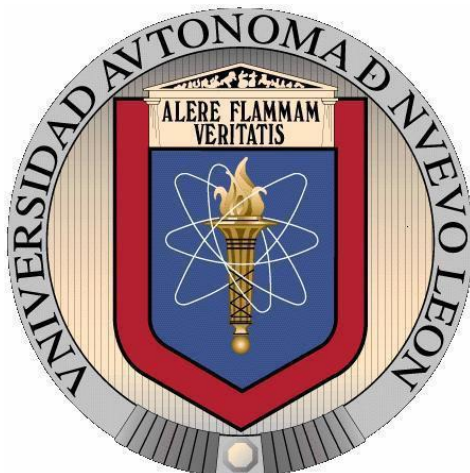


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



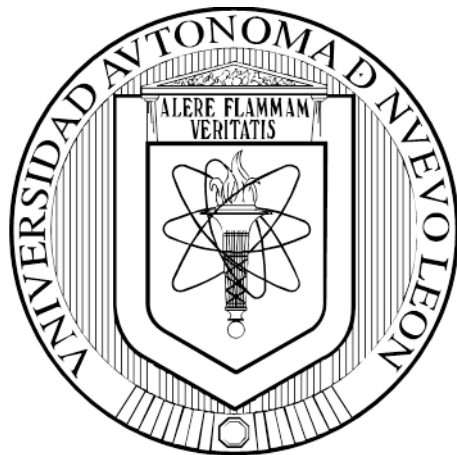
**“EFECTO DE LA SOBREENPRESIÓN DE PEROXIRREDOXINA 5 EN UN MODELO CELULAR DE
LA ENFERMEDAD DE PARKINSON”**

PRESENTADA POR

M.C. ANA PATRICIA DUARTE JURADO

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

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



**“EFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN DE PEROXIRREDOXINA 5 EN UN MODELO CELULAR DE
LA ENFERMEDAD DE PARKINSON”**

PRESENTADA POR

M.C. ANA PATRICIA DUARTE JURADO

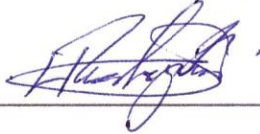
**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR EN CIENCIAS CON
ORIENTACIÓN EN MORFOLOGÍA**

**“EFECTO DE LA SOBREENPRESIÓN DE PEROXIREDOXINA 5 EN UN MODELO CELULAR DE
LA ENFERMEDAD DE PARKINSON”**

Aprobación de Tesis:



Dra. Aracely García García
Director



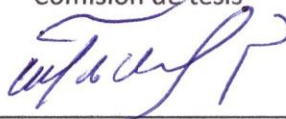
Dr. Humberto Rodríguez Rocha
Co- director



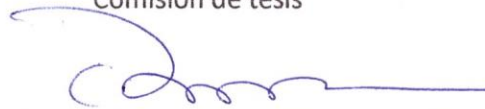
Dra. María de Jesús Loera Arias
Comisión de tesis



Dra. Odilla Saucedo Cárdenas
Comisión de tesis



Dra. Roberto Montes de Oca Luna
Comisión de tesis



Dr. Med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de estudios de posgrado

**“EFECTO DE LA SOBREENPRESIÓN DE PEROXIREDOXINA 5 EN UN MODELO CELULAR DE
LA ENFERMEDAD DE PARKINSON”**

Presentado por:

M.C. Ana Patricia Duarte Jurado

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



Dra. Aracely García García
Director



Dr. Humberto Rodríguez Rocha
Co- director

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi profunda gratitud a todas las personas que han contribuido de manera significativa a la realización de esta tesis doctoral.

En primer lugar, quisiera agradecer a la Dra. Aracely García y el Dr. Humberto Rodríguez, por aceptarme nuevamente en su equipo de trabajo, su orientación experta, apoyo constante y dedicación incansable. Sus valiosos conocimientos y su mentoría han sido fundamentales para dar forma a mi investigación y guiarme en cada etapa del proceso.

También deseo agradecer a mi comisión de tesis, el Dr. Roberto Montes de Oca, La Dra. Odila Saucedo y la Dra. María De Jesús Loera, por sus comentarios constructivos y sugerencias que enriquecieron este trabajo.

A mis amigos y compañeros del laboratorio de terapéutica antioxidante: Yareth, Alfredo, Diego, Daniel, Paulina, Víctor y Edgar. A mis amigos del Departamento de Histología: Ulises, Gloria, Alejandra, la Dra. Sheila Villa y el Dr. José Juan Pérez. Gracias a todos por compartir sus conocimientos, experiencias y su amistad.

A mis papas y mis hermanos, por su apoyo constante, aliento y comprensión durante este largo proceso. Su amor y ánimo han sido mi fuente de fortaleza en momentos desafiantes.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el otorgamiento de la beca de doctorado.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	1
ÍNDICE.....	2
LISTA DE FIGURAS.....	4
RESUMEN	5
ABSTRACT	6
INTRODUCCIÓN	7
ANTECEDENTES	9
ENFERMEDAD DE PARKINSON	9
ESTRÉS OXIDATIVO	14
PEROXIRREDOXINAS	17
PEROXIRREDOXINA 5	22
PARAQUAT COMO MODELO EXPERIMENTAL DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON	25
JUSTIFICACIÓN	27
OBJETIVO GENERAL.....	28
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
MATERIAL Y EQUIPO	29
Línea celular	29
Cultivo celular	29
Anticuerpos	29
Soluciones	30
Material	31
Equipo	32
MÉTODOS.....	33
Cultivo celular	33
Western blot	33
Propagación y titulación de adenovirus	35
Transducción adenoviral	37
Detección de ROS mitocondrial con sondas fluorescentes	38
Detección del ROS citoplasmático con sondas fluorescentes	39
Detección de carbonilación de proteínas por western blot	39
Rojo Ponceau	41
Detección de células en apoptosis	41

RESULTADOS	43
El estado hiperoxidado de las peroxirredoxinas 2-Cys típicas refleja la compartimentalización de las especies reactivas de oxígeno en respuesta a PQ.....	43
La sobreexpresión de PRDX5 disminuye la producción de especies reactivas de oxígeno en el citoplasma y las mitocondrias mediado por PQ.....	44
La sobreexpresión de PRDX5 previene la carbonilación irreversible de las proteínas inducida por PQ	49
La sobreexpresión de PRDX5 previene la muerte de las células dopaminérgicas mediada por PQ.....	51
DISCUSIÓN.....	53
CONCLUSIÓN	56
REFERENCIAS.....	57
ARTCULOS PUBLICADOS.....	64
.....	64
.....	65
.....	66
.....	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cronología de la progresión de los síntomas clínicos en la Enfermedad de Parkinson

Figura 2. Cambios más evidentes en el cerebro de los pacientes con enfermedad de Parkinson

Figura 3. El "triángulo de las Bermudas" de modificaciones moleculares conduce a la muerte de neuronas en la EP

Figura 4. Ciclo catalítico común de las peroxirredoxinas 2-Cys típicas

Figura 5. Clasificación de las peroxirredoxinas en subfamilias y su localización subcelular

Figura 6. Ciclo catalítico y localización subcelular de la PRDX5

Figura 7. Esquema representativo de los estados de oxidación de las peroxirredoxinas 2-Cys típicas

Figura 8. Esquema representativo de la titulación de los adenovirus

Figura 9. Plot representativo de citometría de flujo con anexina V y 7 AAD

Figura 10. Efecto del PQ sobre la óxido-reducción de las peroxirredoxinas 2-Cys típicas

Figura 11. Sobreexpresión de PRDX5 en la línea celular SH-SY5Y

Figura 12. La sobreexpresión de PRDX5 disminuye el estrés oxidativo mitocondrial inducido por PQ

Figura 13. La sobreexpresión de PRDX5 disminuye el estrés oxidativo citoplasmático mediado por PQ

Figura 14. La carbonilación de las proteínas inducida por PQ es prevenida por la sobreexpresión de Prdx5

Figura 15. La sobreexpresión de PRDX5 disminuye la apoptosis mediada por PQ

RESUMEN

M.C. Ana Patricia Duarte Jurado

Fecha de graduación: Septiembre 2023

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Título del estudio: "Efecto de la sobreexpresión de Peroxirredoxina 5 en un modelo celular de la enfermedad de Parkinson"

Número de Páginas: 68

Área de estudio: Morfología

**CANDIDATO PARA EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON
ORIENTACIÓN EN MORFOLOGÍA**

El estrés oxidativo es considerado uno de los mecanismos patológicos que provocan la Enfermedad de Parkinson (EP). La principal característica patológica de la EP es la degeneración progresiva de las neuronas dopaminérgicas. Un desequilibrio en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y en la desintoxicación de intermediarios reactivos genera estrés oxidativo (EO), esto afecta la función celular al atacar diferentes macromoléculas. Las neuronas dopaminérgicas son susceptibles al daño oxidativo debido al metabolismo inherente de la dopamina, que se oxida y genera ROS. La asociación entre la EP y el estrés oxidativo está respaldada por estudios *post mortem* de cerebros de pacientes con EP, donde se encontró una mayor actividad oxidativa en las neuronas dopaminérgicas, así como una disminución de las enzimas antioxidantes. Previamente encontramos, en un modelo *in vitro* de EP inducido con el herbicida paraquat (PQ), que las enzimas peroxirredoxinas (PRDX) dependientes de tiol se encontraban en su forma hiperoxidada, esta forma es catalíticamente inactiva y perpetúa el estado de estrés oxidativo. Es por lo que quisimos evaluar si la sobreexpresión de la PRDX5 puede proteger a las células dopaminérgicas frente al EO y la muerte inducida por PQ. Se estableció el modelo celular en la línea SH-SY5Y con el herbicida y se analizó por eastern blot el estatus redox de las PRDX 2-Cys típicas. Observamos que el PQ induce un patrón de oxidación e hiperoxidación específico para cada una de estas PRDX. Posteriormente se sobreexpresó la PRDX5 mediante un vector adenoviral bajo el promotor de CMV y evaluamos el estrés oxidativo en la mitocondria y en el citoplasma mediante citometría de flujo usando sondas fluorescentes para detectar ROS de cada compartimento. De manera interesante detectamos una disminución del EO en ambos compartimentos al sobreexpresar la PRDX5. Se analizó también el efecto de esta sobreexpresión en los cambios oxidativos irreversibles sobre las macromoléculas, como la carbonilación de proteínas. Mediante la derivación de DNPH observamos que la sobreexpresión de PRDX5 confiere una protección contra estos cambios oxidativos. De forma relevante, la disminución del estrés oxidativo en los principales compartimentos subcelulares condujo a una protección celular general contra la muerte en este modelo de EP, lo que se demostró mediante citometría de flujo utilizando anexina V y 7 AAD. Debido a que la PRDX5 es más resistente a la hiperoxidación que las PRDX 2-Cys típicas y se expresa en múltiples orgánulos, como mitocondrias, peroxisomas y citoplasma, es una diana terapéutica prometedora para la EP. Además, su sobreexpresión protege a las células de tipo dopaminérgico del estrés oxidativo y la muerte, lo que justifica el estudio de este efecto en modelos *in vivo* de EP, para su posterior aplicación en ensayos clínicos.

ABSTRACT

M.C. Ana Patricia Duarte Jurado

Date: September 2023

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Title: "Effect of Peroxiredoxin 5 Overexpression in a Cellular Model of Parkinson's Disease"

Number of pages: 68

Study area: Morphology

**CANDIDATE FOR THE DOCTOR'S
DEGREE IN SCIENCES WITH
ORIENTATION IN MORPHOLOGY**

Oxidative stress is considered a pathological mechanism that triggers Parkinson's Disease (PD). The main pathological characteristic of PD is the progressive degeneration of dopaminergic neurons. An imbalance in the production of reactive oxygen species (ROS) and the detoxification of reactive intermediates generates oxidative stress (OS), which affects cellular function by attacking different macromolecules. Dopaminergic neurons are susceptible to oxidative damage due to the inherent metabolism of dopamine, which undergoes oxidation and generates ROS. The association between PD and oxidative stress is supported by *post mortem* studies of PD patients' brains, which have shown increased oxidative activity in dopaminergic neurons and decreased antioxidant enzymes. Previously, in an *in vitro* model of PD induced by the herbicide paraquat (PQ), we found that thiol-dependent peroxiredoxins (PRDX) were in their hyperoxidized form, which is catalytically inactive and perpetuates the state of oxidative stress. Therefore, we aimed to evaluate whether the overexpression of PRDX5 can protect dopaminergic cells against OS and PQ-induced cell death. The cellular model was established in the SH-SY5Y cell line with PQ, and the redox status of typical 2-Cys PRDX was analyzed by eastern blot. We observed that PQ induces a specific oxidation and hyperoxidation pattern for each of these peroxiredoxins. Subsequently, PRDX5 was overexpressed using an adenoviral vector under the CMV promoter, and oxidative stress in the mitochondria and cytoplasm was evaluated using flow cytometry with fluorescent probes for ROS in each compartment. Interestingly, we detected a decrease in OS in both compartments upon PRDX5 overexpression. We also analyzed the effect of this overexpression on irreversible oxidative changes in macromolecules, such as protein carbonylation. Through DNPH derivatization, we observed that PRDX5 overexpression protects against these oxidative changes. The reduction of oxidative stress in the main subcellular compartments led to a general cellular protection against cell death in this model of PD, which was demonstrated by flow cytometry using annexin V and 7AAD. Since PRDX5 is more resistant to hyperoxidation than typical 2-Cys PRDX and is expressed in multiple organelles, such as mitochondria, peroxisomes, and the cytoplasm, it is a promising therapeutic target for PD. Furthermore, its overexpression protects dopaminergic cells from oxidative stress and death, justifying the study of this effect in animal PD models for subsequent application in clinical trials.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno clínico que se caracteriza por presentar principalmente síntomas relacionados con el movimiento. Los pacientes experimentan temblores en reposo, rigidez muscular, lentitud en los movimientos y dificultades para mantener el equilibrio.

En los países industrializados se estima que la EP tiene una prevalencia del 0.3% en la población en general, y afecta al 1% de la población mayor de 60 años. Las estadísticas de la Organización Mundial de la Salud (OMS) lo posicionan como el trastorno número uno del movimiento a nivel mundial y el segundo neurodegenerativo más frecuente, solo después de la enfermedad de Alzheimer.

La fisiopatología de la EP involucra una pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra de la *pars compacta* (SNpc) del mesencéfalo, lo que conduce a una denervación nigroestriatal y una reducción significativa de la dopamina (DA) a nivel del cuerpo estriado. Consecuentemente, la denervación de esta vía lleva a un desequilibrio en las vías de salida del cuerpo estriado al globo pálido y de este último al tálamo, que es responsable de los síntomas motores mayores.

Los mecanismos patogénicos moleculares clave incluyen la agregación de proteínas mal plegadas, la formación de los característicos cuerpos de Lewy, el deterioro en los sistemas de degradación de proteínas, la neuroinflamación, la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo (EO).

Las neuronas dopaminérgicas son particularmente susceptibles al daño oxidativo debido al metabolismo inherente de la dopamina, la cual es oxidada generando especies reactivas de

oxígeno (ROS por sus siglas en inglés). Durante el EO, las ROS tienen como blanco diferentes macromoléculas. Además, el EO y la neuroinflamación ejercen un efecto sinérgico en la patogenia de la EP, lo que podría contribuir a la cascada de eventos que conducen a la neurodegeneración.

La asociación más concluyente entre el EO y la EP está respaldada por estudios *post mortem* en cerebros de pacientes con EP, donde se encontró un aumento en la actividad oxidativa, evidenciado por el daño de las macromoléculas en las neuronas, así como también una disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes.

Las enzimas antioxidantes se encargan de descomponer y eliminar los radicales libres. Entre estas enzimas se encuentra la familia de las peroxirredoxinas (PRDX), las cuales son un grupo de enzimas tiol dependientes, encargadas de catalizar la reducción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), hidroperóxidos de alquilo y peroxinitrito.

La peroxirredoxina 5 (PRDX5), es el único miembro de esta familia que pertenece al subgrupo de las peroxirredoxinas 2-Cys atípicas. Tiene una amplia localización subcelular, encontrándose principalmente en las mitocondrias, los peroxisomas y el citoplasma; sin embargo, su expresión es relativamente baja en las neuronas, lo que puede contribuir a la vulnerabilidad de estas células frente a los ataques nitro-oxidativos que ocurren durante la EP.

ANTECEDENTES

ENFERMEDAD DE PARKINSON

La EP es un trastorno neurológico complejo y dinámico. Desde su descubrimiento hace dos siglos, ha sido descrita en el contexto de sus manifestaciones clínicas características, que corresponden a síntomas motores, su asociación a la formación de cuerpos de Lewy y la pérdida de neuronas dopaminérgicas [1]. Sin embargo, actualmente se sabe que los pacientes con EP, presentan también síntomas no motores (cognitivos y conductuales), así como también síntomas asociados a la disfunción del sistema nervioso autónomo [2]. De igual forma, ahora se sabe que su patología implica extensas regiones del sistema nervioso central (SNC), además de diversos neurotransmisores más allá de solo la dopamina [3].

La EP es un trastorno universal, con una tasa de prevalencia de 0.3% de la población general en países industrializados y una incidencia bruta de 4.5 a 19 pacientes por cada 100 mil habitantes por año [4]. Con el aumento en la expectativa de vida, se estima que la prevalencia de EP a nivel mundial se duplique en las próximas dos décadas [5]. La incidencia y la prevalencia de la EP incrementan con la edad, aumentando la primera de 5 a 10 veces entre los 60 y los 90 años; y la segunda elevándose de menos del 1% en personas menores a 45 años a 4% en mayores de 85 años [6]. En México 14.9 de cada 100 mil habitantes padecen EP [7]; sin embargo, dado que su diagnóstico certero es un desafío, se estima que esta cifra se puede duplicar por los casos diagnosticados erróneamente [8].

Los síntomas motores clásicos de la EP que se han identificado como elementos destacados de la enfermedad incluyen: bradicinesia, rigidez muscular, temblor en reposo y alteraciones

posturales y de la marcha [9]. Además de los síntomas motores, se observan características no motoras como la disfunción olfatoria, el deterioro cognitivo, los síntomas psiquiátricos, los trastornos del sueño, la disfunción autonómica, el dolor y la fatiga [10]. Estos síntomas suelen ser más frecuentes en etapas iniciales de la enfermedad y su presencia se ha asociado a un deterioro marcado de la calidad de vida [11]. Sin embargo, la presentación de estas características clínicas es muy heterogénea entre los pacientes, lo que ha llevado a la clasificación de la EP en subtipos [12]. La evolución y el pronóstico de los pacientes es diferente para cada subtipo, siendo la variante con predominio de síntomas no motores la que se asocia a una progresión más rápida y un peor pronóstico [10].

Se cree que el proceso patogénico que provoca la EP se encuentra activo durante la fase premotora, afectando tanto a regiones del sistema nervioso periférico como central, así como a las neuronas dopaminérgicas de la SNpc [13, 14] (Figura1).

Aunque actualmente la etiología de la enfermedad no se conoce por completo, se sabe que la EP resulta de una compleja interacción entre factores genéticos y ambientales que afectan a numerosos procesos celulares fundamentales. Además, estudios recientes sugieren que el propio envejecimiento sumado con el estrés ambiental, específicamente la exposición a ciertas toxinas y el abuso de drogas, promueven un proceso de inflamación crónica en el cerebro [15]. Aunque generalmente la causa de la EP es idiopática, alrededor del 15% de todos los casos diagnosticados presentan una historia familiar de EP, y el 5% presenta una herencia mendeliana [16]. Se han vinculado alrededor de 20 genes con el desarrollo de la EP, denominados genes PARK. La mutación en algunos de estos genes suele ser autosómica dominante, por ejemplo SCNA, LRRK2 y VPS32, o autosómica recesiva para

otros como es el caso de PRKN, PINK1 y DJ-1 [17].

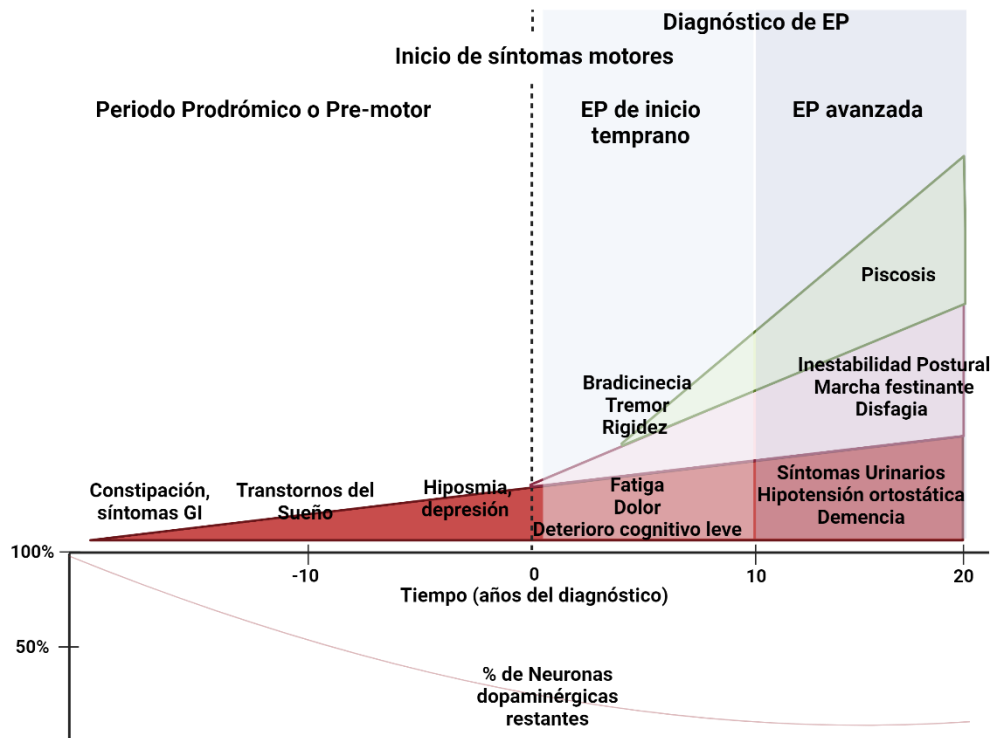


Figura 1. Cronología de la progresión de los síntomas clínicos en la enfermedad de Parkinson (Traducido y modificado de Castilla-Cortázar I 2020 [18]). Esquema representativo de los síntomas motores y no motores de la EP a través del tiempo. El tiempo 0 corresponde al momento del diagnóstico, lo cual coincide con la aparición de los síntomas motores y la pérdida de más del 50% de las neuronas dopaminérgicas. Los síntomas no motores pueden presentarse incluso 20 años antes del momento del diagnóstico.

A menudo, a nivel macroscópico no se observan muchas diferencias en el cerebro de los pacientes con EP comparado con el cerebro de sujetos sanos; sin embargo, se ha reportado que existen cambios relacionados a atrofia cortical en el área frontal, así como dilatación ventricular [19]. La alteración morfológica más notoria en el cerebro de las personas con EP se evidencia en secciones transversales del tronco cerebral, donde se observa una pérdida de la pigmentación en la SNpc y el locus coeruleus. Estos cambios en la pigmentación se

correlacionan directamente con la pérdida de las neuronas dopaminérgicas en esta área del mesencéfalo [20] (Figura 2). Los rasgos clínicos motores predominantes de la EP son secundarios a la pérdida de alrededor del 70% de dichas neuronas dopaminérgicas y sus proyecciones a los núcleos de la base [21]. Esta muerte celular se limita a un tipo específico de neuronas dopaminérgicas que contienen neuromelanina, llamadas neuronas A9 [22].

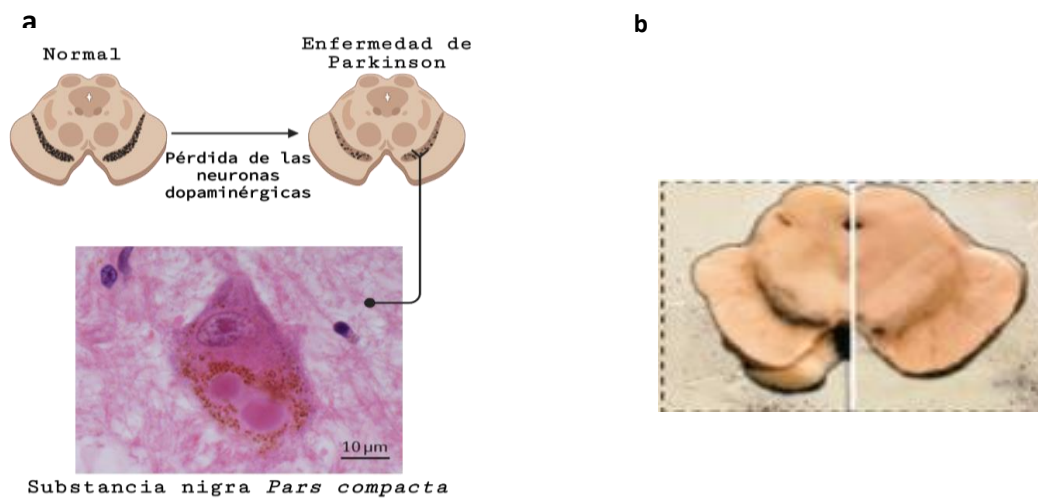


Figura 2. Cambios más evidentes en el cerebro de los pacientes con enfermedad de Parkinson. a) Representación esquemática del mesencéfalo, donde se observa la proporción normal de neuronas dopaminérgicas de la SNpc (izquierda), y la pérdida de éstas durante la EP (derecha). (Inferior) Microfotografía de una neurona dopaminérgica con los característicos cuerpos de Lewy citoplasmáticos. b) Micrografía de un corte transversal del mesencéfalo donde se observa la pérdida de la pigmentación de la SNpc de un cerebro con EP (derecha) en comparación con un cerebro normal (izquierda).

Sin embargo, no solo la SNpc se ve afectada durante la progresión de la EP. Se ha observado una pérdida generalizada de células en múltiples núcleos subcorticales y de la base [23], de igual forma se sabe que la dopamina no es el único neurotransmisor involucrado en la EP [24]. El hallazgo microscópico característico en la EP es la presencia de depósitos citoplasmáticos anormales de α -sinucleína, estos agregados proteicos se denominan

cuerpos de Lewy (LB por sus siglas en inglés) [25]. Las inclusiones intracitoplasmáticas de LB incluyen un núcleo granular y fibrilar con un halo circundante (Figura 2). El tamaño de LB puede variar de 5 a 30 μm de diámetro, y se puede encontrar más de un LB en una sola neurona. Además de α -sinucleína, los LB contienen otros tipos de proteínas, como ubiquitina, proteínas de citoesqueleto, proteínas nitradas y oxidadas, así como elementos lisosomales [26]. Además del cerebro, se ha logrado localizar la α -sinucleína fosforilada los pacientes con EP en órganos periféricos como retina, útero, piel, ventrículos cardiacos e intestino [27].

Sin embargo, la agregación de α -sinucleína no es el único mecanismo molecular involucrado en el desarrollo de la EP. Se sabe que existe disfunción de los sistemas de degradación de proteínas, disfunción mitocondrial y estrés oxidativo participando en la progresión de la enfermedad. Estos eventos interrelacionados, se conocen como “el triángulo de las Bermudas” de daño que subyace a la muerte celular (Figura 3) [28].

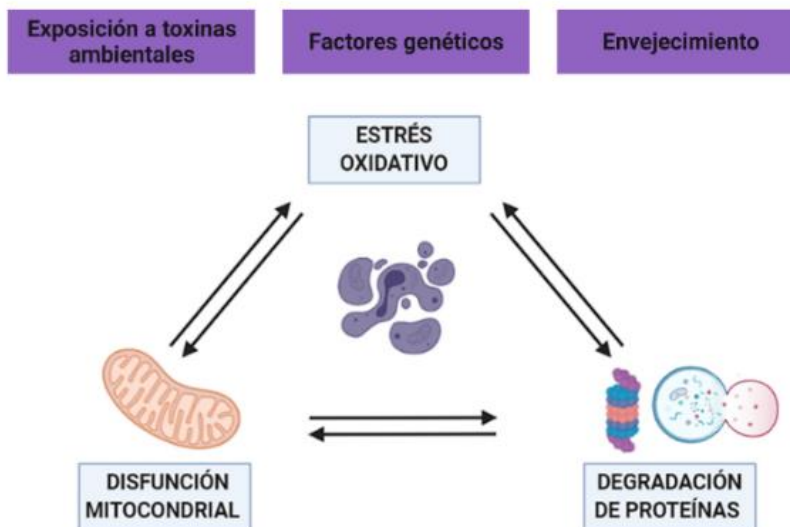


Figura 3. El “triángulo de las Bermudas” de modificaciones moleculares conduce a la muerte de neuronas en la EP. (Modificado de Malkus, K. A E., et al. 2009). Los factores de riesgo conocidos para el inicio de la EP incluyen influencias ambientales, genéticas y endógenas como el envejecimiento. Las contribuciones de estos factores de riesgo desencadenan estrés oxidativo, disfunción mitocondrial y deterioro en los sistemas de degradación de proteínas.

ESTRÉS OXIDATIVO

Por definición, se dice que el EO es “un desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes en favor de los oxidantes, lo que conduce a una interrupción de la señalización redox y daño molecular” [29].

En condiciones de homeostasis, el organismo humano mantiene un equilibrio constante de oxidación y reducción, asegurando la estabilidad entre la generación de prooxidantes, producto del metabolismo celular, y los mecanismos de defensa antioxidante. El desequilibrio en este proceso de oxidación y reducción conduce a un estado de estrés oxidativo [30].

Todas las células tienen varios mecanismos antioxidantes de defensa, diseñados para

mantener la homeostasis en respuesta a factores de estrés oxidativo. Las ROS y las especies reactivas de nitrógeno (RNS por sus siglas en inglés) representan una amplia gama de moléculas químicamente definidas, las cuales se producen durante procesos enzimáticos y no enzimáticos en todas las células. Entre ellas podemos encontrar el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), oxígeno singlete (1O_2), hidroxilo ($OH\cdot$), peroxilo ($RO_2\cdot$), ozono (O_3), alcoxilo ($RO\cdot$), anión peroxinitrito ($ONOO^-$), hidroperoxilo ($HO_2\cdot$), ácido hipocloroso ($HOCl$), ácido hipobromoso ($HOBr$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), entre otras [31]. El anión superóxido es altamente reactivo, se produce en los complejos mitocondriales I y III; además se ha demostrado que el complejo III libera $O_2^{\cdot-}$ hacia ambos lados de la membrana mitocondrial interna, para después reducirse a H_2O_2 [32]. Por su parte, el H_2O_2 también puede ser producido por los peroxisomas durante la oxidación de los ácidos grasos, para luego ser degradado por acción de la catalasa, que es la enzima peroxisomal más abundante, es por eso que el peroxisoma desempeña roles fundamentales en la homeostasis redox celular [33]. Las ROS y las RNS tienen papeles vitales en muchos procesos biológicos, incluyendo crecimiento celular, señalización, respuestas inmunes, síntesis de moléculas biológicas, entre otras [34]. El balance entre la producción de ROS y los sistemas antioxidantes puede alterarse en distintas magnitudes. En el EO leve las defensas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPX), glutatión reductasa (GR), glutatión S-transferasa (GST), tiorredoxinas (TRX) y peroxirredoxinas (PRDX) [31], aún son suficientes para restablecer dicho balance. Sin embargo, si el estatus oxidativo permanece o se agrava, se producen alteraciones severas en el metabolismo celular. Dentro de estas alteraciones se incluyen rupturas en las cadenas de ADN, aumento en la

concentración del calcio intracelular, descompartimentalización de Fe^{+2} y Cu^{+2} catalíticos, daño a las membranas y transporte de iones y proteínas específicas, así como peroxidación de lípidos. El daño por EO puede ser reversible o irreversible, dependiendo de diversos factores como el tiempo de exposición al estrés, la funcionalidad de los sistemas antioxidantes, la edad celular, condiciones nutricionales y factores genéticos [35-37].

Todos los organismos tienen la capacidad de adaptarse al EO, lo cual puede ser llevado a cabo por un aumento en los niveles de enzimas antioxidantes y chaperonas moleculares [38]. De manera fisiológica, las ROS están involucradas en vías de señalización mediadas por los grupos tioles de proteínas que tienen el potencial de regular la transcripción, como por ejemplo en la vía de señalización NF- κ B, la cascada de MAPK y la vía PI3K-Akt [39, 40].

Existe relación entre la presencia de niveles elevados de EO y el desarrollo de muchas condiciones fisiopatológicas y diversas enfermedades, incluyendo el cáncer, diabetes, aterosclerosis, obesidad, enfermedades cardiovasculares y enfermedades neurodegenerativas. Aunque aún no está claro si las especies reactivas contribuyen iniciando el proceso patológico o son una causa del mismo [41].

El cerebro humano es responsable del consumo del 20% del oxígeno en el cuerpo y, por lo tanto, está sometido a niveles altos de ROS derivadas del metabolismo [42, 43]. Una creciente cantidad de evidencia sugiere que el EO está implicado en la etiología y patogénesis de los trastornos neurodegenerativos [44]. El cerebro es rico en ácidos grasos polinsaturados, por lo tanto, es altamente susceptible a la peroxidación lipídica, un proceso complejo que implica la interacción de los ácidos grasos con los radicales libres dando lugar a la generación de aldehídos reactivos electrófilos. Esta peroxidación lipídica ocurre en

muchas de las enfermedades neurodegenerativas [45]. La evidencia del impacto del EO en estas enfermedades se apoya además en el aumento de la oxidación de las bases del ADN y ARN, y en el daño oxidativo que sufren las proteínas en ciertas regiones del cerebro [46]. La destrucción de algunos componentes de la célula induce una diversidad de respuestas a través de la generación de especies reactivas secundarias, y finalmente conduce a la muerte celular por apoptosis o necrosis [47-49].

La mitocondria es el principal centro de producción de ROS. Cerca del 90% del consumo de oxígeno en los mamíferos es mitocondrial, esto hace a la mitocondria particularmente importante en las neuronas debido a su alta demanda de energía [50]. Este hecho junto con la observación de que la disfunción mitocondrial ocurre en muchas enfermedades neurodegenerativas sugiere que son enfermedades mitocondriales [48].

La asociación más concluyente entre la EP y el EO está apoyada por el aumento de la actividad oxidativa y el daño en las macromoléculas, lo cual se ha observado en las neuronas dopaminérgicas en la SNpc en estudios *post mortem* de cerebros de pacientes con la EP [51, 52].

PEROXIRREDOXINAS

Las peroxirredoxinas fueron identificadas inicialmente en 1987 en levaduras y se nombraron “antioxidantes tiol-específicos” (TSA) [53]. Son una superfamilia de enzimas antioxidantes tiol-dependientes que se encuentran evolutivamente conservadas en prácticamente todas las especies vivas, incluyendo organismos anaerobios [54]. Son responsables de reducir alrededor del 90% de los peróxidos celulares [55]. Sin embargo, es

llamativo que las peroxirredoxinas no tengan homología en su secuencia con otras enzimas antioxidantes como la catalasa, la superóxido dismutasa y algunas peroxidases [56].

Es importante destacar que las peroxirredoxinas se caracterizan por carecer de cualquier cofactor redox, como hemo, flavina o iones metálicos, y su actividad peroxidática se basa únicamente en los residuos de cisteína [57].

El mecanismo catalítico general de las peroxirredoxinas consiste en la reducción de peróxidos mediante la oxidación del grupo tiol de un residuo de cisteína conservado (cisteína peroxidática, CysP), originando un residuo de Cys-ácido sulfénico (Cys-SOH) que reacciona con otro residuo de cisteína (cisteína de resolución, CysR) y forma un disulfuro que posteriormente es reducido por un donante de electrones para completar el ciclo catalítico [58]. Los puentes disulfuro intra e intermoleculares formados durante este paso del ciclo catalítico de las peroxirredoxinas son reducidos por las tiorredoxinas (TRX), lo que permite que las cisteínas funcionales alcancen estados de tiol reducidos catalíticamente activos [59]. Si las condiciones oxidativas persisten, la Cys-SOH es blanco de una reacción de oxidación por una segunda molécula oxidante a Cys-ácido sulfínico (Cys-SO₂H); en este punto, la reducción de la PRDX depende de la acción de la sulfiredoxina (SRX) [60]. Sin embargo, si este sistema reductor es sobrepasado, las peroxirredoxinas pueden ser incluso hiperoxidadas a Cys-ácido sulfónico (Cys-SO₃H) de manera irreversible, llevándolas a un estado catalíticamente inactivo (Figura 4) [61]. La alta reactividad de la CysP de las peroxirredoxinas con los peróxidos es debida a su bajo pKa en el sitio catalítico; además, el ambiente del sitio catalítico promueve la ionización del grupo tiol a anión tiolato [61].

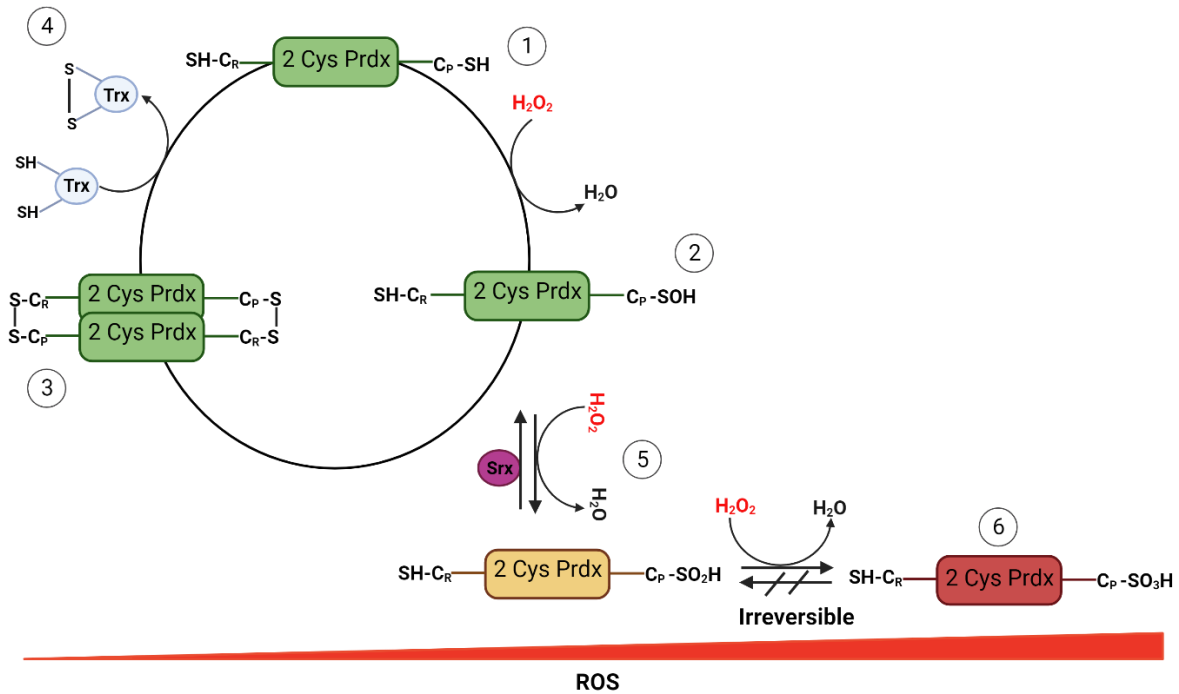


Figura 4. Ciclo catalítico de las peroxirredoxinas 2-Cys típicas. La PRDX se encuentra en su estado reducido, en su residuo de cisteína peroxidática (C_P-SH). En este estado, la enzima es capaz de reaccionar con el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (1) o con otros peróxidos orgánicos. Durante la reacción antioxidante, la C_P-SH reacciona con el sustrato peróxido, lo que resulta en su oxidación y la formación de un ácido sulfénico (C_P-SOH) (2), que posteriormente se unirá a la cisteína de resolución (C_R-SH) de una PRDX idéntica, formando un enlace disulfuro intermolecular (C_P-S-S-C_R) (3). Esto conduce a la resolución del peróxido y la regeneración de la PRDX en su estado reducido por acción de la tiorredoxina (4). Cuando las ROS se encuentran elevadas, las peroxirredoxinas pueden sufrir una reacción adicional de oxidación formando ácido sulfínico (C_P-SO₂H), que puede ser revertida por la sulfiredoxina (5). Sin embargo, en estados de EO la PRDX se hiperoxida formando ácido sulfónico (C_P-SO₃H), y esta reacción es irreversible e inactiva a las peroxirredoxinas (6).

Las peroxirredoxinas son diferencialmente susceptibles a la oxidación e hiperoxidación, estas diferencias se pueden atribuir a su estructura, a sus propiedades fisicoquímicas y a la disponibilidad de agentes reductores dependiente de su localización subcelular [62].

Las seis isoformas de peroxirredoxinas en mamíferos se clasificaron en 3 subfamilias basándose en el mecanismo de resolución y en la ubicación o ausencia de los residuos CysR [54]. Las subfamilias se designaron como peroxirredoxinas 2-Cys típicas, peroxirredoxinas

2-Cys atípicas y peroxirredoxinas 1-Cys. Las peroxirredoxinas 2-Cys típicas, tienen dos residuos de Cys (extremo N-terminal y C-terminal), necesarios para el mecanismo catalítico y separados entre sí por 121 residuos aminoácidos, e incluyen las peroxirredoxinas 1, 2, 3 y 4. Dentro de las peroxirredoxinas 2-Cys típicas, las PRDX1 y PRDX2 tienen localización citosólica, la PRDX3 se encuentra sólo en la mitocondria y la PRDX4 en el retículo endoplásmico y el espacio extracelular; la forma activa de estas peroxirredoxinas es como homodímero [56]. A la subfamilia 2-Cys atípica pertenece la PRDX5, que se localiza en el citosol, peroxisoma y mitocondria. La subfamilia 1-Cys contiene solo una Cys, la CysP en la región N-terminal y está integrada por la PRDX6 (Figura 5) [58]. Los patrones de expresión de las seis peroxirredoxinas en el cerebro muestran una distribución diferente dependiendo de la región cerebral y del tipo celular [63]. La PRDX1 se ha localizado principalmente en los oligodendrocitos y la microglía, la PRDX6 en astrocitos, mientras que las peroxirredoxinas 2, 3, 4 y 5 se encuentran exclusivamente en las neuronas (Tabla 1).

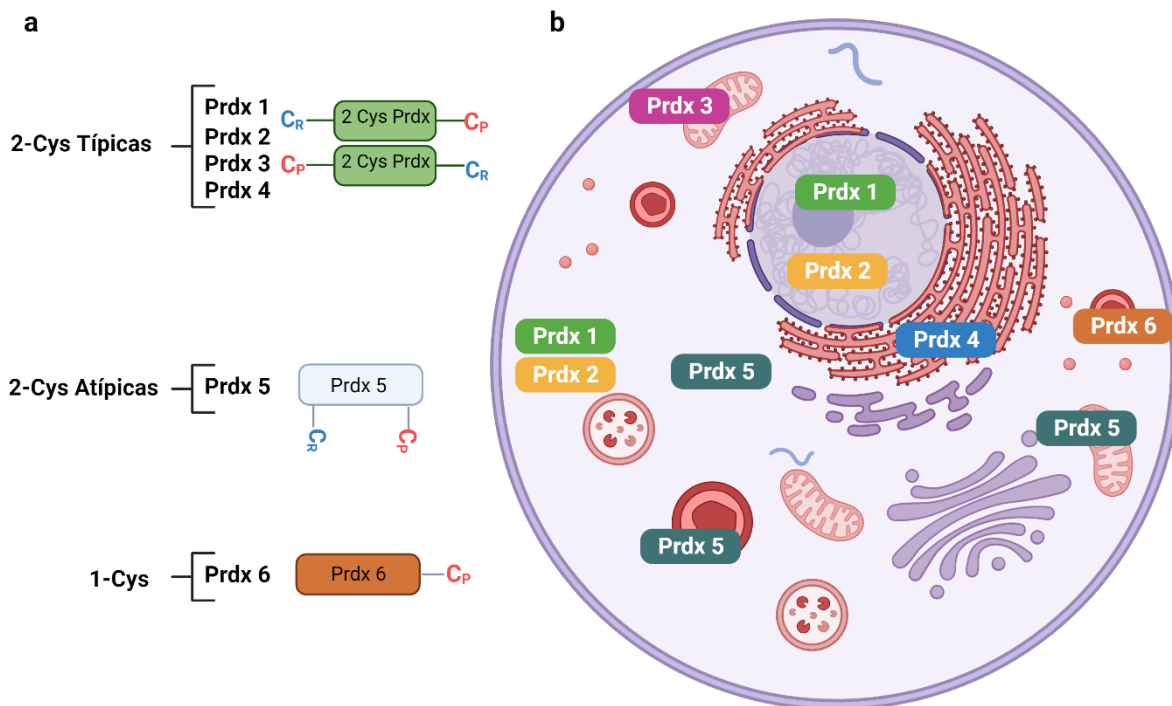


Figura 5. Clasificación de las peroxirredoxinas en subfamilias y su localización subcelular. a) Clasificación de las peroxirredoxinas en 3 subfamilias de acuerdo con la localización relativa y presencia o ausencia de cisteína de resolución. **b)** Esquema representativo de la localización subcelular de las peroxirredoxinas.

Tabla 1.- Comparación de los patrones de expresión de las peroxirredoxinas en el cerebro del ratón.

Tipos celulares	PRDX1	PRDX2	PRDX3	PRDX4	PRDX5	PRDX6
Neuronas	-	+	+	+	+	-
neuroglia:						
Oligodendrocitos	++	-	-	++	-	+
Astrocitos	-	-	-	-	-	+
Microglía	+	-	-	-	-	-

Abundancia relativa (++) alta; (+) moderada a baja; (-) indetectable [63].

Existe evidencia de la asociación entre la expresión anormal de peroxirredoxinas y el desarrollo de diversas patologías, como el cáncer, enfermedades inflamatorias y trastornos neurodegenerativos [64].

PEROXIRREDOXINA 5

La PRDX5 fue la última de las peroxirredoxinas en ser identificada, es la única peroxirredoxina 2-Cys atípica en los mamíferos. De acuerdo con su secuencia de aminoácidos, es la que tiene menor homología con las demás peroxirredoxinas, ya que comparte solo el 28% de similitud con las peroxirredoxinas 2-Cys típicas y 1-Cys [65].

El gen *PRDX5* humano se encuentra en el cromosoma 11q13 y consta de seis exones y cinco intrones que abarcan aproximadamente 3,7 kb [66]. Existen estudios que reportan que PRDX5 tiene una expresión constitutiva en casi todos los tejidos de mamíferos, aunque en diferentes niveles, según el tipo de célula [67].

En comparación con el resto de las peroxirredoxinas, la PRDX5 exhibe la distribución subcelular más amplia, encontrándose en la mitocondria, peroxisomas, citoplasma y en algunos tipos celulares se encuentra incluso en el núcleo. De acuerdo con el estudio de las peroxirredoxinas 2-Cys atípicas, se estima que los niveles de la PRDX5 en los tejidos, también oscila entre 0.2 y 1.3 $\mu\text{g}/\text{mg}$ [68, 69]. Además, se ha encontrado que en ratones que carecen de la expresión de PRDX1, hay una sobreexpresión de PRDX5 en núcleo y citoplasma como mecanismo compensatorio para controlar el aumento de ROS [70].

Inicialmente, la PRDX5 se describió como una proteína de unión a DNA capaz de suprimir la

transcripción dependiente de la RNA polimerasa III de los retrotransposones Alu [71]. Posteriormente, se investigó su efecto citoprotector antioxidante tras caracterizarse como una peroxidasa debido a su presencia en mitocondrias y peroxisomas, las dos principales fuentes de ROS en las células [72].

Al igual que el resto de las peroxirredoxinas, la PRDX5 cataliza la reducción de H_2O_2 , peróxidos orgánicos y $ONOO^-$; sin embargo, la PRDX5 tiene una eficiencia distinta para cada una de estas ROS. La constante de reacción de la PRDX5 con el $ONOO^-$ y otros hidroperóxidos orgánicos se encuentra en el rango de 10^6 - 10^7 $M^{-1} s^{-1}$. Por otra parte, reacciona más lentamente con el H_2O_2 (10^5 $M^{-1} s^{-1}$) [73].

La actividad enzimática de las peroxirredoxinas se ve afectada por las modificaciones postraduccionales que experimentan al ser oxidadas, por lo que, como se muestra en la Figura 4, pueden ser inactivadas de manera transitoria (al encontrarse en forma de ácido sulfínico), o de forma permanente al hiperoxidarse (en forma de ácido sulfónico). Se ha propuesto que las peroxirredoxinas 2-Cys típicas son más susceptibles a la hiperoxidación debido a que adyacente a su CysP, en su extremo C-terminal, se encuentra un motivo YF (tirosina Y y fenilalanina F) que interactúa con un motivo GGLG (Glicina G, Leucina L) en un bucle. Se cree que estas características estructurales generan pausa cinética en la formación de los enlaces disulfuro intermoleculares, lo que lleva a la susceptibilidad de una nueva reacción de oxidación en la CysP [54, 61, 74].

Se ha demostrado que la PRDX5 ejerce un efecto protector en varios tipos celulares, incluyendo las neuronas [75, 76]. La PRDX5 muestra no solo una actividad neuroprotectora, sino también antiinflamatoria. Se ha observado que su sobreexpresión disminuye la

producción de mediadores proinflamatorios como IL-6, IL-1 β y TNF- α [77]. Sin embargo, comparado con otras especies, el cerebro humano tiene una expresión baja de peroxirredoxinas [78, 79]. Por otra parte, en ratones se ha observado un patrón descendente rostro-caudal en la expresión de la PRDX5, siendo difícil de detectar en zonas posteriores como el mesencéfalo [80].

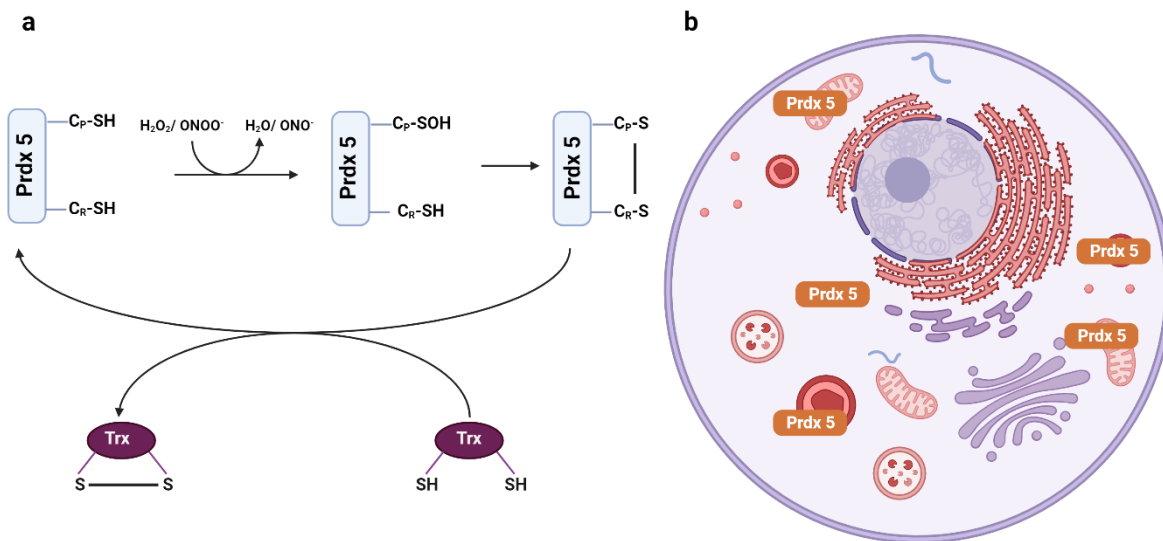


Figura 6. Ciclo catalítico y localización subcelular de la PRDX5. a) Esquema representativo del ciclo catalítico de la PRDX5 donde se muestra que tras la oxidación de su cisteína peroxidática, se forma un enlace disulfuro intramolecular que luego es reducido por acción de la tiorredoxina (Trx). b) Localización de la PRDX5 en los diferentes espacios celulares, encontrándola en mitocondria, citoplasma y peroxisomas.

La importancia de la expresión de la PRDX5 para la supervivencia neuronal ha sido previamente analizada en el contexto de algunas enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, donde se observó que al inhibir la expresión de esta enzima

en neuronas hipocampales se aumentó la apoptosis inducida por glutamato [81]. Por otra parte, se ha observado que su silenciamiento usando un RNA de interferencia, provoca que las neuronas dopaminérgicas sean sensibles a la muerte mediada por distintas neurotoxinas [82]. También se ha reportado que la deficiencia de PRDX5 exacerba la muerte neuronal inducida por sobrecarga de hierro en el hipocampo de ratón [83].

De la misma forma que juega un papel crucial en la homeostasis redox de las neuronas, la PRDX5 es importante para la supervivencia de las células de la glía, en donde se ha reportado que su sobreexpresión en peroxisomas y citoplasma tiene una función citoprotectora contra el estrés oxidativo inducido por H₂O₂ [83].

PARAQUAT COMO MODELO EXPERIMENTAL DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

La exposición ocupacional de los trabajadores agrícolas a ciertos pesticidas y fungicidas ha sido asociada al desarrollo de la EP [84].

El paraquat (PQ) (dicloruro de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilo) es un herbicida de nitrógeno cuaternario del tipo bipiridilo. Fue descubierto en la década de 1950 y comenzó a utilizarse en agricultura en 1962 [85]. Sin embargo, fue hasta hace relativamente poco tiempo que se realizaron estudios epidemiológicos donde la EP se asoció positivamente con dos grupos de pesticidas definidos por mecanismos implicados experimentalmente: aquellos que afectan la función mitocondrial y aquellos que aumentan el EO, siendo el PQ el más usado [86].

El PQ, intracelularmente, actúa como un compuesto del ciclo redox. La toxina experimenta una reducción de un electrón para formar un radical libre, que luego reacciona con el oxígeno molecular para formar O₂^{·-}. Este radical de oxígeno puede dismutarse para formar

H₂O₂, que en presencia de Fe⁺⁺ formará radicales altamente reactivos y tóxicos como el OH· [87], o reaccionar con otras especies reactivas de nitrógeno como el óxido nítrico (NO) formando ONOO⁻ [88]. Además, el peroxinitrito causa una inhibición irreversible de la cadena respiratoria mitocondrial [89] y desencadena la apoptosis [90].

Por otra parte, se han observado cambios epigenéticos provocados por el PQ en modelos celulares de degeneración dopaminérgica, principalmente acetilación de histonas [91]. Por otra parte, se ha descrito que en presencia de PQ aumenta la expresión de NADPH oxidasa 1 (Nox1), llevando a un aumento en la generación de anión superóxido [92].

El uso de los modelos de la EP inducidos por toxinas ha sido de gran ayuda en la comprensión de los mecanismos moleculares que llevan a la enfermedad. El uso de neurotoxinas es particularmente preferido, ya que pueden reproducir la muerte neuronal selectiva tanto *in vitro* como *in vivo* [93].

Se ha demostrado de manera experimental que el PQ produce cambios subcelulares relacionados con la EP como lo son: un aumento en la producción de las ERO, agregados proteicos de α -sinucleína y subsecuente formación de cuerpos de Lewy, lo que ocasiona el cuadro clínico característico de la EP [94].

JUSTIFICACIÓN

Las peroxirredoxinas integran una familia de proteínas antioxidantes que catalizan la reducción de peróxido de hidrógeno, peróxido de alquilo y peroxinitrito, y se distribuyen en diversos compartimentos celulares. La inactivación de las peroxirredoxinas por hiperoxidación incrementa el estrés oxidativo, provocando la oxidación de lípidos, proteínas y ADN. El principal organelo que genera estrés oxidativo es la mitocondria, y su disfunción aumenta el estrés oxidativo, el cual se disemina al citoplasma. Se ha demostrado en diversos modelos y muestras *post mortem* de pacientes con la enfermedad de Parkinson que el estrés oxidativo está involucrado en el desarrollo de la enfermedad.

Por lo tanto, las peroxirredoxinas son candidatos idóneos para reestablecer la homeostasis redox, sobre todo la PRDX5 que se expresa tanto en la mitocondria como en el citoplasma, y por ello consideramos de importancia el evaluar el efecto de la sobreexpresión de esta PRDX sobre el estrés oxidativo y la muerte celular en un modelo de la enfermedad de Parkinson *in vitro*. Los hallazgos derivados de este estudio permitirán establecer si la sobreexpresión de la PRDX5 tiene un potencial terapéutico contra esta enfermedad.

OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto de la sobreexpresión de la PRDX5 en un modelo celular de la enfermedad de Parkinson.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analizar el estatus de las peroxirredoxinas 2-Cys típicas en un modelo celular de la enfermedad de Parkinson.
2. Evaluar el efecto antioxidante de la sobreexpresión de PRDX5 en un modelo celular de EP.
3. Evaluar el efecto de la sobreexpresión de PRDX5 sobre la muerte de las células dopaminérgicas en un modelo celular de la EP.

MATERIAL Y EQUIPO

Línea celular

- SH-SY5Y (ATCC ® CRL-2266 TM); aislada de biopsia de médula ósea de neuroblastoma metastásico.
- HEK-293T (ATC ® CRL-1573 TM); aislada de riñón humano embrionario.

Cultivo celular

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

Anticuerpos

- Anticuerpo anti-PRDX-SO3 (Abcam, ab16830)
- Anticuerpo β -actina (SIGMA-ALDRICH, A5060)
- Anticuerpo anti-conejo (Santa Cruz Biotechnology, sc-2004)
- Anticuerpo fluorescente anti-conejo (Abcam Goat pAb to Rb IgG Alexa Fluor 488, Ab150077)
- Anticuerpo anti PRDX1 (Abcam, ab109498)
- Anticuerpo anti PRDX2 (Abcam, ab109367)
- Anticuerpo anti PRDX3 (Abcam, ab128953)

- Anticuerpo anti PRDX4 (Abcam, ab184167)
- Anticuerpo anti PRDX5 (Abcam, ab180587)

Reactivos

- Pierce TM BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Rockford, USA)
- VECTASHIELD® MOUNTING MEDIUM with DAPI Vector Laboratories H-1200
- Tritón X-100 (Sigma-Aldrich)
- Tween 20 (Sigma- Aldrich)
- N, N, N', N'- Tetrametiletilendiamina (TEMED) (Sigma-Aldrich)
- Coctel inhibidor de proteasas y fosfatasas (Halt Protease Inhibitor Cocktail, Thermo Scientific 78430)
- Acrilamida-bisacrilamida 40% (Bio-Rad)
- PQ (Acros Organics 227320010; Fulkar 36541)
- Dihidroetidio DHE (Life Technologies TM)
- Kit de SuperSignal TM West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific INC)
- Suero de caballo (16050130 Gibco)
- Kit Muse Annexin V & Dead Cell (Millipore, MCH100105)
- Protein Carbonyl Assay Kit Western Blot (ab178020)
- Rojo Ponceau S (Sigma-Aldrich)

Soluciones

- Buffer de lisis celular RIPA 1X (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, SDS 0.1%, Tritón X-100 0.25%)

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

Material

- Pipetas serológicas de 20 ml, 10 ml y 5 ml (Corning)
- Cajas de cultivo celular 75 cm y 25 cm (Corning / Nest)
- Criotubos de 2 ml (Corning)
- Laminillas de 8 pozos (Chamber Slide TM Lab-TekTM 177402)
- Platos de 60 mm (Corning 430166)
- Placas de 6 pozos (Corning 3335)
- Placas de 96 pozos (Corning)

- Viales de 2 ml, 1.7 ml y 0.65 ml
- Tubos de 50 ml y 15 ml (Falcon)
- Membrana de Polifluoruro de Vinilideno PVDF (GVS North América)
- Membrana de nitrocelulosa (Amersham Protran TM)

Equipo

- Micropipetas de 1000 μ l, 200 μ l, 20 μ l y 10 μ l
- Pipetor
- Campana de Seguridad nivel II
- Microscopio invertido
- Fuente de poder ENDURO (Labnet)
- Cámara vertical de electroforesis (Bio-Rad)
- Báscula analítica (AND)
- Vórtex (Daigger)
- Incubadora de ambiente húmedo con inyección de CO₂ (Thermo)
- Cámara de transferencia semihúmeda (Bio-Rad)
- Cámara de transferencia húmeda (Mini Trans-Blot Electrophoretic transfer Cell Bio-Rad)
- Escáner de quimioluminiscencia para western blot (LI-COR)
- Centrífuga (Sigma 1 -15 K)
- Microcentrífuga refrigerada (Sigma 3-15K)
- Incubadora Orbital SHAKER (MRC)
- Fluorómetro (BioTek instruments Flx800TB)

- Ultrasonic Processor Fisher Scientific 505
- Microscopio de fluorescencia Leica
- Cámara adaptada Nikon Eclipse 50 i
- Muse Cell Analyzer (Millipore, 0500-3115)

MÉTODOS

Cultivo celular

Para el modelo celular de la enfermedad de Parkinson se usó la línea celular dopaminérgica de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Las células se cultivaron en medio DMEM/F12 suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor, 100 unidades/ml de penicilina-estreptomicina, en una incubadora de ambiente húmedo a 37°C con inyección de 5% de CO₂. Las células fueron tratadas con PQ 0.5 mM por 24 h (para los ensayos de estrés oxidativo) o 48 h (para los ensayos de muerte celular).

Western blot

Las células se sembraron en platos de 60 mm a una densidad de 5x10⁵ células/placa. Tras 24 h de tratamiento, fueron cosechadas usando Tripsina EDTA. Posterior a esto se centrifugaron a 300 g, 4°C por 5 minutos. El pellet celular se resuspendió para su lisis con buffer RIPA del inglés radio immunoprecipitation assay (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, SDS 0.1%, Tritón X-100 0.25%) con inhibidores de proteasas y fosfatasa. Se sometió a sonicación por 30 s a 20 Hz y se llevó a la centrífuga por 15 minutos a 13,000 rpm y 4°C. Se colectó el sobrenadante y se descartó la pastilla con los restos celulares. Se cuantificó la

proteína usando el Kit Pierce™ BCA Proteína Assay, siguiendo las indicaciones del fabricante.

Cantidades iguales de proteínas (50 µg) se separaron por electroforesis SDS-PAGE en condiciones no reductoras (en ausencia de DTT y/o β-mercaptoetanol), en geles de poliacrilamida al 15%, para posteriormente ser transferidas a una membrana de PVDF, usando la cámara de transferencia semihúmeda. Una vez transferidas las proteínas, la membrana se bloqueó con leche libre de grasa al 10%, y se incubó con los anticuerpos primarios diluidos 1:1000 anti-Prdx1, anti-Prdx2, anti-Prdx3 y anti-Prdx4, así como anti-β-actina diluido 1:2000, este último como control de carga, por 12 h a 4°C en agitación suave. Posteriormente, se realizaron 3 lavados de 15 minutos cada uno con buffer TBST 1X y se incubaron con anticuerpo secundario anti-conejo diluido 1:1000, a temperatura ambiente por 2 h en agitación suave. Se realizaron 3 lavados más, de 15 minutos cada uno, al concluir el tiempo de incubación y la membrana se reveló usando el Kit SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados se fotodocumentaron con el escáner C-Digit y el análisis para densitometría se realizó con el Software Image J, normalizando los valores a 1 con el grupo control y la banda de la β-actina (la cual se usó como control de carga).

Eastern blotting redox

La hiperoxidación de las peroxirredoxinas 2-Cys típicas puede ser monitoreada a través de una modificación del método descrito previamente. Se adicionó N-etilmaleimida (NEM) (100 mM) al buffer de lisis RIPA, que es un agente alquilante de los grupos tiol, así como

catalasa (1 mg/ml), que es una enzima que cataliza la descomposición del H_2O_2 , con el fin de evitar que se continúe la oxidación de las peroxirredoxinas posterior a la extracción de proteínas. En ausencia de alquilación, las peroxirredoxinas reducidas inmediatamente se dimerizan después de la lisis celular. Sin embargo, las peroxirredoxinas hiperoxidadas son incapaces de dimerizarse y permanecen como monómeros (Figura 7).

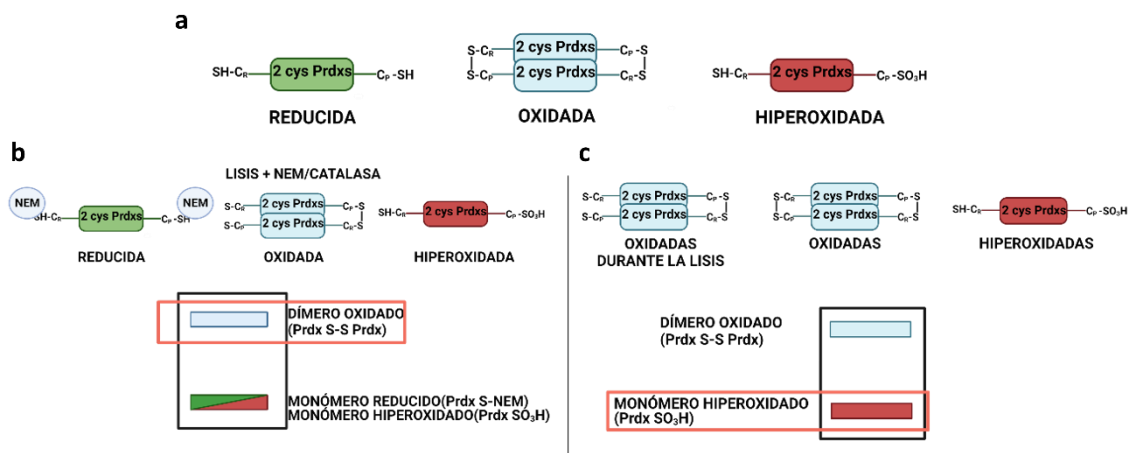


Figura 7.- Esquema representativo de los estados de oxidación de las peroxirredoxinas 2-Cys típicas. a) Las peroxirredoxinas 2-Cys típicas se pueden encontrar en su forma reducida, oxidada o hiperoxidada. b) Se utilizó NEM para la alquilación rápida de las cisteínas reducidas y la catalasa para eliminar los rastros de H_2O_2 y prevenir una mayor oxidación y dimerización durante la preparación de la muestra. Los monómeros representan las formas reducidas e hiperoxidadas de las peroxirredoxinas, mientras que los dímeros corresponden a las peroxirredoxinas oxidadas. c) El protocolo convencional de extracción de proteínas sin el agente alquilante y catalasa, muestra las peroxirredoxinas hiperoxidadas como monómeros.

Propagación y titulación de adenovirus

El constructo del adenovirus se llevó a cabo amplificando el cDNA de la PRDX5 humana (hPRXD5), gentilmente proporcionado por el Dr. Knoops [95], y mediante el sistema Ad-Easy, introduciendo un sitio de restricción *NheI* en el oligonucleótido sentido y un sitio de restricción *XhoI* en el antisentido. El producto de PCR se clonó en un plásmido pUC19

digerido por la enzima de restricción *Sma*I. Luego, este plásmido se digirió con *Nhe*I y *Xho*I para obtener el fragmento de la hPrx5 que se subclonó en el plásmido pShuttle para digerirlo después con *Bgl*II (un sitio cohesivo compatible con *Nhe*I) y *Xho*I. A continuación, se realizó una recombinación homóloga entre el plásmido pShuttle-hPrx5 y el plásmido Ad-Easy en la cepa de *E. coli* JM109, lo que permitió obtener el constructo de ADN Ad-PRDX5. Se utilizó un adenovirus vacío (Ad-Empty) como control. La obtención de partículas virales se llevó a cabo en células HEK-293T. Se sembraron las células en frascos de cultivo T75, y se incubaron en un ambiente húmedo a 37°C con inyección de 5% de CO₂; una vez que alcanzaron el 90% de confluencia fueron infectadas con las partículas virales, y se monitoreó viabilidad y morfología en un microscopio invertido. Las células se cosecharon cuando el 90% de ellas se había desprendido (aproximadamente entre el día 4 a 5 postinfección). La suspensión celular se transfirió a un tubo de 50 ml y se sometió a ciclos de congelación-descongelación (pasando de -80°C por 10 minutos a 37°C por 10 minutos más). Posteriormente, se centrifugaron a velocidad máxima por 12 minutos, y se colectó el sobrenadante en un frasco nuevo, para la posterior titulación de los adenovirus. Se hicieron alícuotas de 1 ml y se almacenaron a -80°C.

Para la titulación del virus se sembraron 1×10^4 células por pozo en una placa de 96 pozos. Una vez adheridas las células, se realizaron diluciones seriadas del sobrenadante conteniendo las partículas virales. Se descartaron las 2 diluciones más altas y con los 8 restantes se infectaron las células, 4 pozos de cada fila por cada dilución. Se incubaron en un ambiente húmedo a 37°C con inyección de 5% de CO₂ y se monitoreó viabilidad y adherencia con el microscopio invertido. A los 7 días postinfección se identificaron las

diluciones que causaron efecto citopático y se hizo el cálculo para la titulación de los adenovirus, dando un valor de 2.5 para cada pozo con efecto citopático en cada una de las diluciones (Figura 8).

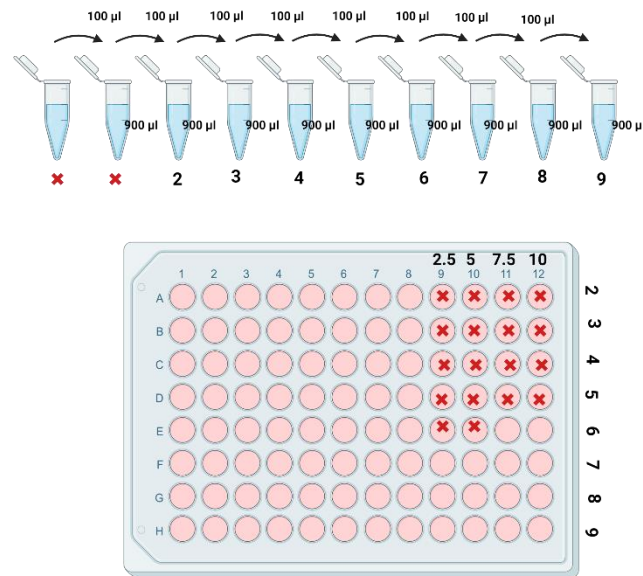


Figura 8. Esquema representativo de la titulación de los adenovirus. Se muestra la manera en la que se hicieron las diluciones seriadas a partir de una alícuota del sobrenadante obtenido de la infección de las células HEK-293T. En la placa de 96 pozos se ejemplifica que se encontró efecto citopático en 2 de los 4 pozos en la fila 6, dando una titulación de 5×10^6 .

Transducción adenoviral

Una vez titulado nuestro stock de ambos adenovirus (Ad-Empty y Ad-PRDX5), se evaluó el efecto de diferentes MOI sobre la expresión de PRDX5. Para esto, en platos de 60 mm se sembraron las células SH-SY5Y a una densidad de 5×10^5 células/placa, una vez adheridas las células, se administraron MOI crecientes de cada uno de los adenovirus, teniendo concentración MOI de 0, 1, 3 y 5. Tras 24 h postinfección se observaron las células al microscopio para evaluar de manera rápida su estado de viabilidad. Posteriormente, se

cosecharon las células y se siguió el mismo protocolo descrito en el apartado de “western blot”, bajo condiciones reductoras (SDS-PAGE estándar, con DTT en el buffer de carga). Se incubaron las membranas con anticuerpo anti-PRDX5 diluido 1:1000, y anti- β -actina diluido 1:2000, este último como control de carga, por 12 h a 4°C en agitación suave. Posteriormente, se realizaron 3 lavados de 15 minutos cada uno con buffer TBST 1X y se incubaron con anticuerpo secundario anti-conejo diluido 1:1000 a temperatura ambiente por 2 h en agitación suave. Se realizaron 3 lavados más, de 15 minutos cada uno, al concluir el tiempo de incubación, la membrana se reveló usando el Kit SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate. Los resultados se fotodocumentaron con el escáner C-Digit y el análisis de densitometría se realizó con el Software Image J, normalizando los valores a 1 con el grupo de MOI 0, y con la banda de la β -actina (control de carga).

Detección de ROS mitocondrial con sondas fluorescentes

Se sembraron 1.5×10^4 células por pozo en laminillas tratadas de 8 pozos (Chamber Slide™ Lab-Tek™ 177402), 24 h después, una vez que se encontraban adheridas, se llevó a cabo la infección con los adenovirus Ad-Empty y Ad-PRDX5 en medio libre de FBS. Después de 6 h de infección, se adicionó medio fresco y se adicionó PQ a 0.5 mM. Tras 24 h se añadió MitoTracker™ Red-CM-H2xRos (Invitrogen M7513) y se incubó por 30 minutos a 37°C en oscuridad. Posteriormente, las células fueron fijadas con PFA 4%, lavadas con PBS, bloqueadas con PBS-Tritón 0.1%, e incubadas con el anticuerpo anti-Prdx5 diluido 1:1000, toda la noche a 4°C. Las células fueron lavadas e incubadas con un anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 anti-conejo por 1 h a temperatura ambiente. Luego, las células se lavaron

por 5 minutos, 2 veces y las laminillas se montaron usando el medio de montaje VECTASHIELD® MOUNTING MEDIUM with DAPI (Vector Laboratories H-1200). Los resultados obtenidos se observaron con el microscopio de epifluorescencia (Microscopio Leica), y la foto-documentación se realizó con la cámara Nikon Eclipse 50i y el software Qimage Pro-7. El análisis de intensidad de fluorescencia de las micrografías se realizó con el Software ImageJ.

Detección del ROS citoplasmático con sondas fluorescentes

Las células se sembraron en platos de 60 mm a una densidad de 5×10^5 células/placa. Una vez que las células se encontraban adheridas, se llevó a cabo la infección con los adenovirus Ad-Empty y Ad-PRDX5 en medio libre de FBS durante 6 h. Después se adicionó medio fresco en presencia o ausencia de PQ a 0.5 mM. Tras 24 h del tratamiento con PQ, las células fueron incubadas con dihidroetidio (DHE, #D11347, Thermo Fisher Scientific) a 10 μ M por 15 minutos (espectro de excitación-emisión 490-570 nm). Posteriormente, las células fueron cosechadas usando tripsina, se centrifugaron a 300 g, 4°C por 5 minutos y se lavaron y resuspendieron en PBS 1X. Luego las células fueron evaluadas por citometría de flujo con el Muse Cell Analyzer (Millipore Sigma, Burlington, MA).

Detección de carbonilación de proteínas por western blot

El análisis de las proteínas carboniladas fue realizado con el Protein Carbonyl Assay Kit Western Blot siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células se sembraron en platos de 60 mm (Corning 430166) a una densidad de 5×10^5 células/placa. Una vez que las células

se encontraban adheridas, se llevó a cabo la infección con los adenovirus Ad-Empty y Ad-PRDX5 en medio libre de FBS durante 6 h. Posteriormente, se adicionó medio fresco con PQ a 0.5 mM. Tras 24 h del tratamiento con PQ, las células fueron cosechadas usando tripsina, se centrifugaron a 300 g, 4°C por 5 minutos, fueron lavadas en 2 ocasiones con PBS 1X y se resuspendió el pellet en buffer de extracción 1X. Se hizo una incubación en hielo por 20 minutos, y se centrifugó a 18,000 g por 20 minutos a 4°C. Los sobrenadantes se transfirieron a tubos limpios y se descartaron los pellets. Se cuantificó la proteína usando usando el Kit Pierce™ BCA Protein Assay, siguiendo las indicaciones del fabricante. Se tomaron 45 µg de la proteína total y se derivatizaron usando dinitrofenilhidrazina (DNPH) al 1%, después, sin desnaturalizarse, se separaron en un gel SDS de poliacrilamida al 10%. Las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa en cámara húmeda. Previo al bloqueo se realizó la tinción con rojo Ponceau S cada membrana (ver metodología de tinción con rojo Ponceau S). Posteriormente, se bloqueó la membrana en buffer de bloqueo (leche al 5% en PBS-Tween) por 1 h a temperatura ambiente. Se incubó la membrana con un anticuerpo primario anti-DNP (provisto en el kit) 1X diluido en buffer de bloqueo a 4° C toda la noche en agitación suave. Se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBS-T 1X y se incubó la membrana con un anticuerpo secundario conjugado con HRP 1X (diluido en buffer de bloqueo), por una h a temperatura ambiente. Se lavó 3 veces, 5 minutos cada vez en PBS 1X. La membrana se reveló usando el Kit SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados se fotodocumentaron con el escáner C-Digit y el análisis para densitometría se realizó con el Software Image J. Para la densitometría, se normalizó a 1 con el patrón obtenido en el control de infección

(Ad-Empty).

Tinción con rojo Ponceau S

Posterior a la transferencia y previo al bloqueo de la membrana se llevó a cabo la tinción con rojo Ponceau S. Se tiñó la membrana con una solución de rojo Ponceau 0.1% en ácido acético 1% durante 5 minutos, a temperatura ambiente en agitación suave. Se retiró la solución de rojo Ponceau S y se hizo un lavado rápido con agua destilada. Posteriormente, se realizaron dos lavados de 10 minutos cada uno, con solución de ácido acético al 1% para desteñir la membrana.

Detección de células en apoptosis

Las células se sembraron en platos de 60 mm (Corning 430166) a una densidad de 5×10^5 células/placa. Una vez que las células se encontraban adheridas, se llevó a cabo la infección con los adenovirus Ad-Empty y Ad-PRDX5 en medio libre de FBS por 6 h. Posterior a la infección, se adicionó medio fresco con PQ a 0.5 mM. Después de 48 h se evaluó la apoptosis usando el Muse Annexin V & Dead Cell Kit siguiendo las indicaciones del fabricante, y se analizó en el Muse Cell Analyzer. Este ensayo se basa en la afinidad de la anexina V para unirse a la fosfatidilserina, un marcador de apoptosis, y la captación de la 7-amino actinomicina D (7AAD), que es un marcador de la pérdida de la integridad de la membrana. Los datos se representan como porcentajes de viabilidad y de células en apoptosis (Figura 9).

- Células vivas: anexina V (-) 7 AAD (-) (cuadrante inferior izquierdo).

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

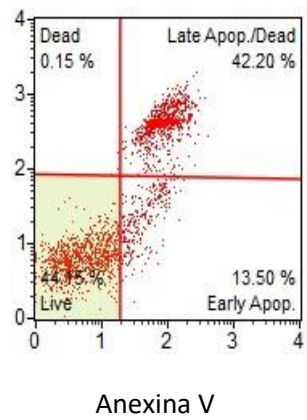


Figura 9. Plot representativo de citometría de flujo con Anexina V y 7 AAD

RESULTADOS

El estado hiperoxidado de las peroxirredoxinas 2-Cys típicas refleja la compartimentalización de las especies reactivas de oxígeno en respuesta a PQ

En nuestro equipo de trabajo demostramos previamente que el PQ induce la hiperoxidación de las peroxirredoxinas 2-Cys típicas [96]. Sin embargo, la detección de la forma sulfonilada de las peroxirredoxinas se realizó con un anticuerpo que no puede discriminar entre las 4 PRDX de esta subfamilia. Es por esto que en el presente trabajo quisimos determinar el estado de óxido-reducción de cada una de ellas. Para esto usamos un protocolo específico de eastern blotting (Figura 8), que nos permitió distinguir las formas oxidadas e hiperoxidadas impidiendo la oxidación adicional que pudiera ocurrir durante la extracción de proteínas. De manera que monitoreamos las formas monoméricas y diméricas de cada PRDX. Los pasos importantes de este protocolo fueron la alquilación rápida de las cisteínas que se encontraban en estado reducido y la eliminación de rastros de H_2O_2 por acción de la catalasa, esto con el fin de evitar una oxidación adicional durante la preparación de las muestras. Mediante este protocolo cuantificamos la banda de mayor peso molecular (dímeros), que corresponde a las peroxirredoxinas oxidadas, ya que la banda de los monómeros representa a las formas tanto reducidas como hiperoxidadas. Por otra parte, bajo el protocolo convencional de extracción sin el agente alquilante y la catalasa, la banda que corresponde a los monómeros incluye sólo aquellas peroxirredoxinas hiperoxidadas durante el tratamiento con PQ.

Con esto logramos observar que el PQ genera un aumento significativo en la oxidación de las peroxirredoxinas, particularmente la PRDX1, PRDX3 y PRDX4. Además, de manera

interesante se encontró la hiperoxidación significativa sólo de la PRDX1 y PRDX4, mientras que las PRDX2 y Prdx3 fueron propensas a la oxidación.

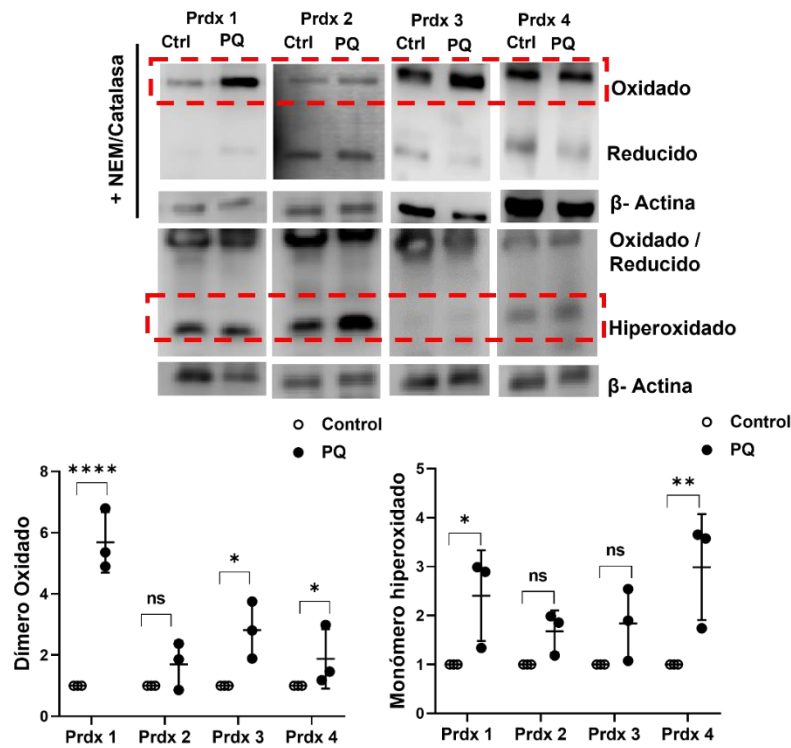


Figura 10. Efecto del PQ sobre la óxido-reducción de las peroxirredoxinas 2-Cys típicas. Con el protocolo de alquilación de NEM, pudimos monitorizar el estado de oxidación de las Prdx, encontrando que las PRDX1 y PRDX4 están en su forma hiperoxidada, mientras que la PRDX2 y PRDX3 son propensas a la oxidación.

La sobreexpresión de peroxirredoxina 5 disminuye la producción de especies reactivas de oxígeno en el citoplasma y las mitocondrias mediado por PQ.

La PRDX5 tiene una amplia distribución subcelular, en las células humanas se encuentra en el citoplasma, mitocondrias, peroxisoma y núcleo [67]. Además, tiene una actividad

moduladora sobre el estrés del retículo endoplásmico [83]. Es sabido que el PQ entra en un ciclo redox perjudicial interfiriendo con la cadena de transporte de electrones al inhibir la reducción de NAD⁺ a NADH en la mitocondria, mientras que en el citoplasma se genera una oxidación rápida y prolongada del NADPH. Como resultado de estas reacciones, el NADPH se consume, lo que resulta en una disminución en la proporción de NADPH/NADP⁺ [97], y un aumento de la generación de ROS mitocondriales [98], los cuales se propagan al citoplasma.

Por lo tanto, se evaluó el efecto de la sobreexpresión de PRDX5 mediada por un vector adenoviral Ad-PRDX5, bajo el promotor CMV (Figura 11a), sobre la toxicidad inducida por PQ en células SH-SY5Y, las cuales tienen un fenotipo dopaminérgico.

Para esto, evaluamos primero la sobreexpresión de PRDX5 infectando las células a diferentes multiplicidades de infección (MOI), usando también el control de infección Ad-Empty (Figura 11b). Encontramos que la expresión de PRDX5 basal en las células SH-SY5Y no se ve afectada con la infección del vector vacío. Sin embargo, al ser infectadas con Ad-PRDX5, la expresión de la enzima aumenta de manera dosis-dependiente (Figura 11c). Para los experimentos posteriores se utilizó una MOI de 5. La sobreexpresión de PRDX5 se corroboró por inmunofluorescencia (Figura 11 d y e).

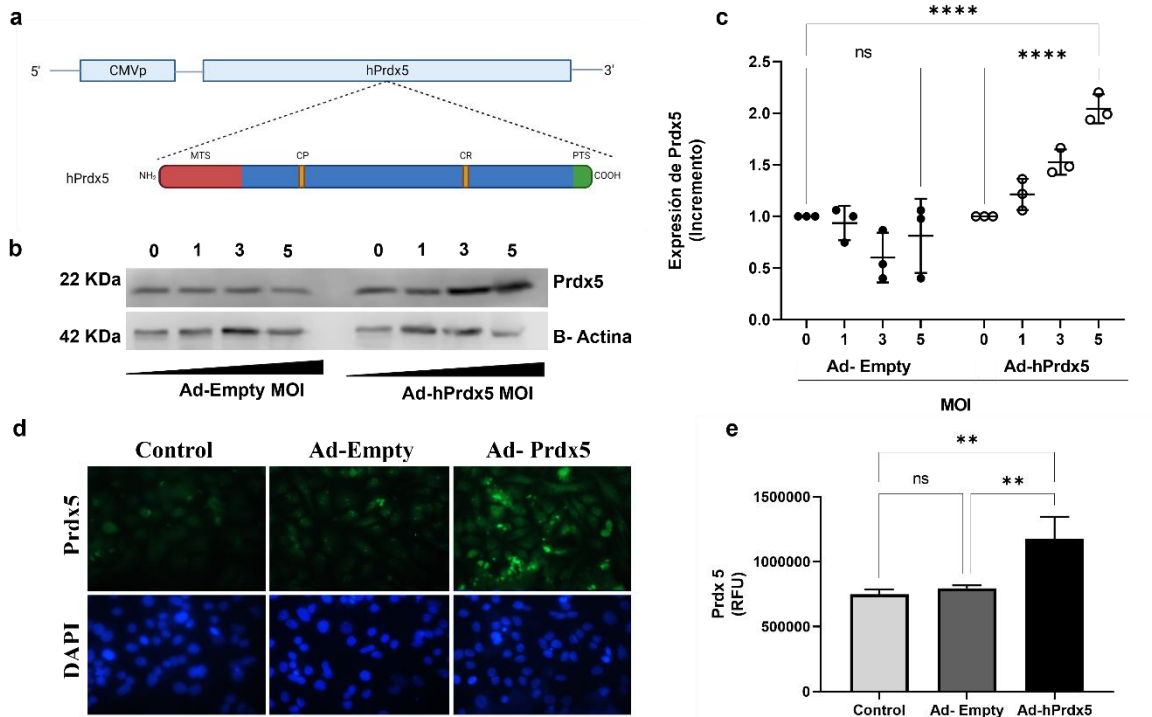


Figura 11. Sobreexpresión de PRDX5 en la línea celular SH-SY5Y. a) La sobreexpresión de PRDX5 humana fue mediada por un vector adenoviral, bajo el promotor de citomegalovirus (CMVp). b) Western blot representativo de la expresión de PRDX5. La línea celular SH-SY5Y fue infectada a las MOI indicadas con el Ad-Empty o Ad-PRDX5, c) encontrándose un aumento en la expresión de PRDX5 estadísticamente significativo para la MOI de 5. d) La sobreexpresión de PRDX5 fue corroborada por inmunofluorescencia (e) RFU (Unidades relativas de fluorescencia). **P= 0.0041, ****P<0.0001.

Después de establecer la dosis de infección con los adenovirus, se evaluó el estrés oxidativo mitocondrial por inmunofluorescencia utilizando una sonda fluorescente específica para ROS mitocondriales, la sonda Mito-Tracker TM Red-CM-H2xROS. Observamos que el aumento de ROS mitocondriales inducidas por el PQ, se redujo al sobreexpresar la PRDX5, llegando a los niveles basales de ROS que muestra el cultivo que no recibió ningún tratamiento. Mientras que el adenovirus vacío (Ad-Empty) no tuvo ningún efecto sobre el estrés oxidativo (Figura 12).

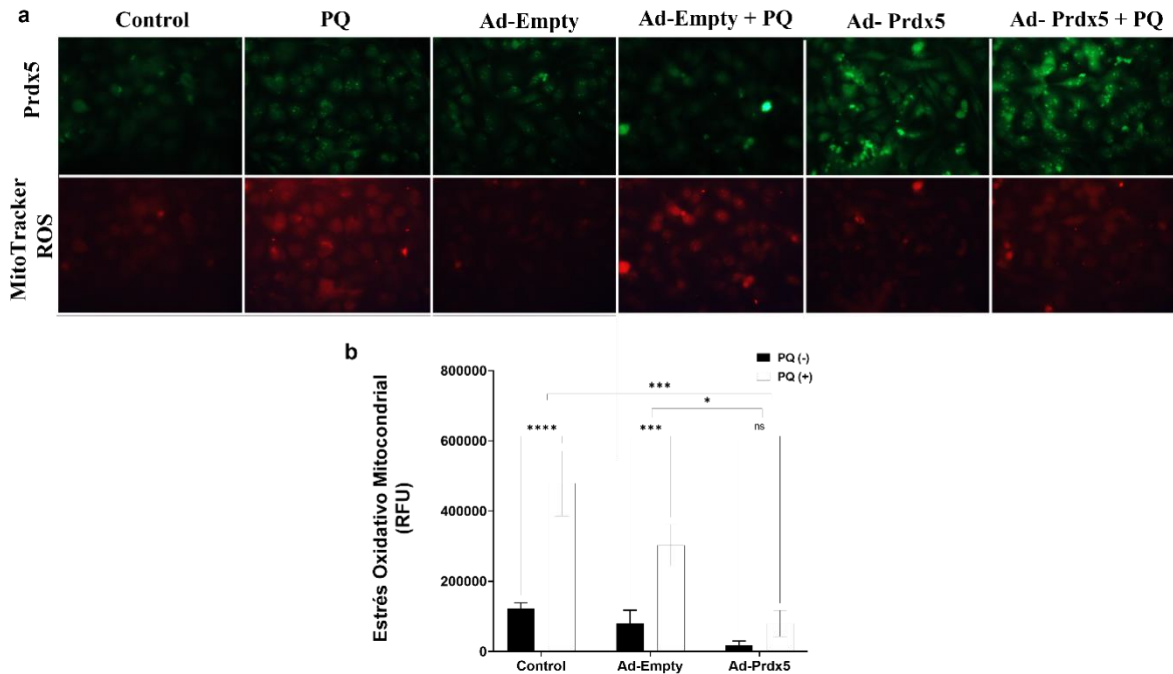


Figura 12. La sobreexpresión de PRDX5 disminuye el estrés oxidativo mitocondrial inducido por PQ. a) Imágenes representativas de inmunofluorescencia, dónde en el canal verde se observa la expresión de la PRDX5 basal (control), misma que no se modifica con el control de infección (Ad-Empty), pero es evidentemente mayor tras la infección con Ad-PRDX5. En el canal rojo se muestra la señal de la sonda fluorescente MitoTracker ROS, específica para especies reactivas de oxígeno mitocondriales. Observamos un aumento de la señal en las células tratadas con PQ, mientras que al sobreexpresar la PRDX5 esta señal se reduce en intensidad comparable con el control sin tratamiento. b) Análisis estadístico de 3 repeticiones independientes. ***P=0.0005, ****P <0.0001. RFU (Unidades relativas de fluorescencia)

Posterior a esto evaluamos el estatus oxidativo del citoplasma, mediante citometría de flujo, usando la sonda fluorescente DHE. Observamos que la sobreexpresión de la PRDX5 disminuyó de manera eficaz las ROS citoplasmáticas generadas por el tratamiento con PQ, llevándolas a niveles basales como los que muestra el control sin tratamiento (Figura 13 a y b). En conjunto, estos resultados indican que la sobreexpresión de PRDX5 protege contra las ROS inducidas por PQ en diferentes compartimentos subcelulares.

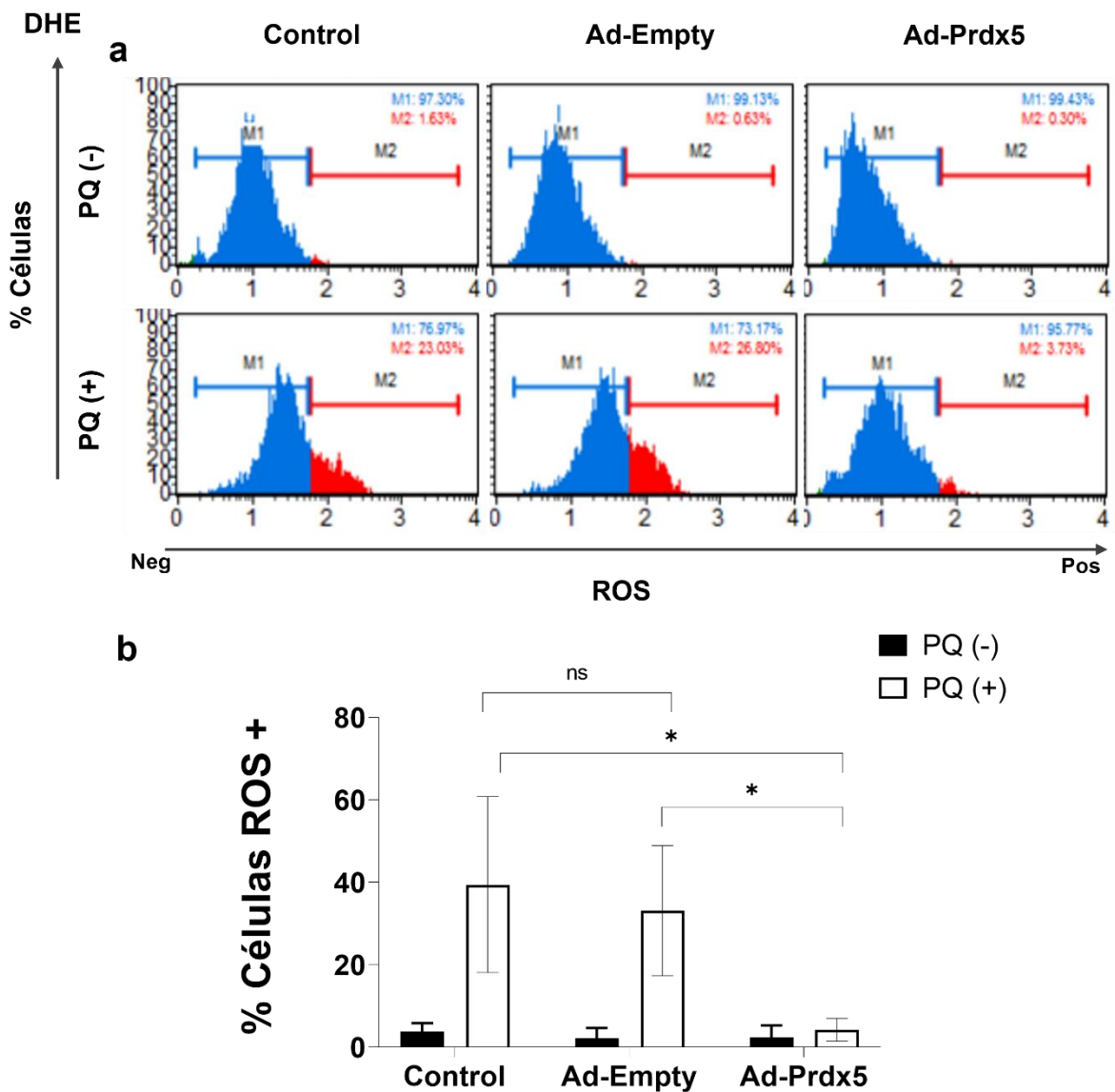


Figura 13. La sobreexpresión de PRDX5 disminuye el estrés oxidativo citoplasmático mediado por PQ. a) Histograma representativo de 3 experimentos independientes donde se observa el porcentaje de células positivas para DHE (con niveles elevados de ROS en el citoplasma). Se puede observar como en presencia del PQ la población celular se desplaza a la derecha, aumentando el % de células positivas para ROS, mientras que al sobreexpresar la PRDX5, incluso en presencia del PQ, el % de células positivas se mantiene en niveles comparables con el control sin tratamiento. b) Análisis estadístico que muestra un aumento en más del 20% de células positivas para DHE, y al sobreexpresar PRDX5 se mantiene en niveles comparables con los basales. * $P < 0.05$.

La sobreexpresión de Prdx5 previene la carbonilación irreversible de las proteínas inducida por PQ

La carbonilación es una modificación postraduccional de las proteínas, causada por la oxidación de las cadenas laterales de los residuos aminoacídicos, principalmente lisina, arginina, prolina y treonina ya que tienen propiedades nucleofílicas, lo que significa que tienen electrones disponibles para reaccionar con aldehídos insaturados y otros compuestos oxidantes [99]. Esta reacción conlleva la adición de un grupo funcional carbonilo (C=O) a los residuos específicos, lo que puede influir en las características bioquímicas de las proteínas, incluyendo su actividad enzimática, la capacidad de unión al ADN de los factores de transcripción y la susceptibilidad a la degradación proteolítica [100]. Con el fin de evaluar el efecto de la sobreexpresión de Prdx5 sobre la oxidación irreversible de las proteínas, analizamos la carbonilación de las proteínas en presencia de PQ. Para esto se aplicó la metodología de derivatización utilizando 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), que reacciona con los grupos carbonilo de las cadenas laterales de aminoácidos para formar hidrazonas estables de 2,4-dinitrofenil (DNP), las cuales fueron detectadas por western blot con un anticuerpo específico contra DNP.

Observamos que la exposición a PQ aumenta los niveles de proteínas carboniladas, pero al sobreexpresar Prdx5 se previenen estas modificaciones oxidativas, manteniendo los niveles en proporciones similares a los grupos que no fueron expuestos a PQ (Figura 14).

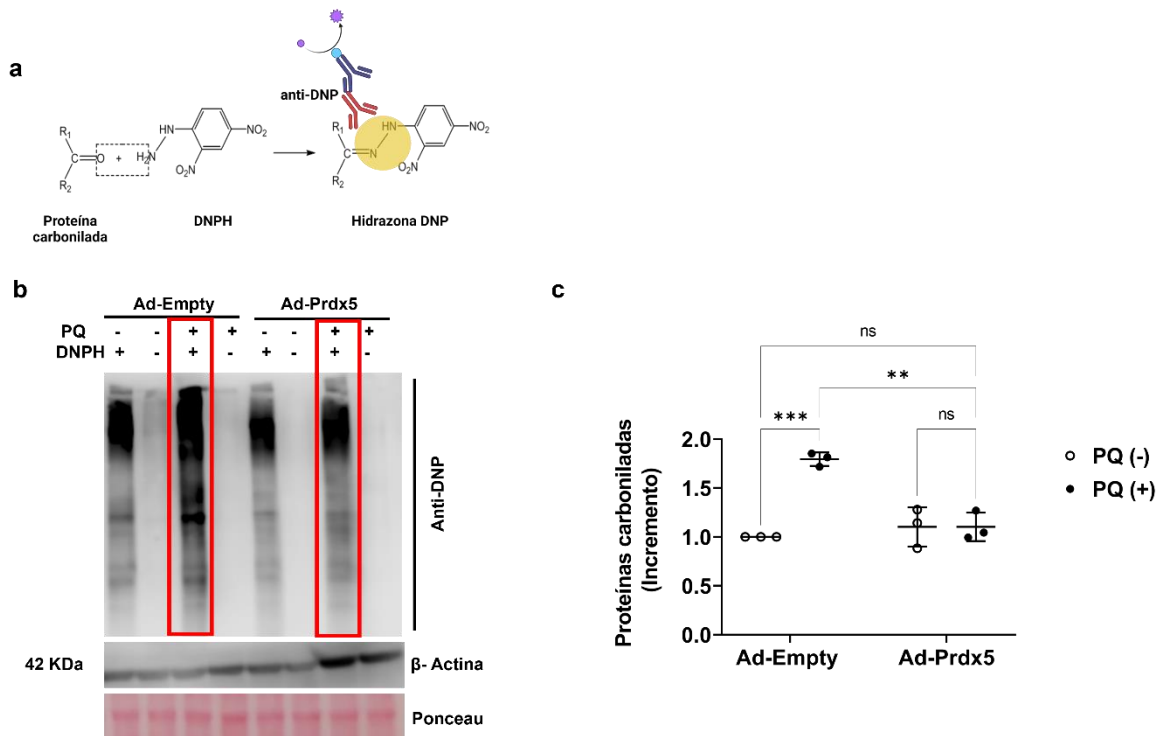


Figura 14. La carbonilación de las proteínas inducida por PQ es prevenida por la sobreexpresión de Prdx5.
 a) Esquema representativo de la reacción de derivatización de los grupos carbonilo con DNPH y la formación de DNP para la posterior detección con anticuerpos. b) Eastern blot de las proteínas carboniladas donde se observa que el control de infección (Ad-Empty) no tiene ningún efecto sobre la oxidación de las proteínas mediada por PQ, mientras que Ad-PRDX5 lleva a una eficiente protección de las proteínas.

La sobreexpresión de la Peroxirredoxina 5 previene la muerte de las células dopaminérgicas mediada por PQ

Se ha reportado que la inhibición en la expresión de PRDX5 aumenta la muerte celular mediada por ciertas neurotoxinas como rotenona y 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP⁺). Debido a lo anterior se evaluó si la sobreexpresión de Prdx5 tendría un efecto opuesto, es decir, si era capaz de proteger a las células de la apoptosis mediada por PQ. Para evaluarlo, se monitorearon los cambios morfológicos del cultivo celular usando un microscopio invertido. El control sin tratamiento, así como el control de infección (Ad-Empty) y Ad-PRDX5 mantuvieron las características normales del cultivo en cuanto a adherencia y morfología ahusada con prolongaciones citoplasmáticas, además de encontrarse una pequeña proporción de células redondeadas flotantes que corresponden a la muerte basal del cultivo en 48 h. Tras el tratamiento con PQ la mayor parte de la población celular se encontró redondeada y había perdido la adherencia; sin embargo, al sobreexpresar PRDX5, el porcentaje de células flotantes disminuyó y se preservó la morfología típica de las células (Figura 15 a).

Posteriormente, evaluamos la apoptosis mediante citometría de flujo con anexina V, la cual tiene afinidad por la fosfatidilserina que se transloca desde la cara interna a la externa de la membrana citoplasmática en los estadios tempranos de la apoptosis. La pérdida de la integridad de la membrana fue evaluada usando la sonda fluorescente 7AAD. Pudimos observar que el PQ aumenta hasta en un 73% la muerte celular, comparado con los niveles basales. Esta proporción de muerte disminuyó drásticamente al sobreexpresar la PRDX5 (Figura 15 b y c). Con esto mostramos que el sobreexpresar la PRDX5 ejerce un efecto

protector sobre la apoptosis inducida por PQ (Figura 15 d).

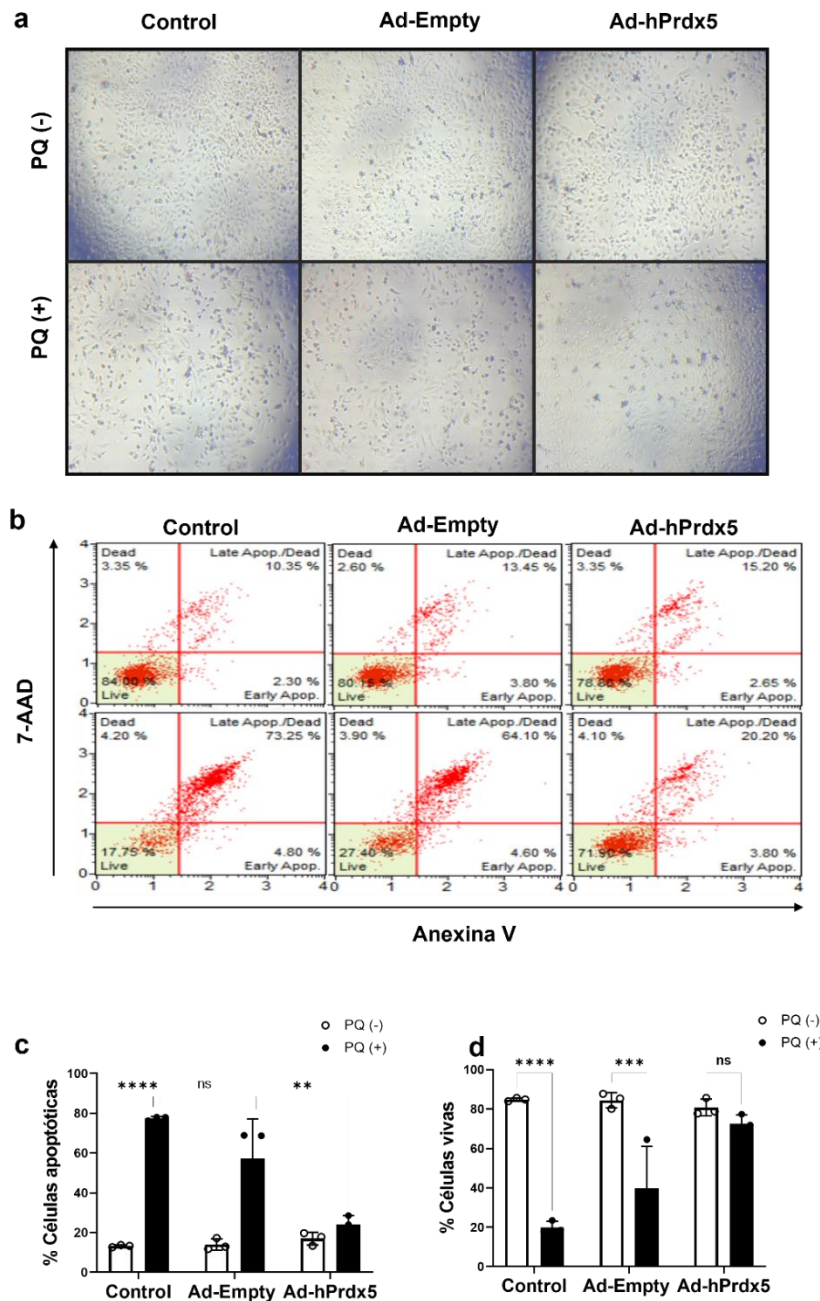


Figura 15. La sobreexpresión de PRDX5 disminuye la apoptosis mediada por PQ. a) Microfotografías de células SH-SY5Y. Se observa su forma ahusada con prolongaciones citoplasmáticas y adheridas al frasco de cultivo. El PQ aumenta la proporción de células redondeadas y flotantes que corresponden a las células muertas. Al sobreexpresar PRDX5, dicha proporción disminuye. b) citometría de flujo de anexina V y 7AAD. La externalización de la fosfatidilserina durante la apoptosis temprana se representa como un aumento de células anexina V (+) /7-AAD (-) (cuadrante inferior derecho). La apoptosis tardía fue medida en el cuadrante superior derecho como anexina V (+) /7-AAD (+). Se muestran gráficas representativas de tres experimentos independientes. c) Se muestra el porcentaje de células apoptóticas y d) la viabilidad celular. *p < 0.05

DISCUSIÓN

La EP es uno de los desórdenes neurodegenerativos con mayor incidencia y prevalencia en el mundo [101], y se estima que en las próximas décadas su frecuencia se vea aumentada conforme se incremente la expectativa de vida [5]. Las terapias actuales para el tratamiento de la EP solo son paliativas y no han mostrado tener un efecto modificador de la enfermedad [102]. Es por lo que consideramos importante el desarrollo de nuevos tratamientos que puedan curar o enlentecer la progresión de la enfermedad.

El estrés oxidativo es uno de los principales agentes etiológicos que subyacen a la muerte de las neuronas dopaminérgicas en la EP [28]. En estados de desequilibrio redox, las proteínas, los lípidos y el ADN son los principales blancos de las ROS [103].

Para evitar este desequilibrio, la célula cuenta con un sistema de defensa antioxidante, que consta de enzimas, moléculas o iones capaces de prevenir o retrasar la oxidación [104].

Dentro del sistema enzimático encontramos, entre otros, a las peroxirredoxinas, las cuales catalizan la reducción de hidroperóxidos, peróxidos orgánicos y peroxinitrito [105]. En condiciones de estrés oxidativo severo y prolongado, las peroxirredoxinas sufren hiperoxidación que lleva a su inactivación, lo que perpetúa el estatus oxidativo de la célula [106]. Se ha reportado, en modelos experimentales de la EP que, en presencia de algunas neurotoxinas, las peroxirredoxinas sufren modificaciones oxidativas [96, 107, 108].

Nosotros observamos un patrón específico de oxidación e hiperoxidación de las PRDX 2-Cys típicas en respuesta al PQ, donde las PRDX1, PRDX3 y PRDX4 se encontraron oxidadas, mientras que PRDX1 y PRDX4 fueron hiperoxidadas, sugiriendo un estado de estrés

oxidativo más severo en el citoplasma y en el retículo endoplásmico (RE). Entre las proteínas que modifican su expresión de manera significativa en el cerebro humano en respuesta al estrés oxidativo durante la EP se encuentra la PRDX2 que se ha demostrado estar incrementada en la SN en muestras postmortem de estos pacientes[109]. Por otra parte, se han encontrado también niveles anormales de Prdx1, encontrándose también aumentada, y la PRDX3 disminuida, en otras enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer [110, 111]. Sin embargo, aunque se evaluó su expresión, el estatus redox de estas PRDX no ha sido analizado y aunque se encontró una mayor expresión de las PRDX1 y PRDX2, estas podrían estar hiperoxidadas e inactivas. Nuestros resultados demostraron que la PRDX1 fue oxidada e hiperoxidada de manera significativa en respuesta al PQ, mientras que la PRDX2 mostró una tendencia a dichas modificaciones oxidativas. Además, la PRDX3 se encontró oxidada pero aun con la capacidad de ser reducida.

El estrés del RE se ha asociado a diferentes enfermedades neurodegenerativas, ya que las neuronas tienen una particular sensibilidad al mal plegamiento de las proteínas [112]. Se ha demostrado que el PQ induce la muerte celular desencadenada por estrés del RE [113], lo que es consistente con nuestros resultados, en los que el estrés del RE es evidente al encontrarse la PRDX4, cuya única localización subcelular es este organelo, en un estado de hiperoxidación. Esto es respaldado por evidencia que muestra que cada compartimento tiene una susceptibilidad redox diferente dependiendo del tipo celular y la función del organelo [98, 114].

El uso de cipermetrina, otro pesticida sintético, se ha asociado también a la neurodegeneración nigroestriatal por disfunción mitocondrial [115]. Además, se ha

demostrado que disminuye la expresión de PRDX3, además de aumentar los niveles de α -sinucleína y la oxidación de lípidos [116]. Asimismo, con el PQ, la principal fuente de ROS en el cerebro es la mitocondria [117], y este estrés oxidativo mitocondrial precede al aumento de las ROS en el citoplasma [98].

Se ha reportado que la eliminación del gen *PRDX5* en modelos animales, aumenta el estrés oxidativo mitocondrial [118]. Dado que la PRDX5 se expresa en múltiples compartimentos dentro de la célula, incluyendo peroxisomas, mitocondria y citoplasma, la sobre expresamos y evaluamos si era capaz de contrarrestar el estrés oxidativo inducido por PQ. Nuestros resultados mostraron que la PRDX5 protege eficientemente a la célula del estrés oxidativo mitocondrial y citoplasmático, reduciéndolo a niveles comparables con los del control sin tratamiento. Estos resultados se correlacionan con otros estudios, donde la sobreexpresión de PRDX5 protege a las neuronas del daño inducido por β - amiloide, hierro y glutamato [119-121].

La carbonilación de las proteínas es una de las modificaciones oxidativas postraduccionales más perjudiciales e irreversibles y es considerada una característica distintiva de las enfermedades relacionadas al estrés oxidativo [122]. Esta modificación es importante no solo como biomarcador de estrés oxidativo, también se ha demostrado que afecta la estructura y función de las proteínas, y participa en la etiología y el progreso de enfermedades y cambios relacionados con la edad [123]. Es por eso que evaluamos el estado de carbonilación inducido por PQ, encontrando que eleva los niveles de las proteínas con este cambio oxidativo, y al sobreexpresar la PRDX5, se obtuvo un efecto protector frente a la carbonilación. Nuestros hallazgos respaldan investigaciones previas que

demuestran que cuando la PRDX5 está disfuncional o ausente, las células dopaminérgicas muestran una mayor susceptibilidad a la carbonilación de proteínas en respuesta al estrés oxidativo causado por otras neurotoxinas como MPP⁺ [124].

Al igual que el resto de las peroxirredoxinas, la PRDX5 no solo tiene actividad como peroxidasa, sino que también actúa como proteína de señalización en diversas vías celulares [125]. Se ha reportado que está involucrada en la dinámica del Ca⁺ mitocondrial en respuesta a la neurotoxina MPP⁺, inductora de parkinsonismo [126]. En muchas enfermedades neurodegenerativas, la alteración en la homeostasis del calcio lleva a una activación persistente patológica de las calpaínas [127]. Previamente demostramos que el PQ induce muerte neuronal por ambas vías, dependiente e independiente de calpaínas [96]. En este trabajo encontramos de manera interesante que la sobreexpresión de PRDX5 confiere una protección total contra la muerte de las células dopaminérgicas mediada por PQ.

CONCLUSIÓN

Con este trabajo demostramos que el PQ induce la compartimentalización de ROS a nivel subcelular, reflejada por el patrón de hiperoxidación de las peroxirredoxinas 2-Cys típicas. La sobreexpresión de PRDX5 disminuyó eficazmente las ROS mitocondriales y citoplasmáticos mediados por el PQ, además de evitar los cambios oxidativos irreversibles de la carbonilación sobre las proteínas, lo que resultó en una protección general de las células contra la muerte celular inducida por PQ. Es importante resaltar que, al tener PRDX5 una actividad de eliminación más amplia, una distribución subcelular y una alta capacidad

para restaurar el equilibrio redox, representa un enfoque atractivo para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, lo que justifica la realización de estudios experimentales adicionales en animales para su posterior aplicación en ensayos clínicos.

REFERENCIAS

1. Parkinson, J., *An essay on the shaking palsy*. 1817. J Neuropsychiatry Clin Neurosci, 2002. **14**(2): p. 223-36; discussion 222.
2. Jain, S., *Multi-organ autonomic dysfunction in Parkinson disease*. Parkinsonism Relat Disord, 2011. **17**(2): p. 77-83.
3. Barone, P., *Neurotransmission in Parkinson's disease: beyond dopamine*. Eur J Neurol, 2010. **17**(3): p. 364-76.
4. de Rijk, M.C., et al., *Prevalence of Parkinson's disease in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group*. Neurology, 2000. **54**(11 Suppl 5): p. S21-3.
5. Dorsey, E.R., et al., *The Emerging Evidence of the Parkinson Pandemic*. J Parkinsons Dis, 2018. **8**(s1): p. S3-S8.
6. Marras, C., et al., *Prevalence of Parkinson's disease across North America*. NPJ Parkinsons Dis, 2018. **4**: p. 21.
7. Martínez-Ramírez, D., et al., *[Incidence and geographic distribution of Parkinson's disease in Mexico]*. Salud Publica Mex, 2020. **62**(6): p. 873-875.
8. Espay, A.J., et al., *Current Concepts in Diagnosis and Treatment of Functional Neurological Disorders*. JAMA Neurol, 2018. **75**(9): p. 1132-1141.
9. Goetz, C.G., *The history of Parkinson's disease: early clinical descriptions and neurological therapies*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2011. **1**(1): p. a008862.
10. Khoo, T.K., et al., *The spectrum of nonmotor symptoms in early Parkinson disease*. Neurology, 2013. **80**(3): p. 276-81.
11. Duncan, G.W., et al., *Health-related quality of life in early Parkinson's disease: the impact of nonmotor symptoms*. Mov Disord, 2014. **29**(2): p. 195-202.
12. Marras, C. and A. Lang, *Parkinson's disease subtypes: lost in translation?* J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2013. **84**(4): p. 409-15.
13. Wong, J.C., et al., *Risk factors for probable REM sleep behavior disorder: A community-based study*. Neurology, 2016. **86**(14): p. 1306-1312.
14. Ponsen, M.M., et al., *Olfactory testing combined with dopamine transporter imaging as a method to detect prodromal Parkinson's disease*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2010. **81**(4): p. 396-9.
15. Ascherio, A. and M.A. Schwarzschild, *The epidemiology of Parkinson's disease: risk factors and prevention*. Lancet Neurol, 2016. **15**(12): p. 1257-1272.

16. Tambasco, N., et al., *A53T in a parkinsonian family: a clinical update of the SNCA phenotypes*. J Neural Transm (Vienna), 2016. **123**(11): p. 1301-1307.
17. Schulte, C. and T. Gasser, *Genetic basis of Parkinson's disease: inheritance, penetrance, and expression*. Appl Clin Genet, 2011. **4**: p. 67-80.
18. Castilla-Cortázar, I., et al., *Is insulin-like growth factor-1 involved in Parkinson's disease development?* J Transl Med, 2020. **18**(1): p. 70.
19. Burton, E.J., et al., *Cerebral atrophy in Parkinson's disease with and without dementia: a comparison with Alzheimer's disease, dementia with Lewy bodies and controls*. Brain, 2004. **127**(Pt 4): p. 791-800.
20. Braak, H., et al., *Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease*. Neurobiol Aging, 2003. **24**(2): p. 197-211.
21. Wichmann, T. and M.R. Delong, *Anatomy and physiology of the basal ganglia: relevance to Parkinson's disease and related disorders*. Handb Clin Neurol, 2007. **83**: p. 1-18.
22. Grealish, S., et al., *The A9 dopamine neuron component in grafts of ventral mesencephalon is an important determinant for recovery of motor function in a rat model of Parkinson's disease*. Brain, 2010. **133**(Pt 2): p. 482-95.
23. Yu, B., et al., *HybraPD atlas: Towards precise subcortical nuclei segmentation using multimodality medical images in patients with Parkinson disease*. Hum Brain Mapp, 2021. **42**(13): p. 4399-4421.
24. Kalia, L.V., J.M. Brotchie, and S.H. Fox, *Novel nondopaminergic targets for motor features of Parkinson's disease: review of recent trials*. Mov Disord, 2013. **28**(2): p. 131-44.
25. Spillantini, M.G., et al., *Alpha-synuclein in Lewy bodies*. Nature, 1997. **388**(6645): p. 839-40.
26. Xia, Q., et al., *Proteomic identification of novel proteins associated with Lewy bodies*. Front Biosci, 2008. **13**: p. 3850-6.
27. Beach, T.G., et al., *Multi-organ distribution of phosphorylated alpha-synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders*. Acta Neuropathol, 2010. **119**(6): p. 689-702.
28. Malkus, K.A., E. Tsika, and H. Ischiropoulos, *Oxidative modifications, mitochondrial dysfunction, and impaired protein degradation in Parkinson's disease: how neurons are lost in the Bermuda triangle*. Mol Neurodegener, 2009. **4**: p. 24.
29. Sies, H., *Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine*. Redox Biol, 2015. **4**: p. 180-3.
30. Birben, E., et al., *Oxidative stress and antioxidant defense*. World Allergy Organ J, 2012. **5**(1): p. 9-19.
31. Halliwell, B., *Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life*. Plant Physiol, 2006. **141**(2): p. 312-22.
32. Muller, F.L., Y. Liu, and H. Van Remmen, *Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane*. J Biol Chem, 2004. **279**(47): p. 49064-73.
33. Okumoto, K., et al., *Peroxisome: Metabolic Functions and Biogenesis*. Adv Exp Med Biol, 2020. **1299**: p. 3-17.
34. Stone, J.R. and S. Yang, *Hydrogen peroxide: a signaling messenger*. Antioxid Redox Signal, 2006. **8**(3-4): p. 243-70.
35. Chatgililoglu, C., et al., *Free radicals in chemical biology: from chemical behavior to biomarker development*. J Vis Exp, 2013(74).
36. Halliwell, B. and M. Whiteman, *Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?* Br J Pharmacol, 2004. **142**(2): p. 231-55.
37. Patten, D.A., et al., *Reactive oxygen species: stuck in the middle of neurodegeneration*. J

- Alzheimers Dis, 2010. **20 Suppl 2**: p. S357-67.
38. Pimentel, C., et al., *Oxidative stress in Alzheimer's and Parkinson's diseases: insights from the yeast Saccharomyces cerevisiae*. Oxid Med Cell Longev, 2012. **2012**: p. 132146.
 39. Danielson, S.R. and J.K. Andersen, *Oxidative and nitrative protein modifications in Parkinson's disease*. Free Radic Biol Med, 2008. **44**(10): p. 1787-94.
 40. Zhang, J., et al., *ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling*. Oxid Med Cell Longev, 2016. **2016**: p. 4350965.
 41. McCord, J.M., *The evolution of free radicals and oxidative stress*. Am J Med, 2000. **108**(8): p. 652-9.
 42. Shulman, R.G., et al., *Energetic basis of brain activity: implications for neuroimaging*. Trends Neurosci, 2004. **27**(8): p. 489-95.
 43. Su, B., et al., *Oxidative stress signaling in Alzheimer's disease*. Curr Alzheimer Res, 2008. **5**(6): p. 525-32.
 44. Halliwell, B., *Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?* J Neurochem, 2006. **97**(6): p. 1634-58.
 45. Reed, T.T., *Lipid peroxidation and neurodegenerative disease*. Free Radic Biol Med, 2011. **51**(7): p. 1302-19.
 46. Ramalingam, M. and S.J. Kim, *Reactive oxygen/nitrogen species and their functional correlations in neurodegenerative diseases*. J Neural Transm (Vienna), 2012. **119**(8): p. 891-910.
 47. Klein, J.A. and S.L. Ackerman, *Oxidative stress, cell cycle, and neurodegeneration*. J Clin Invest, 2003. **111**(6): p. 785-93.
 48. Du, H. and S.S. Yan, *Mitochondrial medicine for neurodegenerative diseases*. Int J Biochem Cell Biol, 2010. **42**(5): p. 560-72.
 49. Kannan, K. and S.K. Jain, *Oxidative stress and apoptosis*. Pathophysiology, 2000. **7**(3): p. 153-163.
 50. Ruszkiewicz, J. and J. Albrecht, *Changes in the mitochondrial antioxidant systems in neurodegenerative diseases and acute brain disorders*. Neurochem Int, 2015. **88**: p. 66-72.
 51. Jenner, P. and C.W. Olanow, *The pathogenesis of cell death in Parkinson's disease*. Neurology, 2006. **66**(10 Suppl 4): p. S24-36.
 52. Giasson, B.I., et al., *Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective alpha-synuclein nitration in synucleinopathy lesions*. Science, 2000. **290**(5493): p. 985-9.
 53. Kim, K., et al., *The isolation and purification of a specific "protector" protein which inhibits enzyme inactivation by a thiol/Fe(III)/O₂ mixed-function oxidation system*. J Biol Chem, 1988. **263**(10): p. 4704-11.
 54. Wood, Z.A., L.B. Poole, and P.A. Karplus, *Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling*. Science, 2003. **300**(5619): p. 650-3.
 55. Adimora, N.J., D.P. Jones, and M.L. Kemp, *A model of redox kinetics implicates the thiol proteome in cellular hydrogen peroxide responses*. Antioxid Redox Signal, 2010. **13**(6): p. 731-43.
 56. Karplus, P.A. and A. Hall, *Structural survey of the peroxiredoxins*. Subcell Biochem, 2007. **44**: p. 41-60.
 57. Chae, H.Z., T.B. Uhm, and S.G. Rhee, *Dimerization of thiol-specific antioxidant and the essential role of cysteine 47*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(15): p. 7022-6.
 58. Rhee, S.G., H.Z. Chae, and K. Kim, *Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling*. Free Radic Biol Med, 2005. **38**(12): p. 1543-52.
 59. Radyuk, S.N., R.S. Sohal, and W.C. Orr, *Thioredoxin peroxidases can foster cytoprotection or*

- cell death in response to different stressors: over- and under-expression of thioredoxin peroxidase in *Drosophila* cells. *Biochem J*, 2003. **371**(Pt 3): p. 743-52.
60. Rhee, S.G., et al., *Sulfiredoxin, the cysteine sulfinic acid reductase specific to 2-Cys peroxiredoxin: its discovery, mechanism of action, and biological significance*. *Kidney Int Suppl*, 2007(106): p. S3-8.
 61. Wood, Z.A., et al., *Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins*. *Trends Biochem Sci*, 2003. **28**(1): p. 32-40.
 62. Poynton, R.A., et al., *Kinetic analysis of structural influences on the susceptibility of peroxiredoxins 2 and 3 to hyperoxidation*. *Biochem J*, 2016. **473**(4): p. 411-21.
 63. Jin, M.H., et al., *Characterization of neural cell types expressing peroxiredoxins in mouse brain*. *Neurosci Lett*, 2005. **381**(3): p. 252-7.
 64. Egler, R.A., et al., *Regulation of reactive oxygen species, DNA damage, and c-Myc function by peroxiredoxin 1*. *Oncogene*, 2005. **24**(54): p. 8038-50.
 65. Leyens, G., I. Donnay, and B. Knoop, *Cloning of bovine peroxiredoxins-gene expression in bovine tissues and amino acid sequence comparison with rat, mouse and primate peroxiredoxins*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2003. **136**(4): p. 943-55.
 66. Nguyễn-Nhu, N.T., et al., *Human peroxiredoxin 5 gene organization, initial characterization of its promoter and identification of alternative forms of mRNA*. *Biochim Biophys Acta*, 2007. **1769**(7-8): p. 472-83.
 67. Knoop, B., et al., *Cloning and characterization of AOEB166, a novel mammalian antioxidant enzyme of the peroxiredoxin family*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(43): p. 30451-8.
 68. Qian, Y., et al., *Implication of Differential Peroxiredoxin 4 Expression with Age in Ovaries of Mouse and Human for Ovarian Aging*. *Curr Mol Med*, 2016. **16**(3): p. 243-51.
 69. Ito, R., et al., *Measurement of peroxiredoxin-4 serum levels in rat tissue and its use as a potential marker for hepatic disease*. *Mol Med Rep*, 2012. **6**(2): p. 379-84.
 70. Graves, J.A., et al., *Regulation of reactive oxygen species homeostasis by peroxiredoxins and c-Myc*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(10): p. 6520-9.
 71. Kropotov, A., et al., *A novel human DNA-binding protein with sequence similarity to a subfamily of redox proteins which is able to repress RNA-polymerase-III-driven transcription of the Alu-family retroposons in vitro*. *Eur J Biochem*, 1999. **260**(2): p. 336-46.
 72. Knoop, B., et al., *Peroxiredoxin 5: structure, mechanism, and function of the mammalian atypical 2-Cys peroxiredoxin*. *Antioxid Redox Signal*, 2011. **15**(3): p. 817-29.
 73. Trujillo, M., et al., *Pre-steady state kinetic characterization of human peroxiredoxin 5: taking advantage of Trp84 fluorescence increase upon oxidation*. *Arch Biochem Biophys*, 2007. **467**(1): p. 95-106.
 74. Woo, H.A., et al., *Reduction of cysteine sulfinic acid by sulfiredoxin is specific to 2-cys peroxiredoxins*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(5): p. 3125-8.
 75. De Simoni, S., et al., *Mitochondrial peroxiredoxin-5 as potential modulator of mitochondria-ER crosstalk in MPP+-induced cell death*. *J Neurochem*, 2013. **125**(3): p. 473-85.
 76. Kim, B., et al., *Peroxiredoxin 5 prevents amyloid-beta oligomer-induced neuronal cell death by inhibiting ERK-Drp1-mediated mitochondrial fragmentation*. *Free Radic Biol Med*, 2016. **90**: p. 184-94.
 77. Park, J., et al., *Peroxiredoxin 5 (Prx5) decreases LPS-induced microglial activation through regulation of Ca*. *Free Radic Biol Med*, 2016. **99**: p. 392-404.
 78. Hanschmann, E.M., et al., *Thioredoxins, glutaredoxins, and peroxiredoxins--molecular mechanisms and health significance: from cofactors to antioxidants to redox signaling*. *Antioxid Redox Signal*, 2013. **19**(13): p. 1539-605.
 79. Dammeyer, P. and E.S. Arnér, *Human Protein Atlas of redox systems - what can be learnt?*

- Biochim Biophys Acta, 2011. **1810**(1): p. 111-38.
80. Goemaere, J. and B. Knoop, *Peroxiredoxin distribution in the mouse brain with emphasis on neuronal populations affected in neurodegenerative disorders*. J Comp Neurol, 2012. **520**(2): p. 258-80.
 81. Shen, G.N., et al., *Knockdown of peroxiredoxin V increases glutamate-induced apoptosis in HT22 hippocampal neuron cells*. Mol Med Rep, 2018. **17**(6): p. 7827-7834.
 82. Wang, M.J., et al., *Peroxiredoxin 5 Silencing Sensitizes Dopaminergic Neuronal Cells to Rotenone via DNA Damage-Triggered ATM/p53/PUMA Signaling-Mediated Apoptosis*. Cells, 2019. **9**(1).
 83. Lee, D.G., et al., *Peroxiredoxin 5 deficiency exacerbates iron overload-induced neuronal death via ER-mediated mitochondrial fission in mouse hippocampus*. Cell Death Dis, 2020. **11**(3): p. 204.
 84. Sturm, E.T., et al., *Risk Factors for Brain Health in Agricultural Work: A Systematic Review*. Int J Environ Res Public Health, 2022. **19**(6).
 85. Rappold, P.M., et al., *Paraquat neurotoxicity is mediated by the dopamine transporter and organic cation transporter-3*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(51): p. 20766-71.
 86. Tanner, C.M., et al., *Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease*. Environ Health Perspect, 2011. **119**(6): p. 866-72.
 87. Chandra, A., et al., *Paraquat poisoning*. BMJ Case Rep, 2021. **14**(11).
 88. Morán, J.M., et al., *Nitric oxide in paraquat-mediated toxicity: A review*. J Biochem Mol Toxicol, 2010. **24**(6): p. 402-9.
 89. Brown, G.C., *Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome c oxidase*. Biochim Biophys Acta, 2001. **1504**(1): p. 46-57.
 90. Ramdial, K., M.C. Franco, and A.G. Estevez, *Cellular mechanisms of peroxynitrite-induced neuronal death*. Brain Res Bull, 2017. **133**: p. 4-11.
 91. Song, C., et al., *Paraquat induces epigenetic changes by promoting histone acetylation in cell culture models of dopaminergic degeneration*. Neurotoxicology, 2011. **32**(5): p. 586-95.
 92. Cristóvão, A.C., et al., *The role of NADPH oxidase 1-derived reactive oxygen species in paraquat-mediated dopaminergic cell death*. Antioxid Redox Signal, 2009. **11**(9): p. 2105-18.
 93. Bové, J., et al., *Toxin-induced models of Parkinson's disease*. NeuroRx, 2005. **2**(3): p. 484-94.
 94. Dinis-Oliveira, R.J., et al., *Paraquat exposure as an etiological factor of Parkinson's disease*. Neurotoxicology, 2006. **27**(6): p. 1110-22.
 95. Banmeyer, I., et al., *Overexpression of human peroxiredoxin 5 in subcellular compartments of Chinese hamster ovary cells: effects on cytotoxicity and DNA damage caused by peroxides*. Free Radic Biol Med, 2004. **36**(1): p. 65-77.
 96. Ramirez-Moreno, M.J., et al., *Autophagy Stimulation Decreases Dopaminergic Neuronal Death Mediated by Oxidative Stress*. Mol Neurobiol, 2019. **56**(12): p. 8136-8156.
 97. Gray, J.P., et al., *Paraquat increases cyanide-insensitive respiration in murine lung epithelial cells by activating an NAD(P)H:paraquat oxidoreductase: identification of the enzyme as thioredoxin reductase*. J Biol Chem, 2007. **282**(11): p. 7939-49.
 98. Rodriguez-Rocha, H., et al., *Compartmentalized oxidative stress in dopaminergic cell death induced by pesticides and complex I inhibitors: distinct roles of superoxide anion and superoxide dismutases*. Free Radic Biol Med, 2013. **61**: p. 370-83.
 99. Weng, S.L., et al., *Investigation and identification of protein carbonylation sites based on position-specific amino acid composition and physicochemical features*. BMC Bioinformatics, 2017. **18**(Suppl 3): p. 66.
 100. Akagawa, M., *Protein carbonylation: molecular mechanisms, biological implications, and analytical approaches*. Free Radic Res, 2021. **55**(4): p. 307-320.

101. Tysnes, O.B. and A. Storstein, *Epidemiology of Parkinson's disease*. J Neural Transm (Vienna), 2017. **124**(8): p. 901-905.
102. Jagadeesan, A.J., et al., *Current trends in etiology, prognosis and therapeutic aspects of Parkinson's disease: a review*. Acta Biomed, 2017. **88**(3): p. 249-262.
103. Khan, Z. and S.A. Ali, *Oxidative stress-related biomarkers in Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis*. Iran J Neurol . 2018. **17**: p. 137-144.
104. Duarte-Jurado, A.P., et al., *Antioxidant Therapeutics in Parkinson's Disease: Current Challenges and Opportunities*. Antioxidants (Basel), 2021. **10**(3).
105. Hall, A., et al., *Structure-based insights into the catalytic power and conformational dexterity of peroxiredoxins*. Antioxid Redox Signal, 2011. **15**(3): p. 795-815.
106. Yang, K.S., et al., *Inactivation of human peroxiredoxin I during catalysis as the result of the oxidation of the catalytic site cysteine to cysteine-sulfinic acid*. J Biol Chem, 2002. **277**(41): p. 38029-36.
107. Garcia-Garcia, A., et al., *Thiol-redox signaling, dopaminergic cell death, and Parkinson's disease*. Antioxid Redox Signal, 2012. **17**(12): p. 1764-84.
108. Lee, Y.M., et al., *Oxidative modification of peroxiredoxin is associated with drug-induced apoptotic signaling in experimental models of Parkinson disease*. J Biol Chem, 2008. **283**(15): p. 9986-98.
109. Basso, M., et al., *Proteome analysis of human substantia nigra in Parkinson's disease*. Proteomics, 2004. **4**(12): p. 3943-52.
110. Kim, S.H., et al., *Protein levels of human peroxiredoxin subtypes in brains of patients with Alzheimer's disease and Down syndrome*. J Neural Transm Suppl, 2001(61): p. 223-35.
111. Krapfenbauer, K., et al., *Aberrant expression of peroxiredoxin subtypes in neurodegenerative disorders*. Brain Res, 2003. **967**(1-2): p. 152-60.
112. Colla, E., *Linking the Endoplasmic Reticulum to Parkinson's Disease and Alpha-Synucleinopathy*. Front Neurosci, 2019. **13**: p. 560.
113. Chinta, S.J., et al., *Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program in dopaminergic cells: effect of paraquat*. Neuromolecular Med, 2008. **10**(4): p. 333-42.
114. Kaludercic, N., S. Deshwal, and F. Di Lisa, *Reactive oxygen species and redox compartmentalization*. Front Physiol, 2014. **5**: p. 285.
115. Agrawal, S., et al., *Cypermethrin-induced nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration alters the mitochondrial function: a proteomics study*. Mol Neurobiol, 2015. **51**(2): p. 448-65.
116. Rajput, C., A. Sarkar, and M.P. Singh, *Involvement of Peroxiredoxin-3, Thioredoxin-2, and Protein Deglycase-1 in Cypermethrin-Induced Parkinsonism*. Mol Neurobiol, 2021. **58**(9): p. 4745-4757.
117. Castello, P.R., D.A. Drechsel, and M. Patel, *Mitochondria are a major source of paraquat-induced reactive oxygen species production in the brain*. J Biol Chem, 2007. **282**(19): p. 14186-93.
118. Lee, Y.J., *Knockout Mouse Models for Peroxiredoxins*. Antioxidants (Basel), 2020. **9**(2).
119. Kim, M.H., et al., *Comparison of the protective effect of cytosolic and mitochondrial Peroxiredoxin 5 against glutamate-induced neuronal cell death*. Redox Rep, 2021. **26**(1): p. 53-61.
120. Lee, D.G., et al., *Peroxiredoxin 5 prevents iron overload-induced neuronal death by inhibiting mitochondrial fragmentation and endoplasmic reticulum stress in mouse hippocampal HT-22 cells*. Int J Biochem Cell Biol, 2018. **102**: p. 10-19.
121. Park, J., et al., *Peroxiredoxin 5 Decreases Beta-Amyloid-Mediated Cyclin-Dependent Kinase 5 Activation Through Regulation of Ca*. Antioxid Redox Signal, 2017. **27**(11): p. 715-726.

122. Dalle-Donne, I., et al., *Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression*. J Cell Mol Med, 2006. **10**(2): p. 389-406.
123. Hasseldam, H., R.S. Rasmussen, and F.F. Johansen, *Oxidative damage and chemokine production dominate days before immune cell infiltration and EAE disease debut*. J Neuroinflammation, 2016. **13**(1): p. 246.
124. De Simoni, S., J. Goemaere, and B. Knoop, *Silencing of peroxiredoxin 3 and peroxiredoxin 5 reveals the role of mitochondrial peroxiredoxins in the protection of human neuroblastoma SH-SY5Y cells toward MPP+*. Neurosci Lett, 2008. **433**(3): p. 219-24.
125. Poncin, M.A., et al., *Role of the Redox State of Human Peroxiredoxin-5 on Its TLR4-Activating DAMP Function*. Antioxidants (Basel), 2021. **10**(12).
126. Davey, G.P. and J.P. Bolaños, *Peroxiredoxin 5 links mitochondrial redox signalling with calcium dynamics: impact on Parkinson's disease*. J Neurochem, 2013. **125**(3): p. 332-3.
127. Vosler, P.S., C.S. Brennan, and J. Chen, *Calpain-mediated signaling mechanisms in neuronal injury and neurodegeneration*. Mol Neurobiol, 2008. **38**(1): p. 78-100.



Peroxiredoxin 5 overexpression decreases oxidative stress and dopaminergic cell death mediated by paraquat

Ana Patricia Duarte-Jurado, María de Jesús Loera-Arias, Odila Saucedo-Cardenas, Roberto Montes de Oca-Luna, Humberto Rodríguez-Rocha^a, Aracely García-García^a

^aDepartamento de Histología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey 64460, Nuevo León, México

ARTICLE INFO

Keywords:
Reactive oxygen species
Antioxidant enzymes
Peroxiredoxins
Paraquat
Parkinson's disease

ABSTRACT

Peroxiredoxins (Prdxs) are thiol-dependent enzymes that scavenge peroxides. Previously, we found that Prdxs were hyperoxidized in a Parkinson's disease model induced by paraquat (PQ), which led to their inactivation, perpetuating reactive oxygen species (ROS) formation. Herein, we evaluated the redox state of the typical 2-Cys-Prx subgroup. We found that PQ induces ROS compartmentalization in different organelles, reflected by the 2-Cys-Prdx hyperoxidation pattern detected by redox eastern blotting. 2-Cys Prdxs are most vulnerable to hyperoxidation, while atypical 2-Cys Peroxiredoxin 5 (Prdx5) is resistant and is expressed in multiple organelles, such as mitochondria, peroxisomes, and cytoplasm. Therefore, we overexpressed human Prdx5 in the dopaminergic SH-SY-5Y cell line using the adenoviral vector Ad-hPrdx5. Prdx5 overexpression was confirmed by western blotting and immunofluorescence (IF) and effectively decreased PQ-mediated mitochondrial and cytoplasmic ROS assessed with a mitochondrial superoxide indicator and DHE through IF or flow cytometry. Decreased ROS mediated by Prdx5 in the main subcellular compartments led to overall cell protection against PQ-induced cell death, which was demonstrated by flow cytometry using Annexin V labeling and 7-AAD. Therefore, Prdx5 is an attractive therapeutic target for PD, as its overexpression protects dopaminergic cells from ROS and death, which warrants further experimental animal studies for its subsequent application in clinical trials.

1. Introduction

Currently, neurological disorders are the primary source of disability in the world. Parkinson's disease (PD) is the most common neurodegenerative disorder affecting movement. From 1990 to 2010, the number of people with PD doubled to >6 million worldwide (Doesey et al., 2018). PD is characterized by the progressive loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta of the midbrain (Hoehn-Klewicz, 2006). Accumulating evidence implicates reactive oxygen species (ROS) as the molecular driver of the complex degenerative cascade that underlies dopaminergic neuronal death (Glasson et al., 2000; Halliday et al., 2005). The brain is rich in unsaturated lipids, has high calcium signaling activity at synaptic endings, and has a high glucose metabolic rate (Magistretti and Allaman, 2015; Reed, 2011). Since the brain consumes 20 % of the total oxygen to support the high ATP synthesis due to energy demand for neuronal function, it is highly

susceptible to ROS (Jain et al., 2010). Dopaminergic neurons are especially susceptible to ROS due to Dopamine (DA) synthesis, as this neurotransmitter undergoes spontaneous oxidation (Umek et al., 2018). In addition, the presence of redox-active metals promotes dopamine oxidation (Sun et al., 2016). Besides, the brain has a very modest endogenous antioxidant defense system; compared to many organs with a high metabolic rate, such as the liver, the brain has 50 times less expression of antioxidant enzymes, such as catalase (Cobley et al., 2018).

Peroxiredoxins (Prdxs) are a superfamily of thiol-dependent antioxidant enzymes evolutionarily conserved in different species. Prdxs are classified into three subfamilies (typical 2-Cys, atypical 2-Cys, and 1-Cys) based on the active cysteine residues number and location and the disulfide bonds type produced during the catalytic reaction (Lee, 2020). Typical 2-Cys Prdx (Prdx1–4) is the largest subfamily of these enzymes (Woo et al., 2003), and their hyperoxidation susceptibility

Abbreviations: PD, Parkinson's disease; Prdxs, Peroxiredoxins; Prdx1, Peroxiredoxin 1; Prdx2, Peroxiredoxin 2; Prdx3, Peroxiredoxin 3; Prdx4, Peroxiredoxin 4; Prdx5, Peroxiredoxin 5; PQ, paraquat; DA, Dopamine; CNS, central nervous system; ROS, reactive oxygen species; MOI, multiplicity of infection; DHE, dihydroethidium; CP-SH, peroxidative cysteine; CP-SOH, sulfenic acid; CR-SH, resolving cysteine; Trx, thioredoxin; Srx, sulfiredoxin; ER, endoplasmic reticulum.

* Corresponding authors at: Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina, Francisco I. Madero S/N, Monterrey 64460, Nuevo León, México.
E-mail addresses: humberto.rodriguezr@uanl.edu.mx (H. Rodríguez-Rocha), aracely.garcia@uanl.edu.mx (A. García-García).

<https://doi.org/10.1016/j.celdev.2023.203860>

Received 31 January 2023; Received in revised form 19 May 2023; Accepted 31 May 2023
Available online 1 June 2023



Review

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

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

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

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

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

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

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



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

Academic Editor: Domenico Nuzzo

Received: 29 January 2021

Accepted: 11 March 2021

Published: 15 March 2021

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



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

1. Introduction

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

The main pathological characteristic of PD is the progressive degeneration of dopaminergic neurons [4]. Dopaminergic neurons are susceptible to oxidative damage due to dopamine's inherent metabolism, which is oxidized and generates reactive oxygen species (ROS), leading to cellular oxidative stress, where ROS have different macromolecular targets [5]. Furthermore, oxidative stress and neuroinflammation exert a synergistic effect on PD pathogenesis [6]. In situ or peripheral neuroinflammation, including glial cell activity [7,8], and pro-inflammatory cytokines [9], has been observed in post-mortem brain samples from PD patients, which might contribute to the cascade of events that lead to neurodegeneration. Once activated, glial cells are capable of regulating various enzymatic systems, such as NADPH oxidase, inducible nitric oxide synthase (iNOS), and myeloperoxidase [10], with the subsequent production of cytotoxic factors like superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$) and nitric oxide (NO^{\bullet}).

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

Pursuing Multiple Biomarkers for Early Idiopathic Parkinson's Disease Diagnosis

Yareth Gopar-Cuevas¹ · Ana P. Duarte-Jurado¹ · Rosa N. Díaz-Pérez¹ · Odila Saucedo-Cardenas^{1,2} · Maria J. Loera-Arias¹ · Roberto Montes-de-Oca-Luna¹ · Humberto Rodríguez-Rocha¹ · Aracely García-García¹

Received: 9 April 2021 / Accepted: 16 July 2021

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

Abstract

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

Graphical abstract

Keywords Biomarkers · Diagnosis · Idiopathic · Parkinson's disease

Introduction

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

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

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

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

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

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

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



Review

Unscrambling the Role of Redox-Active Biometals in Dopaminergic Neuronal Death and Promising Metal Chelation-Based Therapy for Parkinson's Disease

Alfredo Gonzalez-Alcocer ¹, Ana Patricia Duarte-Jurado ¹, Adolfo Soto-Dominguez ¹, Maria de Jesus Loera-Arias ¹, Eliud Enrique Villarreal-Silva ², Odila Saucedo-Cardenas ¹, Roberto Montes de Oca-Luna ¹, Aracely Garcia-Garcia ^{1,*} and Humberto Rodriguez-Rocha ^{1,*}

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

² Servicio de Neurocirugía y Terapia Endovascular Neurológica, Hospital Universitario, Dr. Jose Eleuterio Gonzalez, Monterrey 64460, Mexico

* Correspondence: aracely.garciagr@uanl.edu.mx (A.G.-G.); humberto.rodriguezrc@uanl.edu.mx (H.R.-R.); Tel.: +52-81-83-29-4000 (ext. 2713) (A.G.-G. & H.R.-R.); Fax: +52-(81)-8123-4313 (A.G.-G. & H.R.-R.)

Abstract: Biometals are all metal ions that are essential for all living organisms. About 40% of all enzymes with known structures require biometals to function correctly. The main target of damage by biometals is the central nervous system (CNS). Biometal dysregulation (metal deficiency or overload) is related to pathological processes. Chronic occupational and environmental exposure to biometals, including iron and copper, is related to an increased risk of developing Parkinson's disease (PD). Indeed, biometals have been shown to induce a dopaminergic neuronal loss in the substantia nigra. Although the etiology of PD is still unknown, oxidative stress dysregulation, mitochondrial dysfunction, and inhibition of both the ubiquitin-proteasome system (UPS) and autophagy are related to dopaminergic neuronal death. Herein, we addressed the involvement of redox-active biometals, iron, and copper, as oxidative stress and neuronal death inducers, as well as the current metal chelation-based therapy in PD.

Keywords: redox-active; biometals; iron; copper; chelation; Parkinson's disease



Citation: Gonzalez-Alcocer, A.; Duarte-Jurado, A.P.; Soto-Dominguez, A.; Loera-Arias, M.d.J.; Villarreal-Silva, E.E.; Saucedo-Cardenas, O.; de Oca-Luna, R.M.; Garcia-Garcia, A.; Rodriguez-Rocha, H. Unscrambling the Role of Redox-Active Biometals in Dopaminergic Neuronal Death and Promising Metal Chelation-Based Therapy for Parkinson's Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 1256. <https://doi.org/10.3390/ijms24021256>

Academic Editor: Takuya Noguchi

Received: 29 November 2022

Revised: 28 December 2022

Accepted: 30 December 2022

Published: 9 January 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Metals play essential biological functions in all living organisms. The human body requires minimal amounts of metallic elements to maintain a healthy development of physiological functions. However, metal levels outside the normal range may lead to the development of pathologies. An organism's deficiency or excess of essential metals leads to severe biological alterations. However, not all metals are essential or beneficial to organisms; some nonessential and potentially toxic metals might be capable of causing undesirable effects on the genome, glycolysis, Krebs cycle, oxidative phosphorylation, and carbohydrate, lipid, protein, and amino acid metabolism [1]. Only biometals, including iron, copper, zinc, manganese, molybdenum, sodium, potassium, calcium, chromium, and cobalt, are indispensable for life. About 40% of all enzymes with known structures require biometals to function correctly [2]. These biometals are not limited to enzymatic activities but also play structural, electrostatic, energetic, and transport functions. Biometals directly affect by targeting biomolecules (DNA, lipids, proteins) (Figure 1), organelles, cells, tissues, organs, and the biological micro- and macro-environment, as they become part of it [3,4]. Living cells possess a redox metabolism where oxidation-reduction (redox) reactions occur in fundamental processes of redox regulation, collectively termed "redox signaling" and "redox control" [5]. Several studies performed on biological systems have shown that redox-active metals, including iron, copper, cobalt, chromium, and manganese,