incluso el nivel de activación era mayor al obtenido en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Natarajan y col., 1993b). También en estas células el HNE fue capaz de estimular la actividad de la PLD, esta activación fue independiente tanto del calcio como de la actividad de la PKC (Natarajan y col., 1993a). Sin embargo, la activación de la PLD por parte del HNE fue dependiente de la actividad de tirosinas quinasas (Natarajan y col., 1997). De la misma manera otros

hidroxialdehídos como el hidroxiocetonal y el hidroxihexenal también fueron capaces de estimular la formación de PEth en las células endoteliales (Natarajan y col., 1993a).

Asimismo, se demostró que el HNE puede interactuar con las estructuras del citoesqueleto, modificar los microtúbulos y los microfilamentos y originar cambios en la morfología celular (Gadoni y col., 1993). Se reportó también que el HNE es capaz de disminuir significativamente la actividad de la enzima creatina quinasa en homogenados de cerebro de rata y también la actividad de la citocromo c oxidasa mitocondrial (Horakova y col., 2002; Kaplan y col., 2007). Además este aldehído está involucrado en las modificaciones de la proteína apoB, lo cual altera el metabolismo de las lipoproteínas de baja densidad (Negre-Salvayre y col., 2003), y es también capaz de modificar la conformación de las proteínas de la membrana sinaptosomal (Subramaniam y col., 1997).

Si el nivel de peroxidación lipídica fuera el factor determinante en la activación de las vías enzimáticas responsables de la hidrólisis de la PC a DAG, esto sería concordante con el hecho de no encontrar diferencias en la generación de DAG en animales adultos y seniles, ya que el nivel de peroxidación tampoco se modificó con la edad.

Concluyendo, en la segunda parte de la tesis demostramos por primera vez que el estrés oxidativo induce un marcado aumento en la generación de DAG a partir de la PC en los sinaptosomas de ratas adultas y seniles. El incremento en este mensajero lipídico es consecuencia de la activación de las vías de la PC-PLC y de la PLD, siendo este el primer reporte acerca de la activación de la PC-PLC por injuria oxidativa en el sistema nervioso central.

El hecho de haber demostrado la existencia de esta nueva vía de señalización en la terminal sináptica constituye el punto de partida para el futuro estudio de su rol en los procesos de señalización y de comunicación neuronal. Nuestros resultados abren nuevos interrogantes que nos impulsan a continuar investigando los mecanismos que llevan a la activación y a la regulación de la PC-PLC en los eventos neurodegenerativos en el sistema nervioso central.

## CONCLUSIONES

En este trabajo de tesis se demostró la presencia de la vía de la PC-PLC en las terminales sinápticas de la corteza cerebral de rata. Esta vía de generación de DAG es responsable, junto a la PLD, de la hidrólisis de la PC de la membrana sinaptosomal para generar este segundo mensajero lipídico. Específicamente con los resultados obtenidos hemos demostrado:

- La generación del DAG a partir de la hidrólisis de la PC en los sinaptosomas se vio estimulada por los agentes tensioactivos Triton X-100 y DOC mientras que se vio inhibida por el agregado de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  exógenos.
- Mediante la utilización del etanol como marcador de la reacción de transfosfatidilación catalizada por la PLD, del DL-propranolol como inhibidor de la PAP2 y del D609 como inhibidor de la PC-PLC, se determinó que el 60% del DAG generado proviene de la actividad de la PC-PLC y el 40% restante de la vía de la PLD/PAP2. Se corroboró también que la actividad de la SMS, bajo nuestras condiciones de ensayo, no contribuye a la generación del DAG.
- La caracterización de la cinética enzimática de la PC-PLC permitió determinar un valor de  $K_M$  aparente de 350  $\mu\text{M}$  para la DPPC y una  $V_{\text{máx}}$  de 3.7 nmol DAG x (mg proteína x h)<sup>-1</sup>.
- Los niveles de DAG generados y la contribución de las vías de la PC-PLC y de la PLD no mostraron cambios significativos en los individuos seniles cuando se los comparó con los valores hallados en las ratas adultas.

- Utilizando un anticuerpo contra la PC-PLC de *Bacillus cereus* se detectó por WB la presencia de dos bandas muy próximas correspondientes a un peso molecular cercano a 66 kDa, tanto en los sinaptosomas de ratas adultas como de seniles.
- La actividad de la PC-PLC se localizó en la fracción de la membrana plasmática obtenida a partir de los sinaptosomas de ratas adultas, siendo prácticamente indetectable en la fracción soluble de los mismos.
- La fracción de membrana resistente a detergentes aislada de los sinaptosomas presentó características de dominios "rafts", ya que el contenido de SM y de colesterol fue mayor con respecto a los Syn. De la misma manera, la fracción DRM se encontró enriquecida en proteínas marcadoras de estos microdominios, como caveolina y c-Src.
- La actividad específica de la PC-PLC se vio aumentada en las DRMs con respecto a los Syn. Asimismo, los ensayos de Slot blot confirmaron su localización tanto en los Syn como en los microdominios de membrana.

Los resultados obtenidos en la segunda etapa de la tesis demostraron que, en los sinaptosomas de ratas adultas y seniles, el estrés oxidativo inducido por la sobrecarga de FeSO<sub>4</sub> estimula la hidrólisis de la PC y la generación de DAG. De la segunda parte de la tesis podemos concluir que:

- La incubación de los sinaptosomas en presencia de Fe<sup>2+</sup> afectó la viabilidad de los mismos. La injuria oxidativa produjo una marcada peroxidación de los lípidos de la membrana sinaptosomal y este efecto se observó marcadamente ya a tiempos cortos de incubación con el agente oxidante. Sin embargo, los efectos deletéreos del Fe<sup>2+</sup> a nivel de la función mitocondrial y de la integridad de la membrana plasmática se hicieron evidentes luego de tiempos mayores de incubación con el hierro.

- La injuria oxidativa estimuló fuertemente la formación de DAG a partir de la DPPC. La generación de DAG inducida por la incubación con el hierro, es debido a la activación de las vías de la PC-PLC y de la PLD.
- En animales adultos, la hidrólisis de la PC por acción de las enzimas PC-PLC y PLD en condiciones de estrés oxidativo resultó independiente de la activación de tirosinas quinasas así como también de la vía de la PI3K/Akt.
- El estrés oxidativo indujo un aumento en la generación de DAG catalizado por las vías de la PC-PLC y la PLD en los individuos seniles. Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas con respecto a lo reportado en los animales adultos ni en la generación de DAG ni en el grado de peroxidación lipídica.

## REFERENCIAS

- Acarin, L., Peluffo, H., Barbeito, L., Castellano, B., Gonzalez, B., 2005. Astroglial nitration after postnatal excitotoxic damage: correlation with nitric oxide sources, cytoskeletal, apoptotic and antioxidant proteins. *J.Neurotrauma* 22, 189-200.
- Adamczyk, A., Kazmierczak, A., Strosznajder, J.B., 2006. Alpha-synuclein and its neurotoxic fragment inhibit dopamine uptake into rat striatal synaptosomes. Relationship to nitric oxide. *Neurochem.Int.* 49, 407-412.
- Adibhatla, R.M., Hatcher, J.F., 2005. Cytidine 5'-diphosphocholine (CDP-choline) in stroke and other CNS disorders. *Neurochem.Res.* 30, 15-23.
- Ahn, B.H., Rhim, H., Kim, S.Y., Sung, Y.M., Lee, M.Y., Choi, J.Y., Wolozin, B., Chang, J.S., Lee, Y.H., Kwon, T.K., Chung, K.C., Yoon, S.H., Hahn, S.J., Kim, M.S., Jo, Y.H., Min, D.S., 2002. alpha-Synuclein interacts with phospholipase D isozymes and inhibits pervanadate-induced phospholipase D activation in human embryonic kidney-293 cells. *J.Biol.Chem.* 277, 12334-12342.
- Albert, A.P., Piper, A.S., Large, W.A., 2005. Role of phospholipase D and diacylglycerol in activating constitutive TRPC-like cation channels in rabbit ear artery myocytes. *J.Physiol* 566, 769-780.
- Albi, E., La Porta, C.A., Cataldi, S., Magni, M.V., 2005. Nuclear sphingomyelin-synthase and protein kinase C delta in melanoma cells. *Arch.Biochem.Biophys.* 438, 156-161.
- Albi, E., Lazzarini, R., Viola, M.M., 2008. Phosphatidylcholine/sphingomyelin metabolism crosstalk inside the nucleus. *Biochem.J.* 410, 381-389.
- Allen, V., Swigart, P., Cheung, R., Cockcroft, S., Katan, M., 1997. Regulation of inositol lipid-specific phospholipase cdelta by changes in Ca<sup>2+</sup> ion concentrations. *Biochem.J.* 327 ( Pt 2), 545-552.
- Amtmann, E., 1996. The antiviral, antitumoural xanthate D609 is a competitive inhibitor of phosphatidylcholine-specific phospholipase C. *Drugs Exp.Clin.Res.* 22, 287-294.
- Andersen, J.K., 2004. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat.Med.* 10 Suppl, S18-S25.
- Ansari, M.A., Joshi, G., Huang, Q., Opii, W.O., Abdul, H.M., Sultana, R., Butterfield, D.A., 2006. In vivo administration of D609 leads to protection of subsequently isolated gerbil brain mitochondria subjected to in vitro oxidative stress induced by amyloid beta-peptide and other oxidative stressors: relevance to Alzheimer's disease and other oxidative stress-related neurodegenerative disorders. *Free Radic.Biol.Med.* 41, 1694-1703.
- Antony, P., Farooqui, A.A., Horrocks, L.A., Freysz, L., 2001. Effect of D609 on phosphatidylcholine metabolism in the nuclei of LA-N-1 neuroblastoma cells: a key role for diacylglycerol. *FEBS Lett.* 509, 115-118.
- Arai, K., Ikegaya, Y., Nakatani, Y., Kudo, I., Nishiyama, N., Matsuki, N., 2001. Phospholipase A2 mediates ischemic injury in the hippocampus: a regional difference of neuronal vulnerability. *Eur.J.Neurosci.* 13, 2319-2323.
- Ariga, T., McDonald, M.P., Yu, R.K., 2008. Role of ganglioside metabolism in the pathogenesis of Alzheimer's disease--a review. *J.Lipid Res.* 49, 1157-1175.
- Atwood, C.S., Obrenovich, M.E., Liu, T., Chan, H., Perry, G., Smith, M.A., Martins, R.N., 2003. Amyloid-beta: a chameleon walking in two worlds: a review of the trophic and toxic properties of amyloid-beta. *Brain Res.Brain Res.Rev.* 43, 1-16.
- Augustin, I., Rosenmund, C., Sudhof, T.C., Brose, N., 1999. Munc13-1 is essential for fusion competence of glutamatergic synaptic vesicles. *Nature* 400, 457-461.

- Awad, M.M., Bryant, A.E., Stevens, D.L., Rood, J.I., 1995. Virulence studies on chromosomal alpha-toxin and theta-toxin mutants constructed by allelic exchange provide genetic evidence for the essential role of alpha-toxin in *Clostridium perfringens*-mediated gas gangrene. *Mol.Microbiol.* 15, 191-202.
- Balasubramanian, K., Mirnikjoo, B., Schroit, A.J., 2007. Regulated externalization of phosphatidylserine at the cell surface: implications for apoptosis. *J.Biol.Chem.* 282, 18357-18364.
- Banno, Y., Ohguchi, K., Matsumoto, N., Koda, M., Ueda, M., Hara, A., Dikic, I., Nozawa, Y., 2005. Implication of phospholipase D2 in oxidant-induced phosphoinositide 3-kinase signaling via Pyk2 activation in PC12 cells. *J.Biol.Chem.* 280, 16319-16324.
- Bawa, B., Abbott, L.C., 2008. Analysis of calcium ion homeostasis and mitochondrial function in cerebellar granule cells of adult CaV 2.1 calcium ion channel mutant mice. *Neurotox.Res.* 13, 1-18.
- Benfield, A.P., Goodey, N.M., Phillips, L.T., Martin, S.F., 2007. Structural studies examining the substrate specificity profiles of PC-PLC(Bc) protein variants. *Arch.Biochem.Biophys.* 460, 41-47.
- Berg, D., Youdim, M.B., 2006. Role of iron in neurodegenerative disorders. *Top.Magn Reson.Imaging* 17, 5-17.
- Billah, M.M., Anthes, J.C., 1990. The regulation and cellular functions of phosphatidylcholine hydrolysis. *Biochem.J.* 269, 281-291.
- Billah, M.M., Eckel, S., Mullmann, T.J., Egan, R.W., Siegel, M.I., 1989. Phosphatidylcholine hydrolysis by phospholipase D determines phosphatidate and diglyceride levels in chemotactic peptide-stimulated human neutrophils. Involvement of phosphatidate phosphohydrolase in signal transduction. *J.Biol.Chem.* 264, 17069-17077.
- Bisogno, T., Howell, F., Williams, G., Minassi, A., Cascio, M.G., Ligresti, A., Matias, I., Schiano-Moriello, A., Paul, P., Williams, E.J., Gangadharan, U., Hobbs, C., Di, M., V, Doherty, P., 2003. Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain. *J.Cell Biol.* 163, 463-468.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can.J.Biochem.Physiol* 37, 911-917.
- Bostanci, M.O., Bagirici, F., 2007. Neuroprotection by 7-nitroindazole against iron-induced hippocampal neurotoxicity. *Cell Mol.Neurobiol.* 27, 933-941.
- Boyce, J.A., 2008. Eicosanoids in asthma, allergic inflammation, and host defense. *Curr.Mol.Med.* 8, 335-349.
- Brindley, D.N., 2004. Lipid phosphate phosphatases and related proteins: signaling functions in development, cell division, and cancer. *J.Cell Biochem.* 92, 900-912.
- Brown, D.A., Rose, J.K., 1992. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* 68, 533-544.
- Bull, R., Finkelstein, J.P., Galvez, J., Sanchez, G., Donoso, P., Behrens, M.I., Hidalgo, C., 2008. Ischemia enhances activation by Ca<sup>2+</sup> and redox modification of ryanodine receptor channels from rat brain cortex. *J.Neurosci.* 28, 9463-9472.
- Bunney, T.D., Katan, M., 2006. Phospholipase C epsilon: linking second messengers and small GTPases. *Trends Cell Biol.* 16, 640-648.
- Bush, A.I., 2002. Metal complexing agents as therapies for Alzheimer's disease. *Neurobiol.Aging* 23, 1031-1038.

- Butterfield, D.A., Reed, T., Newman, S.F., Sultana, R., 2007. Roles of amyloid beta-peptide-associated oxidative stress and brain protein modifications in the pathogenesis of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Free Radic.Biol.Med.* 43, 658-677.
- Butterfield, D.A., Yatin, S.M., Varadarajan, S., Koppal, T., 1999. Amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress, neurotoxicity, and Alzheimer's disease. *Methods Enzymol.* 309, 746-768.
- Buttery, P., Beg, A.A., Chih, B., Broder, A., Mason, C.A., Scheiffele, P., 2006. The diacylglycerol-binding protein alpha1-chimaerin regulates dendritic morphology. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 103, 1924-1929.
- Cai, H., Erhardt, P., Szeberenyi, J., az-Meco, M.T., Johansen, T., Moscat, J., Cooper, G.M., 1992. Hydrolysis of phosphatidylcholine is stimulated by Ras proteins during mitogenic signal transduction. *Mol.Cell Biol.* 12, 5329-5335.
- Cai, H., Erhardt, P., Troppmair, J., az-Meco, M.T., Sithanandam, G., Rapp, U.R., Moscat, J., Cooper, G.M., 1993. Hydrolysis of phosphatidylcholine couples Ras to activation of Raf protein kinase during mitogenic signal transduction. *Mol.Cell Biol.* 13, 7645-7651.
- Caro, A.A., Cederbaum, A.I., 2003. Role of phospholipase A2 activation and calcium in CYP2E1-dependent toxicity in HepG2 cells. *J.Biol.Chem.* 278, 33866-33877.
- Carrasco, S., Merida, I., 2007. Diacylglycerol, when simplicity becomes complex. *Trends Biochem.Sci.* 32, 27-36.
- Castellani, R.J., Moreira, P.I., Liu, G., Dobson, J., Perry, G., Smith, M.A., Zhu, X., 2007. Iron: the Redox-active center of oxidative stress in Alzheimer disease. *Neurochem.Res.* 32, 1640-1645.
- Cecchetti, S., Spadaro, F., Lugini, L., Podo, F., Ramoni, C., 2007. Functional role of phosphatidylcholine-specific phospholipase C in regulating CD16 membrane expression in natural killer cells. *Eur.J.Immunol.* 37, 2912-2922.
- Cheng, Y., Zhao, Q., Liu, X., Araki, S., Zhang, S., Miao, J., 2006. Phosphatidylcholine-specific phospholipase C, p53 and ROS in the association of apoptosis and senescence in vascular endothelial cells. *FEBS Lett.* 580, 4911-4915.
- Clark, M.A., Shorr, R.G., Bomalaski, J.S., 1986. Antibodies prepared to *Bacillus cereus* phospholipase C crossreact with a phosphatidylcholine preferring phospholipase C in mammalian cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 140, 114-119.
- Cohen, A.W., Hnasko, R., Schubert, W., Lisanti, M.P., 2004. Role of caveolae and caveolins in health and disease. *Physiol Rev.* 84, 1341-1379.
- Colley, W.C., Sung, T.C., Roll, R., Jenco, J., Hammond, S.M., Altshuller, Y., Bar-Sagi, D., Morris, A.J., Frohman, M.A., 1997. Phospholipase D2, a distinct phospholipase D isoform with novel regulatory properties that provokes cytoskeletal reorganization. *Curr.Biol.* 7, 191-201.
- Colon-Gonzalez, F., Kazanietz, M.G., 2006. C1 domains exposed: from diacylglycerol binding to protein-protein interactions. *Biochim.Biophys.Acta* 1761, 827-837.
- Corl, C.M., Cao, Y.Z., Cohen, Z.S., Sordillo, L.M., 2003. Oxidant stress enhances Lyso-PAF-Act activity by modifying phospholipase D and phosphatidic acid in aortic endothelial cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 302, 610-614.
- Cotman, C.W., 1974. Isolation of synaptosomal and synaptic plasma membrane fractions. *Methods Enzymol.* 31, 445-452.
- Cox, D.A., Cohen, M.L., 1997. Amyloid beta-induced neurotoxicity is associated with phospholipase D activation in cultured rat hippocampal cells. *Neurosci.Lett.* 229, 37-40.

- Cui, Z., Houweling, M., 2002. Phosphatidylcholine and cell death. *Biochim.Biophys.Acta* 1585, 87-96.
- Cui, Z., Houweling, M., Chen, M.H., Record, M., Chap, H., Vance, D.E., Terce, F., 1996. A genetic defect in phosphatidylcholine biosynthesis triggers apoptosis in Chinese hamster ovary cells. *J.Biol.Chem.* 271, 14668-14671.
- Cunningham, T.J., Yao, L., Oetinger, M., Cort, L., Blankenhorn, E.P., Greenstein, J.I., 2006. Secreted phospholipase A2 activity in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *J.Neuroinflammation.* 3, 26.
- Cuschieri, J., Billgren, J., Maier, R.V., 2006. Phosphatidylcholine-specific phospholipase C (PC-PLC) is required for LPS-mediated macrophage activation through CD14. *J.Leukoc.Biol.* 80, 407-414.
- Czarny, M., Fiucci, G., Lavie, Y., Banno, Y., Nozawa, Y., Liscovitch, M., 2000. Phospholipase D2: functional interaction with caveolin in low-density membrane microdomains. *FEBS Lett.* 467, 326-332.
- Czarny, M., Lavie, Y., Fiucci, G., Liscovitch, M., 1999. Localization of phospholipase D in detergent-insoluble, caveolin-rich membrane domains. Modulation by caveolin-1 expression and caveolin-182-101. *J.Biol.Chem.* 274, 2717-2724.
- de Diesbach, P., Medts, T., Carpentier, S., D'Auria, L., Van Der, S.P., Platek, A., Mettlen, M., Caplanusi, A., van den Hove, M.F., Tyteca, D., Courtoy, P.J., 2008. Differential subcellular membrane recruitment of Src may specify its downstream signalling. *Exp.Cell Res.* 314, 1465-1479.
- Depierre, J.W., Karnovsky, M.L., 1973. Plasma membranes of mammalian cells: a review of methods for their characterization and isolation. *J.Cell Biol.* 56, 275-303.
- Diaz, O., Berquand, A., Dubois, M., Di, A.S., Sette, C., Bourgoin, S., Lagarde, M., Nemoz, G., Prigent, A.F., 2002. The mechanism of docosahexaenoic acid-induced phospholipase D activation in human lymphocytes involves exclusion of the enzyme from lipid rafts. *J.Biol.Chem.* 277, 39368-39378.
- Diaz, O., Mebarek-Azzam, S., Benzaria, A., Dubois, M., Lagarde, M., Nemoz, G., Prigent, A.F., 2005. Disruption of lipid rafts stimulates phospholipase d activity in human lymphocytes: implication in the regulation of immune function. *J.Immunol.* 175, 8077-8086.
- Dmitrieva, V.G., Torshina, E.V., Yuzhakov, V.V., Povarova, O.V., Skvortsova, V.I., Limborska, S.A., Dergunova, L.V., 2008. Expression of sphingomyelin synthase 1 gene in rat brain focal ischemia. *Brain Res.* 1188, 222-227.
- Dresbach, T., Nawrotzki, R., Kremer, T., Schumacher, S., Quinones, D., Kluska, M., Kuhse, J., Kirsch, J., 2008. Molecular architecture of glycinergic synapses. *Histochem.Cell Biol.* 130, 617-633.
- Droge, W., Schipper, H.M., 2007. Oxidative stress and aberrant signaling in aging and cognitive decline. *Aging Cell* 6, 361-370.
- Du, C., Zhao, Q., Araki, S., Zhang, S., Miao, J., 2003. Apoptosis mediated by phosphatidylcholine-specific phospholipase C is associated with cAMP, p53 level, and cell-cycle distribution in vascular endothelial cells. *Endothelium* 10, 141-147.
- Exton, J.H., 1994. Phosphatidylcholine breakdown and signal transduction. *Biochim.Biophys.Acta* 1212, 26-42.
- Exton, J.H., 2002. Regulation of phospholipase D. *FEBS Lett.* 531, 58-61.
- Eyster, K.M., 2007. The membrane and lipids as integral participants in signal transduction: lipid signal transduction for the non-lipid biochemist. *Adv.Physiol Educ.* 31, 5-16.

- Fadok, V.A., de, C.A., Daleke, D.L., Henson, P.M., Bratton, D.L., 2001. Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *J.Biol.Chem.* 276, 1071-1077.
- Fadok, V.A., Voelker, D.R., Campbell, P.A., Cohen, J.J., Bratton, D.L., Henson, P.M., 1992. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J.Immunol.* 148, 2207-2216.
- Fang, Y., Vilella-Bach, M., Bachmann, R., Flanigan, A., Chen, J., 2001. Phosphatidic acid-mediated mitogenic activation of mTOR signaling. *Science* 294, 1942-1945.
- Fantuzzi, L., Spadaro, F., Purificato, C., Cecchetti, S., Podo, F., Belardelli, F., Gessani, S., Ramoni, C., 2008. Phosphatidylcholine-specific phospholipase C activation is required for CCR5-dependent, NF- $\kappa$ B-driven CCL2 secretion elicited in response to HIV-1 gp120 in human primary macrophages. *Blood* 111, 3355-3363.
- Farooqui, A.A., Horrocks, L.A., Farooqui, T., 2007. Interactions between neural membrane glycerophospholipid and sphingolipid mediators: a recipe for neural cell survival or suicide. *J.Neurosci.Res.* 85, 1834-1850.
- Farooqui, A.A., Horrocks, L.A., Farooqui, T., 2000. Glycerophospholipids in brain: their metabolism, incorporation into membranes, functions, and involvement in neurological disorders. *Chem.Phys.Lipids* 106, 1-29.
- Fernandez-Tome, M.C., Speziale, E.H., Sterin-Speziale, N.B., 2002. Phospholipase C inhibitors and prostaglandins differentially regulate phosphatidylcholine synthesis in rat renal papilla. Evidence of compartmental regulation of CTP:phosphocholine cytidyltransferase and CDP-choline:1,2-diacylglycerol cholinephosphotransferase. *Biochim.Biophys.Acta* 1583, 185-194.
- Fleming, I.N., Yeaman, S.J., 1995. Subcellular distribution of N-ethylmaleimide-sensitive and -insensitive phosphatidic acid phosphohydrolase in rat brain. *Biochim.Biophys.Acta* 1254, 161-168.
- Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J.Biol.Chem.* 226, 497-509.
- Foster, D.A., Xu, L., 2003. Phospholipase D in cell proliferation and cancer. *Mol.Cancer Res.* 1, 789-800.
- Freyberg, Z., Siddhanta, A., Shields, D., 2003. "Slip, sliding away": phospholipase D and the Golgi apparatus. *Trends Cell Biol.* 13, 540-546.
- Gadoni, E., Olivero, A., Miglietta, A., Bocca, C., Gabriel, L., 1993. Cytoskeletal modifications induced by 4-hydroxynonenal. *Cytotechnology* 11 Suppl 1, S62-S64.
- Galve-Roperh, I., Aguado, T., Palazuelos, J., Guzman, M., 2008. Mechanisms of control of neuron survival by the endocannabinoid system. *Curr.Pharm.Des* 14, 2279-2288.
- Giusto, N.M., Roque, M.E., Ilincheta de Boschero, M.G., 1992. Effects of aging on the content, composition and synthesis of sphingomyelin in the central nervous system. *Lipids* 27, 835-839.
- Giusto, N.M., Salvador, G.A., Castagnet, P.I., Pasquare, S.J., Ilincheta de Boschero, M.G., 2002. Age-associated changes in central nervous system glycerolipid composition and metabolism. *Neurochem.Res.* 27, 1513-1523.
- Gonzalez, R., Loffelholz, K., Klein, J., 1996. Adrenergic activation of phospholipase D in primary rat astrocytes. *Neurosci.Lett.* 219, 53-56.
- Gonzalez-Roura, A., Casas, J., Llebaria, A., 2002. Synthesis and phospholipase C inhibitory activity of D609 diastereomers. *Lipids* 37, 401-406.

- Gould, C.M., Newton, A.C., 2008. The life and death of protein kinase C. *Curr.Drug Targets.* 9, 614-625.
- Griner, E.M., Kazanietz, M.G., 2007. Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer. *Nat.Rev.Cancer* 7, 281-294.
- Guo, Z.H., Mattson, M.P., 2000. Neurotrophic factors protect cortical synaptic terminals against amyloid and oxidative stress-induced impairment of glucose transport, glutamate transport and mitochondrial function. *Cereb.Cortex* 10, 50-57.
- Hall, C., Lim, L., Leung, T., 2005. C1, see them all. *Trends Biochem.Sci.* 30, 169-171.
- Hammond, S.M., Jenco, J.M., Nakashima, S., Cadwallader, K., Gu, Q., Cook, S., Nozawa, Y., Prestwich, G.D., Frohman, M.A., Morris, A.J., 1997. Characterization of two alternately spliced forms of phospholipase D1. Activation of the purified enzymes by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, ADP-ribosylation factor, and Rho family monomeric GTP-binding proteins and protein kinase C-alpha. *J.Biol.Chem.* 272, 3860-3868.
- Han, J.S., Hyun, B.C., Kim, J.H., Shin, I., 1999. Fas-mediated activation of phospholipase D is coupled to the stimulation of phosphatidylcholine-specific phospholipase C in A20 cells. *Arch.Biochem.Biophys.* 367, 233-239.
- Hannun, Y.A., Obeid, L.M., 2008. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 9, 139-150.
- Haorah, J., Ramirez, S.H., Schall, K., Smith, D., Pandya, R., Persidsky, Y., 2007. Oxidative stress activates protein tyrosine kinase and matrix metalloproteinases leading to blood-brain barrier dysfunction. *J.Neurochem.* 101, 566-576.
- Hattori, H., Kanfer, J.N., 1985. Synaptosomal phospholipase D potential role in providing choline for acetylcholine synthesis. *J.Neurochem.* 45, 1578-1584.
- Helms, J.B., Zurzolo, C., 2004. Lipids as targeting signals: lipid rafts and intracellular trafficking. *Traffic.* 5, 247-254.
- Hla, T., 2004. Physiological and pathological actions of sphingosine 1-phosphate. *Semin.Cell Dev.Biol.* 15, 513-520.
- Ho, J.L., Zhu, B., He, S., Du, B., Rothman, R., 1994. Interleukin 4 receptor signaling in human monocytes and U937 cells involves the activation of a phosphatidylcholine-specific phospholipase C: a comparison with chemotactic peptide, FMLP, phospholipase D, and sphingomyelinase. *J.Exp.Med.* 180, 1457-1469.
- Hofman, E.G., Ruonala, M.O., Bader, A.N., van den, H.D., Voortman, J., Roovers, R.C., Verkleij, A.J., Gerritsen, H.C., van Bergen En Henegouwen PM, 2008. EGF induces coalescence of different lipid rafts. *J.Cell Sci.* 121, 2519-2528.
- Hokin, M.R., Hokin, L.E., 1953. Enzyme secretion and the incorporation of P32 into phospholipides of pancreas slices. *J.Biol.Chem.* 203, 967-977.
- Horakova, E., Ondrejickova, O., Vajdova, M., Korytar, P., Durackova, Z., Schaur, R.J., 2002. Mechanisms of iron-induced oxidative modifications of creatine kinase in rat brain in vitro. possible involvement of HNE. *Gen.Physiol Biophys.* 21, 327-336.
- Hostetler, K.Y., Hall, L.B., 1980. Phospholipase C activity of rat tissues. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 96, 388-393.
- Huitema, K., van den, D.J., Brouwers, J.F., Holthuis, J.C., 2004. Identification of a family of animal sphingomyelin synthases. *EMBO J.* 23, 33-44.

- Hwang, J.I., Oh, Y.S., Shin, K.J., Kim, H., Ryu, S.H., Suh, P.G., 2005. Molecular cloning and characterization of a novel phospholipase C, PLC-eta. *Biochem.J.* 389, 181-186.
- Igbavboa, U., Avdulov, N.A., Schroeder, F., Wood, W.G., 1996. Increasing age alters transbilayer fluidity and cholesterol asymmetry in synaptic plasma membranes of mice. *J.Neurochem.* 66, 1717-1725.
- Ito, Y., Nakashima, S., Nozawa, Y., 1997. Hydrogen peroxide-induced phospholipase D activation in rat pheochromocytoma PC12 cells: possible involvement of Ca<sup>2+</sup>-dependent protein tyrosine kinase. *J.Neurochem.* 69, 729-736.
- Janich, P., Corbeil, D., 2007. GM1 and GM3 gangliosides highlight distinct lipid microdomains within the apical domain of epithelial cells. *FEBS Lett.* 581, 1783-1787.
- Jenco, J.M., Rawlingson, A., Daniels, B., Morris, A.J., 1998. Regulation of phospholipase D2: selective inhibition of mammalian phospholipase D isoenzymes by alpha- and beta-synucleins. *Biochemistry* 37, 4901-4909.
- Jiang, H., Wu, Y.C., Nakamura, M., Liang, Y., Tanaka, Y., Holmes, S., Dawson, V.L., Dawson, T.M., Ross, C.A., Smith, W.W., 2007. Parkinson's disease genetic mutations increase cell susceptibility to stress: mutant alpha-synuclein enhances. *Neurobiol.Aging* 28, 1709-1717.
- Joshi, G., Sultana, R., Perluigi, M., Allan, B.D., 2005. In vivo protection of synaptosomes from oxidative stress mediated by Fe<sup>2+</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or 2,2-azobis-(2-amidinopropane) dihydrochloride by the glutathione mimetic tricyclodecan-9-yl-xanthogenate. *Free Radic.Biol.Med.* 38, 1023-1031.
- Kammermeier, P.J., 2008. Endogenous homer proteins regulate metabotropic glutamate receptor signaling in neurons. *J.Neurosci.* 28, 8560-8567.
- Kanfer, J.N., Singh, I.N., Pettegrew, J.W., McCartney, D.G., Sorrentino, G., 1996. Phospholipid metabolism in Alzheimer's disease and in a human cholinergic cell. *J.Lipid Mediat.Cell Signal.* 14, 361-363.
- Kang, M.S., Jung, S.Y., Jung, K.M., Kim, S.K., Ahn, K.H., Kim, D.K., 2008. D609, an Inhibitor of Phosphatidylcholine-specific Phospholipase C, Inhibits Group IV Cytosolic Phospholipase A(2). *Mol.Cells* 26.
- Kanoh, H., Kanaho, Y., Nozawa, Y., 1991. Activation and solubilization by Triton X-100 of membrane-bound phospholipase D of rat brain. *Lipids* 26, 426-430.
- Kaplan, P., Tatarkova, Z., Racay, P., Lehotsky, J., Pavlikova, M., Dobrota, D., 2007. Oxidative modifications of cardiac mitochondria and inhibition of cytochrome c oxidase activity by 4-hydroxynonenal. *Redox.Rep.* 12, 211-218.
- Katan, M., 1998. Families of phosphoinositide-specific phospholipase C: structure and function. *Biochim.Biophys.Acta* 1436, 5-17.
- Kaul, S., Anantharam, V., Yang, Y., Choi, C.J., Kanthasamy, A., Kanthasamy, A.G., 2005. Tyrosine phosphorylation regulates the proteolytic activation of protein kinase Cdelta in dopaminergic neuronal cells. *J.Biol.Chem.* 280, 28721-28730.
- Kaur, D., Andersen, J.K., 2002. Ironing out Parkinson's disease: is therapeutic treatment with iron chelators a real possibility? *Aging Cell* 1, 17-21.
- Kawamata, T., Tooyama, I., Yamada, T., Walker, D.G., McGeer, P.L., 1993. Lactotransferrin immunocytochemistry in Alzheimer and normal human brain. *Am.J.Pathol.* 142, 1574-1585.
- Keller, J.N., Mark, R.J., Bruce, A.J., Blanc, E., Rothstein, J.D., Uchida, K., Waeg, G., Mattson, M.P., 1997. 4-Hydroxynonenal, an aldehydic product of membrane lipid peroxidation, impairs glutamate transport and mitochondrial function in synaptosomes. *Neuroscience* 80, 685-696.

- Keller, J.N., Steiner, M.R., Mattson, M.P., Steiner, S.M., 1996. Lysophosphatidic acid decreases glutamate and glucose uptake by astrocytes. *J.Neurochem.* 67, 2300-2305.
- Kelley, G.G., Reks, S.E., Ondrako, J.M., Smrcka, A.V., 2001. Phospholipase C(epsilon): a novel Ras effector. *EMBO J.* 20, 743-754.
- Kennedy, E.P., 1961. Biosynthesis of complex lipids. *Fed.Proc.* 20, 934-940.
- Kim, J., Min, G., Bae, Y.S., Min, D.S., 2004. Phospholipase D is involved in oxidative stress-induced migration of vascular smooth muscle cells via tyrosine phosphorylation and protein kinase C. *Exp.Mol.Med.* 36, 103-109.
- Kim, J.G., Shin, I., Lee, K.S., Han, J.S., 2001. D609-sensitive tyrosine phosphorylation is involved in Fas-mediated phospholipase D activation. *Exp.Mol.Med.* 33, 303-309.
- Kim, J.H., Han, J.M., Lee, S., Kim, Y., Lee, T.G., Park, J.B., Lee, S.D., Suh, P.G., Ryu, S.H., 1999. Phospholipase D1 in caveolae: regulation by protein kinase Calpha and caveolin-1. *Biochemistry* 38, 3763-3769.
- Kim, J.H., Kim, S.W., Jung, P.J., Yon, C., Kim, S.C., Han, J.S., 2002. Phosphatidylcholine-specific phospholipase C and RhoA are involved in the thyrotropin-induced activation of phospholipase D in FRTL-5 thyroid cells. *Mol.Cells* 14, 272-280.
- Kim, Y., Han, J.M., Han, B.R., Lee, K.A., Kim, J.H., Lee, B.D., Jang, I.H., Suh, P.G., Ryu, S.H., 2000. Phospholipase D1 is phosphorylated and activated by protein kinase C in caveolin-enriched microdomains within the plasma membrane. *J.Biol.Chem.* 275, 13621-13627.
- Kishimoto, A., Takai, Y., Mori, T., Kikkawa, U., Nishizuka, Y., 1980. Activation of calcium and phospholipid-dependent protein kinase by diacylglycerol, its possible relation to phosphatidylinositol turnover. *J.Biol.Chem.* 255, 2273-2276.
- Klein, J., 2005. Functions and pathophysiological roles of phospholipase D in the brain. *J.Neurochem.* 94, 1473-1487.
- Klein, J., Chalifa, V., Liscovitch, M., Loffelholz, K., 1995. Role of phospholipase D activation in nervous system physiology and pathophysiology. *J.Neurochem.* 65, 1445-1455.
- Kobayashi, H., Honma, S., Nakahata, N., Ohizumi, Y., 2000. Involvement of phosphatidylcholine-specific phospholipase C in thromboxane A2-induced activation of mitogen-activated protein kinase in astrocytoma cells. *J.Neurochem.* 74, 2167-2173.
- Kobayashi, M., Kanfer, J.N., 1987. Phosphatidylethanol formation via transphosphatidylolation by rat brain synaptosomal phospholipase D. *J.Neurochem.* 48, 1597-1603.
- Kotter, K., Klein, J., 1999. Adrenergic modulation of astroglial phospholipase D activity and cell proliferation. *Brain Res.* 830, 138-145.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lajoie, P., Nabi, I.R., 2007. Regulation of raft-dependent endocytosis. *J.Cell Mol.Med.* 11, 644-653.
- Lauderback, C.M., Drake, J., Zhou, D., Hackett, J.M., Castegna, A., Kanski, J., Tsoras, M., Varadarajan, S., Butterfield, D.A., 2003. Derivatives of xanthic acid are novel antioxidants: application to synaptosomes. *Free Radic.Res.* 37, 355-365.
- Lee, D.W., Andersen, J.K., Kaur, D., 2006. Iron dysregulation and neurodegeneration: the molecular connection. *Mol.Interv.* 6, 89-97.

- Lee, H., Park, D.S., Wang, X.B., Scherer, P.E., Schwartz, P.E., Lisanti, M.P., 2002. Src-induced phosphorylation of caveolin-2 on tyrosine 19. Phospho-caveolin-2 (Tyr(P)19) is localized near focal adhesions, remains associated with lipid rafts/caveolae, but no longer forms a high molecular mass hetero-oligomer with caveolin-1. *J.Biol.Chem.* 277, 34556-34567.
- Lee, M.Y., Kim, S.Y., Min, D.S., Choi, Y.S., Shin, S.L., Chun, M.H., Lee, S.B., Kim, M.S., Jo, Y.H., 2000. Upregulation of phospholipase D in astrocytes in response to transient forebrain ischemia. *Glia* 30, 311-317.
- Leveugle, B., Spik, G., Perl, D.P., Bouras, C., Fillit, H.M., Hof, P.R., 1994. The iron-binding protein lactotransferrin is present in pathologic lesions in a variety of neurodegenerative disorders: a comparative immunohistochemical analysis. *Brain Res.* 650, 20-31.
- Li, Y., Maher, P., Schubert, D., 1998. Phosphatidylcholine-specific phospholipase C regulates glutamate-induced nerve cell death. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95, 7748-7753.
- Li, Z., Hailemariam, T.K., Zhou, H., Li, Y., Duckworth, D.C., Peake, D.A., Zhang, Y., Kuo, M.S., Cao, G., Jiang, X.C., 2007. Inhibition of sphingomyelin synthase (SMS) affects intracellular sphingomyelin accumulation and plasma membrane lipid organization. *Biochim.Biophys.Acta* 1771, 1186-1194.
- Liscovitch, M., Czarny, M., Fiucci, G., Tang, X., 2000. Phospholipase D: molecular and cell biology of a novel gene family. *Biochem.J.* 345 Pt 3, 401-415.
- Liu, H., Zhang, H., Forman, H.J., 2007. Silica induces macrophage cytokines through phosphatidylcholine-specific phospholipase C with hydrogen peroxide. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 36, 594-599.
- Liu, X., Zhao, Q., Araki, S., Zhang, S., Miao, J., 2006. Contrasting effects of phosphatidylinositol- and phosphatidylcholine-specific phospholipase C on apoptosis in cultured endothelial cells. *Endothelium* 13, 205-211.
- London, E., Brown, D.A., 2000. Insolubility of lipids in triton X-100: physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (rafts). *Biochim.Biophys.Acta* 1508, 182-195.
- Lopez, G.H., Ilincheta de Boschero, M.G., Castagnet, P.I., Giusto, N.M., 1995. Age-associated changes in the content and fatty acid composition of brain glycerophospholipids. *Comp Biochem.Physiol B Biochem.Mol.Biol.* 112, 331-343.
- Lovell, M.A., Robertson, J.D., Teesdale, W.J., Campbell, J.L., Markesbery, W.R., 1998. Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. *J.Neurol.Sci.* 158, 47-52.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.* 193, 265-275.
- Lu, C., Chan, S.L., Fu, W., Mattson, M.P., 2002. The lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal facilitates opening of voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels in neurons by increasing protein tyrosine phosphorylation. *J.Biol.Chem.* 277, 24368-24375.
- Luberto, C., Hannun, Y.A., 1998. Sphingomyelin synthase, a potential regulator of intracellular levels of ceramide and diacylglycerol during SV40 transformation. Does sphingomyelin synthase account for the putative phosphatidylcholine-specific phospholipase C? *J.Biol.Chem.* 273, 14550-14559.
- Luberto, C., Yoo, D.S., Suidan, H.S., Bartoli, G.M., Hannun, Y.A., 2000. Differential effects of sphingomyelin hydrolysis and resynthesis on the activation of NF-kappa B in normal and SV40-transformed human fibroblasts. *J.Biol.Chem.* 275, 14760-14766.
- Lucas, P., Ukhanov, K., Leinders-Zufall, T., Zufall, F., 2003. A diacylglycerol-gated cation channel in vomeronasal neuron dendrites is impaired in TRPC2 mutant mice: mechanism of pheromone transduction. *Neuron* 40, 551-561.

- Lv, X., Wang, N., Su, L., Zhang, S., Miao, J., 2006. Inhibition of PC-PLC blocked the survival of mouse neural cells by up-regulating the expression of integrin beta4 and Rb. *Dev.Neurosci.* 28, 499-504.
- Macfarlane, M.G., Knight, B.C., 1941. The biochemistry of bacterial toxins: The lecithinase activity of *Cl. welchii* toxins. *Biochem.J.* 35, 884-902.
- Mandel, S., Amit, T., Bar-Am, O., Youdim, M.B., 2007. Iron dysregulation in Alzheimer's disease: multimodal brain permeable iron chelating drugs, possessing neuroprotective-neurorescue and amyloid precursor protein-processing regulatory activities as therapeutic agents. *Prog.Neurobiol.* 82, 348-360.
- Martin, R.E., Elliott, M.H., Brush, R.S., Anderson, R.E., 2005. Detailed characterization of the lipid composition of detergent-resistant membranes from photoreceptor rod outer segment membranes. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 46, 1147-1154.
- Mateos, M.V., Uranga, R.M., Salvador, G.A., Giusto, N.M., 2006. Coexistence of phosphatidylcholine-specific phospholipase C and phospholipase D activities in rat cerebral cortex synaptosomes. *Lipids* 41, 273-280.
- Matsuzawa, Y., Hostetler, K.Y., 1980. Properties of phospholipase C isolated from rat liver lysosomes. *J.Biol.Chem.* 255, 646-652.
- Mattson, M.P., 1997. Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. *Physiol Rev.* 77, 1081-1132.
- Mattson, M.P., 2007. Calcium and neurodegeneration. *Aging Cell* 6, 337-350.
- McGrath, L.T., McGleenon, B.M., Brennan, S., McColl, D., McIlroy, S., Passmore, A.P., 2001. Increased oxidative stress in Alzheimer's disease as assessed with 4-hydroxynonenal but not malondialdehyde. *QJM.* 94, 485-490.
- Meier, K.E., Gause, K.C., Wisheart-Johnson, A.E., Gore, A.C., Finley, E.L., Jones, L.G., Bradshaw, C.D., McNair, A.F., Ella, K.M., 1998. Effects of propranolol on phosphatidate phosphohydrolase and mitogen-activated protein kinase activities in A7r5 vascular smooth muscle cells. *Cell Signal.* 10, 415-426.
- Meng, A., Luberto, C., Meier, P., Bai, A., Yang, X., Hannun, Y.A., Zhou, D., 2004. Sphingomyelin synthase as a potential target for D609-induced apoptosis in U937 human monocytic leukemia cells. *Exp.Cell Res.* 292, 385-392.
- Merida, I., vila-Flores, A., Merino, E., 2008. Diacylglycerol kinases: at the hub of cell signalling. *Biochem.J.* 409, 1-18.
- Michel, V., Bakovic, M., 2007. Lipid rafts in health and disease. *Biol.Cell* 99, 129-140.
- Min, D.S., Kim, E.G., Exton, J.H., 1998. Involvement of tyrosine phosphorylation and protein kinase C in the activation of phospholipase D by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Swiss 3T3 fibroblasts. *J.Biol.Chem.* 273, 29986-29994.
- Molander-Melin, M., Blennow, K., Bogdanovic, N., Dellheden, B., Mansson, J.E., Fredman, P., 2005. Structural membrane alterations in Alzheimer brains found to be associated with regional disease development; increased density of gangliosides GM1 and GM2 and loss of cholesterol in detergent-resistant membrane domains. *J.Neurochem.* 92, 171-182.
- Monick, M.M., Carter, A.B., Gudmundsson, G., Mallampalli, R., Powers, L.S., Hunninghake, G.W., 1999. A phosphatidylcholine-specific phospholipase C regulates activation of p42/44 mitogen-activated protein kinases in lipopolysaccharide-stimulated human alveolar macrophages. *J.Immunol.* 162, 3005-3012.
- Moos, T., 1996. Immunohistochemical localization of intraneuronal transferrin receptor immunoreactivity in the adult mouse central nervous system. *J.Comp Neurol.* 375, 675-692.

- Muller-Decker, K., 1989. Interruption of TPA-induced signals by an antiviral and antitumoral xanthate compound: inhibition of a phospholipase C-type reaction. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 162, 198-205.
- Muralikrishna, A.R., Hatcher, J.F., 2006. Phospholipase A2, reactive oxygen species, and lipid peroxidation in cerebral ischemia. *Free Radic.Biol.Med.* 40, 376-387.
- Nakahara, M., Shimosawa, M., Nakamura, Y., Irino, Y., Morita, M., Kudo, Y., Fukami, K., 2005. A novel phospholipase C, PLC(eta)2, is a neuron-specific isozyme. *J.Biol.Chem.* 280, 29128-29134.
- Natarajan, V., Scribner, W.M., Taher, M.M., 1993a. 4-Hydroxynonenal, a metabolite of lipid peroxidation, activates phospholipase D in vascular endothelial cells. *Free Radic.Biol.Med.* 15, 365-375.
- Natarajan, V., Scribner, W.M., Vepa, S., 1997. Phosphatase inhibitors potentiate 4-hydroxynonenal-induced phospholipase D activation in vascular endothelial cells. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 17, 251-259.
- Natarajan, V., Taher, M.M., Roehm, B., Parinandi, N.L., Schmid, H.H., Kiss, Z., Garcia, J.G., 1993b. Activation of endothelial cell phospholipase D by hydrogen peroxide and fatty acid hydroperoxide. *J.Biol.Chem.* 268, 930-937.
- Naylor, C.E., Eaton, J.T., Howells, A., Justin, N., Moss, D.S., Titball, R.W., Basak, A.K., 1998. Structure of the key toxin in gas gangrene. *Nat.Struct.Biol.* 5, 738-746.
- Negre-Salvayre, A., Vieira, O., Escargueil-Blanc, I., Salvayre, R., 2003. Oxidized LDL and 4-hydroxynonenal modulate tyrosine kinase receptor activity. *Mol.Aspects Med.* 24, 251-261.
- Newton, A.C., 2003. Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm. *Biochem.J.* 370, 361-371.
- Nishida, A., Shimizu, M., Kanaho, Y., Nozawa, Y., Yamawaki, S., 1992. Characterization of phospholipase D in a cell-free system of cultured cells derived from rat frontal cortex. *Brain Res.* 595, 12-16.
- Nishizuka, Y., 1992. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 258, 607-614.
- Nishizuka, Y., 1986. Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* 233, 305-312.
- Nishizuka, Y., 1988. The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature* 334, 661-665.
- Nozawa, Y., 2002. Roles of phospholipase D in apoptosis and pro-survival. *Biochim.Biophys.Acta* 1585, 77-86.
- Obeid, L.M., Linardic, C.M., Karolak, L.A., Hannun, Y.A., 1993. Programmed cell death induced by ceramide. *Science* 259, 1769-1771.
- Oh, S.O., Hong, J.H., Kim, Y.R., Yoo, H.S., Lee, S.H., Lim, K., Hwang, B.D., Exton, J.H., Park, S.K., 2000. Regulation of phospholipase D2 by H(2)O(2) in PC12 cells. *J.Neurochem.* 75, 2445-2454.
- Okamoto, T., Schlegel, A., Scherer, P.E., Lisanti, M.P., 1998. Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane. *J.Biol.Chem.* 273, 5419-5422.
- Oliva, J.L., Griner, E.M., Kazanietz, M.G., 2005. PKC isozymes and diacylglycerol-regulated proteins as effectors of growth factor receptors. *Growth Factors* 23, 245-252.
- Pasquare, S.J., Salvador, G.A., Giusto, N.M., 2004. Phospholipase D and phosphatidate phosphohydrolase activities in rat cerebellum during aging. *Lipids* 39, 553-560.

- Pasquare, S.J., Salvador, G.A., Giusto, N.M., 2006. Age-associated changes of insulin action on the hydrolysis of diacylglycerol generated from phosphatidic acid. *Comp Biochem.Physiol B Biochem.Mol.Biol.* 144, 311-318.
- Patton, S.M., Pinero, D.J., Surguladze, N., Beard, J., Connor, J.R., 2005. Subcellular localization of iron regulatory proteins to Golgi and ER membranes. *J.Cell Sci.* 118, 4365-4373.
- Pelkmans, L., Helenius, A., 2002. Endocytosis via caveolae. *Traffic.* 3, 311-320.
- Perluigi, M., Joshi, G., Sultana, R., Calabrese, V., De, M.C., Coccia, R., Butterfield, D.A., 2006. In vivo protection by the xanthate tricyclodecan-9-yl-xanthogenate against amyloid beta-peptide (1-42)-induced oxidative stress. *Neuroscience* 138, 1161-1170.
- Pike, L.J., 2006. Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J.Lipid Res.* 47, 1597-1598.
- Pinero, D.J., Li, N., Hu, J., Beard, J.L., Connor, J.R., 2001. The intracellular location of iron regulatory proteins is altered as a function of iron status in cell cultures and rat brain. *J.Nutr.* 131, 2831-2836.
- Podo, F., Ferretti, A., Knijn, A., Zhang, P., Ramoni, C., Barletta, B., Pini, C., Baccarini, S., Pulciani, S., 1996. Detection of phosphatidylcholine-specific phospholipase C in NIH-3T3 fibroblasts and their H-ras transformants: NMR and immunochemical studies. *Anticancer Res.* 16, 1399-1412.
- Pyne, S., Kong, K.C., Darroch, P.I., 2004. Lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate biology: the role of lipid phosphate phosphatases. *Semin.Cell Dev.Biol.* 15, 491-501.
- Pyne, S., Long, J.S., Ktistakis, N.T., Pyne, N.J., 2005. Lipid phosphate phosphatases and lipid phosphate signalling. *Biochem.Soc.Trans.* 33, 1370-1374.
- Ramoni, C., Spadaro, F., Barletta, B., Dupuis, M.L., Podo, F., 2004. Phosphatidylcholine-specific phospholipase C in mitogen-stimulated fibroblasts. *Exp.Cell Res.* 299, 370-382.
- Ramoni, C., Spadaro, F., Menegon, M., Podo, F., 2001. Cellular localization and functional role of phosphatidylcholine-specific phospholipase C in NK cells. *J.Immunol.* 167, 2642-2650.
- Randell, E., Mulye, H., Mookerjee, S., Nagpurkar, A., 1992. Evidence for phosphatidylcholine hydrolysis by phospholipase C in rat platelets. *Biochim.Biophys.Acta* 1124, 273-278.
- Reid, P.C., Urano, Y., Kodama, T., Hamakubo, T., 2007. Alzheimer's disease: cholesterol, membrane rafts, isoprenoids and statins. *J.Cell Mol.Med.* 11, 383-392.
- Resh, M.D., 2008. The ups and downs of SRC regulation: tumor suppression by Cbp. *Cancer Cell* 13, 469-471.
- Rhee, J.S., Betz, A., Pyott, S., Reim, K., Varoquaux, F., Augustin, I., Hesse, D., Sudhof, T.C., Takahashi, M., Rosenmund, C., Brose, N., 2002. Beta phorbol ester- and diacylglycerol-induced augmentation of transmitter release is mediated by Munc13s and not by PKCs. *Cell* 108, 121-133.
- Riboni, L., Viani, P., Bassi, R., Giussani, P., Tettamanti, G., 2001. Basic fibroblast growth factor-induced proliferation of primary astrocytes. evidence for the involvement of sphingomyelin biosynthesis. *J.Biol.Chem.* 276, 12797-12804.
- Roberts, R., Sciorra, V.A., Morris, A.J., 1998. Human type 2 phosphatidic acid phosphohydrolases. Substrate specificity of the type 2a, 2b, and 2c enzymes and cell surface activity of the 2a isoform. *J.Biol.Chem.* 273, 22059-22067.
- Rouser, G., Fkeischer, S., Yamamoto, A., 1970. Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids* 5, 494-496.

- Rozengurt, E., 2007. Mitogenic signaling pathways induced by G protein-coupled receptors. *J.Cell Physiol* 213, 589-602.
- Ryxk, A., De, K.L., Mikhalap, S., Vantus, T., Seufferlein, T., Vandenheede, J.R., Van, L.J., 2003. Protein kinase D: a family affair. *FEBS Lett.* 546, 81-86.
- Saluja, I., Song, D., O'Regan, M.H., Phillis, J.W., 1997. Role of phospholipase A2 in the release of free fatty acids during ischemia-reperfusion in the rat cerebral cortex. *Neurosci.Lett.* 233, 97-100.
- Salvador, G.A., Ilincheta de Boschero, M.G., Pasquare, S.J., Giusto, N.M., 2005. Phosphatidic acid and diacylglycerol generation is regulated by insulin in cerebral cortex synaptosomes from adult and aged rats. *J.Neurosci.Res.* 81, 244-252.
- Salvador, G.A., Pasquare, S.J., Ilincheta de Boschero, M.G., Giusto, N.M., 2002. Differential modulation of phospholipase D and phosphatidate phosphohydrolase during aging in rat cerebral cortex synaptosomes. *Exp.Gerontol.* 37, 543-552.
- Samanta, S., Perkinson, M.S., Morgan, M., Williams, R.J., 1998. Hydrogen peroxide enhances signal-responsive arachidonic acid release from neurons: role of mitogen-activated protein kinase. *J.Neurochem.* 70, 2082-2090.
- Scales, S.J., Scheller, R.H., 1999. Lipid membranes shape up. *Nature* 401, 123-124.
- Schimmel, S.D., Kent, C., Bischoff, R., Vagelos, P.R., 1973. Plasma membranes from cultured muscle cells: isolation procedure and separation of putative plasma-membrane marker enzymes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 70, 3195-3199.
- Sen, T., Sen, N., Tripathi, G., Chatterjee, U., Chakrabarti, S., 2006. Lipid peroxidation associated cardiolipin loss and membrane depolarization in rat brain mitochondria. *Neurochem.Int.* 49, 20-27.
- Servitja, J.M., Masgrau, R., Pardo, R., Sarri, E., Picatoste, F., 2000. Effects of oxidative stress on phospholipid signaling in rat cultured astrocytes and brain slices. *J.Neurochem.* 75, 788-794.
- Sheikhnejad, R.G., Srivastava, P.N., 1986. Isolation and properties of a phosphatidylcholine-specific phospholipase C from bull seminal plasma. *J.Biol.Chem.* 261, 7544-7549.
- Shelat, P.B., Chalimoniuk, M., Wang, J.H., Strosznajder, J.B., Lee, J.C., Sun, A.Y., Simonyi, A., Sun, G.Y., 2008. Amyloid beta peptide and NMDA induce ROS from NADPH oxidase and AA release from cytosolic phospholipase A2 in cortical neurons. *J.Neurochem.* 106, 45-55.
- Shen, W., Flajolet, M., Greengard, P., Surmeier, D.J., 2008. Dichotomous dopaminergic control of striatal synaptic plasticity. *Science* 321, 848-851.
- Simons, K., Toomre, D., 2000. Lipid rafts and signal transduction. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 1, 31-39.
- Singh, I.N., Sorrentino, G., Kanfer, J.N., 1998. Activation of LA-N-2 cell phospholipase D by amyloid beta protein (25-35). *Neurochem.Res.* 23, 1225-1232.
- Smith, W.L., Marnett, L.J., DeWitt, D.L., 1991. Prostaglandin and thromboxane biosynthesis. *Pharmacol.Ther.* 49, 153-179.
- Soboloff, J., Spassova, M., Hewavitharana, T., He, L.P., Luncsford, P., Xu, W., Venkatachalam, K., van, R.D., Patterson, R.L., Gill, D.L., 2007. TRPC channels: integrators of multiple cellular signals. *Handb.Exp.Pharmacol.* 575-591.
- Spadaro, F., Cecchetti, S., Sanchez, M., Ausiello, C.M., Podo, F., Ramoni, C., 2006. Expression and role of phosphatidylcholine-specific phospholipase C in human NK and T lymphocyte subsets. *Eur.J.Immunol.* 36, 3277-3287.

- Spadaro, F., Ramoni, C., Mezzanzanica, D., Miotti, S., Alberti, P., Cecchetti, S., Iorio, E., Dolo, V., Canevari, S., Podo, F., 2008. Phosphatidylcholine-specific phospholipase C activation in epithelial ovarian cancer cells. *Cancer Res.* 68, 6541-6549.
- Stankiewicz, J., Panter, S.S., Neema, M., Arora, A., Batt, C.E., Bakshi, R., 2007. Iron in chronic brain disorders: imaging and neurotherapeutic implications. *Neurotherapeutics.* 4, 371-386.
- Steed, P.M., Clark, K.L., Boyar, W.C., Lasala, D.J., 1998. Characterization of human PLD2 and the analysis of PLD isoform splice variants. *FASEB J.* 12, 1309-1317.
- Stonehouse, M.J., Cota-Gomez, A., Parker, S.K., Martin, W.E., Hankin, J.A., Murphy, R.C., Chen, W., Lim, K.B., Hackett, M., Vasil, A.I., Vasil, M.L., 2002. A novel class of microbial phosphocholine-specific phospholipases C. *Mol.Microbiol.* 46, 661-676.
- Subramaniam, R., Roediger, F., Jordan, B., Mattson, M.P., Keller, J.N., Waeg, G., Butterfield, D.A., 1997. The lipid peroxidation product, 4-hydroxy-2-trans-nonenal, alters the conformation of cortical synaptosomal membrane proteins. *J.Neurochem.* 69, 1161-1169.
- Suh, P.G., Park, J.I., Manzoli, L., Cocco, L., Peak, J.C., Katan, M., Fukami, K., Kataoka, T., Yun, S., Ryu, S.H., 2008. Multiple roles of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *BMB.Rep.* 41, 415-434.
- Sultana, R., Newman, S., Mohmmad-Abdul, H., Keller, J.N., Butterfield, D.A., 2004. Protective effect of the xanthate, D609, on Alzheimer's amyloid beta-peptide (1-42)-induced oxidative stress in primary neuronal cells. *Free Radic.Res.* 38, 449-458.
- Sun, G.Y., Horrocks, L.A., Farooqui, A.A., 2007. The roles of NADPH oxidase and phospholipases A2 in oxidative and inflammatory responses in neurodegenerative diseases. *J.Neurochem.* 103, 1-16.
- Sun, G.Y., Xu, J., Jensen, M.D., Simonyi, A., 2004. Phospholipase A2 in the central nervous system: implications for neurodegenerative diseases. *J.Lipid Res.* 45, 205-213.
- Sung, J.Y., Lee, S.Y., Min, D.S., Eom, T.Y., Ahn, Y.S., Choi, M.U., Kwon, Y.K., Chung, K.C., 2001. Differential activation of phospholipases by mitogenic EGF and neurogenic PDGF in immortalized hippocampal stem cell lines. *J.Neurochem.* 78, 1044-1053.
- Swapna, I., Kumar, K.V., Reddy, P.V., Murthy, C., Reddanna, P., Senthilkumaran, B., 2006. Phospholipid and cholesterol alterations accompany structural disarray in myelin membrane of rats with hepatic encephalopathy induced by thioacetamide. *Neurochem.Int.* 49, 238-244.
- Tafesse, F.G., Huitema, K., Hermansson, M., van der, P.S., van den, D.J., Uphoff, A., Somerharju, P., Holthuis, J.C., 2007. Both sphingomyelin synthases SMS1 and SMS2 are required for sphingomyelin homeostasis and growth in human HeLa cells. *J.Biol.Chem.* 282, 17537-17547.
- Tafesse, F.G., Ternes, P., Holthuis, J.C., 2006. The multigenic sphingomyelin synthase family. *J.Biol.Chem.* 281, 29421-29425.
- Takai, Y., Kishimoto, A., Kikkawa, U., Mori, T., Nishizuka, Y., 1979. Unsaturated diacylglycerol as a possible messenger for the activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase system. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 91, 1218-1224.
- Tappia, P.S., Dent, M.R., Dhalla, N.S., 2006. Oxidative stress and redox regulation of phospholipase D in myocardial disease. *Free Radic.Biol.Med.* 41, 349-361.
- Teixeira, C., Stang, S.L., Zheng, Y., Beswick, N.S., Stone, J.C., 2003. Integration of DAG signaling systems mediated by PKC-dependent phosphorylation of RasGRP3. *Blood* 102, 1414-1420.
- Topham, M.K., 2006. Signaling roles of diacylglycerol kinases. *J.Cell Biochem.* 97, 474-484.

- Uranga, R.M., Mateos, M.V., Giusto, N.M., Salvador, G.A., 2007. Activation of phosphoinositide-3 kinase/Akt pathway by FeSO<sub>4</sub> in rat cerebral cortex synaptic endings. *J.Neurosci.Res.* 85, 2924-2932.
- van Dijk, M.C., Muriana, F.J., de, W.J., Hilkmann, H., van Blitterswijk, W.J., 1997. Involvement of phosphatidylcholine-specific phospholipase C in platelet-derived growth factor-induced activation of the mitogen-activated protein kinase pathway in Rat-1 fibroblasts. *J.Biol.Chem.* 272, 11011-11016.
- Van, d., V, VanDongen, H.M., VanDongen, A.M., 2005. The nonkinase phorbol ester receptor alpha 1-chimerin binds the NMDA receptor NR2A subunit and regulates dendritic spine density. *J.Neurosci.* 25, 9488-9496.
- Van, L.F., Leo, O., 2002. Membrane lipid rafts: new targets for immunoregulation. *Curr.Mol.Med.* 2, 557-570.
- van, M.G., Lisman, Q., 2002. Sphingolipid transport: rafts and translocators. *J.Biol.Chem.* 277, 25855-25858.
- Vance, J.E., 2008. Phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells: two metabolically related aminophospholipids. *J.Lipid Res.* 49, 1377-1387.
- Venable, M.E., Lee, J.Y., Smyth, M.J., Bielawska, A., Obeid, L.M., 1995. Role of ceramide in cellular senescence. *J.Biol.Chem.* 270, 30701-30708.
- Villani, M., Subathra, M., Im, Y.B., Choi, Y., Signorelli, P., Del, P.M., Luberto, C., 2008. Sphingomyelin synthases regulate production of diacylglycerol at the golgi. *Biochem.J.*
- Vosler, P.S., Brennan, C.S., Chen, J., 2008. Calpain-mediated signaling mechanisms in neuronal injury and neurodegeneration. *Mol.Neurobiol.* 38, 78-100.
- Wakelam, M.J., 1998. Diacylglycerol--when is it an intracellular messenger? *Biochim.Biophys.Acta* 1436, 117-126.
- Wakelam, M.J., Briscoe, C.P., Stewart, A., Pettitt, T.R., Cross, M.J., Paul, A., Yule, J.M., Gardner, S.D., Hodgkin, M., 1993. Phosphatidylcholine hydrolysis: a source of multiple lipid messenger molecules. *Biochem.Soc.Trans.* 21, 874-877.
- Waldron, R.T., Rozengurt, E., 2003. Protein kinase C phosphorylates protein kinase D activation loop Ser744 and Ser748 and releases autoinhibition by the pleckstrin homology domain. *J.Biol.Chem.* 278, 154-163.
- Wang, H., Yang, C., Leskow, F.C., Sun, J., Canagarajah, B., Hurley, J.H., Kazanietz, M.G., 2006. Phospholipase Cgamma/diacylglycerol-dependent activation of beta2-chimaerin restricts EGF-induced Rac signaling. *EMBO J.* 25, 2062-2074.
- Wang, Q.J., 2006. PKD at the crossroads of DAG and PKC signaling. *Trends Pharmacol.Sci.* 27, 317-323.
- Watanabe, H., Yokozeki, T., Yamazaki, M., Miyazaki, H., Sasaki, T., Maehama, T., Itoh, K., Frohman, M.A., Kanaho, Y., 2004. Essential role for phospholipase D2 activation downstream of ERK MAP kinase in nerve growth factor-stimulated neurite outgrowth from PC12 cells. *J.Biol.Chem.* 279, 37870-37877.
- Widnell, C.C., Unkeless, J.C., 1968. Partial purification of a lipoprotein with 5'-nucleotidase activity from membranes of rat liver cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 61, 1050-1057.
- Wojda, U., Salinska, E., Kuznicki, J., 2008. Calcium ions in neuronal degeneration. *IUBMB.Life* 60, 575-590.
- Wu, H.H., Hsieh, W.S., Yang, Y.Y., Tsai, M.C., 2006. Lipoteichoic acid induces prostaglandin E(2) release and cyclooxygenase-2 synthesis in rat cortical neuronal cells: involvement of PKCepsilon and ERK activation. *Life Sci.* 79, 272-280.

- Xu, J., Yu, S., Sun, A.Y., Sun, G.Y., 2003. Oxidant-mediated AA release from astrocytes involves cPLA(2) and iPLA(2). *Free Radic.Biol.Med.* 34, 1531-1543.
- Xu, L., Shen, Y., Joseph, T., Bryant, A., Luo, J.Q., Frankel, P., Rotunda, T., Foster, D.A., 2000. Mitogenic phospholipase D activity is restricted to caveolin-enriched membrane microdomains. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 273, 77-83.
- Xu, Q., Kanthasamy, A.G., Reddy, M.B., 2008. Neuroprotective effect of the natural iron chelator, phytic acid in a cell culture model of Parkinson's disease. *Toxicology* 245, 101-108.
- Yamaoka, S., Miyaji, M., Kitano, T., Umehara, H., Okazaki, T., 2004. Expression cloning of a human cDNA restoring sphingomyelin synthesis and cell growth in sphingomyelin synthase-defective lymphoid cells. *J.Biol.Chem.* 279, 18688-18693.
- Yang, C., Kazanietz, M.G., 2007. Chimaerins: GAPs that bridge diacylglycerol signalling and the small G-protein Rac. *Biochem.J.* 403, 1-12.
- Yavin, E., Tanaka, Y., Ando, S., 1989. Phospholipid-derived choline intermediates and acetylcholine synthesis in mouse brain synaptosomes. *J.Neurosci.Res.* 24, 241-246.
- Yoshida, T., Fukaya, M., Uchigashima, M., Miura, E., Kamiya, H., Kano, M., Watanabe, M., 2006. Localization of diacylglycerol lipase- $\alpha$  around postsynaptic spine suggests close proximity between production site of an endocannabinoid, 2-arachidonoyl-glycerol, and presynaptic cannabinoid CB1 receptor. *J.Neurosci.* 26, 4740-4751.
- Youdim, M.B., Fridkin, M., Zheng, H., 2005. Bifunctional drug derivatives of MAO-B inhibitor rasagiline and iron chelator VK-28 as a more effective approach to treatment of brain ageing and ageing neurodegenerative diseases. *Mech.Ageing Dev.* 126, 317-326.
- Zamorano, J., Rivas, M.D., Garcia-Trinidad, A., Qu, C.K., Keegan, A.D., 2003. Phosphatidylcholine-specific phospholipase C activity is necessary for the activation of STAT6. *J.Immunol.* 171, 4203-4209.
- Zeniou-Meyer, M., Liu, Y., Begle, A., Olanish, M., Hanauer, A., Becherer, U., Rettig, J., Bader, M.F., Vitale, N., 2008. The Coffin-Lowry syndrome-associated protein RSK2 is implicated in calcium-regulated exocytosis through the regulation of PLD1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 105, 8434-8439.
- Zhang, Y., Huang, P., Du, G., Kanaho, Y., Frohman, M.A., Tsirka, S.E., 2004. Increased expression of two phospholipase D isoforms during experimentally induced hippocampal mossy fiber outgrowth. *Glia* 46, 74-83.
- Zhao, D., Frohman, M.A., Blusztajn, J.K., 2001. Generation of choline for acetylcholine synthesis by phospholipase D isoforms. *BMC.Neurosci.* 2, 16.
- Zhao, J., Zhao, B., Wang, W., Huang, B., Zhang, S., Miao, J., 2007. Phosphatidylcholine-specific phospholipase C and ROS were involved in chicken blastodisc differentiation to vascular endothelial cells. *J.Cell Biochem.* 102, 421-428.
- Zhou, D., Lauderback, C.M., Yu, T., Brown, S.A., Butterfield, D.A., Thompson, J.S., 2001. D609 inhibits ionizing radiation-induced oxidative damage by acting as a potent antioxidant. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 298, 103-109.
- Zhou, Y., Wing, M.R., Sondek, J., Harden, T.K., 2005. Molecular cloning and characterization of PLC- $\epsilon$ 2. *Biochem.J.* 391, 667-676.
- Zuckert, W.R., Marquis, H., Goldfine, H., 1998. Modulation of enzymatic activity and biological function of *Listeria monocytogenes* broad-range phospholipase C by amino acid substitutions and by replacement with the *Bacillus cereus* ortholog. *Infect.Immun.* 66, 4823-4831.

## PUBLICACIONES ORIGINADAS DE ESTA TESIS

- "Co-existence of Phosphatidylcholine-Specific Phospholipase C and Phospholipase D Activities in Rat Cerebral Cortex Synaptosomes." **Mateos, M.**; Uranga, R.; Salvador, G. y Giusto, N. *Lipids* (2006) Mar; 41(3):273-80.
- "Activation of PI3K/Akt pathway by FeSO<sub>4</sub> in cerebral cortex synaptic endings." Uranga, R.; **Mateos, M.**; Giusto, N. and Salvador, G. *J Neurosci Res.* (2007) Jun 28;85(13):2924-2932.
- "Activation of phosphatidylcholine signalling during oxidative stress in synaptic endings." **Mateos, M.V.**; Uranga, R.M.; Salvador, G.A. and Giusto, N.M. *Neurochemistry International* (2008) Jul 25. En prensa.
- **Capítulo de Libro:** "Lipid metabolism in the central nervous system" Salvador, G.A.; Pasquaré, S.J.; Ilincheta, M.I.; Zulian, S.E.; Uranga, R.M.; **Mateos, M.V.** and Giusto, N.M. Aceptado para su publicación a Research Singpost. Managing Editor: Dr. S.G. Pandalai

## ABREVIATURAS

2-AG	2-araquidonoil-glicerol
A	Acetona
AA	Ácido araquidónico
AcAc	Ácido acético
AGL	Ácidos grasos libres
AMP	Adenosina 5'-monofosfato
APP	Proteína precursora de amiloide
ARF	Factor de ADP ribosilación
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
A $\beta$	$\beta$ amiloide
BH	Buffer de homogenización
BIM	Bisindolilmaleimida
BSA	Albúmina sérica bovina
C	Cloroformo
CC	Corteza cerebral
Cer	Ceramida
CL	Cardiolipina
CMC	Concentración micelar crítica
Col	Colesterol
CTB	Subunidad B de la toxina colérica
D609	Triciclododecan-9-il-xantato (sal de potasio)
DAG	Diacilglicerol
DAGK	Diacilglicerol quinasa
DAGL	Diacilglicerol lipasa
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DOC	Deoxicolato de sodio
DPPC	Dipalmitoil fosfatidilcolina
DRMs	Membranas resistentes a detergente
DTT	Ditiotreitol
E	Éter etílico
EA	Enfermedad de Alzheimer
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGF	Factor de crecimiento epidermal
EP	Enfermedad de Parkinson
EtOH	Etanol

FMit	Fracción mitocondrial
FN	Fracción nuclear
GAPs	Proteínas activadoras de la actividad GTPasa
GDP	Guanosina 5'-difosfato
GEF	Factor intercambiador de nucleótidos de guanina
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
GSH	Glutati6n
GTP	Guanosina 5'-trifosfato
GTP $\gamma$ S	Guanosina 5'-O-(3-tiofosfato)
H	Hexano
h	Hora/s
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Per6xido de hidr6geno
HBM	Medio en buffer Hepes
HNE	4-hidroxi-2,3-nonenal
HT	Homogenado total
IL	Interleuquina
IP <sub>3</sub>	Inositol 1, 4, 5-trifosfato
IRES	Elementos del respuesta al hierro
IRPS	Proteínas citoplasmáticas reguladoras del hierro
K <sub>M</sub>	Constante aparente de Michaelis-Menten
LDH	Lactato deshidrogenasa
LN	Lípidos neutros
LPA	Ácido lisofosfatídico
LPC	Liso fosfatidilcolina
LPPS	Lípido fosfato fosfatasas
LPS	Lipopolisacárido
M	Metanol
mAChR	Receptor muscarínico de acetilcolina
MAG	Monoacilglicerol
MAPK	Proteína quinasa activada por mit6genos
MDA	Malondialdehído
min	Minuto/s
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
NADPH	Nicotiamida-Adenina Dinucleotido Fosfato
NEM	N-etilmaleimida
NGF	Factor de crecimiento neural
NK	Células "natural killers"
NMDA	N-metil-D-aspartato

NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintasa
PA	Ácido fosfatídico
PAP	Fosfatasa de ácido fosfatídico
PBS	Buffer fosfato salino
PC	Fosfatidilcolina
PColina	Fosfocolina
PC-PLC	Fosfolipasa C específica para fosfatidilcolina
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PE	Fosfatidiletanolamina
PEth	Fosfatidiletanol
PI	Fosfatidilinositol
Pi	Fósforo inorgánico
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinasa
PI5K	Fosfatidilinositol 5-quinasa
PIP <sub>2</sub>	Fosfatidilinositol 4, 5-bifosfato
PIP <sub>2</sub> -PLC	Fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol 4, 5-bifosfato
PKC	Proteína quinasa C
PKD	Proteína quinasa D
PLA <sub>2</sub>	Fosfolipasa A2
PLD	Fosfolipasa D
PLs	Fosfolípidos
PMA	Forbol 12-miristato 13-acetato
PMSF	Fenilmetilsulfonil fluoruro
PN	Pellet nuclear
PPI	Polifosfoinosítidos
PS	Fosfatidilserina
PVDF	Polivinilidenofluoruro
RasGRPs	Proteínas liberadoras de nucleótidos de guanina de Ras
RNA	Ácido Ribonucleico
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RTK	Receptores tirosina quinasa
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
SM	Esfingomielina
SMS	Esfingomielina sintasa
SNC	Sistema nervioso central

SOD	Superóxido dismutasa
Sol	Fracción soluble
SPM	Membrana plasmática sinaptosomal
SPMit	Sobrenadante post mitocondrial
SPN	Sobrenadante post nuclear
Syn	Sinaptosomas
TAG	Triacilglicerol
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico
TBM	Medio en buffer Tris
TCA	Ácido tricloroacético
TLC	Cromatografía en capa fina
Triton X-100	Éter mono[p-(1, 1, 3, 3-tetrametilbutil) fenílico] del polietilenglicol
TRPC	Canal receptor de potencial transitorio
U/L	Unidades por litro
$V_{m\acute{a}x}$	Velocidad máxima
WB	Western blot