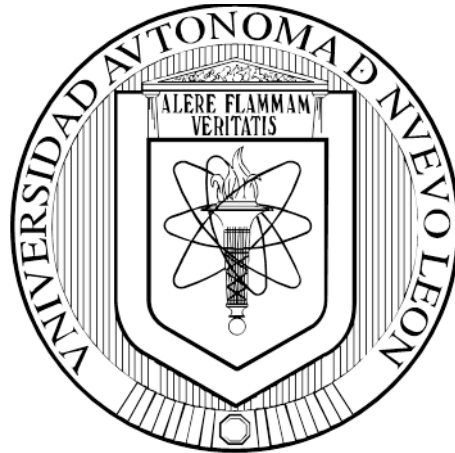


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE MEDICINA**



**ESTUDIO COMPARATIVO DE DIFERENTES INDUCTORES  
DE AUTOFAGIA EN UN MODELO *IN VITRO* DE LA  
ENFERMEDAD DE PARKINSON**

**POR**

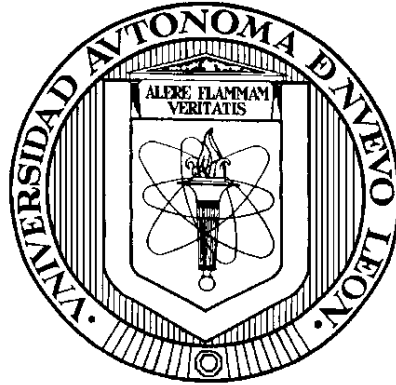
**YARETH GOPAR CUEVAS**

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

**JUNIO, 2019**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**ESTUDIO COMPARATIVO DE DIFERENTES INDUCTORES  
DE AUTOFAGIA EN UN MODELO *IN VITRO* DE LA  
ENFERMEDAD DE PARKINSON**

**Por**

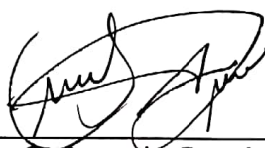
**YARETH GOPAR CUEVAS**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRÍA EN CIENCIAS con ORIENTACIÓN en MORFOLOGÍA**

**Junio, 2019**

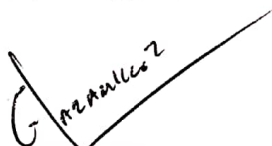
**ESTUDIO COMPARATIVO DE DIFERENTES INDUCTORES  
DE AUTOFAGIA EN UN MODELO *IN VITRO* DE LA  
ENFERMEDAD DE PARKINSON**

Aprobación de la Tesis:



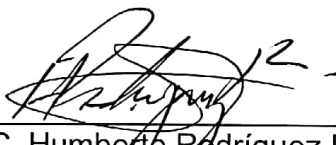
---

Dra. C. Aracely García García  
Director de Tesis



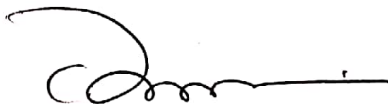
---

Dr. C. Gilberto Jaramillo Rangel  
Codirector de Tesis



---

Dr. C. Humberto Rodríguez Rocha  
Comisión de Tesis



---

Dr. Med. Felipe Arturo Morales Martínez  
Subdirector de Estudios de Postgrado

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres que siempre me ha apoyado en cada decisión que he tomado y me han alentado a ser mejor persona cada día.

A mis hermanos por ser buenos compañeros de vida.

Al Dr. Gilberto Jaramillo Rangel por darme todas las bases y el apoyo para adentrarme en el mundo de la investigación básica, por motivarme a ir siempre por más.

Al Dr. Humberto Rodríguez Rocha y la Dra. Aracely García García por abrirme las puertas a esta familia científica, por toda la paciencia, el apoyo y el conocimiento brindado durante estos dos años.

A Marco Antonio Reyes por todo su amor y apoyo.

## TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCIÓN . . . . .	1
2. ANTECEDENTES . . . . .	3
2.1 Enfermedad de Parkinson (EP) . . . . .	3
2.2 El estrés oxidativo y su relación con la EP . . . . .	5
2.3 Modelos experimentales de la EP . . . . .	7
2.4 La autofagia y su relación con la EP . . . . .	9
3. JUSTIFICACIÓN . . . . .	15
4. OBJETIVOS . . . . .	16
4.1 Objetivo general . . . . .	16
4.2 Objetivos específicos. . . . .	16
5. MATERIAL Y MÉTODOS. . . . .	17
5.1 Diseño experimental . . . . .	17
5.2 Detección de la inducción de autofagia . . . . .	18
5.2.1 Western blot . . . . .	18
5.2.2 Microscopía electrónica de transmisión (MET). . . . .	20
5.3 Análisis del estrés oxidativo . . . . .	20
5.3.1 Detección de especies reactivas de oxígeno citoplasmáticas. . . . .	20
5.3.2 Detección de peroxirredoxinas hiperoxidadas . . . . .	21
5.4 Evaluación de la función mitocondrial . . . . .	22
5.5 Análisis de la viabilidad celular . . . . .	23
5.6 Análisis estadístico . . . . .	24
6. RESULTADOS . . . . .	25
6.1 Evaluación de la inducción de autofagia. . . . .	25
6.1.1 La Metformina y la trehalosa inducen autofagia sin afectar la viabilidad celular. . . . .	25
6.1.2 La metformina y la trehalosa incrementan la autofagia en el modelo de la EP. . . . .	31
6.2 Evaluación del efecto de la metformina y la trehalosa sobre el estrés oxidativo. . . . .	34
6.2.1 La metformina y la trehalosa no disminuyen el estrés oxidativo citoplasmático en el modelo de la EP. . . . .	34

## TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
6.2.2 La trehalosa disminuye la hiperoxidación de las peroxirredoxinas. . . . .	36
6.3 Evaluación del efecto de la trehalosa y la metformina sobre la toxicidad inducida por PQ. . . . .	39
6.3.1 La trehalosa y la metformina ejercen un efecto de protección sobre la toxicidad mediada por PQ. . . . .	39
6.3.2 La trehalosa y metformina incrementan la viabilidad de las células dopaminérgicas en el modelo de la EP. . . . .	40
7. DISCUSIÓN . . . . .	42
8. CONCLUSIONES. . . . .	46
REFERENCIAS . . . . .	47

## LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I. Cuantificación de autofagosomas por célula . . . . .	31

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1. Efecto de las especies reactivas de oxígeno (ROS) sobre las biomoléculas . . . . .	5
2. Ciclo de reducción-oxidación del paraquat . . . . .	8
3. Proceso de formación de los autofagosomas . . . . .	10
4. Mecanismos de inducción de autofagia mediados por la trehalosa . . . .	12
5. Mecanismo de acción de la metformina sobre la autofagia . . . . .	13
6. La metformina y la trehalosa no afectan la morfología celular . . . . .	26
7. La metformina y la trehalosa no afectan la viabilidad celular . . . . .	27
8. La metformina induce autofagia . . . . .	28
9. La trehalosa induce autofagia . . . . .	29
10. La metformina y la trehalosa inducen la formación de autofagosomas y autolisosomas. . . . .	30
11. La metformina y la trehalosa aumentan la autofagia en el modelo de la EP . . . . .	32
12. La inducción de autofagia disminuye el daño mitocondrial inducido en el modelo de la EP. . . . .	33
13. Evaluación del efecto de la metformina y la trehalosa sobre el estrés oxidativo citoplasmático inducido por PQ . . . . .	35
14. La metformina y la trehalosa no disminuyen el estrés oxidativo citoplasmático en el modelo de la EP . . . . .	36
15. La trehalosa disminuye la hiperoxidación de las peroxirredoxinas . . . .	38



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
16. La toxicidad mediada por PQ es disminuida mediante la inducción de autofagia con trehalosa y metformina. . . . .	.39
17. La inducción de autofagia incrementa la viabilidad de las células dopaminérgicas en un modelo de la EP . . . . .	.41

## NOMENCLATURA

%	Porcentaje
ADN	Ácido desoxirribunucleico
AMPK	Del inglés AMP-activated protein kinase
ANOVA	Del inglés analysis of variance
ATP	Adenosín trifosfato
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
Ctrl	Control
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DHE	Dihidroetidio
DS	Desviación estándar
EP	Enfermedad de Parkinson
g	Gravedades
h	Hora
HRP	Del inglés horseradish peroxidase
M	Molar
m-TOR	Del inglés mammalian target of rapamycin
mAmp	Miliamperios
MET	Microscopia electrónica de transmisión
Met	Metformina
mM	Milimolar
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
°C	Grados Celsius

## NOMENCLATURA

OsO <sub>4</sub>	Tetraóxido de osmio
PBS	Del inglés phosphate buffered saline
PQ	Paraquat
Prxs	Peroxirredoxinas
PVDF	fluoruro de polivinilideno
Rapa	Rapamicina
RIPA	Del inglés radioimmunoprecipitation assay buffer
ROS	Del inglés reactive oxygen species
TBST	Del inglés tris-buffered saline + tween 20
Tre	Trehalosa
V	Voltaje
μM	Micromolar

## RESUMEN

**Propósito y Método del Estudio:** La enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno neurodegenerativo caracterizado por la pérdida selectiva de las neuronas dopaminérgicas, el daño mitocondrial, el estrés oxidativo y la alteración de las vías de degradación de proteínas mediadas por el proteosoma y la autofagia. La autofagia desempeña un papel esencial en el mantenimiento neuronal, ya que un deterioro de la autofagia conduce a la neurodegeneración y su estimulación tiene un efecto protector. Por lo tanto, es crucial estudiar el potencial efecto neuroprotector de diferentes moléculas inductoras de autofagia, como la trehalosa y la metformina en un modelo celular de EP. Primero, confirmamos la inducción de autofagia en respuesta a la trehalosa y la metformina en las células dopaminérgicas SH-SY5Y. Luego, analizamos si la autofagia inducida por la trehalosa y la metformina tenía un efecto antioxidante en el modelo experimental de la EP inducida por el herbicida paraquat (PQ). Inesperadamente, la trehalosa no disminuyó el estrés oxidativo citoplasmático, pero sí la hiperoxidación de las peroxirredoxinas; mientras que la metformina aumentó los niveles de estrés oxidativo inducido por el PQ. Dado que las mitocondrias son el blanco principal del PQ, evaluamos el efecto de la inducción de autofagia con trehalosa y metformina sobre la actividad mitocondrial. El PQ disminuyó la actividad mitocondrial, y cuando la autofagia se estimuló con trehalosa y metformina antes del tratamiento con el PQ, la actividad mitocondrial aumentó. Además, es importante destacar que la trehalosa y la metformina mostraron un efecto protector sobre la muerte celular inducida por el PQ.

**Contribuciones y Conclusiones:** Curiosamente, nuestros resultados sugieren que la inducción de autofagia con la metformina no tiene efecto antioxidante sobre el estrés oxidativo inducido por el PQ. Sin embargo, la trehalosa disminuye la hiperoxidación de las peroxirredoxinas. Además, ambas moléculas ejercen un efecto protector sobre las células al mejorar la actividad mitocondrial y proteger a las células de la toxicidad del PQ. Por lo tanto, los inductores de autofagia trehalosa y metformina representan un potencial prometedor para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como la EP.



---

**Dra. C. Aracely García García**  
Director de Tesis

## ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder characterized by the selective loss of dopaminergic neurons, mitochondrial damage, oxidative stress, and disruption of the protein degradation pathways mediated by the proteasome and autophagy. Autophagy plays an essential role in neuronal maintenance since an impairment of autophagy leads to neurodegeneration and its stimulation has a protective effect. Therefore, it is crucial to study the potential neuroprotective effect of different autophagy-inducing molecules such as trehalose and metformin. Trehalose induces autophagy through a mTOR-dependent and independent pathways, and metformin only through a mTOR-dependent pathway. Therefore, we evaluated the effect of autophagy inducers trehalose and metformin in a cellular model of PD. First, we confirmed the induction of autophagy in response to trehalose and metformin in the SH-SY5Y dopaminergic cells through detection of an increase of the LC3-II marker by western blot, and a higher number of autophagosomes by transmission electron microscopy. Then, we analyzed whether autophagy stimulated by trehalose and metformin had an antioxidant effect in the experimental model of PD induced by the herbicide paraquat (PQ). Autophagy was stimulated 1 h before PQ treatment and oxidative stress was evaluated at 24 h by flow cytometry using dihydroethidium. Unexpectedly, trehalose did not show an antioxidant effect, while metformin increased the levels of oxidative stress induced by PQ. Since mitochondria are the main target of PQ, we evaluated the effect of autophagy induction with trehalose and metformin on the mitochondrial activity at 48 h. PQ decreased the mitochondrial activity, and when autophagy was stimulated with trehalose and metformin before PQ treatment, the mitochondrial activity was increased. Importantly, trehalose and metformin showed a protective effect on PQ-induced cell death. Interestingly, our results suggest that even the induction of autophagy with trehalose and metformin has no antioxidant effect on the oxidative stress induced by PQ, it exerts a protective effect on cells by improving the mitochondrial activity and protecting cells from PQ toxicity. Therefore, trehalose and metformin represent autophagy inducers with a promising potential for the treatment of neurodegenerative diseases such as PD.

# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Parkinson (EP) es un desorden neurodegenerativo, cuya incidencia se cree va en aumento. Esta enfermedad se clasifica como familiar y esporádica, la forma familiar representa del 5 al 10% de los casos, y está relacionada con mutaciones en genes como *DJ-1*, *PRKN*, *SNCA*, entre otros; mientras que la forma esporádica comprende del 90 al 95% e implica la interacción entre la predisposición genética, el envejecimiento y la exposición a toxinas ambientales. En la actualidad no contamos con una cura para este desorden, y las terapias disponibles solamente retrasan y disminuyen los síntomas motores.

Aunque no se sabe cómo se origina esta enfermedad, se tiene evidencia de la existencia de alteraciones a nivel mitocondrial, en los niveles de estrés oxidativo y en las vías de degradación de proteínas mediadas por el proteosoma y la autofagia. Existe evidencia que soporta que la autofagia tiene un papel primordial en el sistema nervioso central para el mantenimiento de las neuronas, ya que al ser inhibida ocurre un proceso de neurodegeneración. Por lo tanto, la estimulación de la autofagia, representa una estrategia prometedora para disminuir la pérdida neuronal. Existen diferentes moléculas con capacidad inductora de autofagia, una de las más estudiadas es la rapamicina, la cual induce autofagia a través de la inhibición de mTORC1.

Sin embargo, es importante evaluar el efecto de otras moléculas inductoras de autofagia en el proceso de neurodegeneración, que actúen a través de vías diferentes, como potenciales tratamientos alternativos. Entre las moléculas inductoras de autofagia destacan la trehalosa y la metformina. La metformina, induce autofagia a través de una vía que es dependiente de m-TOR, mientras que la trehalosa lo hace a través de dos vías, una dependiente de m-TOR y una vía independiente. La trehalosa es un disacárido por lo que no representa ningún riesgo a la salud, mientras que la metformina es utilizada comúnmente para el tratamiento de la diabetes tipo 2, y hasta la fecha no se han reportado efectos secundarios notables que afecten la calidad de vida de los pacientes, además que cada vez se le atribuyen mayores beneficios sobre la salud.

## **CAPÍTULO 2**

### **ANTECEDENTES**

#### **2.1 Enfermedad de Parkinson (EP)**

La EP es el segundo desorden neurodegenerativo más común en el mundo, y afecta aproximadamente a 6 millones de personas. En México, la epidemiología de esta enfermedad no se ha explorado con precisión, sin embargo, se estima que existen al menos 500,000 personas afectadas (Secretaría de Salud de México). La EP afecta con mayor frecuencia a personas mayores de 60 años y debido a que actualmente la esperanza de vida es mayor, se estima que estas cifras van en aumento, lo que convierte a esta enfermedad en un problema de salud pública.

Los signos de la EP están relacionados con la disfunción motora, entre los que se encuentran: la hipocinesia, los temblores en reposo, el deterioro del reflejo postural, entre otros <sup>1</sup>. Esta disfunción motora ocurre por la pérdida selectiva de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra pars compacta (SNpc). Desafortunadamente, la sintomatología se presenta cuando hay una pérdida de 40-60% de estas neuronas y es muy difícil su diagnóstico <sup>2</sup>. Se ha demostrado que sólo el 75% de los casos diagnosticados como EP son correctos, lo cual no solo afecta a los casos clínicos, sino también a la investigación epidemiológica <sup>3, 4</sup>. En la actualidad no contamos con una cura para este desorden, y las



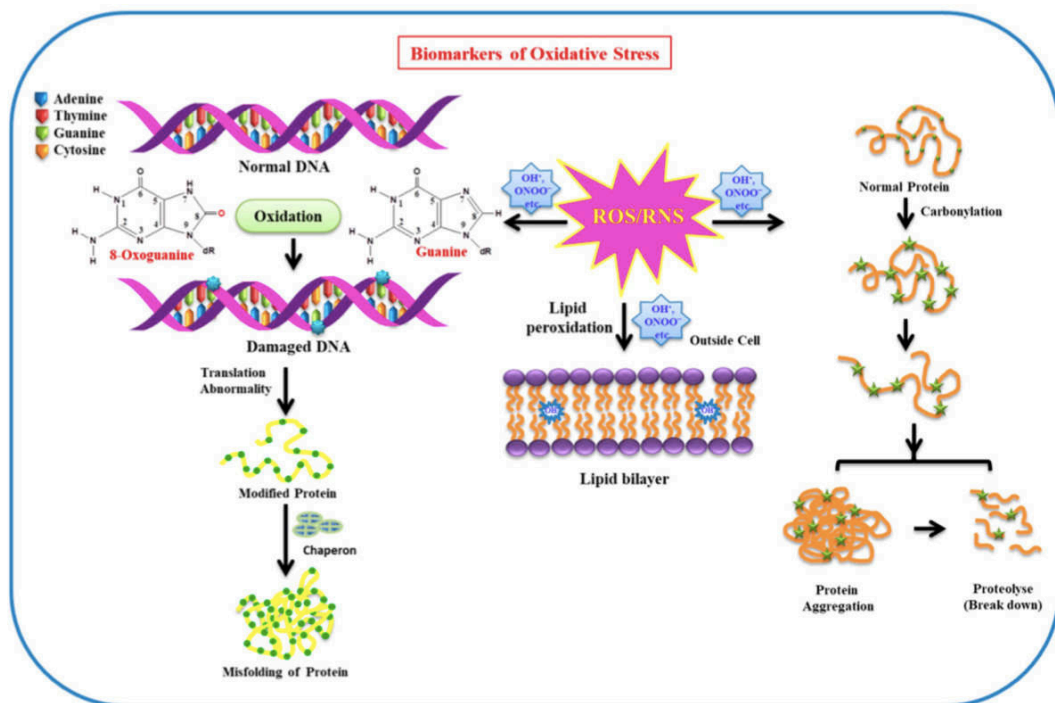
terapias disponibles solamente retrasan y disminuyen los síntomas motores, ya que están dirigidas al déficit de dopamina.

En general, se desconoce la etiología de la EP, y tanto factores genéticos como ambientales han sido relacionados como factores de riesgo. Sin embargo, alrededor del 90% de los casos ocurren de manera esporádica (idiopática) sin una base genética definida, y con una patogénesis posiblemente relacionada a factores ambientales. El principal factor de riesgo identificado en esta enfermedad es el envejecimiento, y su prevalencia e incidencia se incrementan exponencialmente entre las edades de 65 a 90 años. Por tales razones, se cree que la EP se origina como producto de la combinación entre la susceptibilidad genética, la exposición ambiental y el envejecimiento <sup>5</sup>.

A pesar de que la muerte neuronal es una de las principales características de la EP, aún no se conocen los mecanismos moleculares que están implicados, en gran parte debido a que en la mayoría de los casos no se sabe cuál es la causa de esta enfermedad. Sin embargo, existe evidencia que señala que la disfunción mitocondrial, la acumulación anormal de proteína y el estrés oxidativo están involucrados en el proceso de muerte neuronal en la patogénesis de este desorden <sup>6, 7</sup>.

## 2.2 El estrés oxidativo y su relación con la EP

El estrés oxidativo es un fenómeno causado por un desequilibrio entre la producción y acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) en células y tejidos, y la capacidad de un sistema biológico para eliminar estos productos reactivos. La producción y acumulación excesiva de ROS inducida por el estrés oxidativo provoca daños celulares <sup>8, 9</sup>.



**Fig. 1. Efecto de las especies reactivas de oxígeno (ROS) sobre las biomoléculas.** Los lípidos y las proteínas son alterados funcional y estructuralmente: los lípidos sufren peroxidación y las proteínas sufren carbonilación ocasionando su mal plegamiento y su posterior agregación. Las bases heterocíclicas del ADN también son propensas al daño oxidativo, la guanina es más susceptible a la formación de 8-hidroxi guanina y 8-hidroxi-2-desoxiguanosina <sup>10</sup>.

Durante el envejecimiento el sistema nervioso central se convierte en un blanco fácil del daño ocasionado por el estrés oxidativo, debido a su elevado contenido de lípidos, alta demanda de energía y débil capacidad antioxidante. Los

fosfolípidos en el cerebro son particularmente vulnerables a la peroxidación. Además, las proteínas y el ADN también sufren modificaciones oxidativas por ROS (Fig. 1), lo que resulta problemático, ya que se ha reportado que los cerebros envejecidos exhiben altos niveles de mutaciones inducidas por el estrés oxidativo en el ADN mitocondrial <sup>9, 10</sup>.

El estrés oxidativo es uno de los factores responsables del inicio y la progresión de la EP. Se han realizado estudios en cerebros obtenidos de autopsias de individuos diagnosticados con la EP que demuestran daño oxidativo en lípidos, proteínas y ADN <sup>11-13</sup>. Además, el estrés oxidativo ha sido relacionado con la disfunción mitocondrial debido a que se ha observado una disminución en la actividad de la cadena de transporte de electrones en las neuronas de la SNpc de pacientes con la EP <sup>14, 15</sup>.

Los niveles elevados de ROS y la actividad reducida de las enzimas antioxidantes en las neuronas dopaminérgicas de los pacientes con la EP, conducen al estrés oxidativo que finalmente conlleva a la neuroinflamación <sup>10</sup>. Hay dos mecanismos subyacentes implicados en la generación de estrés oxidativo en las neuronas dopaminérgicas. Uno de ellos es mediado por las enzimas tirosina hidroxilasa y monoaminoxidasa, que hacen a las neuronas dopaminérgicas más propensas al daño oxidativo. El segundo mecanismo ocurre por medio de la reacción de Fenton, la cual se lleva a cabo por la presencia de hierro en las neuronas, lo que aumenta la oxidación a través de la

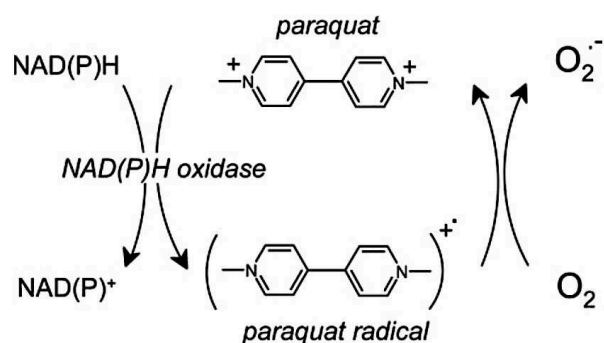
producción de radicales libres a partir de superóxido y peróxido de hidrógeno, generando el radical libre hidroxilo <sup>8</sup>.

### **2.3 Modelos experimentales de la EP**

Para el estudio de la neurodegeneración en la EP se han utilizado modelos celulares y animales tanto genéticos como inducidos por exposición ambiental a neurotoxinas. Sin embargo, no todos los modelos experimentales reproducen las características de la EP <sup>16, 17</sup>. Las neurotoxinas mitocondriales y/o ambientales como 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) o su metabolito activo 1-metil-4-fenilpiridina (MPP<sup>+</sup>), los pesticidas rotenona y paraquat inducen muerte celular *in vitro* e *in vivo* <sup>18</sup>. Asimismo, existe evidencia epidemiológica que muestra que la exposición a agentes tóxicos ambientales como la rotenona y el paraquat incrementa el riesgo a desarrollar la EP <sup>19</sup>. En el caso de los modelos animales, se han generado ratones transgénicos que sobreexpresan versiones mutantes de genes relacionados con la EP. Desafortunadamente, en estos modelos animales no se ha logrado reproducir la muerte celular dopaminérgica <sup>20, 21</sup>, lo que sugiere que los factores de riesgo genético no son suficientes y que la exposición ambiental puede también ser requerida para la degeneración de neuronas dopaminérgicas en una interacción genético-ambiental. Los agentes como MPTP, rotenona y paraquat funcionan principalmente a través de la inhibición del complejo I de la cadena de transporte de electrones, lo cual origina un incremento en la producción de ROS <sup>22, 23</sup>. Estudios recientes sugieren la existencia de otros mecanismos

involucrados en la muerte neuronal mediada por estas neurotoxinas además de la inhibición del complejo I <sup>24-27</sup>.

El paraquat es un potente herbicida no selectivo de amplio espectro, y es el segundo más comúnmente utilizado alrededor del mundo en aproximadamente 100 países. Existe controversia sobre su uso en agricultura debido a su potencial tóxico, especialmente cuando no se toman las precauciones apropiadas <sup>28</sup>. El paraquat puede ser absorbido al contacto con la piel, por lo que resulta altamente tóxico en ausencia de una barrera física de protección. La intoxicación con paraquat afecta el tracto intestinal, los pulmones, el hígado y los riñones <sup>29</sup>, y en el cerebro causa edema generalizado, hemorragia subepidermal y subaracnoidea, actividad de microglía y respuesta de astrocitos, así como inflamación de las meninges <sup>30</sup>. La toxicidad del paraquat se debe a su habilidad para entrar en un ciclo redox (reducción-oxidación), lo cual genera estrés oxidativo (Fig. 2), y subsecuentemente muerte celular <sup>31, 32</sup>.

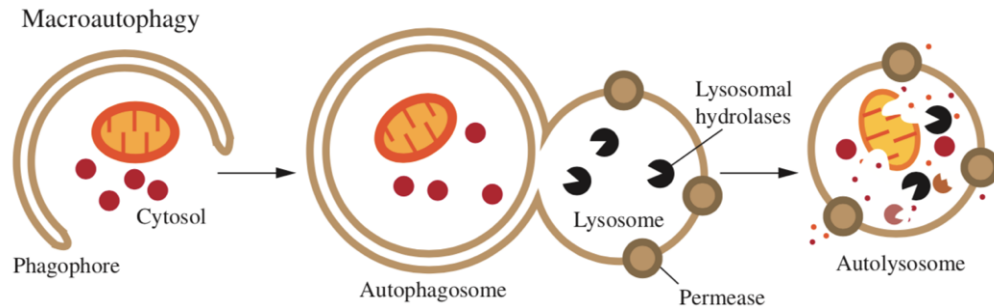


**Fig. 2. Ciclo de reducción-oxidación del paraquat.** El paraquat (PQ) se reduce para formar el radical libre de PQ, que a su vez puede reaccionar espontáneamente con el oxígeno, lo que conduce a la formación de anión superóxido. Otras especies reactivas de oxígeno (ROS) como el peroxinitrito, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo se generan durante la reducción de PQ <sup>32</sup>.

Previamente, se demostró que el paraquat tiene un efecto inhibitorio sobre el mecanismo de autofagia, lo cual incrementa la muerte de las neuronas dopaminérgicas <sup>33</sup>. La estimulación de autofagia con rapamicina logró disminuir ambos, el estrés oxidativo y la apoptosis, inducidos por paraquat. Además, disminuyó tanto la muerte de las neuronas dopaminérgicas como la activación de la microglía, ambas inducidas por el paraquat <sup>34</sup>. Por lo que la estimulación de la autofagia representa una estrategia prometedora para disminuir la pérdida neuronal y la inflamación en la SNpc.

#### **2.4 La autofagia y su relación con la EP**

La autofagia es un proceso catabólico que consiste en la degradación de componentes intracelulares como organelos y macromoléculas para su reciclaje y posterior uso como fuente de energía <sup>35</sup>. La autofagia tiene un papel importante en diferentes procesos celulares como la diferenciación, desarrollo, y respuesta celular a estrés y a otros estímulos como la falta de nutrientes <sup>36</sup>. Este mecanismo inicia con la formación de una doble membrana que se extiende alrededor de los componentes citoplásmicos, y una vez que son secuestrados dentro de una vesícula de doble membrana, la estructura se denomina autofagosoma (Fig. 3). Posteriormente, el autofagosoma se fusiona con un lisosoma formando una estructura llamada autolisosoma, cuyo contenido es degradado por las hidrolasas lisosomales. Las macromoléculas resultantes son recicladas para el mantenimiento celular <sup>37</sup>.



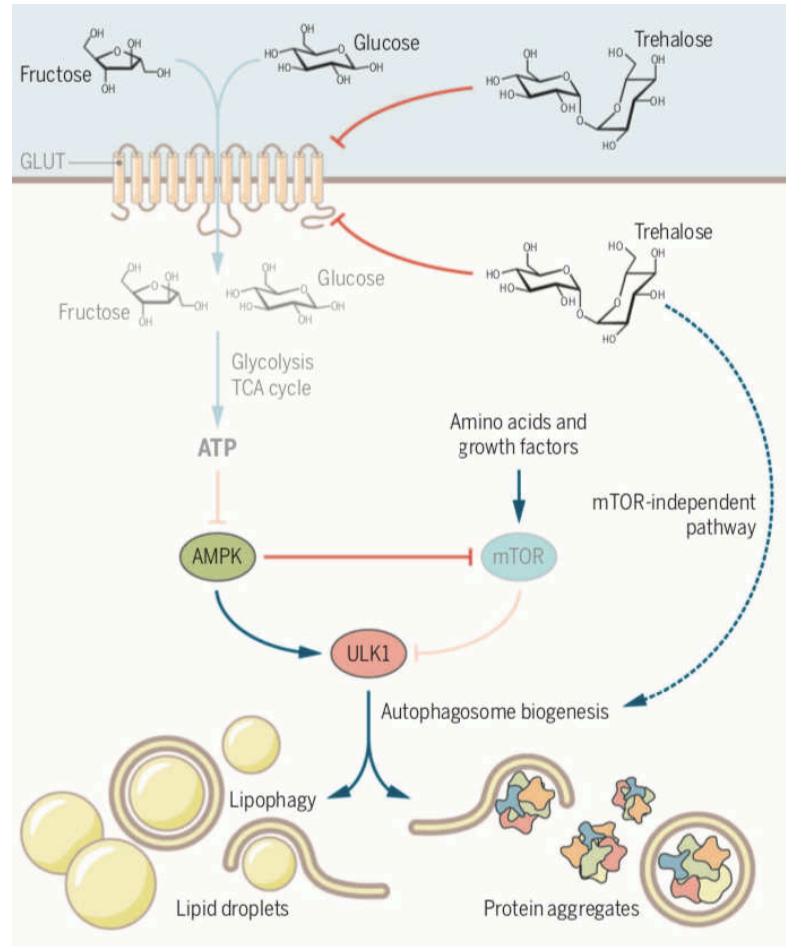
**Fig. 3. Proceso de formación de los autofagosomas.** La autofagia juega un papel importante en la supervivencia y el mantenimiento de las células a través de la degradación de organelos y el reciclaje de macromoléculas <sup>38</sup>.

En los últimos años, el papel de la autofagia ha ganado importancia en las enfermedades neurodegenerativas. Los primeros estudios que muestran su relevancia indican que cuando la autofagia es alterada específicamente en el sistema nervioso, ocurre una degeneración neuronal y agregación de proteínas poli-ubiquitinadas en cuerpos de inclusión citoplasmáticos <sup>39, 40</sup>, lo cual refleja la importancia de la autofagia en el mantenimiento neuronal. Asimismo, se han observado características morfológicas de autofagia en muestras obtenidas post-mortem de individuos con la EP <sup>41</sup>. Sin embargo, aún no está claro el papel de la autofagia en la patogénesis de esta enfermedad.

Existen diferentes moléculas con capacidad inductora de autofagia, una de las más estudiadas es la rapamicina. Sin embargo, este fármaco tiene función inmunosupresora y no se ha caracterizado su efecto a largo plazo. Por lo tanto, es importante evaluar el efecto de otras moléculas inductoras de autofagia, como la trehalosa y la metformina, sobre el estrés oxidativo y la muerte celular en un modelo de la EP.

La trehalosa es un disacárido formado de dos moléculas de glucosa, donde la unión glucosídica de tipo  $\alpha$  involucra los grupos hidroxilos de los dos carbonos anoméricos. La trehalosa induce autofagia a través de dos vías, una dependiente de mTOR y una vía alterna <sup>42, 43</sup>. Se ha demostrado que la trehalosa se une a los transportadores de glucosa (GLUT1-4 y 8), lo cual conduce a una disminución en los niveles de ATP y conlleva a la activación de autofagia a través de AMPK y ULK-1 (Fig. 4) <sup>44</sup>. La trehalosa ha mostrado efectos positivos en diferentes modelos de neurodegeneración <sup>42, 45-47</sup>, un ejemplo de ellos es un modelo murino de taupatía con parkinsonismo que sobreexpresa la proteína humana tau mutada y presenta delección de parkin (PK (- / -) / Tau (VLW)), en donde el tratamiento con la trehalosa aumentó la eliminación de proteínas anormales a través de la inducción de la autofagia, disminuyendo la pérdida de las neuronas dopaminérgicas <sup>48</sup>.

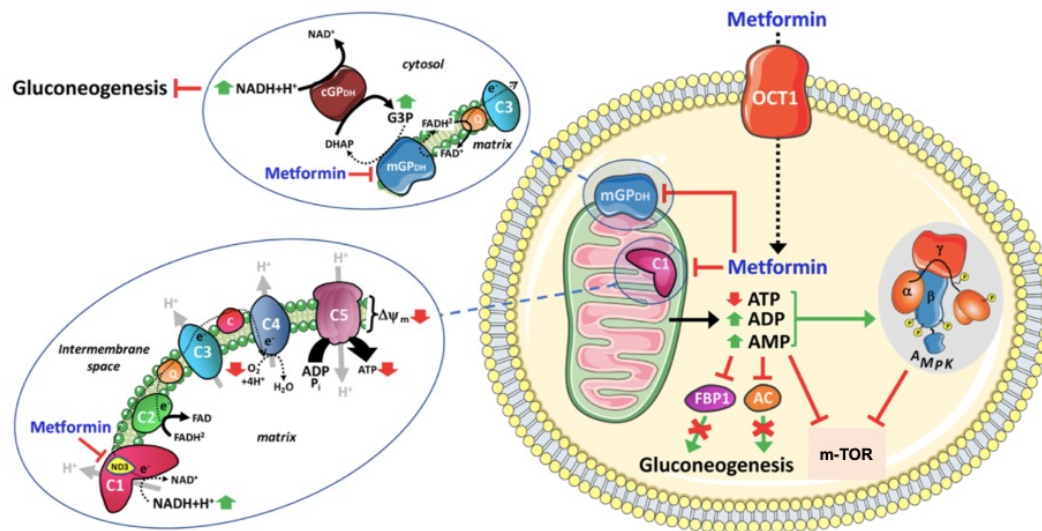




**Fig. 4. Mecanismos de inducción de autofagia mediados por la trehalosa.** La trehalosa inhibe los transportadores de glucosa (GLUT) generando un estado similar a la inanición, que activa la autofagia a través de AMPK y ULK1. Además, la trehalosa puede inducir autofagia por un mecanismo alternativo independiente de mTOR, que aún no se ha caracterizado <sup>43</sup>.

Otra de las moléculas inductoras de autofagia que ha ganado atención es la metformina, que comúnmente es utilizada para el tratamiento de la diabetes tipo 2. Hasta la fecha no se han reportado efectos secundarios notables de la metformina que afecten la calidad de vida de los pacientes; además, cada vez se le atribuyen mayores beneficios sobre la salud. La metformina induce autofagia a través de una vía dependiente de m-TOR mediante la activación de AMPK (Fig. 5) <sup>49</sup>. Su potencial benéfico se ha demostrado en modelos de

neurodegeneración, incluyendo un modelo de la EP inducido con MPTP. En este modelo se encontró que la metformina inhibe la inflamación mediada por la activación de la microglía en la SNpc, lo que podría contribuir al efecto protector de la metformina en la neurodegeneración <sup>50</sup>. En otro modelo de neurodegeneración, utilizaron ratones APP<sup>swe</sup>/PS1 $\Delta$ E9 (APP/PS1) como modelo de la enfermedad de Alzheimer, en donde demostraron que la metformina atenúo el déficit de memoria espacial y la pérdida de neuronas en el hipocampo <sup>51</sup>. Además, disminuyó la carga de placa de  $\beta$ -amiloide y la inflamación crónica en el hipocampo y la corteza de los ratones tratados con metformina <sup>51</sup>.



**Fig. 5. Mecanismo de acción de la metformina sobre la autofagia.** La metformina inhibe el complejo 1 de la cadena respiratoria y la glicerofosfato deshidrogenasa mitocondrial (mGPDH). La inhibición del complejo 1 disminuye la oxidación de NADH, el bombeo de protones a través de la membrana mitocondrial interna y la tasa de consumo de oxígeno, dando como resultado un gradiente de protones más bajo y una reducción de la síntesis de ATP <sup>52</sup>. Además, la metformina suprime la gluconeogénesis mediante la inhibición de la mGPDH <sup>53</sup>.

En el presente trabajo de investigación evaluamos el efecto de los inductores de autofagia trehalosa y metformina, en un modelo *in vitro* de la EP. La trehalosa y la metformina inducen autofagia a través de diferentes vías, y tienen un potencial prometedor como alternativas terapéuticas para el tratamiento de los pacientes con la EP.

## **CAPÍTULO 3**

### **JUSTIFICACIÓN**

Debido al potencial tan prometedor que representa la estimulación del mecanismo de autofagia, consideramos de gran importancia realizar una comparación en un modelo celular de la EP, del efecto de la inducción de autofagia por dos moléculas diferentes: la metformina, cuya vía de acción es dependiente de m-TOR, y la trehalosa que lo hace a través de dos vías, una dependiente y una vía alterna de m-TOR.

Los hallazgos derivados de este estudio permitirán establecer si las vías por las que se lleva a cabo la inducción de autofagia con estas moléculas pueden brindar diferentes alternativas terapéuticas en pacientes con la EP.

## **CAPÍTULO 4**

### **OBJETIVOS**

#### **4.1 Objetivo general**

Evaluar el efecto de diferentes inductores de autofagia en un modelo celular de la enfermedad de Parkinson.

#### **4.2 Objetivos específicos**

1. Evaluar la inducción de autofagia en respuesta a trehalosa y metformina en un modelo celular de la enfermedad de Parkinson inducido con paraquat.
2. Determinar el efecto de la trehalosa y la metformina sobre el estrés oxidativo inducido por paraquat.
3. Analizar el efecto de la trehalosa y la metformina sobre la apoptosis inducida por estrés oxidativo.

## CAPÍTULO 5

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 5.1 Diseño experimental

Para realizar el modelo *in vitro* de la enfermedad de Parkinson se utilizó la línea celular SH-SY5Y (ATCC® CRL-2266™), la cual presenta un fenotipo dopaminérgico, y es una línea secundaria clonada de la línea celular de neuroblastoma SK-N-SH (ATCC® HTB-11™) que se estableció en 1970 a partir de un tumor óseo metastásico. Para este proyecto las células se mantuvieron a una temperatura de 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> utilizando el medio de cultivo DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium / Ham's F-12 50/50 Mix) (10-092-CMR, Corning), el cual fue suplementado con suero fetal bovino (35-010-CV, Corning) al 10%, L-glutamina (25030081, Gibco) al 1%, y penicilina-estreptomicina (15240062, Gibco) al 1%. Todos los experimentos se realizaron entre el pasaje número 12 y 20.

Las células SH-SY5Y fueron pretratadas durante 1 h con trehalosa (182551000, Acros Organics) 100 mM, metformina (D150959, Sigma Aldrich) (1, 2.5, 5 y 10 mM, se evaluó una curva de concentraciones para seleccionar la concentración óptima para los siguientes experimentos) o rapamicina 10 µM, este último se utilizó como control positivo de la inducción de autofagia. Posteriormente, se adicionó el herbicida paraquat (227320010, Acros Organics) a una

concentración de 0.5 mM durante 24 o 48 h. Para monitorear el flujo de autofagia, se agregó cloroquina 40  $\mu$ M 4 h antes de cosechar las células.

## **5.2 Detección de la inducción de autofagia**

### 5.2.1 Western blot

Durante la autofagia, la forma citosólica de la proteína LC3 (identificada como LC3-I) se conjuga con el lípido fosfatidiletanolamina para formar la proteína LC3-II, la cual es reclutada en las membranas autofagosómicas tanto en la superficie interna como en la externa <sup>54</sup>. Por lo que LC3-II es considerado un marcador de la formación de los autofagosomas. Por lo tanto, para determinar la inducción de autofagia por metformina y trehalosa se evaluaron los niveles de la proteína LC3-II por western blot.

Después de realizar el tratamiento mencionado previamente, se recolectó el medio en el que se encontraban las células; se realizó un lavado con buffer de fosfatos (PBS), el cual también fue recolectado; las células fueron desprendidas del plato de cultivo utilizando tripsina, y se recolectaron junto con los componentes anteriores; después las células fueron centrifugadas a 300 g durante 5 min a 4°C. Posteriormente, se retiró el sobrenadante, las células se lisaron en un tampón de ensayo de radioinmunoprecipitación (RIPA) (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, Na<sub>2</sub>EDTA 1 mM, ácido tetra-acético etilenglicol 1 mM (EGTA), Triton X-100 al 1%) al cual se le adicionó un cóctel de inhibidores de proteasas. Las muestras se sonicaron durante 5 seg con una amplitud de 20%.

Por último, fueron centrifugadas a 14000 rpm durante 10 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante. Las concentraciones de proteínas celulares obtenidas se midieron con el kit de ensayo de proteínas BCA (23225, Thermo Scientific) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Luego, cantidades iguales de proteínas (70 µg) de cada tratamiento se sometieron a electroforesis en geles SDS-PAGE al 15% a 80 V durante 3 h y se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinilo (PVDF) a través de transferencia semi-húmeda a 120 mA durante 1 h. Después de bloquearse con 10% de leche en solución salina tamponada con Tris (TBST, pH 7.4) a temperatura ambiente durante 1 h, las membranas se incubaron con anti-LC3 de conejo (dilución 1:1000) (L7543, Sigma Aldrich) a 4°C durante toda la noche. Se realizaron 3 lavados de 10 min con TBST, y las membranas se incubaron con IgG anti-conejo conjugada con HRP (sc-2357, Santa Cruz Biotechnology) (dilución 1:2000) durante 1 h a temperatura ambiente. Luego, la actividad de la peroxidasa se visualizó utilizando el sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Pico Plus (34580, Thermo Fisher Scientific). Las densidades ópticas de las bandas con tinción inmunológica se digitalizaron con el escáner C-DiGit (LI-COR Biosciences) y se analizaron con un sistema de procesamiento y análisis de imágenes (software Image J 1.48, NIH). Como control de carga se utilizó el anticuerpo anti-β-actina conjugada con HRP (sc-47778, Santa Cruz Biotechnology) a una dilución de 1:1000.



### 5.2.2 Microscopía electrónica de transmisión (MET)

Para identificar la presencia de autofagosomas y/o autolisosomas en diferentes grados de maduración se realizó MET, la cual es considerada el estándar de oro para la evaluación del proceso de autofagia. Las células se fijaron con glutaraldehído al 2.5% en cacodilato sódico 0,1 M (pH 7,4) durante 2 h a temperatura ambiente. Las células fijadas se recolectaron y se fijaron posteriormente con tetraóxido de osmio ( $\text{OsO}_4$ ) al 1% en cacodilato sódico 0.1 M y se contrastaron con nitrato de uranilo al 1%. Las células se deshidrataron a través de una serie gradual de acetona y se incluyeron en la resina Epon 812 (14120, Electron Microscopy Sciences) para la realización de los cortes finos. Se observó la ultraestructura de las células bajo un microscopio electrónico de transmisión (EM 109, Carl Zeiss) y las imágenes se obtuvieron con una cámara de 35-75 mm.

## 5.3 Análisis del estrés oxidativo

### 5.3.1 Detección de especies reactivas de oxígeno citoplasmáticas

Como se mencionó previamente el paraquat entra en un ciclo redox, lo cual genera estrés oxidativo, que es uno de los factores responsables del inicio y la progresión de la EP<sup>12, 31</sup>. Por lo que se decidió evaluar el efecto de la trehalosa y la metformina sobre el estrés oxidativo en el modelo de la EP mediante el uso de la sonda fluorescente dihidroetidio (DHE), el cual al ser oxidado emite fluorescencia.

Las células se trataron y cosecharon como previamente se describe, y se centrifugaron a 300 g durante 5 min a 4°C. Después se retiró el sobrenadante, y las células fueron resuspendidas en PBS e incubadas con DHE a una concentración de 0.5  $\mu$ M durante 15 min. Por último, se realizó el conteo de células positivas para DHE utilizando el equipo Muse™ Cell Analyzer (Millipore). Como control positivo se utilizó peróxido de hidrógeno 20 mM durante 15 min.

### 5.3.2 Detección de peroxirredoxinas hiperoxidadas

También se analizaron alteraciones en el estado redox de las peroxirredoxinas (Prxs), que consisten en un grupo de proteínas antioxidantes, capaces de reducir peróxido de hidrógeno, peroxinitrito y otros peróxidos orgánicos que producen daño celular <sup>55</sup>. 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-SO<sub>2</sub>H), e incluso ésta a su vez puede ser hiper-oxidada a Cys-ácido sulfónico (Cys-SO<sub>3</sub>H). Las Prxs hiper-oxidadas representan formas inactivas, por lo que reflejan un ambiente altamente oxidante <sup>55, 56</sup>. El análisis se realizó mediante inmunofluorescencia con un anticuerpo específico para detectar la hiper-oxidación de las Prxs (PrxSO<sub>3</sub>) y DAPI como marcador nuclear.

Después de haber realizado el tratamiento mencionado previamente, se les retiró el medio a las células y éstas fueron lavadas con PBS, luego fueron fijadas con metanol frío. Posteriormente, se realizó la permeabilización de la membrana con PBS + Tritón x100 al 0.1%, seguido del paso de bloqueo con suero de caballo al 10%. Las células fueron incubadas con el anticuerpo primario anti- PrxSO<sub>3</sub> (ab16830, Abcam) a una dilución de 1:1000 durante toda la noche a 4°C. Después de realizar 2 lavados con PBS + Tritón x100 al 0.1%, las células se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo Alexa Fluor 488 (ab150081, Abcam) (dilución 1:2000) durante 2 h a temperatura ambiente en oscuridad, seguido de 2 lavados con PBS. Por último, las células fueron incubadas con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) a una concentración de 100 ng/mL durante 15 min y fueron montadas con glicerol.

#### **5.4 Evaluación de la función mitocondrial**

Se evaluó la función mitocondrial con el ensayo de MTT. El bromuro de metiltiazolildifenil-tetrazolio (MTT, por sus siglas en inglés) es una sal de tetrazolio soluble en agua y de color amarillo, al reducirse el MTT se convierte en formazano, el cual es de color violeta e insoluble en agua. Se considera que la acción de reducción sobre el MTT se debe principalmente a las deshidrogenasas mitocondriales, en particular la succinato deshidrogenasa. Para este ensayo, después de realizar el tratamiento mencionado previamente por 48 h, a las células se les agregó el MTT (M2128, Sigma Aldrich) a una concentración de 5 mg/mL y se incubaron durante 2 h a 37°C. Posteriormente,

se retiró el medio de las células y se les agregó el solvente de MTT (HCl 4 mM, 0,1% de Nonidet P-40 (NP 40), todo disuelto en isopropanol). Luego, las células se llevaron a agitación hasta que los cristales de formazano se disolvieron por completo. Por último, se midió la absorbancia a 590 nm en un lector de placas.

### **5.5 Análisis de la viabilidad celular**

El efecto de la inducción de la autofagia con metformina y trehalosa sobre la viabilidad se evaluó por exclusión de captación utilizando el azul tripano. El azul tripano es un colorante que posee la capacidad de teñir las células muertas, ya que no puede penetrar y por lo tanto teñir a las células vivas que tienen su membrana íntegra.

Una vez realizado el tratamiento mencionado previamente, después de 48 h de incubación, las células fueron lavadas con PBS y tripsinizadas. Una vez obtenidas las células en suspensión, éstas fueron centrifugadas a 300 g a 4°C durante 5 min, se retiró el sobrenadante y fueron resuspendidas en PBS. Las células obtenidas fueron mezcladas con el colorante azul tripano en una proporción de 1:1. La viabilidad fue cuantificada con el contador automático de células TC20™ (Bio Rad).

## 5.6 Análisis estadístico

Se utilizó la prueba de ANOVA de un solo sentido y/o la prueba t de Student para determinar la significancia estadística entre grupos ( $p < 0.05$ ). Los datos fueron analizados utilizando el programa GraphPad Prism 7 pro. Los resultados se presentan como medias  $\pm$  1 desviación estándar (DS).

## CAPÍTULO 6

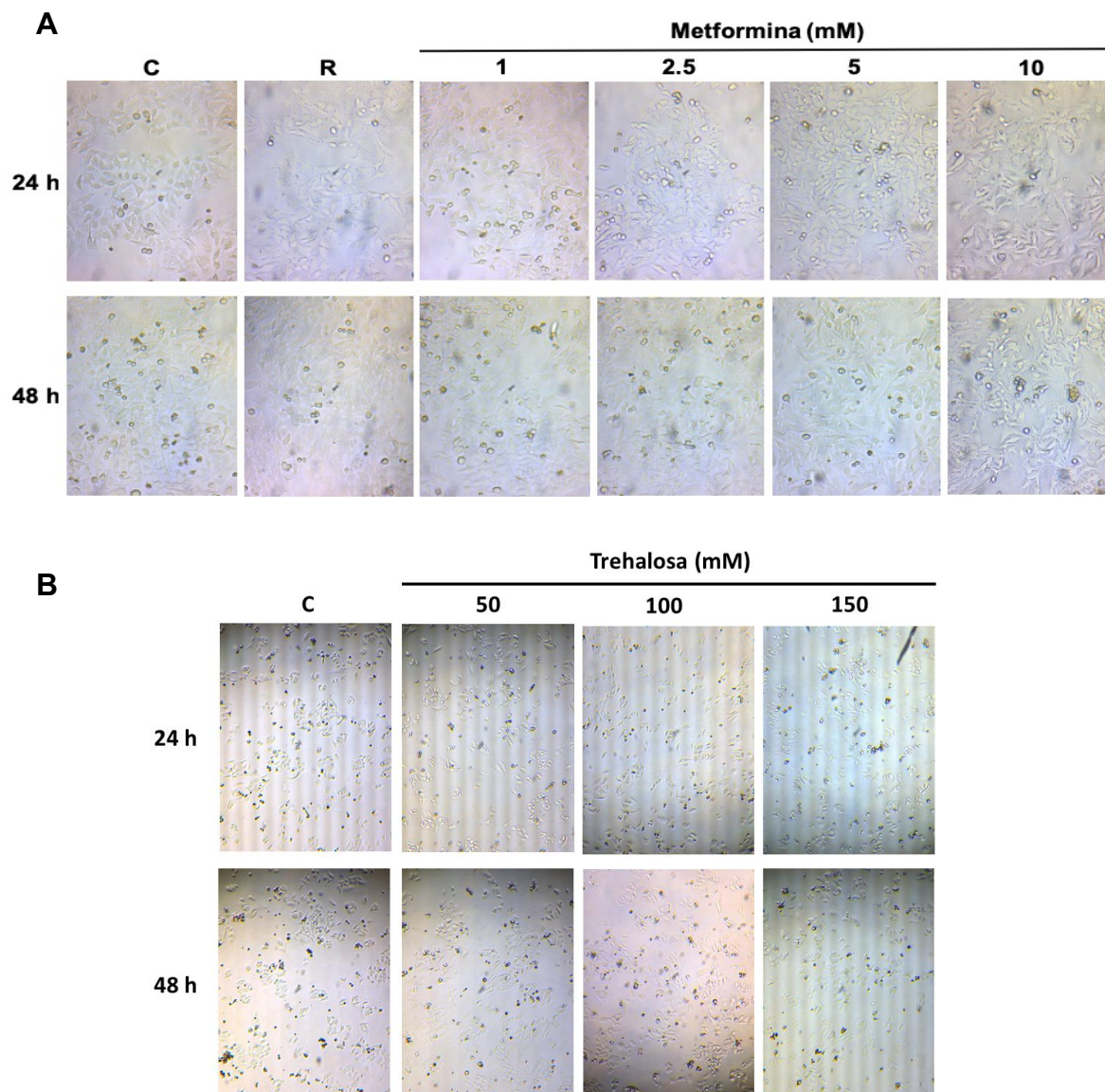
### RESULTADOS

#### 6.1 Evaluación de la inducción de autofagia

##### 6.1.1 La Metformina y la trehalosa inducen autofagia sin afectar la viabilidad celular

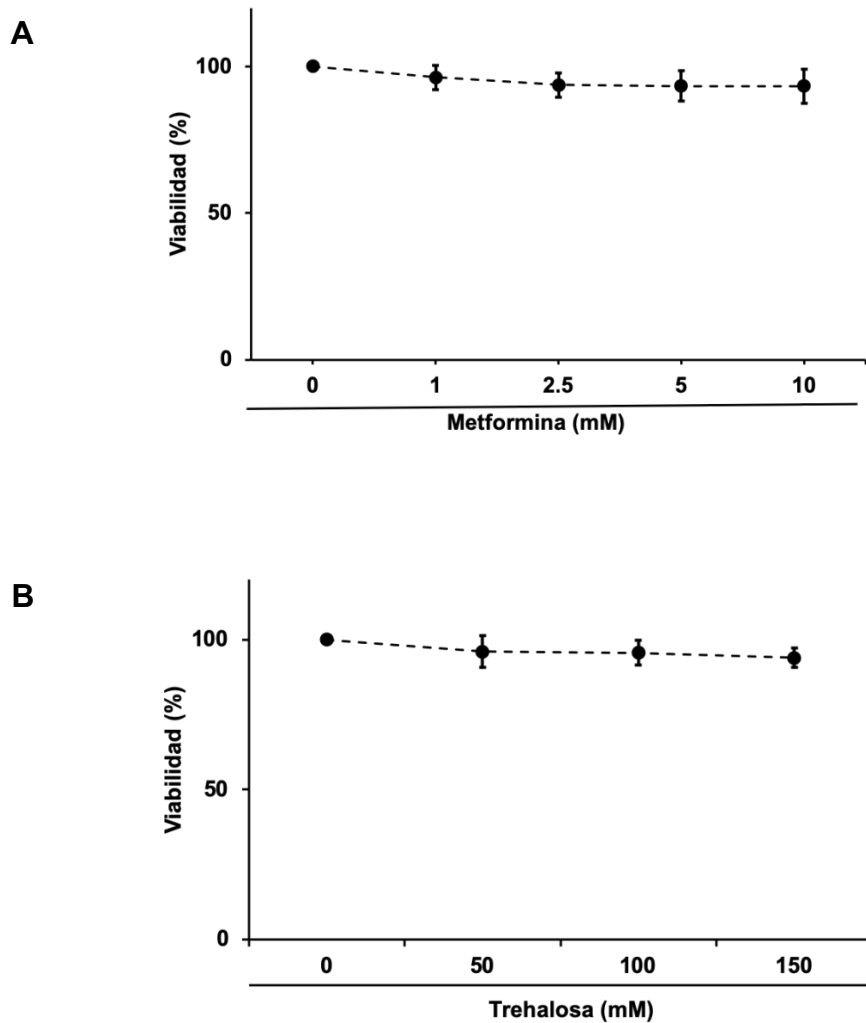
Primeramente, se evaluó el efecto de los inductores de autofagia en las células de fenotipo dopaminérgico SH-SY5Y, las cuales fueron tratadas con metformina (1, 2.5, 5 y 10 mM), trehalosa (50, 100 y 150 mM) o rapamicina (10  $\mu$ M), como control positivo, para inducir la autofagia. Para establecer la dosis óptima de los inductores para activar la autofagia sin mostrar efectos tóxicos, se evaluaron la morfología y la viabilidad de las células.

La morfología se evaluó mediante la observación directa de los cultivos celulares a través de un microscopio invertido (Fig. 6). La morfología de las células se mantuvo sin cambios en respuesta a las diferentes concentraciones tanto de metformina (Fig. 6A) como de trehalosa (Fig. 6B), y con respecto al control, que no recibió ningún tratamiento, y a la rapamicina (control positivo). La mayoría de las células se observaron adheridas al plato de cultivo, con forma ahusada y ramificaciones citoplasmáticas; en una menor proporción se observaron células flotantes de forma redondeada, las cuales representan los niveles basales de muerte celular.



**Fig. 6. La metformina y trehalosa no afectan la morfología celular.** Fotomicrografías de las células SH-SY5Y que fueron tratadas con los inductores de autofagia (A) metformina, (B) trehalosa, y rapamicina (10  $\mu$ M) durante 24 y 48 h. C control, R rapamicina.

Posteriormente, se evaluó la viabilidad con el colorante azul tripano, la viabilidad no se afectó de manera significativa en respuesta a la metformina (Fig. 7A) o la trehalosa (Fig. 7B) después de 48 h de tratamiento. Estos resultados indican que ninguna de las concentraciones evaluadas de metformina y trehalosa es tóxica para las células.

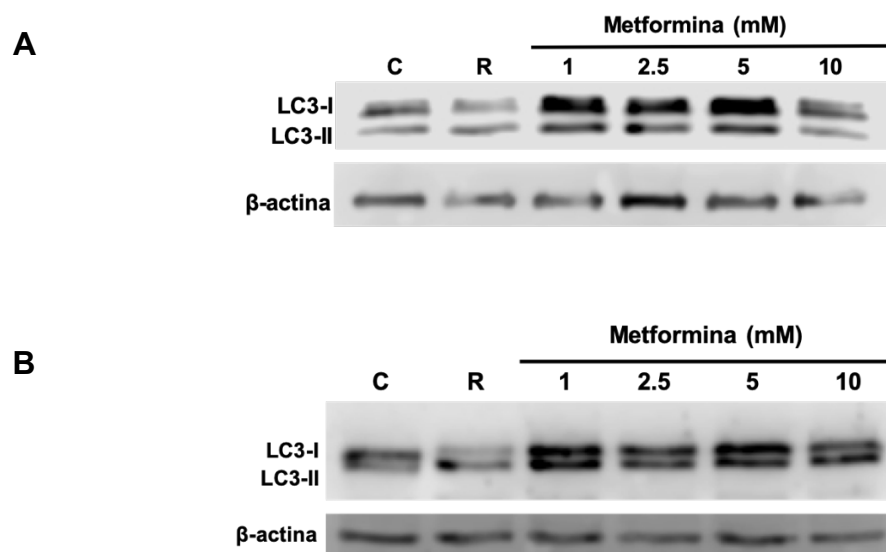


**Fig. 7. La metformina y trehalosa no afectan la viabilidad celular.** Evaluación de la viabilidad celular con azul tripano después de 48 h de tratamiento con (A) metformina, o (B) trehalosa. La viabilidad se representa como porcentaje de células vivas, normalizado con respecto al control negativo (sin tratamiento).

Después de verificar que las diferentes concentraciones de metformina y trehalosa no afectan la morfología y la viabilidad celular, quisimos establecer la dosis óptima para la inducción de autofagia, para lo cual se obtuvieron los extractos de proteína y se evaluó el marcador de autofagia LC3-II mediante western blot. Observamos que tanto a las 24 como a las 48 h de tratamiento con metformina a una concentración de 1 mM, se incrementó el marcador de



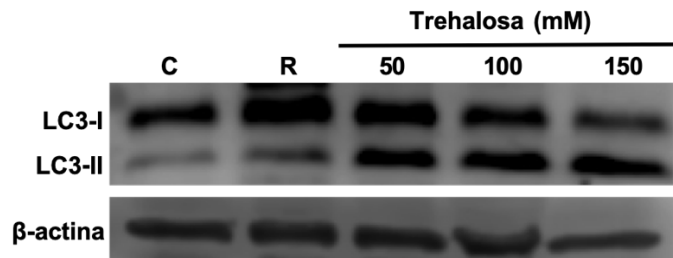
autofagia LC3-II, como se observa en la figura 8. Los niveles de LC3-II se mantuvieron similares o disminuyeron en respuesta a concentraciones crecientes de metformina, por lo que determinamos que la concentración de metformina de 1 mM es la óptima para inducir autofagia, debido a que es la mínima concentración en la que hay un incremento considerable de LC3-II, en comparación con la rapamicina, tanto a las 24 h (Fig. 8A) como a las 48 h (Fig. 8B), y como mostramos anteriormente, no afecta la morfología ni la viabilidad celular.



**Fig. 8. La metformina induce autofagia.** Análisis mediante western blot de la proteína LC3-II, en respuesta a los inductores de autofagia metformina y rapamicina (10  $\mu$ M). El tratamiento con los inductores de autofagia se realizó durante 24 h (A) y 48 h (B). C control, R rapamicina.

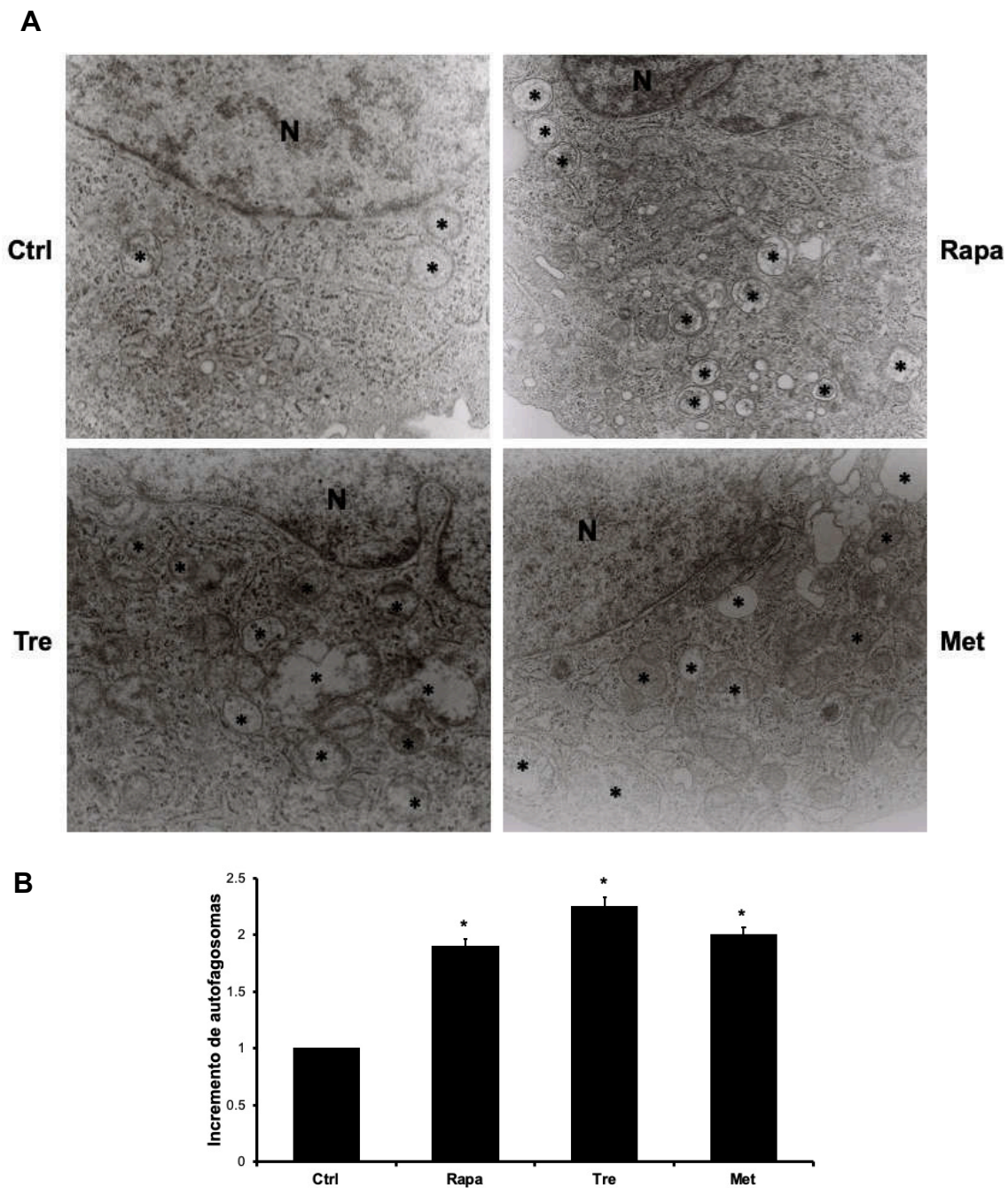
También observamos que efectivamente la trehalosa incrementa la conversión de LC3-I a LC3-II de manera dependiente de la dosis a las 48 h de tratamiento (Fig. 9). Esto confirmó la inducción de autofagia por parte de la trehalosa, ya

que la dosis de trabajo de 100 mM se eligió en base a un artículo publicado previamente por nuestro grupo de trabajo <sup>33</sup>.



**Fig. 9. La trehalosa induce autofagia.** Análisis mediante western de la proteína LC3-II, en respuesta a los inductores de autofagia trehalosa y rapamicina (10  $\mu$ M). El tratamiento con los inductores de autofagia se realizó durante 48 h. C control, R rapamicina.

Por otro lado, se evaluó la presencia de vesículas autofágicas en diferentes grados de maduración a través de MET después del tratamiento con los inductores de autofagia: trehalosa (100 mM), metformina (1 mM) o rapamicina (10  $\mu$ M), como se observa en la figura 10A. Se identificaron estructuras de doble membrana con contenido heterogéneo (autofagosomas) y de membrana sencilla (autolisosomas). Además, se cuantificaron las células con presencia de vesículas autofágicas, y se realizó una normalización con respecto al control. Se observó un incremento en el número de vesículas autofágicas en respuesta a los inductores de autofagia trehalosa, metformina y rapamicina, en comparación con el control (sin tratamiento) (Fig. 10B).



**Fig. 10. La metformina y la trehalosa inducen la formación de autofagosomas y autolisosomas.** (A) Micrografías electrónicas, 12000x. Se analizaron células que no recibieron ningún tratamiento (Ctrl) o que fueron tratadas con metformina (1 mM), trehalosa (100 mM) o rapamicina (10  $\mu$ M) durante 24 h. (B) Representación del incremento de autofagosomas, para el cual se cuantificaron un total de 50 células por tratamiento mediante MET, y se realizó una normalización con respecto al control. Ctrl control, Rapa rapamicina, Tre trehalosa, Met metformina, N núcleo, los asteriscos (\*) señalan la presencia de vesículas autofágicas.

Adicionalmente, se realizó la cuantificación del número de autofagosomas por célula y se obtuvo el rango de autofagosomas que se encontraban presentes en el citoplasma de las células (Tabla I). Las células que fueron tratadas con trehalosa tenían un mayor número de autofagosomas (hasta 26 autofagosomas/célula) en comparación con las células que recibieron los demás tratamientos, incluso llegaron a presentar más del doble de autofagosomas por célula que el control positivo de autofagia rapamicina (hasta 12 autofagosomas/célula).

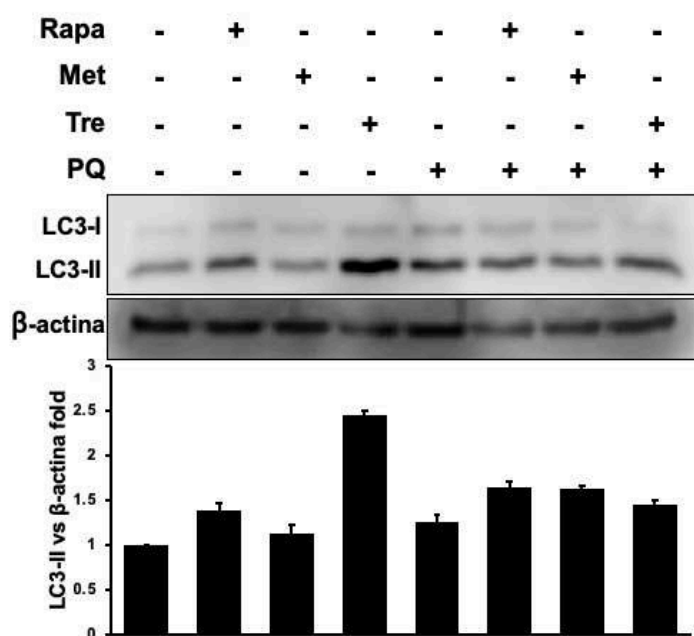
TABLA I  
CUANTIFICACIÓN DE AUTOFAGOSOMAS POR CÉLULA

Tratamiento	Rango de autofagosomas/célula
Control	1 - 6
Rapamicina	2 - 12
Trehalosa	3 - 26
Metformina	2 - 14

### 6.1.2 La metformina y la trehalosa incrementan la autofagia en el modelo de la EP

Después de comprobar que la metformina y la trehalosa inducen autofagia en las células con fenotipo dopaminérgico, se procedió a evaluar si estas moléculas inductoras de autofagia reestablecían el flujo de la autofagia en el modelo de la EP, debido a que el PQ ocasiona una inhibición de la autofagia <sup>57</sup>.

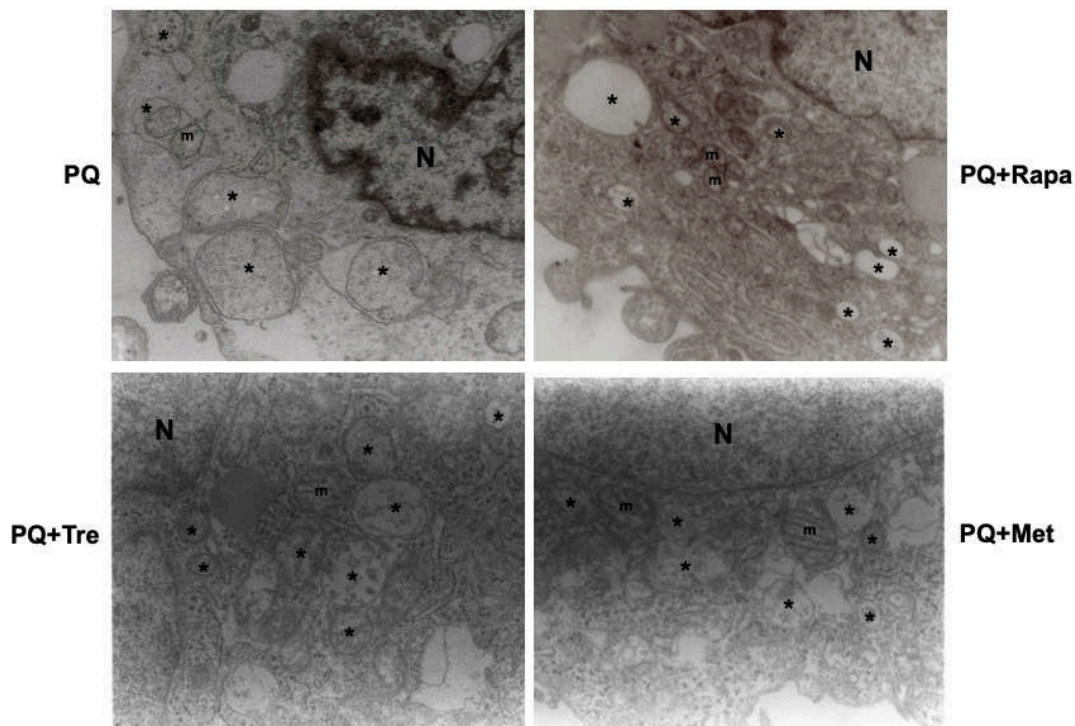
Para evaluar la inducción de autofagia en el modelo de la EP se detectó la proteína LC3-II por western blot, y se observó que en las células que fueron pretratadas con los inductores de autofagia rapamicina, metformina y trehalosa, hubo un incremento en la señal de la proteína LC3-II en comparación con las células que fueron tratadas únicamente con el PQ (Fig. 11).



**Fig. 11. La metformina y la trehalosa aumentan la autofagia en el modelo de la EP.** Análisis mediante western de la proteína LC3-II en respuesta a los inductores de autofagia metformina (1 mM), trehalosa (100 mM) y rapamicina (10  $\mu$ M) en ausencia y presencia de PQ durante 24 h. Rapa rapamicina, Met metformina, Tre trehalosa, PQ paraquat. El análisis densitométrico se normalizó con respecto a la  $\beta$ -actina.

También se evaluó el efecto de los inductores de autofagia en el modelo celular de la EP a través de MET (Fig. 12). En las células tratadas únicamente con PQ se observaron autofagosomas de gran tamaño con contenido de aspecto heterogéneo y mitocondrias dañadas, indicativo de una inhibición del flujo de autofagia. En las células que fueron pretratadas con trehalosa, metformina y rapamicina antes de la exposición al PQ, se observaron autofagosomas en

diferentes grados de maduración y mitocondrias mejor preservadas, debido a que hay una pre-estimulación de autofagia antes de inducir el daño con PQ, lo que sugiere que hay un restablecimiento del flujo de autofagia y disminución de las alteraciones producidas por el PQ.



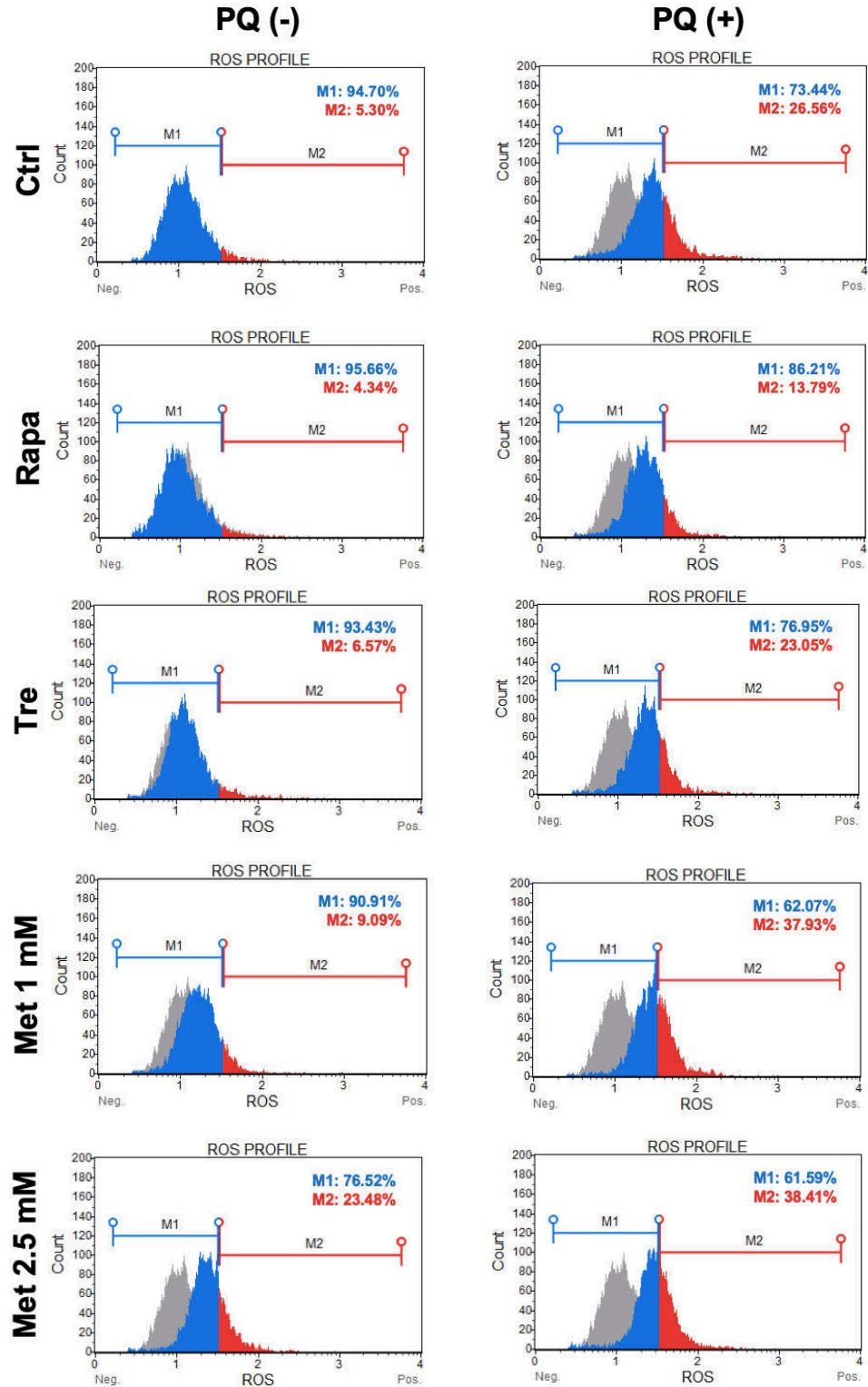
**Fig. 12. La inducción de autofagia disminuye el daño mitocondrial inducido en el modelo de la EP.** Micrografías electrónicas, 12000x. Se analizaron células tratadas con paraquat (PQ) en ausencia o presencia de los inductores de autofagia trehalosa (Tre), metformina (Met) o rapamicina (Rapa) durante 24 h. Los asteriscos (\*) señalan la presencia de vesículas autofágicas, N núcleo, m mitocondria.

## **6.2 Evaluación del efecto de la metformina y la trehalosa sobre el estrés oxidativo**

### 6.2.1 La metformina y la trehalosa no disminuyen el estrés oxidativo citoplasmático en el modelo de la EP

Se evaluó el efecto de la metformina y la trehalosa sobre el estrés oxidativo inducido por PQ, para ello se analizó la generación de ROS en el compartimento citosólico mediante el uso de la sonda fluorescente dihidroetidio (DHE, por sus siglas en inglés), el cual una vez que es oxidado a etidio se intercala en el ADN y exhibe una fluorescencia roja brillante. La oxidación del DHE fue monitoreada por citometría de flujo como se muestra en la Fig. 13.

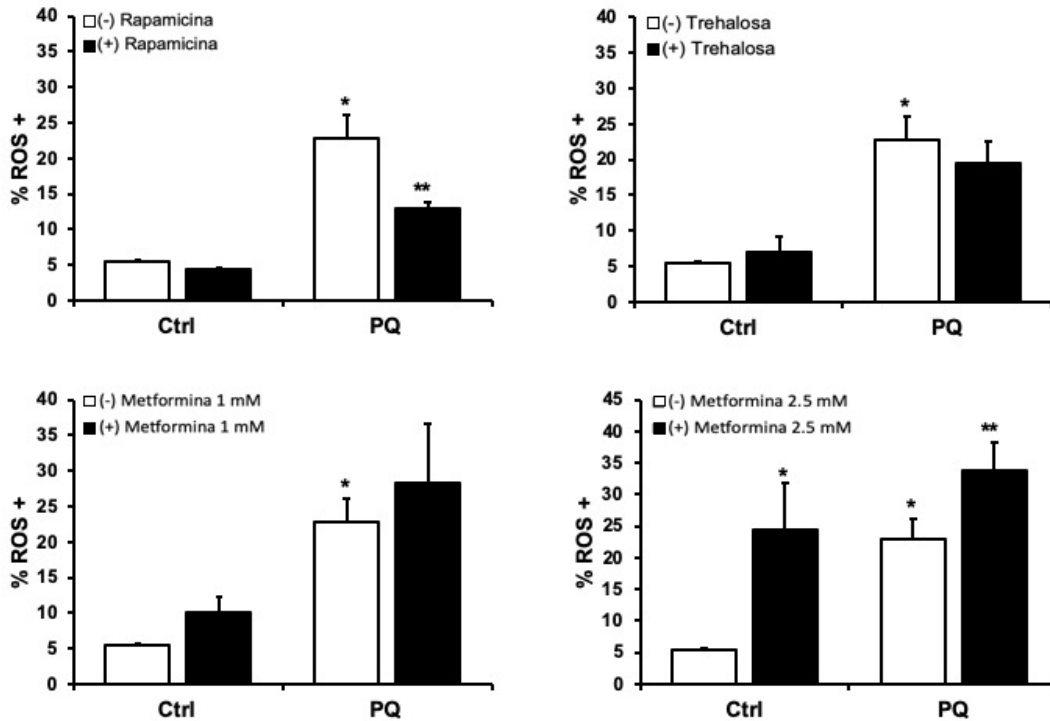
Como control positivo se utilizó la rapamicina para inducir autofagia, la cual tuvo un efecto antioxidante sobre el estrés oxidativo inducido por el PQ, como previamente se reportó <sup>58</sup>. La inducción de autofagia con trehalosa y metformina no disminuyeron el estrés oxidativo producido en el modelo de la EP. Además, la metformina a la concentración de 1 mM incrementó el estrés oxidativo en nuestro modelo, por lo que se decidió utilizar la concentración de 2.5 mM esperando poder observar un efecto antioxidante, pero por el contrario, esta concentración de metformina indujo un notable incremento del estrés oxidativo basal y del inducido por el PQ (Fig. 13 y 14).



**Fig. 13. Evaluación del efecto de la metformina y la trehalosa sobre el estrés oxidativo citoplasmático inducido por PQ.** La autofagia fue pre-estimulada con rapamicina (10  $\mu$ M), trehalosa (100 mM) o metformina (1 mM y 2.5 mM) durante 1 h, seguido del tratamiento con PQ (0.5 mM) por 24 h adicionales. Se cosecharon las



células y se incubaron con DHE (1  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) durante 15 min. Después se analizaron por citometría de flujo. Se muestran histogramas representativos, en donde el sombreado de color gris corresponde al control (sin tratamiento). Rapa rapamicina, Tre trehalosa, Met metformina, PQ paraquat.



**Fig. 14. La metformina y la trehalosa no disminuyen el estrés oxidativo citoplasmático en el modelo de la EP.** Las gráficas representan el porcentaje de células positivas para especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales fueron detectadas por citometría de flujo utilizando la sonda fluorescente dihidroetidio (DHE).

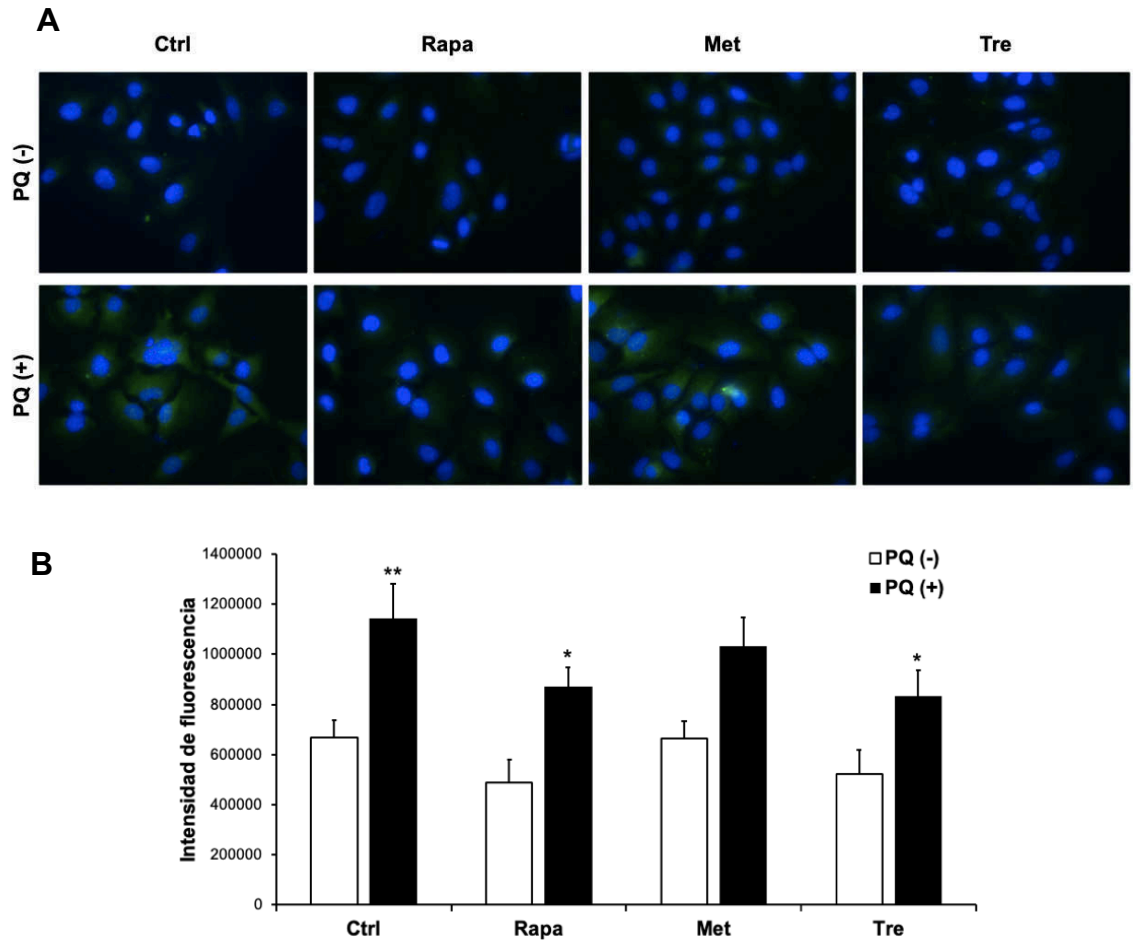
### 6.2.2 La trehalosa disminuye la hiperoxidación de las peroxirredoxinas

Asimismo, se analizó el efecto de los inductores de autofagia sobre las alteraciones inducidas por PQ en el estado redox de las peroxirredoxinas (Prxs), que consisten en un grupo de proteínas antioxidantes capaces de

reducir peróxido de hidrógeno, peroxinitrito y otros peróxidos orgánicos que producen daño celular.

Analizamos la hiperoxidación de las Prxs, la cual refleja un ambiente altamente oxidante. Para ello se realizó una inmunofluorescencia con un anticuerpo específico para la detección de la hiperoxidación de las Prxs (PrxSO<sub>3</sub>), la positividad para este marcaje se observó como una señal de color verde en el citoplasma celular y para marcar el núcleo celular se utilizó DAPI, el cual se observó de color azul, como se muestra en la Fig. 15A.

Se cuantificó la intensidad de la fluorescencia de la inmunodetección de la PrxSO<sub>3</sub>. Los tratamientos con rapamicina, metformina, y trehalosa no afectaron los niveles basales de estrés oxidativo. En contraste, el tratamiento con PQ ocasionó un incremento significativo en la señal positiva para PrxSO<sub>3</sub> en comparación con el control sin tratamiento. Como control positivo se utilizó la rapamicina, que previamente se reportó que disminuye la hiperoxidación de las Prxs inducida por PQ <sup>58</sup>. Las células que recibieron el tratamiento con metformina no mostraron una disminución significativa en la PrxSO<sub>3</sub> inducida por PQ. Sin embargo, la trehalosa disminuyó de manera significativa la hiperoxidación de las Prxs mediada por PQ (Fig. 15B).



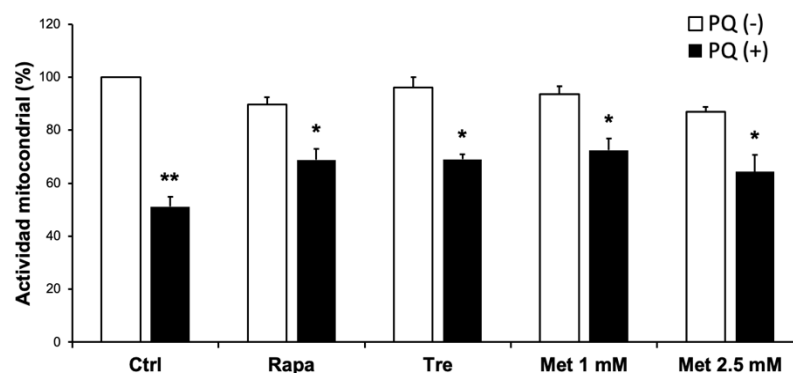
**Fig. 15. La trehalosa disminuye la hiperoxidación de las peroxirredoxinas.** (A) Fotomicrografías representativas de células tratadas con rapamicina (10  $\mu$ M), metformina (1 mM), o trehalosa (100 mM) en ausencia o presencia de PQ. Después de 24 h de tratamiento, las células fueron marcadas con un anticuerpo específico para detectar la hiperoxidación de las Prxs (PrxSO<sub>3</sub>) y DAPI como marcador nuclear. (B) En la gráfica se muestra la intensidad de la fluorescencia de PrxSO<sub>3</sub> en respuesta a cada tratamiento. Rapa rapamicina, Met metformina, Tre trehalosa, PQ paraquat.

### 6.3 Evaluación del efecto de la trehalosa y la metformina sobre la toxicidad inducida por PQ

#### 6.3.1 La trehalosa y la metformina ejercen un efecto de protección sobre la toxicidad mediada por PQ

Debido a que el principal blanco del PQ dentro de la célula es la mitocondria, se evaluó el efecto de la autofagia inducida por trehalosa y metformina sobre la actividad mitocondrial mediante el ensayo de MTT.

Las células que fueron tratadas con PQ tuvieron una actividad mitocondrial significativamente menor en comparación con el control, mientras que cuando se estimuló la autofagia con rapamicina, trehalosa y metformina antes del tratamiento con PQ, la actividad mitocondrial se incrementó de manera significativa, indicando que hay un efecto de protección sobre las células dopaminérgicas en el modelo de la EP (Fig. 16).



**Fig. 16. La toxicidad mediada por PQ es disminuida mediante la inducción de autofagia con trehalosa y metformina.** Se evaluó la actividad mitocondrial en respuesta a los inductores de autofagia rapamicina (10  $\mu$ M), trehalosa (100 mM) y metformina (1 mM y 2.5 mM), en ausencia y presencia de PQ después de 48 h. Rapa rapamicina, Tre trehalosa, Met metformina, PQ paraquat. El porcentaje de la actividad mitocondrial se normalizó con respecto al control (sin tratamiento).

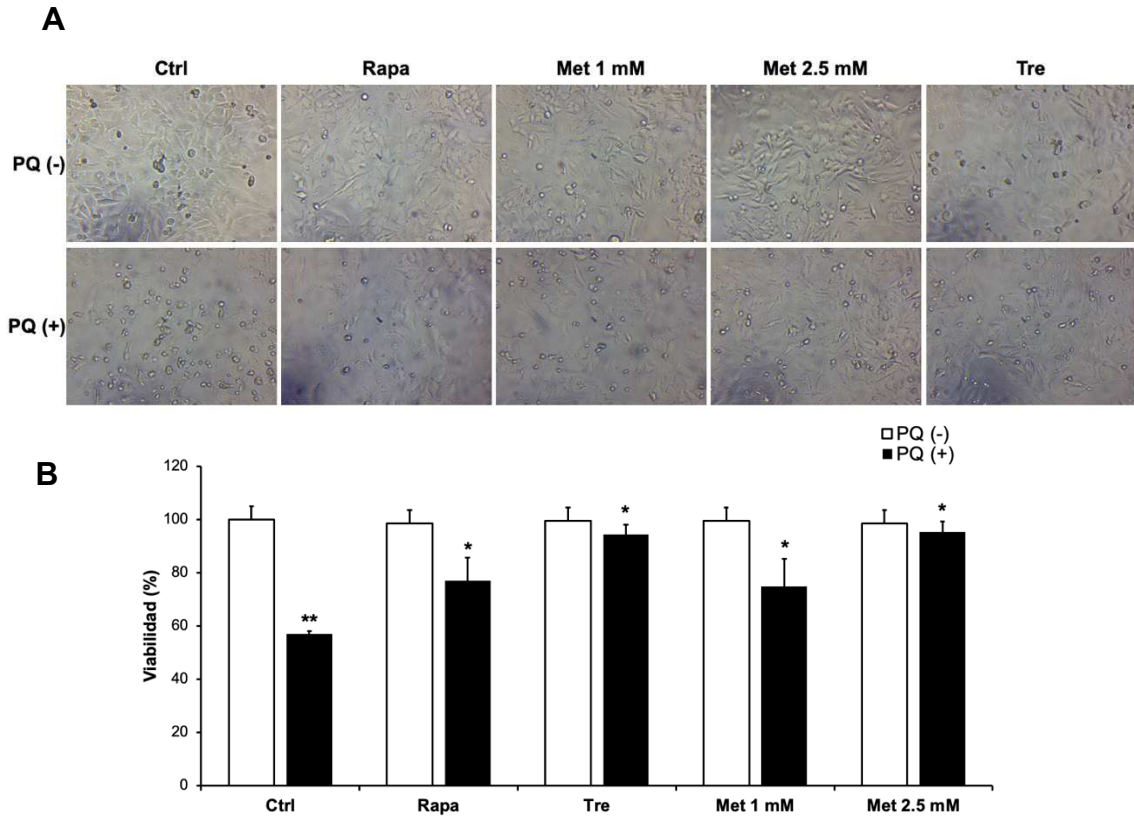
### 6.3.2 La trehalosa y metformina incrementan la viabilidad de las células dopaminérgicas en el modelo de la EP

Una vez que se observó que al inducir autofagia con trehalosa y metformina había un efecto de protección sobre las células en el modelo de la EP, al incrementarse la actividad mitocondrial, se procedió a evaluar la viabilidad de las células mediante el método de azul tripano.

Después de 48 h de tratamiento se evaluó la morfología celular directamente del plato de cultivo, a través de un microscopio invertido. Las células del control sin tratamiento se observaron en su mayoría adheridas al plato de cultivo con forma ahusada y ramificaciones citoplasmáticas, y en una menor proporción se observaron células de forma redondeada flotando en el medio de cultivo (correspondiente a la muerte basal). Las células tratadas con PQ se observaron en su mayoría de forma redondeada y flotando en el medio de cultivo. Cuando las células recibieron tanto el tratamiento con los inductores de autofagia como con el PQ, se observó una disminución en la cantidad de células flotantes y se preservó la morfología celular observada en el control (Fig. 17A).

Mediante el método de azul tripano se confirmaron los resultados descritos previamente. El PQ disminuyó el porcentaje de viabilidad en comparación con el control sin tratamiento, y esta viabilidad se incrementó de manera significativa al utilizar los inductores de autofagia, indicando que hay un efecto de protección

sobre la toxicidad inducida por PQ al incrementarse la viabilidad celular (Fig. 17B).



**Fig. 17. La inducción de autofagia incrementa la viabilidad de las células dopaminérgicas en un modelo de la EP. (A)** Fotomicrografías representativas de células tratadas con los inductores de autofagia rapamicina (10  $\mu$ M), trehalosa (100 mM), y metformina (1 mM y 2.5 mM) en ausencia y presencia de PQ durante 48 h. **(B)** Porcentaje de viabilidad normalizado con respecto al control. Rapa rapamicina, Tre trehalosa, Met metformina, PQ paraquat.

## CAPÍTULO 7

### DISCUSIÓN

La EP es un trastorno neurodegenerativo caracterizado por la pérdida selectiva de neuronas dopaminérgicas, daño mitocondrial, estrés oxidativo y alteración de las vías de degradación de proteínas mediadas por el proteosoma y la autofagia. La autofagia desempeña un papel esencial en el mantenimiento neuronal, ya que un deterioro de la autofagia conduce a la neurodegeneración y su estimulación tiene un efecto protector <sup>35, 39, 58</sup>. Por lo tanto, es crucial estudiar el potencial efecto neuroprotector de diferentes moléculas inductoras de autofagia.

La rapamicina es el inductor de autofagia mejor caracterizado hasta la fecha, se ha reportado que la inducción de la autofagia con este inductor disminuye tanto el estrés oxidativo como la muerte de células dopaminérgicas en un modelo de la EP inducido con PQ <sup>58</sup>. La desventaja de esta molécula es que actúa como un inmunosupresor. Por lo tanto, es importante evaluar el efecto de otras moléculas inductoras de autofagia como la metformina y la trehalosa en un modelo celular de la EP. La metformina se utiliza como un tratamiento a largo plazo en los pacientes con diabetes tipo 2 y la trehalosa es un disacárido formado por dos moléculas de glucosa, por lo que consideramos que estas moléculas no causarán efectos adversos durante su utilización por tiempos prolongados. En este proyecto se reporta que tanto la metformina (1, 2.5, 5 y

10 mM) como la trehalosa (50, 100 y 150 mM) no son tóxicas sobre las células dopaminérgicas.

Previamente se ha reportado la capacidad de inducción de autofagia por parte de la metformina y la trehalosa <sup>59, 60</sup>, lo cual fue comprobado al observar un incremento de la proteína LC3-II por western blot, así como de la presencia de autofagosomas en diferentes grados de maduración en las células que fueron tratadas con estas moléculas.

En el modelo de la EP inducido con PQ hay un efecto inhibitorio sobre el mecanismo de autofagia, lo que ocasiona daño sobre las células dopaminérgicas <sup>33</sup>. Este efecto ocasionado sobre la autofagia por el PQ se previene al inducir la autofagia con trehalosa y metformina. Observamos un incremento en los niveles de la proteína LC3-II en el análisis por western blot, en comparación con las células que fueron tratadas únicamente con el PQ. Además, mediante MET se observó que cuando se hizo el pretratamiento con los inductores de autofagia en el modelo de la EP, la morfología de los autofagosomas fue muy similar a la de las células que no recibieron ningún tipo de tratamiento. Estos hallazgos coinciden con lo reportado previamente por nuestro grupo de trabajo, cuando se realizó la inducción de autofagia con la rapamicina en un modelo de la EP inducido con PQ <sup>58</sup>.

La autofagia promueve la supervivencia de las neuronas a través de la degradación y el reciclaje del contenido intracelular en condiciones no



favorables para las células, por ejemplo, en presencia de estrés oxidativo <sup>60</sup>. Al estimular la autofagia con la metformina y la trehalosa en el modelo de la EP inducido con PQ, no se observó un efecto antioxidante sobre las especies reactivas de oxígeno en el citoplasma, a diferencia de lo reportado en otros estudios, en donde ambos inductores de autofagia disminuyeron el estrés oxidativo <sup>50, 61</sup>. Sin embargo, en respuesta a la trehalosa observamos una disminución en la hiperoxidación de las peroxirredoxinas mediada por PQ. Aunque estos resultados parecen contradictorios, pueden deberse a que el estrés oxidativo está dado tanto por especies reactivas de oxígeno como de nitrógeno, y estas últimas no son detectadas con el DHE. Además, con el DHE sólo se analizó el estrés oxidativo del citoplasma, y es importante evaluar el estrés oxidativo mitocondrial, ya que la mitocondria es el principal blanco del PQ y en donde se genera el estrés oxidativo.

Cuando se indujo autofagia con la metformina (1 mM y 2.5 mM) en el modelo de la EP se observó un incremento en los niveles de las especies reactivas de oxígeno del citoplasma, además cuando se utilizó a la concentración de 2.5 mM aumentó el estrés oxidativo basal. Esto se puede explicar debido a que la metformina inhibe a la glicerofosfato deshidrogenasa mitocondrial, evitando que los electrones del NADH presente en el citoplasma (formado durante la glucólisis) sean transportados hacia la mitocondria para que éste pueda ser convertido a  $\text{NAD}^+$ , lo que resulta en un incremento de la oxidación en el citoplasma y una disminución de la misma en la mitocondria <sup>52,</sup>

<sup>53</sup>.

Al evaluar el efecto de la metformina y la trehalosa sobre la toxicidad inducida por el PQ, se observó que hubo un incremento en la actividad mitocondrial, lo que nos indica que hubo un efecto de protección por parte de estas moléculas. Esto se confirmó con el ensayo de viabilidad, en donde se observó un incremento en la viabilidad en las células del modelo de la EP que fueron tratadas con metformina y trehalosa. Estos resultados indican que la metformina y la trehalosa tienen un efecto de protección en el modelo de la EP inducido con PQ. Estos hallazgos coinciden con otros estudios reportados previamente, en donde se observa un efecto de neuroprotección de la metformina sobre las neuronas dopaminérgicas en un modelo de la EP inducido con MPTP / P en ratones <sup>50</sup>. También, se ha reportado que la trehalosa tiene efecto neuroprotector en un modelo de murino de tauopatía con parkinsonismo, que sobreexpresa la proteína tau humana mutada con la eliminación de parkin (PK - / - / TauVLW) <sup>48</sup>.

En resumen, nuestros resultados sugieren que la inducción de autofagia con la metformina no tiene efecto antioxidante sobre el estrés oxidativo inducido por el PQ. Sin embargo, la trehalosa disminuye la hiperoxidación de las peroxirredoxinas. Además, ambas moléculas ejercen un efecto protector sobre las células al mejorar la actividad mitocondrial y proteger a las células de la toxicidad del PQ. Por lo tanto, los inductores de autofagia trehalosa y metformina representan un potencial prometedor para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como la EP.

## **CAPÍTULO 8**

### **CONCLUSIONES**

- La inducción de autofagia con trehalosa tiene un efecto antioxidante.
- La metformina y la trehalosa tienen un efecto de protección sobre la toxicidad inducida por el PQ en células dopaminérgicas.
- Estas moléculas inductoras de autofagia representan un potencial prometedor para el tratamiento de la EP.

## REFERENCIAS

- 1 Khan AU, Akram M, Daniyal M, Zainab R. Awareness and current knowledge of Parkinson's disease: a neurodegenerative disorder. *Int J Neurosci* 2018;1-39.
- 2 Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 2003; **39**:889-909.
- 3 Rajput AH, Rozdilsky B, Rajput A. Accuracy of clinical diagnosis in parkinsonism--a prospective study. *Can J Neurol Sci* 1991; **18**:275-278.
- 4 Hughes AJ, Ben-Shlomo Y, Daniel SE, Lees AJ. What features improve the accuracy of clinical diagnosis in Parkinson's disease: a clinicopathologic study. *Neurology* 1992; **42**:1142-1146.
- 5 Khan Z, Ali SA. Oxidative stress-related biomarkers in Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. *Iran J Neurol* 2018; **17**:137-144.
- 6 Levy OA, Malagelada C, Greene LA. Cell death pathways in Parkinson's disease: proximal triggers, distal effectors, and final steps. *Apoptosis* 2009; **14**:478-500.
- 7 Yao Z, Wood NW. Cell death pathways in Parkinson's disease: role of mitochondria. *Antioxid Redox Signal* 2009; **11**:2135-2149.
- 8 Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M *et al.* Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev* 2017; **2017**:8416763.
- 9 Salim S. Oxidative Stress and the Central Nervous System. *J Pharmacol Exp Ther* 2017; **360**:201-205.
- 10 Singh A, Kukreti R, Saso L, Kukreti S. Oxidative Stress: A Key Modulator in Neurodegenerative Diseases. *Molecules* 2019; **24**.
- 11 Alam ZI, Daniel SE, Lees AJ, Marsden DC, Jenner P, Halliwell B. A generalised increase in protein carbonyls in the brain in Parkinson's but not incidental Lewy body disease. *J Neurochem* 1997; **69**:1326-1329.

- 12 Alam ZI, Jenner A, Daniel SE *et al.* Oxidative DNA damage in the parkinsonian brain: an apparent selective increase in 8-hydroxyguanine levels in substantia nigra. *J Neurochem* 1997; **69**:1196-1203.
- 13 Dexter DT, Carter CJ, Wells FR *et al.* Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease. *J Neurochem* 1989; **52**:381-389.
- 14 Henchcliffe C, Beal MF. Mitochondrial biology and oxidative stress in Parkinson disease pathogenesis. *Nat Clin Pract Neurol* 2008; **4**:600-609.
- 15 Schapira AH. Mitochondria in the aetiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 2008; **7**:97-109.
- 16 Horowitz MP, Greenamyre JT. Gene-environment interactions in Parkinson's disease: the importance of animal modeling. *Clin Pharmacol Ther* 2010; **88**:467-474.
- 17 Vance JM, Ali S, Bradley WG, Singer C, Di Monte DA. Gene-environment interactions in Parkinson's disease and other forms of parkinsonism. *Neurotoxicology* 2010; **31**:598-602.
- 18 Cannon JR, Greenamyre JT. Neurotoxic in vivo models of Parkinson's disease recent advances. *Prog Brain Res* 2010; **184**:17-33.
- 19 Tanner CM, Kamel F, Ross GW *et al.* Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. *Environ Health Perspect* 2011; **119**:866-872.
- 20 Richfield EK, Thiruchelvam MJ, Cory-Slechta DA *et al.* Behavioral and neurochemical effects of wild-type and mutated human alpha-synuclein in transgenic mice. *Exp Neurol* 2002; **175**:35-48.
- 21 Thiruchelvam MJ, Powers JM, Cory-Slechta DA, Richfield EK. Risk factors for dopaminergic neuron loss in human alpha-synuclein transgenic mice. *Eur J Neurosci* 2004; **19**:845-854.
- 22 Bove J, Prou D, Perier C, Przedborski S. Toxin-induced models of Parkinson's disease. *NeuroRx* 2005; **2**:484-494.

23 Sherer TB, Richardson JR, Testa CM *et al.* Mechanism of toxicity of pesticides acting at complex I: relevance to environmental etiologies of Parkinson's disease. *J Neurochem* 2007; **100**:1469-1479.

24 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**:15136-15141.

25 Nakamura K, Bindokas VP, Marks JD *et al.* The selective toxicity of 1-methyl-4-phenylpyridinium to dopaminergic neurons: the role of mitochondrial complex I and reactive oxygen species revisited. *Mol Pharmacol* 2000; **58**:271-278.

26 Obata T. Dopamine efflux by MPTP and hydroxyl radical generation. *J Neural Transm* 2002; **109**:1159-1180.

27 Richardson JR, Quan Y, Sherer TB, Greenamyre JT, Miller GW. Paraquat neurotoxicity is distinct from that of MPTP and rotenone. *Toxicol Sci* 2005; **88**:193-201.

28 Gonzalez-Polo RA, Bravo-San Pedro JM, Gomez-Sanchez R, Pizarro-Estrella E, Niso-Santano M, Fuentes JM. Paraquat, Between Apoptosis and Autophagy, Toxicity and Drug Testing. 2012.

29 Grabie V, Scemama JL, Robertson JB, Seidel ER. Paraquat uptake in the cultured gastrointestinal epithelial cell line, IEC-6. *Toxicol Appl Pharmacol* 1993; **122**:95-100.

30 Grant H, Lantos PL, Parkinson C. Cerebral damage in paraquat poisoning. *Histopathology* 1980; **4**:185-195.

31 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; **61C**:370-383.

32 Gray JP, Heck DE, Mishin V *et al.* Paraquat increases cyanide-insensitive respiration in murine lung epithelial cells by activating an NAD(P)H:paraquat oxidoreductase: identification of the enzyme as thioredoxin reductase. *J Biol Chem* 2007; **282**:7939-7949.

33 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.

34 Ramirez-Moreno MJ, Duarte-Jurado APG-C, Yareth Gonzalez-Alcocer, Alfredo, Loera-Arias MJS-C, Odila Montes-de-Oca-Luna, Roberto Rodriguez-Rocha, Humberto, Garcia-Garcia A. Autophagy Stimulation Decreases Dopaminergic Neuronal Death Mediated by Oxidative Stress. *Molecular Neurobiology* 2019.

35 Zhang J. Teaching the basics of autophagy and mitophagy to redox biologists--mechanisms and experimental approaches. *Redox Biol* 2015; **4**:242-259.

36 Boya P, Reggiori F, Codogno P. Emerging regulation and functions of autophagy. *Nat Cell Biol* 2013; **15**:713-720.

37 He C, Klionsky DJ. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet* 2009; **43**:67-93.

38 Parzych KR, Klionsky DJ. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid Redox Signal* 2014; **20**:460-473.

39 Hara T, Nakamura K, Matsui M *et al*. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* 2006; **441**:885-889.

40 Komatsu M, Waguri S, Chiba T *et al*. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* 2006; **441**:880-884.

41 Anglade P, Vyas S, Javoy-Agid F *et al*. Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease. *Histol Histopathol* 1997; **12**:25-31.

42 Sarkar S, Davies JE, Huang Z, Tunnacliffe A, Rubinsztein DC. Trehalose, a novel mTOR-independent autophagy enhancer, accelerates the clearance of mutant huntingtin and alpha-synuclein. *J Biol Chem* 2007; **282**:5641-5652.

43 Mardones P, Rubinsztein DC, Hetz C. Mystery solved: Trehalose kickstarts autophagy by blocking glucose transport. *Sci Signal* 2016; **9**:fs2.

44 DeBosch BJ, Heitmeier MR, Mayer AL *et al.* Trehalose inhibits solute carrier 2A (SLC2A) proteins to induce autophagy and prevent hepatic steatosis. *Sci Signal* 2016; **9**:ra21.

45 Castillo K, Nassif M, Valenzuela V *et al.* Trehalose delays the progression of amyotrophic lateral sclerosis by enhancing autophagy in motoneurons. *Autophagy* 2013; **9**:1308-1320.

46 Schaeffer V, Lavenir I, Ozcelik S, Tolnay M, Winkler DT, Goedert M. Stimulation of autophagy reduces neurodegeneration in a mouse model of human tauopathy. *Brain* 2012; **135**:2169-2177.

47 Tanaka M, Machida Y, Niu S *et al.* Trehalose alleviates polyglutamine-mediated pathology in a mouse model of Huntington disease. *Nat Med* 2004; **10**:148-154.

48 Rodríguez-Navarro JA, Rodríguez L, Casarejos MJ *et al.* Trehalose ameliorates dopaminergic and tau pathology in parkin deleted/tau overexpressing mice through autophagy activation. *Neurobiol Dis* 2010; **39**:423-438.

49 Woods A, Dickerson K, Heath R *et al.* Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell Metab* 2005; **2**:21-33.

50 Lu M, Su C, Qiao C, Bian Y, Ding J, Hu G. Metformin Prevents Dopaminergic Neuron Death in MPTP/P-Induced Mouse Model of Parkinson's Disease via Autophagy and Mitochondrial ROS Clearance. *Int J Neuropsychopharmacol* 2016; **19**.

51 Ou Z, Kong X, Sun X *et al.* Metformin treatment prevents amyloid plaque deposition and memory impairment in APP/PS1 mice. *Brain Behav Immun* 2018; **69**:351-363.

52 Vial G, Detaille D, Guigas B. Role of Mitochondria in the Mechanism(s) of Action of Metformin. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2019; **10**:294.



- 53 Madiraju AK, Erion DM, Rahimi Y *et al.* Metformin suppresses gluconeogenesis by inhibiting mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase. *Nature* 2014; **510**:542-546.
- 54 Harris H, Rubinsztein DC. Control of autophagy as a therapy for neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol* 2011; **8**:108-117.
- 55 Karplus PA. A primer on peroxiredoxin biochemistry. *Free Radic Biol Med* 2015; **80**:183-190.
- 56 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**:6641-6654.
- 57 González-Polo RA, Niso-Santano M, Ortíz-Ortíz MA *et al.* Inhibition of paraquat-induced autophagy accelerates the apoptotic cell death in neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Toxicol Sci* 2007; **97**:448-458.
- 58 Ramirez-Moreno MJ, Duarte-Jurado AP, Gopar-Cuevas Y *et al.* Autophagy Stimulation Decreases Dopaminergic Neuronal Death Mediated by Oxidative Stress. *Mol Neurobiol* 2019.
- 59 Levine B, Packer M, Codogno P. Development of autophagy inducers in clinical medicine. *J Clin Invest* 2015; **125**:14-24.
- 60 Thellung S, Corsaro A, Nizzari M, Barbieri F, Florio T. Autophagy Activator Drugs: A New Opportunity in Neuroprotection from Misfolded Protein Toxicity. *Int J Mol Sci* 2019; **20**.
- 61 Mizunoe Y, Kobayashi M, Sudo Y *et al.* Trehalose protects against oxidative stress by regulating the Keap1-Nrf2 and autophagy pathways. *Redox Biol* 2018; **15**:115-124.

## RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

YARETH GOPAR CUEVAS

Candidato para el Grado de  
Maestría en Ciencias con Orientación en Morfología

Tesis: ESTUDIO COMPARATIVO DE DIFERENTES INDUCTORES DE  
AUTOFAGIA EN UN MODELO *IN VITRO* DE LA ENFERMEDAD DE  
PARKINSON

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud

Biografía:

Datos Personales: Nacida en Rio Grande, Oaxaca el 4 de Julio de 1994,  
hija de Arturo Gopar Galván y Azucena Cuevas Ochoa.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado  
obtenido Químico Clínico Biólogo en 2017 con mención honorífica.