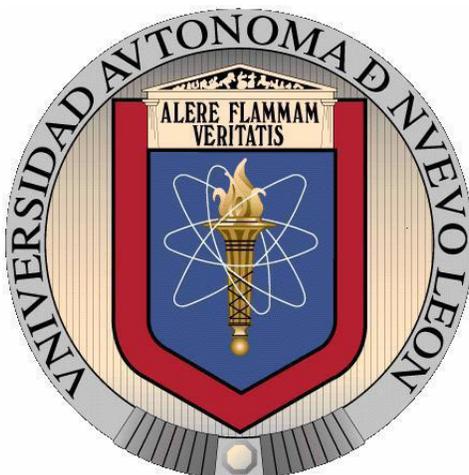


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



**“ANÁLISIS DEL SISTEMA REDOX EN EL EFECTO NEUROPROTECTOR DE LA
AUTOFAGIA”**

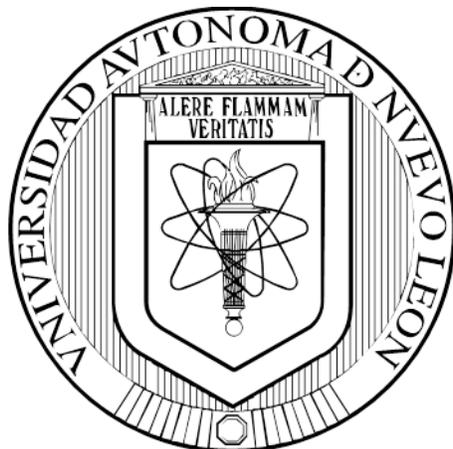
PRESENTADA POR

M.C.P. ANA PATRICIA DUARTE JURADO

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE MAestrÍA EN
CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MORFOLOGÍA**

AGOSTO, 2017

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



**“ANÁLISIS DEL SISTEMA REDOX EN EL EFECTO NEUROPROTECTOR DE LA
AUTOFAGIA”**

PRESENTADA POR

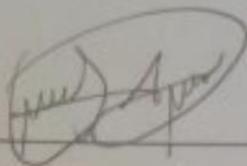
M.C.P. ANA PATRICIA DUARTE JURADO

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE MAestrÍA EN
CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MORFOLOGÍA**

AGOSTO, 2017

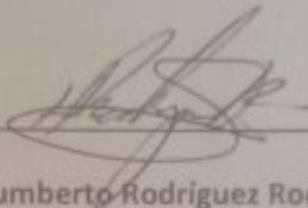
**"ANÁLISIS DEL SISTEMA REDOX EN EL EFECTO NEUROPROTECTOR
DE LA AUTOFAGIA"**

Aprobación de Tesis:



Dra. Aracely García García

Director



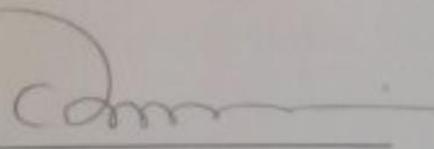
Dr. Humberto Rodríguez Rocha

Co-Director



Dra. Odila Saucedo Cárdenas

Comisión de Tesis



Dr. Med. Felipe Arturo Morales Martínez

Subdirector de Estudios de Posgrado

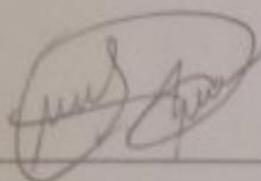
"ANÁLISIS DEL SISTEMA REDOX EN EL EFECTO NEUROPROTECTOR DE LA AUTOFAGIA"

Presentado por:

M.C.P. Ana Patricia Duarte Jurado

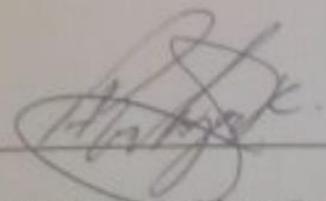
Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Terapéutica Antioxidante, del Departamento de Histología, de la Facultad de Medicina, de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Aracely García García y bajo la co-dirección del Dr. Humberto Rodríguez Rocha.

Este trabajo fue financiado por el fondo CONACYT-CB-221615 y PRODEP-SEP (Apoyo a la incorporación de NPTC 2014-2016).



Dra. Aracely García García

Director



Dr. Humberto Rodríguez Rocha

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y a la Universidad Autónoma de Nuevo León por el apoyo y patrocinio para la realización de este proyecto.

Son muchas las personas importantes a las que quisiera agradecer enseñanzas, apoyo, amistad y compañía en las diferentes etapas de la realización de esta tesis. Algunos están aquí conmigo y otras me acompañan en la distancia. Sin importar donde estén o si alguna vez llegan a leer estas palabras quiero darles las gracias por formar parte de mi vida y por todo lo que han aportado a ella.

A la Dra. Aracely García y al Dr. Humberto Rodríguez, por aceptarme como su estudiante, por su paciencia, por sus enseñanzas académicas y por mostrarme que el camino a la excelencia es difícil, pero es el único que vale la pena.

A la Dra. Odila Saucedo, por formar parte de mi comisión de tesis y por sus recomendaciones y aportaciones en el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Roberto Montes de Oca Luna, la Dra. María de Jesus Loera, el Dr. Arnulfo Villanueva, el Dr. Adolfo Soto y el Dr. Jaime García por formar parte de mi instrucción en esta etapa de mi formación académica.

A Patricia, porque no me equivoco cuando digo que eres la mejor mamá del mundo, gracias por tu apoyo, por quererme aunque sea rara. A Alejandro, mi papá, pilar impasible de mi familia, gracias por todo tu esfuerzo. Gracias a los dos por estar conmigo aunque este lejos.

A mis hermanos Alejandra y Roberto, mis confidentes y compañeros en la vida, ustedes son mis personas favoritas de la tierra. A mi hermano Aarón, el recuerdo de tu música y tu voz serán por siempre el soundtrack de mi vida.

A mis compañeros del laboratorio de terapéutica antioxidante: Alex Navarro, Marcela Ramírez, Mayra Lumbreras, Ulises Covarrubias, Alfredo González y Daniel Meléndez.

A mis amigos del laboratorio de morfo: a David, muchas gracias por escucharme y aprenderte de memoria mis presentaciones, por discutir conmigo y darme perspectiva, por el apoyo, la paciencia, la motivación, los paseos y los muchos momentos compartidos; a Abigail, Daniel, Fany, Jorge, Bianka, José Juan, Sheila, Daniel S., Erik, Guille, Rodolfo y Jared gracias por hacer muy divertida la vida diaria estos dos años.

A mis amigos de toda la vida, cerca y en la distancia: los hermanos Cordero, por ser mi familia en Monterrey y nunca dejarme sola. A Alejandra Álvarez, Brisa, Karla, Nidya, Anabel, Jorge, Gael y Rafa, gracias por el buen humor y el ánimo en más de 10 años de recuerdos y amor.

A todos, gracias.

INDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	1
RESUMEN	6
ABSTRACT	7
INTRODUCCIÓN	8
ANTECEDENTES	10
ENFERMEDAD DE PARKINSON	10
MODELOS EXPERIMENTALES DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON	15
PARKINSONISMO INDUCIDO POR NEUROTOXINAS	16
ESTRÉS OXIDATIVO	22
AUTOFAGIA	25
RELEVANCIA DE LA AUTOFAGIA Y EL ESTRÉS OXIDATIVO EN EL SISTEMA NERVIOSO	29
INDUCCIÓN FARMACOLÓGICA DE LA AUTOFAGIA	31
JUSTIFICACIÓN	34
OBJETIVO GENERAL.....	35
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
MATERIAL Y EQUIPO	36
MÉTODOS.....	41
RESULTADOS	47
LA INDUCCIÓN DE AUTOFAGIA DISMINUYE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN EL CITOPLASMA EN UN MODELO CELULAR DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON	47
LA INDUCCIÓN DE AUTOFAGIA DISMINUYE EL ESTADO DE HIPEROXIDACIÓN DE LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES PEROXIRREDOXINAS	51
LA INDUCCIÓN DE AUTOFAGIA DISMINUYE LA MUERTE MEDIADA POR PARAQUAT	54
LA INDUCCIÓN DE AUTOFAGIA DISMINUYE LA MUERTE DEPENDIENTE DE CALPAÍNAS MEDIADA POR PARAQUAT.....	56
LA INDUCCIÓN DE AUTOFAGIA DISMINUYE LA MUERTE DEPENDIENTE DE CASPASAS MEDIADA POR PARAQUAT.....	58
DISCUSIÓN.....	61
CONCLUSIONES	66
REFERENCIAS.....	67

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. La <i>sustancia nigra</i> en la enfermedad de Parkinson.	11
FIGURA 2. Alteración de los niveles de dopamina en la enfermedad de Parkinson..	12
FIGURA 3. “ <i>Triángulo de las Bermudas</i> ” de eventos moleculares que subyacen a la neurodegeneración	14
FIGURA 4 Estructura química de la 6-hidroxidopamina (6-OHDA).	17
FIGURA 5. Estructura química del 1-metil-4-feni1-1, 2, 3,6 tetrahidropiridina (MPTP).	19
FIGURA 6. Estructura química de la rotenona.	20
FIGURA 7. ESTRUCTURA QUIMICA DEL PARAQUAT	22
FIGURA 8. Flujo de la autofagia	27
FIGURA 9. Plot representativo de la citometría de flujo.....	46
FIGURA 10. Disminución del estrés oxidativo citoplasmático generado por paraquat mediante la estimulación de la autofagia	49
FIGURA 11. Comparación de la intensidad de la fluorescencia emitida en respuesta al estrés oxidativo generado por paraquat y a la inducción de autofagia.	50
FIGURA 12. Efecto de la autofagia sobre el estatus oxidativo de las peroxirredoxinas inducido en el modelo de la enfermedad de Parkinson.	53
FIGURA 13. La muerte mediada por paraquat disminuye al inducir la autofagia.	55
FIGURA 14. Protección de la muerte celular mediada por paraquat mediante la inducción de autofagia.	56
FIGURA 15. La estimulación de la autofagia reduce la actividad de calpaínas inducida por paraquat.	57

FIGURA 16. La estimulación de autofagia reduce la muerte celular dependiente de caspasas

mediada por paraquat 60

LISTA DE ABREVIATURAS

6-OHDA	6-Hidroxidopamina
7 AAD	7-Aminoactinomicina D
Ac-LLY-AFC	Ac-Leu-Leu-Tyr-7-Amino-4-trifluorometilcumarina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AKT	Serina/treonina Kinasa
AMBRA	Regulador 1 de la autofagia/Beclina 1
ARN	Ácido ribonucleico
ATG	Genes relacionados a autofagia
ATP	Adenosina trifosfato
BECN1	Beclina 1
BSA	Albúmina de suero bovino
CMA	Autofagia mediada por chaperonas
CysP	Cisteína peroxidática
CysSO ₂ H	Ácido sulfínico de la cisteína
CysSOH	Ácido sulfénico de la cisteína

DA	Dopamina
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol)
DHE	Dihidroetidio
DJ-1	Protein Deglycase
DMEM	Medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco
DMSO	Dimetil Sulfoxido
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EO	Estrés oxidativo
EP	Enfermedad de Parkinson
ERO	Especies reactivas de nitrógeno
Gpe	Globo pálido externo
Gpi	Globo pálido interno
HSPA8	Proteína de choque térmico A8
kDa	Kilodaltones
KFEFRQ	Código pentapéptido de la secuencia de aminoácidos Lys-Phe-Glu-Arg-Gln

LAMP2A	Proteína de membrana A2 asociada a lisosomas
LC3	Cadena ligera 3 de la proteína asociada al microtúbulo
L-Dopa	Levodopamina
LRRK2	kinasa con dominio rico en leucina
MDA	Malonaldehído
ml	Mililitro
mm	Milimetro
mM	Milimolar
MPTP/MPP+	1-metil-4-fenil-1, 2, 3, 6-terahidropiridina/1-metil-4-fenil-piridina
mTOR	Diana de rapamicina en células de mamífero
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
Nm	Nanómetro
nM	Nanomolar
NST	Núcleo subtalámico
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Solución salina amortiguada por fosfato

PFA	Paraformaldehído
PIK3C3	Fosfatidilinositol 3 quinasa subunidad catalítica 3
PINK	Kinasa putativa inducida por PTEN
PQ	Paraquat
Prx SO ₃	Peroxirredoxina hiperoxidada
PSA	Persulfato de amonio
PVDF	Polifluoruro de vinilideno
Rapa	Rapamicina
RIPA	Ensayo de radioinmunoprecipitación
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sodico
SN2	Sustitución nucleofílica tipo 2
SNARE	Receptores de proteínas de fijación soluble de NSF
SNpc	Sustancia Nigra pars compacta
SNpr	Sustancia Nigra pars reticulada

TAD	Transportador a dopamina
TBST	Tampon tris-salino, Tween 20
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametiletilendiamina
UBL	Ubiquitin-like
UHCL-1	Ubiquitina-carboxilhidroxilasa 1
ULK-1	Unc-51-kinasa activadora de autofagia 1
VPS34	Proteína de clasificación vaculoar 34
Z-LLY-FMK	Z-Leu-Leu-Tyr-Fluorometilcetona
μl	Microlitro
μM	Micromolar

RESUMEN

M.C.P. Ana Patricia Duarte Jurado

Fecha de graduación: Agosto 2017

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Título del estudio: “Análisis del sistema redox en el efecto neuroprotector de la autofagia”

Numero de páginas: 76

Área de estudio: Morfología

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

La enfermedad de Parkinson (EP) es el trastorno de movimiento neurodegenerativo crónico y progresivo más común. Se caracteriza por la pérdida selectiva de neuronas dopaminérgicas en la *sustancia nigra*, lo que conduce a una deficiencia de dopamina con posterior disfunción motora y cognitiva. Aunque su etiología es aún desconocida, la exposición ambiental a herbicidas incluyendo el paraquat se ha asociado al desarrollo de la EP. Además, la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo (EO) y el deterioro de las vías de degradación de proteínas mediadas por el proteosoma y la autofagia, se han relacionado con la EP. La autofagia es un mecanismo de auto-regulación de las células e implica la degradación de las macromoléculas y orgánulos, los cuales pueden reutilizarse para la supervivencia celular. El deterioro de la autofagia está asociado con la muerte celular y la neurodegeneración. Por lo tanto, quisimos determinar si la inducción de la autofagia puede proteger las neuronas dopaminérgicas de la muerte celular inducida por EO. Se estableció el modelo celular experimental de EP en las células dopaminérgicas SH-SY5Y mediante el uso del herbicida paraquat (PQ), que induce el EO, la disrupción de la autofagia y la muerte celular. El efecto de la autofagia en el EO mediada por PQ se evaluó en el compartimiento citoplásmico con dihidroethidio (DHE) por microscopía de fluorescencia. Hemos observado que el EO inducida por PQ fue significativamente menor cuando se estimuló la autofagia con rapamicina. Las peroxiredoxinas (Prxs) son enzimas antioxidantes que catalizan la reducción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), peroxinitrito e hidroperóxidos orgánicos. Los entornos altamente oxidativos inducen la hiperoxidación de Prxs, con su posterior inactivación antioxidante. Encontramos que el paraquat induce peroxidación de las Prxs, mientras que la estimulación de la autofagia disminuyó este efecto, lo cual se determinó por inmunofluorescencia y western blot. Para determinar el efecto de la autofagia en la muerte celular inducida por PQ, las vías de apoptosis dependientes de calpaínas y caspasas fueron evaluadas por fluorimetría y citometría de flujo, respectivamente. Es importante destacar que la estimulación autofaga inhibió la apoptosis dependiente de calpaínas y caspasas inducida por el paraquat. Nuestros resultados muestran que la estimulación de autofagia tiene un papel protector contra el EO y la apoptosis dependiente de calpaínas y caspasas inducida por paraquat, lo que representa una estrategia prometedora contra la EP.

ABSTRACT

M.C.P Ana Patricia Duarte Jurado

Date: August 2017

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Title: "Analysis of the redox system on the neuroprotective effect of autophagy"

Number of pages: 76

Study area: Morphology

Candidate for the Master's degree
in Sciences with Orientation in
Morphology

Parkinson's disease (PD) is the most common chronic and progressive neurodegenerative movement disorder. It is characterized by the selective loss of dopaminergic neurons in the *substantia nigra*, leading to a deficiency of dopamine with subsequent motor and cognitive dysfunction. Although its etiology is still unknown, environmental exposure to herbicides including paraquat has been associated to PD development. In addition, mitochondrial dysfunction, oxidative stress (OS) and impairment of the protein degradation pathways mediated by the proteasome and autophagy, have been related with PD. Autophagy is a self-regulatory mechanism of cells and involves degradation of macromolecules and organelles, which byproducts can be re-used for cell survival. Impairment of autophagy is associated with cell death and neurodegeneration. Therefore, we wanted to determine whether induction of autophagy can protect dopaminergic neurons from cell death-induced by OS. We established the experimental cellular model of PD in the SH-SY5Y dopaminergic cells by using the herbicide paraquat (PQ), which induces OS, autophagy disruption and cell death. The effect of autophagy on PQ-mediated OS was evaluated in the cytoplasmic compartment with dihydroethidium (DHE) by fluorescence microscopy. We observed that OS induced by PQ was significantly decrease by autophagy stimulation with rapamycin. Peroxiredoxins (Prxs) are antioxidant enzymes that catalyze the reduction of hydrogen peroxide (H₂O₂), peroxyxynitrite, and organic hydroperoxides. Highly oxidative environments induce Prxs hyperoxidation, with its subsequent antioxidant inactivation. We found that PQ induced Prxs hyperoxidation, while autophagy stimulation decreased this effect, which was determined by immunofluorescence and western blot. To determine the effect of autophagy on PQ-induced cell death, calpain and caspase-dependent apoptosis pathways were evaluated by fluorometry and flow cytometry, respectively. Importantly, autophagy stimulation inhibited calpain- and caspase-dependent apoptosis induced by paraquat. Our results show that autophagy stimulation has a protective role by decreasing OS and calpain- and caspase-dependent apoptosis induced by paraquat, representing a promising strategy against PD.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno neurodegenerativo crónico, progresivo de inicio insidioso, que afecta principalmente a la población comprendida en el grupo etario de más de 65 años. La Organización Mundial de la Salud (OMS) lo identifica como el principal trastorno del movimiento junto con el tremor esencial, y lo ubica en el segundo lugar de las enfermedades neurodegenerativas sólo después de la enfermedad de Alzheimer. La EP se caracteriza clínicamente por temblor durante el reposo, rigidez muscular, bradicinesia e inestabilidad postural. Anatomopatológicamente se distingue la pérdida de las neuronas dopaminérgicas de la *sustancia nigra pars compacta (SNpc)* en el mesencéfalo.

Ésta pérdida neuronal conduce a una deficiencia del neurotransmisor dopamina (DA) en el cuerpo estriado, lo cual conlleva a las manifestaciones clínicas ya conocidas de la EP, puesto que afecta al núcleo putamen (que está más directamente involucrado con la función motora).

El tratamiento actual de la EP es sólo paliativo y se basa en la utilización de fármacos que buscan compensar el déficit dopaminérgico. En los estadios tempranos de la enfermedad el esquema principal de tratamiento se centra en el uso de la L-Dopa (levodopa), la cual es muy eficiente para aliviar en gran medida los signos y síntomas de esta fase. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, la pérdida de las neuronas es progresiva y con el uso prolongado de estos medicamentos aparecen complicaciones motoras.

A pesar del importante impacto epidemiológico de la enfermedad y de su gran relevancia clínica, en la actualidad se desconocen los mecanismos moleculares que subyacen en la etiopatogenia de la EP. Sin embargo, se han relacionado tres eventos principales a nivel celular: la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo (EO) y las alteraciones en las vías de degradación de las proteínas, ya sea mediada por el proteosoma o la autofagia.

La autofagia es una vía de autorenovación celular y degradación lisosomal que es esencial para el mantenimiento de la viabilidad de la célula en condiciones críticas como la privación de nutrientes, disminución de factores de transcripción y condiciones celulares nocivas como estados de estrés. Funciona principalmente como un mecanismo adaptativo que consiste en la degradación de proteínas mal plegadas o que fueron sintetizadas en exceso, organelos dañados y otros componentes celulares a través de los lisosomas. Subsecuentemente los subproductos de la degradación son reinsertados en las rutas metabólicas o usados para la construcción de nuevas macromoléculas.

La alteración de este proceso se ha relacionado con algunas patologías neurodegenerativas, por lo que su estimulación puede comprenderse como una medida terapéutica neuroprotectora. Se ha demostrado que la inducción de la autofagia disminuye la muerte de las células dopaminérgicas *in vitro* e *in vivo* en modelos experimentales de la EP. Sin embargo, aún no se ha determinado su influencia directamente sobre el EO y sobre la activación de la apoptosis mediada por calpaínas y caspasas, en lo cual se centra el presente estudio.

ANTECEDENTES

ENFERMEDAD DE PARKINSON

En 1817, el médico británico James Parkinson describió de forma detallada las manifestaciones clínicas que presentaban 6 pacientes, en su documento *“An essay on the Shaking Palsy”*, en donde definió *“Temblores involuntarios del movimiento, con potencia muscular disminuida, con propensión a doblar el tronco al frente y una marcha que pasa del andar lento a un ritmo de carrera. Los órganos de los sentidos y el intelecto permanecen sin lesión”* ¹.

Hoy en día, se sabe que la EP es un trastorno neurológico degenerativo, crónico, progresivo y lento, el cual forma parte de las llamadas enfermedades del movimiento, denominadas así porque se manifiestan como diversos trastornos relacionados con el desplazamiento del cuerpo y de las extremidades. Se trata de la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente después de la enfermedad de Alzheimer ^{2,3}. La prevalencia estimada en países industrializados es de 0.3% en la población general, y alrededor del 1% en individuos mayores de 60 años ³. La incidencia parece incrementarse con la edad, alcanzando 0.3 enfermos por cada 1000 habitantes entre los 55 y 65 años y 4.4 enfermos por cada 1000 personas mayores de 85 años ⁴.

La principal característica anatomopatológica de la EP es la progresiva degeneración de las neuronas dopaminérgicas y la aparición de inclusiones eosinofílicas denominadas cuerpos

de Lewy, que contienen proteínas como α -sinucleína y ubiquitina en el interior de las células supervivientes ⁵.

Se estima una pérdida del 70-90% de las neuronas dopaminérgicas, lo cual sucede incluso antes de que se manifiesten los síntomas clínicos. La zona donde más se pierden estas neuronas es la *SNpc* del mesencéfalo (Figura 1), que forma parte del circuito de los ganglios basales y es la principal fuente de DA ⁶.

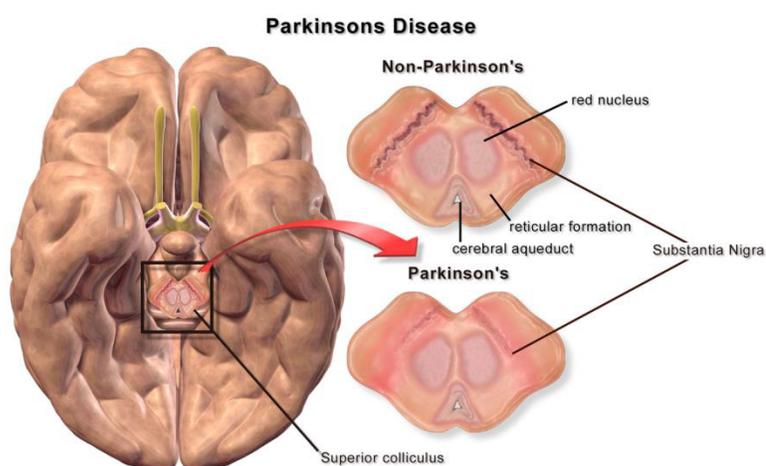


FIGURA 1. La sustancia nigra en la enfermedad de Parkinson. Sección de un corte a nivel del mesencéfalo que muestra en la parte superior, la SN de un individuo normal, en donde se localizan las neuronas dopaminérgicas, y en la parte inferior, cómo la SN disminuye en los pacientes con la EP.

La degeneración de neuronas dopaminérgicas produce una disminución de los niveles de DA en el estriado, lo que causa una pérdida de la regulación del circuito motor de los ganglios basales (Figura 2). Los ganglios basales son acumulaciones de cuerpos de células nerviosas de localización subcortical que se hallan cerca de la base del cerebro. Incluyen el estriado (caudado y putamen), núcleo subtalámico (NST), globo pálido externo (Gpe) e interno (Gpi), núcleo ventral del tálamo, *SNpc* y *SN pars reticulada (SNpr)* ^{6,7}.

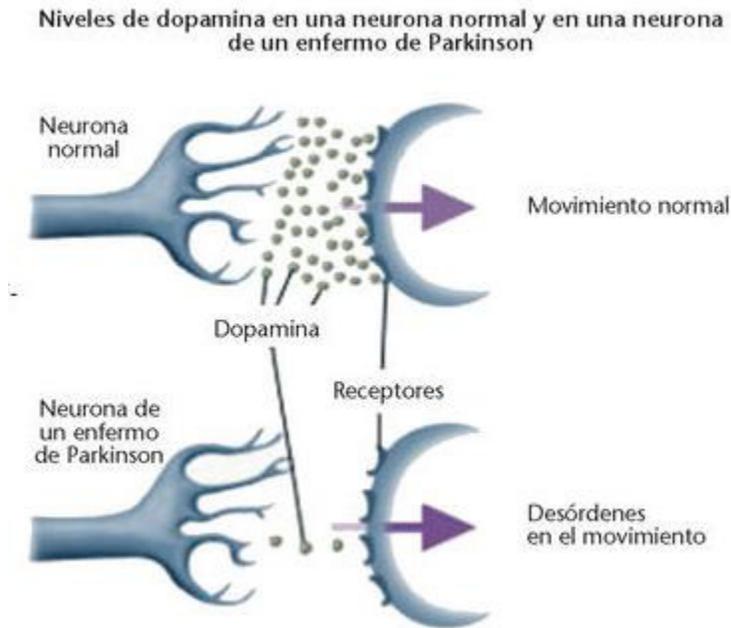


FIGURA 2. Alteración de los niveles de dopamina en la enfermedad de Parkinson. Los niveles normales del neurotransmisor DA son esenciales para el control del movimiento (neurona normal), mientras que su disminución (neurona afectada por la EP) lleva a una alteración del mismo.

Estos núcleos están interconectados con la corteza cerebral, el tálamo y el tronco cerebral, y esta red córtico-subcortical que forman, es la responsable del control motor. En este circuito motor, las áreas corticales motoras inervan el putamen. La degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la *SNpc*, encargadas del aporte de DA al putamen, provoca la pérdida de la regulación de los movimientos motores, que es característica de la EP. Existen cuatro características clínicas cardinales de la EP, que pueden agruparse bajo el acrónimo de TRAP: **T**emblor en reposo, **R**igidez, **A**cinésia (o bradicinesia) e **I**nestabilidad Postural⁸. Los síntomas no motores más frecuentes, además de las alteraciones cognitivas y emocionales, son las disfunciones autonómicas, sensoriales, gastrointestinales y los

trastornos del sueño ^{9 10}. Estos últimos, se consideran criterios menores para el diagnóstico de la enfermedad.

Debido a que la DA participa como neurotransmisor a nivel sistémico en otras funciones del organismo, su disminución puede asociarse con otras alteraciones clínicas que afectan por ejemplo la presión sanguínea, la contracción cardíaca, y la regulación hormonal de la prolactina. Por ello, pacientes con la EP pueden presentar síntomas adicionales, como hipoventilación central, hipotensión ortostática, mioclonía e incontinencia urinaria ¹¹.

Sin embargo, para que la sintomatología sea evidente, se deben perder hasta el 90% de las neuronas dopaminérgicas como consecuencia de la reducción drástica de las concentraciones de DA estriatal. Esto podría justificar por qué los síntomas parkinsonianos se manifiestan en zonas restringidas del cuerpo al inicio de la patología, y luego se extienden bilateralmente a las partes restantes del mismo ¹².

La etiología de la EP está asociada tanto a factores genéticos como ambientales. El número de casos en los que la enfermedad es diagnosticada bajo el estudio de una mutación genética es solamente del 10% ⁴. Hasta el momento, se han identificado 13 *loci* relacionados con la aparición de la EP. De los cuales, los más importantes son los genes que codifican para α -sinucleína, parkin, PINK1, DJ-1 y LRKK2 ¹². El desarrollo de la EP familiar también se atribuye a la aparición de mutaciones en otros genes, entre los que destacan, la ubiquitina carboxil-hidroxilasa-1 (UHCL-1), relacionada con el sistema ubiquitina-proteosoma ^{13,14}.

En la EP idiopática influyen los factores ambientales, factores genéticos, así como procesos inherentes a la célula como el envejecimiento. De esta forma, se ha relacionado un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad con la exposición a pesticidas y herbicidas; patógenos virales y bacterianos; metales como cobre, hierro y manganeso; y diversos solventes ¹⁵⁻¹⁷. La contribución de estos factores de riesgo desencadena la generación de modificaciones oxidativas, disfunción mitocondrial y deterioro en los sistemas de degradación de proteínas, lo cual forma en conjunto el “*Triángulo de las Bermudas*” de eventos moleculares, que subyace a la neurodegeneración (Figura 3) ¹⁸.

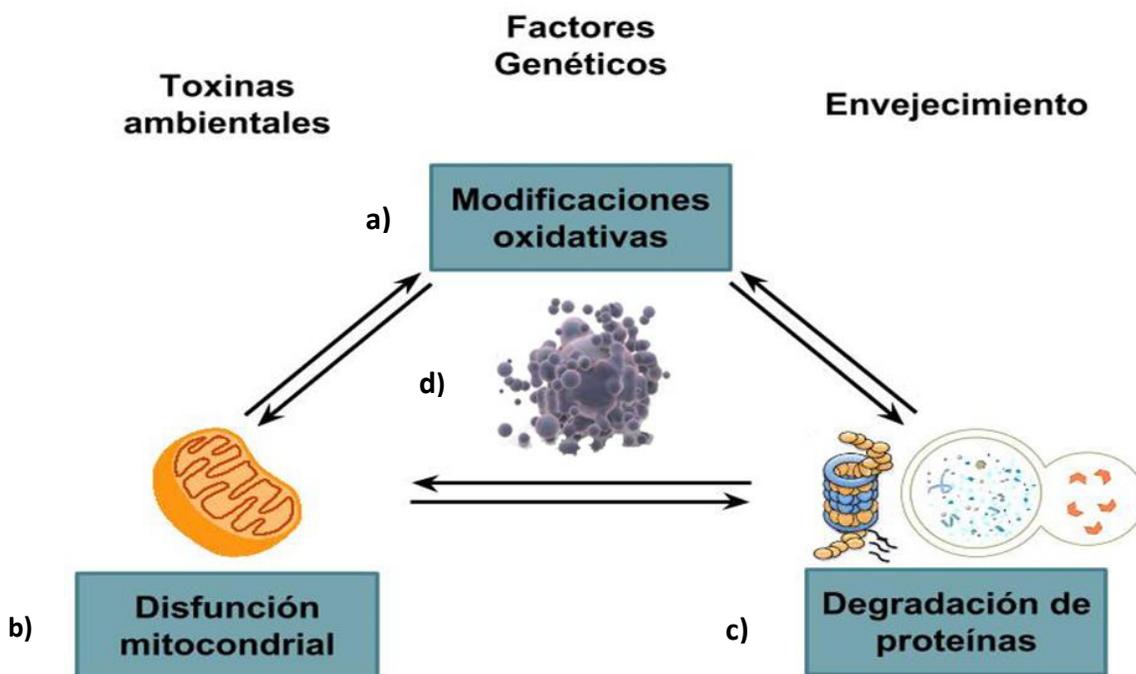


FIGURA 3. “*Triángulo de las Bermudas*” de eventos moleculares que subyace a la neurodegeneración. Los factores de riesgo asociados con el desarrollo de la EP incluyen factores ambientales, genéticos y endógenos. Estos factores producen a) modificaciones oxidativas de macromoléculas, b) disfunción en organelos, principalmente la mitocondria, y c) deficiencia del sistema de degradación de proteínas. Estos eventos llevan por sí solos o en conjunto a d) la muerte de las neuronas dopaminérgicas

La vulnerabilidad de las neuronas dopaminérgicas a estos factores se ha asociado al metabolismo inherente de la DA, la cual es oxidada y a su vez genera especies reactivas de oxígeno (ERO), lo que conduce a la célula a un estatus de estrés oxidativo, en donde las ERO tienen diferentes blancos macromoleculares¹⁹.

MODELOS EXPERIMENTALES DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

En las últimas dos décadas, se han logrado avances significativos en la adquisición de un mejor conocimiento tanto de la etiología como de la patogénesis de la EP, gracias a numerosos estudios clínicos y post-mortem, así como a la utilización de nuevos modelos experimentales *in vitro* e *in vivo*, de la enfermedad humana. A pesar de estos incuestionables avances en la biología molecular y celular, que nos han acercado más que nunca a ser capaces de desentrañar la base fisiopatológica de la EP, todavía tenemos lagunas en nuestra comprensión de los mecanismos implicados en la neurodegeneración parkinsoniana que hay que abordar²⁰.

Disponer de modelos experimentales de la EP es fundamental para poder seguir avanzando en la investigación. Nos permiten no sólo investigar acerca de la etiología de la enfermedad, sino que también facilitan el desarrollo de nuevos agentes neuroprotectores o estrategias terapéuticas. Un modelo experimental debe reproducir la mayoría, y si es posible, todas las características de la enfermedad en humanos²¹

Los modelos *in vitro* proporcionan una importante herramienta para investigar los mecanismos moleculares y bioquímicos implicados en los procesos tóxicos, y son muy útiles para llevar a cabo estudios que son difíciles de realizar en los modelos *in vivo*, en donde influyen múltiples factores ²². Los modelos *in vitro* deben representar lo más cercanamente posible el sistema *in vivo* que es objeto de estudio ^{22,23}.

Casi todos los modelos experimentales inducidos por neurotoxinas afectan principalmente a la mitocondria alterando el metabolismo energético ²⁴ y algunos con acción específica sobre los complejos I y III de la cadena transportadora de electrones ²⁵.

PARKINSONISMO INDUCIDO POR NEUROTOXINAS

El uso de los modelos de la EP inducidos por toxinas ha sido de gran ayuda en la comprensión molecular de la enfermedad. Estos modelos no sólo han proporcionado información invaluable sobre la etiología y patogenia de la EP, sino también sobre los factores bioquímicos y los procesos celulares. El uso de neurotoxinas es particularmente preferido, ya que pueden reproducir la muerte neuronal selectiva tanto *in vitro* como *in vivo* ²⁶.

Entre las toxinas más usadas que inducen la degeneración de las neuronas dopaminérgicas destacan la 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA), 1-metil-4-fenil-1, 2, 3, 6-tetrahidropiridina/1-metil-4-fenil-piridina (MPTP/MPP⁺), reserpina, rotenona y paraquat ²⁷. Sin embargo, todas estas toxinas tienen diferentes mecanismos de acción para causar la lesión citotóxica de las neuronas dopaminérgicas ^{24,28}.

6-HIDROXIDOPAMINA (6-OHDA)

La 6-OHDA (Figura 4) es la neurotoxina más ampliamente utilizada en el desarrollo de modelos experimentales de la EP en roedores. Se ha observado que al ser administrada por vía sistémica es capaz de destruir a las neuronas adrenérgicas de los ganglios simpáticos²⁵. Por otra parte, si se inyecta de manera intracerebral por medio de cirugía estereotáxica²⁹ produce una destrucción selectiva de neuronas catecolaminérgicas^{25,29}. Ha sido usada como una neurotoxina catecolaminérgica por más de 30 años. Es un análogo hidroxilado de la DA y debido a esta similitud estructural muestra una alta afinidad por los transportadores catecolaminérgicos de membrana; como los transportadores de DA y norepinefrina. Esto permite generar el daño de ambos tipos neuronales, dopaminérgico y noradrenérgico³⁰.

Una vez dentro de la célula, la 6-OHDA se acumula dentro del citosol y causa EO, dañando a las neuronas y destruyendo las terminaciones nerviosas adrenérgicas. Además, inhibe el complejo I mitocondrial y juega un papel importante en la producción de ERO, ya que se oxida fácilmente formando paraquinona y peróxido de hidrógeno (H₂O₂)²¹.

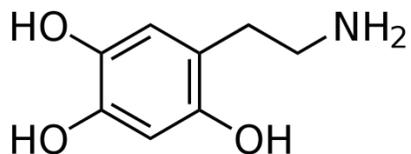


FIGURA 4 Estructura química de la 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA).

En resumen, el modelo de la 6-OHDA induce las condiciones clínico-patológicas agudas y progresivas crónicas de la EP. Ha demostrado ser un modelo útil para estudiar nuevas estrategias neuroprotectoras. La principal limitación de este modelo es su restringida

penetración a través de la barrera hematoencefálica, por lo que en los modelos *in vivo* debe ser administrado directamente en el parénquima³¹. A pesar de esto, muchos de los cambios moleculares causados por la 6-OHDA son similares a los observados en la EP, por lo que resulta útil en la exploración de los mecanismos moleculares de neurodegeneración²¹.

MPTP

La 1-metil-4-fenil-1, 2, 3, 6 tetrahidropiridina (MPTP) (Figura 5) es un derivado meperidínico. Se descubrió su capacidad de inducir un síndrome similar a la EP cuando en un grupo de heroinómanos, que de forma accidental se inyectaron esta sustancia, se observó que mostraban un síndrome parkinsoniano indistinguible en semiología a la EP³². Además, la sintomatología era revertida al administrarse levodopa o agonistas dopaminérgicos³³. Posteriormente, al administrarlo a animales de laboratorio y principalmente a primates no humanos, se comprobó que producía un síndrome parkinsoniano, en el que los trastornos motores se debían a la destrucción selectiva de las neuronas dopaminérgicas en la *SNpc*³⁴.

La neurotoxicidad del MPTP se basa en cambios neuroquímicos que se caracterizan por una reducción de la concentración de DA y de sus metabolitos (ácido 3,4 dihidroxifenilacético y ácido homovanílico), además de una disminución de la enzima tirosina hidroxilasa y una alteración en la densidad de los receptores de DA³⁵.

El MPTP se usa de forma rutinaria como modelo experimental debido a su capacidad de inducir los síntomas de la EP cuando se administra por vía intravenosa³⁶. Es una molécula altamente lipofílica y cruza con facilidad la barrera hematoencefálica³⁷. Una vez que la ha

atravesado, se convierte en 1-metil-4-fenil-2, 3-dihidropiridina (MPDP⁺) por acción de la monoamino oxidasa B (MAO-B) en las células no dopaminérgicas (serotoninérgicas y gliales)³⁸.

Se cree que la muerte neuronal inducida por MPTP se origina en la producción interneuronal de ERO y otros radicales libres citotóxicos producidos durante la oxidación intracelular del MPP⁺, sobre todos si estos radicales libres exceden la capacidad que tiene la célula para neutralizarlos³⁹.

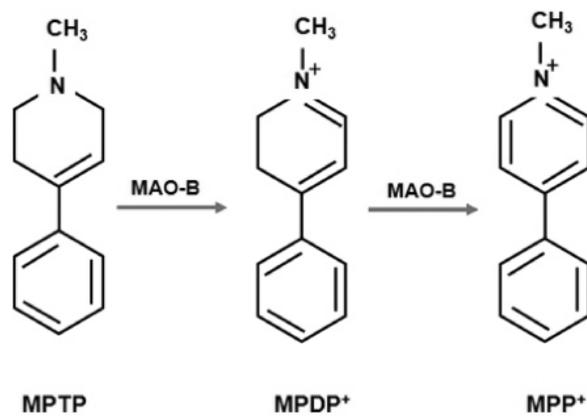


FIGURA 5. Estructura química del 1-metil-4-fenil-1, 2, 3,6 tetrahidropiridina (MPTP).

ROTENONA

La rotenona (Figura 6) es un pesticida y piscicida orgánico que se extrae de las raíces de algunas plantas tropicales de los géneros *Lonchocarpus* y *Derris*. Es altamente liposoluble por lo que es fácil su transporte a través de la membrana celular y otras barreras biológicas⁴⁰.

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 con la consecuente generación de ERO como el anión superóxido, incrementando con esto el EO⁴¹. Existen otros mecanismos subyacentes que se han reportado para la rotenona, como la despolimerización de los microtúbulos y la acumulación de especies reactivas de DA y ERO en cultivos primarios de mesencéfalo⁴².

Inicialmente, el uso de la rotenona en modelos experimentales se enfocó principalmente en demostrar la teoría de la relación entre la EP y la disfunción mitocondrial. Posteriormente, se utilizó en modelos *in vivo* para reproducir la patología y probar nuevos fármacos con potencial para tratar la EP⁴³.

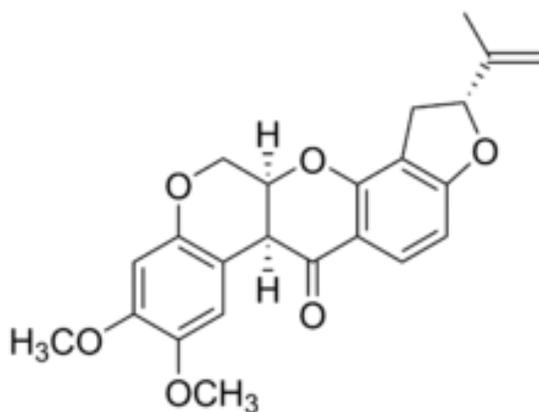


FIGURA 6. Estructura química de la rotenona.

PARAQUAT

EL paraquat (dicloruro de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilo) (Figura 7), es un herbicida de nitrógeno cuaternario del tipo bipiridilo, que es ampliamente utilizado en la agricultura para el control de maleza ⁴⁴. Comenzó a usarse en los años 60's, pero en ese tiempo no se tenía el suficiente conocimiento sobre el alto índice de toxicidad que presenta sobre el ser humano ⁴⁵. Fue hasta hace relativamente poco que se relacionó su uso con la etiología de la EP, incluso cuando desde los 80's se tuvieron reportes de casos de intoxicación aguda y muertes ocasionadas por paraquat ⁴⁶. Esta correlación se dio cuando se comparó su similitud estructural con la del MPP⁺, y se pensó entonces que podían compartir la misma farmacodinamia ⁴⁵.

Recientemente, se ha demostrado de manera experimental que el paraquat produce cambios subcelulares relacionados a la EP, como lo son: un aumento en la producción de las ERO, agregados proteicos de α -sinucleína y subsecuente formación de cuerpos de Lewy, lo que ocasiona el cuadro clínico característico de la EP ⁴⁷.

El mecanismo de toxicidad del paraquat aún no está bien definido. Algunos estudios sugerían que por su similitud al MPP⁺, la muerte de las células dopaminérgicas podía deberse a una inhibición del complejo I mitocondrial ⁴⁸. Sin embargo, la evidencia de que la delección del complejo I mitocondrial no protege a las neuronas dopaminérgicas de la muerte mediada por paraquat, contradice esta teoría ⁴⁹. Es por eso que el estrés oxidativo, independiente de la inhibición del complejo I mitocondrial, se sugiere como un mecanismo crítico en la citotoxicidad de este herbicida ^{49, 50}.

El paraquat, en su estado de catión divalente (PQ^{++}), puede entrar en un ciclo redox en la microglia a través de la NADPH oxidasa y la óxido nítrico sintasa (NOS). Como resultado, se genera un catión monovalente (PQ^+) junto con la producción del anión superóxido, llevando a la célula a un estado nocivo de estrés y citotoxicidad. El PQ^+ es reconocido por el transportador de DA (TAD) y se acumula en las neuronas dopaminérgicas, con la subsecuente formación de más anión superóxido y especies reactivas de DA por el establecimiento de nuevos ciclos redox intracelulares, lo que conlleva a la neurotoxicidad dopaminérgica ⁵⁰.

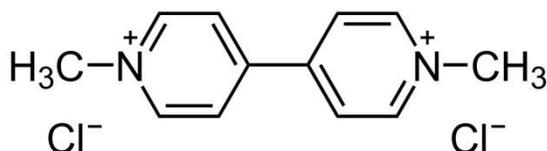


FIGURA 7. ESTRUCTURA QUIMICA DEL PARAQUAT

ESTRÉS OXIDATIVO

El cuerpo humano mantiene un balance de óxido-reducción constante, preservando el equilibrio entre la producción de pro-oxidantes, que se generan como resultado del metabolismo celular, y los sistemas de defensa antioxidante. La pérdida en este balance de óxido-reducción lleva a un estado de EO ⁵¹.

El concepto de estrés oxidativo se introdujo en la investigación de biología y medicina en 1985 ⁵², por definición se dice que el EO es “Un desequilibrio entre oxidantes y

antioxidantes en favor de los oxidantes, lo que conduce a una interrupción de la señalización redox y daño molecular”⁵³.

Todas las células tienen varios mecanismos antioxidantes de defensa, diseñados para mantener la homeostasis en respuesta a factores de estrés oxidativo. Las ERO y las especies reactivas de nitrógeno (RNS) representan una amplia gama de moléculas químicamente definidas, las cuales se producen durante procesos enzimáticos y no enzimáticos en todas las células, entre ellas podemos encontrar el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), oxígeno singlete (1O_2), hidroxilo (OH^{\cdot}), H_2O_2 , peroxilo (RO_2^{\cdot}), ozono (O_3), alcoxilo (RO^{\cdot}), anión peroxinitrito ($ONOO^-$), hidroperoxilo (HO_2^{\cdot}), ácido hipocloroso ($HOCl$), y ácido hipobromoso ($HOBr$), entre otras⁵⁴. Las ERO y ERN tienen papeles vitales en muchos procesos biológicos, incluyendo crecimiento celular, señalización, respuestas inmunes, síntesis de moléculas biológicas, entre otras⁵⁵. El balance entre la producción de ERO y los sistemas antioxidantes puede alterarse en distintas magnitudes. En el EO leve las defensas antioxidantes, como son la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GRs), glutatión S-transferasa (GST), tiorredoxinas (Trx) y peroxirredoxinas (Prxs)⁵⁴, aún son suficientes para restablecer dicho balance. Sin embargo, si el estatus oxidativo permanece o se agrava, se producen alteraciones severas en el metabolismo celular. Dentro de estas alteraciones se incluyen rupturas en las cadenas de ADN, aumento en la concentración del calcio intracelular, descompartmentalización de Fe^{+2} y Cu^{+2} catalíticos, daño a las membranas y transporte de iones y proteínas específicas, así como la peroxidación de lípidos. El daño por EO, puede revertirse o no dependiendo de diversos factores como el tiempo de exposición al

estrés, la funcionalidad de los sistemas antioxidantes, la edad celular, condiciones nutricionales y factores genéticos^{56,57,58}.

Todos los organismos tienen la capacidad de adaptarse al EO, lo cual puede ser llevado a cabo por un aumento en los niveles de enzimas antioxidantes y chaperonas moleculares⁵⁹. De manera fisiológica, las ERO están involucradas en vías de señalización mediadas por los grupos tioles de las proteínas que tienen el potencial de regular la transcripción, como por ejemplo la vía de señalización NF-κB, la cascada de MAPK y la vía PI3K-Akt^{60,61}.

Existe relación entre la presencia de niveles elevados de EO y el desarrollo de muchas condiciones fisiopatológicas y diversas enfermedades, incluyendo el cáncer, diabetes, aterosclerosis, obesidad, enfermedades cardiovasculares y enfermedades neurodegenerativas. Aunque aún no está claro si las especies reactivas contribuyen iniciando el proceso patológico o son una causa del mismo⁶².

El cerebro humano es responsable del consumo del 20% del oxígeno en el cuerpo humano, y por lo tanto, está sometido a niveles altos de ERO derivadas del metabolismo^{63, 64}. Una creciente cantidad de evidencia sugiere que el EO está implicado en la etiología y patogénesis de los trastornos neurodegenerativos⁶⁵. El cerebro es rico en ácidos grasos poli-insaturados, por lo tanto, es altamente susceptible a la peroxidación lipídica, un proceso complejo que implica la interacción de los ácidos grasos con los radicales libres dando lugar a la generación de aldehídos reactivos electrófilos. Esta peroxidación lipídica ocurre en muchas de las enfermedades neurodegenerativas⁶⁶. La evidencia del EO en estas enfermedades se apoya además en el aumento de la oxidación de las bases del ADN

y ARN, y el daño oxidativo que sufren las proteínas en ciertas regiones del cerebro ⁶⁷. La destrucción de algunos componentes de la célula induce una diversidad de respuestas a través de la generación de especies reactivas secundarias, y finalmente conduce a la muerte celular por apoptosis o necrosis ⁶⁸⁻⁷⁰. La mitocondria es el principal centro de producción de ERO. Cerca del 90% del consumo de oxígeno en los mamíferos es mitocondrial, esto hace a la mitocondria particularmente importante en las neuronas debido a su alta demanda de energía ⁷¹. Este hecho junto con la observación de que la disfunción mitocondrial ocurre en muchas enfermedades neurodegenerativas, sugiere que las enfermedades neurodegenerativas son enfermedades mitocondriales ⁶⁹.

La asociación más concluyente entre la EP y el EO está apoyada por el aumento de la actividad oxidativa y el daño en las macromoléculas, lo cual se ha observado en las neuronas dopaminérgicas en la *SNpc* en estudios post-mortem de cerebros de pacientes con EP ^{72, 73}.

AUTOFAGIA

La autofagia es un proceso de degradación y reciclaje celular altamente conservado en todas las células eucariotas ⁷⁴. Es muy importante para el equilibrio energético en puntos críticos del desarrollo o en respuesta a una depleción de nutrientes ⁷⁵. Participa también en la limpieza y la eliminación de proteínas mal plegadas o agregados de las mismas, además del aclaramiento de organelos dañados como mitocondrias, retículo

endoplásmico y peroxisomas, así como también la eliminación de patógenos intracelulares⁷⁶.

El desencadenante típico de la autofagia es la inanición o privación de nutrientes; en este escenario, la falta de cualquier nutriente esencial conduce a la inducción de la autofagia⁷⁷. Asimismo, la autofagia se activa en muchos casos de estrés metabólico y terapéutico, como la falta de factores de crecimiento, la inhibición de la señal de la vía metabólica PI3K/Akt/mTOR, la isquemia-reperfusión, la acumulación de calcio intracelular y el estrés del retículo endoplásmico^{78,79}.

Existen tres tipos de autofagia: microautofagia, autofagia mediada por chaperonas (CMA; sólo en mamíferos), y macroautofagia. Estas vías tienen en común la entrega de los productos a degradar a los lisosomas, aunque difieren en la forma en la que estos sustratos son llevados al compartimento lítico. Durante la microautofagia el contenido citosólico es secuestrado por una pequeña invaginación de la membrana del lisosoma que se pincha hacia la luz⁸⁰. Por otro lado, en la CMA, las proteínas que van a ser degradadas exponen el motivo pentapeptídico KFERQ, que funciona como secuencia señal para ser reconocidas por proteínas de choque térmico (HSPA8/HSC70), que a su vez se unen a la proteína de membrana asociada al lisosoma 2A (LAMP2A)⁸¹. Las proteínas marcadas son entonces desplegadas y trasladadas a la luz lisosomal donde se degradan⁸². La forma mejor caracterizada de la autofagia es la macroautofagia, cuya característica principal es el secuestro de los componentes citosólicos a partir de una doble membrana denominada fagóforo. El fagóforo puede provenir de diversas fuentes, incluyendo el retículo endoplásmico⁸³, compartimento intermedio del retículo endoplásmico-Golgi⁸⁴,

membrana plasmática ⁸⁵, endosomas reciclados, el complejo de Golgi ⁸⁶ y gotitas lípidicas ⁸⁷. El fagóforo se expande para engullir el contenido a degradar, como agregados protéicos, organelos y ribosomas, secuestrando de esta forma el contenido citoplasmático en una vesícula de doble membrana llamada autofagosoma ⁸⁸. Los autofagosomas maduros son transportados a lo largo de los microtúbulos, para finalmente fusionarse con los lisosomas, promoviendo la degradación del contenido citoplasmático por las proteasas ácidas lisosomales. Permeasas y transportadores lisosomales exportan los aminoácidos y otros subproductos de la degradación de nuevo al citoplasma, donde la célula puede reutilizarlos para la construcción de nuevas macromoléculas o incluirlos en alguna ruta metabólica ^{89, 90}.

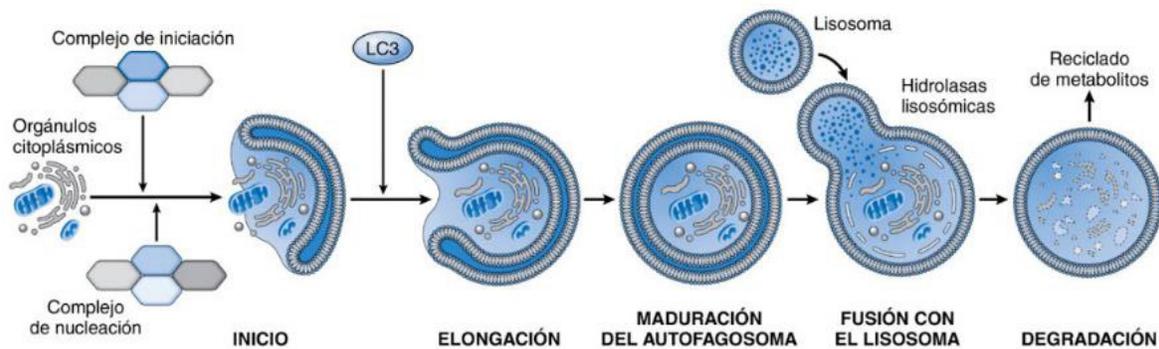


FIGURA 8. Flujo de la autofagia. La autofagia comienza con el aislamiento de un segmento de doble membrana denominado fagóforo, el cual se elonga hasta encerrar a los productos a ser degradados. Posteriormente, madura y se fusiona con un lisosoma, donde hidrolasas ácidas degradan los productos secuestrados, mientras que los subproductos son regresados al citoplasma para ser reciclados por la célula.

La maquinaria central del proceso de autofagia consta de 17 proteínas relacionadas a la autofagia (ATG). Las proteínas ATG son reclutadas al sitio de formación del autofagosoma de una manera jerárquica y funcionan formando diversos complejos de proteínas como: a)

un complejo multiprotéico organizado alrededor de ULK1 (unc-51-like autophagy activating kinase 1) así como de FIP200 (RB1-inducible coiled-coil 1, o RB1CC1), ATG13 y ATG101⁹¹, éstas dos últimas proteínas dan estabilidad a ULK1 para que pueda iniciarse la autofagia y para el reclutamiento de los siguientes complejos en el sitio de aislamiento del fagóforo⁹²; b) un segundo complejo que se encarga de la fase de nucleación del autofagosoma e involucra la proteína de clasificación vacuolar 34 (VPS34, también conocida como fosfatidilinositol 3-quinasa Clase III, subunidad catalítica 3 o PIK3C3), Beclina 1 (BECN1) y la molécula activadora de autofagia regulada por Beclina 1 (AMBRA1, por sus siglas en inglés, activating molecule in Beclin1-regulated autophagy), la actividad de ésta última depende de la fosforilación por ULK1 y puede ser bloqueada por señales inhibitoras de miembros anti-apoptóticos de la familia de proteínas Bcl-2⁷⁴; c) dos proteínas transmembrana, ATG9 y VMP1, que circulan entre el aparato de Golgi, los endosomas y los autofagosomas; d) el sistema tipo ubiquitina (UBL) Atg12-Atg5-Atg16 que acopla de forma covalente a Atg8/LC3/GABARAP a las membranas autofágicas, lo cual es necesario para la biogénesis del autofagosoma. Este complejo protéico tiene una doble función en el sentido de que contribuye a la maduración del fagóforo e interactúa con adaptadores de autofagia selectiva para facilitar el secuestro del sustrato. Por último, f) varios complejos protéicos tipo SNARE promueven la fusión entre autofagosomas maduros y lisosomas⁹³.

RELEVANCIA DE LA AUTOFAGIA Y EL ESTRÉS OXIDATIVO EN EL SISTEMA NERVIOSO

El sistema nervioso de los mamíferos requiere de la autofagia para su desarrollo, función y homeostasis normales, ya que se ha comprobado que la delección ubicua de los genes relacionados a la autofagia es letal en el embrión ⁹⁴. Se ha observado que la ausencia específica, en el sistema nervioso central, de algunos de estos genes relacionados a la autofagia provoca deficiencia neuronal y glial, acumulación de agregados protéicos, y aparición temprana de enfermedades neurodegenerativas ⁹⁵⁻⁹⁹.

Por otro lado, se ha demostrado que la desregulación de la autofagia lleva a un estado de EO en algunos órganos ¹⁰⁰. Además, la interrupción de la vía de autofagia también conduce a la acumulación de proteínas ubiquitinadas, aumento de ERO y mitocondrias disfuncionales ¹⁰¹. Los modelos de ratón manipulados genéticamente, donde se evaluaron ratones deficientes de Atg7 ⁹⁶ y Atg5 ⁹⁵ de manera condicional en el sistema nervioso central, han demostrado que la autofagia es esencial para la integridad mitocondrial y la depuración de proteínas intracelulares. De forma interesante, se ha observado que la deficiencia de Atg7 específicamente en fibroblastos embrionarios de ratón (MEF, por sus siglas en inglés, mouse embryonic fibroblasts) y células pancreáticas, conlleva a un incremento en los niveles de ERO, las cuales disminuyen ante la presencia de antioxidantes ¹⁰².

Las ERO han sido reportadas múltiples veces como inductores tempranos de la autofagia ¹⁰³⁻¹⁰⁸. Se ha demostrado que el $O_2^{\cdot-}$ es una de las principales ERO implicadas en

la inducción de autofagia, se induce por privación de glucosa, glutamina, piruvato y suero, mientras que la ausencia de aminoácidos y suero incrementa la producción tanto de $O_2^{\cdot-}$ como de H_2O_2 , que a su vez inducen autofagia¹⁰⁸. Por otro lado, se ha observado que el H_2O_2 oxida e inactiva a la proteína HsAtg4B, la cual es esencial para la conjugación de LC3-II al autofagosoma, mientras que al ser reducida se reactiva y deslipida a LC3, permitiendo su reciclaje, por lo que esta modificación postraduccional regula la autofagia^{107,109,110}.

Puede entonces decirse que la autofagia se inicia con el fin de proveer energía y materia prima para la construcción de macromoléculas con el fin de restaurar y mantener la homeostasis, y concomitantemente, eliminar el daño oxidativo. Por lo tanto, cualquier disfunción o bloqueo en el flujo de ésta puede involucrar un estado patológico de EO y/o alteraciones en la demanda metabólica^{111, 105}.

Aunque se han postulado una serie de mecanismos subyacentes a la interacción íntima entre el EO y la autofagia, hasta la fecha sólo algunos han sido descrito, como la inducción de autofagia por ERO y la relación de la deficiencia en la autofagia con la aparición de enfermedades neurodegenerativas^{112, 113}. La comprensión de la regulación molecular de la autofagia y su efecto sobre la producción de las ERO y el EO puede proporcionar información valiosa que será útil como blanco terapéutico de las enfermedades neurodegenerativas.

INDUCCIÓN FARMACOLÓGICA DE LA AUTOFAGIA

La acumulación de evidencias ha señalado la importancia y el papel funcional de la autofagia en diversas enfermedades humanas como el cáncer, obesidad, diabetes, enfermedades cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas, con pobre pronóstico en enfermedades infecciosas y autoinmunes ¹¹⁴. Es por eso, que ha surgido un gran interés por el desarrollo de agentes reguladores de la autofagia para la prevención o el tratamiento de enfermedades en las que se cree que la regulación de ésta es clínicamente beneficiosa ¹¹⁵.

A la fecha, se han identificado diversos inductores de autofagia como la carbamacepina, litio, metformina, rimelidina, valproato de sodio, estatinas y rapálogos ¹¹⁵, de estos últimos, la rapamicina es el más utilizado y mejor caracterizado. La rapamicina es un fármaco aprobado por la FDA (por sus siglas en inglés, Food and Drug Administration), usado como tratamiento inmunosupresor durante los trasplantes ¹¹⁶. Su mecanismo de acción como inductor de autofagia es a través de la inhibición de mTOR (por sus siglas en inglés, mammalian target of rapamycin). La proteína mTOR es una quinasa atípica que controla el crecimiento y el metabolismo en respuesta a modificaciones en las concentraciones de nutrientes, factores de crecimiento y niveles de energía, y con frecuencia su desregulación se asocia a enfermedades neurodegenerativas y ciertos tipos de cáncer ¹¹⁷. Como su nombre lo indica, el descubrimiento de mTOR está íntimamente ligado al descubrimiento de la rapamicina, la cual es un metabolito secundario de la

bacteria *Streptomyces hygroscopicus*. Esta bacteria fue aislada por primera vez en 1970 a partir de muestras de suelo recogidas en la Isla de Pascua ¹¹⁸.

El complejo mTOR 1 (mTORC1), está formado por mTOR, además de la proteína reguladora de mTOR (Raptor), mLST8 (del inglés, mammalian lethal with SEC13 protein 8) y PRAS40 (del inglés, proline-rich AKT substrate of 40 kDa) ¹¹⁷, y juega un papel central en el mantenimiento de la homeostasis y deterioro de la misma en el envejecimiento ¹¹⁹. Es por eso que la inhibición del mTORC1 se ha relacionado con un aumento en la expectativa de vida ¹²⁰. Además, como se mencionó previamente, se ha observado que la inducción de autofagia protege a las neuronas de daños causados por neurotoxinas y agregados protéicos tanto *in vitro* como *in vivo* en modelos experimentales de la EP ^{121,122,123}. Se ha demostrado que el paraquat tiene un efecto inhibitorio sobre la autofagia. Asimismo, la inhibición de la autofagia con un dominante negativo de ATG5 incrementa la muerte celular inducida por paraquat, mientras que su estimulación con rapamicina la disminuye, lo cual confirma que la autofagia tiene un papel de protección en respuesta a estas neurotoxinas en células con fenotipo dopaminérgico ¹²³. Recientemente, se demostró que la inducción del mecanismo de autofagia ejerce un efecto neuroprotector en un modelo *in vivo* de la EP inducido por paraquat. Además, la autofagia previno la activación de la microglía inducida por paraquat y disminuyó la acumulación de las proteínas α -sinucleína y ubiquitina. Sin embargo, aún no se ha determinado si el efecto neuroprotector de la autofagia en el modelo experimental de la EP inducido con paraquat es mediado por la regulación del sistema redox, lo cual es esencial para tener una mejor comprensión de su mecanismo de acción y facilitar el desarrollo de estrategias terapéuticas.

Por lo tanto, el presente estudio se centra en el análisis del efecto de la inducción de la autofagia, específicamente sobre el EO y la apoptosis en un modelo celular de la EP inducido con el herbicida paraquat.

JUSTIFICACIÓN

La enfermedad de Parkinson (EP), es una enfermedad neurodegenerativa discapacitante, para la cual sólo existe tratamiento paliativo pero no curativo, y su etiología aún se desconoce. Se sabe que la alteración de la *autofagia* y el incremento del *estrés oxidativo* están implicados en el desarrollo de la EP. Teniendo como evidencia, en modelos experimentales de la EP, que la inhibición de la autofagia incrementa la neurodegeneración y su inducción la disminuye, es importante determinar el papel del *sistema redox* en el efecto *neuroprotector* de la *autofagia*, lo cual facilitará el diseño y desarrollo de nuevos tratamientos contra esta enfermedad.

OBJETIVO GENERAL

Analizar el sistema redox en el mecanismo neuroprotector de la autofagia.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar si la inducción de autofagia disminuye el estrés oxidativo en el citoplasma.
2. Evaluar si la inducción de autofagia modifica los niveles y/o el estatus oxidativo de las enzimas antioxidantes peroxirredoxinas.
3. Determinar si la inducción de autofagia disminuye la apoptosis inducida por estrés oxidativo.

MATERIAL Y EQUIPO

Línea celular

- SH-SY5Y (ATCC® CRL-2266™); aislada de una biopsia de médula ósea de neuroblastoma metastásico.

Cultivo celular

- Medio Eagle Modificado de Dulbecco F12 (Gibco, 11320033)
- Tripisina EDTA 0.25% (Gibco, 25200072)
- Suero fetal bovino (Corning 35-010-cv)
- Penicilina-streptomina (Corning 30-004-C1)
- Dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma C6164)
- Azul Tripano
- Cámara de Neubauer 0.100 mm de profundidad (Marienfeld Germany)

Anticuerpos

- Anticuerpo anti-PrxSO₃ (Abcam, ab16830)
- Anticuerpo β-actina (SIGMA-ALDRICH, A5060)
- Anticuerpo anti-conejo (Santa Cruz Biotechnology, sc-2004)
- Anticuerpo fluorescente anti-conejo (Abcam Goat pAb to Rb IgG Alexa Fluor 594, Ab150077)

Reactivos

- Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Rockford, USA)
- VECTASHIELD® MOUNTING MEDIUM with DAPI Vector Laboratories H-1200
- Tritón X-100 (Sigma-Aldrich)
- Tween 20 (Sigma- Aldrich)
- N, N, N', N'- Tetrametiletilendiamina (TEMED) (Sigma-Aldrich)
- Coctel inhibidor de proteasas y fosfatasa (Halt Protease Inhibitor Cocktail, Thermo Scientific 78430)
- Acrilamida-bisacrilamida 40% (Bio-Rad)
- Paraquat (Acros Organics 227320010; Fulkar 36541)
- Rapamicina (R-500 LC Laboratories)
- Estaurosporina (S-9300 LC Laboratories)
- Dihidroetidio DHE (Life Technologies™)
- Calceína (Sigma C0875)
- Kit de SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific INC)
- Suero de caballo (16050130 Gibco)
- Kit Muse Annexin V & Dead Cell (Millipore, MCH100105)
- Calpain Activity Assay Kit (Abcam ab65308)

Soluciones

- Buffer de lisis celular RIPA 1X (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, SDS 0.1%, Triton X-100 0.25%)
- Buffer Tris Glicina SDS 1X (Tris Base 25 mM, Glicina 250 mM, SDS 0.1%)
- Buffer de transferencia 1X (Tris Base 25 mM, Glicina 192mM, Metanol 20%, pH 8.3)
- Buffer de empaquetamiento de proteínas 4X (0.5 M Tris-HCl pH 6.8)
- Buffer TBST 1X (Tris-HCl 20 mM, NaCl 137 mM pH 7.6, Tween 20 0.05%)
- Persulfato de amonio (PSA) 10%
- PBS 1X pH 7.4
- Ditiotreititol (DTT) 15% (Sigma- Aldrich)
- Leche libre de grasa 10% diluída en Buffer TBST 1X
- Dodecilsulfato sódico (SDS) 10%
- Tris-HCl 1.5 M pH 8.8
- Tris-HCl 0.5 M pH 6.8
- Tris-HCl 125 mM pH 6.8
- Albúmina de suero bovino 1% (BSA)
- Paraformaldehído PFA 4%

Material

- Pipetas serológicas de 20 ml, 10 ml y 5 ml (Corning)
- Cajas de cultivo celular 75 cm y 25 cm (Corning / Nest)
- Criotubos de 2 ml (Corning)

- Laminillas de 8 pozos (Chamber Slide™ Lab-Tek™ 177402)
- Platos de 60 mm (Corning 430166)
- Placas de 6 pozos (Corning 3335)
- Placas de 96 pozos (Corning)
- Viales de 2 ml, 1.7 ml y 0.65 ml
- Tubos de 50 ml y 15 ml (Falcon)
- Membrana de Polifluoruro de Vinilideno PVDF (GVS North America)

Equipo

- Micropipetas de 1000 µl, 200 µl, 20 µl y 10 µl
- Pipetor
- Campana de Seguridad nivel II
- Microscopio invertido
- Fuente de poder ENDURO (Labnet)
- Cámara vertical de electroforesis (Bio-Rad)
- Báscula analítica (AND)
- Vórtex (Daigger)
- Incubadora de ambiente húmedo con inyección de CO₂ (Thermo)
- Cámara de transferencia semihúmeda (Bio-Rad)
- Escáner de quimioluminiscencia para western blot (LI-COR)
- Centrífuga (Sigma 1 -15 K)
- Microcentrífuga refrigerada (Sigma 3-15K)

- Incubadora Orbital SHAKER (MRC)
- Fluorómetro (BioTek instruments Flx800TB)
- Ultrasonic Processor Fisher Scientific 505
- Microscopio de fluorescencia Leica
- Cámara adaptada Nikon Eclipse 50i
- Muse Cell Analyzer (Millipore, 0500-3115)

MÉTODOS

CULTIVO CELULAR

La línea celular dopaminérgica de neuroblastoma humano SH-SY5Y fue obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC CRL 2266). Las células fueron cultivadas en medio DMEM/F12 (GIBCO by Life Technologies 11330-032) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (Corning 35-010-cv), 100 unidades/ml de penicilina-estreptomina (Corning 30-004-C1), en una incubadora de ambiente húmedo a 37°C con inyección de 5% de CO₂. Las células fueron tratadas con paraquat a concentraciones de 0.1 a 1 mM por 24 horas (para los ensayos de estrés oxidativo) o 48 horas (para los ensayos de muerte celular). Como estimulador de autofagia se usó la rapamicina a una concentración de 10 nM, la cual fue añadida 1 hora antes de los tratamientos con paraquat. El paraquat (1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium dichloride) fue obtenido de Acros Organics (227320010) y Fulkar (36541), mientras que la rapamicina (R-500) y la estaurosporina (S-9300) (control positivo para los ensayos de muerte celular) fueron obtenidos de LC Laboratories.

DETECCIÓN DE ESTRÉS OXIDATIVO CON LA SONDA FLUORESCENTE DIHIDROETIDIO

Se sembraron 1.5×10^4 células por pozo en laminillas de 8 pozos (Chamber Slide™ Lab-Tek™ 177402) y se pre-trataron con rapamicina a 10 nM por 1 hora y paraquat a 0.5 nM por 24 horas adicionales. Se usó H₂O₂ a 20 mM durante 15 minutos como control positivo de estrés oxidativo. Después de la incubación con los tratamientos, se añadió en el medio de cultivo de cada uno de los pozos, la sonda fluorescente dihidroetidio (DHE Life

Technologies™) a una concentración de 5 mM y la calceína a una concentración de 5 μM (Sigma C0875), esta última como indicador de viabilidad celular, y se incubaron por 30 minutos a 37°C en oscuridad. Se retiró el medio con las sondas y se fijaron las células con PFA 4% por 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Posteriormente, se realizaron 2 lavados de 5 minutos cada uno con PBS 1X. Se añadieron 5 μl del medio de montaje en cada pozo (VECTASHIELD® MOUNTING MEDIUM with DAPI Vector Laboratories H-1200), se colocó un cubreobjetos y se observó en el microscopio de fluorescencia (Microscopio Leica), y se fotodocumentó con la cámara Nikon Eclipse 50i y el software Qimage Pro 7. El análisis de intensidad de fluorescencia de las micrografías se realizó con el Software Image J.

INMUNOFLUORESCENCIA

Se sembraron 1.5×10^4 células por pozo en laminillas de 8 pozos (Chamber Slide™ Lab-Tek™ 177402) y se pre-trataron con rapamicina a 10 nM por 1 hora y paraquat a 0.5 mM por 24 horas adicionales. Se usó H₂O₂ a 20 mM durante 15 minutos como control positivo de estrés oxidativo. Posteriormente, se retiró el medio de cultivo en el que fueron sembradas las células, se realizaron 2 lavados con PBS 1X de 5 minutos cada uno, y se fijaron con 500 μl por pozo de PFA 4% por 20 minutos. Después, se retiró el PFA y se hicieron dos lavados de 3 minutos cada uno, con PBS 1X + Tritón 0.1% para permeabilizar la membrana celular. Enseguida se bloquearon las células con suero de caballo 10% (16050130 Gibco) diluido en PBS 1X por una hora a temperatura ambiente. Inmediatamente después, se incubó con el anticuerpo primario anti-PrxSO₃ (Abcam ab16830) diluido 1:1000 por 12 horas a 4°C, se recuperó el anticuerpo primario y se

realizaron 2 lavados de 5 minutos con PBS 1X + Tritón 0.1%. Posterior a esto, se incubó con un anticuerpo secundario fluorescente anti-conejo (Abcam Goat pAb to Rb IgG Alexa Fluor 594 Ab150077) diluido 1:1000 por 2 horas a temperatura ambiente en oscuridad. Se retiraron las celdillas de la laminilla y se agregaron 5 µl de medio de montaje en cada pozo (VECTASHIELD® MOUNTING MEDIUM with DAPI Vector Laboratories H-1200). Se colocó un cubreobjetos, se observó bajo el microscopio de fluorescencia, se fotodocumentó y se realizó el análisis de intensidad de fluorescencia de las micrografías.

WESTERN BLOT

Las células fueron sembradas en platos de 60 mm (Corning 430166) a una densidad de 5×10^5 células/placa. Después de 24 horas de tratamiento las células fueron centrifugadas a 300 g y lisadas en el buffer RIPA, del inglés radio immunoprecipitation assay (Tris 50mM, NaCl 150 mM, SDS 0.1%, Tritón X-100 0.25%) con inhibidores de proteasas y fosfatasa (Halt Protease Inhibitor Cocktail, Thermo Scientific 78430). Las células se sometieron a sonicación (Ultrasonic Processor Fisher Scientific 505) por 30 segundos a 20 Hz, y se centrifugaron a 13,000 revoluciones por minuto por 5 minutos a 4°C. Se recolectó el sobrenadante y se desechó la pastilla. La cuantificación de proteínas se realizó usando el kit Pierce™ BCA Protein Assay, según las indicaciones del fabricante. Cantidades iguales de proteínas (entre 25 y 50 µg) se separaron por electroforesis SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 15%, para posteriormente ser transferidas a una membrana de PVDF (GVS North America) usando una cámara de transferencia semi-húmeda (Bio-Rad). Una vez transferidas las proteínas, la membrana fue bloqueada con leche libre de grasa al 10%, y se incubó con los anticuerpos primarios anti-PrxSO₃ (Abcam ab16830) diluido 1:1000 y

anti β -actina (SIGMA-ALDRICH A5060) diluido 1:1000, este último como control de carga, por 12 horas a 4°C. Se realizaron 3 lavados de 15 minutos cada uno con buffer TBST 1X. Posteriormente, se incubó con un anticuerpo secundario anti-conejo (Santa Cruz Biotechnology sc-2004) diluido 1:1000, y se incubó a temperatura ambiente por 2 horas. Después se realizaron tres lavados más con TBST1X, cada uno de 15 minutos y se reveló la membrana con el kit de SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific INC) siguiendo las instrucciones del fabricante. La membrana fue fotodocumentada con el escáner C-Digit (LI-COR) y el análisis para densitometría fue realizada con el Software Image J.

ENSAYO DE VABILIDAD CELULAR CON AZUL TRIPANO

Se sembraron 5×10^5 células en platos de 60 mm (Corning 430166) y se trataron como previamente se indica por 48 horas. La estaurosporina se usó a 50 nM como control positivo de muerte celular (S-9300 LC laboratorios). Después de 48 horas, se tomaron microfotografías de las células con el microscopio invertido. Posteriormente, se lavaron con PBS 1X y se tripsinizaron. Las células fueron teñidas usando azul tripano en una dilución 1:1, y se realizó la cuantificación de células viables con el contador automático TC20 (Bio-Rad).

ENSAYO DE ACTIVIDAD DE CALPAÍNAS

Para analizar la apoptosis mediada por calpaínas se evaluó la actividad endógena de las mismas. Para ello, se sembraron 5×10^4 células por pozo en placas de 6 pozos (Corning 3335) y se trataron con rapamicina, paraquat y estaurosporina a las concentraciones

mencionadas con anterioridad. Después de 48 horas, se cosecharon las células y se extrajeron las proteínas con el buffer de extracción incluido en el kit, se añadió el sustrato de calpaínas Ac-LLY-AFC, el cual emite una fluorescencia en el espectro del amarillo-verde ($\lambda_{\text{max}} = 505 \text{ nm}$). Se usó la calpaína I activa como control positivo y el inhibidor de la calpaína Z-LLY-FMK como control negativo. La fluorescencia emitida fue cuantificada usando un lector de fluorimetría (BioTek instruments Flx800TB). Los resultados se expresaron en unidades relativas de fluorescencia (URF).

EVALUACIÓN DE APOPTOSIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Se sembraron 5×10^4 células por pozo en placas de 6 pozos (Corning 3335) y se trataron con rapamicina, paraquat y estaurosporina a las concentraciones mencionadas con anterioridad. Después de 48 horas se evaluó la apoptosis usando el Kit Muse Annexin V & Dead Cell (Millipore, MCH100105) siguiendo las indicaciones del fabricante, y se analizó en el Muse Cell Analyzer (Millipore, 0500-3115).

En este ensayo se pueden identificar varias poblaciones celulares:

- Células Vivas: Annexina V (-) 7 AAD (-) (cuadrante inferior izquierdo)
- Células en apoptosis temprana: Annexina V (+), 7 AAD (-) (cuadrante inferior derecho)
- Células en apoptosis tardía/necrosis: Annexina V (+), 7 AAD (+) (Cuadrante superior derecho)
- Células en necrosis: Annexina V (-), 7 AAD (+) (Cuadrante superior izquierdo)

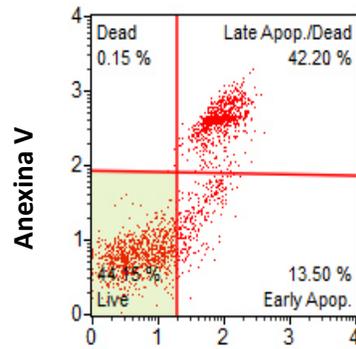


FIGURA 9. Plot representativo de la citometría de flujo. Con 7-AAD y Anexina V

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los experimentos fueron realizados en al menos tres repeticiones independientes. Los datos fueron analizados de acuerdo a los criterios estadísticos con la prueba de Tukey para muestras no paramétricas de comparación múltiple, usando el software Graphpad Prism 6. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo. Las micrografías e histogramas son representativas del estadístico entre las repeticiones.

RESULTADOS

LA INDUCCIÓN DE AUTOFAGIA DISMINUYE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN EL CITOPLASMA EN UN MODELO CELULAR DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

Para analizar el efecto de la autofagia sobre el estrés oxidativo, primero fue necesario el establecimiento de un modelo celular de la EP que reprodujera las características de estrés oxidativo, que se observan en las neuronas dopaminérgicas de los pacientes con dicha enfermedad. Para lograr este objetivo, se utilizó el herbicida paraquat a concentraciones desde 0.1 hasta 1 mM. Una hora antes de ser tratadas con paraquat, las células se pre-incubaron con el inhibidor de mTOR, la rapamicina, a una concentración de 10 μ M, con el fin de inducir la autofagia. Se usó el H₂O₂ a una concentración de 20 mM por 15 minutos como control positivo de estrés oxidativo en este ensayo. A las 24 horas después de los tratamientos se analizó el estrés oxidativo en el compartimento citoplasmático de las células SH-SY5Y, las cuales presentan un fenotipo dopaminérgico. Para esto, se usó la sonda fluorescente dihidroetidio (DHE), también llamada hidoetidina, la cual es un indicador de la presencia de ERO. Esta sonda emite una fluorescencia en el espectro del azul hasta que es oxidada en el citoplasma, y entonces emite una fluorescencia en el espectro del rojo. Se usó también la calceína, en particular su derivado acetoximetilado (AM) el cual no emite fluorescencia, éste es captado por las células a través de la membrana plasmática, una vez en el citoplasma las esterasas transforman la calceína AM en calceína la cual tiene un espectro de fluorescencia de 485 nm de excitación y 520 nm de emisión, por lo que funciona como un marcador de viabilidad celular¹²⁴.

Las células se analizaron bajo microscopía de fluorescencia usando el filtro rojo (λ excitación 488 nm, λ emisión 633 nm) para DHE, el filtro verde (λ excitación 485 nm, λ emisión 520 nm) para calceína, y el azul (λ excitación 358 nm, λ emisión 461 nm) para el marcador nuclear DAPI.

Como resultado, se pudo observar que tanto las células que no recibieron ningún tratamiento como las que recibieron sólo el inductor de autofagia, rapamicina, presentaron una intensidad de fluorescencia mínima correspondiente al estrés oxidativo basal (Figura 10). Por otro lado, las células que fueron tratadas con paraquat mostraron niveles de estrés oxidativo comparables al control positivo (H_2O_2), con un incremento de 6 y 9 veces, respectivamente, en comparación con el control. De forma interesante, al inducir la autofagia, el estrés oxidativo inducido por paraquat (rapamicina+paraquat) se disminuyó completamente, exhibieron una intensidad de fluorescencia muy similar a la observada en el control negativo.

La viabilidad celular analizada con calceína se mantuvo sin cambios significativos entre los diferentes tratamientos, ya que no se esperaba un aumento de la muerte a las 24 horas de tratamiento.

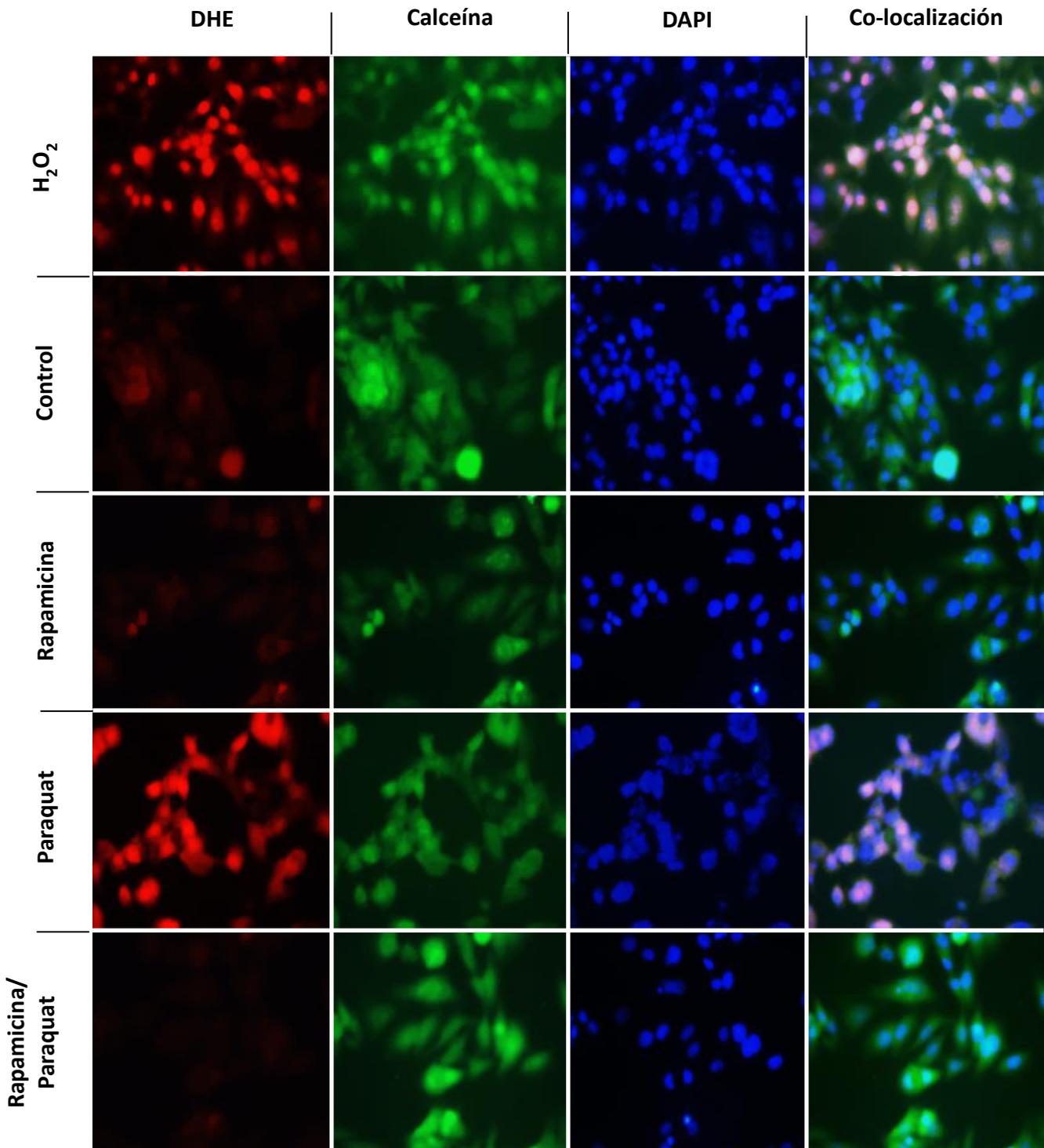


FIGURA 10. Disminución del estrés oxidativo citoplasmático generado por paraquat mediante la estimulación de la autofagia. Micrografías de fluorescencia representativas de al menos tres repeticiones independientes a una amplificación de 40X, de los tratamientos control, paraquat (0.5 mM), rapamicina (10 nM) y rapamicina+paraquat, usando como control positivo de estrés oxidativo el H₂O₂ (20mM). Para la detección del EO se utilizó la sonda fluorescente DHE (5mM rojo). La viabilidad celular fue evaluada con calceína (5μM, verde). Se utilizó DAPI como marcador nuclear (azul). También se muestra la co-localización de los marcadores fluorescentes.

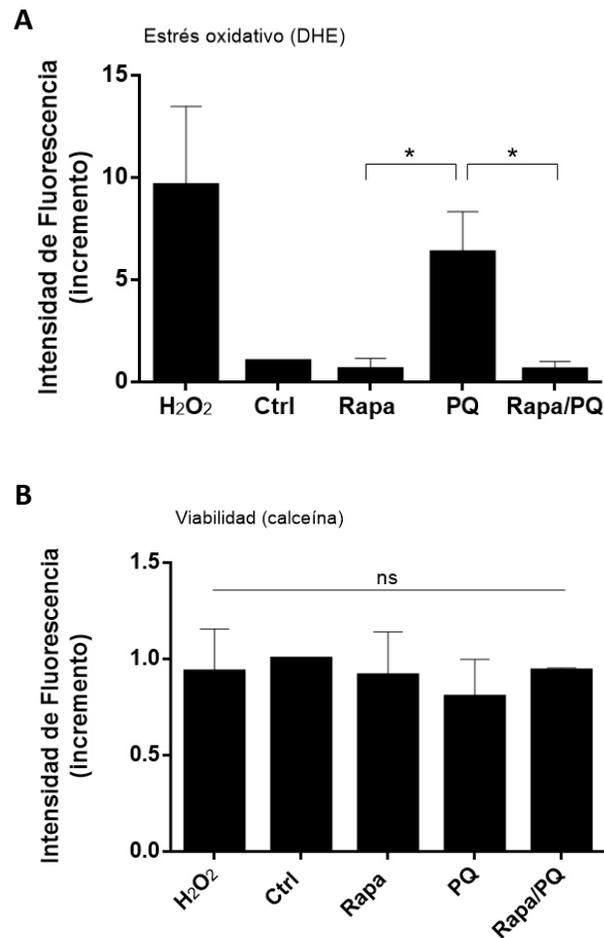


FIGURA 11. Comparación de la intensidad de la fluorescencia emitida en respuesta al estrés oxidativo generado por paraquat y a la inducción de autofagia. A partir de 3 micrografías obtenidas de campos aleatorios a una amplificación de 40X, se cuantificó la intensidad de la fluorescencia de A) DHE, y B) calceína, en cada uno de los tratamientos, mediante el software Image J. Se muestra la intensidad de la fluorescencia como un incremento normalizado con respecto al control. Se indica un diferencia estadísticamente significativa con una $*p \leq 0.05$; ns, diferencia no significativa.

LA INDUCCIÓN DE AUTOFAGIA DISMINUYE EL ESTADO DE HIPEROXIDACIÓN DE LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES PEROXIRREDOXINAS

Otra forma de determinar el impacto de la autofagia sobre el estrés oxidativo, es a través de la evaluación del estatus oxidativo de macromoléculas que son blancos de oxidación. Entre ellas se encuentran las peroxirredoxinas (Prxs), las cuales comprenden una familia de proteínas encargadas de catalizar la reducción de peróxidos como el H_2O_2 , peroxinitrito e hidroperóxidos orgánicos ¹²⁵. El mecanismo catalítico de estas enzimas consiste en la reducción de peróxidos mediante la oxidación del grupo tiol de un residuo de cisteína conservado (cisteína peroxidática, CysP) en las Prxs, originando un residuo de Cys-ácido sulfénico (Cys-SOH). La Cys-SOH puede reducirse de nuevo a su forma tiol una vez que se regulan los niveles de peróxidos. Si las condiciones oxidativas persisten, la Cys-SOH de las Prxs es blanco de una reacción de oxidación por una segunda molécula oxidante a Cys-ácido sulfínico (Cys-SO₂H), e incluso ésta a su vez puede ser hiper-oxidada a Cys-ácido sulfónico (Cys-SO₃H) ¹²⁶. Las Prxs hiper-oxidadas representan formas inactivas, por lo que reflejan un ambiente altamente oxidante ¹²⁷⁻¹²⁹.

Para evaluar el efecto de la estimulación de la autofagia sobre el estrés oxidativo inducido por paraquat, analizamos a las Prxs, que como se mencionó son proteínas antioxidantes susceptibles a oxidación. Para ello, células dopaminérgicas fueron tratadas con paraquat y rapamicina solos o en combinación como previamente se describe, y se usó el H_2O_2 como control positivo de estrés oxidativo. Después de 24 horas, se realizó una inmunofluorescencia con un anticuerpo específico para detectar la hiper-oxidación de las Prxs (PrxSO₃) y se utilizó DAPI como marcador nuclear.

Se observó que aquellas células que no recibieron ningún tratamiento o que sólo recibieron el inductor de autofagia no presentaron reactividad con el anticuerpo anti-PrxSO₃ o fue mínima, lo que indica los niveles basales de estrés oxidativo (Figura 12A). Sin embargo, las células que recibieron el tratamiento con paraquat presentaron una intensidad de fluorescencia comparable con el control positivo, con un incremento de 5 y 6 veces, respectivamente, en comparación con el control (Figura 12B), lo que indica un estado hiper-oxidado de las Prxs. Además, el estatus oxidativo de las Prxs inducido por paraquat fue revertido al estimular la autofagia con la rapamicina. Asimismo, estos resultados se confirmaron mediante western blot (Figura 12C), donde el mismo patrón fue observado, es decir, los niveles de PrxSO₃ fueron mayores en las células que recibieron el paraquat y disminuyeron al inducir la autofagia, lo cual soporta un papel protector de la autofagia contra el estrés oxidativo en el modelo de la EP.

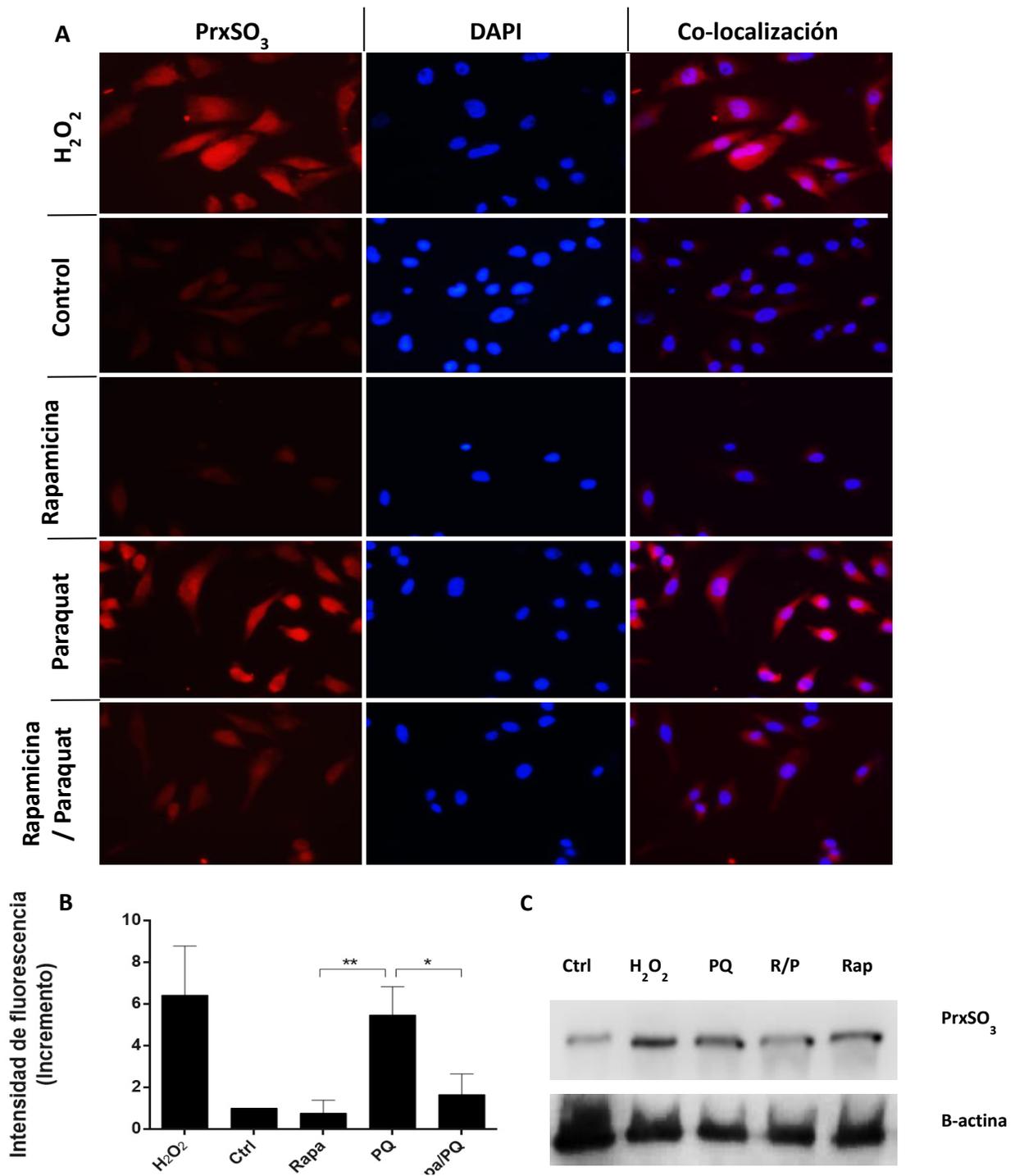


FIGURA 12. Efecto de la autofagia sobre el estatus oxidativo de las peroxirredoxinas inducido en el modelo de la enfermedad de Parkinson. A) Micrografías de fluorescencia representativas de los tratamientos control, paraquat (0.5 mM), rapamicina (10 nM) y rapamicina+paraquat, usando como control positivo de estrés oxidativo el H₂O₂ (20 mM). Para la detección de la forma hiper-oxidada de las Prxs se utilizó el anticuerpo específico anti-PrxSO₃ (rojo). Se utilizó DAPI como marcador nuclear (azul). También se muestra la co-localización de las fluorescencias. B) A partir de 3 micrografías obtenidas de campos aleatorios, se cuantificó la intensidad de la fluorescencia mediante el software Image J. Se muestra la intensidad de la fluorescencia como un incremento normalizado con respecto al control. Se indica un diferencia estadísticamente significativa con una *p ≤ 0.05p. C) Se confirmó el resultado de la inmunofluorescencia mediante western blot. Todos los ensayos se hicieron por triplicado de manera independiente.

LA INDUCCIÓN DE AUTOFAGIA DISMINUYE LA MUERTE MEDIADA POR PARAQUAT

Una vez evaluados los efectos de la autofagia sobre el estatus oxidativo citoplasmático y de algunas macromoléculas, se analizó el efecto protector de este mecanismo sobre la muerte mediada por el estrés oxidativo que es inducido al administrar el paraquat en los cultivos celulares. Las células fueron tratadas como previamente se describe. Como control positivo de muerte celular se utilizó la estaurosporina, que es un agente inductor de apoptosis^{130,131}. Después de 48 horas de incubación, se tomaron microfotografías en campo claro en un microscopio invertido a una amplificación de 40X (Figura 12). En las microfotografías se puede observar que el paraquat aumenta la muerte celular mediada por estrés oxidativo de manera dosis-dependiente, lo cual es evidenciado por la pérdida de la morfología normal de las células, las cuales se caracterizan por su forma ahusada, prolongaciones citoplasmáticas y adherencia. Cuando las células fueron tratadas con la rapamicina en combinación con el paraquat, mantuvieron su morfología normal así como su capacidad de adherencia, y además mostraron un incremento en la densidad celular. Posteriormente, las células fueron cosechadas y se realizó un ensayo de viabilidad con azul tripano, cuyo análisis se llevó a cabo en el contador automático TC-20. Las células viables con la membrana intacta fueron capaces de excluir el colorante, mientras que las células muertas lo captaron. En este ensayo, se observó una disminución en la viabilidad de las células tratadas con paraquat de manera dosis-dependiente, y cómo efectivamente ésta se recuperaba al inducir la autofagia (Figura 13). En particular, se puede destacar que el paraquat utilizado a una concentración de 0.5 mM induce un decremento de la

viabilidad celular de hasta un 50.4%, mientras que al estimular la autofagia en presencia de paraquat se incrementa a un 72.3%.

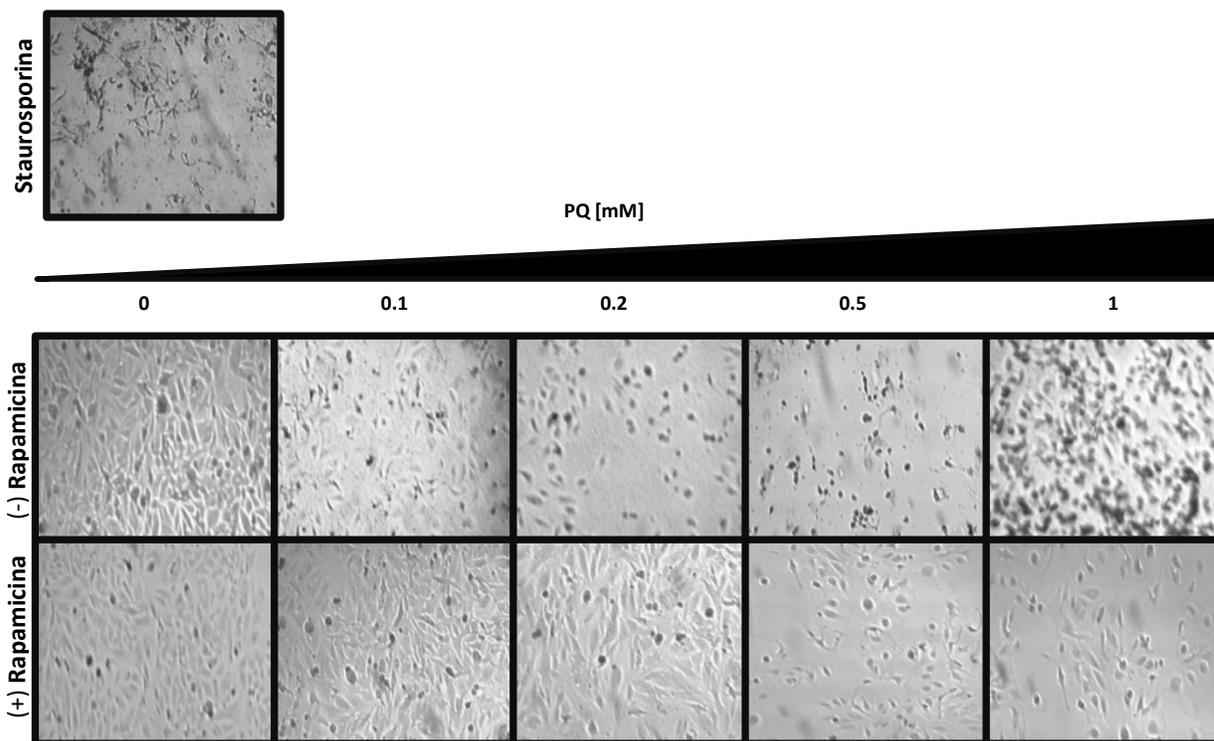


FIGURA 13. La muerte mediada por paraquat disminuye al inducir la autofagia. Las células fueron tratadas con paraquat a las concentraciones indicadas en ausencia o presencia de rapamicina (10 nM) durante 48 horas. Se usó estaurosporina como control positivo de muerte celular. Se muestran microfotografías de campo claro representativas (40X) de al menos tres repeticiones independientes.

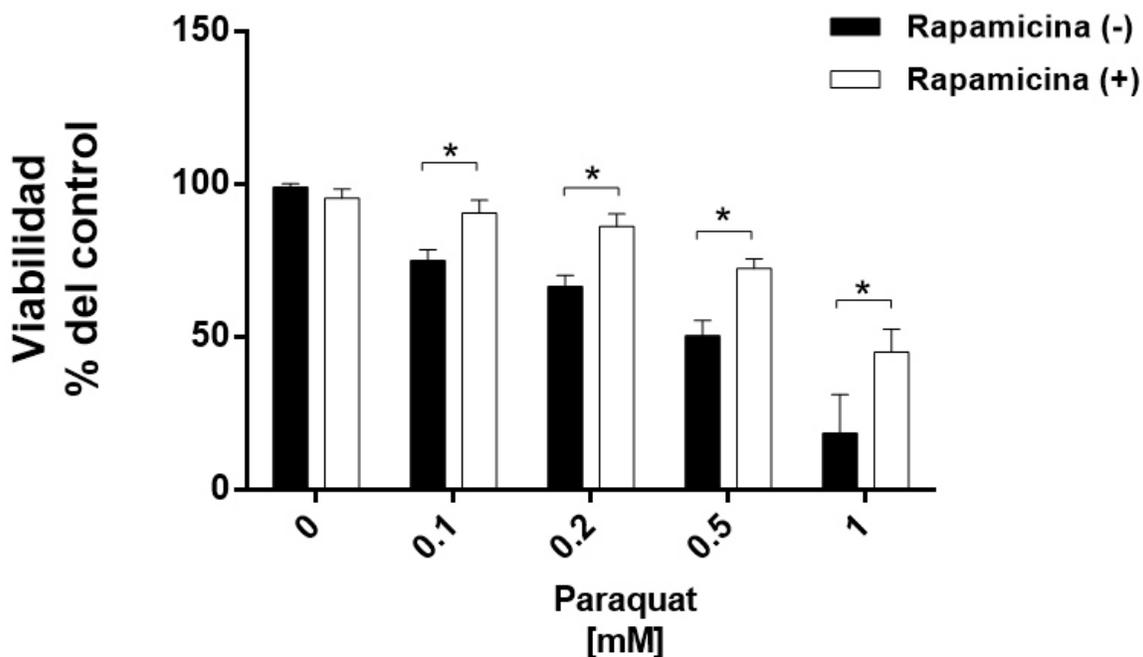


FIGURA 14. Protección de la muerte celular mediada por paraquat mediante la inducción de autofagia. Después de 48 horas de tratamiento (Figura 13), se realizó un ensayo de viabilidad por exclusión con azul tripano. Se indica la diferencia estadísticamente significativa de al menos tres repeticiones independientes. * $p \leq 0.05$.

LA INDUCCIÓN DE AUTOFAGIA DISMINUYE LA MUERTE DEPENDIENTE DE CALPAÍNAS MEDIADA POR PARAQUAT

Después de confirmar los efectos negativos del paraquat sobre la viabilidad del cultivo celular con fenotipo dopaminérgico, y puesto que la autofagia protege a las células de la muerte que este herbicida causa, se decidió analizar el efecto de la autofagia sobre la vía de apoptosis mediada por calpaínas. Para esto, se analizó la actividad de dichas enzimas, el fundamento de este ensayo se basa en la detección de la escisión del sustrato de calpaínas Ac-LLY-AFC. Este sustrato emite luz azul ($\lambda_{max} = 400 \text{ nm}$), pero tras su escisión por la actividad de calpaínas, la porción AFC libre emite una fluorescencia amarillo-verde ($\lambda_{max} = 505 \text{ nm}$), la cual se cuantificó por fluorimetría.

Se comparó la actividad de calpaínas a las 48 horas en los diversos tratamientos previamente mencionados; además, se usó la calpaína activa I como control positivo, y un inhibidor de la actividad de calpaínas (Z-LLY-FMK) como control negativo.

Como se observa en la figura 14, el control positivo (calpaína I) indujo un claro incremento en la actividad de calpaínas de 514 URF, misma que disminuyó a 216 URF en presencia del inhibidor Z-LLY-FMK. Tanto las células control como las tratadas con rapamicina mostraron valores de 230 y 241 URF respectivamente, lo cual indica niveles basales de muerte celular dependiente de calpaínas. Se observó que la actividad de las calpaínas aumentó a 373 URF en aquellas células que fueron tratadas con paraquat. Sin embargo, esta actividad se redujo cuando las células se pre-trataron con rapamicina para inducir la autofagia a valores similares a los del grupo control de 255 URF. Por lo tanto, estos resultados indican que la autofagia disminuye la muerte celular dependiente de calpaínas mediada por paraquat.

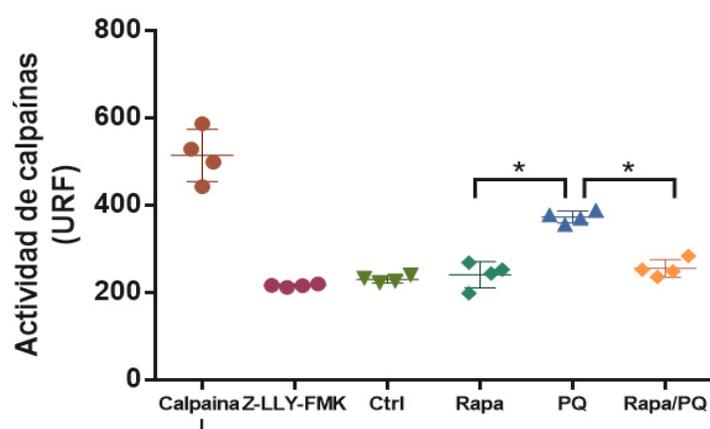


FIGURA 15. La estimulación de la autofagia reduce la actividad de calpaínas inducida por paraquat. Las células fueron tratadas con paraquat (0.5 mM), rapamicina (10 nM) y rapamicina+paraquat. El control no recibió ningún tratamiento. Posteriormente, se obtuvieron los extractos protéicos y se analizó la actividad de calpaínas endógenas mediante fluorimetría. Se utilizó la calpaína activa I como control positivo, y el inhibidor de la actividad de calpaínas Z-LLY-FMK como control negativo. Los resultados están expresados en unidades relativas de fluorescencia (URF). Se indica la diferencia estadísticamente significativa de al menos cuatro repeticiones independientes. * $p \leq 0.05$

LA INDUCCIÓN DE AUTOFAGIA DISMINUYE LA MUERTE DEPENDIENTE DE CASPASAS MEDIADA POR PARAQUAT

Previamente, se ha reportado que la muerte celular inducida por paraquat ocurre a través de la apoptosis mediada por caspasas ^{122,132}. Por lo tanto, se procedió a evaluar si la estimulación de autofagia era capaz de disminuir esta vía de apoptosis. La apoptosis se analizó por citometría de flujo con anexina V y 7-amino-actinomicina D (7-AAD) después de 48 horas de tratamiento, como se ha mencionado antes. El fundamento de este método es que la fosfatidilserina es un fosfolípido que de manera normal, se localiza en la cara citosólica de las membranas plasmáticas. En las etapas tempranas de la apoptosis, las caspasas 3 y 7 activan a la proteína Xrp8, que es responsable de la translocación de la fosfatidilserina hacia la cara externa de la membrana ¹³³. La anexina V es una proteína de unión a fosfolípidos calcio-dependiente, con una alta afinidad a la fosfatidilserina ¹³⁴. Por lo que en este ensayo, se aprovecha la afinidad de la anexina V a la fosfatidilserina para detectar la externalización de la misma. Además, también se usa el 7-AAD que es un derivado fluorescente de la actinomicina D, el cual se une selectivamente a las regiones GC del ADN, no pasa fácilmente a través de la membrana celular intacta, por lo que usa para marcar las células que se encuentran en las etapas finales de apoptosis y han perdido la integridad de la membrana, y que en consecuencia van a morir.

Como se observa en la figura 16, el paraquat induce un aumento gradual de la apoptosis mediada por caspasas, se muestra como a una concentración de 0.1 mM de paraquat hay un 21.6% de apoptosis temprana y un 27.95% de apoptosis tardía. A medida que se incrementa la concentración de paraquat disminuye la población celular en apoptosis

temprana y se incrementa la proporción tardía alcanzando un 13.5% y 42.2% respectivamente, con paraquat 1 mM. Sin embargo, al inducir la autofagia con rapamicina, observamos una disminución tanto de la apoptosis temprana /de 21.6% a 12.55%) como de la apoptosis tardía /de 27.95 a 11.15%) que fue la inducida por paraquat a una concentración de 0.1 mM. Así mismo, cuando se estimuló la autofagia, la apoptosis tardía inducida por paraquat a las concentraciones de 0.2, 0.5 y 1 mM, disminuyó de 31.9% a 11.80%, 30% a 20.2% y 42.2% a 23.45%, respectivamente.

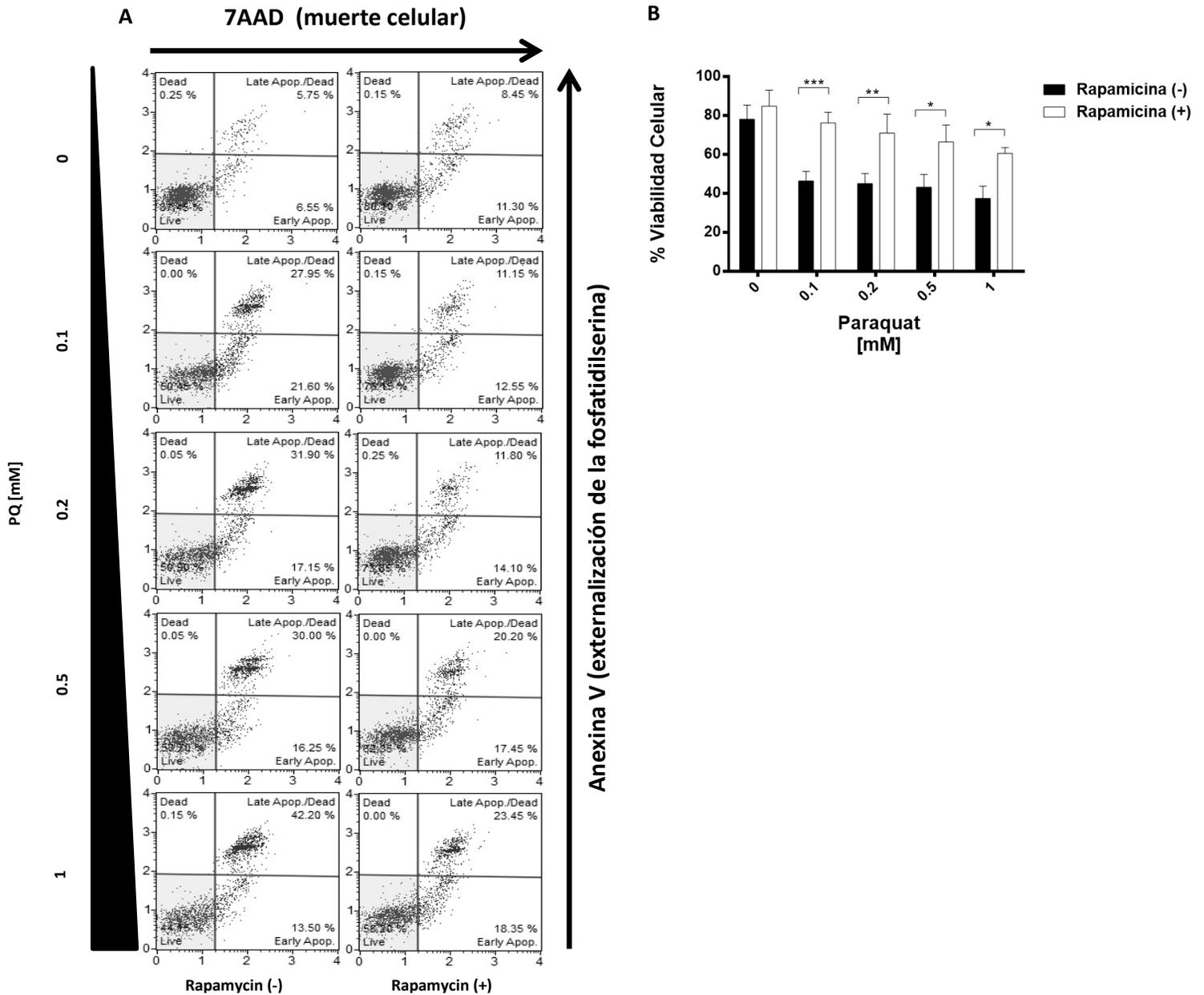


FIGURA 16. La estimulación de autofagia disminuye la apoptosis dependiente de caspasas mediada por paraquat. Las células fueron tratadas con paraquat a las concentraciones indicadas en ausencia o presencia de rapamicina (10 nM) durante 48 horas. Posteriormente, las células fueron cosechadas e incubadas con Anexina V y 7-AAD, después se analizaron mediante citometría de flujo. A) Plots representativos de tres repeticiones independientes de la citometría de flujo. B) La gráfica de barras muestra el porcentaje de viabilidad celular de tres experimentos independientes. Se realizó análisis estadístico de los datos con prueba de Tukey para comparación múltiple. Los asteriscos indican una diferencia estadísticamente significativa * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

DISCUSIÓN

La EP ha sido clasificada por la OMS como el trastorno del movimiento más frecuente y el segundo trastorno neurodegenerativo más diagnosticado después de la enfermedad de Alzheimer ^{15, 135}. La EP se caracteriza principalmente por la pérdida de las neuronas dopaminérgicas en la *SNpc* del mesencéfalo ⁵; sin embargo, se desconocen los detalles de los mecanismos moleculares que desencadenan la muerte de estas neuronas. Es por eso que es necesario el uso de modelos experimentales para llegar a la comprensión de las vías moleculares implicadas en la patogénesis de esta enfermedad.

El paraquat es uno de los herbicidas más utilizados a nivel mundial, la exposición al mismo se ha relacionado epidemiológicamente con un mayor riesgo a desarrollar la EP, pero a la fecha no ha sido caracterizado con exactitud su mecanismo de acción. Se sabe que el paraquat sufre la pérdida de un electrón dentro de las células y se cree que éstas lo secuestran causando un estrés oxidativo y nitrostativo generalizado ⁴⁵. En el presente estudio se logró validar un modelo *in vitro* de la EP, establecido en las células SH-SY5Y usando la neurotoxina paraquat. Puesto que se ha reportado que la toxicidad del paraquat está relacionada a un bloqueo en el flujo de autofagia ¹²², en nuestro modelo se usó la rapamicina con el fin de inducir la autofagia para evaluar su efecto sobre el sistema redox y su potencial implicación como mecanismo neuroprotector en la EP.

Diversos estudios han asociado el estrés oxidativo con el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, entre ellas la EP ¹³⁶. Se ha demostrado que existen alteraciones en el estado redox del citoplasma y la mitocondria en respuesta a neurotoxinas parkinsonianas ¹³⁷. En el presente estudio se estableció un estatus oxidativo del citoplasma a una concentración de 0.5mM de la toxina paraquat a las 24 horas de tratamiento, esto contrasta con otros estudios, donde se observó un aumento en la producción de EROS en concentraciones de 0.5mM a 48 horas ¹³⁸ en células que además fueron sometidas a un estiramiento mecánico. En otro estudio encontraron un incremento de ERO con una concentración de paraquat mucho menor (10 µM) y a las 48 horas de tratamiento ¹³⁹, lo cual puede deberse a que el cultivo celular fue sometido a una diferenciación con ácido retinoico y factor neurotrófico derivado del cerebro, por lo que las células son mucho más sensibles al paraquat.

Mediante sondas fluorescentes (Figura 10), logramos comprobar que la inducción de autofagia con rapamicina es capaz de disminuir el estrés oxidativo inducido por paraquat en el compartimento citoplasmático. Nuestros resultados concuerdan con otros estudios en un modelo *in vivo* de la EP, en donde se ha evidenciado que la inducción de autofagia disminuye el estrés oxidativo mitocondrial, mediante la evaluación de los niveles de malondialdehído (MDA), los cuales se asocian a la actividad del peróxido mitocondrial ¹⁴⁰. El efecto de la autofagia como protector contra el estrés oxidativo ha sido reportado también por otros autores, los cuales utilizaron la rapamicina y observaron una disminución de la toxicidad celular inducida por H₂O₂ ¹⁴¹.

Por otro lado, algunos estudios han identificado el perfil de proteínas que se ven alteradas durante la muerte de las neuronas dopaminérgicas en modelos experimentales de la EP inducidos con neurotoxinas. Dentro de este perfil se ha encontrado la alteración de algunas Prxs^{142, 143}, las cuales son una familia de enzimas antioxidantes encargadas de catalizar la reducción de H₂O₂, peroxinitrito e hidroperóxidos orgánicos¹²⁵. Por lo tanto, decidimos evaluar el estado hiperoxidado de dichas enzimas, ya que se han definido como un biomarcador de estrés oxidativo, puesto que su forma dimérica oxidada se acumula cuando la velocidad de oxidación es mayor que la de reducción¹⁴⁴. Además, se ha observado que el estado de inactividad que genera esta hiperoxidación se relaciona con una disminución de la señalización para la supervivencia en algunos tipos celulares¹²⁹.

Logramos determinar que el paraquat induce un estado hiperoxidado de las Prxs, mientras que la inducción de autofagia disminuye la oxidación mediada por paraquat (Figura 12). Estos resultados se relacionan con un estudio en el que combinaron el paraquat con el fungicida maneb para potenciar el efecto neurotóxico, y observaron la oxidación de la Prx1 citoplasmática y Prx3 mitocondrial¹⁴⁵. Sin embargo, no evaluaron un agente protector como en nuestro estudio.

Por otro lado, la investigación de las vías de muerte celular y la autofagia en las neuronas se complica por la lenta evolución de las enfermedades neurodegenerativas, ya que los factores pro- y anti-apoptóticos dentro de una neurona determinada pueden luchar durante muchos meses o años. La autofagia actúa como un mecanismo protector al promover la supervivencia celular en situaciones críticas o de estrés, y sólo en muy pocos casos participa como un mecanismo de muerte celular programada¹⁴⁶. Previamente, se ha

descrito que el paraquat induce muerte celular a través de la vía de las caspasas en líneas celulares dopaminérgicas ¹⁴⁷, lo cual fue validado en nuestro estudio en donde observamos que el paraquat disminuye la viabilidad celular de manera dosis dependiente (Figuras 13 y 14), e induce la externalización de la fosfatidilserina a la cara externa de la membrana plasmática, la cual es mediada por caspasas (Figura 16). Además, demostramos que la inducción de autofagia con rapamicina revierte la disminución de la apoptosis mediada por caspasas, es decir, que tiene un efecto protector contra la muerte medida por paraquat (Figuras 13, 14 y 16). Nuestros resultados concuerdan con un estudio previo, en donde demostraron que la autofagia dependiente de Atg5 protege contra la muerte de células dopaminérgicas inducida por paraquat ¹²². De igual forma, se ha evidenciado que la estimulación de la autofagia protege a las neuronas contra la muerte inducida por rotenona en cultivos primarios de mesencéfalo ¹⁴⁸. Un estudio similar, mostró que la rapamicina disminuye la activación de caspasa 3 mediada por MPP⁺ ¹¹¹.

Bajo la observación de que la disfunción mitocondrial ocurre en muchas enfermedades neurodegenerativas, se sugiere que las enfermedades neurodegenerativas son enfermedades mitocondriales ⁶⁹. En los modelos experimentales donde se usan inhibidores del complejo I mitocondrial se observó que las células disminuyen sus niveles de ATP, sufren disminución del potencial de membrana mitocondrial, aumentan los niveles de ERO, presentan alteración de microtúbulos, oligomerización de alfa-sinucleína y activación de caspasa 3 y calpaínas ²². De igual forma, otros autores han reportado también la actividad de la calpaína como un importante mecanismo de muerte en

modelos de EP ¹⁴⁹. Por lo tanto, analizamos si la estimulación de autofagia tenía un efecto sobre la actividad de las calpaínas mediada por paraquat, y observamos una disminución de la actividad de estas proteasas, y con ello, de la muerte de las células dopaminérgicas mediada por paraquat (figura 15). Esta actividad ha sido reportada también para modelos experimentales inducidos por otras toxinas ¹⁵⁰.

Se ha demostrado que existe una relación entre la actividad de las calpaínas y la vía de autofagia, ya que al inhibir la autofagia se activa de manera importante la vía de calpaínas ¹⁵¹. Nuestros resultados se correlacionan con estos hallazgos, por lo que la inducción de autofagia con rapamicina protege las células dopaminérgicas de la apoptosis mediada por calpaínas (Figura 15).

En resumen, podemos concluir que en nuestro estudio se comprobó que la inducción de autofagia con rapamicina tiene un efecto de protección sobre las ERO en el compartimento citoplasmático, y además, protege a las células dopaminérgicas de la apoptosis mediada por caspasas y calpaínas. Las propiedades neuroprotectoras de la rapamicina se deben a su capacidad de disminuir el estrés oxidativo, y probablemente también, de disminuir la disfunción mitocondrial al ser capaces de destruir organelos dañados, y de regular la degradación de enzimas relacionadas con la muerte celular programada, contribuyendo en conjunto con un efecto anti-apoptótico. Por lo que nuestros hallazgos proporcionan evidencia que soporta el empleo de estrategias que involucren a la estimulación de la autofagia como medida terapéutica contra enfermedades neurodegenerativas.

CONCLUSIONES

- La estimulación de autofagia disminuye el estrés oxidativo del citoplasma mediado por paraquat.
- La inducción de autofagia reduce el estado hiperoxidado de las enzimas antioxidantes Peroxirredoxinas mediado por paraquat.
- La inducción de autofagia disminuye la apoptosis mediada por calpaínas y caspasas causada por el paraquat.

REFERENCIAS

1. Parkinson J. An essay on the shaking palsy. 1817. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 2002;14(2):223-236; discussion 222.
2. Rajput AH. Frequency and cause of Parkinson's disease. *Can J Neurol Sci*. 1992;19(1 Suppl):103-107.
3. de Rijk MC, Launer LJ, Berger K, et al. Prevalence of Parkinson's disease in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. *Neurology*. 2000;54(11 Suppl 5):S21-23.
4. Darweesh SK, Koudstaal PJ, Stricker BH, Hofman A, Ikram MA. Trends in the Incidence of Parkinson Disease in the General Population: The Rotterdam Study. *Am J Epidemiol*. 2016;183(11):1018-1026.
5. Braak H, Del Tredici K, Rüb U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*. 2003;24(2):197-211.
6. DeLong M, Wichmann T. Changing views of basal ganglia circuits and circuit disorders. *Clin EEG Neurosci*. 2010;41(2):61-67.
7. Obeso JA, Rodríguez-Oroz MC, Rodríguez M, Arbizu J, Giménez-Amaya JM. The basal ganglia and disorders of movement: pathophysiological mechanisms. *News Physiol Sci*. 2002;17:51-55.
8. Jankovic J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2008;79(4):368-376.
9. Martinez-Martin P, Kurtis MM. Systematic review of the effect of dopamine receptor agonists on patient health-related quality of life. *Parkinsonism Relat Disord*. 2009;15 Suppl 4:S58-64.
10. Albers JA, Chand P, Anch AM. Multifactorial sleep disturbance in Parkinson's disease. *Sleep Med*. 2017;35:41-48.
11. Estrada-Bellmann I, Camara-Lemarrooy CR, Calderon-Hernandez HJ, Rocha-Anaya JJ, Villareal-Velazquez HJ. Non-motor symptoms and quality of life in patients with Parkinson's disease in Northeastern Mexico. *Acta Neurol Belg*. 2016;116(2):157-161.
12. Thomas B, Beal MF. Parkinson's disease. *Hum Mol Genet*. 2007;16 Spec No. 2:R183-194.
13. Lim KL, Tan JM. Role of the ubiquitin proteasome system in Parkinson's disease. *BMC Biochem*. 2007;8 Suppl 1:S13.
14. Lim KL. Ubiquitin-proteasome system dysfunction in Parkinson's disease: current evidence and controversies. *Expert Rev Proteomics*. 2007;4(6):769-781.
15. Ascherio A, Schwarzschild MA. The epidemiology of Parkinson's disease: risk factors and prevention. *Lancet Neurol*. 2016;15(12):1257-1272.
16. Ayala A, Venero JL, Cano J, Machado A. Mitochondrial toxins and neurodegenerative diseases. *Front Biosci*. 2007;12:986-1007.
17. Chade AR, Kasten M, Tanner CM. Nongenetic causes of Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl*. 2006(70):147-151.
18. Malkus KA, Tsika E, Ischiropoulos H. Oxidative modifications, mitochondrial dysfunction, and impaired protein degradation in Parkinson's disease: how neurons are lost in the Bermuda triangle. *Mol Neurodegener*. 2009;4:24.
19. Przedborski S. Pathogenesis of nigral cell death in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2005;11 Suppl 1:S3-7.
20. Bezard E, Yue Z, Kirik D, Spillantini MG. Animal models of Parkinson's disease: limits and relevance to neuroprotection studies. *Mov Disord*. 2013;28(1):61-70.

21. Tieu K. A guide to neurotoxic animal models of Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2011;1(1):a009316.
22. Alberio T, Lopiano L, Fasano M. Cellular models to investigate biochemical pathways in Parkinson's disease. *FEBS J.* 2012;279(7):1146-1155.
23. Ceravolo R, Sgadò P, Frosini D, Corsini GU. Assessing neuroprotection in Parkinson's disease: from the animal models to molecular neuroimaging in vivo. *J Neural Transm Suppl.* 2006(71):133-141.
24. 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(9):2032-2048.
25. Schober A. Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell Tissue Res.* 2004;318(1):215-224.
26. Bové J, Prou D, Perier C, Przedborski S. Toxin-induced models of Parkinson's disease. *NeuroRx.* 2005;2(3):484-494.
27. Hisahara S, Shimohama S. Toxin-induced and genetic animal models of Parkinson's disease. *Parkinsons Dis.* 2010;2011:951709.
28. Bové J, Perier C. Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. *Neuroscience.* 2012;211:51-76.
29. Jonsson G, Sachs C. Effects of 6-hydroxydopamine on the uptake and storage of noradrenaline in sympathetic adrenergic neurons. *Eur J Pharmacol.* 1970;9(2):141-155.
30. Blum D, Torch S, Lambeng N, et al. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol.* 2001;65(2):135-172.
31. Cannon JR, Greenamyre JT. Neurotoxic in vivo models of Parkinson's disease recent advances. *Prog Brain Res.* 2010;184:17-33.
32. Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science.* 1983;219(4587):979-980.
33. Langston JW. The MPTP Story. *J Parkinsons Dis.* 2017;7(s1):S11-S22.
34. Singer TP, Castagnoli N, Ramsay RR, Trevor AJ. Biochemical events in the development of parkinsonism induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *J Neurochem.* 1987;49(1):1-8.
35. Pérez-Otaño I, Oset C, Luquin MR, Herrero MT, Obeso JA, Del Río J. MPTP-induced parkinsonism in primates: pattern of striatal dopamine loss following acute and chronic administration. *Neurosci Lett.* 1994;175(1-2):121-125.
36. Bazzu G, Calia G, Puggioni G, et al. alpha-Synuclein- and MPTP-generated rodent models of Parkinson's disease and the study of extracellular striatal dopamine dynamics: a microdialysis approach. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2010;9(4):482-490.
37. Schmidt N, Fergert B. Neurochemical findings in the MPTP model of Parkinson's disease. *J Neural Transm (Vienna).* 2001;108(11):1263-1282.
38. Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron.* 2003;39(6):889-909.
39. Meredith GE, Rademacher DJ. MPTP mouse models of Parkinson's disease: an update. *J Parkinsons Dis.* 2011;1(1):19-33.
40. Mulcahy P, O'Doherty A, Paucard A, O'Brien T, Kirik D, Dowd E. Development and characterisation of a novel rat model of Parkinson's disease induced by sequential intranigral administration of AAV- α -synuclein and the pesticide, rotenone. *Neuroscience.* 2012;203:170-179.

41. Bonet-Ponce L, Saez-Atienzar S, da Casa C, et al. Rotenone Induces the Formation of 4-Hydroxynonenal Aggregates. Role of ROS-Mediated Tubulin Hyperacetylation and Autophagic Flux Disruption. *Mol Neurobiol.* 2016;53(9):6194-6208.
42. Pan-Montojo F, Anichtchik O, Dening Y, et al. Progression of Parkinson's disease pathology is reproduced by intragastric administration of rotenone in mice. *PLoS One.* 2010;5(1):e8762.
43. Greenamyre JT, Cannon JR, Drolet R, Mastroberardino PG. Lessons from the rotenone model of Parkinson's disease. *Trends Pharmacol Sci.* 2010;31(4):141-142; author reply 142-143.
44. Rappold PM, Cui M, Chesser AS, et al. Paraquat neurotoxicity is mediated by the dopamine transporter and organic cation transporter-3. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(51):20766-20771.
45. Berry C, La Vecchia C, Nicotera P. Paraquat and Parkinson's disease. *Cell Death Differ.* 2010;17(7):1115-1125.
46. Hertzman C, Wiens M, Bowering D, Snow B, Calne D. Parkinson's disease: a case-control study of occupational and environmental risk factors. *Am J Ind Med.* 1990;17(3):349-355.
47. Dinis-Oliveira RJ, Remião F, Carmo H, et al. Paraquat exposure as an etiological factor of Parkinson's disease. *Neurotoxicology.* 2006;27(6):1110-1122.
48. Fukushima T, Yamada K, Hojo N, Isobe A, Shiwaku K, Yamane Y. Mechanism of cytotoxicity of paraquat. III. The effects of acute paraquat exposure on the electron transport system in rat mitochondria. *Exp Toxicol Pathol.* 1994;46(6):437-441.
49. Choi WS, Kruse SE, Palmiter RD, Xia Z. Mitochondrial complex I inhibition is not required for dopaminergic neuron death induced by rotenone, MPP+, or paraquat. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(39):15136-15141.
50. Le W, Sayana P, Jankovic J. Animal models of Parkinson's disease: a gateway to therapeutics? *Neurotherapeutics.* 2014;11(1):92-110.
51. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J.* 2012;5(1):9-19.
52. Sies H, Cadenas E. Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1985;311(1152):617-631.
53. Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol.* 2015;4:180-183.
54. Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* 2006;141(2):312-322.
55. Stone JR, Yang S. Hydrogen peroxide: a signaling messenger. *Antioxid Redox Signal.* 2006;8(3-4):243-270.
56. Chatgililoglu C, Ferreri C, Masi A, et al. Free radicals in chemical biology: from chemical behavior to biomarker development. *J Vis Exp.* 2013(74).
57. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol.* 2004;142(2):231-255.
58. Patten DA, Germain M, Kelly MA, Slack RS. Reactive oxygen species: stuck in the middle of neurodegeneration. *J Alzheimers Dis.* 2010;20 Suppl 2:S357-367.
59. Pimentel C, Batista-Nascimento L, Rodrigues-Pousada C, Menezes RA. Oxidative stress in Alzheimer's and Parkinson's diseases: insights from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Oxid Med Cell Longev.* 2012;2012:132146.
60. Danielson SR, Andersen JK. Oxidative and nitrative protein modifications in Parkinson's disease. *Free Radic Biol Med.* 2008;44(10):1787-1794.

61. Zhang J, Wang X, Vikash V, et al. ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:4350965.
62. McCord JM. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med*. 2000;108(8):652-659.
63. Shulman RG, Rothman DL, Behar KL, Hyder F. Energetic basis of brain activity: implications for neuroimaging. *Trends Neurosci*. 2004;27(8):489-495.
64. Su B, Wang X, Nunomura A, et al. Oxidative stress signaling in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*. 2008;5(6):525-532.
65. Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem*. 2006;97(6):1634-1658.
66. Reed TT. Lipid peroxidation and neurodegenerative disease. *Free Radic Biol Med*. 2011;51(7):1302-1319.
67. Ramalingam M, Kim SJ. Reactive oxygen/nitrogen species and their functional correlations in neurodegenerative diseases. *J Neural Transm (Vienna)*. 2012;119(8):891-910.
68. Klein JA, Ackerman SL. Oxidative stress, cell cycle, and neurodegeneration. *J Clin Invest*. 2003;111(6):785-793.
69. Du H, Yan SS. Mitochondrial medicine for neurodegenerative diseases. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010;42(5):560-572.
70. Kannan K, Jain SK. Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology*. 2000;7(3):153-163.
71. Ruskiewicz J, Albrecht J. Changes in the mitochondrial antioxidant systems in neurodegenerative diseases and acute brain disorders. *Neurochem Int*. 2015;88:66-72.
72. Jenner P, Olanow CW. The pathogenesis of cell death in Parkinson's disease. *Neurology*. 2006;66(10 Suppl 4):S24-36.
73. Giasson BI, Duda JE, Murray IV, et al. Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective alpha-synuclein nitration in synucleinopathy lesions. *Science*. 2000;290(5493):985-989.
74. Parzych KR, Klionsky DJ. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid Redox Signal*. 2014;20(3):460-473.
75. Yang Z, Klionsky DJ. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr Opin Cell Biol*. 2010;22(2):124-131.
76. Kim KH, Lee MS. Autophagy--a key player in cellular and body metabolism. *Nat Rev Endocrinol*. 2014;10(6):322-337.
77. Yoshimoto K, Hanaoka H, Sato S, et al. Processing of ATG8s, ubiquitin-like proteins, and their deconjugation by ATG4s are essential for plant autophagy. *Plant Cell*. 2004;16(11):2967-2983.
78. Lum JJ, Bauer DE, Kong M, et al. Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell*. 2005;120(2):237-248.
79. Ogata M, Hino S, Saito A, et al. Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol*. 2006;26(24):9220-9231.
80. Li WW, Li J, Bao JK. Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cell Mol Life Sci*. 2012;69(7):1125-1136.
81. Orenstein SJ, Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy: molecular mechanisms and physiological relevance. *Semin Cell Dev Biol*. 2010;21(7):719-726.
82. Kaushik S, Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy: a unique way to enter the lysosome world. *Trends Cell Biol*. 2012;22(8):407-417.
83. Hamasaki M, Furuta N, Matsuda A, et al. Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature*. 2013;495(7441):389-393.

84. Ge L, Wilz L, Schekman R. Biogenesis of autophagosomal precursors for LC3 lipidation from the ER-Golgi intermediate compartment. *Autophagy*. 2015;11(12):2372-2374.
85. Moreau K, Ravikumar B, Renna M, Puri C, Rubinsztein DC. Autophagosome precursor maturation requires homotypic fusion. *Cell*. 2011;146(2):303-317.
86. Ohashi Y, Munro S. Membrane delivery to the yeast autophagosome from the Golgi-endosomal system. *Mol Biol Cell*. 2010;21(22):3998-4008.
87. Shpilka T, Welter E, Borovsky N, et al. Lipid droplets and their component triglycerides and steryl esters regulate autophagosome biogenesis. *EMBO J*. 2015;34(16):2117-2131.
88. Mizushima K, Watanabe M, Abe K, et al. Analysis of spinocerebellar ataxia type 2 in Gunma Prefecture in Japan: CAG trinucleotide expansion and clinical characteristics. *J Neurol Sci*. 1998;156(2):180-185.
89. Galluzzi L, Pietrocola F, Levine B, Kroemer G. Metabolic control of autophagy. *Cell*. 2014;159(6):1263-1276.
90. Choi AM, Ryter SW, Levine B. Autophagy in human health and disease. *N Engl J Med*. 2013;368(19):1845-1846.
91. Zaffagnini G, Martens S. Mechanisms of Selective Autophagy. *J Mol Biol*. 2016;428(9 Pt A):1714-1724.
92. Ganley IG, Lam dH, Wang J, Ding X, Chen S, Jiang X. ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *J Biol Chem*. 2009;284(18):12297-12305.
93. Dikic I. Proteasomal and Autophagic Degradation Systems. *Annu Rev Biochem*. 2017;86:193-224.
94. Komatsu M, Waguri S, Ueno T, et al. Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *J Cell Biol*. 2005;169(3):425-434.
95. Hara T, Nakamura K, Matsui M, et al. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature*. 2006;441(7095):885-889.
96. Komatsu M, Waguri S, Chiba T, et al. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature*. 2006;441(7095):880-884.
97. Ravikumar B, Duden R, Rubinsztein DC. Aggregate-prone proteins with polyglutamine and polyalanine expansions are degraded by autophagy. *Hum Mol Genet*. 2002;11(9):1107-1117.
98. Dragich JM, Kuwajima T, Hirose-Ikeda M, et al. Autophagy linked FYVE (Alfy/WDFY3) is required for establishing neuronal connectivity in the mammalian brain. *Elife*. 2016;5.
99. Lynch-Day MA, Mao K, Wang K, Zhao M, Klionsky DJ. The role of autophagy in Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(4):a009357.
100. Mitter SK, Song C, Qi X, et al. Dysregulated autophagy in the RPE is associated with increased susceptibility to oxidative stress and AMD. *Autophagy*. 2014;10(11):1989-2005.
101. Rubinsztein DC. The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature*. 2006;443(7113):780-786.
102. Wu JJ, Quijano C, Chen E, et al. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress mediate the physiological impairment induced by the disruption of autophagy. *Aging (Albany NY)*. 2009;1(4):425-437.
103. Navarro-Yepes J, Burns M, Anandhan A, et al. Oxidative stress, redox signaling, and autophagy: cell death versus survival. *Antioxid Redox Signal*. 2014;21(1):66-85.
104. Malaviya R, Laskin JD, Laskin DL. Oxidative stress-induced autophagy: role in pulmonary toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2014;275(2):145-151.
105. Scherz-Shouval R, Elazar Z. Regulation of autophagy by ROS: physiology and pathology. *Trends Biochem Sci*. 2011;36(1):30-38.

106. Lin WJ, Kuang HY. Oxidative stress induces autophagy in response to multiple noxious stimuli in retinal ganglion cells. *Autophagy*. 2014;10(10):1692-1701.
107. Scherz-Shouval R, Shvets E, Elazar Z. Oxidation as a post-translational modification that regulates autophagy. *Autophagy*. 2007;3(4):371-373.
108. Chen Y, Azad MB, Gibson SB. Superoxide is the major reactive oxygen species regulating autophagy. *Cell Death Differ*. 2009;16(7):1040-1052.
109. Scherz-Shouval R, Shvets E, Fass E, Shorer H, Gil L, Elazar Z. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *EMBO J*. 2007;26(7):1749-1760.
110. Zhang C, Yang L, Wang XB, et al. Calyxin Y induces hydrogen peroxide-dependent autophagy and apoptosis via JNK activation in human non-small cell lung cancer NCI-H460 cells. *Cancer Lett*. 2013;340(1):51-62.
111. Arduino DM, Esteves AR, Cortes L, et al. Mitochondrial metabolism in Parkinson's disease impairs quality control autophagy by hampering microtubule-dependent traffic. *Hum Mol Genet*. 2012;21(21):4680-4702.
112. Janda E, Isidoro C, Carresi C, Mollace V. Defective autophagy in Parkinson's disease: role of oxidative stress. *Mol Neurobiol*. 2012;46(3):639-661.
113. Chen Y, McMillan-Ward E, Kong J, Israels SJ, Gibson SB. Mitochondrial electron-transport-chain inhibitors of complexes I and II induce autophagic cell death mediated by reactive oxygen species. *J Cell Sci*. 2007;120(Pt 23):4155-4166.
114. Cheng Y, Ren X, Hait WN, Yang JM. Therapeutic targeting of autophagy in disease: biology and pharmacology. *Pharmacol Rev*. 2013;65(4):1162-1197.
115. Levine B, Packer M, Codogno P. Development of autophagy inducers in clinical medicine. *J Clin Invest*. 2015;125(1):14-24.
116. Martel RR, Klicius J, Galet S. Inhibition of the immune response by rapamycin, a new antifungal antibiotic. *Can J Physiol Pharmacol*. 1977;55(1):48-51.
117. Benjamin D, Colombi M, Moroni C, Hall MN. Rapamycin passes the torch: a new generation of mTOR inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*. 2011;10(11):868-880.
118. Vézina C, Kudelski A, Sehgal SN. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J Antibiot (Tokyo)*. 1975;28(10):721-726.
119. Efeyan A, Zoncu R, Sabatini DM. Amino acids and mTORC1: from lysosomes to disease. *Trends Mol Med*. 2012;18(9):524-533.
120. Harrison DE, Strong R, Sharp ZD, et al. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature*. 2009;460(7253):392-395.
121. 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(3):1166-1175.
122. Garcia-Garcia A, Anandhan A, Burns M, Chen H, Zhou Y, Franco R. Impairment of Atg5-dependent autophagic flux promotes paraquat- and MPP⁺-induced apoptosis but not rotenone or 6-hydroxydopamine toxicity. *Toxicol Sci*. 2013;136(1):166-182.
123. Marcela R-M. *Análisis del efecto de la inducción de autofagia en un modelo animal de la enfermedad de Parkinson*. Monterrey, Nuevo León: Histología, Universidad Autónoma de Nuevo León; 2016.
124. Mueller H, Kassack MU, Wiese M. Comparison of the usefulness of the MTT, ATP, and calcein assays to predict the potency of cytotoxic agents in various human cancer cell lines. *J Biomol Screen*. 2004;9(6):506-515.

125. Karplus PA. A primer on peroxiredoxin biochemistry. *Free Radic Biol Med.* 2015;80:183-190.
126. Wood ZA, Schröder E, Robin Harris J, Poole LB. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci.* 2003;28(1):32-40.
127. Stadtman ER, Berlett BS. Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Drug Metab Rev.* 1998;30(2):225-243.
128. Trujillo M, Clippe A, Manta B, et al. Pre-steady state kinetic characterization of human peroxiredoxin 5: taking advantage of Trp84 fluorescence increase upon oxidation. *Arch Biochem Biophys.* 2007;467(1):95-106.
129. Collins JA, Wood ST, Nelson KJ, et al. Oxidative Stress Promotes Peroxiredoxin Hyperoxidation and Attenuates Pro-survival Signaling in Aging Chondrocytes. *J Biol Chem.* 2016;291(13):6641-6654.
130. Belmokhtar CA, Hillion J, Ségal-Bendirdjian E. Staurosporine induces apoptosis through both caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. *Oncogene.* 2001;20(26):3354-3362.
131. Kabir J, Lobo M, Zachary I. Staurosporine induces endothelial cell apoptosis via focal adhesion kinase dephosphorylation and focal adhesion disassembly independent of focal adhesion kinase proteolysis. *Biochem J.* 2002;367(Pt 1):145-155.
132. Fei Q, McCormack AL, Di Monte DA, Ethell DW. Paraquat neurotoxicity is mediated by a Bak-dependent mechanism. *J Biol Chem.* 2008;283(6):3357-3364.
133. Mariño G, Kroemer G. Mechanisms of apoptotic phosphatidylserine exposure. *Cell Res.* 2013;23(11):1247-1248.
134. Gerke V, Moss SE. Annexins: from structure to function. *Physiol Rev.* 2002;82(2):331-371.
135. Lee A, Gilbert RM. Epidemiology of Parkinson Disease. *Neurol Clin.* 2016;34(4):955-965.
136. Barnham KJ, Masters CL, Bush AI. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat Rev Drug Discov.* 2004;3(3):205-214.
137. 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.
138. Wang F, Franco R, Skotak M, Hu G, Chandra N. Mechanical stretch exacerbates the cell death in SH-SY5Y cells exposed to paraquat: mitochondrial dysfunction and oxidative stress. *Neurotoxicology.* 2014;41:54-63.
139. 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(1):21-31.
140. 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(4):825-832.
141. Song C, Tong F. Autophagy induction is a survival response against oxidative stress in bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy.* 2014;16(10):1361-1370.
142. Lee YM, Park SH, Shin DI, et al. Oxidative modification of peroxiredoxin is associated with drug-induced apoptotic signaling in experimental models of Parkinson disease. *J Biol Chem.* 2008;283(15):9986-9998.
143. Yun HM, Choi DY, Oh KW, Hong JT. PRDX6 Exacerbates Dopaminergic Neurodegeneration in a MPTP Mouse Model of Parkinson's Disease. *Mol Neurobiol.* 2015;52(1):422-431.
144. Poynton RA, Hampton MB. Peroxiredoxins as biomarkers of oxidative stress. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1840(2):906-912.
145. Roede JR, Hansen JM, Go YM, Jones DP. Maneb and paraquat-mediated neurotoxicity: involvement of peroxiredoxin/thioredoxin system. *Toxicol Sci.* 2011;121(2):368-375.

146. Shen S, Kepp O, Kroemer G. The end of autophagic cell death? *Autophagy*. 2012;8(1):1-3.
147. 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(31):32626-32632.
148. Radad K, Moldzio R, Rausch WD. Rapamycin protects dopaminergic neurons against rotenone-induced cell death in primary mesencephalic cell culture. *Folia Neuropathol*. 2015;53(3):250-261.
149. Esteves AR, Arduíno DM, Swerdlow RH, Oliveira CR, Cardoso SM. Dysfunctional mitochondria uphold calpain activation: contribution to Parkinson's disease pathology. *Neurobiol Dis*. 2010;37(3):723-730.
150. Chen MJ, Yap YW, Choy MS, et al. Early induction of calpains in rotenone-mediated neuronal apoptosis. *Neurosci Lett*. 2006;397(1-2):69-73.
151. Zhang JY, Peng C, Shi H, Wang S, Wang Q, Wang JZ. Inhibition of autophagy causes tau proteolysis by activating calpain in rat brain. *J Alzheimers Dis*. 2009;16(1):39-47.