

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE MEDICINA**



**TESIS**

**ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA INDUCCIÓN DE AUTOFAGIA EN  
UN MODELO ANIMAL DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON**

**POR**

**Q.F.B. MARCELA JUDITH RAMÍREZ MORENO**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL  
GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN  
MORFOLOGÍA**

**NOVIEMBRE 2016**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE MEDICINA**

**SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO**



**TESIS**

**ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA INDUCCIÓN DE AUTOFAGIA EN  
UN MODELO ANIMAL DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON**

**PRESENTA**

**Q.F.B. MARCELA JUDITH RAMÍREZ MORENO**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MORFOLOGÍA**

**NOVIEMBRE, 2016**

**ANÁLISIS DE LA INDUCCIÓN DE AUTOFAGIA EN UN MODELO ANIMAL DE  
LA ENFERMEDAD DE PARKINSON**

**APROBACIÓN DE TESIS**

---

**DRA. ARACELY GARCÍA GARCÍA  
DIRECTOR**

---

**DR. HUMBERTO RODRÍGUEZ ROCHA  
CO-DIRECTOR**

---

**DRA. MARÍA DE JESÚS LOERA ARIAS  
COMISIÓN DE TESIS**

---

**DRA. MED. RAQUEL GARZA GUAJARDO  
SUBDIRECTOR DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**ANÁLISIS DE LA INDUCCIÓN DE AUTOFAGIA EN UN MODELO ANIMAL DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON**

Presentado por:

Q.F.B. Marcela Judith Ramírez Moreno

**Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Terapéutica Antioxidante, del Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Aracely García García y la co-dirección del Dr. Humberto Rodríguez Rocha.**

**Monterrey, Nuevo León**

**Noviembre 2016**

*“Learn from yesterday, live for today, hope for tomorrow.*

*The important thing is not to stop questioning.”*

*Albert Einstein (1879 - 1955)*

## **Agradecimientos**

*A mis padres y mis hermanos por brindarme todo el apoyo y amor incondicional, animándome a seguir adelante y concluir esta etapa de mi vida.*

*A la Dra. Aracely García García, por aceptarme como su estudiante, por permitirme aprender de ella y ser tan paciente conmigo.*

*Al Dr. Humberto Rodríguez Rocha, por sus consejos y por alentarme a superarme profesional y personalmente.*

*Al Dr. Roberto Montes de Oca por aceptarme y brindarme la oportunidad de pertenecer al Departamento de Histología.*

*A la Dra. María de Jesús Loera Arias por formar parte de la comisión de tesis.*

*A mis compañeros de Histología, José Juan, Sheila, Juan Antonio, Abigail, Daniel Salas, Ana, Jorge, Estefanía, Daniel Matta, David, por su gran amistad y ayuda que me brindaron en los momentos difíciles.*

*A mis amigos Mayra, Brenda, Sheyla, Karla, Ulises, Alejandro, Alberto, Alfredo, por su amistad y los grandes momentos que pasamos, siempre logrando que sonriera cuando estaba estresada.*

*A mis mejores amigas Elizabeth, Alejandra, Mayela, Isabel, por ser pacientes conmigo y animarme en todo momento, escuchándome y estar ahí para mí cuando las necesitaba.*

*Al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT) por el otorgamiento de la beca de maestría.*

*Y, por último, a Dios, por guiarme y darme la fuerza para seguir en mi camino en la vida.*

## Lista de Abreviaturas

%	Porcentaje
°C	Temperatura
6-OHDA	6-hidroxidopamina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATG	Genes relacionados con la autofagia
ATP	Trifostato de Adenosina
DAPI	4',6-diamidina-2-fenilindol
EP	Enfermedad de Parkinson
g	Gramos
h	Horas
IBA-1	Molécula adaptadora de unión a calcio ionizado tipo 1
kDA	Kilo Dalton
Kg	Kilogramos
mg	Miligramos
min	Minutos
ml	Mililitros
MPP+	1-metil-4-fenilpiridinio
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,5,6-tetrahidropiridina
mTOR	Receptor blanco de rapamicina en células de mamífero
µm	Micrómetro
µl	Microlitro
PBS	Buffer de Fosfato Salino
PFA	Paraformaldehído
PQ	Paraquat
pts	Puntos
PVDF	Polivinilidenofluoruro
Rapa	Rapamicina

RIPA	Buffer de ensayo de radioinmunoprecipitación
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
rpm	Revoluciones por minutos
seg	Segundos
TH	Tirosina Hidroxilasa

## Lista de Figuras

- Fig. 1. Enfermedad de Parkinson.**
- Fig. 2. Cuerpos de Lewy.**
- Fig. 3. Neurotoxinas relacionadas con la enfermedad de Parkinson.**
- Fig. 4. Mecanismo de autofagia.**
- Fig. 5. La intoxicación con paraquat no afecta el peso corporal.**
- Fig. 6. Evaluación de la función motora.**
- Fig. 7. Evaluación del comportamiento.**
- Fig. 8. La estimulación de la autofagia tiene un efecto de protección en un modelo *in vivo* de la EP.**
- Fig. 9. La activación de la microglía mediada por paraquat disminuye al estimular la autofagia.**
- Fig. 10. La agregación de las proteínas  $\alpha$ -sinucleína y ubiquitina disminuye al estimular la autofagia.**

## Contenido Temático

<b>Lista de Abreviaturas</b>	VI
<b>Lista de Figuras</b>	VIII
<b>Resumen</b>	XI
<b>Abstract</b>	XII
<b>Introducción</b>	1
<b>Capítulo 1.</b>	
<b>Antecedentes</b>	2
<b>Enfermedad de Parkinson</b>	2
<b>Modelos Experimentales de la EP</b>	4
<b>Autofagia</b>	6
<b>Autofagia y la Neurodegeneración</b>	8
<b>Justificación</b>	11
<b>Hipótesis</b>	12
<b>Objetivo General</b>	13
<b>Objetivos Específicos</b>	14
<b>Capítulo 2.</b>	
<b>Material y Equipo</b>	15
<b>Material Biológico</b>	15
<b>Soluciones</b>	15
<b>Equipos</b>	16
<b>Materiales</b>	17
<b>Capítulo 3.</b>	
<b>Metodología</b>	18
<b>Modelo Animal</b>	18
<b>Evaluación de la Disfunción Motora</b>	18
<b>Evaluación de la función cognitiva</b>	18
<b>Inmunofluorescencia</b>	19
<b>Extracción de Proteínas</b>	19
<b>Análisis por Western Blot</b>	20
<b>Análisis Estadístico</b>	20

<b>Capítulo 4.</b>	
<b>Resultados</b>	21
<b>El paraquat afecta la función motora y el comportamiento animal.</b>	21
<b>La inducción de la autofagia disminuye la pérdida de las neuronas dopaminérgicas mediada por paraquat.</b>	25
<b>La inducción de la autofagia disminuye la agregación de la <math>\alpha</math>-sinucleína y la ubiquitina en el modelo de la EP.</b>	28
<b>La inducción de la autofagia disminuye la activación de la microglía inducida por paraquat.</b>	30
<b>Capítulo 5.</b>	
<b>Discusiones</b>	32
<b>Capítulo 6.</b>	
<b>Conclusiones</b>	36
<b>Literatura Citada</b>	37

## Resumen

**QFB. Marcela Judith Ramírez Moreno**

**Fecha de Graduación:** Noviembre 2016

**Universidad Autónoma de Nuevo León**

**Facultad de Medicina**

**Título del Estudio:** “ANÁLISIS DE LA INDUCCIÓN DE AUTOFAGIA EN UN MODELO ANIMAL DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON”

**Número de páginas:** 53

**Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con Orientación en Morfología**

**Área de Estudio:** Morfología.

### **Propósito y Método de Estudio:**

La enfermedad de Parkinson (EP) se caracteriza por la pérdida selectiva de las neuronas dopaminérgicas en la *substantia nigra pars compacta*, lo que conduce a una deficiencia del neurotransmisor dopamina y posteriormente a una disfunción motora y cognitiva. La etiología de la EP aún se desconoce, sin embargo, se han visto relacionados tres eventos principales a nivel celular: la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo y alteraciones en las vías de degradación de proteínas mediadas por el proteosoma y la autofagia. La autofagia es un mecanismo regulatorio de las células que consiste en la degradación de orgánulos dañados, proteínas mal plegadas y otros componentes citoplasmáticos a través de los lisosomas. Por lo que el propósito de este trabajo fue el determinar si la inducción de autofagia puede proteger de la muerte de las neuronas dopaminérgicas en un modelo de la EP. Se estableció un modelo animal de la EP utilizando el herbicida paraquat, el cual induce estrés oxidativo, alteración de la autofagia y muerte neuronal. Para estimular la autofagia se utilizó la rapamicina. Se realizaron ensayos para evaluar la disfunción motora y cognitiva. Para determinar si se estaba llevando a cabo la inducción de la autofagia, se evaluaron los niveles de expresión del marcador LC3-II por inmunofluorescencia y western blot. Asimismo, se determinó la expresión del marcador TH por western blot, y se llevó a cabo un conteo celular de las neuronas dopaminérgicas mediante una inmunofluorescencia (células TH positivas) para evaluar si la autofagia ejerce un efector neuroprotector. Se determinó el papel de la autofagia sobre los agregados proteicos por inmunohistoquímica detectando dos principales proteínas que forman parte de estos agregados: la  $\alpha$ -sinucleína y la ubiquitina. Finalmente, se evaluó si la autofagia previene la activación de la microglía, en la cual se realizó un conteo de células positivas para IBA-1 (marcador específico de microglía) mediante inmunohistoquímica.

### **Conclusiones y Contribuciones.**

En nuestro estudio determinamos que la inducción del mecanismo de autofagia ejerce un efecto neuroprotector en un modelo de la EP al aumentar los niveles de expresión de TH. Además, la autofagia previno la activación de la microglía y disminuyó la acumulación de las proteínas  $\alpha$ -sinucleína y ubiquitina. Nuestros resultados sugieren que agentes inductores de la autofagia tienen un potencial prometedor en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

---

**Director: Dra. Aracely García García**

## Abstract

Parkinson's disease (PD) is the second most common chronic and progressive neurodegenerative disorder after Alzheimer's disease. This disorder is characterized by the selective loss of dopaminergic neurons in the *substantia nigra pars compacta*, which leads to a deficiency of the neurotransmitter dopamine and subsequent motor and cognitive dysfunction. PD etiology is still unknown. However, mitochondrial dysfunction, oxidative stress and impairment of the protein degradation mediated by the proteasome and autophagy, have been related to this disorder. Autophagy is a self-regulatory mechanism of cells and involves degradation of damaged organelles, misfolded proteins and other cytoplasmic components through lysosomes, and the degradation products can be re-used for cell survival. Therefore, we wanted to determine whether the induction of autophagy can protect from the dopaminergic neuronal death in an animal model of PD. We established an experimental model of PD using the herbicide paraquat (PQ), which induces oxidative stress, autophagy disruption and neuronal death. Autophagy was stimulated with rapamycin one week previous to intoxication with PQ. After 6 weeks of treatment we observed that both motor and cognitive functions were slightly affected by PQ, with a mild improvement when autophagy was stimulated. PQ induced a decreased of the dopaminergic neuronal population, which was demonstrated by detecting the dopaminergic marker tyrosine hydroxylase (TH) through immunofluorescence and western blot. An increase of LC3-II, the hallmark of autophagy, was confirmed by western blot in rapamycin-treated mice. Interestingly, autophagy induction increased TH marker in PQ-treated mice. Since a pro-inflammatory environment has also been involved in the loss of dopaminergic neurons, we evaluated the microglia activation, which was increased by PQ. However, induction of autophagy reduced the levels of microglia activated by PQ. Furthermore, autophagy stimulation decreased  $\alpha$ -synuclein and ubiquitin aggregation provoked by PQ. Taken together, our results indicate that autophagy stimulation has a protective effect on dopaminergic neuronal death in PD.

## Introducción

La enfermedad de Parkinson (EP) es el segundo desorden neurodegenerativo crónico y progresivo más común después de la enfermedad de Alzheimer, y afecta a personas mayores de 60 años. Este trastorno se caracteriza por la pérdida selectiva de las neuronas dopaminérgicas localizadas en la *substancia nigra pars compacta*, lo que conlleva a una deficiencia del neurotransmisor dopamina, y por lo tanto, a una disfunción motora y cognitiva.

Existen dos tipos de la EP, la EP familiar, la cual involucra mutaciones en genes como PARKIN, PINK1, DJ-1, PARK2, entre otros; y la EP esporádica, la cual es multifactorial e implica una interacción entre la exposición a factores ambientales, el fondo genético y el envejecimiento. La etiología de la EP se desconoce, pero tres eventos principales a nivel celular están relacionados: la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo y alteraciones en las vías de degradación de proteínas mediadas por el proteosoma y la autofagia.

La autofagia es un mecanismo regulatorio de las células que consiste en la degradación de orgánulos dañados, proteínas mal plegadas y otros componentes citoplasmáticos a través de los lisosomas, subsecuentemente, el contenido degradado puede ser re-utilizado para la sobrevivencia celular. La autofagia es esencial para la homeostasis neuronal y su alteración está asociada con el proceso de neurodegeneración, por lo que la estimulación de este mecanismo tiene potencial neuroprotector.

Puesto que los tratamientos para la EP están enfocados en sólo aminorar los síntomas, es importante el tener un mejor entendimiento de los procesos celulares y moleculares implicados, que permitan el diseño y la implementación de nuevos tratamientos profilácticos y terapéuticos que ayuden a reducir o evitar la muerte de las neuronas dopaminérgicas. Por lo tanto, en este proyecto de investigación se evaluó el potencial neuroprotector de la inducción del mecanismo de autofagia en un modelo experimental de la EP.

## Capítulo 1

### 1.1. Antecedentes

#### 1.1.1. Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson (EP) fue descubierta y descrita por James Parkinson hace cerca de 200 años, y era conocida como “Parálisis agitante”<sup>1</sup>. Hoy en día, se sabe que la EP es el segundo desorden neurodegenerativo, crónico y progresivo más común, después de la enfermedad de Alzheimer. La EP afecta a más del 1% de la población que tiene entre 60 y 69 años de edad, mientras que la prevalencia aumenta a un 3% en las personas mayores de 80 años de edad<sup>2-4</sup>.

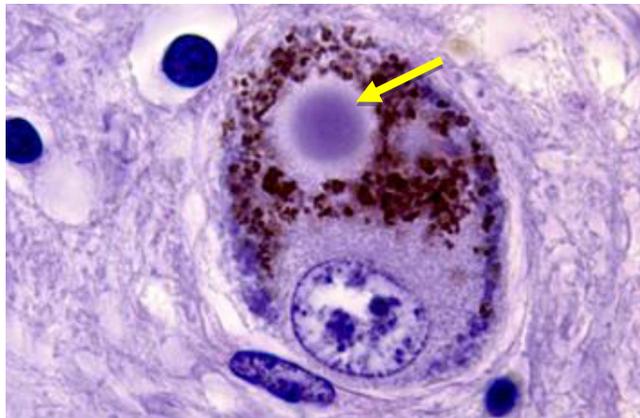
La EP se caracteriza clásicamente por manifestaciones motoras cardinales como: temblor incontrolable de las extremidades incluso en reposo, deformidades e inestabilidad postural, bradicinesia (lentitud en el movimiento) y rigidez<sup>5</sup>. Otro síntoma común que afecta a más de un tercio de los pacientes, principalmente en la etapa avanzada de la enfermedad, es el congelamiento de la marcha o “freezing” que actúa sobre las piernas durante el andar<sup>6, 7</sup>. Los síntomas no motores frecuentemente presentes son la hiposmia (deterioro del sentido del olfato), trastornos del sueño, trastornos neuropsiquiátricos y síntomas de disautonomía gastrointestinal<sup>8</sup>. Dichas manifestaciones se evalúan para diagnosticar si un paciente sufre la EP.

La EP se debe a una gran pérdida de neuronas productoras de dopamina en la *substancia nigra pars compacta*, lo que resulta en una disminución drástica de la dopamina en el cuerpo estriado (Figura 1)<sup>9</sup>.



**Fig. 1. Enfermedad de Parkinson.** En la parte superior derecha se muestra la pigmentación característica de la *substancia nigra pars compacta*, en donde se localizan las neuronas dopaminérgicas. Nótese la pérdida de la *substancia nigra* en la EP.

La pérdida de células dopaminérgicas está asociada con la presencia de inclusiones intraneuronales eosinófilas llamadas cuerpos de Lewy (Figura 2) <sup>10</sup>. Los cuerpos de Lewy se caracterizan primordialmente por contener acúmulos de la proteína  $\alpha$ -sinucleína <sup>11</sup>, aunque también se ha reportado la presencia de la proteína ubiquitina <sup>12</sup> y la proteína tau <sup>13</sup>. La  $\alpha$ -sinucleína es una proteína neuronal que se localiza preferiblemente en las terminaciones pre-sinápticas nerviosas, y cuya función aún no es clara <sup>14, 15</sup>. La principal función de la ubiquitina es la formación de cadenas de poliubiquitina para el marcaje de proteínas mal plegadas o dañadas, para su degradación por medio del proteosoma <sup>16</sup>. Tau es la principal proteína asociada a los microtúbulos neuronales, y cuando es hiperfosforilada forma agregados de haces de filamentos helicoidales pareados <sup>17</sup>; lo cual está relacionado con la enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades referidas como tauopatías <sup>18</sup>.



**Fig. 2. Cuerpos de Lewy.** Cuerpo neuronal localizado en la *sustancia nigra pars compacta*. Nótese la presencia del cuerpo de Lewy, señalado por la flecha amarilla, dentro de la neurona. La pigmentación observada de color café es dada por los gránulos de melanina.

La EP se clasifica en dos tipos, familiar y esporádica. La EP familiar se caracteriza por mutaciones específicas en genes como PINK1 (PARK6), Parkin (PARK2), DJ-1 (PARK7) y  $\alpha$ -sinucleína (PARK1) <sup>19</sup>. Sin embargo, la mayoría de los casos de la EP son de carácter esporádico, es decir, que no se conoce su origen. No obstante, se ha establecido que la disfunción mitocondrial, el incremento de los radicales libres de

oxígeno, y la agregación de proteínas son factores involucrados en el desarrollo de la EP <sup>20-22</sup>.

### 1.1.2. Modelos experimentales de la EP

A través de los años, se ha generado un mejor entendimiento de la EP esporádica mediante la utilización de modelos animales que reproducen muchas de las características de la enfermedad. Estos modelos se establecen con neurotoxinas como la 6-hidroxidopamina (6-OHDA), rotenona, 1-metil-4-fenil-1,2,5,6-tetrahidropiridina (MPTP), y paraquat (Figura 3), ya que todas ellas inducen la degeneración selectiva de las neuronas dopaminérgicas y reproducen muchas de las características patogénicas y fisiopatológicas de la enfermedad.

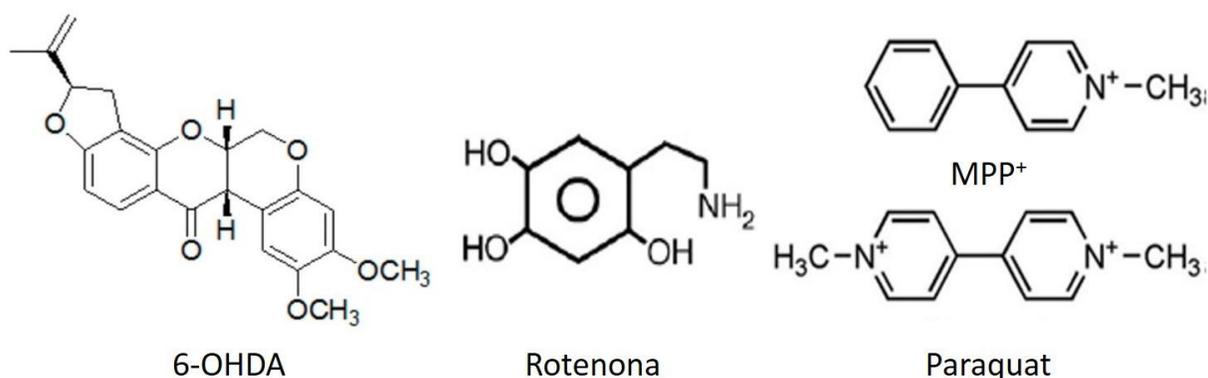
La toxina 6-OHDA es la forma oxidada de la dopamina y es utilizada para lesionar la vía nigroestriatal con el fin de inducir alteraciones motoras <sup>23</sup>. En modelos experimentales de la EP, la 6-OHDA se inyecta directamente en el cuerpo estriado, la *substancia nigra* y/o el haz medial del cerebro anterior, ya que no cruza la barrera hematoencefálica. Diversos estudios han confirmado que la 6-OHDA produce estrés oxidativo *in vitro* <sup>24, 25</sup> e *in vivo* <sup>26-28</sup>.

La rotenona es un insecticida y pesticida de origen natural y se extrae de las raíces de las plantas *Lonchocarpus* y *Derris* <sup>29</sup>. Se utiliza como insecticida en huertos vegetales; sin embargo, la exposición a rotenona se ha visto relacionada con un aumento en el riesgo a desarrollar la EP <sup>30, 31</sup>. Este compuesto es altamente lipofílico, lo que le permite cruzar la barrera hematoencefálica <sup>31</sup>. La rotenona inhibe al complejo I de la cadena de transporte de electrones, provocando una reducción en la producción de ATP, así como la fuga de electrones, lo cual genera especies reactivas de oxígeno (ROS) como el anión superóxido e incrementa el estrés oxidativo <sup>31, 32</sup>.

El MPTP es un subproducto de la síntesis de 1-metil-4-fenil-4-propionoxipiperidina (MPPP), un análogo de meperidina <sup>33</sup>. El MPTP mezclado con el MPPP se utilizó en la década de los 80's por drogadictos, los cuales desarrollaron síntomas similares al Parkinsonismo <sup>34</sup>. Se han reportado casos de individuos que sufrieron una EP leve al ser expuestos al MPTP <sup>35</sup>. Investigaciones subsecuentes en primates han demostrado que los déficits motores se deben a la destrucción selectiva de neuronas

dopaminérgicas en la *substancia nigra* <sup>36, 37</sup>. El MPTP, al igual que la rotenona, es un compuesto lipofílico que atraviesa la barrera hematoencefálica <sup>38</sup>, una vez localizado en el cerebro, el MPTP es convertido a MPDP<sup>+</sup> por la enzima monoamino oxidasa B (MAO-B) de las células de la glía, antes de su rápida oxidación a 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP<sup>+</sup>) <sup>39</sup>. El MPP<sup>+</sup> es captado por el transportador de dopamina (DAT) de las neuronas dopaminérgicas y se deposita en el citoplasma de éstas, donde desencadena la producción de ROS <sup>40</sup>. También se acumula dentro de las mitocondrias en donde inhibe al complejo I de la cadena de transporte de electrones <sup>41</sup>. La combinación de la elevada producción de ROS y la disminución de ATP, es la responsable de que se desencadenen las vías de señalización de muerte celular mediadas por la proteína quinasa p38 activada por mitógeno <sup>42</sup> y Bax <sup>43, 44</sup>.

El paraquat (1,1'-Dimetil-4,4'-bipiridilo) es un herbicida comúnmente utilizado. Se ha observado que la exposición al paraquat, tanto de manera aguda como crónica, es altamente tóxica. Su ingesta accidental o voluntaria (suicidio) causa una lesión severa en los pulmones e incluso disfunciones hepáticas <sup>45</sup> que pueden llegar a ser fatales. Por otra parte, la exposición crónica al paraquat, como en el caso de las zonas agrícolas, se ha visto implicada como un factor de riesgo potencial para el desarrollo de la EP <sup>46, 47</sup>. Es por eso que se empezó a utilizar para generar un modelo de la EP. El paraquat, a pesar de tener una estructura muy similar al MPTP, no es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica. Sin embargo, posiblemente llega al cerebro a través de la vía de transporte de aminoácidos neutros <sup>48</sup>. La toxicidad del paraquat se produce principalmente en la mitocondria a través del ciclo redox por la generación de ROS <sup>49, 50</sup>, y subsecuentemente prosigue un aumento de ROS en el citosol <sup>51</sup>.



**Fig. 3. Neurotoxinas relacionadas con la enfermedad de Parkinson.** Estructura química de las diferentes toxinas utilizadas para generar modelos experimentales de la EP.

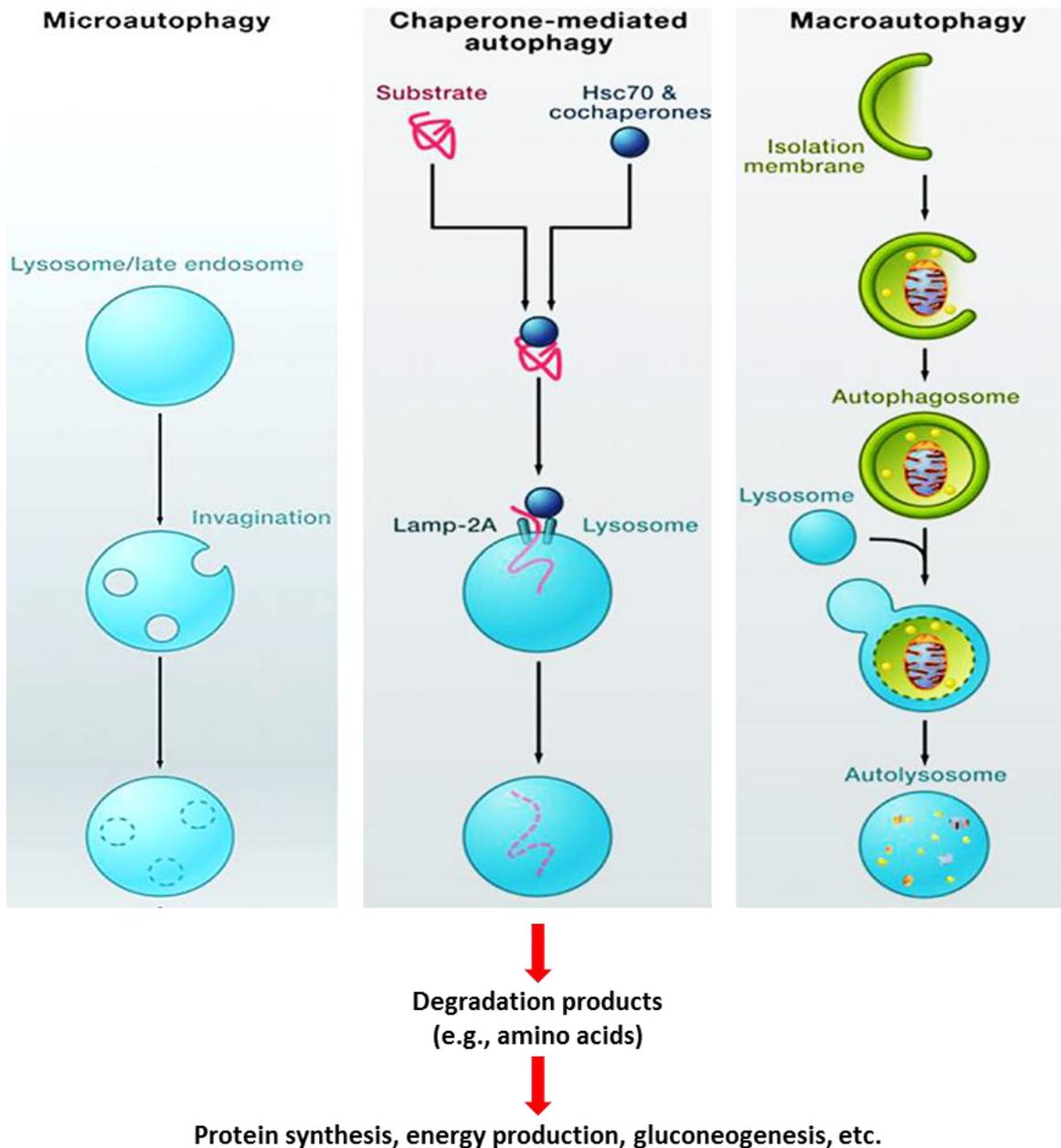
### 1.1.3. Autofagia

La autofagia es un mecanismo de degradación mediado por lisosomas que implica la eliminación de los orgánulos dañados y proteínas mal plegadas o no funcionales <sup>52, 53</sup>, y los productos de la degradación pueden reciclarse para que la célula pueda sobrevivir bajo condiciones de escasos nutrientes. La autofagia se activa por la presencia de varios estímulos como la privación de nutrientes <sup>54, 55</sup> y el estrés oxidativo <sup>56, 57</sup>, entre otros. Existen tres tipos de autofagia: la microautofagia, la autofagia mediada por chaperonas y la macroautofagia <sup>58, 59</sup>, a la cual se le llamará autofagia en adelante.

La microautofagia es mediada directamente por los lisosomas, los cuales capturan componentes del citosol mediante una invaginación de la membrana lisosomal. De esta manera, se forma una vesícula limitada por una sola membrana que se adentra al lisosoma para su posterior degradación <sup>60</sup>.

Por otro lado, la autofagia mediada por chaperonas (CMA, por sus siglas en inglés) se caracteriza por degradar proteínas que son transportadas directamente al lisosoma sin la formación de una vesícula intermediaria. Las proteínas sustrato contienen el motivo (motif) Lys-Phe-Glu-Arg-Gln (KFERQ) en su secuencia amino-terminal <sup>61</sup>. Esta secuencia es reconocida en el citosol por la proteína de choque térmico de 70 kDA (hsp70) <sup>62</sup>, que es la encargada de transportar de manera selectiva a las proteínas con dicha secuencia hacia la membrana lisosomal. Posteriormente, las proteínas interaccionan con la proteína de membrana asociada al lisosoma 2A (LAMP-2A, por sus siglas en inglés) <sup>63</sup> para ser internalizadas al lumen lisosomal con la ayuda de otras chaperonas, para su posterior degradación.

El proceso de autofagia inicia con la formación de una doble membrana que secuestra a los componentes citoplasmáticos dentro de una vesícula denominada autofagosoma. El autofagosoma se traslada a lo largo de los componentes del citoesqueleto y se fusiona con un lisosoma para generar una nueva estructura llamada autolisosoma, en la cual se degrada su contenido mediante las hidrolasas lisosomales <sup>56, 64, 65</sup>.



**Fig. 4. Mecanismo de autofagia.** Representación esquemática de los diferentes tipos de autofagia. Durante la microautofagia, la membrana lisosomal invagina los componentes del citosol para ser degradados. La autofagia mediada por chaperonas secuestra proteínas que contienen un motivo KFERQ en su secuencia amino-terminal, el cual es reconocido por la proteína Hsp70, para ser degradadas en los lisosomas. En la macroautofagia se da la formación de una doble membrana que secuestra a los componentes citoplasmáticos dentro de una vesícula denominada autofagosoma, la cual posteriormente se fusiona con un lisosoma para degradar su contenido.

#### 1.1.4. Autofagia y neurodegeneración

Como se explicó en la sección anterior, la autofagia es un mecanismo de degradación mediada por lisosomas que mantiene la homeostasis celular mediante la eliminación de proteínas y organelos dañados, mientras que en otros casos la autofagia participa como mecanismo de muerte celular programada <sup>66</sup>.

En particular, las células neuronales dependen de las vías de degradación, como la autofagia, para mantener su homeostasis y viabilidad. Una de las características de estas células es que son post-mitóticas, por lo tanto, no pueden disminuir la presencia de toxinas proteicas mediante la división celular <sup>67</sup>.

La importancia de la autofagia en el mantenimiento de la homeostasis neuronal ha sido estudiada en diversos modelos animales. Dos estudios <sup>68, 69</sup> se enfocaron en determinar la importancia de la autofagia en el sistema nervioso central al generar ratones knockout para ATG5 y ATG7, dos proteínas primordiales que participan en el mecanismo de autofagia en la formación de los autofagosomas. Entre sus hallazgos observaron que al encontrarse inhibida la autofagia, los ratones desarrollaban anomalías motoras y cognitivas progresivas. Mediante un análisis histológico se encontraron cambios degenerativos en las neuronas del cerebelo y de la corteza cerebral, así como muerte celular y agregados de proteínas en diferentes zonas del cerebro incluyendo el tálamo, hipotálamo, hipocampo, corteza cerebral, cerebelo, la protuberancia y médula. Estos estudios concluyeron que la alteración del mecanismo de la autofagia está relacionada con el proceso de neurodegeneración.

Por otro lado, se han generado controversias respecto al efecto de las neurotoxinas sobre la autofagia. Se han reportado resultados contradictorios sobre el papel de la autofagia inducida por MPP<sup>+</sup>, por un lado, como mecanismo de muerte celular y por otro como mecanismo de protección <sup>70, 71</sup>. Asimismo, se le ha atribuido al paraquat un efecto tanto inductor como inhibitorio sobre la autofagia <sup>72, 73</sup>.

Recientemente, se determinó el efecto de diferentes neurotoxinas parkinsonianas sobre la autofagia *in vitro*. Se determinó que el paraquat, el MPP<sup>+</sup> y la rotenona inhiben la autofagia, mientras que la 6-OHDA fue la única toxina que induce la autofagia. Además, la inhibición de la autofagia con un dominante negativo de ATG5 incrementó

la muerte celular inducida por paraquat y MPP<sup>+</sup>, lo cual confirma que la autofagia tiene un papel de protección en respuesta a estas toxinas <sup>74</sup>.

Por lo tanto, es razonable pensar que la estimulación de la autofagia pueda ejercer un efecto de protección, lo cual ha sido analizado en algunos modelos celulares y animales <sup>74-76</sup>. Sin embargo, la inducción de autofagia también puede inducir muerte celular <sup>66, 77, 78</sup>. Por lo que es importante caracterizar su efecto bajo condiciones específicas.

Uno de los inductores de autofagia mejor caracterizados es la rapamicina, un antibiótico macrólido lipofílico usado clínicamente como inmunosupresor. Algunas investigaciones han demostrado que la rapamicina ejerce un efecto neuroprotector en modelos celulares y animales <sup>79-81</sup>, convirtiéndolo en un fármaco con potencial terapéutico para tratar enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer <sup>82, 83</sup>, la enfermedad de Huntington <sup>84, 85</sup> y la enfermedad de Parkinson <sup>86, 87</sup>. La rapamicina induce autofagia mediante la inactivación de mTOR (*mammalian target of rapamycin*, por sus siglas en inglés), que a su vez es un regulador negativo de la autofagia.

La quinasa mTOR detecta el estado nutricional y la energía de las células eucarióticas e inicia una cascada de señales corriente abajo. Cuando los nutrientes son abundantes, mTORC1 fosforila a las proteínas efectoras para efectuar cambios en el metabolismo y crecimiento celular e inhiben la autodigestión por autofagia <sup>88</sup>. En el caso de la rapamicina, ésta se une a la proteína FKBP12 para formar el complejo FKBP12-rapamicina, el cual bloquea la actividad de mTOR mediante la unión al dominio FRB en el extremo C-terminal <sup>89</sup>.

Se ha reportado que la rapamicina disminuye la muerte de las neuronas dopaminérgicas inducida *in vitro* por las neurotoxinas MPTP y 6-OHDA, y aumenta los niveles de Akt fosforilada en la Thr308, la cual tiene un papel en la sobrevivencia celular. Este mismo efecto fue reproducido en el modelo *in vivo* inducido con el MPTP <sup>87</sup>. En otro estudio reciente de la EP inducida con la neurotoxina MPTP en murinos se utilizó la rapamicina como inductor de la autofagia. En este estudio reportaron que la rapamicina aumentó los niveles de expresión del marcador de autofagia LC3-II;

además, se observó una disminución de la pérdida de las neuronas dopaminérgicas inducida por MPTP, así como de los niveles de expresión de la proteína  $\alpha$ -sinucleína, la cual se ve aumentada por el MPTP <sup>90</sup>.

En un modelo animal de la EP inducido con la 6-OHDA, se determinó que el pre-tratamiento con la rapamicina ejerce un efecto protector sobre la toxicidad mediada por la neurotoxina sobre las neuronas dopaminérgicas. La 6-OHDA afecta la ultraestructura de las mitocondrias, las cuales se observan hinchadas con presencia de vacuolas y pérdida de las crestas tubulares. En el tratamiento con rapamicina previo a la 6-OHDA, las mitocondrias mantuvieron su ultraestructura normal, con crestas tubulares bien definidas, y se observó una disminución de la presencia de vacuolas. También se evaluaron los niveles de malondialdehído (MDA, biomarcador de estrés oxidativo) generados por la 6-OHDA, los cuales disminuyeron en presencia de rapamicina. Los niveles de las enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa y la glutatión peroxidasa aumentaron, e incluso se disminuyó la muerte mediada por apoptosis <sup>86</sup>.

Sin embargo, cabe señalar que a pesar de que el paraquat es un herbicida que sigue usándose en zonas agrícolas, y se ha visto implicado como un factor de riesgo potencial para el desarrollo de la EP <sup>46, 47</sup>, no ha sido estudiado su efecto en la inducción de autofagia en el modelo de la EP. Por lo que es de gran importancia el determinar si la estimulación de la autofagia ejerce un efecto neuroprotector en un modelo animal de la EP inducido por paraquat.

## **1.2. Justificación**

Actualmente la etiología de la enfermedad de Parkinson se desconoce. Sin embargo, se sabe que el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial y la alteración de la autofagia están implicados en el desarrollo de la enfermedad. Puesto que estos eventos están estrechamente relacionados y la inhibición de la autofagia incrementa el proceso de neurodegeneración, es importante determinar si la estimulación de la misma disminuye la pérdida de las neuronas dopaminérgicas en un modelo de la enfermedad de Parkinson.

### **1.3. Hipótesis**

La inducción de la autofagia ejerce un efecto neuroprotector en un modelo animal de la enfermedad de Parkinson.

#### **1.4. Objetivo General**

Analizar el efecto de la inducción de la autofagia sobre la muerte de las neuronas dopaminérgicas en un modelo animal de la enfermedad de Parkinson.

## **1.5. Objetivos Específicos**

**1.5.1.** Analizar la función motora y cognitiva del modelo experimental de la enfermedad de Parkinson.

**1.5.2.** Determinar si la inducción de autofagia previene la pérdida de las neuronas dopaminérgicas en el modelo de la enfermedad de Parkinson.

**1.5.3.** Analizar el efecto de la inducción de autofagia sobre la agregación de proteínas en el modelo de la enfermedad de Parkinson.

**1.5.4.** Evaluar el efecto de la inducción de autofagia sobre la activación de la microglía en el modelo de la enfermedad de Parkinson.

## Capítulo 2

### Material y Equipo

#### Material Biológico

##### Animales de Laboratorio

- 20 ratones machos de la cepa C57BL6/J de 8 semanas

##### Anticuerpos

- Anticuerpo Anti-LC3B (SIGMA, No. Cat. L7543)
- Anticuerpo Anti-Tirosina Hidroxilasa (ABCAM, No. Cat. ab112)
- Anticuerpo Anti- $\alpha$ -Sinucleína (ABCAM, No. Cat. ab52168)
- Anticuerpo Anti-Ubiquitina (ABCAM, No. Cat. ab7254)
- Anticuerpo Anti-IBA-1 (ABCAM, No. Cat. ab15690)
- Anticuerpo Anti-B-Actina (SIGMA-ALDRICH, No. Cat. A5060)
- Anticuerpo Anti-Conejo (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, No. Cat. sc-2004)
- Anticuerpo Anti-Ratón (SIGMA-ALDRICH, No. Cat. A9044)
- Anticuerpo Anti-Conejo IgG H&L (Alexa Flúor 488) (ABCAM, No. Cat. ab150077)
- Anticuerpo Anti-Conejo IgG H&L (Alexa Flúor 594) (ABCAM, No. Cat. ab150080)

##### Soluciones

- Albúmina de suero bovino 1% (BSA)
- Bis-Acrilamida 30% (Bio Rad)
- Borohidruro de Sodio ( $\text{NaBH}_4$ ) 0.2%
- Buffer de carga (200mM Tris-HCl pH 6.8, SDS 8%, Glicerol 40%, Azul de bromofenol 0.4%, 0.97M DTT)

- Buffer RIPA (Tris 50mM, NaCl 150mM, SDS 0.1%, Desoxicolato de Sodio 0.5%, Tritón X-100 0.25%, coctel de inhibidores de fosfatasas y proteasas, PMSF 0.2 mM)
- Buffer de Transferencia 1X (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, Metanol 20%, pH 8.3)
- Buffer Tris-Glicina 1X (Tris 25 mM, Glicina 250 mM, SDS 0.1%)
- Dodecilsulfato sódico 10% (SDS) (Sigma-Aldrich)
- EDTA 1 mM
- N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina (TEMED) (Sigma-Aldrich)
- Paraformaldehído 4% (PFA)
- Paraquat (10mg/kg)
- PBS 1X (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>•2H<sub>2</sub>O, 2mM KH<sub>4</sub>PO<sub>4</sub>)
- Persulfato de amonio 10% (PSA) (Sigma-Aldrich)
- Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher)
- Rapamicina (1mg/kg)
- SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher)
- TBS 1X (Tris-HCl 20 mM, NaCl 137 mM, pH 7.6)
- TBST 1X (Tris-HCl 20 mM, NaCl 137 mM, pH 7.6, Tween 20 0.05%)
- Tris-HCl 1 M pH 8.8
- Tris-HCl 1 M pH 6.8

## **Equipos**

- Balanza analítica
- Estereoscopio de la marca Leica MZ6
- Campana de extracción de humos
- Procesador de tejidos KD-TS3B de la marca KEDEE
- Centro de Inclusión KD-BM de la marca KEDEE
- Crio placa KD-BL de la marca KEDEE
- Micrótopo de la marca Leica
- Baño de flotación KD-P de la marca KEDEE

- Microscopio de Fluorescencia de la marca Nikon Eclipse 50i
- Ultrasonic Processor de la marca Fisher Scientific
- Microcentrífuga Spectrafuge 24D de la marca LabnetLector de placa de ELISA de la marca Bio-Rad (i Mark Microplate Reader)
- Fuente de poder ENDURO de la marca Labnet Cámara de Electroforesis de la marca Bio-Rad
- Cámara de Transferencia de la marca Bio-Rad
- Escáner para Western Blot C-DiGit Blot de la marca LI-COR

### **Material**

- Jeringas para insulina 1 mL 29 G x 13 mm
- Tubos eppendorf de 1.5 mL y 600 uL
- Tubos tipo Falcon de 15 mL y 50 mL
- Pipetas serológicas de 5 mL y 10 mL
- Algodón Zuum®Placas de 96 pozos
- Membranas de Polifluoruro de Vinilideno (PVDF)
- Micropipetas

## Capítulo 3

### Metodología

#### Modelo Animal

Ratones machos de 8-10 semanas de edad de la cepa C57BL6/J se obtuvieron de Círculo ADN S.A. de C.V. Los ratones se mantuvieron en un ambiente con temperatura controlada, ciclos de luz-obscuridad de 12 h, y libre acceso a alimento y agua. Para establecer el modelo animal de la EP se formaron 4 grupos con 10 ratones cada uno como sigue: Control (Ctrl), Rapamicina (Rapa), Paraquat (PQ) y Rapamicina+ Paraquat (Rapa+PQ). Una semana previa a la intoxicación con PQ se administró un pre-tratamiento con 1 mg/kg de Rapa tres veces por semana vía intraperitoneal. Posteriormente, se administraron 10 mg/kg de PQ dos veces por semana en días intercalados con la rapamicina. El peso corporal de los ratones se monitoreó semanalmente.

#### Evaluación de la Disfunción Motora

Después de 7 semanas de tratamiento, se evaluó la disfunción motora de los ratones mediante una prueba en donde se tomaron en cuenta los criterios mostrados en la tabla 1 <sup>91</sup>.

#### Evaluación de la función cognitiva

El comportamiento animal se evaluó en base a una prueba en la que se le proporcionan 5 g de algodón a los ratones y se califica la complejidad del nido construido después de 24 h, utilizando la escala mostrada en la tabla 2 <sup>92</sup>.

## **Inmunofluorescencia**

Una vez concluido el modelo animal, los ratones se anestesiaron con ketamina (100 mg/kg) y xilazina (10 mg/kg). Cinco ratones de cada tratamiento se perfundieron por vía intracardiaca con PFA 4%, y se recolectaron los cerebros, los cuales fueron procesados mediante la técnica histológica. Los cerebros fueron fijados con PFA 4% y deshidratados gradualmente con diferentes concentraciones de etanol (60%, 70%, 80%, 95% y etanol absoluto). Se prosiguió con el aclaramiento, que consiste en incubar las muestras en etanol:xilol y xilol, ya que este último es miscible con la parafina. Posteriormente, los cerebros fueron embebidos en parafina para realizar cortes histológicos de 5  $\mu$ m, los cuales fueron incubados con anticuerpos específicos. Se utilizaron anticuerpos contra: tirosina hidroxilasa (TH) (ABCAM, ab112) como marcador de las neuronas dopaminérgicas, IBA-1 (ABCAM, ab15690) para detectar la microglía,  $\alpha$ -sinucleína (ABCAM, ab52168) y ubiquitina (ABCAM, ab7254) para detectar agregación de proteínas. Los cortes histológicos se incubaron a 4° C con los anticuerpos primarios correspondientes durante toda la noche, y posteriormente con los anticuerpos secundarios (Alexa Flúor 488 y 594). Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio de fluorescencia de la marca Nikon Eclipse 50i con los objetivos de 10X y 40X. La intensidad de la fluorescencia y/o el número de células fluorescentes se evaluaron con el programa Image J (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2016).

## **Extracción de Proteínas**

Posteriormente, a partir de 5 ratones de cada tratamiento se recolectaron los cerebros, de los cuales se separaron la corteza y el mesencéfalo. Dichos tejidos se trituraron con una navaja y se colocaron 10 mg en tubos eppendorf de 1.5 ml con 150  $\mu$ l de buffer RIPA. Después, las muestras se sonicaron (Ultrasonic Processor) por 5 seg y se centrifugaron a 13,000 rpm por 10 min a 4° C. Se recolectó el sobrenadante y se colocó en un tubo nuevo. La cuantificación de proteínas se realizó mediante el kit Pierce™ BCA Protein Assay siguiendo las especificaciones del fabricante.

## **Análisis por Western Blot**

Cantidades iguales de proteínas se corrieron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida. Posteriormente, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (GVS North America), la cual se incubó con leche libre de grasa al 10% por 1 hora a temperatura ambiente. Después, la membrana se incubó con el anticuerpo primario correspondiente: Anti-LC3B (SIGMA, L7543) como marcador de autofagia, Anti-Tirosina Hidroxilasa (ABCAM, ab112), y Anti-B-Actina (SIGMA-ALDRICH, A5060) como control de carga, durante toda la noche a 4° C. Terminada la incubación, se realizaron tres lavados con TBST 1X por 5 min y se incubó con el anticuerpo secundario unido a la peroxidasa de rábano (HRP) Anti-Conejo (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, sc-2004) o Anti-Ratón (SIGMA-ALDRICH, A9044), a temperatura ambiente por 1 hora. Después de realizar tres lavados con TBST 1X por 5 min, se hizo la detección mediante el kit SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher) en un escáner C-DiGit Blot de la marca LI-COR.

## **Análisis Estadístico**

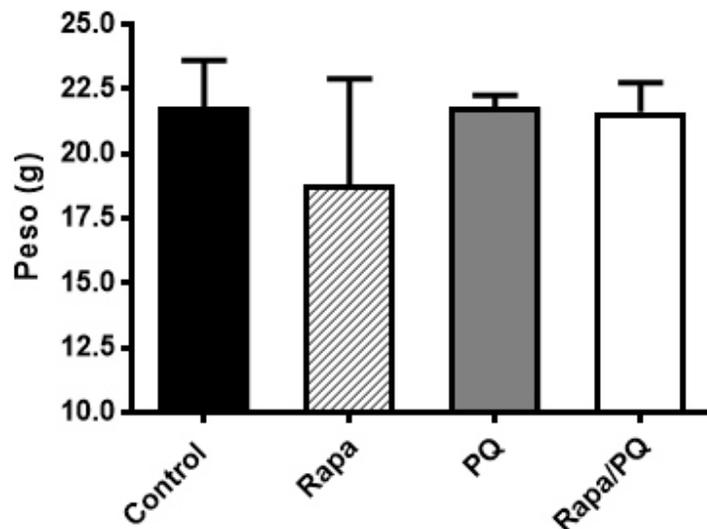
El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante el programa GraphPad Prism®, utilizando pruebas paramétricas y no paramétricas. Los valores de  $p < 0.05$  fueron considerados como significativos.

## Capítulo 4

### Resultados

#### El paraquat afecta la función motora y el comportamiento animal.

El modelo de la EP se estableció mediante el uso de la neurotoxina paraquat (10 mg/kg), la cual se administró vía intraperitoneal a lo largo de 6 semanas. Una semana antes, se realizó un pre-tratamiento con rapamicina (1 mg/kg) para estimular la autofagia. Esto se realizó con el fin de determinar si de esta manera es posible reducir o prevenir la muerte neuronal. Al grupo control se le administró PBS, y a otro grupo se le administró únicamente rapamicina. Durante el desarrollo del modelo animal, se monitoreó el peso corporal de los ratones una vez por semana. Con lo cual, no se observó diferencia significativa en el peso de los ratones en ninguno de los tratamientos (Fig. 5).



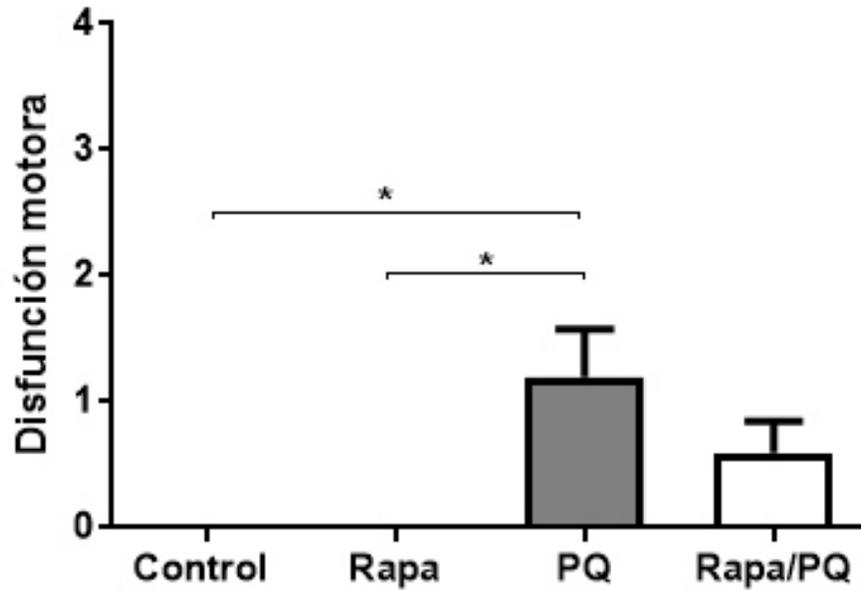
**Fig. 5. La intoxicación con paraquat no afecta el peso corporal.** A) Comparación del peso corporal de los ratones tratados con PBS (control), rapamicina (Rapa, 1 mg/kg), paraquat (PQ, 10 mg/kg) y Rapa/PQ. El peso se monitoreó semanalmente durante 7 semanas. Las barras representan el promedio del peso por grupo a lo largo del modelo experimental. Se utilizó la prueba paramétrica de ANOVA de una cola.

Una de las principales características de la EP es la pérdida de la coordinación motriz, por lo que evaluamos si la función motora de los ratones de cada uno de los grupos de nuestro modelo experimental presentaba alguna alteración. Al término de los tratamientos del modelo experimental, se evaluaron tanto el movimiento como la postura de los ratones y se asignó un valor en una escala del 1 al 4, para indicar el grado de disfunción motora como se muestra en la tabla 1 <sup>91</sup>. Los ratones del grupo control presentaron una postura y movimiento normales al caminar. Los ratones del grupo rapamicina no presentaron diferencia significativa en la postura y movimientos con respecto al grupo control. Por otro lado, los ratones que fueron tratados con paraquat mostraron una postura en reposo ligeramente flexionada y un movimiento más lento; además, alzaban notablemente las patas traseras al caminar, indicando que la función motora estaba afectada de una manera significativa en comparación con el grupo control. En cuanto a los ratones que recibieron el pre-tratamiento de rapamicina junto con la droga paraquat, mostraron una recuperación no significativa a nivel de la postura y el movimiento, al ser comparados con el grupo que solo fue tratado con paraquat (Fig. 6).

**Tabla 1. Evaluación de la postura y movimiento.**

<b>Criterios de Evaluación</b>	
<b>Puntaje</b>	<b>Descripción</b>
<b>Postura</b>	
0	Normal
1	Ligeramente flexionada
2	Severamente curvada
<b>Movimiento</b>	
0	Normal
1	Ligeramente anormal
2	Severamente anormal

Tomado de Sager. *et al. BBR, Vol. 208. 2010*



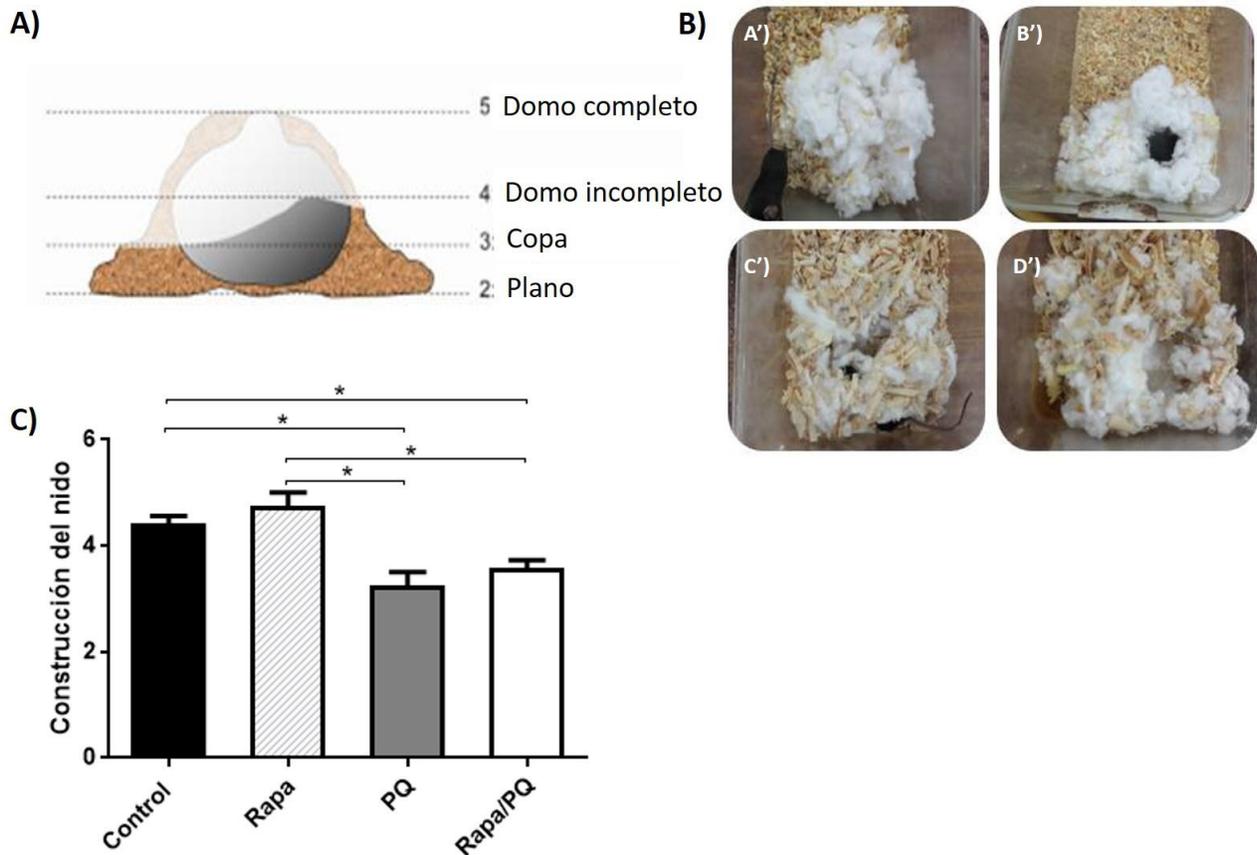
**Fig. 6. Evaluación de la función motora.** La postura y el movimiento de los ratones se evaluaron después de 7 semanas de tratamiento con PBS (control), rapamicina (Rapa, 1 mg/kg), paraquat (PQ, 10 mg/kg) y Rapa/PQ. Las barras representan el promedio de la sumatoria de ambos criterios de evaluación. \* $p < 0.05$ , diferencia significativa entre grupos. Se utilizó la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis.

Por otra parte, uno de los síntomas no motores que se presenta en la EP es la disfunción cognitiva <sup>5</sup>. Por lo que se evaluó el comportamiento de los ratones en base a la construcción del nido como se muestra en la tabla 2. Esta prueba utiliza una escala en donde el puntaje máximo es de 5 pts. y equivale a un comportamiento normal con la elaboración de un nido complejo con forma de domo cerrado, mientras que los valores por debajo del mismo corresponden a un comportamiento anormal con la formación de un nido menos complejo e incompleto (Fig. 7A) <sup>92</sup>. Los ratones del grupo control construyeron un nido bien organizado en forma de domo completo. Un comportamiento similar se observó en los ratones del grupo tratado con rapamicina. Sin embargo, los ratones tratados con paraquat elaboraron nidos desorganizados e incompletos en forma de copa, al igual que los ratones que recibieron el co-tratamiento con rapamicina y paraquat (Fig. 7B). De tal manera que el comportamiento está siendo claramente afectado por el paraquat, y el pre-tratamiento con rapamicina para inducir la autofagia no tiene influencia sobre el mismo (Fig. 7C).

**Tabla 2. Sistema de puntuación de la construcción del nido con algodón.**

Descripción del material del nido	Puntos
El material no fue movido de lugar y no presenta signos de manipulación.	0
Se observa interacción con el material (masticado o esparcido por la caja).	1
<p>Nido plano: el material fue reunido para formar un sitio de anidación sin la formación de paredes.</p> <p>Nido plano con 1 lado que es menos de la mitad de una esfera.</p> <p>Nido plano con 2 lados que son menos de la mitad de una esfera.</p> <p>Nido plano con 3 lados que son menos de la mitad de una esfera.</p>	<p>2</p> <p>2.25</p> <p>2.50</p> <p>2.75</p>
<p>Copa: El nido tiene paredes identificables que dan la apariencia de una copa o tazón de poca profundidad.</p> <p>Nido en forma de copa con 1 lado que es la mitad de una esfera.</p> <p>Nido en forma de copa con 2 lados que son la mitad de una esfera.</p> <p>Nido en forma de copa con 3 lados que son la mitad de una esfera.</p>	<p>3</p> <p>3.25</p> <p>3.50</p> <p>3.75</p>
<p>Domo incompleto: Las paredes del nido alcanzan el punto más ancho de una esfera imaginaria.</p> <p>Domo incompleto con 1 lado más alto que la mitad de una esfera.</p> <p>Domo incompleto con 2 lados más altos que la mitad de una esfera.</p> <p>Domo incompleto con 3 lados más altos que la mitad de una esfera.</p>	<p>4</p> <p>4.25</p> <p>4.50</p> <p>4.75</p>
Domo completo. Las paredes encierran completamente el hueco del nido. Se puede encontrar un agujero de salida en el costado o en la superficie del domo.	5

Tomado Hess E, S. et al. JAALAS, Vol. 47. 2008



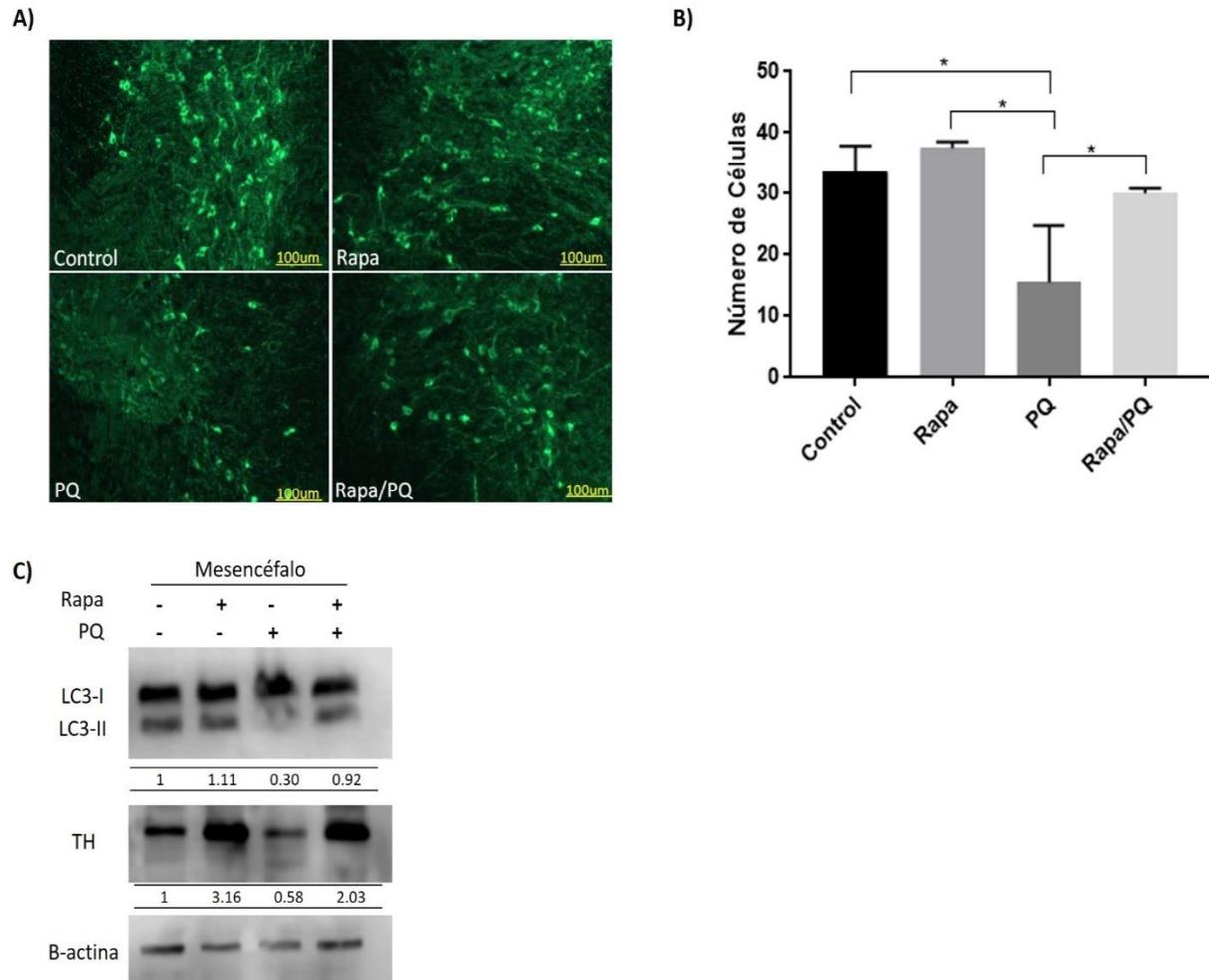
**Fig. 7. Evaluación del comportamiento.** A) Representación esquemática del sistema de puntuación de la construcción del nido. B) Imágenes representativas de los nidos construidos. El comportamiento de los ratones fue evaluado individualmente, a los cuales se les proporcionaron 5 g de algodón. A') corresponde al grupo control; B') grupo rapamicina (Rapa); C') grupo paraquat (PQ); D') el grupo con el co-tratamiento de rapamicina con paraquat (Rapa/PQ). C) Representación gráfica de los puntajes de los nidos construidos. \* $p < 0.05$ , diferencia significativa entre grupos. Se utilizó la prueba paramétrica ANOVA de una cola.

## La inducción de la autofagia disminuye la pérdida de las neuronas dopaminérgicas mediada por paraquat.

Una zona importante del mesencéfalo que se encuentra afectada en la EP es la *substantia nigra pars compacta*, donde radican las neuronas dopaminérgicas productoras del neurotransmisor dopamina. La muerte de estas neuronas es la responsable de la pérdida progresiva de la función motora. Por lo que una vez concluido el modelo animal, los ratones se anestesiaron con ketamina (100 mg/kg) y

xilazina (10 mg/kg), y se perfundieron con PFA 4% vía intracardiaca. Se extrajo el cerebro y se analizó a nivel de la *substancia nigra* mediante inmunofluorescencia. La población de las neuronas dopaminérgicas fue identificada a través de la detección de la tirosina hidroxilasa (TH), la cual es una enzima que participa en la síntesis de dopamina. En la figura 8A se observa la población normal de neuronas dopaminérgicas (control), la cual no se vio afectada por la rapamicina. En contraste, en el grupo tratado con paraquat se observó una notable reducción de las neuronas dopaminérgicas comparado con el grupo control. Sin embargo, lo interesante fue que al estimular la autofagia antes de la intoxicación con paraquat, se observó una disminución de la pérdida de las neuronas inducida por el paraquat. Para validar estos resultados, se realizó un conteo de las neuronas dopaminérgicas, y observamos que efectivamente el paraquat induce una disminución de estas células, mientras que el pre-tratamiento con rapamicina reduce significativamente la pérdida de las neuronas dopaminérgicas causada por el paraquat (Fig. 8B).

Para corroborar el efecto de la rapamicina sobre la autofagia en nuestro modelo experimental, se determinaron mediante western blot los niveles de la proteína LC3-II, ya que es considerada como el principal marcador proteico de autofagia. La proteína LC3 existe en dos formas, la LC3-I es una proteína citosólica, mientras que su conversión a LC3-II ocurre por la adición de un grupo fosfatidiletanolamina, lo que le confiere la habilidad de unirse a la membrana del autofagosoma <sup>93</sup>. Se observó que la rapamicina induce un incremento del marcador de autofagia LC3-II comparado con el grupo control. Confirmamos el efecto inhibitorio del paraquat sobre el mecanismo de autofagia, ya que esta neurotoxina disminuyó los niveles de LC3-II. Se observó que la inducción de la autofagia con la rapamicina previo al tratamiento con paraquat, mantiene los niveles de LC3-II similares a los normales (Fig. 8C). Asimismo, se corroboró por western blot que la toxina paraquat disminuyó los niveles del marcador de neuronas dopaminérgicas TH, mientras que la inducción de autofagia los incrementó. Por lo tanto, pudimos determinar que el paraquat induce la muerte de las neuronas dopaminérgicas, y que la autofagia mediada por rapamicina inhibe esta muerte celular.

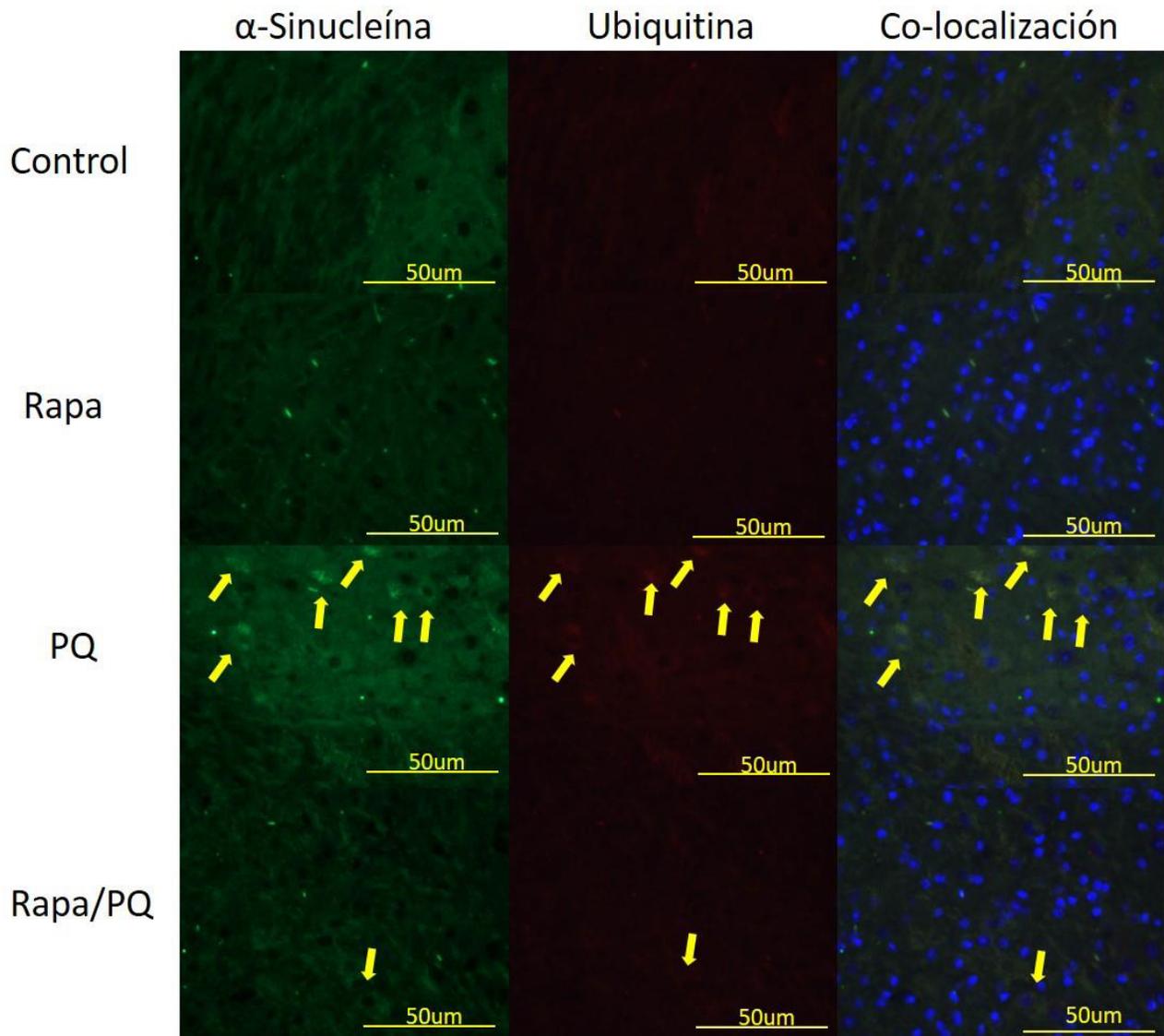


**Fig. 8. La estimulación de la autofagia tiene un efecto de protección en un modelo *in vivo* de la EP.** A) Los ratones tratados con PBS (control), rapamicina (Rapa), paraquat (PQ) y Rapa/PQ se anestesiaron con ketamina (100 mg/kg) y xilazina (10 mg/kg), se perfundieron con PFA 4% vía intracardiaca, y se les extrajo el cerebro. Se realizaron cortes de 5 µm a nivel de la *substancia nigra* y se analizaron mediante inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-TH como marcador de las neuronas dopaminérgicas. Se muestran imágenes representativas de los tratamientos correspondientes. B) Se llevó a cabo el conteo de las células TH positivas en 4 campos diferentes de manera aleatoria. C) Los ratones se sacrificaron por dislocación cervical, se extrajo el cerebro y se aisló la proteína del mesencéfalo. Los niveles de LC3-II y TH se determinaron mediante western blot con anticuerpos específicos. La β-actina se utilizó como control de carga y se utilizó para hacer la normalización en el análisis densitométrico. \* $p < 0.05$  diferencia significativa entre grupos. Se utilizó la prueba paramétrica ANOVA de una cola.

## **La inducción de la autofagia disminuye la agregación de la $\alpha$ -sinucleína y la ubiquitina en el modelo de la EP.**

La  $\alpha$ -sinucleína es una proteína neuronal que se localiza en el citoplasma y preferentemente en las terminaciones pre-sinápticas nerviosas. A pesar de la gran cantidad de estudios que se han realizado sobre esta proteína, aún se desconoce su función. Sin embargo, su acumulación y agregación desempeñan un papel importante en la formación de los cuerpos de Lewy. Los cuerpos de Lewy son agregados anormales de proteína y son característicos de la EP. Por otra parte, la presencia de la proteína ubiquitina en los cuerpos de Lewy ha sido ampliamente reportada. La ubiquitina ejerce su función mediante la formación de cadenas de poliubiquitina, que sirven para marcar proteínas mal plegadas o dañadas, para su degradación por el proteosoma <sup>94</sup>.

Por lo tanto, mediante inmunofluorescencia se determinaron los niveles de expresión de las proteínas  $\alpha$ -sinucleína y ubiquitina, a nivel de la *substancia nigra* en el modelo animal de la EP. Se observó la formación de agregados proteicos de la  $\alpha$ -sinucleína y ubiquitina inducidos por paraquat comparado con el grupo control y el grupo tratado sólo con rapamicina, en donde no se detectó acumulación de las proteínas. De manera sorprendente, la inducción de la autofagia disminuyó la presencia de los agregados de  $\alpha$ -sinucleína y ubiquitina, que habían sido inducidos por el paraquat (Fig. 9).

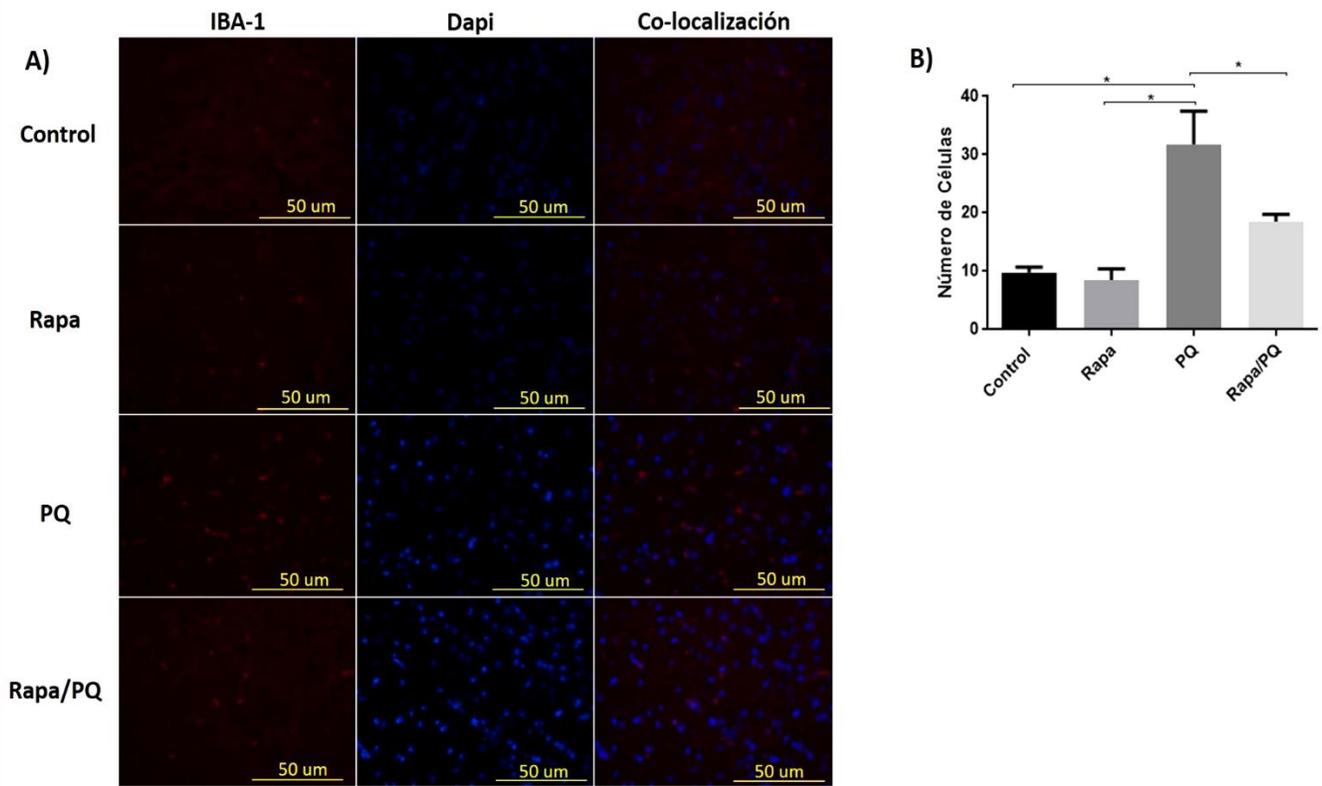


**Fig. 9. La agregación de las proteínas  $\alpha$ -sinucleína y ubiquitina disminuye al estimular la autofagia.** Cortes de 5  $\mu$ m a nivel de la *substancia nigra* fueron analizados mediante inmunofluorescencia, se utilizó el anticuerpo anti- $\alpha$ -sinucleína y el anticuerpo anti-ubiquitina. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Se muestran imágenes representativas de los tratamientos realizados con PBS (control), rapamicina (Rapa), paraquat (PQ) y Rapa/PQ. Las flechas amarillas indican la señal positiva.

## **La inducción de la autofagia disminuye la activación de la microglía inducida por paraquat.**

Las células de la microglía son las células del sistema inmune que residen en el cerebro, y juegan un papel importante en la defensa del sistema nervioso central. En un cerebro lesionado o enfermo, la microglía ramificada se transforma rápidamente de un estado en reposo a un estado activo, prolifera, migra, libera una variedad de citocinas y se vuelve fagocítica <sup>95</sup>. En muestras cerebrales postmortem de pacientes con la EP se ha reportado la activación de la microglía <sup>96</sup>, lo que sugiere que tanto su activación como los procesos inflamatorios, desempeñan un papel importante en la patogénesis de la EP.

Para determinar si la microglía estaba siendo activada en nuestro modelo experimental, detectamos mediante inmunofluorescencia el marcador específico IBA-1 (*ionized calcium binding adaptor molecule 1*, molécula adaptadora de unión a calcio ionizado tipo 1) <sup>97</sup>. En la figura 10 podemos observar las condiciones basales de activación de la microglía (grupo control), y que la rapamicina por sí sola no tiene efecto sobre ésta. En contraste, el paraquat indujo un incremento dramático en la activación de la microglía en comparación con el control. De manera sorprendente, el co-tratamiento en donde se estimuló la autofagia con la rapamicina, indujo una notable disminución de la activación de la microglía inducida por paraquat (Fig. 10A). Para validar estos resultados, se realizó un conteo de las células de la microglía y observamos que el tratamiento con paraquat induce un claro aumento de estas células, mientras que el pre-tratamiento con rapamicina reduce significativamente la microglía activada por paraquat (Fig. 10B).



**Fig. 10. La activación de la microglía mediada por paraquat disminuye al estimular la autofagia.** A) Cortes de 5  $\mu\text{m}$  a nivel de la *substancia nigra* fueron analizados mediante inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-IBA-1 como marcador de la microglía. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Se muestran imágenes representativas de los tratamientos realizados con PBS (control), rapamicina (Rapa), paraquat (PQ) y Rapa/PQ. B) A partir de los cortes de la *substancia nigra* procesados mediante inmunohistoquímica para la detección de la microglía, se llevó a cabo el conteo de las células IBA-1 positivas en 4 campos diferentes de manera aleatoria. \* $p < 0.05$  diferencia significativa entre los grupos. Se utilizó la prueba paramétrica ANOVA de una cola.

## Capítulo 5

### Discusiones

La EP se caracteriza por la pérdida de las neuronas dopaminérgicas en la *substancia nigra pars compacta*. A través de los años se han desarrollado modelos animales con diferentes neurotoxinas para reproducir las características de la EP, principalmente la muerte de dichas neuronas, y así lograr estudiar y comprender mejor esta enfermedad <sup>23, 32</sup>.

Por otra parte, los tratamientos utilizados en la actualidad para tratar la EP se enfocan en reducir la sintomatología y mejorar la calidad de vida. Entre ellos se encuentra la levodopa, que a diferencia del neurotransmisor dopamina, tiene la propiedad de atravesar la barrera hematoencefálica. Una vez en el cerebro la levodopa se convierte en dopamina para llevar a cabo su función <sup>98</sup>.

Sin embargo, aún no se han implementado terapias que logren retardar el desarrollo progresivo de la EP. En la última década, el mecanismo de autofagia ha ganado importancia ya que su inducción ha demostrado tener un gran potencial de protección en diferentes modelos animales de enfermedades neurodegenerativas <sup>83, 85, 87</sup>.

El paraquat, una de las neurotoxinas utilizadas como modelo de la EP, a pesar de estar relacionado epidemiológicamente con el riesgo a desarrollar la enfermedad, no se ha caracterizado completamente.

En el presente estudio se validó el modelo de la EP usando la toxina paraquat y se utilizó la rapamicina como inductor del mecanismo de autofagia para analizar si este último ejerce un efecto neuroprotector sobre la muerte de las neuronas dopaminérgicas.

En un estudio previo, reportaron que el paraquat produjo un incremento del peso corporal más lento que el grupo control en ratas Sprague–Dawley, y solamente cuando se combinó con el fungicida maneb indujo disfunciones motoras a nivel de la postura y la velocidad, aunque dichas alteraciones muestran inconsistencias con respecto al tiempo <sup>99</sup>. Nosotros encontramos que el tratamiento con paraquat en ratones de la cepa C57BL6/J, no tuvieron variaciones significativas en el peso corporal, sin embargo, estos

ratones mostraron una alteración significativa a nivel neuromotor (disfunción motora). De manera muy interesante, la disfunción motora disminuyó de manera no significativa, al pre-estimular la autofagia antes de la intoxicación con paraquat.

Por otro lado, en nuestro modelo experimental, los ratones tratados con paraquat presentaron una clara disfunción cognitiva en comparación con el grupo control, al construir nidos en forma de copa, desorganizados e incompletos. En un modelo animal de la EP inducido con MPTP, donde se evaluó el comportamiento de los ratones mediante la elaboración de sus nidos, se observó que la disfunción cognitiva era dependiente de la dosis de MPTP. Sin embargo, estos ratones mostraron recuperación a través del tiempo, y a los 28 días después de la administración de MPTP su comportamiento se restableció casi por completo <sup>91</sup>. Los resultados del MPTP son consistentes con un estudio *in vitro* en donde tanto el paraquat como el MPP<sup>+</sup> (metabolito activo del MPTP) inducen la muerte de las neuronas dopaminérgicas, sin embargo, el mecanismo de acción es diferente. El paraquat ejerce un efecto tóxico irreversible, mientras que el MPP<sup>+</sup>, debe estar presente de manera continua para surtir un efecto tóxico <sup>100</sup>.

Además, cabe señalar que existen muy pocos estudios en donde se ha evaluado el papel de la autofagia sobre la disfunción motora y cognitiva. Uno de estos estudios analizó el papel de la autofagia inducida por la rapamicina sobre la disfunción cognitiva en un modelo animal de la enfermedad de Alzheimer. La rapamicina fue proporcionada en el alimento de los ratones en microcápsulas a una dosis de 14 mg/kg durante 16 meses. Observaron que el tratamiento con rapamicina previo al desarrollo de la enfermedad inducía la autofagia y prevenía el déficit de memoria y de aprendizaje, así como la disminución de los depósitos de la proteína beta-amiloide. En contraste, cuando se administró la rapamicina en el alimento durante 2 meses a ratones que ya habían desarrollado la enfermedad, no hubo mejoría en la memoria ni en el aprendizaje, y se detectaron depósitos de beta-amiloide en el cerebro <sup>101</sup>.

Nosotros encontramos que los ratones que recibieron rapamicina para inducir la autofagia, previo a la administración de paraquat, no tuvieron una mejora en el comportamiento. Posiblemente la optimización de la dosis o tiempo de administración

de la rapamicina podría tener una influencia positiva sobre la función motora y el comportamiento afectados en el modelo de la EP inducido con paraquat.

El mecanismo de acción de la rapamicina como inductor de la autofagia consiste en la inhibición de mTOR, que a su vez es un regulador negativo de la autofagia <sup>89</sup>. Para confirmar que la rapamicina estuviera induciendo la autofagia en nuestro modelo experimental, analizamos los niveles de expresión de la proteína LC3-II, que es el marcador estándar de la autofagia. Se observó un incremento en la expresión de LC3-II en los ratones tratados con rapamicina, y una notable disminución en el grupo tratado con paraquat, lo cual es consistente con un reporte *in vitro* del efecto inhibitorio del paraquat y el MPP<sup>+</sup> sobre el flujo de autofagia <sup>74</sup>. Sin embargo, la pre-estimulación de la autofagia seguida de la administración del paraquat restableció la autofagia a niveles cercanos a los normales.

Posteriormente, comprobamos que el paraquat disminuye significativamente la población de las neuronas dopaminérgicas como ha sido reportado en otros estudios <sup>102, 103</sup>. De manera muy interesante, demostramos mediante western blot e inmunofluorescencia que la estimulación del mecanismo de autofagia con rapamicina induce un incremento de los marcadores de autofagia (LC3-II) y neuronas dopaminérgicas (TH), y reduce de manera significativa la pérdida de neuronas dopaminérgicas inducida por paraquat, por lo que la autofagia tiene un efecto neuroprotector. Estudios previos en modelos de la EP inducidos con 6-OHDA y MPTP mostraron que la rapamicina tuvo un efecto protector similar sobre la muerte neuronal dopaminérgica <sup>86, 87, 90</sup>. Sin embargo, la exposición al paraquat incrementa el riesgo a desarrollar la EP, por lo que la caracterización de este modelo es de gran relevancia.

En modelos experimentales de la EP inducidos con MPTP y 6-OHDA, se han reportado agregados proteicos formados entre otras proteínas por  $\alpha$ -sinucleína y ubiquitina, que son proteínas características de los cuerpos de Lewy <sup>104, 105</sup>. Asimismo, se ha demostrado que el paraquat induce la disfunción del proteosoma, y, por ende, se desencadena el proceso de agregación de  $\alpha$ -sinucleína y ubiquitina <sup>106, 107</sup>. Puesto que la autofagia, que también es un mecanismo de degradación de proteínas, también es inhibida por el paraquat, analizamos si su inducción era capaz de disminuir la agregación proteica producida por el paraquat. Observamos la formación de agregados

proteicos de  $\alpha$ -sinucleína y ubiquitina en presencia de paraquat, los cuales disminuyeron al inducir el mecanismo de autofagia. Estos resultados se correlacionan con un estudio que demostró que la  $\alpha$ -sinucleína es degradada tanto por la vía del proteosoma, como por la autofagia <sup>108</sup>.

Por otra parte, la primera evidencia sobre el papel de la inflamación en la EP proviene de un estudio post mortem, en donde encontraron la presencia de microglía activada y linfocitos T en la *substancia nigra pars compacta* de un paciente con la EP <sup>96</sup>. Desde entonces, se han realizado numerosos estudios que soportan la importancia de los procesos neuro-inflamatorios en la EP, ya que contribuyen con la muerte de las neuronas dopaminérgicas <sup>96, 109, 110</sup>. Previamente, se ha demostrado que el paraquat induce un incremento de la microglía activada <sup>111</sup>. Nosotros confirmamos que esta toxina incrementa la activación de la microglía en la *substancia nigra pars compacta*. Además, la activación de la microglía mediada por el paraquat, se vio disminuida al pre-estimular el mecanismo de autofagia. Estos resultados son consistentes con un estudio en donde se observó la disminución tanto de la microglía activada como de citocinas pro-inflamatorias al estimular la autofagia mediante la droga metformina, mejorando la sobrevivencia celular frente la toxina MPTP <sup>112</sup>.

La toxicidad del paraquat se produce principalmente en la mitocondria a través del ciclo redox por la generación de ROS <sup>49, 50</sup>, y subsecuentemente prosigue un aumento de ROS en el citosol <sup>51</sup>. Como resultado se producen alteraciones oxidativas a nivel de ADN, lípidos y proteínas, afectando el metabolismo celular <sup>113, 114</sup>.

Dentro de nuestros hallazgos, demostramos que la inducción del mecanismo de autofagia ejerce un efecto neuroprotector en un modelo de la EP inducido con paraquat. Nuestros resultados sugieren que la estimulación de la autofagia restaura el microambiente celular tóxico inducido por el paraquat, disminuyendo la agregación de proteínas y la inflamación. De tal manera que la población neuronal dopaminérgica se mantiene estable. Por lo tanto, los agentes inductores de la autofagia tienen un potencial prometedor en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

## Capítulo 6.

### Conclusiones

- ❖ El paraquat induce una disfunción motora y cognitiva.
- ❖ La estimulación de la autofagia disminuye la pérdida de las neuronas dopaminérgicas.
- ❖ La inducción de la autofagia disminuye la formación de agregados de  $\alpha$ -sinucleína y ubiquitina.
- ❖ La estimulación de la autofagia disminuye la activación de la microglía.

## Literatura Citada

- 1 Parkinson J. An essay on the shaking palsy. 1817. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 2002; **14**:223-236; discussion 222.
- 2 de Lau LM, Breteler MM. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 2006; **5**:525-535.
- 3 Tanner CM, Goldman SM. Epidemiology of Parkinson's disease. *Neurol Clin* 1996; **14**:317-335.
- 4 Nussbaum RL, Ellis CE. Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *N Engl J Med* 2003; **348**:1356-1364.
- 5 Jankovic J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2008; **79**:368-376.
- 6 Bloem BR, Hausdorff JM, Visser JE, Giladi N. Falls and freezing of gait in Parkinson's disease: a review of two interconnected, episodic phenomena. *Mov Disord* 2004; **19**:871-884.
- 7 Giladi N, Treves TA, Simon ES *et al*. Freezing of gait in patients with advanced Parkinson's disease. *J Neural Transm* 2001; **108**:53-61.
- 8 O'Sullivan SS, Williams DR, Gallagher DA, Massey LA, Silveira-Moriyama L, Lees AJ. Nonmotor symptoms as presenting complaints in Parkinson's disease: a clinicopathological study. *Mov Disord* 2008; **23**:101-106.
- 9 Hornykiewicz O. The discovery of dopamine deficiency in the parkinsonian brain. *J Neural Transm Suppl* 2006:9-15.
- 10 Tretiakoff C. *Contributions a l'etude de l'anatomie pathologique du locus niger de soemmering avec quelques deductions relatives a la pathogenie des troubles de tonus musculaire et de la maladie de Parkinson*. Paris 1919.
- 11 Pollanen MS, Dickson DW, Bergeron C. Pathology and biology of the Lewy body. *J Neuropathol Exp Neurol* 1993; **52**:183-191.
- 12 Ii K, Ito H, Tanaka K, Hirano A. Immunocytochemical co-localization of the proteasome in ubiquitinated structures in neurodegenerative diseases and the elderly. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997; **56**:125-131.
- 13 Ishizawa T, Mattila P, Davies P, Wang D, Dickson DW. Colocalization of tau and alpha-synuclein epitopes in Lewy bodies. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003; **62**:389-397.
- 14 Jakes R, Spillantini MG, Goedert M. Identification of two distinct synucleins from human brain. *FEBS Lett* 1994; **345**:27-32.
- 15 George JM. The synucleins. *Genome Biol* 2002; **3**:REVIEWS3002.
- 16 Pickart CM. Ubiquitin in chains. *Trends Biochem Sci* 2000; **25**:544-548.
- 17 Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; **83**:4913-4917.
- 18 Iqbal K, Liu F, Gong CX, Grundke-Iqbal I. Tau in Alzheimer disease and related tauopathies. *Curr Alzheimer Res* 2010; **7**:656-664.
- 19 Gasser T, Hardy J, Mizuno Y. Milestones in PD genetics. *Mov Disord* 2011; **26**:1042-1048.
- 20 Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 2003; **39**:889-909.
- 21 Gupta A, Dawson VL, Dawson TM. What causes cell death in Parkinson's disease? *Ann Neurol* 2008; **64 Suppl 2**:S3-15.
- 22 Sherman MY, Goldberg AL. Cellular defenses against unfolded proteins: a cell biologist thinks about neurodegenerative diseases. *Neuron* 2001; **29**:15-32.
- 23 Blandini F, Armentero MT. Animal models of Parkinson's disease. *FEBS J* 2012; **279**:1156-1166.
- 24 Perumal AS, Tordzro WK, Katz M *et al*. Regional effects of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) on free radical scavengers in rat brain. *Brain Res* 1989; **504**:139-141.

- 25 Perumal AS, Gopal VB, Tordzro WK, Cooper TB, Cadet JL. Vitamin E attenuates the toxic effects of 6-hydroxydopamine on free radical scavenging systems in rat brain. *Brain Res Bull* 1992; **29**:699-701.
- 26 Tiffany-Castiglioni E, Saneto RP, Proctor PH, Perez-Polo JR. Participation of active oxygen species in 6-hydroxydopamine toxicity to a human neuroblastoma cell line. *Biochem Pharmacol* 1982; **31**:181-188.
- 27 Decker DE, Althaus JS, Buxser SE, VonVoigtlander PF, Ruppel PL. Competitive irreversible inhibition of dopamine uptake by 6-hydroxydopamine. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1993; **79**:195-208.
- 28 Lotharius J, Dugan LL, O'Malley KL. Distinct mechanisms underlie neurotoxin-mediated cell death in cultured dopaminergic neurons. *J Neurosci* 1999; **19**:1284-1293.
- 29 Soloway SB. Naturally occurring insecticides. *Environ Health Perspect* 1976; **14**:109-117.
- 30 Tanner CM, Kamel F, Ross GW *et al*. Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. *Environ Health Perspect* 2011; **119**:866-872.
- 31 Martinez TN, Greenamyre JT. Toxin models of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal* 2012; **16**:920-934.
- 32 Duty S, Jenner P. Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease. *Br J Pharmacol* 2011; **164**:1357-1391.
- 33 ZIERING A, BERGER L. Piperidine derivatives; 4-arylpiperidines. *J Org Chem* 1947; **12**:894-903.
- 34 Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* 1983; **219**:979-980.
- 35 Tetrud JW, Langston JW, Garbe PL, Ruttenger AJ. Mild parkinsonism in persons exposed to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Neurology* 1989; **39**:1483-1487.
- 36 Burns RS, Chiueh CC, Markey SP, Ebert MH, Jacobowitz DM, Kopin IJ. A primate model of parkinsonism: selective destruction of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983; **80**:4546-4550.
- 37 Jenner P, Rupniak NM, Rose S *et al*. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced parkinsonism in the common marmoset. *Neurosci Lett* 1984; **50**:85-90.
- 38 Riachi NJ, LaManna JC, Harik SI. Entry of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine into the rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* 1989; **249**:744-748.
- 39 Chiba K, Trevor A, Castagnoli N. Metabolism of the neurotoxic tertiary amine, MPTP, by brain monoamine oxidase. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; **120**:574-578.
- 40 Javitch JA, D'Amato RJ, Strittmatter SM, Snyder SH. Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: uptake of the metabolite N-methyl-4-phenylpyridine by dopamine neurons explains selective toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; **82**:2173-2177.
- 41 Nicklas WJ, Youngster SK, Kindt MV, Heikkila RE. MPTP, MPP+ and mitochondrial function. *Life Sci* 1987; **40**:721-729.
- 42 Karunakaran S, Saeed U, Mishra M *et al*. Selective activation of p38 mitogen-activated protein kinase in dopaminergic neurons of substantia nigra leads to nuclear translocation of p53 in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated mice. *J Neurosci* 2008; **28**:12500-12509.
- 43 Hassouna I, Wickert H, Zimmermann M, Gillardon F. Increase in bax expression in substantia nigra following 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) treatment of mice. *Neurosci Lett* 1996; **204**:85-88.
- 44 Vila M, Jackson-Lewis V, Vukosavic S *et al*. Bax ablation prevents dopaminergic neurodegeneration in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; **98**:2837-2842.
- 45 Muthu V, Das A, Bal A, Agarwal R. Severe cholestasis and hepatic dysfunction in a case of fatal paraquat poisoning. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2015; **39**:e7-9.
- 46 Costello S, Cockburn M, Bronstein J, Zhang X, Ritz B. Parkinson's disease and residential exposure to maneb and paraquat from agricultural applications in the central valley of California. *Am J Epidemiol* 2009; **169**:919-926.

- 47 Liou HH, Tsai MC, Chen CJ *et al.* Environmental risk factors and Parkinson's disease: a case-control study in Taiwan. *Neurology* 1997; **48**:1583-1588.
- 48 Shimizu K, Ohtaki K, Matsubara K *et al.* Carrier-mediated processes in blood--brain barrier penetration and neural uptake of paraquat. *Brain Res* 2001; **906**:135-142.
- 49 Bonne-Barkay D, Reaney SH, Langston WJ, Di Monte DA. Redox cycling of the herbicide paraquat in microglial cultures. *Brain Res Mol Brain Res* 2005; **134**:52-56.
- 50 Bonne-Barkay D, Langston WJ, Di Monte DA. Toxicity of redox cycling pesticides in primary mesencephalic cultures. *Antioxid Redox Signal* 2005; **7**:649-653.
- 51 Rodriguez-Rocha H, Garcia-Garcia A, Pickett C *et al.* Compartmentalized oxidative stress in dopaminergic cell death induced by pesticides and complex I inhibitors: distinct roles of superoxide anion and superoxide dismutases. *Free Radic Biol Med* 2013; **61**:370-383.
- 52 Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in mammalian autophagy research. *Cell* 2010; **140**:313-326.
- 53 Cecconi F, Levine B. The role of autophagy in mammalian development: cell makeover rather than cell death. *Dev Cell* 2008; **15**:344-357.
- 54 Martinet W, De Meyer GR, Andries L, Herman AG, Kockx MM. In situ detection of starvation-induced autophagy. *J Histochem Cytochem* 2006; **54**:85-96.
- 55 Mizushima N, Klionsky DJ. Protein turnover via autophagy: implications for metabolism. *Annu Rev Nutr* 2007; **27**:19-40.
- 56 Klionsky DJ, Emr SD. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* 2000; **290**:1717-1721.
- 57 Polager S, Ofir M, Ginsberg D. E2F1 regulates autophagy and the transcription of autophagy genes. *Oncogene* 2008; **27**:4860-4864.
- 58 Cuervo AM. Autophagy: many paths to the same end. *Mol Cell Biochem* 2004; **263**:55-72.
- 59 Levine B, Klionsky DJ. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* 2004; **6**:463-477.
- 60 De Duve C, Wattiaux R. Functions of lysosomes. *Annu Rev Physiol* 1966; **28**:435-492.
- 61 Dice JF. Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. *Trends Biochem Sci* 1990; **15**:305-309.
- 62 Chiang HL, Terlecky SR, Plant CP, Dice JF. A role for a 70-kilodalton heat shock protein in lysosomal degradation of intracellular proteins. *Science* 1989; **246**:382-385.
- 63 Cuervo AM, Dice JF. A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science* 1996; **273**:501-503.
- 64 Klionsky DJ, Abeliovich H, Agostinis P *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy* 2008; **4**:151-175.
- 65 Xie Z, Klionsky DJ. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol* 2007; **9**:1102-1109.
- 66 Shen S, Kepp O, Kroemer G. The end of autophagic cell death? *Autophagy* 2012; **8**:1-3.
- 67 Maday S. Mechanisms of neuronal homeostasis: Autophagy in the axon. *Brain Res* 2016; **1649**:143-150.
- 68 Komatsu M, Waguri S, Chiba T *et al.* Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* 2006; **441**:880-884.
- 69 Hara T, Nakamura K, Matsui M *et al.* Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* 2006; **441**:885-889.
- 70 Chu CT, Zhu J, Dagda R. Beclin 1-independent pathway of damage-induced mitophagy and autophagic stress: implications for neurodegeneration and cell death. *Autophagy* 2007; **3**:663-666.
- 71 Dehay B, Bové J, Rodríguez-Muela N *et al.* Pathogenic lysosomal depletion in Parkinson's disease. *J Neurosci* 2010; **30**:12535-12544.

- 72 González-Polo RA, Niso-Santano M, Ortíz-Ortíz MA *et al.* Inhibition of paraquat-induced autophagy accelerates the apoptotic cell death in neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Toxicol Sci* 2007; **97**:448-458.
- 73 Wills J, Credle J, Oaks AW *et al.* Paraquat, but not maneb, induces synucleinopathy and tauopathy in striata of mice through inhibition of proteasomal and autophagic pathways. *PLoS One* 2012; **7**:e30745.
- 74 Garcia-Garcia A, Anandhan A, Burns M, Chen H, Zhou Y, Franco R. Impairment of Atg5-dependent autophagic flux promotes paraquat- and MPP<sup>+</sup>-induced apoptosis but not rotenone or 6-hydroxydopamine toxicity. *Toxicol Sci* 2013; **136**:166-182.
- 75 Ravikumar B, Duden R, Rubinsztein DC. Aggregate-prone proteins with polyglutamine and polyalanine expansions are degraded by autophagy. *Hum Mol Genet* 2002; **11**:1107-1117.
- 76 Qin ZH, Wang Y, Kegel KB *et al.* Autophagy regulates the processing of amino terminal huntingtin fragments. *Hum Mol Genet* 2003; **12**:3231-3244.
- 77 Tsujimoto Y, Shimizu S. Another way to die: autophagic programmed cell death. *Cell Death Differ* 2005; **12 Suppl 2**:1528-1534.
- 78 Ryter SW, Mizumura K, Choi AM. The impact of autophagy on cell death modalities. *Int J Cell Biol* 2014; **2014**:502676.
- 79 Pan T, Kondo S, Zhu W, Xie W, Jankovic J, Le W. Neuroprotection of rapamycin in lactacystin-induced neurodegeneration via autophagy enhancement. *Neurobiol Dis* 2008; **32**:16-25.
- 80 Erlich S, Alexandrovich A, Shohami E, Pinkas-Kramarski R. Rapamycin is a neuroprotective treatment for traumatic brain injury. *Neurobiol Dis* 2007; **26**:86-93.
- 81 Berger Z, Ravikumar B, Menzies FM *et al.* Rapamycin alleviates toxicity of different aggregate-prone proteins. *Hum Mol Genet* 2006; **15**:433-442.
- 82 Pierce A, Podlutskaya N, Halloran JJ *et al.* Over-expression of heat shock factor 1 phenocopies the effect of chronic inhibition of TOR by rapamycin and is sufficient to ameliorate Alzheimer's-like deficits in mice modeling the disease. *J Neurochem* 2013; **124**:880-893.
- 83 Spilman P, Podlutskaya N, Hart MJ *et al.* Inhibition of mTOR by rapamycin abolishes cognitive deficits and reduces amyloid-beta levels in a mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One* 2010; **5**:e9979.
- 84 Floto RA, Sarkar S, Perlstein EO, Kampmann B, Schreiber SL, Rubinsztein DC. Small molecule enhancers of rapamycin-induced TOR inhibition promote autophagy, reduce toxicity in Huntington's disease models and enhance killing of mycobacteria by macrophages. *Autophagy* 2007; **3**:620-622.
- 85 Ravikumar B, Vacher C, Berger Z *et al.* Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat Genet* 2004; **36**:585-595.
- 86 Jiang J, Zuo Y, Gu Z. Rapamycin protects the mitochondria against oxidative stress and apoptosis in a rat model of Parkinson's disease. *Int J Mol Med* 2013; **31**:825-832.
- 87 Malagelada C, Jin ZH, Jackson-Lewis V, Przedborski S, Greene LA. Rapamycin protects against neuron death in in vitro and in vivo models of Parkinson's disease. *J Neurosci* 2010; **30**:1166-1175.
- 88 Poüs C, Codogno P. Lysosome positioning coordinates mTORC1 activity and autophagy. *Nat Cell Biol* 2011; **13**:342-344.
- 89 Thomson AW, Turnquist HR, Raimondi G. Immunoregulatory functions of mTOR inhibition. *Nat Rev Immunol* 2009; **9**:324-337.
- 90 Liu K, Shi N, Sun Y, Zhang T, Sun X. Therapeutic effects of rapamycin on MPTP-induced Parkinsonism in mice. *Neurochem Res* 2013; **38**:201-207.
- 91 Sager TN, Kirchoff J, Mørk A *et al.* Nest building performance following MPTP toxicity in mice. *Behav Brain Res* 2010; **208**:444-449.
- 92 Hess SE, Rohr S, Dufour BD, Gaskill BN, Pajor EA, Garner JP. Home improvement: C57BL/6J mice given more naturalistic nesting materials build better nests. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2008; **47**:25-31.
- 93 Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 and Autophagy. *Methods Mol Biol* 2008; **445**:77-88.
- 94 Amm I, Sommer T, Wolf DH. Protein quality control and elimination of protein waste: the role of the ubiquitin-proteasome system. *Biochim Biophys Acta* 2014; **1843**:182-196.

- 95 Joers V, Tansey MG, Mulas G, Carta AR. Microglial phenotypes in Parkinson's disease and animal models of the disease. *Prog Neurobiol* 2016.
- 96 McGeer PL, McGeer EG. Glial reactions in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2008; **23**:474-483.
- 97 Ohsawa K, Imai Y, Sasaki Y, Kohsaka S. Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbrin and enhances its actin-bundling activity. *J Neurochem* 2004; **88**:844-856.
- 98 Fabbrini G, Juncos J, Mouradian MM, Serrati C, Chase TN. Levodopa pharmacokinetic mechanisms and motor fluctuations in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1987; **21**:370-376.
- 99 Cicchetti F, Lapointe N, Roberge-Tremblay A *et al.* Systemic exposure to paraquat and maneb models early Parkinson's disease in young adult rats. *Neurobiol Dis* 2005; **20**:360-371.
- 100 Lei S, Zavala-Flores L, Garcia-Garcia A *et al.* Alterations in energy/redox metabolism induced by mitochondrial and environmental toxins: a specific role for glucose-6-phosphate-dehydrogenase and the pentose phosphate pathway in paraquat toxicity. *ACS Chem Biol* 2014; **9**:2032-2048.
- 101 Majumder S, Richardson A, Strong R, Oddo S. Inducing autophagy by rapamycin before, but not after, the formation of plaques and tangles ameliorates cognitive deficits. *PLoS One* 2011; **6**:e25416.
- 102 Peng J, Mao XO, Stevenson FF, Hsu M, Andersen JK. The herbicide paraquat induces dopaminergic nigral apoptosis through sustained activation of the JNK pathway. *J Biol Chem* 2004; **279**:32626-32632.
- 103 Rodriguez-Rocha H, Garcia Garcia A, Zavala-Flores L, Li S, Madayiputhiya N, Franco R. Glutaredoxin 1 protects dopaminergic cells by increased protein glutathionylation in experimental Parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal* 2012; **17**:1676-1693.
- 104 Pierson J, Svenningsson P, Caprioli RM, Andren PE. Increased levels of ubiquitin in the 6-OHDA-lesioned striatum of rats. *J Proteome Res* 2005; **4**:223-226.
- 105 Kowall NW, Hantraye P, Brouillet E, Beal MF, McKee AC, Ferrante RJ. MPTP induces alpha-synuclein aggregation in the substantia nigra of baboons. *Neuroreport* 2000; **11**:211-213.
- 106 Manning-Bog AB, McCormack AL, Li J, Uversky VN, Fink AL, Di Monte DA. The herbicide paraquat causes up-regulation and aggregation of alpha-synuclein in mice: paraquat and alpha-synuclein. *J Biol Chem* 2002; **277**:1641-1644.
- 107 Yang W, Tiffany-Castiglioni E. The bipyridyl herbicide paraquat induces proteasome dysfunction in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J Toxicol Environ Health A* 2007; **70**:1849-1857.
- 108 Webb JL, Ravikumar B, Atkins J, Skepper JN, Rubinsztein DC. Alpha-Synuclein is degraded by both autophagy and the proteasome. *J Biol Chem* 2003; **278**:25009-25013.
- 109 Tansey MG, McCoy MK, Frank-Cannon TC. Neuroinflammatory mechanisms in Parkinson's disease: potential environmental triggers, pathways, and targets for early therapeutic intervention. *Exp Neurol* 2007; **208**:1-25.
- 110 Hirsch EC, Vyas S, Hunot S. Neuroinflammation in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2012; **18 Suppl 1**:S210-212.
- 111 Purisai MG, McCormack AL, Cumine S, Li J, Isla MZ, Di Monte DA. Microglial activation as a priming event leading to paraquat-induced dopaminergic cell degeneration. *Neurobiol Dis* 2007; **25**:392-400.
- 112 Lu M, Su C, Qiao C, Bian Y, Ding J, Hu G. Metformin Prevents Dopaminergic Neuron Death in MPTP/P-Induced Mouse Model of Parkinson's Disease via Autophagy and Mitochondrial ROS Clearance. *Int J Neuropsychopharmacol* 2016.
- 113 McCormack AL, Atienza JG, Johnston LC, Andersen JK, Vu S, Di Monte DA. Role of oxidative stress in paraquat-induced dopaminergic cell degeneration. *J Neurochem* 2005; **93**:1030-1037.
- 114 McCarthy S, Somayajulu M, Sikorska M, Borowy-Borowski H, Pandey S. Paraquat induces oxidative stress and neuronal cell death; neuroprotection by water-soluble Coenzyme Q10. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004; **201**:21-31.