

Inducción de autofagia como mecanismo antioxidante en un modelo *in vitro* de la enfermedad de Parkinson

Yareth Gopar-Cuevas^a, Odila Saucedo-Cárdenas^{a,b}, Humberto Rodríguez-Rocha^a, Aracely García-García^{a,*}.

^a Laboratorio de Terapéutica Antioxidante, Departamento de Histología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Ave. Madero S/N, C.P. 64460, Monterrey, Nuevo León, México.

^b Departamento de Genética Molecular, Centro de Investigación Biomédica del Noreste, Delegación Nuevo León, Instituto Mexicano del Seguro Social, México.

*aracely.garciagr@uanl.edu.mx

Palabras clave: enfermedad de Parkinson; autofagia; estrés oxidativo; antioxidante.

Introducción

La Enfermedad de Parkinson (EP) es un desorden neurodegenerativo, cuya incidencia se cree va en aumento. Esta enfermedad se caracteriza por la pérdida selectiva de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra¹. Aunque no se sabe cómo se origina esta enfermedad, se tiene evidencia de la existencia de alteraciones a nivel mitocondrial, en los niveles de estrés oxidativo y en las vías de degradación de proteínas mediadas por el proteosoma y la autofagia². Existe evidencia que soporta que la autofagia tiene un papel primordial en el sistema nervioso central para el mantenimiento de las neuronas, ya que al ser inhibida ocurre un proceso de neurodegeneración³. Por lo tanto, la estimulación de la autofagia, representa una estrategia prometedora para disminuir la pérdida neuronal. Existen diferentes moléculas con capacidad inductora de autofagia, una de las más estudiadas es la rapamicina⁴. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la inducción de autofagia con rapamicina sobre el estrés oxidativo en un modelo de la EP *in vitro* inducido con el herbicida paraquat.

Parte experimental

Células de neuroblastoma SH-SY5Y con fenotipo dopaminérgico fueron pretratadas con rapamicina (R) a una concentración de 10 μ M durante 1 h. Posteriormente, se adicionó el herbicida paraquat (PQ) a una concentración de 0.5 mM durante 24 h. El efecto de la inducción de autofagia con rapamicina sobre el estrés oxidativo se evaluó mediante el uso de dihidroetidio (DHE) a una concentración de 0.5 μ M, que al ser oxidado emite fluorescencia. Se realizó el conteo de células positivas para DHE utilizando el equipo MuseTM Cell Analyzer. Para monitorear el flujo de autofagia se agregó cloroquina (CQ) (40 μ M) 4 h antes de que se cosecharan las células. Para evaluar la inducción de autofagia se evaluó el marcador de autofagia LC3-II mediante western blot. Para identificar la presencia de autofagosomas y/o autolisosomas en diferentes grados de maduración se realizó microscopía electrónica de transmisión (MET).

Resultados y discusión

El estrés oxidativo en las células tratadas con PQ fue significativamente mayor que nuestro control positivo, el H₂O₂

(* $p = 0.0237$), mientras que cuando se realizó el pretratamiento con rapamicina (R+PQ) para inducir la autofagia, el estrés oxidativo disminuyó con una diferencia estadísticamente significativa (** $p = 0.0343$) en comparación con las células que no recibieron el pretratamiento con rapamicina (Fig. 1).

En el análisis de MET se observó que en las células tratadas con PQ había un incremento en la presencia de autofagosomas, muchos de los cuales se encontraron secuestrando mitocondrias (mitofagia); mientras que cuando se realizó el pretratamiento con rapamicina se observaron características ultraestructurales similares a las de las células control. Esto se confirmó con el análisis de la LC3-II mediante western blot en las células sin CQ, mientras que esta tendencia no se observó en las células con CQ.

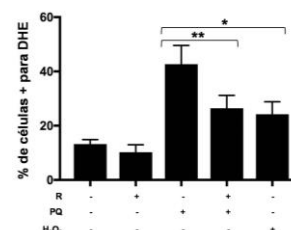


Fig. 1. La inducción de autofagia con rapamicina disminuye el estrés oxidativo inducido con paraquat.

Los resultados se presentan como medias \pm 1 desviación estándar. Los datos fueron analizados por la prueba t de Student de dos colas para muestras no pareadas. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos si $p < 0.05$.

Conclusiones

- La estimulación de la autofagia con rapamicina disminuye el estrés oxidativo en un modelo de la EP inducido con paraquat *in vitro*.
 - El paraquat induce mitofagia, y ésta es revertida al inducir la autofagia.

Referencias

- Dauer, W.; Przedborski, S. *Neuron*. 2003, 39, 889-909.
- Henchcliffe, C.; Beal, M. F. *Nat. Clin. Pract. Neurol.* 2008, 4, 600-609.
- Hara, T.; Nakamura, K.; Matsui, M.; Yamamoto, A.; Nakahara, Y.; Suzuki-Migishima, R.; Yokoyama, M.; Mishima, K.; Saito, I.; Okano, H.; et al. *Nature* 2006, 441, 885-889.
- Cai, Z.; Yan, L. *J. Biochem. Pharmacol. Res.* 2013, 1, 84-90.