

Tesis Doctoral

Rol de la vía autofágica-lisosomal en la muerte celular inducida por manganeso en células gliales

Gorojod, Roxana Mayra

2014-07-17

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Gorojod, Roxana Mayra. (2014-07-17). Rol de la vía autofágica-lisosomal en la muerte celular inducida por manganeso en células gliales. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Gorojod, Roxana Mayra. "Rol de la vía autofágica-lisosomal en la muerte celular inducida por manganeso en células gliales". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2014-07-17.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

Rol de la vía autofágica- lisosomal en la muerte celular inducida por manganeso en células gliales

Tesis doctoral para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Química Biológica

Lic. Roxana Mayra Gorojod

Director de tesis: Dra. Mónica Lidia Kotler

Consejero de Estudios: Dra. Elba Susana Vazquez

Lugar de trabajo: Laboratorio de Apoptosis en el Sistema Nervioso – Nanooncología,
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Instituto de Química Biológica Ciencias Exactas y Naturales, Consejo Nacional de
Investigaciones Científicas y Técnicas.

Buenos Aires, 2014

Fecha de defensa: 17 de Julio de 2014

Resumen

Rol de la vía autofágica- lisosomal en la muerte celular inducida por manganeso en células gliales

El manganismo es un desorden neurodegenerativo originado por la sobre-exposición crónica a Mn, cuyo cuadro clínico y vías de señales se asemejan a los de la Enfermedad de Parkinson Idiopática. El Mn se acumula preferentemente en los ganglios basales y en particular, en las mitocondrias y lisosomas, donde puede generar especies reactivas de oxígeno y afectar las membranas de estas organelas. La permeabilización de la membrana lisosomal (PML) conduce a la liberación de hidrolasas al citosol y a la apoptosis y puede también comprometer la degradación autofágica.

En el presente trabajo se investigó el daño lisosomal inducido por Mn y el impacto de este evento en la muerte de las células C6 de glioma de rata. Parte de los resultados obtenidos fueron trasladados a un modelo *in vivo* de intoxicación aguda con Mn. Por lo tanto, el enfoque estuvo dirigido al estudio de la posible participación de la vía lisosomal en la apoptosis inducida por Mn y al rol potencial de la autofagia en este contexto celular.

Los ensayos *in vitro* se realizaron empleando células expuestas a MnCl₂ en distintas condiciones de incubación. Se demostró que el Mn induce un aumento en el tamaño de las vesículas ácidas que puede ser totalmente prevenido por pre-incubación con antioxidantes. Asimismo, la exposición al metal genera PML y liberación de Catepsina D (CatD) al citosol, procesos que tienen lugar río arriba de la injuria a la mitocondria. El estudio del rol de las catepsinas en la vía de muerte celular apoptótica demostró que las CatD y B regulan los niveles de expresión de FasL, intervienen en el clivaje de caspasa-8 y Bid y en la activación de la vía de muerte mitocondrial. En este contexto, el Mn activó la autofagia como un mecanismo de supervivencia celular.

Los estudios *in vivo* sugieren que los efectos tóxicos del Mn resultan en un daño a los astrocitos del *striatum* y en la alteración de los niveles de expresión de la CatD en las neuronas de ciertos ganglios basales involucrados en el manganismo.

En conjunto, nuestros resultados demuestran por primera vez que los lisosomas constituyen un blanco estratégico de la toxicidad del Mn, integrando la cascada de señales implicadas en la apoptosis. En este escenario, la autofagia se desencadena en un intento de rescatar a las células de la muerte. Estos hallazgos contribuyen al conocimiento de los mecanismos de daño posiblemente activados en el manganismo y probablemente en otras enfermedades neurodegenerativas.

PALABRAS CLAVE:

ASTROCITOS; APOPTOSIS; AUTOFAGIA; CATEPSINAS; CÉLULAS C6; MANGANESO; MANGANISMO; LISOSOMAS; PERMEABILIZACIÓN DE LA MEMBRANA LISOSOMAL

Abstract

Role of the lysosomal- autophagic pathway in Mn- induced cell death in glial cells

Manganism is a neurodegenerative disorder caused by chronic Mn overexposure whose symptoms and signaling pathways resemble those of idiopathic Parkinson's disease. Mn accumulates within the basal ganglia, particularly in mitochondria and lysosomes. Hence, Mn- induced reactive oxygen species may disrupt the integrity of these organelles. Lysosomal membrane permeabilization (LMP) causes the release of cathepsins and other hydrolases from the lysosomal lumen to the cytosol leading to apoptotic cell death. Moreover, LMP may induce alterations in the autophagic degradation pathway.

In the present study, Mn-induced lysosomal damage and its impact on C6 rat glioma cell death were investigated. Some of these results were validated in an acute Mn intoxication *in vivo* model. Our approach was to study the possible involvement of the lysosomal pathway in manganese-induced apoptosis and the potential role of autophagy in this cellular context.

For *in vitro* assays, cells were exposed to MnCl₂ in different incubation conditions. We found that Mn induces an increase in acidic vesicles size, which is completely prevented by antioxidants. Moreover, Mn exposure generates PML and the release of cathepsin D (CatD) to the cytosol, both processes taking place upstream to the mitochondrial damage. CatD and B are involved in both caspase-8 and Bid cleavage, leading to the activation of the mitochondrial apoptotic pathway. Moreover, they regulate FasL expression levels. In this context, autophagy is activated as a survival pathway.

In vivo studies suggested that the toxic effects of Mn result in both striatal astrocyte damage and altered expression of CatD in neurons of the basal ganglia.

Taken together, our results demonstrate for the first time that lysosomes are a strategic target for Mn toxicity, integrating the signal cascades involved in apoptosis. In this scenario, autophagy is triggered as an attempt to rescue the cells from death.

These findings contribute to the understanding of the damage mechanisms possibly activated in manganism and probably in other neurodegenerative diseases.

KEYWORDS:

ASTROCYTES; APOPTOSIS; AUTOPHAGY; CATHEPSINS; C6 CELLS; MANGANESE;
MANGANISM; LYSOSOMES; LYSOSOMAL MEMBRANE PERMEABILIZATION

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a los organismos que hicieron posible el presente trabajo:

A Universidad de Buenos Aires, y a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales en particular, por la formación, gratuita y de excelencia y por la provisión de los espacios y laboratorios donde este trabajo fue llevado a cabo. Al CONICET, por haberme otorgado las becas que me permitieron iniciar mi carrera científica y contribuyeron con mi formación.

Y a las personas, que directa o indirectamente me formaron, guiaron y acompañaron durante el desarrollo de la tesis doctoral:

A Mónica Kotler, por dirigirme, guiarme y aconsejarme. Por haber puesto tanto empeño y dedicación en el desarrollo de esta tesis doctoral y en mi instrucción como científica. Por haberme formado desde que era estudiante, con una paciencia infinita. Todavía tengo el recuerdo de cuando te pregunté, con mucha vergüenza, si me presentabas para la beca doctoral. En todos estos años conocía a una excelente jefa y persona, las palabras no alcanzan para agradecerte.

A Agustina Alaimo, mi compañera a lo largo de todo el trabajo de tesis doctoral. Por habernos formado y crecido juntas. Por su significativa contribución en los experimentos presentados y sobre todo, por los lindos momentos compartidos en el laboratorio y fuera de él. A Soledad Porte Alcón, Esteban Miglietta y Noelia Scarinci, por la buena predisposición de siempre y por enseñarme que la vida es una aplastante derrota tras otra, hasta que acabas deseando que muera Flanders. A Delfina Romero y Carla Sapienza, con las que ya no compartimos mesadas, pero fueron una parte muy importante en el desarrollo de la tesis.

A Flavia Saravia y Patricio Pavia, por haber puesto a disposición su inmensa experiencia y haberme brindado tanto asesoramiento técnico como experimental para la realización de los ensayos *in vivo*. Y al grupo todo (Juan, Angie, y Carlos) por los buenos momentos pasados juntos.

A Dante Paz, por inspirar en la gente los mejores sentimientos y por haberme facilitado anticuerpos que contribuyeron con el desarrollo de la tesis.

Agradecimientos

A Mónica Costas, por haberme prestado el anticuerpo anti- Bid, que permitió obtener resultados importantes para elucidar los mecanismos de señales descriptos.

A los grupos de Elba Vazquez, Eduardo Cánepa, María del Carmen Ríos, Diego Laderach y Daniel Compagno, Martín Monte, Mario Galigniana, Claudia Perez Leiros y Rosanna Ramhorst, Alejandra Guberman, Juan Carlos Calvo, Verónica García, por las infinitas veces que me brindaron ayuda desinteresadamente.

A las Pintonas: Flor, Gaby, Silcho, Euge, Lau y Paco. Por las anécdotas en la FCEN y post FCEN, por las charlas infinitas (para las que el tiempo nunca alcanza) y la buena comida que siempre acompaña.

A mis amigos de siempre: Vero, Hernán (y la hermosa Milena), Fiore (y el genial Joaquin), Gise, Shir, Meli, Levi y Lulo, por acompañarme, sin entender en que trabajo, pero siempre dispuestos a escuchar. Porque aunque hayamos crecido, seguimos siendo los mismos.

A Javier, Adrián y Lore por tantos buenos momentos pasados juntos. A Raúl, Emma y Kari porque aún con la distancia están siempre para todo. A Emi e Iván, por hacerme muy feliz.

A mis padres, Ioli y Ana, por haberme brindado una ayuda inmensurable, por estar siempre al pie del cañón para lo que sea, por haber financiado mis estudios de grado y oficiar de padres, abuelos, niños, cadetes, secretarias y mil cosas más durante los momentos más estresantes de los estudios de posgrado.

A Diego, por ser el que en primera persona me acompañó en cada una de las victorias y derrotas, por haber aprendido sobre caspasas, westerns, lisosomas y bafilomicina. Por ser mi compañero de vida y acompañarme en cada momento. Por hacerme feliz.

A Marco, por cambiarme la vida.

A mi familia

Índice

Resumen	2
Abstract	5
Agradecimientos	8
Abreviaturas	17
Introducción	23
1. Manganeso.....	24
1.1 Generalidades.....	24
1.2 El Mn en el organismo.....	25
1.3 Distribución y transporte del Mn en el cerebro.....	27
2. Manganismo.....	30
2.1 Intoxicación por Mn en humanos.....	30
2.2 Toxicidad del Mn en el SNC.....	35
2.3 Localización subcelular del Mn.....	37
3. Glia.....	38
3.1 Astrocitos en la fisiología del SNC.....	38
3.2 Rol de los astrocitos en las patologías del SNC.....	39
4. Apoptosis.....	41
4.1 Generalidades.....	41
4.2 Características morfológicas de la apoptosis.....	42
4.3 Características bioquímicas de la apoptosis.....	44
4.3.1 Caspasas.....	44
4.3.2. Familia Bcl-2.....	46
4.3.3 Vías de inducción de muerte apoptótica.....	48
Vía extrínseca o de receptores de muerte.....	48
Vía intrínseca o mitocondrial.....	49
Otras vías apoptóticas.....	50
5. Lisosomas.....	51
5.1 Historia.....	51
5.2 Estructura y función.....	52
5.3 Síntesis de proteínas lisosomales.....	56
5.4 Principales funciones del lisosoma y su relación con procesos celulares clave.....	56

5.5 Vía de muerte lisosomal	57
6. Autofagia	59
6.1 Generalidades	59
6.2 Proceso de degradación autofágica y vesículas involucradas.....	60
6.3 Vías de señalización involucradas en la autofagia.....	62
6.2.1 Fosfatidil inositol 3- quinasas	62
6.3.2 mTORC.....	63
6.3.3 Sistemas de conjugación tipo ubiquitina	63
6.4 Rol de la autofagia en el daño lisosomal.....	65
6.5 Vía de muerte autofágica.....	66
Hipótesis y Objetivos	68
Materiales y Métodos.....	72
1 Reactivos	73
1.1 Reactivos generales.....	73
1.2 Anticuerpos	74
1.3 Soluciones generales.....	75
1.4 Soluciones para western blot.....	75
1.5 Preparación de antioxidantes	77
2. Métodos.....	77
2.1. Cultivo celular.....	77
2.2. Ensayo de reducción de MTT	78
2.3. Ensayo de retención de rojo neutro (RN).....	78
2.4. Tinción de los compartimientos ácidos	79
2.4.1 Tinción con naranja de acridina	79
2.4.2 Tinción con Lysotracker Red DND-99	79
2.5 Cuantificación de organelas ácidas mediante citometría de flujo.....	80
2.6 Tinción de vacuolas autofágicas.....	81
2.7 Inmunocitoquímica.....	82
2.7.1 Procedimiento general	82
2.7.2 Procedimientos específicos.....	83
Inmunomarcación de CatD y LC3	83
Liberación de citocromo c.....	83
Localización nuclear de CatD	83

Co- Inmunomarcación de Tom20 y LC3	84
2.8 Actividad enzimática de las caspasas-3/-7	84
2.9 Fraccionamiento subcelular	85
2.10 Western Blots	86
2.10.1 Preparación de las muestras	86
2.10.2 Electroforesis de proteínas.....	86
2.10.3 Inmunodetección.....	87
2.11 Estudios in vivo.....	87
2.11.1 Animales.....	87
2.11.2 Modelo de toxicidad aguda por Mn.....	88
2.11.3 Perfusión de los animales	88
2.11.4 Corte y preservación del tejido cerebral	89
2.11.5 Inmunohistoquímica	89
Revelado con DAB	90
2.12 Análisis estadístico	91
Resultados	92
Capítulo 1: Efecto del Mn sobre el sistema de vesículas ácidas	93
1.1 Generalidades	94
1.2 Estudios de citotoxicidad	96
1.3 Integridad de las vesículas ácidas.....	99
1.3.1 Marcación con LysoTracker Red DND-99.....	99
1.3.2 Tinción con naranja de acridina	103
1.4 Efecto de las ROS sobre el tamaño de las VAs.....	107
1.5 Daño a los lisosomas.....	109
1.5.1 Permeabilización de la membrana lisosomal (PML).....	109
Niveles de expresión de CatD y su liberación al citosol.....	109
Localización nuclear de CatD	116
Capítulo 2: Rol de los lisosomas en la muerte celular.....	118
2.1 Rol de las catepsinas en la toxicidad del Mn.....	119
2.2 Efecto de la BafA1 sobre la toxicidad del Mn	121
2.3 PML en la apoptosis	124
2.3.1 Rol de los lisosomas sobre la activación de la vía extrínseca	124
Caspasa-8.....	125

Participación de FasL	126
2.3.2 Rol de los lisosomas sobre la activación de la vía intrínseca.....	127
Pérdida del $\Delta\psi_m$ y liberación de citocromo c.....	127
Clivaje de Bid	131
Activación de la caspasa -9.....	133
2.3.3 Rol de los lisosomas sobre la activación de las caspasas efectoras	134
Capítulo 3: Rol de la autofagia en la citotoxicidad inducida por Mn	138
3.1 Generalidades	139
3.2 Formación de vesículas autofágicas.....	139
3.2.1 Tinción con monodansilcadaverina.....	139
3.2.2 Niveles de LC3-II	141
3.3 Autofagia en la muerte celular.....	147
3.4. Vías de señales implicadas en la autofagia.....	151
3.4.1 Beclina 1.....	151
3.4.2 Quinasas.....	152
3.5 Mitofagia.....	155
Capítulo 4: Estudios <i>in vivo</i>	158
4.1 Modelo de toxicidad aguda	159
Discusión	169
Capítulo 1: Efecto del Mn sobre el sistema de vesículas ácidas	170
Capítulo 2: Rol de los lisosomas en la muerte celular.....	178
Capítulo 3: Rol de la autofagia en la citotoxicidad inducida por Mn	183
Vías de señales involucradas en la autofagia y la apoptosis.....	186
Capítulo 4: Estudios <i>in vivo</i>	192
Conclusiones	197
Bibliografía	204

Abreviaturas

Abreviaturas

$\Delta\phi_m$	Potencial de membrana mitochondrial
3-MA	3-metiladenina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMPK	<i>Adenosine monophosphate-activated protein kinase</i> Proteína quinasa activada por adenosina monofosfato
APAF-1	<i>Apoptosis protease-activating factor-1</i> Factor 1 activador de proteasas apoptóticas
APS	Persulfato de amonio
ASA	Ácido acetilsalicílico
ATP	Adenosina trifosfato
BafA1	Bafilomicina A1
Bcl	<i>B-cell lymphoma</i> Linfoma de células B
BH	Dominio de homología a Bcl-2
BHE	Barrera Hematoencefálica
Bid	<i>BH3 interacting domain death agonist</i> Agonista letal por dominio de interacción BH3
BSA	Seroalbúmina bovina
CARD	<i>Caspase recruitment domain</i> Dominio de reclutamiento de caspasas
CatB	Catepsina B
CatD	Catepsina D
cIAP	<i>Cellular inhibitor of apoptosis</i> Inhibidor celular de la apoptosis
Cy2	Colorante de cianina 2
DAB	Tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobencidina
DAPK	<i>Death-associated protein kinase</i> Proteína quinasa asociada a la muerte

Abreviaturas

DED	<i>Death effector domain</i> Dominio efector de muerte
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMT1	<i>Divalent metal transporter 1</i> Transportador de cationes divalentes 1
DMSO	Dimetil sulfóxido
DTT	Ditiotreitol
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EP	Enfermedad de Parkinson
ERK	<i>Extracellular signal-Regulated Kinase</i> Quinasa regulada por señales extracelulares
FADD	<i>Fas- associated death domain</i> Dominio de muerte asociado a Fas
Fas	<i>Fas cell surface death receptor</i> Receptor de muerte en la superficie celular Fas
FasL	<i>Ligando de Fas</i>
GABA	Ácido γ - aminobutírico
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i> Proteína ácida fibrilar glial
GSH	Glutación
HEPES	Ácido N-(2-Hidroxietil)-piperazina-N'-(2-etanosulfónico)
HGSNAT	Heparan- α -glucosaminido N-acetiltransferasa
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> Peroxidasa de rábano
i.p.	Intraperitoneal
IAP	Proteína inhibidora de la apoptosis
IFM	Intensidad de fluorescencia media
IgG	Inmunoglobulina G

Abreviaturas

JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i> Quinasa N- terminal de c-Jun
LAAT	<i>Lysosomal amino acid transporter</i> Transportador lisosomal de aminoácidos
LAMP	<i>Lysosomal Associated Membrane Protein</i> Proteína asociada a la membrana lisosomal
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LIMP	<i>Lysosomal integral membrane protein</i> Proteína integral de membrana lisosomal
LYNUS	<i>Lysosomal Nutrient Sensing</i> Sensado de nutrientes lisosomal
M6P	Manosa 6 fosfato
MAP LC3	<i>Microtubule-associated protein light chain 3</i> Cadena liviana 3 de la proteína asociada a microtúbulos
MCOLN1	Mucopolina 1
MDC	Monodansilcadaverina
MLS	Medio libre de suero
MLT	Melatonina
MME	Membrana mitocondrial externa
Mn	Mn ²⁺
MOMP	Permeabilización de la membrana externa mitocondrial
MSFB	Medio suplementado con 10% de suero fetal bovino
mTORC	<i>Mammalian Target of Rapamycin Complex</i> Complejo blanco de la rapamicina en mamíferos
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio
NAC	N- acetilcisteína
NPC1	Niemann–Pick C1
ON	Durante la noche

Abreviaturas

PAS	<i>Phagophore assembly site</i> Sitio de ensamblaje del fagóforo
PE	Fosfatidiletanolamina
PBS	Buffer fosfato salino
PBST	Buffer fosfato salino - Tween 20
PepA	Pepstatina A
PI3KC1	Fosfatidil inositol 3- quinasa clase 1
PI3KC3	Fosfatidil inositol 3- quinasa clase 3
PML	Permeabilización de la membrana lisosomal
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
RE	Retículo endoplasmático
RN	Rojo neutro
RNS	<i>Reactive nitrogen species</i> Especies reactivas del nitrógeno
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> Especies reactivas del oxígeno
Rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	<i>Real- Time Polymerase Chain Reaction</i> Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SEM	Error estándar
SFB	Suero fetal bovino
SNARE	<i>Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) Attachment Protein (SNAP) Receptor</i> Receptor de la proteína de unión al factor sensible a N-etilmaleimida
SNC	Sistema nervioso central
SSC	Buffer citrato de sodio salino

Abreviaturas

TA	Temperatura ambiente
TBS	Buffer tris salino
TBST	Buffer tris salino con Tween-20
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
Tf	Transferrina
TfR	Receptor de transferrina
TGN	Red del trans Golgi
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i> Factor de necrosis tumoral
TNFR1	Receptor 1 de TNF
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i> Ligando inductor de apoptosis relacionado a TNF
TRAIL-R	Receptor de TRAIL
v-ATPasa	ATPasa vacuolar
VAs	Vesículas ácidas
WM	Wortmanina
XIAP	<i>X-linked inhibitor of apoptosis</i> Proteína inhibidora de la apoptosis ligada al cromosoma X
ZIP	Proteínas relacionadas a Zrt/Irt

Introducción

1. Manganeso

1.1 Generalidades

El manganeso (Mn) es un elemento ampliamente distribuido en la corteza terrestre y es considerado el quinto metal en orden de abundancia (Organización Mundial de la Salud, 2000). Debe su nombre (en latín: *magnesia*) a que sus minerales de color gris oscuro o negro como la pirolusita (MnO_2) tienen propiedades magnéticas (en latín, imán: *magnes*) (Venable, 1894).

Por el año 1656, el científico Alemán-Danés Johann Rudolph Glauber fue el primero en realizar experimentos empleando un mineral de Mn. La mayor parte de los estudiosos de la mineralogía, al no saber cómo clasificarlo, lo situaron entre los minerales de hierro (Fe). Sin embargo, el alemán Johann Heinrich Pott, que publicó el primer examen químico en 1740, reportó que generalmente contenía apenas algo de Fe (Thomson, 1802; Venable, 1894).

Fue recién en 1758 cuando el destacado mineralogista sueco Axel Fredrik Cronstedt, en su ensayo "*An assay toward a system of mineralogy*" le asignó al mineral de Mn un lugar propio. En el año 1770, Ignatius Gottfried Kaim publicó en Viena una serie de experimentos en los que buscaba demostrar que se podía extraer un metal del mineral. Cuatro años más tarde, el profesor sueco Torbern Olof Bergman difundió una disertación en la que demostraba que el mineral, al que llamaban manganeso, era en realidad un óxido metálico. Si bien sus intentos de reducirlo no fueron exitosos, su connacional Johan Gottlieb Gahn, halló el procedimiento correcto. El metal obtenido se llamó manganeso, y en estado puro resultó ser de un color blanco-grisáceo brillante, con textura granular y sin sabor ni gusto (Thomson, 1802; Venable, 1894).

Hoy en día, el Mn se encuentra clasificado como un metal de transición, de peso atómico 54,938049, de número atómico 25 y está situado en el grupo 7 en la Tabla Periódica de los Elementos. Tiene valencias 1, 2, 3, 4, 6 o 7 (**Fig. 1**) (Lide, 2004).

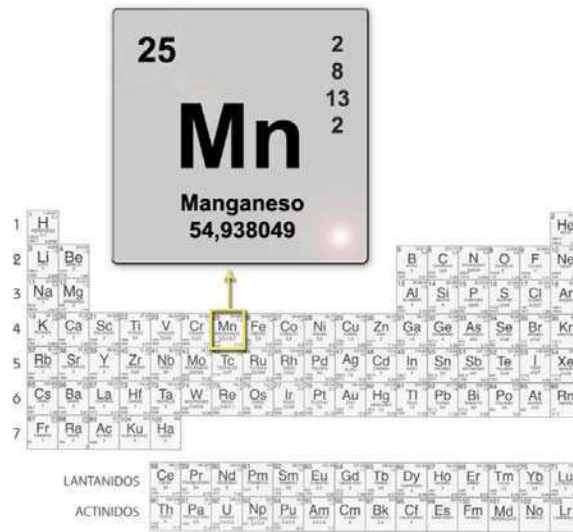


Figura 1. Tabla Periódica de los Elementos. Se muestran el nombre, la abreviatura, el número atómico, la estructura electrónica y el peso atómico del Mn así como también su ubicación en la tabla periódica.

El Mn se encuentra tanto en el agua, el suelo y el aire así como en los alimentos formando óxidos, carbonatos y silicatos (Aschner, 2000; Organización Mundial de la Salud, 2000). Además de dar lugar a una diversidad de minerales, también está presente en la mayoría de los minerales de hierro, en el carbón y en el petróleo. El Mn se emplea principalmente en la industria metalúrgica como constituyente de aleaciones o como un aditivo para desoxidar y desulfurar. Además, se utiliza en la producción de pilas de celda seca, en la industria química, en los combustibles, en la fabricación de vidrio, en las industrias del cuero y textil y en fertilizantes (Organización Mundial de la Salud, 2000).

1.2 El Mn en el organismo

Si bien el Mn es esencial para la vida de los mamíferos, su función es poco comprendida debido a su baja concentración en los tejidos y por ser reemplazado, en condiciones de baja disponibilidad, por otros cationes divalentes. En el organismo, este metal se encuentra en cantidades traza (10-20mg), principalmente como Mn^{2+} o Mn^{3+} . Está involucrado en el metabolismo de proteínas, lípidos y

carbohidratos y actúa como cofactor de enzimas descarboxilasas, transferasas, óxido-reductasas, ligasas, liasas, hidrolasas y quinasas incluyendo las mitocondriales superóxido dismutasa (SOD) y piruvato carboxilasa y la específica de astrocitos, glutamina sintetasa. Se cree que esta última se encuentra asociada al 80% del Mn en el cerebro. Por medio de sus funciones celulares, este micronutriente cumple roles en la respuesta inmune, la homeostasis del azúcar en sangre, la regulación de los niveles de ATP, la reproducción, la digestión y el crecimiento del hueso (Aschner, 2000; Takeda, 2003; Burton y Guilarte, 2009; Gropper y Smith, 2012).

Los alimentos constituyen la principal ruta de incorporación del Mn al organismo. Los más ricos en este mineral son la palta, los arándanos, los frutos secos y las semillas, las algas, la yema de huevo, los cereales integrales, las legumbres y las verduras de hoja verde. El consumo diario aproximado se encuentra entre 2- 9 mg/día para una persona promedio de 70kg (Aschner, 2000). Según estudios realizados por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA), entre los años 1982- 1989 todos los grupos etarios tuvieron una ingesta de Mn dentro del rango recomendado con excepción de las mujeres entre 14- 16 años, que se encontraron 10% por debajo del límite inferior. Asimismo, un trabajo que evaluó los niveles de consumo en Europa Occidental encontró que la ingesta es adecuada. Estos hallazgos sugieren que la ingesta de Mn por parte de la población, en términos generales es suficiente para los requerimientos del organismo a lo largo del ciclo de vida. Estudios con animales demostraron que la deficiencia de Mn causa anormalidades esqueléticas y afecta la reproducción y la actividad exocrina y endocrina del páncreas (Failla, 1999). Sin embargo, la deficiencia en humanos es rara y los reportes escasos.

La cantidad de Mn en el organismo está regulada a nivel de la captación y la excreción intestinal y sus niveles se mantienen casi constantes. Un aumento del metal en la dieta, lleva a un incremento en su metabolismo en el hígado y aumenta la excreción que ocurre primariamente por la vía biliar. Típicamente, 1-5% del Mn ingerido alcanza la circulación sistémica. En sangre, la concentración se encuentra entre 8-11 µg/ l, mientras que en el plasma los datos obtenidos son muy variables.

El Mn suele estar presente en la mayoría de los tejidos, y si bien no se almacena en ninguno en particular, su concentración es mayor en hueso, páncreas, hígado y riñón (Leggett, 2011; Gropper y Smith, 2012).

Una vez absorbido en el intestino, el Mn ingresa a la circulación portal hepática como Mn libre o Mn^{2+} unido a α -2 macroglobulina y al llegar al hígado es casi completamente removido del torrente sanguíneo. Por otra parte, el Mn que ingresa al organismo por otras vías evade el mecanismo de control hepático y se encuentra en mayor parte unido a transferrina (Tf), lo que permite su transporte a los tejidos que posean receptores, entre ellos el cerebro. Por lo tanto, la captación hepática funcionaría manteniendo la homeostasis del Mn en sangre (Leggett, 2011; Gropper y Smith, 2012).

1.3 Distribución y transporte del Mn en el cerebro

El Mn se distribuye en el cerebro de manera heterogénea. La mayor concentración se detecta en los ganglios basales (en particular en el núcleo caudado, *globus pallidus* y putamen, seguidos por la *substantia nigra*) y en el tálamo. Además, en la corteza cerebral, la concentración es mayor en la materia blanca que en la materia gris mientras que esta diferencia no se observa en el cerebelo (Larsen et al., 1979; Yamada et al., 1986). En la **Fig. 2** se muestra un esquema con la localización de las áreas de mayor acumulación de Mn mencionadas.

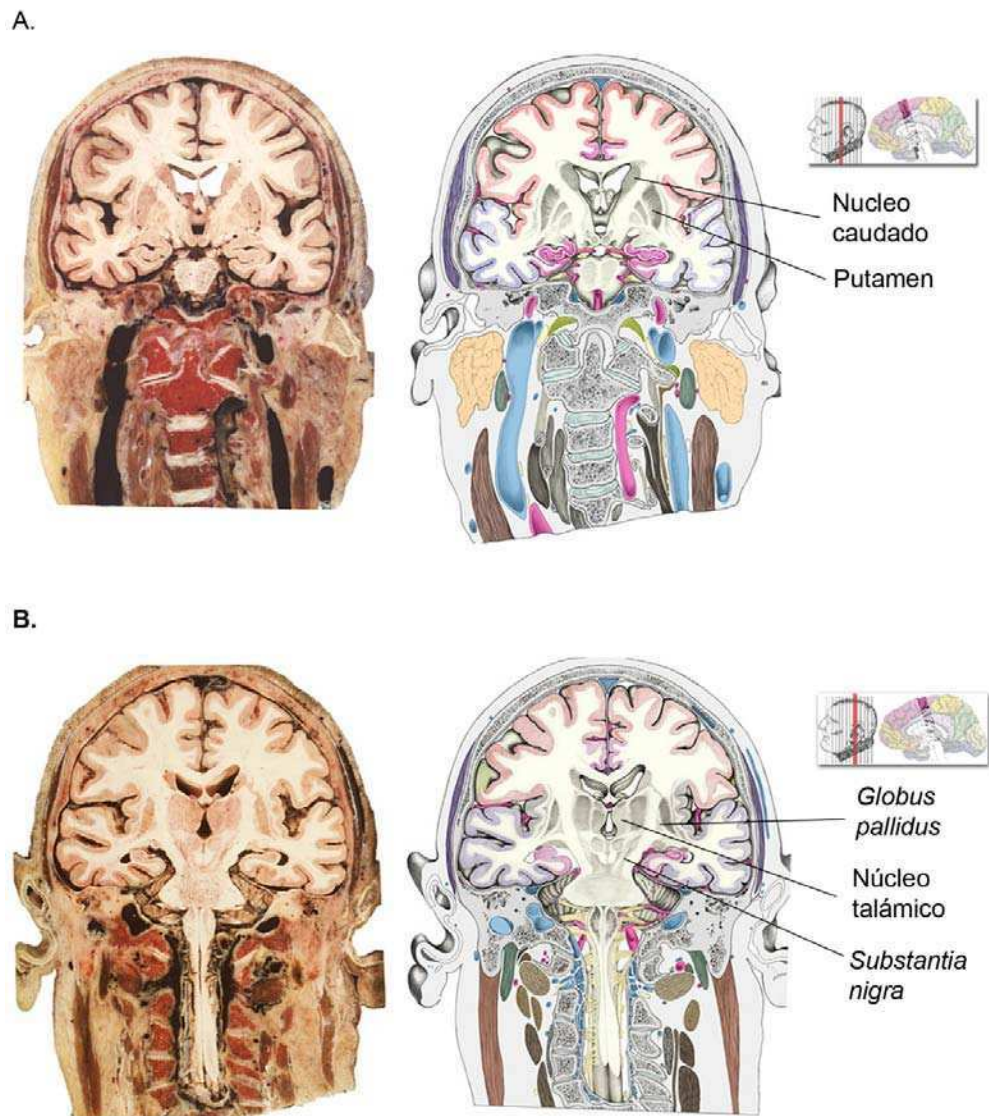


Figura 2. Anatomía del cerebro humano. Imágenes de cortes coronales del cerebro, de anterior a posterior, sección 9 (A) y 10 (B). Se muestran a la izquierda fotografías y a la derecha diagramas en los que se señalan las áreas de mayor acumulación de Mn en el cerebro. Adaptado del Atlas coronal del Atlas del cerebro humano (Jürgen et al., 2008)

Si bien existe un gran número de trabajos que estudian el transporte del Mn al cerebro, la forma en que esto ocurre en condiciones fisiológicas no ha sido

completamente elucidada debido a las complicaciones que acarrearán la existencia de distintos estados de oxidación y la unión en el plasma a compuestos de alto y bajo peso molecular. Además, la captación en dicho órgano estaría críticamente influenciada por la concentración del metal, el pH y la competencia con otros metales (Rabin et al., 1993). Sin embargo, hay una diversidad de mecanismos descriptos.

Existen dos vías de entrada del Mn al cerebro, la barrera hematoencefálica (BHE) y la barrera sangre-líquido cefalorraquídeo (LCR). El estado de oxidación +2 es la forma más estable del Mn a pH fisiológico y se propone que ingresa primariamente a través de la BHE como ion libre mediante transporte facilitado (Rabin et al., 1993) por proteínas transportadoras de metales no específicas como DMT1 y ZIP8/ZIP14 (Cuadro 1). Además, se ha demostrado que este metal es capaz de ser captado en células endoteliales de la microvasculatura del cerebro por canales de Ca^{2+} (Crossgrove y Yokel, 2005) o unido a citrato (Crossgrove et al., 2003). Si bien en eritrocitos se encontró que puede ingresar mediante el intercambiador ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$) (Frame y Milanick, 1991) o por un antiporter de Mn (Günther y Vormann, 1990), estos mecanismos no han sido descriptos, hasta donde sabemos, en tejido nervioso.

Gran parte del Mn^{2+} del plasma se une a proteínas, lo que restringe la captación por parte del sistema nervioso central (SNC). Alrededor del 70% del Mn^{2+} estaría asociado a proteínas de alto peso molecular como Tf, albúmina y α 2-macroglobulina (siendo la unión a Tf de menor afinidad que la correspondiente a Mn^{3+}). Con respecto al 30% restante de Mn^{2+} , May et al. (1977) estudiaron la interacción con 40

Cuadro 1

Transporte de Mn^{2+}

DMT1

El transportador de cationes divalentes (DMT1) es un simporter que emplea el gradiente de protones generado en la membrana plasmática por la ATPasa vacuolar (v-ATPasa) para ingresar metales al interior celular. Además, sirve como transportador en el interior celular (p. ej., complementando el transporte mediado por Tf).

En los ganglios basales, se encuentra mayormente expresado en astrocitos en el núcleo caudado, putamen y substantia nigra pars reticulata (Au et al., 2008).

ZIP8/ZIP14

Son dos proteínas transmembrana que forman parte de la familia de proteínas relacionadas a Zrt/Irt (ZIP), con función en la importación de iones metálicos (He et al., 2006). ZIP8 se expresa de manera más abundante en pulmón, testículo y riñón, mientras que ZIP14 lo hace en hígado, corazón y páncreas. Sus niveles proteicos en el cerebro son mucho menores que en otros tejidos (Jenkitkasemwong et al., 2012).

ligandos de bajo peso molecular, empleando simulaciones computacionales. Ellos estimaron que la gran mayoría del Mn^{2+} no unido a proteínas existe como ión libre (60%), mientras que el resto formaría complejos con bicarbonato (HCO_3 , 24%), citrato (10%) y otros solutos de bajo peso molecular como fosfato y oxalato (5%).

El transporte de Mn^{3+} ocurre mediante su unión a Tf (Cuadro 2) y se encuentra en estado libre en una muy baja proporción. Una vez en el SNC, es utilizado por las células endoteliales que forman los capilares de la BHE o enviado a las neuronas, los oligodendrocitos y los astrocitos para uso y almacenamiento (Takeda, 2003).

En presencia de altos niveles del metal, la entrada tendría lugar por el plexo coroideo como Mn^{2+} libre. Si bien esta captación es rápida, es poco probable que este sitio sea el primario para el flujo de Mn al cerebro y el rol exacto de esta vía de entrada sigue constituyendo una incógnita (Rabin et al., 1993).

2. Manganismo

2.1 Intoxicación por Mn en humanos

La exposición crónica a altos niveles de Mn resulta en una enfermedad denominada manganismo, que se encuentra asociada a un daño irreversible al SNC y a alteraciones psicológicas y neurológicas prominentes (Aschner, 2000).

Los signos de la intoxicación por Mn fueron reportados por primera vez por John Couper en el año 1837 en su trabajo *“On the effects of black oxide of manganese when inhaled in the*

Cuadro 2

Transporte de Mn^{3+}

Transferrina (Tf)

Las células endoteliales de los capilares del cerebro expresan receptores de Tf tipo 1 (TfR1) en su cara luminal y el Mn^{3+} unido al transportador ingresa a las mismas por endocitosis mediada por receptor formando vesículas de clatrina. Una vez en el medio intracelular, el endosoma se acidifica, el Mn es liberado del complejo y la Tf unida al receptor regresa a la superficie luminal. En el caso del Fe^{3+} , que emplea este mismo mecanismo de transporte, se sabe que es reducido por las proteínas Steap dentro de los endosomas a Fe^{2+} , transportado fuera de dichas vesículas mediante DMT1 y llevado hacia la mitocondria. El Mn es capaz también de unirse a DMT1, posee propiedades similares al Fe, y si bien podría seguir una ruta parecida, hasta donde conocemos esto no se ha demostrado (Gunter et al., 2013).

lungs". En este trabajo, el autor describió las condiciones laborales y los efectos tóxicos del metal sobre los trabajadores empleados en la molienda de óxido de Mn utilizado para la fabricación de polvo de blanqueo.

"En la química Charles Tennant and Co., un número considerable de hombres se ocupa de la molienda de óxido negro de Mn para ser utilizado en la fabricación de polvo de blanqueo. La superficie de sus cuerpos está, por supuesto, constantemente cubierta con el Mn; el aire que respiran está cargado con polvo fino, y se encuentran siempre expuestos, por negligencia en las condiciones de limpieza, a consumir Mn junto con su comida".

Couper, 1837

Los síntomas iniciales asociados al manganismo son de naturaleza

psiquiátrica y se definen clínicamente como *locura mangánica*. Estos son similares a los que presentan los esquizofrénicos, incluyendo comportamiento compulsivo o violento, cambios de humor, irritabilidad, déficits intelectuales y alucinaciones. Además se ve afectada la coordinación motora fina, que se evidencia por dificultades en la escritura (Aschner, 2000; Roth, 2009; Guilarte, 2010).

Las manifestaciones neurológicas usualmente comienzan en un corto período (1 o 2 meses luego de los primeros síntomas) e incluyen anorexia, debilidad, comportamiento psicótico severo, bradiquinesia progresiva, distonia y dificultades en la marcha. Se ve afectada la expresión facial y se observa dificultad en el habla. Los pacientes suelen hablar lento, con menos claridad y desarrollar tartamudez, mientras que su voz se vuelve monótona y de muy bajo volumen. En estadios avanzados, los enfermos quedan incapacitados, con rigidez en las extremidades, temblores, "marcha de gallo" y problemas en el balance al caminar, salivación y sudoración excesiva. El cuadro clínico se asemeja al de otros desórdenes neurodegenerativos que son descriptos como disfunciones motoras extrapiramidales, entre ellos, la enfermedad de Parkinson (EP). Si bien la mayor parte de los síntomas son similares en ambas enfermedades, la toxicidad del Mn lleva a temblores más leves, los pacientes pueden mantenerse en una postura más erguida y no responden al tratamiento con L-DOPA. Por otro lado, los pacientes que

“La pérdida de fuerza es más evidente en las extremidades inferiores, las cuales se ven afectadas de manera tan considerable que el paciente se tambalea y tiende a correr por la sala cuando intenta caminar. Los brazos se encuentran debilitados, aunque de manera leve. El paciente se queja de que no puede hacerse oír a una distancia moderada, como en otro tiempo, y la incapacidad parece depender, no de todos los desperfectos de la articulación, sino de la debilidad de la voz. El intelecto y los sentidos externos están intactos, pero hay una evidente expresión de vacío en el rostro, que proviene aparentemente del estado paralizado de los músculos de la cara. Por la misma causa, la saliva tiende a escapar de la boca especialmente durante el habla. No hay temblor en ninguna parte del cuerpo”.

Couper, 1837

padecen la EP no presentan la “marcha de gallo” ni pérdida en el equilibrio, que son típicos del manganismo (Aschner, 2000; Roth, 2009; Guilarte, 2010).

Existen sólo dos estudios que evaluaron los efectos del cese en la exposición a Mn en pacientes con efectos neurotóxicos tempranos. El primero de ellos, llevado a cabo por Roels et al. (1999), demostró que, superado un cierto nivel del metal en el aire, la neurotoxicidad alcanza un punto de no retorno y no es posible la reversión de los

síntomas. Por otra parte, en el trabajo de Bouchard et al. (2007) se realizó la evaluación luego de un tiempo mayor a partir del cese de la exposición al Mn y se encontraron déficits persistentes para ciertas funciones neuromotoras, flexibilidad cognitiva y cambios en el humor, mientras que otros síntomas pudieron revertirse.

La forma más documentada de sobreexposición a Mn es la que se da en ámbitos laborales, especialmente en relación con la fundición de aleaciones de Mn y Fe, las soldaduras, la minería, el ensamblaje de baterías y la manufactura de vidrio y cerámicas. La enfermedad puede desencadenarse también como un proceso secundario a otra afección en la salud. Las deficiencias en la excreción por la vía biliar debidas a cirrosis u otros tipos de daño hepático, llevan a un aumento del Mn en el organismo. Se ha descrito también intoxicación con Mn en individuos que recibieron alimentación intravenosa prolongada, existiendo un riesgo mayor en poblaciones con la BHE comprometida o inmadura o con vías excretorias mal desarrolladas. Además, se han reportado casos en los cuales consumidores de efedrina (una droga de abuso) presentan, en un corto lapso, síntomas que serían

producto de una intoxicación con Mn. Esto ocurre porque la droga puede encontrarse contaminada con permanganato de potasio, un oxidante utilizado durante su preparación (Burton y Guilarte, 2009).

El uso de tricarbonilo metilciclopentadienilo de manganeso (MMT) como un agente antidetonante en las gasolinas, ha generado preocupación por la creciente exposición de la población a Mn. El aumento en los niveles ambientales de Mn producto del uso de MMT y de procesos industriales, resulta sumamente alarmante dado que podría llevar aparejada una mayor prevalencia de parkinsonismos y otros desórdenes en el movimiento (Burton y Guilarte, 2009). Si bien los niveles ambientales no tienen la envergadura de los que se encuentran en las minas, existe una vacancia en el conocimiento en lo que respecta a las diferencias individuales que hacen que, ante los mismos niveles de exposición, ciertos individuos resulten afectados rápidamente, mientras que otros nunca presentan síntomas. Rodier (1955) consideró que estas diferencias podrían estar relacionadas principalmente a la edad, el *clearance* del Mn en el organismo, la vía de exposición y demás factores concernientes al individuo. Entre los pacientes que examinó, un porcentaje mostró síntomas luego de 10 años de exposición (**Fig. 3**). Esto es particularmente relevante desde el punto de vista de la salud pública, donde poblaciones grandes y diversas se encuentran expuestas a bajos niveles del metal. En estos casos, es difícil establecer la conexión entre exposición y efectos (Newland, 1999).

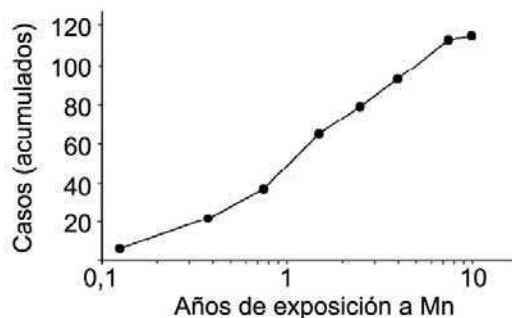


Figura 3. Tiempo de aparición de los síntomas a partir del comienzo de la exposición a Mn. Se muestra, en años, el tiempo que demoró en aparecer la enfermedad en 115 mineros empleados en minas de Mn en Marruecos. El tiempo se encuentra expresado en escala logarítmica. Los datos provienen del trabajo de Rodier (1955) y la figura está adaptada del análisis realizado por Newland (1999). En las minas en las que Rodier describió 150 casos de manganismo, había alrededor de 4.000 trabajadores. El 90% de los enfermos se dedicaba a la perforación de hoyos con taladros mecánicos para realizar explosiones en el interior de la mina.

La concentración de Mn en el ambiente es baja en comparación con las cantidades ingeridas en la dieta. No obstante, la absorción y transporte a varios órganos blanco sería relativamente mayor por inhalación que por ingestión. Si bien no existen estudios de farmacocinética que comparen las rutas de exposición, se ha demostrado que los niveles de Mn se encuentran bien regulados cuando se incorpora por la ingesta. Esto condice con el hecho de que los reportes de intoxicación por dicha vía sean escasos. Sin embargo, al ser inhalado, el metal entra al torrente sanguíneo y alcanza el cerebro antes de ser procesado en el hígado (Organización Mundial de la Salud, 2000). Dorman et al. (2002) demostraron que, además de la deposición pulmonar del metal y el subsecuente direccionamiento al cerebro, el Mn inhalable es capaz de transportarse desde las neuronas olfatorias al bulbo y al tubérculo olfatorio, representando una vía directa de entrada del metal al SNC.

El trabajo realizado por Dorman et al. (2006), demostraron que la exposición sub-crónica de monos Rhesus a 1,5 mg/ m³ de sulfato de Mn (MnSO₄) inhalable generaba un aumento mayor a 3- 5 veces en la concentración del metal en el *globus pallidus*, el putamen y el caudado con respecto a los animales control (**Fig. 4**).

	Concentración de MnSO ₄ nominal (mg Mn/m ³)			
	Aire	0,06	0,3	1,5
Tejidos olfatorios				
Epitelio olfatorio ^a	0.42 ± 0.01	1.22 ± 0.15*	2.96 ± 0.46*	7.10 ± 2.01*
Bulbo olfatorio	0.31 ± 0.01	0.77 ± 0.04*	1.36 ± 0.15*	2.40 ± 0.18*
Tracto olfatorio	0.30 ± 0.06	0.43 ± 0.02	0.61 ± 0.05*	1.12 ± 0.08*
Corteza olfatoria	0.19 ± 0.004	0.27 ± 0.02*	0.31 ± 0.01*	0.42 ± 0.01*
Cerebro				
<i>Globus pallidus</i> ^a	0.48 ± 0.04	0.80 ± 0.04*	1.28 ± 0.15*	2.94 ± 0.23*
Putamen	0.36 ± 0.01	0.58 ± 0.04*	0.75 ± 0.05*	1.81 ± 0.14*
Caudado	0.34 ± 0.02	0.47 ± 0.04	0.69 ± 0.03*	1.72 ± 0.10*
Materia blanca	0.17 ± 0.01	0.25 ± 0.01*	0.39 ± 0.04*	0.87 ± 0.08*
Corteza frontal	0.25 ± 0.03	0.29 ± 0.02	0.29 ± 0.01	0.47 ± 0.02*
Cerebelo ^a	0.44 ± 0.01	0.62 ± 0.02*	0.70 ± 0.04*	1.10 ± 0.11*
Hipófisis	0.84 ± 0.12	1.53 ± 0.25	2.43 ± 0.13*	6.19 ± 0.61*
Nervio trigémino	0.17 ± 0.05	0.17 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.42 ± 0.08*
Órganos				
Femur	0.13 ± 0.02	0.11 ± 0.01	0.13 ± 0.03	0.20 ± 0.03
Corazón	0.16 ± 0.03	0.33 ± 0.03*	0.49 ± 0.03*	0.62 ± 0.05*
Riñón	1.14 ± 0.12	1.43 ± 0.05	1.86 ± 0.14*	2.61 ± 0.30*
Hígado	2.49 ± 0.09	2.91 ± 0.18	3.17 ± 0.20	3.52 ± 0.45*
Pulmón	0.15 ± 0.03	0.18 ± 0.01	0.25 ± 0.02*	0.33 ± 0.04*
Pancreas	1.59 ± 0.11	1.72 ± 0.09	2.34 ± 0.11*	2.95 ± 0.24*
Músculo esquelético ^a	0.15 ± 0.03	0.12 ± 0.03	0.18 ± 0.02	0.58 ± 0.19*
Hueso parietal ^a	0.08 ± 0.04	0.05 ± 0.02	0.13 ± 0.06	0.25 ± 0.04*
Testículos	0.26 ± 0.03	0.35 ± 0.03	0.40 ± 0.05	0.39 ± 0.07
Fluidos				
Bilis ^a	0.89 ± 0.22	1.65 ± 0.31	3.78 ± 0.34*	7.60 ± 1.68*
Sangre	0.010 ± 0.001	0.015 ± 0.002	0.022 ± 0.003*	0.026 ± 0.003*
Orina ^a	0.000 ± 0.000	0.001 ± 0.000	0.005 ± 0.003*	0.005 ± 0.001*
Tamaño del grupo (n)	6	6	4	4

^a Análisis de datos llevado a cabo realizando una transformación ln

*p < 0,05 respecto al control

Figura 4. Acumulación de Mn en distintos tejidos, órganos y fluidos. Los monos Rhesus fueron expuestos a distintas concentraciones de MnSO₄ inhalable durante 65 días. Luego, se midió la masa de Mn (µg/ g de peso húmedo) en tejidos olfatorios, áreas del cerebro, órganos y fluidos. Adaptado de Dorman et al. (2006).

2.2 Toxicidad del Mn en el SNC

La exposición crónica a Mn en humanos conduce a una atrofia de los ganglios basales. En particular, se ven afectados el *globus pallidus*, el núcleo caudado, el putamen y, en algunos casos, la *substantia nigra*. Comúnmente, en autopsias de pacientes, se puede observar degeneración neuronal bilateral en el *globus pallidus*, en conjunto con una marcada disminución de las fibras mielinizadas y proliferación de astrocitos (Normandin y Hazell, 2002). En ensayos realizados en roedores, se ha encontrado que el *striatum* presenta peroxidación lipídica, disminución en los niveles de Ca²⁺ y dopamina, excitotoxicidad, apoptosis neuronal y activación de

células gliales (Brouillet et al., 1993; Liu et al., 2006; Avila et al., 2008). Además, en nuestro laboratorio, hemos demostrado, en un modelo de intoxicación aguda, que el Mn genera contracción y pérdida celular en el *striatum* de rata, en conjunto con condensación de la cromatina y un desequilibrio en los niveles de las proteínas de fusión y fisión mitocondrial (Alaimo et al., 2014).

La corteza cerebral se ha propuesto también como un blanco de la toxicidad del metal (Guilarte et al., 2006; Erikson et al., 2007; Guilarte, 2013).

Un gran número de trabajos se han dedicado a descifrar los mecanismos mediante los cuales el Mn afecta la función motora de modo similar a lo observado en la EP idiopática. Sin embargo, dado que existen diferencias en la sintomatología, así como también una falta de respuesta a L- DOPA (empleada para el tratamiento de la EP), se cree que el manganismo podría afectar vías neuronales diferentes y/o adicionales. En el caso de la *substantia nigra*, aunque podría asumirse que la oxidación de dopamina debida al estrés oxidativo generado por el Mn conduciría a una vulnerabilidad aumentada de las neuronas, hasta donde se conoce, las mismas son relativamente inmunes, al menos inicialmente, a los efectos deletéreos del metal. Esto se evidencia por el hecho de que la captación de fluorodopa en las terminales nerviosas dopaminérgicas del *striatum* parece ser normal o sólo ligeramente menor en individuos con Manganismo (Roth, 2009). Estas observaciones no conducen al concepto de que la intoxicación con Mn no llevaría a síntomas asociados a la EP ya que también se han observado niveles de fluorodopa anormales en pacientes con Manganismo. Esto indica que las lesiones en los ganglios basales pueden ser más extensivas que lo que se conoce actualmente. Dado que el número de estudios que han evaluado la toxicidad en un contexto de exposición crónica es limitado, el daño sobre las sinapsis dopaminérgicas es aún materia de debate (Huang, 2007; Burton y Guilarte, 2009).

Una característica importante de la neurotoxicidad del Mn es la aparición de astrocitos Alzheimer tipo II en los ganglios basales caracterizados por poseer núcleos agrandados y pálidos con marginación de la cromatina y nucléolos prominentes (Normandin y Hazell, 2002). Este tipo de astrocitos reactivos ha sido descrito principalmente en la encefalopatía hepática, una enfermedad del SNC

causada por el mal funcionamiento del hígado (Norenberg, 1987) que resulta en niveles aumentados de Mn en sangre y en cerebro (Krieger et al., 1995). Dadas las similitudes observadas entre el manganismo y la encefalopatía hepática se ha propuesto que el Mn podría estar asociado con el daño al SNC observado como consecuencia de la falla hepática y que, por otra parte, la presencia de astrocitosis de Alzheimer tipo II en el manganismo, tendría un rol importante en la patofisiología de la toxicidad del Mn (Normandin y Hazell, 2002).

2.3 Localización subcelular del Mn

Una vez que ingresa a la célula, el Mn^{2+} es rápidamente secuestrado por la mitocondria a través del uniporter de Ca^{2+} y permanece mayormente unido a proteínas de la matriz o de la membrana mitocondrial. La salida del metal de esta organela ocurre a través de un sistema lento, independiente de Na^+ (Gavin et al., 1999). Es decir, que el Mn^{2+} emplea un mecanismo rápido de entrada a la mitocondria y uno lento de salida, por lo cual tiende a acumularse en esta organela. Esta acumulación sumada al hecho de que el Mn puede inhibir la salida de Ca^{2+} , conduce al daño mitocondrial (Gavin et al., 1999; Martinez-Finley et al., 2013). En la mayoría de los tipos celulares, la mitocondria, y en particular la cadena de transporte de electrones, constituyen la fuente principal de ROS. Allí, la primer especie formada es el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) que es convertido a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por la enzima superóxido dismutasa (Lambert y Brand, 2009). En presencia de Mn u otros metales de transición, el H_2O_2 puede ser convertido a radical hidroxilo (OH^{\cdot}), una especie altamente reactiva (Goldstein et al., 1993; Watts et al., 2005).

Si bien la mayoría de los estudios realizados describen la acumulación del Mn en las mitocondrias (Gunter et al., 2009) y la generación de un daño dirigido sobre esta organela (Malecki, 2001; Rao y Norenberg, 2004; Tamm et al., 2008; Yin et al., 2008; Prabhakaran et al., 2009; Jiang et al., 2014), los aportes realizados por Suzuki et al. (1983) señalan a los lisosomas como organelas importantes en el metabolismo y la toxicidad del Mn. Estos autores estudiaron la distribución intracelular del metal y

los cambios ultraestructurales en las células del cerebro de ratón luego de una inyección intraperitoneal de Mn. Por centrifugación diferencial en un gradiente de Percoll, encontraron que el metal se encontraba distribuido en fracciones con actividad de fosfatasa ácida y de monoamino oxidasa; es decir, en fracciones que corresponden a lisosomas y a mitocondrias, respectivamente. La fracción lisosomal incorporó mayores niveles de Mn que la mitocondrial, con respecto a los controles no inyectados. Además, observaron por microscopía electrónica la formación de cuerpos electron- densos en los cortes de cerebro de animales tratados, que resultaron ser lisosomas secundarios. Así, la incorporación excesiva de Mn en los lisosomas sugiere que esta organela juega un rol importante en su metabolismo y en el desarrollo de su toxicidad.

3. Glia

3.1 Astrocitos en la fisiología del SNC

Hasta hace relativamente poco tiempo, se consideraba que los astrocitos eran simplemente células gliales de soporte del tejido nervioso. Por ello, no se tenía en cuenta la posibilidad de que alteraciones en este tipo celular contribuyeran a los síntomas clínicos y mecanismos de muerte involucrados en las patologías del SNC. Sin embargo, en los últimos años, se ha demostrado que los astrocitos son responsables de una variedad de funciones complejas y esenciales: contribuyen a la formación de sinapsis durante el desarrollo, colaboran con el metabolismo energético en el SNC, regulan localmente el flujo sanguíneo, contribuyen con el mantenimiento de las propiedades de la BHE, mantienen la concentración de iones, el pH y la homeostasis de neurotransmisores en el espacio sináptico y juegan roles directos en la sinapsis por medio de la regulación de moléculas activas como purinas, glutamato, GABA y D- serina así como por la liberación de factores de crecimiento (Sofroniew y Vinters, 2010; Sidoryk-Wegrzynowicz et al., 2012).

El metabolismo de los astrocitos, incluyendo la homeostasis de aminoácidos y las vías de generación de energía, se encuentra estrechamente asociado al de las neuronas. La enzima glutamina sintetasa se encuentra exclusivamente en los

astrocitos, por lo que estas células juegan un rol clave en la síntesis de glutamina y de los neurotransmisores ácido glutámico y ácido γ -aminobutírico (Norenberg y Martinez-Hernandez, 1979). Por último, los astrocitos constituyen el sitio principal de almacenamiento de gránulos de glucógeno en el SNC y por ello podrían mantener la actividad neuronal en períodos de gran actividad sináptica o de hipoglucemia (Sofroniew y Vinters, 2010).

Los astrocitos poseen conexiones tanto con los vasos sanguíneos como con las neuronas, por lo que pueden regular el flujo sanguíneo local en respuesta a la actividad neuronal liberando mediadores moleculares como prostaglandinas, óxido nítrico y ácido araquidónico. Los procesos astrocíticos envuelven esencialmente a todas las sinapsis y cumplen funciones en el mantenimiento de fluidos, iones, pH y homeostasis de neurotransmisores en el espacio sináptico. Además, estas células son capaces de modular las sinapsis a través de la liberación de glutamato, purinas (ATP y adenosina), GABA y D- serina, lo que dio lugar a la hipótesis de la “sinapsis tripartita”, que propone que las células astrocíticas poseen un rol directo, interactivo y esencial junto con las neuronas pre- y post- sinápticas durante el proceso sináptico (Sofroniew y Vinters, 2010).

3.2 Rol de los astrocitos en las patologías del SNC

Los astrocitos responden a los insultos en el SNC mediante un proceso denominado astrogliosis reactiva, que involucra cambios morfológicos y funcionales, y en los casos severos, la formación de una cicatriz glial. A pesar de representar una respuesta ubicua y ampliamente reportada en condiciones patológicas, las funciones y efectos desencadenados por la astrogliosis se encuentran poco comprendidos (Sofroniew, 2009).

La astrogliosis altera la función astrocítica y puede impactar positiva o negativamente sobre las células circundantes. Por este motivo, se propone que no se trata de procesos de “todo o nada”, sino de un continuo, con cambios progresivos en la expresión génica y en las funciones celulares. Las evidencias sugieren que los

astrocitos reactivos pueden proteger al SNC por mecanismos diversos, que incluyen: la captación de glutamato potencialmente tóxico, la defensa frente al estrés oxidativo mediante la producción de GSH, la protección a través de la liberación de adenosina, la detoxificación de NH_4^+ , la degradación de péptidos del β - amiloide, la colaboración con la reparación de la BHE y la estabilización del fluido extracelular, entre otros (Sofroniew, 2009).

Por otra parte, la astrogliosis reactiva puede contribuir o ser la fuente primaria del daño en el SNC, ya sea por medio de la pérdida de funciones esenciales llevadas a cabo por los astrocitos, o por la generación de productos pro- inflamatorios que resultan tóxicos para otros tipos celulares, como citoquinas y especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS)(Sofroniew, 2009; Filipov y Dodd, 2012).

Los astrocitos poseen transportadores de alta capacidad para el Mn. Por este motivo, pueden alcanzar concentraciones de este metal 50- 60 veces superiores a las de las neuronas (Aschner et al., 1992). Además, el 80% del Mn del cerebro, se encuentra asociado con la glutamina sintetasa, una enzima específica de astrocitos (Wedler y Denman, 1984). Por lo tanto, se propone que este tipo celular es un blanco temprano en la toxicidad del metal.

En astrocitos en cultivo, el Mn induce un estado de estrés oxidativo, colapso del potencial de membrana mitocondrial, activación de caspasas y muerte celular apoptótica (Milatovic et al., 2007; Gonzalez et al., 2008).

Debido a la relevancia de los astrocitos en el funcionamiento del sistema nervioso, el daño sobre este tipo celular podría conducir a los efectos deletéreos sobre la función neuronal observados en los pacientes que sufren manganismo. Consecuentemente, el estudio de los mecanismos de toxicidad que conducen a la muerte astrocítica, es relevante por cuanto permite conocer nuevos blancos moleculares sobre los cuales intervenir, a efectos de prevenir la neurodegeneración observada en el manganismo y otras patologías del SNC.

4. Apoptosis

4.1 Generalidades

Durante el desarrollo y la vida adulta, un enorme número de células muere en los tejidos tanto de vertebrados como de invertebrados. En algunos casos, esto puede llevar a la eliminación de regiones completas u órganos, mientras que en otros, la muerte colabora con el desarrollo y la homeostasis de los tejidos (Clarke y Clarke, 1996).

La muerte celular fue observada y reportada por primera vez en 1842 por Carl Vogt, aunque en ese momento aún no era identificada como tal. Esta fue reconocida casi en paralelo con la comprensión de la vida celular, a mediados del siglo XIX. Fue entonces que los histólogos describieron por primera vez células en proceso de muerte con morfologías que hoy se conoce que corresponden a la apoptosis. Sin embargo, el concepto de que la muerte se encontraba bajo algún tipo de regulación data de mediados del siglo XX y actualmente se cuenta con interesantes reseñas históricas acerca de estos descubrimientos (Clarke y Clarke, 1996; Zakeri y Lockshin, 2008).

La palabra apoptosis proviene del griego antiguo (*apo*: de, desde separar, *ptosis*: caer) y es empleada para describir la caída de los pétalos de las flores o de las hojas de los árboles. En el contexto de la biología celular, se acuñó para describir un tipo de muerte caracterizado por la formación de cuerpos apoptóticos que se separan de las células muriendo (Kerr et al., 1972). La muerte apoptótica implica una gran reestructuración de la célula que incluye tanto el núcleo como el citoplasma y finaliza con el desmantelamiento celular. Los cambios nucleares ocurren principalmente a nivel de la cromatina, mientras que en el citoplasma tienen lugar eventos cruciales que alteran la estructura y función de las organelas (Bottone et al., 2013).

En las últimas dos décadas, el número de publicaciones relacionadas con la apoptosis ha aumentado exponencialmente. Este creciente interés en el tema radica en que las alteraciones en esta vía de muerte se encuentran relacionadas a numerosas enfermedades, ya sea por sobre-activación de la misma (p. ej. en el SIDA,

en las enfermedades neurodegenerativas como la EP o la Enfermedad de Alzheimer, o por exposición a toxinas) o por inhibición (p. ej. en el cáncer o en las enfermedades autoinmunes) (Lawen, 2003).

4.2 Características morfológicas de la apoptosis

Durante la apoptosis, las células disminuyen su volumen y se redondean, perdiendo el contacto con sus vecinas. La plasticidad que este proceso requiere, está dada por una reorganización del citoesqueleto mediada por cambios conformacionales en los microfilamentos y microtúbulos. Debido a la disminución en el volumen celular, el citoplasma se vuelve más denso y las organelas se encuentran más comprimidas (Ziegler y Groscurth, 2004; Elmore, 2007; Bottone et al., 2013).

En el núcleo, la cromatina se condensa y se fragmenta. El clivaje internucleosomal del ADN genera fragmentos de 180 a 200 pares de bases de longitud. La condensación es inicialmente periférica y forma una estructura de anillo o medialuna alrededor de la membrana nuclear. El núcleo se condensa (picnosis) y en estadios avanzados se rompe, mientras que la célula conserva aún la membrana plasmática intacta (cariorraxis). Posteriormente, los fragmentos del núcleo son encapsulados en los cuerpos apoptóticos (Lawen, 2003; Ziegler y Groscurth, 2004).

Las mitocondrias se localizan en el citoplasma celular y poseen una estructura dinámica que sufre permanentemente procesos de fusión y fisión que se encuentran en perfecto equilibrio. Durante la apoptosis, se genera un desbalance en este fino equilibrio que induce un aumento en la fisión. A la vez, la localización de estas organelas cambia adoptando una posición perinuclear (Youle y Karbowski, 2005; Bottone et al., 2013).

El retículo endoplasmático (RE) y el aparato de Golgi son también organelas dinámicas y las membranas de sus cisternas son capaces de fusionarse y fisionarse homotípicamente en condiciones fisiológicas. Durante la apoptosis, el RE se agranda y el aparato de Golgi se fragmenta. Además, se ha observado que tanto estas

organelas como la mitocondria se hinchan durante este proceso de muerte (Mukherjee et al., 2007; Pfeffer, 2010; Bottone et al., 2013).

La membrana plasmática se vuelve más activa y compleja y se genera un burbujeo (en inglés: *blebbing*), a la vez que las uniones célula-célula son eliminadas. En la medida que el desmantelamiento celular avanza, se pueden observar vesículas de distintos tamaños que encierran al contenido celular, los cuerpos apoptóticos. Estos contienen organelas estrechamente comprimidas, que pueden estar condensadas, pero se encuentran aparentemente intactas tanto química como estructuralmente. Entre las modificaciones que sufre la membrana plasmática, la exposición de la fosfatidilserina constituye una señal “*eat me*” que permite el reconocimiento de las células apoptóticas por parte de los macrófagos para su posterior fagocitosis. Dado que no hay liberación del contenido celular al exterior, este tipo de muerte ocurre generalmente sin inflamación (Kerr et al., 1972; Lawen, 2003).

En la **Fig. 5** se muestra un esquema que resume los cambios morfológicos mencionados y las fotografías obtenidas por microscopía de barrido que reflejan la diferencia entre una célula viable y una apoptótica a nivel de la membrana plasmática.

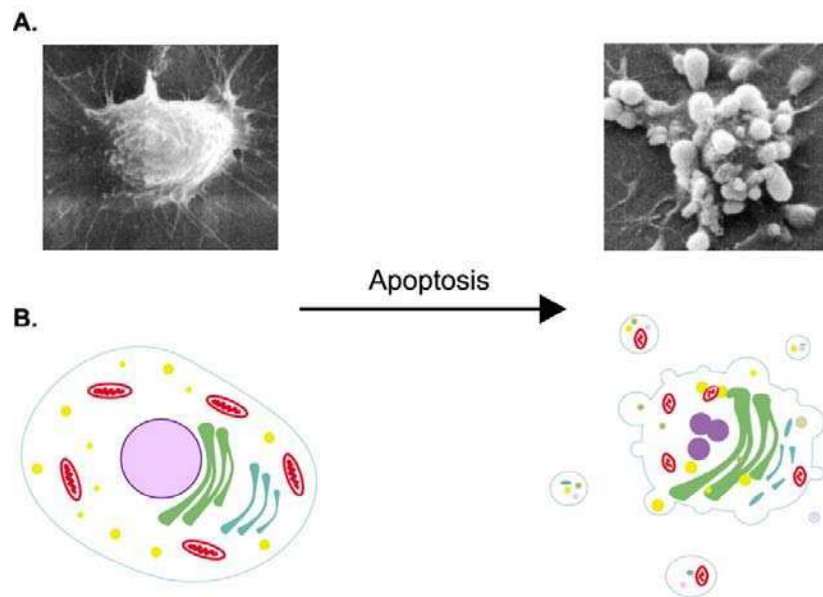


Figura 5. Morfología celular en la apoptosis. A. Se muestran imágenes obtenidas por microscopía de barrido de una célula normal (izquierda) y de otra muriendo por apoptosis (derecha). En esta última, las vesículas que rodean a la membrana plasmática

son los denominados cuerpos apoptóticos (Monack et al., 1997). **B.** El esquema representa los cambios celulares luego del disparo de la muerte celular apoptótica: Fragmentación de la cromatina, aumento de la fisión mitocondrial y del aparato de Golgi, dilatación del RE, burbujeo de la membrana y formación de cuerpos apoptóticos.

4.3 Características bioquímicas de la apoptosis

Los procesos apoptóticos están regulados por proteínas que cumplen roles específicos en la señalización de los distintos pasos de la muerte celular. La activación de proteínas pro- apoptóticas conduce al desmantelamiento de la célula, y por lo tanto, este proceso se encuentra controlado a distintos niveles. En primer lugar, las mismas pueden ser sintetizadas en forma de zimógenos o ser mantenidas en localizaciones subcelulares donde se encuentran inactivas. Además, los miembros anti- apoptóticos son capaces de contrarrestar sus efectos deletéreos y prevenir la muerte celular. Ante un estímulo de muerte, se genera una activación coordinada de cascadas de señales que ejecutan el desmantelamiento celular.

4.3.1 Caspasas

La mayor parte de los cambios morfológicos que se observan en las células apoptóticas son causados por una familia de cisteína proteasas, las caspasas. Estas enzimas son centrales para el desencadenamiento de este tipo de muerte celular y se encuentran muy conservadas evolutivamente. Todas las caspasas conocidas poseen una cisteína en su sitio activo y clivan sustratos luego de un residuo aspartato (cisteína aspartato proteasas). La especificidad de cada caspasa se encuentra determinada por los cuatro residuos que se encuentran en posición N-terminal al sitio de corte. Si bien en la mayor parte de los casos el clivaje inactiva a la proteína blanco, en otros puede eliminar un dominio o una subunidad reguladora, llevando a la activación de la misma (Hengartner, 2000).

Se conocen 14 caspasas en mamíferos, de las cuales, 11 se encuentran presentes en humanos y participan en la apoptosis o bien en la inflamación. Las caspasas

apoptóticas se clasifican generalmente como: iniciadoras (caspasa-2, -8, -9, -10 y -12) y ejecutoras (caspasa-3, -6 y -7) (Breckenridge et al., 2003; Riedl y Shi, 2004).

Estas proteínas se sintetizan como zimógenos inactivos compuestos por tres dominios: un pro- dominio N- terminal que es removido durante la activación, un dominio largo p20 y un dominio corto p10. Los dominios p20 y p10 se separan por proteólisis y se conservan en la enzima madura. La enzima activa consiste en un heterotetrámero compuesto por dos heterodímeros p20/p10, cada uno con un sitio activo (**Fig. 6**) (Hengartner, 2000; Crawford y Wells, 2011).

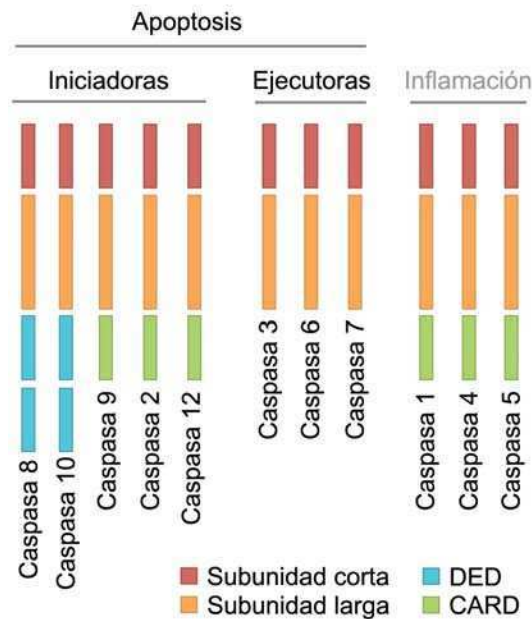


Figura 6. Clasificación de las caspasas. Las caspasas se sintetizan como zimógenos inactivos compuestos por un prodominio, una subunidad larga p20 y una subunidad corta p10. Las caspasas apoptóticas se clasifican como iniciadoras o ejecutoras. Figura adaptada de McIlwain et al. (2013), con modificaciones.

Las caspasas iniciadoras poseen prodominios largos portadores de dominios de reclutamiento de caspasas (CARDS) o dominios efectores de muerte (DED) que les permiten unirse a complejos de andamiaje que se forman en respuesta a distintos estímulos apoptóticos.

Las caspasas efectoras, por el contrario, poseen pro- dominios cortos y requieren, para su activación, del procesamiento por parte de las caspasas iniciadoras. Una vez

activas, clivan un amplio espectro de blancos celulares conduciendo a la muerte celular.

El modelo de proximidad inducida sugiere que la concentración local elevada del zimógeno permite el procesamiento homotípico de caspasas de baja actividad intrínseca. En este sentido, las pro- caspasas iniciadoras podrían auto- activarse en los complejos de andamiaje, y conducir a la activación de las cascadas de señales apoptóticas.

4.3.2. Familia Bcl-2

Los miembros de la familia Bcl-2 son proteínas multidominio que comparten una estructura globular similar con dominios de homología a Bcl-2 (BH). Estos regulan la integridad de la membrana mitocondrial externa mediante interacciones complejas, interviniendo en la vía mitocondrial de muerte apoptótica. Asimismo, en los últimos años han surgido trabajos que describen un rol para los miembros de la familia Bcl-2 en la permeabilización de la membrana lisosomal (PML). Según su rol en dichos procesos, pueden ser clasificados como pro- apoptóticos o anti- apoptóticos (Chipuk et al., 2010; Johansson et al., 2010; Oberle et al., 2010; Llambi et al., 2011).

Las proteínas anti- apoptóticas están representadas por Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, Mcl-1 y Bfl-1/A1 y se caracterizan por poseer cuatro dominios de homología a Bcl-2 (BH1-4) (**Fig. 7A**). Se encuentran generalmente en la membrana mitocondrial externa (MME) y preservan la integridad de la misma inhibiendo directamente a las proteínas pro- apoptóticas de la familia (Chipuk et al., 2010; Llambi et al., 2011).

Las proteínas pro- apoptóticas se dividen en efectoras, con dominios BH1-4, y *BH3-only*, que contienen únicamente un dominio BH3 (**Fig. 7A**). Luego de su activación, las efectoras Bak y Bax sufren un cambio conformacional, se insertan en la membrana mitocondrial externa (MME), se oligomerizan y forman poros induciendo la permeabilización de la MME (MOMP). Se han planteado dos modelos mediante los cuales las proteínas *BH3-only*, podrían promover la apoptosis. El

modelo del activador indirecto propone que Bax y Bak se encuentran unidos a las proteínas anti- apoptóticas de la familia Bcl-2 en un estado constitutivamente activo. En este contexto, la competencia con las proteínas de la familia BH3- *only* por la unión a las anti- apoptóticas, es suficiente para liberar Bax y Bak e inducir la MOMP. En el modelo del activador directo o desrepressor, Bax y Bak son activados por Bid y Bim y las proteínas anti- apoptoticas Bcl-2 previenen la apoptosis inhibiendo tanto a las proteínas efectoras como a los activadores directos. Un segundo grupo de proteínas BH3- *only*, los sensibilizadores, son capaces de neutralizar a las proteínas anti- apoptóticas favoreciendo así la formación del MOMP (Chipuk et al., 2010; Tait y Green, 2010; Llambi et al., 2011).

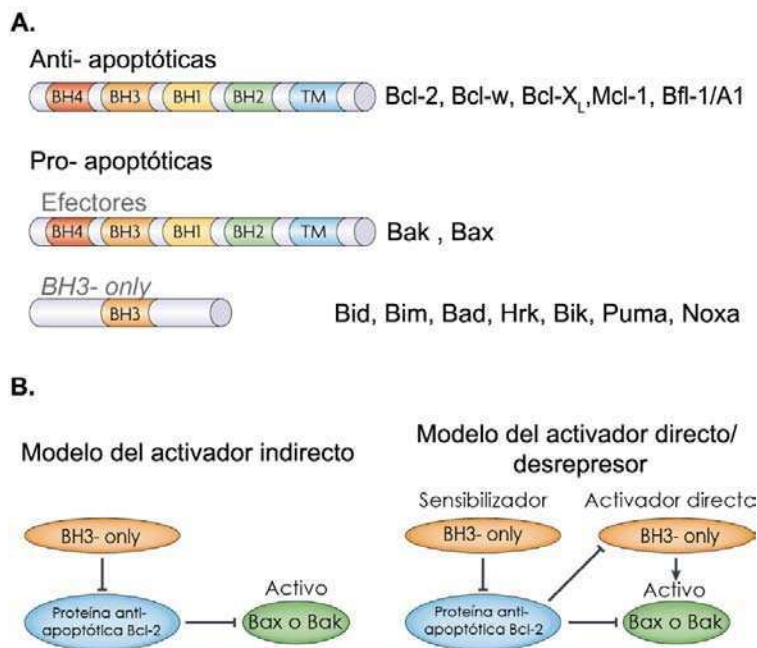


Figura 7. Familia Bcl-2. A. Se muestran representados los dominios de homología a Bcl-2 (BH1-4) en proteínas anti- apoptóticas, efectoras o BH3- *only*. B. Modelos de regulación de la MOMP por parte de los miembros de la familia Bcl-2. Adaptada de Tait y Green (2010), con modificaciones.

Las proteínas anti- apoptóticas previenen la formación del MOMP secuestrando a los activadores directos (Bid y Bim) o directamente a los efectoras (Bax y Bak) (Chipuk et al., 2010; Llambi et al., 2011).

Las interacciones entre el repertorio anti- apoptótico, los distintos tipos de proteínas *BH3-only* y las proteínas efectoras van a determinar la ocurrencia de la MOMP y consecuentemente la apoptosis (Chipuk et al., 2010; Llambi et al., 2011).

4.3.3 Vías de inducción de muerte apoptótica

En vertebrados, la apoptosis se activa típicamente a través de dos vías principales, denominadas intrínseca o mitocondrial y extrínseca o de receptores de muerte. Ambas vías convergen en la activación de las caspasas ejecutoras -3/-6/-7.

Vía extrínseca o de receptores de muerte

Los receptores de muerte son miembros de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF). Estos se caracterizan por poseer un dominio citoplasmático, el dominio de muerte, que juega un rol crucial en la transmisión de la señal de muerte desde la superficie celular a las vías de señalización intracelulares. Entre los miembros de esta familia se destacan Fas (APO-1/ CD-95), el receptor 1 de TNF (TNFR1) y los receptores 1 y 2 del ligando inductor de apoptosis relacionado a TNF (TRAIL-R1 y TRAIL R2 o DR4 y DR5) (Ashkenazi y Dixit, 1998; Aggarwal, 2003; Fulda y Debatin, 2006).

La vía extrínseca de la apoptosis es disparada por ligandos extracelulares, como FasL y TRAIL, que se unen al dominio de receptores de muerte conduciendo a la trimerización del receptor y la unión de la proteína adaptadora FADD (dominio de muerte asociado a Fas). El reclutamiento de las caspasas-8/ -10 al DED de FADD conduce a la formación del complejo de señalización inductor de muerte (DISC), compuesto por el receptor, la proteína adaptadora y las caspasas iniciadoras de la vía extrínseca. En este contexto, ocurre el clivaje de las mismas por el mecanismo de proximidad inducida y su consecuente activación. Una vez activadas, las caspasas iniciadoras clivan y activan a las caspasas efectoras transmitiendo la señal apoptótica (Fulda y Debatin, 2006; Riedl y Salvesen, 2007).

Vía intrínseca o mitocondrial

Ciertos estímulos de daño intracelulares generan cambios principalmente en los balances entre proteínas pro- y anti- apoptóticas de la familia Bcl-2 que resultan en la apertura del MOMP, pérdida del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) y liberación de dos grupos de proteínas pro- apoptóticas del espacio intermembrana mitocondrial al citosol. El primer grupo está integrado por el citocromo c, Smac/DIABLO y HtrA2/ Omi y conducen a la activación de la vía mitocondrial dependiente de caspasas. El citocromo c promueve un cambio conformacional en APAF- 1 que favorece su oligomerización (dependiente de ATP) para formar un complejo heptamérico con forma de rueda, que recluta a la caspasa- 9 y se denomina apoptosoma. Esta estructura sirve para el andamiaje, dimerización y activación de esta caspasa. Por otra parte, Smac/DIABLO y HtrA2/Omi promueven la apoptosis por medio de la inhibición de las proteínas inhibidoras de la apoptosis XIAP, cIAP1 y cIAP2. El segundo grupo de proteínas pro- apoptóticas liberadas de la mitocondria se compone de AIF, endonucleasa G y CAD y su liberación es un evento tardío que ocurre luego del punto de no retorno (Elmore, 2007; Tait y Green, 2010).

La señal de activación desde el receptor a la mitocondria se encuentra mediada por Bid, una proteína BH3 *only* que es blanco de la caspasa-8. Esta última cliva a Bid generando un fragmento activo tBid que es capaz de activar a Bax y Bak para inducir la MOMP y activar la vía apoptótica mitocondrial (Luo et al., 1998; Korsmeyer et al., 2000; Yin, 2000). Este mecanismo es particularmente relevante en las células tipo II, en las cuales la cantidad de caspasa-8 activa generada en el DISC es insuficiente para activar a la caspasa-3 y se requiere una amplificación mediada por la mitocondria (Scaffidi et al., 1998).

En la **Fig. 8** se esquematizan los procesos centrales que ejecutan la activación de las vías extrínseca e intrínseca, así como la interacción entre ambos mecanismos de muerte.

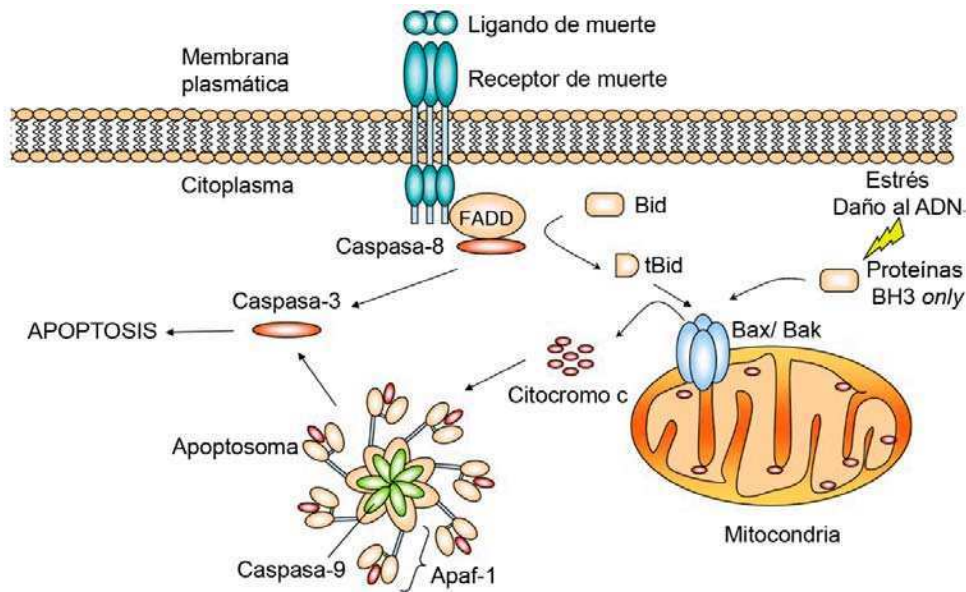


Figura 8. Principales vías de muerte celular apoptótica. Representación esquemática de la vía extrínseca (mediada por receptores de muerte) o intrínseca (iniciada por daño o estrés intracelular). La activación de la caspasa-8 en receptores de muerte puede conducir a la activación directa de la caspasa-3 (células tipo I) o bien a la amplificación de la señal por medio de la activación de la vía mitocondrial mediada por tBid (células tipo II). En la vía intrínseca, diversos estímulos activan a las proteínas BH3-only, que promueven el ensamblaje de oligómeros Bak/ Bax en la mitocondria y la MOMP. La liberación del citocromo c al citosol conduce al ensamblaje del apoptosoma y a la activación de las caspasas-9 y -3.

Otras vías apoptóticas

Si bien las vías de muerte apoptótica mediadas por el receptor o por la mitocondria han sido las más estudiadas, evidencias crecientes sugieren que otras organelas, incluyendo el RE, los lisosomas y el aparato de Golgi, representan sitios importantes para el sensado de daño celular y la integración de señales pro-apoptóticas. En este sentido, cada una de estas organelas posee sensores que detectan alteraciones específicas y son capaces de activar vías de transducción de señales que conducen a la muerte celular (Ferri y Kroemer, 2001).

Curiosamente, el daño específico sobre el RE, los lisosomas o el aparato de Golgi, conduce en la mayor parte de los casos a la MOMP y a la activación de caspasas, lo

que sugiere que estos últimos son mecanismos integradores centrales de las vías de muerte (Ferri y Kroemer, 2001).

5. Lisosomas

5.1 Historia

El compartimiento lisosomal representa el principal sitio intracelular para la degradación de una variedad de macromoléculas incluyendo proteínas, carbohidratos, ácidos nucleicos y lípidos (Saftig, 2006). Fue descrito por primera vez en el año 1955 por Christian de Duve et al. Este grupo estudió la localización de una variedad de enzimas empleando técnicas de fraccionamiento subcelular por centrifugación diferencial. En particular, demostró que la fosfatasa ácida (Appelmans et al., 1955), así como también la ribonucleasa, la desoxi-ribonucleasa, la β -glucuronidasa y la catepsina (de Duve et al., 1955) se detectaban en una fracción con propiedades de sedimentación intermedias entre las correspondientes a las mitocondrias y los microsomas. Además, estas enzimas se encontraban en un estado de “latencia” y solo se lograba medir su actividad si la muestra era sometida a congelado y descongelado o expuesta a un shock osmótico. Esto los llevó a concluir que dichas hidrolasas se ubicaban dentro de gránulos rodeados por una membrana. Por su naturaleza lítica, los denominaron lisosomas. Un año más tarde, colaborando con Alex Novikoff, el mismo grupo estudió por microscopía electrónica la fracción subcelular que correspondía a los lisosomas y encontró que las vacuolas que se observaban tenían una gran relación en cuanto a tamaño y estructura con los “cuerpos densos” que ya habían sido previamente observados en tejido hepático (Novikoff et al., 1956). Por sus descubrimientos respecto a la organización estructural y funcional de la célula, de Duve recibió el Premio Nobel de Fisiología o Medicina en 1974 en conjunto con Albert Claude y George E. Palade. En el discurso de aceptación del premio, Christian de Duve dijo “Todo lo que queríamos era saber algo sobre la localización de la enzima glucosa 6- fosfatasa, que pensábamos que podría aportar una posible pista sobre el mecanismo de acción, o falta de acción, de la insulina en las células del hígado”(de Duve, 1975).

5.2 Estructura y función

Los lisosomas son organelas ácidas ($\text{pH} \leq 5$), delimitadas por una membrana bilipídica simple con bajo contenido de colesterol y contienen más de 60 hidrolasas ácidas (Settembre et al., 2013). Los lisosomas y sus organelas asociadas (como melanosomas, gránulos líticos, compartimientos del complejo mayor de histocompatibilidad clase II y gránulos densos de plaquetas) están involucrados en varios procesos fisiológicos como la homeostasis del colesterol, la reparación de la membrana plasmática, el remodelado del hueso, la defensa contra patógenos, el sensado de nutrientes y la muerte celular. Estas funciones complejas hacen del lisosoma una organela central y dinámica y no solo el paso final de la vía endocítica como se pensaba originalmente (Saftig y Klumperman, 2009; Settembre et al., 2013).

La forma y el tamaño de los lisosomas dependen de su contenido y por lo tanto estos parámetros presentan gran variabilidad dependiendo del tipo y microambiente celular. Existe además diversidad en cuanto al número de lisosomas por célula, siendo esto función directa de las necesidades de degradación y del contexto. Los lisosomas se observan por microscopía electrónica como cuerpos electron densos esféricos, ovoides u ocasionalmente tubulares (**Fig. 9**) (Saftig, 2006). Su tamaño varía entre 0,1 – 1,2 μm (Kühnel, 2003) aunque se han observado tamaños de hasta varias micras en células con alta capacidad degradativa como macrófagos.

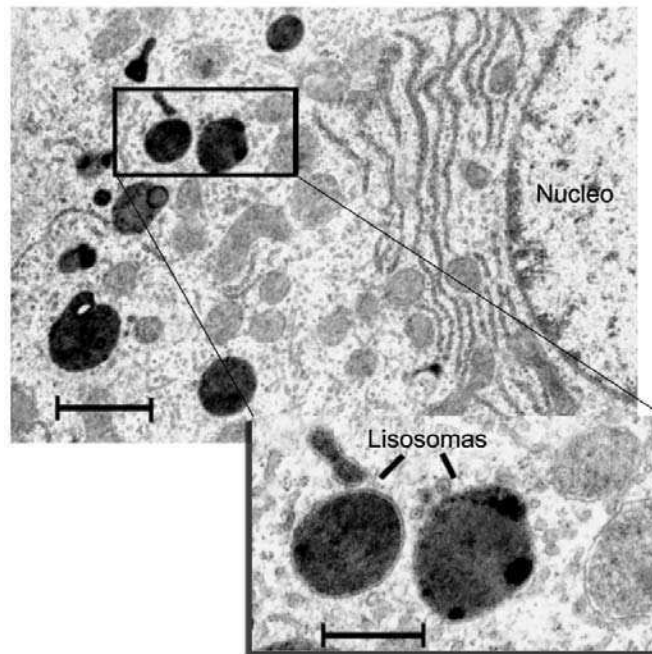


Figura 9. Microscopía electrónica de lisosomas. Los lisosomas aparecen como cuerpos densos citoplasmáticos. Puede observarse la membrana simple y la matriz electrón densa. Las barras representan 1 μm y 0,5 μm en el inset (Saftig, 2006).

El número y tamaño de los lisosomas puede aumentar dramáticamente en condiciones patológicas. Estas alteraciones ocurren como consecuencia de la acumulación de material no degradado debido a la inhibición de las enzimas lisosomales y almacenaje de sustratos no fisiológicos. Además, se ha observado un gran aumento del compartimento lisosomal en pacientes con defectos genéticos en enzimas lisosomales (Saftig, 2006). Existen alrededor de 50 patologías conocidas en conjunto como enfermedades de almacenamiento lisosomal (LSD) que se deben a un impedimento en el catabolismo lisosomal como consecuencia de defectos genéticos en enzimas hidrolíticas o sus proteínas activadoras, cofactores o proteínas de transporte (Mehta et al., 2006; Zhang et al., 2009).

Las proteínas esenciales para la función de los lisosomas comprenden dos grupos principales: las hidrolasas lisosomales solubles (también denominadas hidrolasas ácidas) y las proteínas integrales de membrana. Cada una de las hidrolasas ácidas conocidas tiene como blanco sustratos específicos para la degradación, y su acción colectiva es responsable de la capacidad catabólica total del lisosoma (Saftig y

Klumperman, 2009). Este grupo está compuesto por proteasas, lipasas, nucleasas, poli y oligosacaridasas, fosfatasa y enzimas hidrolíticas de esfingolípidos y glicosaminoglicanos que generalmente tienen actividad enzimática máxima a pH bajo (**Fig. 10**) (Karp, 2009).

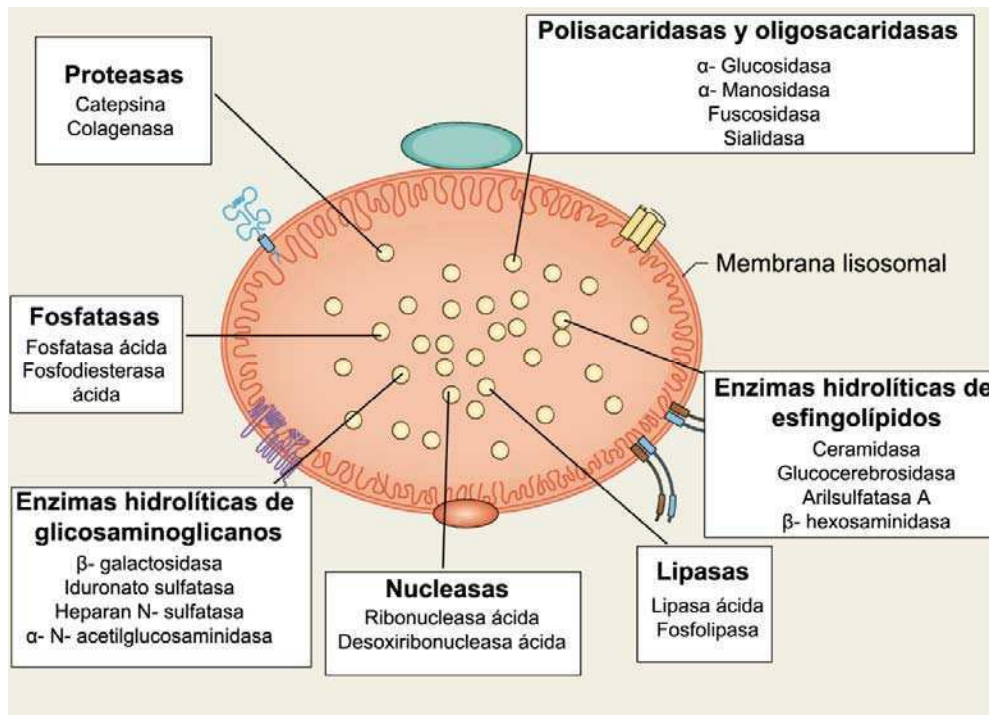


Figura 10. Hidrolasas solubles. Se ilustran los distintos tipos de hidrolasas ácidas presentes en el lumen lisosomal y se ejemplifican enzimas que corresponden a cada una de las clasificaciones. Se ha descrito que deficiencias en las enzimas α -glucosidasa, α -galactosidasa A, β -galactosidasa, hexosaminidasas A y B, glucocerebrosidasa, esfingomielinasa, ceramidasa, galactocerebrosidasa y arilsulfatasa A, entre otras, generan enfermedades de almacenamiento lisosomal (Karp, 2009). La figura se ha modificado de Settembre et al. (2013).

Las proteínas de la membrana lisosomal están usualmente altamente glicosiladas y decoran la superficie luminal de las membranas lisosomales. Las más abundantes son LAMP-1, LAMP-2 y LIMP-2. Las LAMPs y LIMPs representan más del 50% de las proteínas totales en endosomas tardíos y lisosomas. Debido a la alta abundancia de glicoproteínas, en la superficie interna de la membrana lisosomal se forma una cubierta de carbohidratos que la protege frente a la degradación por parte de las hidrolasas (Saftig, 2006). Las proteínas de membrana lisosomal están involucradas en el transporte de sustancias desde y hacia el lumen, en la acidificación del lumen

lisosomal y en la fusión del lisosoma con otras estructuras celulares (**Fig. 11**) (Settembre et al., 2013).

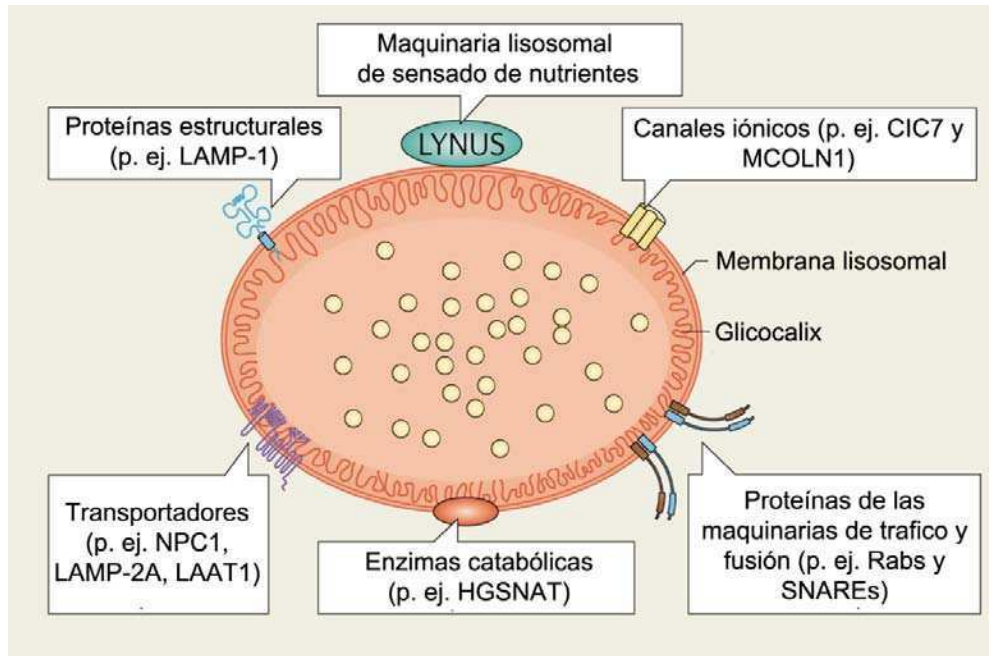


Figura 11. Proteínas de la membrana lisosomal. Los lisosomas poseen una membrana compuesta por una bicapa lipídica simple y proteínas tanto integrales como periféricas. Las proteínas de tráfico y fusión están compuestas por SNAREs y Rabs. Las proteínas estructurales incluyen a LAMP-1, que se encuentra involucrada en el tráfico lisosomal favoreciendo la unión de los lisosomas a la maquinaria de transporte. La maquinaria lisosomal de sensorio de nutrientes (LYNUS, por sus siglas en inglés) incluye varios complejos proteicos que interactúan en la superficie lisosomal, sienten el contenido de nutrientes de esta organela y envían señales al núcleo. Dos componentes de este sistema son la ATPasa vacuolar (v-ATPasa) y el complejo blanco de la rapamicina en mamíferos 1 (mTORC1). Se han identificado además varios canales iónicos, entre ellos CIC7, un canal de Cl^- necesario para la acidificación lisosomal y mucolipina 1 (MCOLN1), un canal catiónico no selectivo que se encuentra involucrado en la señalización de Ca^{2+} durante la fusión de los lisosomas con otras membranas. Entre los transportadores, se encuentra LAMP-2A, que está relacionado con la translocación de proteínas al lumen en la autofagia mediada por chaperonas, NPC1 que transporta colesterol al exterior de los lisosomas y el transportador lisosomal 1 de aminoácidos (LAAT1), que está involucrado en el importe de lisina y arginina al lumen lisosomal. Por último, una de las enzimas presentes es la Heparan- α -glucosaminidasa N-acetiltransferasa (HGSNAT) que participa de la degradación del heparan sulfato. Deficiencias en MCOLN1, LAMP-2A, NPC1 o HGSNAT generan enfermedades de almacenamiento lisosomal (Settembre et al., 2013).

5.3 Síntesis de proteínas lisosomales

Las hidrolasas lisosomales se sintetizan en el RE rugoso y se transportan a través del aparato de Golgi. Desde la red trans-Golgi (TGN), la mayoría llega a los endosomas/lisosomas por la vía del receptor de manosa 6 fosfato (M6P). Las hidrolasas lisosomales poseen una secuencia de señalización N- terminal de 20 – 25 aminoácidos que es reconocida por la partícula de reconocimiento de señal y permite al polipéptido naciente ser translocado a través de la membrana del RE. Luego de la remoción del péptido señal, se transfieren oligosacáridos preformados a residuos asparagina que son parte de un consenso de N- glicosilación Asn-X-Thr/Ser. El oligosacárido sufre varios procesos de remodelación antes de la compleción de la traducción. Una vez que arriban al Golgi, las cadenas de oligosacáridos de las enzimas lisosomales son nuevamente recortadas y modificadas por la adición de residuos de azúcares complejos (galactosa, fucosa y ácido siálico), grupos sulfato y M6P. Luego, las enzimas son reconocidas por dos receptores transmembrana presentes en TGN: el receptor de M6P independiente de cationes y/o el receptor de M6P dependiente de cationes. Ambos se unen a las hidrolasas lisosomales en el lado luminal de la membrana y a adaptinas para formar vesículas de clatrina. De este modo, las hidrolasas se transportan en vesículas que brotan desde el TGN (Saftig, 2006).

5.4 Principales funciones del lisosoma y su relación con procesos celulares clave

Las funciones lisosomales pueden ser divididas en tres tipos principales: degradación, secreción y señalización (**Fig. 12**). El material extracelular que está destinado a degradación alcanza el lisosoma principalmente mediante endocitosis. Por esta vía también se reciclan los receptores de membrana plasmática y se degradan las proteínas de la matriz extracelular, así como también las bacterias y células apoptóticas. Si el material a degradar proviene de la misma célula, el proceso se denomina autofagia. Otra función de estas organelas consiste en secretar su contenido mediante fusión con la membrana plasmática en un proceso conocido

como exocitosis, mecanismo que además cumple un rol en la reparación de dicha membrana. El papel de los lisosomas en el sensado de nutrientes es un concepto nuevo que posiciona a esta organela como reguladora de varios procesos celulares. Una proteína clave de la maquinaria de LYNUS es mTORC, un regulador del balance entre la biosíntesis y catabolismo celular que se localiza en la superficie lisosomal (Boya y Kroemer, 2008; Settembre et al., 2013).

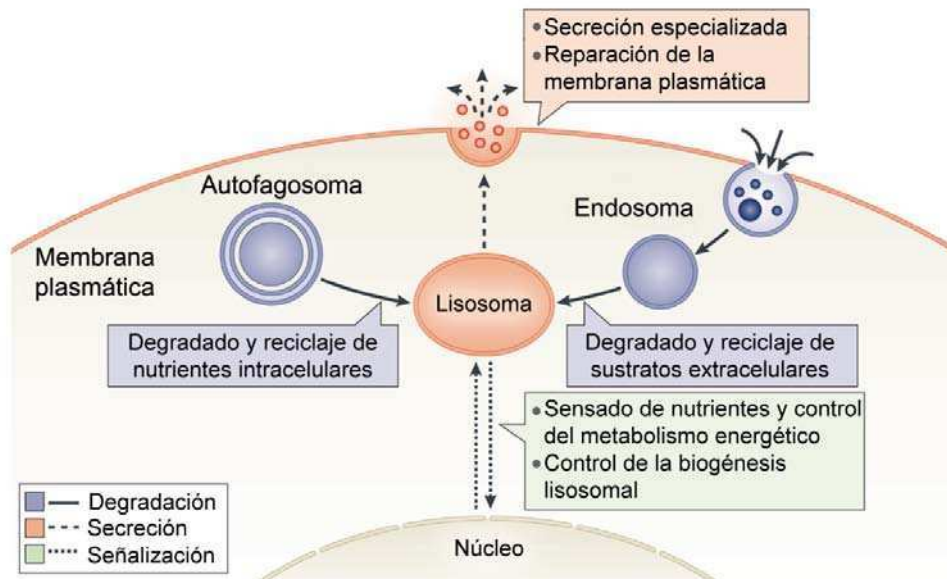


Figura 12. Principales funciones del lisosoma y su relación con otros procesos celulares. Los lisosomas están involucrados en la degradación y el reciclado del material intracelular vía autofagia y el extracelular por endocitosis. En estos procesos, los lisosomas se fusionan con autofagosomas y con endosomas tardíos, respectivamente. Los productos de la catálisis son empleados para generar nuevos componentes celulares y energía, según las necesidades nutricionales de la célula. Además, los lisosomas son capaces de realizar exocitosis para secretar su contenido al espacio extracelular o para reparar la membrana plasmática dañada. Más recientemente, los lisosomas fueron identificados como organelas de señalización capaces de sensar la disponibilidad de nutrientes y regular el metabolismo energético. Adaptado de Settembre et al. (2013).

5.5 Vía de muerte lisosomal

Los lisosomas representan organelas potencialmente peligrosas para la célula debido a su alto contenido de enzimas hidrolíticas. Por este motivo, su descubridor Christian de Duve los llamó "bolsas de suicidio" (de Duve, 1959). Si bien la

compartimentalización de la degradación en el lumen lisosomal es protectora para la célula, en condiciones de estrés celular, la función e integridad lisosomal pueden verse comprometidos y disparar la muerte celular (**Fig. 13**)(Pivtoraiko et al., 2009). La PML es un evento letal dado que la presencia ectópica de las proteasas lisosomales en el citosol causa la digestión de proteínas vitales y la activación de otras proteasas, incluyendo caspasas. El tipo de muerte depende del grado de la permeabilización, y cuando es masiva, lleva a la acidificación del citosol y muerte celular necrótica. En cambio, si la PML resulta parcial, la muerte desencadenada es de tipo apoptótico. Dado que las hidrolasas lisosomales poseen actividad máxima a pH ácido, aún es tema de debate el modo en que son capaces de funcionar en el citosol. Estudios *in vitro* han demostrado que algunas de estas proteasas tienen actividad también a pH neutro durante un tiempo limitado. Además, otras evidencias indican que el pH citoplasmático disminuye durante el transcurso de la muerte celular. Las proteasas lisosomales que han sido involucradas en la muerte celular apoptótica son las catepsinas que permanecen activas a pH neutro, como la catepsina B (CatB), la catepsina D (CatD) y la catepsina L (CatL). La activación de la apoptosis está mediada por la interacción de las catepsinas con miembros de la familia Bcl-2 y caspasas. Para el caso de las proteínas Bcl-2, hasta el momento, se conoce que las CatB y CatD clivan a Bid, generan la MOMP y activan la vía mitocondrial de muerte celular apoptótica. Se ha demostrado además que la CatD interactúa con Bax en la promoción de la apoptosis. A pesar de la extensiva caracterización de los mecanismos apoptóticos, el rol de los lisosomas en la muerte celular ha sido pobremente estudiado por varias razones. Por una parte, la ultraestructura de los lisosomas observada por microscopía electrónica permanece intacta incluso en situaciones en que puede medirse liberación de catepsinas por técnicas de inmunofluorescencia. Por otra parte, varios inhibidores de las caspasas inhiben también a las proteasas lisosomales cuando son empleados a altas concentraciones (~100 μ M). Por lo tanto, los efectos citoprotectores de ciertos inhibidores como z-VAD-fmk ante determinados estímulos de muerte, pueden incluir la protección a través de la inhibición de proteasas lisosomales (Boya y Kroemer, 2008; Pivtoraiko et al., 2009).

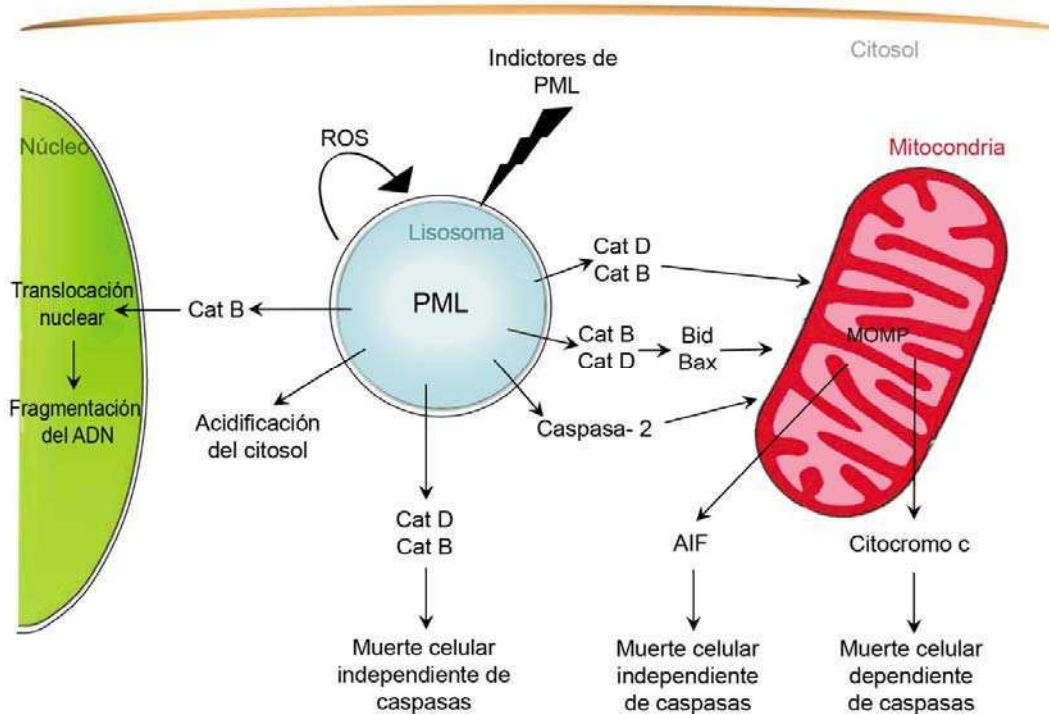


Figura 13. Vías de muerte activadas por la PML. Existen una variedad de moléculas efectoras diferentes que pueden disparar distintas modalidades de dismantelamiento celular. La vía desencadenada dependerá de la intensidad de la PML, la expansión de las hidrolasas lisosomales, la concentración citosólica de inhibidores de catepsinas, el estado funcional de la mitocondria, la concentración de caspasas y sus antagonistas, así como de una multiplicidad de otros factores. Adaptado de Boya y Kroemer, 2008.

6. Autofagia

6.1 Generalidades

El término autofagia deriva de las raíces griegas, *Auto* (a uno mismo) y *phagos* (comer). Este mecanismo se encuentra conservado evolutivamente y es un proceso por el cual el contenido citoplasmático es secuestrado en vesículas y enviado a los lisosomas para su degradación. Cuando la autofagia fue descubierta, más de 40 años atrás, era complicado entender porque la célula degradaba sus propios componentes. La hipótesis más simple fue que la autofagia sirve como un mecanismo de eliminación de desechos. Sin embargo, con el tiempo se ha comprendido que este proceso de auto digestión no solo se encarga de la

eliminación de proteínas de vida media larga o mal plegadas, organelas superfluas o dañadas y microorganismos invasores, sino que además constituye una respuesta adaptativa para proveer energía y nutrientes en condiciones de estrés. La autofagia se encuentra relacionada a la patofisiología humana y su conocimiento tiene implicancias en un amplio rango de procesos y enfermedades, como en la neurodegeneración, el cáncer, la respuesta inmune, el desarrollo y el envejecimiento (Yang y Klionsky, 2010).

Hasta el momento se han descrito 3 tipos de autofagia: macroautofagia, microautofagia y autofagia mediada por chaperonas. Se cree que la macroautofagia (de aquí en más denominada autofagia) es la principal responsable de la degradación intracelular de proteínas y es la vía más estudiada. Si bien generalmente se considera a la degradación autofágica como un mecanismo no específico, se han descrito diversos ejemplos de autofagia selectiva, incluyendo mitofagia (para mitocondrias), ribofagia (para ribosomas), pexofagia (para peroxisomas), reticulofagia (para RE) y la reciente incorporada lisofagia (para lisosomas) (Chen y Klionsky, 2011; Hung et al., 2013; Maejima et al., 2013)

6.2 Proceso de degradación autofágica y vesículas involucradas

El proceso autofágico puede ser dividido en 4 pasos: inducción, nucleación, expansión/secuestro y degradación. La inducción es el paso inicial y ocurre mediante la activación de ULK, una proteína que se encuentra regulada negativamente por el complejo mTORC. La nucleación conduce al reclutamiento de proteínas y lípidos en el sitio de ensamblaje del fagóforo (PAS), los cuales van a contribuir a la construcción del autofagosoma. Si bien el mecanismo que lleva a la nucleación no se encuentra esclarecido, se ha demostrado que la activación de la fosfatidil inositol 3 quinasa clase 3 (PI3KC3) es esencial. Durante la expansión/secuestro, las membranas se expanden, ya sea por flujo directo desde el RE o por adición de vesículas, hasta formar el autofagosoma que secuestra a la carga citosólica. En este estadio, los componentes citoplasmáticos incluyendo organelas, son encerrados por un saco membranoso denominado membrana de aislamiento o

fagóforo, que se cierra sobre sí mismo para formar una estructura de doble membrana, el autofagosoma. Dunn (1990) sugirió que la maduración de las vacuolas autofágicas requiere: I) la incorporación de proteínas de membrana lisosomal, II) la acidificación y III) la adquisición de hidrolasas lisosomales, procesos que pueden ocurrir en un paso único por medio de la fusión con lisosomas preexistentes. Los autofagosomas pueden fusionarse directamente con lisosomas para dar lugar a los autolisosomas, o bien se puede formar una vesícula intermediaria, el anfisoma, por unión con endosomas tardíos. Las hidrolasas lisosomales presentes en los autolisosomas degradan el contenido proveniente del citoplasma en un medio ácido, junto con la membrana interna del autofagosoma. En la **Fig. 14** se muestra un esquema ilustrando las vacuolas involucradas en el proceso autofágico (Mizushima et al., 2002; Pivtoraiko et al., 2009; Chen y Klionsky, 2011; Kang et al., 2011).

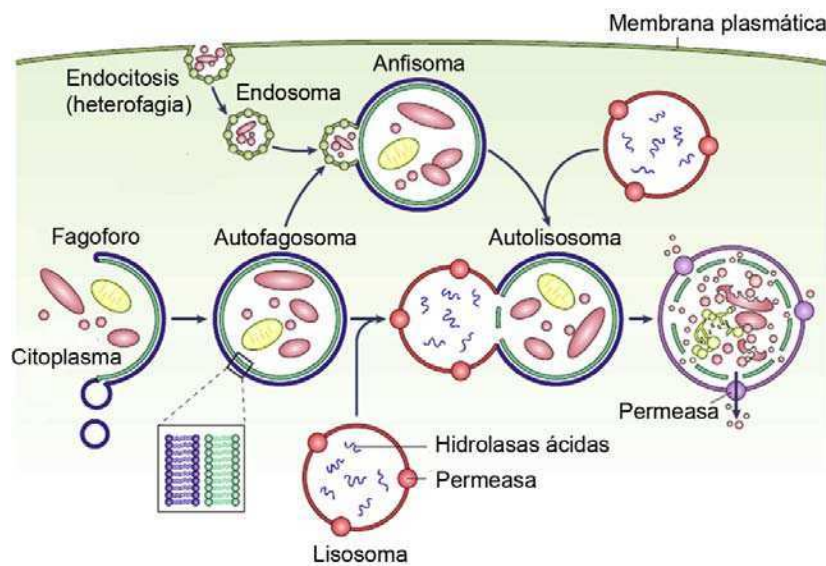


Figura 14. Vacuolas involucradas en la autofagia. El secuestro del material comienza con la formación de un fagóforo que encierra material citoplasmático y se expande hasta formar un autofagosoma de doble membrana. El autofagosoma puede fusionarse con un endosoma, dando como producto un anfisoma, o directamente fusionarse con lisosomas, que lo proveen de hidrolasas ácidas para formar el autolisosoma. Este último es el compartimiento degradativo de la vía autofágica. Las macromoléculas resultantes son liberadas por medio de permeasas al citosol para ser reusadas. Adaptado de Klionsky (2007).

6.3 Vías de señalización involucradas en la autofagia

6.2.1 Fosfatidil inositol 3- quinazas

En eucariotas superiores hay 3 tipos de fosfatidil inositol 3- quinazas (PI3K): clases 1, 2 y 3. La clase 1 (PI3KC1) regula negativamente la autofagia, mientras que la PI3KC3 es esencial para la activación de esta vía (Chen y Klionsky, 2011). Beclina 1 es una proteína que actúa como plataforma para el ensamblaje de un interactoma formado por un *core* Beclina 1- PI3KC3/ Vps34- Vps15 y proteínas accesorias, que regula positivamente la autofagia. Por otra parte, Beclina 1 posee interacciones dinámicas con miembros anti- apoptóticos de la familia Bcl-2 que compiten con la unión a la PI3KC3 y regulan negativamente la autofagia (Kang et al., 2011). En este sentido, la fosforilación de Beclina 1 por parte de la proteína quinasa asociada a la muerte (DAPK) inhibe su unión a Bcl-XL (Zalckvar et al., 2009). Además, se ha descrito que Bcl-2 puede ser fosforilado por JNK, lo que genera su disociación de Beclina 1 y consecuente activación de la autofagia (Wei et al., 2008).

Por otra parte, en presencia de factores de crecimiento, sus receptores correspondientes activan la cascada PI3KC1-Akt-mTORC, lo que resulta en la inhibición de la autofagia (Kondo et al., 2005).

En la **Fig. 15** se esquematizan las vías de señales relacionadas con la autofagia reguladas por las PI3K.

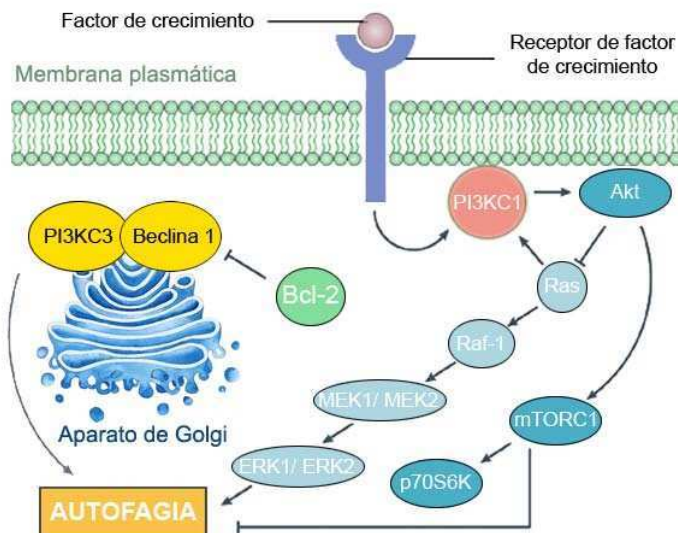


Figura 15. Señalización por PI3K en la autofagia. La activación de la PI3KC1 en la membrana plasmática conduce a la activación de la vía de Akt y de mTORC y/ o a la inhibición de la vía de ERK, inhibiendo el proceso autofágico. La proteína Ras puede señalizar de modo dual, dependiendo si actúa sobre la PI3KC1 o Raf-1. Por otra parte, el complejo de la PI3KC3 en el TGN induce la autofagia. Bcl-2 es capaz de unirse a Beclina 1 e impedir su unión a la PI3KC3. Adaptada de Kondo et al. (2005), con modificaciones.

6.3.2 mTORC

El complejo mTORC puede regular la autofagia fosforilando directamente a Atg13 y ULK1 o actuando en la transducción de señales de otras proteínas relevantes en este proceso. Varias vías de señalización involucradas en la regulación de la autofagia confluyen en mTORC1, incluyendo las de la proteína quinasa activada por adenosina monofosfato (AMPK) que activa la autofagia y la de Akt (que se encuentra regulada por la PI3KC1), que inhibe la vía (**Fig. 16**) (Chen y Klionsky, 2011).

6.3.3 Sistemas de conjugación tipo ubiquitina

El proceso de expansión/secuestro y compleción de los autofagosomas depende de los sistemas de conjugación tipo ubiquitina de Atg12 y de LC3 (o Atg8 en levaduras) (**Fig. 16**).

Atg12 es clivada en su extremo C-terminal por Atg7 (una enzima tipo E1) y luego transferida a Atg10 (una enzima tipo E2) que la conjuga con Atg5. Esta última interactúa mediante una unión no covalente con Atg16, para formar un complejo multimérico a través de la homo-oligomerización de Atg16. Por otra parte, la conjugación de LC3 no ocurre con una proteína sino con un lípido (PE), lo que permite su unión a membranas. En primer lugar, LC3 es clivada en el extremo C-terminal por Atg4 para dar lugar a LC3-I. Esta es reconocida por la enzima tipo E1 Atg7. Una vez activada, LC3 es transferida a Atg3, que la conjuga con PE (Geng y Klionsky, 2008). Se propone que LC3-II recluta contenido citoplasmático al fagóforo, asegurando su incorporación en los autofagosomas. Además, esta proteína contribuiría con la fusión de vesículas, por lo cual favorecería el proceso de expansión del fagóforo (Nakatogawa et al., 2007).

El complejo Atg12–Atg5-Atg16 es esencial para la formación de autofagosomas. Se propone que este complejo recluta a Atg3 (conjugado a LC3) a la membrana del fagóforo, facilitando la unión a PE. Adicionalmente, se ha demostrado mediante

experimentos *in vitro*, que este complejo podría también favorecer la fusión de vesículas con el fagóforo (Romanov et al., 2012).

En la **Fig. 16** se esquematiza la acción de las proteínas más importantes relacionadas con el proceso autofágico.

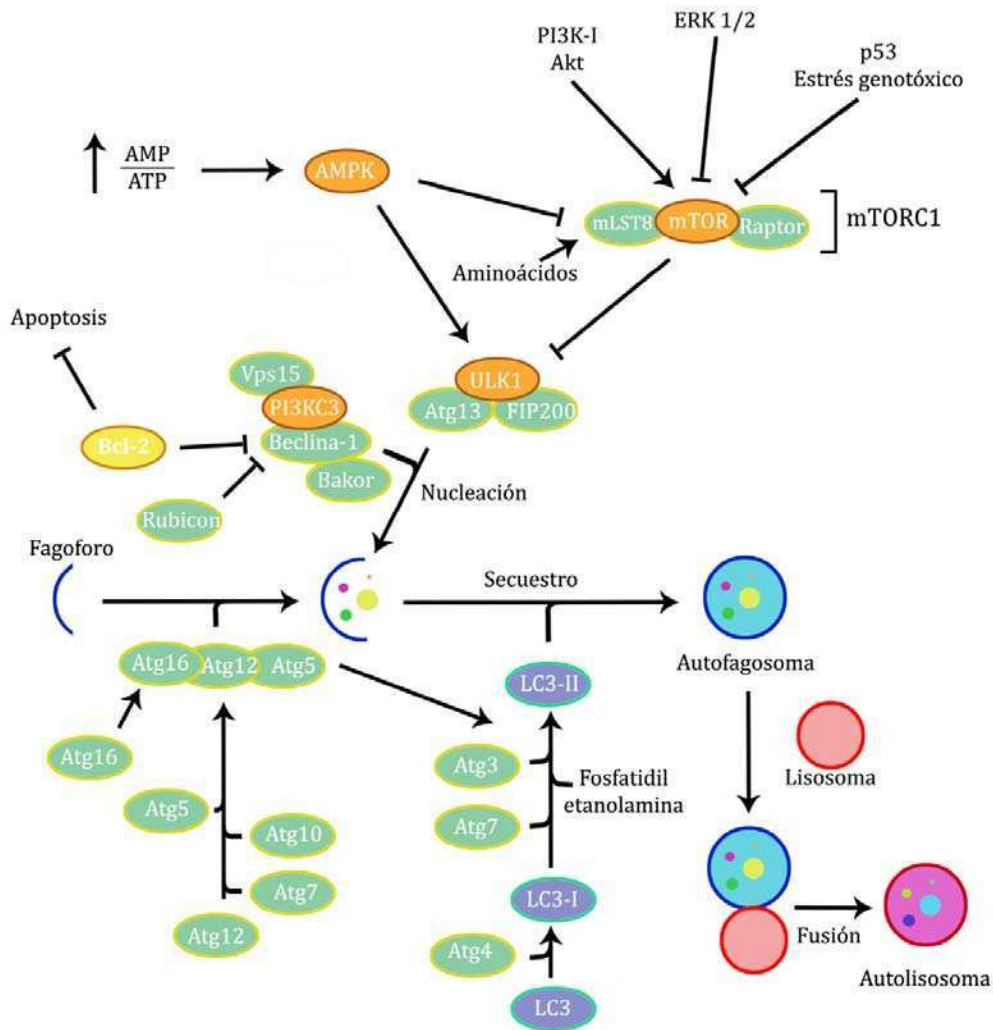


Figura 16. Proteínas involucradas en la señalización autofágica. En el esquema se muestran las principales proteínas involucradas en el proceso autofágico, indicando los niveles sobre los cuales actúan. El complejo formado por mTOR (mTORC) es un regulador crítico de la inducción de la autofagia. La activación del mismo, modulada entre otros por Akt, suprime la autofagia, mientras que su inhibición por ERK, p53 y AMPK, la promueve. ULK1 actúa río abajo de mTORC y forma un complejo con Atg13 y FIP200 que es el principal responsable del proceso de iniciación. El complejo PI3KC3 está formado por un *core* Vps34/ Beclina 1/ Vps15 y proteínas accesorias como Bakor y UVRAG. Bcl-2 es capaz de unirse a Beclina 1, compitiendo por la unión al complejo *core* y manteniéndolo inactivo. Los genes Atg controlan la formación de autófagosomas a través de los complejos Atg12– Atg5 y LC3-II. Atg12 se conjuga a Atg5 en una reacción

tipo ubiquitina que requiere Atg7 y Atg10 (las enzimas tipo E1 y E2). El conjugado Atg12– Atg5 interactúa no covalentemente con Atg16. LC3 es clivado en su extremo C-terminal por Atg4 para generar LC3-I. Esta proteína se conjuga a fosfatidiletanolamina en otra reacción tipo ubiquitina que requiere Atg7 y Atg3. La forma lipídada, LC3-II, se une a la membrana de los autofosomas. La imagen corresponde al diagrama de la vía de señales de autofagia publicada por Cell Signaling Technology, Inc., con modificaciones.

6.4 Rol de la autofagia en el daño lisosomal

Los lisosomas constituyen el eslabón final de la vía autofágica. Por lo tanto, el material que llega para ser degradado por dicha vía puede tener un rol en la PML. La autofagia de macromoléculas que contienen Fe lleva a un aumento en la concentración del metal en los lisosomas. Esto tiene especial relevancia en situaciones de estrés oxidativo. El pH ácido, sumado a la presencia de equivalentes de reducción y el alto contenido de Fe generan en los lisosomas un ambiente propicio para que tenga lugar la reacción de Fenton. Esta consiste en la conversión del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a radical hidroxilo (HO^\bullet) mediada por Fe. Además, los lisosomas no suelen contener enzimas antioxidantes como catalasa o glutatión peroxidasa, lo que exacerba el potencial daño que pueden producir las ROS sobre la membrana. Los radicales libres intra-lisosomales pueden causar peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados para formar aldehídos, alquenes o hidroxialquenes relativamente estables y citotóxicos. Asimismo, la acumulación de lipoproteínas oxidadas en el lumen lisosomal puede afectar negativamente la integridad de la membrana. Por otra parte, se ha propuesto que la autofagia de proteínas ricas en tioles, como las metalotioneínas, es capaz de contrarrestar el daño lisosomal por medio de la unión a Fe y otros metales de transición como Zn en los lisosomas, disminuyendo la probabilidad de que ocurran reacciones de Fenton (Pivtoraiko et al., 2009).

La ruptura lisosomal impide la degradación autofágica y conduce a la acumulación de autofosomas como mera consecuencia del proceso anterior y sin implicar un disparo de esta vía (**Fig. 17**) (Klionsky et al., 2012).

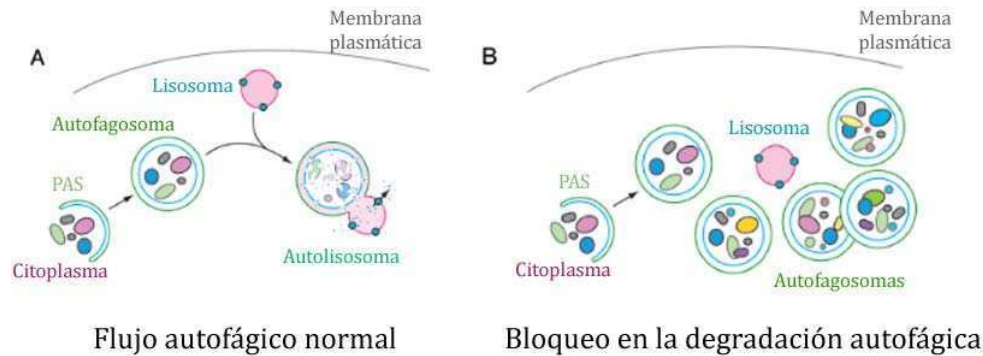


Figura 17. Modelo del flujo autofágico normal o de bloqueo en la degradación. Se esquematiza el flujo autofágico en condiciones normales (A) o en casos en que la degradación se encuentra impedida (B), ya sea por un desperfecto en la fusión entre autofagosomas y lisosomas o por la PML, conduciendo a la acumulación de autofagosomas que no pueden ser degradados. Adaptado de Klionsky et al. (2012).

6.5 Vía de muerte autofágica

La autofagia fue originalmente descrita como un mecanismo de supervivencia inducido por hambre celular. Sin embargo, en la actualidad se le adjudican roles en una variedad de procesos celulares incluyendo supervivencia, metabolismo, desarrollo, envejecimiento e inmunidad. Si bien existen numerosos trabajos que describen características autofágicas en células en proceso de muerte, su rol preciso en dicha muerte es tema de controversia.

La interacción entre la autofagia y la apoptosis es compleja, y en ciertos casos, la vía autofágica es necesaria para que se active la apoptótica. Es importante entonces discriminar los casos en los que la autofagia determina la muerte celular de aquellos en que altera la dinámica de muerte. Shen y Codogno (2011), han propuesto que se deben cumplir tres criterios para definir a la muerte celular autofágica:

1. La muerte ocurre independientemente de la apoptosis
2. Aumenta el flujo autofágico
3. La supresión de la autofagia empleando inhibidores químicos o manipulaciones genéticas es capaz de prevenir la muerte celular

Hasta el momento, estudios empleando organismos modelo como *Arabidopsis thaliana*, *Dictyostelium discoideum* y *Drosophila melanogaster* han presentado evidencias contundentes que apoyan la existencia de la muerte celular autofágica (Kourtis y Tavernarakis, 2008). Sin embargo, la importancia de este tipo de muerte en mamíferos todavía no es claro y el proceso aparenta ser poco común (Denton et al., 2012). En *Drosophila* la autofagia ha demostrado tener un rol en el desarrollo. En contraste, ratones deficientes en Atg5 o Atg7 no muestran defectos anatómicos ni histológicos hasta el período neonatal, donde mueren por problemas metabólicos. Esto sugiere que la autofagia no es requerida para el desarrollo en mamíferos. Además, el *knock out* de genes relacionados con la autofagia en células humanas o murinas falla en conferir protección a largo plazo frente a la inducción de muerte de una variedad de estímulos de estrés, y aún más, suele acelerar el desmantelamiento apoptótico o necrótico.

Si bien la inhibición de la autofagia previene la vacuolización, no suele prevenir la muerte celular. Esto refuerza la idea de que en la mayoría de los casos las células mueren *con* autofagia y no *por* autofagia (Galluzzi et al., 2012). Por lo tanto, son necesarios un mayor número de estudios que confirmen la existencia de este tipo de muerte en mamíferos (Shen et al., 2012).

Hipótesis y Objetivos

Los lisosomas cumplen roles diversos en la fisiología celular entre los cuales resulta clave su función en las vías degradativas. Tanto los mecanismos autofágicos como heterofágicos de degradación de organelas y macromoléculas confluyen a los lisosomas. Es por ello, que un daño a estas vesículas conduce a la acumulación de material no degradado que puede resultar tóxico para las células. Existen diferentes estímulos, entre ellos la generación excesiva de ROS, que pueden inducir la permeabilización de la PML generando la liberación de hidrolasas al citosol. La permeabilización parcial induce la formación de poros que permiten la translocación al citosol de ciertas proteasas (entre ellas las catepsinas B, D y L) capaces de clivar sustratos citosólicos específicos activando la apoptosis.

En nuestro laboratorio hemos obtenido resultados que sugieren que las células C6 de glioma de rata responden al daño inducido por Mn de modo similar a los astrocitos en cultivo. En ambos casos, la muerte está mediada por estrés oxidativo, llevando a la injuria de la mitocondria y a la apoptosis dependiente de caspasas. En estas células se ha demostrado además que la vía de receptores de muerte se encuentra activada, y que su inhibición previene completamente la muerte celular. Por otra parte, la inhibición de la vía apoptótica mitocondrial disminuye parcialmente la citotoxicidad inducida por Mn, lo que sugiere que otras vías de muerte dependientes de la caspasa-8, podrían encontrarse activas.

En base a estos antecedentes se propone la siguiente hipótesis de estudio:

Hipótesis

La exposición a Mn de las células de glioma C6 induce la generación de ROS. Estas especies reactivas actúan a nivel de la membrana lisosomal contribuyendo a su permeabilización y consecuente liberación de catepsinas al citosol. Las catepsinas clivan sustratos esenciales para la célula participando de las vías apoptóticas de muerte. El daño lisosomal inducido por el Mn impacta sobre el proceso esencial de la autofagia favoreciendo o previniendo la muerte celular.

En base a la hipótesis, se plantearon los siguientes objetivos:

Objetivo General

Caracterizar los mecanismos moleculares y celulares que intervienen en la vía de muerte lisosomal inducida por Mn y sus consecuencias a nivel de la autofagia empleando un modelo *in vitro* de células C6 de glioma de rata y un modelo *in vivo* de toxicidad aguda por Mn en ratas.

En el presente proyecto se abordará el estudio de la vía lisosomal de muerte y su posible vinculación a la apoptosis inducida por manganeso (Mn). Los estudios se centrarán en la elucidación de los eventos celulares y moleculares participantes de esta cascada, su conexión con la vía apoptótica mitocondrial y autofágica y los niveles de acción de distintos inhibidores. El propósito final consiste en anular una vía de muerte (o inducir una vía de supervivencia) aumentando así el programa protector intrínseco de los astrocitos y consecuentemente, la supervivencia de las neuronas.

Objetivos específicos

Empleando nuestros modelos de muerte celular inducida por Mn^{2+} en células C6 de glioma de rata la propuesta es:

- Describir el efecto del manganeso sobre la integridad de las vesículas ácidas.
- Investigar si las posibles alteraciones a nivel lisosomal están mediadas por ROS.
- Evaluar la ocurrencia de la PML y la consecuente translocación de las catepsinas lisosomales al citosol.
- Analizar participación de las CatD y B en la muerte celular.
- Estudiar en detalle el rol de las CatD y B sobre la activación de las vías extrínseca e intrínseca.

Hipótesis y Objetivos

- Analizar la eventual participación de procesos autofágicos y su implicancia en la muerte celular.

Empleando un modelo de toxicidad aguda por Mn en ratas *Sprague-Dawley*:

- Evaluar el posible daño a los astrocitos en el *striatum*.
- Corroborar la existencia de alteraciones en la vía lisosomal.

*Materiales y
 Métodos*

1 Reactivos

1.1 Reactivos generales

Se utilizaron los reactivos cuya procedencia se describe a continuación: medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), tripsina, cloruro de manganeso, RNasaA, bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio (MTT), clorhidrato de 3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina (Rojo neutro), Hoechst 33258, 3,6-bis-dimetilaminoacridina (naranja de acridina), monodansilcadaverina (MDC), Brilliant Blue G, EGTA, seroalbúmina bovina, glutatión (GSH), melatonina, benzamidina, PMSF, luminol y ácido p- cumárico (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA); EDTA, 2- mercaptoetanol y TEMED (BIO-RAD laboratories, Hercules, CA, USA); acrilamida, N',N'- metilénbisacrilamida, dodecil sulfato de sodio, Tris, Glicina y metanol (Biopack, Zárate, Buenos Aires, Argentina); suero fetal bovino (SFB) (NATOCOR, Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina); estreptomina, penicilina y anfotericina (Richet, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina); ditiotreitól (DTT), Tween-20 y persulfato de amonio (GE Healthcare, Pittsburg, PA, USA); LysoTracker Red DND-99 y Mitotracker Red CMXRos (Molecular Probes, Eugene, OR, USA); ácido N-(2-Hidroxietil)-piperazina-N'-(2-etanosulfónico)(HEPES), azul de bromofenol, Ponceau S, ortovanadato de sodio y glicerol (ICN Biomedicals, Irvine, CA, USA); PageRuler Plus (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA); DMSO (Anedra, San Fernando, Buenos Aires, Argentina); fluoruro de sodio (Mallinckrodt, Dublin, Irlanda); Triton X-100 (Merck, Whitehouse Station, NJ, USA); 3- metiladenina (3-MA), wortmanina (WM), Ca-074 Me, SP600125 y PD98059 (Calbiochem, La Jolla, CA, USA); Bafilomicina A1 (BafA1)(Fermentek, Jerusalem, Israel); Aprotinina y Pepstatina A (PepA)(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA); ketamina (Holliday-Scott, Beccar, Buenos Aires, Argentina); xilacina (Bayer, Munro, Buenos Aires, Argentina); membrana de nitrocelulosa (Hybond ECL, Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, USA).

Todos los demás reactivos utilizados fueron de grado biología molecular o grado analítico según el caso.

Todos los inhibidores se disolvieron en dimetil sulfóxido (DMSO) de modo tal que la concentración final del solvente, una vez agregado a las células, no excediera el 0,125%. La concentración de DMSO empleada no afectó la viabilidad celular, la morfología ni otros parámetros testeados.

1.2 Anticuerpos

Se utilizaron los anticuerpos cuya procedencia se describe a continuación:

Anticuerpos primarios

Akt #9272, Beclina 1 #3738, Caspasa-3 #9662, LC3A/B (D3U4C) #12741, p-Akt (Ser473) #9271 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA); NeuN (Clon A60) MAB 377 (Chemicon, EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA); LAMP1 (H4A3) (Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa, IA, USA); β - Actina (C4) sc-47778, BID (FL-195) sc-11423, Catepsina D (H-75) sc-10725, Caspasa-8 p18 (H-134) sc-7890, Caspasa-9 p10 (H-83) sc-7885, Citocromo c (H-104) sc-7159, ERK2 (C-14) sc-154, FasL (C-178) sc-6237, p-ERK (E-4) sc-7383, p-JNK (G7) sc-6254, TOM-20 (FL- 145) sc-11415, MAP LC3 β (N-20) sc-16755, JNK1 (G-13) sc-46006 (Santa Cruz Biotechnology); GFAP G-3893 (Sigma- Aldrich)

Anticuerpos secundarios biotinilados:

Anti- conejo biotinilado BA-1000 (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA.)

Anticuerpos secundarios acoplados a fluoróforos:

Anti- cabra IgG- Alexa Fluor 488 (A-11055), Anti- conejo IgG (H+L) Alexa Fluor 532, Anti- conejo IgG (H+L) Alexa Fluor 488, Anti- ratón IgG (H+L) Alexa Fluor 555 (Molecular Probes); Anti- conejo IgG- Cy2 AP132J (Chemicon)

Anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa:

Anti- conejo IgG-HRP sc-2030, Anti- ratón IgG-HRP sc-2031, Anti- cabra IgG-HRP sc-2020 (Santa Cruz Biotechnology).

1.3 Soluciones generales

PBS - *Buffer fosfato salino pH 7,4*

NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM

PBST - *Buffer fosfato salino – Tween 20 pH 7,4*

NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM, Tween 20 0,05%

Buffer fosfato 0,1M - *pH 7,4*

Partiendo de stocks de NaH₂PO₄ 0,2M y Na₂HPO₄ 0,2M:

95 ml de NaH₂PO₄, 405 ml de Na₂HPO₄ 0,2M, H₂O_d c.s.p 1000 ml (NaH₂PO₄ 0,019 mM y Na₂HPO₄ 0,081 mM)

Buffer citrato de sodio salino 2x (SSC) - *pH 7*

Na₃C₆H₅O₇ 0,03M, NaCl 0,3M

Reactivo de Bradford

Coomassie Brilliant Blue G-250 al 0,01% (p/v) en etanol al 4,7% (p/v) y ácido fosfórico 8,5% (p/v)

1.4 Soluciones para western blot

Buffer de lisis

HEPES 50mM, Triton 0,1%

Inhibidores de proteasas: Benzamidina 63,8 μM, Aprotinina 1,5 μM, PMSF 500 μM

En los casos en que se estudiaron proteínas fosforiladas, se agregaron también inhibidores de fosfatasa:

NaF 5 mM

NaVO₄ 1 mM

Buffer de cracking

Tris-HCl 62,5mM pH 6,8, SDS 2%, Glicerol 30%, DTT 3mM, β-mercaptoetanol 15%, Azul de bromofenol 3,75 x 10⁻⁴%

Gel concentrador – pH 6,8

Acrilamida- bisacrilamida (N',N'- metilenbisacrilamida) 3,8%, Tris- HCl 126 mM, SDS 0,1%, APS 0,1%, TEMED 0,2%

Gel separador – pH 8,8

Acrilamida- bisacrilamida (10, 12 o 15%), Tris- HCl 375 mM, SDS 0,1%, APS 0,1%, TEMED 0,25%.

Buffer para la separación electroforética – pH 8,3

Tris 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0,1%

Buffer de transferencia – pH 8,3

Tris 25 mM, Glicina 192 mM, metanol 20%

TBS – Tris buffer salino pH 8

Tris -HCl 50mM, NaCl 150 mM

TBST – Tris buffer salino Tween-20 pH 8

Tris-HCl 10mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0,05%

Solución de bloqueo

Leche en polvo descremada 5% y SDS 0,1% en TBS

Solución para la preparación de anticuerpos

Anticuerpos marca Santa Cruz: Leche en polvo descremada 3% y SDS 0,1% en TBS

Anticuerpos de otras marcas: BSA 5% en TBST

ECL

Solución A – pH 8,5

Tris-HCl 0,1 M, Luminol 2,5 mM, Ácido p-cumárico 0,4 mM,

Solución B – pH 8,5

Tris-HCl 0,1 M, H₂O₂ 0,064 vol.

1.5 Preparación de antioxidantes

Melatonina (17,2 mM)

Se disolvieron 0,016g de melatonina (MLT) en 200 µl de etanol 96%, se agitó y se llevó a 4 ml con PBS. El procedimiento fue realizado en oscuridad.

GSH (20,4 mM)

Se disolvieron 0,0123g de GSH en 1 ml de Tris- HCl 0,5 M pH 7, se ajustó el pH a 7 empleando ácido clorhídrico 1M y se llevó a 2 ml con PBS.

2. Métodos

2.1. Cultivo celular

Las células C6 de glioma de rata (ATCC® CCL-107™) fueron gentilmente cedidas por el Dr. Zvi Vogel (Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel). Los cultivos fueron mantenidos en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% SFB, glutamina (2 mM), penicilina (100 unidades/ ml), estreptomycin (100 µg/ ml) y anfotericina B (2,5 µg/ ml). Antes de ser adicionado al medio de cultivo, el SFB fue inactivado a 56°C durante 30 min. Las células se cultivaron a 37°C en una atmósfera húmeda de 5% CO₂- 95% aire y el medio de cultivo fue renovado 3 veces por semana.

Para llevar a cabo los experimentos, las células C6 se tripsinizaron (tripsina 0,25%- EDTA 0,5 mM), se diluyeron en DMEM con 10% SFB y se re- plaquearon en cajas de 60mm o multi- pocillo.

Cajas de 60 mm: $6,0 \times 10^5$ células/ pocillo
Cajas de 12 pocillos: $1,5 \times 10^5$ células/ pocillo
Cajas de 24 pocillos: $7,5 \times 10^4$ células/ pocillo
Cajas de 96 pocillos: $1,5 \times 10^4$ células/ pocillo

Luego de 24 hs en cultivo, las células alcanzaron ~70 - 80% de confluencia y se incubaron con el tratamiento correspondiente.

2.2. Ensayo de reducción de MTT

Las sales de tetrazolio, como el MTT, poseen un anillo que es capaz de ser reducido por varias deshidrogenasas celulares generando formazan, un producto azul oscuro y parcialmente insoluble. Dicha reacción tiene lugar en todas las células metabólicamente activas y es, por lo tanto, un indicador de viabilidad celular (Mosmann, 1983). El ensayo se realizó según el protocolo original descrito por Mosmann (1983) con leves modificaciones (Alaimo et al., 2011). Luego de los tratamientos, las células crecidas en placas de 96 pocillos se lavaron con PBS y se incubaron con MTT 0,125 mg/ ml en medio de cultivo a 37°C. Una vez transcurridos 90 min, el medio se removió y el formazan se solubilizó en 200 μ l de DMSO. La absorbancia se midió a 570nm y se le restó la absorbancia de una referencia medida a 655nm. Las lecturas se realizaron en un lector de microplacas BIO-RAD Modelo 680.

2.3. Ensayo de retención de rojo neutro (RN)

Este ensayo se basa en la capacidad de las células viables de incorporar y retener el RN en los lisosomas (Repetto et al., 2008). La técnica se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Repetto et al. (2008) con leves modificaciones. Un día antes del ensayo, una solución 40 μ g/ml de RN en medio de cultivo sin suero se incubó *overnight* (ON) a 37°C. Luego, la solución se centrifugó durante 10 min a 2.600 rpm y se descartaron los cristales precipitados. Una vez finalizados los tratamientos, las

células crecidas en placas de 96 pocillos se lavaron con PBS y se agregaron 200 μ l de solución de RN por pocillo. Luego de 2 hs a 37°C, las células se lavaron con PBS y el RN se disolvió en 200 μ l de una solución de alcohol ácido (Ácido acético 1% en etanol 50%). La absorbancia se midió a 570nm y se le restó la absorbancia de una referencia medida a 690nm. Las lecturas se realizaron en un lector de microplacas BIO-RAD Modelo 680.

2.4. Tinción de los compartimientos ácidos

2.4.1 Tinción con naranja de acridina

Las células se sembraron sobre cubreobjetos de 15 mm de diámetro, previamente flameados y dispuestos en una placa de 12 pocillos. Para la tinción, el colorante se agregó al medio de cultivo 6 hs antes de finalizar los tratamientos a una concentración final de 1 μ g/ml y se incubó a 37°C hasta finalizar la exposición al metal. Luego, las células se lavaron dos veces con PBS, los cubreobjetos se montaron en portaobjetos empleando medio de montaje PBS: Glicerol (1:1) e inmediatamente se observaron en un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse E600 (Nikon Instech Co., Ltd., Karagawa, Japón) empleando filtros B2A (λ_{ex} : 450–490 nm; λ_{em} : 515 nm). Las imágenes se capturaron con una cámara digital Nikon CoolPix5000 empleando el objetivo de 100x.

2.4.2 Tinción con LysoTracker Red DND-99

Las células se cultivaron sobre cubreobjetos de 15 mm de diámetro, previamente flameados y dispuestos en una placa de 12 pocillos. Una vez finalizado el tratamiento, las células se lavaron con PBS y luego se incubaron con LysoTracker Red DND-99 50nM en medio de cultivo sin suero durante 30 min a 37°C. Posteriormente, se retiró el colorante, se lavó dos veces con PBS y se realizó una fijación con paraformaldehído (PFA) 4%/ sacarosa 4% en PBS durante 30 min a temperatura ambiente (TA). Para eliminar los restos del fijador, las células se lavaron 5 veces con PBS y se dejaron en dicho buffer ON a 4°C. Los cubreobjetos se montaron en portaobjetos empleando medio de montaje PBS: Glicerol (1:1). Las muestras se

analizaron en un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse E600 con un filtro G-2E/C (λ_{ex} : 528–553 nm; λ_{em} : 600–660 nm) o alternativamente en un microscopio Olympus IX71 (λ_{ex} : 510–550 nm; λ_{em} : LP 590nm), según se detalla en cada figura.

Para el estudio del tamaño de los lisosomas, se adquirieron imágenes de 614 x 460 píxeles y resolución de 300 píxeles/pulgada empleando una cámara digital Nikon CoolPix5000 y usando el objetivo de 100x. Para la cuantificación del diámetro de las vacuolas, se empleó el *software* ImageTool (UTHSCSA, San Antonio, TX, USA). Se seleccionó manualmente el área alrededor de uno o varios lisosomas y se aplicó un umbral manual para discernir entre vacuolas adyacentes y evitar la cuantificación de píxeles fluorescentes no específicos. Se cuantificó el área de los lisosomas de 25 células por tratamiento (400- 500 lisosomas) y se calculó el diámetro $d=2(\sqrt{\text{área}/\pi})$. Dado que para realizar el análisis estadístico (ANOVA de dos factores) fue necesario disminuir el número de datos, se seleccionaron 52 valores por tratamiento al azar. Para ello, a cada dato de diámetro cuantificado se le adjudicó un número empleando la función “aleatorio” de Microsoft Excel 2013 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA), y dicho valor fue utilizado en una segunda fórmula para seleccionar los 52 valores de diámetro que se usaron en el análisis estadístico. Este procedimiento se realizó empleando 4 grupos de datos diferentes y se obtuvieron resultados similares.

Por otra parte, se realizó una cuantificación manual y las células se clasificaron en dos categorías: células normales o células presentando lisosomas de tamaño aumentado (1000 células/ tratamiento).

2.5 Cuantificación de organelas ácidas mediante citometría de flujo

Este ensayo se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Jiang et al. (2009) con pequeñas modificaciones. Finalizados los tratamientos, los cultivos en placas de 12 pocillos se lavaron con PBS y se tiñeron con naranja de acridina 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en medio de cultivo durante 15 min a 37°C. Luego de dos lavados con PBS, las células se tripsinizaron (con 100 μl de tripsina 0,25%- EDTA 0,5 mM) durante 3 min a 37°C y se transfirieron a tubos eppendorf. Posteriormente, la tripsina se diluyó en 1500 μl

de PBS, las células se centrifugaron a 1.000 rpm y el pellet resultante se resuspendió en 500 μ l de PBS. Las muestras se mantuvieron en hielo y protegidas de la luz hasta la medición. Se cuantificó la emisión de fluorescencia de 10.000 células/ tratamiento en un citómetro de flujo FACS Aria II (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) (λ_{ex} : 488 nm; λ_{em} : >650 nm, canal FL3). Los datos se analizaron empleando el Flowing Software v2.5.0 (Cell Imaging Core, Turku Centre for Biotechnology, Universidad de Turku, Finlandia). Para ello, se realizó un gráfico de puntos (dot plot) de complejidad (SSC) en función del tamaño (FSC) y se seleccionó una región con una población de características similares (~90% de las células analizadas). La misma se mantuvo sin modificaciones en el análisis de todos los tratamientos. Para cada una de las muestras, se realizó un histograma de eventos en función de la emisión en FL3 y se calculó la media geométrica, que fue utilizada como la intensidad de fluorescencia media (IFM) para cada réplica, en cada tratamiento.

2.6 Tinción de vacuolas autofágicas

Las células se cultivaron sobre cubreobjetos de 15 mm de diámetro, previamente flameados y dispuestos en cajas de 12 pocillos. Finalizados los tratamientos, las células se lavaron con PBS y se incubaron con una solución de monodansilcadaverina (MDC) 0,05 mM en PBS durante 10 min a 37°C (Biederbick et al., 1995). Luego, los cubreobjetos se lavaron cuatro veces con PBS, se montaron sobre portaobjetos utilizando medio de montaje PBS: Glicerol (1:1) y se observaron inmediatamente por microscopía de fluorescencia en un microscopio Nikon Eclipse E600 empleando filtros UV-2E/C (λ_{ex} : 330–380 nm; λ_{em} : 435–485 nm). Las imágenes se obtuvieron con una cámara digital Nikon CoolPix5000 empleando el objetivo de 100x.

2.7 Inmunocitoquímica

2.7.1 Procedimiento general

Las células se cultivaron sobre cubreobjetos de 10mm de diámetro, previamente flameados y dispuestos en cajas de 24 pocillos. Luego de los tratamientos, las muestras se lavaron dos veces con PBS, se fijaron con PFA 4%/ Sacarosa 4% (30 min, TA) y se lavaron 5 veces con PBS. Las células se permeabilizaron con PBST-Tritón X- 100 0,25% (10 min, TA), se lavaron 3 veces (5 min) con PBS, se bloquearon con BSA 1% en PBST (30 min, TA) y se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente diluido en BSA 1% en PBST (ON a 4°C). Al día siguiente, las células se lavaron 3 veces (5 min) con PBS y se incubaron con los anticuerpos secundarios acoplados a fluoróforos disueltos en BSA 1% en PBST (1 h, TA en oscuridad). Por último, los cubreobjetos se lavaron 3 veces con PBS y se montaron con PBS: Glicerol (1:1). En todos los casos se realizaron controles empleando el protocolo descrito, pero sin anticuerpo primario, para descartar unión inespecífica del anticuerpo secundario.

Las muestras se analizaron empleando un microscopio confocal Olympus FV300 (Olympus Optical Co., Tokyo, Japón) equipado con el sistema de adquisición de imágenes Fluoview 5.0 (Olympus Optical Co.). Se empleó un objetivo de inmersión Olympus 60x Plan Apo (apertura numérica: 1,4) y se realizó un escaneo secuencial de las muestras excitadas con Argón (λ : 488 nm) o Helio-Neón (λ :543 nm) para reducir el pasaje de la señal fluorescente de un canal a otro.

El coeficiente de co-localización fue calculado en cada célula empleando el plugin de ImageJ Intensity correlation análisis (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Previo a la cuantificación, la imagen fue corregida sustrayendo un fondo correspondiente a una región que fue considerada de autofluorescencia \pm 3 desvíos estándar.

2.7.2 Procedimientos específicos

Inmunomarcación de CatD y LC3

Para los ensayos de translocación de CatD al citosol y co-localización de LC3 con vesículas ácidas (VAs), se procedió acorde a lo descrito en la sección 2.7.1 con leves modificaciones. Previo al paso de fijación, las células se tiñeron con LysoTracker Red DND-99 200 nM en medio de cultivo durante 30 min a 37°C. En estos ensayos, las células no fueron permeabilizadas dado que los detergentes ensayados (Tritón X-100 y digitonina) condujeron a la pérdida de la marca del colorante. Se emplearon las diluciones de los anticuerpos: CatD 1:100, LC3 1:100; anti- cabra Alexa 488 1: 1.000 (para LC3) o Cy2 anti- conejo 1:1.000 (para CatD).

Liberación de citocromo c

Para evaluar la translocación del citocromo c desde la mitocondria al citosol, se procedió acorde a lo descrito en la sección 2.7.1, pero previo a la fijación, las células se macaron con Mitotracker Red CMXRos 75 nM en medio de cultivo durante 30 min a 37°C. Se emplearon las diluciones de los anticuerpos: citocromo c 1: 50; Cy2 anti- conejo 1: 1.000.

Localización nuclear de CatD

Para estudiar si la CatD co-localiza con el ADN nuclear, se procedió acorde a lo descrito en el apartado 2.7.1 con leves modificaciones. Una vez realizada la inmunomarcación de CatD (en las condiciones empleadas en *Marcación de CatD y LC3*), las células fueron incubadas durante 20 min a 37°C con RNasaA (100 µg/ µl en SSC) para degradar el ARN y prevenir su marcación con el agente intercalante. Luego, las células se lavaron dos veces en buffer SSC y se tiñeron con yoduro de propidio (1,5 µM en buffer SSC, 30 min, TA), se lavaron, se montaron y se visualizaron por microscopía confocal.

Co- Inmunomarcación de TOM-20 y LC3

Para estudiar la posible ocurrencia de eventos de mitofagia, se procedió acorde a lo descrito en 2.7.1, hasta el paso del bloqueo. En este caso, las muestras se bloquearon ON en agitación a 4°C con BSA 1% en PBST y al día siguiente se incubaron durante 1 h a 37°C con la solución de anticuerpos primarios (TOM-20 1:500 y LC3 1:100) en BSA 1% en PBST. Posteriormente, se realizaron 3 lavados (5 min) con PBS y se incubó el anticuerpo anti- cabra Alexa 488 (1:1.000) en BSA 1% en PBST, durante 1 h a TA en oscuridad. Luego de 3 lavados con PBS (5 min), los cubreobjetos se incubaron con el anticuerpo anti- conejo Alexa 532 (1:1.000) disuelto en BSA 1% en PBST (1 h, TA en oscuridad). Por último, los cubreobjetos se lavaron 3 veces con PBS, se montaron en PBS: Glicerol (1:1) y se analizaron por microscopía confocal.

2.8 Actividad enzimática de las caspasas-3/-7

Los niveles de activación de las caspasas efectoras -3 y -7 se analizaron por espectrofotometría midiendo la formación de pNA, generada por el clivaje del sustrato Ac-DEVD-pNA (N- Acetil- Asp- Glu- Val- Asp- p- nitroanilida).

Las células se sembraron en placas de 12 pocillos y cada tratamiento se realizó por triplicado. Luego, las células se lavaron 2 veces con PBS y se incubaron con 50 µl/ pocillo de buffer de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 7,4, EDTA 1 mM, EGTA 10 mM, digitonina 0,01 mM, Inhibidores de proteasas: benzamidina 63,86 µM, aprotinina 1,54 µM, PMSF 500 µM) durante 30 min a 37°C. Posteriormente, los triplicados de los lisados celulares correspondientes al mismo tratamiento se reunieron y se centrifugaron durante 20 min a 14.000 rpm. La concentración de proteínas en los sobrenadantes se determinó mediante el ensayo de Bradford (1976). Para ello, se tomaron 7 µl de muestra, se diluyeron en 14 µl de H₂O destilada y se agregó 1ml del reactivo de Bradford durante 15 min en oscuridad. Se transfirieron 200 µl de la suspensión a una caja de 96 pocillos y se midió la absorbancia a 595 nm en un lector de microplacas BIO-RAD Modelo 680. La concentración de proteínas se calculó empleando una curva patrón obtenida empleando seroalbúmina bovina. A

continuación, se tomaron 150 μ l de cada sobrenadante (80-100 μ g de proteína) y se incubaron con 146 μ l de buffer de incubación (HEPES 100 mM pH 7,5, glicerol 10%, EDTA 1 mM, DTT 10 mM; Inhibidores de proteasas: benzamidina 63,86 μ M, aprotinina 1,54 μ M, PMSF 500 μ M) y 4 μ l del sustrato Ac-DEVD-pNA (100 μ M) a 37°C. Se midieron las absorbancias a 405 nm luego de 2, 3 y 4 hs de incubación empleando un lector de microplacas BIO-RAD Modelo 680. La actividad específica de las caspasas 3/7, se expresó como el cociente entre la absorbancia a 405nm (en unidades arbitrarias) y los mg de proteínas. Los resultados que se detallan corresponden a los obtenidos para 4 hs de incubación.

2.9 Fraccionamiento subcelular

Para la obtención de las fracciones citosólica y lisosomal, las células se cultivaron en cajas de 100 mm. Una vez finalizados los tratamientos, las células se lavaron con PBS, se tripsinizaron y las suspensiones celulares se transfirieron a tubos Falcon. Se realizó una centrifugación a 1.000 rpm durante 5 min a TA y el pellet resultante se resuspendió en buffer MSHE pH 7,4 (manitol 0,22 M, sacarosa 70 mM, EGTA 0,5 mM, HEPES-KOH 2 mM; Inhibidores de proteasas: benzamidina 63,86 μ M, aprotinina 1,54 μ M y PMSF 500 μ M). Estas muestras se sonicaron a una amplitud de 40% durante 10 seg en un equipo Fisher Sonic Dismembrator modelo 500 (Fisher Scientific, Loughborough, Reino Unido) y luego se centrifugaron a 700 x g, durante 10min a 4°C. El sobrenadante post- nuclear se centrifugó a 10.000 x g durante 20 min. El sobrenadante proveniente de esta centrifugación constituye la fracción citosólica y el pellet contiene la fracción de membranas (lisosomas/ mitocondria). Para obtener una fracción libre de ARNm citosólico, este pellet se lavó con KCl 150 mM y se centrifugó durante 10 min a 10.000 x g a 4°C. El pellet obtenido y la fracción citosólica se emplearon para los experimentos de detección de CatD mediante western blot.

2.10 Western Blots

Los ensayos de western blot se realizaron acorde al protocolo descrito por (Alaimo et al., 2014).

2.10.1 Preparación de las muestras

En este caso las células se cultivaron en placas de 60 mm. Una vez finalizados los tratamientos, las células se lavaron con PBS, se levantaron con un *cell scraper* en 1 ml de PBS y se transfirieron a tubos eppendorf. La suspensión celular se centrifugó durante 5 min a 1.000 rpm, se lavó con PBS y se centrifugó nuevamente. El pellet resultante se resuspendió en 75 μ l de buffer de lisis para western (ver sección 1.4, soluciones para western blot) y se incubó durante 30 min en hielo. Posteriormente, las muestras se sonicaron durante 15 seg y se centrifugaron a 12.000 rpm durante 20 min a 4°C.

A continuación, se determinó la concentración de proteínas en los sobrenadantes empleando el método de Bradford (1976) como se describió anteriormente. Se tomaron entre 50- 80 μ g de proteínas, se llevaron a 30 μ l con buffer de lisis, se agregaron 15 μ l de buffer de cracking y se calentaron a 100° C durante 10 min.

2.10.2 Electroforesis de proteínas

Las muestras, en paralelo con un marcador de peso molecular (PageRuler Plus), se separaron en geles de poliacrilamida (gel concentrador: 3,8%; gel separador: 10-15%) en condiciones desnaturalizantes (buffer de electroforesis), a voltaje constante (120V) durante 1,5- 2 hs empleando el sistema MiniProtean III de BIO-RAD.

Una vez finalizada la separación electroforética, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa empleando buffer de transferencia en el dispositivo *MiniPROTEAN Transblot System* a un amperaje constante de 250mA, durante 2 horas en frío. Luego se realizó una tinción con Rojo Ponceau (Rojo Ponceau S 0,2%:ácido acético 1%) para comprobar la eficiencia de la transferencia.

Posteriormente, la membrana se lavó con TBS (Tris-HCl 50mM; NaCl 150mM; pH 8) para eliminar el colorante.

2.10.3 Inmunodetección

Luego de la transferencia, las membranas se incubaron en una solución de bloqueo durante 90 min a TA y luego en una solución de anticuerpo primario ON a 4°C.

Se realizaron dos lavados con TBST y dos con TBS (10 min) y posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente (1 h, TA). A continuación, se realizaron 3 lavados con TBST y uno con TBS (10 min). Todas las incubaciones con anticuerpos y lavados se realizaron con agitación.

Las membranas se revelaron empleando el reactivo quimioluminiscente ECL. Para ello, se mezclaron 1 ml de la solución A con 1 ml de la solución B (ECL, sección 1.4) y la emisión de luminiscencia fue detectada empleando el analizador de imágenes Fujifilm Luminiscent Analyser (FujiFilm Co.,Tokio, Japón). La captura de imágenes se realizó mediante el software LAS-1000 pro (FujiFilm).

La intensidad de las bandas se cuantificó empleando el programa ImageJ.

2.11 Estudios *in vivo*

2.11.1 Animales

Se emplearon ratas macho *Sprague-Dawley* de 150-170g (n=4) provistas por el bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME, UBA- CONICET, certificado de seguridad de la NIH #A5072-01).

Los animales recibieron una dieta balanceada y agua *ad libitum* y fueron mantenidos en condiciones controladas de temperatura (22°C) y humedad (50%) con ciclos de 12 horas de luz/ 12 horas de oscuridad (encendido de las luces: 7:00 am).

Los experimentos se realizaron de acuerdo a la “Guía para el cuidado y utilización de animales de laboratorio” del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (NIH) y fueron aprobados por el Comité de Ética del IByME.

La metodología empleada en los experimentos contempló el minimizar el sufrimiento de los animales y reducir el número de ratas utilizadas.

2.11.2 Modelo de toxicidad aguda por Mn

Los animales fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal de xilacina (50mg/ ml): ketamina (20mg/ml) (1:4, 1ml) en solución salina. Para realizar las inyecciones intra- estriatales, las ratas se colocaron en un marco estereotáxico (David Kopf Stereotaxic Instruments, Tujunga, CA, USA) con la barra de los incisivos situada a -3,3 mm respecto a la línea interauricular. Previo a la realización de la trepanación, se rasuró la cabeza y se identificaron las coordenadas correspondientes a la zona del *striatum* donde se realizó la inyección: Anteroposterior: -0,2, Lateral: ± 3 , Ventral: -5 con respecto al bregma. Se empleó el protocolo descrito por Alaimo et al. (2014) inyectando en el hemisferio izquierdo 1 μmol de MnCl_2 (1 μl) y en el hemisferio derecho, que fue utilizado como control, 1 μl de solución salina (NaCl 0,9% en agua bidestilada).

Las inyecciones se realizaron con una jeringa Hamilton a una velocidad promedio de 1 μl / 40seg y luego la aguja se mantuvo durante 2 min para evitar el reflujo de la solución. Finalmente, se cerró la piel con puntos sueltos y se colocó a los animales en una jaula hasta que despertaran de la anestesia y se observó su comportamiento. Transcurridos 7 días, las ratas fueron perfundidas y sacrificadas.

2.11.3 Perfusión de los animales

Los animales fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal de xilacina (50mg/ ml): ketamina (20mg/ml) (1:4, 1ml) en solución salina y perfundidos por vía transcardíaca con 20 ml de solución salina, seguido de 40ml de PFA 4% (preparado en buffer fosfato 0,1M, pH 7,4). Los cerebros fueron removidos y fijados en PFA 4% a 4°C durante 24 hs. Transcurrido este tiempo, los cerebros fueron

lavados dos veces con PBS y mantenidos en dicho buffer hasta el momento de ser utilizados.

2.11.4 Corte y preservación del tejido cerebral

Se realizaron cortes coronales de 50 μm de espesor empleando un vibrátomo Integraslice 7550PSDS (Campden Instruments, Loughborough, Reino Unido) (Frecuencia: 70 Hz, amplitud 0,8 mm, velocidad: 0,20 mm/s).

Las secciones obtenidas se colocaron en libre flotación en placas de 24 pocillos conteniendo una solución criopreservadora (25% glicerol, 25% etilenglicol, 50% buffer fosfato 0,1 M, pH 7,4) a -20°C hasta su uso.

2.11.5 Inmunohistoquímica

Protocolo general

Los cortes de tejido se colocaron en pocillos de una placa de 24 pocillos y se lavaron 3 veces con PBS durante 15 min. Luego, los cortes se calentaron a 85°C en buffer citrato (0,01M, pH 6) en un baño térmico para desenmascarar el antígeno, se lavaron 2 veces con PBS durante 5 min y se bloquearon con suero de cabra 1% en PBS- Tritón X-100 0,1% durante 20 min a 37°C en agitación. Los anticuerpos primarios fueron disueltos en suero de cabra 1% en PBS-Tritón X-100 0,1% (CatD 1:150, GFAP 1:400, NeuN 1:250) e incubados ON a 4°C en libre flotación y agitación. Posteriormente, las muestras se lavaron 3 veces (5 min) con PBS y se incubaron durante 1 h a TA con los anticuerpos secundarios correspondientes, disueltos en suero de cabra 1% en PBS-Tritón X-100 0,1%. Se realizaron 3 lavados con PBS (5min), los cortes se colocaron en portaobjetos gelatinizados, se montaron y se observaron al microscopio. En todos los casos se realizaron controles empleando el protocolo descrito, pero sin anticuerpo primario, para descartar la unión inespecífica del anticuerpo secundario.

Inmunofluorescencia

Los cortes se montaron en Fluoromount G (Birmingham, AL, USA) y fueron analizados en un microscopio confocal Nikon Eclipse E800 C1 (Alexa 488: λ_{ex} : 488nm, λ_{em} : 515- 530nm; Alexa 555: λ_{ex} : 544nm, λ_{em} : LP- 570nm) o en un microscopio Olympus IX71 (Alexa 488: λ_{ex} : 460- 495nm, λ_{em} : 510- 550nm; Alexa 555: λ_{ex} : 510- 530nm, λ_{em} : LP 590nm), según el caso.

Revelado con DAB

Se siguió el protocolo general de inmunohistoquímica descripto, con leves modificaciones. Previo al desenmascaramiento del antígeno, se inhibieron las peroxidasas endógenas incubando los cortes con 1% H₂O₂ en una solución 1:1 de metanol en PBS (10 min, TA) y se lavaron dos veces con PBS (5 min).

Luego de la incubación con el anticuerpo secundario biotinilado, se realizaron 3 lavados con PBS y se incubaron con una dilución 1:100 del reactivo ABC (Avidina DH + Peroxidasa de rábano Biotinilada; Vector Laboratories) en PBS durante 30 min a TA y se realizaron dos lavados con PBS (5 min). Las secciones se incubaron con una solución del cromógeno DAB 2 mM y H₂O₂ 0,5 mM en buffer Tris- HCl 0,1 M durante 3- 5 min a TA y luego se realizaron dos lavados rápidos en PBS. Las muestras se colocaron en portaobjetos gelatinizados, se dejaron secar ON a TA y se deshidrataron empleando un gradiente creciente de etanol (96%: 2 veces durante 1 min; 100%: 2 veces durante 2 min) y luego xilol (2 veces durante 3 min). Por último, las secciones fueron montadas con Bálsamo de Canadá y analizadas en un microscopio óptico Nikon Eclipse E200.

Las imágenes obtenidas se aleatorizaron empleando el macro Shuffler 1.0 para ImageJ. La cuantificación del área inmunoreactiva y de la intensidad media de la marca se llevó a cabo por medio del programa ImageTool. Las imágenes aleatorizadas se transformaron a escala de grises, se seleccionó el área inmunoreactiva (la *substantia nigra* o las células en el *striatum*) y se establecieron los umbrales que condujeron a la selección del área considerada positiva y a la cuantificación de los datos de interés.

2.12 Análisis estadístico

Los experimentos se realizaron por triplicado, salvo que se mencione lo contrario. Los resultados se expresan como medias \pm error estándar (SEM). Las comparaciones entre tratamientos se realizaron mediante la prueba t de Student, ANOVA de un factor con contrastes *a posteriori* de Newman-Keuls o bien ANOVA de dos factores con contrastes *a posteriori* de Bonferroni. Para el los análisis estadísticos se empleó el programa GraphPad Prism 4 (San Diego, CA, USA).

Resultados

Capítulo 1

Efecto del Mn sobre el sistema de vesículas
ácidas

1.1 Generalidades

Durante mucho tiempo, los lisosomas han sido considerados como meros procesadores de desechos de la célula, ejecutando la degradación y el reciclaje de los residuos celulares. Sin embargo, en la actualidad, existe evidencia concluyente que indica que los lisosomas llevan a cabo un amplio espectro de funciones y están involucrados en procesos celulares fundamentales como la secreción, la reparación de la membrana plasmática, la señalización y el metabolismo energético. Además, el rol esencial de los lisosomas en las vías apoptóticas y autofágicas ubica a estas organelas como actores centrales en varios eventos celulares de significativa implicancia en la salud y la enfermedad (Settembre et al., 2013).

En nuestro laboratorio, hemos encontrado evidencias que demuestran que el Mn dispara la muerte celular apoptótica a través de mecanismos mediados por ROS y que los antioxidantes ácido acetilsalicílico (ASA), melatonina (MLT), glutatión (GSH) y N-acetilcisteína (NAC) son capaces de prevenir dicha muerte (Alaimo et al., 2011). Está ampliamente aceptado que la mitocondria, y la cadena de transporte de electrones en particular, constituyen el sitio primario de generación de ROS y, a la vez, el blanco principal del daño oxidativo. Sin embargo, la generación de especies reactivas no se encuentra restringida a la mitocondria. En efecto, los lisosomas representan un compartimento ácido rico en Fe redox activo y equivalentes de reducción (provistos p. ej. por la oxidación de la cisteína). Este ambiente resulta favorable para la ocurrencia de reacciones de tipo Fenton que conducen a la generación de OH^\bullet , un radical altamente reactivo. Además, las membranas lisosomales poseen un alto contenido de ácidos grasos poli-insaturados que constituyen un blanco del ataque de las ROS favoreciendo la peroxidación lipídica y la PML (Zdolsek y Svensson, 1993; Terman et al., 2006).

El sitio que ocupan los lisosomas en las vías de señalización de muerte no ha sido completamente elucidado. Sin embargo, la mayor parte de los reportes coincide, a grandes rasgos, con los modelos propuestos por Guicciardi et al. (2000) y por Zhao et al. (2003), en los cuales los lisosomas ocupan una posición apical, río arriba de la mitocondria y dependen de esta última para la ejecución de la muerte (**Fig. 18A**).

Por otra parte, Baumgartner et al. (2007) reportaron que las vías mitocondrial y lisosomal podrían funcionar en paralelo y activar caspasas diferentes (**Fig. 18B**).

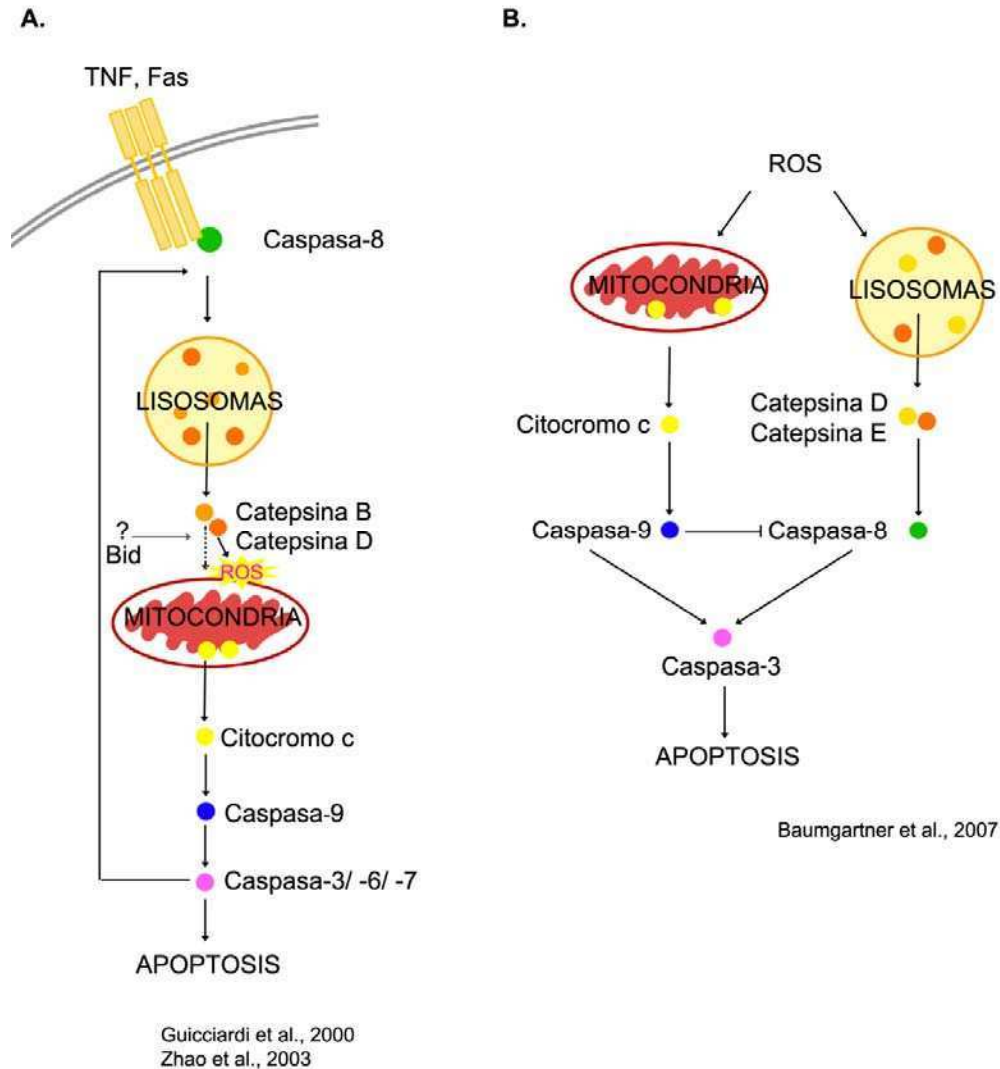


Figura 18. Rol de los lisosomas y la mitocondria en la apoptosis. **A.** Esquema simplificado de los modelos propuestos por Guicciardi et al. (2000) y Zhao et al. (2003). Para Guicciardi, la señalización mediada por el receptor de TNF- α lleva a la activación de bajos niveles de caspasa-8, que resultan insuficientes para desencadenar la apoptosis pero logran inducir un mecanismo de amplificación empleando primero los lisosomas y luego la mitocondria [similar a lo descrito por Scaffidi et al. (1999) para las células tipo II]. Estos niveles de caspasa-8 activada promueven la translocación de la CatB al citosol, la cual por medio del clivaje de sustratos citosólicos aún no identificados (probablemente Bid), induce la liberación de citocromo c de la mitocondria llevando a la activación de la caspasa-9 y luego a la de las caspasas efectoras -3/-6/-7. Estas últimas generan un *feedback* positivo conduciendo a una activación mayor de la caspasa-8. Zhao et al. (2003), agregan a estos antecedentes, que las CatB y D liberadas de los lisosomas son capaces de inducir directamente la generación de ROS

por parte de la mitocondria, generando un daño oxidativo que produce la translocación de citocromo c al citosol. Además, estos últimos autores describen evidencia que apoya el hecho de que los receptores de muerte (Fas o TNF) y la caspasa-8 serían responsables de la liberación de catepsinas, las cuales clivarían a Bid llevando al daño mitocondrial. **B.** Modelo propuesto por Baumgartner et al. (2007), según el cual la activación de las vías mitocondrial y lisosomal ocurre en forma paralela y llevan al clivaje de las caspasas-9 y -8, respectivamente. La activación de la caspasa-9 inhibe parcialmente a la caspasa-8 y río abajo de la caspasas iniciadoras ocurriría la activación de la caspasa-3 y la apoptosis.

Además del daño directo a los lisosomas, las ROS pueden afectar proteínas y otras organelas y llevar a la activación de la autofagia como un mecanismo de supervivencia celular (Kiffin et al., 2006).

Teniendo en cuenta estos antecedentes nos resultó relevante **evaluar si el Mn inducía daño a los lisosomas y, de ser así, si dicho evento desempeñaba un rol activo en la muerte de las células C6 de glioma de rata. Por lo tanto, el enfoque estuvo dirigido al estudio de la posible participación de la vía lisosomal en la apoptosis inducida por Mn y al rol potencial de la autofagia en este contexto celular.**

1.2 Estudios de citotoxicidad

Las células C6 de glioma fueron establecidas a partir de un tumor de rata inducido mediante inyecciones de N-nitrosometilurea (Benda et al., 1968). Tiffany-Castiglioni et al. (1988) evaluaron y compararon el efecto de la exposición a plomo (Pb) en células gliales en cultivo primario y en células C6. Sus resultados indicaron que, en ciertos aspectos, esta última línea celular se comporta de modo semejante a la astroglia y oligodendroglia en cultivo, constituyendo un modelo adecuado para el estudio de ciertos eventos de toxicidad por metales. En nuestro laboratorio hemos demostrado que el Mn genera muerte celular apoptótica mediada por ROS, con activación de las caspasas-3/7, clivaje de PARP-1, condensación y fragmentación de la cromatina, aumento en los niveles de Bax, fragmentación de la red mitocondrial, pérdida del $\Delta\psi_m$ y liberación de citocromo c de la mitocondria tanto en células C6 (Alaimo et al., 2011) como en astrocitos de corteza cerebral de rata en cultivo primario (Gonzalez et al., 2008). Estos resultados sugieren que las células C6

responden al daño inducido por Mn de modo similar a los astrocitos en cultivo, avalando la propuesta de Tiffany-Castiglioni et al. (1988). Por lo tanto, decidimos continuar trabajando con esta línea celular para realizar el presente trabajo de tesis.

Evidencias obtenidas por Alaimo et al. (2011), demostraron que la incubación de células C6 con MnCl_2 750 μM durante 24 hs en medio libre de suero (MLS) genera un ~50% de muerte celular. La captación de Mn por parte de las células en las condiciones empleadas fue determinada mediante espectrometría de absorción atómica (Cortina et al., resultados no publicados) y los niveles intracelulares detectados se encontraban dentro del rango fisiológico reportado para células gliales de corteza cerebral de embrión de pollo (Tholey et al., 1988). Por otra parte, por exposición a Mn durante 24 hs en medio suplementado con 10% SFB (MSFB) no se observó muerte celular medida por reducción de MTT y retención de RN (Alaimo et al., 2011). Esto podría deberse, entre otros factores, a que la unión del metal a proteínas del plasma tales como albúmina, Tf y α 2-macroglobulina disminuya su concentración efectiva (Rabin et al., 1993). La **Fig. 19** muestra imágenes de células C6 luego de 24 hs de exposición a Mn en MSFB o MLS donde pueden apreciarse los efectos descriptos.

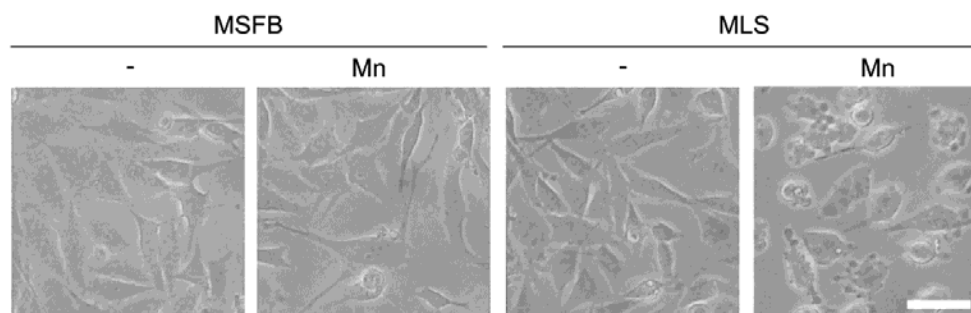


Figura 19. Toxicidad del Mn en células C6. Las células se incubaron con MnCl_2 750 μM en MSFB o MLS durante 24 hs y se observaron en campo claro en un microscopio invertido de contraste de fases Nikon Eclipse TS100. Se observa la presencia de células apoptóticas con el característico burbujeo de la membrana plasmática para la exposición a Mn en MLS. Barra de escala: 50 μm .

Para evaluar el daño citotóxico inducido por Mn en función del tiempo de exposición se emplearon dos ensayos de viabilidad: el de reducción de MTT y el de

retención de RN. Dado que el Mn afecta una amplia gama de funciones celulares, el uso de diferentes ensayos de citotoxicidad permite tomar como medida de viabilidad parámetros fisiológicos distintos. Mientras que el MTT determina la citotoxicidad de acuerdo al metabolismo celular, el RN lo hace en función de la integridad de la membrana lisosomal (Materiales y Métodos 2.2 y 2.3). Como se mencionó, la incubación con Mn durante 24 hs en MSFB no genera muerte celular; por lo tanto, los ensayos de citotoxicidad en función del tiempo se realizaron en MLS (Fig. 20).

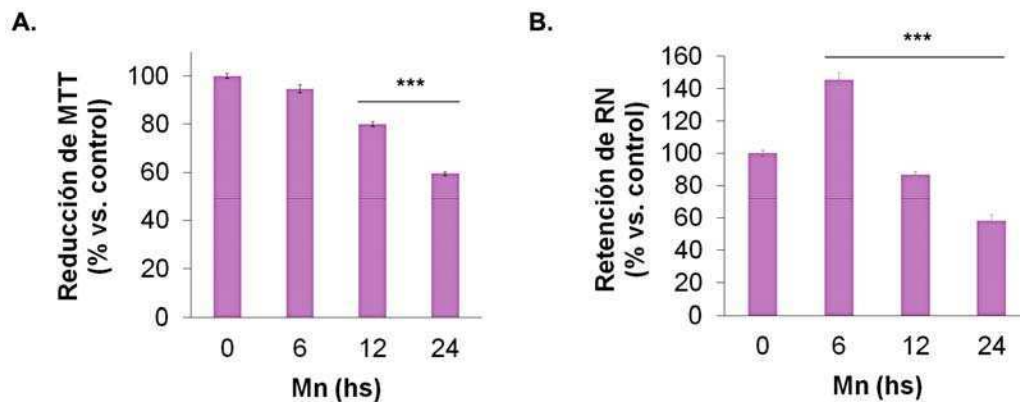


Figura 20. Efecto citotóxico del Mn. Las células se incubaron con MnCl_2 750 μM en MLS durante 6, 12 o 24 hs y la viabilidad celular se midió mediante las técnicas de reducción de MTT (A) o retención de RN (B). Se consideró el control de cada tiempo como 100% y los datos se expresaron como porcentaje de dicho control (media \pm SEM). *** $p < 0,001$ con respecto al control de cada ensayo. Estadístico: ANOVA de un factor con contrastes de Newman-Keuls.

Los resultados obtenidos mediante ambos ensayos mostraron una disminución significativa en la viabilidad celular a partir de las 12 hs de incubación con Mn (12 hs: MTT: 20 ± 1 %, NR: 13 ± 2 %; 24 hs: MTT: 41 ± 1 %, NR: 42 ± 4 %; $p < 0,001$). Sorprendentemente, la incubación durante 6 hs generó un aumento en la retención de RN (45 ± 4 %; $p < 0,001$). Esto resultó interesante teniendo en cuenta el hecho de que luego de dicha exposición, no se observan diferencias en los ensayos de microscopía (resultados no mostrados) ni en la viabilidad medida por MTT.

Para obtener mayor información acerca del efecto producido por el Mn sobre la retención de RN, las células se incubaron con distintas concentraciones del metal y se midió la retención del colorante (**Fig. 21**).

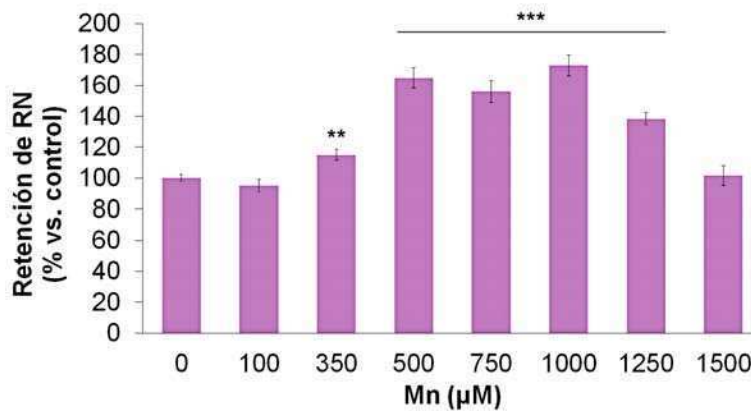


Figura 21. Retención de RN en función de la concentración de Mn. Las células se incubaron con distintas concentraciones de $MnCl_2$ durante 6 hs en MLS y se midió la retención de RN. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. control. Estadístico: ANOVA de un factor con contrastes de Newman-Keuls.

El Mn indujo un aumento en la retención del colorante entre 350- 1250 μM (350 μM : $15 \pm 4\%$, $p < 0,01$; 500 μM : $65 \pm 7\%$, 750 μM : $56 \pm 7\%$, 1000 μM : $73 \pm 7\%$, 1250 μM : 38 ± 4 , $p < 0,001$). Para las concentraciones de Mn en el rango de 500- 1000 μM la retención del colorante fue mayor y no se observaron diferencias significativas entre los valores correspondientes. Estos resultados sugieren que **el metal genera alteraciones celulares que llevan a un aumento en la retención del colorante en los lisosomas.**

1.3 Integridad de las vesículas ácidas

1.3.1 Marcación con LysoTracker Red DND-99

Con el fin de estudiar si el Mn induce alteraciones morfológicas en las vesículas ácidas (VAs), se empleó el colorante fluorescente LysoTracker Red DND-99. Este es un fluoróforo unido a una base débil que a pH neutro se encuentra parcialmente

protonada y es capaz de atravesar las membranas libremente. A pH ácido, la base se protona y queda retenida en la vesícula. Se evaluó la morfología de las VAs por microscopía de fluorescencia luego de 6 o 24 hs de exposición a Mn, tanto en MSFB como en MLS. La incubación con el metal indujo la formación de vesículas de mayor tamaño para todas las condiciones ensayadas, raramente observadas en las células control (**Fig. 22A**, flechas blancas).

Como ya se mencionó, el contexto celular, así como las necesidades de degradación y el tipo de material a eliminar afectan el número y tamaño de los lisosomas. Si bien existe una gran variabilidad según el tipo celular, el tamaño suele estar entre 0,1- 1,2 μm y se han observado lisosomas de hasta varias micras en células con alta capacidad degradativa (como por ejemplo, macrófagos). Además, el número y/o tamaño pueden aumentar dramáticamente en distintas condiciones patológicas, entre ellas en un modelo de enfermedad de Huntington y en la enfermedad de Alzheimer (Kühnel, 2003; Saftig, 2006; Nixon et al., 2008; Heng et al., 2010). Para obtener mayor información acerca del tamaño de las VAs en las células C6 y el efecto que tiene el Mn sobre el mismo, se tomaron fotografías y se calculó el diámetro utilizando el programa Image Tool (**Fig. 22B**). Se encontró que tanto en MSFB como en MLS el Mn genera vesículas de tamaño entre ~ 2 -4 veces mayor que la media salvo para la condición 6hs en MSFB, en coincidencia con lo observado en la **Fig. 22A**. Para medir la relevancia de dicho evento en la población celular, se cuantificó el número de células que presentaban VAs hinchadas luego de la incubación con Mn (**Fig. 22C**).

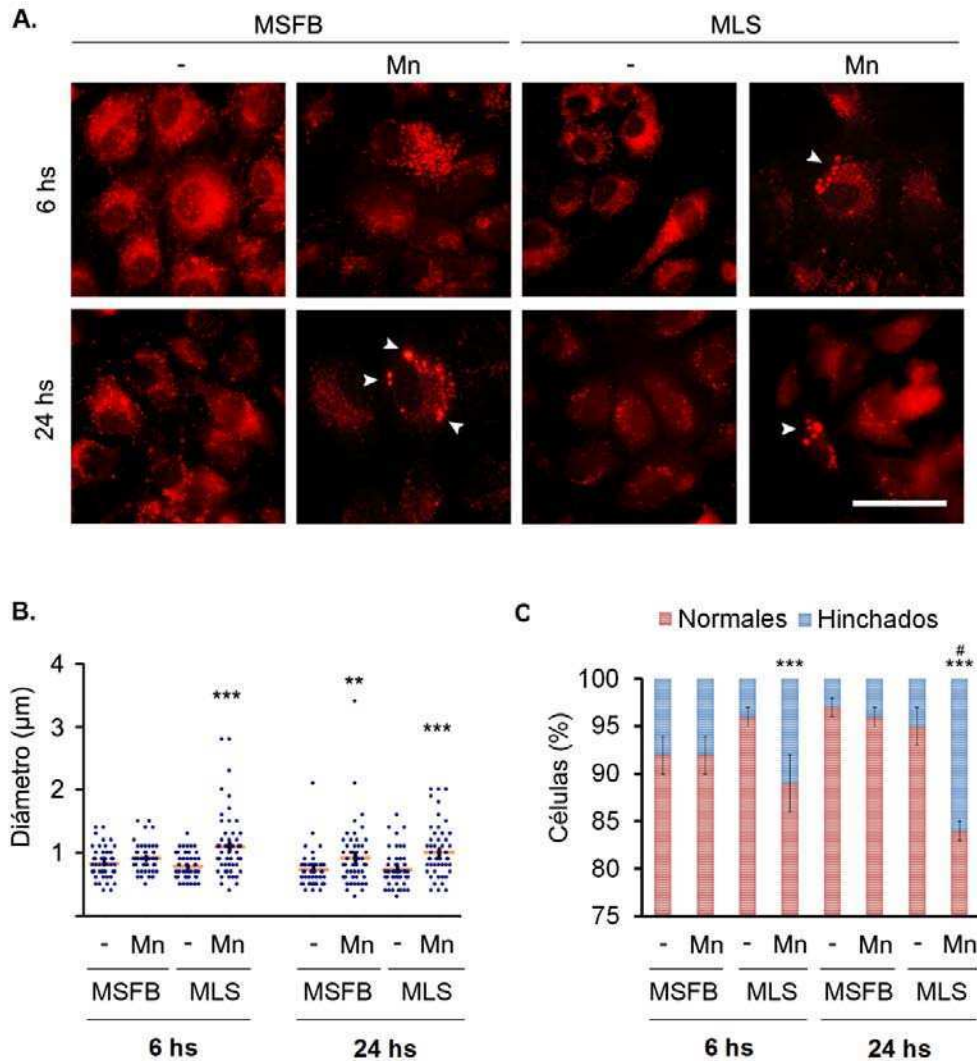


Figura 22. Tamaño de las VAs. Las células se incubaron durante 6 o 24 hs con Mn en MSFB o MLS, se tiñeron con LysoTracker Red DND-99 (50nM, 30 min) y se visualizaron por microscopía de fluorescencia. **A.** Se muestran imágenes representativas de cada uno de los tratamientos. Las flechas blancas señalan VAs de tamaño aumentado. Barra de escala: 50 µm. **B.** Cuantificación del diámetro de las VAs en células control o expuestas a Mn empleando el programa Image Tool (n=52). **C.** Cuantificación del número de células presentando VAs hinchadas (n=1000). Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio Nikon Eclipse E600 (λ_{ex} : 528- 553nm; λ_{em} : 600- 660nm). Estadístico: ANOVA de dos factores con contraste *a posteriori* de Bonferroni. **p<0,01, ***p<0,001 con respecto a su control, #p<0,05 respecto a la incubación con Mn durante 6 hs.

El Mn generó un aumento significativo en el número de células presentando VAs hinchadas en MLS luego de 6 y 24 hs ($11 \pm 3\%$ y $16 \pm 1\%$, respectivamente; $p<0,001$), con un efecto mayor para 24 hs de incubación ($p<0,05$). En el caso de la exposición

en MSFB (24 hs), se encontró un aumento en el diámetro de las VAs (**Fig. 22B**) pero no en la cantidad de células afectadas (**Fig. 22C**). Esto podría deberse a la diferencia de criterios asignados para la medición, en cada ensayo en particular.

La incógnita que inmediatamente subyace al resultado anterior se refiere a si las VAs de mayor tamaño son el resultado de un aumento en el volumen o de una fusión de las mismas. Si bien no resulta concluyente, en numerosas ocasiones pudo observarse una aglomeración de VAs convergiendo hacia las de mayor tamaño, lo que lleva a suponer que, al menos en parte de los casos, podrían estar ocurriendo procesos de fusión de vesículas (**Fig. 23**).

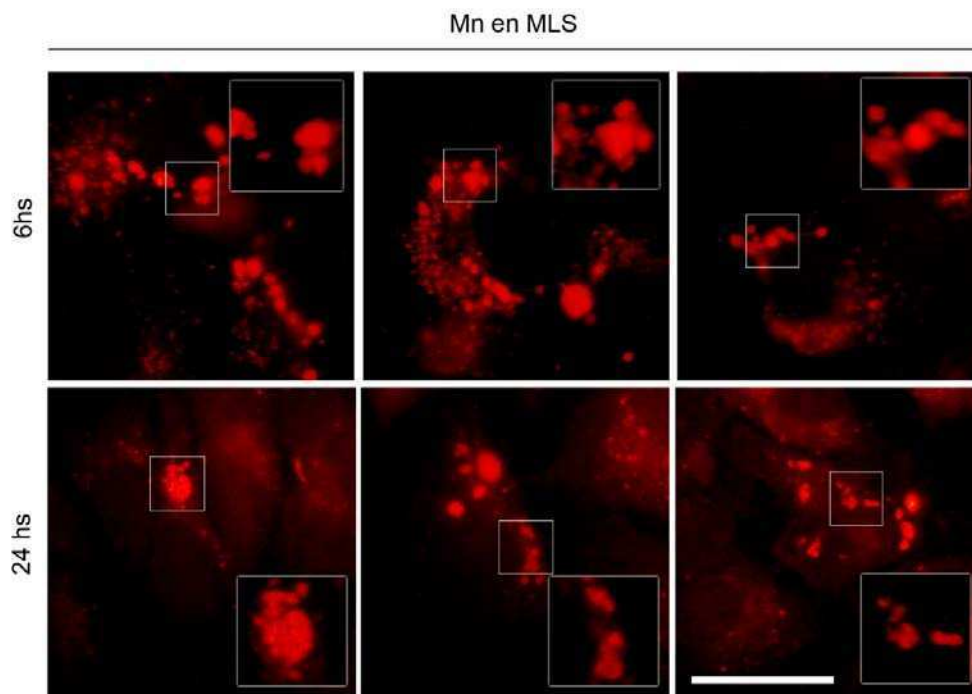


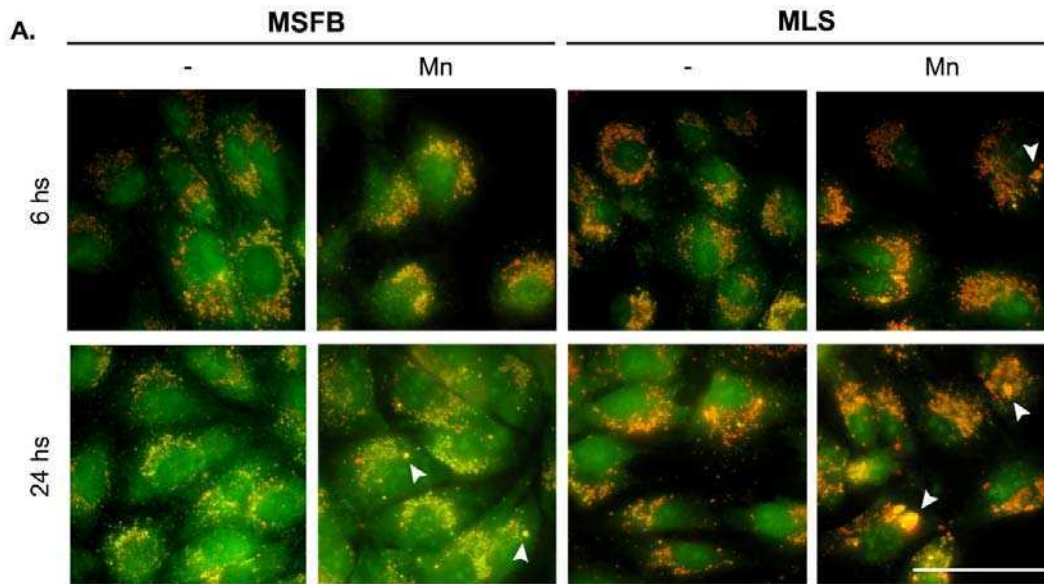
Figura 23. Distribución de VAs. Las células se incubaron durante 6 o 24 hs con Mn en MLS, se tiñeron con LysoTracker Red DND-99 (50nM, 30 min) y se visualizaron por microscopía de fluorescencia. Si bien en la mayoría de los casos las VAs de mayor tamaño se marcaron homogéneamente, frecuentemente se pudo observar una aglomeración de vesículas convergiendo en un área pequeña. Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio Nikon Eclipse E600 (λ_{ex} : 528- 553nm; λ_{em} : 600- 660nm). Los recuadros en la imagen delimitan el área ampliada. Ampliación: 2X. Barra de escala: 25 μ m.

1.3.2 Tinción con naranja de acridina

La naranja de acridina es un colorante vital que tiñe el citoplasma y el núcleo de color verde y se acumula en las VAs confiriéndoles una coloración rojo brillante. La intensidad de fluorescencia roja es proporcional a la acidez y/ o al volumen total de las vesículas ácidas en cada célula (Canónico y Bird, 1969; Paglin et al., 2001). Jiang et al. (2009) han descrito un protocolo por el cual es posible monitorear la generación de VAs marcadas con naranja de acridina mediante citometría de flujo. Si bien los autores realizaron su trabajo en el contexto de la activación de la autofagia y la formación de autolisosomas (las vesículas ácidas que se ven incrementadas al activarse la vía), en nuestro modelo esto podría reflejar tanto la ocurrencia de autofagia como de posibles alteraciones lisosomales. Por lo tanto, empleamos esta técnica para extender los resultados obtenidos en la **Fig. 22** y medir no sólo el aumento en el tamaño de las vesículas, sino también el incremento total en el volumen de VAs en la célula (incluyendo la generación de vesículas normales). Las células fueron expuestas a Mn durante 6 o 24 hs en MSFB o MLS, se tiñeron con naranja de acridina e inmediatamente se observaron por microscopía de fluorescencia (**Fig. 24A**) o se analizaron por citometría de flujo (**Fig. 24B**). En la **Fig. 24A** se observa que la incubación con Mn en todas las condiciones ensayadas (MSFB y MLS, 6 y 24 hs) generó un aumento en la cantidad de vesículas marcadas y/o en la intensidad de coloración de las mismas. Además, la exposición durante 24 hs en MLS condujo a una marcación difusa de las VAs, lo que estaría relacionado con el daño a la membrana lisosomal y la liberación del colorante. Se observó también la formación de vacuolas de mayor tamaño (Flechas blancas, **Fig. 24A**) en correspondencia con lo observado mediante tinción con Lysotracker Red DND-99 (Flechas blancas, **Fig. 22A**). Por otra parte, la privación de suero por si misma aumentó tanto la coloración de las vesículas como su número.

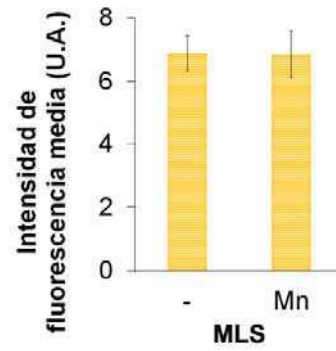
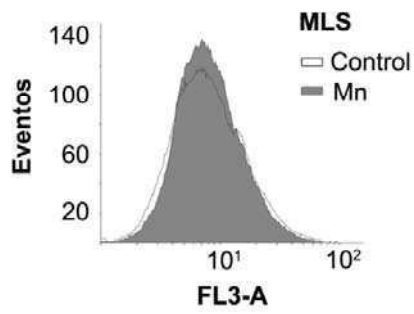
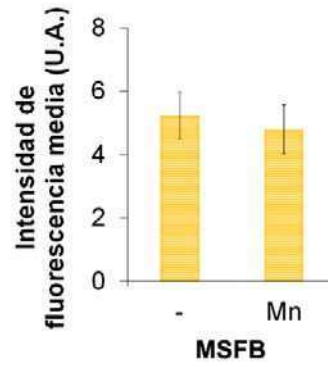
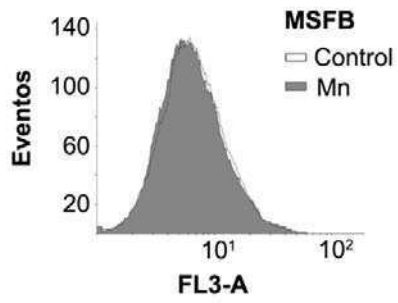
Los datos obtenidos en los experimentos de citometría de flujo (**Fig. 24B**) muestran que el Mn (24 h de incubación) genera un incremento en la intensidad de fluorescencia media (IFM) de las células en el canal FL3-A, lo que indica mayor coloración roja de las células marcadas y un aumento en el volumen total de VAs. Este efecto puede observarse tanto en la incubación con Mn en MSFB ($33 \pm 10\%$,

p<0,05) como en MLS (15 ± 6%, p<0,05). La privación de suero por si misma generó un aumento en la IFM respecto al control con suero (111 ± 16%, p<0,001) sugiriendo que, en estas condiciones, las células podrían estar desencadenando procesos autofágicos, tal como ha sido reportado en otros trabajos (Mitchener et al., 1976; Punnonen et al., 1992).



B.

I. 6 hs



II. 24 hs

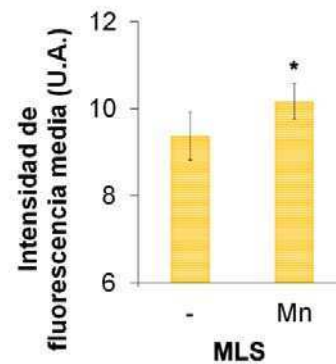
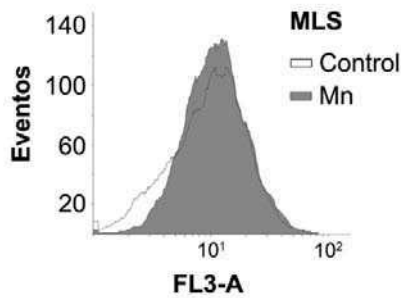
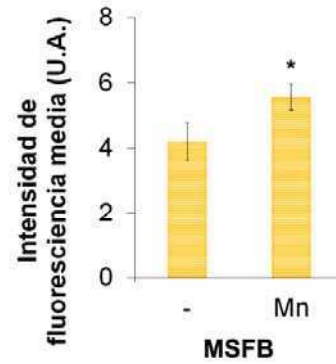
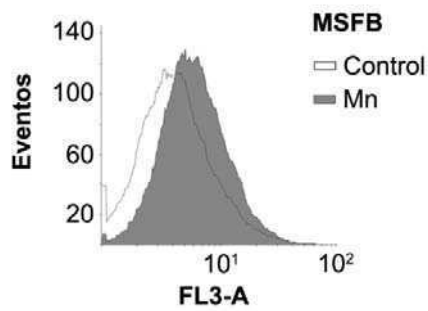


Figura 24. Tinción de VAs con naranja de acridina. Las células se incubaron durante 6 o 24 hs con Mn en MSFB o MLS y luego se tiñeron con naranja de acridina (1µg/ml). **A.** Las VAs se observaron por microscopía de fluorescencia empleando un microscopio Nikon Eclipse E600 (λ_{ex} : 465- 495nm, λ_{em} : LP 515nm). Las flechas señalan vesículas de tamaño aumentado. Barra de escala: 50 µm. **B.** Las células se analizaron por citometría de flujo (λ_{ex} : 488 nm, λ_{em} : >650 nm, canal FL3-A). Se cuantificaron 10.000 eventos (n=2). *p<0,05 con respecto al control. Estadístico: Prueba t de Student.

En la **Tabla 1** se resumen los resultados obtenidos en cuanto a las alteraciones detectadas en las VAs empleando diferentes metodologías. Si bien existen diferencias en las condiciones de incubación para las cuales cada colorante fue capaz de registrar cambios, los resultados indican que **el Mn genera alteraciones celulares que conducen a un aumento en el tamaño y en el volumen de las VAs.**

		6 hs		24 hs	
		MSFB	MLS	MSFB	MLS
Rojo Neutro	Aumento en la retención	-	✓	✗	✗
Lysotracker Red DND-99	Aumento en el diámetro de las VAs	✗	✓	✓	✓
	Aumento en el número de células con VAs hinchadas	✗	✓	✗	✓
Naranja de acridina	Aumento en la marca roja de VAs por microscopía	✗	✓	✓	✓
	Aumento en el volumen total de VAs por citometría de flujo	✗	✗	✓	✓

Tabla 1. Resumen de los resultados obtenidos. Se muestran los ensayos para los cuales el Mn generó un incremento en la medición del parámetro evaluado (✓) y para los que no se encontraron diferencias (X). La retención de RN luego de la exposición a Mn durante 24 hs en MSFB fue reportada por Alaimo et al. (2011).

En general, la evidencia acumulada indica que los cambios detectados en las VAs pueden ser el producto de la activación de la autofagia normal así como de la ocurrencia de enfermedades que conducen a la disfunción lisosomal generando impedimentos en la degradación.

La autofagia conduce a un estado de mayor actividad degradativa en la célula, para lo que se requiere la formación de autolisosomas y, como consecuencia, un aumento en el volumen total de organelas ácidas (Paglin et al., 2001; Jiang et al., 2009). Estas VAs suelen tener tamaños de entre 0,5– 1,5 µm aunque en ciertos tipos celulares pueden alcanzar tamaños mayores (Mizushima et al., 2002). Por otra

parte, la presencia de vacuolas de gran tamaño es una característica típica de una variedad de desórdenes que se encuentran relacionados a la acumulación de productos de deshecho (Nixon et al., 2008).

Se ha reportado que el aumento en el tamaño lisosomal incrementa la tensión y la susceptibilidad de su membrana y representa un riesgo para la estabilidad de estas vesículas (Ono et al., 2003). Teniendo en cuenta que el daño a los lisosomas conduce a la muerte celular, resultó relevante evaluar los procesos que podrían estar involucrados en la generación de VAs de mayor tamaño.

1.4 Efecto de las ROS sobre el tamaño de las VAs

El estrés oxidativo y el daño inducido por ROS juegan un rol destacado en la disfunción lisosomal dado que se encuentran relacionados con la PML, la inhibición de enzimas lisosomales y la generación de alteraciones en la vía autofágica. En particular, la desestabilización de la membrana lisosomal como consecuencia de una generación aumentada de ROS ocurre a través de una peroxidación masiva de los lípidos de membrana (Pivtoraiko et al., 2009). Se ha propuesto que la toxicidad del Mn esta mediada por ROS (Erikson et al., 2004; Zhang et al., 2004; Tamm et al., 2008; Yang et al., 2009; Xu et al., 2013; Fernsebner et al., 2014), y como ya se mencionó, esto ocurre también en nuestro modelo experimental (Alaimo et al., 2011).

Evaluamos entonces si las alteraciones morfológicas inducidas por Mn en las VAs estaban mediadas por ROS, empleando los antioxidantes MLT y GSH. Las concentraciones se seleccionaron de acuerdo a trabajos previos de nuestro laboratorio que demostraron que dichos antioxidantes previenen la muerte celular inducida por la exposición a Mn durante 24 hs en MLS (Alaimo et al., 2011). Por lo tanto, las células se pre- incubaron 1 h con MLT 0,5 mM o GSH 1 mM, se expusieron a Mn (6 hs, MLS) y se tiñeron con Lysotracker Red DND-99 (**Fig. 25**).

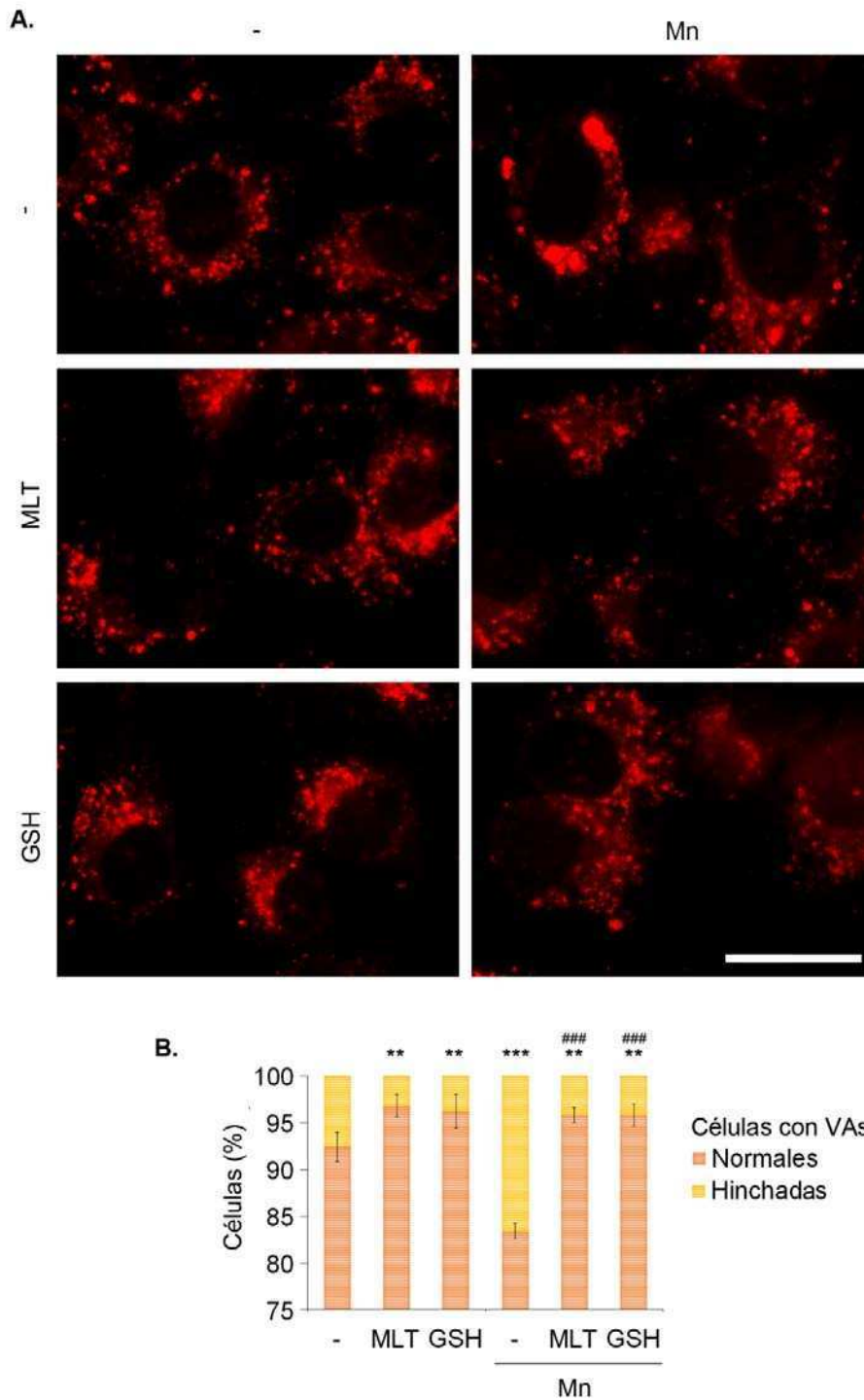


Figura 25. Efecto de antioxidantes sobre la formación de VAs de tamaño aumentado. **A.** Las células se pre- incubaron durante 1 h con MLT 0,5 mM o GSH 1 mM, se expusieron a Mn durante 6 h en MLS, se tiñeron con Lysotracker Red DND-99 (50nM, 30 min) y se visualizaron por microscopía de fluorescencia. Se muestran imágenes representativas de cada uno de los tratamientos adquiridas con un microscopio Olympus IX71 (λ_{ex} : 510- 530nm, λ_{em} : LP 590nm). Barra de escala: 25 μ m. **B.** Cuantificación del

porcentaje de células con VAs normales o hinchadas (250 células por tratamiento, n=2). Estadístico: ANOVA de un factor con contrastes de Newman-Keuls. **p<0,01, ***p<0,001 con respecto a su control, ###p<0,001 respecto a la incubación con Mn durante 6 hs.

La preincubación con antioxidantes logró prevenir totalmente el efecto del Mn sobre el aumento de tamaño de las VAs. **Estos resultados demuestran que las alteraciones morfológicas, y muy probablemente funcionales, inducidas por el Mn sobre las VAs se encuentran mediadas por la generación de ROS.**

El aumento en el número y tamaño de las VAs generado por el Mn y el rol desempeñado por las ROS en las alteraciones morfológicas, podrían reflejar un daño al compartimento lisosomal. Por lo tanto, evaluamos si existía daño en los lisosomas luego de la exposición a Mn durante 24h en MLS.

1.5 Daño a los lisosomas

1.5.1 Permeabilización de la membrana lisosomal (PML)

Niveles de expresión de CatD y su liberación al citosol

El daño a la membrana de los lisosomas produce la liberación de catepsinas y otras hidrolasas desde el lumen lisosomal al citosol. La presencia ectópica de estas proteasas causa la digestión de proteínas vitales y la activación de caspasas, llevando a la muerte celular. Las principales catepsinas que han sido involucradas en este proceso son las aspartil- proteasa CatD y las cisteína- proteasas CatB y L (Boya y Kroemer, 2008; Aits y Jäättelä, 2013).

En los resultados hasta aquí descriptos, se han observado alteraciones en las VAs que comienzan a tiempos cortos de exposición a Mn (6hs). Sin embargo, la muerte celular se detecta recién luego de 12 hs de exposición al metal en MLS (**Fig. 20**) o de 48hs en MSFB (datos no mostrados). Por lo tanto, el daño a los lisosomas podría contribuir a la muerte celular en ambas condiciones.

Cabe destacar que parte de las vesículas de tamaño aumentado generadas por el Mn son capaces de retener los colorantes empleados (RN, Lysotracker Red DND-99, naranja de acridina), lo que indica que aún mantienen el gradiente de pH con el

citósol. Incluso en estas condiciones, es probable que ocurra la liberación de catepsinas como han demostrado Bidère et al. (2003). De acuerdo a este trabajo, la translocación de los distintos dominios de catepsinas desde los lisosomas al citósol sería selectiva por tamaño, liberándose en mayor medida moléculas de 10 kDa, en menor extensión las de 40 kDa y quedando retenidas las correspondientes a pesos moleculares mayores a 70 kDa.

Tomando en cuenta este conjunto de evidencias, decidimos evaluar la posible translocación de CatD de los lisosomas al citósol como un indicador de PML, considerando que otras catepsinas podrían estar sujetas al mismo proceso.

Las células se expusieron a Mn durante 24 hs en MSFB o MLS, se marcaron con Lysotracker Red DND-99 y se realizó una inmunomarcación de CatD (**Fig. 26**). En las células control, tanto en MSFB como MLS, la inmunotinción de CatD exhibió una distribución puntillada consistente con su localización en vacuolas ácidas. En contraste, en las células expuestas a Mn, el patrón de marcación presentó una distribución mixta puntillada/difusa indicando que parte de la CatD fue translocada al citósol. Este evento fue más acentuado en MLS. Con respecto a la tinción con Lysotracker Red DND-99, el teñido granular es consistente con la presencia de un gradiente de pH citoplasma-lisosoma normal mientras parte del colorante puede ser observado también en el citoplasma en las células expuestas a Mn, principalmente en MLS.

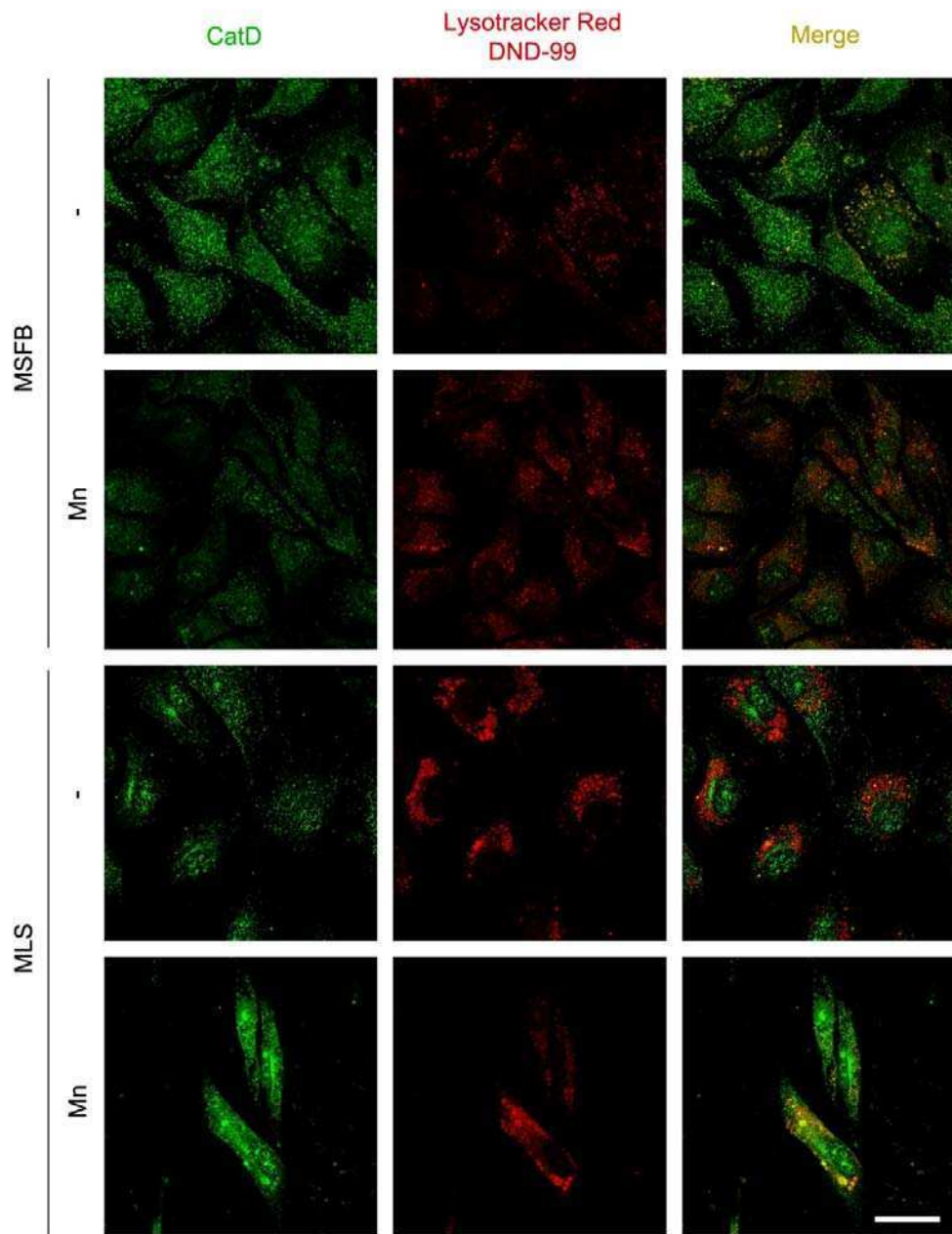


Figura 26. Inmunocitoquímica de CatD. Las células fueron expuestas a Mn durante 24 hs en MSFB o MLS, marcadas con Lysotracker Red DND-99 y fijadas con PFA 4%. Luego se realizó una inmunocitoquímica para detectar CatD. Las imágenes fueron obtenidas en un microscopio confocal Olympus FV300 (Cy2: λ_{ex} : 488nm, λ_{em} : 510- 530nm; Lysotracker Red DND-99: λ_{ex} : 543 nm, λ_{em} : 585- 605nm). Barra de escala: 25 μ m.

La CatD se sintetiza en el RE rugoso como una pre-pro-CatD (Laurent-Matha et al., 2006). Luego de la remoción del péptido señal, la pro- enzima inmadura de 52

kDa es enviada a vesículas como lisosomas y endosomas. Esta forma de la proteína se mantiene asociada a la membrana y es clivada por autoproteólisis de modo dependiente de la función degradativa en la región N-terminal para dar origen a un intermediario activo de 48 kDa, también asociado a membranas. Luego, un nuevo clivaje proteolítico probablemente mediado por las cisteína proteasas CatB y L, da como resultado la proteasa madura soluble que se compone de una cadena pesada de 34 kDa y una liviana de 14 kDa unidas por interacciones no-covalentes (**Fig. 27**) (Diment et al., 1988; Heinrich et al., 1999; Liaudet-Coopman et al., 2006; Benes et al., 2008). En el presente trabajo se empleó un anticuerpo que detecta la histidina 75, la cual se encuentra en la porción de la proteína de 14 kDa, y por lo tanto, sería capaz de marcar la pro- enzima inmadura, el intermediario activo y una de las formas maduras.



Figura 27. Maduración de CatD. La proteína se sintetiza como una pro- enzima inmadura de 52 kDa. La autoproteólisis en el extremo N- terminal da como resultado una proteína de cadena única, activa, de 48 kDa. Este intermediario es nuevamente clivado generando cadenas de 34 y 14 kDa que forman un heterodímero mediante interacciones no-covalentes. Se señalan los Aspartatos (Asp) críticos, presentes en el sitio activo (Liaudet-Coopman et al., 2006; Benes et al., 2008).

Para confirmar los resultados obtenidos mediante inmunocitoquímica, se estudiaron los niveles de expresión de CatD (**Fig. 28A**) y se evaluó su liberación desde los lisosomas al citosol mediante western blot (**Fig. 28B**). La pro- enzima inmadura (52 kDa) y el intermediario activo (48 kDa), pero no la forma madura (14 kDa) lograron ser detectadas en el inmunoblot.

La exposición a Mn ocasionó un aumento en los niveles de expresión de la proenzima inmadura en MSFB y en MLS con un efecto más pronunciado en MLS ($60 \pm 10 \%$ y $210 \pm 24 \%$, respectivamente) ($p < 0,001$). Además, se midió un incremento en la expresión del intermediario activo en MLS ($58 \pm 2\%$) (**Fig. 28A**).

La reducción observada en los niveles de expresión de ambas formas de la proteína en condiciones de privación de suero no resultó significativa (52 kDa: $30 \pm 14\%$; 48 kDa: $17 \pm 18\%$).

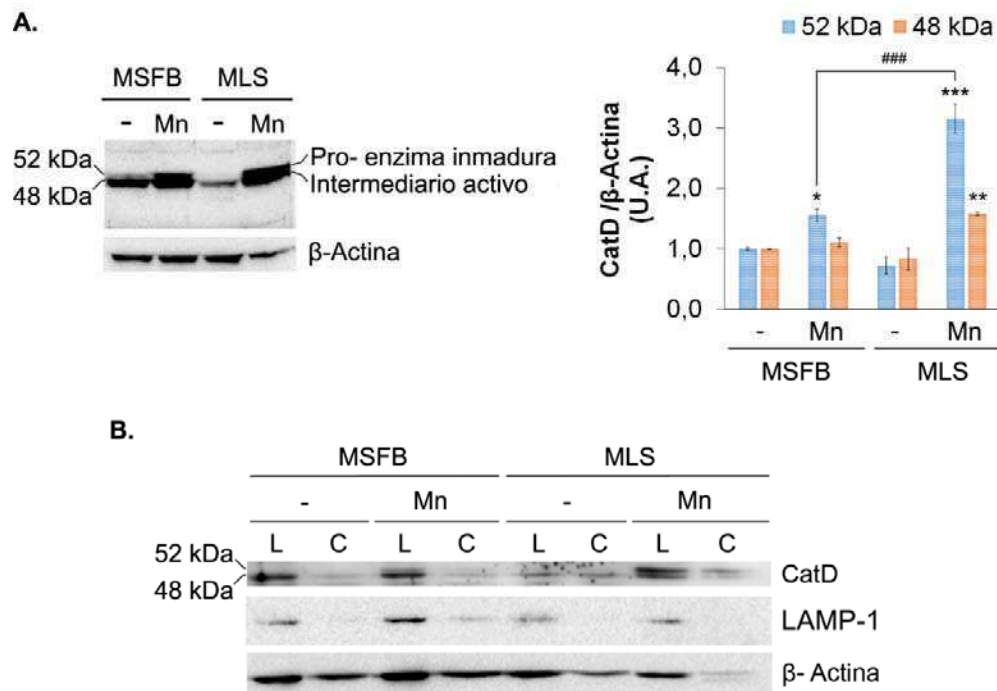


Figura 28. Niveles de expresión y localización subcelular de la CatD. Las células se incubaron con Mn durante 24 hs en MSFB o MLS. **A.** Niveles de expresión en la fracción total. **B.** Niveles de expresión en las fracciones enriquecidas en lisosomas (L) y citosol (C). Las proteínas fueron resueltas por medio de un gel 10% y transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Se midieron los niveles de CatD y de β - Actina como control de carga. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. el respectivo control, ### $p < 0,001$ con respecto al Mn en MSFB. Estadístico: ANOVA de un factor con contrastes de Newman-Keuls.

Mediante fraccionamiento subcelular, se demostró que la exposición a Mn en MLS indujo un aumento de la forma de 52 kDa de la CatD en el citosol (**Fig. 28B**), avalando la observación realizada por inmunocitoquímica, que sugiere que la CatD se libera

de los lisosomas (**Fig. 26**). En cambio, no se observaron diferencias debidas a la exposición al metal en MSFB. Este resultado no permite descartar que las formas de menor peso molecular (34 y 14 kDa) puedan translocar al citosol por la exposición a Mn en MSFB.

La liberación de CatD al citosol indica que el Mn induce PML en los lisosomas y sugiere que la funcionalidad de esta organela se halla comprometida.

Como ya se mencionó, los niveles de la CatD dependen tanto de la síntesis *de novo* como de su procesamiento en organelas degradativas funcionales. Los lisosomas generan y mantienen el pH ácido mediante la actividad de la v- ATPasa (Mindell, 2012), la cual puede ser inhibida por el antibiótico macrólido Bafilomicina A1 (BafA1) conduciendo a la pérdida de función de esta organela (Bowman et al., 1988; Yoshimori et al., 1991). Con el fin de clarificar si el aumento en la expresión observado en las proformas de la CatD se encuentra relacionado con un bloqueo en su procesamiento, se realizaron experimentos empleando BafA1. Si los lisosomas no son funcionales, la pérdida en el gradiente de pH no tiene un efecto adicional sobre los niveles de la proteína inmadura. En cambio, si la CatD estaba siendo procesada, la inhibición en dicho evento genera una acumulación de las proformas. En la **Fig. 29A** se muestra un esquema a modo de ejemplo.

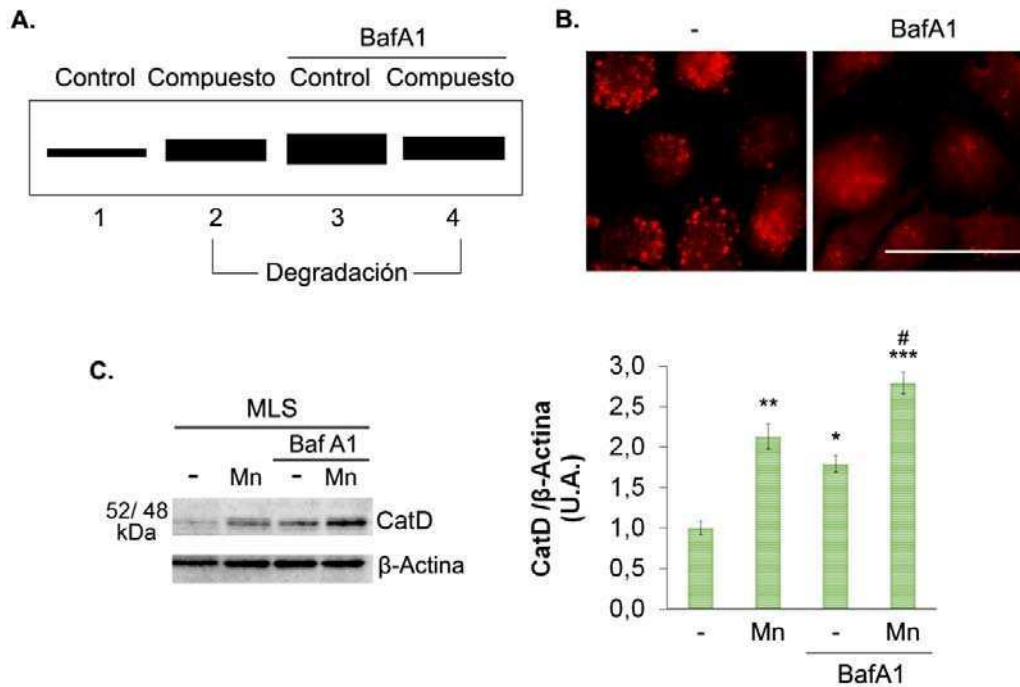


Figura 29. Procesamiento de la CatD. **A.** Se esquematiza un inmunoblot donde se emplea BafA1 para inhibir la degradación lisosomal. Si el compuesto evaluado genera un aumento en los niveles de expresión de la proteína (calle 2) y este efecto es debido a un impedimento en la degradación lisosomal, la incubación con BafA1 no tiene efecto adicional (calle 4). **B.** Las células se incubaron con BafA1 100 nM durante 2 hs en MLS, se tiñeron con LysoTracker Red DND-99 y se observaron en un microscopio Olympus IX71 (λ_{ex} : 510- 530nm, λ_{em} : LP 590nm). Barra de escala: 50 μ M. **C.** Las células se incubaron con Mn durante 24 hs en MLS y 2 hs antes de la finalización del tratamiento se agregó BafA1 100 nM. Las proteínas fueron resueltas por medio de un gel 12% y transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Se midieron los niveles de CatD y de β - Actina como control de carga. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ con respecto al control, # $p < 0,05$ con respecto al Mn. Estadístico: ANOVA de un factor con contrastes de Newman- Keuls.

Para evaluar si la incubación durante 2 hs con BafA1 100 nM es suficiente para inhibir la acidificación lisosomal, las células se tiñeron con LysoTracker Red DND-99 y se observaron por microscopía de fluorescencia (**Fig. 29B**). Mediante el protocolo empleado se previno la marcación de las VAs con el colorante, lo que indica un aumento en el pH de las mismas. Por lo tanto, en los ensayos subsiguientes se empleó BafA1 100 nM durante 2 hs.

La incubación con BafA1 de las células expuestas a Mn condujo a un aumento en los niveles de expresión de las formas de 52 y 48 kDa con respecto a las células incubadas sólo con Mn (**Fig. 29C**). Este resultado indica que los lisosomas mantienen la capacidad de procesar proteínas y concuerda con los datos obtenidos

por inmunocitoquímica (**Fig. 26**), donde se observó que parte de las vacuolas mantienen el pH ácido y contienen CatD. Por lo tanto, el aumento en los niveles de expresión de esta proteasa medidos en la **Figs. 28 y 29** serían consecuencia de la síntesis *de novo* de la proteína. De todos modos, mediante este ensayo no puede descartarse que el procesamiento de la misma se encuentre afectado de manera parcial.

Localización nuclear de CatD

Además de la localización lisosomal de la CatD y su liberación como consecuencia de la exposición a Mn, en la **Fig. 26** se observó una aparente localización nuclear de la proteína. En este punto, es importante mencionar que durante el desarrollo de esta Tesis hemos encontrado varios trabajos que documentan mediante microscopía la localización nuclear de la CatD. Sin embargo, en esos casos los autores no hacen referencia a esta observación. Por esta causa decidimos evaluar dicha localización empleando una técnica alternativa. Para ello, se realizó una inmunomarcación de la CatD en conjunto con una tinción del ADN con yoduro de propidio para comprobar si efectivamente esta proteasa se encontraba en el núcleo (**Fig. 30**).

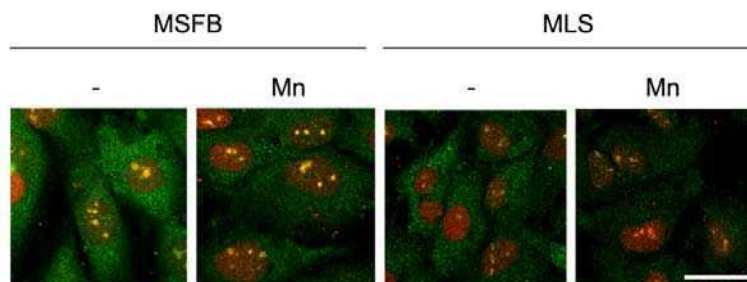


Figura 30. Localización nuclear de la CatD. Las células fueron incubadas con Mn durante 24 hs en MSFB o MLS y fijadas con PFA 4%. Se realizó una inmunocitoquímica para detectar CatD. Para obtener tinción específica del ADN, el ARN se degradó incubando las células con RNasaA y las células se marcaron con yoduro de propidio (1,5 μ M, 30 min). Las imágenes fueron obtenidas en un microscopio confocal Olympus FV300 (Cy2: λ_{ex} : 488nm, λ_{em} : 510- 530nm; Yoduro de propidio: λ_{ex} : 543 nm, λ_{em} : 585-605nm). Barra de escala: 25 μ m.

El análisis de las imágenes obtenidas por microscopía confocal reveló que la CatD co-localiza con el ADN nuclear y en particular con el nucleolar. Para cuantificar la co-localización se calculó el índice de superposición de Manders (R) que mide en una escala de 0 a 1 la superposición de píxeles entre los dos canales (rojo y verde). De este modo, un coeficiente de correlación igual a 1 representa 100% de co-localización, mientras que uno cercano a 0 implica baja correlación (Manders et al., 1993). La localización nuclear de la CatD aumentó un $26 \pm 16\%$ por exposición a Mn en MLS, mientras que no se observaron cambios con respecto al control en MSFB. Por otra parte, la privación de suero disminuyó la co-localización un $40 \pm 12\%$. Estos resultados señalan la necesidad de realizar experimentos adicionales tendientes a confirmar la localización nuclear de esta catepsina y el significado funcional de la misma.

Capítulo 2

Rol de los lisosomas en la muerte celular

2.1 Rol de las catepsinas en la toxicidad del Mn

Se ha demostrado que la CatD (Deiss et al., 1996; Kågedal et al., 2001; Roberg, 2001; Bidère et al., 2003; Conus et al., 2008; Appelqvist et al., 2012) y la CatB (Guicciardi et al., 2000; Fehrenbacher et al., 2004; Nagaraj et al., 2006; Garnett et al., 2007; Bhoopathi et al., 2010) actúan como factores inductores de muerte en distintos modelos de apoptosis.

Para determinar, en nuestro modelo, si estas catepsinas se encuentran involucradas en la muerte celular, las células se pre-incubaron con los inhibidores de CatD (pepstatina A, 1 o 10 μM) (**Fig. 31A**) y de CatB (Ca-074 Me, 0,5 o 1 μM) (**Fig. 31B**) y se expusieron a Mn durante 24 hs. La viabilidad se midió por el ensayo de reducción de MTT.

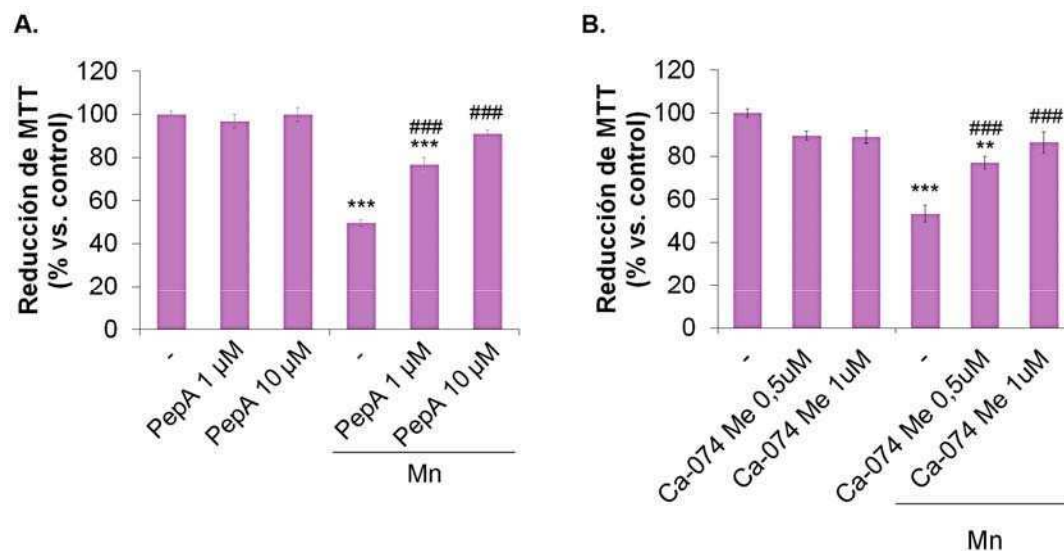


Figura 31. Rol de las CatD y B en la muerte celular inducida por Mn. Las células fueron pre-incubadas durante 1h con Pepstatina A (PepA) 1 o 10 μM (**A**) o Ca-074 Me 0,5 o 1 μM (**B**) y luego expuestas a Mn en MLS durante 24 hs. La viabilidad se midió por medio del ensayo de reducción de MTT. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ con respecto al control. ### $p < 0,001$ con respecto al tratamiento con Mn. Estadístico: ANOVA de un factor con contrastes de Newman-Keuls.

La inhibición de las CatD y B empleando Pepstatina A (PepA) 10 μM y Ca-074 Me 1 μM previno totalmente la muerte celular inducida por Mn. Estos resultados indican que **el daño lisosomal en general, y la actividad de estas proteasas en**

particular, representan eventos fundamentales en el proceso de muerte celular.

El hallazgo de que la inhibición de la vía de muerte lisosomal previene completamente la citotoxicidad inducida por Mn nos permite descartar el modelo propuesto por Baumgartner et al. (2007), donde la mitocondria genera una señal apoptótica en paralelo a los lisosomas (**Fig. 18B**). En ese caso, la inhibición de la vía lisosomal no hubiera tenido efecto sobre la activación de la vía mitocondrial, y por lo tanto se hubiera observado una prevención parcial de la muerte celular.

Existen evidencias que demuestran que las catepsinas, una vez liberadas al citosol, actúan como mediadores de la vía de muerte lisosomal. Sin embargo, estas podrían además jugar un rol en el inicio de la PML. Aits y Jäättelä (2013) han propuesto que, ante un estímulo de estrés, la CatB puede actuar en la degradación intralisosomal de las proteínas de la cara interna de la membrana altamente glicosiladas que forman el glicocalix protector.

Para evaluar si las catepsinas están involucradas en el daño a los lisosomas, se midió el efecto de su inhibición sobre la retención de RN. Las células se pre-incubaron con PepA o Ca-074 Me, se expusieron a Mn durante 6hs y se realizó un ensayo de retención de RN (**Fig. 32**).

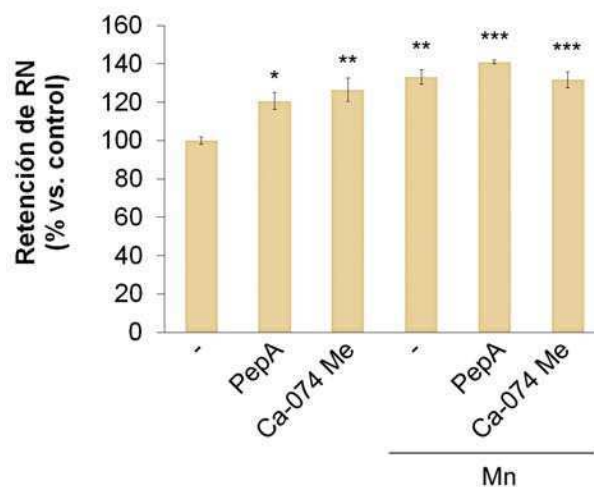


Figura 32. Efecto de la inhibición de las CatD y B sobre el aumento en la retención de RN. Las células fueron pre-incubadas durante 1h con PepA 10 μ M o Ca-074 Me 1 μ M, luego se expusieron a Mn durante 6 hs y se midió la

retención de RN. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ respecto al control.
Estadístico: ANOVA de un factor con contrastes de Newman-Keuls.

El ensayo realizado demostró que la inhibición de las CatD y B induce un aumento en la retención del RN. Los resultados concuerdan con los observados por tinción con Lysotracker Red DND-99, donde se encontró un aumento generalizado en el tamaño de las VAs (resultados no mostrados). Este efecto puede estar relacionado con las deficiencias en la proteólisis, producto de la inhibición de la actividad de las proteasas, evento que conduciría a una acumulación de material en las vacuolas. Por otra parte, la inhibición de las catepsinas no presentó efecto sobre el aumento en la retención de RN inducido por Mn. Sin embargo, es importante notar que en la **Fig. 21**, no se observaron variaciones en la retención de RN al aumentar la concentración de Mn en el rango 500-1000 μM . Esto sugiere que posiblemente el sistema llegue a un punto de saturación a partir del cual no posee la capacidad de retener niveles adicionales de colorante.

2.2 Efecto de la BafA1 sobre la toxicidad del Mn

Se ha reportado que la BafA1 posee efectos diferenciales, dependientes de su concentración. Mientras que en altas concentraciones este compuesto inhibe la v-ATPasa, promueve la acumulación de vacuolas autofágicas y dispara la apoptosis en distintos tipos celulares (Nishihara et al., 1995; Kinoshita et al., 1996; Ohta et al., 1998; Nakashima et al., 2003; Xu et al., 2003), a concentraciones menores a las reportadas para inhibir a la v-ATPasa es neuroprotectora frente a estímulos que perturban la función autofágica- lisosomal (Shacka et al., 2006a, b; Pivtoraiko et al., 2010).

Por estos motivos y dado que en nuestros estudios se requería del empleo de BafA1 para determinadas estrategias experimentales, se decidió evaluar el efecto de BafA1 sobre la muerte inducida por Mn así como la posible toxicidad generada por incubación con este inhibidor durante 25 hs.

Las células se pre- incubaron con BafA1 0,01 nM- 100 nM durante 1 h y luego se agregó Mn durante 24 hs. La viabilidad celular se midió mediante el ensayo de reducción de MTT (**Fig. 33A**).

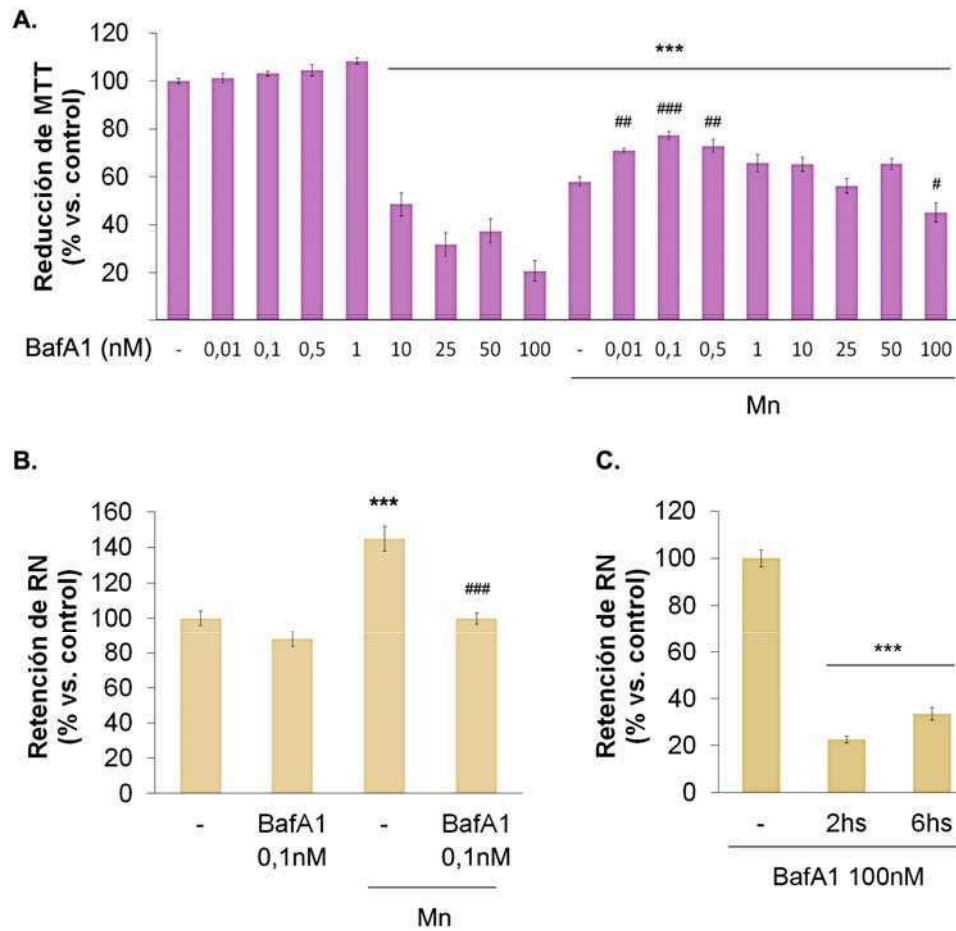


Figura 33. Efecto de la BafA1. **A.** Las células se pre- incubaron con distintas concentraciones de BafA1 durante 1 h en MLS, se expusieron a Mn durante 24 hs y se midió la reducción de MTT. **B.** Las células se pre- incubaron durante 1 h con BafA1 0,1 nM en MLS, se agregó Mn durante 6 hs y se midió la retención de RN. **C.** Las células se incubaron durante 2 o 6 hs con BafA1 100 nM en MLS y se midió la retención de RN. ***p<0,001 vs. Control; #p<0,05, ##p<0,01, ###p<0,001 vs. Mn. Estadístico: ANOVA de un factor con contrastes de Newman-Keuls.

En ausencia de Mn, la incubación durante 25 hs con concentraciones de BafA1 mayores a 10 nM induce muerte, tal como ha sido reportado en diversos tipos celulares (Xu et al., 2003; Shacka et al., 2006b; Pivtoraiko et al., 2010).

Por otra parte, la BafA1 a concentraciones en el rango 0,01- 0,5 nM logró prevenir parcialmente la muerte celular inducida por Mn (0,01 nM: $13 \pm 3\%$, $p < 0,01$; 0,1 nM: $19 \pm 4\%$, $p < 0,001$; 0,5 nM: $15 \pm 5\%$, $p < 0,01$). Las mismas son 4 y 3 órdenes de magnitud menores que las habitualmente empleadas para inhibir la v-ATPasa (100 nM). Sorprendentemente, la muerte celular inducida por BafA1 para concentraciones entre 10- 100 nM resultó menor en presencia de Mn. En este sentido, es posible que las alteraciones en la vía autofágica- lisosomal generadas por el metal interfieran de alguna manera con la acción de la BafA1.

A continuación, se evaluó si además de su rol protector frente a la citotoxicidad del Mn, la incubación con una concentración baja de BafA1 (0,1 nM) tenía efecto sobre el aumento en la retención de RN inducido por 6 hs de exposición a Mn (**Fig. 33B**). Efectivamente, la incubación con BafA1 previno el incremento en la retención del colorante, lo que sugiere que el inhibidor actúa a nivel de mecanismos que conducen al aumento en el volumen total de VAs, como podría ser la autofagia.

Por otra parte, teniendo en cuenta que el RN es una base débil que se acumula en las VAs por un mecanismo dependiente del pH ácido, el hecho de que la BafA1 0,1 nM por sí misma no genere cambios en la retención del colorante con respecto al control, sugiere que los efectos del inhibidor sobre la muerte celular inducida por exposición a Mn (**Fig. 33A**) no se deberían a la alcalinización de los lisosomas.

Se realizó entonces un ensayo empleando BafA1 100 nM durante 2 o 6 hs para corroborar que la retención de RN se ve afectada por la alcalinización de los lisosomas. Se observó una gran disminución en la retención del colorante (2 hs: $77 \pm 2\%$; 6 hs: $67 \pm 3\%$; $p < 0,001$) (**Fig. 33C**). En estas condiciones, no se detectó muerte celular por reducción de MTT (resultados no mostrados).

En conclusión, **la BafA1 0,1 nM estaría previniendo la citotoxicidad inducida por Mn y el aumento en la retención de RN inducida por el metal sin generar cambios en el pH de las VAs**. Por lo tanto, este inhibidor podría tener una función protectora frente a la toxicidad del Mn como la reportada por Shacka et al. (2006a, 2006b) y Pivtoraiko et al. (2010) en respuesta a estímulos que perturban la función autofágica- lisosomal. En base a estos resultados se decidió incluir el estudio del

efecto de BafA1 0,1 nM sobre las vías de muerte celular apoptótica que tienen lugar río abajo de los lisosomas.

2.3 PML en la apoptosis

Como se esquematizó en la **Fig. 18**, existen modelos de señalización donde se ha descrito que la PML activa la muerte celular señalizando río arriba (**Fig. 18A**) o bien en paralelo (**Fig. 18B**) a la mitocondria. Como ya se discutió, los resultados obtenidos en la **Fig. 31**, permitieron descartar el segundo modelo. En consecuencia, llevamos a cabo estudios tendientes a dilucidar la participación de los lisosomas en los mecanismos moleculares de muerte celular que tienen lugar río abajo de estas organelas.

Alaimo et al. (2011) han descrito que la exposición a Mn en MLS durante 24 hs induce muerte celular apoptótica mediada por ROS activando tanto las vías extrínseca como intrínseca. En particular, se ha demostrado que la muerte es completamente dependiente de caspasas. En este modelo, el Mn conduce a un aumento en la activación de la caspasa-8, niveles de FasL y clivaje de Bid (vía extrínseca), así como a la translocación de Bax a la mitocondria, clivaje de Bcl-2, pérdida del $\Delta\psi_m$, translocación del citocromo c al citosol y activación de la caspasa -9 (vía intrínseca). Además, se encuentran activadas las caspasas -3/-7, se genera el clivaje de PARP-1 y se condensa y fragmenta la cromatina (ejecución de la muerte).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, y considerando que la exposición a Mn durante 24 hs en MSFB no induce muerte celular, los experimentos relacionados a la señalización apoptótica fueron realizados en MLS.

2.3.1 Rol de los lisosomas sobre la activación de la vía extrínseca

Caspasa-8

La caspasa-8 se sintetiza como un zimógeno inactivo de 55/53 kDa que, ante un estímulo apoptótico, es procesado para dar lugar a dos fragmentos intermedios de 43/41 kDa y 12 kDa. El fragmento pequeño es rápidamente clivado originando una forma potencialmente activa de 10 kDa. A su vez, los fragmentos p43/p41 sufren un clivaje adicional generando un fragmento p18. El heterodímero activo está formado por dos subunidades p10 y dos p18 (Lavrik et al., 2003).

El análisis del efecto del inhibidor de CatD y BafA1 sobre los niveles de expresión de la caspasa-8 mostró que tanto BafA1 como PepA1 lograron prevenir parcialmente el clivaje de la forma de 53 kDa (Pep: $34 \pm 21\%$, $p < 0,01$; Baf: $38 \pm 3\%$, $p < 0,001$), y no tuvieron efecto sobre la correspondiente a 55 kDa. Asimismo, los inhibidores previnieron la aparición de los clivados intermedios p43/p41 (En forma parcial: Pep: p43: $43 \pm 5\%$, $p < 0,001$; p41: $31 \pm 11\%$, $p < 0,01$; en forma total: Baf)(Fig. 34).

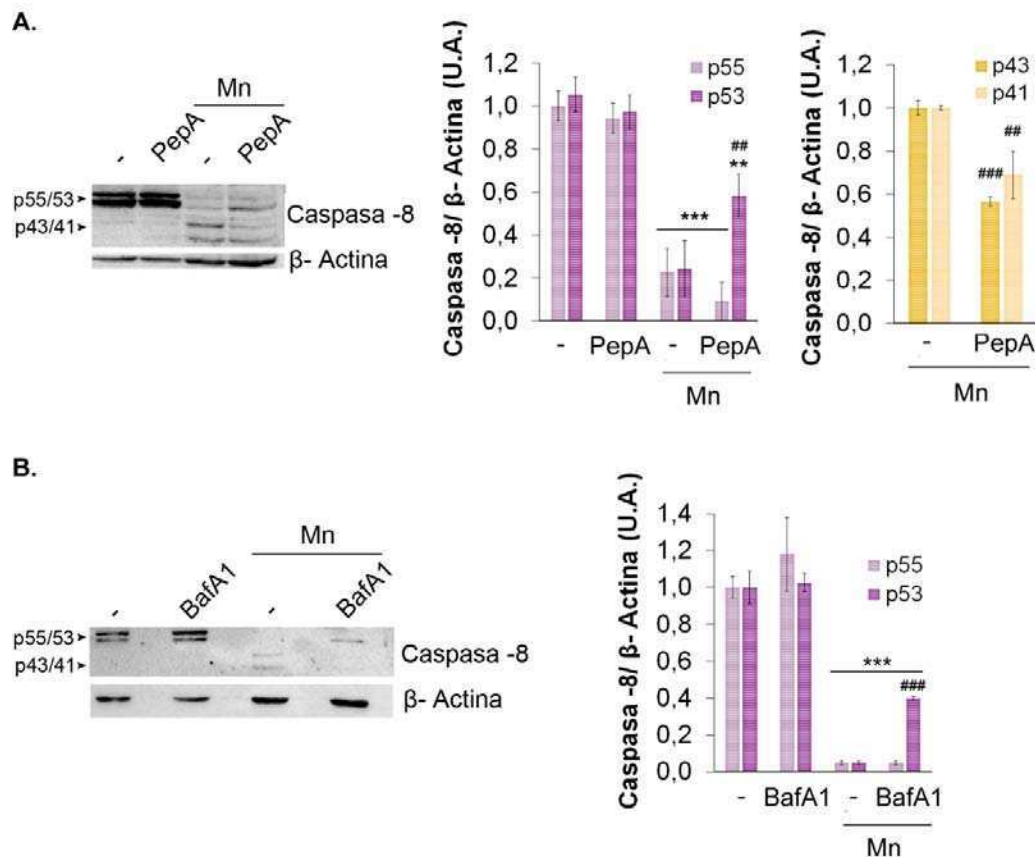


Figura 34. Activación de la caspasa-8. Las células fueron pre- incubadas durante 1 h con PepA 10 μ M o BafA1 0,1 nM y luego expuestas a Mn durante 24 hs. Se detectaron las formas de caspasa-8 p55/p53 y p43/p41. Las membranas se reprobaron con un anticuerpo anti- β -Actina como control de carga. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. control. ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ con respecto al Mn. Estadístico: ANOVA de un factor con contrastes de Neuman-Keuls.

Los resultados obtenidos indican que la activación de la vía lisosomal, juega un rol en el clivaje de la caspasa-8. El hecho de que los inhibidores no ejerzan ningún efecto sobre el procesamiento de la isoforma de 55 kDa y que la prevención en el clivaje de la forma de 53 kDa así como la disminución en la aparición de las formas clivadas, no sea total, es coherente con la activación de la caspasa-8 en el DISC y subsecuente amplificación de la señal iniciada en el receptor por parte de la PML.

Es interesante mencionar que en nuestro laboratorio se ha encontrado que fracciones enriquecidas en mitocondrias poseerían sólo la proforma de 53 kDa de la caspasa-8 y la exposición a Mn genera su clivaje y la aparición de un fragmento intermedio p43/p41 en esta fracción (Alaimo, 2012). Por lo tanto, es posible que de existir un paso de amplificación en el clivaje de caspasa-8 mediado por la PML, éste involucre a la mitocondria.

Participación de FasL

En nuestro laboratorio hemos demostrado que la activación de la vía de señalización mediada por el receptor Fas es esencial para la apoptosis inducida por Mn en células C6 (Alaimo, 2012). En este sentido, la inhibición de esta vía por parte de una proteína quimera que secuestra al ligando FasL, previno completamente la citotoxicidad del metal. Además, se ha demostrado que el Mn aumenta los niveles de expresión de FasL (Alaimo et al., 2011). El incremento en la expresión de esta proteína, llevaría a la activación del receptor de Fas, formación del complejo DISC y activación en el mismo, de la caspasa-8.

Nos propusimos entonces analizar el efecto de la pre- incubación con BafA1, PepA y Ca-074 Me sobre los niveles de FasL (**Fig. 35**).

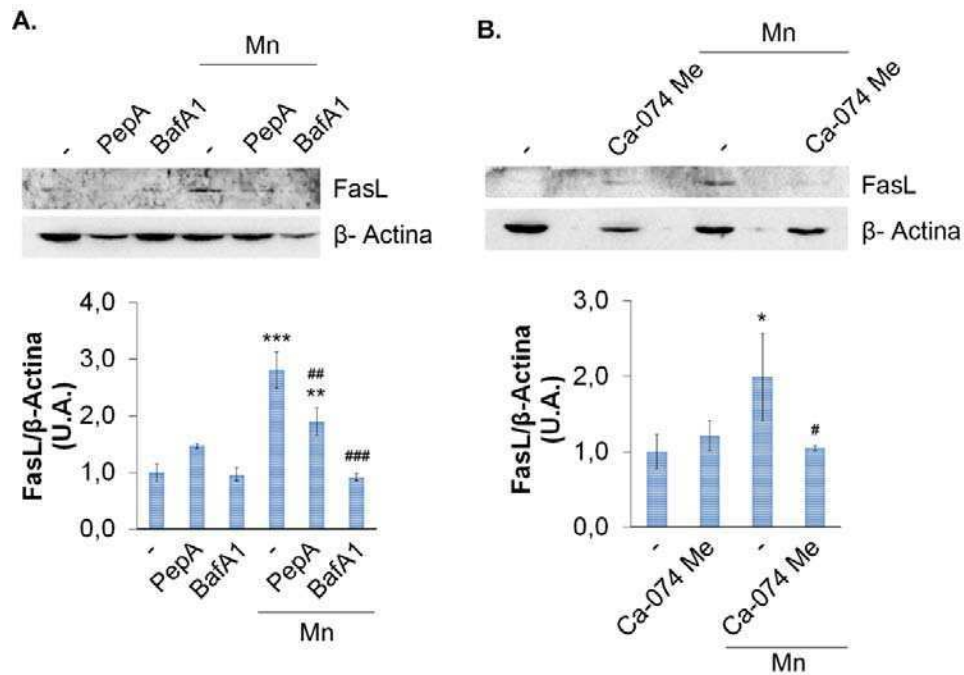


Figura 35. Niveles de expresión de FasL. Las células fueron pre-incubadas con PepA 10 μ M, BafA1 0,1 nM **(A)**, o Ca-074 Me 1 μ M **(B)** durante 1 h y luego expuestas a Mn durante 24 hs. El inmunoblot fue revelado con un anticuerpo anti- FasL y la membrana fue reprobadada con anticuerpos anti- β -Actina como control de carga. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. control. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ con respecto al Mn. Estadístico: ANOVA de un factor con contrastes de Neuman-Keuls.

El aumento en los niveles de expresión de FasL generado por la incubación con Mn pudo ser completamente prevenido por BafA1 y Ca-074 Me, mientras que PepA indujo una prevención parcial ($50 \pm 20\%$, $p < 0,01$).

Estos resultados sugieren que posiblemente la vía lisosomal se encuentra río arriba de un aumento en la transcripción de FasL, el cual generaría un *feedback* positivo que conduce a una mayor activación del receptor Fas.

2.3.2 Rol de los lisosomas sobre la activación de la vía intrínseca

Pérdida del $\Delta\psi_m$ y liberación de citocromo c

Dependiendo de cuál sea el estímulo de muerte, de la magnitud de la PML y de la cantidad y tipo de catepsinas liberadas al citosol, el daño a la membrana lisosomal

puede conducir a la activación de caspasas y calpaínas y/o a la inducción de la vía apoptótica mitocondrial. En el último caso, es probable que al menos las mitocondrias ubicadas en el espacio perinuclear, próximas a los lisosomas, se vean comprometidas y ocurra la disipación del $\Delta\psi_m$ (Boya y Kroemer, 2008).

El citocromo c es una proteína que se encuentra normalmente unida a cardiolipina en la membrana interna de la mitocondria y participa en la cadena de transporte de electrones. Sin embargo, un gran número de estímulos apoptóticos, entre ellos el estrés oxidativo, inducen su liberación de la cardiolipina y también la MOMP. De esta manera, se promueve su translocación al citosol donde media la activación alostérica de APAF-1, que es requerido para la maduración proteolítica y activación de la caspasa -9 (Liu et al., 1996; Garrido et al., 2006).

Para evaluar si en nuestro modelo, la PML es responsable de la pérdida del $\Delta\psi_m$ y de la liberación de citocromo c que se induce por exposición a Mn durante 24 hs (Alaimo et al., 2011), las células se pre- incubaron durante 1 h con PepA, Ca-074 Me o BafA1 y se expusieron a Mn. Las mitocondrias se marcaron con el colorante fluorescente Mitotracker Red CMXRos (una sonda que difunde a través de la membrana plasmática y se acumula en las mitocondrias que mantienen el $\Delta\psi_m$) y se realizó una inmunomarcación de citocromo c (**Fig. 36**).

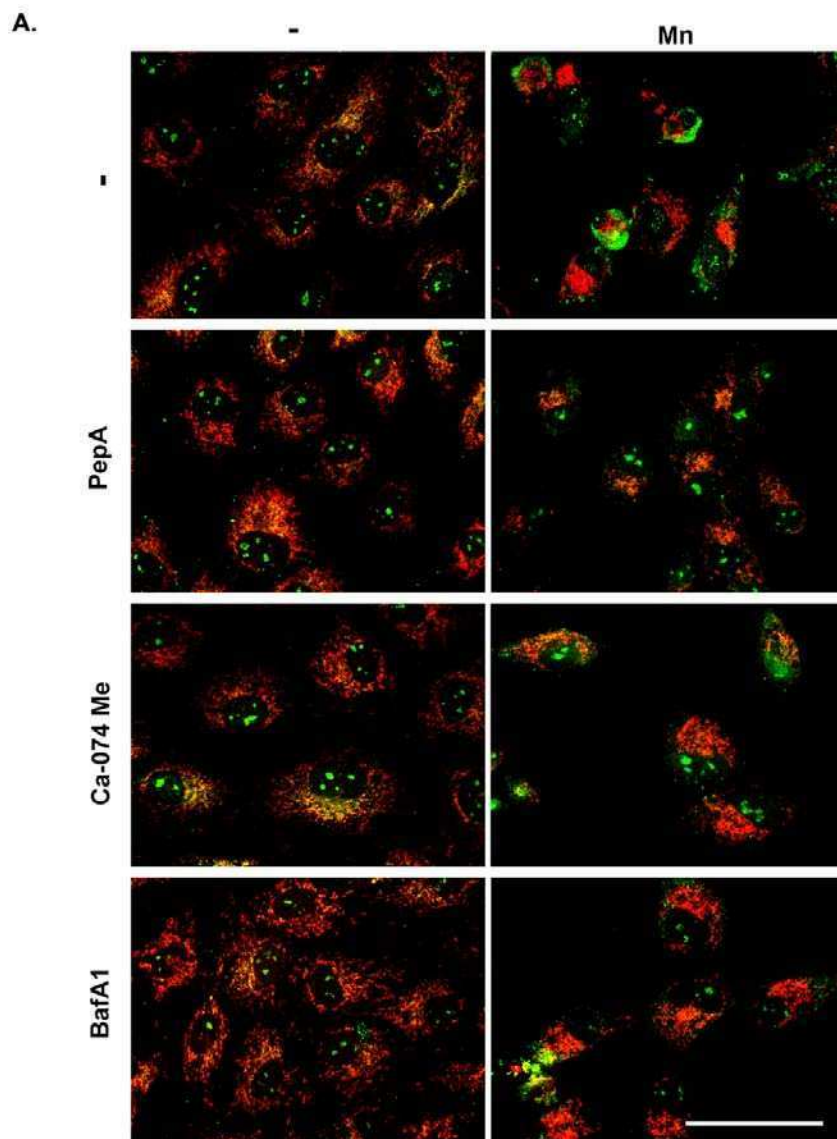
Las células expuestas a Mn mostraron una retracción de las redes mitocondriales hacia el espacio perinuclear con fragmentación de las mismas y, en ciertos casos, un patrón de tinción con Mitotracker Red CMXRos correspondiente a la disipación de $\Delta\psi_m$. Además, en estas condiciones, las células presentaron mayor marcación de citocromo c en el citosol con respecto al control. Los inhibidores empleados previnieron notablemente la pérdida del $\Delta\psi_m$, la fragmentación de las redes mitocondriales y la liberación de citocromo c (**Fig. 36A**).

Para calcular el grado en que los inhibidores de la vía lisosomal previnieron el daño mitocondrial, se realizó una cuantificación del número de células exhibiendo pérdida del $\Delta\psi_m$ con respecto a las normales, para cada tratamiento. El Mn generó una pérdida del $\Delta\psi_m$ en un $67 \pm 14\%$ ($p < 0,001$) de las células. Este daño

mitocondrial fue prevenido parcialmente empleando los inhibidores PepA ($30 \pm 4\%$), Ca-074 Me ($19 \pm 7\%$) y BafA1 ($43 \pm 3\%$)(**Fig. 36B**).

Además, con la finalidad de obtener un dato cuantitativo de la co-localización del citocromo c con la mitocondria marcada con Mitotracker Red CMXRos se empleó el coeficiente de Manders (R). El Mn indujo una disminución en R del $20 \pm 6\%$ ($p < 0,001$) con respecto al control, indicando un aumento en la liberación del citocromo c en estas condiciones. Ca-074 Me previno completamente la disminución en la co-localización, mientras que empleando PepA y BafA1 se logró una protección de $8 \pm 4\%$ ($p < 0,05$) y $13 \pm 5\%$ ($p < 0,01$), respectivamente (**Fig. 36C**).

Estos resultados indican que la PML y la consecuente liberación de catepsinas representan un evento temprano en la toxicidad del Mn y juegan un rol en el daño a la mitocondria, la pérdida del $\Delta\psi_m$ y la liberación de citocromo c.



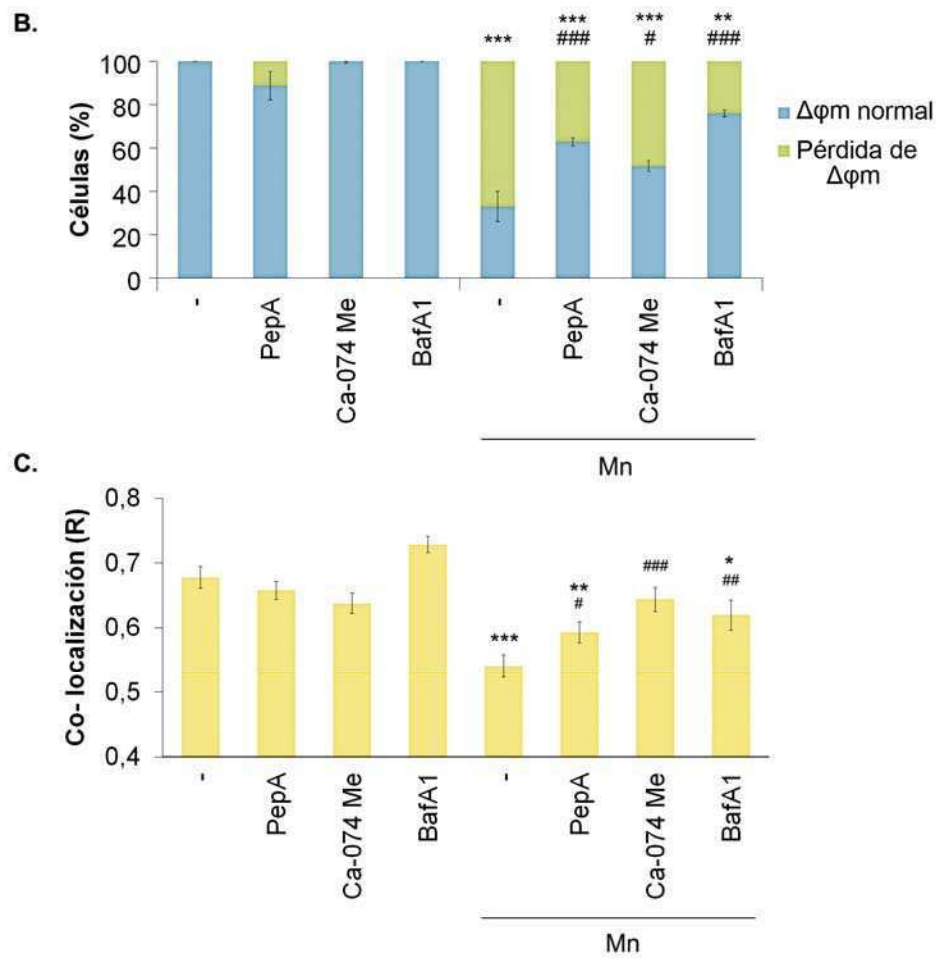


Figura 36. Disipación del $\Delta\psi_m$ y liberación de citocromo c de la mitocondria. Las células fueron pre-incubadas durante 1 h con PepA 10 μ M, Ca-074 Me 1 μ M o BafA1 0,1 nM, expuestas a Mn durante 24 hs y teñidas con Mitotracker Red CMXRos (75 nM, 30 min). Luego, se fijaron con PFA 4% y se realizó una inmunomarcación para detectar citocromo c (verde). **A.** Se muestran imágenes representativas de cada tratamiento, adquiridas empleando un microscopio confocal Olympus FV300 (Cy2: λ_{ex} : 488nm, λ_{em} : 510- 530nm; Mitotracker Red CMXRos: λ_{ex} : 543 nm, λ_{em} : 585- 605nm). **B.** Se cuantificó el porcentaje de células que mantuvieron el $\Delta\psi_m$ normal o que presentaron pérdida del mismo. Se contaron 250 células por tratamiento (n=3). **C.** El gráfico muestra el coeficiente de superposición R de Manders. Se cuantificaron 25 células por tratamiento (n=2). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 vs. control. #p<0,05, ##p<0,01, ###p<0,001 vs. Mn. Estadístico: ANOVA de un factor con contrastes de Newman- Keuls.

Clivaje de Bid

Bid es una proteína pro- apoptótica normalmente presente en el citosol en estado inactivo. Sin embargo, ante un estímulo apoptótico, puede ser clivada por la caspasa-

8 activada en los receptores de muerte o en la mitocondria, generando un fragmento truncado (tBid) que contribuye a la liberación del citocromo c de la mitocondria. De este modo, Bid funciona como un nexo entre las vías de muerte extrínseca e intrínseca (Luo et al., 1998; Schug et al., 2011). Esta proteína es además capaz de interactuar e inhibir a los miembros anti- apoptóticos más importantes de la familia Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-w, Mcl-1, Bfl-1 y Bcl-X_L) (Certo et al., 2006) así como de colaborar con la activación de los pro- apoptóticos Bak y Bax (siendo el primero el de mayor preferencia) (Sarosiek et al., 2013). Se ha encontrado que Bid puede ser también clivada por extractos lisosomales (Stoka et al., 2001), y entre otras, por las CatB y D (Blomgran et al., 2007; Boya y Kroemer, 2008; Appelqvist et al., 2012). En nuestro modelo ocurre el clivaje de Bid (Alaimo et al., 2011) y los inhibidores de catepsinas así como BafA1 previenen en parte la pérdida del $\Delta\phi_m$ (**Fig. 36**). Por esta causa decidimos evaluar si las CatB y D, así como los procesos inhibibles por BafA1, son responsables del clivaje de Bid. Las células se pre- incubaron durante 1 h con PepA, Ca-074 Me o BafA1, se expusieron a Mn durante 24 hs y se evaluó la generación del fragmento tBid (**Fig. 37**).

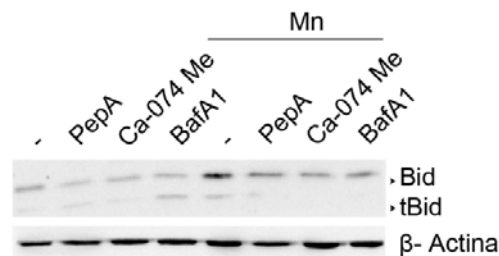


Figura 37. Clivaje de Bid. Las células fueron pre- incubadas durante 1 h con PepA 10 μ M, Ca-074 Me 1 μ M o BafA1 0,1 nM y luego expuestas a Mn durante 24 hs. Se detectaron los niveles de Bid (21kDa) y tBid (15kDa) empleando un anticuerpo específico. Las membranas se reprobaron con un anticuerpo anti- β -actina como control de carga.

Los inhibidores empleados lograron prevenir totalmente el clivaje de Bid inducido por Mn, sugiriendo que **la CatD y la CatB son enzimas indispensables para el procesamiento de Bid.**

Activación de la caspasa -9

Por último, se estudió el efecto de los inhibidores de la vía lisosomal sobre la activación de la caspasa-9. Esta proteína se sintetiza como una pro- enzima de 47 kDa y es clivada para generar el heterodímero p35/ p12. El fragmento pequeño puede ser reconocido y clivado por la caspasa-3 dando lugar a una forma p10, que no es reconocida por el inhibidor de caspasas XIAP (Zou et al., 2003). Con el objeto de analizar el rol de las catepsinas en este paso de la vía apoptótica, las células se pre- incubaron durante 1 h con PepA 10 μ M, Ca-074 Me 1 μ M o BafA1 0,1 nM, se expusieron a Mn durante 24 hs y se realizó un inmunoblot para medir los niveles de expresión de la caspasa-9 (**Fig. 38**).

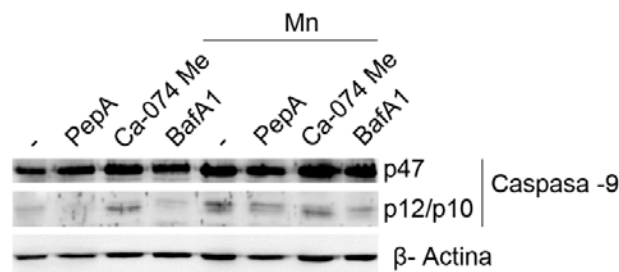


Figura 38. Activación de la caspasa-9. Las células fueron pre- incubadas durante 1 h con PepA 10 μ M, Ca-074 Me 1 μ M o BafA1 0,1 nM y luego expuestas a Mn durante 24 hs. El fragmento de 10 kDa se detectó empleando un anticuerpo específico. Las membranas se reprobaron con un anticuerpo anti- β -actina como control de carga.

El Mn generó un incremento en los niveles de expresión de los fragmentos p12/p10. La formación de dichos productos de clivaje fue prevenida parcialmente por los inhibidores PepA y BafA1. Por otra parte, Ca-074 Me disminuyó los niveles de la subunidad p12 con respecto al tratamiento con Mn, pero generó por sí misma un aumento en la forma p10. Estos resultados avalan los obtenidos en los experimentos de la **Fig. 36**. Es decir, **PepA y BafA1 previenen parcialmente los eventos involucrados en la vía apoptótica mitocondrial.**

2.3.3 Rol de los lisosomas sobre la activación de las caspasas efectoras

Las caspasas efectoras (entre ellas la -3 y la -7) son típicamente procesadas y activadas por caspasas iniciadoras relacionadas tanto a la vía extrínseca como a la intrínseca y juegan un rol en la ejecución de los pasos finales de la apoptosis por medio del clivaje de una amplia variedad de sustratos celulares (Riedl y Shi, 2004).

La caspasa-3 se sintetiza como una pro-enzima inmadura y, ante un estímulo apoptótico, sufre un procesamiento proteolítico para generar dos heterodímeros p12/p17 que se asocian para formar un tetrámero catalíticamente activo (Rotonda et al., 1996).

Para evaluar si el efecto de los inhibidores de la vía lisosomal sobre la activación de las vías extrínseca e intrínseca de muerte, se refleja en una menor actividad de las caspasas efectoras, se evaluaron los niveles del fragmento clivado largo de caspasa-3 que se observa como p19/p17 en la **Fig. 39A**.

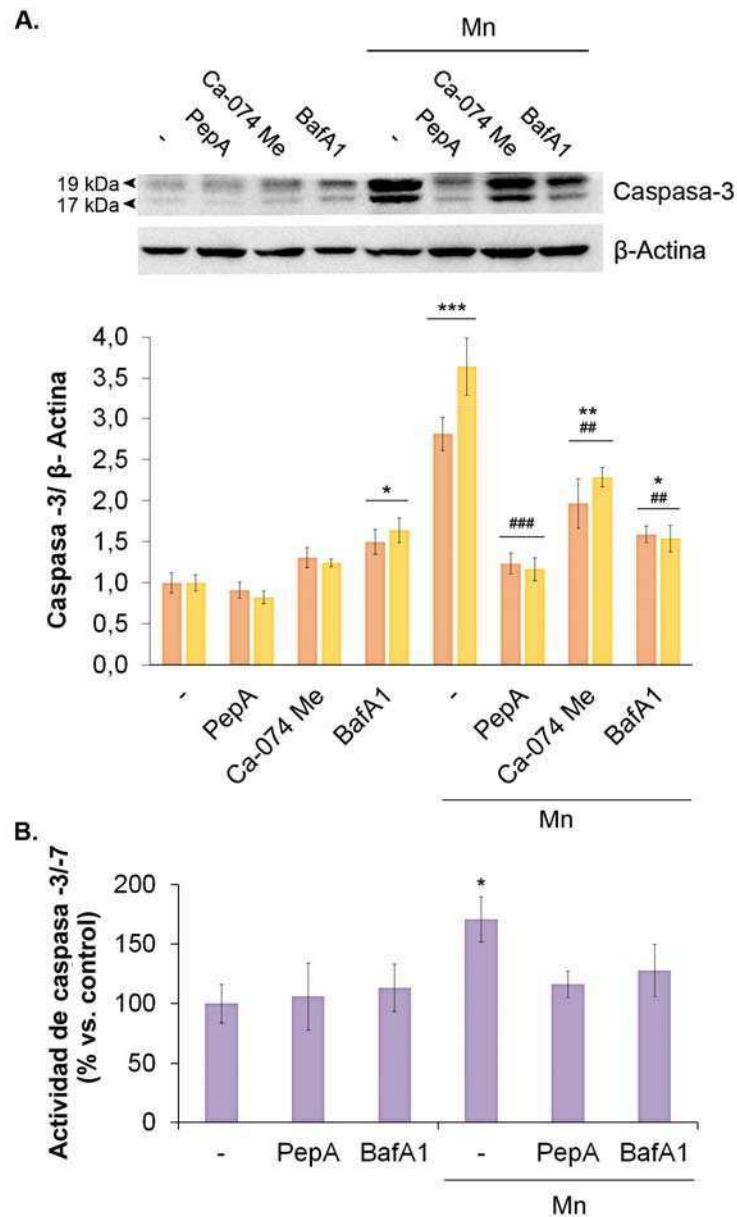


Figura 39. Activación de la caspasa-3. **A.** Las células fueron pre- incubadas durante 1 h con PepA 10 μ M, Ca-074 Me 1 μ M o BafA1 0,1 nM y luego expuestas a Mn durante 24 hs. Se detectaron los niveles del fragmento largo de caspasa-3 activa (17/ 19kDa) empleando un anticuerpo específico. Las membranas se reprobaron con un anticuerpo anti- β -actina como control de carga. **B.** Las células fueron pre- incubadas durante 1 h con PepA 10 μ M o BafA1 0,1 nM y luego expuestas a Mn durante 24 hs. La actividad de las caspasas -3/-7 se evaluó por medio del clivaje del sustrato Ac-DEVD-pNA (100 μ M). Las mediciones de absorbancia a 405 nm que detectan la generación de pNA se realizaron luego de 2, 3 y 4 hs de incubación en un lector de microplacas. Los resultados mostrados corresponden a las mediciones de 4 hs. * p <0,05 vs. control. Estadístico: ANOVA de un factor con contrastes de Newman- Keuls.

El Mn generó un aumento en las formas clivadas p19/ p17 de $2,8 \pm 0,4$ y $3,6 \pm 0,6$ veces con respecto al control, que fue completamente prevenido por PepA. Por su parte, Ca-074 Me previno en un $44 \pm 22\%$ y $50 \pm 15\%$ la generación de los productos clivados p19/p17 con respecto a Mn, mientras que la BafA1 disminuyó los niveles de expresión $67 \pm 13\%$ y $81 \pm 20\%$, respectivamente.

Para confirmar los resultados obtenidos en el inmunoblot, se realizó un ensayo de actividad enzimática empleando el sustrato de las caspasas-3/-7 Ac-DEVD-pNA. El clivaje en la secuencia de reconocimiento DEVD permite la liberación de pNA que puede ser medida espectrofotométricamente (**Fig. 39B**). Tanto PepA como BafA1 lograron prevenir totalmente el aumento en la actividad de las caspasas-3/-7 inducido por Mn.

En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos hasta el momento en lo que respecta al efecto de los inhibidores PepA, Ca-074 Me y BafA1 sobre los distintos parámetros apoptóticos.

	Mn 24 hs en MLS		
	PepA	Ca-074 Me	BafA1
Activación de caspasa-8	↓		↓
Niveles de FasL	↓	↓	↓
Clivaje de Bid	↓	↓	↓
Pérdida $\Delta\psi_m$	↓	↓	↓
Liberación de citocromo c	↓	↓	↓
Activación de caspasa-9	↓	↓	↓
Activación de caspasas-3/-7	↓	↓	↓

Tabla 2. Resumen de los resultados obtenidos empleando los inhibidores PepA, Ca-074 Me y BafA1 de la vía lisosomal de muerte sobre las vías apoptóticas.

Hasta aquí hemos demostrado que la que la disrupción de la integridad lisosomal como producto de la exposición a Mn afecta la viabilidad celular y conduce a la activación de mecanismos apoptóticos. Los eventos moleculares relacionados, en principio, con la vía extrínseca (activación de la caspasa-8 y niveles de FasL) fueron prevenidos por los compuestos analizados. Además,

resulta evidente que las CatD y B son responsables del clivaje de Bid, lo cual conduciría a la pérdida del $\Delta\psi_m$, liberación de citocromo c y activación de las caspasas -9 y -3/-7. El hecho de que el clivaje de Bid sea totalmente prevenido por los inhibidores de catepsinas, y los procesos relacionados con la vía intrínseca resulten parcialmente inhibidos, pone de manifiesto que otros actores de esta cascada, además de los miembros de la familia Bcl-2 están interviniendo en su ejecución. Por último, los resultados se ajustan a un modelo donde la PML ese ubica en un nivel apical a la activación de la vía de muerte mitocondrial.

Por otra parte, la PML podría también afectar la degradación lisosomal-autofágica, un proceso que normalmente mantiene la supervivencia celular (Eskelinen y Saftig, 2009; Galluzzi et al., 2012). Sin embargo, se ha demostrado que en ciertos modelos la autofagia puede colaborar con la apoptosis o bien desencadenar la muerte por mecanismos independientes (Eisenberg-Lerner et al., 2009).

Teniendo en cuenta que los lisosomas y las mitocondrias dañadas se eliminan por autofagia (Ashrafi y Schwarz, 2013; Hung et al., 2013; Maejima et al., 2013) y que la degradación autofágica en condiciones de estrés oxidativo puede conducir al daño de las membranas lisosomales (Pivtoraiko et al., 2009), el siguiente objetivo consistió en estudiar la posible activación de la autofagia en nuestro modelo y su relevancia en la muerte celular inducida por Mn.

Capítulo 3

Rol de la autofagia en la citotoxicidad inducida
por Mn

3.1 Generalidades

La vía autofágica- lisosomal requiere un flujo continuo de formación, fusión y eliminación de vesículas. Por lo tanto, una alteración en alguno de los pasos de esta vía conduce a cambios en su funcionamiento tanto río arriba como río abajo de la misma. En el capítulo 1, hemos demostrado que los lisosomas se encuentran afectados como consecuencia de la exposición a Mn, pero aún no conocemos si este evento incide o no en la degradación autofágica. Por lo tanto, esta parte final de la Tesis estuvo dedicada a tratar de elucidar este interrogante.

3.2 Formación de vesículas autofágicas

3.2.1 Tinción con monodansilcadaverina

La posible generación de vacuolas autofágicas se evaluó mediante la tinción con monodansilcadaverina (MDC), un colorante fluorescente que se acumula en autofagosomas y autolisosomas (Munafó y Colombo, 2001). Las células se expusieron a Mn durante 24 hs en MSFB o MLS, se marcaron con MDC (0,05mM, 10 min) e inmediatamente se observaron por microscopía de fluorescencia (**Fig. 40**).

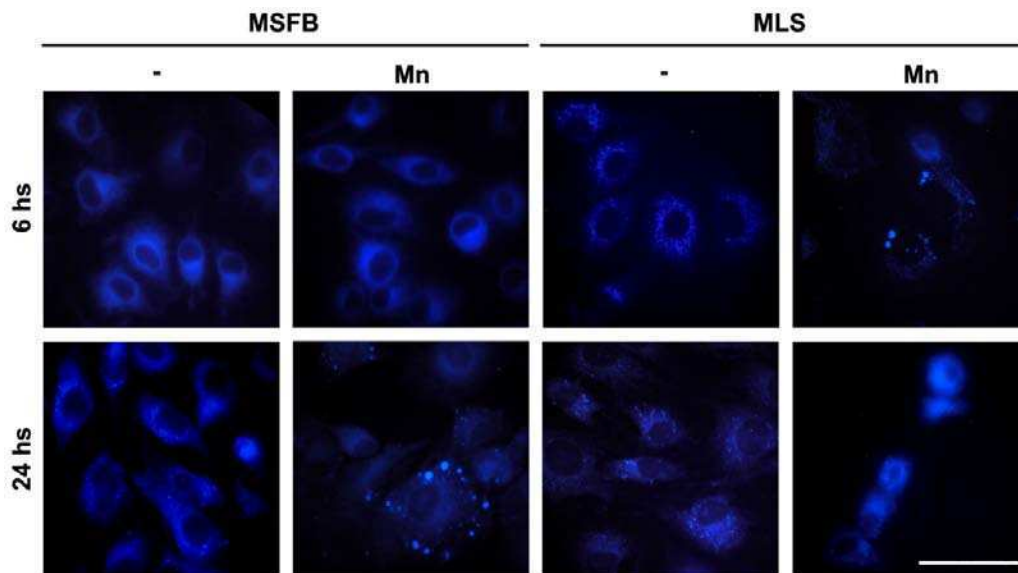


Figura 40. Formación de vacuolas autofágicas. Las células se incubaron durante 6 o 24 hs con Mn en MSFB o MLS, se tiñeron con MDC durante 10 min a 37°C e inmediatamente se visualizaron en un microscopio Nikon Eclipse E600 (λ_{ex} : 330–380 nm; λ_{em} : 435–485 nm). Barra de escala: 50 μ m.

El Mn generó la aparición de vacuolas autofágicas a partir de las 6 hs de incubación en MLS y más tardíamente en MSFB (24 hs). También en este ensayo, la privación de suero por si misma indujo la formación de pequeñas vesículas. Estos hallazgos podrían estar relacionados con la activación de la autofagia. Por otra parte, no fue posible observar la morfología de las células incubadas con Mn durante 24 hs en MLS dado que estas se contrajeron y redondearon rápidamente al ser analizadas por microscopía. Este efecto podría deberse al daño fototóxico causado por la generación de oxígeno singlete como consecuencia de la excitación del colorante fluorescente (Lichtman y Conchello, 2005). Dado que la exposición a Mn durante 24 hs en MLS induce ~50% de muerte, estrés oxidativo y apoptosis, es probable que este cultivo sea más susceptible a este estrés fototóxico adicional.

La activación de la autofagia conduce inicialmente a un aumento en la formación de autofagosomas y, consecuentemente, a un incremento en el número de autolisosomas. Por otra parte, un estímulo que impide la degradación lisosomal (ya sea causando daño a la organela o afectando la fusión vesicular) puede conducir a una acumulación de autofagosomas. Por este motivo, la medición de un aumento en la cantidad de autofagosomas no implica necesariamente que la vía autofágica se encuentre activada (**Fig. 41**) y por lo tanto se requiere de la determinación de parámetros adicionales para asegurar que este proceso esté ocurriendo.

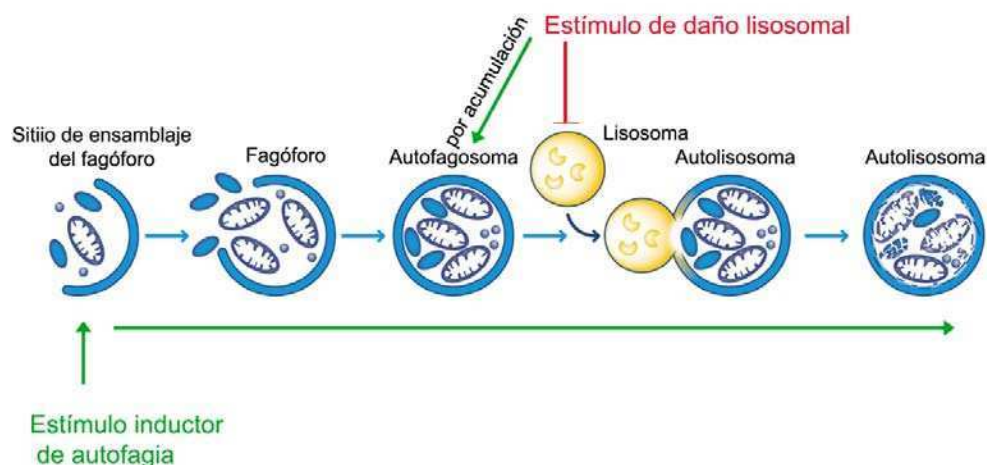


Figura 41. Vesículas intervinientes en la inducción o inhibición de la autofagia. Un estímulo puede inducir la vía autofágica mediante mecanismos de señalización que aumenten el secuestro de material para degradar, llevando a la generación de fagóforos, autofagosomas y autolisosomas. Por otra parte, si el estímulo causara daño lisosomal, llevaría a una acumulación de autofagosomas. La imagen de las vacuolas pertenece a Abcam Inc. (Cambridge, MA, USA)

3.2.2 Niveles de LC3-II

La cadena liviana 3 de la proteína asociada a microtúbulos (MAP- LC3 o simplemente LC3) es el marcador por excelencia de la activación de la autofagia. Esta se sintetiza y sufre rápidamente un procesamiento post- traduccional para generar la variante citosólica, LC3-I. Ante un estímulo autofágico, LC3-I se conjuga covalentemente a fosfatidil-etanolamina para formar LC3-II, que se ancla en el fagóforo y se mantiene asociada a las vacuolas durante los siguientes estadíos de la autofagia. Por lo tanto, los niveles de LC3-II mantienen una estrecha relación con la cantidad de autofagosomas. Dado que los niveles de esta proteína están sujetos a síntesis y degradación, es necesario separar estos procesos empleando inhibidores que impidan la degradación lisosomal. Uno de los más empleados es la BafA1, que al inhibir irreversiblemente a la v-ATPasa, detiene la acidificación lisosomal y con ello, la degradación en dicha organela. De este modo, la incubación de las células con este inhibidor permite poner en juego una variable a la vez y diferenciar los cambios debidos a la activación de la autofagia de los generados por una disminución en la degradación de los autofagosomas (**Fig. 42**) (Bowman et al., 1988; Kabeya et al., 2000; Mizushima and Yoshimori, 2007; Rubinsztein et al., 2009).

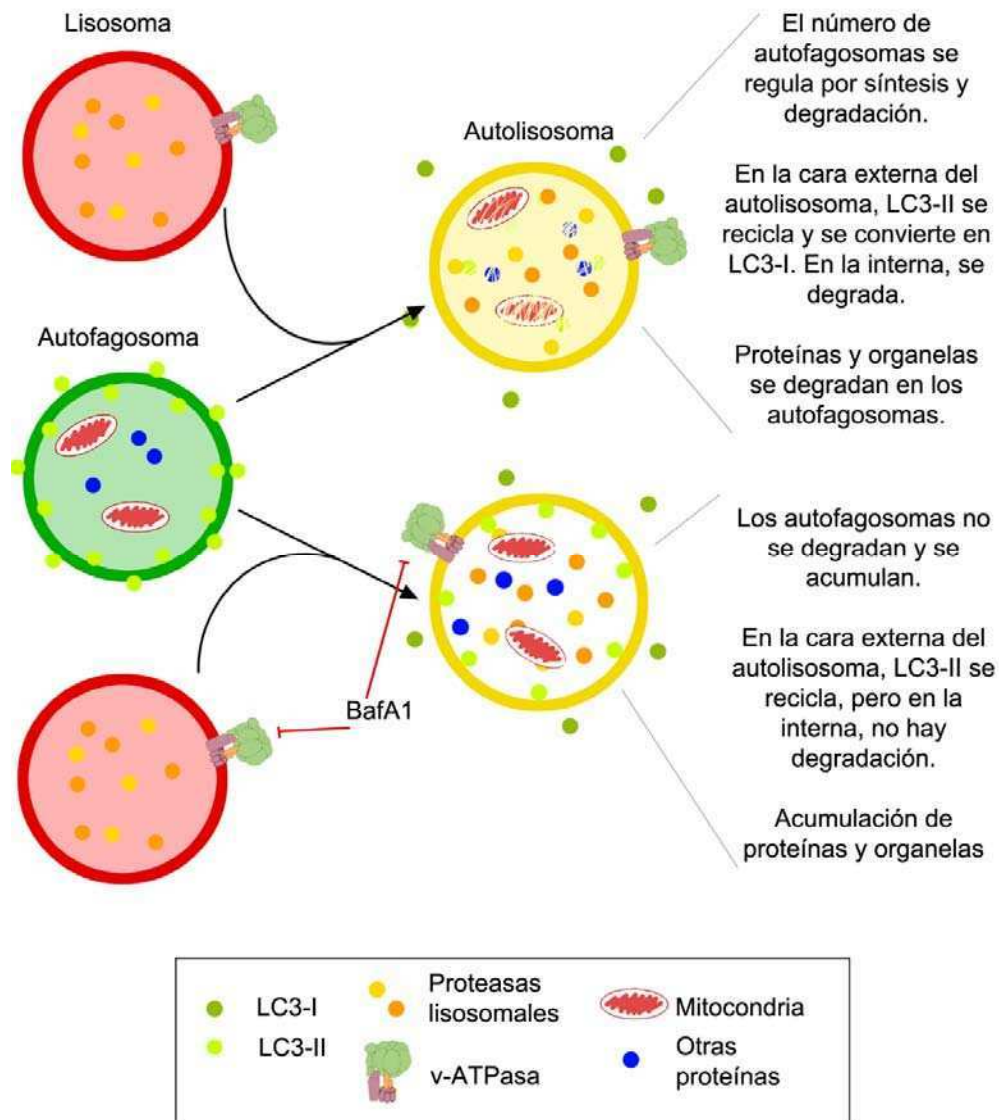


Figura 42. Empleo de BafA1 para disociar la síntesis de LC3-II de la degradación. Se esquematiza el efecto de la BafA1 sobre el flujo autofágico. La inhibición de la v-ATPasa impide la acidificación de las VAs y la degradación por la vía autofágica-lisosomal.

Para estudiar en el tiempo una posible activación del proceso autofágico en respuesta al insulto generado por el Mn, las células se incubaron con el metal durante tiempos crecientes (1- 6hs) en MSFB o MLS, se realizó un inmunoblot y se

midió la expresión de la proteína LC3 (**Fig 43A**). Se encontró un aumento en los niveles de LC3-II a partir de 1 h de incubación con Mn tanto en MSFB como en MLS.

Para evaluar si el aumento en los niveles de LC3-II se sostiene en el tiempo, y teniendo en cuenta que luego de 24 hs de exposición al metal en MLS se genera la PML (**Figs. 26 y 28**) y se desencadena un proceso apoptótico (**Figs. 34- 39**), las células se incubaron con Mn durante 24 hs y previo a la finalización del tratamiento se agregó BafA1 (2 hs, 100 nM) (**Fig. 43B**). En presencia del metal, se midió un aumento en los niveles de LC3-II tanto en MSFB como en MLS (calles 1 vs. 2 y 5 vs. 6, respectivamente). Además, la incubación de las células expuestas a Mn en ambos tipos de medio con BafA1 aumentó aún más los niveles de LC3-II, lo que sugiere que las células poseen capacidad degradativa (calles 2 vs. 4 y 6 vs. 8). En consecuencia, **los niveles aumentados de LC3-II en las células expuestas a Mn indican la activación de procesos autofágicos.**

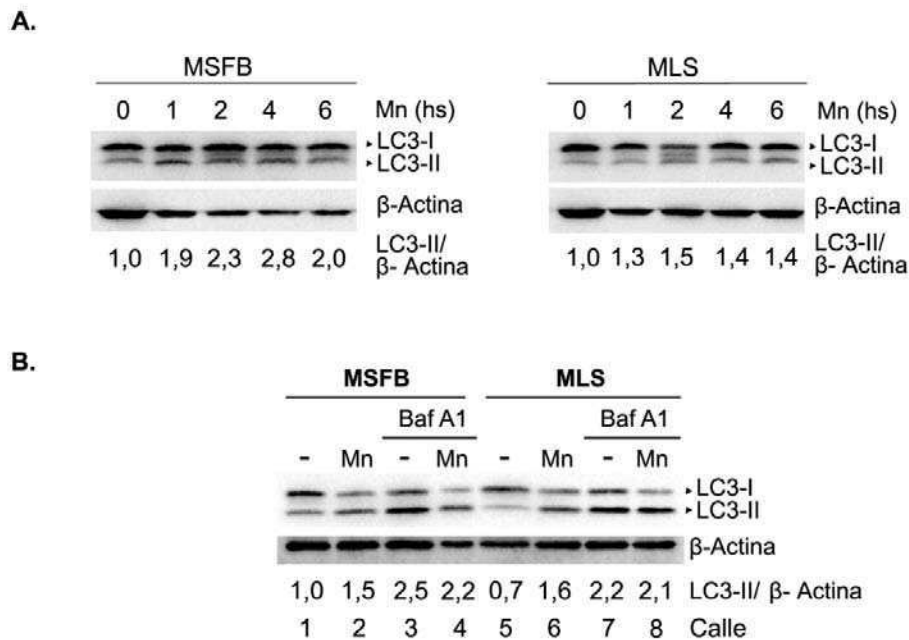
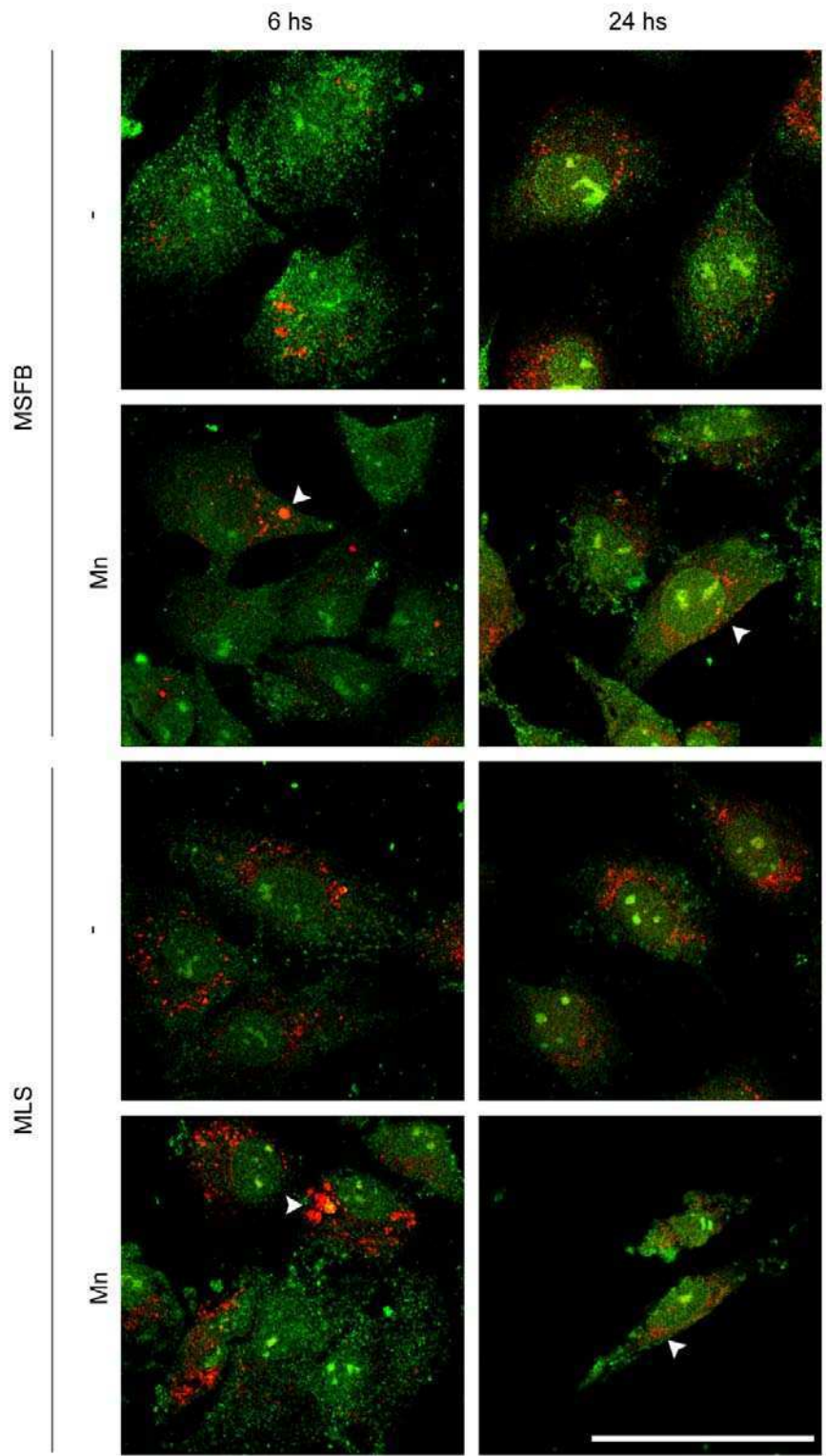


Figura 43. Niveles de LC3. (A-B). Las células se incubaron con Mn durante 1- 6 hs (**A**) o 24 hs (**B**) en MSFB o MLS. Previo a la finalización de la incubación con Mn durante 24 hs, las células fueron incubadas durante 2 hs con BafA1 (100nM) para impedir la degradación lisosomal. Las proteínas fueron resueltas por medio de un gel 15% y transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas se revelaron con un anticuerpo anti-LC3 y se reprobaron con un anticuerpo anti- β-Actina como control de carga.

Teniendo en cuenta que el Mn activa el proceso autofágico y también afecta la estabilidad lisosomal, es posible que el aumento en los niveles de LC3-II sea una contribución de ambos procesos. Para estudiar la formación de autofagosomas y evaluar si el daño lisosomal inducido por Mn afecta la formación de autolisosomas, se realizó una inmunomarcación de LC3 en conjunto con una tinción con LysoTracker Red DND-99 (**Fig. 44**). Mediante esta técnica se distinguen los autolisosomas por poseer doble marcación.



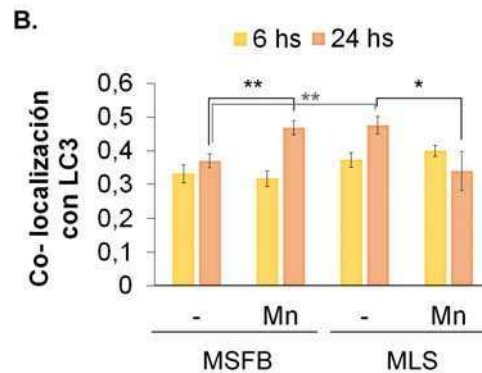


Figura 44. Formación de autofagosomas y autolisosomas. A. Las células se expusieron a Mn durante 6 o 24hs en MSFB o MLS, se tiñeron con Lysotracker Red DND-99 (200nM) y se marcaron con anticuerpos específicos anti-LC3 (verde). Las flechas blancas señalan autolisosomas en las células expuestas a Mn. Las imágenes se obtuvieron en un microscopio confocal Olympus FV300 (Alexa 488: λ_{ex} : 488nm, λ_{em} : 510- 530nm; Lysotracker Red DND-99: λ_{ex} : 543 nm, λ_{em} : 585- 605nm). Barra de escala: 50 μ m. B. Se calculó el coeficiente de Manders de co- localización en el canal verde. Se cuantificaron 25 células por tratamiento (n=2). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Estadístico: ANOVA de un factor con contrastes de Newman- Keuls.

La incubación con Mn en todas las condiciones ensayadas, generó cambios en la distribución de los autolisosomas y/o la formación de autolisosomas con doble marcación (LC3 y Lysotracker Red DND-99; flechas blancas).

Para estudiar si la fusión vesicular se ve afectada, se evaluó el grado de co-localización entre LC3 y las VAs (marcadas con Lysotracker Red DND-99) (**Fig. 44B**). La exposición a Mn durante 6 hs no indujo cambios en los niveles de co- localización, indicando que la fusión vesicular no se encuentra afectada en estas condiciones.

La incubación con Mn durante 24 hs en MSFB indujo un aumento en la formación de autolisosomas ($p < 0,01$). En cambio, en MLS la exposición al metal llevó a una disminución en la formación de este tipo de vesículas.

Los resultados obtenidos indican que la autofagia se activa en respuesta a la toxicidad del Mn. Sin embargo, una vez que los lisosomas se encuentran comprometidos y se desencadena la apoptosis, la compleción de la autofagia se encontraría afectada.

3.3 Autofagia en la muerte celular

Para estudiar el posible rol de la autofagia en la toxicidad del Mn, se emplearon los inhibidores 3- metiladenina (3-MA) y wortmanina (WM). Los mismos actúan inhibiendo la formación de autofagosomas mediada por PI3KC3. Sin embargo, la mayoría de los inhibidores de la autofagia no son enteramente específicos y por esto es importante considerar sus efectos en función de la concentración y del tiempo de incubación. En este sentido, la 3-MA y la WM pueden inhibir también a la PI3K clase 1 (PI3KC1) y dar como resultado la activación de la autofagia y/o la inhibición de la vía de supervivencia dependiente de Akt (Klionsky et al., 2012). Por este motivo, se ensayaron diferentes protocolos de incubación para ajustar el sistema de modo que los inhibidores por si mismos no resulten citotóxicos y además sean capaces de prevenir los cambios en los niveles de expresión de LC3-II inducidos por Mn.

Para el caso de la 3-MA se ensayaron dos protocolos: I) Las células se pre-incubaron con una concentración baja de 3-MA (1 mM) durante 1 h y luego se agregó Mn durante 24 hs (**Fig. 45AI**) o II) las células se pre- incubaron con 3-MA 10mM 1h, se removió el medio y luego se realizó la exposición al metal durante 24 hs (**Fig. 45AII**). Empleando el protocolo I, se midió un aumento en los niveles de LC3-II en presencia de Mn como consecuencia de la incubación con el inhibidor (**Fig. 45BI**), lo cual sugiere una activación de la vía autofágica. Utilizando el protocolo II, se logró prevenir la generación de LC3-II inducida por Mn, por lo que en dichas condiciones, la 3-MA estaría funcionando de modo tal de inhibir la autofagia (**Fig. 45BII**). Teniendo en cuenta que en el protocolo I la 3-MA estaría activando la autofagia, y en el II inhibiéndola, se midió la viabilidad celular por reducción de MTT con el fin de establecer si la autofagia está implicada en la muerte celular.

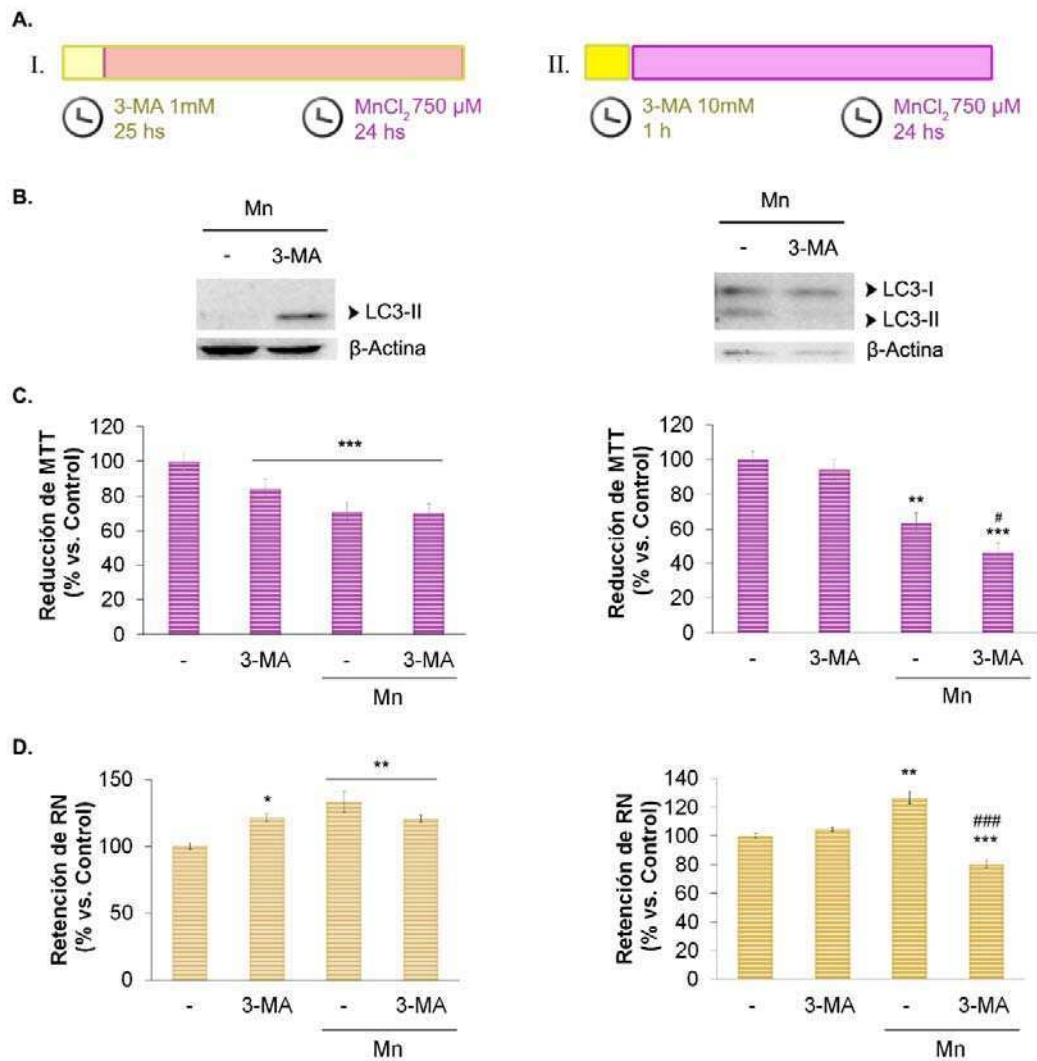


Figura 45. Inhibición de PI3K3 empleando 3-MA. A. Las células se pre- incubaron con 3-MA 1 mM durante 1 h en MLS y luego se agregó Mn por 24 hs (I), o bien se pre- incubaron con 3-MA 10 mM, se realizó un lavado con MLS y luego se incubaron con Mn durante 24 hs en MLS (II). B. Las proteínas fueron resueltas por medio de un gel 15% y transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Se reveló con un anticuerpo anti- LC3 y luego la membrana se reproboó con un anticuerpo anti- β-Actina como control de carga. Para cada uno de los protocolos se realizó un ensayo de reducción de MTT (Mn 24 hs en MLS) (C) y de retención de RN (D) (Mn 6 hs en MLS). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 con respecto al control; #p<0,05, ###p<0,001, con respecto al Mn. Estadístico: ANOVA de un factor con contrastes de Newman-Keuls.

La exposición a Mn en presencia de 3-MA 10mM (protocolo II) incrementó la citotoxicidad inducida por Mn en un $17 \pm 5\%$ ($p<0,05$) (Fig. 45CII). Estos resultados indicarían que la autofagia juega un rol importante en la supervivencia celular frente

al estrés generado por el metal. Por otra parte, en el caso del protocolo I, no se observó efecto de la 3-MA sobre el daño inducido por Mn (**Fig. 45CI**).

Para evaluar si los cambios a nivel de la retención de RN están relacionados con el desencadenamiento del proceso autofágico, se realizó este ensayo acorde a los protocolos descritos, pero exponiendo las células a Mn durante 6 hs. Empleando el protocolo I, la 3-MA no tuvo efecto sobre el aumento en la retención del colorante inducido por Mn (**Fig. 45CI**). Por otra parte, empleando el segundo protocolo, la 3-MA disminuyó la retención de RN tanto respecto al Mn como al control ($p < 0,001$) (**Fig. 45CII**).

Como se mencionó previamente, la WM es otro inhibidor de la PI3KC3. Para ensayar el efecto de este inhibidor, se realizó en primer lugar una curva de concentración para evaluar su rol en la muerte celular inducida por Mn (**Fig. 46A**). Se observó que ninguna de las concentraciones analizadas tuvo efecto sobre la toxicidad del metal. Por otra parte, la WM 500 nM disminuyó la viabilidad celular, lo que sugiere que, en estas condiciones, podría afectar la supervivencia por la vía de Akt.

Teniendo en cuenta que la concentración de WM 100 nM ha sido empleada para inhibir la autofagia en células C6 y otras líneas de glioma (Harhaji-Trajkovic et al., 2009; Suswam et al., 2013), así como en astrocitos en cultivo primario (Melzer et al., 2008), evaluamos si a esta concentración la WM era capaz de inhibir la formación de autofagosomas. Para ello, las células se pre- incubaron 1 h con WM 100 nM, se expusieron a Mn durante 6 o 24 hs, y se midieron los niveles de LC3-II. La WM logró prevenir el aumento en los niveles de LC3-II inducidos por la exposición a Mn durante 6 hs, pero no tuvo efecto para 24 hs (**Fig. 46B**).

Dado que la WM inhibe la autofagia inducida por 6 hs de exposición a Mn, se evaluó su efecto sobre la retención de RN (**Fig. 46C**). Se observó que la WM previene el aumento de la retención del colorante.

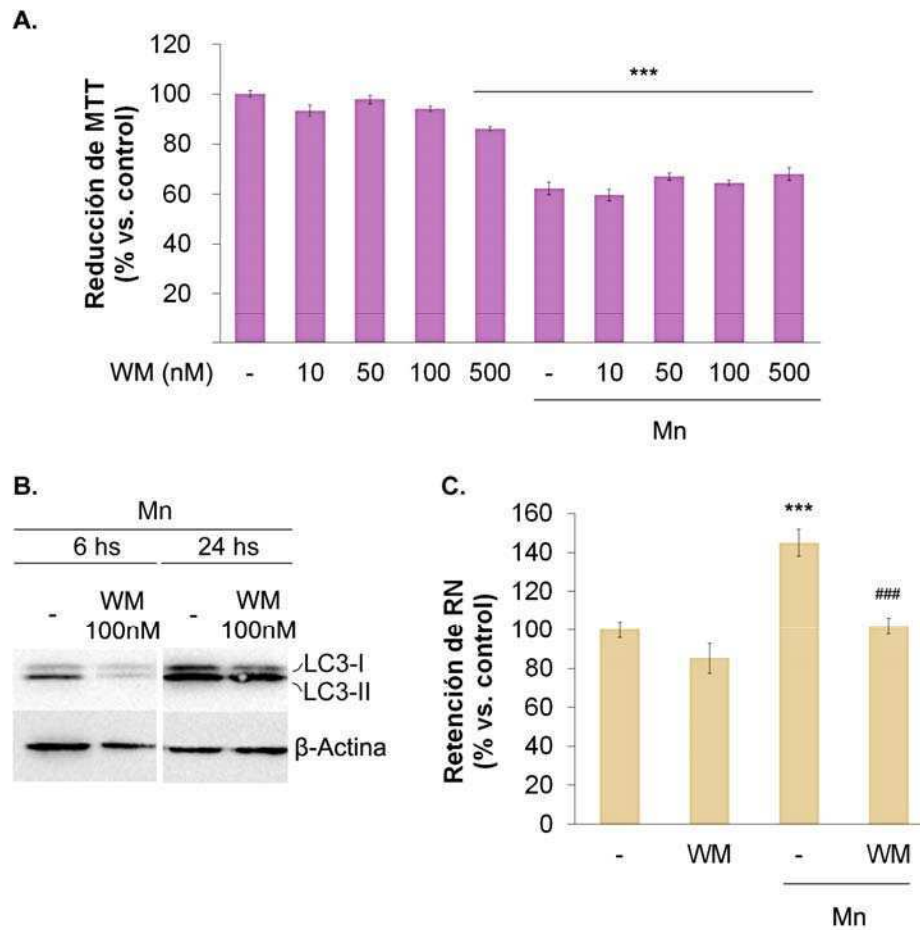


Figura 46. Inhibición de PI3KC3 empleando WM. **A.** Las células se pre- incubaron con distintas concentraciones de WM, se expusieron a Mn durante 24 hs y se midió la reducción de MTT. **B.** Las células se pre- incubaron 1 h con WM 100 nM, se expusieron a Mn durante 6 o 24 hs en MLS y se midieron los niveles de LC3. Las proteínas fueron resueltas por medio de un gel 15% y transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Se reveló con un anticuerpo anti- LC3 y las membranas se reprobaron con un anticuerpo anti- β - Actina como control de carga. **C.** Las células se pre- incubaron con WM 100 nM, se expusieron a Mn durante 6 hs y se realizó un ensayo de retención de RN. *** $p < 0,001$ vs. Control; ### $p < 0,001$ vs. Mn. Estadístico: ANOVA de un factor con contrastes de Newman-Keuls.

En conjunto, los resultados de las Figs. 45DII y 46C sugieren que el aumento en la retención lisosomal de RN se encuentra mediado por procesos autofágicos inducidos por el Mn. Además, la vía autofágica favorecería la supervivencia celular, dado que su inhibición empleando 3-MA incrementa la toxicidad del Mn (Fig. 45CII).

3.4. Vías de señales implicadas en la autofagia

3.4.1 Beclina 1

Beclina 1 es una proteína que actúa como plataforma para el ensamblaje de un complejo que contribuye a la activación de la PI3KC3/Vps34 y es necesario para la formación de autofagosomas. La fosforilación de Beclina 1 permite su disociación de proteínas inhibitorias y favorece la actividad de la PI3KC3 (Kang et al., 2011).

Para evaluar su participación en nuestro modelo, se analizaron los niveles de expresión de Beclina 1 luego de 6 o 24 hs de exposición a Mn en MSFB o MLS (**Fig. 47**). Se detectó la presencia de dos bandas de peso molecular muy cercano, que posiblemente representen las formas fosforilada y no fosforilada de la proteína. La exposición a Mn indujo un aumento en los niveles de ambas bandas luego de 6 hs de exposición en MLS. La incubación con el metal durante 24 hs generó mayor expresión de la banda de mayor peso molecular en ambas condiciones de cultivo.

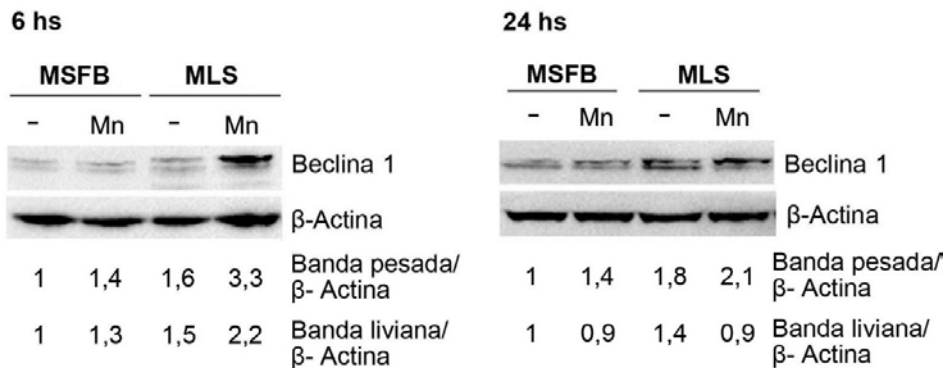


Figura 47. Niveles de expresión de Beclina 1. Las células fueron incubadas con Mn durante 6 o 24 hs tanto en MSFB como en MLS. Las proteínas fueron resueltas por medio de un gel 10% y transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Se reveló con un anticuerpo anti- Beclina 1 y la membrana se reproboó con un anticuerpo anti- β-Actina como control de carga.

Los cambios registrados en los niveles de expresión de Beclina 1 sugieren que esta proteína podría estar involucrada en la activación de la autofagia por la vía de PI3KC3.

3.4.2 Quinasas

Las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) están compuestas por 3 familias: la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK), la quinasa N-terminal de c-Jun (JNK) y p38.

Las proteínas JNK han sido involucradas en la regulación de la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis. Más recientemente se les han adjudicado roles en la autofagia y la muerte celular autofágica (Dhanasekaran y Reddy, 2008; Wei et al., 2008; Shimizu et al., 2010). Por su parte ERK es capaz de inhibir la apoptosis o promover la autofagia en respuesta a un amplio rango de estímulos (Lu y Xu, 2006; Wang et al., 2009; Cagnol y Chambard, 2010; Martinez-Lopez et al., 2013). No obstante, está ampliamente aceptado que la función que estas quinasas cumplan va a depender del estímulo y del tipo celular.

Por otra parte, Akt juega un rol importante en la inhibición de la apoptosis (Franke et al., 2003) y ha sido involucrada también en la inhibición de la autofagia (Huang y Manning, 2009; Wang et al., 2012).

Con el fin de conocer las vías de señales que conducen a la muerte celular inducida por Mn, ya sea modulando la autofagia o favoreciendo la apoptosis, se estudió la señalización mediada por MAPKs y Akt.

Como un indicador de su activación, se midieron los niveles de fosforilación de las quinasas mencionadas. El Mn generó un aumento en los niveles de fosforilación de ERK y JNK en todas las condiciones de exposición (6 y 24 hs en MSFB y MLS). A la vez, se observó una disminución en los niveles de Akt luego de 6 hs de incubación en MSFB y MLS así como luego de 24 hs en MLS (**Fig. 48**).

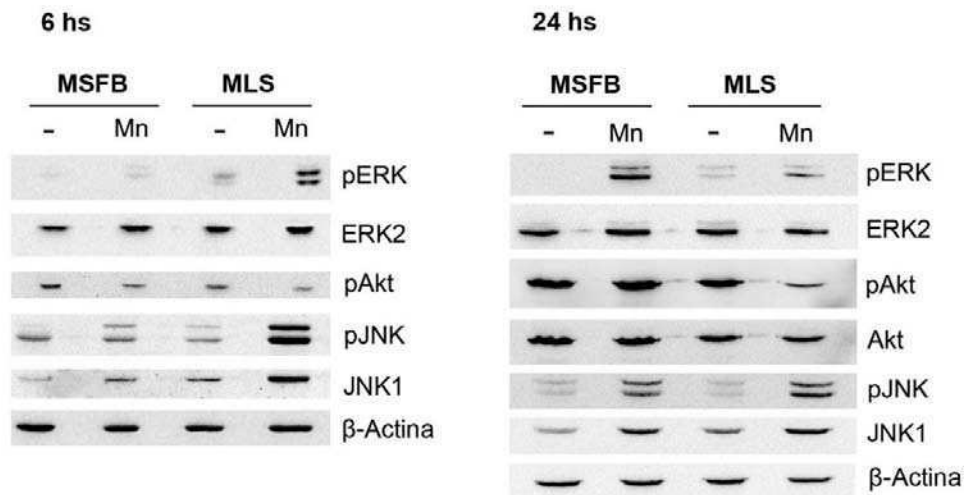


Figura 48. Niveles de fosforilación de quinasas. Las células fueron incubadas con Mn durante 6 o 24 hs tanto en MSFB como en MLS. Las proteínas fueron resueltas por medio de un gel 10% y transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Se reveló con anticuerpos anti- pERK, pJNK, pAkt y la membrana se reprobó con anticuerpos anti-ERK2, Akt, JNK1 y β -Actina como control de carga.

Resultó sorprendente un incremento en los niveles de expresión de la proteína JNK1 luego de la incubación con Mn en todas las condiciones de cultivo. No obstante, Zhang et al. (2008) obtuvieron resultados similares en un modelo de apoptosis inducida por Fas en células HeLa, en el cual la autofagia se activa para prevenir la apoptosis. Si bien los autores no cuentan con evidencia que explique este evento, la señalización de JNK se encuentra relacionada con la activación del proceso autofágico.

La privación de suero por sí misma aumentó los niveles de fosforilación de ERK, pudiendo esto estar relacionado con la posible activación de la autofagia en dicha vía.

Para conocer en detalle si las vías de señales estudiadas son relevantes para los efectos generados por el Mn a nivel de las VAs y de la muerte celular, se emplearon los inhibidores de las vías de ERK y JNK y se evaluó su efecto a nivel de la inducción en la retención de RN y de la citotoxicidad inducida por Mn.

MEK es la MAPK kinasa (MAPKK) que fosforila a ERK. En primera instancia, se realizó un control para comprobar que el inhibidor de MEK (PD98059 25 μ M) es

capaz de disminuir el aumento en los niveles de fosforilación de ERK inducido por Mn (**Fig. 49A**). Efectivamente, PD98059 logró prevenir dicho evento y, por lo tanto, la actividad de la MAPKK. Luego se investigó si la inhibición de las vías de MEK y JNK afecta la muerte celular inducida por Mn. Para ello, las células se pre- incubaron con PD98059 25 μ M y SP600125 20 μ M (inhibidor de la actividad de JNK), se expusieron a Mn durante 24 hs y la viabilidad celular se midió por el ensayo de reducción de MTT (**Fig. 49B**). Ninguno de los inhibidores tuvo efecto sobre la muerte celular inducida por Mn.

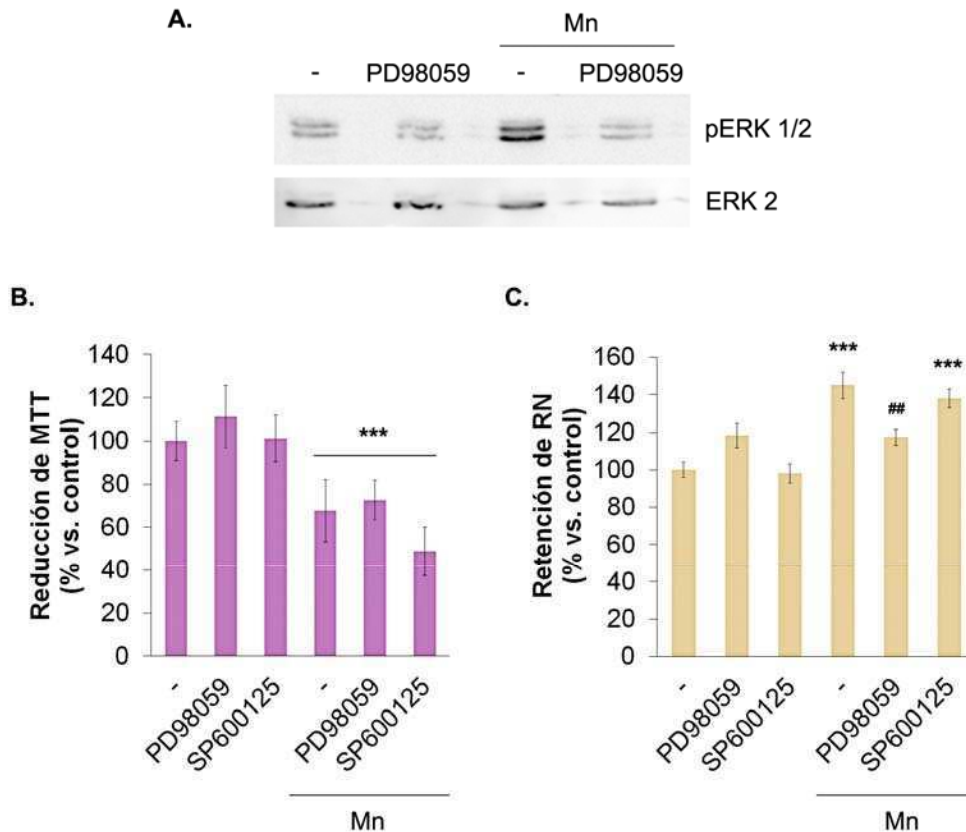


Figura 49. Inhibición de MEK y JNK empleando PD98059 y SP600125. **A.** Las células se pre- incubaron durante 1 h con PD98059 25 μ M y luego se expusieron a Mn durante 24 hs en MLS. Las proteínas fueron resueltas por medio de un gel 10% y transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Se midieron los niveles de pERK 1/2 empleando un anticuerpo específico. La membrana se reproboó con un anticuerpo anti-ERK2 como control de carga. **B.** Las células se pre- incubaron durante 1 h con PD98059 25 μ M o SP600125 20 μ M y luego se expusieron a Mn durante 24 hs. La viabilidad celular se midió por reducción de MTT. **C.** Las células se pre- incubaron durante 1 h con PD98059 25 μ M o SP600125 20 μ M, se expusieron a Mn durante 6 hs

y se midió la retención de RN. *** $p < 0,001$ vs. Control; ## $p < 0,01$ vs. Mn. Estadístico: ANOVA de un factor con contrastes de Newman-Keuls.

Por último, se estudió si dichos inhibidores eran capaces de prevenir el aumento en la retención de RN (**Fig. 49C**). La inhibición de la vía de MEK logró prevenir el aumento en la retención del colorante, mientras que no hubo diferencias al anular la vía de JNK. Estos resultados sugieren que, en estas condiciones, ERK tendría un rol en la activación de la autofagia.

Los resultados obtenidos indican que las vías de señalización de Beclina 1, ERK y JNK se activan en respuesta al daño inducido por Mn, mientras que se genera una inhibición en la vía de supervivencia de Akt. El patrón de señalización obtenido podría estar relacionado con la activación de un proceso autofágico. Esta propuesta es avalada por el efecto de la inhibición de la vía de PI3KC3 y de ERK sobre la retención de RN. La modulación farmacológica de las PI3K y de las MAPK luego de distintos tiempos de exposición al metal, permitirá clarificar su relación con la autofagia y la muerte celular.

3.5 Mitofagia

La mitofagia es un mecanismo autofágico de defensa celular que se desencadena en presencia de mitocondrias dañadas. Este proceso implica el secuestro selectivo y la degradación de las mitocondrias disfuncionales como una manera de prevenir que el daño mitocondrial conduzca a la activación de la muerte celular. Por lo tanto, la mitofagia funciona como una respuesta temprana en la supervivencia. Por el contrario, el estrés oxidativo y las proteasas apoptóticas pueden inactivar la mitofagia y permitir la ejecución de la muerte (Kubli y Gustafsson, 2012).

La exposición a Mn durante 24 hs induce estrés oxidativo, daño mitocondrial (**Fig. 36**) y desencadena la autofagia como un mecanismo de supervivencia (**Fig. 45DII**). Por lo tanto, nos resultó interesante evaluar si la activación de dicha vía luego de 6 hs de exposición, se encuentra relacionada con la remoción de mitocondrias dañadas. Para ello, las células expuestas a Mn durante 6 hs en MSFB o MLS fueron

marcadas con anticuerpos anti- LC3 y anti TOM-20 (una proteína de la membrana externa mitocondrial) y analizadas por microscopía confocal (**Fig. 50A**).

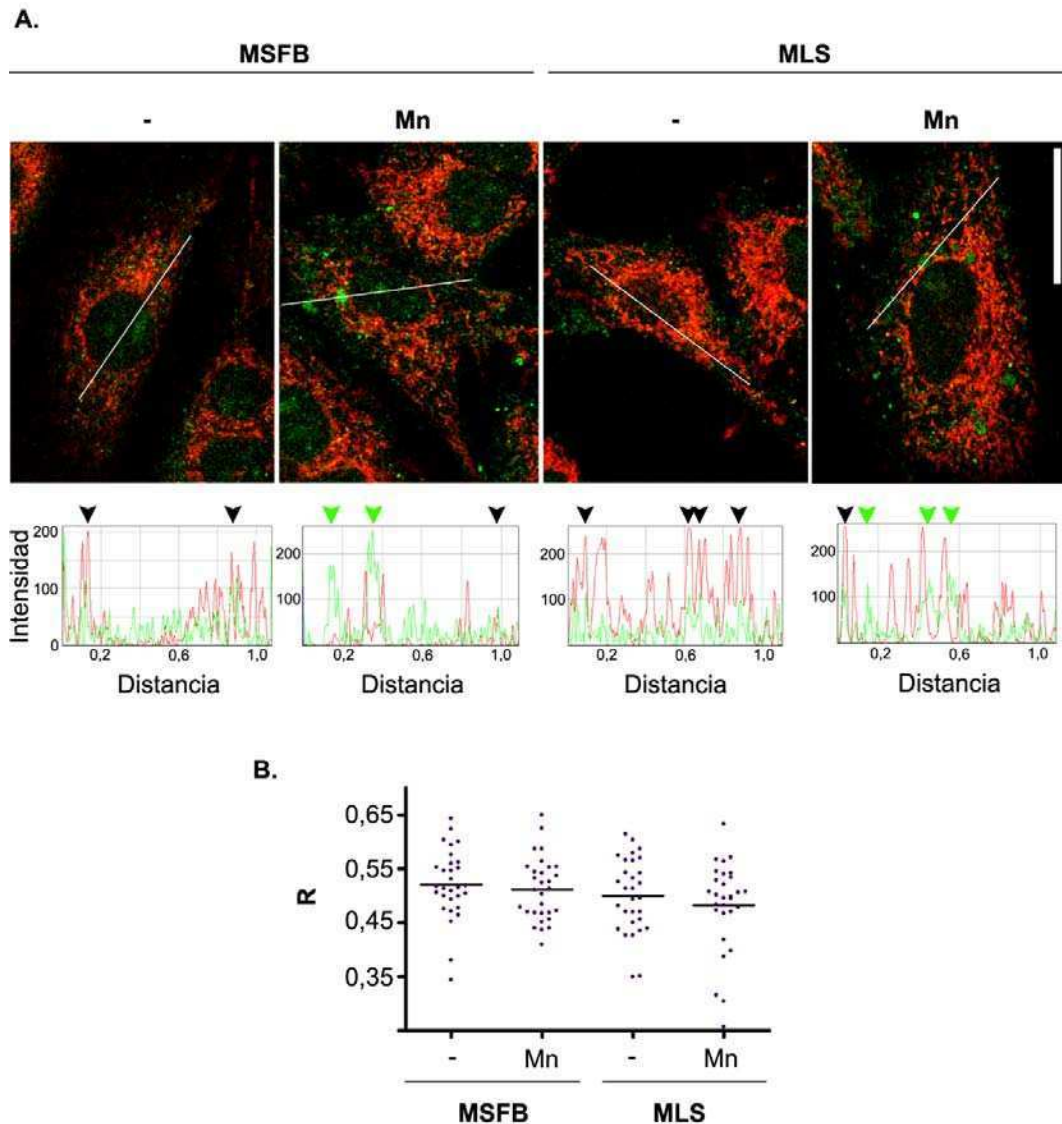


Figura 50. Mitofagia. Las células fueron expuestas a Mn durante 6 hs en MSFB o MLS y fijadas con PFA 4%. **A.** Se realizó una co- inmunomarcación con LC3 (verde) y TOM-20 (rojo). Empleando el complemento de ImageJ RGB profiler, se trazó una línea y se cuantificó la fluorescencia en cada uno de los canales. Se muestra en un gráfico la intensidad de cada canal a lo largo de la línea. Las flechas marcan los picos de fluorescencia, que corresponden a vesículas marcadas con LC3 o con TOM-20. Las flechas negras indican co-localización entre las proteínas LC3 y TOM-20 y las flechas verdes señalan las vesículas formadas como consecuencia de la exposición a Mn, que no contienen TOM-20. **B.** Se calculó el coeficiente de superposición de Manders (R) en 30 células por tratamiento. No se observaron diferencias significativas entre los controles y los tratados. Las imágenes fueron analizadas en un microscopio confocal Olympus

FV300 (Alexa 488: λ_{ex} : 488nm, λ_{em} : 510- 530nm; Alexa 532: λ_{ex} : 543 nm, λ_{em} : 585- 605nm). Barra de escala: 25 μm .

Nuestros resultados mostraron que las vesículas marcadas con LC3, formadas como consecuencia de la exposición a Mn en MSFB así como en MLS, no contienen mitocondrias. Si bien existe co- localización entre la proteína LC3 y TOM-20 (**Fig 3.35B**), los niveles no se vieron afectados como consecuencia de la exposición a Mn.

Estos resultados sugieren que la degradación autofágica de mitocondrias no sería un proceso relevante luego de 6 hs de exposición al metal. De todos modos, este proceso podría estar involucrado en un estadio posterior, donde la mitocondria se encuentre más comprometida.

Capítulo 4

Estudios *in vivo*

4.1 Modelo de toxicidad aguda

En una siguiente etapa se decidió investigar el posible daño a los astrocitos y el compromiso de los lisosomas en un modelo *in vivo* de intoxicación por Mn. Con este objetivo, se empleó un modelo de toxicidad aguda en ratas siguiendo el protocolo puesto a punto por nuestro grupo (Alaimo et al., 2014).

Para ello, se procedió a la inyección de 1 μmol de MnCl_2 (1 μl en solución fisiológica estéril) en el estriado del hemisferio izquierdo de 4 ratas Sprague Dawley macho. En las mismas coordenadas en el hemisferio derecho, se inyectó 1 μl de vehículo como control (**Fig. 51A**). Se empleó un marco estereotáxico como el mostrado en la **Fig. 51B**.

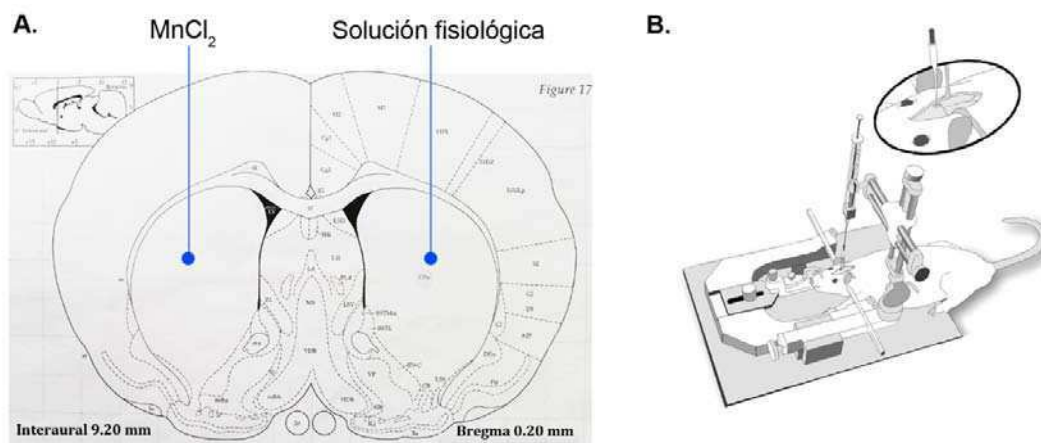


Figura 51. Inyección intra- estriatal. **A.** Se muestra un esquema del estriado 0,20 mm anterior al bregma y se señala el sitio de inyección. El esquema corresponde al Atlas del cerebro en coordenadas estereotáxicas, de Paxinos y Watson (2006). **B.** La rata anestesiada es ubicada en el marco estereotáxico y se coloca verticalmente una jeringa Hamilton. En el círculo superior se muestra un esquema de la vista de la cánula en posición para la inyección en el hemisferio derecho, ligeramente anterior al bregma, tal como ha sido realizado en este caso. La imagen fue adaptada de Rosenblad y Lundberg (2003).

A los 7 días post- inyección, las ratas fueron sacrificadas y los cerebros removidos y seccionados empleando un vibrátomo. Los animales no presentaban alteraciones motoras y se encontraban en buen estado general.

Como se explicó en la Introducción, sección 2.2., la exposición crónica a Mn se caracteriza por una atrofia de los ganglios basales, y en particular, el daño se localiza en el *striatum*, en el *globus pallidus* y, en algunos casos, en la *substantia nigra* y/o en la corteza cerebral.

Teniendo en cuenta que nuestros resultados *in vitro* demuestran que la exposición a Mn resulta tóxica en células gliales, evaluamos el efecto del tratamiento agudo con Mn en el *striatum*, analizando por inmunohistoquímica los niveles de expresión de la proteína fibrilar glial ácida (GFAP), un característico marcador de astrocitos (Fig. 52).

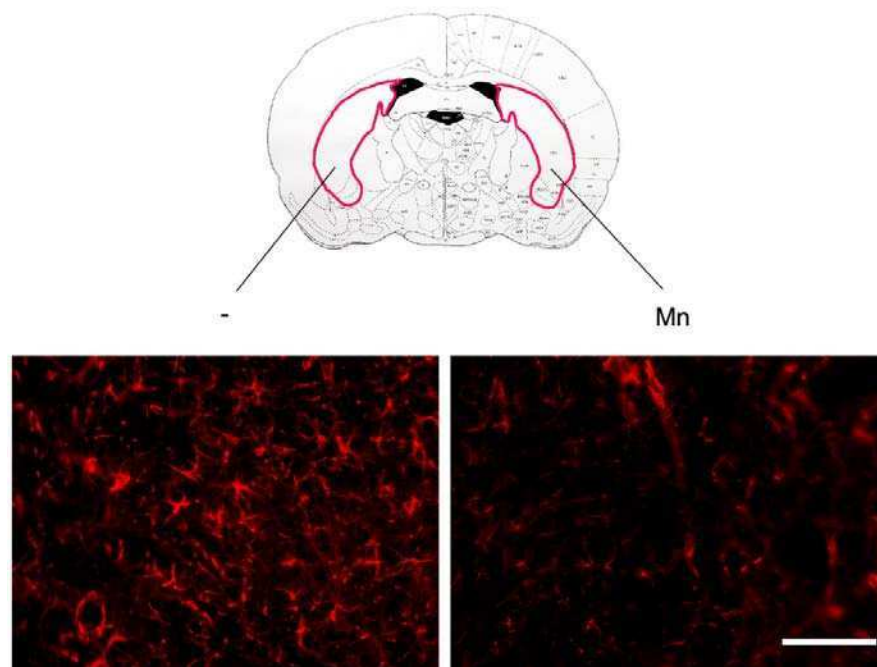


Figura 52. Inmunohistoquímica de astrocitos en el *striatum*. En el esquema superior, se muestra la zona del *striatum* a la que corresponde la imagen obtenida. Los tejidos fueron marcados con anticuerpos específicos anti- GFAP y observados en un microscopio Olympus IX71 (λ_{ex} : 510- 530nm, λ_{em} : LP 590nm). Barra de escala: 100 μ m.

Se observó una marcada disminución en la señal de GFAP en el *striatum* del hemisferio cerebral expuesto a Mn. Evidencias obtenidas por nuestro grupo han demostrado una disminución en la masa celular en el *striatum* de ratas sometidas a

este mismo esquema de tratamiento agudo con Mn (Alaimo et al., 2014). En conjunto los resultados sugieren que la reducción en la marca de GFAP se encontraría relacionada con la muerte celular de los atrofitos.

En el presente trabajo, hemos demostrado que el daño lisosomal juega un rol relevante en la toxicidad del Mn en las células C6 de glioma de rata. Las alteraciones en los lisosomas se caracterizan por un aumento en la cantidad y tamaño (**Figs. 22 y 24**), permeabilización, aumento en los niveles de expresión de CatD (**Fig. 28**) y translocación de esta proteína al citosol (**Fig. 26**). Tomando como base esta evidencia, evaluamos los niveles de expresión de la CatD mediante inmunohistoquímica en distintas áreas del cerebro relacionadas con la toxicidad del metal.

En el *striatum*, las células marcadas se distribuyeron a lo largo de todo el tejido. Si bien la expresión de CatD es ubicua, la marca de esta proteína se localizó predominantemente en escasa cantidad de células con apariencia neuronal (**Fig. 53A**). Este hecho sugiere que la expresión de la CatD es mayor en ciertos tipos celulares. En dichas células, la señal de la proteína fue mayor en los cuerpos celulares, particularmente en vesículas de localización perinuclear, consistentes con compartimientos lisosomales (flechas blancas, **Fig. 53A**). Para estudiar si el Mn generaba cambios en la cantidad de células marcadas, se cuantificó el número de células positivas en 30 campos distribuidos a lo largo del *striatum*. Se obtuvieron resultados similares en el hemisferio control y en el tratado. No obstante, se observó un mayor número/ tamaño de vesículas por célula con un incremento en la intensidad de la señal con respecto al control. Por lo tanto, se cuantificaron distintos parámetros de las células marcadas tales como la intensidad media, el área de mayor inmunoreactividad (que generalmente corresponde con vesículas perinucleares) y el área total de cada célula (25 células por tratamiento, n=3) (**Fig. 53B**). Los resultados obtenidos mostraron una tendencia hacia una mayor intensidad de marca de CatD en las células del hemisferio tratado y un aumento en la relación entre el área de mayor inmunoreactividad y el área total, aunque no se obtuvieron diferencias significativas. Para obtener evidencias concluyentes en este sentido, se

repetirán estas mediciones empleando un número mayor de animales y aumentando el número de células analizadas.

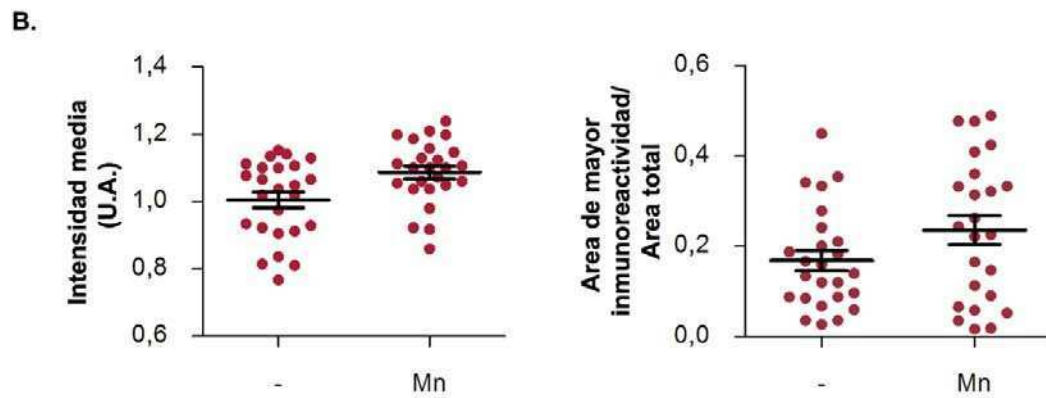
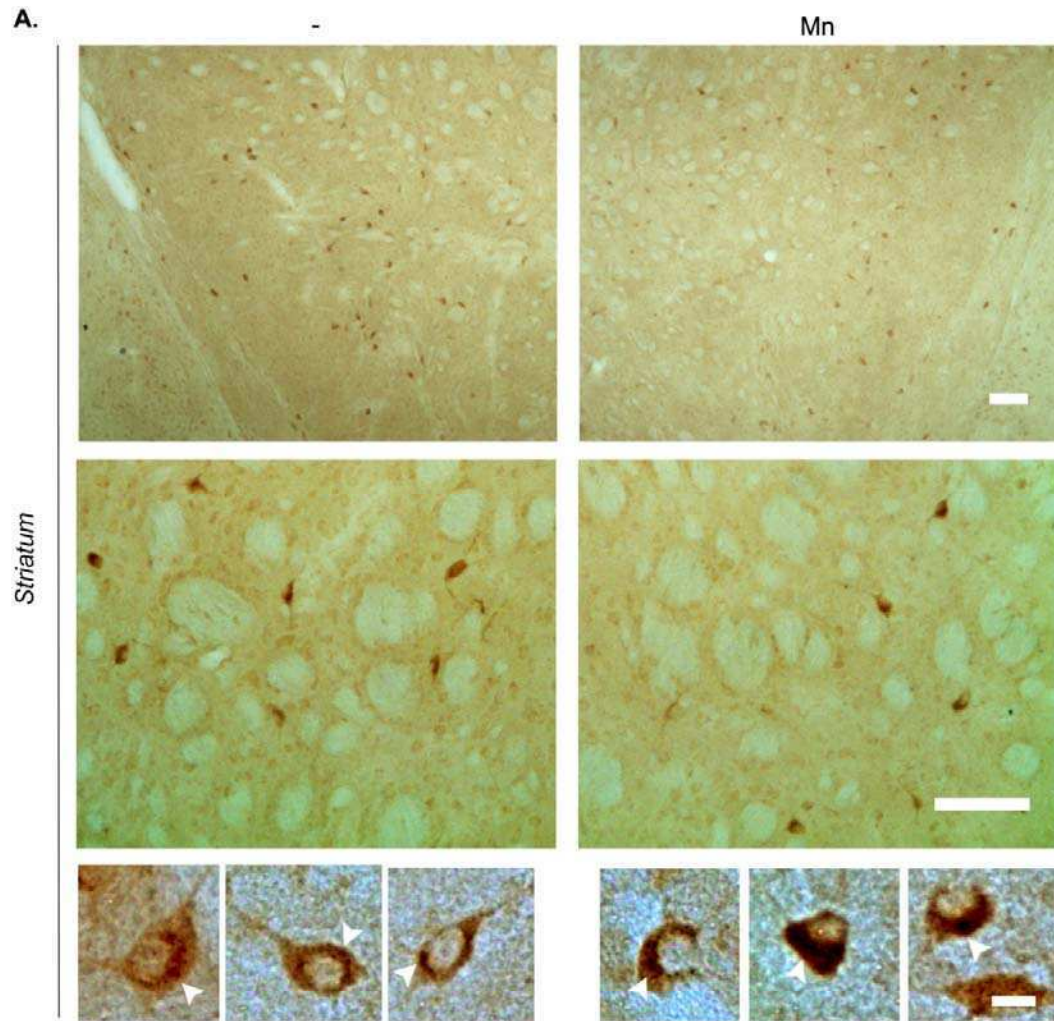


Figura 53. Inmunomarcación de CatD en el *striatum*. **A.** Se estudió mediante inmunohistoquímica la expresión de CatD en cortes de *striatum*. La detección se realizó empleando anticuerpos específicos y el kit ABC (Avidina DH- peroxidasa biotinilada) y se reveló usando el cromógeno DAB (n=3). Los cortes fueron observados en un microscopio Nikon Eclipse E200. Las flechas señalan el área de mayor inmunoreactividad de CatD, que corresponde con la zona perinuclear en la mayoría de los casos. Barra de escala: 100 μm (En las células ampliadas: 10 μm). **B.** La intensidad media y el área de mayor inmunoreactividad/ área total de 25 células por tratamiento (n=3) se cuantificó empleando el programa Image Tool. Se muestran resultados representativos correspondientes a un animal.

En la *substantia nigra*, la marca de CatD se localizó principalmente en la *pars compacta* y disminuyó notablemente en el hemisferio tratado (**Fig. 54A**). De hecho, la cuantificación del área inmunoreactiva mostró tendencia hacia la reducción por exposición a Mn ($77 \pm 41\%$) (**Fig. 54B**). Estos ensayos serán repetidos con el fin de aumentar el n y evaluar la ocurrencia de eventos estadísticamente significativos.

El *globus pallidus* presentó mayor marcación de la proteína que el *striatum*. Además, se observaron células con mayor inmunoreactividad en el control, que no se encontraron luego de la exposición a Mn.

En la corteza cerebral no se observaron diferencias.

en un microscopio Nikon Eclipse E200. Barra de escala: 100 μ m. B. Se cuantificó el área inmunoreactiva en la *pars compacta* empleando el programa Image Tool.

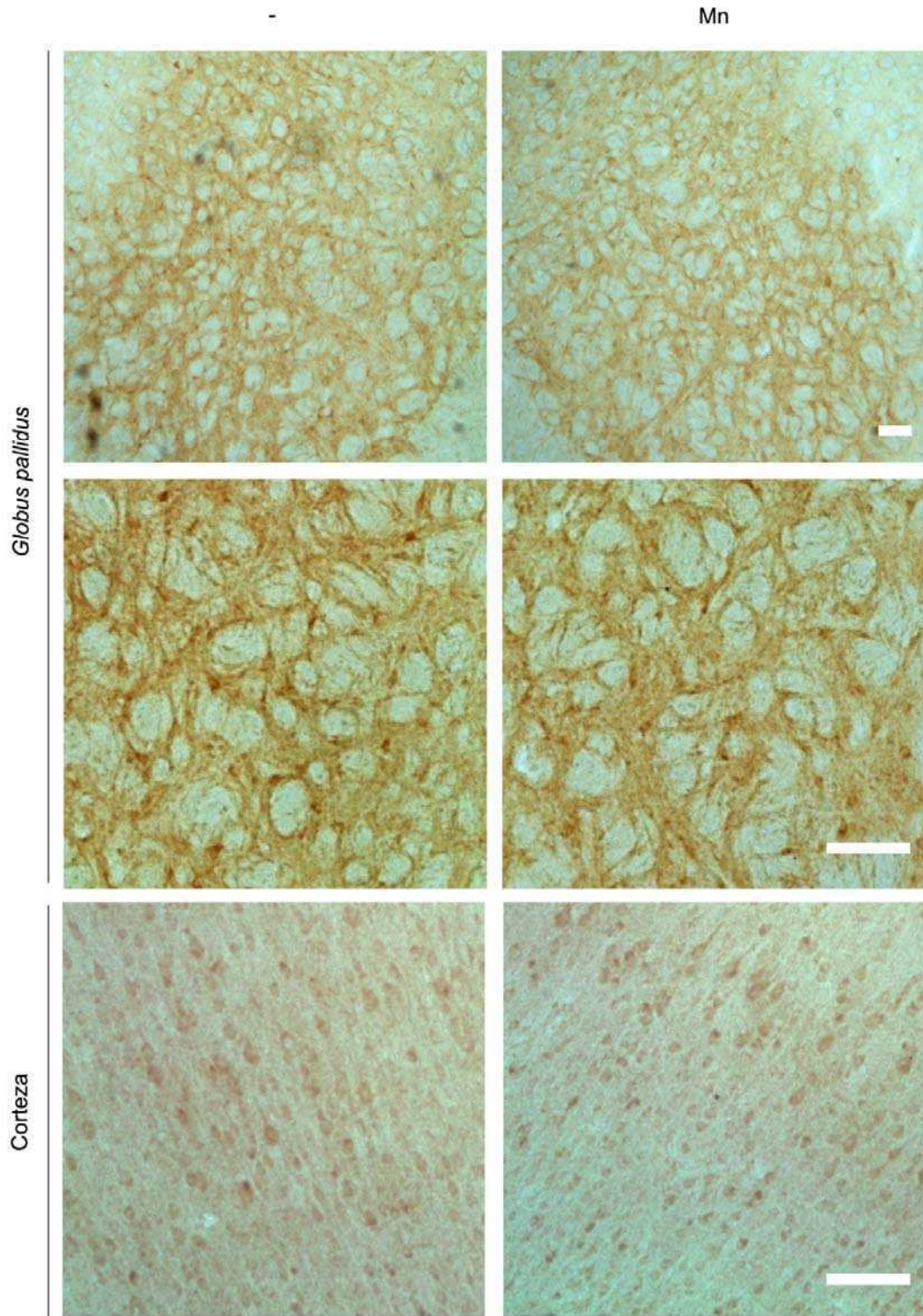


Figura 55. Inmunomarcación de CatD en el *globus pallidus* y la corteza cerebral.

Se estudió por inmunohistoquímica la expresión de CatD en cortes de *globus pallidus* y corteza cerebral. La detección se realizó empleando anticuerpos específicos y el kit ABC (Avidina DH- peroxidasa biotilada) y se reveló usando el cromógeno DAB. Los cortes fueron analizados en un microscopio Nikon Eclipse E200. Barra de escala: 100 μ m.

Dado que hemos detectado una marcada pérdida de astrocitos en el *striatum* (Fig. 52), resultó de interés evaluar si los cambios inducidos por Mn en los niveles de expresión de CatD ocurren en este tipo celular. Para ello, realizamos una co-inmunomarcación con GFAP y visualizamos los tejidos por microscopía confocal (Fig. 56).

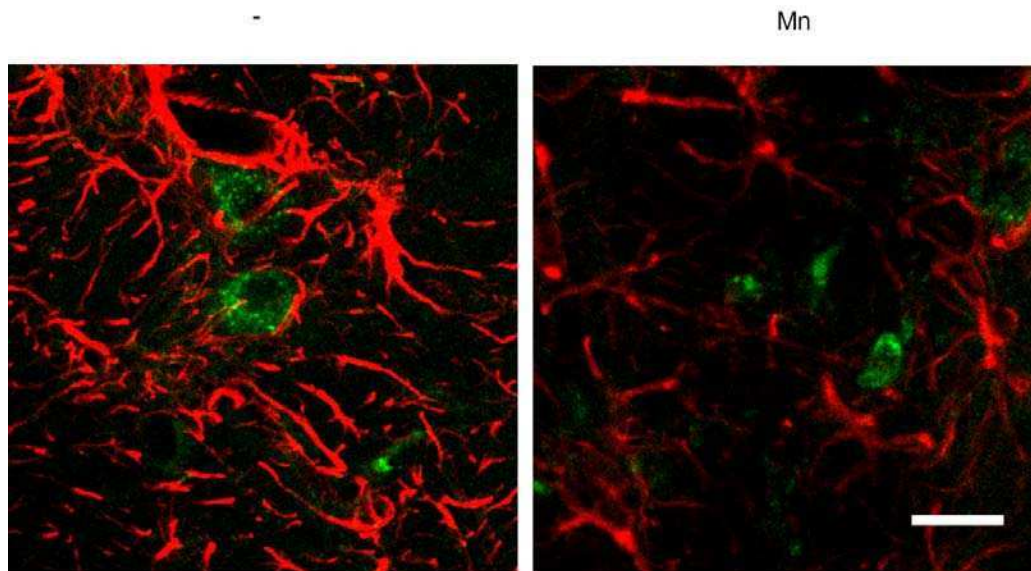


Figura 56. Co- inmunomarcación de GFAP y CatD. Los cortes de *striatum* fueron marcados con anticuerpos específicos anti- GFAP (rojo) y CatD (verde). Las imágenes fueron analizadas en un microscopio confocal Nikon Eclipse E800 C1 (Alexa 488: λ_{ex} : 488nm, λ_{em} : 515- 530nm; Alexa 555: λ_{ex} : 544nm, λ_{em} : LP- 570nm). Barra de escala: 25 μ m

La marca de CatD no co-localizó con la de GFAP, lo que indica que las células marcadas no son astrocitos. Este resultado es consistente con nuestra idea original que proponía que las células marcadas con CatD en la Figs. 53- 55 podrían ser neuronas. Para para corroborar si la CatD co- localiza con este tipo celular, se realizó

una inmunohistoquímica empleando anticuerpos anti- NeuN (un marcador neuronal) y anti- CatD (**Fig. 57**).

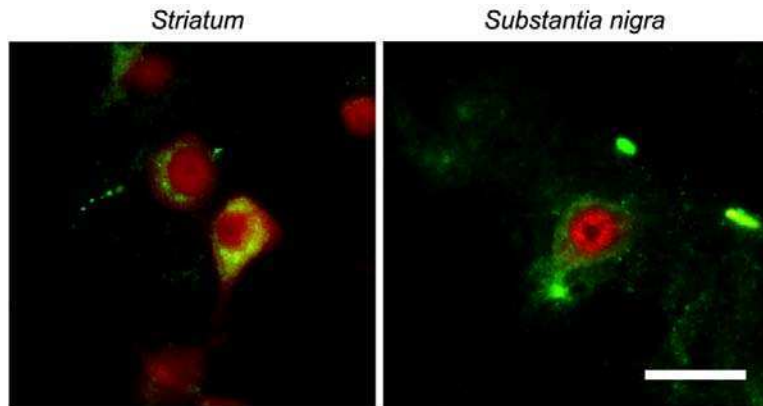


Figura 57. Co- inmunomarcación de NeuN y CatD. Los cortes de *striatum* fueron marcados con anticuerpos específicos anti- NeuN (rojo) y CatD (verde) para determinar si las células inmunoreactivas para CatD eran neuronas. Las imágenes fueron analizadas en un microscopio Olympus IX71 (Alexa 488: λ_{ex} : 460- 495nm, λ_{em} : 510- 550nm; Alexa 555: λ_{ex} : 510- 530nm, λ_{em} : LP 590nm). Barra de escala: 25 μ m.

Efectivamente, la marca de CatD se encontró en células positivas para NeuN en el *striatum* y la *substantia nigra*. Este resultado demuestra que los cambios observados en las **Figs. 53 y 54** ocurren en células neuronales.

Los estudios *in vivo* demostraron que las neuronas poseen mayores niveles de CatD que otros tipos celulares, lo que condujo a que los parámetros analizados se llevaran a cabo en este tipo celular. El Mn generó cambios en los niveles de expresión de la proteína en las distintas áreas cerebrales, siendo destacable un aumento en la marca intracelular en el *striatum* y una importante disminución en la inmunoreactividad en la *substantia nigra*.

Además, el Mn condujo a una importante disminución en la marca de GFAP en el *striatum*, lo que sugiere que la viabilidad de los astrocitos en esta área se encuentra sustancialmente afectada por el metal.

Los resultados obtenidos señalan a los astrocitos como un blanco de la toxicidad del Mn y sugieren la ocurrencia de alteraciones en la vía lisosomal en neuronas del *striatum*, del *globus pallidus* y de la *substantia nigra*.

Discusión

Capítulo 1**Efecto del Mn sobre el sistema de vesículas ácidas**

Los astrocitos son células clave en el funcionamiento del cerebro, fundamentalmente debido a su estrecha interacción con las neuronas (Sofroniew y Vinters, 2010; Sidoryk-Wegrzynowicz y Aschner, 2013). Existen evidencias que los señalan como un blanco temprano en la neurotoxicidad del Mn (Normandin y Hazell, 2002; Zwingmann et al., 2003; Rao y Norenberg, 2004). En trabajos llevados a cabo en nuestro laboratorio, hemos demostrado que este metal induce la muerte celular apoptótica tanto en astrocitos de corteza cerebral de rata en cultivo (Gonzalez et al., 2008) como en líneas celulares C6 de glioma de rata (Alaimo et al., 2011) y Gli36 de astrocitoma humano (Alaimo et al., 2013). En estos modelos, la apoptosis ocurre en un contexto de estrés oxidativo y la vía mitocondrial de muerte cumple un rol relevante en la toxicidad del metal. Recientemente, hemos presentado evidencias que indican que además, el Mn induce desequilibrio en la dinámica mitocondrial conduciendo a la fragmentación de las redes, un evento que favorece la muerte celular apoptótica (Alaimo et al., 2014).

La sobreexposición a Mn ha sido vinculada con la apoptosis en cultivos primarios de astrocitos de rata y ratón (Yin et al., 2008; Fan et al., 2010), células de glioblastoma humano U87 y T98G (Puli et al., 2006; Park y Park, 2010), cultivos primarios de neuronas de rata (Malecki, 2001), células madre neurales de rata (Tamm et al., 2008), células de neuroblastoma humano SH-SY5Y (Li et al., 2010), células dopaminérgicas inmortalizadas MES 23.5 (Prabhakaran et al., 2009), células de feocromocitoma de ratón PC-12 (Hirata et al., 1998; Hirata, 2002; Ferrara et al., 2013; Jiang et al., 2014), cultivos de fibroblastos de ratón NIH/3T3 (Oubrahim et al., 2002), cultivos de miocitos ventriculares de rata (Yang et al., 2007), células B humanas (Schrantz et al., 1999; El Mchichi et al., 2007) y células de epitelio bronquial humano 16HBE (L. Zhang et al., 2013). La vía apoptótica mitocondrial ha sido señalada como responsable de la toxicidad del Mn en varios de los modelos mencionados (Malecki, 2001; Rao y Norenberg, 2004; Tamm et al., 2008; Yin et al., 2008; Prabhakaran et al., 2009; Zhang et al., 2013; Jiang et al., 2014).

Si bien la generación de un estado de estrés oxidativo por exposición a Mn en el tejido nervioso ha sido bien demostrada (Erikson et al., 2004; Xu et al., 2009; Fernsebner et al., 2014), el posible daño a los lisosomas y su contribución a las vías apoptóticas no ha sido aún abordado.

En el presente trabajo, la citotoxicidad inducida por Mn en MLS fue evaluada mediante los ensayos de reducción de MTT y retención de RN (**Fig. 20**). Ambas técnicas mostraron una disminución en la viabilidad celular a partir de las 12 hs de incubación con el metal. Sin embargo, la exposición a Mn durante 6 hs condujo a un incremento en la retención de RN (**Figs. 20- 21**).

El ensayo de retención de RN depende de la capacidad celular de mantener gradientes de pH por medio de la producción de ATP. A pH fisiológico, el colorante posee una carga neta cercana a cero, lo que le permite atravesar las membranas celulares. Una vez en los lisosomas, el RN se protona y es retenido. Los agentes que inducen efectos adversos en estas organelas alteran la captación de RN, por lo que puede ser empleado para la detección de compuestos que afecten selectivamente a los lisosomas (Borenfreund y Puerner, 1985; Repetto et al., 2008).

El ensayo de MTT ha sido descrito como una técnica para determinar la viabilidad celular, basada en la actividad de las deshidrogenasas mitocondriales (Mosmann, 1983). Estudios posteriores llevados a cabo por Gonzalez y Tarloff (2001), demostraron que el MTT también es reducido por enzimas citosólicas y microsomales. En particular, Berridge y Tan (1993) atribuyen la reducción a la acción de NAD(P)H óxido-reductasas intracelulares.

Teniendo en cuenta que los ensayos de citotoxicidad se basan en la medición de diferentes parámetros celulares, los mismos pueden arrojar resultados disímiles (Borenfreund et al., 1988; Weyermann et al., 2005). Por este motivo, y para evitar una sobre- o sub- estimación de la muerte, es recomendable emplear más de un ensayo de citotoxicidad y evaluar el efecto de distintas concentraciones y tiempos de incubación del agente testado (Fotakis y Timbrell, 2006).

En nuestro caso, el aumento en la retención de RN se da en un contexto en el que la monocapa celular no se ve afectada ni se detectan cambios a nivel de la viabilidad celular medida por MTT (**Fig. 20**)

Estudios realizados por Repetto y Sanz (1993) contribuyen a clarificar el modo en que la retención de RN es afectada por las alteraciones en las membranas lisosomales. En su trabajo, estos autores evalúan el efecto de la exposición de células de neuroblastoma Neuro-2a a 24 metales diferentes y estudian los efectos tóxicos específicos sobre los lisosomas. Ellos encuentran que ciertos metales generan un aumento en la retención de RN, aunque no detectan alteraciones en el caso del $MnCl_2$. Este hecho puede ser atribuido a que las mediciones fueron realizadas solo luego de 24 hs de exposición y a que las células neuronales podrían responder a la injuria del Mn de manera diferente a las gliales.

Complementando los resultados obtenidos por retención de RN, la tinción con Lysotracker Red DND-99 reveló la formación de VAs de tamaño aumentado como consecuencia de la exposición a Mn durante 6 hs en MLS (**Fig. 22**). Además, la marcación con el colorante fluorescente develó la presencia de este tipo de vesículas como resultado de la exposición al metal durante 24 hs en ambas condiciones de cultivo (**Fig. 22A y B**).

Por tinción con naranja de acridina (**Fig. 24A**), hemos observado la formación de VAs de tamaño aumentado en las mismas condiciones que por marcación con Lysotracker Red DND-99 (**Fig. 24A y B**). Asimismo, empleando citometría de flujo se detectó un incremento en el volumen total de vesículas ácidas luego de 24 hs de exposición en ambas condiciones de cultivo (**Fig. 24B**). Estos resultados sugieren que la exposición a Mn podría inducir inicialmente un aumento en el tamaño de las VAs, conduciendo más tardíamente a un incremento en el volumen total de las mismas por célula.

En las células existen distintos tipos de VAs. Entre ellas, se encuentran los lisosomas, los autolisosomas, los endosomas tardíos, los anfisomas y las organelas relacionadas a lisosomas, específicas de ciertos tipos celulares (Strømhaug y Seglen, 1993; Saftig, 2006).

Los lisosomas constituyen un grupo heterogéneo de vacuolas de diferente tamaño, forma y densidad y las características propias de cada vesícula (tamaño, contenido) determinan su susceptibilidad ante un estímulo de estrés. Suzuki et al. (1983) reportaron que la intoxicación aguda con Mn en ratones genera acumulación del metal principalmente en los lisosomas. Además, demostraron que el Mn aumenta la formación de lisosomas primarios y secundarios, observados como cuerpos grandes y densos mediante microscopía electrónica de cortes del *striatum* y del mesencéfalo. Por este motivo, sugieren que los lisosomas juegan un rol importante en el metabolismo del metal y en el desarrollo de la neurotoxicidad inducida por Mn.

El incremento en el tamaño lisosomal ha sido relacionado también con otras patologías neurodegenerativas. Los desórdenes de almacenamiento lisosomal comprenden un grupo de alrededor de 50 enfermedades caracterizadas por la acumulación de productos de deshecho en los lisosomas, lo que resulta en la formación de grandes vacuolas intracelulares (Greiner-Tollersrud y Berg, 2006). La presencia VAs de tamaño aumentado ha sido reportada también en trastornos neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer (Nixon et al., 2008a) y en modelos de demencia frontotemporal (Lee et al., 2007) y de la enfermedad de Huntington (Heng et al., 2010). Por otra parte se ha demostrado que la cloroquina, un compuesto que inhibe directamente la función lisosomal, induce la dilatación de los lisosomas en células de la retina (Yoon et al., 2010). Es decir, que las causas que llevan a la formación de grandes VAs se relacionan generalmente con un daño específico sobre los lisosomas.

Ono et al. (2003) han propuesto que el aumento en el tamaño de los lisosomas altera la tensión de la membrana e incrementa su susceptibilidad a la ruptura. Ante un estímulo de daño, la reparación de los lisosomas de mayor tamaño sería más dificultosa y, en caso de ocurrir la PML, los mismos liberarían mayor cantidad de contenido. Por lo tanto, el tamaño de los lisosomas constituye un factor de riesgo para su estabilidad.

Los lisosomas son capaces de fusionarse homotípicamente o heterotípicamente. La fusión homotípica permite la redistribución del contenido lisosomal, mientras

que la heterotípica conduce a la degradación de material que proviene de las vías autofágica o endosomal (Ward et al., 2005). En estado estacionario, el tamaño promedio de los lisosomas es constante, lo que indica que su volumen está regulado por mecanismos de fusión y fisión. La desregulación de los procesos de fusión y fisión conduce a alteraciones en el tamaño lisosomal. El síndrome de Chediak Higashi es una enfermedad de almacenamiento lisosomal debida a la mutación del gen *Chs1/Lyst*, que conduce a una disminución en la tasa de fisión lisosomal, y a la formación de lisosomas de gran tamaño (Durchfort et al., 2012). En nuestro modelo, no podemos descartar que el balance fusión/ fisión se encuentre alterado. Sin embargo, los estudios describiendo este proceso lisosomal son escasos y por lo tanto, se desconoce su relevancia en el desarrollo de patologías que no se deban a mutaciones genéticas específicas.

Estudios previos de nuestro laboratorio indicaron que la exposición a Mn genera ROS y que el empleo de antioxidantes previene la muerte celular luego de 24 hs de exposición a Mn en MLS (Alaimo et al., 2011). En el presente trabajo, se demostró que los antioxidantes MLT y GSH previenen las alteraciones tempranas en el tamaño lisosomal observadas luego de 6 hs de exposición a Mn en MLS (**Fig. 25**). Por lo tanto, es posible que la muerte celular inducida por las ROS se encuentre, al menos en parte, mediada por el daño a los lisosomas. Se han descripto diferentes mecanismos mediante los cuales las ROS podrían afectar la integridad lisosomal. En primer lugar, el lumen lisosomal se caracteriza por poseer pH bajo, equivalentes de reducción y altos niveles de Fe^{2+} . En estas condiciones, y en presencia de H_2O_2 , se ven favorecidas las reacciones de Fenton, que conducen a la generación de OH^{\bullet} , a la peroxidación lipídica y a la permeabilización de la membrana lisosomal (Pivtoraiko et al., 2009; Lin et al., 2010). Además, se ha demostrado que la oxidación de los grupos tioles conduce al *crosslinking* de las proteínas de la membrana lisosomal afectando su conformación y distribución y aumentando la rigidez de la membrana. Estas perturbaciones incrementan la permeabilidad de la membrana a H^+ , K^+ y H_2O , labilizando a los lisosomas frente al estrés osmótico (Wan et al., 2001, 2002).

La exposición a Mn durante 24 hs indujo la liberación parcial de la CatD y del colorante Lysotracker Red DND-99 al citosol tanto en MSFB como en MLS (**Fig. 26**).

Asimismo, mediante fraccionamiento subcelular, se detectó la liberación de la pro-CatD en el citosol, en MLS (**Fig. 28B**).

El consenso general es que al ocurrir la PML, el contenido lisosomal se libera a través de poros no- selectivos. En este sentido, Bidère et al., (2003) reportaron que la translocación de proteínas al citosol se encuentra regulada por el peso molecular de las mismas. De esta manera, aquellas proteínas de peso molecular menor o igual a 40 kDa translocan al citosol con mayor facilidad. De todos modos, los mecanismos que gobiernan a la PML serían dependientes tanto del estímulo de muerte como del tipo celular (Johansson et al., 2010). Teniendo en cuenta este antecedente y el hecho de que el anticuerpo empleado reconoce la forma madura de 14 kDa de CatD (**Fig. 27**), es posible que las diferencias observadas entre ambos experimentos (inmunofluorescencia vs. western blot de las fracciones subcelulares) se deban a que, en el caso de la inmunofluorescencia, se esté detectando la liberación de la forma madura de 14 kDa de la CatD, la cual no pudo ser medida en el ensayo de western blot.

En el último año, han surgido trabajos que demostraron la existencia un mecanismo autofágico de eliminación de lisosomas dañados (lisofagia), por el cual el daño a la membrana lisosomal conduce a la generación de autofagosomas y a una activación de la vía autofágica que evita la muerte celular inducida por la PML (Hung et al., 2013; Maejima et al., 2013). En este sentido, es posible que en MSFB, donde ocurre la liberación de CatD (**Fig. 26**) y el proceso autofágico se encuentra activado (**Figs. 40 y 43- 45**), pero no se detecta muerte celular (datos no mostrados), la lisofagia juegue un rol protector.

Los ensayos de inmunocitoquímica mostraron que parte del pool de CatD se localiza en el núcleo, tanto en las células control como en las expuestas a Mn (**Fig. 30**). No obstante, es necesario realizar experimentos adicionales para abordar este estudio en mayor profundidad y confirmar esta localización así como su significado funcional. Hasta donde sabemos, la localización nuclear de la CatD ha sido reportada solo por de Duve et al. (1955), quienes encontraron actividad de esta enzima en una fracción nuclear obtenida por centrifugación diferencial de hígado de ratas sin tratar. Existen otros trabajos donde se observa marca aparentemente nuclear tanto

en cardiomiocitos en cultivo primario (Roberg, 2001) como en la línea celular de macrófagos J774 (Fratti et al., 2003), aunque el análisis de este parámetro no se consideró en estas publicaciones. Contrariamente, la localización nuclear de otras catepsinas como la B, la V y la L ha sido descrita (Tedelind et al., 2010; Goulet et al., 2007) y se ha sugerido que se encontrarían involucradas en la regulación de los niveles de ciertos factores de transcripción. En la apoptosis, se ha demostrado que la CatB es capaz de translocar al núcleo en células SH-SY5Y y en hepatocitos de rata y ratón.

Las alteraciones inducidas por exposición a Mn no se relacionaron sólo con cambios en la localización celular de la CatD, sino también en su expresión. El Mn indujo un aumento en los niveles de la pro- enzima inmadura (52 kDa) tanto en MSFB como en MLS y del intermediario activo (48 kDa) en MLS (**Fig 28A**).

Este efecto podría asociarse a perturbaciones en la vía autofágica- lisosomal descritas en varias enfermedades neurodegenerativas (Nixon et al., 2008). En particular, se han detectado niveles de expresión aumentados de CatD en cerebros de pacientes que padecían la enfermedad de Alzheimer (Cataldo et al., 1995) y se ha demostrado que esta proteína se encuentra sobreexpresada en un modelo de parkinsonismo en primates (Yelamanchili et al., 2011). Estas alteraciones en la expresión de la proteasa estarían relacionadas con la activación anormal y la inestabilidad del sistema autofágico- lisosomal y probablemente tengan un rol en la disfunción celular.

Por otra parte, se ha reportado que el daño a los lisosomas inducido por cloroquina impide el procesamiento de la CatD a sus formas maduras, conduciendo a una acumulación de la pro- enzima inmadura (Pivtoraiko et al., 2010). Si un proceso como el mencionado ocurre en nuestro modelo, es de esperar que la inhibición de la función lisosomal empleando BafA1 no tenga ningún efecto adicional sobre los niveles de expresión de las pro- enzimas luego de la exposición a Mn. La inhibición de la v- ATPasa generó un incremento mayor en las proformas de la enzima (**Fig. 29C**), lo que sugiere que los cambios observados se encuentran relacionados a mayores niveles de síntesis. De todos modos, estos resultados serán respaldados mediante ensayos de RT- PCR.

Recientemente, se ha demostrado la existencia de un regulador maestro de la función autofágica- lisosomal, el factor de transcripción EB (TFEB). El mismo reconoce secuencias regulatorias comunes en el promotor de los genes relacionados con la biogénesis y la función lisosomal. Entre ellos, se encuentran los que codifican a las catepsinas y a subunidades de la la v-ATPasa, así como a otras hidrolasas, transportadores y proteínas accesorias. La sobreexpresión de TFEB incrementa el número de lisosomas y mejora las capacidades degradativas de la célula. Además, este factor de transcripción modula el proceso autofágico, indicando que existe una regulación común que controla en conjunto a los mecanismos degradativos dependientes de la vía lisosomal (Sardiello y Ballabio, 2009; Sardiello et al., 2009). Dado que nuestros resultados muestran que el Mn genera un aumento en el volumen total de VAs (**Fig. 24**), así como en los niveles de CatD (**Fig. 28**) y la vía autofágica está activada (**Figs 40, 43-45**) es posible que un mecanismo mediado por TFEB sea funcional en nuestro modelo, induciendo un incremento en la masa lisosomal y favoreciendo la degradación autofágica. En este sentido, los resultados obtenidos abren nuevas perspectivas para el estudio de este factor de transcripción así como de los efectos de su modulación en la toxicidad por Mn. Hasta la fecha, se conoce que la sobreexpresión de TFEB previene la acumulación de glucógeno en la enfermedad de Pompe (Spampanato et al., 2013), mejora el plegamiento y la actividad de la glucocerebrosidasa en la enfermedad de Gaucher, mientras que reduce la actividad de la β - hexosaminidasa mutante asociada a la enfermedad de Tay Sachs (Song et al., 2013), todas ellas enfermedades de almacenamiento lisosomal. Los cambios en los niveles de expresión de TFEB se han relacionado además con enfermedades neurodegenerativas más comunes. Así, este factor de transcripción está involucrado en la eliminación de los agregados de β - sinucleína en PD (Decressac et al., 2013), la reducción de la agregación de la hungtintina en Hungtinton (La Spada, 2012; Tsunemi et al., 2012) y el aumento en la degradación de la proteína precursora de amiloide (APP) en Alzheimer (Parr et al., 2012).

Capítulo 2

Rol de los lisosomas en la muerte celular

En el presente trabajo se demostró que el Mn induce la PML cuando las células se exponen a este metal durante 24 hs en MSFB o MLS (**Fig. 26**) y que, en condiciones de privación de suero, la consecuente liberación de catepsinas al citosol se encuentra implicada en el clivaje de la caspasa-8 (**Fig. 34**) y Bid (**Fig. 37**), la pérdida del $\Delta\psi_m$ y la translocación de citocromo c al citosol (**Fig. 36**) y la activación de las caspasas -9 (**Fig. 38**) y -3/7 (**Fig. 39**). Además, la PML conduce a un aumento en los niveles de expresión de FasL (**Fig. 35**) que podría contribuir a la amplificación de la señal de muerte a través del receptor Fas (Suhara et al., 2002). A la vez, no se descarta la ocurrencia de un *feedback* positivo por el cual la caspasa-3 activa conduzca a un aumento en el clivaje de las caspasas-8 y -9 (Zou et al., 2003; Yang et al., 2006).

Los eventos mencionados, se encuentran involucrados en las vías de señalización apoptóticas y pueden ser inhibidos por PepA y Ca-074 Me. En efecto, la preincubación con estos inhibidores previno completamente la disminución en la viabilidad de células expuestas a Mn durante 24 hs en MLS. Además, la activación de las caspasas-3/-7, enzimas efectoras encargadas del desmantelamiento celular en la apoptosis, resultó totalmente inhibida por la PepA. Estos resultados ponen de manifiesto el rol central que juegan las catepsinas en la vía de muerte que tiene lugar río abajo de los lisosomas. En este sentido, se planea confirmar los resultados obtenidos mediante experimentos de silenciamiento de las CatD y B empleando siRNAs específicos y evaluando su efecto sobre la viabilidad celular y la activación de caspasas.

Las CatD, B y L han sido relacionadas con los mecanismos de señalización apoptótica y su contribución a la muerte se encuentra generalmente mediada por la activación de la vía mitocondrial (Guicciardi et al., 2000; Roberg, 2001; Zhao et al., 2003; Nagaraj et al., 2006; Conus et al., 2008; Marino et al., 2013). Nosotros demostramos que los inhibidores de catepsinas empleados previnieron parcialmente el desmantelamiento de las redes mitocondriales, la pérdida del $\Delta\psi_m$

y la liberación del citocromo c (**Fig. 36**). En concordancia, la activación de la caspasa-9, enzima iniciadora de la vía mitocondrial, también resultó parcialmente inhibida por PepA y Ca-074 Me (**Fig. 38**). Estos resultados demuestran que, como se mencionó anteriormente, la mitocondria es una organela blanco del daño mediado por las catepsinas.

La integridad de la membrana mitocondrial está regulada a través de un fino balance entre los miembros pro- y anti- apoptóticos de la familia Bcl-2. Luego de la PML, las CatD y B son capaces de clivar a Bid, conduciendo a la activación de Bax y a la formación de poros en la mitocondria. En el presente trabajo hemos demostrado que los inhibidores de catepsinas previenen totalmente el clivaje de Bid (**Fig. 37**). Por lo tanto, es posible que además de Bid, otras proteínas pro- apoptóticas de la familia Bcl-2 sean responsables de la pérdida del $\Delta\psi_m$ que aún tiene lugar en presencia de PepA y Ca-074 Me. En cuanto a la prevención parcial de la liberación de citocromo c por parte de los inhibidores de catepsinas, es importante tener en cuenta que dicha liberación también puede ocurrir a través del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial (Korsmeyer et al., 2000).

Dado que además Bid es clivado por la caspasa-8 generando el fragmento tBid que es un mediador típico entre las vías de muerte extrínseca e intrínseca (Li et al., 1998; Heinrich et al., 1999; Cirman et al., 2004; Caruso et al., 2006; Nagaraj et al., 2006; Yacoub et al., 2008), se requieren ensayos adicionales para esclarecer si las catepsinas procesan a Bid en forma directa o mediada por la caspasa-8.

La activación de la caspasa-8 en los receptores de muerte puede conducir a la PML ya sea directamente (Guicciardi et al., 2000; Zhao et al., 2003) o por mecanismos mediados por ceramidas (Heinrich et al., 2004). En nuestro caso, la inhibición de la CatD previno parcialmente el clivaje de la caspasa-8, por lo cual, esta catepsina podría tener un rol en la activación de esta caspasa. En este sentido, se ha reportado que un pool de pro- caspasa-8 y de tBid residen en la membrana mitocondrial externa. La activación de la caspasa-8 en el DISC conduce a la activación del pool mitocondrial y al consecuente clivaje de Bid, lo que resulta esencial para la liberación de citocromo c (Schug et al., 2011). En nuestro laboratorio, hemos demostrado la presencia de la isoforma de 53 kDa de la caspasa-

8 en fracciones enriquecidas en mitocondrias (Alaimo, 2012). La pre-incubación con PepA tuvo un efecto exclusivo sobre el clivaje de esta isoforma, por lo cual, las catepsinas podrían mediar la señal entre la caspasa-8 activada en el DISC y la mitocondrial. Para aclarar si un mecanismo como este es funcional en nuestro modelo, se planea evaluar en principio, mediante western blot, el efecto de los inhibidores de la vía lisosomal sobre la activación de la caspasa-8 en la fracción mitocondrial.

El receptor Fas es un miembro de la familia de receptores de muerte y la expresión de su ligando (FasL) ha sido descrita principalmente en células del sistema inmune. Sin embargo, la expresión de FasL se ha reportado también en diferentes tipos celulares del sistema nervioso, entre ellos, los astrocitos. Se postula que los niveles incrementados de Fas y FasL encontrados en condiciones de inflamación podrían favorecer la neurodegeneración. En particular, se ha descrito que la señalización mediada por este sistema contribuiría a la muerte neuronal en las enfermedades de Alzheimer y Esclerosis Múltiple (Choi et al., 1999; Ethell y Buhler, 2003; Choi y Benveniste, 2004).

Existen evidencias que sugieren que los procesos de muerte inducidos por distintas señales de estrés mediados por la proteína p53, conducen a la activación del sistema Fas- FasL. En los mismos, se ha demostrado que el incremento en los niveles de expresión de Fas es dependiente de p53 (Müller et al., 1998; Embree-Ku et al., 2002). Además, este factor de transcripción puede movilizar un pool de Fas presente en el Golgi hacia la membrana plasmática y favorecer la activación de la vía de muerte del receptor (Bennett et al., 1998). En nuestro modelo, la pre-incubación con PepA, Ca-074 Me y BafA1 lograron prevenir el aumento en los niveles de FasL (**Fig. 35**). A la vez, PepA previno el aumento en los niveles de p53 inducido por Mn (resultados no mostrados), lo que podría contribuir con una menor activación de la vía de Fas- FasL y disminuir parcialmente el clivaje de la caspasa-8. Teniendo en cuenta que la inhibición de la vía de Fas en nuestro modelo previene completamente la muerte celular (Alaimo, 2012), esta constituiría un mecanismo apical en la señalización apoptótica. Por lo tanto, es posible que los niveles de FasL que se expresan constitutivamente en astrocitos (Choi et al., 1999) conduzcan a la

activación del receptor, y que los niveles de expresión observados luego de 24 hs se deban a una mayor transcripción del gen relacionada con un proceso de amplificación que retroalimenta la cascada.

Uno de los temas más discutidos en cuanto al rol pro- apoptótico de las catepsinas, se refiere a su actividad a pH citosólico. Se ha demostrado que la CatB puede catalizar el clivaje de uniones peptídicas por medio de su actividad endopeptidasa o bien por medio de la exopeptidasa (peptidil- dipeptidasa y carboxipeptidasa). Estos mecanismos funcionan óptimamente a pH diferentes, lo que sugiere que no tienen lugar en el mismo momento y contexto celular. A pH ácido, la catepsina B tiene actividad predominantemente peptidil dipeptidasa y carboxipeptidasa. Por otra parte, la actividad endopeptidasa tiene un pH óptimo ~7,4 (Linebaugh et al., 1999).

No se ha reportado precisamente el mecanismo por el cual la CatD exhibe actividad a pH neutro. Si bien esta enzima tiene actividad máxima a pH 3- 4 (Benes et al., 2008), Heinrich et al. (2004) demostraron mediante estudios *in vitro* que la CatD es capaz de clivar a Bid a pH 6,2. En el mismo trabajo, se describe un mecanismo que favorece dicho clivaje: los autores demuestran que la activación de la apoptosis por TNF α en células HeLa, conduce a la co- localización de la CatD y Bid en endosomas, donde Bid se ubica sobre la superficie y CatD en el lumen. Estos hallazgos, en un contexto apoptótico donde el citosol se acidifica, contribuirían al clivaje de Bid y a la activación de los mecanismos que tienen lugar río abajo. Sin embargo, aún restan por conocer otras proteínas blanco de la CatD y los mecanismos involucrados en su procesamiento a pH neutro.

Si bien la CatB actúa como un factor de muerte, su actividad fuera de los lisosomas puede ser inhibida por inhibidores citosólicos de cistina proteasas, las estefinas. Sin embargo, no han sido reportados este tipo de inhibidores para la CatD, lo que probablemente se encuentre relacionado con su rol predominante en los mecanismos de muerte mediados por los lisosomas (Bidère et al., 2003).

La inhibición de las catepsinas condujo a un aumento en la retención de RN (**Fig. 32**). En este sentido, se ha demostrado que en ciertas variantes de la enfermedad de

almacenamiento lisosomal *lipofuscinosis neuronal cerioidea* (NCL) en la que la CatD se encuentra mutada (Goebel y Wisniewski, 2004), así como en ratones CatD (-/-) (Koike et al., 2005), existe una progresiva acumulación de autofagosomas y autolisosomas. Asimismo, se encontraron alteraciones similares por medio de la inhibición farmacológica de las cisteína proteasas *in vivo* (Ivy et al., 1984) y por el doble *knock out* de las CatB y L en ratones (Felbor et al., 2002).

Los efectos protectores de la BafA1 sobre la activación de las vías extrínseca e intrínseca fueron observados a una concentración de 0,1 nM, a la cual el inhibidor no tiene efecto sobre el pH lisosomal (**Fig. 33B**) ni es capaz de inhibir a la v-ATPasa en un sistema libre de células (Bowman et al., 1988). El empleo de concentraciones bajas de BafA1 ha sido efectivo en prevenir la apoptosis en modelos donde la señal de estrés tiene como blanco la función lisosomal. En este sentido, Shacka et al. (2006) comprobaron que dosis ≤ 1 nM de BafA1 inhiben la apoptosis en cultivos de neuronas granulares de cerebelo expuestos a cloroquina. Años más tarde, el mismo grupo aportó nuevos hallazgos respecto al rol de la BafA1 demostrando que este compuesto es capaz de atenuar la muerte en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y expuestas a cloroquina, hidroxicloroquina, amodiaquina y estaurosporina con un efecto máximo a concentraciones ≤ 1 nM. Además, la BafA1 fue capaz de inhibir la activación de la caspasa-3, mantener el correcto procesamiento de la CatD, y preservar el flujo autofágico en células cuales expuestas a cloroquina (Pivtoraiko et al., 2010). En base a estos trabajos los autores concluyen que la acción protectora de la BafA1 se encuentra río arriba de la activación de la vía de muerte mitocondrial dependiente de Bax. BafA1 podría afectar la interacción de miembros de la familia Bcl-2 con los lisosomas o bien con la mitocondria, preservando la integridad de la membrana de dichas organelas y consecuentemente la vía autofágica- lisosomal (Pivtoraiko et al., 2010; Shacka et al., 2006a, 2006b). En el presente trabajo nosotros hemos demostrado efectos protectores de la BafA1 a nivel de la injuria mitocondrial pero también de otros componentes de la cascada apoptótica.

Cabe destacar que en el presente trabajo, la BafA1 0,1 nM previno el aumento en la retención de RN inducido por 6 hs de exposición a Mn (**Fig. 33B**), lo que sugiere que, además de sus acciones anti- apoptóticas, tiene un efecto a nivel del aumento

en las VAs. Por lo tanto, si bien se desconoce el blanco directo de la acción de este inhibidor, nuestros resultados avalan su empleo como posible agente protector frente a estímulos que afectan negativamente a la función lisosomal.

Por otra parte, a concentraciones en las que inhibe a la v-ATPasa, se ha reportado que la BafA1 promueve la apoptosis en neuronas granulares de cerebelo (Shacka et al., 2006b), en células de neuroblastoma SH-SY5Y (Pivtoraiko et al., 2010), en la línea celular de macrófagos RAW (Xu et al., 2003), en la línea tumoral de páncreas Capan-1 (Ohta et al., 1998), en la línea tumoral gástrica MKN-1 (Nakashima, 2003) y en al menos otras 11 líneas celulares (Nishihara et al., 1995).

Nuestros resultados indicaron que la exposición durante 25 hs a concentraciones de BafA1 mayores o iguales a 10 nM fueron tóxicas en las células C6 (**Fig. 33A**). De todos modos, cabe destacar que la incubación durante un período corto (2hs) con BafA1 100nM, que fue empleada en las **Figs. 30 y 43**, no induce muerte celular en este tipo celular.

Capítulo 3

Rol de la autofagia en la citotoxicidad inducida por Mn

Teniendo en cuenta que el Mn induce estrés oxidativo que conduce a la disfunción mitocondrial y lisosomal y que las organelas dañadas son eliminadas por procesos autofágicos, resultó de interés investigar el rol de la autofagia en la citotoxicidad inducida por Mn.

Nuestros resultados mostraron que la exposición a Mn conduce a la formación de autofagosomas y autolisosomas detectados mediante marcación con MDC (**Fig. 40**) y LC3 (**Fig. 44**) (6hs en MLS, 24 hs en MSFB). En concordancia con estas evidencias, el análisis western blot reveló un aumento en los niveles de expresión de LC3-II (**Fig. 43**) para 24 hs de exposición en MSFB y MLS y de Beclina -1 (**Fig. 47**) (6 hs en MLS y 24 hs en ambas condiciones). La inhibición de la autofagia empleando 3-MA incrementó la muerte celular inducida por 24 hs de exposición en MLS (**Fig. 45**). Estas evidencias indican que en respuesta al insulto generado por el Mn, las células activarían la autofagia como un mecanismo de rescate.

La autofagia ha sido inicialmente relacionada con la supervivencia frente a condiciones de estrés celular, y típicamente, a la privación de nutrientes. Con el tiempo, se ha demostrado que este es un proceso activo en todos los tipos celulares y que distintos estímulos pueden conducir a la activación de este mecanismo. Hoy se sabe que la autofagia juega un rol en varios procesos patológicos incluyendo cáncer, neurodegeneración, envejecimiento, autoinmunidad, cardiopatías e infección (Eisenberg-Lerner et al., 2009; Gump y Thorburn, 2011).

Dependiendo del contexto, la autofagia puede desempeñar funciones que favorezcan la supervivencia o la muerte celular (Gump y Thorburn, 2011). La presencia de vacuolas autofágicas en las células en proceso de muerte ha conducido frecuentemente a la adjudicación de un rol de la autofagia en la muerte celular. Por esta causa, es bastante frecuente el empleo del término “muerte celular autofágica” en diversos artículos relacionados con esta área de investigación. Sin embargo, tanto el uso de este término como el rol preciso de la autofagia en la muerte celular es un tema aún en debate (Galluzzi et al., 2012; Shen et al., 2012).

Eisenberg-Lerner et al. (2009) proponen tres mecanismos de interacción entre la autofagia y la apoptosis que dependen del estímulo y del tipo y contexto celular. En primer lugar, la apoptosis y la autofagia pueden co- participar en la inducción de la muerte de manera coordinada o cooperativa. En segundo lugar, la autofagia puede antagonizar a la apoptosis, promoviendo la supervivencia celular por medio del reciclado de nutrientes, la eliminación de organelas dañadas y la remoción de agregados. En tercera instancia, la autofagia puede facilitar indirectamente la apoptosis, generando ATP que va a permitir la inducción de procesos dependientes de energía como la exposición de la fosfatidil serina y el burbujeo de la membrana plasmática. El hecho de que en nuestro modelo de muerte celular inducida por Mn, la inhibición de la autofagia resulte en un aumento en la toxicidad del Mn, sugiere que este proceso antagoniza la apoptosis, probablemente a través de la eliminación de proteínas y organelas dañadas.

La eliminación de mitocondrias disfuncionales por medio de la autofagia es un evento que colabora con el control de calidad mitocondrial y protege a la célula de los efectos deletéreos de las mitocondrias disfuncionales. En particular, la mitofagia

retrasa la apoptosis intrínseca limitando la liberación de factores pro- apoptóticos desde la mitocondria dañada al citosol (Mariño et al., 2014). En base a estos antecedentes, realizamos ensayos tendientes a dilucidar si la mitofagia tenía lugar como un mecanismo de supervivencia en nuestro modelo. Para ello, se estudió si dicho evento era activado luego de una exposición corta a Mn (6 hs), para la cual no se detecta pérdida del $\Delta\psi_m$, un evento que marca el punto de no- retorno para la muerte celular (Kroemer et al., 2007).

Los resultados indicaron que la eliminación autofágica de mitocondrias no se activa en estas condiciones experimentales (**Fig. 50**) y tampoco se observan alteraciones en la dinámica mitocondrial. Esto último se remarca dado que la fisión de las mitocondrias es un evento directamente relacionado a su eliminación por mitofagia (Chen y Chan, 2009; Mao y Klionsky, 2013). Considerando que para 24 hs de exposición a Mn en MLS hemos demostrado que ocurre considerable fisión mitocondrial (Alaimo et al., 2014), es posible que a tiempos mayores de incubación, el proceso de mitofagia tenga lugar. Por este motivo, se planea realizar estudios empleando tiempos mayores de exposición a Mn (12- 18 hs) con el fin de evaluar si este mecanismo es relevante para la protección celular a tiempos más tardíos.

Las PI3Ks C1 y C3 se encuentran involucradas en la regulación de la autofagia. Mientras el producto de la enzima C1, $PI(3,4,5)P_3$ inhibe la señalización autofágica, el PI3P generado por la enzima C3 activa dicho proceso. El efecto neto de los inhibidores de PI3Ks (3-MA y WM) es típicamente el bloqueo en la autofagia, dado que la enzima PI3KC3 tienen un efecto río abajo de la regulación negativa llevada a cabo por la C1 (Klionsky et al., 2012). Además, la 3-MA inhibe mediante patrones temporales diferentes según la PI3K sobre la cual actúa. De esta forma causaría una inhibición a largo plazo de la PI3KC1, pero solo una inhibición transiente de la enzima C3. De hecho, la exposición prolongada a 3-MA en células control, y en particular a concentraciones sub- óptimas, puede promover la autofagia por medio de la inhibición de la PI3KC1 (Wu et al., 2010). En nuestro modelo, la 3-MA inhibió la autofagia inducida por 6 y 24 hs de exposición a Mn (Resultados no mostrados y **Fig. 45BII**), mientras que la WM tuvo efecto sobre este proceso solo luego de 6 hs de exposición al metal (**Fig. 46B**).

Los dos inhibidores empleados lograron prevenir la autofagia por exposición a Mn durante 6 hs (resultados no mostrados y **Fig. 46**). Asimismo, tanto 3-MA como WM previnieron completamente el aumento en la retención de RN inducida por Mn, lo que sugiere que dicho proceso se encuentra relacionado a la activación de la autofagia.

Vías de señales involucradas en la autofagia y la apoptosis

Los mecanismos de señalización involucrados en la apoptosis y la autofagia se encuentran estrechamente conectados, no solo por su capacidad de ser activados por los mismos estímulos, sino que además comparten proteínas críticas para su ejecución. Dada la complejidad y diversidad de estas interconexiones, hasta el momento, se encuentra poco comprendido el modo en que la apoptosis y la autofagia dialogan.

En la **Tabla 3** se muestran las proteínas que participan de ambos procesos. Entre ellas, las que han sido más estudiadas son p62 y Beclina-1.

Proteínas con rol dual en la autofagia y la apoptosis

	DAPK	Fosforila a Beclina 1; Activa el DISC
	RIP	Activa la muerte celular independiente de caspasas; podría activar la muerte celular autofágica
	NF-κB	Regula vías de supervivencia; Inhibe la apoptosis y activa la autofagia
	p62	Crucial para la activación de caspasa-8; regula la autofagia selectiva
→	Beclina 1	Activador primario de la autofagia; regulado por Bcl-2
	Bcl-2	Inhibe la autofagia y la apoptosis por medio de la unión a Beclina 1 y Bax/Bad/Bak
→	Caspasa-8	Activa la apoptosis por la vía extrínseca; cliva p62 en la apoptosis
→	Caspasa-3	Podría clivar a Beclina 1 para inhibir la autofagia en los estadios finales de la apoptosis
	p53	Induce la MOMP en respuesta a estrés; Regula positiva y negativamente la autofagia
	Atg5	Crucial para la autofagia; Luego de su clivaje por calpainas, activa la apoptosis via FADD y la MOMP
	FLIP	c-FLIP inhibe la autofagia a través de la inhibición de la conjugación Atg3-LC3
	Atg12-Atg3	Regulador mitocondrial y de la apoptosis, sin función conocida en la autofagia
→	Akt	Fosforila TSC1 y 2, permitiendo la activación de mTOR, regula negativamente factores pro- apoptóticos
→	ERK	Conduce al desensamblaje de mTORC1 y 2; favorece la supervivencia (según el contexto)
→	JNK	Fosforila a Bcl-2 impidiendo su unión a Beclina 1; modula positivamente la transcripción de proteínas pro- apoptóticas y regula la actividad de miembros de la familia Bcl-2
	p38	Regula el tráfico de Atg9 e Inhibe la autofagia; favorece la apoptosis (en ambos casos, según el contexto)

Tabla 3. Proteínas relacionadas a la regulación de la apoptosis y de la autofagia. Adaptado de Gump y Thorburn (2011) con modificaciones. Se señalan con flechas las proteínas estudiadas en el presente trabajo.

Beclina 1 es una proteína *BH3-only* que forma complejos con la PI3KC3, los cuales favorecen la nucleación de autofagosomas y contribuyen con la autofagia. Esta proteína interactúa a través de su dominio BH3 con los miembros anti-apoptóticos de la familia Bcl-2. Por lo tanto, la disponibilidad de Beclina 1 para unir a la PI3KC3 y activar la autofagia, se encuentran regulada por los niveles de proteínas involucradas en el proceso apoptótico (Kang et al., 2011). En este sentido, la fosforilación de Bcl-2 por parte de JNK1, impide su unión a Beclina 1 y favorece la activación de la PI3KC3 y la autofagia (Wei et al., 2008). Además, la fosforilación de Beclina 1 por parte de la proteína quinasa asociada a la muerte (DAPK), relacionada al proceso apoptótico, la disocia de Bcl-X_L y favorece su unión a la PI3KC3 (Zalckvar et al., 2009).

La exposición a Mn durante 6 hs en MLS o 24 hs en ambos medios de cultivo, condujo a un aumento en los niveles de expresión de Beclina 1 (**Fig. 47**). La expresión de esta proteína pueden aumentar durante el proceso autofágico y se encuentra bajo la regulación de los factores de transcripción NFκB y E2F y de miRNAs (Kang et al., 2011). Curiosamente, la detección de Beclina 1 mostró la presencia de 2 bandas de peso molecular muy cercano, con una tendencia a un aumento mayor en la expresión de la banda pesada. Estos resultados podrían estar indicando el aumento de la forma fosforilada por DAPK luego de la exposición a Mn. En paralelo con estos hallazgos, en el laboratorio se ha demostrado que los niveles de expresión de Bcl-2 disminuyen por exposición a Mn en un contexto apoptótico (24 hs, MLS) (Alaimo et al., 2011), con lo cual, el balance entre Beclina 1 y Bcl-2 aumenta, favoreciendo la activación de la PI3KC3 y la autofagia.

La proteína p62 posee en su estructura diversos dominios de interacción proteína-proteína, entre los cuales se destacan los dominios de unión a LC3, de unión a ubiquitina y de oligomerización (Moscat y Diaz-Meco, 2009). En la autofagia, p62 reconoce a proteínas poliubiquitinadas y forma complejos que, por medio de la unión a LC3, se degradan en los autolisosomas (Bjørkøy et al., 2005; Klionsky et al.,

2012). Por otra parte, el rol de p62 en la apoptosis se encuentra menos estudiado. Jin et al. (2009) han demostrado que p62 puede colaborar con la activación de la caspasa-8 en un contexto apoptótico. Estos autores han demostrado que la activación de los receptores de muerte DR4/ DR5, conduce a la ubiquitinación de la caspasa-8 en el DISC, el reconocimiento por p62 y la translocación de la caspasa a *foci* citosólicos, donde la agregación facilita su activación por autoproteólisis. Asimismo, la caspasa-8 puede activarse de modo dependiente de p62 por señales de estrés que impactan en el RE (Tomar et al., 2013). Cabe destacar que la activación dicha caspasa en este modelo ocurre en la membrana de autolisosomas de tamaño mayor al habitual (>2 μm). En nuestro sistema, parte de las VAs de tamaño aumentado co- localizaron con LC3 (**Fig. 44A**), lo que indica que se trata de autolisosomas. Por lo tanto, es interesante evaluar si estas vesículas poseen un rol directo en la activación de la caspasa-8. Para ello, en primera instancia, se investigará la posible co- localización entre la caspasa-8 activa con p62 y con las VAs de tamaño aumentado mediante inmunofluorescencia y/inmunoprecipitación. En caso de observarse interacción con este compartimento, se estudiará el efecto de la inhibición de la autofagia sobre la activación de la caspasa-8 empleando una aproximación farmacológica (3-MA) y una genética (*knockdown* de Atg7).

En nuestro modelo, la inhibición de la autofagia por 3-MA aumenta la toxicidad del Mn. No obstante, aún si la autofagia fuera necesaria para la apoptosis (como en los modelos descritos en el párrafo anterior), la inhibición de este proceso de muerte puede modificar la respuesta celular al estrés e inducir muerte por necrosis (Golstein y Kroemer, 2007).

En contraposición a los mecanismos de interacción operantes entre la autofagia y la apoptosis descritos anteriormente, la autofagia puede favorecer la supervivencia degradando a la caspasa-8 y previniendo la apoptosis (Hou et al., 2010). El posible rol de la autofagia activando o inhibiendo la apoptosis mediada por caspasa-8, podrá aclararse mediante los experimentos de inhibición farmacológica y genética propuestos y la determinación de parámetros apoptóticos y autofágicos.

Es bien conocido que las MAPK cumplen un papel relevante en la señalización de la muerte celular apoptótica (Wada y Penninger, 2004). En la autofagia, el rol preciso

de las estas quinasas se encuentra poco caracterizado y cumplen una función modulando a proteínas específicas relacionadas con dicha vía (Sridharan et al., 2011). No obstante, los mecanismos de acción de cada una de las quinasas dependen de la naturaleza del estímulo, así como de la intensidad y duración de la señal de las MAPKs activadas (Lu y Xu, 2006; Webber, 2010).

La exposición a Mn condujo a alteraciones en los niveles de fosforilación de JNK, ERK y Akt. En particular, los niveles de pJNK y pERK aumentaron a partir de las 6 hs de exposición al metal en ambas condiciones de cultivo y los de pAkt disminuyeron luego de 6 hs de exposición en MSFB y MLS y luego de 24 hs en MLS (**Fig. 48**). Curiosamente, se observó un aumento en los niveles de JNK 1 en todas las condiciones de exposición, un hecho poco común pero que ha sido relacionado con la activación de la autofagia mediada por el receptor Fas (Zhang et al., 2008). Si bien este receptor se encuentra directamente relacionado con la apoptosis en nuestro modelo, no se descarta que pueda además, activar la autofagia. Por otra parte, se ha descrito que la isoforma 1 de JNK es capaz de fosforilar a Bcl-2, generando su disociación de Beclina 1 y activando la vía (Wei et al., 2008). Adicionalmente se ha reportado que la activación de JNK ríó abajo de la inducción de la autofagia es un evento crucial para la ocurrencia de la muerte celular autofágica (Shimizu et al., 2010).

En relación a la apoptosis, la quinasas JNK tiene un papel modulando la transcripción de genes pro- apoptóticos o regulando la actividad de las proteínas mitocondriales pro- y anti- apoptóticas por fosforilación (Dhanasekaran y Reddy, 2008).

Por su parte, ERK puede activar la autofagia desensamblando los complejos mTORC1 y mTORC2 (Wang et al., 2009). La exposición a factores de crecimiento aumenta la interacción de la cascada de ERK con las proteínas Atg tanto en el citosol como en el núcleo, donde las Atg funcionan como *scaffolds* en la regulación de la fosforilación de la MAPK (Martinez-Lopez et al., 2013). En este último caso, ERK se activa una vez que la autofagia se encuentra activada. En relación a la apoptosis, la activación de la vía de ERK resulta en efectos inhibitorios de este proceso en

respuesta a un amplio rango de estímulos, río arriba, río abajo o independientemente de la vía apoptótica intrínseca. Esta quinasa es capaz de inhibir proteínas pro- apoptóticas como Bad y Bim, así como activar anti- apoptóticas como Bcl-2, Bcl-X_L, IAP y Mcl-1. Contrariamente, la activación sostenida de ERK puede promover las vías intrínseca o extrínseca de muerte induciendo la translocación de citocromo c, la activación de la caspasa-8 o la disminución en los niveles de LAMP-1 y -2, favoreciendo la vía de muerte lisosomal (Lu y Xu, 2006; Cagnol y Chambard, 2010).

En el presente trabajo, la pre-incubación con el inhibidor de la vía de ERK (PD98059), previno el aumento en la retención de RN luego de 6 hs de exposición a Mn, lo que sugiere que esta quinasa se encuentra relacionada con las alteraciones observadas en las VAs y probablemente con la autofagia (**Fig. 49**). Por otra parte, no se observaron en este ensayo efectos mediados por la inhibición de la vía de JNK (SP600125). El rol de estas quinasas en la autofagia será complementado con el estudio de los niveles de formación de LC3-II en presencia de los inhibidores de estas vías.

La inhibición de las vías de ERK y JNK no tuvo efecto neto sobre la muerte celular.

La MAPK p38 ha sido relacionada principalmente con la activación de la apoptosis y la inhibición de la autofagia. Se ha reportado que p38 α regula negativamente la activación de la autofagia inhibiendo a mAtg9, una proteína esencial para dicho proceso (Zarubin y Han, 2005; Webber, 2010). Resultados previos obtenidos en el laboratorio, indicaron que los niveles de fosforilación de p38 no varían luego de 24 hs de exposición a Mn en MSFB o MLS (datos no publicados), por lo que dicho ensayo no fue contemplado en el presente trabajo. Sin embargo, se estudiará la activación de p38 luego de 6 hs de exposición al metal.

Akt juega un rol crucial en la inhibición de la apoptosis. Uno de los mecanismos de acción de esta quinasa consiste en la fosforilación de proteínas blanco, como por ejemplo la proteína pro- apoptótica Bad. En el estado fosforilado Bad se une a la chaperona 14-3-3 lo cual permite que la proteína fosforilada se mantenga inactiva. Además, Akt regula negativamente la actividad de JNK y p38 (Franke et al., 2003).

Por otra parte, esta quinasa ha sido clásicamente involucrada en la inhibición de la autofagia por medio de la fosforilación del complejo de esclerosis tuberosa 2 (TSC2) en múltiples sitios, disminuyendo la actividad inhibitoria del mismo sobre mTORC1 (Huang y Manning, 2009). Akt puede también fosforilar a Beclina 1 en la S295 (y probablemente en la S234), favoreciendo su unión a proteínas 14-3-3 y a filamentos intermedios, lo que contribuye a la inhibición de la autofagia por un mecanismo alternativo (Wang et al., 2012).

En nuestro modelo, el Mn indujo una disminución en los niveles de fosforilación de Akt, que puede estar relacionado con la activación de la autofagia y/ o la apoptosis, y puede cumplir un rol diferente para cada una de las condiciones de cultivo y tiempos de exposición (**Fig. 48**). Notablemente, los inhibidores de PI3K 3-MA (**protocolo I, Fig. 45**) y WM 500 nM (**Fig. 46**), disminuyeron la viabilidad celular de las células control, pero no tienen un efecto adicional en las expuestas a Mn durante 24 hs. Es posible que la inactivación de la vía de supervivencia de Akt como producto de la exposición a Mn durante 24 hs, se encuentre relacionada con la falta de efecto de los inhibidores a este nivel.

En el presente trabajo se estudió el efecto de la exposición a Mn durante distintos tiempos y condiciones de cultivo. Resultados previos de nuestro laboratorio (Alaimo et al., 2011) indicaron que luego de 24 hs de exposición al metal en MLS se encuentra activado un mecanismo apoptótico que, en presencia de MSFB, se detecta luego de 48 hs de incubación (resultados no mostrados).

La conveniencia del empleo del SFB está sujeta a debate, principalmente en células del sistema nervioso. Si bien su uso ha sido indispensable para posibilitar el cultivo de distintos tipos celulares, su alto contenido de nutrientes, hormonas y factores de crecimiento, puede enmascarar los efectos producidos por determinados agentes. En el tejido nervioso en particular, la BHE permite el paso de ciertos componentes en una concentración definida para el correcto desarrollo y el mantenimiento de la red neuronal. Por este motivo, se trata de hallar medios de cultivo que se asemejen en la mayor medida posible a las condiciones en que se encuentra cada tipo celular *in vivo* (Romijn, 1988).

Además, la exposición a Mn en MSFB merece una particular consideración, dado que el metal es capaz de unirse a proteínas del plasma tales como albúmina, transferrina y α 2-macroglobulina lo cual disminuye su concentración efectiva (Rabin et al., 1993).

Por otra parte, se ha reportado que la privación de suero por si misma puede disparar mecanismos autofágicos (Mitchener et al., 1976; Punnonen et al., 1992). Si bien para estudiar los mecanismos apoptóticos empleando concentraciones de Mn que una vez incorporadas a la célula se mantuvieran en un nivel fisiológico, fue necesaria la exposición en MLS, esta condición podría activar la autofagia. Por esta causa, el estudio de esta vía se realizó en ambas condiciones de cultivo y distintos tiempos de incubación, los cuales se superponen (24 hs en MLS) o no (6 hs en MSFB o MLS, 24 hs en MSFB) con la activación de procesos apoptóticos.

Capítulo 4

Estudios *in vivo*

En el año 1959, Russell y Burch propusieron el concepto de las 3 R para la experimentación en animales de laboratorio: **R**eemplazo de los animales de experimentación, **R**edución del número empleado y **R**efinamiento de las técnicas para aminorar el sufrimiento.

Por medio del empleo de técnicas *in vitro*, se investigaron en profundidad los mecanismos celulares y moleculares que se desencadenan en respuesta a la exposición a Mn. Sin embargo, los estudios *in vivo* fueron necesarios para validar la respuesta de los astrocitos a la intoxicación aguda y las posibles alteraciones en los niveles de expresión de la CatD, como marcador de la alteración en la vía lisosomal en este u otros tipos celulares.

El modelo de toxicidad aguda empleado, en el cual un hemisferio cerebral es inyectado con Mn y el otro con vehículo, reduce la variabilidad y permite disminuir notablemente el número de animales empleados.

El protocolo empleado ha sido puesto a punto en nuestro laboratorio y hemos encontrado que el hemisferio tratado presentó daño en el striatum, observado por

una disminución en la población celular y presencia de células con núcleos picnóticos (una característica del proceso apoptótico) (Alaimo et al., 2014).

En el presente trabajo, el abordaje de planteó de modo de obtener información acerca del posible efecto específico del Mn sobre los astrocitos. La proteína GFAP forma parte de los filamentos intermedios y se encuentra expresada predominantemente en los astrocitos. Nuestros resultados *in vivo* mostraron que la inyección intra-estriatal de 1 μ mol de Mn generó una marcada disminución en los niveles de GFAP en el *striatum* (**Fig. 52**). Cabe resaltar que dicha alteración fue observada exclusivamente en esta estructura y no así en la corteza ni en el *globus pallidus*. De hecho, la zona del *globus pallidus* aparentó una mayor marcación con GFAP en el hemisferio tratado (resultados no mostrados). La proliferación de astrocitos en esta estructura, ha sido reportada previamente en autopsias de pacientes (Yamada et al., 1986)

La disminución en la marca de GFAP fue encontrada también en modelos animales de isquemia, diabetes y consumo de alcohol; todos ellos estímulos que conducen a un daño en el SNC (Liu et al., 1999; Rintala et al., 2001; Lechuga-Sancho et al., 2006; Coleman et al., 2010). En dichos trabajos, la disminución en GFAP estuvo relacionada con una menor expresión de la proteína (Rintala et al., 2001; Coleman et al., 2010;) o bien con la muerte celular de los astrocitos (Liu et al., 1999; Lechuga-Sancho et al., 2006). Para clarificar cual es el caso en la intoxicación con Mn, se llevará a cabo un ensayo de co-inmunomarcación con GFAP y S100B, otra proteína expresada principalmente por los astrocitos, para corroborar si los cambios observados son exclusivos sobre GFAP o se relacionan con un menor número de astrocitos.

Si bien los resultados conjuntos de Alaimo et al. (2014) y de esta Tesis, apuntan a que la disminución en la expresión de GFAP probablemente se deba a la muerte de los astrocitos, existen otros contextos que pueden explicar estas observaciones.

Middeldorp et al. (2009) reportaron que la inhibición del proteasoma disminuye los niveles de ARNm y proteína de GFAP en células de glioblastoma y previene el aumento en la expresión que se induce durante la astrogliosis reactiva en cerebro

de rata. Los autores encontraron que la cloroquina, un inhibidor de la función lisosomal, también disminuye los niveles de ARNm de GFAP, aunque de manera menos marcada. En ensayos *in vitro* llevados a cabo en células PC12, se demostró que el estrés oxidativo generado por exposición a Mn inhibe el proteosoma (Cai et al., 2007).

Nuestros hallazgos demostrando el daño a los lisosomas y las alteraciones en las vías degradativas sugieren que estos procesos podrían estar relacionados con la disminución en la marca de GFAP.

En la literatura, han sido empleados distintos modelos en roedores para evaluar los efectos tóxicos del Mn, obteniéndose resultados disímiles. La generación de la neurotoxicidad por este metal depende de la dosis acumulada, la ruta de administración y el punto final escogido para la examinación (Newland, 1999). La proliferación de astrocitos en el *striatum* fue observada luego de 24 hs de una inyección intraperitoneal (i.p.) única de Mn (Suzuki et al., 1983), así como por la administración de Mn en el agua por un sonda gástrica, una vez al día durante 8 semanas (Liu et al., 2006). La exposición de ratas durante 10 días a vapores de soldadura conteniendo Mn produjo un aumento leve de la expresión de GFAP en el *striatum* (Antonini et al., 2009), mientras que no se observaron diferencias respecto a los animales control por exposición sub- crónica (13 semanas) a Mn inhalable (Dorman et al., 2002).

Hasta donde sabemos, se han reportado 5 casos de astrogliosis por sobreexposición a Mn en humanos, varios de ellos en la primera mitad del siglo XX y, por lo tanto, no poseen marcaciones inmunohistoquímicas. Mientras que estos reportes proveen información sobre los efectos neuropatológicos del metal, describen estadios finales del manganismo que rara vez se observan en la actualidad. Un trabajo reciente llevado a cabo por Gonzalez-Cuyar et al. (2013), aborda el manganismo con una visión moderna: como consecuencia de las regulaciones vigentes, las exposiciones ocupacionales actuales a Mn son un orden de magnitud menor que las históricas, y el fenotipo clínico es sustancialmente diferente. Estos autores realizaron sus estudios en biopsias de cerebros de mineros asintomáticos. En este trabajo, se encontró una tendencia hacia una menor densidad

de astrocitos en el *striatum*, siendo este tipo celular detectado por marcación de GFAP (Gonzalez-Cuyar et al., 2013 y referencias allí citadas). Si bien no se discute una posible disminución en los niveles de expresión de GFAP, estos resultados avalan nuestro modelo de toxicidad por Mn y ponen en evidencia las diferencias fenotípicas inducidas por las distintas vías de exposición.

La posible generación de una astrogliosis de Alzheimer tipo II ha sido demostrada en primates expuestos a Mn (Burton y Guilarte, 2009) y en ratas (Hazell et al., 2006). Por lo tanto, evaluaremos la posible generación de este tipo de astrocitos por tinción con hematoxilina- eosina en nuestro modelo de toxicidad aguda.

Los niveles de CatD se vieron afectados en el hemisferio tratado, con una tendencia hacia el aumento. La inmunomarcación positiva en el *striatum* se localizó primordialmente en un tipo de células con morfología similar, y la marca en la mayor parte de los casos fue consistente con vesículas perinucleares. La co-inmunomarcación con GFAP (**Fig. 56**) o NeuN (**Fig. 57**) reveló que las células marcadas son también positivas para NeuN, lo que indica que se trata de neuronas.

La *substantia nigra pars compacta* mostró una marcada tendencia hacia la disminución del área inmunoreactiva en neuronas del hemisferio tratado (**Figs. 54 y 57**). En esta misma estructura cerebral, Zhao et al. (2009) demostraron mediante inyecciones de Mn en el *striatum* la activación de la microglia y una importante pérdida de las neuronas dopaminérgicas en la *substantia nigra pars compacta*. Por lo tanto, es posible que la pérdida en la marca de CatD en la *substantia nigra* se encuentre relacionada con la muerte de las neuronas dopaminérgicas.

El *globus pallidus* presentó mayor marcación basal, lo que dificultó la cuantificación, sin embargo; a nivel general, se observó una disminución en las células inmunopositivas. En la corteza no se observaron cambios.

Es necesario resaltar que mientras que los resultados obtenidos *in vitro* corresponden a células gliales, los efectos observados sobre la marcación de CatD en tejidos pudieron ser observados sólo en neuronas.

En un trabajo reciente llevado a cabo por Zhang et al. (2013), los autores describieron la formación de autofagosomas luego de un corto período post

inyección (4- 12 hs) y la presencia de lisosomas disfuncionales conteniendo material electrón denso a largo plazo (1- 28 días) en las neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra pars compacta*. Estos resultados fueron concordantes con un aumento de marcadores autofágicos a corto plazo en cerebro entero, y una disminución de los mismos respecto a los controles a tiempos mayores. Además, el pre- tratamiento de los animales con WM incrementó la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra pars compacta*, por lo cual los autores proponen que la activación de la autofagia juega un rol importante en la protección inicial frente a la toxicidad del Mn y que la desregulación a largo plazo podría estar relacionada con la muerte de estas neuronas. Si bien en los ensayos mencionados no se puede adjudicar la activación de la autofagia ni el rol neuroprotector a un tipo celular en particular, estos resultados concuerdan con nuestras observaciones *in vitro* en cuanto a que el proceso autofágico protege de la muerte celular.

Dado que la mayor parte de los trabajos relacionados con procesos neurodegenerativos se ha enfocado en las alteraciones que ocurren en las funciones neuronales, aún resta mucho por elucidar acerca del rol de los astrocitos en las enfermedades del SNC. Por lo tanto, nuestros hallazgos obtenidos *in vivo* respecto a la marcación con GFAP apoyan la propuesta de que el Mn genera daño específico sobre los astrocitos, mientras que los resultados *in vitro* contribuyen con la elucidación de los mecanismos de toxicidad involucrados. En el presente trabajo se proponen nuevos ensayos, que contribuirán sustancialmente con el conocimiento de la implicancia de los astrocitos y la muerte celular en la toxicidad del Mn.

Conclusiones

En el presente trabajo, se han descrito eventos moleculares y celulares y vías de señales involucrados en la toxicidad del Mn, particularmente los inherentes a la vía lisosomal-autofágica. Los principales hallazgos se resumen a continuación.

Estudios *in vitro*

En los experimentos de exposición de células C6 a MnCl_2 750 μM en MSFB o MLS, se ha demostrado que:

- El Mn induce muerte celular en función del tiempo a partir de las 12 hs de exposición en MLS.
- En el rango de concentraciones entre 350- 1250 μM , la exposición a Mn durante 6 hs en MLS genera alteraciones celulares que conducen a un aumento en la retención de RN en los lisosomas.
- En las células expuestas al metal, se observan VAs de tamaño hasta ~4 veces mayor que el correspondiente a las células control. Este aumento en el tamaño está acompañado por un incremento en el volumen total de VAs por célula.
- Los antioxidantes MLT y GSH previenen las alteraciones morfológicas inducidas por el Mn en las VAs indicando que las ROS serían responsables directas o indirectas de la acción del Mn sobre la integridad lisosomal.
- La exposición a Mn induce la permeabilización parcial de la membrana lisosomal y la consecuente liberación de CatD al citosol. Esto sugiere que la funcionalidad de esta organela se halla comprometida. Asimismo, los niveles de expresión de CatD se encuentran aumentados.
- La pre-incubación de las células con los inhibidores de CatD y CatB previno totalmente la disminución en la viabilidad celular inducida por Mn. Estos efectos indican que el daño lisosomal en general, y la actividad

de estas proteasas en particular, representan eventos fundamentales en el proceso de muerte celular.

- La inhibición de la CatD previno parcialmente el clivaje de la caspasa-8. Este efecto es consistente con la activación inicial de esta caspasa en el DISC y tal vez con un procesamiento posterior de la misma a nivel de la mitocondria que actuaría amplificando la señal. En consecuencia, la activación de la vía del receptor se ubicaría de manera apical a los lisosomas.
- Los inhibidores de las CatD y B previnieron totalmente el aumento en los niveles de FasL inducidos por Mn. Esto sugiere la posible existencia de un *feedback* positivo en el que FasL actuaría amplificando la señal del receptor Fas.
- La pre- incubación con los inhibidores de CatD y B previno parcialmente la disrupción de la redes mitocondriales, la disipación del $\Delta\psi_m$ y la liberación de citocromo c al citosol indicando que las catepsinas son mediadoras del daño mitocondrial y que la vía apoptótica intrínseca se activa río abajo de la liberación de las CatD y B.
- Las CatD y B son indispensables para que ocurra el clivaje de Bid. El hecho de que el clivaje de Bid sea totalmente prevenido por los inhibidores de catepsinas, y los procesos relacionados con la vía intrínseca resulten parcialmente inhibidos, sugiere que otros eventos de esta cascada, además de aquellos regulados por Bid, están interviniendo en su ejecución.
- La PepA previene totalmente el aumento en la actividad de las caspasas-3/-7 inducido por Mn. Si se tiene en cuenta que la inhibición farmacológica de estas caspasas ejecutoras anula en forma completa la muerte celular (Alaimo et al. 2011) los resultados ponen de manifiesto la relevancia de la vía lisosomal de muerte en las cascadas de señales apoptóticas inducidas por Mn.

- La BafA1 a concentraciones sub- óptimas para ejercer inhibición de la v-ATPasa previene la apoptosis, actuando sobre las vías de señales de muerte de modo similar a los inhibidores de catepsinas.
- Se estableció por primera vez la ocurrencia de eventos autofágicos desencadenados por exposición a Mn en células gliales. Los mismos se caracterizan por la formación de autofagosomas y autolisosomas marcados con MDC y LC3 y aumento en los niveles de expresión de LC3-II y Beclina 1.
- La autofagia juega un rol en la supervivencia celular frente al estrés inducido por Mn de modo que su inhibición por 3-MA aumenta la toxicidad del metal.
- Los inhibidores de la autofagia 3-MA y WM previenen el aumento inducido por Mn en la retención de RN, lo cual indica que este evento se encontraría vinculado a la activación de la vía autofágica.
- El Mn disminuye los niveles de fosforilación de Akt, mientras que incrementa los de las MAPKs ERK y JNK. Estas vías de señales necesitan ser estudiadas en mayor profundidad con el fin de establecer si se activan para actuar en vías de señales apoptóticas, autofágicas o modulando ambas.
- La mitofagia no se activa luego de 6 hs de exposición a Mn.

En base a los resultados obtenidos, se plantea el modelo de señalización esquematizado en la **Fig. 58**.

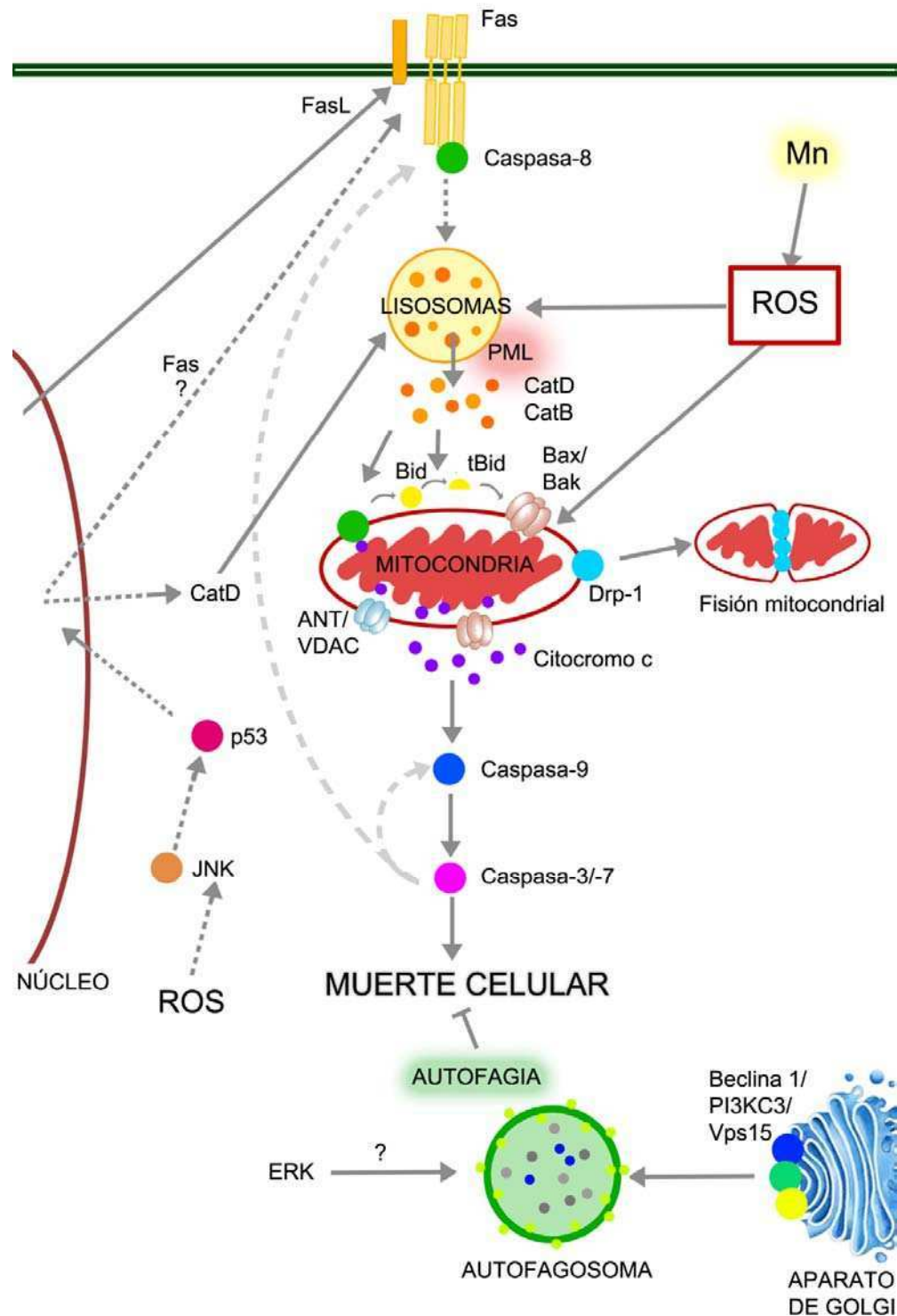


Fig. 58. Modelo de señalización propuesto. El Mn induce la activación de la vía extrínseca a través de la vía Fas/FasL/caspasa-8. Esta caspasa, en un contexto de estrés oxidativo, conduciría a la PML y a la liberación de las CatD y B al citosol. Las catpsinas promueven el clivaje de Bid, ya sea directamente o activando el pool mitocondrial de caspasa-8. El fragmento tBid contribuye a la formación de poros compuestos por Bax/ Bak, los cuales en conjunto con el MPTP, son responsables de la pérdida del $\Delta\psi_m$ y la

translocación de citocromo c al citosol. Posteriormente, el citocromo c interviene en la formación del apoptosoma, donde ocurre la activación de la caspasa iniciadora-9, y río abajo, el clivaje de las efectoras -3/-7. Estas últimas retroalimentarían la cascada procesando niveles mayores de las caspasas iniciadoras. Las ROS pueden inducir la activación de JNK, que permitiría la estabilización de p53, y consecuente transcripción de genes como Fas y CatD que favorecen el proceso de muerte. La activación de la autofagia por la vía de Beclina 1/ PI3KC3/ Vps15 y ERK previene la muerte celular, probablemente a través de la degradación de proteínas y organelas dañadas.

Estudios *in vivo*

Empleando un modelo de intoxicación aguda por Mn en ratas, en el cual se inyectó 1µmol de MnCl₂ en el *striatum*, se demostró que:

- El Mn induce alteraciones en los astrocitos evidenciadas por una marcada disminución de la señal de GFAP en el *striatum*.
- Las células inmunopositivas para CatD en el *striatum* y la *substantia nigra* resultaron ser neuronas, detectadas mediante experimentos de co-localización de esta proteína con NeuN.
- En las neuronas inmunopositivas para CatD del *striatum* la señal de la proteína fue mayor en vesículas de localización perinuclear, consistentes con compartimientos lisosomales.
- El hemisferio tratado presentó una tendencia hacia una mayor inmunoreactividad de CatD en el *striatum*, y una disminución en el área inmunoreactiva en la *substantia nigra pars compacta*.

En resumen, los hallazgos obtenidos en el presente trabajo aportan nuevas evidencias acerca de los mecanismos celulares y moleculares responsables de la señalización de muerte involucrada en la toxicidad del Mn. Los astrocitos cumplen funciones esenciales en el SNC y se postula que la desregulación de las mismas puede desempeñar un papel central en las enfermedades neurodegenerativas. Por lo tanto, nuestra contribución al conocimiento de las vías que regulan su muerte/supervivencia permitirá a futuro elaborar estrategias para proteger a los astrocitos y consecuentemente a las neuronas, de los efectos deletéreos ejercidos

por el Mn. La idea central apunta a proponer blancos terapéuticos más precisos y tempranos relacionados con la toxicidad del Mn, con la posibilidad de hacerlos extensivos a la EP y otras enfermedades neurodegenerativas relacionadas.

Bibliografía

- Aggarwal, B.B., 2003. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 745–756. doi:10.1038/nri1184
- Aits, S., Jättelä, M., 2013. Lysosomal cell death at a glance. *J. Cell Sci.* 126, 1905–1912. doi:10.1242/jcs.091181
- Alaimo, A., 2012. Neurotoxicidad inducida por manganeso. Vías de muerte apoptóticas. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.
- Alaimo, A., Gorojod, R.M., Beauquis, J., Muñoz, M.J., Saravia, F., Kotler, M.L., 2014. Deregulation of Mitochondria-Shaping Proteins Opa-1 and Drp-1 in Manganese-Induced Apoptosis. *PLoS ONE* 9, e91848. doi:10.1371/journal.pone.0091848
- Alaimo, A., Gorojod, R.M., Kotler, M.L., 2011. The extrinsic and intrinsic apoptotic pathways are involved in manganese toxicity in rat astrocytoma C6 cells. *Neurochem. Int.* 59, 297–308. doi:10.1016/j.neuint.2011.06.001
- Alaimo, A., Gorojod, R.M., Miglietta, E.A., Villarreal, A., Ramos, A.J., Kotler, M.L., 2013. Manganese induces mitochondrial dynamics impairment and apoptotic cell death: A study in human Gli36 cells. *Neurosci. Lett.* doi:10.1016/j.neulet.2013.08.061
- Antonini, J.M., Sriram, K., Benkovic, S.A., Roberts, J.R., Stone, S., Chen, B.T., Schwegler-Berry, D., Jefferson, A.M., Billig, B.K., Felton, C.M., Hammer, M.A., Ma, F., Frazer, D.G., O'Callaghan, J.P., Miller, D.B., 2009. Mild steel welding fume causes manganese accumulation and subtle neuroinflammatory changes but not overt neuronal damage in discrete brain regions of rats after short-term inhalation exposure. *Neurotoxicology* 30, 915–925. doi:10.1016/j.neuro.2009.09.006
- Appelmans, F., Wattiaux, R., De Duve, C., 1955. Tissue fractionation studies. 5. The association of acid phosphatase with a special class of cytoplasmic granules in rat liver. *Biochem. J.* 59, 438–445.
- Appelqvist, H., Johansson, A.-C., Linderöth, E., Johansson, U., Antonsson, B., Steinfeld, R., Kågedal, K., Ollinger, K., 2012. Lysosome-mediated apoptosis is associated with cathepsin D-specific processing of bid at Phe24, Trp48, and Phe183. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 42, 231–242.
- Aschner, M., 2000. Manganese: brain transport and emerging research needs. *Environ. Health Perspect.* 108 Suppl 3, 429–432.
- Aschner, M., Gannon, M., Kimelberg, H.K., 1992. Manganese uptake and efflux in cultured rat astrocytes. *J. Neurochem.* 58, 730–735.
- Ashkenazi, A., Dixit, V.M., 1998. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281, 1305–1308.
- Ashrafi, G., Schwarz, T.L., 2013. The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria. *Cell Death Differ.* 20, 31–42. doi:10.1038/cdd.2012.81
- Au, C., Benedetto, A., Aschner, M., 2008. Manganese transport in eukaryotes: the role of DMT1. *Neurotoxicology* 29, 569–576. doi:10.1016/j.neuro.2008.04.022
- Avila, D.S., Gubert, P., Fachineto, R., Wagner, C., Aschner, M., Rocha, J.B.T., Soares, F.A.A., 2008. Involvement of striatal lipid peroxidation and inhibition of calcium influx into brain slices in neurobehavioral alterations in a rat model of short-term oral exposure to manganese. *Neurotoxicology* 29, 1062–1068. doi:10.1016/j.neuro.2008.08.004
- Baumgartner, H.K., Gerasimenko, J.V., Thorne, C., Ashurst, L.H., Barrow, S.L., Chvanov, M.A., Gillies, S., Criddle, D.N., Tepikin, A.V., Petersen, O.H., Sutton, R., Watson, A.J.M., Gerasimenko, O.V., 2007. Caspase-8-mediated apoptosis induced by oxidative stress is independent of the intrinsic pathway and dependent on cathepsins. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 293, G296–307. doi:10.1152/ajpgi.00103.2007
- Benda, P., Lightbody, J., Sato, G., Levine, L., Sweet, W., 1968. Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science* 161, 370–371.
- Benes, P., Vetvicka, V., Fusek, M., 2008. Cathepsin D--many functions of one aspartic protease. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 68, 12–28. doi:10.1016/j.critrevonc.2008.02.008
- Bennett, M., Macdonald, K., Chan, S.-W., Luzio, J.P., Simari, R., Weissberg, P., 1998. Cell Surface Trafficking of Fas: A Rapid Mechanism of p53-Mediated Apoptosis. *Science* 282, 290–293. doi:10.1126/science.282.5387.290
- Berridge, M.V., Tan, A.S., 1993. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch. Biochem. Biophys.* 303, 474–482. doi:10.1006/abbi.1993.1311

- Bhoopathi, P., Chetty, C., Gujrati, M., Dinh, D.H., Rao, J.S., Lakka, S., 2010. Cathepsin B facilitates autophagy-mediated apoptosis in SPARC overexpressed primitive neuroectodermal tumor cells. *Cell Death Differ.* 17, 1529–1539. doi:10.1038/cdd.2010.28
- Bidère, N., Lorenzo, H.K., Carmona, S., Laforge, M., Harper, F., Dumont, C., Senik, A., 2003. Cathepsin D triggers Bax activation, resulting in selective apoptosis-inducing factor (AIF) relocation in T lymphocytes entering the early commitment phase to apoptosis. *J. Biol. Chem.* 278, 31401–31411. doi:10.1074/jbc.M301911200
- Biederbick, A., Kern, H.F., Elsässer, H.P., 1995. Monodansylcadaverine (MDC) is a specific in vivo marker for autophagic vacuoles. *Eur. J. Cell Biol.* 66, 3–14.
- Bjørkøy, G., Lamark, T., Brech, A., Outzen, H., Perander, M., Overvatn, A., Stenmark, H., Johansen, T., 2005. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J. Cell Biol.* 171, 603–614. doi:10.1083/jcb.200507002
- Blomgran, R., Zheng, L., Stendahl, O., 2007. Cathepsin-cleaved Bid promotes apoptosis in human neutrophils via oxidative stress-induced lysosomal membrane permeabilization. *J. Leukoc. Biol.* 81, 1213–1223. doi:10.1189/jlb.0506359
- Borenfreund, E., Babich, H., Martin-Alguacil, N., 1988. Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays—The neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. *Toxicol. Vitro.* 2, 1–6.
- Borenfreund, E., Puerner, J.A., 1985. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol. Lett.* 24, 119–124.
- Bottone, M.G., Santin, G., Aredia, F., Bernocchi, G., Pellicciari, C., Scovassi, A.I., 2013. Morphological Features of Organelles during Apoptosis: An Overview. *Cells* 2, 294–305. doi:10.3390/cells2020294
- Bouchard, M., Mergler, D., Baldwin, M., Panisset, M., Bowler, R., Roels, H.A., 2007. Neurobehavioral functioning after cessation of manganese exposure: a follow-up after 14 years. *Am. J. Ind. Med.* 50, 831–840. doi:10.1002/ajim.20407
- Bowman, E.J., Siebers, A., Altendorf, K., 1988. Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 7972–7976.
- Boya, P., Kroemer, G., 2008. Lysosomal membrane permeabilization in cell death. *Oncogene* 27, 6434–6451. doi:10.1038/onc.2008.310
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Breckenridge, D.G., Germain, M., Mathai, J.P., Nguyen, M., Shore, G.C., 2003. Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene* 22, 8608–8618. doi:10.1038/sj.onc.1207108
- Brouillet, E.P., Shinobu, L., McGarvey, U., Hochberg, F., Beal, M.F., 1993. Manganese injection into the rat striatum produces excitotoxic lesions by impairing energy metabolism. *Exp. Neurol.* 120, 89–94. doi:10.1006/exnr.1993.1042
- Burton, N.C., Guilarte, T.R., 2009. Manganese neurotoxicity: lessons learned from longitudinal studies in nonhuman primates. *Environ. Health Perspect.* 117, 325–332. doi:10.1289/ehp.0800035
- Cagnol, S., Chambard, J.-C., 2010. ERK and cell death: Mechanisms of ERK-induced cell death – apoptosis, autophagy and senescence. *FEBS J.* 277, 2–21. doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07366.x
- Cai, T., Yao, T., Li, Y., Chen, Y., Du, K., Chen, J., Luo, W., 2007. Proteasome inhibition is associated with manganese-induced oxidative injury in PC12 cells. *Brain Res.* 1185, 359–365. doi:10.1016/j.brainres.2007.09.075
- Canonica, P.G., Bird, J.W., 1969. The use of acridine orange as a lysosomal marker in rat skeletal muscle. *J. Cell Biol.* 43, 367–371.
- Caruso, J.A., Mathieu, P.A., Joiakim, A., Zhang, H., Reiners, J.J., Jr, 2006. Aryl hydrocarbon receptor modulation of tumor necrosis factor- α -induced apoptosis and lysosomal disruption in a hepatoma model that is caspase-8-independent. *J. Biol. Chem.* 281, 10954–10967. doi:10.1074/jbc.M508383200
- Cataldo, A.M., Barnett, J.L., Berman, S.A., Li, J., Quarless, S., Bursztajn, S., Lippa, C., Nixon, R.A., 1995. Gene expression and cellular content of cathepsin D in Alzheimer's disease brain: evidence for early up-regulation of the endosomal-lysosomal system. *Neuron* 14, 671–680.

- Certo, M., Del Gaizo Moore, V., Nishino, M., Wei, G., Korsmeyer, S., Armstrong, S.A., Letai, A., 2006. Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. *Cancer Cell* 9, 351–365. doi:10.1016/j.ccr.2006.03.027
- Chen, H., Chan, D.C., 2009. Mitochondrial dynamics—fusion, fission, movement, and mitophagy—in neurodegenerative diseases. *Hum. Mol. Genet.* 18, R169–R176. doi:10.1093/hmg/ddp326
- Chen, Y., Klionsky, D.J., 2011. The regulation of autophagy - unanswered questions. *J. Cell Sci.* 124, 161–170. doi:10.1242/jcs.064576
- Chipuk, J.E., Moldoveanu, T., Llambi, F., Parsons, M.J., Green, D.R., 2010. The BCL-2 family reunion. *Mol. Cell* 37, 299–310. doi:10.1016/j.molcel.2010.01.025
- Choi, C., Benveniste, E.N., 2004. Fas ligand/Fas system in the brain: regulator of immune and apoptotic responses. *Brain Res. Rev.* 44, 65–81. doi:10.1016/j.brainresrev.2003.08.007
- Choi, C., Park, J.Y., Lee, J., Lim, J.H., Shin, E.C., Ahn, Y.S., Kim, C.H., Kim, S.J., Kim, J.D., Choi, I.S., Choi, I.H., 1999. Fas ligand and Fas are expressed constitutively in human astrocytes and the expression increases with IL-1, IL-6, TNF-alpha, or IFN-gamma. *J. Immunol.* 162, 1889–1895.
- Cirman, T., Oresić, K., Mazovec, G.D., Turk, V., Reed, J.C., Myers, R.M., Salvesen, G.S., Turk, B., 2004. Selective disruption of lysosomes in HeLa cells triggers apoptosis mediated by cleavage of Bid by multiple papain-like lysosomal cathepsins. *J. Biol. Chem.* 279, 3578–3587. doi:10.1074/jbc.M308347200
- Clarke, P.G., Clarke, S., 1996. Nineteenth century research on naturally occurring cell death and related phenomena. *Anat. Embryol. (Berl.)* 193, 81–99.
- Coleman, E.S., Dennis, J.C., Braden, T.D., Judd, R.L., Posner, P., 2010. Insulin treatment prevents diabetes-induced alterations in astrocyte glutamate uptake and GFAP content in rats at 4 and 8 weeks of diabetes duration. *Brain Res.* 1306, 131–141. doi:10.1016/j.brainres.2009.10.005
- Conus, S., Perozzo, R., Reinheckel, T., Peters, C., Scapozza, L., Yousefi, S., Simon, H.-U., 2008. Caspase-8 is activated by cathepsin D initiating neutrophil apoptosis during the resolution of inflammation. *J. Exp. Med.* 205, 685–698. doi:10.1084/jem.20072152
- Couper, J., 1837. On the effects of black oxide of manganese when inhaled into the lungs. *Br Ann Med Pharmacol* 1, 41–42.
- Crawford, E.D., Wells, J.A., 2011. Caspase substrates and cellular remodeling. *Annu. Rev. Biochem.* 80, 1055–1087. doi:10.1146/annurev-biochem-061809-121639
- Crossgrove, J.S., Allen, D.D., Bukaveckas, B.L., Rhineheimer, S.S., Yokel, R.A., 2003. Manganese distribution across the blood-brain barrier. I. Evidence for carrier-mediated influx of manganese citrate as well as manganese and manganese transferrin. *Neurotoxicology* 24, 3–13.
- Crossgrove, J.S., Yokel, R.A., 2005. Manganese distribution across the blood-brain barrier. IV. Evidence for brain influx through store-operated calcium channels. *Neurotoxicology* 26, 297–307. doi:10.1016/j.neuro.2004.09.004
- de Duve, 1959. *Subcellular Particles*. Hayashi T. Ed: The Ronald Press Co., Nueva York, USA.
- de Duve, C., Pressman, B.C., Gianetto, R., Wattiaux, R., Appelmans, F., 1955. Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem. J.* 60, 604–617.
- Decressac, M., Mattsson, B., Weikop, P., Lundblad, M., Jakobsson, J., Björklund, A., 2013. TFEB-mediated autophagy rescues midbrain dopamine neurons from α -synuclein toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, E1817–1826. doi:10.1073/pnas.1305623110
- Deiss, L.P., Galinka, H., Berissi, H., Cohen, O., Kimchi, A., 1996. Cathepsin D protease mediates programmed cell death induced by interferon-gamma, Fas/APO-1 and TNF-alpha. *EMBO J.* 15, 3861–3870.
- Denton, D., Nicolson, S., Kumar, S., 2012. Cell death by autophagy: facts and apparent artefacts. *Cell Death Differ.* 19, 87–95. doi:10.1038/cdd.2011.146
- Dhanasekaran, D.N., Reddy, E.P., 2008. JNK Signaling in Apoptosis. *Oncogene* 27, 6245–6251. doi:10.1038/onc.2008.301
- Diment, S., Leech, M.S., Stahl, P.D., 1988. Cathepsin D is membrane-associated in macrophage endosomes. *J. Biol. Chem.* 263, 6901–6907.
- Dorman, D.C., Brennehan, K.A., McElveen, A.M., Lynch, S.E., Roberts, K.C., Wong, B.A., 2002. Olfactory transport: a direct route of delivery of inhaled manganese phosphate to the rat brain. *J. Toxicol. Environ. Health A.* 65, 1493–1511. doi:10.1080/00984100290071630

- Dorman, D.C., Struve, M.F., Marshall, M.W., Parkinson, C.U., James, R.A., Wong, B.A., 2006. Tissue Manganese Concentrations in Young Male Rhesus Monkeys following Subchronic Manganese Sulfate Inhalation. *Toxicol. Sci.* 92, 201–210. doi:10.1093/toxsci/kfj206
- Dunn, W.A., Jr, 1990. Studies on the mechanisms of autophagy: maturation of the autophagic vacuole. *J. Cell Biol.* 110, 1935–1945.
- Durchfort, N., Verhoef, S., Vaughn, M.B., Shrestha, R., Adam, D., Kaplan, J., Ward, D.M., 2012. The enlarged lysosomes in beige j cells result from decreased lysosome fission and not increased lysosome fusion. *Traffic Cph. Den.* 13, 108–119. doi:10.1111/j.1600-0854.2011.01300.x
- Duve, C., 1975. Exploring cells with a centrifuge. *Science* 189, 186–194.
- Eisenberg-Lerner, A., Bialik, S., Simon, H.-U., Kimchi, A., 2009. Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell Death Differ.* 16, 966–975. doi:10.1038/cdd.2009.33
- El Mchichi, B., Hadji, A., Vazquez, A., Leca, G., 2007. p38 MAPK and MSK1 mediate caspase-8 activation in manganese-induced mitochondria-dependent cell death. *Cell Death Differ.* 14, 1826–1836. doi:10.1038/sj.cdd.4402187
- Elmore, S., 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol. Pathol.* 35, 495–516. doi:10.1080/01926230701320337
- Embree-Ku, M., Venturini, D., Boekelheide, K., 2002. Fas Is Involved in the p53-Dependent Apoptotic Response to Ionizing Radiation in Mouse Testis. *Biol. Reprod.* 66, 1456–1461. doi:10.1095/biolreprod66.5.1456
- Erikson, K.M., Dobson, A.W., Dorman, D.C., Aschner, M., 2004. Manganese exposure and induced oxidative stress in the rat brain. *Sci. Total Environ.* 334–335, 409–416. doi:10.1016/j.scitotenv.2004.04.044
- Erikson, K.M., Dorman, D.C., Lash, L.H., Aschner, M., 2007. Manganese inhalation by rhesus monkeys is associated with brain regional changes in biomarkers of neurotoxicity. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 97, 459–466. doi:10.1093/toxsci/kfm044
- Eskelinen, E.-L., Saftig, P., 2009. Autophagy: a lysosomal degradation pathway with a central role in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1793, 664–673. doi:10.1016/j.bbamcr.2008.07.014
- Ethell, D.W., Buhler, L.A., 2003. Fas ligand-mediated apoptosis in degenerative disorders of the brain. *J. Clin. Immunol.* 23, 439–446.
- Failla, M.L., 1999. Considerations for determining “optimal nutrition” for copper, zinc, manganese and molybdenum. *Proc. Nutr. Soc.* 58, 497–505.
- Felbor, U., Kessler, B., Mothes, W., Goebel, H.H., Ploegh, H.L., Bronson, R.T., Olsen, B.R., 2002. Neuronal loss and brain atrophy in mice lacking cathepsins B and L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 7883–7888. doi:10.1073/pnas.112632299
- Fernsebner, K., Zorn, J., Kanawati, B., Walker, A., Michalke, B., 2014. Manganese leads to an increase in markers of oxidative stress as well as to a shift in the ratio of Fe(II)/(III) in rat brain tissue. *Met. Integr. Biometal Sci.* 6, 921–931. doi:10.1039/c4mt00022f
- Ferrara, G., Gambelunghe, A., Mozzi, R., Marchetti, M.C., Migliorati, G., Muzi, G., Buratta, S., 2013. Phosphatidylserine metabolism modification precedes manganese-induced apoptosis and phosphatidylserine exposure in PC12 cells. *Neurotoxicology* 39, 25–34. doi:10.1016/j.neuro.2013.07.006
- Ferri, K.F., Kroemer, G., 2001. Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat. Cell Biol.* 3, E255–263. doi:10.1038/ncb1101-e255
- Filipov, N.M., Dodd, C.A., 2012. Role of glial cells in manganese neurotoxicity. *J. Appl. Toxicol.* 32, 310–317. doi:10.1002/jat.1762
- Fotakis, G., Timbrell, J.A., 2006. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol. Lett.* 160, 171–177. doi:10.1016/j.toxlet.2005.07.001
- Frame, M.D., Milanick, M.A., 1991. Mn and Cd transport by the Na-Ca exchanger of ferret red blood cells. *Am. J. Physiol.* 261, C467–475.
- Franke, T.F., Hornik, C.P., Segev, L., Shostak, G.A., Sugimoto, C., 2003. PI3K/Akt and apoptosis: size matters. *Oncogene* 22, 8983–8998. doi:10.1038/sj.onc.1207115
- Fratti, R.A., Chua, J., Vergne, I., Deretic, V., 2003. Mycobacterium tuberculosis glycosylated phosphatidylinositol causes phagosome maturation arrest. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 5437–5442. doi:10.1073/pnas.0737613100

- Fulda, S., Debatin, K.-M., 2006. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* 25, 4798–4811. doi:10.1038/sj.onc.1209608
- Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J.M., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., et al., 2012. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.* 19, 107–120. doi:10.1038/cdd.2011.96
- Garnett, T.O., Filippova, M., Duerksen-Hughes, P.J., 2007. Bid is cleaved upstream of caspase-8 activation during TRAIL-mediated apoptosis in human osteosarcoma cells. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* 12, 1299–1315. doi:10.1007/s10495-007-0058-8
- Garrido, C., Galluzzi, L., Brunet, M., Puig, P.E., Didelot, C., Kroemer, G., 2006. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ.* 13, 1423–1433. doi:10.1038/sj.cdd.4401950
- Gavin, C.E., Gunter, K.K., Gunter, T.E., 1999. Manganese and calcium transport in mitochondria: implications for manganese toxicity. *Neurotoxicology* 20, 445–453.
- Geng, J., Klionsky, D.J., 2008. The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. “Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects” Review Series. *EMBO Rep.* 9, 859–864. doi:10.1038/embor.2008.163
- Goebel, H.H., Wisniewski, K.E., 2004. Current State of Clinical and Morphological Features in Human NCL. *Brain Pathol.* 14, 61–69. doi:10.1111/j.1750-3639.2004.tb00499.x
- Goldstein, S., Meyerstein, D., Czapski, G., 1993. The Fenton reagents. *Free Radic. Biol. Med.* 15, 435–445.
- Golstein, P., Kroemer, G., 2007. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem. Sci.* 32, 37–43. doi:10.1016/j.tibs.2006.11.001
- Gonzalez, L.E., Juknat, A.A., Venosa, A.J., Verrengia, N., Kotler, M.L., 2008. Manganese activates the mitochondrial apoptotic pathway in rat astrocytes by modulating the expression of proteins of the Bcl-2 family. *Neurochem. Int.* 53, 408–415. doi:10.1016/j.neuint.2008.09.008
- Gonzalez, R., Tarloff, J., 2001. Evaluation of hepatic subcellular fractions for Alamar blue and MTT reductase activity. *Toxicol. In Vitro* 15, 257–259. doi:10.1016/S0887-2333(01)00014-5
- Gonzalez-Cuyar, L.F., Nelson, G., Criswell, S.R., Ho, P., Lonzanida, J.A., Checkoway, H., Seixas, N., Gelman, B.B., Evanoff, B.A., Murray, J., Zhang, J., Racette, B.A., 2013. Quantitative neuropathology associated with chronic manganese exposure in South African mine workers. *Neurotoxicology*. doi:10.1016/j.neuro.2013.12.008. En prensa.
- Goulet, B., Sansregret, L., Leduy, L., Bogyo, M., Weber, E., Chauhan, S.S., Nepveu, A., 2007. Increased expression and activity of nuclear cathepsin L in cancer cells suggests a novel mechanism of cell transformation. *Mol. Cancer Res.* 5, 899–907. doi:10.1158/1541-7786.MCR-07-0160
- Greiner-Tollersrud, O.K., Berg, T., 2006. Lysosomal Storage Disorders, in: *Lysosomes*. Springer-Verlag New York Inc., pp. 60–73.
- Gropper, S., Smith, J., 2012. *Advanced Nutrition and Human Metabolism*. Cengage Learning.
- Guicciardi, M.E., Deussing, J., Miyoshi, H., Bronk, S.F., Svingen, P.A., Peters, C., Kaufmann, S.H., Gores, G.J., 2000. Cathepsin B contributes to TNF-alpha-mediated hepatocyte apoptosis by promoting mitochondrial release of cytochrome c. *J. Clin. Invest.* 106, 1127–1137. doi:10.1172/JCI9914
- Guilarte, T.R., 2010. Manganese and Parkinson’s disease: a critical review and new findings. *Environ. Health Perspect.* 118, 1071–1080. doi:10.1289/ehp.0901748
- Guilarte, T.R., 2013. Manganese neurotoxicity: new perspectives from behavioral, neuroimaging, and neuropathological studies in humans and non-human primates. *Front. Aging Neurosci.* 5, 23. doi:10.3389/fnagi.2013.00023
- Guilarte, T.R., McGlothan, J.L., Degaonkar, M., Chen, M.-K., Barker, P.B., Syversen, T., Schneider, J.S., 2006. Evidence for cortical dysfunction and widespread manganese accumulation in the nonhuman primate brain following chronic manganese exposure: a 1H-MRS and MRI study. *Toxicol. Sci.* 94, 351–358. doi:10.1093/toxsci/kfl106
- Gump, J.M., Thorburn, A., 2011. Autophagy and apoptosis: what is the connection? *Trends Cell Biol.* 21, 387–392. doi:10.1016/j.tcb.2011.03.007
- Gunter, T.E., Gavin, C.E., Gunter, K.K., 2009. The Case for Manganese Interaction with Mitochondria. *Neurotoxicology* 30, 727–729. doi:10.1016/j.neuro.2009.05.003
- Gunter, T.E., Gerstner, B., Gunter, K.K., Malecki, J., Gelein, R., Valentine, W.M., Aschner, M., Yule, D.I., 2013. Manganese Transport via the Transferrin Mechanism. *Neurotoxicology* 34, 118–127. doi:10.1016/j.neuro.2012.10.018

- Günther, T., Vormann, J., 1990. Induction of Mn²⁺/H⁺ antiport in chicken erythrocytes by intracellular Mg²⁺ and Mn²⁺. *FEBS Lett.* 265, 55–58. doi:10.1016/0014-5793(90)80882-J
- Harhaji-Trajkovic, L., Vilimanovich, U., Kravic-Stevovic, T., Bumbasirevic, V., Trajkovic, V., 2009. AMPK-mediated autophagy inhibits apoptosis in cisplatin-treated tumour cells. *J. Cell. Mol. Med.* 13, 3644–3654. doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00663.x
- Hazell, A.S., Normandin, L., Norenberg, M.D., Kennedy, G., Yi, J.-H., 2006. Alzheimer type II astrocytic changes following sub-acute exposure to manganese and its prevention by antioxidant treatment. *Neurosci. Lett.* 396, 167–171. doi:10.1016/j.neulet.2005.11.064
- He, L., Girijashanker, K., Dalton, T.P., Reed, J., Li, H., Soleimani, M., Nebert, D.W., 2006. ZIP8, member of the solute-carrier-39 (SLC39) metal-transporter family: characterization of transporter properties. *Mol. Pharmacol.* 70, 171–180. doi:10.1124/mol.106.024521
- Heinrich, M., Neumeyer, J., Jakob, M., Hallas, C., Tchikov, V., Winoto-Morbach, S., Wickel, M., Schneider-Brachert, W., Trauzold, A., Hethke, A., Schütze, S., 2004. Cathepsin D links TNF-induced acid sphingomyelinase to Bid-mediated caspase-9 and -3 activation. *Cell Death Differ.* 11, 550–563. doi:10.1038/sj.cdd.4401382
- Heinrich, M., Wickel, M., Schneider-Brachert, W., Sandberg, C., Gahr, J., Schwandner, R., Weber, T., Saftig, P., Peters, C., Brunner, J., Krönke, M., Schütze, S., 1999. Cathepsin D targeted by acid sphingomyelinase-derived ceramide. *EMBO J.* 18, 5252–5263. doi:10.1093/emboj/18.19.5252
- Heng, M.Y., Duong, D.K., Albin, R.L., Tallaksen-Greene, S.J., Hunter, J.M., Lesort, M.J., Osmand, A., Paulson, H.L., Detloff, P.J., 2010. Early autophagic response in a novel knock-in model of Huntington disease. *Hum. Mol. Genet.* 19, 3702–3720. doi:10.1093/hmg/ddq285
- Hengartner, M.O., 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407, 770–776. doi:10.1038/35037710
- Hirata, Y., 2002. Manganese-induced apoptosis in PC12 cells. *Neurotoxicol. Teratol.* 24, 639–653.
- Hirata, Y., Adachi, K., Kiuchi, K., 1998. Activation of JNK pathway and induction of apoptosis by manganese in PC12 cells. *J. Neurochem.* 71, 1607–1615.
- Hou, W., Han, J., Lu, C., Goldstein, L.A., Rabinowich, H., 2010. Autophagic degradation of active caspase-8: a crosstalk mechanism between autophagy and apoptosis. *Autophagy* 6, 891–900. doi:10.4161/auto.6.7.13038
- Huang, C.-C., 2007. Parkinsonism induced by chronic manganese intoxication--an experience in Taiwan. *Chang Gung Med. J.* 30, 385–395.
- Huang, J., Manning, B.D., 2009. A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes. *Biochem. Soc. Trans.* 37, 217–222. doi:10.1042/BST0370217
- Hung, Y.-H., Chen, L.M.-W., Yang, J.-Y., Yang, W.Y., 2013. Spatiotemporally controlled induction of autophagy-mediated lysosome turnover. *Nat. Commun.* 4, 2111. doi:10.1038/ncomms3111
- Ivy, G.O., Schottler, F., Wenzel, J., Baudry, M., Lynch, G., 1984. Inhibitors of lysosomal enzymes: accumulation of lipofuscin-like dense bodies in the brain. *Science* 226, 985–987.
- Jenkitkasemwong, S., Wang, C.-Y., Mackenzie, B., Knutson, M.D., 2012. Physiologic implications of metal-ion transport by ZIP14 and ZIP8. *Biometals Int. J. Role Met. Ions Biol. Biochem. Med.* 25, 643–655. doi:10.1007/s10534-012-9526-x
- Jiang, H., White, E.J., Conrad, C., Gomez-Manzano, C., Fueyo, J., 2009. Autophagy pathways in glioblastoma. *Methods Enzymol.* 453, 273–286. doi:10.1016/S0076-6879(08)04013-5
- Jiang, J.K., Ma, X., Wu, Q.Y., Qian, W.B., Wang, N., Shi, S.S., Han, J.L., Zhao, J.Y., Jiang, S.Y., Wan, C.H., 2014. Upregulation of mitochondrial protease HtrA2/Omi contributes to manganese-induced neuronal apoptosis in rat brain striatum. *Neuroscience* 268, 169–179. doi:10.1016/j.neuroscience.2014.03.003
- Jin, Z., Li, Y., Pitti, R., Lawrence, D., Pham, V.C., Lill, J.R., Ashkenazi, A., 2009. Cullin3-based polyubiquitination and p62-dependent aggregation of caspase-8 mediate extrinsic apoptosis signaling. *Cell* 137, 721–735. doi:10.1016/j.cell.2009.03.015
- Johansson, A.-C., Appelqvist, H., Nilsson, C., Kagedal, K., Roberg, K., Ollinger, K., 2010. Regulation of apoptosis-associated lysosomal membrane permeabilization. *Apoptosis* 15, 527–540. doi:10.1007/s10495-009-0452-5
- Jürgen, M.K., Paxinos, G., Voss, T., 2008. Atlas of the human brain. 3era edición. Ed: Academic Press, Massachusetts, USA. Versión Online: <http://www.thehumanbrain.info>

- Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y., Yoshimori, T., 2000. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.* 19, 5720–5728. doi:10.1093/emboj/19.21.5720
- Kågedal, K., Johansson, U., Ollinger, K., 2001. The lysosomal protease cathepsin D mediates apoptosis induced by oxidative stress. *FASEB J.* 15, 1592–1594.
- Kang, R., Zeh, H.J., Lotze, M.T., Tang, D., 2011. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ.* 18, 571–580. doi:10.1038/cdd.2010.191
- Karp, G., 2009. *Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments*. Ed: John Wiley & Sons, New Jersey, USA.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R., 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239–257.
- Kiffin, R., Bandyopadhyay, U., Cuervo, A.M., 2006. Oxidative stress and autophagy. *Antioxid. Redox Signal.* 8, 152–162. doi:10.1089/ars.2006.8.152
- Kinoshita, K., Waritani, T., Noto, M., Takizawa, K., Minemoto, Y., Nishikawa, Y., Ohkuma, S., 1996. Bafilomycin A1 induces apoptosis in PC12 cells independently of intracellular pH. *FEBS Lett.* 398, 61–66. doi:10.1016/S0014-5793(96)01182-9
- Klionsky, D.J., 2007. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 931–937. doi:10.1038/nrm2245
- Klionsky, D.J., Abdalla, F.C., Abeliovich, H., Abraham, R.T., Acevedo-Arozena, et al., 2012. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 8, 445–544.
- Koike, M., Shibata, M., Waguri, S., Yoshimura, K., Tanida, I., Kominami, E., Gotow, T., Peters, C., von Figura, K., Mizushima, N., Saftig, P., Uchiyama, Y., 2005. Participation of autophagy in storage of lysosomes in neurons from mouse models of neuronal ceroid-lipofuscinoses (Batten disease). *Am. J. Pathol.* 167, 1713–1728. doi:10.1016/S0002-9440(10)61253-9
- Kondo, Y., Kanzawa, T., Sawaya, R., Kondo, S., 2005. The role of autophagy in cancer development and response to therapy. *Nat. Rev. Cancer* 5, 726–734. doi:10.1038/nrc1692
- Korsmeyer, S.J., Wei, M.C., Saito, M., Weiler, S., Oh, K.J., Schlesinger, P.H., 2000. Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death Differ.* 7, 1166–1173. doi:10.1038/sj.cdd.4400783
- Kourtis, N., Tavernarakis, N., 2008. Autophagy and cell death in model organisms. *Cell Death Differ.* 16, 21–30. doi:10.1038/cdd.2008.120
- Krieger, D., Krieger, S., Jansen, O., Gass, P., Theilmann, L., Lichtnecker, H., 1995. Manganese and chronic hepatic encephalopathy. *Lancet* 346, 270–274.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Brenner, C., 2007. Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death. *Physiol. Rev.* 87, 99–163. doi:10.1152/physrev.00013.2006
- Kubli, D.A., Gustafsson, Å.B., 2012. Mitochondria and Mitophagy The Yin and Yang of Cell Death Control. *Circ. Res.* 111, 1208–1221. doi:10.1161/CIRCRESAHA.112.265819
- Kühnel, W., 2003. *Color Atlas of Cytology, Histology, and Microscopic Anatomy*. Ed: Thieme, Stuttgart, Alemania.
- La Spada, A.R., 2012. PPARGC1A/PGC-1 α , TFEB and enhanced proteostasis in Huntington disease: defining regulatory linkages between energy production and protein-organelle quality control. *Autophagy* 8, 1845–1847. doi:10.4161/auto.21862
- Lambert, A.J., Brand, M.D., 2009. Reactive oxygen species production by mitochondria. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 554, 165–181. doi:10.1007/978-1-59745-521-3_11
- Larsen, N.A., Pakkenberg, H., Damsgaard, E., Heydorn, K., 1979. Topographical distribution of arsenic, manganese, and selenium in the normal human brain. *J. Neurol. Sci.* 42, 407–416.
- Laurent-Matha, V., Derocq, D., Prebois, C., Katunuma, N., Liaudet-Coopman, E., 2006. Processing of human cathepsin D is independent of its catalytic function and auto-activation: involvement of cathepsins L and B. *J. Biochem. (Tokyo)* 139, 363–371. doi:10.1093/jb/mvj037
- Lavrik, I., Krueger, A., Schmitz, I., Baumann, S., Weyd, H., Krammer, P.H., Kirchhoff, S., 2003. The active caspase-8 heterotetramer is formed at the CD95 DISC. *Cell Death Differ.* 10, 144–145. doi:10.1038/sj.cdd.4401156
- Lawen, A., 2003. Apoptosis-an introduction. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 25, 888–896. doi:10.1002/bies.10329
- Lechuga-Sancho, A.M., Arroba, A.I., Frago, L.M., García-Cáceres, C., de Céliz, A.D.-R., Argente, J., Chowen, J.A., 2006. Reduction in the number of astrocytes and their projections is associated

- with increased synaptic protein density in the hypothalamus of poorly controlled diabetic rats. *Endocrinology* 147, 5314–5324. doi:10.1210/en.2006-0766
- Lee, J.-A., Beigneux, A., Ahmad, S.T., Young, S.G., Gao, F.-B., 2007. ESCRT-III Dysfunction Causes Autophagosome Accumulation and Neurodegeneration. *Curr. Biol.* 17, 1561–1567. doi:10.1016/j.cub.2007.07.029
- Leggett, R.W., 2011. A biokinetic model for manganese. *Sci. Total Environ.* 409, 4179–4186. doi:10.1016/j.scitotenv.2011.07.003
- Li, H., Zhu, H., Xu, C.J., Yuan, J., 1998. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94, 491–501.
- Li, Y., Sun, L., Cai, T., Zhang, Y., Lv, S., Wang, Y., Ye, L., 2010. alpha-Synuclein overexpression during manganese-induced apoptosis in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Brain Res. Bull.* 81, 428–433. doi:10.1016/j.brainresbull.2009.11.007
- Liaudet-Coopman, E., Beaujouin, M., Derocq, D., Garcia, M., Glondu-Lassis, M., Laurent-Matha, V., Prébois, C., Rochefort, H., Vignon, F., 2006. Cathepsin D: newly discovered functions of a long-standing aspartic protease in cancer and apoptosis. *Cancer Lett.* 237, 167–179. doi:10.1016/j.canlet.2005.06.007
- Lichtman, J.W., Conchello, J.-A., 2005. Fluorescence microscopy. *Nat. Methods* 2, 910–919. doi:10.1038/nmeth817
- Lide, D.R., 2004. CRC Handbook of Chemistry and Physics, 85th Edition. Ed: CRC Press, Florida, USA.
- Lin, Y., Epstein, D.L., Liton, P.B., 2010. Intralysosomal Iron Induces Lysosomal Membrane Permeabilization and Cathepsin D-Mediated Cell Death in Trabecular Meshwork Cells Exposed to Oxidative Stress. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51, 6483–6495. doi:10.1167/iovs.10-5410
- Linebaugh, B.E., Sameni, M., Day, N.A., Sloane, B.F., Keppler, D., 1999. Exocytosis of active cathepsin B enzyme activity at pH 7.0, inhibition and molecular mass. *Eur. J. Biochem. FEBS* 264, 100–109.
- Liu, D., Smith, C.L., Barone, F.C., Ellison, J.A., Lysko, P.G., Li, K., Simpson, I.A., 1999. Astrocytic demise precedes delayed neuronal death in focal ischemic rat brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 68, 29–41.
- Liu, X., Kim, C.N., Yang, J., Jemmerson, R., Wang, X., 1996. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86, 147–157.
- Liu, X., Sullivan, K.A., Madl, J.E., Legare, M., Tjalkens, R.B., 2006. Manganese-induced neurotoxicity: the role of astroglial-derived nitric oxide in striatal interneuron degeneration. *Toxicol. Sci.* 91, 521–531. doi:10.1093/toxsci/kfj150
- Llambi, F., Moldoveanu, T., Tait, S.W.G., Bouchier-Hayes, L., Temirov, J., McCormick, L.L., Dillon, C.P., Green, D.R., 2011. A unified model of mammalian BCL-2 protein family interactions at the mitochondria. *Mol. Cell* 44, 517–531. doi:10.1016/j.molcel.2011.10.001
- Lu, Z., Xu, S., 2006. ERK1/2 MAP kinases in cell survival and apoptosis. *IUBMB Life* 58, 621–631. doi:10.1080/15216540600957438
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., Wang, X., 1998. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94, 481–490.
- Maejima, I., Takahashi, A., Otori, H., Kimura, T., Takabatake, Y., Saitoh, T., Yamamoto, A., Hamasaki, M., Noda, T., Isaka, Y., Yoshimori, T., 2013. Autophagy sequesters damaged lysosomes to control lysosomal biogenesis and kidney injury. *EMBO J.* 32, 2336–2347. doi:10.1038/emboj.2013.171
- Malecki, E.A., 2001. Manganese toxicity is associated with mitochondrial dysfunction and DNA fragmentation in rat primary striatal neurons. *Brain Res. Bull.* 55, 225–228.
- Manders, E.M.M., Verbeek, F.J., Aten, J.A., 1993. Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images. *J. Microsc.* 169, 375–382. doi:10.1111/j.1365-2818.1993.tb03313.x
- Mao, K., Klionsky, D.J., 2013. Participation of mitochondrial fission during mitophagy. *Cell Cycle* 12, 3131–3132. doi:10.4161/cc.26352
- Mariño, G., Niso-Santano, M., Baehrecke, E.H., Kroemer, G., 2014. Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 81–94. doi:10.1038/nrm3735
- Marino, J., García Vior, M.C., Furmento, V.A., Blank, V.C., Awruch, J., Roguin, L.P., 2013. Lysosomal and mitochondrial permeabilization mediates zinc(II) cationic phthalocyanine phototoxicity. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45, 2553–2562. doi:10.1016/j.biocel.2013.08.012

- Martinez-Finley, E.J., Gavin, C.E., Aschner, M., Gunter, T.E., 2013. Manganese neurotoxicity and the role of reactive oxygen species. *Free Radic. Biol. Med.* 62, 65–75. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.01.032
- Martinez-Lopez, N., Athonvarangkul, D., Mishall, P., Sahu, S., Singh, R., 2013. Autophagy proteins regulate ERK phosphorylation. *Nat. Commun.* 4, 2799. doi:10.1038/ncomms3799
- May, P.M., Linder, P.W., Williams, D.R., 1977. Computer simulation of metal-ion equilibria in biofluids: models for the low-molecular-weight complex distribution of calcium(II), magnesium(II), manganese(II), iron(III), copper(II), zinc(II), and lead(II) ions in human blood plasma. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 588–595. doi:10.1039/DT9770000588
- McIlwain, D.R., Berger, T., Mak, T.W., 2013. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, a008656. doi:10.1101/cshperspect.a008656
- Mehta, A., Beck, M., Linhart, A., Sunder-Plassmann, G., Widmer, U., 2006. History of lysosomal storage diseases: an overview, in: Mehta, A., Beck, M., Sunder-Plassmann, G. (Eds.), *Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS*. Oxford PharmaGenesis, Oxford, Reino Unido.
- Melzer, T., Duffy, A., Weiss, L.M., Halonen, S.K., 2008. The Gamma Interferon (IFN- γ)-Inducible GTP-Binding Protein IGTP Is Necessary for Toxoplasma Vacuolar Disruption and Induces Parasite Egression in IFN- γ -Stimulated Astrocytes. *Infect. Immun.* 76, 4883–4894. doi:10.1128/IAI.01288-07
- Middeldorp, J., Kamphuis, W., Sluijs, J.A., Achoui, D., Leenaars, C.H.C., Feenstra, M.G.P., Tijn, P. van, Fischer, D.F., Berkers, C., Ovaa, H., Quinlan, R.A., Hol, E.M., 2009. Intermediate filament transcription in astrocytes is repressed by proteasome inhibition. *FASEB J.* 23, 2710–2726. doi:10.1096/fj.08-127696
- Milatovic, D., Yin, Z., Gupta, R.C., Sidoryk, M., Albrecht, J., Aschner, J.L., Aschner, M., 2007. Manganese induces oxidative impairment in cultured rat astrocytes. *Toxicol. Sci.* 98, 198–205. doi:10.1093/toxsci/kfm095
- Mindell, J.A., 2012. Lysosomal acidification mechanisms. *Annu. Rev. Physiol.* 74, 69–86. doi:10.1146/annurev-physiol-012110-142317
- Mitchener, J.S., Shelburne, J.D., Bradford, W.D., Hawkins, H.K., 1976. Cellular autophagocytosis induced by deprivation of serum and amino acids in HeLa cells. *Am. J. Pathol.* 83, 485–491.
- Mizushima, N., Ohsumi, Y., Yoshimori, T., 2002. Autophagosome formation in mammalian cells. *Cell Struct. Funct.* 27, 421–429.
- Mizushima, N., Yoshimori, T., 2007. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy* 3, 542–545.
- Monack, D.M., Meccas, J., Ghori, N., Falkow, S., 1997. Yersinia signals macrophages to undergo apoptosis and YopJ is necessary for this cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 10385–10390.
- Moscat, J., Diaz-Meco, M.T., 2009. p62 at the Crossroads of Autophagy, Apoptosis, and Cancer. *Cell* 137, 1001–1004. doi:10.1016/j.cell.2009.05.023
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63.
- Mukherjee, S., Chiu, R., Leung, S.-M., Shields, D., 2007. Fragmentation of the Golgi apparatus: an early apoptotic event independent of the cytoskeleton. *Traffic Cph. Den.* 8, 369–378. doi:10.1111/j.1600-0854.2007.00542.x
- Müller, M., Wilder, S., Bannasch, D., Israeli, D., Lehlbach, K., Li-Weber, M., Friedman, S.L., Galle, P.R., Stremmel, W., Oren, M., Krammer, P.H., 1998. p53 Activates the CD95 (APO-1/Fas) Gene in Response to DNA Damage by Anticancer Drugs. *J. Exp. Med.* 188, 2033–2045. doi:10.1084/jem.188.11.2033
- Munafó, D.B., Colombo, M.I., 2001. A novel assay to study autophagy: regulation of autophagosome vacuole size by amino acid deprivation. *J. Cell Sci.* 114, 3619–3629.
- Nakashima, S., Hiraku, Y., Tada-Oikawa, S., Hishita, T., Gabazza, E.C., Tamaki, S., Imoto, I., Adachi, Y., Kawanishi, S., 2003. Vacuolar H⁺-ATPase inhibitor induces apoptosis via lysosomal dysfunction in the human gastric cancer cell line MKN-1. *J. Biochem. (Tokyo)* 134, 359–364.
- Nakatogawa, H., Ichimura, Y., Ohsumi, Y., 2007. Atg8, a ubiquitin-like protein required for autophagosome formation, mediates membrane tethering and hemifusion. *Cell* 130, 165–178. doi:10.1016/j.cell.2007.05.021
- Newland, M.C., 1999. Animal models of manganese's neurotoxicity. *Neurotoxicology* 20, 415–432.

- Nishihara, T., Akifusa, S., Koseki, T., Kato, S., Muro, M., Hanada, N., 1995. Specific inhibitors of vacuolar type H(+)-ATPases induce apoptotic cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 212, 255–262. doi:10.1006/bbrc.1995.1964
- Nixon, R.A., Yang, D.-S., Lee, J.-H., 2008. Neurodegenerative lysosomal disorders: a continuum from development to late age. *Autophagy* 4, 590–599.
- Norenberg, M.D., 1987. The role of astrocytes in hepatic encephalopathy. *Neurochem. Pathol.* 6, 13–33.
- Norenberg, M.D., Martinez-Hernandez, A., 1979. Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Res.* 161, 303–310. doi:10.1016/0006-8993(79)90071-4
- Normandin, L., Hazell, A.S., 2002. Manganese neurotoxicity: an update of pathophysiologic mechanisms. *Metab. Brain Dis.* 17, 375–387.
- Novikoff, A.B., Beaufay, H., de Duve, C., 1956. Electron microscopy of lysosomeric fractions from rat liver. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 2, 179–184.
- Oberle, C., Huai, J., Reinheckel, T., Tacke, M., Rassner, M., Ekert, P.G., Buellesbach, J., Borner, C., 2010. Lysosomal membrane permeabilization and cathepsin release is a Bax/Bak-dependent, amplifying event of apoptosis in fibroblasts and monocytes. *Cell Death Differ.* 17, 1167–1178. doi:10.1038/cdd.2009.214
- Ohta, T., Arakawa, H., Futagami, F., Fushida, S., Kitagawa, H., Kayahara, M., Nagakawa, T., Miwa, K., Kurashima, K., Numata, M., Kitamura, Y., Terada, T., Ohkuma, S., 1998. Bafilomycin A1 induces apoptosis in the human pancreatic cancer cell line Capan-1. *J. Pathol.* 185, 324–330.
- Ono, K., Kim, S.O., Han, J., 2003. Susceptibility of lysosomes to rupture is a determinant for plasma membrane disruption in tumor necrosis factor alpha-induced cell death. *Mol. Cell. Biol.* 23, 665–676.
- Organización mundial de la salud, 2000. Air quality guidelines for Europe. World Health Organization, Oficina Regional para Europa, Copenhagen, Dinamarca.
- Oubrahim, H., Chock, P.B., Stadtman, E.R., 2002. Manganese(II) induces apoptotic cell death in NIH3T3 cells via a caspase-12-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 277, 20135–20138. doi:10.1074/jbc.C200226200
- Paglin, S., Hollister, T., Delohery, T., Hackett, N., McMahon, M., Sphicas, E., Domingo, D., Yahalom, J., 2001. A novel response of cancer cells to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles. *Cancer Res.* 61, 439–444.
- Park, E.-J., Park, K., 2010. Induction of oxidative stress and inflammatory cytokines by manganese chloride in cultured T98G cells, human brain glioblastoma cell line. *Toxicol. Vitro* 24, 472–479. doi:10.1016/j.tiv.2009.09.022
- Parr, C., Carzaniga, R., Gentleman, S.M., Van Leuven, F., Walter, J., Sastre, M., 2012. Glycogen synthase kinase 3 inhibition promotes lysosomal biogenesis and autophagic degradation of the amyloid- β precursor protein. *Mol. Cell. Biol.* 32, 4410–4418. doi:10.1128/MCB.00930-12
- Paxinos, G., Watson, C., 2006. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Ed: Academic Press, Massachusetts, USA.
- Pfeffer, S.R., 2010. Recent advances in understanding Golgi biogenesis. *F1000 Biol. Rep.* 2. doi:10.3410/B2-32
- Pivtoraiko, V.N., Harrington, A.J., Mader, B.J., Luker, A.M., Caldwell, G.A., Caldwell, K.A., Roth, K.A., Shacka, J.J., 2010. Low-dose bafilomycin attenuates neuronal cell death associated with autophagy-lysosome pathway dysfunction. *J. Neurochem.* 114, 1193–1204. doi:10.1111/j.1471-4159.2010.06838.x
- Pivtoraiko, V.N., Stone, S.L., Roth, K.A., Shacka, J.J., 2009. Oxidative stress and autophagy in the regulation of lysosome-dependent neuron death. *Antioxid. Redox Signal.* 11, 481–496. doi:10.1089/ARS.2008.2263
- Prabhakaran, K., Chapman, G.D., Gunasekar, P.G., 2009. BNIP3 up-regulation and mitochondrial dysfunction in manganese-induced neurotoxicity. *Neurotoxicology* 30, 414–422. doi:10.1016/j.neuro.2009.02.012
- Puli, S., Lai, J.C.K., Edgley, K.L., Daniels, C.K., Bhushan, A., 2006. Signaling pathways mediating manganese-induced toxicity in human glioblastoma cells (u87). *Neurochem. Res.* 31, 1211–1218. doi:10.1007/s11064-006-9178-8
- Punnonen, E.L., Autio, S., Marjomäki, V.S., Reunanen, H., 1992. Autophagy, cathepsin L transport, and acidification in cultured rat fibroblasts. *J. Histochem. Cytochem.* 40, 1579–1587.

- Rabin, O., Hegedus, L., Bourre, J.M., Smith, Q.R., 1993. Rapid brain uptake of manganese(II) across the blood-brain barrier. *J. Neurochem.* 61, 509–517.
- Rao, K.V.R., Norenberg, M.D., 2004. Manganese induces the mitochondrial permeability transition in cultured astrocytes. *J. Biol. Chem.* 279, 32333–32338. doi:10.1074/jbc.M402096200
- Repetto, G., del Peso, A., Zurita, J.L., 2008. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat. Protoc.* 3, 1125–1131. doi:10.1038/nprot.2008.75
- Repetto, G., Sanz, P., 1993. Neutral red uptake, cellular growth and lysosomal function: in vitro effects of 24 metals. *ATLA* 21, 501–507.
- Riedl, S.J., Salvesen, G.S., 2007. The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 405–413. doi:10.1038/nrm2153
- Riedl, S.J., Shi, Y., 2004. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 897–907. doi:10.1038/nrm1496
- Rintala, J., Jaatinen, P., Kiianmaa, K., Riikonen, J., Kemppainen, O., Sarviharju, M., Hervonen, A., 2001. Dose-dependent decrease in glial fibrillary acidic protein-immunoreactivity in rat cerebellum after lifelong ethanol consumption. *Alcohol Fayettev. N* 23, 1–8.
- Roberg, K., 2001. Relocalization of cathepsin D and cytochrome c early in apoptosis revealed by immunoelectron microscopy. *Lab. Invest. J. Tech. Methods Pathol.* 81, 149–158.
- Rodier, J., 1955. Manganese Poisoning in Moroccan Miners. *Br. J. Ind. Med.* 12, 21–35.
- Roels, H.A., Ortega Eslava, M.I., Ceulemans, E., Robert, A., Lison, D., 1999. Prospective study on the reversibility of neurobehavioral effects in workers exposed to manganese dioxide. *Neurotoxicology* 20, 255–271.
- Romanov, J., Walczak, M., Ibricu, I., Schüchner, S., Ogris, E., Kraft, C., Martens, S., 2012. Mechanism and functions of membrane binding by the Atg5-Atg12/Atg16 complex during autophagosome formation. *EMBO J.* 31, 4304–4317. doi:10.1038/emboj.2012.278
- Romijn, H.J., 1988. Development and advantages of serum-free, chemically defined nutrient media for culturing of nerve tissue. *Biol. Cell Auspices Eur. Cell Biol. Organ.* 63, 263–268.
- Rosenblad, C., Lundberg, C., 2003. Cells of the Nervous System, in: *Lentivirus Gene Engineering Protocols, Methods in Molecular Biology.* Humana Press, Nueva York, USA, pp. 299–307.
- Roth, J.A., 2009. Are there common biochemical and molecular mechanisms controlling manganese and parkinsonism. *Neuromolecular Med.* 11, 281–296. doi:10.1007/s12017-009-8088-8
- Rotonda, J., Nicholson, D.W., Fazil, K.M., Gallant, M., Gareau, Y., Labelle, M., Peterson, E.P., Rasper, D.M., Ruel, R., Vaillancourt, J.P., Thornberry, N.A., Becker, J.W., 1996. The three-dimensional structure of apopain/CPP32, a key mediator of apoptosis. *Nat. Struct. Biol.* 3, 619–625.
- Rubinsztein, D.C., Cuervo, A.M., Ravikumar, B., Sarkar, S., Korolchuk, V., Kaushik, S., Klionsky, D.J., 2009. In search of an “autophagometer”. *Autophagy* 5, 585–589.
- Russell, W.M.S., Burch, R.L., 1959. *The principles of humane experimental technique.* Ed: Methuen, Londres, Reino Unido.
- Saftig, P., 2006. *Lysosomes.* Ed: Springer-Verlag, Nueva York, USA.
- Saftig, P., Klumperman, J., 2009. Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 623–635. doi:10.1038/nrm2745
- Sardiello, M., Ballabio, A., 2009. Lysosomal enhancement: a CLEAR answer to cellular degradative needs. *Cell Cycle Georget. Tex* 8, 4021–4022.
- Sardiello, M., Palmieri, M., di Ronza, A., Medina, D.L., Valenza, M., Gennarino, V.A., Di Malta, C., Donaudy, F., Embrione, V., Polishchuk, R.S., Banfi, S., Parenti, G., Cattaneo, E., Ballabio, A., 2009. A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. *Science* 325, 473–477. doi:10.1126/science.1174447
- Sarosiek, K.A., Chi, X., Bachman, J.A., Sims, J.J., Montero, J., Patel, L., Flanagan, A., Andrews, D.W., Sorger, P., Letai, A., 2013. BID Preferentially Activates BAK while BIM Preferentially Activates BAX, Affecting Chemotherapy Response. *Mol. Cell* 51, 751–765. doi:10.1016/j.molcel.2013.08.048
- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K.M., Krammer, P.H., Peter, M.E., 1998. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* 17, 1675–1687. doi:10.1093/emboj/17.6.1675
- Scaffidi, C., Schmitz, I., Zha, J., Korsmeyer, S.J., Krammer, P.H., Peter, M.E., 1999. Differential Modulation of Apoptosis Sensitivity in CD95 Type I and Type II Cells. *J. Biol. Chem.* 274, 22532–22538.

- Schrantz, N., Blanchard, D.A., Mitenne, F., Auffredou, M.T., Vazquez, A., Leca, G., 1999. Manganese induces apoptosis of human B cells: caspase-dependent cell death blocked by bcl-2. *Cell Death Differ.* 6, 445–453. doi:10.1038/sj.cdd.4400508
- Schug, Z.T., Gonzalez, F., Houtkooper, R.H., Vaz, F.M., Gottlieb, E., 2011. BID is cleaved by caspase-8 within a native complex on the mitochondrial membrane. *Cell Death Differ.* 18, 538–548. doi:10.1038/cdd.2010.135
- Settembre, C., Fraldi, A., Medina, D.L., Ballabio, A., 2013. Signals from the lysosome: a control centre for cellular clearance and energy metabolism. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 283–296. doi:10.1038/nrm3565
- Shacka, J.J., Klocke, B.J., Roth, K.A., 2006a. Autophagy, bafilomycin and cell death: the “a-B-Cs” of plecomacrolide-induced neuroprotection. *Autophagy* 2, 228–230.
- Shacka, J.J., Klocke, B.J., Shibata, M., Uchiyama, Y., Datta, G., Schmidt, R.E., Roth, K.A., 2006b. Bafilomycin A1 inhibits chloroquine-induced death of cerebellar granule neurons. *Mol. Pharmacol.* 69, 1125–1136. doi:10.1124/mol.105.018408
- Shen, H.-M., Codogno, P., 2011. Autophagic cell death: Loch Ness monster or endangered species? *Autophagy* 7, 457–465.
- Shen, S., Kepp, O., Kroemer, G., 2012. The end of autophagic cell death? *Autophagy* 8, 1–3. doi:10.4161/auto.8.1.16618
- Shimizu, S., Konishi, A., Nishida, Y., Mizuta, T., Nishina, H., Yamamoto, A., Tsujimoto, Y., 2010. Involvement of JNK in the regulation of autophagic cell death. *Oncogene* 29, 2070–2082. doi:10.1038/onc.2009.487
- Sidoryk-Wegrzynowicz, M., Aschner, M., 2013. Role of astrocytes in manganese mediated neurotoxicity. *BMC Pharmacol. Toxicol.* 14, 23. doi:10.1186/2050-6511-14-23
- Sidoryk-Wegrzynowicz, M., Lee, E., Aschner, M., 2012. Mechanism of Mn(II)-mediated dysregulation of glutamine-glutamate cycle: focus on glutamate turnover. *J. Neurochem.* 122, 856–867. doi:10.1111/j.1471-4159.2012.07835.x
- Sofroniew, M.V., 2009. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci.* 32, 638–647. doi:10.1016/j.tins.2009.08.002
- Sofroniew, M.V., Vinters, H.V., 2010. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 119, 7–35. doi:10.1007/s00401-009-0619-8
- Song, W., Wang, F., Savini, M., Ake, A., Ronza, A. di, Sardiello, M., Segatori, L., 2013. TFEB regulates lysosomal proteostasis. *Hum. Mol. Genet.* ddt052. doi:10.1093/hmg/ddt052
- Spampanato, C., Feeney, E., Li, L., Cardone, M., Lim, J.-A., Annunziata, F., Zare, H., Polishchuk, R., Puertollano, R., Parenti, G., Ballabio, A., Raben, N., 2013. Transcription factor EB (TFEB) is a new therapeutic target for Pompe disease. *EMBO Mol. Med.* 5, 691–706. doi:10.1002/emmm.201202176
- Sridharan, S., Jain, K., Basu, A., 2011. Regulation of Autophagy by Kinases. *Cancers* 3, 2630–2654. doi:10.3390/cancers3022630
- Stoka, V., Turk, B., Schendel, S.L., Kim, T.H., Cirman, T., Snipas, S.J., Ellerby, L.M., Bredesen, D., Freeze, H., Abrahamson, M., Bromme, D., Krajewski, S., Reed, J.C., Yin, X.M., Turk, V., Salvesen, G.S., 2001. Lysosomal protease pathways to apoptosis. Cleavage of bid, not pro-caspases, is the most likely route. *J. Biol. Chem.* 276, 3149–3157. doi:10.1074/jbc.M008944200
- Strømhaug, P.E., Seglen, P.O., 1993. Evidence for acidity of prelysosomal autophagic/endocytic vacuoles (amphisomes). *Biochem. J.* 291, 115–121.
- Suhara, T., Kim, H.S., Kirshenbaum, L.A., Walsh, K., 2002. Suppression of Akt signaling induces Fas ligand expression: involvement of caspase and Jun kinase activation in Akt-mediated Fas ligand regulation. *Mol. Cell Biol.* 22, 680–691.
- Suswam, E.A., Shacka, J.J., Walker, K., Lu, L., Li, X., Si, Y., Zhang, X., Zheng, L., Nabors, L.B., Cao, H., King, P.H., 2013. Mutant tristetraprolin: a potent inhibitor of malignant glioma cell growth. *J. Neurooncol.* 113, 195–205. doi:10.1007/s11060-013-1112-8
- Suzuki, H., Wada, O., Inoue, K., Tosaka, H., Ono, T., 1983. Role of brain lysosomes in the development of manganese toxicity in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 71, 422–429.
- Tait, S.W.G., Green, D.R., 2010. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 621–632. doi:10.1038/nrm2952
- Takeda, A., 2003. Manganese action in brain function. *Brain Res. Rev.* 41, 79–87. doi:10.1016/S0165-0173(02)00234-5

- Tamm, C., Sabri, F., Ceccatelli, S., 2008. Mitochondrial-mediated apoptosis in neural stem cells exposed to manganese. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 101, 310–320. doi:10.1093/toxsci/kfm267
- Tedelind, S., Poliakova, K., Valeta, A., Hunegnaw, R., Yemanaberhan, E.L., Heldin, N.-E., Kurebayashi, J., Weber, E., Kopitar-Jerala, N., Turk, B., Bogyo, M., Brix, K., 2010. Nuclear cysteine cathepsin variants in thyroid carcinoma cells. *Biol. Chem.* 391, 923–935. doi:10.1515/BC.2010.109
- Terman, A., Gustafsson, B., Brunk, U.T., 2006. The lysosomal-mitochondrial axis theory of postmitotic aging and cell death. *Chem. Biol. Interact.* 163, 29–37. doi:10.1016/j.cbi.2006.04.013
- Tholey, G., Ledig, M., Mandel, P., Sargentini, L., Frivold, A.H., Leroy, M., Grippo, A.A., Wedler, F.C., 1988. Concentrations of physiologically important metal ions in glial cells cultured from chick cerebral cortex. *Neurochem. Res.* 13, 45–50.
- Thomson, T., 1802. *A system of chemistry*, in four volumes. Printed for Bell & Bradfute, and E. Balfour.
- Tiffany-Castiglioni, E., Garcia, D.M., Wu, J.N., Zmudzki, J., Bratton, G.R., 1988. Effects of lead on viability and intracellular metal content of C6 rat glioma cells. *J. Toxicol. Environ. Health* 23, 267–279. doi:10.1080/15287398809531112
- Tomar, D., Prajapati, P., Sripada, L., Singh, K., Singh, R., Singh, A.K., Singh, R., 2013. TRIM13 regulates caspase-8 ubiquitination, translocation to autophagosomes and activation during ER stress induced cell death. *Biochim. Biophys. Acta* 1833, 3134–3144. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.08.021
- Tsunemi, T., Ashe, T.D., Morrison, B.E., Soriano, K.R., Au, J., Roque, R.A.V., Lazarowski, E.R., Damian, V.A., Masliah, E., La Spada, A.R., 2012. PGC-1 α rescues Huntington's disease proteotoxicity by preventing oxidative stress and promoting TFEB function. *Sci. Transl. Med.* 4, 142ra97. doi:10.1126/scitranslmed.3003799
- Venable, F.P., 1894. *A short history of chemistry*. Ed: Heath & Co, Boston, USA.
- Wada, T., Penninger, J.M., 2004. Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene* 23, 2838–2849. doi:10.1038/sj.onc.1207556
- Wan, F.Y., Wang, Y.N., Zhang, G.J., 2001. The influence of oxidation of membrane thiol groups on lysosomal proton permeability. *Biochem. J.* 360, 355–362.
- Wan, F.Y., Yang, L., Zhong, Y.G., Zhu, W., Wang, Y.N., Zhang, G.J., 2002. Enhancement of lysosomal osmotic sensitivity induced by the photooxidation of membrane thiol groups. *Photochem. Photobiol.* 75, 134–139.
- Wang, J., Whiteman, M.W., Lian, H., Wang, G., Singh, A., Huang, D., Denmark, T., 2009. A non-canonical MEK/ERK signaling pathway regulates autophagy via regulating Beclin 1. *J. Biol. Chem.* 284, 21412–21424. doi:10.1074/jbc.M109.026013
- Wang, R.C., Wei, Y., An, Z., Zou, Z., Xiao, G., Bhagat, G., White, M., Reichelt, J., Levine, B., 2012. Akt-mediated regulation of autophagy and tumorigenesis through Beclin 1 phosphorylation. *Science* 338, 956–959. doi:10.1126/science.1225967
- Ward, D.M., Shiflett, S.L., Kaplan, J., 2005. *Lysosome Biogenesis and Dynamics*, en: *The Biogenesis of Cellular Organelles*, Molecular Biology Intelligence Unit. Ed: Springer, Nueva York, USA. pp. 111–126.
- Watts, R., Sarasa, J., Loge, F., Teel, A., 2005. Oxidative and Reductive Pathways in Manganese-Catalyzed Fenton's Reactions. *J. Environ. Eng.* 131, 158–164. doi:10.1061/(ASCE)0733-9372(2005)131:1(158)
- Webber, J.L., 2010. Regulation of autophagy by p38 α MAPK. *Autophagy* 6, 292–293. doi:10.4161/auto.6.2.11128
- Wedler, F.C., Denman, R.B., 1984. Glutamine synthetase: the major Mn(II) enzyme in mammalian brain. *Curr. Top. Cell. Regul.* 24, 153–169.
- Wei, Y., Pattingre, S., Sinha, S., Bassik, M., Levine, B., 2008. JNK1-Mediated Phosphorylation of Bcl-2 Regulates Starvation-Induced Autophagy. *Mol. Cell* 30, 678–688. doi:10.1016/j.molcel.2008.06.001
- Weyermann, J., Lochmann, D., Zimmer, A., 2005. A practical note on the use of cytotoxicity assays. *Int. J. Pharm.* 288, 369–376. doi:10.1016/j.ijpharm.2004.09.018
- Wu, Y.T., Tan, H.L., Shui, G., Bauvy, C., Huang, Q., Wenk, M.R., Ong, C.N., Codogno, P., Shen, H.M., 2010. Dual role of 3-methyladenine in modulation of autophagy via different temporal patterns of inhibition on class I and III phosphoinositide 3-kinase. *J. Biol. Chem.* 285, 10850–10861. doi:10.1074/jbc.M109.080796

- Xu, B., Wu, S.W., Lu, C.W., Deng, Y., Liu, W., Wei, Y.G., Yang, T.Y., Xu, Z.F., 2013. Oxidative stress involvement in manganese-induced alpha-synuclein oligomerization in organotypic brain slice cultures. *Toxicology* 305, 71–78. doi:10.1016/j.tox.2013.01.006
- Xu, B., Xu, Z.F., Deng, Y., 2009. Effect of manganese exposure on intracellular Ca²⁺ homeostasis and expression of NMDA receptor subunits in primary cultured neurons. *Neurotoxicology* 30, 941–949. doi:10.1016/j.neuro.2009.07.011
- Xu, J., Feng, H.T., Wang, C., Yip, K.H.M., Pavlos, N., Papadimitriou, J.M., Wood, D., Zheng, M.H., 2003. Effects of Bafilomycin A1: An inhibitor of vacuolar H (+)-ATPases on endocytosis and apoptosis in RAW cells and RAW cell-derived osteoclasts. *J. Cell. Biochem.* 88, 1256–1264. doi:10.1002/jcb.10477
- Yacoub, A., Park, M.A., Gupta, P., Rahmani, M., Zhang, G., Hamed, H., Hanna, D., Sarkar, D., Lebedeva, I.V., Emdad, L., Sauane, M., Vozhilla, N., Spiegel, S., Koumenis, C., Graf, M., Curiel, D.T., Grant, S., Fisher, P.B., Dent, P., 2008. Caspase-, cathepsin-, and PERK-dependent regulation of MDA-7/IL-24-induced cell killing in primary human glioma cells. *Mol. Cancer Ther.* 7, 297–313. doi:10.1158/1535-7163.MCT-07-2166
- Yamada, M., Ohno, S., Okayasu, I., Okeda, R., Hatakeyama, S., Watanabe, H., Ushio, K., Tsukagoshi, H., 1986. Chronic manganese poisoning: a neuropathological study with determination of manganese distribution in the brain. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 70, 273–278.
- Yang, H., Gu, L., Zhang, L., Yan, M., Zheng, X., 2009. Involvement of hydrogen peroxide in the manganese-induced myocytes mitochondrial membrane potential loss. *Toxicol. Mech. Methods* 19, 66–72. doi:10.1080/15376510802428583
- Yang, H., Sun, Y., Zheng, X., 2007. Manganese-induced apoptosis in rat myocytes. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 21, 94–100. doi:10.1002/jbt.20172
- Yang, S., Thor, A.D., Edgerton, S., Yang, X., 2006. Caspase-3 mediated feedback activation of apical caspases in doxorubicin and TNF-alpha induced apoptosis. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* 11, 1987–1997. doi:10.1007/s10495-006-0084-y
- Yang, Z., Klionsky, D.J., 2010. Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nat. Cell Biol.* 12, 814–822. doi:10.1038/ncb0910-814
- Yelamanchili, S.V., Chaudhuri, A.D., Flynn, C.T., Fox, H.S., 2011. Upregulation of cathepsin D in the caudate nucleus of primates with experimental parkinsonism. *Mol. Neurodegener.* 6, 52. doi:10.1186/1750-1326-6-52
- Yin, X.M., 2000. Signal transduction mediated by Bid, a pro-death Bcl-2 family proteins, connects the death receptor and mitochondria apoptosis pathways. *Cell Res.* 10, 161–167. doi:10.1038/sj.cr.7290045
- Yin, Z., Aschner, J.L., dos Santos, A.P., Aschner, M., 2008. Mitochondrial-dependent manganese neurotoxicity in rat primary astrocyte cultures. *Brain Res.* 1203, 1–11. doi:10.1016/j.brainres.2008.01.079
- Yoon, Y.H., Cho, K.S., Hwang, J.J., Lee, S.J., Choi, J.A., Koh, J.Y., 2010. Induction of lysosomal dilatation, arrested autophagy, and cell death by chloroquine in cultured ARPE-19 cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51, 6030–6037. doi:10.1167/iovs.10-5278
- Yoshimori, T., Yamamoto, A., Moriyama, Y., Futai, M., Tashiro, Y., 1991. Bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type H(+)-ATPase, inhibits acidification and protein degradation in lysosomes of cultured cells. *J. Biol. Chem.* 266, 17707–17712.
- Youle, R.J., Karbowski, M., 2005. Mitochondrial fission in apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 657–663. doi:10.1038/nrm1697
- Zakeri, Z., Lockshin, R.A., 2008. Cell death: history and future. *Adv. Exp. Med. Biol.* 615, 1–11. doi:10.1007/978-1-4020-6554-5_1
- Zalckvar, E., Berissi, H., Mizrachy, L., Idelchuk, Y., Koren, I., Eisenstein, M., Sabanay, H., Pinkas-Kramarski, R., Kimchi, A., 2009. DAP-kinase-mediated phosphorylation on the BH3 domain of beclin 1 promotes dissociation of beclin 1 from Bcl-XL and induction of autophagy. *EMBO Rep.* 10, 285–292. doi:10.1038/embor.2008.246
- Zarubin, T., Han, J., 2005. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res.* 15, 11–18. doi:10.1038/sj.cr.7290257
- Zdolsek, J.M., Svensson, I., 1993. Effect of reactive oxygen species on lysosomal membrane integrity. A study on a lysosomal fraction. *Virchows Arch. B Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.* 64, 401–406.

- Zhang, J., Cao, R., Cai, T., Aschner, M., Zhao, F., Yao, T., Chen, Y., Cao, Z., Luo, W., Chen, J., 2013. The role of autophagy dysregulation in manganese-induced dopaminergic neurodegeneration. *Neurotox. Res.* 24, 478–490. doi:10.1007/s12640-013-9392-5
- Zhang, L., Sang, H., Liu, Y., Li, J., 2013. Manganese activates caspase-9-dependent apoptosis in human bronchial epithelial cells. *Hum. Exp. Toxicol.* 32, 1155–1163. doi:10.1177/0960327112470272
- Zhang, L., Sheng, R., Qin, Z., 2009. The lysosome and neurodegenerative diseases. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 41, 437–445.
- Zhang, S., Fu, J., Zhou, Z., 2004. In vitro effect of manganese chloride exposure on reactive oxygen species generation and respiratory chain complexes activities of mitochondria isolated from rat brain. *Toxicol. In Vitro* 18, 71–77. doi:10.1016/j.tiv.2003.09.002
- Zhang, Y., Wu, Y., Cheng, Y., Zhao, Z., Tashiro, S., Onodera, S., Ikejima, T., 2008. Fas-mediated autophagy requires JNK activation in HeLa cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377, 1205–1210. doi:10.1016/j.bbrc.2008.10.151
- Zhao, F., Cai, T., Liu, M., Zheng, G., Luo, W., Chen, J., 2009. Manganese induces dopaminergic neurodegeneration via microglial activation in a rat model of manganism. *Toxicol. Sci.* 107, 156–164. doi:10.1093/toxsci/kfn213
- Zhao, M., Antunes, F., Eaton, J.W., Brunk, U.T., 2003. Lysosomal enzymes promote mitochondrial oxidant production, cytochrome c release and apoptosis. *Eur. J. Biochem. FEBS* 270, 3778–3786.
- Ziegler, U., Groscurth, P., 2004. Morphological features of cell death. *News Physiol. Sci.* 19, 124–128.
- Zou, H., Yang, R., Hao, J., Wang, J., Sun, C., Fesik, S.W., Wu, J.C., Tomaselli, K.J., Armstrong, R.C., 2003. Regulation of the Apaf-1/caspase-9 apoptosome by caspase-3 and XIAP. *J. Biol. Chem.* 278, 8091–8098. doi:10.1074/jbc.M204783200
- Zwingmann, C., Leibfritz, D., Hazell, A.S., 2003. Energy metabolism in astrocytes and neurons treated with manganese: relation among cell-specific energy failure, glucose metabolism, and intercellular trafficking using multinuclear NMR-spectroscopic analysis. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 23, 756–771. doi:10.1097/01.WCB.0000056062.25434.4D