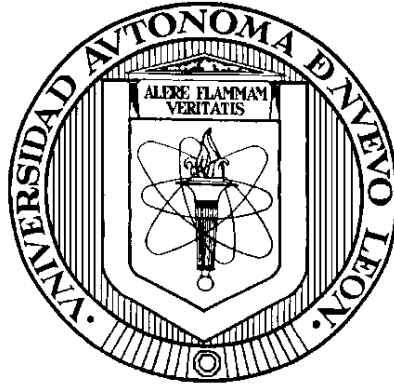


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**ESTUDIO COMPARATIVO DE DIFERENTES INDUCTORES DE AUTOFAGIA
EN UN MODELO *IN VIVO* DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON Y SU
INFLUENCIA SOBRE LA MICROBIOTA INTESTINAL**

Por

YARETH GOPAR CUEVAS

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

Agosto, 2023

**ESTUDIO COMPARATIVO DE DIFERENTES INDUCTORES DE AUTOFAGIA
EN UN MODELO *IN VIVO* DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON Y SU
INFLUENCIA SOBRE LA MICROBIOTA INTESTINAL**

Aprobación de la Tesis:



Dra. C. Aracely García García
Director de Tesis



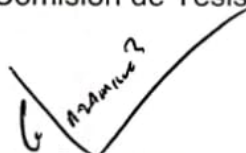
Dr. C. Humberto Rodríguez Rocha
Codirector de Tesis



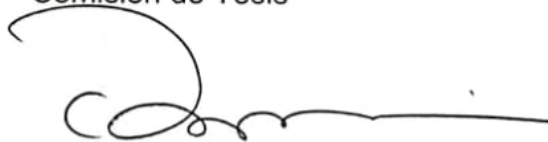
Dra. C. Odila Saucedo Cárdenas
Comisión de Tesis



Dr. C. Miguel Ángel Déctor Carrillo
Comisión de Tesis



Dr. C. Gilberto Jaramillo Rangel
Comisión de Tesis



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

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por enseñarme a salir adelante a pesar de las dificultades que pueda presentar la vida y por su apoyo incondicional, ya que sin ellos no hubiera podido llegar hasta donde estoy.

A mis hermanos por su invaluable compañía.

Al Dr. Humberto Rodríguez y la Dra. Aracely García por aceptarme y permitirme llegar a esta familia científica, por todas las enseñanzas y la paciencia brindadas durante estos siete años.

Al Dr. Gilberto Jaramillo Rangel y la Dra. Marta Ortega por enseñarme el camino de la investigación científica y el conocimiento brindado.

A los miembros de mi comisión, la Dra. Odila Saucedo y al Dr. Dr. Miguel Ángel Déctor por su asesoría en el desarrollo de esta tesis.

A mis compañeras y amigas científicas Ana, Ale, Sheila y Aby, así como mi amigo Ulises por hacer este largo camino más ameno y divertido.

Al personal del Departamento de Histología por su ayuda y por todos estos años juntos.

A mi esposo Marco Reyes por todo su amor y apoyo incondicional, esta tesis también es suya.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1 Enfermedad de Parkinson (EP)	4
2.2 Eje microbiota-intestino-cerebro en la EP	5
2.3 La autofagia y su relación con la EP	8
2.4 Inductores de autofagia	10
2.4.1 Proteína cinasa activada por AMP (AMPK).	11
2.4.2 Metformina	12
2.4.3 Trehalosa.	14
3. JUSTIFICACIÓN	17
4. HIPÓTESIS.	18
5. OBJETIVOS	19
5.1 Objetivo general	19
5.2 Objetivos específicos.	19
6. MATERIAL Y MÉTODOS.	20
6.1 Estrategia general	20
6.2 Modelo animal de la EP	20
6.3 Evaluación de la función motora y cognitiva	22
6.3.1 Prueba de la marcha	22
6.3.2 Prueba de la construcción del nido.	23
6.4 Inmunofluorescencia	24
6.5 Western blot	25
6.6 Ensayo de TUNEL	26
6.7 Análisis del perfil de la microbiota intestinal	26
6.7.1 Extracción del ADN bacteriano	26
6.7.2 PCR tiempo real	27
6.8 Análisis estadístico	29
7. RESULTADOS	30
7.1 Evaluación de la función motora y cognitiva	30
7.1.1 La metformina y la trehalosa no modifican el peso corporal durante el modelo de la EP.	30

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
7.1.2 La inducción de autofagia con metformina y trehalosa previene la disfunción motora en el modelo animal de la EP.	31
7.1.3 La inducción de autofagia con metformina y trehalosa previene la disfunción cognitiva en el modelo animal de la EP.	32
7.2 Evaluación de las neuronas dopaminérgicas y las células de la glía.	34
7.2.1 La metformina y la trehalosa inducen autofagia en el mesencéfalo a través de la fosforilación de AMPK.	34
7.2.2 La metformina y la trehalosa ejercen un efecto protector sobre la pérdida de las neuronas dopaminérgicas mediada por PQ	36
7.2.3 La metformina y la trehalosa ejercen un efecto protector sobre las alteraciones de las células de la glía en el modelo animal de la EP	38
7.3 Evaluación de la agregación de la proteína α -Syn y la muerte celular inducida por el PQ	40
7.3.1 La inducción de la autofagia previene la agregación de la α -Syn y la muerte celular inducida por el PQ en la sustancia nigra pars compacta.	40
7.4 Análisis de la microbiota intestinal en el modelo animal de la EP.	42
7.4.1 La metformina y trehalosa previenen la alteración del perfil de la microbiota intestinal en el modelo de la EP inducido con PQ	42
8. DISCUSIÓN	45
9. CONCLUSIONES.	54
REFERENCIAS	56
PRODUCCIÓN CIENTÍFICA	65

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I. Buffer de lisis SNET	27
II. Oligonucleótidos usados en la PCR tiempo real.	28

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Eje microbiota-intestino-cerebro.	6
2. Autofagia	9
3. Mecanismo de inducción de autofagia de la metformina.	13
4. Mecanismo de inducción de autofagia de la trehalosa.	15
5. Estrategia general.	20
6. Modelo experimental	21
7. La metformina y la trehalosa no afectan el peso corporal en el modelo de la EP	30
8. Los inductores de autofagia metformina y trehalosa previenen la disfunción motora en el modelo animal de la EP	31
9. La inducción de autofagia previene la disfunción cognitiva en el modelo animal de la EP	33
10. La metformina y la trehalosa inducen autofagia a través de la fosforilación de AMPK	35
11. Los inductores de autofagia previenen la pérdida de las neuronas dopaminérgicas en el modelo de la EP	37
12. Los inductores de autofagia previenen la pérdida de los oligodendrocitos, la astrocitosis y la microgliosis mediada por PQ.	39
13. La metformina y trehalosa previenen la agregación de la α -Syn y la muerte celular inducida por el PQ	41
14. La metformina o trehalosa previenen la alteración del perfil de la microbiota intestinal inducida por el PQ.	43
15. Resumen gráfico de las conclusiones	54

NOMENCLATURA

%	Porcentaje
°C	Grados Celsius
α -Syn	Alfa-sinucleína
μ M	Micromolar
μ L	Microlitros
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMPK	Del inglés AMP-activated protein kinase
ANOVA	Del inglés analysis of variance
ATP	Adenosín trifosfato
Ctrl	Control
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DS	Desviación estándar
EP	Enfermedad de Parkinson
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
h	Hora
HRP	Del inglés horseradish peroxidase
Iba-1	Del inglés ionized calcium-binding adaptor molecule 1
M	Molar
m-TOR	Del inglés mammalian target of rapamycin
mAmp	Miliamperios
Met	Metformina

NOMENCLATURA

mGPDH	Glicerofosfato deshidrogenasa mitocondrial
min	minutos
mM	Milimolar
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido de hidrógeno
pAMPK	Del inglés phospho-AMPK
PBS	Del inglés phosphate buffered saline
PQ	Paraquat
PVDF	fluoruro de polivinilideno
Rapa	Rapamicina
RIPA	Del inglés radioimmunoprecipitation assay buffer
ROS	Del inglés reactive oxygen species
s	Segundos
TA	Temperatura ambiente
TBST	Del inglés tris-buffered saline + tween 20
TH	Tiroxina hidroxilasa
Tre	Trehalosa
TUNEL	Del inglés Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
V	Voltaje

ABSTRACT

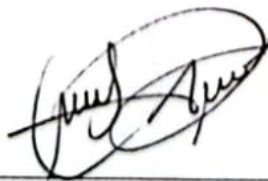
Since the number of aged people will increase in the next years, neurodegenerative diseases, including Parkinson's Disease (PD), will also rise. Previously, we demonstrated that autophagy stimulation with rapamycin decreases dopaminergic neuronal death mediated by oxidative stress in the paraquat (PQ)-induced PD model. Assessing the neurotherapeutic efficacy of autophagy-inducing molecules is critical for preventing or delaying neurodegeneration. Recently, we evaluated the autophagy inducers metformin and trehalose effect in a PD model. Autophagy induced by both molecules was confirmed in the SH-SY5Y dopaminergic cells by detecting increased LC3-II marker and autophagosome number compared to the control by western blot and transmission electron microscopy. Both autophagy inducers showed an antioxidant effect, improved mitochondrial activity, and decreased dopaminergic cell death induced by PQ. Herein, we evaluated the effect of both inducers *in vivo*. C57BL6 mice were pretreated with metformin or trehalose before PQ administration. Cognitive and motor deteriorated functions in the PD model were evaluated through the nest building and the gait tests and were prevented by metformin and trehalose. Both autophagy inducers significantly reduced the dopaminergic neuronal loss, astrogliosis, and microgliosis induced by PQ. Also, cell death mediated by PQ was prevented by metformin and trehalose, assessed by TUNEL assay. Metformin and trehalose induced autophagy through AMPK phosphorylation and decreased α -synuclein accumulation. Therefore, metformin and trehalose are promising neurotherapeutic autophagy inducers with great potential for treating neurodegenerative diseases such as PD.

Keywords: Metformin; Trehalose; Autophagy; Parkinson's disease; Dopaminergic neurons; Paraquat.

RESUMEN

Propósito y Método del Estudio: La esperanza de vida ha incrementado en los últimos años, trayendo como consecuencia un aumento de las enfermedades neurodegenerativas, incluida la enfermedad de Parkinson (EP). Previamente, demostramos que la estimulación de la autofagia con rapamicina disminuye la muerte de las células dopaminérgicas mediada por el estrés oxidativo en un modelo de la EP inducido con paraquat (PQ). Por lo que consideramos importante evaluar la eficacia neuroterapéutica de las moléculas inductoras de autofagia metformina y trehalosa para prevenir o retrasar la neurodegeneración. Por lo tanto, evaluamos el efecto de ambos inductores *in vivo*. Para ello se utilizaron ratones C57BL6, los cuales fueron pretratados con metformina (500 mg/kg) o trehalosa (2%) en el agua para beber *ad libitum* una semana antes de la administración intraperitoneal de PQ (10 mg/kg) y durante las siete semanas consecutivas. Al final del modelo analizamos la función cognitiva y motora con la prueba de la construcción del nido y la prueba de la marcha, respectivamente. Posteriormente, evaluamos las neuronas dopaminérgicas, las células de la glía, la agregación de la α -sinucleína (α -Syn) y la inducción de autofagia por inmunofluorescencia. Además, determinamos la muerte celular usando el ensayo de TUNEL y la microbiota intestinal mediante PCR tiempo real.

Contribuciones y Conclusiones: Nuestros resultados demuestran que la inducción de autofagia con metformina y trehalosa previene: el deterioro motor y cognitivo, la muerte de las neuronas dopaminérgicas y de los oligodendrocitos, la astrocitosis, la activación de la microglía y la agregación de α -Syn mediados por PQ. Además, confirmamos que ambas moléculas inducen autofagia a través de la fosforilación de AMPK. Adicionalmente, encontramos modificaciones en el perfil de la microbiota intestinal en respuesta al PQ, las cuales fueron prevenidas mediante el pretratamiento con metformina y trehalosa. Por lo tanto, ambos inductores de autofagia tienen un potencial prometedor para prevenir las alteraciones que conducen al desarrollo de la EP.



Dra. C. Aracely García García
Director de Tesis

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

Actualmente la esperanza de vida en el mundo es de 73 años, de acuerdo con los datos reportados por la Organización Mundial de la Salud (1). Además, se estima que en próximos años aumentará significativamente el número de personas envejecidas, lo cual se asocia con un incremento en la presencia de las enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Parkinson (EP) (2).

La EP es un desorden neurológico caracterizado por la presencia de síntomas motores como la bradicinesia, inestabilidad postural y el temblor en reposo, los cuales son causados por la pérdida selectiva de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia *nigra pars compacta*, resultando en la denervación dopaminérgica del cuerpo estriado (3, 4). Además, síntomas no motores como la sialorrea, disfagia, gastroparesia y el estreñimiento, pueden presentarse hasta una década antes de la aparición de los síntomas motores (5). Esta relación entre el sistema digestivo y el sistema nervioso central (SNC) se debe al eje intestino-cerebro (6). Recientemente, se reportó que en los pacientes con EP existe una alteración en el perfil de la microbiota intestinal (7-9); además, el incremento de bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* se asocia con la severidad de la inestabilidad postural y la dificultad para caminar. Por lo tanto, el perfil de la microbiota intestinal juega un papel importante en el desarrollo y la progresión de la EP (10).

Otras características importantes de la EP son las alteraciones intracelulares que ocurren en las neuronas dopaminérgicas, incluyendo daño mitocondrial, estrés oxidativo y la alteración de las vías de degradación de proteínas mediadas por el proteosoma y la autofagia (11). La autofagia consiste en la degradación de los componentes celulares a través de hidrolasas lisosomales para posteriormente ser reciclados (12). La autofagia juega un papel esencial en el buen funcionamiento del SNC, ya que su deficiencia conduce a la neurodegeneración (13, 14). La evidencia reciente resalta el papel de la autofagia en el control de calidad mitocondrial y su relación con enfermedades neurodegenerativas como la EP (15).

Dada su importancia, consideramos que la inducción de autofagia puede prevenir el desarrollo de la EP. Previamente demostramos que la inducción de autofagia con rapamicina disminuye la muerte de las neuronas dopaminérgicas mediada por el estrés oxidativo en un modelo de la EP inducido con paraquat (PQ) (16). Por lo tanto, consideramos importante evaluar la eficacia neuroterapéutica de moléculas inductoras de autofagia, como la metformina y la trehalosa, para encontrar un tratamiento que ayude a prevenir o retrasar la neurodegeneración.

La metformina es un agente hipoglucemiante usado ampliamente en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 (17). Además, la metformina induce autofagia a través de un mecanismo dependiente de AMPK que provoca un

estado de inanición al inhibir el complejo 1 de la cadena respiratoria y la enzima glicerofosfato deshidrogenasa mitocondrial (mGPDH). La inhibición del complejo 1 disminuye la oxidación del NADH, el bombeo de protones a través de la membrana mitocondrial interna y la tasa de consumo de oxígeno, lo que da como resultado un gradiente de protones más bajo y una síntesis de ATP reducida. Además, la metformina suprime la gluconeogénesis al inhibir la mGPDH (18, 19).

Por otro lado, la trehalosa es un disacárido formado por dos moléculas de glucosa, donde el enlace α -glucosídico involucra a los grupos hidroxilo de los dos carbonos anoméricos (20). La trehalosa induce autofagia a través de dos vías, una dependiente de m-TOR y otra alterna. La trehalosa inhibe los transportadores de glucosa (GLUT), generando un estado similar a la inanición, lo cual activa la autofagia a través de AMPK y ULK1 (21). También, la trehalosa puede inducir autofagia debido a que ocasiona daño en los lisosomas con la subsecuente translocación nuclear de TFEB, para así inducir la biogénesis lisosomal (22).

Hasta la fecha no se han reportado efectos secundarios notables de la metformina y la trehalosa que afecten la calidad de vida de los pacientes. Por el contrario, en los últimos años se les han atribuido beneficios para la salud (23-26), por lo cual consideramos que estas moléculas tienen un potencial terapéutico prometedor como una terapia alternativa para el tratamiento de pacientes con EP.

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES

2.1 Enfermedad de Parkinson (EP)

La EP es un desorden neurodegenerativo con afección motora. Sus principales características patológicas incluyen la muerte de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia *nigra pars compacta*, lo que ocasiona una deficiencia de dopamina, y la presencia de los cuerpos de Lewy. Además, se asocia con la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo y la alteración de las vías de degradación de proteínas, entre las que se incluyen la vía del proteosoma y de la autofagia (3). Hasta la fecha la etiología de la EP no se conoce con exactitud, pero se sabe que está relacionada con factores ambientales (p. ej. exposición a pesticidas), predisposición genética (p. ej. mutaciones en los genes *LRRK2* y *parkin*) o la combinación de ambos, y el envejecimiento. Los estudios epidemiológicos muestran que menos del 10% de los pacientes con EP tienen una etiología estrictamente genética, mientras que la mayoría de los casos son considerados esporádicos (3, 27).

Uno de los grandes problemas de la EP es que desde su primera descripción en 1817 por James Parkinson hasta la actualidad, no existe un tratamiento que ayude a prevenir o modificar la enfermedad, y los pacientes sólo reciben tratamientos paliativos que imitan el efecto de la dopamina enfocados únicamente en controlar los síntomas motores (28, 29). El medicamento más

utilizado es la levodopa combinada con carbidopa, ésta última bloquea la conversión de la levodopa en dopamina fuera del SNC, por lo tanto, inhibe los efectos secundarios no deseados de la levodopa fuera del SNC durante el tratamiento (30).

Las características clínicas de la EP incluyen alteraciones motoras (bradicinesia, temblor en reposo e inestabilidad postural) y no motoras, entre las que se incluyen problemas cognitivos y gastrointestinales (GI) (27). Las alteraciones motoras llegan a presentarse cuando la *sustancia nigra* ya se ha deteriorado entre un 50-60% y los niveles de dopamina se han reducido de un 80-85% (31). De las alteraciones no motoras, los problemas GI son los más comunes y además son evidentes durante todo el curso de la enfermedad. El estreñimiento es el síntoma GI más frecuente con una prevalencia de 28-80%; además, es importante destacar que puede presentarse hasta 15 años antes que los síntomas motores (5). La presencia de los problemas GI en pacientes con EP se ha asociado con el eje microbiota-intestino-cerebro.

2.2 Eje microbiota-intestino-cerebro en la EP

El eje microbiota-intestino-cerebro consiste en la señalización bioquímica bidireccional que existe entre estos tres componentes a través del nervio vago y el sistema circulatorio; la señalización bioquímica está compuesta por diversas moléculas como metabolitos, neurotransmisores, proteínas y citocinas (Fig. 1). El perfil bioquímico que se intercambia del intestino al cerebro depende

principalmente del perfil de la microbiota intestinal; además, es importante mencionar que modificaciones en el perfil de la microbiota intestinal se han asociado con diversas enfermedades neurodegenerativas, entre las que se encuentra la EP (6, 32).

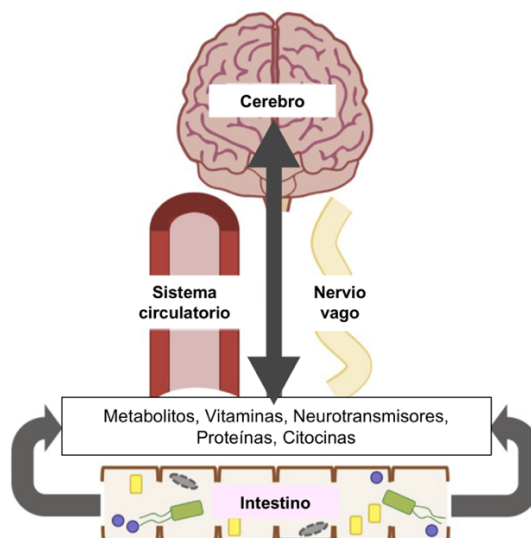


Fig. 1. Eje microbiota-intestino-cerebro. Comunicación bidireccional que existe entre la microbiota intestinal, el intestino y el cerebro a través del nervio vago y el sistema circulatorio (33).

En un estudio en ratones que sobreexpresan α -sinucleína (α -Syn), se demostró que la microbiota intestinal está implicada en el desarrollo de la EP. Cuando se realizó el tratamiento con antibiótico se previno el desarrollo de las alteraciones motoras, la activación de la microglía y la acumulación de α -Syn; mientras que, la recolonización microbiana promovió esas características fisiopatológicas. Además, la administración oral de metabolitos microbianos específicos a ratones libres de gérmenes promovió la neuroinflamación y los síntomas motores. Asimismo, la colonización de ratones que sobre expresan α -Syn con microbiota de pacientes con EP intensificó el deterioro físico en comparación

con los ratones que fueron trasplantados con microbiota de donantes sanos (34).

En los pacientes con EP se han descrito modificaciones en el perfil de la microbiota intestinal. Hasta el momento, debido su complejidad, no ha sido posible establecer una composición específica de la microbiota intestinal como biomarcador de esta enfermedad. Sin embargo, entre las modificaciones que más se han reportado en pacientes con EP (7-9), se encuentra el incremento de las familias *Lactobacillaceae*, *Enterococcaceae*, *Christensenellaceae*, *Verrucomicrobiaceae* y *Enterobacteriaceae*; mientras que los *Bacteroidetes*, la familia *Prevotellaceae* y *Lachnospiraceae* se encuentran disminuidos en comparación con los sujetos sanos (35). Además, el incremento de bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* se ha asociado con la severidad de la inestabilidad postural y la dificultad para caminar (10).

Entre los factores que pueden modificar la microbiota intestinal se encuentra la autofagia. En un estudio donde se inactivó el gen *Atg5* de manera específica en el intestino, como modelo de inhibición de autofagia, se observó que disminuyeron las bacterias relacionadas con la regulación de la inflamación (*Akkermansia muciniphila* y las familia *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, *Verrucomicrobiaceae*) y se incrementaron las bacterias asociadas al desarrollo de la inflamación (*Candidatus arthromitus* y las familias *Clostridiaceae* y *Pseudomonadaceae*) (36).

Por lo tanto, el perfil de la microbiota intestinal juega un papel importante en el desarrollo y la progresión de la EP. Además, el perfil de la microbiota intestinal puede verse modificado de manera negativa por la inhibición de la autofagia, lo cual puede promover el desarrollo de la EP.

2.3 La autofagia y su relación con la EP

La autofagia se define como un proceso de degradación intracelular de organelos y macromoléculas para su posterior reciclaje, el cual es mediado por lisosomas (12). La autofagia se puede clasificar en 3 subtipos de acuerdo al mecanismo que utilizan para entregar los componentes celulares a los lisosomas: 1) autofagia mediada por chaperonas, 2) microautofagia y 3) macroautofagia (37). En este trabajo nos enfocamos en la macroautofagia, que para fines prácticos nos referiremos a ella como autofagia.

La autofagia inicia con la nucleación de una membrana de aislamiento denominada fagóforo, la cual se elonga gradualmente para formar una vesícula de doble membrana, denominada autofagosoma, en donde quedan atrapados los componentes celulares. Después, el autofagosoma migra a lo largo de los microtúbulos hasta fusionarse con la membrana de un lisosoma para formar el autolisosoma. Posteriormente, ocurre la degradación y el reciclaje del cuerpo autofágico junto con los componentes celulares por el medio hidrolítico del autolisosoma (Fig. 2) (38).

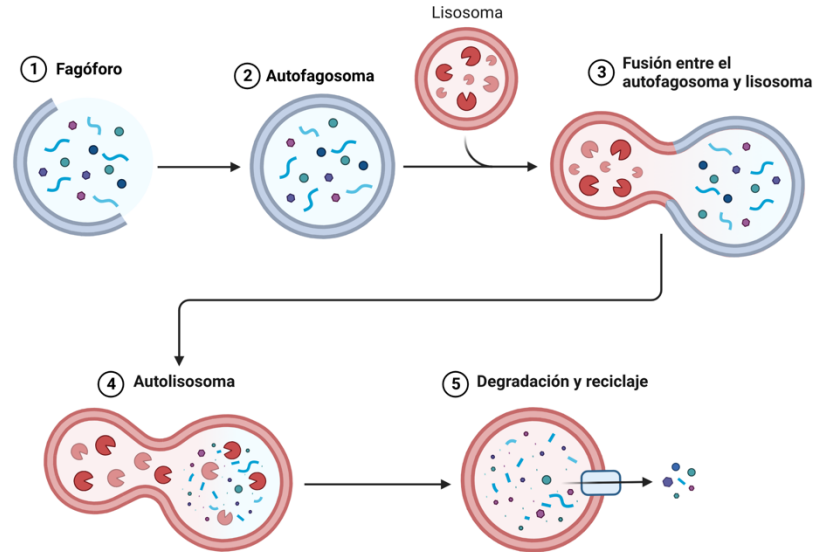


Fig. 2. Autofagia. La autofagia es un proceso catabólico que se encarga de la degradación y el reciclaje de los componentes celulares, lo cual ayuda a prevenir el daño y promueve la supervivencia celular.

La autofagia es un proceso altamente conservado en todas las células e inducido bajo diferentes condiciones de estrés, para ayudar a prevenir el daño y promover la supervivencia, al eliminar los desencadenantes de la muerte celular. Por lo tanto, las alteraciones en la vía de la autofagia se han relacionado con diferentes enfermedades, incluidas el cáncer, las enfermedades infecciosas, inflamatorias, metabólicas y neurodegenerativas (39).

La principal característica de las enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (EA), enfermedad de Huntington (EH) y EP, es la formación de agregados de proteínas mal plegadas que se acumulan en las células neuronales. Dicha agregación ocurre debido a la alteración de las vías de degradación de proteínas mediadas por el proteosoma y la autofagia, lo cual

ocasiona alteraciones en el funcionamiento neuronal, promoviendo la muerte celular (38, 40). El análisis de muestras post-mortem de tejido cerebral de pacientes con EP mostraron que la autofagia se encuentra deteriorada en la región de la sustancia nigra (41, 42). Además, se ha reportado que la autofagia es esencial para el SNC, ya que su disfunción causa neurodegeneración (13, 14). Por lo tanto, evaluar la eficacia neuroterapéutica de moléculas inductoras de autofagia es fundamental para prevenir o retrasar la neurodegeneración.

2.4 Inductores de autofagia

Actualmente existen varios fármacos experimentales, así como compuestos naturales que inducen autofagia. Previamente, demostramos que la inducción de autofagia con rapamicina disminuye la muerte de las neuronas dopaminérgicas mediada por el estrés oxidativo en el modelo de la EP inducido con PQ (16). La rapamicina es el inductor de autofagia mejor caracterizado y ha sido el más utilizado (43, 44), mostrando efectos positivos en estudios experimentales de modelos de enfermedades neurodegenerativas (45). Sin embargo, recientemente la administración de rapamicina se asoció con la alteración de la actividad microglial y un aumento de las placas de β -amiloide en un modelo de la EA (46). Por lo tanto, es esencial evaluar la eficacia neuroterapéutica de otras moléculas inductoras de autofagia para prevenir o retrasar la neurodegeneración.

Recientemente, demostramos que los inductores de autofagia metformina y trehalosa previenen el estrés oxidativo, el daño mitocondrial y la muerte de las células dopaminérgicas en un modelo celular de la EP inducido con el herbicida PQ. Por lo tanto, consideramos relevante evaluar si la metformina y trehalosa previenen la neurodegeneración, así como el perfil de la microbiota intestinal en un modelo animal de la EP inducido con PQ. Además, éstas moléculas tienen diferentes mecanismos de inducción de autofagia, la metformina induce autofagia a través de una vía dependiente de AMPK y la trehalosa induce autofagia por dos vías, una dependiente de AMPK y otra a través de la activación de TFEB (21, 22, 26); lo que podría brindar diferentes alternativas terapéuticas para el tratamiento de la EP.

2.4.1 Proteína cinasa activada por AMP (AMPK)

La proteína cinasa activada por monofosfato de adenosina (AMPK) es un sensor metabólico que mantiene el equilibrio energético (47), por lo tanto, juega un papel fundamental en la regulación del crecimiento celular, la reprogramación del metabolismo celular, la migración y la polaridad celular, así como en la autofagia (48). La activación de esta proteína esta dada en respuesta al estrés energético cuando hay un aumento en las proporciones AMP:ATP y ADP:ATP. La proteína AMPK restablece el equilibrio energético al inhibir los procesos fisiológicos que consumen ATP y promueve aquellos procesos que generan ATP (49).

AMPK es un complejo trimérico que consta de una subunidad catalítica (subunidad α) y dos subunidades reguladoras (subunidades β y γ). En los mamíferos, la subunidad α está codificada por dos isoformas, y las subunidades β y γ están codificadas por dos y tres isoformas, respectivamente. En el extremo N-terminal de la subunidad α se encuentra el dominio catalítico, así como un sitio de fosforilación para inducir la activación de AMPK, dicha fosforilación ocurre en una treonina conservada (Thr172) del bucle de activación (49).

La fosforilación de AMPK en la Thr172 inhibe la vía del blanco de rapamicina del complejo 1 de mamífero (mTORC1), para ocasionar la inhibición del crecimiento celular y la inducción del proceso de autofagia. Además, estudios recientes han reportado que AMPK puede fosforilar directamente varios sitios de ULK1 para inducir autofagia (48).

2.4.2 Metformina

La metformina es un derivado sintético de la guanidina y se usa como primera línea para el tratamiento contra la diabetes mellitus tipo 2. Recientemente, se ha reportado que la metformina tiene otros efectos benéficos para la salud, entre los que se incluye: el efecto antitumoral, prevención del síndrome de ovario poliquístico, efecto antienvjecimiento, y neuroprotección (50).

La metformina induce autofagia a través de un mecanismo dependiente de AMPK. Una vez que ingresa a la célula, la metformina ocasiona un estado de inanición al inhibir el complejo 1 de la cadena de transporte de electrones y la enzima glicerofosfato deshidrogenasa mitocondrial (mGPDH) (26). La inhibición del complejo 1 en la mitocondria ocasiona la disminución de: la oxidación de NADH, el bombeo de protones a través de la membrana mitocondrial interna y la tasa de consumo de oxígeno, lo que resulta en una disminución del gradiente de protones y una síntesis de ATP reducida. Además, la metformina suprime la gluconeogénesis mediante la inhibición de mGPDH, lo que conlleva también a la inducción de autofagia (Fig. 3) (18, 19).

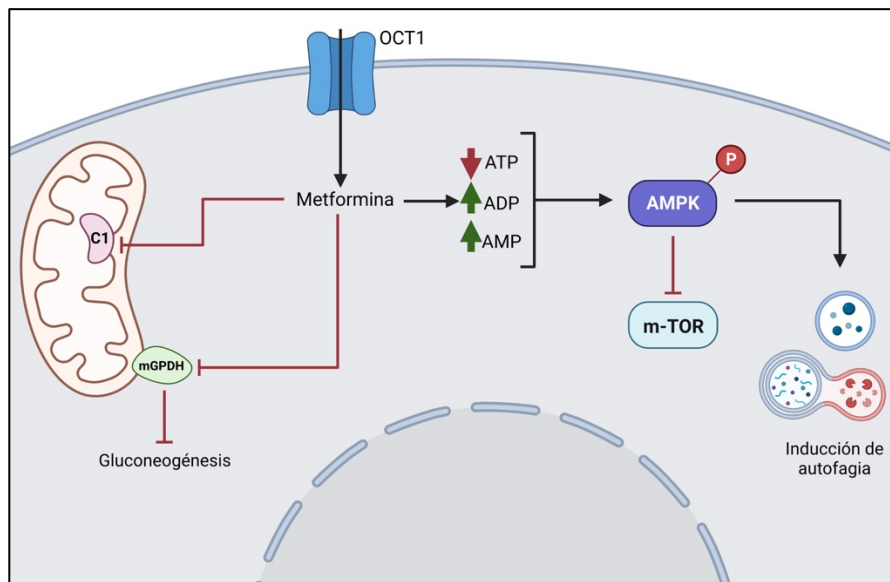


Fig. 3. Mecanismo de inducción de autofagia de la metformina. La metformina induce autofagia a través de un mecanismo dependiente de AMPK, al inhibir el complejo 1 de la mitocondria y la gluconeogénesis a través de la mGPDH.

Hasta la fecha no existen reportes que indiquen que la metformina tenga un efecto negativo sobre los niveles de glucosa en sangre. En un estudio en donde se administró la metformina en pacientes a dosis crecientes, de 500 mg

a 2000 mg por día durante 12 semanas, no se observaron modificaciones en la tolerancia a la glucosa o en los niveles de glucosa en sangre (51). Sin embargo, se ha reportado el riesgo de hipoglucemia cuando se usa la metformina con otros medicamentos antidiabéticos, o se combina con ejercicio intenso, grandes cantidades de alcohol o al no consumir suficientes calorías en la dieta (52, 53). Por lo tanto, la metformina puede ser considerada como un fármaco con potencial prometedor contra la EP, siempre y cuando se administre bajo supervisión médica.

2.4.3 Trehalosa

La trehalosa es un disacárido no reductor compuesto por dos moléculas de glucosa unidas por un enlace α,α -1,1 glucosídico. Esta molécula se encuentra presente en una amplia variedad de organismos, incluyendo bacterias, hongos, plantas y animales invertebrados. La trehalosa se ha utilizado en la industria para estabilizar lípidos y proteínas, así como virus, bacterias y tejidos (54); además, la trehalosa se ha descrito como una molécula inductora de autofagia (55).

La trehalosa puede entrar a la células como disacárido a través del transportador de glucosa GLUT 8 o por endocitosis. Una vez dentro de la célula, la trehalosa inhibe a los transportadores de glucosa GLUT 1-4, generando un estado de inanición, que induce autofagia a través de la activación de AMPK y ULK1 (21). También puede ocasionar daño en los lisosomas al inducir su agrandamiento y

generar la permeabilización de su membrana, con la subsecuente translocación de TFEB al núcleo para inducir la biogénesis lisosomal, lo cual también conlleva a la inducción de la autofagia para reemplazar los lisosomas afectados (Fig. 4) (22).

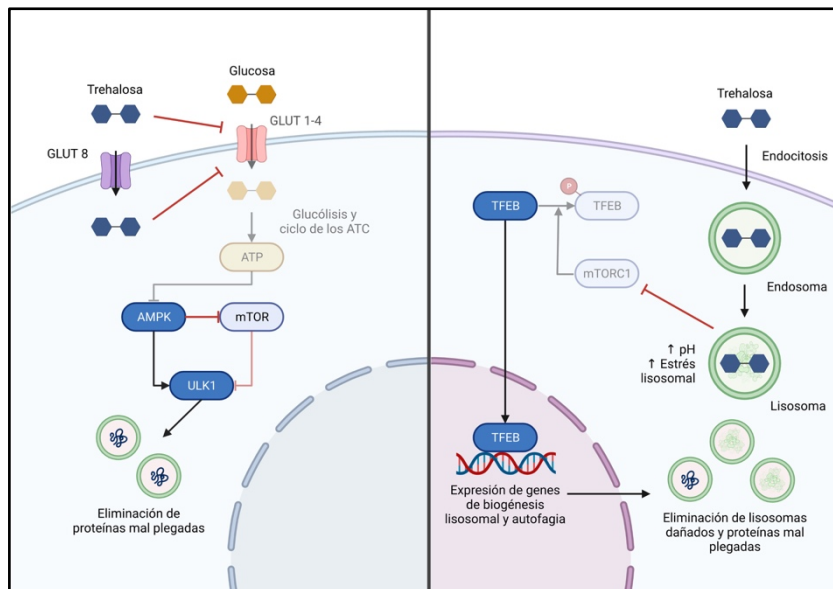


Fig. 4. Mecanismo de inducción de autofagia de la trehalosa. La trehalosa induce autofagia a través de una vía dependiente de AMPK y otra independiente por la activación de TFEB.

A pesar de ser un disacárido, los niveles de glucosa en sangre no se ven alterados después de la administración de trehalosa. Estudios previos evaluaron los niveles de glucosa en sangre después del tratamiento con diferentes concentraciones de trehalosa: 2 % durante 6 semanas (56) y 5 % durante 13 semanas (57), y no se encontraron diferencias significativas en comparación con el grupo control. Además, nosotros evaluamos el efecto de la administración de la trehalosa en un modelo murino sobre los órganos relacionados con su metabolismo (hígado, páncreas y riñón), y no se observó

ninguna alteración histológica (58), por lo que el uso de la trehalosa como potencial tratamiento para la EP puede considerarse seguro.

CAPÍTULO 3

JUSTIFICACIÓN

En los últimos años, el papel de la autofagia ha ganado relevancia en las enfermedades neurodegenerativas por su potencial efecto de protección. Previamente, nuestro grupo de investigación demostró que las moléculas inductoras de autofagia, metformina y trehalosa, tienen un efecto neuroprotector en un modelo celular de la Enfermedad de Parkinson (EP). Por lo tanto, consideramos de gran importancia evaluar el efecto neuroprotector de estas moléculas en un modelo animal de la EP, y analizar su efecto sobre la microbiota intestinal. Los hallazgos derivados de este estudio permitirán establecer si la inducción de autofagia con estas moléculas puede brindar diferentes alternativas terapéuticas en pacientes con la EP.

CAPÍTULO 4

HIPÓTESIS

La inducción de autofagia ejerce un papel protector sobre las neuronas dopaminérgicas y la microbiota intestinal en un modelo animal de la enfermedad de Parkinson.

CAPÍTULO 5

OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar el efecto neuroprotector de diferentes inductores de autofagia en un modelo animal de la enfermedad de Parkinson y su influencia sobre la microbiota intestinal.

5.2 Objetivos específicos

1. Determinar el efecto de la autofagia inducida por metformina y trehalosa sobre la función motora y cognitiva en un modelo animal de la enfermedad de Parkinson.
2. Evaluar el efecto de la inducción de la autofagia con metformina y trehalosa sobre las neuronas dopaminérgicas y las células de la glía en un modelo animal de la enfermedad de Parkinson.
3. Evaluar el efecto de la inducción de la autofagia con metformina y trehalosa sobre la muerte celular inducida por PQ en el mesencéfalo en un modelo animal de la enfermedad de Parkinson.
4. Analizar el efecto de la regulación de la autofagia sobre la microbiota intestinal en un modelo animal de la enfermedad de Parkinson.

CAPÍTULO 6

MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Estrategia general

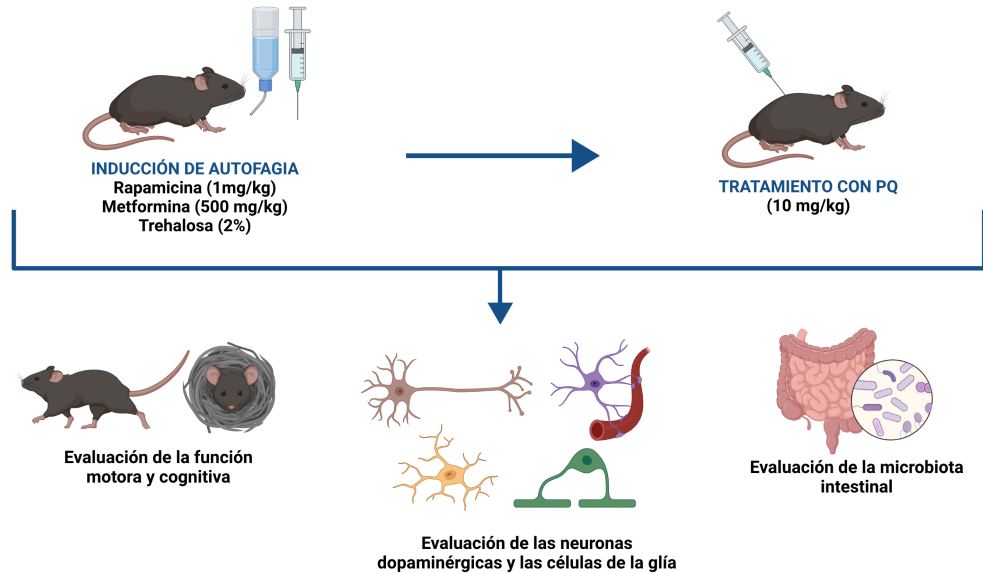


Fig. 5. Estrategia general. Descripción general del modelo animal de la EP y los análisis realizados.

6.2 Modelo animal de la EP

Se utilizaron ratones de la cepa C57BL/6 de 8-10 semanas de edad (Círculo ADN, Ciudad de México), los cuales fueron mantenidos en ciclos de luz-oscuridad de 12 h, con acceso *ad libitum* a comida y agua. El peso de los ratones se registró semanalmente. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 y el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio

(CICUAL). Además, el proyecto fue aprobado por el Comité de Ética de nuestra Universidad (número de registro HT19-00002).

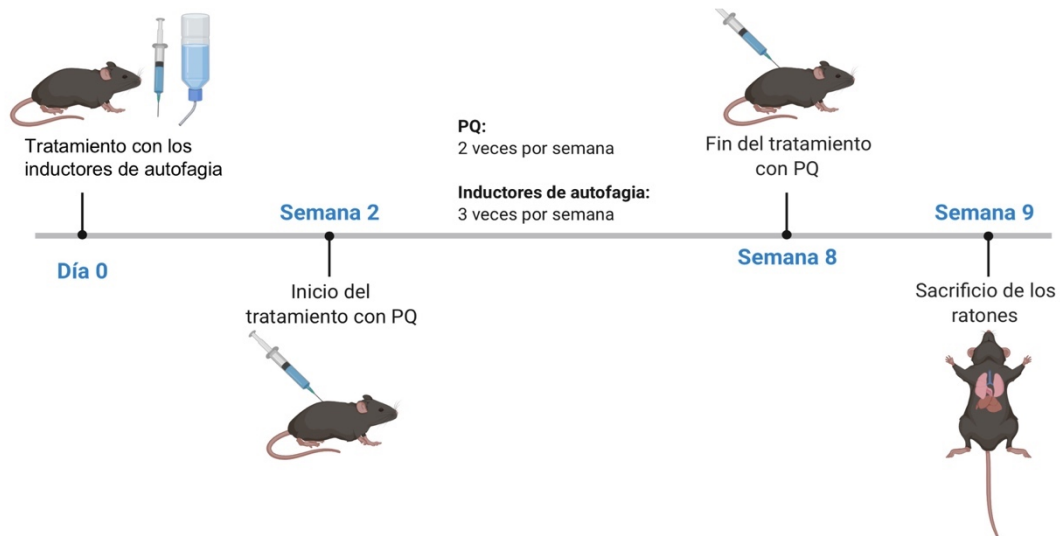


Fig. 6. Modelo experimental. Descripción de los pretratamiento con los inductores de autofagia y la exposición al PQ a través del tiempo.

Los ratones fueron divididos en 8 grupos: 1) Control, 2) Rapamicina, 3) Metformina, 4) Trehalosa, 5) PQ, 6) Rapamicina + PQ, 7) Metformina + PQ, y 8) Trehalosa + PQ. El grupo control fue inyectado por vía intraperitoneal con PBS. La rapamicina (1 mg/Kg) (R-5000, LC Laboratories) y el paraquat (10 mg/Kg) (227320010, Acros Organics) se prepararon en PBS y también fueron administrados por vía intraperitoneal. La metformina (500 mg/kg) (D150959, Sigma Aldrich) y la trehalosa (2%) (182551000, Acros Organics) se administraron por vía oral en el agua para beber, las cuales fueron preparadas y colocadas en los bebederos diariamente. La rapamicina se administró cada tercer día. Se realizó un pretratamiento con los inductores de autofagia (rapamicina, metformina y trehalosa) una semana previa al tratamiento con paraquat y durante las 7 semanas consecutivas. El paraquat se utilizó para

inducir el modelo experimental de la EP y se aplicó dos veces por semana, por 7 semanas consecutivas (Fig. 6).

Al final de los tratamientos se realizó la evaluación de la función motora y cognitiva. Posteriormente, tres ratones de cada grupo fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal de xilacina 10mg/kg (Q7833099, PiSA Labs, General Escobedo, Mexico) y ketamina 100mg/kg (Q7833028, PiSA Labs). Posteriormente, se realizó perfusión intracardiaca con paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS. Los cerebros fueron removidos, post-fijados por 24 h en PFA 4% y procesados para realizar cortes en parafina de 5 μ m, para su posterior análisis por inmunofluorescencia. Por otro lado, tres ratones de cada grupo fueron sacrificados por dislocación cervical, se colectaron los cerebros y se colocaron en buffer para ensayo de radioinmunoprecipitación (RIPA, pos sus siglas en inglés) para aislar las proteínas, seguido de su análisis por western blot.

6.3 Evaluación de la función motora y cognitiva

6.3.1 Prueba de la marcha

Para evaluar la función motora se analizó el patrón de la marcha de los ratones, para ello se pintaron las patas de los ratones con pintura lavable no tóxica. Se utilizaron dos colores, uno para las extremidades posteriores y otro para las extremidades anteriores. Después, se dejó que caminaran a través de un túnel sobre una hoja de papel. Esta prueba aprovecha el comportamiento natural del ratón y su afinidad por los pequeños lugares oscuros. El túnel que se utilizó

tenía las dimensiones que permiten que los ratones puedan caminar cómodamente y dar suficientes pasos (> 4) para poder medir la marcha.

Antes de iniciar con la prueba, se realizó la aclimatación de los ratones durante 30 min. Se evaluó la longitud y el ancho de la zancada. Este enfoque es lo suficientemente sensible como para detectar cambios tempranos en la marcha, y debido a su enfoque no invasivo, permite evaluar grupos a lo largo de la vida o evolución de la enfermedad.

6.3.2 Prueba de la construcción del nido

La función cognitiva se puede medir a través de comportamientos sociales directamente relacionados con las funciones reproductivas y la crianza de los hijos. En el caso de la anidación de pequeños roedores, los nidos son importantes para la conservación del calor, así como para la reproducción y el refugio.

Para realizar la prueba de la construcción del nido, los ratones recibieron 5 g de algodón comprimido; la evaluación se realizó en base a un sistema de puntuación tomando en cuenta la calidad de los nidos. Brevemente, los nidos fueron evaluados considerando la altura y el cierre de las paredes que rodean la cavidad del nido. Las puntuaciones más altas indicaron nidos de mayor calidad, equivalentes a un comportamiento normal (puntuación de 5 = nido en forma de domo completo), mientras que aquellos con puntuaciones más bajas

correspondieron a nidos de mala calidad e indicaron un comportamiento anormal (puntuación de 4 = nido en forma de domo incompleto; puntuación de 3 = nido en forma de copa, puntuación de 2 = nido plano, y las puntuaciones de 1 y 0 se refieren a material de anidación perturbado y no perturbado, respectivamente).

6.4 Inmunofluorescencia

Los cerebros obtenidos después de la perfusión intracardiaca fueron procesados por la técnica histológica convencional e incluidos en parafina, para luego realizar cortes histológicos seriados en plano coronal de 5 μm (como se describió previamente). Los cortes histológicos fueron desparafinizados en xilol e hidratados en concentraciones decrecientes de alcohol. Posteriormente, se realizó la recuperación de los antígenos con calor, utilizando el buffer de recuperación de antígenos (TRS, por sus siglas en inglés) Tris/EDTA a pH 9. Después, se realizó el bloqueo con suero de caballo al 10%, seguido de la incubación con el anticuerpo primario (1:1000): anti-TH de ratón (sc-25269, Santa Cruz), anti-CNPasa de ratón (PA5-27972, Invitrogen), anti-GFAP de conejo (ab7260, Abcam), anti-Iba1 de conejo (178847, Abcam), anti-AMPK alpha 1 (phospho T183) + AMPK alpha 2 (phospho T172) de conejo (ab23875, Abcam), anti-LC3 de conejo (L7543, Merck Millipore) o anti- α -sinucleína de ratón (sc-12767, Santa Cruz Biotechnology) durante toda la noche a 4 °C. Al final de la incubación se realizó un lavado con TBST y las secciones fueron incubadas con el anticuerpo secundario (1:2000): Alexa 488 anti-conejo

(ab150077, Abcam) o Alexa 488 anti-ratón (A11001, Invitrogen) durante 1 h a temperatura ambiente y luego se realizó un lavado con TBST. Por último, las secciones fueron incubadas con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) a una concentración de 100 ng/mL durante 15 min y fueron montadas con VECTASHIELD Antifade Mounting Medium (H1200, Thermo Fisher Scientific). Las imágenes se obtuvieron usando un microscopio fluorescente Nikon Eclipse 50i y se analizaron con el software ImageJ.

6.5 Western blot

Los cerebros fueron lisados en tampón de ensayo de radioinmunoprecipitación (RIPA, por sus siglas en inglés) (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, Na₂EDTA 1 mM, ácido tetraacético de etilenglicol (EGTA) 1 mM, Triton X-100 al 1 %) que contenía inhibidor de proteasas (78430, Thermo Fisher Scientific). Los lisados celulares fueron sonicados y centrifugados. Posteriormente, se recuperó el sobrenadante y los sedimentos fueron desechados. Se cargaron 80 µg de proteína por muestra, las cuales fueron separadas mediante electroforesis SDS-PAGE, luego fueron transferidas a una membrana de PVDF. Después, las membranas se incubaron a 4°C durante la noche con el anticuerpo primario (1:1000): anti-TH de ratón (sc-25269, Santa Cruz) o anti-β-actina de conejo (sc-2357, Santa Cruz Biotechnology), éste último se utilizó como control de carga. Se utilizó un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con peroxidasa (sc-2004, Santa Cruz Biotechnology) a una dilución de 1:2000, y las bandas fueron detectadas con el sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Pico Plus

(34580, Thermo Fisher Scientific). El análisis de densitometría se realizó utilizando el software ImageJ.

6.6 Ensayo de TUNEL

El ensayo de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) se realizó utilizando el kit de ensayo de fragmentación de ADN *in situ* BrdU-Red (ab66110, Abcam), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, las secciones de tejido se incubaron con proteinasa K 20 µg/ml durante 5 min a temperatura ambiente, seguido de solución de marcaje de ADN (Br-dUTP + enzima TdT) durante 1 h a 37 °C y, finalmente, anticuerpo anti-BrdU-Red durante 30 min a temperatura ambiente. Las secciones se montaron con VECTASHIELD Antifade Mounting Medium con DAPI (H1200, Thermo Fisher Scientific). Las imágenes se obtuvieron en un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 50i y se analizaron utilizando el software ImageJ.

6.7 Análisis del perfil de la microbiota intestinal

6.7.1 Extracción del ADN bacteriano

El ADN bacteriano fue extraído a partir de las heces, ya que se ha determinado que representan a la microbiota intestinal (59). Las heces fueron obtenidas de tres sujetos por grupo, colectadas directamente del animal tras la defecación y se congelaron a -80°C hasta su procesamiento. El ADN genómico bacteriano fue obtenido con la técnica fenol-cloroformo. Primero, se realizó la incubación

de la materia fecal con el buffer de lisis SNET (Tabla I) con proteinasa K (400 µg/mL) y lisozima (1 mg/mL), por 1 h a 40 °C y 1 h a 50 °C. Luego, las muestras fueron centrifugadas a máxima velocidad y se obtuvo el sobrenadante, al cual se le agregó un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (P2069, Sigma-Aldrich), para separar el ADN de las proteínas. Después de una centrifugación a máxima velocidad se recolectó la fase acuosa. Posteriormente, se agregó un volumen de isopropanol frío para precipitar el ADN, seguido de un lavado con etanol al 70%. Por último, el ADN fue disuelto en buffer TE1X pH 8.0. La calidad y cantidad de ADN fueron evaluadas mediante electroforesis en gel de agarosa y espectrofotometría.

TABLA I. BUFFER DE LISIS SNET

Reactivo	Volumen	Concentración final
EDTA 0.5 M (pH 8.0)	400 µL	5 mM
Tris 1 M (pH 8.0)	800 µL	20 mM
NaCl 1 M	16 mL	400 mM
SDS 10%	4 mL	1%

* Aforar con 18.8 mL de agua destilada.

6.7.2 PCR tiempo real

Se realizó el análisis de la microbiota intestinal usando oligonucleótidos dirigidos contra una región del ADN ribosomal (ADNr) 16S altamente conservada a nivel taxonómico de familia bacteriana. Además, se utilizó un par de oligonucleótidos que amplifica una región del ADNr 16S conservada en

todas las bacterias, como gen endógeno. Las familias analizadas fueron: *Enterobacteriaceae* (60), *Lactobacillaceae* (61), *Enterococcaceae* (62) y del grupo *Bacteroidaceae-Prevotellaceae* (60). Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 10 µL conteniendo: 0.2 mM de cada dNTP, 1.5 mM de MgCl₂, SYBR Green 1X (S33102, Invitrogen), 0.6 U/µL de Taq ADN polimerasa, 4 ng/µL de cada oligonucleótido (Tabla II) y 50 ng de ADN o agua. Las amplificaciones se realizaron con los siguientes ciclos de temperatura: un ciclo a 95°C (3 min); 40 ciclos a 95°C (30 s), 58°C (30 s), 72°C (30 s) y un ciclo final a 95°C (15 s). Finalmente, los análisis de la curva de fusión se realizaron calentando lentamente de 55 a 95°C (1°C por ciclo de 10 s) con mediciones simultáneas de las intensidades de señal de SYBR Green.

TABLA II. OLIGONUCLEÓTIDOS USADOS EN LA PCR TIEMPO REAL

Familia		Secuencia (5' to 3')	pb	Referencia
<i>Lactobacillaceae</i>	F R	AGCAGTAGGGAATCTTCCA CACCGCTACACATGGAG	341	S. Bartosch, A. et. al.
<i>Enterococcaceae</i>	F R	AGAAATTCCAAACGAACTTG CAGTGCTCTACCTCCATCATT	92	T. Rinttilä, A. et. al.
<i>Enterobacteriaceae</i>	F R	CATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGC CTCTACGAGACTCAAGCTTGC	195	H. Ryu. et. al.
<i>Bacteroidaceae</i> <i>Prevotellaceae</i>	F R	GAAGGTCCCCCACATTG CAATCGGAGTTCTTCGTG	418	S. Bartosch, A. et. al.
16s universal	F R	TCCTACGGGAGGCAGCAGT GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT	466	S. Bartosch, A. et. al.

6.8 Análisis estadístico

Todas las repeticiones de cada experimento fueron independientes y se realizaron en días separados. Los datos obtenidos se analizaron con la prueba ANOVA de 2 vías y t de Student usando el software estadístico GraphPad Prism 6.0. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$. Los datos se representaron como la media de al menos 3 experimentos independientes \pm DE. En los ensayos de inmunofluorescencia, para determinar el número de células positivas por campo, se cuantificaron todas las células presentes en 3 campos diferentes por cada sujeto; cuando se determinó el porcentaje de células positivas, el control sin tratamiento se estableció como el 100%. Para obtener los resultados de la intensidad de fluorescencia se cuantificó toda la señal positiva presente en 3 campos diferentes por sujeto.

CAPÍTULO 7

RESULTADOS

7.1 Evaluación de la función motora y cognitiva

7.1.1 La metformina y la trehalosa no modifican el peso corporal durante el modelo de la EP

Primero, se evaluó el peso corporal de los ratones una vez por semana, durante las 8 semanas de duración del modelo de la EP. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos analizados (Fig. 5). Por lo tanto, estos datos sugieren que los tratamientos administrados, incluidos la metformina y trehalosa, no alteran el peso de los ratones utilizados en este trabajo.

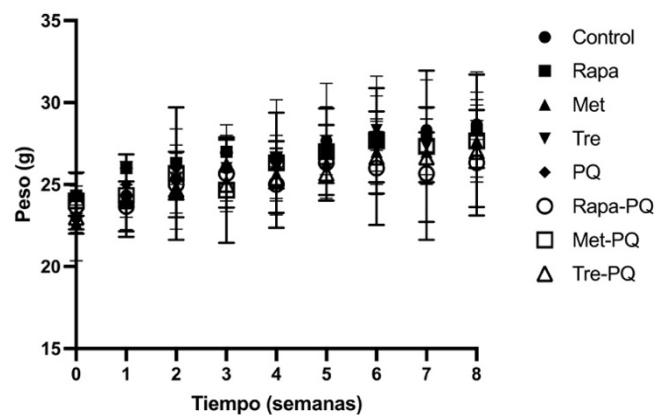


Fig. 7. La metformina y la trehalosa no afectan el peso corporal en el modelo de la EP. El peso corporal de los ratones se midió semanalmente. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Rapa, rapamicina; Met, metformina; Tre, trehalosa; PQ, paraquat. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$.

7.1.2 La inducción de autofagia con metformina y trehalosa previene la disfunción motora en el modelo animal de la EP

Los Criterios de Diagnóstico Clínico de la Sociedad de Trastornos del Movimiento para la enfermedad de Parkinson (MDS-PD, por sus siglas en inglés), establecen que la principal característica para identificar la enfermedad es la alteración del movimiento (63). Por lo tanto, se evaluó la función motora en el modelo animal de la EP utilizando la prueba de la marcha, que proporciona datos cuantificables sobre las alteraciones del movimiento (64). Durante esta prueba se determinó el largo y ancho de la zancada tanto de las patas posteriores como de las anteriores (Fig. 8A).

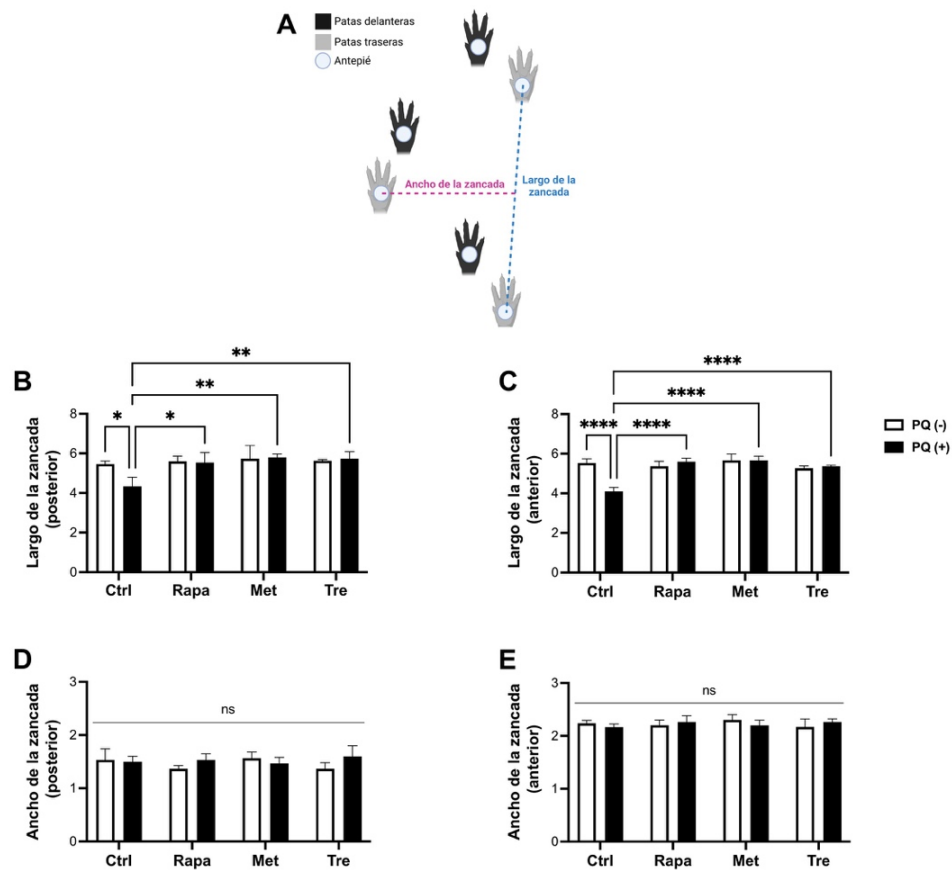


Fig. 8. Los inductores de autofagia previenen la disfunción motora en el modelo animal de la EP. A. Esquema representativo de los parámetros evaluados en la prueba

de la marcha. B, C. Evaluación del largo de la zancada de las patas posteriores y anteriores; se observó una alteración en el patrón de la marcha en el grupo tratado con PQ, mientras que los ratones tratados con los inductores de autofagia y PQ mostraron un patrón similar al del grupo control. D, E. Evaluación del ancho de la zancada tanto de las patas posteriores como de las anteriores, en donde no se observó diferencia estadísticamente significativa. Ctrl, control; Rapa, rapamicina; Met, metformina; Tre, trehalosa; PQ, paraquat. Se consideró estadísticamente significativo un valor de probabilidad de $p < 0.05$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$; ns, no significativo.

El grupo control mostró una función motora normal, que se vio afectada en respuesta al PQ, lo cual fue evidenciado por la disminución en el largo de la zancada de las patas posteriores y anteriores en comparación con el grupo control (Fig. 8B, C), mientras que el ancho de la zancada no se vio afectado entre los diferentes grupos (Fig. 8D, E). Sin embargo, la inducción de la autofagia evitó las alteraciones motoras mediadas por el PQ, debido a que los grupos tratados con los inductores de autofagia previo al PQ mostraron un largo de zancada similar al grupo control. Por lo tanto, la metformina y la trehalosa previenen el deterioro de la función motora en el modelo animal de la EP.

7.1.3 La inducción de autofagia con metformina y trehalosa previene la disfunción cognitiva en el modelo animal de la EP

El deterioro cognitivo se encuentra entre las alteraciones no motoras más frecuentes de la EP (3). Por lo tanto, se evaluó en el modelo animal de la EP usando la prueba de la construcción del nido, la cual se basa en la integridad funcional de los sistemas sensorial y motor, para así determinar si existe una alteración cognitiva (65). Además, la construcción del nido requiere del

movimiento orofacial y de las extremidades anteriores, que dependen de la dopamina (66).

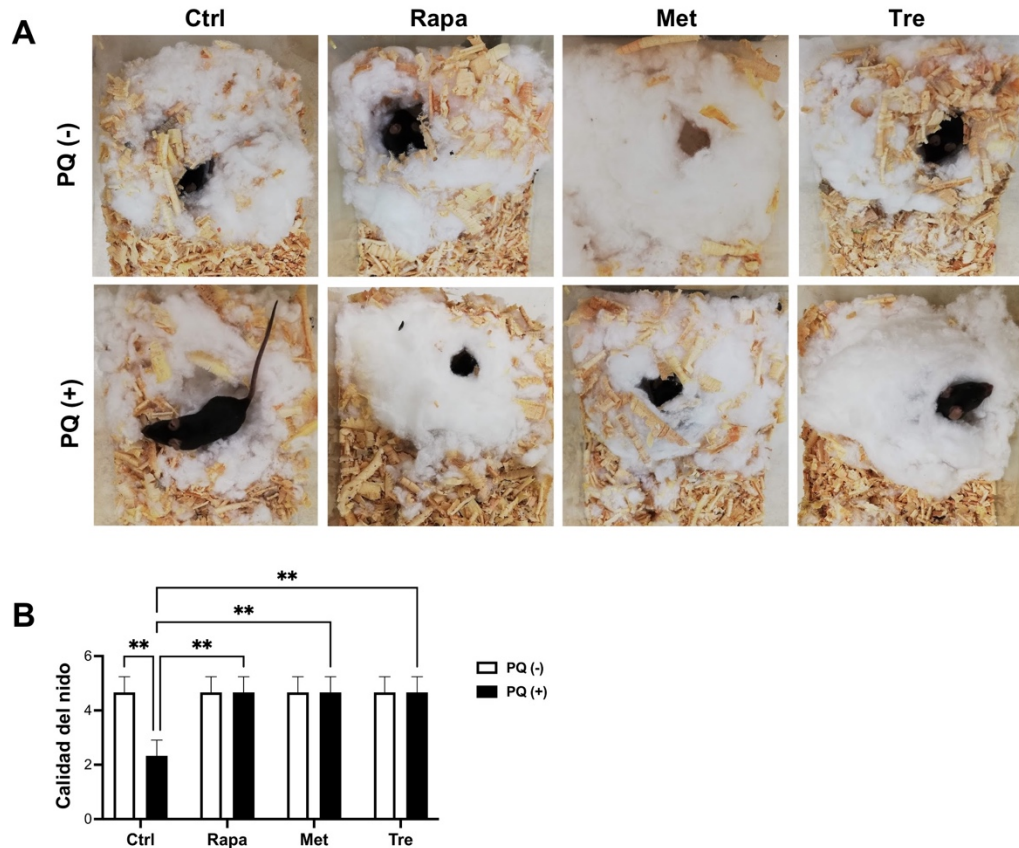


Fig. 9. La inducción de autofagia previene la disfunción cognitiva en el modelo animal de la EP. A. Imágenes representativas de los nidos construidos, donde se muestra que los ratones tratados con PQ construyeron nidos de mala calidad; en cambio, cuando se realizó el pretratamiento con los inductores de autofagia, los ratones construyeron nidos de buena calidad. B. Los nidos se calificaron de la siguiente manera: 5 = nido en forma de domo completo, 4 = nido en forma de domo incompleto, 3 = nido en forma de copa, 2 = nido plano, 1 = material de anidación perturbado y 0 = material de anidación no perturbado. Control, control; Rapa, rapamicina; Met, metformina; Tre, trehalosa; PQ, paraquat. Se consideró estadísticamente significativo un valor de probabilidad de $p < 0.05$; $**p < 0.01$.

Los ratones tratados con los inductores de autofagia construyeron nidos en forma de domo completo y bien organizados, comparables con los construidos por el grupo control. Los ratones tratados con PQ construyeron nidos incompletos en forma de copa y desorganizados. Curiosamente, el tratamiento

con los inductores de autofagia ocasionó un efecto de protección sobre la capacidad de la construcción de los nidos en los ratones afectados por la toxicidad del PQ (Fig. 9A, B). Por lo tanto, la metformina y la trehalosa previenen el deterioro cognitivo en el modelo animal de la EP.

7.2 Evaluación de las neuronas dopaminérgicas y las células de la glía

7.2.1 La metformina y la trehalosa inducen autofagia en el mesencéfalo a través de la fosforilación de AMPK

Antes de evaluar el efecto de la metformina y la trehalosa sobre las neuronas dopaminérgicas y las células de la glía en nuestro modelo, se confirmó que estas moléculas llevaran a cabo la inducción de autofagia en el mesencéfalo. Para ello, se evaluó mediante inmunofluorescencia la proteína cinasa activada por AMP (AMPK), cuya fosforilación ocasiona su activación para posteriormente inducir autofagia (49). El tratamiento con metformina y trehalosa indujo la fosforilación de AMPK en la subunidad α en la T172, la cual se mantuvo incluso después del tratamiento con el PQ (Fig. 10A, B). Cabe mencionar, que la rapamicina induce autofagia a través de un mecanismo independiente de AMPK, y por lo tanto sus niveles de fosforilación son comparables con el grupo control.

Además, se confirmó la inducción de autofagia mediante la detección de la proteína LC3-II. Durante la autofagia, la forma citosólica de LC3 (LC3-I) se conjuga con el lípido fosfatidiletanolamina para convertirse en LC3-II, la cual es

reclutada a la membrana de los autofagosomas (67). Por lo tanto, después del tratamiento con los inductores de autofagia, la proteína LC3-II se observó como un patrón punteado que representa la formación de los autofagosomas (Fig. 10C). Estos resultados indican que la metformina y la trehalosa activan a AMPK mediante su fosforilación, para posteriormente inducir la autofagia en el mesencéfalo en nuestro modelo de la EP.

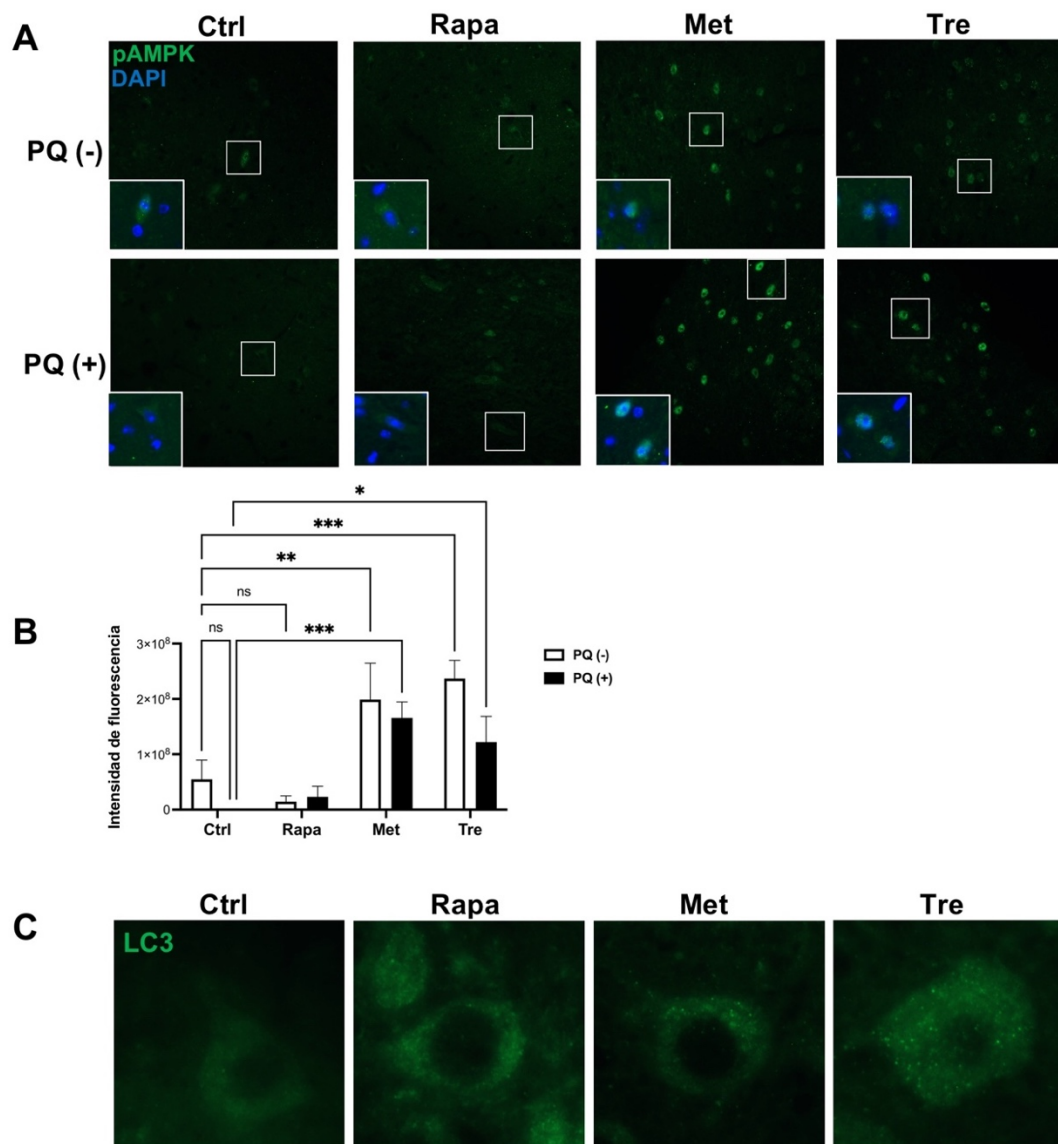


Fig. 10. La metformina y la trehalosa inducen autofagia a través de la fosforilación de AMPK. A. la fosforilación de AMPK (pAMPK) se evaluó usando un

anticuerpo anti-pAMPK. B. Se cuantificó la intensidad de fluorescencia de la señal positiva de pAMPK. La metformina y la trehalosa indujeron la fosforilación y translocación de AMPK al compartimento nuclear, lo que indica su activación y, por lo tanto, la inducción de autofagia. C. Detección de los autofagosomas mediante inmunofluorescencia usando un anticuerpo anti-LC3. El tratamiento con los inductores de autofagia provoca el reclutamiento de LC3, dando como resultado la formación de los autofagosomas (patrón punteado). Control, control; Rapa, rapamicina; Met, metformina; Tre, trehalosa; PQ, paraquat. Se consideró estadísticamente significativo un valor de probabilidad de $p < 0.05$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns, no significativo.

7.2.2 La metformina y la trehalosa ejercen un efecto protector sobre la pérdida de las neuronas dopaminérgicas mediada por PQ

Dado que la principal característica fisiopatológica de la EP es la pérdida selectiva de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra (4), se evaluó si la metformina y la trehalosa tienen un efecto protector sobre ellas.

Los ratones tratados con los inductores de autofagia mostraron una población de neuronas dopaminérgicas similar a la del grupo control. Se observó una disminución notable en las neuronas dopaminérgicas en respuesta al PQ en comparación con el grupo control. Es importante destacar que la metformina y la trehalosa mostraron un efecto protector sobre la pérdida neuronal inducida por el PQ, similar a lo reportado previamente en respuesta a la rapamicina (16) (Fig. 11A). Estos resultados fueron corroborados mediante la cuantificación de las neuronas positivas para TH (Fig. 11B) detectadas por inmunofluorescencia, y por la detección de los niveles de la proteína TH en la región del meséncéfalo mediante la técnica de western blot (Fig. 11C, D). De acuerdo a los resultados obtenidos, podemos concluir que la metformina y la trehalosa ejercen un efecto protector frente a la neurodegeneración dopaminérgica mediada por el PQ.

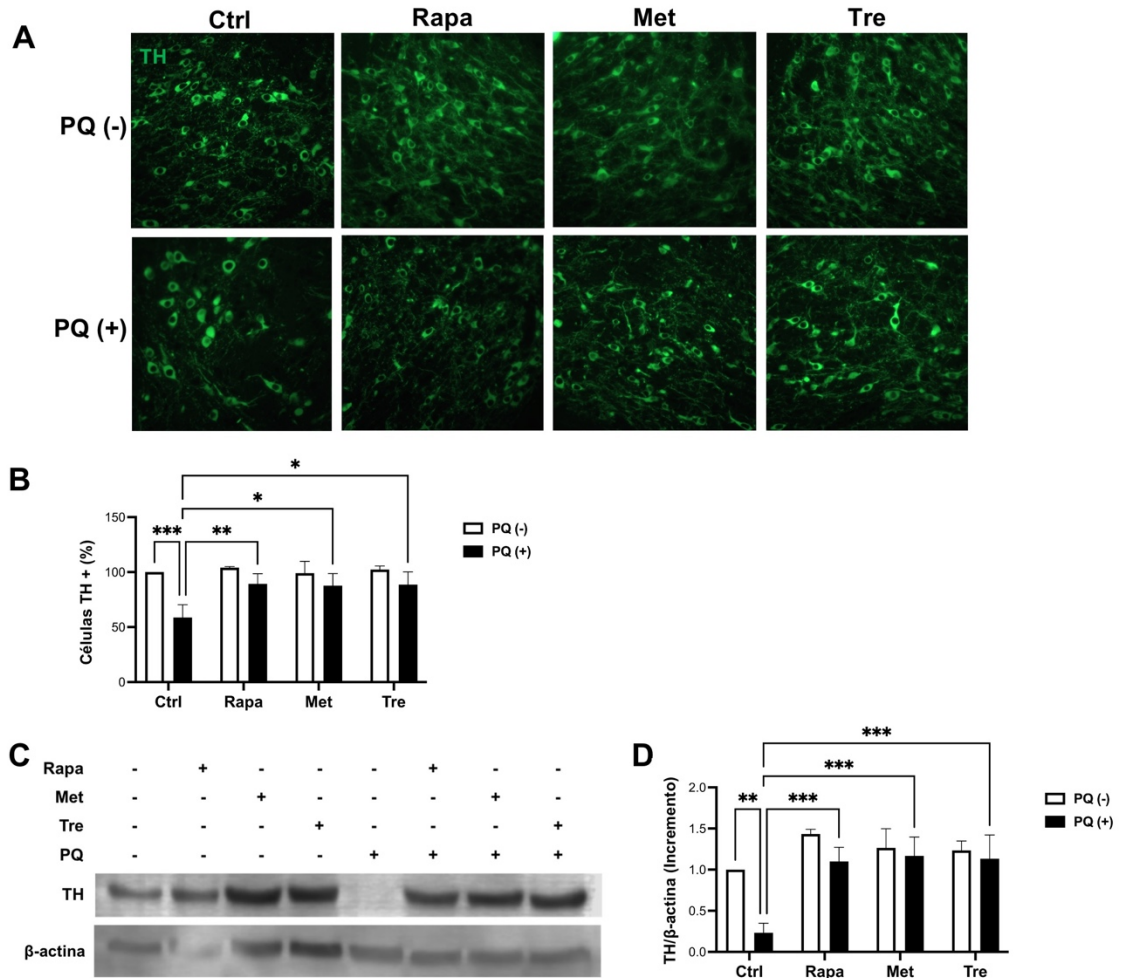


Fig. 11. Los inductores de autofagia previenen la pérdida de las neuronas dopaminérgicas en el modelo de la EP. A. Inmunofluorescencias representativas de la detección de las neuronas dopaminérgicas utilizando un anticuerpo anti-TH (tirosina hidroxilasa). B. Determinación del porcentaje de las células TH positivas. El pretratamiento con metformina o trehalosa protegió contra la muerte neuronal inducida por PQ. C. Detección de TH por western blot. D. Los valores de la densitometría se normalizaron con respecto a la β -actina. En el análisis de western blot, se confirmó que los inductores de autofagia protegen contra la pérdida de las neuronas dopaminérgicas. Control, control; Rapa, rapamicina; Met, metformina; Tre, trehalosa; PQ, paraquat. Se consideró estadísticamente significativo un valor de probabilidad de $p < 0.05$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

7.2.3 La metformina y la trehalosa ejercen un efecto protector sobre las alteraciones de las células de la glía en el modelo animal de la EP

Los oligodendrocitos envuelven los axones con múltiples vainas de mielina para generar una transducción de señal rápida y eficiente, además proporcionan apoyo trófico y metabólico a las neuronas, promoviendo su supervivencia (68). Debido a la estrecha asociación entre los oligodendrocitos y las fibras nerviosas, nos preguntamos si estas células estaban afectadas en el modelo de la EP y si eran protegidas por los inductores de autofagia. El tratamiento con los inductores de autofagia no alteró la población de los oligodendrocitos, ya que se mantuvieron en niveles comparables al grupo control. El PQ provocó una disminución significativa en esta población celular, la cual fue evitada mediante el tratamiento con los inductores de autofagia, previo a la exposición al PQ (Fig. 12A). Estos hallazgos se confirmaron cuantificando la intensidad de fluorescencia de CNPasa (Fig. 12B).

Los astrocitos son el tipo de célula más abundante en el SNC, y participan activamente en muchas funciones, como el control de la transmisión sináptica, la regulación del metabolismo y el flujo sanguíneo, la formación de la barrera hematoencefálica, la regulación de los ritmos circadianos y la neurogénesis (69, 70); además, responden al daño del SNC a través de un proceso llamado astrocitosis (71). Por lo tanto, se analizó el estado de los astrocitos en el modelo animal de la EP. La población de los astrocitos permaneció sin alteración en los ratones tratados con los inductores de autofagia en comparación con el grupo

de control (Fig. 12C). Los ratones expuestos al PQ mostraron una astrocitosis evidente, que fue evitada cuando se indujo la autofagia con rapamicina, metformina o trehalosa. Estos datos fueron confirmados por la cuantificación de células positivas para la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (Fig. 12D).

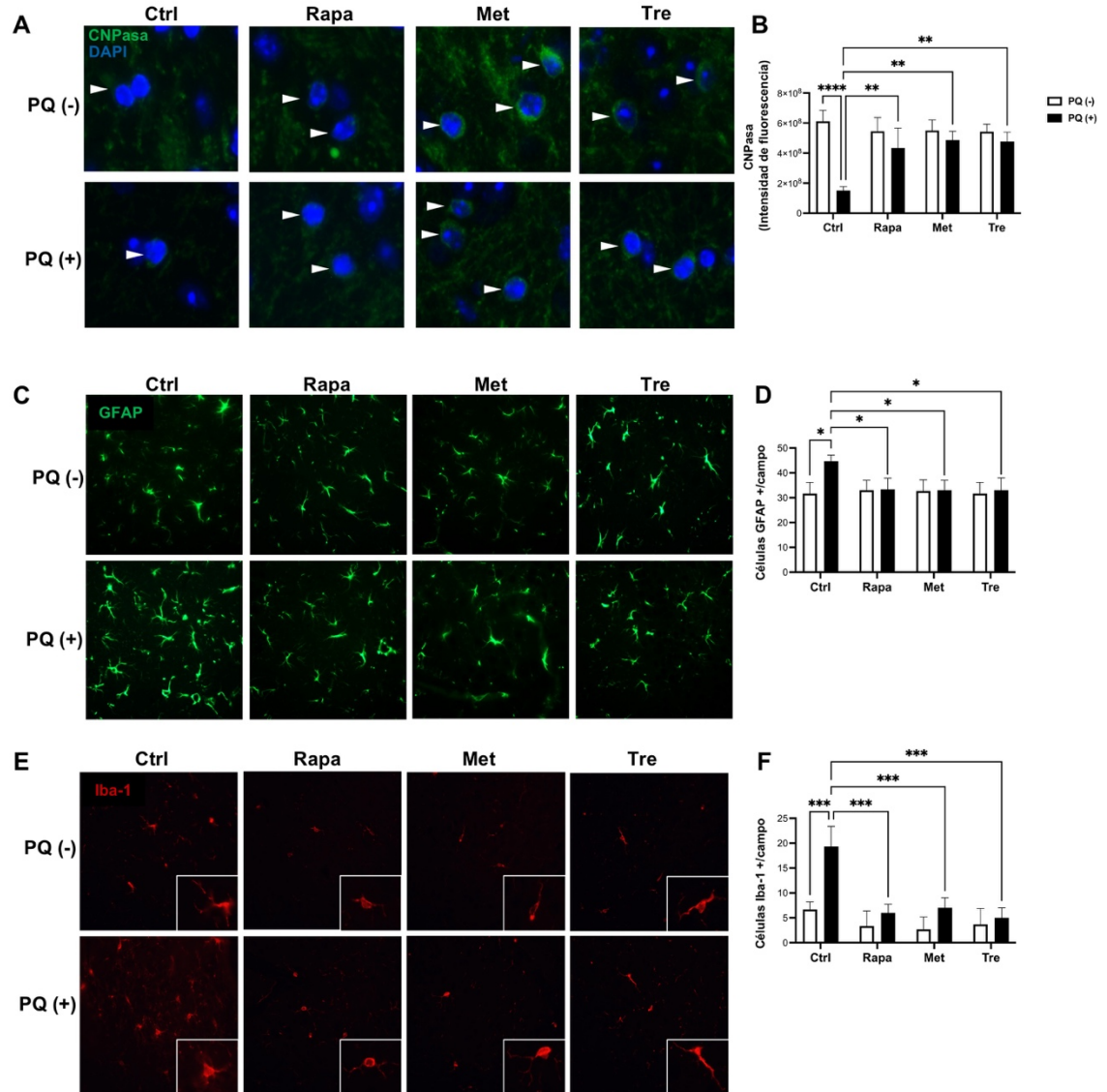


Fig. 12. Los inductores de autofagia previenen la pérdida de los oligodendrocitos, la astrocitosis y la microgliosis en el modelo de la EP. Realizamos inmunofluorescencias para detectar A. oligodendrocitos usando un anticuerpo anti-CNPasa; C. astrocitos usando anti-GFAP y E. microglía activada usando anti-Iba-1. B. Cuantificación de la intensidad de fluorescencia positiva para CNPasa. La inducción de autofagia con metformina y trehalosa previene la pérdida de oligodendrocitos inducida por el PQ. D. Cuantificación de células

GFAP positivas. La astrocitosis inducida por PQ se previno mediante un pretratamiento con los inductores de autofagia. F. Cuantificación de la intensidad de fluorescencia positiva para Iba-1. El PQ provocó la activación de la microglía, lo que resultó en neuroinflamación, que se evitó mediante el tratamiento con los inductores de autofagia. Control, control; Rapa, rapamicina; Met, metformina; Tre, trehalosa; PQ, paraquat. Se consideró estadísticamente significativo un valor de probabilidad de $p < 0.05$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

La activación de la microglía y el proceso inflamatorio son fundamentales para la patogénesis de la EP (72). Por lo tanto, se evaluó el efecto de los inductores de autofagia sobre la activación de la microglía mediada por el PQ. El grupo control mostró los niveles basales de la microglía activada, los cuales no se vieron afectados por la inducción de la autofagia. Por el contrario, el PQ aumentó significativamente la activación de microglía y todos los inductores de autofagia la previnieron (Fig. 12E). Estos resultados fueron respaldados por la cuantificación de las células positivas para la molécula adaptadora de unión a calcio ionizado 1 (IBA-1) (Fig. 12F). En conjunto, estos hallazgos indican que la inducción de la autofagia previene la muerte de los oligodendrocitos, la astrocitosis y la microgliosis inducidas por el PQ.

7.3 Evaluación de la agregación de la proteína α -Syn y la muerte celular inducida por el PQ

7.3.1 La inducción de la autofagia previene la agregación de la α -Syn y la muerte celular inducida por el PQ en la sustancia nigra pars compacta

La α -sinucleína (α -Syn), una proteína soluble altamente expresada en las terminales presinápticas del SNC. La agregación de esta proteína es una de las

principales características fisiopatológicas de la EP (73). Por lo tanto, se analizó su presencia el modelo animal de la EP. Los ratones tratados con el PQ mostraron un patrón punteado que representa la agregación de la α -Syn (Fig. 13A). Curiosamente, los inductores de autofagia disminuyeron la agregación de la α -Syn inducida por el PQ (Fig. 13A, B), lo que sugiere que la autofagia inducida por la rapamicina, metformina o trehalosa previene la agregación de la α -Syn en el modelo animal de la EP.

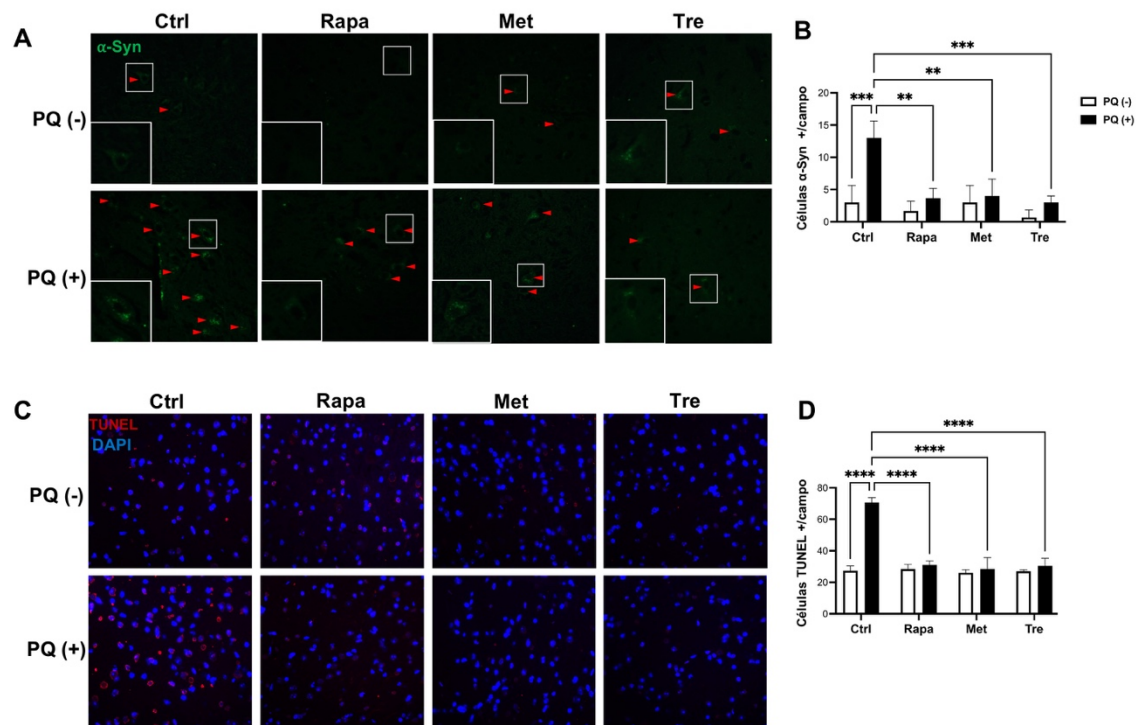


Fig. 13. La metformina y trehalosa previenen la agregación de la α -Syn y la muerte celular inducida por el PQ. A. Detección de la α -Syn por inmunofluorescencia y B. cuantificación de las células positivas para α -Syn. El pretratamiento con los inductores de autofagia protegió de la agregación de la proteína α -Syn inducida por el PQ. C. Detección de la fragmentación del ADN usando el ensayo de TUNEL. D. Cuantificación de las células positivas para TUNEL. El pretratamiento con metformina o trehalosa protegió de la muerte celular inducida por el PQ. Control, control; Rapa, rapamicina; Met, metformina; Tre, trehalosa; PQ, paraquat. Se consideró estadísticamente significativo un valor de probabilidad de $p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$; $****p < 0.0001$.

Se ha demostrado que el PQ induce la muerte celular mediada por apoptosis dependiente e independiente de caspasas, acompañada de la escisión del ADN cromosómico en fragmentos (74). Por lo tanto, se evaluó la muerte celular con el ensayo de TUNEL, que identifica la fragmentación del ADN en función de la capacidad de la transferasa desoxinucleotidil terminal (TdT) para marcar los extremos fragmentados del ADN de doble cadena (75). Las células positivas para TUNEL aumentaron drásticamente en los ratones expuestos al PQ, mientras que la inducción previa al PQ con rapamicina, metformina o trehalosa protegió a las células de la toxicidad del PQ en el modelo de la EP (Fig. 11C, D).

7.4 Análisis de la microbiota intestinal en el modelo animal de la EP

7.4.1 La metformina y trehalosa previenen la alteración del perfil de la microbiota intestinal en el modelo de la EP inducido con PQ

La homeostasis de la barrera intestinal depende principalmente de la relación entre la microbiota y el epitelio intestinal (76). Además, se ha reportado que las alteraciones en la barrera intestinal tienen un efecto directo sobre el SNC, debido al eje microbiota-intestino-cerebro (6). Por lo tanto, se analizó el perfil de la microbiota intestinal en el modelo animal de la EP. Para ello se utilizó PCR tiempo real usando oligonucleótidos dirigidos contra una región del ADN ribosomal (ADNr) 16S altamente conservada a nivel taxonómico de familia bacteriana. Las familias evaluadas fueron *Enterobacteriaceae*, *Lactobacillaceae*, *Enterococcaceae* y el grupo *Bacteroidaceae-Prevotellaceae*.

Además, se utilizó un par de oligonucleótidos que amplifica una región del ADNr 16S conservada en todas las bacterias, como gen endógeno (Tabla II).

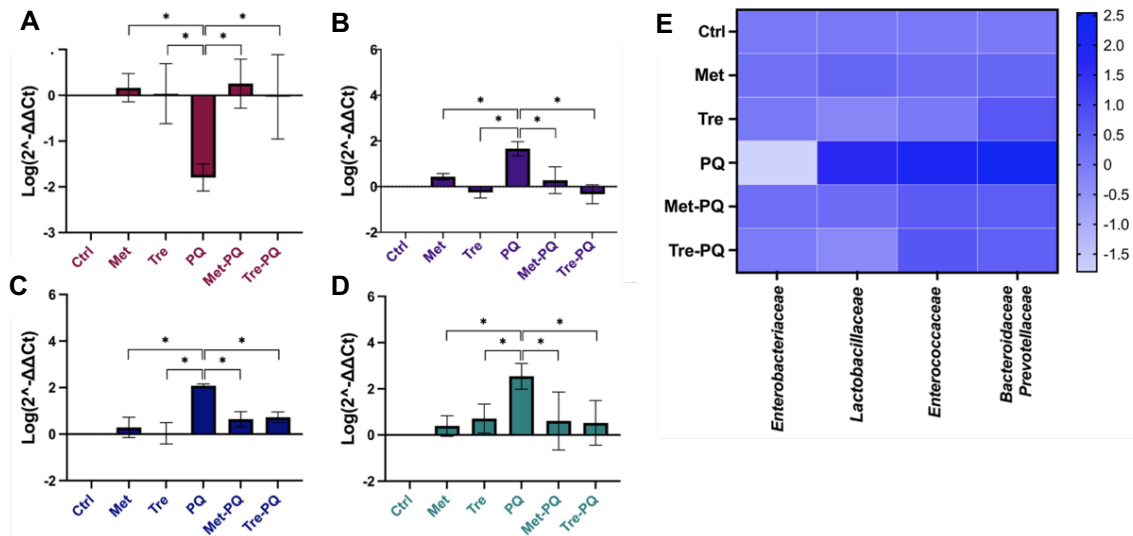


Figura 14. La metformina y trehalosa previenen la alteración del perfil de la microbiota intestinal inducida por el PQ. A partir de las heces se aisló el ADN bacteriano y se amplificó una región del ADNr 16S específica de familia por PCR tiempo real. Se muestran las abundancias relativas de las familias (A) *Enterobacteriaceae*, (B) *Lactobacillaceae*, (C) *Enterococcaceae* y (D) del grupo *Bacteroidaceae-Prevotellaceae*. Los valores fueron normalizados con respecto al grupo control (sin tratamiento), al cual se le asignó el valor de cero. (E) Mapa de calor que muestra las modificaciones de la microbiota intestinal en nuestro modelo. Ctrl, control; Met, metformina; Tre, trehalosa; PQ, paraquat. Se consideró estadísticamente significativo un valor de probabilidad de * $p < 0.05$.

Como resultado de este análisis se encontró que las moléculas inductoras de autofagia no modificaron el perfil de la microbiota intestinal en comparación con el grupo control, lo que sugiere que no ejercen ningún efecto negativo sobre la composición de la microbiota intestinal. Mientras que en el grupo tratado con PQ se observó la modificación en el perfil de la microbiota intestinal evidenciada por la disminución de la familia *Enterobacteriaceae* (Fig. 14A, E) y el incremento de las familias *Lactobacillaceae* (Fig. 14B, E), *Enterococcaceae* (Fig. 14C, E) y

del grupo *Bacteroidaceae-Prevotellaceae* (Fig. 14D, E). Sin embargo, de manera notable, estos cambios fueron prevenidos mediante el pretratamiento con los inductores de autofagia metformina o trehalosa, mostrando niveles similares a los del grupo control. Por lo tanto, la metformina y la trehalosa previenen las alteraciones del perfil de la microbiota intestinal en el modelo de la EP, lo cual puede contribuir a la prevención del desarrollo de la enfermedad.

CAPÍTULO 8

DISCUSIÓN

La EP es un trastorno neurodegenerativo progresivo, para el que desafortunadamente, en la actualidad no se cuenta con un tratamiento que prevenga o modifique la enfermedad. Los pacientes con EP solo disponen de tratamientos paliativos enfocados en el control de los síntomas motores (28). Por lo tanto, la búsqueda de tratamientos que ayuden a frenar las alteraciones neuropatológicas, es fundamental para prevenir la muerte de las neuronas dopaminérgicas y los síntomas motores que deterioran la calidad de vida.

Entre los agentes con potencial para el tratamiento o prevención de la EP se encuentran los inductores de autofagia. La rapamicina es el inductor de autofagia mejor caracterizado hasta la fecha. Previamente, se reportó que reduce el estrés oxidativo y la muerte de las células dopaminérgicas en un modelo de la EP inducido con PQ (16). Aunque la dosis neuroprotectora de la rapamicina es menor a la utilizada como agente inmunosupresor, su aplicación neuroterapéutica sigue siendo controvertida debido a sus propiedades inmunomoduladoras (77). Además, recientemente se reportó que en un modelo animal de la EA, la rapamicina disminuyó la expresión del receptor Trem2 microglial, el cual es crucial para la captación de las placas de β -amiloide ($A\beta$), y por lo tanto reduce su eliminación, lo que sugiere que la rapamicina puede exacerbar patologías relacionadas con el $A\beta$ (46). Por lo tanto, es fundamental evaluar el efecto de otras moléculas inductoras de autofagia, como la

metformina y la trehalosa, en un modelo de la EP, que puedan ejercer efectos protectores a través de diferentes mecanismos.

Puesto que la metformina se usa para el tratamiento a largo plazo de la diabetes mellitus tipo 2 y la trehalosa puede hidrolizarse en glucosa, los niveles de glucosa en sangre podrían verse afectados durante el tratamiento con estos inductores de autofagia. Estudios previos evaluaron los niveles de glucosa en sangre después del tratamiento con diferentes concentraciones de trehalosa, incluida la utilizada en nuestro estudio (2 %) (56) durante 6 semanas, así como una concentración más alta (5 %) (57) durante 13 semanas, y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo control. Además, cuando se administró metformina en pacientes a dosis crecientes, de 500 mg a 2000 mg por día durante 12 semanas, la tolerancia a la glucosa y los niveles de glucosa en sangre no se vieron afectados (51); la dosis máxima de 2000 mg equivale a 41.66 mg/kg (tomando en cuenta un peso promedio de 60 kg), la cual al determinar la dosis equivalente humana (HED, por sus siglas en inglés) para ratones, tomando en cuenta la superficie corporal, corresponde a la dosis de 500 mg/kg usada en este estudio. Sin embargo, existe el riesgo de hipoglucemia cuando la metformina se usa con otros medicamentos antidiabéticos, o se combina con ejercicio intenso, grandes cantidades de alcohol o al no consumir suficientes calorías en la dieta (52, 53). Por lo tanto, ambos inductores de autofagia son candidatos prometedores para su uso a largo plazo.

Además, es relevante mencionar que las dosis de metformina y trehalosa utilizadas en nuestro estudio se encuentran dentro de las dosis aprobadas y recomendadas para su uso en humanos. La dosis de metformina que usamos en este estudio corresponde a la dosis máxima diaria aprobada por la FDA (2000 mg) (78). En cuanto a la trehalosa, la dosis que utilizamos corresponde a 14.7 g por día en humanos (considerando un peso promedio de 60 kg), la cual se encuentra por debajo del límite diario de consumo de azúcar recomendado por la OMS, que es de 25 g (79).

Previamente, se administró la metformina (150 mg/kg) por vía oral, dos veces al día durante 3 semanas en ratas. Posteriormente, se determinó su biodisponibilidad en el SNC. La metformina se distribuyó a diferentes concentraciones en el cuerpo estriado (1.9 ± 0.3 nmol/g), hipocampo (7.3 ± 1 nmol/g), cerebelo (7.8 ± 1.2 nmol/g), hipotálamo (3.4 ± 0.4 nmol/g), corteza frontal (11.7 ± 2.1 nmol/g) y líquido cefalorraquídeo (44.3 ± 2.2 μ mol/g) (80), lo que indica que la metformina puede llegar intacta al SNC para ejercer su efecto neuroprotector cuando es administrada por vía oral.

Actualmente, no hay reportes de la biodisponibilidad de trehalosa en el cerebro, pero existen estudios que indican que la vía enterohepática metaboliza aproximadamente el 99 % de la trehalosa ingerida por vía oral, y solo el 1 % se absorbe en el torrente sanguíneo (81, 82). Probablemente, la trehalosa no absorbida es fermentada por la microbiota intestinal a ácidos grasos de cadena corta como acetato, propionato y butirato (83), lo que sugiere la posibilidad de

que los efectos neuroprotectores de la trehalosa ocurran a través del eje microbiota-intestino-cerebro (84). Curiosamente, se ha detectado trehalasa, responsable de la hidrolización de la trehalosa en dos moléculas de glucosa, en la corteza cerebral, el hipocampo y el cerebelo de ratones (85, 86), y se ha demostrado que la trehalosa es necesaria para la arborización neuronal durante la maduración (85).

En el presente estudio se determinó que la metformina y la trehalosa no son tóxicas, ya que no afectaron el peso y la supervivencia en el modelo animal de la EP. Previamente, se ha reportado que la metformina y la trehalosa son moléculas inductoras de autofagia (26, 39), lo cual fue confirmado en este estudio, mediante la detección del aumento de la proteína LC3-II a través de inmunofluorescencia. Además, la metformina y la trehalosa indujeron la fosforilación de AMPK (pAMPK) en la treonina 172 de la subunidad α , y su localización en el núcleo en la región del mesencéfalo. Probablemente, la translocación de pAMPK al núcleo activa la autofagia al regular la expresión de genes relacionados con factores de transcripción como FOXO3, TFEB y BRD4 (87). Existen reportes que indican que la translocación de pAMPK al núcleo está regulada por una señal de localización nuclear, la fosforilación en la treonina 172 y el estado de inanición inducido por metformina y trehalosa (18, 21, 88, 89).

La autofagia promueve la supervivencia de las neuronas, debido a que ayuda a degradar y reciclar el contenido intracelular nocivo en condiciones

desfavorables para las células (90). Anteriormente, reportamos que el PQ inhibe el mecanismo de autofagia y como consecuencia ocasiona la muerte de las células dopaminérgicas (91). Previamente, demostramos *in vitro* que la inhibición del flujo de autofagia en respuesta al PQ se previno al inducir la autofagia con metformina o trehalosa (92), lo cual fue consistente con el aumento de los niveles de LC3-II detectados por inmunofluorescencia, en respuesta a ambos inductores. Estos hallazgos se correlacionan con el efecto de la autofagia estimulada por rapamicina en el modelo de EP inducido con PQ (16).

El modelo animal de EP inducido con PQ mostró alteraciones cognitivas y del patrón de la marcha relacionadas con el fenotipo de los pacientes con EP (63). El pretratamiento con metformina o trehalosa previno la disfunción motora y cognitiva. Además, ambos inductores de autofagia redujeron la pérdida de las neuronas dopaminérgicas, así como la fragmentación del ADN mediados por el PQ a niveles comparables con el grupo control, lo que sugiere que las moléculas inductoras de autofagia ejercen un efecto neuroprotector. Estos hallazgos concuerdan con un estudio que reportó el efecto neuroprotector de la metformina sobre las neuronas dopaminérgicas en un modelo de la EP inducido con MPTP/P en ratones (93); así como con el efecto de protección de la trehalosa en un modelo de ratones con tauopatía y parkinsonismo, que sobreexpresaban la proteína tau humana mutada (VLW) con la eliminación del gen parkin (PK(-)/Tau(VLW)) (94).

Además, el pretratamiento con metformina o trehalosa evitó la muerte de los oligodendrocitos, la astrocitosis, la microgliosis y la agregación de α -sinucleína en el modelo animal inducido con PQ. Tanto la desmielinización como la disfunción de los oligodendrocitos se han asociado con el desarrollo de la EP, donde el grado de mielinización es un factor crucial que determina la susceptibilidad de las neuronas a la agregación de la α -Syn (95). De hecho, en un estudio *post mortem* en cerebros de pacientes con EP se reportó que la acumulación de α -Syn fue mayor en los axones que estaban desmielinizados (96), lo que concuerda con el efecto del PQ observado en este estudio. Es importante destacar que el pretratamiento con metformina o trehalosa ocasionó protección contra la pérdida de los oligodendrocitos, lo que se asocia con la prevención de la agregación de α -Syn y de la pérdida de las neuronas dopaminérgicas. El análisis de muestras *post mortem* y de estudios de neuroimagen de pacientes con EP evidenció que la activación de la microglía y la agregación de α -Syn están involucradas en la fisiopatología de la EP (97, 98), lo que concuerda con los hallazgos en el modelo inducido con PQ en este estudio, y sorprendentemente, ambas fueron prevenidas por el pretratamiento con los inductores de autofagia.

Por otra parte, los astrocitos responden al daño del SNC a través de un proceso llamado astrocitosis, el cual puede ocurrir en respuesta al estrés oxidativo inducido por el PQ. Los astrocitos sobreexpresan Nrf2 para regular transcripcionalmente las enzimas antioxidantes, con un potencial antioxidante mayor que el de las neuronas (99, 100). Previamente, determinamos que la

autofagia mediada por metformina y trehalosa ejerce un efecto antioxidante *in vitro* (16). Por lo tanto, consideramos que la astrocitosis se activa como un mecanismo de respuesta para disminuir las especies reactivas de oxígeno (ROS) producidas en nuestro modelo por el PQ, lo cual es consistente con la prevención de la astrocitosis cuando se realizó el pretratamiento con metformina o trehalosa.

Por otro lado, el perfil de la microbiota intestinal es importante para mantener la integridad y el buen funcionamiento del epitelio intestinal (101, 102). Algunas bacterias residentes como *Akkermansia muciniphila* degradan el moco del epitelio intestinal para mantener en un equilibrio homeostático tanto su metabolismo, como el de otras bacterias comensales (103). Las células inmunes también mantienen la homeostasis del epitelio intestinal a través de la secreción de citocinas. Previamente, se demostró que la IL-4 aumenta el grosor de la capa de moco del lumen intestinal (104), mientras que la sobreexpresión de IL-18 se ha asociado con una disminución de las células caliciformes (105).

Los metabolitos bacterianos, así como la interacción entre la microbiota, el epitelio intestinal y el sistema inmune son importantes en las enfermedades neurodegenerativas, debido a la conexión bidireccional que existe entre el sistema nervioso y el tracto gastrointestinal a través del eje microbiota-intestino-cerebro. Estudios realizados en modelos animales han confirmado el papel de la microbiota intestinal en el SNC, debido a que se ha observado que participa en la modulación de los comportamientos afectivos, sociales,

nociceptivos, así como en el control de la ingesta de alimentos (106). Además, se ha reportado que las modificaciones en el perfil de la microbiota y la disfunción intestinal están presentes en varios trastornos neurodegenerativos, como la EA y la EP (103).

En el modelo animal de la EP inducido con PQ se observó una disminución de la familia *Enterobacteriaceae* y un incremento de las familias *Lactobacillaceae*, *Enterococcaceae* y del grupo *Bacteroidaceae-Prevotellaceae*. Las familias que se observaron incrementadas están relacionadas con la regulación del proceso inflamatorio, ya que promueven la secreción de citocinas anti-inflamatorias como IL-4, IL-6 e IL10 (107). Estos resultados sugieren la presencia de un proceso pro-inflamatorio inducido por el PQ en nuestro modelo, por lo que la microbiota intestinal responde para contrarrestar el daño, incrementando las familias bacterianas que promueven la secreción de citocinas anti-inflamatorias. De manera importante, estos cambios fueron prevenidos por el tratamiento con la metformina y trehalosa previo a la exposición al PQ, debido a que no se observaron modificaciones en el perfil de la microbiota intestinal, indicando que estas moléculas previenen el proceso pro-inflamatorios en el intestino del modelo de la EP.

También, se encontró que el incremento de las familias *Lactobacillaceae* y *Enterococcaceae*, coincide con las modificaciones reportadas en pacientes con EP de diferentes países (35). A pesar de que actualmente, debido a su complejidad, no ha sido posible establecer una composición específica de la

microbiota intestinal como biomarcador de esta enfermedad, consideramos que los hallazgos de este estudio son importantes, porque indican la relevancia de las familias *Lactobacillaceae* y *Enterococcaceae* sobre el desarrollo de la EP al presentarse en humanos, así como en un modelo murino inducido con el PQ.

CAPÍTULO 9

CONCLUSIONES

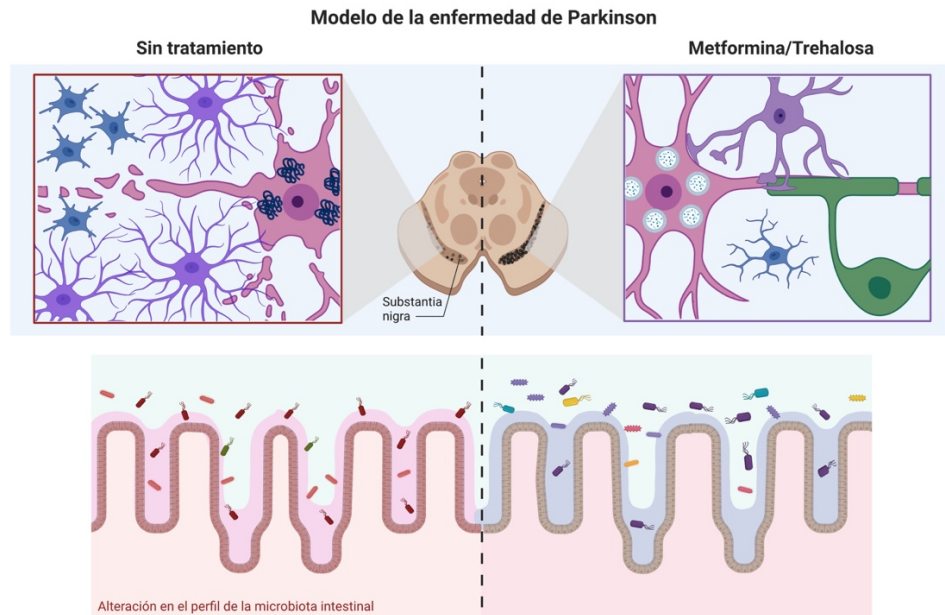


Figura 15. Resumen gráfico de las conclusiones del estudio comparativo de diferentes inductores de autofagia en un modelo *in vivo* de la enfermedad de Parkinson y su influencia sobre la microbiota intestinal.

- La inducción de autofagia con metformina o trehalosa ejerce un efecto protector sobre la función motora y cognitiva en el modelo animal de la EP.
- La metformina y trehalosa protegen de forma efectiva a las neuronas dopaminérgicas de la muerte inducida por el PQ.
- La inducción de autofagia con metformina o trehalosa protege de la muerte a los oligodendrocitos, y previene el desarrollo de astrocitosis y microgliosis, que se producen por la toxicidad del PQ.

- La metformina y trehalosa previenen la agregación de la α -Syn en el modelo animal de la EP inducido con PQ.
- La exposición al PQ induce alteraciones en el perfil de la microbiota intestinal, las cuales fueron notablemente prevenidas mediante el tratamiento con metformina o trehalosa.
- Por lo tanto, ambos inductores de autofagia tienen un potencial prometedor para prevenir el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como la EP.

REFERENCIAS

1. WHO. (World Health Organization, <https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates/ghe-life-expectancy-and-healthy-life-expectancy>).
2. E. Giacomello, L. Toniolo, Nutrition, Diet and Healthy Aging. *Nutrients* **14**, (2021).
3. L. V. Kalia, A. E. Lang, Parkinson's disease. *Lancet* **386**, 896-912 (2015).
4. D. W. Dickson, Neuropathology of Parkinson disease. *Parkinsonism Relat Disord* **46 Suppl 1**, S30-S33 (2018).
5. L. Klingelhoefer, H. Reichmann, The Gut and Nonmotor Symptoms in Parkinson's Disease. *Int Rev Neurobiol* **134**, 787-809 (2017).
6. M. C. Houser, M. G. Tansey, The gut-brain axis: is intestinal inflammation a silent driver of Parkinson's disease pathogenesis? *NPJ Parkinsons Dis* **3**, 3 (2017).
7. F. Li *et al.*, Alteration of the fecal microbiota in North-Eastern Han Chinese population with sporadic Parkinson's disease. *Neurosci Lett* **707**, 134297 (2019).
8. C. Li *et al.*, Gut Microbiota Differs Between Parkinson's Disease Patients and Healthy Controls in Northeast China. *Front Mol Neurosci* **12**, 171 (2019).
9. Y. Qian *et al.*, Alteration of the fecal microbiota in Chinese patients with Parkinson's disease. *Brain Behav Immun* **70**, 194-202 (2018).
10. F. Scheperjans *et al.*, Gut microbiota are related to Parkinson's disease and clinical phenotype. *Mov Disord* **30**, 350-358 (2015).
11. O. A. Levy, C. Malagelada, L. A. Greene, Cell death pathways in Parkinson's disease: proximal triggers, distal effectors, and final steps. *Apoptosis* **14**, 478-500 (2009).
12. J. Zhang, Teaching the basics of autophagy and mitophagy to redox biologists--mechanisms and experimental approaches. *Redox Biol* **4**, 242-259 (2015).
13. T. Hara *et al.*, Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* **441**, 885-889 (2006).
14. M. Komatsu *et al.*, Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* **441**, 880-884 (2006).

15. B. N. Lizama, C. T. Chu, Neuronal autophagy and mitophagy in Parkinson's disease. *Mol Aspects Med* **82**, 100972 (2021).
16. M. J. Ramirez-Moreno, A. P. G.-C. Duarte-Jurado, Yareth Gonzalez-Alcocer, Alfredo, M. J. S.-C. Loera-Arias, Odila Montes-de-Oca-Luna, Roberto Rodriguez-Rocha, Humberto, A. Garcia-Garcia, Autophagy Stimulation Decreases Dopaminergic Neuronal Death Mediated by Oxidative Stress. *Molecular Neurobiology*, (2019).
17. E. Sanchez-Rangel, S. E. Inzucchi, Metformin: clinical use in type 2 diabetes. *Diabetologia* **60**, 1586-1593 (2017).
18. A. K. Madiraju *et al.*, Metformin suppresses gluconeogenesis by inhibiting mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase. *Nature* **510**, 542-546 (2014).
19. G. Vial, D. Demaille, B. Guigas, Role of Mitochondria in the Mechanism(s) of Action of Metformin. *Front Endocrinol (Lausanne)* **10**, 294 (2019).
20. S. Sarkar, J. E. Davies, Z. Huang, A. Tunnacliffe, D. C. Rubinsztein, Trehalose, a novel mTOR-independent autophagy enhancer, accelerates the clearance of mutant huntingtin and alpha-synuclein. *J Biol Chem* **282**, 5641-5652 (2007).
21. P. Mardones, D. C. Rubinsztein, C. Hetz, Mystery solved: Trehalose kickstarts autophagy by blocking glucose transport. *Sci Signal* **9**, fs2 (2016).
22. P. Rusmini *et al.*, Trehalose induces autophagy via lysosomal-mediated TFEB activation in models of motoneuron degeneration. *Autophagy* **15**, 631-651 (2019).
23. R. L. Vidal, S. Matus, L. Bargsted, C. Hetz, Targeting autophagy in neurodegenerative diseases. *Trends Pharmacol Sci* **35**, 583-591 (2014).
24. S. Byun, E. Lee, K. W. Lee, Therapeutic Implications of Autophagy Inducers in Immunological Disorders, Infection, and Cancer. *Int J Mol Sci* **18**, (2017).
25. M. Russo, G. L. Russo, Autophagy inducers in cancer. *Biochem Pharmacol* **153**, 51-61 (2018).
26. S. Thellung, A. Corsaro, M. Nizzari, F. Barbieri, T. Florio, Autophagy Activator Drugs: A New Opportunity in Neuroprotection from Misfolded Protein Toxicity. *Int J Mol Sci* **20**, (2019).
27. B. Thomas, M. F. Beal, Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* **16 Spec No. 2**, R183-194 (2007).

28. J. S. C. Ng, Palliative care for Parkinson's disease. *Ann Palliat Med* **7**, 296-303 (2018).
29. C. G. Goetz, The history of Parkinson's disease: early clinical descriptions and neurological therapies. *Cold Spring Harb Perspect Med* **1**, a008862 (2011).
30. S. G. Reich, J. M. Savitt, Parkinson's Disease. *Med Clin North Am* **103**, 337-350 (2019).
31. A. U. Khan, M. Akram, M. Daniyal, R. Zainab, Awareness and current knowledge of Parkinson's disease: a neurodegenerative disorder. *Int J Neurosci*, 1-39 (2018).
32. T. G. Dinan, J. F. Cryan, The Microbiome-Gut-Brain Axis in Health and Disease. *Gastroenterol Clin North Am* **46**, 77-89 (2017).
33. P. Gazerani, Probiotics for Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci* **20**, (2019).
34. T. R. Sampson *et al.*, Gut Microbiota Regulate Motor Deficits and Neuroinflammation in a Model of Parkinson's Disease. *Cell* **167**, 1469-1480.e1412 (2016).
35. Y. Gopar-Cuevas *et al.*, Pursuing Multiple Biomarkers for Early Idiopathic Parkinson's Disease Diagnosis. *Mol Neurobiol* **58**, 5517-5532 (2021).
36. L. Yang *et al.*, Impaired Autophagy in Intestinal Epithelial Cells Alters Gut Microbiota and Host Immune Responses. *Appl Environ Microbiol* **84**, (2018).
37. W. Cao, J. Li, K. Yang, D. Cao, An overview of autophagy: Mechanism, regulation and research progress. *Bull Cancer* **108**, 304-322 (2021).
38. I. Dikic, Z. Elazar, Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol* **19**, 349-364 (2018).
39. B. Levine, M. Packer, P. Codogno, Development of autophagy inducers in clinical medicine. *J Clin Invest* **125**, 14-24 (2015).
40. D. J. Klionsky *et al.*, Autophagy in major human diseases. *EMBO J* **40**, e108863 (2021).
41. J. Do, C. McKinney, P. Sharma, E. Sidransky, Glucocerebrosidase and its relevance to Parkinson disease. *Mol Neurodegener* **14**, 36 (2019).
42. P. Anglade *et al.*, Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease. *Histol Histopathol* **12**, 25-31 (1997).

43. E. K. Rowinsky, Targeting the molecular target of rapamycin (mTOR). *Curr Opin Oncol* **16**, 564-575 (2004).
44. A. Fleming, T. Noda, T. Yoshimori, D. C. Rubinsztein, Chemical modulators of autophagy as biological probes and potential therapeutics. *Nat Chem Biol* **7**, 9-17 (2011).
45. H. Harris, D. C. Rubinsztein, Control of autophagy as a therapy for neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol* **8**, 108-117 (2011).
46. Q. Shi, C. Chang, A. Saliba, M. A. Bhat, Microglial mTOR Activation Upregulates Trem2 and Enhances β -Amyloid Plaque Clearance in the 5XFAD Alzheimer's Disease Model. *J Neurosci* **42**, 5294-5313 (2022).
47. R. Muraleedharan, B. Dasgupta, AMPK in the brain: its roles in glucose and neural metabolism. *FEBS J* **289**, 2247-2262 (2022).
48. M. M. Mihaylova, R. J. Shaw, The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nat Cell Biol* **13**, 1016-1023 (2011).
49. D. Garcia, R. J. Shaw, AMPK: Mechanisms of Cellular Energy Sensing and Restoration of Metabolic Balance. *Mol Cell* **66**, 789-800 (2017).
50. G. Lu *et al.*, The effects of metformin on autophagy. *Biomed Pharmacother* **137**, 111286 (2021).
51. S. M. Carlsen, V. Grill, I. Følling, Evidence for dissociation of insulin- and weight-reducing effects of metformin in non-diabetic male patients with coronary heart disease. *Diabetes Res Clin Pract* **39**, 47-54 (1998).
52. H. Nasri, M. Rafieian-Kopaei, Metformin: Current knowledge. *J Res Med Sci* **19**, 658-664 (2014).
53. N. Harada, Effects of metformin on blood glucose levels and bodyweight mediated through intestinal effects. *J Diabetes Investig* **11**, 1420-1421 (2020).
54. A. Chen, H. Tapia, J. M. Goddard, P. A. Gibney, Trehalose and its applications in the food industry. *Compr Rev Food Sci Food Saf* **21**, 5004-5037 (2022).
55. K. Hosseinpour-Moghaddam, M. Caraglia, A. Sahebkar, Autophagy induction by trehalose: Molecular mechanisms and therapeutic impacts. *J Cell Physiol* **233**, 6524-6543 (2018).

56. Q. He *et al.*, Treatment with Trehalose Prevents Behavioral and Neurochemical Deficits Produced in an AAV α -Synuclein Rat Model of Parkinson's Disease. *Mol Neurobiol* **53**, 2258-2268 (2016).
57. J. Perucho *et al.*, Trehalose protects from aggravation of amyloid pathology induced by isoflurane anesthesia in APP(swe) mutant mice. *Curr Alzheimer Res* **9**, 334-343 (2012).
58. D. A. Morales-Carrizales *et al.*, A neuroprotective dose of trehalose is harmless to metabolic organs: comprehensive histopathological analysis of liver, pancreas, and kidney. *Daru*, (2023).
59. D. Vandeputte *et al.*, Stool consistency is strongly associated with gut microbiota richness and composition, enterotypes and bacterial growth rates. *Gut* **65**, 57-62 (2016).
60. S. Bartosch, A. Fite, G. T. Macfarlane, M. E. McMurdo, Characterization of bacterial communities in feces from healthy elderly volunteers and hospitalized elderly patients by using real-time PCR and effects of antibiotic treatment on the fecal microbiota. *Appl Environ Microbiol* **70**, 3575-3581 (2004).
61. T. Rinttilä, A. Kassinen, E. Malinen, L. Krogus, A. Palva, Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. *J Appl Microbiol* **97**, 1166-1177 (2004).
62. H. Ryu *et al.*, Development of quantitative PCR assays targeting the 16S rRNA genes of Enterococcus spp. and their application to the identification of enterococcus species in environmental samples. *Appl Environ Microbiol* **79**, 196-204 (2013).
63. R. B. Postuma *et al.*, MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Mov Disord* **30**, 1591-1601 (2015).
64. R. J. Carter, J. Morton, S. B. Dunnett, Motor coordination and balance in rodents. *Curr Protoc Neurosci* **Chapter 8**, Unit 8.12 (2001).
65. A. K. Kraeuter, P. C. Guest, Z. Sarnyai, The Nest Building Test in Mice for Assessment of General Well-Being. *Methods Mol Biol* **1916**, 87-91 (2019).
66. T. N. Sager *et al.*, Nest building performance following MPTP toxicity in mice. *Behav Brain Res* **208**, 444-449 (2010).
67. C. He, D. J. Klionsky, Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet* **43**, 67-93 (2009).

68. N. Baumann, D. Pham-Dinh, Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev* **81**, 871-927 (2001).
69. T. Guillamón-Vivancos, U. Gómez-Pinedo, J. Matías-Guiu, Astrocytes in neurodegenerative diseases (I): function and molecular description. *Neurologia* **30**, 119-129 (2015).
70. M. R. Freeman, Specification and morphogenesis of astrocytes. *Science* **330**, 774-778 (2010).
71. M. V. Sofroniew, Astrogliosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **7**, a020420 (2014).
72. M. S. Ho, Microglia in Parkinson's Disease. *Adv Exp Med Biol* **1175**, 335-353 (2019).
73. A. Recchia *et al.*, Alpha-synuclein and Parkinson's disease. *FASEB J* **18**, 617-626 (2004).
74. J. H. Zhang, M. Xu, DNA fragmentation in apoptosis. *Cell Res* **10**, 205-211 (2000).
75. K. Kyrylkova, S. Kyryachenko, M. Leid, C. Kioussi, Detection of apoptosis by TUNEL assay. *Methods Mol Biol* **887**, 41-47 (2012).
76. N. Di Tommaso, A. Gasbarrini, F. R. Ponziani, Intestinal Barrier in Human Health and Disease. *Int J Environ Res Public Health* **18**, (2021).
77. A. Gonzalez-Alcocer *et al.*, Peripheral tissular analysis of rapamycin's effect as a neuroprotective agent in vivo. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **395**, 1239-1255 (2022).
78. FDA. (Food and Drug Administration, https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2000/21202lbl.pdf).
79. WHO. (World Health Organization, <https://www.who.int/news/item/05-03-2014-who-opens-public-consultation-on-draft-sugars-guideline>).
80. K. Łabuzek *et al.*, Quantification of metformin by the HPLC method in brain regions, cerebrospinal fluid and plasma of rats treated with lipopolysaccharide. *Pharmacol Rep* **62**, 956-965 (2010).
81. Y. Zhang, B. J. DeBosch, Using trehalose to prevent and treat metabolic function: effectiveness and mechanisms. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **22**, 303-310 (2019).

82. S. J. Jeong *et al.*, Trehalose causes low-grade lysosomal stress to activate TFEB and the autophagy-lysosome biogenesis response. *Autophagy* **17**, 3740-3752 (2021).
83. A. Stachowicz *et al.*, The Influence of Trehalose on Atherosclerosis and Hepatic Steatosis in Apolipoprotein E Knockout Mice. *Int J Mol Sci* **20**, (2019).
84. H. J. Lee, Y. S. Yoon, S. J. Lee, Mechanism of neuroprotection by trehalose: controversy surrounding autophagy induction. *Cell Death Dis* **9**, 712 (2018).
85. G. Martano *et al.*, Biosynthesis of Astrocytic Trehalose Regulates Neuronal Arborization in Hippocampal Neurons. *ACS Chem Neurosci* **8**, 1865-1872 (2017).
86. L. Halbe, A. Rami, Trehalase localization in the cerebral cortex, hippocampus and cerebellum of mouse brains. *J Adv Res* **18**, 71-79 (2019).
87. Y. Li, Y. Chen, AMPK and Autophagy. *Adv Exp Med Biol* **1206**, 85-108 (2019).
88. A. Suzuki *et al.*, Leptin stimulates fatty acid oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene expression in mouse C2C12 myoblasts by changing the subcellular localization of the alpha2 form of AMP-activated protein kinase. *Mol Cell Biol* **27**, 4317-4327 (2007).
89. Q. Afinanisa, M. K. Cho, H. A. Seong, AMPK Localization: A Key to Differential Energy Regulation. *Int J Mol Sci* **22**, (2021).
90. Q. Gao, Oxidative Stress and Autophagy. *Adv Exp Med Biol* **1206**, 179-198 (2019).
91. A. Garcia-Garcia *et al.*, Impairment of Atg5-Dependent Autophagic Flux Promotes Paraquat- and MPP+-Induced Apoptosis But Not Rotenone or 6-Hydroxydopamine Toxicity. *Toxicol Sci*, (2013).
92. G.-C. Yareth, Estudio comparativo de diferentes inductores de autofagia en un modelo in vitro de la enfermedad de parkinson. UANL, Tesis maestría (2019).
93. M. Lu *et al.*, Metformin Prevents Dopaminergic Neuron Death in MPTP/P-Induced Mouse Model of Parkinson's Disease via Autophagy and Mitochondrial ROS Clearance. *Int J Neuropsychopharmacol* **19**, (2016).

94. J. A. Rodríguez-Navarro *et al.*, Trehalose ameliorates dopaminergic and tau pathology in parkin deleted/tau overexpressing mice through autophagy activation. *Neurobiol Dis* **39**, 423-438 (2010).
95. S. Orimo *et al.*, Unmyelinated axons are more vulnerable to degeneration than myelinated axons of the cardiac nerve in Parkinson's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* **37**, 791-802 (2011).
96. H. Braak, D. Sandmann-Keil, W. Gai, E. Braak, Extensive axonal Lewy neurites in Parkinson's disease: a novel pathological feature revealed by alpha-synuclein immunocytochemistry. *Neurosci Lett* **265**, 67-69 (1999).
97. M. G. Tansey, M. Romero-Ramos, Immune system responses in Parkinson's disease: Early and dynamic. *Eur J Neurosci* **49**, 364-383 (2019).
98. S. Mehra, S. Sahay, S. K. Maji, α -Synuclein misfolding and aggregation: Implications in Parkinson's disease pathogenesis. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom* **1867**, 890-908 (2019).
99. A. Y. Shih *et al.*, Coordinate regulation of glutathione biosynthesis and release by Nrf2-expressing glia potently protects neurons from oxidative stress. *J Neurosci* **23**, 3394-3406 (2003).
100. Y. Chen *et al.*, Astrocytes protect neurons from nitric oxide toxicity by a glutathione-dependent mechanism. *J Neurochem* **77**, 1601-1610 (2001).
101. R. Sharma, U. Schumacher, V. Ronaasen, M. Coates, Rat intestinal mucosal responses to a microbial flora and different diets. *Gut* **36**, 209-214 (1995).
102. J. Petersson *et al.*, Importance and regulation of the colonic mucus barrier in a mouse model of colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **300**, G327-333 (2011).
103. M. Herath, S. Hosie, J. C. Bornstein, A. E. Franks, E. L. Hill-Yardin, The Role of the Gastrointestinal Mucus System in Intestinal Homeostasis: Implications for Neurological Disorders. *Front Cell Infect Microbiol* **10**, 248 (2020).
104. S. Sharba *et al.*, Interleukin 4 induces rapid mucin transport, increases mucus thickness and quality and decreases colitis and *Citrobacter rodentium* in contact with epithelial cells. *Virulence* **10**, 97-117 (2019).
105. R. Nowarski *et al.*, Epithelial IL-18 Equilibrium Controls Barrier Function in Colitis. *Cell* **163**, 1444-1456 (2015).

106. V. Osadchiy, C. R. Martin, E. A. Mayer, The Gut-Brain Axis and the Microbiome: Mechanisms and Clinical Implications. *Clin Gastroenterol Hepatol* **17**, 322-332 (2019).
107. A. Jenab, R. Roghanian, G. Emtiazi, Bacterial Natural Compounds with Anti-Inflammatory and Immunomodulatory Properties (Mini Review). *Drug Des Devel Ther* **14**, 3787-3801 (2020).

**PRODUCCIÓN
CIENTÍFICA**

ARTÍCULOS PUBLICADOS

Gopar-Cuevas Y, Saucedo-Cardenas O, Loera-Arias MJ, Montes de Oca-Luna R, Rodriguez-Rocha H, Garcia-Garcia A. Metformin and trehalose-modulated autophagy exerts a neurotherapeutic effect in a Parkinson's disease model. *Mol Neurobiol.* (2023). doi: 10.1007/s12035-023-03530-5.

Morales-Carrizales DA, **Gopar-Cuevas Y**, Loera-Arias MJ, Saucedo-Cardenas O, Montes de Oca-Luna R, Garcia-Garcia A, Rodriguez-Rocha H. A neuroprotective dose of trehalose is harmless to metabolic organs: comprehensive histopathological analysis of liver, pancreas, and kidney. *DARU J Pharm Sci.* (2023). doi: 10.1007/s40199-023-00468-w.

Gonzalez-Alcocer A, **Gopar-Cuevas Y**, Soto-Dominguez A, Castillo-Velazquez U, Loera-Arias MJ, Saucedo-Cardenas O, Montes de Oca-Luna R, Garcia-Garcia A, Rodriguez-Rocha H. Combined chronic copper exposure and aging lead to neurotoxicity in vivo. *Neurotoxicology.* (2023); 95:181-192. doi: 10.1016/j.neuro.2023.02.002.

Gonzalez-Alcocer A, **Gopar-Cuevas Y**, Soto-Dominguez A, Loera-Arias MJ, Saucedo-Cardenas O, Montes de Oca-Luna R, Rodriguez-Rocha H, Garcia-Garcia A. Peripheral tissular analysis of rapamycin's effect as a neuroprotective agent in vivo. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* (2022); 395(10):1239-1255. doi: 10.1007/s00210-022-02276-6.

Gopar-Cuevas Y, Duarte-Jurado AP, Diaz-Perez RN, Saucedo-Cardenas O, Loera-Arias MJ, Montes-de-Oca-Luna R, Rodriguez-Rocha H, Garcia-Garcia A. Pursuing Multiple Biomarkers for Early Idiopathic Parkinson's Disease Diagnosis. *Mol Neurobiol.* (2021); 58(11):5517-5532. doi: 10.1007/s12035-021-02500-z.

Duarte-Jurado AP, **Gopar-Cuevas Y**, Saucedo-Cardenas O, Loera-Arias MdJ, Montes-de-Oca-Luna R, Garcia-Garcia A, Rodriguez-Rocha H. Antioxidant Therapeutics in Parkinson's Disease: Current Challenges and Opportunities. *Antioxidants.* (2021); 10(3):453. <https://doi.org/10.3390/antiox10030453>.

Ramirez-Moreno MJ, Duarte-Jurado AP, **Gopar-Cuevas Y**, Gonzalez-Alcocer A, Loera-Arias MJ, Saucedo-Cardenas O, Montes de Oca-Luna R, Rodriguez-Rocha H, Garcia-Garcia A. Autophagy Stimulation Decreases Dopaminergic

Neuronal Death Mediated by Oxidative Stress. *Mol Neurobiol.* (2019); 56, 8136–8156. <https://doi.org/10.1007/s12035-019-01654-1>.

CITAS DE TRABAJOS PUBLICADOS: 69

PRESENTACIONES EN CONGRESOS

Gopar-Cuevas Y, Morales-Carrizales DA, Montes de Oca-Luna R, Rodríguez-Rocha H, García-García A.

“Los inductores de autofagia metformina y trehalosa previenen la disfunción cognitiva y motora al proteger las neuronas dopaminérgicas de la toxicidad del paraquat”

XXIX Congreso Nacional de Anatomía

Ciudad de México, México

3 al 7 de octubre 2022

Duarte-Jurado AP, **Gopar-Cuevas Y**, Morales-Carrizales DA, Rodríguez-Rocha H, García-García A.

“La metformina mejora la salud y la calidad de vida en ratones de mediana y avanzada edad”

XXIX Congreso Nacional de Anatomía

Ciudad de México, México

3 al 7 de octubre 2022

Morales-Carrizales DA, **Gopar-Cuevas Y**, Duarte-Jurado AP, García-García A, Rodríguez-Rocha H.

“Análisis histopatológico del efecto de la administración de una dosis neuroprotectora de trehalosa”

XXIX Congreso Nacional de Anatomía

Ciudad de México, México

3 al 7 de octubre 2022

Yareth Gopar-Cuevas, María de Jesús Loera-Arias, Odila Saucedo-Cárdenas, Roberto Montes-de-Oca-Luna, Humberto Rodríguez-Rocha, Aracely García-García.

“Autophagy Inducers Trehalose and Metformin Prevent Cognitive and Motor Dysfunction by Protecting Dopaminergic Neurons from Paraquat Toxicity”
4th Edition of Symposium on Physiology and Pathology of Neuroglia
Querétaro, México
3 al 4 de octubre 2022

Yareth Gopar-Cuevas, Rosa N. Díaz-Pérez, María de Jesús Loera-Arias, Odila Saucedo- Cárdenas, Roberto Montes-de-Oca-Luna, Humberto Rodríguez-Rocha, Aracely García- García.

“Autophagy Inducers Trehalose and Metformin Prevent Cognitive and Motor Dysfunction by Protecting Dopaminergic Neurons from Paraquat Toxicity”
IV Neurobiology Meeting of the Mexican Society for Biochemistry
Oaxaca, México
3 al 7 de abril 2022

Y. Gopar-Cuevas, O. Saucedo-Cárdenas, M.D.J. Loera-Arias, R. Montes-de-Oca-Luna, H. Rodríguez-Rocha, A. García-García.

“Autophagy induced by trehalose and metformin prevents dopaminergic cell death”
AD/PD™ 2021 The 15th International Conference on Alzheimer’s and Parkinson’s disease
Virtual Conference
9 al 14 de marzo 2021

Yareth Gopar-Cuevas., Rosa N. Díaz-Pérez., Odila Saucedo-Cárdenas., Humberto Rodríguez-Rocha., Aracely García-García.

“La autofagia inducida por trehalosa y metformina tiene un efecto de protección en un modelo celular de la enfermedad de Parkinson”
VII Simposio Nacional de Ciencias Farmacéuticas y Biomedicina y V Simposio Nacional de Microbiología Aplicada
Webinar
1º al 2 de octubre 2020

Yareth Gopar-Cuevas., Odila Saucedo-Cárdenas., Gilberto Jaramillo-Rangel., María de Jesús Loera-Arias., Roberto Montes de Oca-Luna., Humberto Rodríguez-Rocha., Aracely García-García.

“Efecto de los inductores de autofagia trehalosa y metformina en un modelo celular de la enfermedad de Parkinson”
30º Congreso Nacional de Investigación e Innovación en Medicina.
Nuevo León, México.
2-5 de octubre 2019.

Yareth Gopar-Cuevas., Rosa N. Díaz-Pérez., Odila Saucedo-Cárdenas., Gilberto Jaramillo- Rangel., María de Jesús Loera-Arias., Roberto Montes-de-Oca-Luna., Humberto Rodríguez- Rocha., Aracely García-García.
“Autophagy inducers trehalose and metformin prevent dopaminergic cell death”
III Neurobiology Meeting of the Mexican Society for Biochemistry
Guanajuato, México.
22-26 de septiembre 2019.

PREMIOS Y DISTINCIONES

- 2023 1º Lugar en el Concurso estatal de Investigación en Salud, en el área de Investigación en Ciencias Básicas.
- 2022 Estudiante distinguido del Doctorado en Ciencias con Orientación en Morfología.
- 2020 1º Lugar en el Concurso de trabajos libres en el VII Simposio Nacional de Ciencias Farmacéuticas y Biomedicina y V Simposio Nacional de Microbiología Aplicada.
- 2019 Estudiante distinguido de la Maestría en Ciencias con Orientación en Morfología.



Metformin and Trehalose-Modulated Autophagy Exerts a Neurotherapeutic Effect on Parkinson's Disease

Yareth Gopar-Cuevas¹ · Odila Saucedo-Cardenas¹ · Maria J. Loera-Arias¹ · Roberto Montes-de-Oca-Luna¹ · Humberto Rodriguez-Rocha¹ · Aracely Garcia-Garcia¹

Received: 1 May 2023 / Accepted: 20 July 2023
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2023

Abstract

Since the number of aged people will increase in the next years, neurodegenerative diseases, including Parkinson's Disease (PD), will also rise. Recently, we demonstrated that autophagy stimulation with rapamycin decreases dopaminergic neuronal death mediated by oxidative stress in the paraquat (PQ)-induced PD model. Assessing the neurotherapeutic efficacy of autophagy-inducing molecules is critical for preventing or delaying neurodegeneration. Therefore, we evaluated the autophagy inducers metformin and trehalose effect in a PD model. Autophagy induced by both molecules was confirmed in the SH-SY5Y dopaminergic cells by detecting increased LC3-II marker and autophagosome number compared to the control by western blot and transmission electron microscopy. Both autophagy inducers showed an antioxidant effect, improved mitochondrial activity, and decreased dopaminergic cell death induced by PQ. Next, we evaluated the effect of both inducers in vivo. C57BL6 mice were pretreated with metformin or trehalose before PQ administration. Cognitive and motor deteriorated functions in the PD model were evaluated through the nest building and the gait tests and were prevented by metformin and trehalose. Both autophagy inducers significantly reduced the dopaminergic neuronal loss, astrogliosis, and microgliosis induced by PQ. Also, cell death mediated by PQ was prevented by metformin and trehalose, assessed by TUNEL assay. Metformin and trehalose induced autophagy through AMPK phosphorylation and decreased α -synuclein accumulation. Therefore, metformin and trehalose are promising neurotherapeutic autophagy inducers with great potential for treating neurodegenerative diseases such as PD.

Keywords Metformin · Trehalose · Autophagy · Parkinson's disease · Dopaminergic neurons · Paraquat

Highlights

Autophagy inducers metformin and trehalose in a Parkinson's disease model induced with paraquat prevented:

- Oxidative stress and mitochondrial dysfunction
- PQ-induced autophagy deterioration
- Cognitive and motor dysfunction
- Loss of dopaminergic neurons and oligodendrocytes
- Astrogliosis and microgliosis
- α -synuclein accumulation

- ✉ Humberto Rodriguez-Rocha
humberto.rodriguezrc@uanl.edu.mx
- ✉ Aracely Garcia-Garcia
aracely.garciagr@uanl.edu.mx

¹ Departamento de Histología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Francisco I. Madero S/N, 64460 Monterrey, Nuevo León, Mexico

Introduction

The current life expectancy worldwide is 73 years [1], and the number of aged people will increase significantly in the following years [2], which is associated with a more significant increase in the presence of neurodegenerative diseases, such as Parkinson's disease (PD). PD is a neurological and motor disorder characterized by bradykinesia, rigidity, postural instability, and tremor, symptoms caused by dopaminergic neuronal death in the substantia nigra pars compacta, resulting in dopaminergic denervation of the striatum [3, 4]. Epidemiological studies have demonstrated that environmental exposure to paraquat (PQ), which is widely used as an herbicide, increases the risk of developing PD [5]. PQ toxicity is due to its ability to enter a redox cycle that leads to NADPH consumption and PQ reduction, forming the free radical PQ, which in turn can spontaneously react with oxygen, leading to the formation of superoxide anion,



A neuroprotective dose of trehalose is harmless to metabolic organs: comprehensive histopathological analysis of liver, pancreas, and kidney

Diego Armando Morales-Carrizales¹ · Yareth Gopar-Cuevas¹ · Maria de Jesus Loera-Arias¹ · Odila Saucedo-Cardenas¹ · Roberto Montes de Oca-Luna¹ · Aracely Garcia-Garcia¹ · Humberto Rodriguez-Rocha¹

Received: 1 February 2023 / Accepted: 18 June 2023
© The Author(s), under exclusive licence to Tehran University of Medical Sciences 2023

Abstract

Background Trehalose is a non-reducing disaccharide synthesized by lower organisms. It has recently received special attention because of its neuroprotective properties by stimulating autophagy in Parkinson's disease (PD) models. Therefore, evaluating whether trehalose affects metabolic organs is vital to determine its neurotherapeutic safety.

Methods We validated the trehalose neuroprotective dosage in a PD model induced with intraperitoneal paraquat administration twice weekly for 7 weeks. One week before paraquat administration, mice were treated with trehalose in the drinking water and continued along with paraquat treatment. Histological and morphometrical analyses were conducted on the organs involved in trehalose metabolism, including the liver, pancreas, and kidney.

Results Paraquat-induced dopaminergic neuronal loss was significantly decreased by trehalose. After trehalose treatment, the liver morphology, the mononucleated/binucleated hepatocytes percentage, and sinusoidal diameter remained unchanged in each liver lobes. Endocrine and exocrine pancreas's histology was not affected, nor was any fibrotic process observed. The islet of Langerhans's structure was preserved when analyzing the area, the largest and smallest diameter, and circularity. Renal morphology remained undamaged, and no changes were identified within the glomerular basement membrane. The renal corpuscle structure did not suffer alterations in the Bowman's space, area, diameter, circularity, perimeter, and cellularity. Besides, the renal tubular structures's luminal area and internal and external diameter were preserved.

Conclusion Our study demonstrates that systemic trehalose administration preserved the typical histological architecture of the organs involved in its metabolism, supporting its safety as a potential neuroprotective agent.

Keywords Neuroprotective dose · Trehalose · Liver · Pancreas · Kidney

Introduction

Trehalose is a non-reducing disaccharide formed by an α -1-1-glycosidic bond of two D-glucose and lacks a hydroxyl group at the reducing end. Many plant species, algae, fungi, bacteria, and insects contain trehalose, as do some human consumption food, such as honey, yeast-based products, and shellfish. Trehalose's protective properties against stressful conditions (heat, freezing, oxidative and osmotic stress, desiccation, and dehydration) [1–3] are probably due to its ability to form hydrogen bonds with polar groups on cell membrane proteins and lipids, modifying water's tetrahedral hydrogen bond structure by reorganizing remaining water molecules around biological structures [4]. Mammals cannot synthesize trehalose by themselves, but trehalase, responsible for its degradation into two glucose, has been found in

Diego Armando Morales-Carrizales and Yareth Gopar-Cuevas contributed equally to this work.

✉ Aracely Garcia-Garcia
aracely.garciagr@uanl.edu.mx

✉ Humberto Rodriguez-Rocha
humberto.rodriguezrc@uanl.edu.mx

¹ Departamento de Histología, Universidad Autónoma de Nuevo Leon, Francisco I. Madero S/N, Mitras Centro, 64460 Monterrey, Nuevo Leon, Mexico



Combined chronic copper exposure and aging lead to neurotoxicity *in vivo*

Alfredo Gonzalez-Alcocer^a, Yareth Gopar-Cuevas^a, Adolfo Soto-Dominguez^a,
 Uziel Castillo-Velazquez^b, Maria de Jesus Loera-Arias^a, Odila Saucedo-Cardenas^a,
 Roberto Montes de Oca-Luna^a, Aracely Garcia-Garcia^{a,*}, Humberto Rodriguez-Rocha^{a,*}

^a Departamento de Histología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León 64460, Mexico

^b Departamento de Inmunología Veterinaria, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Nuevo León, Escobedo, Nuevo León 66050, Mexico

ARTICLE INFO

Edited by Kennie Raviie Shepherd

Keywords:
 Copper
 Chronic exposure
 Parkinson's disease
 Neurodegeneration
 Metal ions

ABSTRACT

The environment, containing pollutants, toxins, and transition metals (copper, iron, manganese, and zinc), plays a critical role in neurodegenerative disease development. Copper occupational exposure increases Parkinson's disease (PD) risk. Previously, we determined the mechanisms by which copper induces dopaminergic cell death *in vitro*. The copper transporter protein 1 (Ctr1) overexpression led to intracellular glutathione depletion potentiating caspase-3 mediated cell death; oxidative stress was primarily cytosolic, and Nrf2 was upregulated mediating an antioxidant response; and protein ubiquitination, AMPK-Ulk1 signaling, p62, and Atg5-dependent autophagy were increased as a protective mechanism. However, the effect of chronic copper exposure on the neurodegenerative process has not been explored *in vivo*. We aimed to elucidate whether prolonged copper treatment reproduces PD features and mechanisms during aging. Throughout 40 weeks, C57BL/6J male mice were treated with copper at 0, 100, 250, and 500 ppm in the drinking water. Chronic copper exposure altered motor function and induced dopaminergic neuronal loss, astrogliosis, and microgliosis in a dose-dependent manner. α -Synuclein accumulation and aggregation were increased in response to copper, and the proteasome and autophagy alterations, previously observed *in vitro*, were confirmed *in vivo*, where protein ubiquitination, AMPK phosphorylation, and the autophagy marker LC3-II were also increased by copper exposure. Finally, nitrosative stress was induced by copper in a concentration-dependent fashion, as evidenced by increased protein nitration. To our knowledge, this is the first study combining chronic copper exposure and aging, which may represent an *in vivo* model of non-genetic PD and help to assess potential prophylactic and therapeutic approaches.

Data Availability: The data underlying this article are available in the article.

1. Introduction

Copper, one of the most abundant transition metal ions in the human body and essential for life, participates in erythropoiesis, immune function, energy production, glucose metabolism, and neuropeptide synthesis (Uriu-Adams and Keen, 2005; Singh et al., 2011). Copper's involvement in physiological processes is mainly due to its function as a cofactor or structural component in diverse proteins. Its oxidation state can transition from Cu^+ to Cu^{2+} (Bisaglia and Bubacco, 2020), acting as an enzyme cofactor with oxidoreductase activity (Fukai and Ushio-Fukai, 2011). Alterations in copper homeostasis have detrimental consequences; either increased or decreased copper bioavailability is related to neurodegeneration. Copper overload may occur by

environmental and occupational exposure and from copper-contaminated food such as shellfish, meat, cereal, and drinking water (Uriu-Adams and Keen, 2005). Epidemiological evidence suggests an involvement of heavy metals in PD etiology (Santner and Uversky, 2010). Alteration of intracellular metal ions concentration has been proposed to contribute to PD progression (Ayton et al., 2013).

Sporadic (non-genetic) Parkinson's disease (PD) represents 90–95% of all cases (Lesage and Brice, 2009). Increased copper levels have been reported in the cerebrospinal fluid and blood of PD patients (Hozumi et al., 2011; Pall et al., 1987), and chronic occupational exposure to copper increases the risk of developing PD (Santner and Uversky, 2010; Gorell et al., 1997, 1999; Rybicki et al., 1993). However, a recent meta-analysis reported decreased copper levels in the substantia nigra of

* Corresponding authors.

E-mail addresses: aracely.garciagr@uanl.edu.mx (A. Garcia-Garcia), humberto.rodriguezre@uanl.edu.mx (H. Rodriguez-Rocha).

<https://doi.org/10.1016/j.neuro.2023.02.002>

Received 27 October 2022; Received in revised form 28 December 2022; Accepted 8 February 2023

Available online 11 February 2023

0161-813X/© 2023 Elsevier B.V. All rights reserved.



Peripheral tissular analysis of rapamycin's effect as a neuroprotective agent in vivo

Alfredo Gonzalez-Alcocer¹ · Yareth Gopar-Cuevas¹ · Adolfo Soto-Dominguez¹ · Maria de Jesus Loera- Arias¹ · Odila Saucedo-Cardenas¹ · Roberto Montes de Oca-Luna¹ · Humberto Rodriguez-Rocha¹ · Aracely Garcia-Garcia¹

Received: 3 March 2022 / Accepted: 15 July 2022

© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2022

Abstract

Rapamycin is the best-characterized autophagy inducer, which is related to its antiaging and neuroprotective effects. Although rapamycin is an FDA-approved drug for human use in organ transplantation and cancer therapy, its administration as an antiaging and neuroprotective agent is still controversial because of its immunosuppressive and reported side effects. Therefore, it is critical to determine whether the dose that exerts a neuroprotective effect, 35 times lower than that used as an immunosuppressant agent, harms peripheral organs. We validated the rapamycin neuroprotective dosage in a Parkinson's disease (PD) model induced with paraquat. C57BL/6 J mice were treated with intraperitoneal (IP) rapamycin (1 mg/kg) three times per week, followed by paraquat (10 mg/kg) twice per week for 6 weeks, along with rapamycin on alternate days. Rapamycin significantly decreased dopaminergic neuronal loss induced by paraquat. Since rapamycin's neuroprotective effect in a PD model was observed at 7 weeks of treatment; we evaluated its effect on the liver, kidney, pancreas, and spleen. In addition, we prolonged treatment with rapamycin for 14 weeks. Tissue sections were subjected to histochemical, immunodetection, and morphometric analysis. Chronic rapamycin administration does not affect bodyweight, survival, and liver or kidney morphology. Although the pancreas tissular architecture and cellular distribution in Langerhans islets are modified, they may be reversible. The spleen B lymphocyte and macrophage populations were decreased. Notably, the lymphocyte T population was not affected. Therefore, chronic administration of a rapamycin neuroprotective dose does not produce significant tissular alterations. Our findings support the therapeutic potential of rapamycin as a neuroprotective agent.

Keywords Rapamycin · Chronic exposure · Histology · Neuroprotective dose · mTOR

Introduction

Rapamycin, a lipophilic macrolide antibiotic, is the best-characterized autophagy inducer, participating in cell growth, proliferation, and protein synthesis (Jung et al. 2010; Noda and Ohsumi 1998). Rapamycin is associated with beneficial effects on cancer (Anisimov et al. 2010, 2011; Heuer et al. 2012; Wang et al. 2013), diabetes (Xie and Herbert 2012; Long et al. 2012), tuberous sclerosis (Rosado et al. 2013; Wataya-Kaneda et al. 2012), cardiovascular diseases

(Selman and Partridge 2012; Comas et al. 2012; Chong and Maiese 2012; Ru et al. 2012), and neurological disorders (Tsang et al. 2007; Chong et al. 2010).

Rapamycin inhibits the serine/threonine kinase mammalian target of rapamycin (mTOR), and forms two protein complexes. The sensitivity of the mTOR complex 1 (mTORC1) and 2 (mTORC2) to rapamycin varies by cell line, tissue type, and exposure time. mTORC1 is a sensor for nutrient levels (amino acids and glucose) and insulin (Johnson et al. 2013a; Li et al. 2016; Vander Haar et al. 2007), while mTORC2 function is mediated by insulin/insulin-like growth factor 1 (IGF-1) signaling (Guertin et al. 2006; García-Martínez and Alessi 2008; Ikenoue et al. 2008; Liu et al. 2014). Interestingly, rapamycin is an acute and chronic inhibitor of mTORC1 and mTORC2, respectively.

Importantly, rapamycin immunomodulatory properties are widely used to prevent graft rejection after organ transplantation by inhibiting T and B cell proliferation (Khanna

✉ Aracely Garcia-Garcia
aracely.garciagr@uanl.edu.mx

Humberto Rodriguez-Rocha
humberto.rodriguezrc@uanl.edu.mx

¹ Departamento de Histología, Facultad de Medicina,
Universidad Autónoma de Nuevo León, Francisco I. Madero
S/N, 64460 Monterrey, Nuevo León, México



Pursuing Multiple Biomarkers for Early Idiopathic Parkinson's Disease Diagnosis

Yareth Gopar-Cuevas¹ · Ana P. Duarte-Jurado¹ · Rosa N. Diaz-Perez¹ · Odila Saucedo-Cardenas^{1,2} · Maria J. Loera-Arias¹ · Roberto Montes-de-Oca-Luna¹ · Humberto Rodriguez-Rocha¹ · Aracely Garcia-Garcia¹

Received: 9 April 2021 / Accepted: 16 July 2021

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2021

Abstract

Parkinson's disease (PD) ranks first in the world as a neurodegenerative movement disorder and occurs most commonly in an idiopathic form. PD patients may have motor symptoms, non-motor symptoms, including cognitive and behavioral changes, and symptoms related to autonomic nervous system (ANS) failures, such as gastrointestinal, urinary, and cardiovascular symptoms. Unfortunately, the diagnostic accuracy of PD by general neurologists is relatively low. Currently, there is no objective molecular or biochemical test for PD; its diagnosis is based on clinical criteria, mainly by cardinal motor symptoms, which manifest when patients have lost about 60–80% of dopaminergic neurons. Therefore, it is urgent to establish a panel of biomarkers for the early and accurate diagnosis of PD. Once the disease is accurately diagnosed, it may be easier to unravel idiopathic PD's pathogenesis, and ultimately, finding a cure. This review discusses several biomarkers' potential to set a panel for early idiopathic PD diagnosis and future directions.

Graphical abstract

Keywords Biomarkers · Diagnosis · Idiopathic · Parkinson's disease

Introduction

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disease after Alzheimer's but ranks first in the world as neurodegenerative movement disorder [1]. The various monogenic forms of PD account for a minority of PD cases. PD most commonly occurs in an idiopathic form, where genetics, environmental exposure, and aging are related risk factors [2, 3].

PD's pathological characteristics include dopaminergic neuronal loss in the *substantia nigra* at the central nervous system (CNS), the subsequent dopamine (DA) level reduction affecting motor function, and Lewy bodies' presence [4, 5]. Also, mitochondrial dysfunction, oxidative stress (OS), and abnormal protein accumulation are involved in PD's pathogenesis [6].

PD patients may suffer from motor and non-motor symptoms (cognitive and behavioral) and those related to the autonomic nervous system (ANS) [7]. PD cardinal motor symptoms are tremor, bradykinesia, rigidity, and postural instability [8]. Some pathologic changes that may appear up to 20 years before the motor symptoms onset [7] are related to ANS failures, including gastrointestinal, urinary, and cardiovascular symptoms, which increase with age, the severity of the disease, and higher dopaminergic medication doses [9]. Constipation is an early gastrointestinal symptom that precedes motor symptoms. Men with less than one bowel movement per day have 4.1 times the risk of developing PD compared to men who have two bowel movements per day, and the risk increases 4.5 times compared to men who have more than two bowel movements per day [10]. There, the

✉ Humberto Rodriguez-Rocha
humberto.rodriguezrc@uanl.edu.mx

✉ Aracely Garcia-Garcia
aracely.garciagr@uanl.edu.mx

¹ Departamento de Histología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, 64460 Monterrey, Mexico

² Departamento de Genética Molecular, Centro de Investigación Biomédica del Noreste, Delegación Nuevo León, Instituto Mexicano del Seguro Social, Monterrey, Mexico



Review

Antioxidant Therapeutics in Parkinson's Disease: Current Challenges and Opportunities

Ana Patricia Duarte-Jurado ¹, Yareth Gopar-Cuevas ¹, Odila Saucedo-Cardenas ^{1,2}, Maria de Jesus Loera-Arias ¹ , Roberto Montes-de-Oca-Luna ¹ , Aracely Garcia-Garcia ^{1,*} and Humberto Rodriguez-Rocha ^{1,*}

¹ Departamento de Histología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey 64460, Mexico; ana.duartejr@uanl.edu.mx (A.P.D.-J.); yareth.goparcu@uanl.edu.mx (Y.G.-C.); odila.saucedocr@uanl.edu.mx (O.S.-C.); MDJESUS.LOERAARS@uanl.edu.mx (M.d.J.L.-A.); ROBERTO.MONTESDEOCALN@uanl.edu.mx (R.M.-d.-O.-L.)

² Centro de Investigación Biomédica del Noreste, Departamento de Genética Molecular, Instituto Mexicano del Seguro Social, Delegación Nuevo León 40080, Mexico

* Correspondence: aracely.garciagr@uanl.edu.mx (A.G.-G.); humberto.rodriguezrc@uanl.edu.mx (H.R.-R.); Tel.: +52-81-8329-4000 (ext. 2713) (A.G.-G. & H.R.-R.); Fax: +52-81-8123-4313 (A.G.-G. & H.R.-R.)

Abstract: Oxidative stress is considered one of the pathological mechanisms that cause Parkinson's disease (PD), which has led to the investigation of several antioxidants molecules as a potential therapeutic treatment against the disease. Although preclinical studies have demonstrated the efficacy of these compounds to maintain neuronal survival and activity in PD models, these results have not been reflected in clinical trials, antioxidants have not been able to act as disease modifiers in terms of clinical symptoms. Translational medicine currently faces the challenge of redesigning clinical trials to standardize criteria when testing molecules to reduce responses' variability. Herein, we discuss current challenges and opportunities regarding several non-enzymatic antioxidants' therapeutic molecules for PD patients' potential treatment.

Keywords: Parkinson's disease; oxidative stress; antioxidants; clinical trials



Citation: Duarte-Jurado, A.P.; Gopar-Cuevas, Y.; Saucedo-Cardenas, O.; Loera-Arias, M.d.J.; Montes-de-Oca-Luna, R.; Garcia-Garcia, A.; Rodriguez-Rocha, H. Antioxidant Therapeutics in Parkinson's Disease: Current Challenges and Opportunities. *Antioxidants* **2021**, *10*, 453. <https://doi.org/10.3390/antiox10030453>

Academic Editor: Domenico Nuzzo

Received: 29 January 2021

Accepted: 11 March 2021

Published: 15 March 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Parkinson's disease (PD) is a progressive, chronic, and degenerative neurological disorder. It manifests as a movement disorder, tremor, bradykinesia, and rigidity. PD is the second most common neurodegenerative disease after Alzheimer's disease [1,2]. The estimated prevalence in industrialized countries is 0.3% in the general population, and older than 60 years is around 1% [1]. The incidence seems to increase with age, reaching 0.3 patients for every 1000 people between 55 and 65, and 4.4 patients for every 1000 people older than 85 years [3].

The main pathological characteristic of PD is the progressive degeneration of dopaminergic neurons [4]. Dopaminergic neurons are susceptible to oxidative damage due to dopamine's inherent metabolism, which is oxidized and generates reactive oxygen species (ROS), leading to cellular oxidative stress, where ROS have different macromolecular targets [5]. Furthermore, oxidative stress and neuroinflammation exert a synergistic effect on PD pathogenesis [6]. In situ or peripheral neuroinflammation, including glial cell activity [7,8], and pro-inflammatory cytokines [9], has been observed in post-mortem brain samples from PD patients, which might contribute to the cascade of events that lead to neurodegeneration. Once activated, glial cells are capable of regulating various enzymatic systems, such as NADPH oxidase, inducible nitric oxide synthase (iNOS), and myeloperoxidase [10], with the subsequent production of cytotoxic factors like superoxide anion (O₂^{•-}) and nitric oxide (NO[•]).

Substantial evidence suggests that oxidative stress is involved in the etiology and pathogenesis of neurodegenerative disorders. The brain is rich in polyunsaturated fatty



Autophagy Stimulation Decreases Dopaminergic Neuronal Death Mediated by Oxidative Stress

Marcela J. Ramirez-Moreno¹ · Ana P. Duarte-Jurado¹ · Yareth Gopar-Cuevas¹ · Alfredo Gonzalez-Alcocer¹ · Maria J. Loera-Arias¹ · Odila Saucedo-Cardenas^{1,2} · Roberto Montes de Oca-Luna¹ · Humberto Rodriguez-Rocha¹ · Aracely Garcia-Garcia¹

Received: 7 February 2019 / Accepted: 17 May 2019
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2019

Abstract

The neurodegenerative process of Parkinson's disease (PD) involves autophagy impairment and oxidative stress. Therefore, we wanted to determine whether stimulation of autophagy protects dopaminergic cell death induced by oxidative stress in a PD model. Since environmental exposure to herbicides increases the risk to develop PD, the experimental model was established using the herbicide paraquat, which induces autophagy disruption, oxidative stress, and cell death. Rapamycin-stimulated autophagy inhibited calpain-dependent and independent apoptosis induced by paraquat. Autophagy stimulation decreased oxidative stress and peroxiredoxins (PRXs) hyperoxidation induced by paraquat. Cells exposed to paraquat displayed abnormally large autophagosomes enclosing mitochondria, which correlates with an increase of p62, an essential mitophagy regulator. Interestingly, when autophagy was stimulated before paraquat treatment, autophagosome size and number were similar to that observed in control cells. Motor and cognitive function impairment induced by paraquat showed an improvement when preceded by autophagy stimulation. Importantly, dopaminergic neuronal death and microglial activation mediated by paraquat were significantly reduced by rapamycin-induced autophagy. Our results indicate that autophagy stimulation has a protective effect on dopaminergic neurons and may have a promising potential to prevent or delay PD progression.

Keywords Autophagy · Oxidative stress · Paraquat · Parkinson's disease · Rapamycin

Introduction

Parkinson's disease (PD) is characterized by the dopaminergic neuronal loss in the *substantia nigra* at the central nervous system (CNS), a significant reduction in dopamine levels affecting the motor function, and the presence of Lewy bodies

[1, 2]. Most of the PD cases have an idiopathic origin, but it is believed that genetic susceptibility, environmental exposures, and aging concur in the progress of this disease [3, 4]. Epidemiological studies have demonstrated that environmental exposures to herbicides and pesticides increase the risk of developing PD [5–8]. Although the underlying etiology of PD is not entirely understood, several mechanisms have been associated with promoting neuronal death, including mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and protein accumulation [9–11]. The latter is related to the main pathological hallmark of PD, the presence of Lewy bodies, which are composed of abnormal deposits of protein aggregates, particularly α -synuclein and ubiquitin-bound proteins [12]. Abnormal protein aggregation results from the proteasome and autophagy alteration, and in the latter, includes disruption of lysosomal hydrolase trafficking [13–15]. Importantly, both degradation pathways are dysregulated or inhibited in PD [16].

Autophagy is a self-regulatory mechanism involving macromolecules and organelles degradation, which are sequestered into autophagosomes [17, 18]. Ulterior fusion with a

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s12035-019-01654-1>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Aracely Garcia-Garcia
aracely.garciagr@uanl.edu.mx

¹ Departamento de Histología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo Leon, Francisco I. Madero S/N, 64460 Monterrey, Nuevo Leon, Mexico

² Departamento de Genética Molecular, Centro de Investigación Biomédica del Noreste, Instituto Mexicano del Seguro Social, Delegación Nuevo León, , Mexico