



**LA INHIBICIÓN GÉNICA Y FARMACOLÓGICA DEL LRRK2 MODULAN
ESTRÉS OXIDATIVO, LA AUTOFAGIA Y LA APOPTOSIS EN MODELOS
CELULARES DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON: ESTRATEGIAS
TERAPÉUTICAS**

**Presentado por
DIANA ALEJANDRA QUINTERO ESPINOSA**

**CORPORACIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA
MEDELLÍN
2024**

**LA INHIBICIÓN GÉNICA Y FARMACOLÓGICA DEL LRRK2 MODULAN EL ESTRÉS
OXIDATIVO, LA AUTOFAGIA Y LA APOPTOSIS EN MODELOS CELULARES DE LA
ENFERMEDAD DE PARKINSON: IMPLICACIONES TERAPÉUTICAS**

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

**(Para optar al título de Doctor en Ciencias Básicas Biomédicas – Énfasis en
Neurociencias)**

Presentado por

DIANA ALEJANDRA QUINTERO ESPINOSA, B.Sc MSc

Tutor MARLENE JIMENEZ DEL RIO, D.Sc

Comité Tutorial

CARLOS VÉLEZ PARDO, D.Sc

JUAN ÁLVARO LÓPEZ QUINTERO D.Sc

MIGUEL ÁNGEL MENDIVIL PÉREZ D.Sc

BIBIANA ZAPATA LONDOÑO D.Sc

**CORPORACIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA
MEDELLÍN
2024**

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|---|----|
| RESUMEN | 12 |
| ABSTRACT | 14 |
| MARCO TEÓRICO | 16 |
| CAPITULO 1: ENFERMEDAD DE PARKINSON (EP) | 16 |
| 1. ENFERMEDAD DE PARKINSON (EP) | 16 |
| 1.1. Definición | 16 |
| 1.2. Epidemiología de EP en el mundo y en Colombia | 18 |
| 1.3. Características Clínico-patológicas de la EP | 18 |
| 1.4. Neurofisiopatología del movimiento en la EP | 20 |
| 1.5. Etiología de la EP | 23 |
| 1.6. La LRRK2: QUINASA CON REPETICIONES RICAS EN LEUCINA | 36 |
| 1.7. MECANISMOS NEUROPATOLÓGICOS INDUCIDOS POR LA QUINASA LRRK2 EN LA EP | 43 |
| 1.8. TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON | 56 |
| CAPÍTULO 2: EDICIÓN GÉNICA DEL LRRK2 EN LA LINEA CELULAR HEK293 COMO MODELO Y ESTRATEGIA MOLECULAR DE ESTUDIO DE LA EP-AD | 66 |
| 2.1. Historia y Definición de la Edición génica | 66 |
| 2.2. Nucleasas asociadas a repeticiones palindrómicas cortas, agrupadas y regularmente inter-espaciadas (CRISPR/Cas) | 68 |
| 2.3. Mecanismos de reparación del rompimiento de doble cadena de ADN en la edición génica por Nucleasas específicas CRISPR/cas9 | 70 |
| 2.4. Edición Génica como estrategia molecular de estudio en la EP | 73 |
| 2.5. Edición Génica como estrategia terapéutica en la EP | 74 |
| 2.6. La línea celular-HEK293 | 75 |
| CAPÍTULO 3: LAS CÉLULAS MESENQUIMALES ESTROMALES DE LA GELATINA DE WHARTON Y SANGRE MESTRUAL (CME-GW, SM) COMO MODELO DE ESTUDIO DE INHIBICION FARMACOLOGICO DEL LRRK2 EN LA EP-AD | 78 |
| 3.1. Células Mesenquimales estromales (CME) definición y características | 78 |
| 3.2. Células Mesenquimales estromales en el modelamiento de la EP | 82 |
| CAPITULO 4: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN | 84 |
| 4.1. OBJETIVOS TRABAJO DE INVESTIGACION | 88 |
| 4.1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS PARTE 1: SUPRESIÓN GÉNICA DE LRRK2 EN CÉLULAS HEK293 | 88 |

| | |
|---|-----|
| 4.1.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS PARTE 2: LAS NEURONAS DOPAMINÉRGICAS DERIVADAS DE CME-GW-CU y SM COMO MODELO PARA EL ESTUDIO Y DISEÑO TERAPÉUTICO EN LA EP (SUPRESIÓN FARMACOLÓGICA DE LRRK2 EN ESTE MODELO) | 88 |
| 4.2. HIPÓTESIS GENERAL | 89 |
| 4.3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN | 89 |
| CAPITULO 5: DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN PARTE 1: SUPRESIÓN GÉNICA DEL <i>LRRK2</i> EN CÉLULAS HEK293T | 89 |
| 5.1. Introducción | 89 |
| 5.2. Materiales y métodos. | 90 |
| 5.3. Resultados. | 90 |
| 5.4. Discusión | 90 |
| CAPITULO 6 DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN PARTE 2 : LAS NEURONAS DOPAMINÉRGICAS DERIVADAS DE CME-GW-CU y SM COMO MODELO PARA EL ESTUDIO Y DISEÑO TERAPÉUTICO EN LA EP (SUPRESIÓN FARMACOLÓGICA DE LRRK2 EN UN ESTE MODELO) OBJETIVOS 3 Y 4 | 90 |
| 6.1. Introducción | 90 |
| 6.2. Materiales y métodos. | 90 |
| 6.3. Resultados. | 91 |
| 6.4. Discusión | 91 |
| CAPITULO 7: DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN PARTE 3 TRANSDIFERENCIACIÓN DE CME-SM A NEURONAS DOPAMINERGICAS COMO MODELO PARA EL ESTUDIO Y DISEÑO TERAPÉUTICO EN LA EP OBJETIVOS 5,6 Y 7. | 91 |
| 7.1. Introducción | 91 |
| 7.2. Materiales y métodos | 91 |
| 7.3. Resultados. | 92 |
| 7.4. Discusión | 92 |
| CAPITULO 8: DISCUSIÓN GENERAL | 92 |
| CAPITULO 9: CONCLUSIONES GENERALES | 98 |
| CAPITULO 10: APORTES Y PRODUCTOS CIENTÍFICOS | 99 |
| CAPITULO 11: PESPECTIVAS | 101 |
| CAPÍTULO 12. ANEXOS | 104 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS | 105 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|-----------|
| Figura 1. Etapas de Braak de la progresión de la EP de acuerdo con el depósito de los cuerpos de Lewy. | 17 |
| Figura 2. Principales marcadores neuropatológicos de la EP. Microfotografías describen la neuropatología de la EP. | 19 |
| Figura 3. Ganglios Basales.. | 20 |
| Figura 4. Circuitos neuronales de los ganglios basales: Vías directa e indirecta.. | 23 |
| Figura 5. La Rotenona (ROT), estructura y mecanismo de acción | 25 |
| Figura 6. Estructura química del Paraquat. | 27 |
| Figura 7. Mecanismo de acción del Paraquat. | 29 |
| Figura 8. Estructura química del MANEB. | 30 |
| Figura 9. Representación esquemática de la ubicación citogenética del gen <i>LRRK2</i> | 36 |
| Figura 10. Estructura de la quinasa del <i>LRRK2</i> con los dominios en su forma monomérica y dimérica. | 37 |
| Figura 11. Estados conformacionales del dímero de la quinasa <i>LRRK2</i> | 39 |
| Figura 12. <i>LRRK2</i> y sus mecanismos de acción | 40 |
| Figura 13. Eventos morfológicos y moleculares en la apoptosis | 49 |
| Figura 14. Vía molecular de la apoptosis intrínseca inducida por especies reactivas de oxígeno (ROS) y la activación de la quinasa <i>LRRK2</i>. | 50 |
| Figura 15. Fases de la autofagia.. | 51 |
| Figura 16. Representación esquemática de los genes relacionados con la EP asociados con macroautofagia, autofagia mediada por chaperonas (AMC) y mitofagia.. | 53 |
| Figura 17. Alineación de residuos claves en el sitio de unión al ATP de las quinasas <i>LRRK2</i> y <i>MST</i> por el inhibidor PF-06447475. | 60 |
| Figura 18. Clasificación básica de los polifenoles más comunes. | 63 |
| Figura 19. La inmunidad adaptativa por los sistemas CRISPR/Cas (Proteínas Cas asociadas a repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas). | 68 |

| | |
|--|-----------|
| Figura 20. Componentes del sistema CRISPR/Cas de tipo II. | 69 |
| Figura 21. Enfoques de edición génica con nucleasas específicas de acuerdo a los mecanismos de reparación. | 71 |
| Figura 22. Modelos transgénicos de EP generados con CRISPR/Cas9 con diferentes aplicaciones. | 72 |
| Figura 23. Características morfológicas de las células HEK293 | 76 |
| Figura 24. Las células HEK293 como modelo de la Enfermedad de Parkinson | 77 |
| Figura 25. Las células mesenquimales estromales aisladas y expandidas a partir de diversas fuentes.. | 79 |
| Figura 26. La estructura del cordón umbilical humano con un diagrama de despiece tridimensional. | 80 |
| Figura 27. Estructura del endometrio y sus poblaciones celulares | 82 |
| Figura 28. Principales hallazgos obtenidos con los diferentes modelos para el estudio de los mecanismos neuropatológicos de la EP con supresión genética, farmacológica de LRRK2 expuestos a ROT/PQ-MB o antioxidantes. | 97 |

LISTA DE TABLAS

| | |
|--|-----------|
| Tabla 1. Genes implicados en la enfermedad de Parkinson..... | 32 |
| Tabla 2. Características de las sustituciones de LRRK2 asociadas con la EP... | 42 |
| Tabla 3. Características de algunos de los inhibidores de la quinasa LRRK2 disponibles comercialmente | 58 |
| Tabla 4. Capacidad antioxidante (ORAC, ABTS, FRAP) del extracto metanólico del exocarpio, endocarpio y semilla de las variedades de aguacate hass, fuerte, reed y colinred..... | 65 |
| Tabla 5. Caracterización fitoquímica por espectrofotometría de masas (MS) del exocarpio de la variedad collinred de <i>Persea americana</i>..... | 66 |
| Tabla 6. Clasificación de los sistemas CRISPR/cas9..... | 70 |

LISTA DE ANEXOS

- Anexo 1. 104
Quintero-Espinosa D, Sanchez-Hernandez S, Velez-Pardo C, Martin-Molina F, Jimenez-Del-Rio M, LRRK2 Knockout Confers Resistance in HEK-293 Cells to Rotenone-Induced Oxidative Stress, Mitochondrial Damage, and Apoptosis. Int J Mol Sci. 2023 Jun 22;24(13):10474. doi: 10.3390/ijms241310474.
- Anexo 2. 104
Quintero-Espinosa D, Sanchez-Hernandez S, Velez-Pardo C, Martin-Molina F, Jimenez-Del-Rio M, LRRK2 Knockout Confers Resistance in HEK-293 Cells to Rotenone-Induced Oxidative Stress, Mitochondrial Damage, and Apoptosis. Int J Mol Sci. 2023 Jun 22;24(13):10474. doi: 10.3390/ijms241310474. Supplementaty Materials <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/13/10474#app1-ijms-24-10474>
- Anexo 3. 104
Quintero-Espinosa DA, Ortega-Arellano HF, Velez-Pardo C, Jimenez-Del-Rio M. Phenolic-rich extract of avocado Persea americana (var. Colinred) peel blunts paraquat/maneb-induced apoptosis through blocking phosphorylation of LRRK2 kinase in human nerve-like cells. Environ Toxicol. 2022 Mar;37(3):660-676. doi: 10.1002/tox.23433. Epub 2021 Dec 12. PMID: 34897981.
- Anexo 4. 104
Quintero-Espinosa D, Soto-Mercado V, Quintero-Quinchia C, Mendivil-Perez M, Velez-Pardo C, Jimenez-Del-Rio M. Latent Tri-lineage Potential of Human Menstrual Blood-Derived Mesenchymal Stromal Cells Revealed by Specific In Vitro Culture Conditions. Mol Neurobiol. 2021 Oct;58(10):5194-5209. doi: 10.1007/s12035-021-02442-6. Epub 2021 Jul 16. PMID: 34269964.
- Anexo 5. 104
Quintero-Espinosa, D.A.; Velez-Pardo, C.; Jimenez-Del-Rio, M. High Yield of Functional Dopamine-like Neurons Obtained in NeuroForsk 2.0 Medium to Study Acute and Chronic Rotenone Effects on Oxidative Stress, Autophagy, and Apoptosis. Int. J. Mol. Sci. 2023, 24, 15744. <https://doi.org/10.3390/ijms242115744>.
- Anexo 6. 104
Quintero-Espinosa D, Velez-Pardo C, Jimenez-Del-Rio M. LRRK2 kinase inhibitor PF-06447475 protects Drosophila melanogaster against paraquat-

**induced locomotor impairment, life span reduction, and oxidative stress.
Neurochem. Res. Accepted**

104

Anexo 7.

Aura Cristina Yepes Echeverri¹, Diana Alejandra Quintero Espinosa, Carlos Vélez-Pardo, Marlene Jiménez-Del-Río. El Nilotinib reduce el EO vía inhibición de la fosforilación Y412 de la proteína c-Abelson en un modelo neuronal: implicaciones en la Enfermedad de Parkinson (Manuscrito en preparación).

AGRADECIMIENTOS

Agradezco sinceramente a los profesores Carlos Vélez Pardo y Marlene Jiménez Del Río, por confiar en mí desde un principio al vincularme con este proyecto como estudiante de Doctorado en el área de enfermedades neurodegenerativas, neuroquímica y biología molecular. Por poner toda su experiencia y sabiduría a mi servicio, por ser mis guías con sus pertinentes consejos y direccionamientos durante mi formación, por enseñarme a creer y a apasionarme por la investigación en esta rama, porque además de ser un apoyo invaluable en mi vida académica también me ayudaron a sortear mis dificultades personales creyendo en mí cuando ni siquiera yo lo hacía. Gracias a ellos y a su constante motivación por forjar, enfocarme y creer en mis ideas es que hoy puedo decir que he crecido como investigadora y me llena de orgullo haberlos tenido en este camino.

De la misma manera quiero agradecerles a los miembros de mi comité asesor, los doctores Juan Álvaro López, María Bibiana Zapata Londoño. quienes siempre estuvieron prestos a escucharme y cuyas sugerencias fueron oportunas durante el desarrollo del trabajo de Investigación. Al profesor Miguel Ángel Mendivil Perez quien además de acompañarme como miembro del comité asesor estuvo de cerca en mi proceso experimental y de formación, por sus consejos además de llevarme su aprendizaje me llevo su gran calidad humana.

A mis compañeros de laboratorio: Natalia, Viviana, Laura, Daniela, Nicolas, porque a través de las experiencias que compartí con ellos como equipo de trabajo pude enriquecer mi trabajo. A los compañeros de las otras líneas de investigación, a Claudita, Glori, Yaneth por esos momentos de cafecito, stellas y catarsis, me los llevo en el corazón.

A la Corporación Ciencias Básicas Biomédicas Gracias a su eficiente gestión académica, administrativa y apoyo constante, pude completar satisfactoriamente todas las fases de mi formación doctoral.

Al grupo de neurociencias de Antioquia en cabeza del doctor Francisco Lopera Restrepo, por permitir el desarrollo de este trabajo de investigación. Me llena de orgullo hacer parte del mejor grupo de investigación de la Universidad de Antioquia.

Al fondo para posgrados nacionales de Sapiencia el otorgamiento de la media beca para mis estudios de doctorado.

Al Doctor Francisco Molina Martin por su enorme generosidad y colaboración y a todo el equipo de trabajo del grupo de terapia celular y molecular de GENYO; Pili, María, Aracelly, Sabina, Ana, Iris, Juan Elías, Marina. Carlos, Pedro por abrirme las puertas de su laboratorio, por su humildad, buena disposición y por su hospitalidad. A Valerie Griesche por ser mi hermanita alemana durante mi estadía en España con quien espero volver a compartir más tapas y “Kulter Hund”.

A mi familia por su apoyo incondicional, a mi papá que desde pequeñas nos inculcó el amor a la academia y a mi mamá por ser ejemplo de lucha y tenacidad. A mis hermanas que con sus palabras de aliento siempre estuvieron dándome fuerza para seguir adelante.

A Yurany por brindarme su amistad invaluable por escucharme aconsejarme y alentarme, a mi compañera peluda de trasnochos Canela las dos fueron mi hogar y refugio en muchas ocasiones.

RESUMEN

La enfermedad de Parkinson (EP) es el segundo trastorno neurodegenerativo progresivo más común en el mundo. Este trastorno neurológico se caracteriza por alteraciones del movimiento, daño oxidativo y pérdida de neuronas dopaminérgicas (DAérgicas) en la región de la sustancia negra parte compacta. La EP se ha asociado a mutaciones o factores de riesgo asociados a los genes de PARK1 al 19 de los pacientes con la EP. Dentro de estos genes se encuentra el gen PARK8 que codifica para la proteína quinasa rica en repeticiones de leucina 2 (LRRK2, por sus siglas en inglés) la cual se ha relacionado con la vulnerabilidad neuronal dopaminérgica al estrés oxidativo (EO), el deterioro mitocondrial y el aumento de la muerte celular en la enfermedad de Parkinson (EP) idiopática y familiar. Sin embargo, aún se desconoce cómo participa exactamente esta quinasa en la conexión EO--mitocondria-apoptosis. Además, se carece de un modelo *in vitro* que permita recapitular estos eventos moleculares. De modo que, durante los últimos años, la investigación de la EP se ha centrado no solo en el esclarecimiento de los mecanismos moleculares involucrados en la relación entre LRRK2 y el EO sino también, en el desarrollo de modelos que sirvan de plataforma para la búsqueda de alternativas terapéuticas. El objetivo de nuestro estudio fue desarrollar modelos *in vitro* con el fin de investigar el efecto de la inhibición genética y farmacológica de LRRK2 y su relación con los mecanismos de EO, muerte celular y autofagia. Adicionalmente, nos interesamos en evaluar el potencial antioxidante y neuroprotector de extractos de *Persea americana* (*P. americana*) en los modelos *in vitro* expuestos al EO.

Inicialmente utilizamos las repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente interespaciadas CRISPR/Cas9 para eliminar el gen LRRK2 (LRRK2 knockout KO) en la línea celular de riñón embrionario humano 293 (HEK-293) y evaluar la respuesta celular al inhibidor mitocondrial complejo I rotenona (ROT), un conocido inductor de OS y muerte celular, en términos de las especies reactivas de oxígeno intracelular (ROS, DJ-1-Cys106-SO3 oxidado); fosforilación de LRRK2 y c-JUN, expresión de la proteína tumoral del modulador de la apoptosis regulado por p53 (PUMA, y de Parkina (PRKN); activación de la caspasa 3 (CC3), fragmentación del ADN y disminución del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) y de la quinasa putativa 1 inducida por PTEN (PINK), y DRP1 en comparación con las células WT tratadas y no tratadas con ROT. Estos mismos marcadores fueron analizados en células semejantes a neuronas (CSNs) obtenidas de células mesenquimales estromales de Cordon umbilical (CME-CU) expuestas a PQ+MB en presencia o ausencia del inhibidor de LRRK2 PF-06447475 (PF-475) y extracto rico en fenoles de cáscara de aguacate *Persea americana* var. Colinred (CRE). Finalmente se analizaron marcadores neuropatológicos de la EP (p- α Syn) de mitocondria ($\Delta\Psi_m$, Parkina, DRP1), muerte celular (CC3), y autofagia (LC3-II), fosforilación de LRRK2 (p-LRRK2) en Neuronas dopaminérgicas (NDAs) derivadas de células mesenquimales estromales de Sangre menstrual (CME-SM).

El análisis de los marcadores neuropatológicos en las células HEK293, mostró una reducción significativa en los marcadores asociados a la muerte celular y el estrés oxidativo en células HEK293 LRRK2 KO con respecto a las HEK293 WT. Este mismo comportamiento

se observó en las CSNs tratadas con el inhibidor de LRRK2 PF- 06447475 (PF-475) y el CRE bajo el estímulo de EO inducido por PQ y MB. Mas interesante aún el inhibidor PF-475 en las NDAs intoxicadas con ROT de manera crónica y aguda logró revertir los marcadores neuropatológicos y la alteración de los marcadores lisosomales cuyo aumento se evidenció en la intoxicación crónica.

En conjunto, nuestros datos sugieren que la quinasa LRRK2 regula tanto la muerte celular apoptótica como la autofagia en diferentes modelos *in vitro* evaluados bajo EO. Así mismo, los extractos metanólicos de *P. americana* tienen un mecanismo antiapoptótico asociado a su capacidad antioxidante. Dado que los defectos en la actividad del complejo mitocondrial I son comúnmente observados en la EP, el PQ+MB y la ROT funciona bien como un modelo químico de la EP tanto en condiciones agudas como crónicas. Así mismo estos hallazgos validan los modelos neuronales desarrollados como herramientas para la búsqueda de alternativas terapéuticas en la EP, las cuales de acuerdo con nuestros resultados deben estar enfocados en la inhibición de la quinasa LRRK2 y el uso de moléculas con actividad antioxidantes.

Palabras clave: Enfermedad de Parkinson, LRRK2, Estrés oxidativo, apoptosis, autofagia, Extractos Naturales, *Persea americana*, actividad antioxidante, *in vitro*, células madre mesenquimales, neuronas dopaminérgicas.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is the second most common progressive neurodegenerative disorder in the world. This neurological disorder is characterized by movement disorders, oxidative damage and loss of dopaminergic (DAergic) neurons in the substantia nigra pars compacta region. PD has been associated with mutations or risk factors associated with PARK1-21 genes in PD patients. Among these genes is the PARK8 gene encoding for leucine repeat-rich protein kinase 2 (LRRK2) which has been linked to dopaminergic neuronal vulnerability to oxidative stress (OS), mitochondrial impairment and increased cell death in idiopathic and familial Parkinson's disease (PD). However, exactly how this kinase participates in the EO--mitochondria--apoptosis connection is still unknown. Moreover, an *in vitro* model to recapitulate these molecular events is lacking. Thus, during the last few years, PD research has focused not only on elucidating the molecular mechanisms involved in the relationship between LRRK2 and EO, but also on the development of models that serve as a platform for the search for therapeutic alternatives. The aim of our study was to develop *in vitro* models in order to investigate the effect of genetic and pharmacological inhibition of LRRK2 on the mechanisms of EO, cell death and autophagy. Additionally, we were interested in evaluating the antioxidant and neuroprotective potential of *Persea americana* (*P. americana*) extracts in *in vitro* models exposed to EO.

First we used the clustered regularly interspaced short palindromic repeats CRISPR/Cas9 to knock out the LRRK2 gene (LRRK2 knockout KO) in the human embryonic kidney cell line 293 (HEK-293) and evaluate the cellular response to the mitochondrial inhibitor complex I rotenone (ROT), a known inducer of OS and cell death, in terms of intracellular reactive oxygen species (ROS, oxidized DJ-1-Cys106-SO₃); LRRK2 and c-JUN phosphorylation, tumor protein expression of p53-regulated modulator of apoptosis (PUMA, and Parkin (PRKN); activation of caspase 3 (CC3), DNA fragmentation and decreased mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) and PTEN-induced putative kinase 1 (PINK), and DRP1 compared to ROT-treated and untreated WT cells. These same markers were analyzed in neuron-like cells (NSCs) obtained from umbilical cord mesenchymal stromal cells (UC-MSCs) exposed to PQ+MB in the presence or absence of the LRRK2 inhibitor PF-06447475 (PF-475) and phenol-rich extract of avocado peel *Persea americana* var. *Colinred* (CRE). Finally, neuropathological markers of PD (p- α Syn) of mitochondria ($\Delta\Psi_m$, Parkin, DRP1), cell death (CC3), and autophagy (LC3-II), phosphorylation of LRRK2 (p-LRRK2) were analyzed in menstrual blood stromal mesenchymal stromal cell (MB-MSCs)-derived dopaminergic neurons (DALNs).

Analysis of neuropathological markers in HEK293 cells showed a significant reduction in markers associated with cell death and oxidative stress in HEK293 LRRK2 KO cells with respect to HEK293 WT cells. This same behavior was observed in CSNs treated with the LRRK2 inhibitor PF-06447475 (PF-475) and CRE under PQ- and MB-induced EO stimulus. More interestingly, PF-475 inhibitor in chronically and acutely ROT intoxicated

DALNs was able to reverse neuropathological markers and alteration of lysosomal markers whose increase was evidenced in chronic intoxication.

Taken together, our data suggest that LRRK2 kinase regulates both apoptotic cell death and autophagy in different in vitro models evaluated under EO. Likewise, methanolic extracts of *P. americana* have an anti-apoptotic mechanism associated with their antioxidant capacity. Since defects in mitochondrial complex I activity are commonly observed in PD, PQ+MB and ROT function well as a chemical model of PD in both acute and chronic conditions. Likewise, these findings validate the neuronal models developed as tools for the search of therapeutic alternatives in PD, which according to our results should be focused on the inhibition of LRRK2 kinase and the use of molecules with antioxidant capacity.

Keywords: Parkinson's disease, LRRK2, Oxidative stress, apoptosis, autophagy, Natural Extracts, *Persea americana*, antioxidant activity, in vitro, mesenchymal stem cells, dopaminergic neurons.

MARCO TEÓRICO

CAPITULO 1: ENFERMEDAD DE PARKINSON (EP)

1. ENFERMEDAD DE PARKINSON (EP)

1.1. Definición

La enfermedad de Parkinson (EP, OMIM # 168600) es un trastorno neurológico progresivo que afecta a una cantidad significativa de personas en todo el mundo, siendo el segundo en prevalencia. Desde un punto de vista clínico, la EP se caracteriza por la presencia de temblores, rigidez muscular, lentitud en los movimientos, problemas de estabilidad, dificultades en la marcha y falta de expresión facial (1). Fue el médico británico Dr. James Parkinson quien, en 1817 con su ensayo "Essay on the Shaking Palsy", documentó por primera vez esta enfermedad, que denominó como "Paralysis agitans". Aunque en su descripción inicial hizo referencia a la lentitud en los movimientos y los temblores en reposo, omitió síntomas fundamentales como la rigidez y los problemas posturales (2). No fue hasta 1919 que se identificó la pérdida de células en la sustancia negra compacta y la presencia de inclusiones proteicas llamadas cuerpos de Lewy en pacientes con EP (3). Pasaron 140 años desde la descripción de James Parkinson para que Carlsson y sus colaboradores en 1957 descubrieran la dopamina como un neurotransmisor clave en el sistema nervioso, además de otros síntomas no motores como la demencia, depresión, problemas sensoriales y trastornos del sueño (2, 4).

En 1960, Ehringer y Hornykiewicz observaron una drástica disminución de las concentraciones de dopamina en el estriado de pacientes con EP (1). Fue en 1961 cuando se demostró por primera vez que la administración de Levodopa mejoraba la acinesia en pacientes con EP (6). Estos descubrimientos han sido fundamentales para el desarrollo de tratamientos, incluyendo el uso de Levodopa como reemplazo de la dopamina deficiente, y han llevado a investigaciones como el uso de injertos de células dopaminérgicas (7) con el fin de restaurar la función de las células perdidas debido a la enfermedad. Esto ha abierto posibilidades en la búsqueda de nuevas terapias y ha contribuido a comprender mejor los mecanismos celulares y moleculares involucrados en el desarrollo de la EP.

Braak y sus colegas (2003) dividieron la progresión de la patología de Parkinson en seis etapas (Fig. 1), identificando la afectación de la sustancia nigra hasta la etapa tres (8). Esta evolución anatómica de la patología está relacionada con la aparición de síntomas no motores, como ansiedad, depresión y problemas cognitivos, que pueden manifestarse en una fase premotora o debido a tratamientos farmacológicos (9-11). La variabilidad en la presentación clínica de las áreas afectadas en pacientes con la patología de Lewy va desde

la constipación hasta la demencia. Otras condiciones similares, como la demencia con cuerpos de Lewy (DLB) y la falla autonómica pura (PAF), comparten características histopatológicas con la enfermedad de Parkinson, sugiriendo que son parte del mismo espectro.

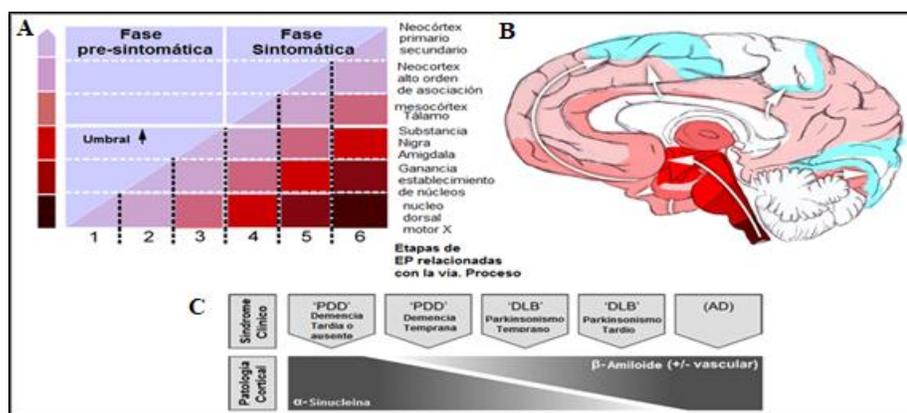


Figura 1. Etapas de Braak de la progresión de la EP de acuerdo con el depósito de los cuerpos de Lewy. A. Diagrama simplificado que muestra la expansión topográfica de las lesiones (de izquierda a derecha) y, simultáneamente, la gravedad creciente por parte de la parte de la patología global (de abajo hacia arriba: estadios 1-6). **B.** En la fase presintomática, las lesiones ocurren inicialmente en el núcleo motor dorsal IX/X y también en el núcleo olfatorio anterior. Posteriormente, las estructuras cerebrales menos susceptibles se ven afectadas gradualmente (véanse las flechas blancas). La patología en el núcleo olfatorio anterior se expande menos fácilmente a las áreas relacionadas que la que evoluciona en el tronco cerebral. La patología del tronco cerebral sigue un curso ascendente (véanse las flechas blancas). Sigue la afectación cortical, comenzando por el mesocórtex temporal anteromedial. A partir de ahí, el neocórtex sucumbe, empezando por las áreas de asociación sensorial de alto orden y prefrontales. Le siguen las áreas de asociación sensorial/premotoras de primer orden y, posteriormente, los campos sensoriales y motores primarios. a disminución gradual de la intensidad del sombreado pretende representar la expansión topográfica de las lesiones durante el curso de la enfermedad. **C.** Así mismo, la presencia de estos agregados proteicos en presencia de α -sinucleína puede definir diferentes subtipos de parkinsonismo que pueden evolucionar a otras patologías asociadas a amiloidopatías (patología de Alzheimer) El modelo propuesto muestra en un extremo del espectro, los pacientes con EP que desarrollan demencia tardíamente o no la desarrollan tienen mínimos depósitos de amiloide neurítico, centrándose principalmente en el depósito de α -Syn. En el extremo opuesto, los pacientes con EA tienen predominio de depósitos de amiloide neurítico y pocos depósitos de α -Syn, presentando los rasgos clínicos de la EA más adelante. Tomado de Braak et al., 2003 (8); Berg et al., 2014 (14).

Recientemente se ha propuesto una redefinición de la enfermedad de Parkinson que considera aspectos clínicos, histopatológicos y genéticos. Esta reevaluación reconoce que la enfermedad no se limita a una sola entidad, sino que afecta múltiples áreas del cerebro, la médula espinal y el sistema nervioso periférico autónomo. El conocimiento creciente sobre los mecanismos moleculares, los genes asociados y los factores de riesgo de la enfermedad sugieren que las alteraciones pueden afectar a grupos celulares no neuronales y procesos moleculares a través de múltiples tipos celulares con vulnerabilidades variables (12, 13). Esta variabilidad puede ser el resultado de interacciones con factores genéticos, ambientales y patologías comórbidas (14-16), que facilitan la comprensión de las causas moleculares, la identificación de biomarcadores, el desarrollo de tratamientos (17), y el establecimiento de un diagnóstico, que se base en la consideración de las enfermedades definidas biológicamente que colectivamente forman el Parkinson. Esto permitiría una estratificación

más precisa de los pacientes y redefinir el Parkinson como un conjunto de enfermedades individuales (18).

1.2. Epidemiología de EP en el mundo y en Colombia

La enfermedad de Parkinson (EP) se sitúa como la segunda enfermedad neurodegenerativa más común a nivel mundial después de la enfermedad de Alzheimer. Afecta a todos los grupos étnicos, aunque su incidencia es menor en la raza negra y en orientales. Globalmente, hay alrededor de 13 a 14 casos nuevos por cada 100.000 personas al año, y entre las personas mayores de 65 años, la incidencia aumenta a unos 160 casos nuevos por cada 100.000 individuos en este grupo de edad. En cuanto a la prevalencia de la enfermedad oscila entre 100 y 200 por cada 100.000 personas (19), estando por encima de 200 individuos por cada 100.000 personas en la población mayor de 60 años y entre el 400 a 500 personas por cada 100.000 habitantes en la población mayor de 85 años (19). Estudios epidemiológicos en Colombia han estimado una prevalencia de 158 individuos por cada 100,000 habitantes (21), siendo el departamento de Antioquia el más afectado, con una prevalencia de la enfermedad de 30.7 individuos por cada 100.000 habitantes y en personas mayores de 50 años, 176 casos por cada 100.00 habitantes (22, 23).

El inicio de la EP antes de los 40 años se observa en menos del 2% de los casos en cohortes basadas en la población mundial. Así mismo, la enfermedad es ligeramente más frecuente en hombres que en mujeres. En el 2040, se estima que habrá alrededor de 17 millones de afectados. Esto hace que la enfermedad de Parkinson sea de todas las enfermedades neurológicas, la de más rápido crecimiento a nivel mundial (20). Además, factores interculturales como la exposición a riesgos ambientales y las variaciones genéticas, afectan la prevalencia de la EP. Estos estimativos de la enfermedad siguen en incremento, especialmente en áreas urbanas, lo que representa un desafío para el sistema de salud, sumado al aumento en la expectativa de vida de la población colombiana (24).

1.3. Características Clínico-patológicas de la EP

Existen cuatro características clínicas cardinales de la EP que pueden agruparse bajo el acrónimo TRAP: Temblor en reposo, Rigidez, Acinesia (o bradicinesia) e Inestabilidad postural. Además, la postura flexionada y el congelamiento (bloques motores) se han incluido entre las características clásicas del parkinsonismo, siendo la EP la forma más común. Los síntomas no motores también son una característica común e infravalorada de la EP. Entre ellos se incluyen la disfunción autonómica, los trastornos cognitivos/neuroconductuales, las anomalías sensoriales (25, 26) y disfunción gastrointestinal asociadas a etapas tempranas de la enfermedad (27).

Los signos clínicos se manifiestan cuando las neuronas dopaminérgicas sufren deterioro o muerte, dejando de producir dopamina que es el neurotransmisor esencial para regular el circuito neuronal involucrado en el control del movimiento. A nivel macroscópico, el cerebro parkinsoniano muestra despigmentación del locus cerúleo y afectación de estructuras mesencefálicas, como el núcleo pedúnculo-pontino y el núcleo del rafe. Esta despigmentación se debe a la pérdida de neuromelanina por la muerte de aproximadamente del 70 - 80 % de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra pars compacta (SNc) que se proyectan al putamen asociada a una gliosis reactiva, a causa de agregados proteícos intracelulares y formación de cuerpos de Lewy (inclusiones intracitoplasmáticas que contienen principalmente α -sinucleína) que afectan también el núcleo basal de Meynert y de otros núcleos subcorticales (3, 28) (Fig. 2). Así mismo, se ha encontrado que la patología de Lewy inicialmente ocurre en las neuronas colinérgicas y monoaminérgicas del tronco cerebral y en el sistema olfatorio, pero luego es encontrado en las regiones límbicas y neocorticales con la progresión de la enfermedad (8, 20).

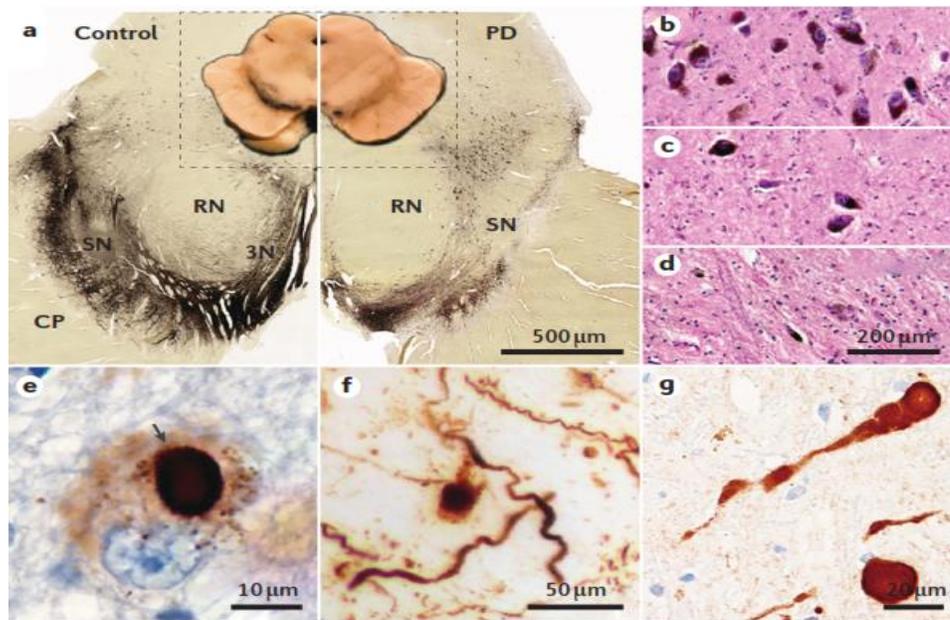


Figura 2. Principales marcadores neuropatológicos de la EP. Microfotografías describen la neuropatología de la EP a). Corte transversal del mesencéfalo en donde se evidencia la pérdida selectiva de neuronas en la parte ventrolateral de la SN se presenta como la despigmentación de la sustancia nigra (SN) (panel derecho) comparado con un control (panel izquierdo). Las microfotografías b-d describen la Tinción de hematoxilina eosina de las inclusiones de alpha sinucleína características en los cerebros de los pacientes con la EP. e, f y g La tinción inmunohistoquímica de α sinucleína muestra la forma redonda intracitoplasmática de los cuerpos de Lewy (flecha e) y depósitos granulares más difusos (f y g). Tomado y adaptado de Poewe et al. 2017 (20).

Otro descubrimiento fundamental en el ámbito neuropatológico de la EP es la perturbación de las mitocondrias, específicamente del complejo I mitocondrial en las neuronas dopaminérgicas localizadas en la región de la sustancia nigra en pacientes con EP. Además, de los genes asociados con la enfermedad que están vinculados a las vías mitocondriales, como PRKN, PINK1, DJ-1 y HTRA2, y se relacionan con esta alteración mitocondrial. Esta

condición fenotípica podría originarse debido a la disfunción del sistema de control de calidad de las mitocondrias (29, 30).

Estudios en modelos animales expuestos a neurotoxinas que compiten o inhiben a nivel del complejo I mitocondrial como MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina), PQ, rotenona y 6-hidroxi-dopamina, inducen una disminución de la dopamina a través de la generación de estrés oxidativo. Este estrés oxidativo se ha convertido en uno de los factores clave en el desarrollo tanto de la forma clínica idiopática como de la familiar de la enfermedad de Parkinson (31-33).

1.4. Neurofisiopatología del movimiento en la EP

La apropiada ejecución de los movimientos voluntarios resulta de un procesamiento correcto de la información sensor-motora en el cerebro. Esta tarea es llevada a cabo por una compleja red neuronal, la cual incluye la corteza cerebral, el tálamo y los ganglios basales (34). Los circuitos neuronales que implican los ganglios basales están interconectados formando conjuntos neuronales jerarquizados y dinámicos formando una parte clave del sistema motor extrapiramidal, por lo que la disfunción de estos circuitos está asociada directamente a la EP (35).

1.4.1. Ganglios Basales (GB)

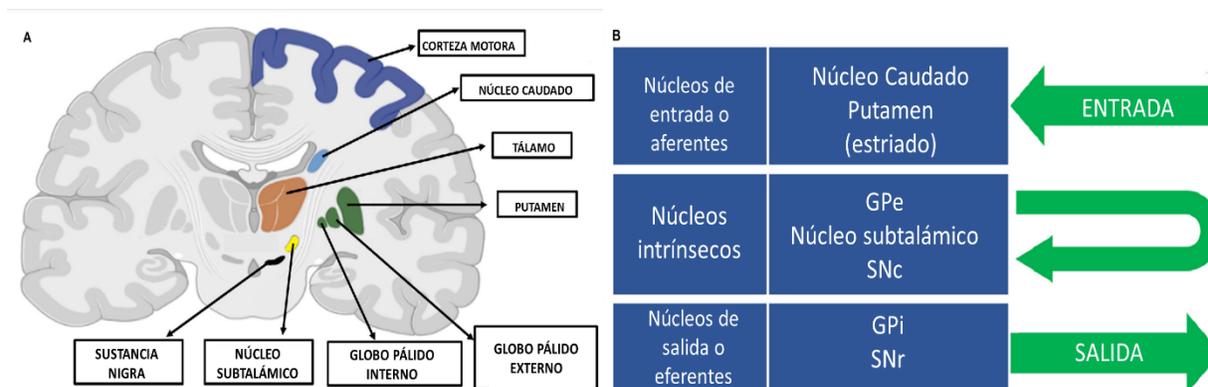


Figura 3. Ganglios Basales. (A) Corte coronal del cerebro, mostrando las estructuras que forman parte de los ganglios basales y la corteza motora. (B) Núcleos aferentes, intrínsecos y eferentes de los ganglios basales. Globo pálido externo (GPe), globo pálido interno (GPi), sustancia negra pars compacta (SNc) y sustancia negra pars reticulata (SNr). Adaptado de Rocha et al 2023 (36).

Los ganglios basales (GB) consisten en una variedad de núcleos subcorticales o agrupaciones neuronales ubicadas en la base del cerebro (diencéfalo y mesencéfalo). Las estructuras que integran los GB son: el cuerpo estriado, que a su vez se subdividen en tres estructuras conocidas como núcleo caudado, putamen, las cuales forman la región dorsal del cuerpo estriado y el núcleo accumbens, que corresponde a la parte ventral del cuerpo estriado; el globo pálido externo (GPe), el globo pálido interno (GPi), el núcleo subtalámico

(STN), que forman parte del diencefalo, y la sustancia negra (SN), que se divide en pars compacta (SNc) y pars reticulata (SNr), que hacen parte del mesencefalo (Fig. 3).

En cuanto a las proyecciones neuronales, los GB y los núcleos relacionados pueden clasificarse en términos generales como: 1) núcleos de entrada, 2) núcleos de salida y 3) núcleos intrínsecos(36). Los núcleos de entrada son aquellas estructuras que reciben información de distintas fuentes, principalmente de origen cortical, talámico y nigral. El estriado conformado por el núcleo caudado (CN), el putamen (Put) y el núcleo accumbens (Acb) se consideran núcleos de entrada. Los núcleos de salida son aquellas estructuras que envían información de los GB al tálamo y están formados por el segmento interno del globo pálido (GPi) y la sustancia negra pars reticulata (SNr). Por último, los núcleos intrínsecos como el segmento externo del globo pálido (GPe), el núcleo subtalámico STN y la sustancia negra pars compacta (SNc) se sitúan entre los núcleos de entrada y salida (36). La información eferente cortical y talámica entra en el cuerpo estriado (CN, Put y Acb) para seguir procesándose en el sistema de los GB (Ver Fig. 3) (37).

1.4.2. Sistema Dopaminérgico Nigroestriatal

El sistema dopaminérgico-nigroestriatal describe la interacción entre dos regiones cerebrales: la sustancia negra y el cuerpo estriado. Se considera que la vía dopaminérgica nigroestriada desempeña un papel esencial en el control del movimiento (38). La comunicación entre el estriado y la sustancia negra es bidireccional, formando un circuito de retroalimentación entre las vías nigroestriatal y estriato-nigral. La sustancia negra pars compacta envía fibras dopaminérgicas al caudado y al putamen, mientras que el estriado proyecta fibras GABAérgicas hacia la sustancia negra reticulada y compacta (39).

La dopamina tiene un efecto dual y complementario en las neuronas GABAérgicas del estriado. Por una parte, estimula las neuronas GABAérgicas que contienen GABA, sustancia P y dinorfinas y por otra parte, inhibe las neuronas que contienen GABA, encefalina y neurotensina. Por lo tanto, hay dos vías de entrada al cuerpo estriado que se ven influenciadas de manera diferente por la proyección dopaminérgica de la sustancia negra compacta. A pesar de sus diferentes acciones sinápticas, las influencias dopaminérgicas tienen el mismo efecto general de disminuir la inhibición de las neuronas talamocorticales, lo que facilita la realización de movimientos iniciados en la corteza (36).

1.4.3. Organización de los GB y su alteración en la EP

A finales de la década de los 80's, los neurocientíficos y los médicos adoptaron un nuevo modelo para dar explicación de cómo funcionaban los circuitos de los GB y cómo se alteraban en la EP (40). Una característica clave de este modelo fue identificar que había dos sistemas de proyección en el cuerpo estriado. Un sistema denominado vía "directa" que se proyecta directamente a la SNr y otra indirecta a través del segmento externo del globo pálido (GPe) y el núcleo subtalámico. Canónicamente, se cree que cada vía está controlada por una población distinta de proyecciones de neuronas espinosas (SPN) de la sustancia negra

pars compacta (SNc); las SPN de vía directa (dSPN) que expresan predominantemente el receptor de dopamina D1 (D1R), y las SPN de vía indirecta (iSPN) que expresan el receptor de dopamina D2. Las neuronas que envían señales directas a los dos núcleos de salida tienen receptores de dopamina D1 que facilitan la transmisión, mientras que las de la vía indirecta poseen receptores D2 que reducen la transmisión (41).

La vía directa describe una ruta inhibitoria monosináptica (mediada por GABA, sustancia P y Dinorfina) que va desde el putamen hacia el globo pálido interno (GPi). Esta vía tiene la función de convertir la idea abstracta de un movimiento en su realización. La idea abstracta del movimiento se origina en la corteza asociativa, que tiene conexiones estimulantes con el caudado y el putamen. El caudado y el putamen comparten una estructura similar, por lo tanto, se consideran funcionalmente como un solo núcleo dividido en dos partes. Por la cápsula interna, tienen conexiones inhibitorias con el GPi y con la parte reticular de la sustancia nigra. Por consiguiente, cuando se activa el caudado, disminuye la actividad del GPi y la parte reticular de la sustancia nigra. Estas estructuras tienen conexiones con los núcleos talámicos que también son inhibitorias (42). Así, cuando el caudado y el putamen se activan, aumenta la actividad de los núcleos talámicos porque se inhibe la inhibición del GPi y de la sustancia nigra, lo que resulta en una activación debido a dos vías inhibitorias en serie. Los núcleos talámicos activan la corteza motora suplementaria, que envía la orden de movimiento a la corteza motora primaria, y esta a su vez dirige la orden a las motoneuronas de la médula espinal para ejecutar el movimiento. Esta vía transforma la idea de un movimiento en su realización (Fig. 4).

La vía indirecta inicia en las neuronas estriatales GABAérgicas que expresan encefalina y neurotensina y se dirigen al globo pálido externo (GPe), que a su vez envía proyecciones inhibitorias GABAérgicas a la región sensoriomotora del núcleo subtalámico (NST), el cual envía a su vez estímulos excitatorios directamente al GPi y SNr (37). Esta vía inhibe los movimientos, teniendo un efecto contrario a la vía directa. Algunas neuronas del caudado y el putamen tienen conexiones inhibitorias con el globo pálido externo, que a su vez inhibe el núcleo subtalámico. Cuando se activa esta vía, el caudado y el putamen inhiben el globo pálido externo, desinhibiendo así el núcleo subtalámico, el cual activa al globo pálido interno y a la parte reticular de la sustancia nigra. Esta activación resulta en una inhibición de los núcleos talámicos, lo que provoca la inhibición de la corteza motora. Esta vía inhibe los movimientos debido a sus tres sinapsis inhibitorias en serie en lugar de dos, como ocurre en la vía directa, invirtiendo así la estimulación. Mientras la vía directa tiende a activar movimientos voluntarios, la vía indirecta tiende a inhibir la aparición de componentes involuntarios en el movimiento. Un equilibrio adecuado entre ambas vías es crucial para los movimientos normales, por lo tanto, un desequilibrio puede llevar a alteraciones en el movimiento, como se observa en algunas patologías, como la enfermedad de Parkinson (Fig. 4)(42).

A través de esta red moduladora, los potenciales de acción en las neuronas DAérgicas SNc y las elevaciones transitorias en la liberación de DA estriatal promueven la activación de las dSPNs y suprimirían la activación de las iSPNs, dando lugar al movimiento. Por el contrario, la inhibición de la actividad de las neuronas DAérgicas de la SNc y una reducción transitoria de la liberación de DA estriatal harían lo contrario y suprimirían el movimiento. Por lo tanto, en la EP, la pérdida de la liberación de DA estriatal conduce el circuito estriatal hacia la vía indirecta y la supresión del movimiento (43).

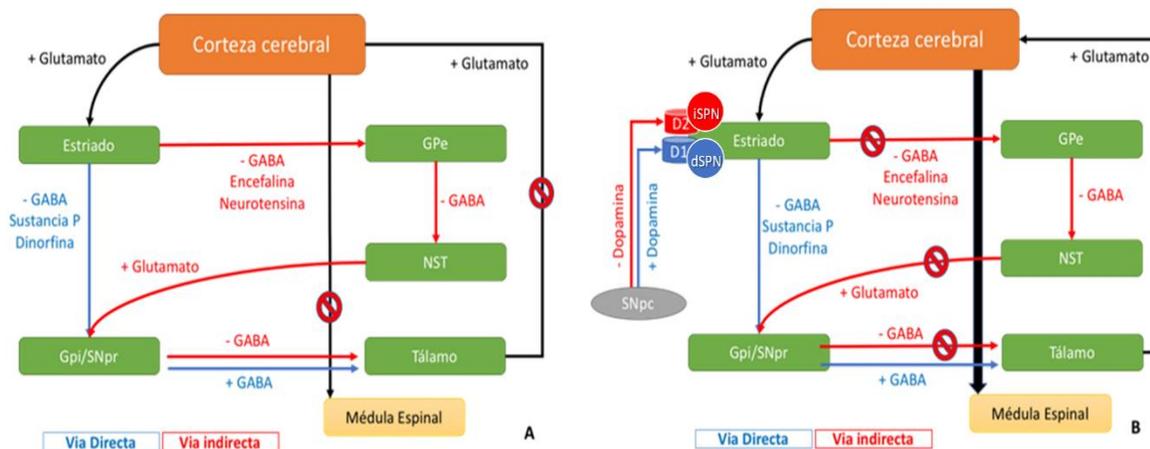


Figura 4. Circuitos neuronales de los ganglios basales: Vías directa e indirecta. A. Vía directa e indirecta de los ganglios basales involucradas en el control del movimiento. B. Modulación de la vía directa e indirecta de los circuitos basales por parte de la dopamina para permitir el movimiento. SNpc: sustancia nigra parte compacta; GPE: globo pálido externo; GPI: globo pálido interno; NST: núcleo subtalámico; SNpr: sustancia nigra parte reticulata; ME: médula espinal; + activador; - inhibidor. dSPN: Proyecciones de neuronas espinosas vía directa; iSPN: Proyecciones de neuronas espinosas vía indirecta, Adaptado de: Ortega-Arellano H. et al., 2019 (44).

1.5. Etiología de la EP

Hasta la fecha no se conoce completamente la etiología de la EP. Los modelos experimentales actuales de EP, que incluyen investigaciones neuropatológicas, análisis genéticos y estudios epidemiológicos, han intentado dilucidar en detalle las causas de la enfermedad de la EP (53-58). En este contexto, se sugiere que la EP es un trastorno multifactorial, lo que significa que interactúan tanto factores ambientales como genéticos. Se cree que los factores genéticos explican solo una pequeña proporción de los casos de EP, alrededor del 5 al 10 % (45) los cuales son llamados Parkinson familiar (EPF) con una edad de inicio temprano, mientras que aproximadamente el 90 al 95 % de los casos parecen ser esporádicos (conocido como EPE), sin una causa genética identificada (46). Estos casos se conocen comúnmente como Parkinson idiopático y se caracterizan por un inicio de la enfermedad en edades avanzadas (más de 65 años). Estudios epidemiológicos, han relacionado claramente a factores ambientales como; la edad (28), la exposición laboral a herbicidas y pesticidas neurotóxicos como la rotenona, paraquat (PQ), maneb (MB) (47) y metales pesados (48), las lesiones cerebrales y el hábito de fumar, con la aparición de las

formas esporádicas. Así mismo, se ha encontrado que la dieta, especialmente en relación con el consumo de ácidos grasos, hierro y el metabolismo de la homocisteína (49, 50) puede contribuir de gran manera en el desarrollo de la EPE. Por otro lado, en la forma de aparición familiar se consideran factores de tipo genético como las mutaciones puntuales o sin sentido en genes específicos.

1.5.1. Factores Ambientales asociados al desarrollo de la EP

Los principales factores ambientales que se han asociado al desarrollo de la EP han sido las toxinas ambientales. En 1983, Langston y Ballard reportaron por primera vez que la toxina ambiental 1-metil-4-fenil,1,2,5,6-tetrahidropiridina, (MPTP) podía inducir la EP, al observar que un producto secundario, el 1-metil-4-fenil piridina (MPP⁺), generado por equivocación durante la síntesis de la meperidina, y consumida en adictos en esa época, actuaba como un narcótico analgésico depresor del sistema nervioso central (SNC) adictivo originando parkinsonismo irreversible en 6 pacientes, con todas sus características clínicas (51).

El MPP⁺ es un inhibidor del Complejo I que puede ser captado selectivamente por las neuronas dopaminérgicas (52). Además del MPTP, una gran variedad de inhibidores del Complejo I mitocondrial, incluyendo el pesticida, insecticida y piscicidas rotenona, inducen parkinsonismo en roedores y primates no humanos, proporcionando una visión importante del papel de la deficiencia del Complejo I en la patogénesis de la EP. Mecanicamente, la rotenona es un potente inhibidor de la actividad del complejo I mitocondrial y, por lo tanto, reduce el consumo de oxígeno y aumentan los déficits bioenergéticos que inducen daños estructurales en las mitocondrias y por consiguiente en las neuronas (47). Asimismo, el herbicida paraquat (N, N'-dimetil-4,4'-bipiridinium) tiene una estructura similar al MPP⁺ y puede generar un modelo tóxico de la EP (49). De hecho, entre todos los herbicidas con potencial neurotóxico estudiados, los hallazgos realizados sobre el paraquat parecen ser los más concluyentes, por lo que la exposición a este herbicida se ha asociado con un mayor riesgo de padecer EP (53). Mas aún, el paraquat se ha utilizado para replicar aspectos de la patología de la EP en modelos animales, incluyendo la pérdida de neuronas dopaminérgicas y la acumulación de sinucleína, mediante la inducción de estrés oxidativo y neuroinflamación (54-56) . Por último, el fungicida Etileno-bis-ditiocarbamato de manganeso (Mn-EBDC)-maneb (MB) posee un mecanismo neurotóxico muy similar a la Rotenona y Paraquat que incluye estrés oxidativo (57) e inhibición mitocondrial (58), debido a su afinidad por el complejo I y III en la cadena de transporte de electrones.

1.5.1.1. Pesticidas: Rotenona (ROT)

La rotenona es un pesticida, inhibidor del complejo I mitocondrial altamente selectivo y bien caracterizado como uno de los neurotóxicos asociados a la EP. Se encuentra de forma natural en las raíces de varias especies de plantas, como estrategia de defensa endógena frente a los

insectos(59). En 1902, el botánico japonés Kazuo Nagai, aisló este compuesto de la planta *Derris elliptica*, a la que denominó rotenona por el nombre “*roten*” que en Japonés corresponde a “*Derris*”, el género de la planta de donde se obtuvo (60). Sin embargo, no fue sino hasta 1947 que la rotenona fue registrada convirtiéndose en uno de los pesticidas, insecticidas y piscicidas más utilizados en todo el mundo.

Aunque la rotenona tiene una vida media relativamente corta en el medio ambiente y un uso comercial limitado, estudios epidemiológicos realizados en Francia, Australia y EEUU, han vinculado la exposición ambiental crónica a la rotenona con un mayor riesgo de desarrollar EP (53, 61-63). Adicionalmente, estos estudios encontraron diferencias de género, indicando un mayor riesgo en hombres expuestos a la rotenona a padecer EP en comparación con las mujeres (64). Los resultados sugieren entonces que el riesgo de EP aumenta en agricultores expuestos a ciertos pesticidas como la rotenona (61).

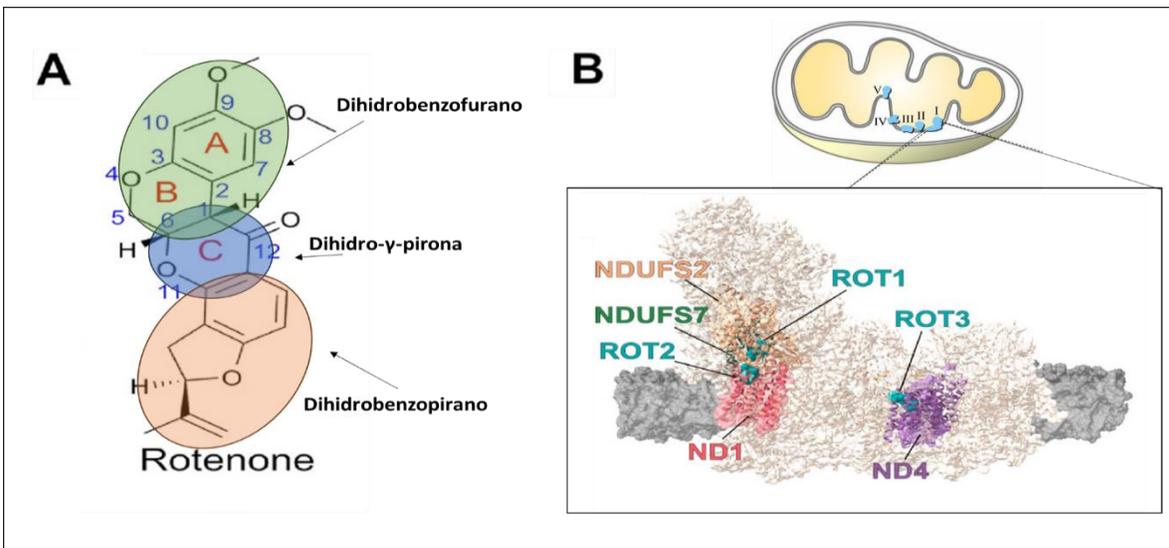


Figura 5. La Rotenona (ROT), estructura y mecanismo de acción sobre el complejo I mitocondrial en las neuronas dopaminérgicas. A. Estructura química que muestra que la ROT contiene un anillo central de di-hidro- γ -pirona central con un sistema dihidrobenzopirano a la izquierda y un sistema de dihidrobenzofurano a la derecha. B. Sitios de unión de la rotenona (ROT1, ROT2, ROT3) dentro del complejo I de la cadena transportadora de electrones mitocondrial. Tomado y adaptado de Pereira et al., 2023 (68).

Recientemente, se ha propuesto una serie de mecanismos moleculares asociados a las consecuencias adversas de la rotenona que destacan a la inhibición del complejo I mitocondrial como el evento iniciador que más se asocia con el riesgo a desarrollar EP tras la exposición. Estos mecanismos se basan en los efectos de la Rotenona a nivel de la disfunción mitocondrial, la alteración de la proteóstasis, la neuroinflamación y la degeneración de las neuronas dopaminérgicas los cuales son eventos clave indicativos del inicio de la enfermedad (65).

Con el vínculo establecido entre la inhibición del Complejo I y la EP, la rotenona ha ganado una atención significativa como agente potencialmente causante de EP y como posible

herramienta para el modelamiento de la EP. De hecho, parte de su mecanismo neurotóxico se debe a su estructura química la cual está conformada por anillos hexagonales centrales; un anillo de dihidro- γ -pirona central con un sistema dihidrobenzopirano a la izquierda y un sistema de dihidrobenzofurano a la derecha (66) (Fig. 5A). Esta estructura permite que ROT se una a tres sitios de unión dentro del complejo I, los dos primeros sitios de unión de la ROT se ubican en el bolsillo del complejo I, el primero es donde se une la ubiquinona (ROT1), el segundo se ubica en la región de la subunidad ND1 (ROT2) y el tercer sitio se ubica lejos del bolsillo de unión a la ubiquinona, en la subunidad ND4 (ROT3) (67, 68)(Fig. 5B). Una vez se ocupan los 3 sitios de unión de la ROT en el complejo I (Fig 5B) (69-71) se bloquea la transferencia de electrones del complejo I a la ubiquinona, deteniendo la producción de ATP (71, 72).

El mecanismo anterior implica la interrupción de la cadena transportadora de electrones, inhibición de la fosforilación oxidativa, y la excitotoxicidad celular mediada por Ca^{2+} que resulta en la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS, v.gr. H_2O_2), estrés oxidativo (71-73), disminución de los sistemas de defensa antioxidante celular y daño oxidativo en macromoléculas celulares como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (74). Adicionalmente, se ha evidenciado que la inhibición de la funcionalidad mitocondrial por la acción de la neurotoxina ROT afecta la transición de permeabilidad mitocondrial (mPT) por la formación de poros en la membrana externa mitocondrial y la activación de vías apoptóticas.

Es importante destacar que la ROT induce la degeneración específica de las neuronas DA y la agregación de alfa sinucleína intracelular *in vitro* e *in vivo* (47, 75, 76), contribuyendo a la muerte celular (77). En modelos *in vitro*, más específicamente en células PC12 (derivadas de un feocromocitoma de la médula suprarrenal de rata), el tratamiento crónico de 48 horas con rotenona conduce a la muerte celular mediada por la oxidación de la dopamina (78) y la exposición a este tóxico altera potentemente la autofagia y promueve la agregación de α -sinucleína (77). La ROT de hecho, puede desregular múltiples funciones mitocondriales esenciales para el mantenimiento mitocondrial. Por ejemplo, las células neuronales tratadas con rotenona presentan mitofagia (proceso especializado que degrada selectivamente las mitocondrias dañadas) que implica la externalización del lípido mitocondrial cardiolipina (CL) a la superficie mitocondrial y el posterior reclutamiento de la maquinaria autofágica a través de una interacción entre cardiolipina y la proteína microtúbular de cadena ligera 3, LC3 (79). Un estudio similar del mismo grupo reforzó la importancia de la interacción CL-LC3 como señal para la mitofagia inducida por rotenona en células SH-SY5Y, una línea humana de neuroblastoma (80).

Más allá del proceso de mitofagia, se ha encontrado que la ROT también puede potenciar la autofagia e inducir la muerte celular a través de mecanismos mediados por ROS en células HeLa y en SH-SY5Y. Sin embargo, en astrocitos primarios de ratón, la ROT no consigue

aumentar significativamente los niveles de ROS ni la autofagia (81). Así mismo, se ha reportado que las ROS inducidas por la ROT pueden inhibir el flujo autofágico en células SH-SY5Y diferenciadas y en células PC-12 (82, 83), mientras que en las HEK-293, la ROT induce EO, daño mitocondrial y muerte celular apoptótica independientemente de la acumulación de lisosomas y autofagolisosomas (84). Estos diversos resultados reflejan una ausencia en la determinación de un mecanismo concreto que explique el efecto de la ROT o de sus subproductos como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) sobre la autofagia, mitofagia, y muerte celular u otros mecanismos asociados a la vulnerabilidad y pérdida neuronal dopaminérgica, lo cual podría deberse a diversos factores como los sistemas celulares analizados (cultivos primarios frente a líneas celulares), el tiempo de exposición (aguda frente a crónica), la dosis (baja frente a alta), y/o el tipo de modelo (*in vitro* frente a *in vivo*).

1.5.1.2. Herbicidas: Paraquat (PQ) (*N, N'*-dimetil-4,4'-bipiridinium)

El Paraquat (PQ, *N, N'*-dimetil-4,4'-bipiridinium) conocido como viológeno de metilo, es un catión orgánico de amonio cuaternario derivado de un hidruro de 4,4'-bipiridina que se ha utilizado como indicador redox. Su estructura está formada por dos anillos de piridina (4,4'-bipiridina) con dos sustituyentes *N*-metilados en las posiciones 1- y 1'- (Fig. 6). Desde 1957, se ha explorado su utilidad como herbicida, y se caracteriza por ser un compuesto altamente soluble en agua, no volátil y térmicamente estable. En años posteriores, se demostró que la exposición prolongada a dosis bajas de PQ constituye un riesgo ambiental para el desarrollo de la EP (85, 86). Además, se encontró que la exposición al paraquat dentro de los 500 metros del lugar de trabajo y el hogar se asocia con riesgo de EP (OR 1.50, IC 95% 1.03-2.18)(87).

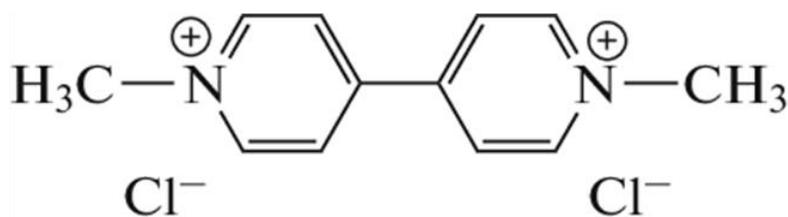


Figura 6. Estructura química del Paraquat. 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridinio diclorhidrido. Imagen Fuente: Pubchem: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Paraquat>

El PQ inicialmente es absorbido por la piel y se acumula mayoritariamente en riñón y pulmones donde causa toxicidad (88). Posteriormente el PQ puede ser, activamente transportado a través de la barrera hematoencefálica por el mismo transportador de aminoácidos neutros o sistema denominado LAT-1 usado por L-valina y L-dopa (89, 90). Una vez en el cerebro, el PQ²⁺ es reducido extracelularmente a PQ⁺¹, por la NADPH-

oxidasa presente en la microglía. En este estado reducido, se convierte en el sustrato del transportador de dopamina (DAT) y del transportador catiónico orgánico-3 (Oct-3) por medio de los cuales ingresa a la neurona donde realiza un nuevo ciclo de óxido-reducción (91). Intracelularmente, en las neuronas, el PQ induce EO por medio de la producción de aniones superóxido a través del ciclo redox (55). Particularmente, se ha evidenciado que el PQ afecta específicamente las neuronas dopaminérgicas, dada la selectividad de su captación como sustrato por el transportador DAT, lo que hace altamente vulnerables a las neuronas dopaminérgicas, ya que se pueden generar i) altas cantidades de ROS que a su vez, estimulan la oxidación y autooxidación de la dopamina, y pueden formar aductos con grupos tiol de las proteínas como la glutatión y con DNA (92, 93). De igual forma, la vulnerabilidad neuronal se aumenta por el ii) incremento de la actividad de respiración aeróbica (94), y por la iii) producción de radical Hidroxil ($\text{HO}\cdot$) a través de la reacción de Fenton debido a la alta concentración de hierro en la sustancia nigra (95, 96). De esta manera la alta producción de ROS, limita los recursos metabólicos encargados de la degradación de proteínas, la remoción y reemplazo de lípidos oxidados ((97, 98) y de la reparación del ADN dañado. Las neuronas que no pueden compensar esta disfunción entran en procesos de muerte celular programada como la apoptosis o necrosis bajo condiciones extremas (99) (Fig. 7).

Adicionalmente, se ha demostrado que el PQ induce la oxidación de la tiorredoxina (Trx) vía la activación de la ASK/JNK (100). De acuerdo con este mecanismo, los niveles bajos de Trx determina la sensibilidad neuronal a la toxicidad del PQ inducida por la activación de la señalización ASK1/JNKp38. Dentro de esta cadena de eventos moleculares de toxicidad del PQ, se ha evidenciado la peroxidación de lípidos, la nitración de la tirosina (55, 56, 101); la agregación de la proteína de membrana plasmática ATPasa (PMCA) y su degradación por medio de calpaínas como consecuencia del EO inducido por PQ (Fig. 7) (102).

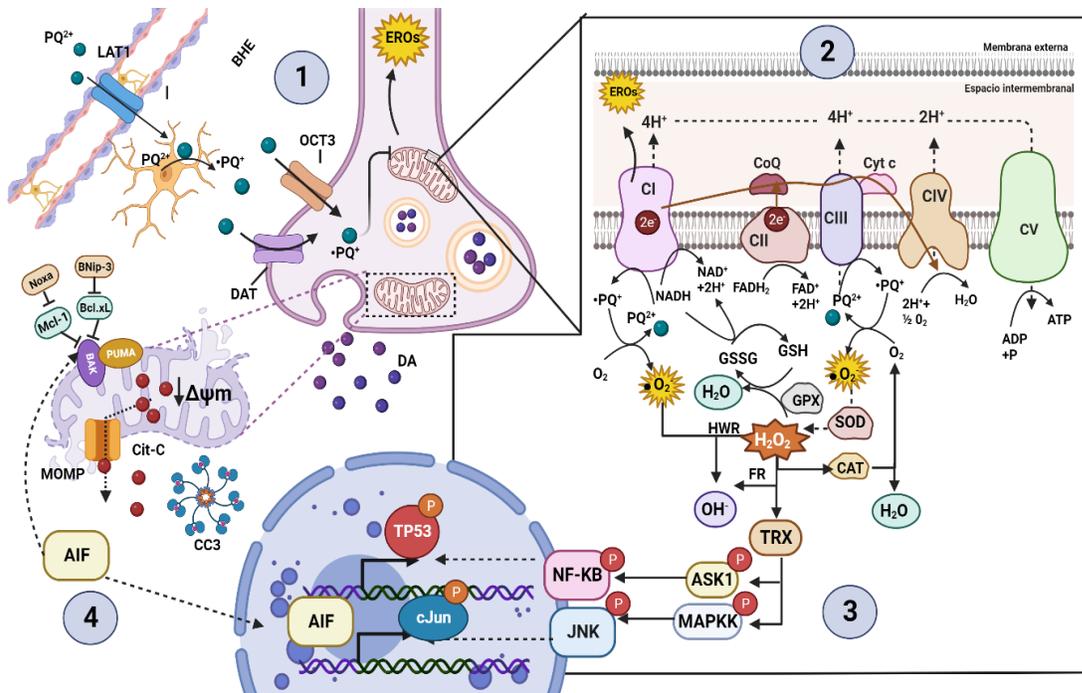


Figura 7. Mecanismo de acción del Paraquat. 1) El PQ^{2+} atraviesa fácilmente la barrera hematoencefálica a través del transportador de aminoácidos neutros (LAT1) y es captado por la microglía cercana, que posteriormente lo convierte en $\bullet PQ^+$ a través de la NADPH oxidasa. El $\bullet PQ^+$ es absorbido por DAT u OCT3 en las neuronas DA. 2) Dentro de las neuronas, el PQ genera ROS mediante ciclos redox en CI y CIII de la cadena de transporte de electrones mitocondrial CTE afectando la producción de energía. ROS como el H_2O_2 en la activación de cascadas de señalización de muerte celular. 3) El estrés oxidativo desencadena la inducción del estrés del retículo endoplasmático y la activación de la enzima 1 que requiere inositol (IRE1), activando a continuación la cascada de señalización ASK1/JNK. La PQ induce una disminución dosis-dependiente de los niveles de Trx que conduce a un aumento de ASK1 fosforilada. 4) La fosforilación de JNK induce el factor de transcripción p53 que conduce a la activación/inducción de los miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2 que culminan en la apoptosis. **BHE:** Barrera Hematoencefálica; **LAT-1:** Transportador de Aminoácidos Neutros; **DAT:** Transportador de Dopamina; **SOD:** Superóxido Dismutasa; **FR:** Reacción de Fenton; **HWR:** Reacción Haber Weiss; **CAT:** Catalasa; **GPX:** Glutacion Peroxidasa. **CI:** Complejo I, **CII:** Complejo II, **CIII:** Complejo III, **CIV:** Complejo IV, **CIV:** Complejo IV. Fuente: Autor, Creado con Biorender.

1.5.1.3. Fungicidas Maneb (MB)

El maneb (MB) es un complejo polimérico de manganeso con el ligando aniónico de etileno bis (etilen 1,2-bisditiocarbamato o etilenbisditiocarbamato de manganeso Fig. 8), pertenece a la variedad de fungicidas ditiocarbamatos, comúnmente usados para proteger los cultivos de plantas contra plagas de origen fúngico(103, 104). La toxicidad del MB, en humanos, ocurre por exposición oral y dérmica. Los estudios epidemiológicos muestran que la exposición a MB se asocia con un mayor riesgo de EP (53, 105). Estos datos, han ido incrementando la preocupación sobre los efectos del MB en la salud de la población en general (106). Se ha encontrado que el MB induce toxicidad y neurotoxicidad durante el desarrollo embrionario en modelos animales (107). De hecho, diversos hallazgos soportan la idea que la exposición a MB causa defectos motores similares a la EP en modelos de roedores (108, 109) e induce neurodegeneración selectiva en neuronas dopaminérgicas en cerebros de ratones (110).

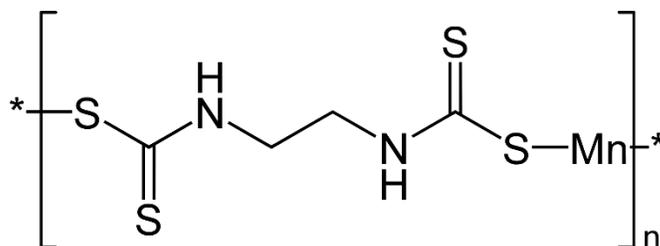


Figura 8. Estructura química del MANEB etilen 1,2-bisditiocarbamato... Imagen Fuente: Pubchem: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3032581>.

Más específicamente, se ha demostrado que el MB exagera la condición prooxidante a través de su capacidad para interrumpir el sistema antioxidante del glutatión en las neuronas dopaminérgicas(111), cataliza la autooxidación de DA (112) y perturba la función mitocondrial, actuando como un desacoplador e inhibidor de los complejos I y III de la cadena transportadora de electrones(113-115). Recientemente, también se ha encontrado que el MB altera la función mitocondrial al dirigirse a las enzimas mitocondriales con tioles de cisteína reactivos y alterar su redox tiol(116). Adicionalmente, se ha descubierto que el MB disminuye la expresión de Bcl2, el potencial de membrana mitocondrial desencadenando EO y aumenta la expresión de Bax, citocromo c y caspasa-3 activada lo que sugiere la activación de la vía de apoptosis mitocondrial(117),(118, 119). Adicionalmente, se ha demostrado que la exposición de las células dopaminérgicas al MB no solo produce una neurotoxicidad significativa, sino también una disminución de la función proteasomal que conduce a la agregación de α -sinucleína y la formación de inclusiones citoplasmáticas o cuerpos de Lewy (117, 120).

1.5.1.4. *El PQ y MB*

Estudios epidemiológicos en zonas geográficamente cercanas, mostraron que los trabajadores rurales expuestos a ambos pesticidas PQ y MB, aumentaron un 75% el riesgo a desarrollar la EP (121). Estos hallazgos habían sido demostrados en modelos murinos, en donde se observó que la exposición de la combinación del PQ y el MB inducía un aumento de la patología neuronal de la sustancia nigra, la degeneración motora dependiente de la edad, reducción progresiva de los metabolitos de la dopamina, y reducción de la inmunoreactividad de la tirosina hidroxilasa y del transportador de dopamina (122, 123).

Se ha encontrado que el PQ y el MB tienen mecanismos de toxicidad que actúan sinérgicamente (124-126). Fei y Ehtell (2008) descubrieron que el MB potencia la neurotoxicidad de la PQ desencadenando la muerte celular dependiente de Bax a través de la activación de tres fuertes inhibidores de Bak, Bfl-1, Bcl-xL y Mcl-1, además de inducir activadores de Bax que incluyen Bik y Bim (127). Estos hallazgos podrían explicar el posible mecanismo sinérgico entre PQ y maneb y proporciona pruebas que los 2 pesticidas, actúan sinérgicamente para convertirse en neurotóxicos aumentando el riesgo de EP en humanos,

especialmente cuando la exposición combinada ocurre en etapas tempranas de la vida. Por tanto, la combinación de PQ y MB constituye una excelente herramienta para modelar in vitro la EP inducida por toxinas ambientales y para la identificación de dianas y/o la evaluación de nuevas moléculas terapéuticas.

1.5.2. Factores Genéticos asociados al desarrollo de la EP

En 1898, Gowers describió por primera vez la contribución genética al desarrollo de la EP, al observar que el 15% de sus pacientes tenían una historia familiar (128). Posteriormente, un estudio en familias Griegas e Italianas encontró que la EP se distribuía de manera autosómica dominante aportando al descubrimiento del primer gen con incidencia directa en esta enfermedad denominado SNCA, locus PARK1 que codifica para la proteína α -Sinucleína (129) confirmando la contribución de factores genéticos en el desarrollo de la EP.

A partir de estos primeros hallazgos en 1997 y varias investigaciones en epidemiología de la EP, estudios de ligamiento y de asociación del genoma completo (de la sigla en inglés, GWAS, Genome-wide association studies) llevadas a cabo por colaboraciones internacionales, se ha logrado determinar que alrededor del 10% de los pacientes con EP presentan un origen hereditario preciso, relacionado con mutaciones en genes específicos que desencadenan formas mendelianas de la EP (Tabla 1)(130). Hasta el momento, se han identificado aproximadamente 23 áreas cromosómicas distintas vinculadas con la EP. No obstante, el Comité de Nomenclatura de Genes HUGO ha identificado 18 genes que han demostrado ser agentes causales de la EP, incluyendo 9 genes autosómicos dominantes (*SNCA*, *LRRK2*, *GBA*, *VPS35*, *POLG*, *DNAJC13*, *TMEM230*, *CHCHD2*, *DCTN1*) y 9 genes autosómicos recesivos (*PINK*, *PARK7*, *PRKN*, *ATP13A2*, *FBX07*, *PLA2G6*, *DNAJC13*, *SYNJ1*, *VPS13C*) que dan origen a la EP de tipo monogénico o enfermedad de Parkinson Familiar (EPF). Adicionalmente, los estudios de asociación han revelado varios loci y variantes genéticas únicas que se comportan como un fuerte factor de riesgo para la EP esporádica(131, 132).

Es importante resaltar, que se ha demostrado que los factores genéticos de riesgo y esporádicos en los pacientes con EP, convergen en mecanismos de disfunción mitocondrial, EO, mal plegamiento y agregación proteica que conducen finalmente a procesos de neurodegeneración y muerte celular (28). Estos descubrimientos han direccionado la investigación hacia la búsqueda de nuevos blancos moleculares que regulen la expresión de genes específicos, con fines terapéuticos (Tabla 1)(133).

Tabla 1. Genes implicados en la enfermedad de Parkinson. Tomado de Day et al., 2021 (131) .

| | Gen (HGNC Nombre aprobado) | Nombre alternativo del gen | Patrón de herencia | Patogenicidad | Fenotipo EP | Función |
|--|----------------------------------|---|-----------------------|------------------------------------|-----------------------------|--|
| Alta penetrancia | <i>SNCA</i> | <i>PARK1,</i> <i>PARK4,</i> <i>NCAP</i> | AD | Patogénica | Inicio temprano | Incierto (codifica para la α -sinucleína) |
| | <i>VPS35</i> | <i>PARK17,</i> <i>MEM3</i> | AD | Patogénica | Típico(tardío) | Tráfico retromero and endosomal |
| | <i>PINK1</i> | <i>PARK6</i> | AR | Patogénica | Inicio temprano | Mitocondrial |
| | <i>PARK7</i> | <i>DJ-1</i> | AR | Patogénica | Inicio temprano | |
| | <i>PRKN</i> | <i>PARK2,</i> <i>PARKIN</i> | AR | Patogénica | Inicio temprano | |
| | <i>PLA2G6</i> | <i>PARK14,</i> <i>IPLA2</i> | AR | Patogénica | inicio temprano, atípico | Membrana celular |
| | <i>ATP13A2</i> | <i>PARK9</i> | AR | Patogénica | inicio temprano, atípico | Lisosomal |
| | <i>FBXO7</i> | <i>PARK15,</i> <i>FBX7</i> | AR | Patogénica | inicio temprano, atípico | Mitocondrial |
| | <i>POLG</i> | <i>POLG1,</i> <i>POLGA</i> | AD | Patogénica | inicio temprano, atípico | Mitocondrial mantenimiento del DNA |
| | <i>DNAJC6</i> | <i>PARK19,</i> <i>DJC6</i> | AR | Probablemente patogénica | Inicio temprano | Formación de la vesícula sináptica y tráfico vesicular |
| | <i>DNAJC13</i> | <i>PARK21,</i> <i>RME8</i> | AD | Conflicto en reportes | Típico(tardío) | |
| | <i>TMEM230</i> | <i>C20ORF30</i> | AD | Conflicto en reportes | Típico(tardío) | |
| | <i>SYNJ1</i> | <i>PARK20</i> | AR | Patogénica | inicio temprano, atípico | |
| | <i>VPS13C</i> | <i>PARK23</i> | AR | Patogénica | Inicio temprano | Mitocondrial |
| <i>CHCHD2</i> | - | AD | Patogénica | Típico(tardío) | Incierto | |
| <i>DCTN1</i> | - | AD | Patogénica | atípico | Microtúbulo | |
| Penetrancia variable | <i>LRRK2</i> | <i>PARK8,</i> <i>DARDARIN</i> | AD | Patogénica | Típico(tardío) | Lisosomal, mitocondrial, microtúbulo |
| | <i>GBA</i> | <i>GBA1</i> | AD | Patogénica | Típico(tardío) | Lisosomal |
| Asociada con la EP pero no patogénica | <i>HTRA2</i> | - | AD | Incierto/Probable mente benigna | - | Mitocondrial |
| | <i>UCHL1</i> | <i>PARK5</i> | AD | Incierto/Probable mente benigna | - | Ubiquitina/proteoso mal |
| | <i>GIGYF2</i> | <i>PARK11</i> | AD | Incierto/Probable mente benigna | - | Incierto |
| | <i>EIF4G1</i> | - | AD | Benigna | - | translación de mRNA |
| | <i>LRP10</i> | <i>LRP9</i> | AD | Incierto | - | Incierto |

AD = autosómico dominante, AR = autosómico recesivo, HNGC = HUGO Gene Nomenclature Committee.

1.5.2.1. La EP Autosómica recesiva (EP-AR)

La EP con herencia autosómica recesiva difiere de las otras formas de EP en las siguientes características. i) Presenta una edad de inicio temprano, en la mayoría de los casos antes de los 40 años; tiene una ii) progresión lenta; iii) tiene excelente respuesta a la levodopa, a pesar de las discinesias tempranas inducidas por este fármaco; y presencia de iv) deterioro cognitivo mínimo debido a que la autonomía del paciente perdura, lo cual es coherente con la neurodegeneración selectiva de las neuronas dopaminérgicas en el cerebro. Esta correlación clínica-patológica ha sido confirmada por los pocos estudios neuropatológicos realizados en autopsias de los casos disponibles. Los únicos casos de formas recesivas autosómicas de la EP que han sido examinadas post mortem en cortes del cerebro son de mutaciones de los genes de la Parkina, y de PINK1(134).

1.5.2.1.1. PARK2, parkina: Ubiquitina E3 ligasa

El gen *PARK2* o *PRKN* (OMIM#602544) está ubicado en la región cromosómica 6q25.2-27, se compone por 12 exones separados por grandes regiones intrónicas con una extensión de 1,53Mb. Se han registrado alrededor de 147 mutaciones, mayormente deleciones o duplicaciones en uno o más exones, aunque también se presentan cambios de un solo nucleótido y deleciones menores (135, 136)

El gen *PRKN* codifica para una proteína llamada parkina con actividad ubiquitina ligasa E3, por lo cual su expresión puede estar involucrada en vías de ubiquitinación afectando la degradación de proteínas anormales por medio del proteosoma (137). La función de la ubiquitina ligasa E3 en su estado normal genera la degradación de la α -sinucleína glicosilada, así como de otras proteínas cuya acumulación tiene efectos neurotóxicos (138). Así mismo, la Parkina se ha vinculado a través de funciones mitocondriales con efectos antiapoptóticos, evitando la liberación de citocromo c y la muerte celular por EO.

Por lo tanto, las mutaciones en el gen *PRKN* traen como consecuencia la pérdida de actividad de la enzima ubiquitina ligasa E3, generando una acumulación de proteínas no ubiquitinadas que conducen a EO, disfunción mitocondrial y muerte temprana de las neuronas dopaminérgicas, sin la formación de los cuerpos de Lewy, siendo estas las principales causas del Enfermedad de Parkinson Juvenil autosómico recesivo (EPJAR-JP).

En Colombia, en la región nordeste del departamento de Antioquia, se han identificado cuatro mutaciones en el gen *PRKN*: i) la inserción c.321-322insGT de origen francés, ii) la deleción c255delA, iii) la duplicación del exón 3; y iv) la mutación C212Y, que consiste en el cambio de una cisteína por una tirosina en el codón 212 (g.736G>A, exón 6), encontradas en 6 familias (139-141). Todas las anteriores mutaciones están asociadas con la EPJAR-JP, con un rango de aparición temprana entre los 13 y 43 años.

1.5.2.1.2. PARK6, PINK 1

El gen *PINK1* (Proteína quinasa 1 putativa inducida por PTEN- PARK6) está localizado en el cromosoma 1 en la posición 1p36.12, tiene 8 exones, teniendo una extensión de 18Mb, que codifican para una proteína de 581 aminoácidos que contiene una secuencia N-terminal de orientación mitocondrial (MTS), un dominio transmembrana (TM), un dominio regulador N-terminal (NT), un dominio conservado de proteína quinasa que comprende un lóbulo N y un lóbulo C, y por último un dominio C-terminal (CTD)(142, 143). Funcionalmente, PINK1 está relacionado con la homeostasis mitocondrial en respuesta al EO, ya que induce la mitofagia y regula la bioenergética los cuales inciden directamente en la morfología mitocondrial (procesos de fisión y fusión). (144).

Hasta el presente, según los informes de la base de datos MDSGene, se han descrito en todo el mundo 151 portadores de la mutación *PINK1*, con un total de 62 variantes de secuencia diferentes causantes de la enfermedad implicadas tanto en la EP esporádica como en la familiar, incluyendo 13 mutaciones definitivamente patogénicas, 44 probablemente patogénicas y 5 patogénicas (143). El gen de la fosfatasa homóloga de la tensina (PTEN) que induce la quinasa I PINK fue descubierta en una familia Italiana con casos familiares de EP. Estudios funcionales *in vitro*, han demostrado que PINK1 se localiza en las mitocondrias. La proteína PINK1 de tipo salvaje parece ser importante en la neuroprotección reduciendo la disfunción mitocondrial y la apoptosis inducida por el proteosoma (136, 145).

1.5.2.1.3. PARK7, DJ-1

El gen *PARK7* o *DJ-1* está localizado en la región cromosómica 1p36 y está compuesto por 8 exones distribuidos en 24 kb que codifican una proteína de 189 aminoácidos homodimérica de la familia de las peptidasas C56 conocida como DJ-1(146). Los dos primeros exones (1A y 1B) son no codificantes y se empalman alternativamente en el gen DJ-1. Normalmente, esta proteína se encuentra en el citoplasma donde funciona como chaperona (147); sin embargo, también puede translocarse a la mitocondria cumpliendo un función como antioxidante (148), cuya actividad depende de un residuo de cisteína en la posición 106 y del estado de oxidación de los enlaces de disulfuro (149).

Las mutaciones en el gen DJ-1 son una de las causas menos conocidas del parkinsonismo autosómico recesivo, representando solo el 1% de los casos de aparición temprana de la enfermedad de Parkinson. Estas mutaciones fueron identificadas a través del mapeo genético de dos familias consanguíneas procedentes de comunidades genéticamente aisladas en los Países Bajos e Italia. (150). Se ha observado que las mutaciones asociadas con este gen se encuentran tanto en estado heterocigoto como homocigoto, lo que resulta en la pérdida de función de la proteína (146, 151).

1.5.2.1.4. Los genes *PINK1*, *DJ-1*, y su relación con *PRKN*

Los genes vinculados a la enfermedad de Parkinson *PINK1*, *DJ-1* y *PRKN* desempeñan roles fundamentales en la biología, regulación y mantenimiento de las mitocondrias (152). La proteína PINK1 se localiza en las mitocondrias y se ha demostrado su capacidad para fosforilar proteínas mitocondriales en respuesta al estrés oxidativo celular, lo que contribuye a proteger contra la disfunción mitocondrial. Además, se ha observado su relación indirecta con el metabolismo de lípidos y la biogénesis mitocondrial. Estudios previos realizados por Xiong et al. en 2009 evidenciaron que PINK1 aumenta la actividad de PARKINA, la cual es degradada a través del sistema de ubiquitina-proteasoma (153).

Se ha planteado la hipótesis que DJ-1 y PINK1 colaboran para resguardar a la célula del estrés que induce apoptosis, contribuyendo con la regulación y actividad de la ubiquitina de la PARKINA (154). Finalmente, se ha comprobado que las proteínas codificadas por los genes *PINK1*, *PRKN* y *DJ-1* interactúan formando un complejo funcional de ubiquitina E3 ligasa en neuronas primarias humanas, con un peso molecular aproximado de 200 kD (155).

1.5.2.2. EP Autosómica Dominante (EPAD)

Los genes dominantes suelen ser detectados mediante clonación posicional en linajes familiares extensos a lo largo de múltiples generaciones. Diversas evidencias de estudios clínicos y genéticos sugieren su asociación con la enfermedad dado que : 1) la mutación se hereda de manera clara junto con la enfermedad; 2) esta mutación no se encuentra comúnmente en un gran conjunto de individuos sanos utilizados como controles; 3) normalmente se localiza en un área importante del gen que codifica la proteína; 4) estas mutaciones suelen ser altamente conservadas a lo largo de diferentes especies; 5) observaciones experimentales, tanto in vitro como in vivo, muestran que la mutación perturba funciones celulares o aumenta la muerte celular (140).

1.5.2.2.1. *PARK1/PARK4*, α sinucleína (*SNCA*)

El gen *PARK1/PARK4* o *SNCA* está localizado en la región cromosómica 4q21.3-q22, conformada por 5 exones con una longitud total de transcripción de 3041 bps que codifican para la proteína SNCA de 14,5 kDa y 140 aminoácidos. El *SNCA* inicialmente identificado y considerado como el principal gen causante de la enfermedad la EP autosómica dominante de la aparición temprana (EPAD). Se han reportado, como mínimo, 19 variantes patogénicas en el gen *SNCA* (136).

El gen *SNCA* codifica para la proteína α -sinucleína que se expresa específicamente en las terminaciones nerviosas presinápticas (129). La α -sinucleína puede contribuir a la

patogénesis de la EP de varias maneras, pero generalmente se piensa que sus conformaciones oligoméricas solubles aberrantes, denominadas protofibrillas, son las especies tóxicas que median la alteración de la homeostasis celular y la muerte neuronal, a través de efectos sobre varios blancos intracelulares, alterando la función sináptica. Además, la α -sinucleína secretada puede ejercer efectos deletéreos en las células vecinas, contribuyendo así posiblemente a la propagación de la enfermedad (156).

1.6. La LRRK2: QUINASA CON REPETICIONES RICAS EN LEUCINA

El gen de la quinasa rica en repeticiones de leucina 2 (*LRRK2*), fue clonado por primera vez en 2004 e identificado el producto génico responsable del subtipo genético autosómico dominante más común y un determinante importante en la fisiopatología de la EP (157, 158).

El gen *LRRK2* se encuentra ubicado en el brazo largo q del cromosoma 12 en la posición 12 (12.q12), con 51 exones, que codifican para una proteína también conocida como dardarina (proveniente de la palabra vasca “*Dardarin*” que significa “temblor”) (Fig. 9). El *LRRK2* se expresa en el sistema nervioso en las regiones del cerebro tales como: la corteza, el estriado, el hipocampo, el cerebelo y en las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra pars compacta (SNpc)(159). También puede detectarse en niveles más bajos en astrocitos y microglía, donde su expresión puede ser inducida por estímulos inflamatorios (160, 161). En las neuronas, la proteína del *LRRK2* se localiza principalmente en las estructuras vesiculares y membranas intracelulares (v.gr., endosomas, lisosomas, cuerpos multi-vesiculares, membrana externa mitocondrial, balsas lipídicas, vesículas de transporte asociadas a los microtúbulos, en los sinaptosomas, en el complejo de Golgi y el retículo endoplásmico) (162).

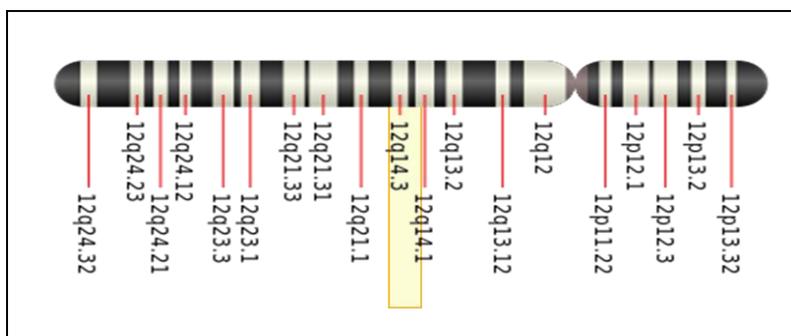


Figura 9. Representación esquemática de la ubicación citogenética del gen *LRRK2*. Posición en el brazo largo q del cromosoma 12 donde se encuentra el locus *PARK8* correspondiente al gen *LRRK2*. Fuente: National Library of Medicine. <http://ghr.nlm.nih.gov/chromosome=12>

1.6.1. Estructura de la LRRK2

La proteína quinasa *LRRK2* está compuesta por un multidominio de 2.527 aminoácidos y un peso molecular de 280 kDa. Esta quinasa pertenece a la familia de proteínas ROCO, las cuales se caracterizan por contener un dominio característico de GTPasa o complejo Ras (ROC) adyacente a su región de unión C-terminal (COR). *LRRK2* también contiene un

dominio de proteína quinasa serina/treonina y varios dominios putativos de interacción proteína-proteína flanqueando la región catalítica central de ROC-COR-quinasa. También posee en la parte C terminal el dominio WD40 y en el extremo N-terminal, un dominio de repeticiones ricas en leucina (LRR) y el dominio de ankirina (Fig.10)(163).

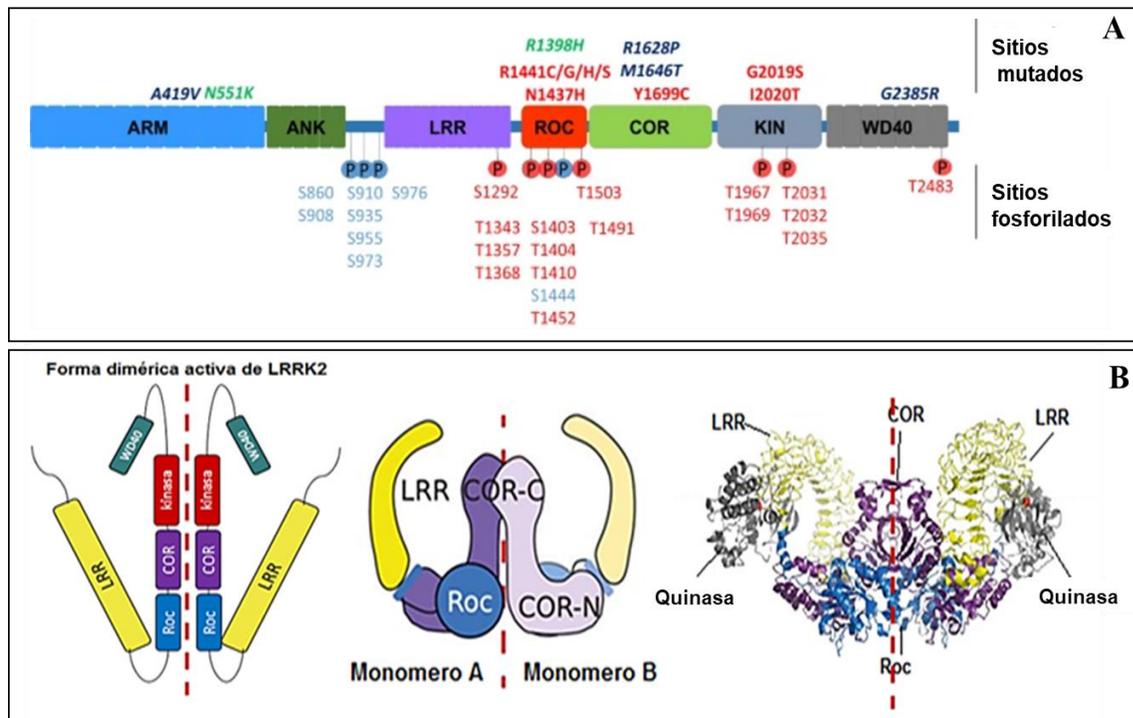


Figura 10. Estructura de la quinasa del LRRK2 con los dominios en su forma monomérica y dimérica. A) Esquema de la estructura de los dominios de LRRK2 en su forma monomérica, sobre el esquema de los dominios de la proteína, se indican las sustituciones de aminoácidos incluyendo, tanto las variantes patogénicas (rojo), las variantes de riesgo (azul), como las variantes que confieren un riesgo reducido de EP (verde). Los residuos fosforilados se muestran debajo del esquema de los dominios de la proteína, con los residuos fosforilados heterólogos en azul y los sitios de autofosforilación en rojo. **B)** Muestra de izquierda a derecha: la forma dimérica activa de LRRK2 vista frontal, esquemática y superior del módulo dimérico; monómero A LRR-Roc, monómero B COR (LRR, amarillo; Roc, azul; subdominios N-/C-terminal, subdominio quinasa, rojo; COR, violeta). Tomada de Taymans et al, 2023 (158).

1.6.2. Mecanismos moleculares de activación del LRRK2

La quinasa LRRK2 es una proteína con una alta capacidad de fosforilación debido a los numerosos residuos que posee y que pueden sufrir autofosforilación o hetero-fosforilación (164, 165). Esta quinasa se presenta predominantemente en estructura dimérica, lo que indica que la dimerización es necesaria para su actividad quinasa y para su localización a membranas celulares (166). Esta conformación dimérica se presenta gracias a i) la autofosforilación de la proteína a través de eventos intramoleculares (cis) (167), o a ii) la interacción con otras proteínas (v.gr. c proteína adaptadora 14-3-3). La mayoría de los sitios de autofosforilación residen en el dominio ROC, y unos pocos sitios se encuentran en los dominios COR y quinasa. Estudios *in vitro* han demostrado autofosforilación en los residuos treonina 1410 (T1410) (168) y serina 1292 (S1292) (167) del dominio COR, lo cual sugiere

que la autofosforilación de LRRK2 puede desempeñar una función reguladora de su actividad GTPasa(169, 170).

Adicional a los sitios de autofosforilación de la LRRK2, también presenta un grupo de residuos de serina (S910, S935, S955 y S973) previos al dominio ROC, que están constitutivamente fosforilados. Se ha demostrado que estos residuos se ven afectados cuando ocurren mutaciones en los dominios ROC/COR/quinasa en la proteína LRRK2(171). De igual forma, se ve afectada la unión de la LRRK2 a la proteína adaptadora 14-3-3, cuando ocurre la desfosforilación de las serinas S910 y S935. Esta interacción es muy importante porque estabiliza las conformaciones o modificaciones estructurales de esta proteína quinasa para regular su actividad enzimática y localización subcelular (172, 173). Asimismo, se han identificado corriente arriba proteínas quinasas que podrían estar fosforilando a LRRK2 en los residuos S910/S935; como las quinasas de la familia de Ikappa B (174), y la caseína quinasa 1 alfa (162). Por el contrario, las proteínas fosfatasa 1A (PPIA), estarían desfosforilando a LRRK2 en esta misma posición (S910/S935) (175).

Estudios realizados de la relación estructura-función de la quinasa LRRK2, han evidenciado que en el estado dímérico la proteína actúa como una GTPasa activada por la dimerización dependiente de nucleótidos (GAD) que permiten la formación de un dímero con el dominio ROC mostrando una yuxtaposición dependiente del nucleótido que se denomina cis-homodimerización) (176, 177). Este modelo implica dos estados conformacionales del dímero de LRRK2, el primer estado la quinasa LRRK2 forma un dímero obligado (mediado por un dominio COR); este dímero de unión del GTP al dominio ROC induce al estado dímérico, el cual permite la unión del efector o activación de la quinasa (Fig. 11).

La hidrólisis de GTP causa la disociación del dominio de ROC y la inactivación de la quinasa; en este estado no son necesarias las proteínas activadoras de GTPasa (GAPs), o factores intercambiadores de guaninas (GEFs) (Fig. 11). En el segundo estado, o mecanismo convencional del ciclo GTPasa; la disociación lenta de GDP es estimulada por GEFs (Fig. 11). La unión de GTP permite las interacciones con los efectores o la activación de la quinasa por la acción acelerada de las GAPs con actividad de GTPasas que complementan o estabilizan el sitio activo. La reacción biológica (unión del efector) y la reacción GTPasa son generalmente mutuamente excluyentes (178).

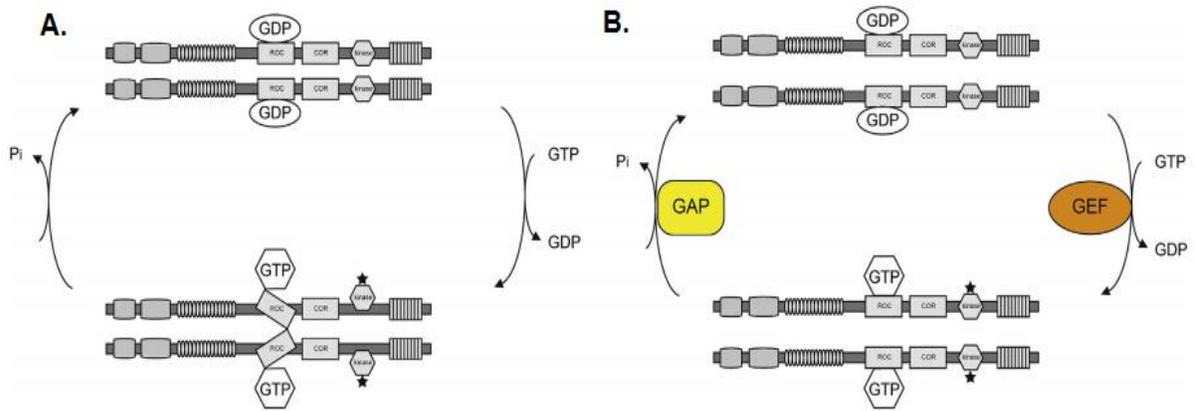


Figura 11. Estados conformacionales del dímero de la quinasa LRRK2. A. En el primer estado, La quinasa se encuentra activada (estrella) por la formación del dímero es mediada por el dominio COR unida a una molécula de GTP, La hidrólisis de GTP provoca la disociación de los dominios ROC, inactivando la quinasa. En este estado, no son necesarias las proteínas activadoras de GTPsa (GAPs) o los factores intercambiadores del nucleótido guanina (GEFs). En contraste, en el mecanismo convencional del ciclo GTPasa, la disociación lenta de GDP es estimulada por GEFs. La reacción de la GTPsa se acelera gracias a GAPs que complementan o estabilizan el sitio activo. Tomado de Gomez-Suaga et al., 2014 (178).

1.6.3. Sustratos de la LRRK2

La LRRK2 puede fosforilar numerosos sustratos putativos por la actividad de la proteína quinasa LRRK2, evidenciados tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*. Estos sustratos incluyen la propia LRRK2 por autofosforilación en la Ser1292 (179), los miembros de la familia de las MAP quinasa quinasa (MAPKK)(180), las proteínas del citoesqueleto de la familia ERM (ezrina/radixina/moesina)(181), la proteína beta-tubulina (182), la Akt1 (183), FoxO1 (184), la proteína tau asociada a los microtúbulos(185, 186), la 4E-BP1 (187, 188), la ArfGAP1 (189, 190), la α -sinucleína (191), la esnapina (192), la endofilina A (193) y p53 (194). Estos hallazgos demuestran que la LRRK2 es una proteína multifuncional con una amplia variedad de vías de señalización moleculares sobre diferentes sustratos celulares debido a su actividad quinasa. Estas características, sumado a las evidencias experimentales que mutaciones en el gen LRRK2 son una causa genética relativamente común de EP en todo el mundo, convierte a la LRRK2 en una molécula promisorio de blanco terapéutico. Más aún, evidencias genéticas y bioquímicas recientes han sugerido que las mutaciones sin sentido patogénicas resultan en la hiperactivación de la actividad de la quinasa LRRK2 en 2 a ~ 3 veces su actividad normal (195). Por lo tanto, las moléculas pequeñas que inhiben la actividad de la quinasa LRRK2 podrían proporcionar un tratamiento potencial modificador para la EP. Sin embargo, los mecanismos por medio de los cuales estos inhibidores disminuyen la actividad de esta quinasa no están aun claramente establecidos (178).

1.6.4. Funciones de la LRRK2

Las principales funciones fisiológicas de la LRRK2 se relacionan estrechamente con sus dos dominios enzimáticos: el dominio quinasa, que cataliza la fosforilación de sus diferentes sustratos y el dominio ROC-GTPasa que está implicado en la hidrólisis GTP-GDP (Fig.12). Además, de estas funciones enzimáticas, la LRRK2 puede funcionar como proteína de andamiaje contribuyendo a la formación de un complejo multiprotéico de transporte y

señalización celular. Más aún, estudios bioquímicos y moleculares demostraron que la LRRK2 regula el tráfico celular interactuando o fosforilando los componentes celulares del citoesqueleto, como la tubulina asociada a los microtúbulos, la proteína tau y los microfilamentos como la proteína actina (182, 196). Adicionalmente, se ha reportado su asociación con GTPasas pequeñas (Ras), clatrininas y proteínas accesorias de transporte vesicular y mitocondrial como la dinamina DRP1 asociada con la dinámica mitocondrial. Estas observaciones sugieren que la LRRK2 puede estar implicada en varias etapas del tráfico mitocondrial y vesicular como el reciclaje de la vesícula sináptica, internalización de receptores de tráfico endocítico temprano o tardío, tráfico en el aparato de Golgi (mediante la sobreexpresión de Rab29) o autofagia (reclutamiento en los lisosomas bajo la influencia de agentes lisosomotrópicos) (189, 190). Así mismo, estudios recientes en neuronas de rata, han indicado que LRRK2 también está implicada en funciones celulares como la regulación de la morfología de los procesos de formación de las neuritas (197) (Fig.12).

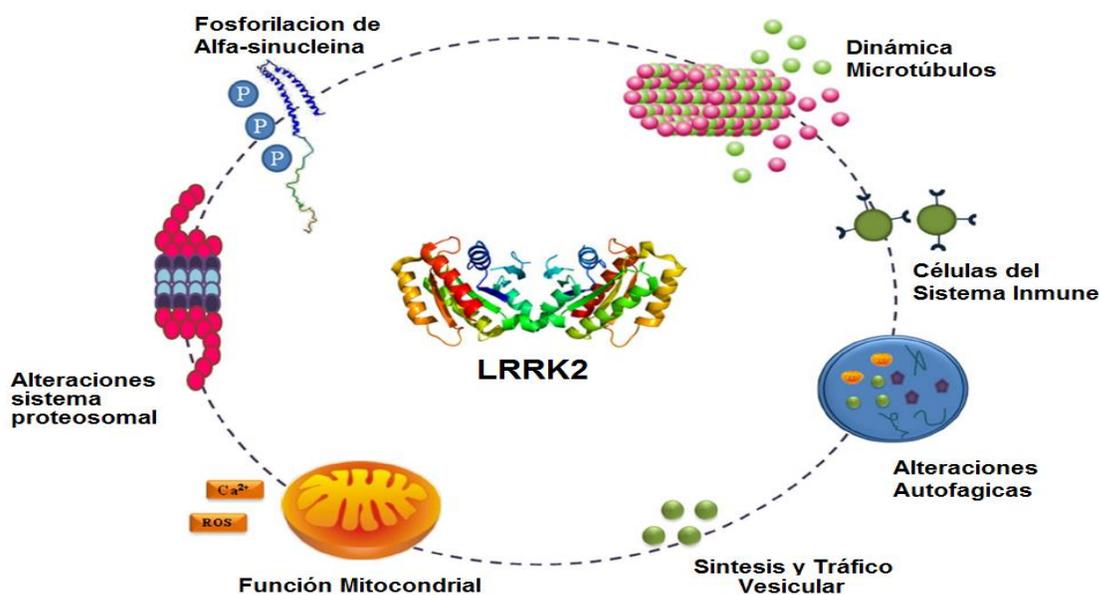


Figura 12. LRRK2 y sus mecanismos de acción. Varios datos postulan que LRRK2 a través de su dominio quinasa y/o GTPasa puede afectar a la función mitocondrial, el sistema ubiquitina-proteasomal, la vía autofágica-lisosomal, la dinámica de los microtúbulos, así como el tráfico de vesículas y proteínas, la fosforilación de α -sinucleína y las células del sistema inmunológico. Tomado de Esteves al., 2014 (198).

1.6.5. La EP y la proteína quinasa LRRK2

Dentro de los genes asociados con la enfermedad de Parkinson, se destaca el gen de la quinasa LRRK2, cuyas variantes son las más prevalentes, reportándose en aproximadamente el 0.7% de todas las personas que presentan síntomas de la enfermedad de Parkinson. (199). Se han encontrado más de 900 variantes identificadas en los diferentes dominios de LRRK2, de las cuales 9 se han identificado como patogénicas para la EP (136) de tres maneras: primera, variantes que se segregan de manera mendeliana (aunque con una penetrancia dependiente de la edad) y tienen un mayor efecto en el fenotipo de la enfermedad; segunda,

variantes que no tienen un tipo de segregación definida para la forma familiar de EPAD y que muestran asociación a nivel poblacional como factores de riesgo y la tercera, variantes designadas por los estudios GWAS, las cuales se asocian con efectos muy modestos sobre el riesgo de la enfermedad (200).

Dentro de las variantes que se segregan de manera mendeliana se encuentran algunas que conducen a mecanismos de ganancia de función, donde la actividad quinasa de la LRRK2 aumenta para fosforilar un grupo de proteínas Rab en diferentes localizaciones subcelulares, afectando vías descendentes que inducen la patogénesis de la EP(201). Estas variantes en el dominio quinasa incluyen la G2019S, I2020T, mientras que en los dominios ROC GTPasa y COR se encuentran las variantes R1441C/G/H, e Y1699C. Estos dominios donde se encuentran mutaciones están altamente conservados y segregan en familias con la EP (199, 202). La mutación sin sentido más frecuente en la LRRK2 es la G2019S y la que ha recibido mayor atención porque parece ser la variante más penetrante en la EP autosómica dominante de aparición tardía y la EP esporádica, con una influencia del 40% y 10%, respectivamente (202, 203). Además, la ocurrencia de las variantes en LRRK2 afectan a un amplio espectro de diversos grupos étnicos en diferentes regiones geográficas, creando susceptibilidad genética en la población con EP (204). La penetrancia de la mutación no sinónima G2019S en LRRK2 es alta y dependiente de la edad, pero incompleta, lo que sugiere que factores genéticos y/o ambientales se asocian con LRRK2 para desencadenar la neurodegeneración dopaminérgica (205).

Interesantemente, en estudios *in vitro* e *in vivo*, la eliminación de LRRK2 recapituló aspectos de la patogénesis de la EP tales como la pérdida de neuronas dopaminérgicas, la acumulación de α -Syn, el deterioro de la degradación de proteínas y la desregulación de la autofagia (206, 207). Sin embargo, no existe evidencia del impacto fenotípico, ya que no hubo un incremento en el riesgo de EP en humanos portadores de variantes de pérdida de función de LRRK2 (208). Muchos estudios también muestran que la función aberrante de LRRK2 en la EP no es necesaria sólo por la mutación, sino que algunos factores cascada arriba de su vía de señalización, como Rab29 y α -Syn podrían exacerbar la actividad de LRRK2 (209). Por lo tanto, la evidencia sugiere que la LRRK2 mutante está interrelacionada con otras proteínas e impacta diversos procesos biológicos celulares, aumentando la complejidad y el enigma de la comprensión de la patogénesis de la EP (210).

Tabla 2. Características de las sustituciones de LRRK2 asociadas con la EP. Tomado de Taymans *et al.*, 2023 (158).

| Variación aminoacídica | Posición | Dominio Proteico | Etnicidad de riesgo | Neuropatología | Referencia |
|------------------------|----------|------------------|---|---|--|
| <i>R1441C</i> | Exón 31 | ROCc | Europa Media | Cuerpos de Lewy Pérdida Neuronal SN Ovillos Neurofibrilares Tinción de la ubiquitina | Tong <i>et al.</i> , 2012 (211) |
| <i>R1441G</i> | Exón 31 | ROCc | Caucásica (País Vasco Country) Italia | Pérdida Neuronal SN Tinción de la ubiquitina | Marti-Masso <i>et al.</i> , 2009 (212) |
| <i>R1441H</i> | Exón 31 | ROCc | NAb | Desconocido | Ross <i>et al.</i> , 2009 (213) |
| <i>R1628P</i> | Exón 34 | CORc | China | Desconocido | Zhang <i>et al.</i> , 2009 (214) |
| <i>Y1699C</i> | Exón 35 | CORc | NAb | Cuerpos de Lewy Pérdida Neuronal SN Ovillos Neurofibrilares Tinción de la ubiquitina | Daniëls <i>et al.</i> , 2011(215) |
| <i>G2019S</i> | Exón 41 | Quinasa | Teóricamente en todas las poblaciones especialmente en el Norte de África | Cuerpos de Lewy Pérdida Neuronal SN Ovillos Neurofibrilares Tinción de la ubiquitina | Trinh <i>et al.</i> , 2014 (216), Gatto <i>et al.</i> , 2013 (217), Healy <i>et al.</i> , 2008 (218) |
| <i>I2020T</i> | Exón 41 | Quinasa | NAb | Cuerpos de Lewy Pérdida Neuronal SN | Hasegawa <i>et al.</i> , 2008 (219) |
| <i>R2385R</i> | Exón 48 | WD40 | Asia del Este | Desconocido Di Fonzo | Di Fonzo <i>et al.</i> , 2006 (220) |
| <i>Q1111H</i> | Exón 24 | LRR | Sur América | Desconocido | Mata <i>et al.</i> , 2011 (221) |

ROC: Dominio GTPasa, COR: Dominio C Terminal de ROC, LRR: Dominio con repeticiones ricas en leucina.

Los estudios de asociación en todo el genoma (GWAS) indican además que la variación común en el gen LRRK2 es un factor de riesgo para la EP idiopática. Las mutaciones en el LRRK2 dan lugar a una forma de aparición tardía de EP familiar que es clínica y neuroquímicamente indistinguible de la EP idiopática (135, 222, 223).

1.6.6. Los genes *PRKN*, *SNCA*, *PARK7* y su relación con *LRRK2*

La proteína LRRK2 se encuentra principalmente en el citoplasma celular, sin embargo, una parte de esta fracción se ha identificado que esta también asociada con la membrana externa mitocondrial, donde interactúa con la proteína Miro deteniendo la movilidad mitocondrial

para dar el inicio a la mitofagia (224), y con DRP1 con el fin de regular la fisión mitocondrial junto con parkina (225). Asimismo, mutantes del gen *DJI* (*PARK7*) que codifica para una peroxirredoxina, capaz de barrer peróxido, similar a la peroxidasa, inducen la fragmentación de la matriz mitocondrial por medio de la modulación de la expresión de Drp2. De igual forma, la supresión de la expresión de DJ-1 ha sido relacionada con la deficiencia de complejo 1 mitocondrial (226). Se ha reportado que tanto en individuos mutantes como silvestres para la proteína α -sinucleína, esta proteína se une e ingresa a la mitocondria posiblemente a través de los canales iónicos dependientes de voltaje, afectando la función del complejo 1 mitocondrial en la membrana interna(227). La unión de la α -sinucleína en la membrana externa mitocondrial inhibe la fusión de modo que las proteínas LRRK2, parkina y DJ-1 rescatan esta función y conducen a una excesiva fisión y fragmentación de la matriz mitocondrial (228).

Adicionalmente, se ha demostrado que las variantes patogénicas de LRRK2 asociadas con el aumento de la actividad quinasa, inducen alteraciones en los procesos implicados en la regulación de la vía endosomal, como cambios morfológicos y funcionales de los lisosomas que se observan agrandados, capacidad degradativa reducida de estos organelos; aumento de la expresión de la de la ATPasa transportadora de cationes 13A2 (ATP13A2), de la fosforilación de la proteína α -sinucleína. Más aún, se ha demostrado que la toxicidad de la α -sinucleína se ve incrementada por aductos de dopamina (229) e inactivación de la Parkina modificada o mal plegada (230, 231) y DJ-1 (232) que se acumulan selectivamente en los cerebros de pacientes con EP. Estos hallazgos, sugieren que mutaciones génicas o modificaciones postraduccionales de las proteínas codificadas por los cuatro genes (*PRKN*, *PINK1*, *DJ-1* y *LRRK2*) interactúan estrechamente con la α -sinucleína; y que esta interacción desencadena múltiples vías de señalización que alteran la morfología, la función de la cadena respiratoria, el control de calidad de la mitocondria, el estrés reticular, la liberación de ROS y los procesos de biogénesis mitocondriales (fisión/fragmentación)(210). Por lo tanto, estudios de nuevas interacciones moleculares posibles entre las proteínas (alfa-sinucleína, Parkina, DJ-1, PINK1 y LRRK2) constituyen interesantes herramientas para estudiar los mecanismos subyacentes a la patogénesis y a la muerte selectiva de neuronas dopaminérgicas y asimismo, poder identificar nuevas dianas terapéuticas en la EP (233) .

1.7. MECANISMOS NEUROPATOLÓGICOS INDUCIDOS POR LA QUINASA LRRK2 EN LA EP

1.7.1. Disfunción Mitocondrial y LRRK2

La actividad quinasa y GTPasa de LRRK2 interviene en una amplia gama de procesos celulares (164) que conduce a una disfunción mitocondrial que a su vez, conlleva a la patogénesis de la EP. Estudios en Fibroblastos de pacientes con la mutación G2019S evidenciaron una morfología mitocondrial anormal(234). Adicionalmente, en un modelo de

neuronas derivadas de células madre mesenquimales, expuestas al estímulo neurotóxico de la rotenona (Inhibidor complejo I mitocondrial) se demostró que el inhibidor de LRRK2 PF-06447475 redujo el EO evitando la alteración del potencial de membrana mitocondrial y la vía de señalización de muerte neuronal(235). Adicionalmente, se ha demostrado que la sobreexpresión de LRRK2 causa el reclutamiento de la proteína similar a la dinamina 1 (DLP1) en la mitocondria (225) y la co-expresión de estas dos proteínas (DLP1 y LRRK2) inducen un incremento en el EO, y relocalización de DLP1 en la mitocondria promoviendo el aclaramiento mitocondrial(236). También, se ha encontrado que la inhibición de DLP1 es capaz de rescatar la fragmentación mitocondrial tanto en células HEK como en fibroblastos que expresan la mutación G2019S(237).

Por otro lado, se ha descubierto que LRRK2 interactúa con otras proteínas en la membrana externa mitocondrial como Miro deteniendo la motilidad mitocondrial e iniciando la mitofagia(224). Asimismo, RAB10 actúa como sustrato de la actividad quinasa de LRRK2, se acumula en las mitocondrias despolarizadas e interactúa con el receptor de autofagia OPTN (optineurina) para mediar la mitofagia de una manera dependiente de PINK1/parkin(238). Mas aún, la ganancia de función tóxica de la actividad quinasa de LRRK2 inhibe la acumulación de RAB10 en las mitocondrias(238). Estas observaciones sugieren que LRRK2 podría ser responsable de la homeostasis mitocondrial por medio del control de la calidad mitocondrial dependiente de DLP1 y regulando proceso de mitofagia asociadas a las proteínas Miro, RAB10, OPTIN, y PINK1/PRKN. Sin embargo, aún queda por determinar si estos procesos se generan como un evento patogénico primario en el desarrollo de la EP o si el daño mitocondrial sucede como una consecuencia secundaria de la toxicidad inducida por LRRK2.

1.7.2. Estrés Oxidativo (EO) y LRRK2

El estrés oxidativo (EO), resultante de la acumulación intracelular excesiva de especies reactivas de oxígeno (de la sigla en inglés: *Reactive Oxygen Species; ROS*), especies reactivas de nitrógeno (de la sigla en inglés: *Reactive Nitrogen Species; RNS*) y otras especies de radicales libres contribuyen a la aparición y progresión de las enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson (EP). La EO se define como el desbalance entre la excesiva producción de especies reactivas de oxígeno y la deficiente capacidad de los sistemas antioxidantes para detoxificar los metabolitos oxidantes formados y para reparar el daño generado en los compartimientos celulares. Las ROS incluyen radicales libres derivados de oxígeno, definidas como moléculas con uno o más electrones desapareados en su último nivel de valencia. Dentro de las principales ROS que se producen bajo condiciones de EO y daño celular se encuentran el anión radical superóxido (O_2^-), el radical Hidróxido ($\cdot OH$), y el peróxido de Hidrogeno (H_2O_2).

Una cantidad significativa de O_2 consumida por la mitocondria es convertida a O_2^- durante el proceso de respiración celular que se realiza en la membrana interna de la mitocondria por

medio de los complejos de la cadena de transporte de electrones; en donde, el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial transporta electrones de la NADH (nicotinamida adenosina dinucleótido) a la CoQ (coenzima Q) y luego en el complejo III la CoH₂ (coenzima Q reducida) dona dos electrones al citocromo C para continuar con el transporte y generación de ATP (adenosina trifosfato). Cuando ocurren errores en la mitocondria ya sea por mutaciones específicas en genes (v.gr. *DJI*, *PRKN*, *SNCA*, *LRRK2*, *PINK1*) o por factores externos (v. gr. incremento de hierro, calcio, procesos inflamatorios o disminución de la actividad de enzimas antioxidantes como glutatión) se pueden producir moléculas desapareadas de oxígeno, que dan lugar a la formación de O₂⁻.

El O₂⁻ reacciona controlando la tasa de difusión del óxido nítrico (NO⁻) producido por NO-sintasas (NOS), llevando a la formación de una amplia diversidad de especies nitrosantes/nitrantes como el peroxinitrito (ONOO⁻), el cual también dismuta de una manera enzimática o no enzimática con la ayuda de la enzima superóxido dismutasa (SODs) a H₂O₂. Este puede ser utilizado por las mieloperoxidasas (MPO) para producir ácido hipocloroso y otros oxidantes dañinos derivados del cloro. El hidrogeno, también puede ser reducido a ·OH a través de la reacción de Fenton. Es claro entonces que la formación de las especies reactivas puede llevar a una reacción en cadena que se va amplificando hasta generar otras especies reactivas mucho más tóxicas(239, 240). Las ROS como el H₂O₂ están involucrados en eventos de señalización mediada por los residuos de tiol en proteínas que tienen el potencial para regular la transcripción bajo condiciones fisiológicas normales. Pero cuando hay procesos que conlleven a la generación de EO, las ROS generan productos tóxicos incluyendo malondialdehído en la peroxidación de lípidos (241), oxidación de proteínas (evidenciado por reticulación y fragmentación), así como la formación de grupos carbonilo y la oxidación del ADN/ ARN (242, 243).

La disfunción mitocondrial ha sido implicada desde hace tiempo como un sello patológico clave en la EP. Dado que las mitocondrias son orgánulos altamente multifuncionales, su integridad es esencial para la función neuronal y la supervivencia (244). Sin embargo, aún falta por definir la jerarquía causal y el papel que juega el LRRK2 y el estrés oxidativo (EO) durante el desarrollo de la EP. Estudios recientes han sugerido que los altos niveles de ROS son generados por la disfunción mitocondrial y constituyen una de las principales características patológicas de la EP y que están relacionados con la proteína LRRK2, más aún, estudios in vitro en células HEK293 y SH-SY5Y, han encontrado que el LRRK2 en condiciones normales es más resistente a la muerte celular inducida por H₂O₂, mientras que iPSCs con la mutación G2019S exhiben mayor sensibilidad a la exposición del H₂O₂, junto con un aumento en los niveles de caspasa 3 y muerte celular (245).

Se han propuesto varios mecanismos para controlar la vulnerabilidad neuronal dopaminérgica a las ROS asociadas a la neurotoxicidad de LRRK2. Uno de estos mecanismos, está relacionado con un aumento de interacciones dependientes de quinasa, entre la LRRK2, y sus substratos DLP1 (236) y peroxiredoxina 3 (PRDX3) (246). Otros de los mecanismos de mayor vulnerabilidad a ROS están relacionados con la sobreexpresión

de mutaciones de pérdida de función del dominio quinasa en *Caenorhabditis elegans* (247) así como en otros dominios diferentes al de la quinasa.

1.7.3. Agregación de las proteínas α -sinucleína (SNCA) y la proteína tau (MAPT) asociada a microtúbulos en la EP

Las variantes comunes en los genes *SNCA* y *MAPT*, que codifican para la α -sinucleína y la proteína tau respectivamente, han sido identificadas como los principales factores de riesgo de la EP idiopática(248). Estudios en tejido postmortem de cerebros de pacientes que presentaban mutaciones en el *LRRK2* con la EP mostraron predominantemente patología de cuerpos de Lewy positivos para α -sinucleína, y algunos casos también presentaron ovillos neurofibrilares (ONF) positivos para la proteína tau. Los ONF exhibieron características similares a los que fueron identificados, como única neuropatología detectable en la entidad clínica de la Taupatía de parálisis supranuclear progresiva(249-252). Se desconoce si esta patología de agregación de proteínas contribuye a los procesos neurodegenerativos en estos casos de EP asociada a mutaciones en el gen de la *LRRK2* o si representa una patología que ocurre de forma secundaria a la neurodegeneración.

Con el objetivo de investigar la interacción patológica entre estas proteínas y el *LRRK2*, se han establecido modelos *in vivo* que sobre expresan simultáneamente el *LRRK2* con la mutación G2019S y la α -sinucleína con la mutación A53T, en neuronas del cerebro anterior de ratones. Con estas aproximaciones experimentales, se logró demostrar que la sobreexpresión de la proteína *LRRK2* con la mutación G2019S humana, aumentó significativamente la progresión de la neurodegeneración, y que esta fue inducida por la α -sinucleína mutada A53T en su forma humana. Además, se observó que la expresión de *LRRK2* G2019S por sí sola no provoca daño neuronal. Asimismo, se demostró que la eliminación de la proteína *LRRK2* en estos ratones, protege contra el daño neuronal inducido por la α -sinucleína (253). Estos estudios sugieren que la proteína *LRRK2* actúa en las vías neurodegenerativas causadas por la α -sinucleína y que las mutaciones del *LRRK2* potencializan la inducción de la agregación de la α -sinucleína (252). También sugieren, que la fosforilación de la proteína *LRRK2* es necesaria para desencadenar todos los efectos neurotóxicos de la α -sinucleína mutante.

De igual forma, ratas transgénicas que expresan la forma humana G2019S de la *LRRK2* presentaron una mayor neurodegeneración dopaminérgica inducida por la administración por transfección del AAV2- α -sinucleína, la cual puede ser rescatada de manera similar mediante la inhibición de la quinasa con el inhibidor PF-06447475. Mas aún, los roedores con supresión o eliminación de *LRRK2* también mostraron neuroprotección contra la neurodegeneración dopaminérgica y la gliosis inducida por el lipopolisacárido (LPS), un potente inductor de la neuroinflamación(254, 255). Estas evidencias respaldan la hipótesis que el *LRRK2* cumple un papel importante, como quinasa, en la agregación inducida por la α -sinucleína y la neurodegeneración en modelos de roedores y a su vez, que el uso de

inhibidores de la quinasa LRRK2 podría constituir una excelente medida preventiva contra la neurotoxicidad inducida por la agregación de la α -sinucleína mutada en la enfermedad de Parkinson.

Numerosos estudios *in vitro*, *in vivo* y en tejido postmortem de pacientes con variantes del LRRK2 evidenciaron una posible interacción entre la LRRK2 y la α -sinucleína, o la LRRK2 y la tau, sin embargo, otros estudios no han encontrado una correlación entre estas dos proteínas; por ejemplo, análisis en tejido postmortem de pacientes con la mutación R1441G, no se detectaron inclusiones proteicas(212), a diferencia de la investigación en el modelo *in vitro* de la línea de ratón transgénico BAC que expresaba LRRK2 R1441G humana, se identificaron niveles elevados de proteína tau fosforilada comparados con los controles. Estos hallazgos se podrían explicar en la diferencia de los resultados en función de los modelos utilizados, en la poca información de los mecanismos comprensión de la biología de LRRK2 Y más Aún, en que todavía no se han establecido los mecanismos por los cuales la proteína LRRK2 induce, promueve o acelera la agregación y la neurodegeneración neuronal dopaminérgica en modelos nulos para el LRRK2 *in vitro*; ni si la α -sinucleína, o la proteína tau son esenciales para la neuropatología inducida por las interacciones con la proteína LRRK2. Por lo anterior, el desarrollo de modelos junto con los estudios de i) los mecanismos de señalización del LRRK2, ii) de agregados proteicos, iii) disfunción mitocondrial, iv) neurodegeneración y v) muerte neuronal son críticos para la comprensión de la neuropatología y el desarrollo de diseños terapéuticos de la EP asociada a la proteína LRRK2 (256) .

1.7.4. Apoptosis como mecanismo de Muerte celular en la EP

En 1972, Kerr y sus colegas acuñaron el término "apoptosis" para describir un patrón específico de muerte celular. Este fenómeno se observó durante la eliminación de células en el desarrollo embrionario, el recambio normal de tejidos adultos sanos y la atrofia hormonal subsiguiente(257). La apoptosis se caracteriza por cambios morfológicos y bioquímicos una vez que se inicia el proceso. Los cambios morfológicos incluyen la reducción del tamaño celular, la condensación y el desplazamiento del núcleo hacia la periferia del citoplasma, la formación de bolsas en la membrana plasmática, la dilatación del retículo endoplasmático, la formación de vesículas de membrana, la compartimentalización, la condensación de la cromatina y la fragmentación del ADN. Estos cuerpos apoptóticos, que resultan de la descomposición de la membrana celular, son rápidamente eliminados por fagocitos o células vecinas (258). A nivel bioquímico y molecular, la apoptosis implica la degradación del ADN, la activación de caspasas y la externalización de la fosfatidilserina en la membrana celular (Fig. 13). La pérdida del potencial de membrana mitocondrial y la liberación del citocromo C también son características de este proceso (259-261).

La apoptosis puede ser inducida por vías moleculares intrínsecas y extrínsecas. La vía extrínseca involucra la interacción de ligandos externos con receptores de la membrana celular dando lugar al inicio de la muerte celular de manera independiente de la

permeabilidad mitocondrial, mientras que la vía intrínseca se desencadena por señales dentro de la célula que afectan la permeabilidad mitocondrial(262). La regulación de la permeabilidad mitocondrial implica proteínas pro y anti-apoptóticas de la familia Bcl-2. Las proteínas pro-apoptóticas, como Bax y Bak, inducen la apertura de poros en la membrana mitocondrial, liberando proteínas como el citocromo C. Este proceso culmina en la formación del apoptosoma y la activación de caspasas, conduciendo a la fragmentación del ADN y la muerte celular(263).

La vía de apoptosis intrínseca es desencadenada por señales de estrés intracelular que resultan en una cascada de muerte dependiente o independiente de caspasas (236). Las señales de estrés intracelular que activan la fase de inducción de la apoptosis intrínseca incluyen; daño ADN, estrés oxidativo y excitotoxicidad. Como se mencionó anteriormente, se ha encontrado que especies reactivas de oxígeno como el H₂O₂ puede desempeñar el papel de una molécula señalizadora en el proceso de muerte celular, a través de la oxidación de las tioredoxinas que activan la cascada de señalización ASK1/JNK, que a su vez regula la inducción de las proteínas pro-apoptóticas Bcl-2. Esta fase de inducción entonces desencadena una respuesta dependiente o independiente de caspasas (237), mediadas por la unión entre las proteínas pro-apoptóticas de la familia Bcl-2, como Bak o Bax (238), y la proteína supresora de tumores p53 o proteínas anti-apoptóticas Bcl-2.

Bak y Bax, junto con PUMA (Modulador de la apoptosis sobre regulado por p53, de inglés *p53 upregulated modulator of apoptosis*) inducen la formación de un poro en la membrana externa mitocondrial (239). Lo anterior permite la liberación de citocromo c oxidasa I (COX I) de la mitocondria. La proteína COXI, se une al factor de activación de proteasas 1(Apaf-1) para formar un complejo multimérico llamado apoptosoma, el cual, durante la fase efectora, interactúa con la pro-caspasa 9 para producir caspasa 9 (240). La caspasa 9 activa corriente abajo caspasas efectoras como la caspasa 3, las cuales inician la fase de degradación de la apoptosis donde ocurre la destrucción de estructuras celulares, la condensación de la cromatina, fragmentación nuclear y la contracción celular (236). La apoptosis presenta ventajas sobre otros tipos de muerte celular, como la necrosis, ya que es un proceso regulado que conserva la integridad de la membrana celular. Las células apoptóticas expresan marcadores que facilitan su fagocitosis sin desencadenar una respuesta inflamatoria (264).

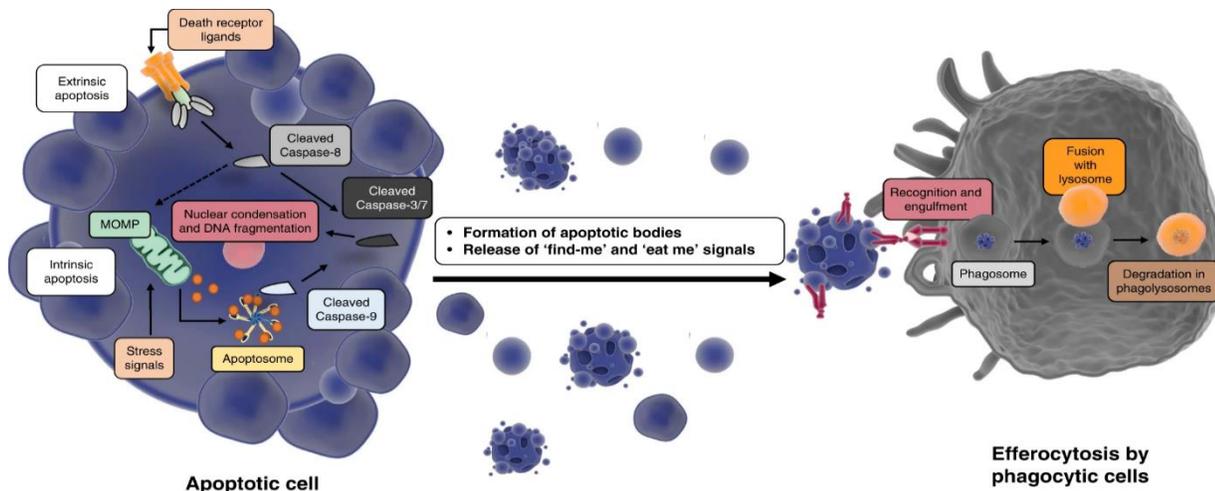


Figura 13. Eventos morfológicos y moleculares en la apoptosis. las características morfológicas y moleculares de las apoptosis descritas por Kerr, Wyllie y Currie, incluyen la condensación nuclear, permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP), la fragmentación celular, la formación de cuerpos apoptóticos y el engullimiento por células fagocíticas. Fuente: Nössing et al., 2023 (259).

El primer reporte de la apoptosis como tipo de muerte neuronal predominante en el EP fue en el modelo *in vitro* con la neurotoxina MPP⁺ (por su sigla en inglés, 1-methyl-4-phenylpyridinium, MPP⁺) (265). La apoptosis dependiente de caspasas intrínseca es una vía de muerte celular que se ha relacionado con la EP en humanos y en modelos celulares. Los estudios postmortem revelaron que las neuronas dopaminérgicas nigrales que expresan caspasa-3 son más propensas a sufrir muerte celular en la EP que las células que no expresan caspasa-3 (266). Además, en comparación con los pacientes de control post mortem, los pacientes con EP tenían una mayor proporción de neuronas nigrales que contenían el regulador de poro de membrana externa mitocondrial, y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (267, 268).

Además, estudios incluyendo algunos realizados en nuestro grupo, han evidenciado que diversas sustancias asociadas con la neurotoxicidad y el desarrollo de la enfermedad de Parkinson, como la dopamina, la serotonina, la 5,6-dihidroxitriptamina (5,6-DHT) y la 5,7-dihidroxitriptamina (5,7-DHT), la 6-hidroxidopamina (6-OHDA), el paraquat y la rotenona, provocan la muerte de neuronas tanto *in vitro* como *in vivo* mediante el mecanismo de apoptosis. Estudios en un modelo invertebrado de moscas expuesto al paraquat (PQ), presentan un deterioro neuronal dopaminérgico acelerado en las neuronas dopaminérgicas y que la disminución en la expresión de los genes de señalización de muerte como p53, JNK y caspasa-3 en neuronas DAérgicas, junto con la exposición a antioxidantes, retardaron el deterioro y la muerte neuronal (269), similar a lo observado en modelos *in vitro* de células humanas (235, 270). Este proceso de muerte celular neuronal es desencadenado por la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) como el O₂^{•-} y el H₂O₂, que a su vez inducen la activación de factores de transcripción como el factor nuclear kappa-B (NF-κB) y los factores p53/c-Jun N-terminal quinasa (JNK) y c-Jun. Estos eventos conducen a la

despolarización y apertura del poro mitocondrial, la formación del complejo del apoptosoma y la activación de la caspasa 3, que son marcadores bioquímicos reconocidos del proceso de apoptosis(32, 270).

Se ha demostrado que la sobreexpresión de la proteína quinasa LRRK2 con la mutación R1441C, en la línea SH-SY5Y y en células precursoras neuronales murinas, conduce a una neurotoxicidad mediada por la vía apoptótica intrínseca. Esta vía, inicialmente induce la liberación de citocromo c y posteriormente la activación de la caspasa 3 y muerte celular(271). Adicionalmente, se ha encontrado que el LRRK2 también genera EO tanto en su estado silvestre (WT) como mutada (132, 272), y que esta generación de ROS, ocurre a través de la activación de la cinasa reguladora de la señal de apoptosis 1 (ASK-1) (273) vía MKK4-JNK(180), la fosforilación de p53(194), y el bloqueo de la peroxiredoxina 3 (Fig. 14)(246). Por lo anterior y con el conocimiento que el EO juega un papel muy importante en los procesos apoptóticos, es razonable pensar que existe la necesidad prioritaria de buscar nuevas terapias antioxidantes que disminuyan el impacto del EO en la SNpc, para detener el avance de la muerte neuronal en los pacientes con EP.

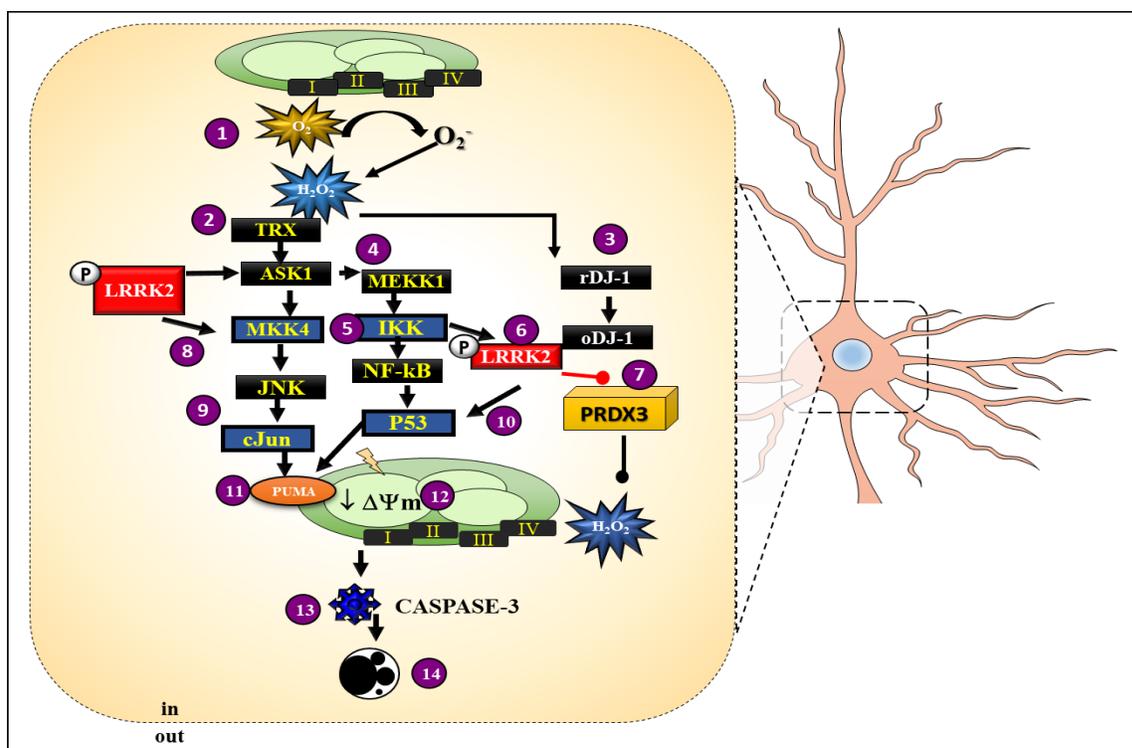


Figura 14. Vía molecular de la apoptosis intrínseca inducida por especies reactivas de oxígeno (ROS) y la activación de la quinasa LRRK2. La interrupción de la cadena de transporte de electrones genera concomitantemente anión superóxido (O_2^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2 , 1). Este último compuesto a través de la oxidación de tioxiredoxinas (TRDX) activa ASK-1 (2), y es capaz de oxidar directamente a DJ-1Cys106SH en DJ-1Cys106SO₃e (3) y fosforila LRRK2 a través de la activación de MEKK1 (4) /IKK (5). Una vez que la LRRK2 se fosforila en la Ser935 y 910 (6), la quinasa activa p-(S-935)-LRRK2 fosforila tres dianas principales: inactiva PRDX3 (7), impidiendo así la catálisis del H_2O_2 ; activa ASK-1 (2) y MKK4 (8), que activa el factor proapoptótico c-Jun a través de la vía MKK4/JNK. vía MKK4/JNK (9) y fosforila a p53(10). El resultado es la generación adicional de H_2O_2 (1) y la regulación al alza de PUMA (11), que a su vez induce la despolarización de la membrana mitocondrial. del potencial de membrana mitocondrial, $\Delta\Psi_m$ (12). La

pérdida del $\Delta\Psi_m$ permite la liberación de proteínas proapoptógenas que dan lugar a la activación de la CASPASA-3 (13). Esta endoproteasa es responsable de la fragmentación del ADN mediante la activación enzimática del factor de fragmentación del ADN-45 (DFF45) y la subsiguiente activación de la actividad nucleasa del DFF40. Esta morfología de los núcleos constituye el sello típico de la apoptosis. Fuente: Autor.

1.7.5. Autofagia en la EP

La autofagia es un proceso celular esencial para la eliminación oportuna de proteínas mal plegadas, orgánulos disfuncionales y para prevenir la toxicidad subsiguiente a la muerte celular en las células eucariotas. Las proteínas innecesarias o mal plegadas y los orgánulos subcelulares dañados son engullidos por vesículas de doble membrana específicas de la autofagia, denominadas autofagosomas, que posteriormente, son entregados a los lisosomas para su descomposición. En casi todas las células, la autofagia se produce a un nivel basal, una vez ocurre la inhibición del complejo 1 de la proteína diana de la rapamicina, denominada mTORC1 (por sus siglas en inglés, Mammalian Target of Rapamicin mTORC1), que es un regulador clave de la autofagia para mantener la homeostasis celular. Tras varios tipos de estrés celular, como la privación de nutrientes, la ausencia del factor de crecimiento o la hipoxia, la inhibición de mTORC1 es suprimida y la autofagia se aumenta para satisfacer las elevadas demandas energéticas celulares. El proceso de autofagia consta de una serie de acontecimientos moleculares, cada uno de los cuales está gestionado por complejos específicos de autofagia cuya actividad está estrechamente regulada por moléculas de señalización. Se divide en 4 fases: 1) la iniciación, 2) la formación del autofagosoma, 3) la autofagia selectiva y 4) la maduración del fagosoma (274) (Fig. 15).

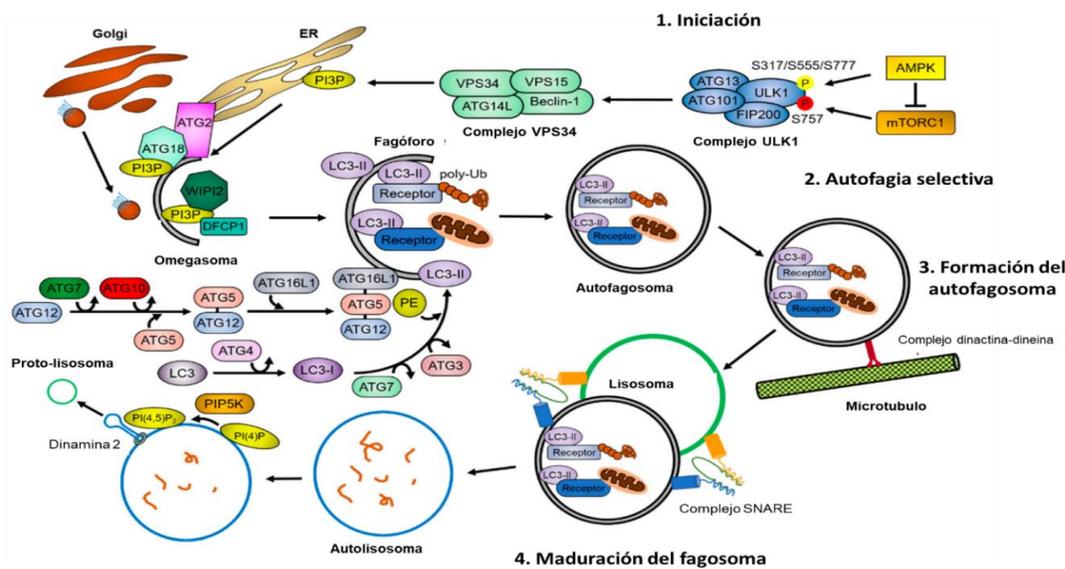


Figura 15. Fases de la autofagia. La autofagia es un proceso celular que se activa en respuesta al estrés. 1. Iniciación: Se inicia con la fosforilación de los complejos ULK1 y VPS34 por mTORC1 y AMPK. El complejo VPS34 genera PI3P en membranas, reclutando proteínas que facilitan la formación de omegasomas. 2. Autofagia selectiva y 3. Formación del autofagosoma: Estos se convierten en autofagosomas, donde las proteínas ATG convierten LC3 en LC3-II, y los receptores autofágicos llevan cargas al autofagosoma. 4. Los autofagosomas maduros se transportan cerca de los lisosomas y forman autolisosomas. Las proteasas lisosomales degradan las cargas, mientras que PI(4,5)P₂ ayuda a mantener la reserva de lisosomas libres en el citosol mediante la formación de proto-lisosomas. Fuente: Park et al., 2020 (264).

En la fase de iniciación, tras el estrés celular, las dos moléculas de señalización principales de la autofagia, mTORC1 y la proteína cinasa activada por AMP (AMPK), regulan negativamente la actividad de la autofagia fosforilando a la cinasa activadora de la autofagia 1 Unc-51 (ULK1) en diferentes sitios; a su vez el mTORC1 inhibe el inicio de la autofagia fosforilando ULK1 en Ser757 (275); mientras que AMPK promueve el inicio de la autofagia fosforilando ULK1 en Ser317, Ser555 y Ser777(276). El complejo VPS34, secuencialmente activado, genera PI3P en membranas enriquecidas en lípidos, que reclutan proteínas de unión a PI3P como el retículo endoplásmico (RE), sitios de contacto RE-mitocondrias y sitios de contacto RE-membrana plasmática. Este complejo lípido-proteico facilita el ensamblaje de proteínas relacionadas con la autofagia (ATG), dando lugar a la formación de omegasomas. En la segunda fase, durante la formación de los autofagosomas a partir de los omegasomas, los sistemas de conjugación similares a la ubiquitina de las proteínas ATG (Atg12 y Atg8 ó LC3) convierten LC3 en LC3-II mediante la conjugación de fosfatidil-etanolamina (PE), proceso conocido como lipidación de LC3 (277).

En la siguiente etapa los receptores autofágicos y las proteínas adaptadoras transportan cargas a los autofagosomas (278, 279), en un proceso de degradación selectiva. Se han identificado muchos tipos de receptores autofágicos que reconocen y reclutan cargas específicas al autofagosoma; por ejemplo, p62 para los agregados proteicos y la proteína nuclear FMR1 interactuante 1 (NUFIP1) para los ribosomas. Dependiendo de las moléculas diana, la autofagia selectiva se divide en agrefagia para agregados proteicos, mitofagia para mitocondrias, ER-fagia para el retículo endoplásmico ER, pexofagia para peroxisomas, xenofagia para patógenos, lipofagia para liposomas, lisofagia para lisosomas, proteafagia para proteasomas, ribofagia para ribosomas y granulofagia para gránulos (280). Los receptores autofágicos reconocen principalmente moléculas diana a través de sus cadenas conjugadas de poli-ubiquitina mediante un dominio específico, como el dominio asociado a ubiquitina (UBA) en p62 o NBR1 y el dominio de dedo de zinc (ZF) en la OPTN. Tras este reconocimiento, los receptores autofágicos transfieren las cargas a los autofagosomas uniéndose directamente a los ATG8s a través de la región de interacción con LC3 (LIR) o el motivo de interacción con GABARAP (GIM). Por último, en del proceso de maduración de los autofagosomas, estos son transportados cerca de los lisosomas por un complejo dineína-dinactina, donde forman los autolisosoma a través del complejo SNARE. Tras la fusión, las proteasas lisosomales degradan las cargas, mientras tanto, PI(4,5)P2 construye sitios de formación de túbulos lisosomales, generando los proto-lisosomas necesarios para mantener la reserva de lisosomas libres en el citosol (274).

Así mismo, la autofagia se ha clasificado en tres tipos principales de acuerdo con las diferentes vías utilizadas para el transporte de la carga al lisosoma (Fig 16). Estos tipos son la i) autofagia mediada por chaperonas (AMC). ii) la microautofagia y la iii) la macroautofagia. En la AMC, las proteínas desplegadas se translocan directamente a través de la membrana del lisosoma por medio de Las proteínas chaperonas que facilitan este

proceso al unirse a los sustratos citosólicos y permitir su interacción con un receptor/canal en la membrana lisosomal (281). El segundo tipo, en la microautofagia, los materiales citoplasmáticos son captados directamente en la superficie del lisosoma mediante la invaginación de su membrana. Una vez que las vesículas que contienen los sustratos citosólicos se han formado, son desprendidas hacia el lumen lisosomal y degradadas rápidamente (282). En el tercer tipo, que corresponde a la macroautofagia, se forma un fagóforo de doble membrana que se expande y rodea partes del citoplasma, creando una vesícula llamada autofagosoma. Una vez formado, el autofagosoma se dirige completo al lisosoma, (275), en donde se fusiona con la membrana lisosomal, lo que permite que las hidrolasas accedan a la membrana interna del autofagosoma y a su carga, que se degrada y recicla. A diferencia del sistema proteasoma-ubiquitina 26S, la macroautofagia puede degradar de manera no selectiva y masiva contenidos citoplasmáticos, incluyendo orgánulos completos como las mitocondrias proceso llamada mitofagia (279, 283) (Fig 16).

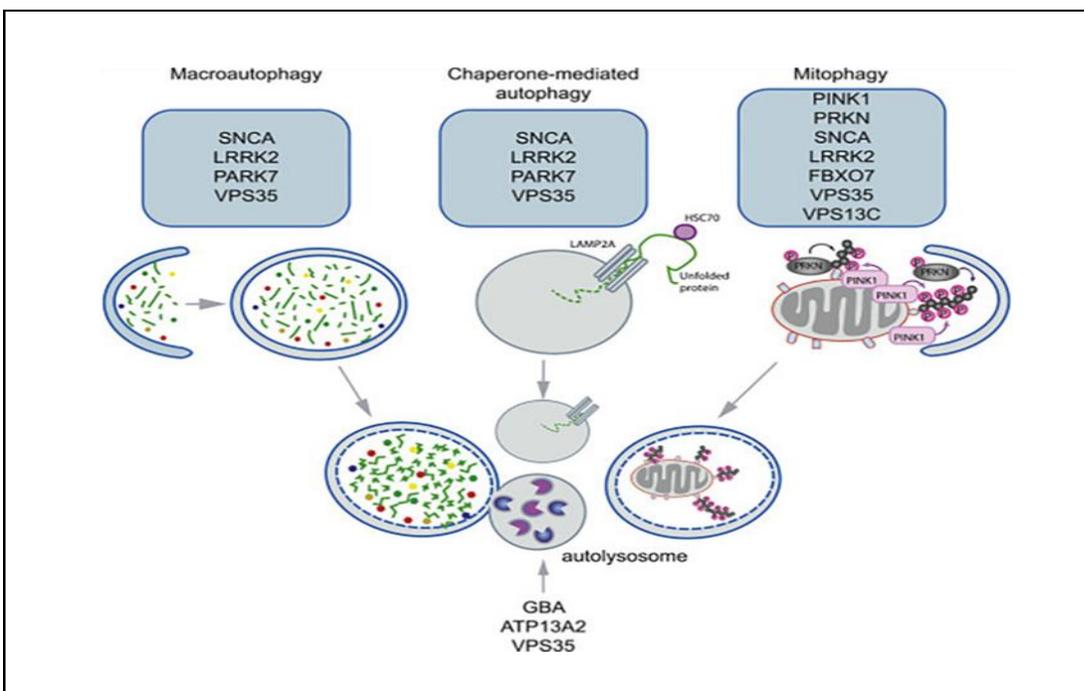


Figura 16. Representación esquemática de los genes relacionados con la EP asociados con macroautofagia, autofagia mediada por chaperonas (AMC) y mitofagia. Un gran grupo de genes asociados con la EP familiar y esporádica está fuertemente vinculado con la macroautofagia, la autofagia mediada por chaperonas, la mitofagia y la función lisosomal corriente abajo. La macroautofagia, la principal ruta de degradación celular se inicia a partir de una membrana aislada (fagoforo), formando el autofagosoma de doble membrana para secuestrar el material citosólico. La posterior fusión de los autofagosomas con los lisosomas forma el autolisosoma para la degradación de su contenido mediada por la hidrolasa. En la autofagia mediada por chaperonas, la proteína chaperona citosólica HSC70 dirige y transloca las proteínas desplegadas directamente a los lisosomas mediante su unión al receptor lisosomal LAMP2A. En comparación con la macroautofagia no selectiva/en masa, la mitofagia selectiva etiqueta sólo las mitocondrias dañadas para su degradación autofágica posterior. Tomado de Hou et al., 2020 (284).

Adicionalmente, se ha demostrado que, procesos moleculares como la agregación anormal de proteínas, el mal funcionamiento de las vías de degradación (autofagia) y las disfunciones

de los lisosomas, contribuyen a la patogénesis de la enfermedad de Parkinson en etapas tempranas. Más aún varios estudios indican que las inclusiones patológicas de α -sinucleína denominadas cuerpos de Lewy en las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra presentadas en la EP, son una consecuencia de la degradación autofágica-lisosomal anormal (285-289). De hecho, se ha demostrado, que las inclusiones de α -sinucleína a su vez perjudican la vía autofágica en varios pasos; en la reducción de la formación de omegasomas y daño del transporte retrógrado de los autofagosomas, pero no la fusión autofagosoma-lisosoma. Asimismo, estudios muestran que la α -sinucleína interrumpe la actividad de la aspartil proteasa lisosomal catepsina D (CTSD) y el proceso de degradación autofágica (290).

A su vez, también se ha encontrado que la α -sinucleína afecta las funciones mitocondriales (219-223). Las neuronas dopaminérgicas son metabólicamente muy activas con una alta demanda de energía mitocondrial y, por lo tanto, son especialmente vulnerables a una eliminación insuficiente de mitocondrias dañadas (224, 225). La acumulación de mitocondrias defectuosas da lugar a un aumento de los niveles de ROS que pueden dañar las mitocondrias sanas circundantes y acelerar aún más la progresión de la enfermedad en un círculo vicioso (226, 227) y, por ende, generar vulnerabilidad neuronal lo cual acelera aún más la progresión y severidad de la enfermedad (291).

Por otro lado, el gen *PARK2* ó *PRKN*, que codifica para parkina, enzima ubiquitina E3 ligasa, que cumple la función de eliminar las mitocondrias dañadas, reclutándolas y promoviendo su degradación autofágica (292). En estado estacionario, la parkina se encuentra ubicada en el citosol. Sin embargo, estudios de microscopía muestran que Parkina en presencia de fragmentos de mitocondrias, es reclutada selectivamente, lo que sugiere un papel de la Parkina en la distinción entre mitocondrias sanas y dañadas. También estos estudios, mostraron que estos fragmentos mitocondriales marcados con Parkina eran positivos para proteína LC3, lo que demuestra que la eliminación de las mitocondrias alteradas se realiza a través de la autofagia. Así mismo, la proteína p62 une proteínas ubiquitinadas a la LC3 para su degradación autofágica(293). Debido a que la proteína p62 se acumula cuando se bloquea la autofagia y se pierde el potencial de membrana mitocondrial de forma dependiente de Parkina, se utiliza ampliamente como marcador de autofagia (294).

Además de los genes *PRKN* y *SNCA*, el gen de *LRRK2* también se ha asociado a la autofagia y la dinámica mitocondrial (Fig. 16). La reducción de *LRRK2* resulta en el deterioro de la autofagia y la acumulación de las proteínas marcadoras de autofagia LC3 y p62(295, 296). Recientemente, se ha relacionado a la *LRRK2* con la regulación de la función lisosomal a través de su actividad quinasa por las GTPasas RAB (viene de la sigla del inglés Ras-associated binding proteins) (297). La inhibición farmacológica de la quinasa *LRRK2* redujo la localización de α -sinucleína en compartimentos RAB35-positivos y podría facilitar la eliminación de α -sinucleína a través de un mayor tráfico al lisosoma (298). Más

recientemente, se ha demostrado que LRRK2 regula la mitofagia dependiente de PINK1-PRKN a través de su sustrato RAB10, que se une al receptor de optineurina (OPTN) y promueve su acumulación en mitocondrias despolarizadas (238). Este fenómeno condujo, en células de pacientes con mutaciones en el LRRK2, al aumento de la fosforilación de RAB10 con la alteración de la mitofagia, la cual fue restablecida por la inhibición de la actividad quinasa y la reducción de la expresión de la quinasa LRRK2 por la inducción del *knockdown* de la proteína (238).

Interesantemente en modelos *in vitro* e *in vivo* que sobreexpresan LRRK2 con la mutación G2019S, con ganancia de función en su actividad quinasa; mostraron niveles elevados de LC3B lipidado(299), y de vacuolas autofágicas tanto en las neuritas neuronales como en el soma(300). Resultados similares se observaron en fibroblastos mutantes del LRRK2 con la variante G2019S, que aumentaron la autofagia basal y muerte celular por apoptosis (301). Más aún, se evidenció que la sobreexpresión de la mutación LRRK2 R1441C *in vitro*, aumentó los niveles del receptor autofágico p62/SQSTM1 (295). En conjunto, los experimentos anteriores indican los efectos deletéreos de las mutaciones de ganancia de función del LRRK2 en la autofagia a través de diferentes mecanismos (295).

De igual forma que la α -sinucleína, la LRRK2 de tipo salvaje puede ser degradada selectivamente por la AMC. Este mecanismo de degradación ocurre gracias a que uno de los ocho motivos putativos de la proteína LRRK2, se une a la proteína chaperona HSC70, e induce la AMC (302). Esta vía de degradación se ve bloqueada por la presencia de mutaciones patogénicas de LRRK2. El mecanismo de bloqueo consiste en que el LRRK2 G2019S y R1441G mutado, bloquea la formación del complejo de translocación de la AMC en la membrana lisosomal induciendo la acumulación de las proteínas LAMP2A y HSC70. Este evento molecular fue demostrado en cultivos neuronales, en ratones transgénicos LRRK2, en neuronas dopaminérgicas humanas derivadas de iPSCs y en autopsias de cerebro de pacientes con EP con mutaciones en LRRK2(302, 303). Además, como resultado del bloqueo de AMC inducido por LRRK2, la degradación de α -sinucleína es inhibida, de manera que la acumulación de α -sinucleína oligomérica pudo ser detectada en el estriado y corteza de ratones *Knockin* del LRRK2 con la mutación R1441G envejecidos comparados con controles de tipo salvaje pareados por edad(303). También se demostró que el LRRK2 con la mutación G2019S, se une directamente al factor de fisión DRP1 y lo fosforila en la treonina 595, induciendo fragmentación mitocondrial y mitofagia excesiva mediada por DRP1, en fibroblastos provenientes de pacientes con EP que portan la mutación(237).

En conclusión, numerosos estudios indican que varios genes implicados en la EP (v.gr. SNCA, LRRK2, PINK1 y PRKN) están asociados a la vía autofagia-lisosomal. Mas aún, mutaciones en algunos de estos genes conllevan a la codificación de proteínas que forman agregados proteínicos intracelulares que pueden alterar varios pasos de la autofagia. En este contexto, se hace necesario el diseño de enfoques experimentales selectivos dirigidos a

estudiar etapas específicas de la autofagia con el fin de comprender las funciones de la autofagia y la interacción de los genes implicados en la neuropatología de la EP.

1.8. TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

1.8.1. Convencional

A pesar de los notables avances en la comprensión de las causas genéticas y biológicas de la enfermedad de Parkinson en las últimas décadas, las alternativas terapéuticas siguen siendo limitadas y se han enfocado principalmente en la reposición de dopamina, la reducción de la sintomatología y algunas terapias médicas y quirúrgicas para el manejo sintomático de los signos motores y no motores a lo largo del curso de la enfermedad (304).

De este modo, aunque los medicamentos dopaminérgicos siguen siendo fundamentales para el manejo sintomático de los síntomas motores, como temblores y rigidez, conllevan efectos adversos no deseados, lo cual genera una necesidad persistente en la clínica por desarrollar nuevas opciones terapéuticas que modifiquen la enfermedad, mejoren los síntomas resistentes a los fármacos convencionales y aborden los trastornos cognitivos, del estado de ánimo y del control de los impulsos relacionados con déficits de dopamina fuera de los ganglios basales o en sistemas serotoninérgicos y noradrenérgicos (305).

1.8.1.1. L-dopa (Levodopa)

La pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra pars compacta conduce a la disminución de la dopamina estriatal como mecanismo central subyacente a las características cardinales motoras de la EP. De esta manera, la sustitución de la pérdida de dopamina estriatal por la administración sistémica del aminoácido precursor de la dopamina L-dopa representó un avance revolucionario en el tratamiento de la EP hace más de 50 años; dado que puede atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) y convertirse en dopamina tanto en el SNC como en la periferia (255).

A pesar de que la L-dopa se mantiene como el tratamiento estándar para la EP, con el tiempo su uso conlleva a la evolución de complicaciones motoras, incluyendo respuestas motoras oscilatorias y disquinesias inducidas. Se ha encontrado que la causa clave es la liberación discontinua de la droga debido a la corta vida media de la L-dopa, a la variabilidad de la absorción gastrointestinal y el transporte de la barrera hematoencefálica. La levodopa se absorbe en el intestino delgado y es catabolizada rápidamente por la L-aminoácido aromático descarboxilasa (AADC) y la catecol-O-metiltransferasa (COMT). Dado que la AADC y la COMT gástricas degradan la levodopa, el fármaco se administra con inhibidores de la AADC (carbidopa o benserazida), y de la COMT (Entacapona, Opicapona, Tolcapona), para prevenir este metabolismo periférico de la dopamina, potenciar su biodisponibilidad y permitir que una mayor cantidad de levodopa atraviese la BHE, generando un beneficio particular para pacientes que desarrollan fluctuaciones motoras(306).

Si bien es cierto que se desconoce el lugar exacto de la descarboxilación de la levodopa exógena a dopamina en el cerebro, la mayor parte de la AADC estriatal se localiza en las terminales nerviosas dopaminérgicas nigroestriatales. La dopamina recién sintetizada se almacena en los terminales y luego se libera en el espacio intraneuronal, como en el espacio intersináptico, en donde es regulada por la monoamina oxidasa tipo B (MAO-B). Esta enzima, por medio de la oxidación convierte a la dopamina en su correspondiente ácido carboxílico a través de un intermediario aldehído que disminuye su disponibilidad en las terminales nerviosas, donde luego es recaptada a través del transportador de dopamina por la neurona presináptica (307). La inhibición de la MAO-B entonces prolonga e incrementa las concentraciones de dopamina intracelularmente y en el espacio intersináptico. Por último, la dopamina liberada estimula los receptores dopaminérgicos postsinápticos compensando la disminución de dopamina endógena (308), de ahí la acción anti parkinsoniana de la levodopa.

1.8.1.2. Agonistas de la dopamina

Debido a los efectos secundarios de la administración a largo plazo con levodopa, los agonistas dopaminérgicos se desarrollaron originalmente como terapia coadyuvante a este tratamiento. En la actualidad se recomienda iniciar el tratamiento con agonistas dopaminérgicos en monoterapia en pacientes jóvenes para posponer la terapia con levodopa y el posterior desarrollo de efectos secundarios extrapiramidales (309, 310). Los agonistas dopaminérgicos son fármacos que estimulan directamente los receptores de dopamina (en particular el subtipo D-2), evitando así la necesidad de conversión metabólica. Estos fármacos ejercen potentes efectos contra los signos y síntomas de la EP.

Las investigaciones han demostrado que los receptores dopaminérgicos D1 y D2 participan principalmente en el control del movimiento voluntario, la recompensa y el comportamiento adictivo, y el aprendizaje y la memoria (311). Los agonistas dopaminérgicos se clasifican de acuerdo a la presencia de estructuras químicas heterocíclicas, características de las ergotaminas una familia de alcaloides presentes en algunos hongos (Cornezuelo del centeno) por lo cual pueden llamarse ergóticos y no ergóticos (312). Los derivados ergóticos más antiguos son la bromocriptina, la cabergolina, la lisurida y la pergolida. Hoy en día se utilizan raramente en la EP, debido al riesgo de fibrosis valvular y pulmonar. La mayoría de los agonistas dopaminérgicos utilizados en la EP son agonistas de los receptores dopaminérgicos D2 (312).

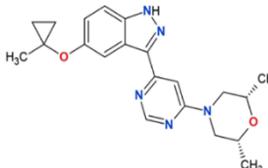
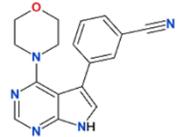
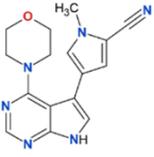
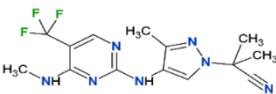
1.8.2. Inhibidores de la quinasa LRRK2

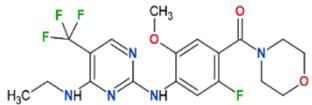
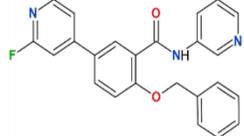
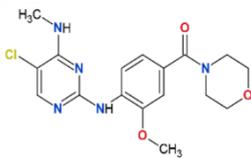
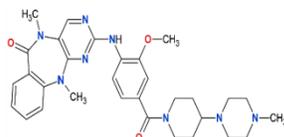
La quinasa LRRK2 se ha postulado como una diana terapéutica para la EP. De hecho, los hallazgos de la hiperactivación de LRRK2 en mutantes de la enfermedad, han demostrado que los efectos deletéreos de los mutantes de LRRK2 en modelos preclínicos, pueden ser bloqueados inhibiendo la expresión y la actividad quinasa de la proteína LRRK2. Estas

observaciones proporcionaron una validación inicial de que la LRRK2 constituye un blanco terapéutico promisorio para los pacientes portadores de mutaciones en el LRRK2 y los pacientes con la EP esporádica (255, 313), lo que la convierte en una estrategia de tratamiento muy atractiva (314).

Los esfuerzos científicos se han centrado en el desarrollo de moléculas pequeñas, potentes, y selectivas con capacidad de inhibir la actividad de la quinasa de la proteína LRRK2. De igual forma, se han diseñado oligonucleótidos anti-sentido para reducir los niveles de LRRK2 (158). Estos avances científicos, son muy alentadores en la búsqueda de terapias modificadoras de la EP. Sin embargo, la validación de la LRRK2 como diana terapéutica de la EP aún no se ha establecido. Una de las posibles dificultades de este proceso de validación, es seleccionar un inhibidor del LRRK2 específico y selectivo para ser evaluado en los pacientes, que no presenten efectos secundarios y que conduzcan a resultados clínicos concluyentes. En este contexto, la estrategia usada para el diseño de las moléculas inhibidoras de la LRRK2, es el modelamiento de las interacciones con moléculas de referencia utilizando el docking molecular. A partir de este enfoque, se han desarrollado varios modelos del dominio quinasa de LRRK2 (315, 316).

Tabla 3. Características de algunos de los inhibidores de la quinasa LRRK2 disponibles comercialmente, tomado de Wojewska et al., 2021 (317)

| Nombre del compuesto | Estructura química | LRRK2 IC ₅₀ (nM) | | | Permeabilidad | Referencia |
|----------------------|---|-----------------------------|--------|--|---------------|------------|
| | | WT | G2019S | | | |
| MLi-2 |  | 0.8 | 0.76 | | Si | (318, 319) |
| PF-06447475 |  | 3 | 11 | | Si | (320) |
| PF-06685360 |  | 2.3 | n.d. | | Si | (321) |
| GNE-0877 |  | 3 | n.d. | | Si | (322) |

| | | | | | |
|-------------|---|------|------|----|-------|
| GNE-7915 |  | 9 | n.d. | Si | (323) |
| GSK2578215A |  | 10.9 | 8.9 | Si | (324) |
| HG-10-102-1 |  | 20.3 | 3.2 | Si | (325) |
| LRRK2-IN-1 |  | 13.0 | 6.0 | Si | (326) |

Para el diseño de inhibidores de *novo* (327) se ha utilizado tamizajes de nuevos inhibidores, de los cuales sólo dos de las moléculas identificadas, la GNE-7915 y el PF-06447475 han avanzado hasta su uso experimental (328, 329)(Fig.17), proporcionando información importante sobre los residuos de aminoácidos en LRRK2 que son cruciales para su inhibición selectiva (Fig.17). Otra de las estrategias para el desarrollo de inhibidores de LRRK2, es el diseño de sustitutos estructurales (empleando quimeras moleculares de la quinasa LRRK2 soluble con las propiedades del bolsillo de unión a ATP como andamiaje). Estos sustitutos estructurales de la LRRK2 se obtuvieron de varias de las estructuras identificadas con inhibidores específicos de la proteína LRRK2 que se pegaron al bolsillo de unión al ATP; lo que demuestra la eficacia del uso de los sustitutos estructurales para el diseño computacional de inhibidores mejorados de la quinasa LRRK2 (320, 330).

A pesar de la gran selectividad de los compuestos diseñados de inhibidores de la LRRK2 de mayor de 25 y >300 veces, superior en la mutante G2019S que en la LRRK2 silvestre (WT), se han realizado pocos estudios en modelos preclínicos (315, 331).

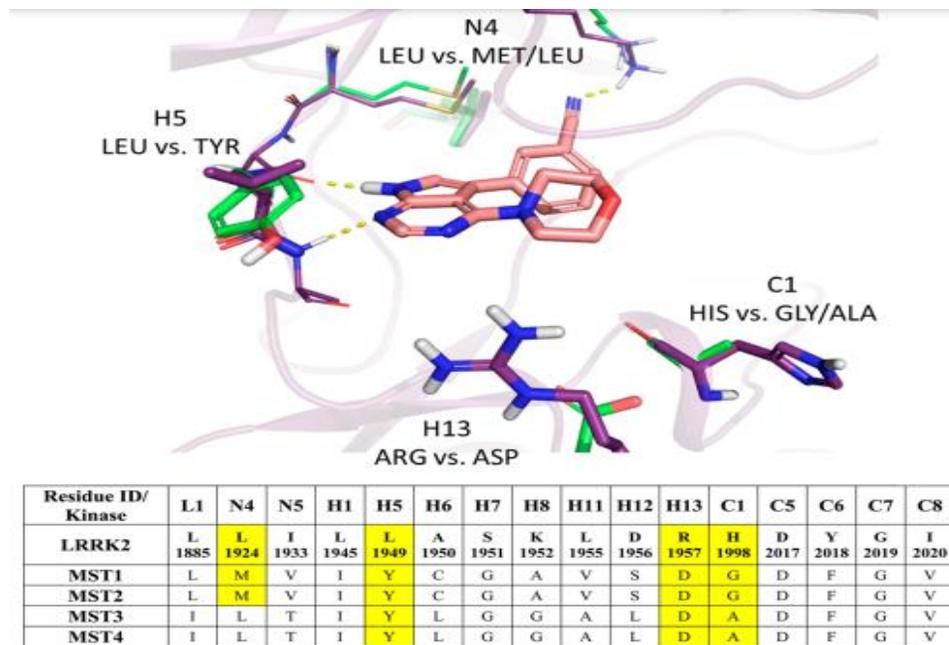


Figura 17. Alineación de residuos claves en el sitio de unión al ATP de las quinasas LRRK2 y MST por el inhibidor PF-06447475. La anotación de los residuos del sitio de unión del inhibidor PF-06447475 se basó en las estructuras cristalina de rayos X de los modelos homólogos de LRRK2 utilizando como plantilla la quinasa MST3, código PDB 4U8Z. Tomado de Henderson *et al.*, 2015 (310).

1.8.3. Terapia Celular

Debido a que actualmente, no existe un tratamiento curativo o capaz de revertir o detener la degeneración y muerte de las neuronas dopaminérgicas en la EP, la terapia celular se ha sugerido como un nuevo prospecto terapéutico para el tratamiento de la EP. Esta terapia consiste en el uso de células madre adultas con potencial directo de diferenciación o de transdiferenciación neuronal(332).

Como terapias celulares, se han sugerido las células madre de tejidos adultos (Médula ósea), neonatales (Gelatina de Wharton del cordón umbilical y epitelio amniótico) y las células pluripotentes inducidas (iPSCs) derivadas de tejidos adultos (Biopsias de piel) por sus características hipoinmunogénicas, fácil adquisición, poco invasivas en su obtención y porque su uso no representa dificultades de tipo bioético(333). Estudios recientes han demostrado que las iPSCs sobreviven al injerto en modelos in vivo, al inervar las regiones del cerebro en donde se realizó el trasplante y además apoyan la recuperación funcional de los déficits inducidos por lesión(334, 335). La investigación actual se centra en la alta producción de Células mesenquimales estromales (CME) y de vesículas extracelulares de las CME que garanticen la seguridad y satisfagan las crecientes demandas regulatorias establecidas por la Sociedad Internacional para la Investigación de Células Madre, ISSCR que se aplican a los productos biológicos para su uso en ensayos clínicos (336) . Más aun, algunos ensayos clínicos de trasplante de células madre de tejidos adultos y células

pluripotentes inducidas (iPSCs) en la EP ya se encuentran en fases de ensayos clínicos tempranos 1, 2 y 3 (335).

1.8.4. Tratamientos Alternativos

1.8.4.1. Productos naturales (Compuestos polifenólicos bioactivos de origen natural)

La L-dopa en combinación con los agonistas de los receptores dopaminérgicos son las terapias más populares y efectivas para los pacientes con EP. Estos dos fármacos disminuyen su efecto clínico y eficacia después de un tratamiento prolongado debido a la neurotoxicidad generada por la L-dopa presentándose en los pacientes complicaciones motoras y efectos secundarios a largo plazo (337). Con el objetivo de reducir la neurotoxicidad inducida por el L-dopa, se ha propuesto la utilización de antioxidantes de origen natural o sintético en combinación con la terapia con L-dopa que pueda disminuir los efectos secundarios y proporcionar alivio sintomático(338, 339).

Por definición, un antioxidante es una sustancia capaz de prevenir, retardar o eliminar el proceso de oxidación (pérdida de electrones) en macromoléculas celulares como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos(340). Los antioxidantes pueden ser enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa y glutatión-S-transferasa, o moléculas no enzimáticas, como la melatonina, los carotenoides, la vitamina E y algunos microelementos. Estas sustancias trabajan juntas para proteger a las células y al organismo contra los daños causados por los ROS y radicales libres (RLs) mediante numerosos mecanismos que incluyen los sistemas catalíticos para neutralizar, desviar o eliminar las ROS y los RLs. También, pueden ejercer su función i) uniéndose a los iones metálicos, ii) evitando la reacción de Haber-Weiss, que consiste en la generación de radicales hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) a partir de H_2O_2 (peróxido de hidrógeno) y superóxido ($\text{O}_2\bullet^-$), previniendo la generación de estas ROs y RLs (341).

Es importante resaltar que estudios postmortem en tejidos de pacientes con la EP se han hallado niveles reducidos de glutatión, a nivel de la substantia nigra parte compacta (SNc), en comparación con otras regiones del sistema nervioso central (SNC). Esto se debe a que, en las primeras etapas de la enfermedad, la dopamina (DA) extra vesicular y sus productos de degradación actúan como agentes oxidantes del glutatión reducido (GSH), convirtiéndolo en la forma oxidada, llamada disulfuro de glutatión (GSSG). Este metabolismo de la dopamina provoca una disminución del GSH y un aumento de la forma oxidada GSSG que se da a medida que aumenta el recambio de DA. Como resultado de este fenómeno metabólico, se incrementa la producción de ROS, que genera EO al presentarse un desbalance entre ROS y los sistemas antioxidantes bajos como la (GSH-GPx), la SOD y catalasa a favor de los primeros, dando inicio al proceso de neurodegeneración y muerte celular por apoptosis (342, 343).

Durante las dos últimas décadas el uso de moléculas activas con potencial antioxidante, de origen natural o sintéticos han sido validados, en modelos *in vitro* e *in vivo* de la EP. Dentro

de las moléculas empleadas para evaluar esta actividad biológica tenemos el 17-beta-estradiol (344), N-acetil-cisteína, Vitamina E (345), los cannabinoides como CP55940, JWH-015(346, 347), canabidiol (348); moléculas sintéticas como la melatonina (349, 350), y la minociclina (351, 352); y moléculas antioxidantes naturales como los polifenoles (353).

Todos estos hallazgos con moléculas antioxidantes han mostrado resultados concluyentes como la dramática reducción de las ROS y de proteínas pro-apoptóticas, restauración del potencial de la membrana mitocondrial y reducción de la muerte celular (354, 355). De hecho, durante los últimos años, los extractos vegetales y fitoquímicos han ganado gran importancia como compuestos neuroprotectores en las enfermedades neurodegenerativas, especialmente en la EP; gracias a su potencial actividad antioxidante, capacidad de activar sistemas antioxidantes, y a su acción antiinflamatoria que en conjunto logran reducir las vías de muerte celular (354, 356-358). Interesantemente, estos antioxidantes naturales pueden ser aislados de diferentes partes de las plantas, como las flores, las semillas, las hojas, las raíces, la corteza y sus extractos contienen compuestos polifenólicos o polihidroxifenólicos que pueden retardar la oxidación de los lípidos (359).

Los polihidroxifenoles (PHF) o polifenoles son moléculas o metabolitos secundarios de las plantas, producidos como una respuesta protectora contra situaciones de estrés como la radiación ultravioleta, la invasión de patógenos o el daño mecánico o físico. Estas moléculas poseen una gran capacidad antioxidante que depende de su estructura química y se encuentran principalmente en frutas, verduras, cereales y bebidas como el té verde y el vino (360). Los PHF se caracterizan por la presencia de un grupo fenol o más por molécula (de donde proviene su denominación de polifenol) o por más de un grupo hidroxilo presente en su grupo fenol (de donde proviene su denominación de polihidroxifenol que ha sido una de las aceptada por la comunidad científica). Los PHF provienen de un origen común que son los aminoácidos fenilalanina o tirosina. Durante la biosíntesis de los PHF, las plantas producen una gran variedad de compuestos que pueden clasificarse como: i) taninos hidrolizables (ésteres de ácido gálico de glucosa y otros azúcares); y ii) fenilpropanoides, como la lignina y los flavonoides principalmente (361).

A su vez, la gran familia de flavonoides (Fig.18) incluye: (i) flavonoles (v.gr. kaempferol, quercetina), presentes en vegetales comunes como cebollas (*Allium cepa* L.), puerros (*Allium porrum* L.) y brócoli (*Brassica oleracea* var. *Italica*); (ii) isoflavonas (v.gr. daidzeína, genisteína); (iii) flavanonas que se encuentran en el género de los cítricos, hierba santa, tomates y propóleos; (iv) flavanoles o también llamados flavan-3-oles (v.gr. catequina y su isómero epicatequina, así como sus derivados tales como epigallocatequina (EGC), y la epigallocatequina galato (EGCG)), presente principalmente en el té verde; (v) antocianidinas (v.gr. cianidina, malvidina, pelargonidina), presentes en el vino tinto (362, 363). Otros de los PHF que se han estudiado son el resveratrol, presente en uvas, arándanos, frambuesas y vino tinto; la curcumina presente en la raíz en polvo de *Curcuma longa*, y los alcoholes fenólicos hidroxitirosol y tirosol, encontrados en el aceite de oliva (364-366).

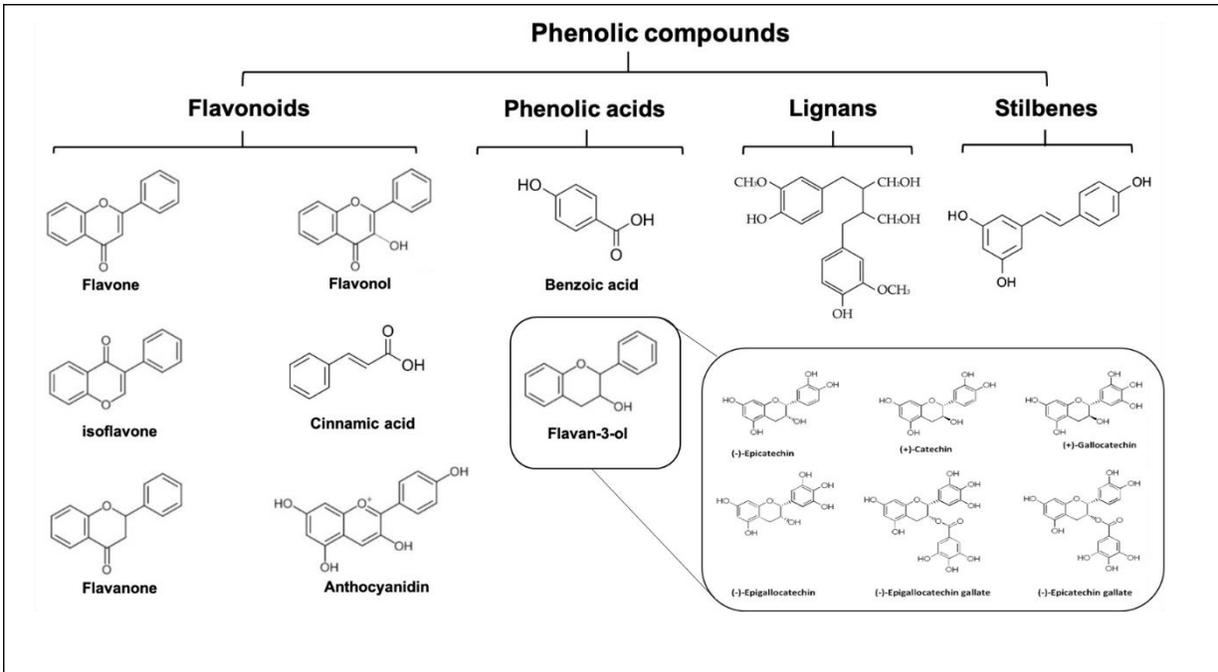


Figura 18. Clasificación básica de los polifenoles más comunes. Tomado de Wang *et al.*, 2022 (367).

Estudios farmacocinéticos en modelos *in vivo* de los PHF naturales han demostrado que su papel farmacológico depende principalmente de su biodisponibilidad que difiere en gran medida de un compuesto a otro, debido a las diferencias en su estructura química. Una vez absorbidos, los compuestos polihidroxifenólicos se liberan de los enterocitos a la linfa y posteriormente a la sangre, y se someten a biotransformación sustancial a través de reacciones tales como metilación, sulfatación, glucuronidación y conjugación de tiol que se producen principalmente en el hígado (368). Estas reacciones generalmente modifican las propiedades químicas de los metabolitos de los PHF, lo que resulta en actividades biológicas nuevas (369) como la capacidad de disminuir el EO y la inflamación, lo cual los ha convertido en una importante alternativa terapéutica en la EP.

Adicionalmente, se ha reportado que los PHF inhiben la formación de agregados mal plegados de α -sinucleína y reducen el EO inducido por la disfunción mitocondrial. De igual forma, los PHF son capaces de regular los genes del ciclo celular, así como las vías de señalización de la supervivencia celular mediada por la activación de las quinasas de señal extracelular (ERK), las cuales a su vez activan la fosfoinositol 3-quinasa (PI3K) (proteína quinasa dependiente de quinasas mitogénicas (MAPK)/ Akt, (proteína quinasa serina / treonina (AKT) que inhibe al factor de transcripción nuclear factor K-B (NF- κ B) en la vía de señalización de muerte (370).

Con el conocimiento que los antioxidantes sintéticos o naturales pueden contrarrestar los efectos nocivos del EO, es razonable pensar que la búsqueda de compuestos con potencial antioxidante capaces de prevenir la generación y acumulación de ROS constituye un promisorio tratamiento alternativo en la EP. De hecho, estudios clínicos han reportado efectos neuroprotectores de los PHF en patologías neurodegenerativas y neurológicas, al

disminuir la neuroinflamación, aumentar la memoria, el aprendizaje y las funciones cognitivas (354, 371-374).

Interesantemente, también se ha demostrado que en modelos *in vitro* e *in vivo* de la EP sometidos neurotoxina 6-hidroxidopamina (6OHDA), los PHF como el ácido gálico (AG), el ácido ferúlico, el ácido cafeico, el ácido cumárico, el propil galato (PG), la epicatequina (EC), la epigallocatequina (EGC), la epigallocatequina 3-galato (EGCG) libre y encapsulada (375-377), en conjunto con la sobre expresión de la Parkina (378) y la Minociclina (MC) (351) presentan una alta actividad neuroprotectora (379, 380).

1.8.4.2. Extracto de aguacate *Persea americana*

El aguacate o palta (viene del náhuatl *ahuácatl* = ‘testículo de árbol’ o del quechua que significa cura) es el nombre popular de una fruta tropical, de la especie conocida como *Persea americana* Mill (*Persea americana* en The Plant List, vers. 1.1, 2012-2013). Esta planta es una especie de arbóreas del género *Persea* perteneciente a la familia Lauraceae (381). Se originó en la región de Mesoamérica, en la zona montañosa situada al occidente de México y Guatemala y fue domesticada por los pueblos indígenas de esa zona hace unos 7000 años. Su distribución natural va desde México hasta Perú, pasando por Centroamérica, Colombia, Venezuela y Ecuador (382). Actualmente, el fruto de aguacate es ampliamente cultivado y consumido en el mundo (FAO, 2012, (383), por sus características organolépticas apetecidas para el consumo humano (v.gr. sabor, color y olor), y por la gran cantidad de nutrientes, sodio, grasas, bajo contenido de azúcares, y antioxidantes.

Colombia es el tercer productor de aguacate en el mundo, las variedades comunes de uso en el comercio incluyen Hass, Fuerte, Reed y Colinred, entre otras. En la actualidad, la pulpa del aguacate ha sido utilizada principalmente para el consumo humano como complemento alimenticio en la dieta, generando una gran cantidad subproductos de descarte y desecho como la cáscara o exocarpio, el endocarpio o cubierta de la semilla y las semillas. La caracterización fitoquímica de los componentes de estos subproductos ha demostrado la presencia diferentes clases de compuestos que se dividen en: (i) alcoholes (también denominados "acetogeninas alifáticas"); (ii) glucósidos terpenoides; (iii) derivados que contienen anillos de furano; (iv) flavonoides (polifenoles); y (v) cumarinas (384-387). Particularmente, se encontró en las semillas de aguacate y la cáscara o exocarpio, altas cantidades de polifenoles (388). De hecho, la semilla y la cáscara proporcionan numerosos metabolitos secundarios que incluyen alcanos, glicósidos terpenoides, que contienen derivados del anillo de furano y flavonoides (389, 390). Estos hallazgos han atraído la atención de la investigación farmacéutica y médica.

Chai y colaboradores, realizaron investigaciones complementarias sobre la composición fitoquímica de los productos naturales presentes en el fruto del aguacate, demostrando que las proantocianidinas eran componentes de los extractos y que tenían la capacidad de inhibir la tirosinasa a través de la quelación del cobre, un metal presente en el centro catalítico de la

enzima. Estos descubrimientos desempeñaron un papel importante en la selección y diseño de inhibidores potenciales de la tirosinasa a gran escala (391). Así mismo, estudios realizados del perfil fenólico del aguacate han demostrado la presencia de moléculas bioactivas con actividades enzimáticas, antimicrobianas y antioxidantes en cáscaras y semillas de las variedades Hass y Fuerte (386, 392-394), sin embargo, la información es todavía escasa en la comunidad de los cultivares de aguacate y en la comunidad científica de Colombia. En 2019 Ortega-Arellano y colaboradores evaluó la capacidad antioxidante de los extractos metanólicos del exocarpio, endocarpio y semilla en las diferentes variedades de aguacate presentes en Colombia (Hass, Fuerte, reed y Colinred) donde se evidenció una alta capacidad antioxidante en el exocarpio de la variedad Colinred con respecto a las otras variedades (Tabla 4).

Tabla 4. Capacidad antioxidante (ORAC, ABTS, FRAP) del extracto metanólico del exocarpio, endocarpio y semilla de las variedades de aguacate hass, fuerte, reed y colinred (Tomado de Ortega-Arellano et al., 2019) (395)

| Parte del fruto | Variedad | ORAC | | ABTS | | FRAP | |
|-----------------|-----------------------|-------------------------------|---------------|-------------------------------|--------------|--|--------------|
| | | mmol TE/100g ¹ | ± SD | mmol TE/100g ¹ | ± SD | mmol Fe ¹⁺ /100g ² | ± SD |
| Exocarpio | Hass ^A | 733.29 ^{b,c,d} | 0.449 | 743.00 ^{b,c,d} | 0.042 | 732.28 ^{b,c,d} | 0.043 |
| | Fuerte ^B | 759.77 ^{a,c,d} | 0.238 | 660.00 ^{a,c,d} | 0.084 | 707.10 ^{a,c,d} | 0.073 |
| | Reed ^C | 523.16 ^{a,b,d} | 0.634 | 587.00 ^{a,b,d} | 0.155 | 555.39 ^{a,b,d} | 0.132 |
| | Colinred ^D | 788.63^{a,b,c} | 0.295 | 766.00^{a,b,c} | 0.141 | 774.40^{a,b,c} | 0.178 |
| Endocarpio | Hass ^A | 130.83 ^{b,c,d} | 0.189 | 378.50^{b,c,d} | 0.049 | 200.10^{b,c,d} | 0.061 |
| | Fuerte ^B | 95.43 ^{a,c,d} | 0.063 | 95.50 ^{a,c,d} | 0.007 | 94.69 ^{a,c,d} | 0.011 |
| | Reed ^C | 100.43 ^{a,b,d} | 0.135 | 271.50 ^{a,b,d} | 0.035 | 195.30 ^{a,b,d} | 0.041 |
| | Colinred ^D | 136.58^{a,b,c} | 0.072 | 174.50 ^{a,b,c} | 0.035 | 141.91 ^{a,b,c} | 0.039 |
| Semilla | Hass ^A | 45.72 ^{b,c,d} | 0.025 | 37.40 ^{b,c,d} | 0.008 | 42.53 ^{b,c,d} | 0.014 |
| | Fuerte ^B | 28.49 ^{a,c,d} | 0.071 | 23.20 ^{a,c,d} | 0.004 | 26.42 ^{a,c,d} | 0.009 |
| | Reed ^C | 57.49^{a,b,d} | 0.0104 | 46.45^{a,b,d} | 0.002 | 52.90^{a,b,d} | 0.007 |
| | Colinred ^D | 40.30 ^{a,b,c} | 0.087 | 29.20 ^{a,b,c} | 0.005 | 34.70 ^{a,b,c} | 0.010 |

Expresado como mmol equivalentes Trolox por g de exocarpio, endocarpio, y semilla de aguacate (liofilizado)

2 Expresado como mmol Fe²⁺ por g de exocarpio, endocarpio, y semilla de aguacate (liofilizado)

Letras mayúscula (A, B, C, D) representando las variedades de aguacate. Significancias representadas por letras en minúscula (a, b, c, d) en la misma columna son significativamente diferentes de otras por el test de Tukey (p < 0.05)

Números en negrilla representan el valor mas alto de la actividad antioxidante

ABTS ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico, FRAP capacidad de reducir el ácido, GAE equivalentes, de ácido gálico, ORAC capacidad de absorbancia del radical oxígeno, TE equivalentes trolox, Los valores de la desviación estándar SD son representados como los triplicados ± la desviación estándar .

Dado que el extracto de exocarpio de la variedad Colinred (CRE) mostró los valores más altos, se seleccionó para realizar análisis fitoquímico. Los resultados obtenidos por HPLC cuantitativa revelaron que la mayoría de los componentes del extracto metanólico eran monómeros de flavanoles (por ejemplo, (-)-epicatequina (~22%) y (+)-catequina (~ 5%), con un porcentaje menor (<5%) de ácido clorogénico y ácido neoclorogénico (396) (Tabla 5). Debido a que las procianidinas de tipo B son cadenas poliméricas de catequina y epicatequina (contienen 2-7 unidades monoméricas unidas a través de enlaces C4-C6 o C4-

C8(390), es razonable que durante el metabolismo de las procianidinas se generen los flavanoles monoméricos como las catequinas y epicatequinas en estos extractos de exocarpio (Tabla 5).

Tabla 5. Caracterización fitoquímica por espectrofotometría de masas (MS) del exocarpio de la variedad collinred de *Persea americana*. (Tomado de Ortega-Arellano et al., 2019) (395)

| Componente | <i>Persea americana</i> | | |
|----------------------|-------------------------|------|---------|
| | mg/kg | ± SD | RSD (%) |
| (+)- Catequina | 4.77 | 0.07 | 1.40 |
| (-)- Epicatequina | 20.85 | 0.90 | 4.44 |
| Ácido clorogénico | 2.79 | 0.03 | 1.05 |
| ácido neoclorogénico | 1.12 | 0.02 | 1.50 |
| Total procianidinas | 35.61 | 1.10 | 3.10 |

Resultados son expresados como ± la desviación estandar (SD) y la desviación estandar relativa (RSD) de tres determinaciones independientes de la muestra.

Más interesante, los extractos de exocarpio (CRE) fueron evaluados en un modelo transgénico de la mosca *Drosophila melanogaster* (*Dm*) con deficiencia de la expresión de parkina, en donde se evidenció que los extractos a bajas concentraciones (1 mg/mL) protegieron contra la neurodegeneración inducida por PQ. Estos hallazgos, sugieren que la Epicatequina y catequina podrían estar involucradas en el efecto protector del extracto de la cáscara de aguacate. En la actualidad, los productos naturales antioxidantes son ampliamente reconocidos como agentes potenciales en la protección neuronal en estudios preclínicos y clínicos de la EP (354, 397). En este sentido, el aguacate (*Persea americana*) contiene más de 40 componentes incluyendo alcanos, terpenoides, compuestos derivados del anillo furano, flavonoides, y polifenoles (389, 392, 398). Interesantemente, los polifenoles han demostrado propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, neuroprotectoras y de regulación de la autofagia en trastornos neurodegenerativos como la EP (399). Por lo tanto, el extracto de aguacate constituye una fuente natural alternativa de compuestos polifenólicos o polihidroxifenólicos bioactivos (400) que podrían ser beneficiosos para el tratamiento de la EP (370).

CAPÍTULO 2: EDICIÓN GÉNICA DEL LRRK2 EN LA LINEA CELULAR HEK293 COMO MODELO Y ESTRATEGIA MOLECULAR DE ESTUDIO DE LA EP-AD

2.1. Historia y Definición de la Edición génica

La edición del genoma es un tipo de ingeniería genética en la que el ADN se inserta, se elimina o se reemplaza en el genoma mediante el uso de proteínas modificadas que pueden unirse de manera específica. A principios de los 80s, con el interés de estudiar la función de

un gen *in vivo* se logró realizar la inserción de varias copias de un transgén en el genoma, su expresión en diferentes células somáticas y su transmisión a través de líneas celulares germinales (401, 402). Sin embargo, esta integración ocurría de una manera inespecífica y se conocía muy poco acerca de las implicaciones en los patrones de expresión e inactivación de un gen. Posteriormente, con el entendimiento de los mecanismos de reparación del DNA por recombinación homóloga (HR), se logró la introducción de transgenes en el genoma de una manera específica creando el primer sistema de edición génica en ratones a partir de células madre embrionarias (403, 404). Asimismo, se implementó el uso de las recombinasas específicas (SSR) (del inglés **S**ite **S**pecific **R**ecombinases) que permitieran realizar modificaciones de manera tejido-específica. Los tipos más comunes de los sistemas de enzimas son Cre-LoxP y Flp-FRT (405). La enzima Cre-recombinasa elimina el ADN mediante recombinación homóloga entre secuencias de unión conocidas como sitios LoxP(406). El sistema Flp-FRT funciona de manera similar, con la Flp recombinasa reconociendo las secuencias FRT (407, 408). Al cruzar un organismo que contiene los sitios de recombinasa que flanquean el gen de interés con un organismo que expresa el SSR bajo el control de promotores específicos de tejido, es posible desactivar o activar genes en células específicas. Fue así, que estas técnicas se utilizaron para eliminar genes marcadores de animales transgénicos permitiendo a los investigadores inducir la recombinación bajo ciertas condiciones controladas, induciendo la eliminación/supresión (Knock-out/Knock-down) o expresión (Knock-in) de genes en tejidos o etapas de desarrollo deseados (408).

A pesar de que la transgénesis basada en SSR representó un avance importante en el campo de la investigación, presenta varias limitaciones: la primera, se requieren al menos dos líneas transgénicas diferentes (líneas Cre y LoxP) para lograr líneas animales con knock-out o knock-in específicos para el tejido y / o estadio de desarrollo, de manera que cuando se pretenden generar dobles o triples Knockouts o cuando se necesita un reportero de recombinación de Cre en el mismo animal, el número de transgenes y la cantidad de cruces necesarios pueden ser extremadamente laboriosos y consumir mucho tiempo. En segundo lugar, en estas modificaciones genéticas mediadas por SSR no es posible modificar uno o pocos nucleótidos (v.gr, mutaciones puntuales). En tercer lugar, que el uso de métodos basados en recombinasas requieren un análisis cuidadoso de los efectos biológicos de las enzimas SSR, dado que algunas líneas con expresión de Cre sola, independientemente de la activación genética tejido o estadio-específica, son capaces de inducir algún fenotipo, como muerte celular, aberraciones cromosómicas, daño al ADN y esterilidad (409-412). Adicionalmente, La recombinación mediada por Cre de las secuencias de LoxP también puede variar dependiendo de la posición de la secuencia de LoxP en el genoma (413). Algunas de estas limitaciones se resolvieron mediante los métodos de edición del genoma basados en nucleasas específicas que dieron origen a las Nucleasas con dedos de zinc (ZNFs), Nucleasas tipo activadores de transcripción (TALENs) y finalmente el Sistema de Nucleasas asociadas a repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR/Cas) (414).

2.2. Nucleasas asociadas a repeticiones palindrómicas cortas, agrupadas y regularmente inter-espaciadas (CRISPR/Cas)

La edición génica con nucleasas específicas es una quimera entre dominios específicos de unión al DNA (por sus siglas en inglés **DNA-binding domains** DBDs) y dominios de corte no específicos (por sus siglas en inglés **DNA-cleavage domains** DCDs). Los DBDs permiten la llegada y unión eficiente y precisa a la secuencia blanco mientras que los DCDs como tijeras genómicas, cortan el DNA en el sitio blanco para producir un rompimiento de doble hebra (DSB(415)). El Sistema de nucleasas Cas asociadas a repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR/Cas *del inglés Clustered Repeat Interspaced palindromic repeats associated protein Cas*), como su nombre lo indica, está compuesto por un DBD de secuencias repetidas con espaciadores CRISPR y un DCD

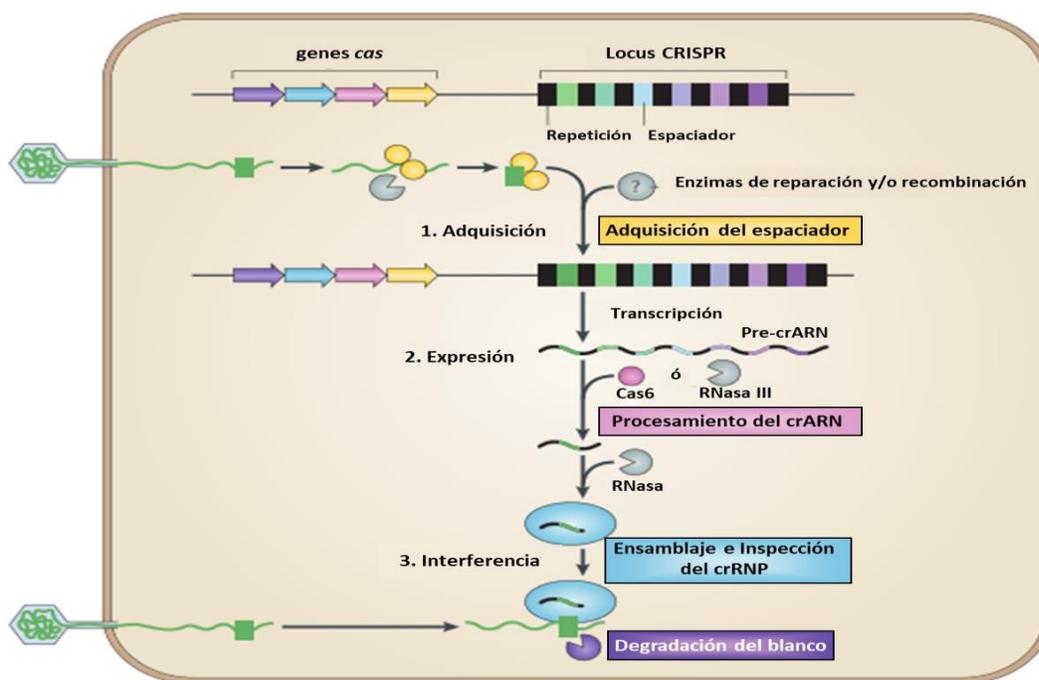


Figura 19. La inmunidad adaptativa por los sistemas CRISPR/Cas (Proteínas Cas asociadas a repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas) está mediada por los ARN CRISPR (crARN) y las proteínas Cas, que forman complejos de ribonucleoproteína CRISPR de múltiples componentes (crRNP). Los genes cas se colorean de acuerdo con la función, como lo indican las cuatro categorías funcionales en las cajas coloreadas: adquisición del espaciador (amarillo); procesamiento de ARNr (rosa); Ensamblaje e inspección del crRNA (azul); y degradación del DNA blanco (púrpura). Tomado y adaptado de Van-der-Oost et al 2014 (420).

formado un conjunto de genes asociados a CRISPR (cas) que codifican proteínas Cas con actividad endonucleasa.

El DBD CRISPR, contiene una serie de secuencias repetidas cortas separadas por espaciadores con secuencias únicas, y características de los organismos procariontes que pueden transcribirse en ARN CRISPR (ARNcr) y ARN transactivador (416). Estas repeticiones fueron observadas por primera vez por Ishino y sus colegas en *Escherichia coli*

(417). Las secuencias de ácidos nucleicos correspondientes al espaciador denominadas protoespaciador son de origen exógenos. Este, suele estar flanqueado por un patrón corto de nucleótidos que contienen de 2 a 5 guanosinas muy conservadas (v. g. NGG), denominado motivo adyacente al protoespaciador (PAM *del inglés protospacer-adjacent motif*; Fig. 19). El PAM de hecho, es un componente único e indispensable en CRISPR/Cas para la identificación y destrucción de ADN foráneo ya que es la secuencia que reconoce el complejo de la nucleasa Cas (418).

De este modo, se ha identificado a CRISPR/cas como un mecanismo del sistema inmune adaptativo en bacterias y arqueas, impidiendo que sean infectadas por fagos, virus y otros elementos genéticos extraños (419). Cuando los procariontes son invadidos por elementos genéticos extraños, el ADN foráneo puede ser cortado en fragmentos cortos por las proteínas Cas, entonces los fragmentos de ADN se integrarán en la matriz CRISPR como nuevos espaciadores (421) lo que se denomina adquisición. Durante la segunda etapa, que se conoce como expresión, el locus CRISPR se transcribe y el pre-crARN se procesa en pequeños crARN por medio de las ribonucleasas asociadas a CRISPR (Cas6) y / o domésticas (como la RNasa III). Los ARNr maduros y las proteínas Cas se ensamblan para formar un complejo crRNP. Una vez que el mismo invasor vuelva a invadir, el ARNr reconocerá rápidamente y se emparejará con el ADN extraño por medio de la secuencia PAM, lo que guiará a la proteína Cas a cortar las secuencias diana del ADN extraño, protegiendo así al huésped, lo cual se denomina etapa final de interferencia (Fig. 20) (422).

Cas, entonces los fragmentos de ADN se integrarán en la matriz CRISPR como nuevos espaciadores (421) lo que se denomina adquisición. Durante la segunda etapa, que se conoce como expresión, el locus CRISPR se transcribe y el pre-crARN se procesa en pequeños crARN por medio de las ribonucleasas asociadas a CRISPR (Cas6) y / o domésticas (como la RNasa III). Los ARNr maduros y las proteínas Cas se ensamblan para formar un complejo crRNP. Una vez que el mismo invasor vuelva a invadir, el ARNr reconocerá rápidamente y se emparejará con el ADN extraño por medio de la secuencia PAM, lo que guiará a la proteína Cas a cortar las secuencias diana del ADN extraño, protegiendo así al huésped, lo cual se denomina etapa final de interferencia (Fig. 20) (422).

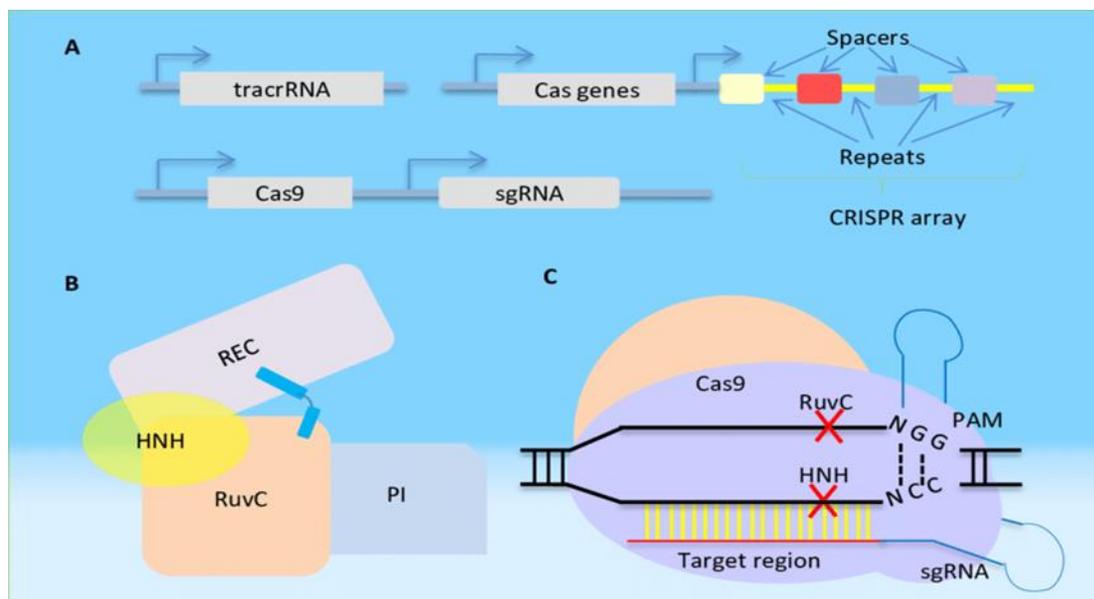


Figura 20. Componentes del sistema CRISPR/Cas de tipo II. **A.** Estructuras genómicas del sistema CRISPR/Cas bacteriano nativo (arriba) y del sistema CRISPR/Cas9 diseñado (abajo). *tracrRNA*, ARN transactivador; *sgRNA*, ARN guía único; **B.** Representación esquemática de la estructura de la proteína Cas9. Los dominios incluyen REC (gran lóbulo de reconocimiento) y RuvC (un dominio nucleasa) que está unido a una región rica en arginina. HNH es un segundo dominio nucleasa. PI, dominio de interacción con PAM. **C.** Conformación del complejo Cas9-sgRNA en el proceso de escisión del ADN. Tomado y adaptado de Song et al 2016 (423).

El conjunto de genes asociados a CRISPR (cas) que codifican para proteínas Cas nucleasa, pueden clasificarse en 2 clases (Clase 1 y Clase 2), 6 tipos (I al VI) y en varios subtipos, que se caracterizan por la presencia de complejos efectores con múltiples proteínas Cas como es el caso de los sistemas de Clase 1 (Tipo I, III y IV) o por poseer una única proteína efectora como los sistemas de Clase 2 (Tipo II, V y VI) (424, 425)(Tabla 6).

Tabla 6. Clasificación de los sistemas CRISPR/cas. Tomado de Xu et al 2020 (426)

| Clase | Tipo | Subtipo | Efeotor | Blanco | Dominio Nucleasa | requerimient o TracrRNA | PAM/PFS |
|-------------------------|------|----------------|--------------|-------------|-------------------|-------------------------|----------------------------|
| 1 (multi-Casproteínas) | I | A,B,C,D,E,F, U | Cascade | dsDNA | HD fused to Cas3 | No | – |
| | III | A,B,C,D | Cascade | ssRNA | HD fused to Cas10 | No | – |
| | IV | A,B | Cascade | dsDNA | unknown | No | – |
| 2 (Única proteína Casp) | II | A | SpCas9 | dsDNA | RuvC,HNH | Yes | NGG |
| | II | A | SaCas9 | dsDNA | RuvC,HNH | Yes | NNGRRT |
| | II | B | FnCas9 | dsDNA/ssRNA | RuvC,HNH | Yes | NGG |
| | II | C | NmCas9 | dsDNA | RuvC,HNH | Yes | NNNNGATT |
| | V | A | Cas12a(Cpf1) | dsDNA | RuvC,Nuc | No | 50 AT-richPAM |
| | V | B | Cas12b(C2c1) | dsDNA | RuvC | Yes | 50 AT-richPAM |
| | V | C | Cas12c(C2c3) | dsDNA | RuvC | Yes | 50 AT-richPAM |
| | VI | A | Cas13a(C2c2) | ssRNA | 2xHEPN | No | 30PFS:non-G |
| | VI | B | Cas13b(C2c4) | ssRNA | 2xHEPN | No | 50PFS:non-C;30PFS:NAN/NN A |
| | VI | C | Cas13c(C2c7) | ssRNA | 2xHEPN | No | – |
| VI | D | Cas13d | ssRNA | 2xHEPN | No | – | |

El sistema CRISPR-Cas9 de tipo II derivado de *Streptococcus pyogenes* (SpCas9) es uno de los mejor caracterizados y más comúnmente utilizados en numerosos sistemas CRISPR-Cas(425, 427). Los principales componentes del sistema CRISPR-Cas9 son la endonucleasa Cas9 guiada por un ARN de guía única (sgARN)(428). La proteína Cas9 posee dos dominios nucleasa, denominados HNH y RuvC, cada uno de ellos tienen como blanco una cadena del ADN bicatenario(423, 429). El RNA de guía única (sgRNA) es una combinación simplificada de crRNA y tracrRNA(430). La nucleasa Cas9 y el ARNsg forman una ribonucleoproteína (RNP) Cas9, que puede unirse y escindir la diana del ADN (431) y la secuencia adyacente al protoespaciador (PAM) para la unión de la proteína Cas9 al ADN diana (428).

2.3. Mecanismos de reparación del rompimiento de doble cadena de ADN en la edición génica por Nucleasas específicas CRISPR/cas9

Durante el proceso de edición del genoma, el sgRNA recluta a la endonucleasa Cas9 en un lugar específico del genoma para generar una DSB, que puede repararse mediante dos vías:

la recombinación homóloga (HDR) ó la unión de extremos no homólogos (NHEJ)(415). La vía de reparación HDR permite una reparación sin errores y requiere una extensa homología de secuencias desde la cual se pueden copiar fielmente las secuencias del ADN dañado. Naturalmente, la homología de la secuencia es proporcionada por la cromátida hermana y, por lo tanto, la HDR es operativa durante las fases S y G2 inicial del ciclo celular durante el cual está disponible la cromátida hermana(432).

Así como en la recombinación homóloga tradicional, la HDR puede proceder de la misma manera utilizando un vector de ADN de doble cadena exógeno como plantilla de reparación(433, 434); esto permite que pueda introducir modificaciones genómicas precisas en el sitio diana utilizando una plantilla de reparación de ADN homóloga, lo cual ha sido usado para insertar una mutación específica, con la introducción de una plantilla de reparación (DNA donador) que contiene la mutación deseada flanqueada por los brazos homólogos (Fig. 21).

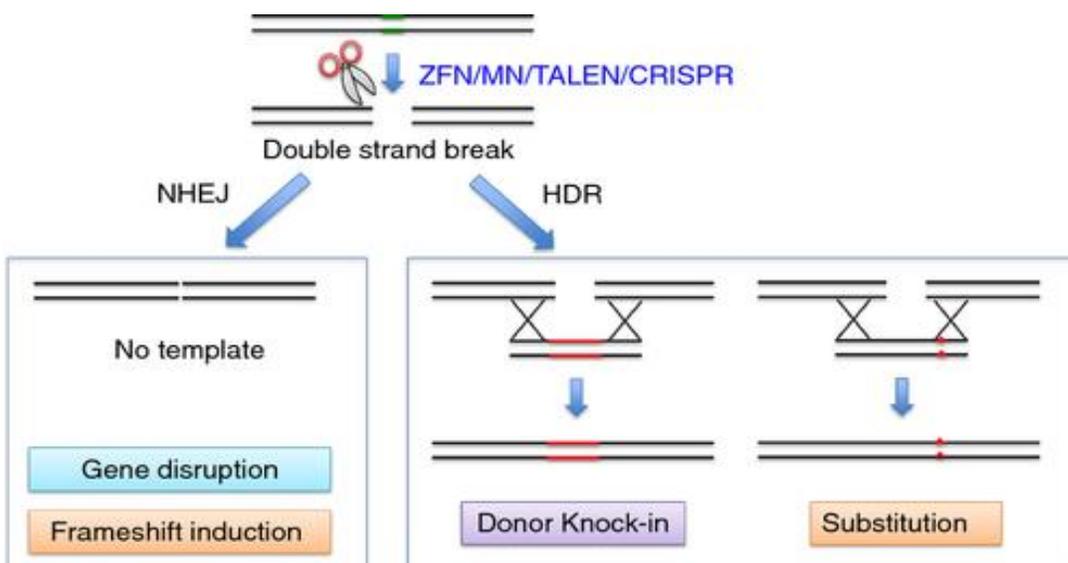


Figura 21. Enfoques de edición génica con nucleasas específicas de acuerdo a los mecanismos de reparación. Tomado de Gupta et al., 2014 (433).

Por su parte NHEJ es un proceso propenso a errores en el que los extremos del ADN roto se ligan directamente a través de las proteínas de procesamiento final, Ku70: Ku80 (una parte de la proteína quinasa dependiente del ADN(ADN-PK)), la subunidad catalítica del ADN-PK (DNAPKsc), y la ligasa IV(435). Durante este proceso de unión de extremos no homólogos, usualmente se generan inserciones y/o deleciones de nucleótidos a pequeña escala (indels) (436) en los sitios de corte, lo que genera mutaciones de desplazamiento de marco o codones de parada prematuros en el marco (ORF) de los genes diana(437). Puesto que NHEJ no requiere una secuencia de homología, puede ocurrir a lo largo del ciclo celular, de modo que en la mayoría de las condiciones, NHEJ es más eficiente que HDR, ya que es activa en aproximadamente el 90% del ciclo celular y no depende de un donante de homología cercano (438).

De este modo, la naturaleza propensa a errores de la NHEJ puede utilizarse para exportar e introducir cambios de marco en la secuencia de codificación de un gen, eliminando potencialmente el gen mediante la combinación de dos mecanismos: i) el truncamiento prematuro de la proteína y ii) el decaimiento sin mediación de la transcripción del ARNm, de los cuales este último no siempre es particularmente eficiente. Además, por medio de estos mecanismos, se pueden conseguir deleciones de grandes fragmentos y el knockout simultáneo de múltiples genes mediante el uso de múltiples sgRNAs dirigidos a un único gen o más(439).

Finalmente, se puede concluir que estas vías de reparación del ADN se promueven de manera rápida después del daño de DSB para mantener la integridad genómica que es fundamental para la función y la supervivencia celular (440). Esta vía de reparación, en el contexto de la edición génica aplicada a estudios moleculares es útil para: 1) generar cambios en el marco de lectura o codones de parada que impidan o alteren la transcripción de la proteína codificada por el gen blanco (*Knock-out*); permitiendo realizar estudios de pérdida de función, en el caso de la vía de reparación NHEJ y también para 2), aislar los alelos de enfermedades deseados para introducir mutaciones en secuencias de tipo salvaje (WT) o revertir mutaciones a secuencias WT (*Knock-in*) en la vía HDR (Fig. 22).

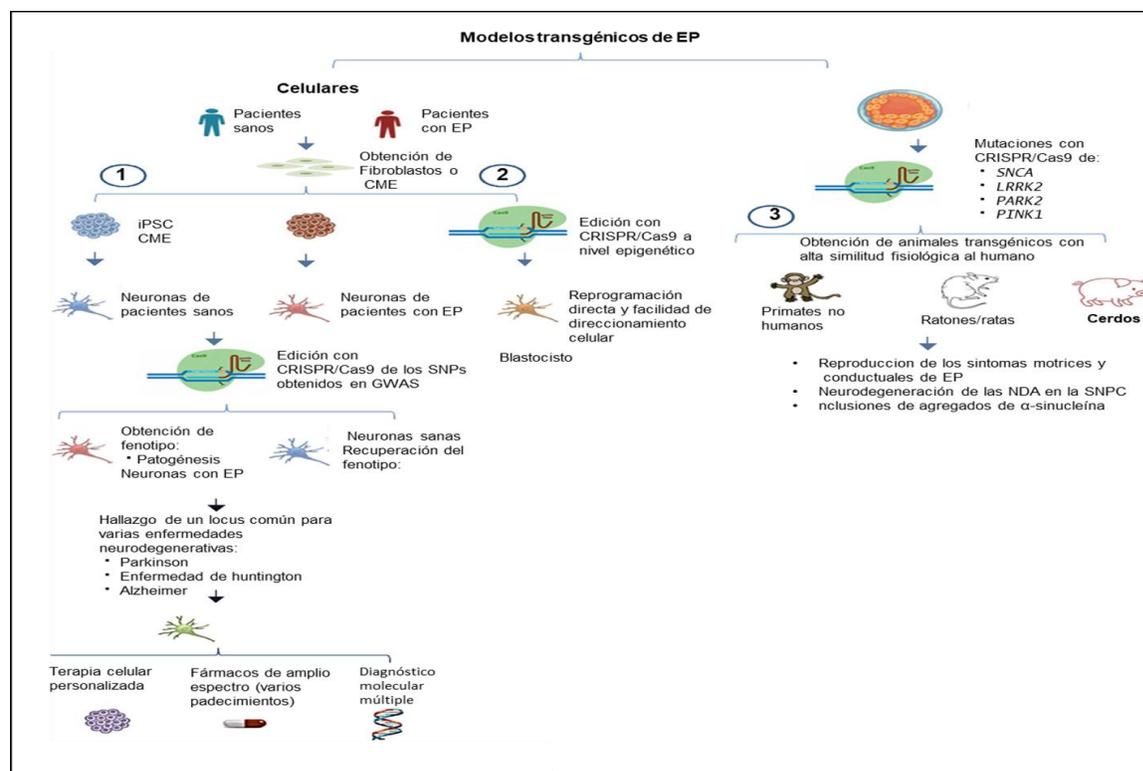


Figura 22. Modelos transgénicos de EP generados con CRISPR/Cas9 con diferentes aplicaciones. 1) Selección de genes candidatos para EP por medio de CRISPR/Cas9 en neuronas diferenciadas de iPSC obtenidas de fibroblastos o CME de pacientes mediante los estudios de asociación del genoma completo (GWAS) y sus implicaciones futuras (modificado de Heidenreich y Zhang). 2) Reprogramación directa de fibroblastos a NDA por medio de manipulación epigenética con CRISPR/Cas9. 3) Generación de modelos transgénicos animales por edición de genes a nivel embrionario, asociados con EP del tipo familiar. Se puede reproducir la fisiopatología típica, así como las manifestaciones conductuales características de la EP. Tomado de Cota-Coronado et al 2017 (441).

2.4. Edición Génica como estrategia molecular de estudio en la EP

Durante los últimos años, la tecnología CRISPR-Cas9 ha sido ampliamente empleada en la investigación de la EP para eliminar, introducir o modificar genes relacionados con la enfermedad, activar o reprimir selectivamente la expresión de genes clave, o realizar modificaciones epigenéticas. Los estudios *in vitro* se han utilizado principalmente para generar modelos celulares de EP. Por ejemplo, utilizando células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) de titíes (un primate no humano), Vermilyea y sus colegas utilizaron CRISPR-Cas9 para introducir la mutación G2019S en el gen *LRRK2*, en neuronas dopaminérgicas derivadas de las iPSCs y encontraron un incremento en la producción de ROS, disminución de la viabilidad neuronal y de la complejidad de las neuritas; todas estas características que están asociadas con la EP(442). También, el sistema CRISPR-Cas9 ha sido empleado para generar modelos *in vivo* de la EP. Por ejemplo, ratones knock-in para (del inglés vacuolar protein sorting 35) *Vps35* D620N, que desarrollan algunas características típicas de la EP, fueron creados por ingeniería genómica mediada por CRISPR-Cas9(443). Dos grupos independientes de científicos fueron más allá y generaron modelos de EP en primates no humanos(444).

Chen y colaboradores utilizaron un CRISPR-Cas9 modificado, que les permitió reducir las modificaciones fuera del sitio blanco. Por ejemplo, para dirigirse al gen *PINK1*, utilizaron un gen Cas9 con una mutación D10A, conocido como nCas9 (429). Como se mencionó anteriormente, en lugar de introducir DSBs, el nCas9 mutado corta sólo una hebra del ADN diana, y su frecuencia de ediciones fuera del sitio blanco se reduce en gran medida. De hecho, utilizando el nCas9 con un par de gRNAs dirigidos a la misma región del gen de interés, se puede conseguir un DSB. En un estudio independiente, se logró el bloqueo concomitante de los genes *PINK1* y *DJ-1* en la sustancia nigra de monos mediante un sistema CRISPR-Cas9 estándar administrado por vectores virales adeno-asociados, AAV9. Este enfoque condujo al desarrollo de la generación de modelos con las diferentes características típicas de la EP, incluyendo alteraciones conductuales y neuropatológicas(445).

La tecnología CRISPR-Cas9 en la EP también se ha utilizado para eliminar la expresión de un gen mutado o revertir directamente mutaciones que se sabe que causan la enfermedad. Un ejemplo clásico, es el de la mutación A53T en el gen *SNCA*, que es una de las mutaciones más estudiadas en la EP. De hecho, estudios en ratas demostraron que la sobreexpresión de la α -sinucleína portando la mutación A53T desarrollaron un fenotipo similar a la EP, que fue prevenido mediante la delección mediada por CRISPR-Cas9 del gen mutado(446). Así mismo, para modificar el estado de metilación del gen *SNCA*, el cual está incrementado en pacientes con EP, Guhathakurta y sus colegas utilizaron un enfoque muy elegante e inteligente mediado por CRISPR-dCas9, con esta metodología, reclutaron una histona lisina desmetilasa específica, *JARID1A*, en el promotor del gen *SNCA* de iPSCs de pacientes con la EP y reportaron que su sistema fue suficiente para disminuir la expresión de la α -

sinucleína. Este estudio sentó las bases para un enfoque terapéutico innovador para la EP empleando (447).

Otra de las aproximaciones interesantes, es la utilización de la edición genética mediante el método CRISPR/cas9 en el estudio del gen del *LRRK2*. Di Maio y colaboradores usaron células HEK293 de tipo salvaje (WT) para introducir la mutación dominante G2019S en el *LRRK2* G2019S/G2019S) y la supresión del gen *LRRK2* (*LRRK2*^{-/-}). Como resultado de estas aproximaciones, se demostró que la actividad de la quinasa *LRRK2* se ve aumentada en las células WT como resultando de la fosforilación del sustrato Rab10 de la *LRRK2* en un modelo idiopático de la EP. Esta actividad aumentada de la *LRRK2* también incluyó anomalías en la importación de proteínas mitocondriales y la función lisosomal. Lo anterior indica que, independientemente de las mutaciones, la *LRRK2* salvaje juega un papel clave en la EP idiopática. Por lo tanto, las terapias dirigidas a *LRRK2* pueden ser útiles para la mayoría de los individuos con EP(448).

2.5. Edición Génica como estrategia terapéutica en la EP

La corrección génica mediada por CRISPR/Cas9 y otros sistemas de edición génica proporciona una nueva visión de la terapia celular para muchas enfermedades genéticas humanas. La estrategia general es fragmentar el ADN genómico cerca de los genes que presentan la mutación utilizando CRISPR/Cas9 y simultáneamente, proporcionar un donante que presente secuencias normales. Los fragmentos de genes mutantes pueden corregirse mediante recombinación homóloga, eliminando así el defecto funcional asociado en las células diana.

Otra de las opciones de la edición génica son las iPSC específicas del paciente para la corrección de genes, esto se debe a su capacidad de diferenciarse en todo tipo de células somáticas funcionales después de la corrección de genes (449). Una de las aplicaciones de alto impacto de CRISPR/Cas9 son los denominados estudios de asociación del genoma completo (GWAS) en iPSC, donde se evalúan polimorfismos que cambian en un solo par de bases en el ADN (SNPs) y se atribuyen como posibles causantes de una enfermedad como la EP en una población masiva (441). Heidenreich y Zhang, partiendo de un estudio GWAS lograron la obtención de iPSC a partir de fibroblastos de individuos saludables y de pacientes con EP y su diferenciación in vitro a neuronas. Posteriormente en las iPSC derivadas de pacientes sintomáticos se realizó una edición por medio de CRISPR/Cas9 del sitio-específico de recombinación homóloga (HR) de los genes candidatos que podrían estar involucrados en la patogénesis de la enfermedad. Aunque ha habido un auge en corrección génica en el modelo de iPSCs mutadas empleando CRISPR/Cas, también se logró la corrección de las mutaciones causales de la EP en estudios similares en iPSCs provenientes de fibroblastos de portadores de las mutaciones G2019S y R1441C del gen *LRRK2*, utilizando nucleasas ZNFs(451).

2.6. La línea celular-HEK293

2.6.1. Definición

La línea celular HEK293 se originó a partir del riñón de un embrión humano femenino y se inmortalizó originalmente en 1973 mediante la integración de un fragmento del genoma adenoviral 5 (Ad5) de 4 kbp que incluía los genes que codifican las proteínas E1A y E1B, en el cromosoma 19(452, 453). La expresión de E1A y E1B permite el cultivo continuo de células HEK293 al inhibir la apoptosis e interferir en las vías de transcripción y control del ciclo celular(454). Además, dado que E1A y E1B son factores auxiliares esenciales para la producción de virus adenoasociados (AAV), la expresión continua de estos genes hace que las células HEK293 sean huéspedes de producción atractivos para partículas AAV recombinantes(455).

2.6.2. Características Fenotípicas y Moleculares

Las células HEK293 presentan un fenotipo celular adeno-transformado típico, con tendencia a seguir dividiéndose tras alcanzar la confluencia y a mantener su crecimiento en islas o grupos de células. Al igual que las células de rata y hámster adeno-transformadas, las células HEK293 tienen un carácter epitelioide macroscópico. El diámetro de estas células oscila entre 11 y 15 μm ; que depende de las condiciones de cultivo. Las células cultivadas crecen en monocapa adherente con apariencia más planar y con un diámetro mayor que las células en cultivo en suspensión, que toman la forma esferoide(456). En algunos casos, los núcleos celulares parecen hinchados y se observan frecuentes heterocariones. Otra característica importante es la capacidad de las células 293 para crecer igualmente en medios en presencia o en ausencia de iones de calcio, o en concentraciones bajas de suero (452) (Fig. 23). Recientemente se mapearon los genomas y los perfiles transcriptómicos de seis líneas celulares HEK293, confirmando que poseen un genoma humano hipotriploide con el ADN adenoviral insertado en el cromosoma 19 (457, 458) .

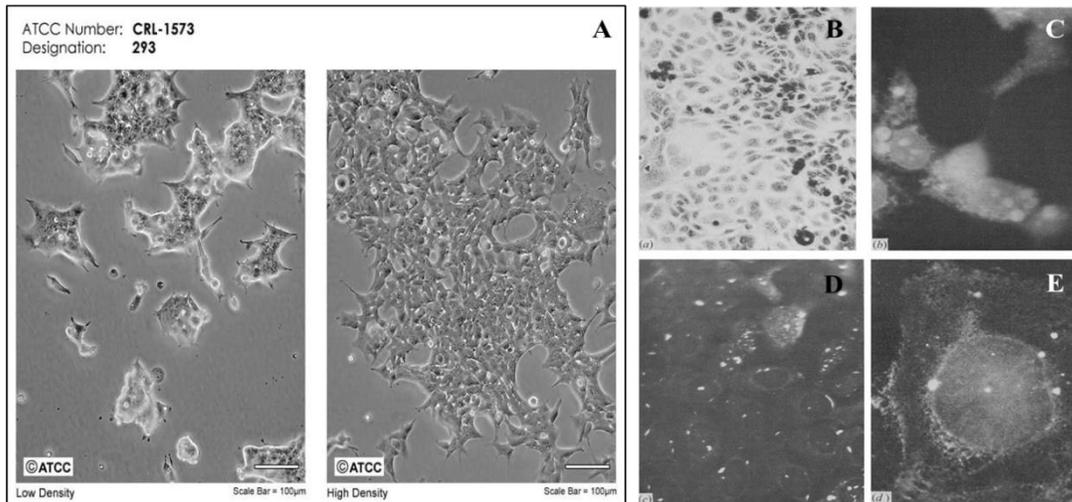


Figura 23. Características morfológicas de las células HEK293. (A) Morfología epitelioide de las células HEK293 en una monocapa adherente a baja y alta confluencia. (B-C) Tinción de Giemsa y de fenantrenoquinona. (D-E) Tinción con anticuerpos fluorescentes anti-tumorales. Tomada de Grahan et al 1977 (459).

2.6.3. Las HEK293 en el modelamiento de la EP

En el 2002, Shaw y colaboradores demostraron que las células HEK293 expresan más de 60 genes específicos neuronales, que incluían neuro receptores, subunidades de canales iónicos específicos de neuronas, proteínas asociadas a vesículas sinápticas y enzimas metabólicas específicas de neuronas(460, 461). También identificaron las subunidades de neurofilamentos (NF) NF-L, NF-M, NF-H y la α -internexina. Estudios electrofisiológicos mostraron que las células 293 poseen canales de calcio, potasio y sodio funcionales que son específicos de neuronas (462) y además presentan afinidad a diversos agonistas implicados en la señalización neuronal como por ejemplo, a la acetilcolina, bradiquinina, histamina, neurotensina y ATP) (463)(**Fig. 24**).

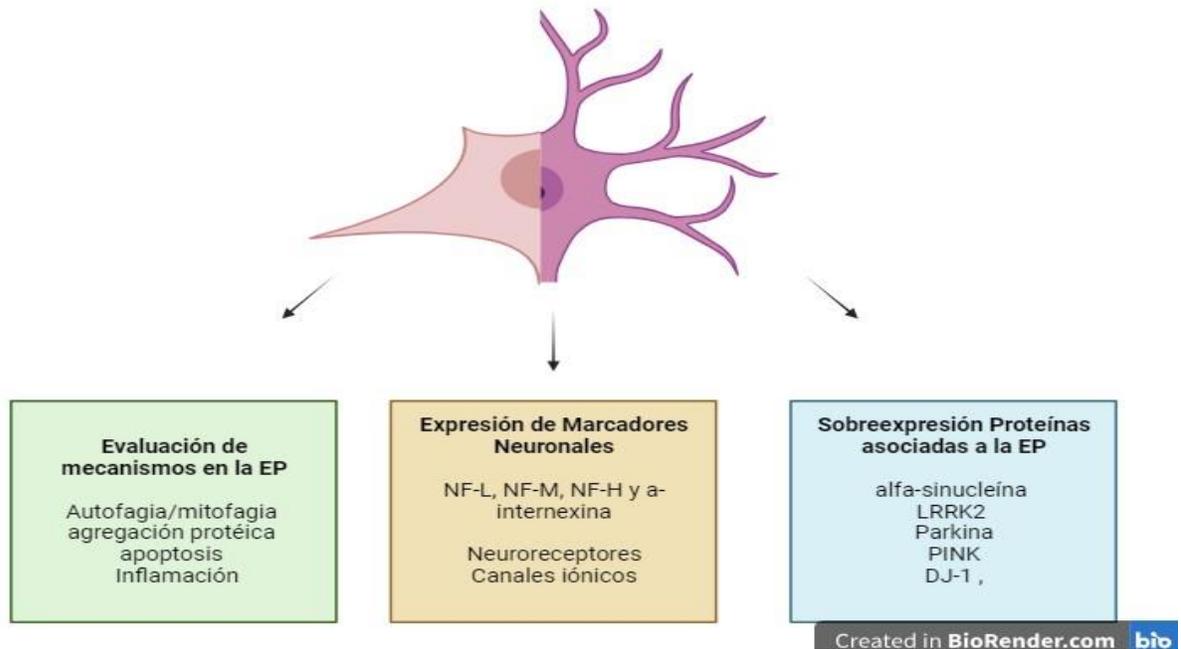


Figura 24. Las células HEK293 como modelo de la Enfermedad de Parkinson Fuente: Autor Creado en BioRender.

Estos hallazgos inesperados de la expresión génica, transcriptómica y funcional de marcadores neuronales en el modelo HEK293, se puede explicar en términos del origen de las células HEK293, a partir de células precursoras neuronales presentes en el riñón durante las etapas embrionarias más específicamente, en la médula suprarrenal, la cual tiene un origen en la cresta neural, lo que podría explicar la expresión de varios genes específicos de las neuronas que pueden encontrarse en las células HEK293 y la reducida eficacia para poder generar una línea celular HEK a partir de células renales. Estas observaciones de la relación inesperada de la línea HEK con las neuronas, debido a sus características genóticas y fenotípicas compartidas con el linaje neuronal, lo posicionan como un modelo celular excelente en el estudio de las enfermedades neurodegenerativas como la EP. Las células HEK293 en la investigación de la EP ha estado relacionada principalmente con la expresión de proteínas transportadoras y receptores dopaminérgicos con la función dopaminérgica, de proteínas asociadas (464) y proteínas relevantes en la EP tales como la alfa-sinucleína (447, 465, 466), la LRRK2(448, 467, 468), la Parkina(469), PINK (470, 471) y DJ-1 (472), con el fin de analizar su función tanto en estado silvestre como mutado. También se han utilizado las HEK293 para evaluar el flujo autofágico, procesos de mitofagia (469), agregación celular (473), apoptosis e inflamación (474) en esta enfermedad. Adicionalmente, la expresión continua de genes esenciales para la producción de virus adenoasociados (AAV) en HEK293, hace que estas células sean huéspedes atractivos de producción para partículas AAV recombinantes.

Interesantemente, las células HEK293 también se han usado en estudios de cribado de medicamentos para identificar moléculas con potencial terapéutico en la EP, evaluando en

diferentes compuestos químicos de origen sintético (475) o natural (476) para determinar y seleccionar el compuesto su capacidad para reducir la agregación de proteínas tóxicas, proteger las neuronas dopaminérgicas, o modular vías moleculares editando o suprimiendo genes causales relacionadas con la EP.

CAPÍTULO 3: LAS CÉLULAS MESENQUIMALES ESTROMALES DE LA GELATINA DE WHARTON Y SANGRE MESTRUAL (CME-GW, SM) COMO MODELO DE ESTUDIO DE INHIBICION FARMACOLOGICO DEL LRRK2 EN LA EP-AD

3.1. Células Mesenquimales estromales (CME) definición y características

Las células mesenquimales estromales (CME ó MSC, por sus siglas en inglés *Mesenchymal Stromal cells*), son células estromales con capacidad de autorrenovación y diferenciación multilínea. Fueron identificadas originalmente por Friedenstein y colaboradores (477), como precursores de fibroblastos en la médula ósea, esta población se definió posteriormente como originaria del estroma (478), de ahí el término células estromales. El término "mesenquimal" hace referencia al origen embrionario de las células, de la capa germinal del mesodermo, como las células que forman los vasos sanguíneos, las células sanguíneas y el sistema urogenital. Desde el descubrimiento de las CME por Friedenstein, esta población se considera una población de células madre adultas de la médula ósea (479) y han sido denominadas también como células madre estromales (CME). Sin embargo, el uso del término célula madre, ha sido cuestionado dado que no se ha podido comprobar su capacidad de autorrenovación y diferenciación *in vivo* por lo que se ha sugerido el uso del término de "Células mesenquimales estromales" (CME) (480, 481).

Aunque el término MSC sigue siendo ampliamente acuñado para referirse al origen mesodérmico de estas células. Recientemente, se ha postulado que estas CME posiblemente se deriven de los pericitos, lo que explica su ubicación en varios tejidos y la similitud en marcadores inmunofenotípicos (480). Los hallazgos experimentales de Caplan evidencian que las MSC se ubican en las paredes de los poros donde se forma la unidad vascular al igual que los pericitos en el organismo. Además, describe el papel de los pericitos como reguladoras de la dinámica del endotelio vascular sirviendo como guardianes del paso de sustancia o agentes por medio de la vasculatura y de la secreción de factores inmunomoduladores y regenerativos (482). De acuerdo con lo anterior, Caplan propone el término de células de señalización medicinal "*Medicinal Signaling Cells*" para estas células debido a que sirven como un repositorio de biomoléculas con potencial terapéutico.

Con el objetivo de unificar los criterios para la identificación de las CME humanas, la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) sugiere unas normas mínimas: 1) Presentar adherencia al plástico cuando se mantiene en condiciones de cultivo estándar. 2)

expresar las moléculas de superficie CD105, CD73 y CD90 y la ausencia de expresión de CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79 α o CD19 y HLA-DR. 3) capacidad de diferenciarse en osteoblastos, adipocitos y condroblastos *in vitro*; 4) presentar morfología fibroblastoide. (483, 484)(Fig.25).

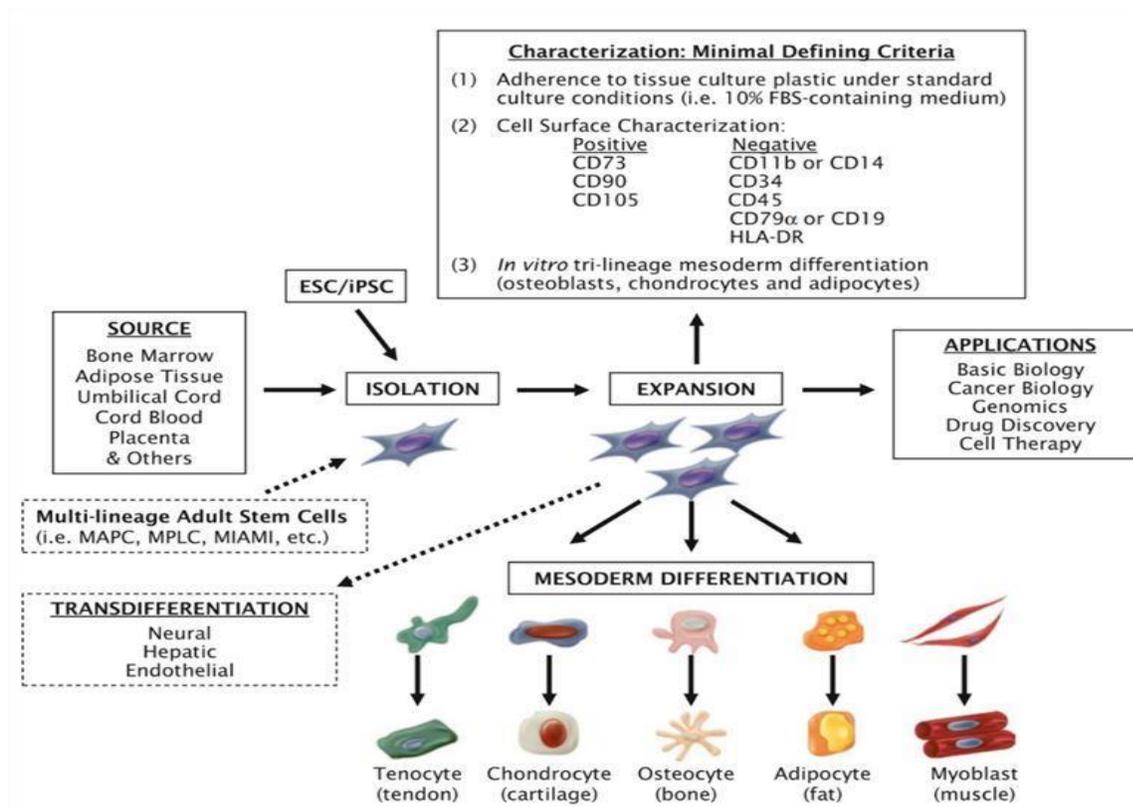


Figura 25. Las células mesenquimales estromales aisladas y expandidas a partir de diversas fuentes. Estas se caracterizan por un conjunto mínimo de criterios definidos por la ISCT y pueden aplicarse a diversos hallazgos experimentales. Tomado de Vemuri et al., 2011 (485).

Las CME se pueden aislar de diversos tejidos de origen embrionario o adulto (486), que incluyen tejido adiposo, sangre menstrual, médula ósea, sangre y gelatina de Wharton del cordón umbilical, pulpas dentales, placenta y músculo (487, 488). Adicionalmente, aunque se les atribuye un carácter multipotente, tienen la capacidad de diferenciarse a células de otras capas germinales embrionarias además de la mesodérmica, como las neuronas (489), que se originan del ectodermo, y hepatocitos, derivados de endodermo (490).

En condiciones de crecimiento estándar (es decir, medio con un 10% de Suero Fetal Bovino), las CME humanas aisladas de una fuente tisular y expandidas en una placa de cultivo cambian gradualmente su aspecto de esférico a fusiforme a medida que pasan de la condición de suspensión a la de cultivo adherente. A medida que se propagan los cultivos adherentes, sólo una fracción de las células permanece clonogénica (capaz de generar UFC-F en condiciones de crecimiento estándar), lo que sugiere la presencia de un nicho *in vitro* de CMM dentro de estos cultivos. A diferencia de otras poblaciones de células madre, como las

células madre embrionarias humanas, la mayoría de las CME humanas en cultivo muestran un potencial de expansión in vitro limitado (es decir, ~5-10 pasajes)(485).

3.1.1. Células Mesenquimales estromales de la gelatina de Wharton

El cordón umbilical humano es considerado una excelente fuente de obtención de CME, dadas sus características como: 1) la obtención no invasiva a partir de tejido que normalmente se desecha al nacer el bebe, que a su vez exime de dilemas éticos importantes, 2) los altos rendimientos celulares obtenidos; al ser una población celular más primitiva, tiene un tiempo de duplicación más rápido y más pasajes antes de alcanzar la senescencia 3) la presencia de un fenotipo paralelo al de las células estromales mesenquimales de otras fuentes tisulares (v.gr médula ósea, MO). En la actualidad, estas células constituyen una fuente celular importante para un número creciente de estudios preclínicos y básicos que destacan la eficacia terapéutica de estas células estromales mesenquimales derivadas del cordón umbilical y sus posibles ventajas frente a otras fuentes que paralelamente se están empleando en ensayos clínicos (491, 492).

El cordón se puede dividir, en tres componentes principales (a) el amnios (b) la gelatina de Wharton y (c) los vasos. La gelatina de Wharton en sí se puede dividir en tres zonas distintas (a) el subamnios, (b) la gelatina de Wharton intermedia y (c) la gelatina de Wharton perivascular. La gelatina de Wharton, amniótica y subamniótica, ha sido denominada “revestimiento del cordón”. Otra región entre la gelatina de Wharton perivascular que rodea cada vaso puede denominarse "gelatina de Wharton intervascular". Sin embargo, desde una perspectiva pragmática, sólo el revestimiento del cordón umbilical y la gelatina de Wharton perivascular pueden diseccionarse claramente de las regiones o zonas restantes. Finalmente, cada uno de los vasos comprende una pared de músculo liso y un revestimiento endotelial (Fig 26).

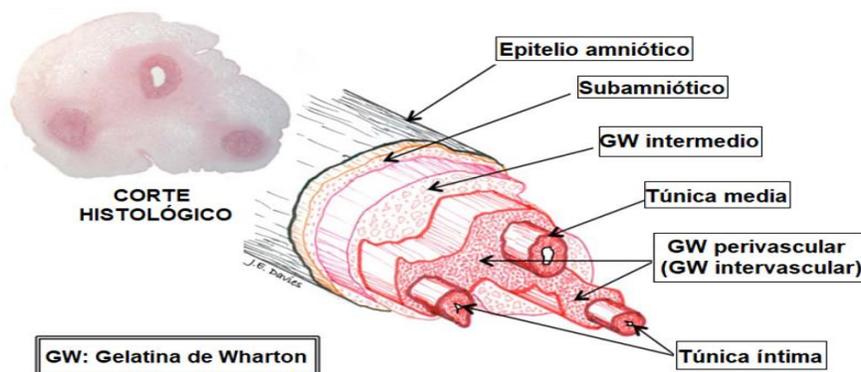


Figura 26. La estructura del cordón umbilical humano con un diagrama de despiece tridimensional. El diagrama muestra el orden de ensamblaje de las partes que componen el cordón umbilical de un corte histológico. Se realizó trazando directamente los contornos de las distintas características en la sección histológica y desplazándolos después a lo largo del eje longitudinal inclinado. Adaptado de Davies et al., 2017 (493).

Los análisis fenotípicos realizados por diversos grupos de investigación demostraron que las CME-GW se ajustaban a los criterios mínimos descritos por la ISCT para las CME. Dentro los cuales se encuentra la expresión positiva de marcadores mesenquimales como CD73, CD90 y CD105 y negatividad para marcadores endoteliales, CD31, y hematopoyéticos, CD45 y CD34 (494). Mas allá de la similitud fenotípica de las CME-GW con otras fuentes, lo que las hace más singulares y útiles para aplicaciones terapéuticas, son sus propiedades más primitivas. Diversos hallazgos muestran varias características de las células madre embrionarias (ESC) en las CME-GW, especialmente en la expresión de marcadores de pluripotencialidad como Oct-4, Nanog, y SOX-2 (495). Interesantemente se ha encontrado que las CME-GW también expresan varios genes supresores de tumores (495), que demuestran su baja capacidad tumorigénica en numerosos estudios preclínicos empleando animales inmunocompetentes (496, 497).

Adicionalmente las CME-GW presentan un amplio espectro de diferenciación más allá del origen mesodérmico (492). De hecho, son capaces de transdiferenciarse hacia la capa del ectodermo en poblaciones celulares de astrocitos y neuronas mediante medios enriquecidos con diferentes factores de crecimiento como el Factor de crecimiento fibroblástico (FGF) o el epidérmico (EGF) y compuestos como el DMSO, Beta-mercaptoetanol (498) ácido retinoico, hidroxianisolbutilato o Forskolina, pudiendo variar el número de células neuronales según el protocolo propuesto. Estos cócteles de diferenciación aumentan la expresión de marcadores neurales como Nestina, β -III tubulina, NeuN y GFAP(235, 499, 500).

Otras de las aplicaciones de las CME derivadas de la gelatina de Wharton (GW) se da a nivel terapéutico, esto debido a su potencial regenerativo e inmunomodulador, ya que son capaces de suprimir y evitar el sistema inmunitario, lo que las convierte en candidatas óptimas para terapias celulares en trasplantes alogénicos (501). Estas características han permitido a las CME-GW ser consideradas en numerosos ensayos clínicos para un espectro amplio de indicaciones médicas (493).

3.1.2. Células Mesenquimales estromales de sangre menstrual (CME-SM)

La fuente de CME en el fluido menstrual, se derivan del tejido endometrial descamado en lugar del estroma de médula ósea no descamado (479). Las poblaciones celulares del endometrio incluyen: células mesenquimales endoteliales (eCME ó eMSC) que se localizan predominantemente en la capa funcional del endometrio; las células positivas para CD140b + CD146 + eMSC, las SUSD2+ eMSC que se localizan perivascularmente y las células de la población lateral (SP) que se localizan en el endotelio vascular, tanto en la capa basalis como en la funcionalis del endometrio. El flujo de la sangre menstrual, contienen (MenSC ó

CME-SM), células madre epiteliales SUSD2+ eMSC, células positivas para CD140b + CD146 + eMSC y células perivasculares Cordeiro et al., 2023 (502) (Fig 27).

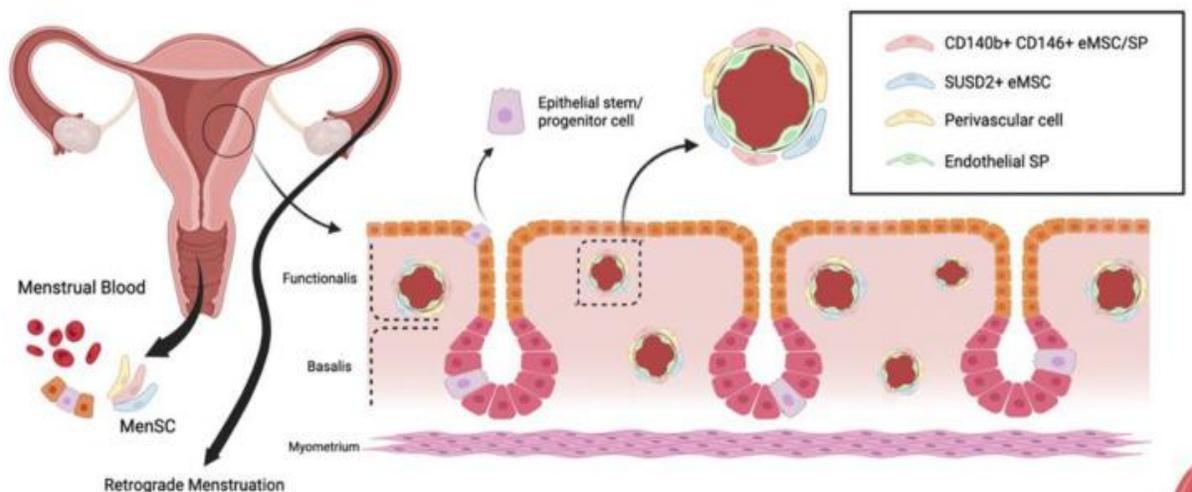


Figura 27. Estructura del endometrio y sus poblaciones celulares.-Fuente: Robalo-Cordeiro et al., 2023 (502).

Las células mesenquimales derivadas de la sangre menstrual (CME-SM ó MenSC) fueron descubiertas por Meng y colaboradores en 2007 y clasificadas como células mesenquimales estromales (503). Desde su descubrimiento, se ha demostrado un gran interés por las MenSC debido a su facilidad y abundancia en el método de obtención, al tener una recolección no invasiva a través de la copa menstrual logra ser una fuente continua. Así mismo su baja inmunogenicidad, estabilidad cromosómica, alta proliferación, capacidad de diferenciación y pocas dificultades éticas, las posicionan como una fuente excelente de CME (504). Interesantemente, estudios en tejido de biopsia endometrial confirmaron la presencia de pequeñas poblaciones de células madre/estromales endometriales adultas con propiedades clásicas de células madre como lo son la clonogenicidad, autorrenovación y diferenciación (505).

Al igual que las CME-GW, las CME-SM también expresan marcadores clásicos de ISCT, son negativas para HLA-DR y marcadores de linaje hematopoyético (506). Además, expresan marcadores de pluripotencialidad como Oct4, SSEA4 y NANOG aunque sus niveles son bajos (506) y poseen una capacidad de diferenciación similar a las CME-MO (507). Asimismo, tienen capacidad de transdiferenciación a otras capas germinales diferentes al mesodermo, como linajes ectodérmicos (neuronas y glía) (508).

3.2. Células Mesenquimales estromales en el modelamiento de la EP

Durante las dos últimas décadas se han establecido diversos protocolos para la obtención de CME de diversas fuentes y su mantenimiento en cultivos *in vitro* (485, 487). Estudios pioneros realizados por Jiang y colaboradores, mostraron que las células progenitoras adultas

multipotentes de ratón (subpoblación de CME) generaron en presencia de factores tróficos (PDGF, SHH y FGF8) un 25% de células con marcadores positivos para tirosina hidroxilasa (TH+) indicativo de neuronas dopaminérgicas (509). Posteriormente, Dezawa y colaboradores (510), reportaron 41% de eficiencia en la obtención de neuronas dopaminérgicas TH+, empleando la transfección de genes con dominio Notch (510). Otro hallazgo importante, fue el que evidenció que las CME de rata estimuladas con factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF) e interleucina-1 en medio condicionado de células gliales generaron células que expresaron TH+ y que adicionalmente secretaban DA (531). De igual forma, se demostró, en CME aisladas de médula ósea humana en presencia de múltiples inductores químicos y factores tróficos se generaron neuronas que expresaban TH+ (534).

Estos resultados previos permitieron el establecimiento de modelos neuronales dopaminérgicos, derivados de la transdiferenciación de CME humanas obtenidas de diferentes fuentes, con una eficiencia de inducción entre el 12,7% y el 41% (511, 512). De igual forma, se han empleado cócteles de inducción (v.gr. SHH, FGF8, y bFGF) a linajes dopaminérgicos que expresaron TH+ con una eficiencia del 67% (513).

Recientemente en estudios realizados en el laboratorio, se logró la transdiferenciación de células mesenquimales estromales humanas a neuronas semejantes a neuronas dopaminérgicas *in vitro*, mediante una metodología rápida y eficiente (235) y el desarrollo de neuroesferas TH+ (514). Esta técnica redujo significativamente el tiempo de formación de células precursoras neurales y células semejantes a neuronas en comparación con los métodos tradicionales, que requieren hasta 20 días. Estudios adicionales mostraron que las CME que sobre expresaban Parkina, y que fueron expuestas a la neurotoxina, 6OHDA, disminuyeron la expresión de marcadores moleculares relacionados con la producción de EO y muerte celular por apoptosis. Estas observaciones indicaron que la parkina posee efectos antioxidantes y neuroprotectores (378). Así mismo, en experimentos con células semejantes a neuronas dopaminérgicas derivadas de CME, se recrearon *in vitro* los efectos de la neurotoxina rotenona, demostrando que las células responden a la neurotoxina generando estrés oxidativo y muerte neuronal, eventos que fueron inhibidos por un inhibidor de la quinasa LRRK2 (235). En conjunto, estos resultados confirman que las CME son un modelo excelente para estudiar la EP y representan una valiosa fuente celular para la terapia regenerativa en esta enfermedad. Estos resultados sugieren que los precursores neuronales generados podrían utilizarse en terapias de reemplazo *in vivo* y en estudios *in vitro* a gran escala para la selección de fármacos (514).

Por lo tanto, las CME se han convertido en una atractiva e innovadora alternativa en el modelamiento de los procesos de neurodegeneración en la EP, debido a su alta capacidad de transdiferenciación a neuronas (235, 514, 515).

CAPITULO 4: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

La EP es el primer trastorno neurodegenerativo del movimiento más común en el mundo y la primera enfermedad responsable de las alteraciones del movimiento (516). En los últimos años la EP se ha convertido en el desorden neurodegenerativo con mayor crecimiento en la población debido a que el número de personas que padecen esta enfermedad se ha duplicado superando los 6 millones y se estima que para el 2040 esta cifra incrementaría de la misma forma alcanzando los 12 millones de personas llegándose a considerar como una Pandemia (517). En Colombia, de acuerdo con la Asociación Colombiana de Neurología (ACN), se han reportado 220.000 casos en el país, siendo la mayoría procedentes del departamento de Antioquia (518). La EP se ha convertido en un problema importante de salud pública, con una prevalencia de 101 individuos por cada 100,000 habitantes (23). Este trastorno, se manifiesta con alteraciones motoras que incluyen Bradicinesia (movimientos lentos), acinesia (dificultad para el movimiento), temblor en reposo, rigidez muscular y desequilibrio postural, y por la muerte progresiva de las neuronas dopaminérgicas (DAérgicas) en la sustancia nigra pars compacta (SNpc) (27) lo cual conlleva a deterioro motor y cognitivo con una evolución de 8 a 15 años posterior a su diagnóstico (519). Por lo tanto, este trastorno constituye un grave problema social y económico para las familias de los pacientes que la padecen y para el sistema de salud del departamento de Antioquia y del país.

El estudio del EP es relevante para el departamento de Antioquia a causa de que, en el, se presentan casos de la EP sin causa aparente denominados esporádicos (520) y casos genéticos como la EP temprana denominada EP juvenil autosómica recesiva (EPJAR) en menores de 40 años (22, 139-141). La EPJAR, es causada por la presencia de la mutación C212Y en el gen PRKN reportada en familias principalmente provenientes del municipio de Peque, ubicado al noroccidente y de la capital-Medellín. La situación es aún más dramática, debido a que la EPJAR que afecta a esta población, se manifiesta desde los 12 años que corresponde a la edad juvenil y productiva (139-141). Adicional a esta forma clínica temprana, se ha reportado mutaciones en la quinasa repetida rica en leucina 2 (LRRK2, mutación G2019S, (521) y en el gen de la GBA que codifica para la enzima glucocerebrosidasa una nueva mutación la K198E, y otras mutaciones L444P y la N370S, (522). Todos estos datos y estudios epidemiológicos y poblacionales sugieren que otras mutaciones pueden causar EPF en el departamento de Antioquia que aumentan aún más la incidencia y el número de pacientes para los próximos 10 años creando una alta carga económica y social en nuestra región, país y en el mundo (518, 523, 524).

A pesar de los numerosos estudios moleculares de la EP en modelos *in vitro* e *in vivo* y de los estudios clínicos realizados en búsqueda de terapias efectivas, hasta el presente, no existen medicamentos efectivos, asequibles, que no presenten efectos secundarios y que curen la enfermedad (525). Esta situación, puede deberse a que aún no se conocen con

precisión las causas, ni se han dilucidado con exactitud los mecanismos de señalización que conducen a la muerte neuronal, ni el papel de la supresión del LRRK2 en la EP. Más aún, todavía no existe un modelo que reproduzca completamente la neuropatología de la EP. Es por esto que el desarrollo de un modelo *in vitro* neuronal, constituye una excelente herramienta experimental que permitirá estudiar y esclarecer los mecanismos moleculares implicados en esta patología, aportando a su vez, al diseño de estrategias terapéuticas útiles, eficaces, personalizadas y accesibles a la población afectada en la región de Antioquia y para cualquier persona en general que padezca EPF y poder extrapolar estos hallazgos a nivel mundial en las formas de EP esporádicas.

Las células madre mesenquimales (CME) son células no-hematopoyéticas, multipotentes las cuales han ganado atención en las últimas décadas gracias a sus ventajas comparadas con otras células madre. De hecho, las CME presentan baja inmunogenicidad, no tienen riesgo de formación teratomas, y no tienen problemas éticos para su utilización experimental. Otra ventaja, es su uso potencial para la Medicina personalizada, dado que las CME pueden recolectarse del mismo individuo o paciente, sin riesgo de respuesta inmune. Además, las CME tienen una muy baja probabilidad de ser tumorigénicas después de su trasplante en Pacientes o animales (526, 527). Curiosamente, las CME expresan marcadores genéticos y proteicos neuronales y DAérgicos, cuando son expuestas a una mezcla de factores de crecimiento y productos químicos tales como Sonic Hedgehog (SHH), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) 2, FGF8 y FGF básico (bFGF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), Forskolina, ácido retinoico (RA)(511, 528-531). Recientemente, hemos logrado un “coctel de factores” de transdiferenciación de CME en células nerviosas (514). Esta aproximación experimental nos ha permitido demostrar que la inhibición farmacológica con el inhibidor PF475 confiere resistencia a neuronas contra los efectos tóxicos de ROT (235).

Así mismo, la LRRK2, una quinasa, también conocida como dardarina (de la palabra vasca "dardara" que significa temblar), es una enzima codificada por el gen PARK8 (250), del cual se han reportado 127 variantes (532). La proteína LRRK2 contiene dos dominios enzimáticos, un dominio GTPasa y un dominio quinasa y múltiples dominios de interacción proteína-proteína incluyendo una repetición rica en leucina (LRR), una repetición WD40 y un dominio repetido específico LRRK2(201). Se cree que los dominios de interacción LRRK2 sirven como módulos de unión a proteínas en los que LRRK2 actúa como un andamio de señalización. De hecho, las mutaciones patógenas de LRRK2 se centran en los dominios enzimáticos LRRK2 (533). Por tanto, la actividad enzimática de LRRK2 es importante en la EP. La mutación LRRK2 más prevalente, G2019S, está dentro del dominio quinasa. Representa el 5-6% de los pacientes con EP autosómica dominante y ~ 1% de la EP esporádica de inicio tardío. Efectivamente, en Colombia esta mutación también se ha identificado (521, 534).

Investigaciones en sistemas biológicos *in vitro* e *in vivo* sugieren que el LRRK2 está involucrado en diversas vías y señalización celular, incluyendo la regulación de la traducción de proteínas, el tráfico de vesículas, el crecimiento de las neuritas, la autofagia, la dinámica del citoesqueleto, y muerte neuronal (535, 536). Numerosos modelos de estudio de EP se han desarrollado para estudiar la función de la LRRK2 desde la levadura a los invertebrados como *Drosophila* y *C. elegans*, y roedores (537). Específicamente, *Drosophila* tiene un homólogo humano LRRK2, denominado Lrrk (FLYBASE: FBgn0038816), y los residuos amino-acidicos afectados por las mutaciones causantes de EP en LRRK2 (v.gr. G2019S) se conservan en la mosca Lrrk. De hecho, para estudiar la función de Lrrk endógena de tipo salvaje (WT), *Drosophila* Lrrk knock-out (KO, o nulos) han sido generados (538-542). Interesantemente, varias investigaciones concuerdan en que la mosca mutante Lrrk nulas se desarrollan normalmente con un ciclo de vida normal, con un número/grupo y patrón de las neuronas DAérgicas normal comparados con moscas no mutadas (352, 539, 540, 542). Más aún, las moscas dLrrk nulas son relativamente resistentes a la oxidación estrés oxidativo generado por tratamiento con PQ y H₂O₂, en comparación con las moscas silvestres (352, 540). Tomadas estas observaciones en conjunto, sugieren que, primero, Lrrk no es necesaria para la supervivencia de neuronas DAérgicas en moscas, siendo estos hallazgos consistentes con el fenotipo en ratones LRRK2 nulos (v.gr. cepas de ratón C57BL/6-Lrrk2(tm1Mjfa) /J; B.6129X1(FVB)-Lrrk2(tm1.1Cai)/J), y segundo, la toxicidad LRRK2 obedece a un mecanismo de ganancia de función y no de pérdida de función. Compatible con esta idea, hemos propuesto que el LRRK2 /Lrrk está involucrado en señalización de muerte neuronal (235). Por lo tanto, su inhibición farmacológica o la supresión total de la expresión de LRRK2 silvestre podría ser una alternativa terapéutica en individuos expuestos a agentes estresantes (v.gr. agricultores a pesticidas (543) o individuos con un riesgo genético alto de padecer EP (v.gr. deficientes en la proteína DJ-1(150), Parkina (139)). El propósito de esta investigación es evaluar esta hipótesis en modelos *in vitro* de la EP, y adicionalmente, evaluar inhibidores farmacológicos del LRRK2 (v.gr. PF-475), y antioxidantes de origen natural como el extracto metanólico de la cáscara de *Persea americana var. Colin Red*).

Recientemente, han surgido innovadoras herramientas de edición génica incluyendo las nucleasas CRISPR/cas (del inglés: clustered regularly interspaced short palindromic repeats–associated nucleases) como métodos eficaces no solo para generar modelos *in vitro* e *in vivo* de enfermedades neurodegenerativas, sino también como herramientas para el estudio de los mecanismos neuropatológicos de estos trastornos y en la búsqueda de terapias potenciales a través de la edición de secuencias específicas en genes alterados para recuperar la función y conectividad en las áreas del cerebro afectadas en estos pacientes (34-36). En este contexto, el uso de CRISPR/cas para la generación de un modelo *in vitro* con la supresión del *LRRK2* surge como una aproximación valiosa para el estudio de los mecanismos de señalización de este gen asociados al desarrollo de la EP (448).

Por todo lo anteriormente expuesto, es necesario realizar investigaciones que contribuyan al esclarecimiento etiológico de la enfermedad, que identifiquen los eventos celulares y moleculares causales del deterioro neuronal, pero aún más crítico que revelen dianas terapéuticas que contribuirían de manera importante con el avance hacia el desarrollo de un tratamiento eficaz que logre detener el curso de la EP. Por lo tanto, es justificable evaluar el efecto de la inhibición farmacológica y /o la supresión del LRRK2 (nulo) y compuestos naturales con potencial antioxidante. La presente investigación reporta por primera vez el establecimiento de un protocolo implementado para la alta producción de neuronas dopaminérgicas como modelo de estudio de la EP , la **evaluación de la supresión del gene LRRK2 (nulo), la inhibición farmacológica en células nerviosas derivadas de células madre mesenquimales (CME) así como el uso de moléculas con potencial antioxidante, que podrían constituir una terapia potencial contra el estrés oxidativo y la muerte neuronal en células nerviosas, como modelo de la Enfermedad de Parkinson familiar autosómica dominante.**

4.1. OBJETIVOS TRABAJO DE INVESTIGACION

4.1.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la inhibición génica, farmacológica de LRRK2 y sustancias con potencial antioxidante en modelos celulares de la Enfermedad de Parkinson (EP).

4.1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS PARTE 1: SUPRESIÓN GÉNICA DE LRRK2 EN CÉLULAS HEK293

1. Obtener y caracterizar células HEK293 Wild-Type (WT) y con la supresión del *LRRK2* (LRRK2-KO) en función de la expresión de la LRRK2.
2. Evaluar el efecto de la supresión génica del *LRRK2* (LRRK2-KO) en términos de los marcadores neuropatológicos (pS935-LRRK2), EO (DJ-1Ox), $\Delta\Psi_m$; muerte neuronal (p-cJun, PUMA, caspasa-3), Fragmentación del DNA y marcadores mitocondriales (niveles de PRKN, TOM20, PINK, DRP1).

4.1.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS PARTE 2: LAS NEURONAS DOPAMINÉRGICAS DERIVADAS DE CME-GW-CU y SM COMO MODELO PARA EL ESTUDIO Y DISEÑO TERAPÉUTICO EN LA EP (SUPRESIÓN FARMACOLÓGICA DE LRRK2 EN ESTE MODELO)

2. Estudiar el efecto del inhibidor PF-475 (PF-06447475) en neuronas WT a partir de CME-GW-CU, expuestas a prooxidantes (rotenona (ROT)/ y /o paraquat (PQ)/ maneb MB). en términos de los marcadores neuropatológicos muerte neuronal marcadores neuropatológicos (pS935-LRRK2), EO (DJ-1Ox), $\Delta\Psi_m$; y de muerte neuronal (PUMA, caspasa-3, Fragmentación del DNA).
3. Evaluar los efectos del antioxidante del Extracto de aguacate (Colinred extract, CRE) en cultivos neuronales en ausencia o presencia del paraquat/ maneb y/o el inhibidor PF-475, en función de los niveles de los marcadores neuropatológicos (pS935-LRRK2), EO (DJ-1Ox), de muerte neuronal (PUMA, caspasa-3) y funcionalidad del flujo de Ca⁺ intracelular.
4. Obtener y caracterizar neuronas dopaminérgicas (NDAs) a partir de CME-SM en función de marcadores neuronales (β IIITUB, MAP2, NFL), gliales (GFAP), dopaminérgicos (TH, DAT) y funcionales (Ca⁺).

6. Evaluar el efecto de la rotenona en NDAs en términos de los marcadores neuropatológicos (pS935-LRRK2, pS129- α Syn), EO (DJ-1Ox), $\Delta\Psi_m$; muerte neuronal (caspasa-3), marcadores mitocondriales (niveles de PRKN, TOM20, PINK, DRP1) y de autofagia (LC3B lipidado , acidificación lisosomal).
7. Evaluar el efecto del inhibidor PF-475, en NDAs expuestas a rotenona en términos de los marcadores neuropatológicos (pS935-LRRK2, pS129- α Sinucleína), EO (DJ-1Ox), muerte neuronal (caspasa-3), y de autofagia (LC3B lipidado, acidificación lisosomal).

4.2. HIPÓTESIS GENERAL

La inhibición génica y farmacológica del LRRK2 y el uso de extractos de plantas con potencial antioxidante logran revertir la muerte celular por apoptosis y la autofagia inducida en modelos celulares bajo un estímulo de estrés oxidativo.

4.3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

- 1) ¿Pueden las células HEK293 y las neuronas dopaminérgicas (NDAs) derivadas de CME emplearse como modelos celulares in vitro, para el estudio de los mecanismos moleculares del LRRK2 asociados al desarrollo de la EP?
- 2) ¿Constituye la inhibición génica y farmacológica del gene *LRRK2* y el uso de moléculas con potencial antioxidante, terapias potenciales contra el estrés oxidativo, la autofagia y la apoptosis en la EP?

CAPITULO 5: DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN PARTE 1: SUPRESIÓN GÉNICA DEL *LRRK2* EN CÉLULAS HEK293T

5.1. Introducción véase parágrafo introducción de: Quintero-Espinosa D, Sanchez-Hernandez S, Velez-Pardo C, Martin-Molina F, Jimenez-Del-Rio M, LRRK2 Knockout Confers Resistance in HEK-293 Cells to Rotenone-Induced Oxidative Stress, Mitochondrial Damage, and Apoptosis. Int J Mol Sci. 2023 Jun 22;24(13):10474. doi: 10.3390/ijms241310474.

5.2. Materiales y métodos véase párrafo materiales y métodos de: Quintero-Espinosa D, Sanchez-Hernandez S, Velez-Pardo C, Martin-Molina F, Jimenez-Del-Rio M, LRRK2 Knockout Confers Resistance in HEK-293 Cells to Rotenone-Induced Oxidative Stress, Mitochondrial Damage, and Apoptosis. *Int J Mol Sci.* 2023 Jun 22;24(13):10474. doi: 10.3390/ijms241310474.

5.3. Resultados véase párrafo resultados de: Quintero-Espinosa D, Sanchez-Hernandez S, Velez-Pardo C, Martin-Molina F, Jimenez-Del-Rio M, LRRK2 Knockout Confers Resistance in HEK-293 Cells to Rotenone-Induced Oxidative Stress, Mitochondrial Damage, and Apoptosis. *Int J Mol Sci.* 2023 Jun 22;24(13):10474. doi: 10.3390/ijms241310474.

5.4. Discusión véase párrafo Discusión de: Quintero-Espinosa D, Sanchez-Hernandez S, Velez-Pardo C, Martin-Molina F, Jimenez-Del-Rio M, LRRK2 Knockout Confers Resistance in HEK-293 Cells to Rotenone-Induced Oxidative Stress, Mitochondrial Damage, and Apoptosis. *Int J Mol Sci.* 2023 Jun 22;24(13):10474. doi: 10.3390/ijms241310474.

CAPITULO 6 DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN PARTE 2 : LAS NEURONAS DOPAMINÉRGICAS DERIVADAS DE CME-GW-CU y SM COMO MODELO PARA EL ESTUDIO Y DISEÑO TERAPÉUTICO EN LA EP (SUPRESIÓN FARMACOLÓGICA DE LRRK2 EN UN ESTE MODELO) OBJETIVOS 3 Y 4

6.1. Introducción véase párrafo introducción de: Quintero-Espinosa DA, Ortega-Arellano HF, Velez-Pardo C, Jimenez-Del-Rio M. Phenolic-rich extract of avocado Persea americana (var. Colinred) peel blunts paraquat/maneb-induced apoptosis through blocking phosphorylation of LRRK2 kinase in human nerve-like cells. *Environ Toxicol.* 2022 Mar;37(3):660-676. doi: 10.1002/tox.23433. Epub 2021 Dec 12. PMID: 34897981.

6.2. Materiales y método véase párrafo materiales y métodos de: Quintero-Espinosa DA, Ortega-Arellano HF, Velez-Pardo C, Jimenez-Del-Rio M. Phenolic-rich extract of avocado Persea americana (var. Colinred) peel blunts paraquat/maneb-induced apoptosis through blocking phosphorylation of LRRK2 kinase in human nerve-like cells. *Environ Toxicol.* 2022 Mar;37(3):660-676. doi: 10.1002/tox.23433. Epub 2021 Dec 12. PMID: 34897981.

6.3. Resultados véase parágrafo resultados de: Quintero-Espinosa DA, Ortega-Arellano HF, Velez-Pardo C, Jimenez-Del-Rio M. Phenolic-rich extract of avocado Persea americana (var. Colinred) peel blunts paraquat/maneb-induced apoptosis through blocking phosphorylation of LRRK2 kinase in human nerve-like cells. *Environ Toxicol.* 2022 Mar;37(3):660-676. doi: 10.1002/tox.23433. Epub 2021 Dec 12. PMID: 34897981.

6.4. Discusión véase parágrafo discusión de: Quintero-Espinosa DA, Ortega-Arellano HF, Velez-Pardo C, Jimenez-Del-Rio M. Phenolic-rich extract of avocado Persea americana (var. Colinred) peel blunts paraquat/maneb-induced apoptosis through blocking phosphorylation of LRRK2 kinase in human nerve-like cells. *Environ Toxicol.* 2022 Mar;37(3):660-676. doi: 10.1002/tox.23433. Epub 2021 Dec 12. PMID: 34897981.

CAPITULO 7: DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN PARTE 3 TRANSDIFERENCIACIÓN DE CME-SM A NEURONAS DOPAMINERGICAS COMO MODELO PARA EL ESTUDIO Y DISEÑO TERAPÉUTICO EN LA EP OBJETIVOS 5,6 Y 7.

7.1. Introducción véase parágrafo introducción de: Quintero-Espinosa D, Soto-Mercado V, Quintero-Quinchia C, Mendivil-Perez M, Velez-Pardo C, Jimenez-Del-Rio M. Latent Tri-lineage Potential of Human Menstrual Blood-Derived Mesenchymal Stromal Cells Revealed by Specific In Vitro Culture Conditions. *Mol Neurobiol.* 2021 Oct;58(10):5194-5209. doi: 10.1007/s12035-021-02442-6. Epub 2021 Jul 16. PMID: 34269964.

Quintero-Espinosa D, Velez-Pardo C, Jimenez-Del-Rio M. High Yield of Functional Dopamine-like Neurons Obtained in NeuroForsk 2.0 Medium to Study Acute and Chronic Rotenone Effects on Oxidative Stress, Autophagy, and Apoptosis. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24(21), 15744.

7.2. Materiales y métodos véase parágrafo materiales y métodos de: Quintero-Espinosa D, Soto-Mercado V, Quintero-Quinchia C, Mendivil-Perez M, Velez-Pardo C, Jimenez-Del-Rio M. Latent Tri-lineage Potential of Human Menstrual Blood-Derived Mesenchymal Stromal Cells Revealed by Specific In Vitro Culture Conditions. *Mol Neurobiol.* 2021 Oct;58(10):5194-5209. doi: 10.1007/s12035-021-02442-6. Epub 2021 Jul 16. PMID: 34269964.

Quintero-Espinosa D, Velez-Pardo C, Jimenez-Del-Rio M. High Yield of Functional Dopamine-like Neurons Obtained in NeuroForsk 2.0 Medium to Study Acute and Chronic Rotenone Effects on Oxidative Stress, Autophagy, and Apoptosis. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24(21), 15744.

7.3. Resultados véase parágrafo resultados de: Quintero-Espinosa D, Soto-Mercado V, Quintero-Quinchia C, Mendivil-Perez M, Velez-Pardo C, Jimenez-Del-Rio M. Latent Trilineage Potential of Human Menstrual Blood-Derived Mesenchymal Stromal Cells Revealed by Specific In Vitro Culture Conditions. *Mol Neurobiol.* 2021 Oct;58(10):5194-5209. doi: 10.1007/s12035-021-02442-6. Epub 2021 Jul 16. PMID: 34269964.

Quintero-Espinosa D, Velez-Pardo C, Jimenez-Del-Rio M. High Yield of Functional Dopamine-like Neurons Obtained in NeuroForsk 2.0 Medium to Study Acute and Chronic Rotenone Effects on Oxidative Stress, Autophagy, and Apoptosis. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24(21), 15744.

7.4. Discusión véase parágrafo discusión de: Quintero-Espinosa D, Soto-Mercado V, Quintero-Quinchia C, Mendivil-Perez M, Velez-Pardo C, Jimenez-Del-Rio M. Latent Trilineage Potential of Human Menstrual Blood-Derived Mesenchymal Stromal Cells Revealed by Specific In Vitro Culture Conditions. *Mol Neurobiol.* 2021 Oct;58(10):5194-5209. doi: 10.1007/s12035-021-02442-6. Epub 2021 Jul 16. PMID: 34269964.

Quintero-Espinosa D, Velez-Pardo C, Jimenez-Del-Rio M. High Yield of Functional Dopamine-like Neurons Obtained in NeuroForsk 2.0 Medium to Study Acute and Chronic Rotenone Effects on Oxidative Stress, Autophagy, and Apoptosis. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24(21), 15744.

CAPITULO 8: DISCUSIÓN GENERAL

La EP es una entidad clínica multifactorial en la que convergen factores genéticos-ambientales y se caracteriza neuropatológicamente por pérdida neuronal, disfunción mitocondrial, sináptica y EO. En un esfuerzo por explicar la interacción de todos estos factores y recrear las características neuropatológicas de la enfermedad, se han propuesto varios modelos de estudio celulares, estrategias y metodologías moleculares (441, 544, 545). A pesar de estos avances, la relación de estos factores y su asociación con el desarrollo de la EP no han sido estudiados en modelos unificados empleando las estrategias de supresión génica, ni farmacología del LRRK2. Mas aún, aunque se ha propuesto la hipótesis que el EO podría ser uno de los factores desencadenantes asociados al LRRK2 los mecanismos de señalización de la neurodegeneración por los cuales el EO y el LRRK2 (245) podría inducir toxicidad y muerte neuronal aún no son conocidos completamente, ni tampoco las dianas terapéuticas.

Este trabajo reporta por primera vez el uso de las células HEK293 como modelo *in vitro* con la inhibición genética del *LRRK2* por CRISPR/Cas 9, como una herramienta valiosa para el estudio de la EP. En este contexto, las células HEK-293 ofrecen varias ventajas para el

estudio de la EP: i) desde el aspecto técnico, son fáciles de cultivar, no requieren de condiciones especiales, crecen rápidamente, pueden ser transfectadas fácilmente por diferentes métodos (v.gr. electroporación, nucleofección) y su análisis de evaluación cuantitativa es rápida y reproducible; ii) desde el aspecto del desarrollo, las células HEK-293 comparten el mismo origen embrionario con las neuronas, se derivan de la misma línea precursora; esto significa que los procesos biológicos fundamentales y sus mecanismos reguladores (es decir, transcripción, traducción, plegamiento y tráfico de proteínas) son muy similares, pero no idénticos. De hecho, las células HEK-293 fueron generadas en 1970, a partir de células embrionarias normales de riñón humano (HEK) con ADN de adenovirus 5 cizallado. Estas mostraron rasgos típicos de neuronas inmaduras, como, por ejemplo, la expresión de las subunidades del neurofilamento (NF) NF-L, NF-M, NF-H, de la alfa-internexina, de la vimentina, de las queratinas 8 y 18, y también revelaron la expresión de ARNm específicos de muchos otros genes que se expresan normalmente en las células del linaje neuronal (460). Basándose en estas observaciones, la HEK293 puede considerarse un modelo de línea celular neuronal humana. Por lo tanto, células HEK 293 proporcionan una aproximación razonable para abordar numerosas cuestiones de biología básica de la EP. Específicamente, dado que LRRK2 es un gen evolutivo bien conservado (546), las células HEK-293 han sido utilizadas para identificar sustratos moleculares de esta quinasa (547) y para estudiar el análisis funcional de las mutaciones de LRRK2 (468, 548). Además, dado que las células HEK-293 han demostrado un claro perfil de respuesta transcripcional pro-apoptótico en neuronas sometidas a apoptosis (549) y mostraron elementos de autofagia mecánicamente similares a los expresados en neuronas DAérgicas (550), estas observaciones sugieren que las células HEK-293 podrían ser adecuadas para estudios celulares y moleculares de la EP, como se reporta en el presente trabajo.

Sin embargo, las células HEK-293 presentan al menos dos limitaciones principales. Primero, las células HEK-293 han sido resistentes a su transdiferenciación en neuronas dopaminérgicas. En segundo lugar, estas células no expresan de forma endógena marcadores del linaje dopaminérgico como la tirosina hidroxilasa (TH), que cataliza la hidroxilación de L-tirosina en L-DOPA (l-3,4-dihidroxifenilalanina), el paso que limita la síntesis de dopamina (DA), o el transportador de dopamina humano (hDAT). Cabe destacar que esta limitación en un contexto científico específico podría convertirse en una ventaja. De hecho, las células HEK-293 se han utilizado para expresar ectópicamente hDAT para estudiar, por ejemplo, el efecto tóxico del MPTP (464), así como la función de receptores dopaminérgicos, por ejemplo, D1 (551) y/o D5 (552). De hecho, la elección de un modelo celular específico como las células HEK-293 conlleva el requisito de centrarse en un aspecto de la enfermedad, por ejemplo, el efecto de factores ambientales (exposición a pesticidas como la rotenona) y genéticos (supresión de genes asociados al EP-AD como LRRK2), ignorando otros, por ejemplo, los efectos de la astrogliía y la microglía en las neuronas expuestas a la rotenona tal y como ocurre *in vivo* (553).

Como alternativa ante estas limitaciones, el modelo de enfermedad basado en células semejantes a neuronas derivadas de células mesenquimales estromales proporciona una excelente plataforma para la comprensión de los mecanismos de las enfermedades neurodegenerativas humanas (554) y el descubrimiento potencial de terapias innovadoras (555). Dado que las neuronas humanas de sujetos vivos no suelen estar al alcance de los investigadores, existe una necesidad apremiante de una fuente de neuronas humanas auténticas en condiciones óptimas de cultivo que permita modelar la neurodegeneración in vitro.

Recientemente, nuestro laboratorio ha desarrollado un medio de cultivo original conocido como NeuroForsk, para obtener neuronas de tipo dopaminérgico (NDAs), de Células mesenquimales estromales de gelatina de Wharton de cordón umbilical (CME-GW-CU) (235, 499) y Células mesenquimales estromales de sangre menstrual CME-SM. A partir de este medio, hemos logrado implementar las condiciones de cultivo y desarrollar el medio NeuroForsk 2.0, que nos permitió aumentar el porcentaje de un 26 -30 % a un 70% de células positivas para los marcadores de neuronales dopaminérgicos (NDAs) TH+ y DAT+ a partir de células mesenquimales estromales de Sangre menstrual (CME-SM) transdiferenciadas. Adicionalmente, las NDAs presentaron funcionalidad de influjo de calcio en presencia de la dopamina a los 7 días de cultivo celular.

La suplementación de NeuroForsk con los factores más comúnmente reportados, como FGFb, BDNF, la hormona melatonina, y un agonista sintético de la purmorfamina, dieron lugar a una nueva marca de medio NeuroForsk 2.0. Efectivamente, FGFb y BDNF desempeñan un papel crucial en la supervivencia y diferenciación terminal de las neuronales durante el desarrollo (556, 557), mientras que la purmorfamina activa la vía Hedgehog (Hh) dirigiéndose a Smoothed, un componente crítico de la vía de señalización Hh (558). De hecho, la señalización Hh es un importante regulador del patrón embrionario, la regeneración de tejidos y la renovación de células madre (558) y la melatonina mejora la diferenciación y el injerto de células madre neurales al aumentar la función mitocondrial (350).

En comparación con otros protocolos, en los que el rendimiento de neuronas DA TH+ derivadas de hPSCs fue entre el 50% y el 85% (559-561) o de neuronas DA TH+ derivadas de hMSCs fue entre el 23% y el 59% (499, 562), la producción de ~70% de NDAs TH+/DAT+ a partir de MenSCs en 7 días convierte a NeuroForsk2.0 en un medio ahorrador de tiempo, económico y fiable para obtener NDAs. Además, comparado con el medio de cultivo habitual (RCm), el medio NeuroForsk 2.0 produjo un 590% de NDAs TH+/DAT+, mientras que NeuroForsk generó células TH+/DAT+ en un 140%. Aún más interesante, las NDAs transdiferenciadas en medio NeuroForsk 2.0 respondieron a estímulos con el neurotransmisor dopamina (DA), mostrando dos cambios máximos de fluorescencia ($\Delta F/F$) de afluencia transitoria de Ca^{2+} transitorio. Esta observación sugiere que los NDAs son funcionales, muy probablemente con la participación de D2 y la afluencia de Ca^{2+} a través de canales de voltaje de tipo L (563). Sorprendentemente, las CME-SM cultivadas en medio

RCm y NB B27TM no respondieron a estímulos DA. En conjunto estas observaciones sugieren que el medio NeuroForsk 2.0 es muy eficaz para producir células específicas, es decir, NFL-positivas, y funcionales, NDAs que responden al Ca^{2+} in vitro. Estos modelos desarrollados sirvieron de plataforma para el estudio de mecanismos moleculares asociados a los procesos de neurodegeneración asociados a la EP, principalmente el EO.

Durante la última década, se han sugerido varias hipótesis, incluida la del EO, que tratan de explicar la etiología y neuropatología de la EP. Por definición, el EO es una consecuencia de la sobreproducción o la eliminación inadecuada de ROS en las células, causando un deterioro del equilibrio oxidante-antioxidante en el cuerpo que puede conducir a daños no específicos en diferentes biomoléculas celulares como proteínas, lípidos y ácidos. De hecho, el EO como hipótesis es la que ha tenido una mayor aceptación en la comunidad científica, porque ha logrado explicar las posibles causas del daño neuronal y la degeneración DAérgica, al evidenciar daños oxidativos localizados y sistémicos provocadas por ROS y RL en los modelos de estudio de la EP (564).

Varios de estos mecanismos moleculares de muerte neuronal inducidos por estrés oxidativo han sido dilucidados por diversos equipos de investigación, incluido el nuestro (32, 269, 344, 375, 565-568). De hecho, se han detallado exhaustivamente que varias moléculas, entre las que se encuentran la dopamina, la serotonina y sus neurotoxinas correspondientes (6OHDA; 5,6 y 5,7-dihidroxi-triptamina (5,6- y -5,7-DHT), el paraquat (PQ) y la rotenona, inducen apoptosis en modelos de enfermedad de Parkinson (EP), independientemente de su concentración y tiempo de exposición (378, 569-571). Este proceso implica un mecanismo dependiente del estrés oxidativo (EO), que incluye varios pasos: i) generación de $\text{O}_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 (572), ii) activación del factor nuclear kappa-B (NF- κ B) y los factores de transcripción p53/c-Jun N-terminal quinasa (JNK) y c-Jun (180, 573, 574), iii) despolarización mitocondrial (575) y iv) activación de la caspasa-3 y el factor inductor de apoptosis (AIF) (576). Como resultado, in vitro se pueden observar v) la pérdida del potencial de membrana mitocondrial ($\downarrow\Delta\Psi_m$) y vi) la morfología nuclear característica de la apoptosis, que incluye la condensación y fragmentación de la cromatina (259). Con base en lo anterior, se sugiere que el EO celular, específicamente el generado por procesos relacionados con alteraciones mitocondriales, constituye una de las principales causas del desencadenamiento de la muerte en las neuronas dopaminérgicas.

En concordancia con estos hallazgos, en este trabajo reportamos que neurotoxinas como la rotenona (ROT) y el Paraquat (PQ), en combinación con el Maneb (PQ+MB) a través de la producción de H_2O_2 , activaban la quinasa LRRK2 tanto en células HEK293, como en NDAs obtenidas de CME-SM y CME-GW, evidenciado por un alto porcentaje de p-S⁹³⁵-LRRK2. Sin embargo, aún se desconoce cómo el H_2O_2 activa la quinasa LRRK2. Una posibilidad es que el H_2O_2 active IKK (577) a través de la activación del complejo MEKK1/IKK (573). Una vez que IKK está activa, puede a su vez activar la quinasa LRRK2 por fosforilación en los residuos Ser⁹¹⁰ y Ser⁹³⁵ (174). Este último residuo fosforilado (Ser⁹³⁵), se utilizó en

nuestro presente trabajo como marcador sustitutivo positivo de la actividad de LRRK2. Tras su activación, el LRRK2 contribuye a la señalización de la apoptosis mediante la activación de la quinasa de señalización de la apoptosis-1 (ASK-1, (273) o activando la proteína pro-apoptogénica c-JUN a través de la MKK4/MAPK quinasa-JNK (180, 578).

Aún más interesante, encontramos que la inhibición genética (células HEK 293 desprovistas de la proteína quinasa LRRK2 (LRRK2-KO)) al igual que la inhibición farmacológica (NDAs tratadas con el inhibidor de la fosforilación de LRRK2 PF-475, eran resistentes a la OS, el daño mitocondrial y la apoptosis inducidos por ROT. De hecho, las células LRRK2 KO expuestas a ROT casi no muestran signos de generación intracelular de ROS, según el análisis de células DCF+, ni de oxidación de la proteína sensor de estrés DJ-1-Cys¹⁰⁶-SO₃. Además, las células LRRK2 KO no muestran pérdida importante de $\Delta\Psi_m$, activación significativa de los factores de transcripción c-JUN y TP53, activación de la proteína pro-apoptótica BH3-only PUMA, del ejecutor CASP3, ni fragmentación nuclear. Cabe destacar que todos los marcadores de OS y apoptosis estaban ausentes de forma concomitante con p-S935-LRRK2.

Así mismo, las mitocondrias son orgánulos críticos en el proceso de toma de decisiones sobre la vida y la muerte celular (260). Es importante destacar que se ha demostrado que PRKN, una E3 ubiquitina ligasa (579), y PINK1 median en el control de calidad mitocondrial (580, 581). Varios estudios han demostrado que tras una pérdida de $\Delta\Psi_m$, la PRKN citosólica es reclutada a las mitocondrias por PINK1 (582, 583), a lo que sigue una estimulación de la autofagia mitocondrial (584). Además, se ha demostrado que LRRK2 atenúa la mitofagia dependiente de PINK1/PRKN de forma quinasa-dependiente, contribuyendo a la apoptosis (585), un fenómeno que podría ser deficiente en las células LRRK2 KO, aumentando así la supervivencia y la resistencia de las células frente a los estímulos del OS. En línea con estas observaciones, en el presente estudio descubrimos que las células HEK-293 LRRK2 WT expuestas a ROT mostraban una alta expresión tanto de PRKN como de PINK1, mientras que en ausencia de LRRK2 y H₂O₂, PRKN estaba regulada a la baja con un potencial mitocondrial inalterado, probablemente debido a su alta actividad mitocondrial PRX3 (11). Además, DRP-1 se localizó principalmente en el citoplasma, y la proteína mitocondrial TOM20 no se vio afectada, lo cual confirma la estrecha relación entre DRP1 y LRRK2 en la dinámica mitocondrial.

En conjunto, nuestros hallazgos sugieren que LRRK2 actúa como un desencadenante crítico en la muerte celular inducida por EO. De hecho, con nuestros hallazgos informamos por primera vez de que las células HEK-293 desprovistas de la proteína quinasa LRRK2 son resistentes a la EO, el daño mitocondrial y la apoptosis inducidos por ROT. Las células LRRK2 KO expuestas a ROT, casi no muestran signos de generación intracelular de ROS, según el análisis de células DCF+, ni de oxidación de la proteína sensor de estrés DJ-1-Cys¹⁰⁶-SO₃. De manera que, LRRK2 actúa regulando proteínas mitocondriales (PINK1, PRKN, DRP-1 y PUMA) y factores de transcripción (c-JUN y TP53) (83). Por lo tanto, la

inhibición de la función de la quinasa LRRK2 es una estrategia terapéutica prometedora para el tratamiento de la EP. De hecho, demostramos que la CRE es un agente antioxidante (586)(62). Por lo tanto, no sólo la inhibición farmacológica de la quinasa, sino también la sustancia natural de los subproductos del aguacate podría ser una excelente fuente de moléculas antioxidantes coadyuvantes en el tratamiento de la EP.

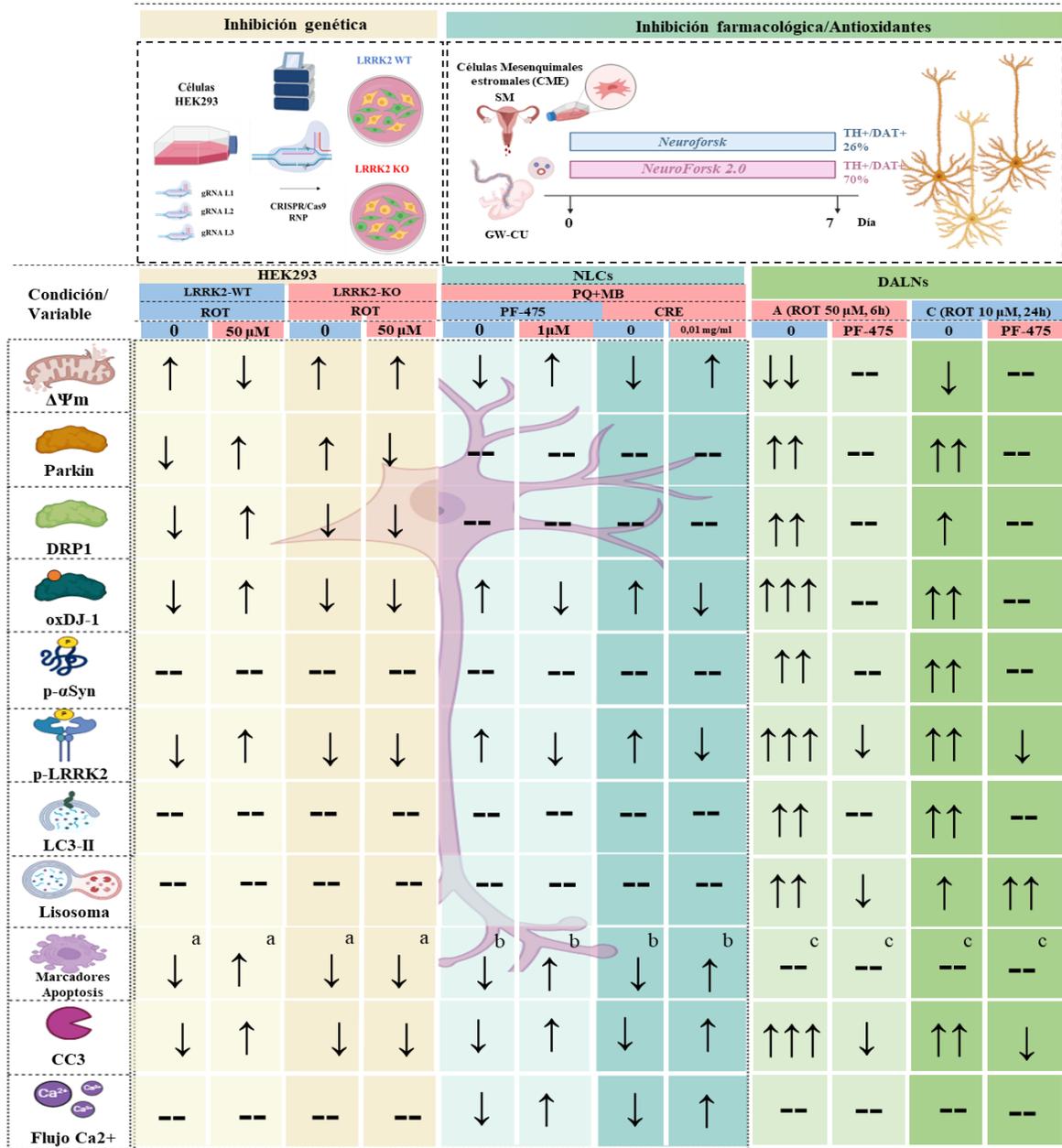


Figura 28. Principales hallazgos obtenidos con los diferentes modelos para el estudio de los mecanismos neuropatológicos de la EP con supresión genética, farmacológica de LRRK2 expuestos a ROT/PQ-MB o antioxidantes. Se evaluaron marcadores asociados a la apoptosis intrínseca en a. células HEK 293 WT y LRRK2 KO (PUMA, pS65-c-Jun, TP53) b. NLCs (PUMA), y c. en NDAs (CC3); donde se evidenció incremento (flechas hacia arriba) o disminución del marcador (flechas hacia arriba) de acuerdo a su exposición a agentes prooxidantes (ROT, PQ+MB), inhibidores de quinasa (Inhibidor de LRRK2 PF-475) o moléculas con potencial actividad antioxidante, como el extracto del endocarpio de *Persea Americana* var. Colin red CRE).

CAPITULO 9: CONCLUSIONES GENERALES

Los resultados de este estudio muestran el establecimiento de modelos *in vitro* para el estudio de la EP en los que reportamos por primera vez ; que **1)** las células HEK293, en conjunto con la edición génica por CRISPR/cas, son un modelo *in vitro* valioso para el estudio del papel del LRRK2 en el desarrollo de la EP. Asimismo, se evidenció que **2)** las CME-SM pueden transdiferenciarse en NDAs (~26%) cultivadas en medios NeuroForsk durante 7 días, los porcentajes de expresión proteica de TH (~ 29% +células), DAT (~ 33% +células), y (~ 26% TH/DAT células doblemente positivas) encontrados en las NDAs son comparables o incluso superiores a los reportados previamente por otras investigaciones , como los obtenidos en células CME-GW-CU tras 7 días de diferenciación sólo con NeuroForsk.

De igual forma, demostramos que **3)** el medio NeuroForsk 2.0, es altamente eficiente en la producción de NDAs específicas y funcionales (70% TH+/DAT+) en 7 días, lo que garantiza su uso para estudios *in vitro*. También logramos demostrar que **4)** la supresión del LRRK2 (HEK293 LRRK2-KO) e la inhibición farmacológica (PF-475) de la fosforilación de LRRK2, ejerce un efecto protector frente a la apoptosis inducida por la ROT y que **5)** el uso de moléculas con potencial antioxidante como el extracto metanólico de *Persea Americana* (CRE) en los modelos *in vitro* establecidos de las células semejantes a las neuronas dopaminérgicas CSNs (CME-GW-CU), protege directamente mediante un mecanismo antioxidante e indirectamente mediante el bloqueo de la fosforilación de la quinasa LRRK2 frente a los estímulos de EO inducido PQ/MB/ROT, en el que intervienen DJ-1, PUMA, CASP-3, la quinasa LRRK2, el daño mitocondrial, la fragmentación del ADN y la alteración de los receptores DA. Por lo tanto, no sólo la inhibición genética y farmacológica de la quinasa LRRK2 sino también la sustancia natural de los subproductos del aguacate podría ser una excelente fuente para la estrategia de modificación de la enfermedad.

Adicionalmente, **6)** se evidenció que en el modelo de NDAs sometidos a una exposición crónica de EO son más susceptibles de sufrir apoptosis que autofagia. Por lo cual, las estrategias terapéuticas deben dirigirse a reducir o eliminar la apoptosis más que la autofagia, como potencial tratamiento para la EP.

Finalmente, en conjunto nuestros hallazgos sugieren que LRRK2 actúa como un desencadenante crítico en la muerte celular inducida por EO, regulando proteínas mitocondriales (por ejemplo, PINK1, PRKN, DRP-1 y PUMA) y factores de transcripción (por ejemplo, c-JUN y TP53). Por lo tanto, la edición del gen LRRK2 o el tratamiento farmacológico sintético o natural pueden proteger a las neuronas del deterioro en la EP. Por último, dado que la patogénesis de la EP es compleja, no completamente entendida, y las opciones terapéuticas son limitadas, elucidar la interacción entre el EO, la apoptosis y la autofagia en la EP es esencial para desarrollar estrategias terapéuticas efectivas.

CAPITULO 10: APORTES Y PRODUCTOS CIENTÍFICOS

Este trabajo aporta el establecimiento de dos nuevos modelos *in vitro* para el estudio de los marcadores neuropatológicos asociados al LRRK2 durante el desarrollo de la EP, la identificación de dianas y moléculas con potencial terapéuticos. De igual forma se aportó un protocolo implementado para la obtención de un alto porcentaje de neuronas dopaminérgicas a partir de CME-SM. Así mismo aporta al conocimiento de nuevas estrategias terapéuticas genéticas y farmacológicas de inhibición del LRRK2 para la EP y la utilización compuestos antioxidantes de origen natural como los extractos metanólicos de *Persea americana* (Aguacate). También aporta al conocimiento de los mecanismos de la modulación del estrés oxidativo y la muerte celular y autofagia en modelos *in vitro* (v.gr. células semejantes a neuronas humanas, CSNh, Neuronas Dopaminérgicas NDASs) en los modelos EP genética-ambiental, empleando las neurotoxinas solas (v.gr. ROT) o en combinación PQ+MB y antioxidantes de origen natural. A su vez, los hallazgos de esta investigación han contribuido al desarrollo y establecimiento de protocolos de edición génica y de experimentación. Como productos de esta investigación, se cuenta con 4 publicaciones originales, tituladas:

- i) Quintero-Espinosa, D.A.; Velez-Pardo, C.; Jimenez-Del-Rio, M. High Yield of Functional Dopamine-like Neurons Obtained in NeuroForsk 2.0 Medium to Study Acute and Chronic Rotenone Effects on Oxidative Stress, Autophagy, and Apoptosis. Int. J. Mol. Sci. 2023, 24, 15744. <https://doi.org/10.3390/ijms242115744>.
- ii) Quintero-Espinosa DA, Sanchez-Hernandez S, Velez-Pardo C, Martin F, Jimenez-Del-Rio M. LRRK2 Knockout Confers Resistance in HEK-293 Cells to Rotenone-Induced Oxidative Stress, Mitochondrial Damage, and Apoptosis. Int J Mol Sci. 2023 Jun 22;24(13):10474. doi: 10.3390/ijms241310474.
- iii) Quintero-Espinosa DA, Ortega-Arellano HF, Velez-Pardo C, Jimenez-Del-Rio M. Phenolic-rich extract of avocado *Persea americana* (var. Colinred) peel blunts paraquat/maneb-induced apoptosis through blocking phosphorylation of LRRK2 kinase in human nerve-like cells. Environ Toxicol. 2022 Mar;37(3):660-676. doi: 10.1002/tox.23433.
- iv) Quintero-Espinosa D, Soto-Mercado V, Quintero-Quinchia C, Mendivil-Perez M, Velez-Pardo C, Jimenez-Del-Rio M. Latent Tri-lineage Potential of Human Menstrual Blood-Derived Mesenchymal Stromal Cells Revealed by Specific In Vitro Culture Conditions. Mol Neurobiol 2021;58(10):5194-5209.
- v) Quintero-Espinosa D, Velez-Pardo C, Jimenez-Del-Rio M. LRRK2 kinase inhibitor PF-06447475 protects *Drosophila melanogaster* against paraquat-induced locomotor impairment, life span reduction, and oxidative stress. Neurochem. Res. Accepted

De igual forma, la realización de este estudio contribuyó a la estandarización de diferentes técnicas de laboratorio, las cuales quedaron registradas en protocolos de extensivo uso y aplicación para estudiantes de pregrado, maestría y doctorado del área temática Enfermedades neurodegenerativas, Neuroquímica y Biología Molecular del grupo de Neurociencias.

- Protocolo para la obtención de Células Mesenquimales Estromales a partir de Sangre Menstrual.

- Protocolo diseño y análisis de ARN guías para Knock out (KO) y Knock in (KI) de genes por CRISPR/Cas9.

- Protocolo para la nucleofección de Células Mesenquimales Estromales y células HEK 293

Así mismo, los hallazgos de esta investigación han contribuido al desarrollo de nuevos trabajos de investigación en el grupo de neurociencias de Antioquia, enfocados en estudiar mecanismos de autofagia y su relación con genes de riesgo en la EP como el GBA en el modelo de células HEK 293 KO LRRK2. Evaluación de moléculas con potencial terapéutico como el CBD e inhibidores de la quinasa Abelson, en el modelo de intoxicación con ROT y PQ-MB en neuronas dopaminérgicas obtenidas a partir de CME-SM, y uso del sistema CRISPR para la generación de modelos celulares con mutaciones puntuales tanto para la Enfermedad de Parkinson como la enfermedad de Alzheimer. Por otro lado, se realizó el acompañamiento en la formación de un Joven investigador de Minciencias.

A su vez, con los resultados obtenidos de investigación, se participó en los siguientes encuentros académicos (congresos, seminarios, cursos):

- i) 11th World Congress of the International Brain Research Organization (IBRO). Granada, España. Sesión de posters: “LRRK2 KNOCKOUT CONFERS RESISTANCE IN HEK-293 CELLS AGAINST ROTENONE-INDUCED OXIDATIVE STRESS, MITOCHONDRIAL DAMAGE, AND APOPTOSIS” Septiembre 2023.
- ii) XIII Encuentro Nacional y XIV Seminario Internacional de Neurociencias. Colegio Colombiano de Neurociencias (COLNE). Cali, COL, Sesión de posters: “La eliminación del gen LRRK2 confiere resistencia al estrés oxidativo inducido por rotenona en las células HEK293”. Abril 2023.
- iii) Curso Neurodegeneración Molecular y Enfoques Terapéuticos - Evento Virtual Wellcome Genome Campus Scientific Conferences UK. Sesión de estudiantes (Flash talk): Establecimiento de un modelo neuronal portador de la mutación C212Y y supresión del gen LRRK2 para el estudio y diseño terapéutico de la enfermedad de Parkinson familiar. 25-29 de enero de 2021

- iv) XII Encuentro Nacional y XIII Seminario Internacional de Neurociencias. Colegio Colombiano de Neurociencias (COLNE). Virtual, COL, Junio 2021. Sesión poster: El inhibidor de la quinasa PF-06447475 protege a células semejantes a neuronas del estrés oxidativo y la apoptosis inducida por el Paraquat y el Maneb: Impacto en la Enfermedad de Parkinson
- v) Digital International Student Congress Of (bio)Medical Sciences 2020 Universidad de Groningen Países Bajos, Sesión de pósters: Junio 2020.
- vi) VII JORNADAS DE MEDICINA GENÓMICA Y ONCOLOGÍA DE GENYO 2019. Pfizer - Universidad de Granada - Junta de Andalucía Centre for Genomics and Oncological Research (GENYO). Granada España Diciembre 2019

Por otra parte, en el marco del XIII Encuentro Nacional y XIV Seminario Internacional de Neurociencias organizado por el Colegio Colombiano de Neurociencias (COLNE). se participó en el concurso de mejor poster con el trabajo titulado: “La eliminación del gen LRRK2 confiere resistencia al estrés oxidativo inducido por rotenona en las células HEK293” el cuál fue ganadora con el **Premio segundo puesto por rigurosidad metodológica**.

Finalmente, se elaboraron **4** productos de apropiación social del conocimiento: 2 videos instructivos para la toma de muestra de sangre menstrual titulados “Dona esperanza y contribuye al cuidado del medio ambiente”, el guion para una pauta radial y un folleto instructivo con ISBN 435886.

CAPITULO 11: PESPECTIVAS

La EP se caracteriza neuropatológicamente por la pérdida selectiva de las neuronas dopaminérgicas (NDAs) en la sustancia nigra compacta. El esclarecimiento de los factores que generan esta vulnerabilidad selectiva en las NDAs es clave, no solo para el entendimiento de los mecanismos celulares que generan procesos de neurodegeneración en la EP, sino también para la identificación de blancos terapéuticos. Así mismo, aunque la etiología de la EP es desconocida, se han sugerido que tanto factores genéticos (mutaciones en genes SNCA, PRKN, DJ-1, LRRK2) como ambientales (exposición a herbicidas Paraquat, Maneb), pueden causar la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y proteínas mal plegadas anormales, que se acumulan descontroladamente para dañar la neurona, y eventualmente superar los mecanismos antioxidantes neuronales, lo que lleva al desarrollo de las características patológicas de las EP.

En este contexto, herramientas de edición de genes, incluidas las nucleasas asociadas a repeticiones palindrómicas cortas regularmente interespaciadas (CRISPR/cas9), han surgido como estrategias novedosas y efectivas para generar modelos que permitan estudiar los mecanismos de neurodegeneración y detectar posibles dianas y fármacos contra la EP.

Con esta experiencia previa, se podría proponer como perspectiva, editar genes específicos asociados a las formas familiares de EP (v.gr. Mutación G2019S en el gen LRRK2 y C212Y en el gen PRKN) que permitan recrear la enfermedad y a la vez ayudar a pacientes a recuperar la función y la conectividad neuronal a través del reemplazo de genes defectuosos asociados a este desorden neurológico. Adicionalmente, las Células Mesenquimales Estromales (CME), debido a su capacidad de transdiferenciación a linaje neuronal y fácil obtención a partir de diferentes fuentes, han surgido como un modelo para el estudio de la EP, permitiendo simular el microambiente celular de los procesos de neurodegeneración presentes en portadores de mutaciones asociadas a formas familiares de la EP. De hecho, se ha propuesto la combinación de CME con técnicas de edición génica para el estudio de la EP dando la posibilidad real de establecer una medicina traslacional y personalizada en estos individuos con EP Familiar, pero también aportando al descubrimiento de blancos terapéuticos o biomarcadores para el diagnóstico y tratamiento de la EP de tipo esporádico.

Dado que la minociclina, como molécula de reposicionamiento y los extractos naturales antioxidantes, obtenidos de materiales agroindustriales de descarte del aguacate como el exocarpio, constituyen moléculas promisorias en la protección contra la pérdida neuronal en la EP. Dada la comprensión que se tiene hasta presente de los mecanismos de muerte neuronal y déficit dopaminérgico y los resultados interesantes que hemos obtenido en este estudio con los extractos de aguacate en los modelos genético-ambientales in vitro de CSN_h, se amplía el panorama de estudio con otra perspectiva que sería enfocada en realizar estudios de sobre expresión de sistemas antioxidantes y moléculas de control de la estabilidad mitocondrial (v.gr. Glutathion (GSH), PARKINA, PINK1 y DJ-1) en combinación con la MC y/o el extracto del exocarpio de la var. Colinred y evaluar si se observa un efecto de protección y/o prevención contra la muerte inducida por PQ+MB O Rotenona.

Así mismo, se podrían realizar ensayos de protección con los extractos del exocarpio de *Persea americana* de la var. Colinred libre y encapsulados in vitro y evaluar el efecto de las nanopartículas solas y cargadas con el extracto. En este sentido, se debe valorar la restauración del funcionamiento neuronal, utilizando marcadores neuronales positivos, y a través de técnicas de funcionalidad de canales iónicos y de calcio que demuestren la restauración después del insulto de EO y la viabilidad de las CSN.

De igual forma, es importante realizar ensayos de farmacodinámica y farmacocinética en modelos in vivo genético-ambientales de la EP para comprobar la eficacia y biodisponibilidad de los extractos del exocarpio de la var. Colinred libre y encapsulados en nanopartículas poliméricas cargadas con el extracto en ratones parkinsonianos, reduciendo la sintomatología y restaurando la actividad motora, al aumentar la biodisponibilidad y la compatibilidad del principio activo. Finalmente, teniendo en cuenta los resultados prometedores obtenidos en esta investigación, sería recomendable hacer un fraccionamiento del extracto metanólico de exocarpio de *Persea americana* variedad Colinred para identificar cada uno de los componentes del extracto y determinar la capacidad antioxidante de cada

uno y seleccionar el de mayor capacidad antioxidante y evaluar su mecanismo de acción neuroprotectora y / o preventiva solo y en combinación con la MC o con los tratamientos farmacológicos usados tradicionalmente (v.gr. L-dopa) como coadyuvante en el modelo preclínico de cultivos mixtos 3D de células mutadas y no mutadas obtenidas a partir de la edición génica por CRISPR/cas9 o de pacientes con la EP que permitiría el desarrollo de una terapia combinada preventiva en pacientes que sufren esta enfermedad neurodegenerativa progresiva desde muy temprana edad como es la EPJAR, formas de inicio tardío como es el caso de la EPAD o esporádicas.

CAPÍTULO 12. ANEXOS

Anexo 1.

Quintero-Espinosa D, Sanchez-Hernandez S, Velez-Pardo C, Martin-Molina F, Jimenez-Del-Rio M, LRRK2 Knockout Confers Resistance in HEK-293 Cells to Rotenone-Induced Oxidative Stress, Mitochondrial Damage, and Apoptosis. *Int J Mol Sci.* 2023 Jun 22;24(13):10474. doi: 10.3390/ijms241310474.

Anexo 2.

Quintero-Espinosa D, Sanchez-Hernandez S, Velez-Pardo C, Martin-Molina F, Jimenez-Del-Rio M, LRRK2 Knockout Confers Resistance in HEK-293 Cells to Rotenone-Induced Oxidative Stress, Mitochondrial Damage, and Apoptosis. *Int J Mol Sci.* 2023 Jun 22;24(13):10474. doi: 10.3390/ijms241310474. Supplementary Materials <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/13/10474#app1-ijms-24-10474>

Anexo 3.

Quintero-Espinosa DA, Ortega-Arellano HF, Velez-Pardo C, Jimenez-Del-Rio M. Phenolic-rich extract of avocado *Persea americana* (var. Colinred) peel blunts paraquat/maneb-induced apoptosis through blocking phosphorylation of LRRK2 kinase in human nerve-like cells. *Environ Toxicol.* 2022 Mar;37(3):660-676. doi: 10.1002/tox.23433. Epub 2021 Dec 12. PMID: 34897981.

Anexo 4.

Latent Tri-lineage Potential of Human Menstrual Blood-Derived Mesenchymal Stromal Cells Revealed by Specific In Vitro Culture Conditions. *Mol Neurobiol.* 2021 Oct;58(10):5194-5209. doi: 10.1007/s12035-021-02442-6. Epub 2021 Jul 16. PMID: 34269964.

Anexo 5.

Quintero-Espinosa D, Velez-Pardo C, Jimenez-Del-Rio M. High Yield of Functional Dopamine-like Neurons Obtained in NeuroForsk 2.0 Medium to Study Acute and Chronic Rotenone Effects on Oxidative Stress, Autophagy, and Apoptosis. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24(21), 15744.

Anexo 6.

Quintero-Espinosa D, Velez-Pardo C, Jimenez-Del-Rio M. LRRK2 kinase inhibitor PF-06447475 protects *Drosophila melanogaster* against paraquat-induced locomotor impairment, life span reduction, and oxidative stress. *Neurochem. Res.* Accepted.

Anexo 7.

Aura Cristina Yepes Echeverri, Diana Alejandra Quintero Espinosa, Carlos Vélez-Pardo, Marlene Jiménez-Del-Río. El Nilotinib reduce el EO vía inhibición de la fosforilación Y412 de la proteína c-Abelson en un modelo neuronal: implicaciones en la Enfermedad de Parkinson (Manuscrito en preparación).

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Savitt JM, Dawson VL, Dawson TM. Diagnosis and treatment of Parkinson disease: molecules to medicine. *J Clin Invest.* 2006;116(7):1744-54.
2. Jankovic J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2008;79(4):368-76.
3. Goedert M, Spillantini MG, Del Tredici K, Braak H. 100 years of Lewy pathology. *Nat Rev Neurol.* 9. England 2013. p. 13-24.
4. Xu Z, Chu X, Jiang H, Schilling H, Chen S, Feng J. Induced dopaminergic neurons: A new promise for Parkinson's disease. *Redox Biol.* 2017;11:606-12.
5. Ehringer H, Hornykiewicz O. Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system. *Klin Wochenschr.* 1960;38:1236-9.
6. Cotzias GC, Papavasiliou PS, Gellene R. Modification of Parkinsonism--chronic treatment with L-dopa. *N Engl J Med.* 1969;280(7):337-45.
7. Lindvall O, Brundin P, Widner H, Rehncrona S, Gustavii B, Frackowiak R, et al. Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in Parkinson's disease. *Science.* 1990;247(4942):574-7.
8. Braak H, Tredici KD, Rüb U, de Vos RAI, Jansen Steur ENH, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging.* 2003;24(2):197-211.
9. Truong DD, Wolters EC. Recognition and management of Parkinson's disease during the premotor (prodromal) phase. *Expert Review of Neurotherapeutics.* 2009;9(6):847-57.
10. Pellicano C, Benincasa D, Pisani V, Buttarelli FR, Giovannelli M, Pontieri FE. Prodromal non-motor symptoms of Parkinson's disease. *Neuropsychiatric Disease and Treatment.* 2007;3(1):145-52.
11. Rukavina K, Batzu L, Boogers A, Abundes-Corona A, Bruno V, Chaudhuri KR. Non-motor complications in late stage Parkinson's disease: recognition, management and unmet needs. *Expert Review of Neurotherapeutics.* 2021;21(3):335-52.

12. Reynolds RH, Botía J, Nalls MA, Noyce AJ, Nicolas A, Cookson MR, et al. Moving beyond neurons: the role of cell type-specific gene regulation in Parkinson's disease heritability. *npj Parkinson's Disease*. 2019;5(1):6.
13. Huang B, Chau SWH, Liu Y, Chan JWY, Wang J, Ma SL, et al. Gut microbiome dysbiosis across early Parkinson's disease, REM sleep behavior disorder and their first-degree relatives. *Nature Communications*. 2023;14(1):2501.
14. Berg D, Borghammer P, Fereshtehnejad S-M, Heinzl S, Horsager J, Schaeffer E, et al. Prodromal Parkinson disease subtypes — key to understanding heterogeneity. *Nature Reviews Neurology*. 2021;17(6):349-61.
15. Szvedo AA, Dalen I, Pedersen KF, Camacho M, Bäckström D, Forsgren L, et al. GBA and APOE Impact Cognitive Decline in Parkinson's Disease: A 10-Year Population-Based Study. *Movement Disorders*. 2022;37(5):1016-27.
16. Farrow SL, Cooper AA, O'Sullivan JM. Redefining the hypotheses driving Parkinson's diseases research. *npj Parkinson's Disease*. 2022;8(1):45.
17. Kaiser S, Zhang L, Mollenhauer B, Jacob J, Longrich S, Del-Aguila J, et al. A proteogenomic view of Parkinson's disease causality and heterogeneity. *npj Parkinson's Disease*. 2023;9(1):24.
18. Mortberg MA, Vallabh SM, Minikel EV. Disease stages and therapeutic hypotheses in two decades of neurodegenerative disease clinical trials. *Scientific Reports*. 2022;12(1):17708.
19. Tysnes O-B, Storstein A. Epidemiology of Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission*. 2017;124(8):901-5.
20. Poewe W, Seppi K, Tanner CM, Halliday GM, Brundin P, Volkmann J, et al. Parkinson disease. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17013.
21. Orozco JL, Valderrama-Chaparro JA, Pinilla-Monsalve GD, Molina-Echeverry MI, Pérez Castaño AM, Ariza-Araújo Y, et al. Parkinson's disease prevalence, age distribution and staging in Colombia. *Neurol Int*. 2020;12(1):8401.
22. Sanchez JL, Buritica O, Pineda D, Uribe CS, Palacio LG. Prevalence of Parkinson's disease and parkinsonism in a Colombian population using the capture-recapture method. *Int J Neurosci*. 2004;114(2):175-82.
23. Diazgranados Sánchez JA, Chan Guevara L, Gómez Betancourt LF, Lozano Arango AF, Ramirez M. Descripción de la población de pacientes con enfermedad de Parkinson en un centro médico neurológico en la ciudad de Cali, Colombia. *Acta Neurológica Colombiana*. 2011;27:205-10.
24. Dorsey ER, Bloem BR. The Parkinson Pandemic-A Call to Action. *JAMA Neurol*. 2018;75(1):9-10.
25. Simon DK, Tanner CM, Brundin P. Parkinson Disease Epidemiology, Pathology, Genetics, and Pathophysiology. *Clin Geriatr Med*. 2020;36(1):1-12.
26. Sung VW, Nicholas AP. Nonmotor symptoms in Parkinson's disease: expanding the view of Parkinson's disease beyond a pure motor, pure dopaminergic problem. *Neurol Clin*. 2013;31(3 Suppl):S1-16.

27. Schneider SA, Obeso JA. Clinical and Pathological Features of Parkinson's Disease. In: Nguyen HHP, Cenci MA, editors. Behavioral Neurobiology of Huntington's Disease and Parkinson's Disease. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2015. p. 205-20.
28. Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*. 2003;39(6):889-909.
29. Miller RL, James-Kracke M, Sun GY, Sun AY. Oxidative and inflammatory pathways in Parkinson's disease. *Neurochem Res*. 2009;34(1):55-65.
30. Larsen SB, Hanss Z, Krüger R. The genetic architecture of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Cell Tissue Res*. 2018;373(1):21-37.
31. Drechsel DA, Patel M. Role of reactive oxygen species in the neurotoxicity of environmental agents implicated in Parkinson's disease. *Free Radic Biol Med*. 2008;44(11):1873-86.
32. Jimenez Del Rio M, Moreno S, Garcia-Ospina G, Buritica O, Uribe CS, Lopera F, et al. Autosomal recessive juvenile parkinsonism Cys212Tyr mutation in parkin renders lymphocytes susceptible to dopamine- and iron-mediated apoptosis. *Mov Disord*. 2004;19(3):324-30.
33. Kazlauskaitė A, Muqit MM. PINK1 and Parkin – mitochondrial interplay between phosphorylation and ubiquitylation in Parkinson's disease. *Febs j*. 2015;282(2):215-23.
34. Yin HH, Knowlton BJ. The role of the basal ganglia in habit formation. *Nature Reviews Neuroscience*. 2006;7(6):464-76.
35. DeLong MR, Wichmann T. Circuits and Circuit Disorders of the Basal Ganglia. *Archives of Neurology*. 2007;64(1):20-4.
36. Rocha GS, Freire MAM, Britto AM, Paiva KM, Oliveira RF, Fonseca IAT, et al. Basal ganglia for beginners: the basic concepts you need to know and their role in movement control. *Frontiers in Systems Neuroscience*. 2023;17.
37. Zhai S, Cui Q, Simmons DV, Surmeier DJ. Distributed dopaminergic signaling in the basal ganglia and its relationship to motor disability in Parkinson's disease. *Curr Opin Neurobiol*. 2023;83:102798.
38. Leisman G, Melillo R. The basal ganglia: motor and cognitive relationships in a clinical neurobehavioral context. *Rev Neurosci*. 2013;24(1):9-25.
39. Milardi D, Quartarone A, Bramanti A, Anastasi G, Bertino S, Basile GA, et al. The Cortico-Basal Ganglia-Cerebellar Network: Past, Present and Future Perspectives. *Frontiers in Systems Neuroscience*. 2019;13.
40. Kordower JH, Bjorklund A. Trophic factor gene therapy for Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2013;28(1):96-109.
41. Peak J, Chieng B, Hart G, Balleine BW. Striatal direct and indirect pathway neurons differentially control the encoding and updating of goal-directed learning. *Elife*. 2020;9.

42. Arber S, Costa RM. Networking brainstem and basal ganglia circuits for movement. *Nature Reviews Neuroscience*. 2022;23(6):342-60.
43. Criaud M, Anton J-L, Nazarian B, Longcamp M, Metereau E, Boulinguez P, et al. The Human Basal Ganglia Mediate the Interplay between Reactive and Proactive Control of Response through Both Motor Inhibition and Sensory Modulation. *Brain Sciences* [Internet]. 2021; 11(5).
44. Ortega-Arellano HF. La Minociclina y los extractos de *Persea Americana* modulan el estrés oxidativo en modelos de la enfermedad de Parkinson: nuevas alternativas terapéuticas: Universidad de Antioquia; 2019.
45. Zimprich A. Genetics of Parkinson's disease and essential tremor. *Curr Opin Neurol*. 2011;24(4):318-23.
46. Spatola M, Wider C. Genetics of Parkinson's disease: the yield. *Parkinsonism Relat Disord*. 20 Suppl 1. England: © 2013 Elsevier Ltd; 2014. p. S35-8.
47. Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci*. 2000;3(12):1301-6.
48. Allam M, Castillo A, Navajas R. Factores de riesgo en la enfermedad de Parkinson. *Revista de Neurología*. 2003;36:749.
49. Murray LK, Jadavji NM. The role of one-carbon metabolism and homocysteine in Parkinson's disease onset, pathology and mechanisms. *Nutr Res Rev*. 32. England2019. p. 218-30.
50. Madhaw G, Kumar N. Dietary and Environmental Risk Factors in Parkinson's Disease and Alzheimer's Disease: Beware of Your Food Plate and Your Surroundings! *Annals of Indian Academy of Neurology*. 2023;26(2).
51. Langston JW, Ballard PA, Jr. Parkinson's disease in a chemist working with 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *N Engl J Med*. 1983;309(5):310.
52. Richardson JR, Caudle WM, Guillot TS, Watson JL, Nakamaru-Ogiso E, Seo BB, et al. Obligatory role for complex I inhibition in the dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Toxicol Sci*. 95. United States2007. p. 196-204.
53. Tanner CM, Kamel F, Ross GW, Hoppin JA, Goldman SM, Korell M, et al. Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. *Environ Health Perspect*. 2011;119(6):866-72.
54. Manning-Bog AB, McCormack AL, Li J, Uversky VN, Fink AL, Di Monte DA. The herbicide paraquat causes up-regulation and aggregation of alpha-synuclein in mice: paraquat and alpha-synuclein. *J Biol Chem*. 2002;277(3):1641-4.
55. McCormack AL, Atienza JG, Johnston LC, Andersen JK, Vu S, Di Monte DA. Role of oxidative stress in paraquat-induced dopaminergic cell degeneration. *Journal of Neurochemistry*. 2005;93(4):1030-7.
56. McCormack AL, Thiruchelvam M, Manning-Bog AB, Thiffault C, Langston JW, Cory-Slechta DA, et al. Environmental risk factors and Parkinson's disease: selective

- degeneration of nigral dopaminergic neurons caused by the herbicide paraquat. *Neurobiol Dis.* 2002;10(2):119-27.
57. Domico LM, Cooper KR, Bernard LP, Zeevalk GD. Reactive oxygen species generation by the ethylene-bis-dithiocarbamate (EBDC) fungicide mancozeb and its contribution to neuronal toxicity in mesencephalic cells. *Neurotoxicology.* 2007;28(6):1079-91.
 58. Iorio R, Castellucci A, Rossi G, Cinque B, Cifone MG, Macchiarelli G, et al. Mancozeb affects mitochondrial activity, redox status and ATP production in mouse granulosa cells. *Toxicol In Vitro.* 30. England: © 2015 Elsevier B.V; 2015. p. 438-45.
 59. *The Mode of Action of Organic Insecticides.* Metcalf RL, editor. Washington, DC: The National Academies Press; 1948. 88 p.
 60. Turner N. Notes on Rotenone as an Insecticide. *Journal of Economic Entomology.* 1932;25(6):1228-37.
 61. Pouchieu C, Piel C, Carles C, Gruber A, Helmer C, Tual S, et al. Pesticide use in agriculture and Parkinson's disease in the AGRICAN cohort study. *Int J Epidemiol.* 2018;47(1):299-310.
 62. Ayton D, Ayton S, Barker AL, Bush AI, Warren N. Parkinson's disease prevalence and the association with rurality and agricultural determinants. *Parkinsonism Relat Disord.* 2019;61:198-202.
 63. Dhillon AS, Tarbutton GL, Levin JL, Plotkin GM, Lowry LK, Nalbone JT, et al. Pesticide/environmental exposures and Parkinson's disease in East Texas. *J Agromedicine.* 2008;13(1):37-48.
 64. De Miranda BR, Fazzari M, Rocha EM, Castro S, Greenamyre JT. Sex Differences in Rotenone Sensitivity Reflect the Male-to-Female Ratio in Human Parkinson's Disease Incidence. *Toxicological Sciences.* 2019;170(1):133-43.
 65. Terron A, Bal-Price A, Paini A, Monnet-Tschudi F, Bennekou SH, Leist M, et al. An adverse outcome pathway for parkinsonian motor deficits associated with mitochondrial complex I inhibition. *Arch Toxicol.* 2018;92(1):41-82.
 66. La Forge FB, Haller HL, Smith LE. The Determination of the Structure of Rotenone. *Chemical Reviews.* 1933;12(2):181-213.
 67. Kampjut D, Sazanov LA. The coupling mechanism of mammalian respiratory complex I. *Science.* 370. United States: © 2020 The Authors, some rights reserved; exclusive licensee American Association for the Advancement of Science. No claim to original U.S. Government Works.; 2020.
 68. Pereira CS, Teixeira MH, Russell DA, Hirst J, Arantes GM. Mechanism of rotenone binding to respiratory complex I depends on ligand flexibility. *Scientific Reports.* 2023;13(1):6738.
 69. Cabeza-Arvelaiz Y, Schiestl RH. Transcriptome Analysis of a Rotenone Model of Parkinsonism Reveals Complex I-Tied and -Untied Toxicity Mechanisms Common to Neurodegenerative Diseases. *PLOS ONE.* 2012;7(9):e44700.

70. Choi W-S, Palmiter RD, Xia Z. Loss of mitochondrial complex I activity potentiates dopamine neuron death induced by microtubule dysfunction in a Parkinson's disease model. *Journal of Cell Biology*. 2011;192(5):873-82.
71. Sanders LH, Timothy Greenamyre J. Oxidative damage to macromolecules in human Parkinson disease and the rotenone model. *Free Radical Biology and Medicine*. 2013;62:111-20.
72. Sherer TB, Betarbet R, Stout AK, Lund S, Baptista M, Panov AV, et al. An in vitro model of Parkinson's disease: linking mitochondrial impairment to altered alpha-synuclein metabolism and oxidative damage. *J Neurosci*. 2002;22(16):7006-15.
73. Marella M, Seo BB, Nakamaru-Ogiso E, Greenamyre JT, Matsuno-Yagi A, Yagi T. Protection by the NDI1 Gene against Neurodegeneration in a Rotenone Rat Model of Parkinson's Disease. *PLOS ONE*. 2008;3(1):e1433.
74. Sanders LH, Timothy Greenamyre J. Oxidative damage to macromolecules in human Parkinson disease and the rotenone model. *Free Radic Biol Med*. 2013;62:111-20.
75. Lawana V, Cannon JR. Chapter Five - Rotenone neurotoxicity: Relevance to Parkinson's disease. In: Aschner M, Costa LG, editors. *Advances in Neurotoxicology*. 4: Academic Press; 2020. p. 209-54.
76. Rocha SM, Bantle CM, Aboellail T, Chatterjee D, Smeyne RJ, Tjalkens RB. Rotenone induces regionally distinct α -synuclein protein aggregation and activation of glia prior to loss of dopaminergic neurons in C57Bl/6 mice. *Neurobiol Dis*. 2022;167:105685.
77. Ganjam GK, Bolte K, Matschke LA, Neitemeier S, Dolga AM, Höllerhage M, et al. Mitochondrial damage by α -synuclein causes cell death in human dopaminergic neurons. *Cell Death & Disease*. 2019;10(11):865.
78. Liu HQ, Zhu XZ, Weng EQ. Intracellular dopamine oxidation mediates rotenone-induced apoptosis in PC12 cells. *Acta Pharmacol Sin*. 2005;26(1):17-26.
79. Chu CT, Bayır H, Kagan VE. LC3 binds externalized cardiolipin on injured mitochondria to signal mitophagy in neurons: implications for Parkinson disease. *Autophagy*. 2014;10(2):376-8.
80. Chu CT, Ji J, Dagda RK, Jiang JF, Tyurina YY, Kapralov AA, et al. Cardiolipin externalization to the outer mitochondrial membrane acts as an elimination signal for mitophagy in neuronal cells. *Nat Cell Biol*. 2013;15(10):1197-205.
81. Xiong N, Xiong J, Jia M, Liu L, Zhang X, Chen Z, et al. The role of autophagy in Parkinson's disease: rotenone-based modeling. *Behav Brain Funct*. 2013;9:13.
82. Mader BJ, Pivtoraiko VN, Flippo HM, Klocke BJ, Roth KA, Mangieri LR, et al. Rotenone inhibits autophagic flux prior to inducing cell death. *ACS Chem Neurosci*. 2012;3(12):1063-72.
83. Wu F, Xu HD, Guan JJ, Hou YS, Gu JH, Zhen XC, et al. Rotenone impairs autophagic flux and lysosomal functions in Parkinson's disease. *Neuroscience*. 2015;284:900-11.
84. Perez-Abshana LP, Mendivil-Perez M, Velez-Pardo C, Jimenez-Del-Rio M. Rotenone Blocks the Glucocerebrosidase Enzyme and Induces the Accumulation of Lysosomes

- and Autophagolysosomes Independently of LRRK2 Kinase in HEK-293 Cells. *Int J Mol Sci.* 2023;24(13).
85. Dinis-Oliveira RJ, Remiao F, Carmo H, Duarte JA, Navarro AS, Bastos ML, et al. Paraquat exposure as an etiological factor of Parkinson's disease. *Neurotoxicology.* 2006;27(6):1110-22.
 86. Bastías-Candia S, Zolezzi JM, Inestrosa NC. Revisiting the Paraquat-Induced Sporadic Parkinson's Disease-Like Model. *Mol Neurobiol.* 2019;56(2):1044-55.
 87. Wang A, Costello S, Cockburn M, Zhang X, Bronstein J, Ritz B. Parkinson's disease risk from ambient exposure to pesticides. *Eur J Epidemiol.* 2011;26(7):547-55.
 88. Shimada H, H. F, Hirai KI, J. K, J. A, E. S. Paraquat detoxicative system in the mouse liver postmitochondrial fraction ☆. *Arch Biochem Biophys.* 2002;402(1):149–57.
 89. Shimizu K, Matsubara K, Ohtaki K, Fujimaru S, Saito O, Shiono H. Paraquat induces long-lasting dopamine overflow through the excitotoxic pathway in the striatum of freely moving rats. *Brain research.* 2003;976(2):243-52.
 90. Manning-Bog AB, McCormack AL, Purisai MG, Bolin LM, Di Monte DA. Alpha-synuclein overexpression protects against paraquat-induced neurodegeneration. *J Neurosci.* 2003;23(8):3095-9.
 91. Rappold PM, Cui M, Chesser AS, Tibbett J, Grima JC, Duan L, 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):20766-71.
 92. Levay G, Bodell WJ. Detection of dopamine--DNA adducts: potential role in Parkinson's disease. *Carcinogenesis.* 1993;14(6):1241-5.
 93. Hastings TG. Enzymatic oxidation of dopamine: the role of prostaglandin H synthase. *J Neurochem.* 1995;64(2):919-24.
 94. Bueler H. Impaired mitochondrial dynamics and function in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Experimental neurology.* 2009;218(2):235-46.
 95. Andersen JK. Iron dysregulation and Parkinson's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD.* 2004;6(6 Suppl):S47-52.
 96. Kaur D, J. A. Does cellular iron dysregulation play a causative role in Parkinson's disease? 2004;3(3):327–43.
 97. West JD, Marnett LJ. Endogenous reactive intermediates as modulators of cell signaling and cell death. *Chem Res Toxicol.* 2006;19(2):173-94.
 98. Franco R, Li S, Rodriguez-Rocha H, Burns M, Panayiotidis MI. Molecular mechanisms of pesticide-induced neurotoxicity: Relevance to Parkinson's disease. *Chemico-biological interactions.* 2010;188(2):289-300.
 99. Hirayama N, Aki T, Funakoshi T, Noritake K, Unuma K, Uemura K. Necrosis in human neuronal cells exposed to paraquat. *J Toxicol Sci.* 2018;43(3):193-202.
 100. Niso-Santano M, González-Polo RA, Bravo-San Pedro JM, Gómez-Sánchez R, Lastres-Becker I, Ortiz-Ortiz MA, et al. Activation of apoptosis signal-regulating

- kinase 1 is a key factor in paraquat-induced cell death: modulation by the Nrf2/Trx axis. *Free Radic Biol Med.* 48. United States: 2010 Elsevier Inc; 2010. p. 1370-81.
101. Schmuck G, Röhrdanz E, Tran-Thi QH, Kahl R, Schlüter G. Oxidative stress in rat cortical neurons and astrocytes induced by paraquat in vitro. *Neurotox Res.* 2002;4(1):1-13.
 102. Zaidi A, Fernandes D, Bean JL, Michaelis ML. Effects of paraquat-induced oxidative stress on the neuronal plasma membrane Ca(2+)-ATPase. *Free Radic Biol Med.* 2009;47(10):1507-14.
 103. Piel C, Pouchieu C, Carles C, Béziat B, Boulanger M, Bureau M, et al. Agricultural exposures to carbamate herbicides and fungicides and central nervous system tumour incidence in the cohort AGRICAN. *Environ Int.* 130. Netherlands: © 2019 The Authors. Published by Elsevier Ltd.; 2019. p. 104876.
 104. Stadler K, Li X, Liu B, Bao W, Wang K, Lehmler H-J. Systematic review of human biomonitoring studies of ethylenethiourea, a urinary biomarker for exposure to dithiocarbamate fungicides. *Environmental Pollution.* 2022;292:118419.
 105. Brouwer M, Huss A, van der Mark M, Nijssen PCG, Mulleners WM, Sas AMG, et al. Environmental exposure to pesticides and the risk of Parkinson's disease in the Netherlands. *Environment International.* 2017;107:100-10.
 106. Mora Ana M, Córdoba L, Cano Juan C, Hernandez-Bonilla D, Pardo L, Schnaas L, et al. Prenatal Mancozeb Exposure, Excess Manganese, and Neurodevelopment at 1 Year of Age in the Infants' Environmental Health (ISA) Study. *Environmental Health Perspectives.* 2018;126(5):057007.
 107. Hou L, Qu X, Qiu X, Huang R, Zhao X, Wang Q. Integrin CD11b mediates locus coeruleus noradrenergic neurodegeneration in a mouse Parkinson's disease model. *Journal of Neuroinflammation.* 2020;17(1):148.
 108. Bastías-Candia S, Di Benedetto M, D'Addario C, Candeletti S, Romualdi P. Combined exposure to agriculture pesticides, paraquat and maneb, induces alterations in the N/OFQ—NOPr and PDYN/KOPr systems in rats: Relevance to sporadic Parkinson's disease. *Environmental Toxicology.* 2015;30(6):656-63.
 109. Coughlan C, Walker DI, Lohr KM, Richardson JR, Saba LM, Caudle WM, et al. Comparative Proteomic Analysis of Carbonylated Proteins from the Striatum and Cortex of Pesticide-Treated Mice. *Parkinson's Disease.* 2015;2015:812532.
 110. Ding W, Lin H, Hong X, Ji D, Wu F. Poloxamer 188-mediated anti-inflammatory effect rescues cognitive deficits in paraquat and maneb-induced mouse model of Parkinson's disease. *Toxicology.* 2020;436:152437.
 111. Barlow BK, Lee DW, Cory-Slechta DA, Opanashuk LA. Modulation of antioxidant defense systems by the environmental pesticide maneb in dopaminergic cells. *Neurotoxicology.* 26. Netherlands2005. p. 63-75.
 112. Fitsanakis VA, Amarnath V, Moore JT, Montine KS, Zhang J, Montine TJ. Catalysis of catechol oxidation by metal-dithiocarbamate complexes in pesticides. *Free Radic Biol Med.* 33. United States2002. p. 1714-23.

113. Domico LM, Zeevalk GD, Bernard LP, Cooper KR. Acute neurotoxic effects of mancozeb and maneb in mesencephalic neuronal cultures are associated with mitochondrial dysfunction. *Neurotoxicology*. 27. Netherlands 2006. p. 816-25.
114. Ahn EH, Lei K, Kang SS, Wang Z-H, Liu X, Hong W, et al. Mitochondrial dysfunction triggers the pathogenesis of Parkinson's disease in neuronal C/EBP β transgenic mice. *Molecular Psychiatry*. 2021;26(12):7838-50.
115. Zhang J, Fitsanakis VA, Gu G, Jing D, Ao M, Amarnath V, et al. Manganese ethylene-bis-dithiocarbamate and selective dopaminergic neurodegeneration in rat: a link through mitochondrial dysfunction. *J Neurochem*. 2003;84(2):336-46.
116. Anderson CC, Marentette JO, Rauniyar AK, Prutton KM, Khatri M, Matheson C, et al. Maneb alters central carbon metabolism and thiol redox status in a toxicant model of Parkinson's disease. *Free Radical Biology and Medicine*. 2021;162:65-76.
117. Liu C, Liu Z, Fang Y, Liao Z, Zhang Z, Yuan X, et al. Exposure to dithiocarbamate fungicide maneb in vitro and in vivo: Neuronal apoptosis and underlying mechanisms. *Environ Int*. 171. Netherlands: © 2022 The Authors. Published by Elsevier Ltd.; 2023. p. 107696.
118. Signorile A, Ferretta A, Ruggieri M, Paolicelli D, Lattanzio P, Trojano M, et al. Mitochondria, Oxidative Stress, cAMP Signalling and Apoptosis: A Crossroads in Lymphocytes of Multiple Sclerosis, a Possible Role of Nutraceuticals. *Antioxidants* [Internet]. 2021; 10(1).
119. Liu C, Liu Z, Fang Y, Du Z, Yan Z, Yuan X, et al. Exposure to the environmentally toxic pesticide maneb induces Parkinson's disease-like neurotoxicity in mice: A combined proteomic and metabolomic analysis. *Chemosphere*. 2022;308:136344.
120. Zhou Y, Shie FS, Piccardo P, Montine TJ, Zhang J. Proteasomal inhibition induced by manganese ethylene-bis-dithiocarbamate: relevance to Parkinson's disease. *Neuroscience*. 2004;128(2):281-91.
121. Costello S, Cockburn M, Bronstein J, Zhang X, Ritz B. Parkinson's disease and residential exposure to maneb and paraquat from agricultural applications in the central valley of California. *Am J Epidemiol*. 2009;169(8):919-26.
122. Colle D, Santos DB, Naime AA, Gonçalves CL, Ghizoni H, Hort MA, et al. Early Postnatal Exposure to Paraquat and Maneb in Mice Increases Nigrostriatal Dopaminergic Susceptibility to a Re-challenge with the Same Pesticides at Adulthood: Implications for Parkinson's Disease. *Neurotox Res*. 2020;37(1):210-26.
123. Cicchetti F, Lapointe N, Roberge-Tremblay A, Saint-Pierre M, Jimenez L, Ficke BW, et al. Systemic exposure to paraquat and maneb models early Parkinson's disease in young adult rats. *Neurobiology of Disease*. 2005;20(2):360-71.
124. Thiruchelvam M, Brockel BJ, Richfield EK, Baggs RB, Cory-Slechta DA. Potentiated and preferential effects of combined paraquat and maneb on nigrostriatal dopamine systems: environmental risk factors for Parkinson's disease? *Brain research*. 2000;873(2):225-34.

125. Thiruchelvam M, Richfield EK, Goodman BM, Baggs RB, Cory-Slechta DA. Developmental exposure to the pesticides paraquat and maneb and the Parkinson's disease phenotype. *Neurotoxicology*. 2002;23(4-5):621-33.
126. Thiruchelvam M, McCormack A, Richfield EK, Baggs RB, Tank AW, Di Monte DA, et al. Age-related irreversible progressive nigrostriatal dopaminergic neurotoxicity in the paraquat and maneb model of the Parkinson's disease phenotype. *Eur J Neurosci*. 2003;18(3):589-600.
127. Fei Q, Ethell DW. Maneb potentiates paraquat neurotoxicity by inducing key Bcl-2 family members. *J Neurochem*. 105. England2008. p. 2091-7.
128. Gowers WR. *A manual of diseases of the nervous system*: P. Blakiston, Son & Company; 1898.
129. Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, et al. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*. 1997;276(5321):2045-7.
130. Karimi-Moghadam A, Charsouei S, Bell B, Jabalameli MR. Parkinson Disease from Mendelian Forms to Genetic Susceptibility: New Molecular Insights into the Neurodegeneration Process. *Cell Mol Neurobiol*. 2018;38(6):1153-78.
131. Day JO, Mullin S. The Genetics of Parkinson's Disease and Implications for Clinical Practice. *Genes* [Internet]. 2021; 12(7).
132. West AB, Moore DJ, Choi C, Andrabi SA, Li X, Dikeman D, et al. Parkinson's disease-associated mutations in LRRK2 link enhanced GTP-binding and kinase activities to neuronal toxicity. *Hum Mol Genet*. 16. England2007. p. 223-32.
133. Hernandez DG, Reed X, Singleton AB. Genetics in Parkinson disease: Mendelian versus non-Mendelian inheritance. *Journal of Neurochemistry*. 2016;139(S1):59-74.
134. Corti O, Lesage S, Brice A. What Genetics Tells Us About The Causes and Mechanisms of Parkinson's Disease. *Physiol Rev*. 2011; 91:1161-218.
135. Lill CM. Genetics of Parkinson's disease. *Mol Cell Probes*. 2016;30(6):386-96.
136. A Parkinson's disease Mutation Database [Internet]. Leiden University Medical Center. 2022 [cited nov 27 2023]. Available from: <https://databases.lovd.nl/shared/genes/PARK2>.
137. Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, et al. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*. 1998;392(6676):605-8.
138. Cha GH, Kim S, Park J, Lee E, Kim M, Lee SB, et al. Parkin negatively regulates JNK pathway in the dopaminergic neurons of Drosophila. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(29):10345-50.
139. Pineda-Trujillo N, Carvajal-Carmona LG, Buritica O, Moreno S, Uribe C, Pineda D, et al. A novel Cys212Tyr founder mutation in parkin and allelic heterogeneity of juvenile Parkinsonism in a population from North West Colombia. *Neurosci Lett*. 2001;298(2):87-90.

140. Pineda-Trujillo N, Arias Pérez W. Mutation c.255delA in the PARK2 gene as cause of juvenile Parkinson's disease in a large Colombian family Una mutación en el gen PARK2 causa enfermedad de Parkinson juvenil en una extensa familia colombiana. *Iatreia*. 2009;22.
141. Pineda-Trujillo N, Apergi M, Moreno S, Arias W, Lesage S, Franco A, et al. A genetic cluster of early onset Parkinson's disease in a Colombian population. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2006;141b(8):885-9.
142. Quinn PMJ, Moreira PI, Ambrósio AF, Alves CH. PINK1/PARKIN signalling in neurodegeneration and neuroinflammation. *Acta Neuropathologica Communications*. 2020;8(1):189.
143. Vizziello M, Borellini L, Franco G, Ardolino G. Disruption of Mitochondrial Homeostasis: The Role of PINK1 in Parkinson's Disease. *Cells* [Internet]. 2021; 10(11).
144. Heeman B, Van den Haute C, Aelvoet SA, Valsecchi F, Rodenburg RJ, Reumers V, et al. Depletion of PINK1 affects mitochondrial metabolism, calcium homeostasis and energy maintenance. *J Cell Sci*. 2011;124(Pt 7):1115-25.
145. Bekris LM, Mata IF, Zabetian CP. The genetics of Parkinson disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol*. 2010;23(4):228-42.
146. Repici M, Giorgini F. DJ-1 in Parkinson's Disease: Clinical Insights and Therapeutic Perspectives. *J Clin Med*. 2019;8(9).
147. Zhou W, Zhu M, Wilson MA, Petsko GA, Fink AL. The oxidation state of DJ-1 regulates its chaperone activity toward alpha-synuclein. *J Mol Biol*. 356. Netherlands2006. p. 1036-48.
148. Moore DJ, Zhang L, Troncoso J, Lee MK, Hattori N, Mizuno Y, et al. Association of DJ-1 and parkin mediated by pathogenic DJ-1 mutations and oxidative stress. *Hum Mol Genet*. 14. England2005. p. 71-84.
149. Canet-Avilés RM, Wilson MA, Miller DW, Ahmad R, McLendon C, Bandyopadhyay S, et al. The Parkinson's disease protein DJ-1 is neuroprotective due to cysteine-sulfinic acid-driven mitochondrial localization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(24):9103-8.
150. Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, Schaap O, Breedveld GJ, Krieger E, et al. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science*. 299. United States2003. p. 256-9.
151. Abou-Sleiman PM, Healy DG, Quinn N, Lees AJ, Wood NW. The role of pathogenic DJ-1 mutations in Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 2003;54(3):283-6.
152. Salazar C, Ruiz-Hincapie P, Ruiz LM. The Interplay among PINK1/PARKIN/Dj-1 Network during Mitochondrial Quality Control in Cancer Biology: Protein Interaction Analysis. *Cells*. 2018;7(10).
153. Xiong H, Wang D, Chen L, Choo YS, Ma H, Tang C, et al. Parkin, PINK1, and DJ-1 form a ubiquitin E3 ligase complex promoting unfolded protein degradation. *J Clin Invest*. 2009;119(3):650-60.

154. Requejo-Aguilar R, Lopez-Fabuel I, Jimenez-Blasco D, Fernandez E, Almeida A, Bolaños JP. DJ1 represses glycolysis and cell proliferation by transcriptionally up-regulating Pink1. *Biochem J*. 2015;467(2):303-10.
155. Kasten M, Hartmann C, Hampf J, Schaake S, Westenberger A, Vollstedt EJ, et al. Genotype-Phenotype Relations for the Parkinson's Disease Genes Parkin, PINK1, DJ1: MDSGene Systematic Review. *Mov Disord*. 2018;33(5):730-41.
156. Uversky VN. A protein-chameleon: conformational plasticity of alpha-synuclein, a disordered protein involved in neurodegenerative disorders. *J Biomol Struct Dyn*. 2003;21(2):211-34.
157. Ding X, Ren F. Leucine-rich repeat kinase 2 inhibitors: a patent review (2014-present). *Expert Opin Ther Pat*. 2020;30(4):275-86.
158. Taymans J-M, Fell M, Greenamyre T, Hirst WD, Mamais A, Padmanabhan S, et al. Perspective on the current state of the LRRK2 field. *npj Parkinson's Disease*. 2023;9(1):104.
159. Mandemakers W, Snellinx A, O'Neill MJ, de Strooper B. LRRK2 expression is enriched in the striosomal compartment of mouse striatum. *Neurobiol Dis*. 48. United States: © 2012 Elsevier Inc; 2012. p. 582-93.
160. Moehle MS, Webber PJ, Tse T, Sukar N, Standaert DG, DeSilva TM, et al. LRRK2 inhibition attenuates microglial inflammatory responses. *J Neurosci*. 2012;32(5):1602-11.
161. Giesert F, Hofmann A, Bürger A, Zerle J, Kloos K, Hafen U, et al. Expression Analysis of Lrrk1, Lrrk2 and Lrrk2 Splice Variants in Mice. *PLOS ONE*. 2013;8(5):e63778.
162. Chia R, Haddock S, Beilina A, Rudenko IN, Mamais A, Kaganovich A, et al. Phosphorylation of LRRK2 by casein kinase 1 α regulates trans-Golgi clustering via differential interaction with ARHGEF7. *Nat Commun*. 2014;5:5827.
163. Tsika E, Moore DJ. Mechanisms of LRRK2-Mediated Neurodegeneration. *Current Neurology and Neuroscience Reports*. 2012;12(3):251-60.
164. Marchand A, Drouyer M, Sarchione A, Chartier-Harlin MC, Taymans JM. LRRK2 Phosphorylation, More Than an Epiphenomenon. *Front Neurosci*. 2020;14:527.
165. Marchand A, Sarchione A, Athanopoulos PS, Roy HB, Goveas L, Magnez R, et al. A Phosphosite Mutant Approach on LRRK2 Links Phosphorylation and Dephosphorylation to Protective and Deleterious Markers, Respectively. *Cells*. 2022;11(6).
166. Berger Z, Smith KA, Lavoie MJ. Membrane localization of LRRK2 is associated with increased formation of the highly active LRRK2 dimer and changes in its phosphorylation. *Biochemistry*. 2010;49(26):5511-23.
167. Sheng Z, Zhang S, Bustos D, Kleinheinz T, Le Pichon CE, Dominguez SL, et al. Ser1292 autophosphorylation is an indicator of LRRK2 kinase activity and contributes to the cellular effects of PD mutations. *Sci Transl Med*. 4. United States 2012. p. 164ra1.

168. Bernal-Conde LD, Ramos-Acevedo R, Reyes-Hernández MA, Balbuena-Olvera AJ, Morales-Moreno ID, Argüero-Sánchez R, et al. Alpha-Synuclein Physiology and Pathology: A Perspective on Cellular Structures and Organelles. *Front Neurosci.* 2019;13:1399.
169. Webber PJ, Smith AD, Sen S, Renfrow MB, Mobley JA, West AB. Autophosphorylation in the leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) GTPase domain modifies kinase and GTP-binding activities. *J Mol Biol.* 2011;412(1):94-110.
170. Kamikawaji S, Ito G, Sano T, Iwatsubo T. Differential effects of familial parkinson mutations in LRRK2 revealed by a systematic analysis of autophosphorylation. *Biochemistry.* 2013;52(35):6052-62.
171. Nichols RJ, Dzamko N, Morrice NA, Campbell DG, Deak M, Ordureau A, et al. 14-3-3 binding to LRRK2 is disrupted by multiple Parkinson's disease-associated mutations and regulates cytoplasmic localization. *Biochem J.* 2010;430(3):393-404.
172. Dzamko N, Deak M, Hentati F, Reith AD, Prescott AR, Alessi DR, et al. Inhibition of LRRK2 kinase activity leads to dephosphorylation of Ser(910)/Ser(935), disruption of 14-3-3 binding and altered cytoplasmic localization. *Biochem J.* 2010;430(3):405-13.
173. Mamais A, Chia R, Beilina A, Hauser DN, Hall C, Lewis PA, et al. Arsenite stress down-regulates phosphorylation and 14-3-3 binding of leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2), promoting self-association and cellular redistribution. *J Biol Chem.* 2014;289(31):21386-400.
174. Dzamko N, Inesta-Vaquera F, Zhang J, Xie C, Cai H, Arthur S, et al. The IkappaB kinase family phosphorylates the Parkinson's disease kinase LRRK2 at Ser935 and Ser910 during Toll-like receptor signaling. *PLoS One.* 2012;7(6):e39132.
175. Lobbestael E, Zhao J, Rudenko IN, Beylina A, Gao F, Wetter J, et al. Identification of protein phosphatase 1 as a regulator of the LRRK2 phosphorylation cycle. *Biochem J.* 2013;456(1):119-28.
176. Gotthardt K, Weyand M, Kortholt A, Van Haastert PJ, Wittinghofer A. Structure of the Roc-COR domain tandem of *C. tepidum*, a prokaryotic homologue of the human LRRK2 Parkinson kinase. *EMBO J.* 2008;27(16):2239-49.
177. Wittinghofer A, Vetter IR. Structure-function relationships of the G domain, a canonical switch motif. *Annu Rev Biochem.* 2011;80:943-71.
178. Gómez-Suaga P, Fdez E, Fernández B, Martínez-Salvador M, Blanca Ramírez M, Madero-Pérez J, et al. Novel insights into the neurobiology underlying LRRK2-linked Parkinson's disease. *Neuropharmacology.* 85. England: © 2014 Elsevier Ltd; 2014. p. 45-56.
179. Sheng Z, Zhang S, Bustos D, Kleinheinz T, Le Pichon CE, Dominguez SL, et al. Ser1292 Autophosphorylation Is an Indicator of LRRK2 Kinase Activity and Contributes to the Cellular Effects of PD Mutations. *Sci Transl Med.* 2012;4(164):164ra1-ra1.

180. Chen CY, Weng YH, Chien KY, Lin KJ, Yeh TH, Cheng YP, et al. (G2019S) LRRK2 activates MKK4-JNK pathway and causes degeneration of SN dopaminergic neurons in a transgenic mouse model of PD. *Cell Death Differ.* 2012;19(10):1623-33.
181. Jaleel M, Nichols RJ, Deak M, Campbell DG, Gillardon F, Knebel A, et al. LRRK2 phosphorylates moesin at threonine-558: characterization of how Parkinson's disease mutants affect kinase activity. *Biochem J.* 2007;405(2):307-17.
182. Gillardon F. Leucine-rich repeat kinase 2 phosphorylates brain tubulin-beta isoforms and modulates microtubule stability – a point of convergence in Parkinsonian neurodegeneration? *Journal of Neurochemistry.* 2009;110(5):1514-22.
183. Ohta E, Kawakami F, Kubo M, Obata F. LRRK2 directly phosphorylates Akt1 as a possible physiological substrate: impairment of the kinase activity by Parkinson's disease-associated mutations. *FEBS Lett.* 2011;585(14):2165-70.
184. Kanao T, Venderova K, Park DS, Unterman T, Lu B, Imai Y. Activation of FoxO by LRRK2 induces expression of proapoptotic proteins and alters survival of postmitotic dopaminergic neuron in *Drosophila*. *Hum Mol Genet.* 19. England2010. p. 3747-58.
185. Kawakami F, Yabata T, Ohta E, Maekawa T, Shimada N, Suzuki M, et al. LRRK2 phosphorylates tubulin-associated tau but not the free molecule: LRRK2-mediated regulation of the tau-tubulin association and neurite outgrowth. *PLoS One.* 2012;7(1):e30834.
186. Bailey RM, Covy JP, Melrose HL, Rousseau L, Watkinson R, Knight J, et al. LRRK2 phosphorylates novel tau epitopes and promotes tauopathy. *Acta Neuropathol.* 2013;126(6):809-27.
187. Gehrke S, Imai Y, Sokol N, Lu B. Pathogenic LRRK2 negatively regulates microRNA-mediated translational repression. *Nature.* 2010;466(7306):637-41.
188. Trancikova A, Mamais A, Webber PJ, Stafa K, Tsika E, Glauser L, et al. Phosphorylation of 4E-BP1 in the Mammalian Brain Is Not Altered by LRRK2 Expression or Pathogenic Mutations. *PLOS ONE.* 2012;7(10):e47784.
189. Stafa K, Trancikova A, Webber PJ, Glauser L, West AB, Moore DJ. GTPase activity and neuronal toxicity of Parkinson's disease-associated LRRK2 is regulated by ArfGAP1. *PLoS Genet.* 2012;8(2):e1002526.
190. Xiong Y, Yuan C, Chen R, Dawson TM, Dawson VL. ArfGAP1 is a GTPase activating protein for LRRK2: reciprocal regulation of ArfGAP1 by LRRK2. *J Neurosci.* 2012;32(11):3877-86.
191. Qing H, Wong W, McGeer EG, McGeer PL. Lrrk2 phosphorylates alpha synuclein at serine 129: Parkinson disease implications. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;387(1):149-52.
192. Yun HJ, Park J, Ho DH, Kim H, Kim CH, Oh H, et al. LRRK2 phosphorylates Snapin and inhibits interaction of Snapin with SNAP-25. *Exp Mol Med.* 2013;45(8):e36.
193. Matta S, Van Kolen K, da Cunha R, van den Bogaart G, Mandemakers W, Miskiewicz K, et al. LRRK2 controls an EndoA phosphorylation cycle in synaptic endocytosis. *Neuron.* 2012;75(6):1008-21.

194. Ho DH, Kim H, Kim J, Sim H, Ahn H, Seo H, et al. Leucine-Rich Repeat Kinase 2 (LRRK2) phosphorylates p53 and induces p21(WAF1/CIP1) expression. *Mol Brain*. 2015;8:54.
195. Boecker CA, Goldsmith J, Dou D, Cajka GG, Holzbaur ELF. Increased LRRK2 kinase activity alters neuronal autophagy by disrupting the axonal transport of autophagosomes. *Curr Biol*. 2021;31(10):2140-54.e6.
196. Law BM, Spain VA, Leinster VH, Chia R, Beilina A, Cho HJ, et al. A direct interaction between leucine-rich repeat kinase 2 and specific β -tubulin isoforms regulates tubulin acetylation. *J Biol Chem*. 2014;289(2):895-908.
197. Li JQ, Tan L, Yu JT. The role of the LRRK2 gene in Parkinsonism. *Mol Neurodegener*. 2014;9:47.
198. Esteves AR, Swerdlow RH, Cardoso SM. LRRK2, a puzzling protein: insights into Parkinson's disease pathogenesis. *Experimental neurology*. 2014;261:206-16.
199. Tran J, Anastacio H, Bardy C. Genetic predispositions of Parkinson's disease revealed in patient-derived brain cells. *npj Parkinson's Disease*. 2020;6(1):8.
200. Müller-Nedebock AC, Dekker MCJ, Farrer MJ, Hattori N, Lim S-Y, Mellick GD, et al. Different pieces of the same puzzle: a multifaceted perspective on the complex biological basis of Parkinson's disease. *npj Parkinson's Disease*. 2023;9(1):110.
201. Berwick DC, Heaton GR, Azeggagh S, Harvey K. LRRK2 Biology from structure to dysfunction: research progresses, but the themes remain the same. *Molecular Neurodegeneration*. 2019;14(1):49.
202. Ren C, Ding Y, Wei S, Guan L, Zhang C, Ji Y, et al. G2019S Variation in LRRK2: An Ideal Model for the Study of Parkinson's Disease? *Front Hum Neurosci*. 2019;13:306.
203. Hur EM, Lee BD. LRRK2 at the Crossroad of Aging and Parkinson's Disease. *Genes (Basel)*. 2021;12(4).
204. Shu L, Zhang Y, Sun Q, Pan H, Tang B. A Comprehensive Analysis of Population Differences in LRRK2 Variant Distribution in Parkinson's Disease. *Front Aging Neurosci*. 2019;11:13.
205. Hulihan MM, Ishihara-Paul L, Kachergus J, Warren L, Amouri R, Elango R, et al. LRRK2 Gly2019Ser penetrance in Arab-Berber patients from Tunisia: a case-control genetic study. *The Lancet Neurology*. 2008;7(7):591-4.
206. Albanese F, Mercatelli D, Finetti L, Lamonaca G, Pizzi S, Shimshek DR, et al. Constitutive silencing of LRRK2 kinase activity leads to early glucocerebrosidase deregulation and late impairment of autophagy in vivo. *Neurobiol Dis*. 2021;159:105487.
207. Huang G, Bloodgood DW, Kang J, Shahapal A, Chen P, Kaganovsky K, et al. Motor Impairments and Dopaminergic Defects Caused by Loss of Leucine-Rich Repeat Kinase Function in Mice. *J Neurosci*. 2022;42(23):4755-65.

208. Blauwendraat C, Reed X, Kia DA, Gan-Or Z, Lesage S, Pihlstrøm L, et al. Frequency of Loss of Function Variants in LRRK2 in Parkinson Disease. *JAMA Neurol.* 2018;75(11):1416-22.
209. Strioga M, Viswanathan S, Darinskas A, Slaby O, Michalek J. Same or not the same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells. *Stem Cells Dev.* 2012;21(14):2724-52.
210. Ravinther AI, Dewadas HD, Tong SR, Foo CN, Lin Y-E, Chien C-T, et al. Molecular Pathways Involved in LRRK2-Linked Parkinson's Disease: A Systematic Review. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. 2022; 23(19).
211. Tong Y, Pisani A, Martella G, Karouani M, Yamaguchi H, Pothos EN, et al. R1441C mutation in LRRK2 impairs dopaminergic neurotransmission in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(34):14622-7.
212. Martí-Massó JF, Ruiz-Martínez J, Bolaño MJ, Ruiz I, Gorostidi A, Moreno F, et al. Neuropathology of Parkinson's disease with the R1441G mutation in LRRK2. *Mov Disord.* 2009;24(13):1998-2001.
213. Ross OA, Spanaki C, Griffith A, Lin CH, Kachergus J, Haugarvoll K, et al. Haplotype analysis of Lrrk2 R1441H carriers with parkinsonism. *Parkinsonism Relat Disord.* 2009;15(6):466-7.
214. Zhang Z, Burgunder JM, An X, Wu Y, Chen W, Zhang J, et al. LRRK2 R1628P variant is a risk factor of Parkinson's disease among Han-Chinese from mainland China. *Mov Disord.* 2009;24(13):1902-5.
215. Daniëls V, Vancraenenbroeck R, Law BM, Greggio E, Lobbestael E, Gao F, et al. Insight into the mode of action of the LRRK2 Y1699C pathogenic mutant. *J Neurochem.* 2011;116(2):304-15.
216. Trinh J, Amouri R, Duda JE, Morley JF, Read M, Donald A, et al. Comparative study of Parkinson's disease and leucine-rich repeat kinase 2 p.G2019S parkinsonism. *Neurobiol Aging.* 2014;35(5):1125-31.
217. Gatto EM, Parisi V, Converso DP, Poderoso JJ, Carreras MC, Martí-Massó JF, et al. The LRRK2 G2019S mutation in a series of Argentinean patients with Parkinson's disease: clinical and demographic characteristics. *Neurosci Lett.* 2013;537:1-5.
218. Healy DG, Falchi M, O'Sullivan SS, Bonifati V, Durr A, Bressman S, et al. Phenotype, genotype, and worldwide genetic penetrance of LRRK2-associated Parkinson's disease: a case-control study. *Lancet Neurol.* 2008;7(7):583-90.
219. Hasegawa K, Stoessel AJ, Yokoyama T, Kowa H, Wszolek ZK, Yagishita S. Familial parkinsonism: study of original Sagamiyama PARK8 (I2020T) kindred with variable clinicopathologic outcomes. *Parkinsonism Relat Disord.* 2009;15(4):300-6.
220. Di Fonzo A, Tassorelli C, De Mari M, Chien HF, Ferreira J, Rohé CF, et al. Comprehensive analysis of the LRRK2 gene in sixty families with Parkinson's disease. *Eur J Hum Genet.* 2006;14(3):322-31.

221. Mata IF, Wilhoite GJ, Yearout D, Bacon JA, Cornejo-Olivas M, Mazzetti P, et al. Lrrk2 p.Q1111H substitution and Parkinson's disease in Latin America. *Parkinsonism Relat Disord.* 2011;17(8):629-31.
222. Satake W, Nakabayashi Y, Mizuta I, Hirota Y, Ito C, Kubo M, et al. Genome-wide association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson's disease. *Nat Genet.* 41. United States2009. p. 1303-7.
223. Simón-Sánchez J, Schulte C, Bras JM, Sharma M, Gibbs JR, Berg D, et al. Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease. *Nat Genet.* 2009;41(12):1308-12.
224. Hsieh CH, Shaltouki A, Gonzalez AE, Bettencourt da Cruz A, Burbulla LF, St Lawrence E, et al. Functional Impairment in Miro Degradation and Mitophagy Is a Shared Feature in Familial and Sporadic Parkinson's Disease. *Cell Stem Cell.* 2016;19(6):709-24.
225. Wang X, Yan MH, Fujioka H, Liu J, Wilson-Delfosse A, Chen SG, et al. LRRK2 regulates mitochondrial dynamics and function through direct interaction with DLP1. *Hum Mol Genet.* 2012;21(9):1931-44.
226. Wang X, Petrie TG, Liu Y, Liu J, Fujioka H, Zhu X. Parkinson's disease-associated DJ-1 mutations impair mitochondrial dynamics and cause mitochondrial dysfunction. *J Neurochem.* 2012;121(5):830-9.
227. Rostovtseva TK, Gurnev PA, Protchenko O, Hoogerheide DP, Yap TL, Philpott CC, et al. α -Synuclein Shows High Affinity Interaction with Voltage-dependent Anion Channel, Suggesting Mechanisms of Mitochondrial Regulation and Toxicity in Parkinson Disease. *J Biol Chem.* 2015;290(30):18467-77.
228. Kamp F, Exner N, Lutz AK, Wender N, Hegermann J, Brunner B, et al. Inhibition of mitochondrial fusion by α -synuclein is rescued by PINK1, Parkin and DJ-1. *Embo j.* 2010;29(20):3571-89.
229. Conway KA, Rochet JC, Bieganski RM, Lansbury PT, Jr. Kinetic stabilization of the alpha-synuclein protofibril by a dopamine-alpha-synuclein adduct. *Science.* 294. United States2001. p. 1346-9.
230. Chung KK, Thomas B, Li X, Pletnikova O, Troncoso JC, Marsh L, et al. S-nitrosylation of parkin regulates ubiquitination and compromises parkin's protective function. *Science.* 2004;304(5675):1328-31.
231. Yao D, Gu Z, Nakamura T, Shi ZQ, Ma Y, Gaston B, et al. Nitrosative stress linked to sporadic Parkinson's disease: S-nitrosylation of parkin regulates its E3 ubiquitin ligase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(29):10810-4.
232. Choi J, Sullards MC, Olzmann JA, Rees HD, Weintraub ST, Bostwick DE, et al. Oxidative damage of DJ-1 is linked to sporadic Parkinson and Alzheimer diseases. *J Biol Chem.* 2006;281(16):10816-24.
233. Li W, Fu Y, Halliday GM, Sue CM. PARK Genes Link Mitochondrial Dysfunction and Alpha-Synuclein Pathology in Sporadic Parkinson's Disease. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:612476.

234. Mortiboys H, Johansen KK, Aasly JO, Bandmann O. Mitochondrial impairment in patients with Parkinson disease with the G2019S mutation in LRRK2. *Neurology*. 75. United States 2010. p. 2017-20.
235. Mendivil-Perez M, Velez-Pardo C, Jimenez-Del-Rio M. Neuroprotective Effect of the LRRK2 Kinase Inhibitor PF-06447475 in Human Nerve-Like Differentiated Cells Exposed to Oxidative Stress Stimuli: Implications for Parkinson's Disease. *Neurochemical Research*. 2016;41(10):2675-92.
236. Niu J, Yu M, Wang C, Xu Z. Leucine-rich repeat kinase 2 disturbs mitochondrial dynamics via Dynamin-like protein. *J Neurochem*. 2012;122(3):650-8.
237. Su YC, Qi X. Inhibition of excessive mitochondrial fission reduced aberrant autophagy and neuronal damage caused by LRRK2 G2019S mutation. *Hum Mol Genet*. 2013;22(22):4545-61.
238. Wauters F, Cornelissen T, Imberechts D, Martin S, Koentjoro B, Sue C, et al. LRRK2 mutations impair depolarization-induced mitophagy through inhibition of mitochondrial accumulation of RAB10. *Autophagy*. 2020;16(2):203-22.
239. Franco R, Schoneveld OJ, Pappa A, Panayiotidis MI. The central role of glutathione in the pathophysiology of human diseases. *Arch Physiol Biochem*. 2007;113(4-5):234-58.
240. Ryter SW, Kim HP, Hoetzel A, Park JW, Nakahira K, Wang X, et al. Mechanisms of cell death in oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*. 2007;9(1):49-89.
241. Fu Y, He Y, Phan K, Bhatia S, Pickford R, Wu P, et al. Increased unsaturated lipids underlie lipid peroxidation in synucleinopathy brain. *Acta Neuropathologica Communications*. 2022;10(1):165.
242. Chiaradia E, Renzone G, Scaloni A, Caputo M, Costanzi E, Gambelunghe A, et al. Protein carbonylation in dopaminergic cells exposed to rotenone. *Toxicology letters*. 2019;309:20-32.
243. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, et al. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:8416763.
244. Henrich MT, Oertel WH, Surmeier DJ, Geibl FF. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease – a key disease hallmark with therapeutic potential. *Molecular Neurodegeneration*. 2023;18(1):83.
245. Nguyen HN, Byers B, Cord B, Shcheglovitov A, Byrne J, Gujar P, et al. LRRK2 mutant iPSC-derived DA neurons demonstrate increased susceptibility to oxidative stress. *Cell Stem Cell*. 2011;8(3):267-80.
246. Angeles DC, Gan BH, Onstead L, Zhao Y, Lim KL, Dachsel J, et al. Mutations in LRRK2 increase phosphorylation of peroxiredoxin 3 exacerbating oxidative stress-induced neuronal death. *Hum Mutat*. 2011;32(12):1390-7.
247. Saha S, Guillily MD, Ferree A, Lanceta J, Chan D, Ghosh J, et al. LRRK2 modulates vulnerability to mitochondrial dysfunction in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci*. 2009;29(29):9210-8.

248. Nalls MA, Pankratz N, Lill CM, Do CB, Hernandez DG, Saad M, et al. Large-scale meta-analysis of genome-wide association data identifies six new risk loci for Parkinson's disease. *Nat Genet.* 2014;46(9):989-93.
249. Hernandez DG, Reed X, Singleton AB. Genetics in Parkinson disease: Mendelian versus non-Mendelian inheritance. *J Neurochem.* 2016;139 Suppl 1(Suppl 1):59-74.
250. Paisán-Ruiz C, Lewis PA, Singleton AB. LRRK2: cause, risk, and mechanism. *Journal of Parkinson's disease.* 2013;3(2):85-103.
251. Zimprich A, Biskup S, Leitner P, Lichtner P, Farrer M, Lincoln S, et al. Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron.* 2004;44(4):601-7.
252. Ross OA, Toft M, Whittle AJ, Johnson JL, Papapetropoulos S, Mash DC, et al. Lrrk2 and Lewy body disease. *Annals of Neurology.* 2006;59(2):388-93.
253. Lin X, Parisiadou L, Gu XL, Wang L, Shim H, Sun L, et al. Leucine-rich repeat kinase 2 regulates the progression of neuropathology induced by Parkinson's-disease-related mutant alpha-synuclein. *Neuron.* 2009;64(6):807-27.
254. Daher JP, Volpicelli-Daley LA, Blackburn JP, Moehle MS, West AB. Abrogation of α -synuclein-mediated dopaminergic neurodegeneration in LRRK2-deficient rats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(25):9289-94.
255. Daher JP, Abdelmotilib HA, Hu X, Volpicelli-Daley LA, Moehle MS, Fraser KB, et al. Leucine-rich Repeat Kinase 2 (LRRK2) Pharmacological Inhibition Abates α -Synuclein Gene-induced Neurodegeneration. *J Biol Chem.* 2015;290(32):19433-44.
256. Dues DJ, Moore DJ. LRRK2 and Protein Aggregation in Parkinson's Disease: Insights From Animal Models. *Front Neurosci.* 2020;14:719.
257. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972;26(4):239-57.
258. Fadeel B, Orrenius S. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *Journal of Internal Medicine.* 2005;258(6):479-517.
259. Nössing C, Ryan KM. 50 years on and still very much alive: 'Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics'. *British Journal of Cancer.* 2023;128(3):426-31.
260. Bock FJ, Tait SWG. Mitochondria as multifaceted regulators of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020;21(2):85-100.
261. Bholra PD, Letai A. Mitochondria-Judges and Executioners of Cell Death Sentences. *Mol Cell.* 2016;61(5):695-704.
262. Lovell JF, Billen LP, Bindner S, Shamas-Din A, Fradin C, Leber B, et al. Membrane binding by tBid initiates an ordered series of events culminating in membrane permeabilization by Bax. *Cell.* 2008;135(6):1074-84.
263. Green DR. Caspases and Their Substrates. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2022;14(3).
264. Venderova K, Park DS. Programmed cell death in Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2(8).

265. Kalivendi SV, Kotamraju S, Cunningham S, Shang T, Hillard CJ, Kalyanaraman B. 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺)-induced apoptosis and mitochondrial oxidant generation: role of transferrin-receptor-dependent iron and hydrogen peroxide. *Biochem J*. 2003;371(Pt 1):151-64.
266. Hartmann A, Hunot S, Michel PP, Muriel MP, Vyas S, Faucheux BA, et al. Caspase-3: A vulnerability factor and final effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(6):2875-80.
267. Tarze A, Deniaud A, Le Bras M, Maillier E, Molle D, Larochette N, et al. GAPDH, a novel regulator of the pro-apoptotic mitochondrial membrane permeabilization. *Oncogene*. 2007;26(18):2606-20.
268. Tatton NA. Increased caspase 3 and Bax immunoreactivity accompany nuclear GAPDH translocation and neuronal apoptosis in Parkinson's disease. *Experimental neurology*. 2000;166(1):29-43.
269. Ortega-Arellano HF, Jimenez-Del-Rio M, Velez-Pardo C. Dmp53, basket and drICE gene knockdown and polyphenol gallic acid increase life span and locomotor activity in a Drosophila Parkinson's disease model. *Genet Mol Biol*. 2013;36(4):608-15.
270. Jimenez-Del-Rio M, Velez-Pardo C. The bad, the good, and the ugly about oxidative stress. *Oxid Med Cell Longev*. 2012;2012:163913.
271. Iaccarino C, Crosio C, Vitale C, Sanna G, Carrì MT, Barone P. Apoptotic mechanisms in mutant LRRK2-mediated cell death. *Hum Mol Genet*. 16. England2007. p. 1319-26.
272. Heo HY, Park JM, Kim CH, Han BS, Kim KS, Seol W. LRRK2 enhances oxidative stress-induced neurotoxicity via its kinase activity. *Exp Cell Res*. 316. United States: 2009 Elsevier Inc; 2010. p. 649-56.
273. Yoon JH, Mo JS, Kim MY, Ann EJ, Ahn JS, Jo EH, et al. LRRK2 functions as a scaffolding kinase of ASK1-mediated neuronal cell death. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2017;1864(12):2356-68.
274. Park H, Kang J-H, Lee S. Autophagy in Neurodegenerative Diseases: A Hunter for Aggregates. *International Journal of Molecular Sciences [Internet]*. 2020; 21(9).
275. Klionsky DJ. The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *J Cell Sci*. 2005;118(Pt 1):7-18.
276. Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol*. 2011;13(2):132-41.
277. Martens S, Nakamura S, Yoshimori T. Phospholipids in Autophagosome Formation and Fusion. *J Mol Biol*. 2016;428(24 Pt A):4819-27.
278. Okamoto K, Kondo-Okamoto N, Ohsumi Y. Mitochondria-anchored receptor Atg32 mediates degradation of mitochondria via selective autophagy. *Dev Cell*. 2009;17(1):87-97.
279. Shintani T, Huang WP, Stromhaug PE, Klionsky DJ. Mechanism of cargo selection in the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *Dev Cell*. 2002;3(6):825-37.

280. Conway O, Akpinar HA, Rogov VV, Kirkin V. Selective Autophagy Receptors in Neuronal Health and Disease. *Journal of Molecular Biology*. 2020;432(8):2483-509.
281. Majeski AE, Dice JF. Mechanisms of chaperone-mediated autophagy. *Int J Biochem Cell Biol*. 36. Netherlands2004. p. 2435-44.
282. Kunz JB, Schwarz H, Mayer A. Determination of four sequential stages during microautophagy in vitro. *J Biol Chem*. 2004;279(11):9987-96.
283. Kanki T, Wang K, Cao Y, Baba M, Klionsky DJ. Atg32 is a mitochondrial protein that confers selectivity during mitophagy. *Dev Cell*. 2009;17(1):98-109.
284. Hou X, Watzlawik JO, Fiesel FC, Springer W.
285. Wang Y, Martinez-Vicente M, Krüger U, Kaushik S, Wong E, Mandelkow EM, et al. Tau fragmentation, aggregation and clearance: the dual role of lysosomal processing. *Hum Mol Genet*. 2009;18(21):4153-70.
286. Moors T, Paciotti S, Chiasserini D, Calabresi P, Parnetti L, Beccari T, et al. Lysosomal Dysfunction and α -Synuclein Aggregation in Parkinson's Disease: Diagnostic Links. *Mov Disord*. 2016;31(6):791-801.
287. Ryan BJ, Hoek S, Fon EA, Wade-Martins R. Mitochondrial dysfunction and mitophagy in Parkinson's: from familial to sporadic disease. *Trends Biochem Sci*. 2015;40(4):200-10.
288. Xilouri M, Brekk OR, Stefanis L. Autophagy and Alpha-Synuclein: Relevance to Parkinson's Disease and Related Synucleopathies. *Mov Disord*. 2016;31(2):178-92.
289. Caballero B, Wang Y, Diaz A, Tasset I, Juste YR, Stiller B, et al. Interplay of pathogenic forms of human tau with different autophagic pathways. *Aging Cell*. 2018;17(1).
290. Hoffmann A-C, Minakaki G, Menges S, Salvi R, Savitskiy S, Kazman A, et al. Extracellular aggregated alpha synuclein primarily triggers lysosomal dysfunction in neural cells prevented by trehalose. *Scientific Reports*. 2019;9(1):544.
291. Haddad D, Nakamura K. Understanding the susceptibility of dopamine neurons to mitochondrial stressors in Parkinson's disease. *FEBS Lett*. 2015;589(24 Pt A):3702-13.
292. Malpartida AB, Williamson M, Narendra DP, Wade-Martins R, Ryan BJ. Mitochondrial Dysfunction and Mitophagy in Parkinson's Disease: From Mechanism to Therapy. *Trends Biochem Sci*. 2021;46(4):329-43.
293. Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, Outzen H, et al. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem*. 2007;282(33):24131-45.
294. Zaffagnini G, Savova A, Danieli A, Romanov J, Tremel S, Ebner M, et al. p62 filaments capture and present ubiquitinated cargos for autophagy. *The EMBO Journal*. 2018;37(5):e98308.
295. Alegre-Abarrategui J, Christian H, Lufino MM, Mutihac R, Venda LL, Ansoorge O, et al. LRRK2 regulates autophagic activity and localizes to specific membrane

- microdomains in a novel human genomic reporter cellular model. *Hum Mol Genet.* 2009;18(21):4022-34.
296. Tong Y, Yamaguchi H, Giaime E, Boyle S, Kopan R, Kelleher RJ, 3rd, et al. Loss of leucine-rich repeat kinase 2 causes impairment of protein degradation pathways, accumulation of alpha-synuclein, and apoptotic cell death in aged mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(21):9879-84.
297. Eguchi T, Kuwahara T, Sakurai M, Komori T, Fujimoto T, Ito G, et al.
298. Bae EJ, Kim DK, Kim C, Mante M, Adame A, Rockenstein E, et al. LRRK2 kinase regulates α -synuclein propagation via RAB35 phosphorylation. *Nat Commun.* 2018;9(1):3465.
299. Yue M, Hinkle KM, Davies P, Trushina E, Fiesel FC, Christenson TA, et al. Progressive dopaminergic alterations and mitochondrial abnormalities in LRRK2 G2019S knock-in mice. *Neurobiol Dis.* 2015;78:172-95.
300. Plowey ED, Cherra SJ, 3rd, Liu YJ, Chu CT. Role of autophagy in G2019S-LRRK2-associated neurite shortening in differentiated SH-SY5Y cells. *J Neurochem.* 2008;105(3):1048-56.
301. Bravo-San Pedro JM, Niso-Santano M, Gómez-Sánchez R, Pizarro-Estrella E, Aiastui-Pujana A, Gorostidi A, et al. The LRRK2 G2019S mutant exacerbates basal autophagy through activation of the MEK/ERK pathway. *Cell Mol Life Sci.* 2013;70(1):121-36.
302. Orenstein SJ, Kuo SH, Tasset I, Arias E, Koga H, Fernandez-Carasa I, et al. Interplay of LRRK2 with chaperone-mediated autophagy. *Nat Neurosci.* 2013;16(4):394-406.
303. Ho PW, Leung CT, Liu H, Pang SY, Lam CS, Xian J, et al. Age-dependent accumulation of oligomeric SNCA/ α -synuclein from impaired degradation in mutant LRRK2 knockin mouse model of Parkinson disease: role for therapeutic activation of chaperone-mediated autophagy (CMA). *Autophagy.* 2020;16(2):347-70.
304. Elkouzi A, Vedam-Mai V, Eisinger RS, Okun MS. Emerging therapies in Parkinson disease - repurposed drugs and new approaches. *Nat Rev Neurol.* 2019;15(4):204-23.
305. Barbagallo G, Quattrone A. Does levodopa have a disease-modifying effect in Parkinson's disease? Evidence from a delayed-start trial. *Mov Disord.* 2019;34(6):820.
306. Fox SH, Katzenschlager R, Lim SY, Barton B, de Bie RMA, Seppi K, et al. International Parkinson and movement disorder society evidence-based medicine review: Update on treatments for the motor symptoms of Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2018;33(8):1248-66.
307. Schapira AH. Monoamine oxidase B inhibitors for the treatment of Parkinson's disease: a review of symptomatic and potential disease-modifying effects. *CNS Drugs.* 2011;25(12):1061-71.
308. Ogungbenro K, Pertinez H, Aarons L. Empirical and semi-mechanistic modelling of double-peaked pharmacokinetic profile phenomenon due to gastric emptying. *AAPS J.* 2015;17(1):227-36.

309. Stathis P, Konitsiotis S, Antonini A. Dopamine agonists early monotherapy for the delay of development of levodopa-induced dyskinesias. *Expert Rev Neurother.* 2015;15(2):207-13.
310. Blandini F, Armentero MT. Dopamine receptor agonists for Parkinson's disease. *Expert Opin Investig Drugs.* 2014;23(3):387-410.
311. LeWitt PA. Dopaminergic Agonists in Parkinson's Disease. In: Kompoliti K, Metman LV, editors. *Encyclopedia of Movement Disorders.* Oxford: Academic Press; 2010. p. 332-7.
312. Cacabelos R. Parkinson's Disease: From Pathogenesis to Pharmacogenomics. *Int J Mol Sci.* 2017;18(3).
313. Obergasteiger J, Frapporti G, Lamonaca G, Pizzi S, Picard A, Lavdas AA, et al. Kinase inhibition of G2019S-LRRK2 enhances autolysosome formation and function to reduce endogenous alpha-synuclein intracellular inclusions. *Cell Death Discovery.* 2020;6(1):45.
314. Ferguson FM, Gray NS. Kinase inhibitors: the road ahead. *Nat Rev Drug Discov.* 2018;17(5):353-77.
315. Garofalo AW, Bright J, De Lombaert S, Toda AMA, Zobel K, Andreotti D, et al. Selective Inhibitors of G2019S-LRRK2 Kinase Activity. *J Med Chem.* 2020;63(23):14821-39.
316. Hu J, Zhang D, Tian K, Ren C, Li H, Lin C, et al. Small-molecule LRRK2 inhibitors for PD therapy: Current achievements and future perspectives. *Eur J Med Chem.* 2023;256:115475.
317. Wojewska DN, Kortholt A. LRRK2 Targeting Strategies as Potential Treatment of Parkinson's Disease. *Biomolecules.* 2021;11(8).
318. Fell MJ, Mirescu C, Basu K, Cheewatrakoolpong B, DeMong DE, Ellis JM, et al. MLi-2, a Potent, Selective, and Centrally Active Compound for Exploring the Therapeutic Potential and Safety of LRRK2 Kinase Inhibition. *J Pharmacol Exp Ther.* 2015;355(3):397-409.
319. Scott JD, DeMong DE, Greshock TJ, Basu K, Dai X, Harris J, et al. Discovery of a 3-(4-Pyrimidinyl) Indazole (MLi-2), an Orally Available and Selective Leucine-Rich Repeat Kinase 2 (LRRK2) Inhibitor that Reduces Brain Kinase Activity. *J Med Chem.* 2017;60(7):2983-92.
320. Henderson JL, Kormos BL, Hayward MM, Coffman KJ, Jasti J, Kurumbail RG, et al. Discovery and Preclinical Profiling of 3-[4-(Morpholin-4-yl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-5-yl]benzotrile (PF-06447475), a Highly Potent, Selective, Brain Penetrant, and in Vivo Active LRRK2 Kinase Inhibitor. *Journal of Medicinal Chemistry.* 2015;58(1):419-32.
321. Andersen MA, Wegener KM, Larsen S, Badolo L, Smith GP, Jeggo R, et al. PFE-360-induced LRRK2 inhibition induces reversible, non-adverse renal changes in rats. *Toxicology.* 2018;395:15-22.

322. Estrada AA, Chan BK, Baker-Glenn C, Beresford A, Burdick DJ, Chambers M, et al. Discovery of highly potent, selective, and brain-penetrant aminopyrazole leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) small molecule inhibitors. *J Med Chem*. 2014;57(3):921-36.
323. Estrada AA, Liu X, Baker-Glenn C, Beresford A, Burdick DJ, Chambers M, et al. Discovery of Highly Potent, Selective, and Brain-Penetrable Leucine-Rich Repeat Kinase 2 (LRRK2) Small Molecule Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2012;55(22):9416-33.
324. Reith AD, Bamborough P, Jandu K, Andreotti D, Mensah L, Dossang P, et al. GSK2578215A; a potent and highly selective 2-arylmethoxy-5-substituent-N-arylbenzamide LRRK2 kinase inhibitor. *Bioorg Med Chem Lett*. 2012;22(17):5625-9.
325. Choi HG, Zhang J, Deng X, Hatcher JM, Patricelli MP, Zhao Z, et al. Brain Penetrant LRRK2 Inhibitor. *ACS Med Chem Lett*. 2012;3(8):658-62.
326. Deng X, Dzamko N, Prescott A, Davies P, Liu Q, Yang Q, et al. Characterization of a selective inhibitor of the Parkinson's disease kinase LRRK2. *Nat Chem Biol*. 2011;7(4):203-5.
327. Bhayye SS, Roy K, Saha A. Exploring structural requirement, pharmacophore modeling, and de novo design of LRRK2 inhibitors using homology modeling approach. *Medicinal Chemistry Research*. 2014;23(8):3705-13.
328. Chan BK, Estrada AA, Chen H, Atherall J, Baker-Glenn C, Beresford A, et al. Discovery of a Highly Selective, Brain-Penetrant Aminopyrazole LRRK2 Inhibitor. *ACS Med Chem Lett*. 2013;4(1):85-90.
329. Gao HM, Hong JS, Zhang W, Liu B. Distinct role for microglia in rotenone-induced degeneration of dopaminergic neurons. *J Neurosci*. 2002;22(3):782-90.
330. Williamson DS, Smith GP, Mikkelsen GK, Jensen T, Acheson-Dossang P, Badolo L, et al. Design and Synthesis of Pyrrolo[2,3-d]pyrimidine-Derived Leucine-Rich Repeat Kinase 2 (LRRK2) Inhibitors Using a Checkpoint Kinase 1 (CHK1)-Derived Crystallographic Surrogate. *J Med Chem*. 2021;64(14):10312-32.
331. Lang CA, Ray SS, Liu M, Singh AK, Cuny GD. Discovery of LRRK2 inhibitors using sequential in silico joint pharmacophore space (JPS) and ensemble docking. *Bioorg Med Chem Lett*. 2015;25(13):2713-9.
332. Mendes Filho D, Ribeiro PDC, Oliveira LF, de Paula DRM, Capuano V, de Assunção TSF, et al. Therapy With Mesenchymal Stem Cells in Parkinson Disease: History and Perspectives. *Neurologist*. 2018;23(4):141-7.
333. Saeedi P, Halabian R, Imani Fooladi AA. A revealing review of mesenchymal stem cells therapy, clinical perspectives and Modification strategies. *Stem Cell Investig*. 2019;6:34.
334. Wang F, Sun Z, Peng D, Gianchandani S, Le W, Boltze J, et al. Cell-therapy for Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Translational Medicine*. 2023;21(1):601.
335. Liu Z, Cheung HH. Stem Cell-Based Therapies for Parkinson Disease. *Int J Mol Sci*. 2020;21(21).

336. Turner L. ISSCR's Guidelines for Stem Cell Research and Clinical Translation: Supporting development of safe and efficacious stem cell-based interventions. *Stem Cell Reports*. 2021;16(6):1394-7.
337. Brott DA, Andersson HAS, Stewart J, Ewart L, Christoph G, Harleman J, et al. A peripherally restricted P2Y(12) receptor antagonist altered rat tumor incidences with no human relevance: Mode of action consistent with dopamine agonism. *Toxicol Rep*. 2014;1:1202-12.
338. Nikolova G, Karamalakova Y, Gadjeva V. Reducing oxidative toxicity of L-dopa in combination with two different antioxidants: an essential oil isolated from *Rosa Damascena* Mill., and vitamin C. *Toxicol Rep*. 2019;6:267-71.
339. Sharma R, Singla RK, Banerjee S, Sinha B, Shen B. Role of Shankpushpi (*Convolvulus pluricaulis*) in neurological disorders: An umbrella review covering evidence from ethnopharmacology to clinical studies. *Neurosci Biobehav Rev*. 2022;140:104795.
340. Gulcin İ. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Arch Toxicol*. 2020;94(3):651-715.
341. Percário S, da Silva Barbosa A, Varela ELP, Gomes ARQ, Ferreira MES, de Nazaré Araújo Moreira T, et al. Oxidative Stress in Parkinson's Disease: Potential Benefits of Antioxidant Supplementation. *Oxid Med Cell Longev*. 2020;2020:2360872.
342. Guo JD, Zhao X, Li Y, Li GR, Liu XL. Damage to dopaminergic neurons by oxidative stress in Parkinson's disease (Review). *Int J Mol Med*. 2018;41(4):1817-25.
343. Kryl'skii ED, Razuvaev GA, Potapova TN, Akinina AI, Nihaev LE. Correction to: Functioning of the Antioxidant Defense System in Rotenone-Induced Parkinson's Disease. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2021;172(1):111-.
344. Jimenez Del Rio M, Velez-Pardo C. 17 beta-estradiol protects lymphocytes against dopamine and iron-induced apoptosis by a genomic-independent mechanism. Implication in Parkinson's disease. *Gen Pharmacol*. 2000;35(1):1-9.
345. Jimenez-Del-Rio M, Suarez-Cedeño G, Velez-Pardo C. Using paraquat to generate anion free radicals and hydrogen peroxide in in vitro: Antioxidant effect of vitamin E: A procedure to teach theoretical and experimental principles of reactive oxygen species biochemistry. *Biochem Mol Biol Educ*. 2010;38(2):104-9.
346. Jimenez-Del-Rio M, Daza-Restrepo A, Velez-Pardo C. The cannabinoid CP55,940 prolongs survival and improves locomotor activity in *Drosophila melanogaster* against paraquat: Implications in Parkinson's disease. *Neuroscience Research*. 2008;61(4):404-11.
347. Velez-Pardo C, Jimenez-Del-Rio M, Lores-Arnaiz S, Bustamante J. Protective effects of the synthetic cannabinoids CP55,940 and JWH-015 on rat brain mitochondria upon paraquat exposure. *Neurochem Res*. 2010;35(9):1323-32.
348. Mendivil-Perez M, Felizardo-Otalvaro AA, Jimenez-Del-Rio M, Velez-Pardo C. Cannabidiol Protects Dopaminergic-like Neurons against Paraquat- and Maneb-Induced Cell Death through Safeguarding DJ-1/CYS(106) and Caspase 3

- Independently of Cannabinoid Receptors: Relevance in Parkinson's Disease. *ACS Chem Neurosci*. 2023;14(11):2159-71.
349. Ortega-Arellano HF, Jimenez-Del-Rio M, Velez-Pardo C. Melatonin Increases Life Span, Restores the Locomotor Activity, and Reduces Lipid Peroxidation (LPO) in Transgenic Knockdown Parkin *Drosophila melanogaster* Exposed to Paraquat or Paraquat/Iron. *Neurotox Res*. 2021.
350. Mendivil-Perez M, Soto-Mercado V, Guerra-Librero A, Fernandez-Gil BI, Florido J, Shen YQ, et al. Melatonin enhances neural stem cell differentiation and engraftment by increasing mitochondrial function. *J Pineal Res*. 2017;63(2).
351. Ortega-Arellano HF, Jimenez-Del-Rio M, Velez-Pardo C. Minocycline protects, rescues and prevents knockdown transgenic parkin *Drosophila* against paraquat/iron toxicity: Implications for autosomic recessive juvenile parkinsonism. *Neurotoxicology*. 2017;60:42-53.
352. Quintero-Espinosa D, Jimenez-Del-Rio M, Velez-Pardo C. Knockdown transgenic Lrrk *Drosophila* resists paraquat-induced locomotor impairment and neurodegeneration: A therapeutic strategy for Parkinson's disease. *Brain research*. 2017;1657:253-61.
353. Bonilla-Ramirez L, Jimenez-Del-Rio M, Velez-Pardo C. Low doses of paraquat and polyphenols prolong life span and locomotor activity in knock-down parkin *Drosophila melanogaster* exposed to oxidative stress stimuli: implication in autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Gene*. 2013;512(2):355-63.
354. Pohl F, Kong Thoo Lin P. The Potential Use of Plant Natural Products and Plant Extracts with Antioxidant Properties for the Prevention/Treatment of Neurodegenerative Diseases: In Vitro, In Vivo and Clinical Trials. *Molecules*. 2018;23(12).
355. Velez-Pardo C, Jimenez Del Rio M. Avoidance of A β [25-35] / (H₂O₂) -Induced Apoptosis in Lymphocytes by the Cannabinoid Agonists CP55, 940 and JWH-015 via Receptor-Independent and PI3K-Dependent Mechanisms: Role of NF- κ B and p53. *Medicinal Chemistry*. 2006;2(5):471-9.
356. Bhullar KS, Rupasinghe HP. Polyphenols: multipotent therapeutic agents in neurodegenerative diseases. *Oxid Med Cell Longev*. 2013;2013:891748.
357. Amro MS, Teoh SL, Norzana AG, Srijit D. The potential role of herbal products in the treatment of Parkinson's disease. *Clin Ter*. 2018;169(1):e23-e33.
358. Mazo NA, Echeverria V, Cabezas R, Avila-Rodriguez M, Tarasov VV, Yarla NS, et al. Medicinal Plants as Protective Strategies Against Parkinson's Disease. *Curr Pharm Des*. 2017;23(28):4180-8.
359. Javed H, Nagoor Meeran MF, Azimullah S, Adem A, Sadek B, Ojha SK. Plant Extracts and Phytochemicals Targeting α -Synuclein Aggregation in Parkinson's Disease Models. *Front Pharmacol*. 2018;9:1555.
360. Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*. 2010;2(12):1231-46.

361. Pereira DM, Valentão P, Pereira JA, Andrade PB. Phenolics: From Chemistry to Biology. *Molecules*. 2009;14(6):2202-11.
362. McDougall GJ. Phenolic-enriched foods: sources and processing for enhanced health benefits. *Proc Nutr Soc*. 2017;76(2):163-71.
363. Winter AN, Ross EK, Khatter S, Miller K, Linseman DA. Chemical basis for the disparate neuroprotective effects of the anthocyanins, callistephin and kuromanin, against nitrosative stress. *Free Radic Biol Med*. 103. United States: © 2016 Elsevier Inc; 2017. p. 23-34.
364. Casamenti F, Stefani M. Olive polyphenols: new promising agents to combat aging-associated neurodegeneration. *Expert Rev Neurother*. 2017;17(4):345-58.
365. Omar SH, Scott CJ, Hamlin AS, Obied HK. The protective role of plant biophenols in mechanisms of Alzheimer's disease. *J Nutr Biochem*. 2017;47:1-20.
366. Ullah F, Liang A, Rangel A, Gyengesi E, Niedermayer G, Münch G. High bioavailability curcumin: an anti-inflammatory and neurosupportive bioactive nutrient for neurodegenerative diseases characterized by chronic neuroinflammation. *Arch Toxicol*. 2017;91(4):1623-34.
367. Wang Q, Yang B, Wang N, Gu J. Tumor immunomodulatory effects of polyphenols. *Front Immunol*. 2022;13:1041138.
368. D'Archivio M, Filesi C, Vari R, Scazzocchio B, Masella R. Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. *Int J Mol Sci*. 2010;11(4):1321-42.
369. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*. 2004;79(5):727-47.
370. Kujawska M, Jodynis-Liebert J. Polyphenols in Parkinson's Disease: A Systematic Review of In Vivo Studies. *Nutrients*. 2018;10(5).
371. Ajami M, Pazoki-Toroudi H, Amani H, Nabavi SF, Braidly N, Vacca RA, et al. Therapeutic role of sirtuins in neurodegenerative disease and their modulation by polyphenols. *Neurosci Biobehav Rev*. 73. United States: © 2016 Elsevier Ltd; 2017. p. 39-47.
372. Libro R, Giacoppo S, Soundara Rajan T, Bramanti P, Mazzon E. Natural Phytochemicals in the Treatment and Prevention of Dementia: An Overview. *Molecules*. 2016;21(4):518.
373. Pérez-Hernández J, Zaldívar-Machorro VJ, Villanueva-Porras D, Vega-Ávila E, Chavarría A. A Potential Alternative against Neurodegenerative Diseases: Phytodrugs. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:8378613.
374. Vacca RA, Valenti D, Caccamese S, Daglia M, Braidly N, Nabavi SM. Plant polyphenols as natural drugs for the management of Down syndrome and related disorders. *Neurosci Biobehav Rev*. 2016;71:865-77.
375. Jimenez-Del-Rio M, Guzman-Martinez C, Velez-Pardo C. The effects of polyphenols on survival and locomotor activity in *Drosophila melanogaster* exposed to iron and paraquat. *Neurochem Res*. 2010;35(2):227-38.

376. Martinez-Perez DA, Jimenez-Del-Rio M, Velez-Pardo C. Epigallocatechin-3-Gallate Protects and Prevents Paraquat-Induced Oxidative Stress and Neurodegeneration in Knockdown dj-1- β *Drosophila melanogaster*. *Neurotox Res*. 2018;34(3):401-16.
377. Hoyos-Ceballos GP, Sánchez-Giraldo V, Mendivil-Perez M, Jimenez-Del-Rio M, Sierra-Garcia L, Vélez-Pardo C, et al. Design of epigallocatechin gallate loaded PLGA/PF127 nanoparticles and their effect upon an oxidative stress model. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2018;48:152-60.
378. Bonilla-Porras AR, Arevalo-Arbelaez A, Alzate-Restrepo JF, Velez-Pardo C, Jimenez-Del-Rio M. PARKIN overexpression in human mesenchymal stromal cells from Wharton's jelly suppresses 6-hydroxydopamine-induced apoptosis: Potential therapeutic strategy in Parkinson's disease. *Cytotherapy*. 2018;20(1):45-61.
379. Scholz R, Sobotka M, Caramoy A, Stempf T, Moehle C, Langmann T. Minocycline counter-regulates pro-inflammatory microglia responses in the retina and protects from degeneration. *J Neuroinflammation*. 2015;12:209.
380. Cronin A, Grealy M. Neuroprotective and Neuro-restorative Effects of Minocycline and Rasagiline in a Zebrafish 6-Hydroxydopamine Model of Parkinson's Disease. *Neuroscience*. 2017;367:34-46.
381. Chen H, Morrell PL, Ashworth VE, de la Cruz M, Clegg MT. Tracing the geographic origins of major avocado cultivars. *J Hered*. 2009;100(1):56-65.
382. Williams LO. The avocados, a Synopsis of the genus *Persea*, subg. *Persea*. *Economic Botany*. 1977;31(3):315-20.
383. Bernal J, Díaz C, Osorio C, Tamayo A, Osorio W, O C. Actualización tecnológica y buenas prácticas agrícolas (BPA) en el cultivo de aguacate. 2 ed: Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - AGROSAVIA; 2014. p. 410.
384. Yasir M, Das S, Kharya MD. The phytochemical and pharmacological profile of *Persea americana* Mill. *Pharmacogn Rev*. 2010;4(7):77-84.
385. Hurtado-Fernández E, Carrasco-Pancorbo A, Fernández-Gutiérrez A. Profiling LC-DAD-ESI-TOF MS method for the determination of phenolic metabolites from avocado (*Persea americana*). *J Agric Food Chem*. 2011;59(6):2255-67.
386. Kosińska A, Karamać M, Estrella I, Hernández T, Bartolomé B, Dykes GA. Phenolic compound profiles and antioxidant capacity of *Persea americana* Mill. peels and seeds of two varieties. *J Agric Food Chem*. 2012;60(18):4613-9.
387. Dreher ML, Davenport AJ. Hass avocado composition and potential health effects. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2013;53(7):738-50.
388. Wei Wang and Terrell RBaLG. Antioxidant capacities, procyanidins and pigments in avocados of different strains and cultivars. *Food Chemistry*. 2010;122(4):1193-8.
389. Ding H, Chin YW, Kinghorn AD, D'Ambrosio SM. Chemopreventive characteristics of avocado fruit. *Semin Cancer Biol*. 2007;17(5):386-94.
390. Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, Pouységu L. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2011;50(3):586-621.

391. Chai WM, Wei MK, Wang R, Deng RG, Zou ZR, Peng YY. Avocado Proanthocyanidins as a Source of Tyrosinase Inhibitors: Structure Characterization, Inhibitory Activity, and Mechanism. *J Agric Food Chem.* 2015;63(33):7381-7.
392. Kupnik K, Primožič M, Kokol V, Knez Ž, Leitgeb M. Enzymatic, Antioxidant, and Antimicrobial Activities of Bioactive Compounds from Avocado (*Persea americana* L.) Seeds. *Plants* [Internet]. 2023; 12(5).
393. Rodríguez-Carpena JG, Morcuende D, Andrade MJ, Kylli P, Estévez M. Avocado (*Persea americana* Mill.) phenolics, in vitro antioxidant and antimicrobial activities, and inhibition of lipid and protein oxidation in porcine patties. *J Agric Food Chem.* 2011;59(10):5625-35.
394. Calderón M, Escalona-Buendía H, Medina-Campos O, Pedraza-Chaverri J, Pedroza R, Ponce-Alquicira E. Optimization Of The Antioxidant And Antimicrobial Response Of The Combined Effect Of Nisin And Avocado Byproducts. *LWT - Food Science and Technology.* 2016;65:46-52.
395. Ortega-Arellano HF, Jimenez-Del-Rio M, Velez-Pardo C. Neuroprotective Effects of Methanolic Extract of Avocado *Persea americana* (var. Colinred) Peel on Paraquat-Induced Locomotor Impairment, Lipid Peroxidation and Shortage of Life Span in Transgenic knockdown Parkin *Drosophila melanogaster*. *Neurochem Res.* 2019;44(8):1986-98.
396. Quintero-Espinosa DA, Ortega-Arellano HF, Velez-Pardo C, Jimenez-Del-Rio M. Phenolic-rich extract of avocado *Persea americana* (var. Colinred) peel blunts paraquat/maneb-induced apoptosis through blocking phosphorylation of LRRK2 kinase in human nerve-like cells. *Environ Toxicol.* 2022;37(3):660-76.
397. Nagpal I, Abraham SK. Protective effects of tea polyphenols and β -carotene against γ -radiation induced mutation and oxidative stress in *Drosophila melanogaster*. *Genes Environ.* 2017;39:24.
398. Figueroa JG, Borrás-Linares I, Lozano-Sánchez J, Segura-Carretero A. Comprehensive characterization of phenolic and other polar compounds in the seed and seed coat of avocado by HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS. *Food Res Int.* 2018;105:752-63.
399. Nabavi SF, Sureda A, Dehpour AR, Shirooie S, Silva AS, Devi KP, et al. Regulation of autophagy by polyphenols: Paving the road for treatment of neurodegeneration. *Biotechnol Adv.* 2018;36(6):1768-78.
400. Tremocoldi MA, Rosalen PL, Franchin M, Massarioli AP, Denny C, Daiuto É R, et al. Exploration of avocado by-products as natural sources of bioactive compounds. *PLoS One.* 2018;13(2):e0192577.
401. Brinster RL, Chen HY, Trumbauer M, Senear AW, Warren R, Palmiter RD. Somatic expression of herpes thymidine kinase in mice following injection of a fusion gene into eggs. *Cell.* 1981;27(1, Part 2):223-31.

402. Brinster RL, Chen HY, Warren R, Sarthy A, Palmiter RD. Regulation of metallothionein–thymidine kinase fusion plasmids injected into mouse eggs. *Nature*. 1982;296(5852):39-42.
403. Folger KR, Wong EA, Wahl G, Capecchi MR. Patterns of integration of DNA microinjected into cultured mammalian cells: evidence for homologous recombination between injected plasmid DNA molecules. *Molecular and Cellular Biology*. 1982;2(11):1372-87.
404. Folger K, Thomas K, Capecchi MR. Analysis of homologous recombination in cultured mammalian cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1984;49:123-38.
405. Turan S, Bode J. Site-specific recombinases: from tag-and-target- to tag-and-exchange-based genomic modifications. *The FASEB Journal*. 2011;25(12):4088-107.
406. Sauer B, Henderson N. Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1988;85(14):5166-70.
407. Gates CA, Cox MM. FLP recombinase is an enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1988;85(13):4628-32.
408. Branda CS, Dymecki SM. Talking about a Revolution: The Impact of Site-Specific Recombinases on Genetic Analyses in Mice. *Developmental Cell*. 2004;6(1):7-28.
409. Schmidt EE, Taylor DS, Prigge JR, Barnett S, Capecchi MR. Illegitimate Cre-dependent chromosome rearrangements in transgenic mouse spermatids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000;97(25):13702-7.
410. Loonstra A, Vooijs M, Beverloo HB, Allak BA, van Drunen E, Kanaar R, et al. Growth inhibition and DNA damage induced by Cre recombinase in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001;98(16):9209-14.
411. Forni PE, Scuoppo C, Imayoshi I, Taulli R, Dastrù W, Sala V, et al. High Levels of Cre Expression in Neuronal Progenitors Cause Defects in Brain Development Leading to Microencephaly and Hydrocephaly. *The Journal of Neuroscience*. 2006;26(37):9593-602.
412. Schmidt-Supprian M, Wunderlich FT, Rajewsky K. Excision of the Frt-flanked neoRcassette from the CD19cre knock-in transgene reduces Cre-mediated recombination. *Transgenic Research*. 2007;16(5):657-60.
413. Vooijs M, Jonkers J, Berns A. A highly efficient ligand-regulated Cre recombinase mouse line shows that LoxP recombination is position dependent. *EMBO Rep*. 2001;2(4):292-7.
414. ROCHA-MARTINS M, CAVALHEIRO GR, MATOS-RODRIGUES GE, MARTINS RAP. From Gene Targeting to Genome Editing: Transgenic animals applications and beyond. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 2015;87:1323-48.
415. Fan HC, Chi CS, Lee YJ, Tsai JD, Lin SZ, Harn HJ. The Role of Gene Editing in Neurodegenerative Diseases. *Cell Transplant*. 2018;27(3):364-78.

416. Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, Soria E, Juez G. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Molecular Microbiology*. 2000;36(1):244-6.
417. Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology*. 1987;169(12):5429-33.
418. Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Almendros C. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology*. 2009;155(3):733-40.
419. Makarova KS, Wolf YI, Koonin EV. Comparative genomics of defense systems in archaea and bacteria. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(8):4360-77.
420. van der Oost J, Westra ER, Jackson RN, Wiedenheft B. Unravelling the structural and mechanistic basis of CRISPR–Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*. 2014;12:479.
421. Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJ, Charpentier E, Horvath P, et al. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*. 9. England 2011. p. 467-77.
422. Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, Costa F, Shah SA, Saunders SJ, et al. An updated evolutionary classification of CRISPR–Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*. 2015;13:722.
423. Song G, Jia M, Chen K, Kong X, Khattak B, Xie C, et al. CRISPR/Cas9: A powerful tool for crop genome editing. *The Crop Journal*. 2016;4.
424. Koonin EV, Makarova KS. CRISPR-Cas: an adaptive immunity system in prokaryotes. *F1000 Biol Rep*. 2009;1:95.
425. Jiang F, Doudna JA. CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms. *Annu Rev Biophys*. 2017;46:505-29.
426. Xu Y, Li Z. CRISPR-Cas systems: Overview, innovations and applications in human disease research and gene therapy. *Comput Struct Biotechnol J*. 2020;18:2401-15.
427. Wahlqvist ML, Lee MS, Hsu CC, Chuang SY, Lee JT, Tsai HN. Metformin-inclusive sulfonylurea therapy reduces the risk of Parkinson's disease occurring with Type 2 diabetes in a Taiwanese population cohort. *Parkinsonism Relat Disord*. 2012;18(6):753-8.
428. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols*. 2013;8(11):2281-308.
429. Chen H, Choi J, Bailey S. Cut site selection by the two nuclease domains of the Cas9 RNA-guided endonuclease. *J Biol Chem*. 2014;289(19):13284-94.
430. Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, Gonzales K, Chao Y, Pirzada ZA, et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*. 2011;471(7340):602-7.

431. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, A Doudna J, Charpentier E. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity 2012. 816-21 p.
432. Benjamin MB, Little JB. X rays induce interallelic homologous recombination at the human thymidine kinase gene. *Molecular and cellular biology*. 1992;12(6):2730-8.
433. Gupta RM, Musunuru K. Expanding the genetic editing tool kit: ZFNs, TALENs, and CRISPR-Cas9. *The Journal of Clinical Investigation*. 2014;124(10):4154-61.
434. Richardson CD, Ray GJ, DeWitt MA, Curie GL, Corn JE. Enhancing homology-directed genome editing by catalytically active and inactive CRISPR-Cas9 using asymmetric donor DNA. *Nature Biotechnology*. 2016;34(3):339-44.
435. Critchlow SE, Jackson SP. DNA end-joining: from yeast to man. *Trends Biochem Sci*. 1998;23(10):394-8.
436. Heidenreich E, Novotny R, Kneidinger B, Holzmann V, Wintersberger U. Non-homologous end joining as an important mutagenic process in cell cycle-arrested cells. *Embo j*. 2003;22(9):2274-83.
437. Weterings E, Chen DJ. The endless tale of non-homologous end-joining. *Cell Research*. 2008;18(1):114-24.
438. Patsali P, Kleanthous M, Lederer CW. Disruptive Technology: CRISPR/Cas-Based Tools and Approaches. *Molecular Diagnosis & Therapy*. 2019;23(2):187-200.
439. Minkenberg B, Wheatley M, Yang Y. Chapter Seven - CRISPR/Cas9-Enabled Multiplex Genome Editing and Its Application. In: Weeks DP, Yang B, editors. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. 149: Academic Press; 2017. p. 111-32.
440. Lee HB, Sundberg BN, Sigafos AN, Clark KJ. Genome Engineering with TALE and CRISPR Systems in Neuroscience. *Frontiers in Genetics*. 2016;7(47).
441. Cota-Coronado JA, Sandoval-Avila S, Gaytan-Davila YP, Diaz NF, Vega-Ruiz B, Padilla-Camberos E, et al. New transgenic models of Parkinson's disease using genome editing technology. *LID - S0213-4853(17)30306-7 [pii] LID - 10.1016/j.nrl.2017.08.009 [doi]*. (1578-1968 (Electronic)).
442. Vermilyea SC, Babinski A, Tran N, To S, Guthrie S, Kluss JH, et al. In Vitro CRISPR/Cas9-Directed Gene Editing to Model LRRK2 G2019S Parkinson's Disease in Common Marmosets. *Sci Rep*. 2020;10(1):3447.
443. Ishizu N, Yui D, Hebisawa A, Aizawa H, Cui W, Fujita Y, et al. Impaired striatal dopamine release in homozygous Vps35 D620N knock-in mice. *Human Molecular Genetics*. 2016;25(20):4507-17.
444. Tu Z, Yang W, Yan S, Guo X, Li X-J. CRISPR/Cas9: a powerful genetic engineering tool for establishing large animal models of neurodegenerative diseases. *Molecular Neurodegeneration*. 2015;10(1):35.
445. Wang X, Cao C, Huang J, Yao J, Hai T, Zheng Q, et al. One-step generation of triple gene-targeted pigs using CRISPR/Cas9 system. *Scientific Reports*. 2016;6:20620.

446. Arias-Fuenzalida J, Jarazo J, Qing X, Walter J, Gomez-Giro G, Nickels SL, et al. FACS-Assisted CRISPR-Cas9 Genome Editing Facilitates Parkinson's Disease Modeling. *Stem Cell Reports*. 2017;9(5):1423-31.
447. Basu S, Adams L, Guhathakurta S, Kim Y-S. A novel tool for monitoring endogenous alpha-synuclein transcription by NanoLuciferase tag insertion at the 3'end using CRISPR-Cas9 genome editing technique. *Scientific Reports*. 2017;7:45883.
448. Di Maio R, Hoffman EK, Rocha EM, Keeney MT, Sanders LH, De Miranda BR, et al. LRRK2 activation in idiopathic Parkinson's disease. *Sci Transl Med*. 2018;10(451):eaar5429.
449. Zhang Z, Zhang Y, Gao F, Han S, Cheah KS, Tse H-F, et al. CRISPR/Cas9 Genome-Editing System in Human Stem Cells: Current Status and Future Prospects. *Molecular therapy Nucleic acids*. 2017;9:230-41.
450. Heidenreich M, Zhang F. Applications of CRISPR–Cas systems in neuroscience. *Nature Reviews Neuroscience*. 2015;17:36.
451. Lee J, Bayarsaikhan D, Arivazhagan R, Park H, Lim B, Gwak P, et al. CRISPR/Cas9 Edited sRAGE-MSCs Protect Neuronal Death in Parkinson's Disease Model. *International journal of stem cells*. 2019;12(1):114-24.
452. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*. 1977;36(1):59-74.
453. Louis N, Eveleigh C, Graham FL. Cloning and sequencing of the cellular-viral junctions from the human adenovirus type 5 transformed 293 cell line. *Virology*. 1997;233(2):423-9.
454. Berk AJ. Recent lessons in gene expression, cell cycle control, and cell biology from adenovirus. *Oncogene*. 2005;24(52):7673-85.
455. Clément N, Grieger JC. Manufacturing of recombinant adeno-associated viral vectors for clinical trials. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2016;3:16002.
456. Seidel S, Maschke RW, Mozaffari F, Eibl-Schindler R, Eibl D. Improvement of HEK293 Cell Growth by Adapting Hydrodynamic Stress and Predicting Cell Aggregate Size Distribution. *Bioengineering (Basel)*. 2023;10(4).
457. Lin YC, Boone M, Meuris L, Lemmens I, Van Roy N, Soete A, et al. Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations. *Nat Commun*. 2014;5:4767.
458. Bylund L, Kytölä S, Lui WO, Larsson C, Weber G. Analysis of the cytogenetic stability of the human embryonal kidney cell line 293 by cytogenetic and STR profiling approaches. *Cytogenet Genome Res*. 2004;106(1):28-32.
459. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5. *Journal of General Virology*. 1977;36(1):59-72.
460. Shaw G, Morse S, Ararat M, Graham FL. Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *Faseb j*. 2002;16(8):869-71.

461. Thomas P, Smart TG. HEK293 cell line: A vehicle for the expression of recombinant proteins. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 2005;51(3):187-200.
462. He B, Soderlund DM. Human embryonic kidney (HEK293) cells express endogenous voltage-gated sodium currents and Na^v 1.7 sodium channels. *Neurosci Lett*. 2010;469(2):268-72.
463. Vetter I, Lewis RJ. Characterization of endogenous calcium responses in neuronal cell lines. *Biochemical Pharmacology*. 2010;79(6):908-20.
464. Storch A, Ludolph AC, Schwarz J. HEK-293 cells expressing the human dopamine transporter are susceptible to low concentrations of 1-methyl-4-phenylpyridine (MPP⁺) via impairment of energy metabolism. *Neurochem Int*. 1999;35(5):393-403.
465. Yamasaki TR, Holmes BB, Furman JL, Dhavale DD, Su BW, Song ES, et al. Parkinson's disease and multiple system atrophy have distinct α -synuclein seed characteristics. *J Biol Chem*. 2019;294(3):1045-58.
466. Ancolio K, Alves da Costa C, Uéda K, Checler F. α -Synuclein and the Parkinson's disease-related mutant Ala53Thr- α -synuclein do not undergo proteasomal degradation in HEK293 and neuronal cells. *Neuroscience Letters*. 2000;285(2):79-82.
467. Thirstrup K, Dächsel JC, Oppermann FS, Williamson DS, Smith GP, Fog K, et al. Selective LRRK2 kinase inhibition reduces phosphorylation of endogenous Rab10 and Rab12 in human peripheral mononuclear blood cells. *Sci Rep*. 2017;7(1):10300.
468. Coku I, Mutez E, Eddarkaoui S, Carrier S, Marchand A, Deldycke C, et al. Functional Analyses of Two Novel LRRK2 Pathogenic Variants in Familial Parkinson's Disease. *Mov Disord*. 2022;37(8):1761-7.
469. Bingol B, Tea JS, Phu L, Reichelt M, Bakalarski CE, Song Q, et al. The mitochondrial deubiquitinase USP30 opposes parkin-mediated mitophagy. *Nature*. 2014;510(7505):370-5.
470. Liu J, Wang X, Lu Y, Duan C, Gao G, Lu L, et al. Pink1 interacts with α -synuclein and abrogates α -synuclein-induced neurotoxicity by activating autophagy. *Cell Death Dis*. 2017;8(9):e3056.
471. Chen Y, Dorn GW, 2nd. PINK1-phosphorylated mitofusin 2 is a Parkin receptor for culling damaged mitochondria. *Science*. 2013;340(6131):471-5.
472. Ma J, Wu R, Zhang Q, Wu JB, Lou J, Zheng Z, et al. DJ-1 interacts with RACK1 and protects neurons from oxidative-stress-induced apoptosis. *Biochem J*. 462. England2014. p. 489-97.
473. Delenclos M, Burgess JD, Lamprokostopoulou A, Outeiro TF, Vekrellis K, McLean PJ. Cellular models of alpha-synuclein toxicity and aggregation. *J Neurochem*. 2019;150(5):566-76.
474. Xiaojuan Han SSYSQSJZNSMCTSMXJDMLHYaGH. Small molecule-driven NLRP3 inflammation inhibition via interplay between ubiquitination and autophagy: implications for Parkinson disease. *Autophagy*. 2019;15(11):1860-81.

475. Pulix M, Lukashchuk V, Smith DC, Dickson AJ. Molecular characterization of HEK293 cells as emerging versatile cell factories. *Curr Opin Biotechnol.* 2021;71:18-24.
476. Zhou ZD, Xie SP, Saw WT, Ho PGH, Wang H, Lei Z, et al. The Therapeutic Implications of Tea Polyphenols Against Dopamine (DA) Neuron Degeneration in Parkinson's Disease (PD). *Cells.* 2019;8(8).
477. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* 1970;3(4):393-403.
478. Dexter TM, Allen TD, Lajtha LG. Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro. *J Cell Physiol.* 1977;91(3):335-44.
479. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 1991;9(5):641-50.
480. Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell.* 2008;2(4):313-9.
481. Dominici M, le K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Dominici M, Blanc KL, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8: 315-317. *Cytotherapy.* 2006;8:315-7.
482. Caplan AI. New MSC: MSCs as pericytes are Sentinels and gatekeepers. *J Orthop Res.* 2017;35(6):1151-9.
483. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315-7.
484. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 7. England2005. p. 393-5.
485. Vemuri MC, Chase LG, Rao MS. Mesenchymal stem cell assays and applications. *Methods Mol Biol.* 2011;698:3-8.
486. Bianchi G, Muraglia A, Daga A, Corte G, Cancedda R, Quarto R. Microenvironment and stem properties of bone marrow-derived mesenchymal cells. *Wound Repair Regen.* 2001;9(6):460-6.
487. Xiao L, Tsutsui T. Characterization of human dental pulp cells-derived spheroids in serum-free medium: stem cells in the core. *J Cell Biochem.* 2013;114(11):2624-36.
488. Kisiel AH, McDuffee LA, Masaoud E, Bailey TR, Esparza Gonzalez BP, Nino-Fong R. Isolation, characterization, and in vitro proliferation of canine mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, muscle, and periosteum. *Am J Vet Res.* 2012;73(8):1305-17.

489. Krampera M, Marconi S, Pasini A, Galie M, Rigotti G, Mosna F, et al. Induction of neural-like differentiation in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, fat, spleen and thymus. *Bone*. 2007;40(2):382-90.
490. Aurich H, Sgodda M, Kaltwasser P, Vetter M, Weise A, Liehr T, et al. Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from human adipose tissue in vitro promotes hepatic integration in vivo. *Gut*. 2009;58(4):570-81.
491. Joerger-Messerli MS, Marx C, Oppliger B, Mueller M, Surbek DV, Schoeberlein A. Mesenchymal Stem Cells from Wharton's Jelly and Amniotic Fluid. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2016;31:30-44.
492. Kalaszczynska I, Ferdyn K. Wharton's jelly derived mesenchymal stem cells: future of regenerative medicine? Recent findings and clinical significance. *Biomed Res Int*. 2015;2015:430847.
493. Davies JE, Walker JT, Keating A. Concise Review: Wharton's Jelly: The Rich, but Enigmatic, Source of Mesenchymal Stromal Cells. *STEM CELLS Translational Medicine*. 2017;6(7):1620-30.
494. Anzalone R, Lo Iacono M, Corrao S, Magno F, Loria T, Cappello F, et al. New emerging potentials for human Wharton's jelly mesenchymal stem cells: immunological features and hepatocyte-like differentiative capacity. *Stem Cells Dev*. 2010;19(4):423-38.
495. Fong CY, Chak LL, Biswas A, Tan JH, Gauthaman K, Chan WK, et al. Human Wharton's jelly stem cells have unique transcriptome profiles compared to human embryonic stem cells and other mesenchymal stem cells. *Stem Cell Rev Rep*. 2011;7(1):1-16.
496. Rachakatla RS, Marini F, Weiss ML, Tamura M, Troyer D. Development of human umbilical cord matrix stem cell-based gene therapy for experimental lung tumors. *Cancer Gene Ther*. 2007;14(10):828-35.
497. Kim DW, Staples M, Shinozuka K, Pantcheva P, Kang SD, Borlongan CV. Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells: phenotypic characterization and optimizing their therapeutic potential for clinical applications. *Int J Mol Sci*. 2013;14(6):11692-712.
498. Ma L, Feng XY, Cui BL, Law F, Jiang XW, Yang LY, et al. Human umbilical cord Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells differentiation into nerve-like cells. *Chin Med J (Engl)*. 2005;118(23):1987-93.
499. Paldino E, Cenciarelli C, Giampaolo A, Milazzo L, Pescatori M, Hassan HJ, et al. Induction of dopaminergic neurons from human Wharton's jelly mesenchymal stem cell by forskolin. *J Cell Physiol*. 2014;229(2):232-44.
500. Mendivil-Perez M, Velez-Pardo C, Jimenez-Del-Rio M. Direct transdifferentiation of human Wharton's jelly mesenchymal stromal cells into cholinergic-like neurons. *J Neurosci Methods*. 2019;312:126-38.

501. Marino L, Castaldi MA, Rosamilio R, Ragni E, Vitolo R, Fulgione C, et al. Mesenchymal Stem Cells from the Wharton's Jelly of the Human Umbilical Cord: Biological Properties and Therapeutic Potential. *Int J Stem Cells*. 2019;12(2):218-26.
502. Cordeiro MR, Carvalhos CA, Figueiredo-Dias M. The Emerging Role of Menstrual-Blood-Derived Stem Cells in Endometriosis. *Biomedicines*. 2022;11(1).
503. Meng X, Ichim TE, Zhong J, Rogers A, Yin Z, Jackson J, et al. Endometrial regenerative cells: a novel stem cell population. *J Transl Med*. 2007;5:57.
504. Lv H, Hu Y, Cui Z, Jia H. Human menstrual blood: a renewable and sustainable source of stem cells for regenerative medicine. *Stem Cell Res Ther*. 2018;9(1):325.
505. Gargett CE, Schwab KE, Zillwood RM, Nguyen HP, Wu D. Isolation and culture of epithelial progenitors and mesenchymal stem cells from human endometrium. *Biol Reprod*. 2009;80(6):1136-45.
506. Khanjani S, Khanmohammadi M, Zarnani AH, Akhondi MM, Ahani A, Ghaempanah Z, et al. Comparative evaluation of differentiation potential of menstrual blood- versus bone marrow-derived stem cells into hepatocyte-like cells. *PLoS One*. 2014;9(2):e86075.
507. Patel AN, Park E, Kuzman M, Benetti F, Silva FJ, Allickson JG. Multipotent menstrual blood stromal stem cells: isolation, characterization, and differentiation. *Cell Transplant*. 2008;17(3):303-11.
508. Borlongan CV, Kaneko Y, Maki M, Yu SJ, Ali M, Allickson JG, et al. Menstrual blood cells display stem cell-like phenotypic markers and exert neuroprotection following transplantation in experimental stroke. *Stem Cells Dev*. 2010;19(4):439-52.
509. Jiang Y, Henderson D, Blackstad M, Chen A, Miller RF, Verfaillie CM. Neuroectodermal differentiation from mouse multipotent adult progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100 Suppl 1(Suppl 1):11854-60.
510. Dezawa M, Kanno H, Hoshino M, Cho H, Matsumoto N, Itokazu Y, et al. Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation. *J Clin Invest*. 2004;113(12):1701-10.
511. Fu YS, Cheng YC, Lin MY, Cheng H, Chu PM, Chou SC, et al. Conversion of human umbilical cord mesenchymal stem cells in Wharton's jelly to dopaminergic neurons in vitro: potential therapeutic application for Parkinsonism. *Stem Cells*. 24. England2006. p. 115-24.
512. Guo L, Yin F, Meng HQ, Ling L, Hu-He TN, Li P, et al. Differentiation of mesenchymal stem cells into dopaminergic neuron-like cells in vitro. *Biomed Environ Sci*. 2005;18(1):36-42.
513. Trzaska KA, Kuzhikandathil EV, Rameshwar P. Specification of a dopaminergic phenotype from adult human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2007;25(11):2797-808.
514. Bonilla-Porras AR, Velez-Pardo C, Jimenez-Del-Rio M. Fast transdifferentiation of human Wharton's jelly mesenchymal stem cells into neurospheres and nerve-like cells. *J Neurosci Methods*. 2017;282:52-60.

515. Zomer HD, Vidane AS, Gonçalves NN, Ambrósio CE. Mesenchymal and induced pluripotent stem cells: general insights and clinical perspectives. *Stem cells and cloning : advances and applications*. 2015;8:125-34.
516. Bloem BR, Okun MS, Klein C. Parkinson's disease. *Lancet*. 2021.
517. Barker RA. Parkinson's disease as a preventable pandemic. *The Lancet Neurology*. 2020;19(10):813.
518. Peña GM. El parkinson afecta a las de 220 personas en Colombia. *Opinion & Saludcom revista digital* [Internet]. 2017. Available from: <http://www.opinionysalud.com/parkinson-acn-sintomas-tratamiento-asociacion-colombiana-de-neurologia/>.
519. Moreno S, Buriticá O, Franco A, Pineda N, Arias W, Sepúlveda D, et al. Cognitive alterations in juvenile Parkinson's disease caused by the C212Y mutation in the Parkin gene. *International Journal of Psychological Research*. 2010;3(2):55-62.
520. Pradilla AG, Vesga AB, Leon-Sarmiento FE. (2). *Rev Panam Salud Publica*. 2003;14(2):104-11.
521. Cornejo-Olivas M, Torres L, Velit-Salazar MR, Inca-Martinez M, Mazzetti P, Cosentino C, et al. Variable frequency of LRRK2 variants in the Latin American research consortium on the genetics of Parkinson's disease (LARGE-PD), a case of ancestry. *NPJ Parkinsons Dis*. 2017;3:19.
522. Velez-Pardo C, Lorenzo-Betancor O, Jimenez-Del-Rio M, Moreno S, Lopera F, Cornejo-Olivas M, et al. The distribution and risk effect of GBA variants in a large cohort of PD patients from Colombia and Peru. *Parkinsonism Relat Disord*. 2019;63:204-8.
523. Gaviria Uribe AG, FernandoMuñoz Muñoz, Norman JulioBurgos Bernal, GerardoHelfer Vogel, Susana. ENVEJECIMIENTO DEMOGRÁFICO. COLOMBIA 1951-2020 DINÁMICA DEMOGRÁFICA Y ESTRUCTURAS POBLACIONALES. In: Social MdSyP, editor. 2013.
524. Zesiewicz TA. *Parkinson Disease*. Continuum (Minneapolis Minn). 2019;25(4):896-918.
525. Calabresi P, Standaert DG. Dystonia and levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease: Is there a connection? *Neurobiol Dis*. 2019;132:104579.
526. Venkataramana NK, Kumar SK, Balaraju S, Radhakrishnan RC, Bansal A, Dixit A, et al. Open-labeled study of unilateral autologous bone-marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in Parkinson's disease. *Transl Res*. 2010;155(2):62-70.
527. Xiong Y, Mahmood A, Chopp M. Angiogenesis, neurogenesis and brain recovery of function following injury. *Curr Opin Investig Drugs*. 2010;11(3):298-308.
528. Shetty P, Ravindran G, Sarang S, Thakur AM, Rao HS, Viswanathan C. Clinical grade mesenchymal stem cells transdifferentiated under xenofree conditions alleviates motor deficiencies in a rat model of Parkinson's disease. *Cell Biol Int*. 2009;33(8):830-8.
529. Thomas MG, Stone L, Evill L, Ong S, Ziman M, Hool L. Bone marrow stromal cells as replacement cells for Parkinson's disease: generation of an anatomical but not functional neuronal phenotype. *Transl Res*. 2011;157(2):56-63.

530. Chang CC, Chang KC, Tsai SJ, Chang HH, Lin CP. Neurogenic differentiation of dental pulp stem cells to neuron-like cells in dopaminergic and motor neuronal inductive media. *J Formos Med Assoc.* 2014;113(12):956-65.
531. Nandy SB, Mohanty S, Singh M, Behari M, Airan B. Fibroblast Growth Factor-2 alone as an efficient inducer for differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells into dopaminergic neurons. *J Biomed Sci.* 2014;21(1):83.
532. re3data.org: Parkinson Disease Mutation Database 2021 [updated editing status 2021-08-25. Available from: <http://doi.org/10.17616/R33Z1R>.
533. Martin I, Kim JW, Dawson VL, Dawson TM. LRRK2 pathobiology in Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry.* 2014;131(5):554-65.
534. Duque AF, Lopez JC, Benitez B, Hernandez H, Yunis JJ, Fernandez W, et al. Analysis of the LRRK2 p.G2019S mutation in Colombian Parkinson's Disease Patients. *Colomb Med (Cali).* 2015;46(3):117-21.
535. Rosenbusch KE, Kortholt A. Activation Mechanism of LRRK2 and Its Cellular Functions in Parkinson's Disease. *Parkinson's disease.* 2016;2016:7351985.
536. Rideout HJ. Neuronal death signaling pathways triggered by mutant LRRK2. *Biochem Soc Trans.* 2017;45(1):123-9.
537. Daniel G, Moore DJ. Modeling LRRK2 Pathobiology in Parkinson's Disease: From Yeast to Rodents. *Curr Top Behav Neurosci.* 2015;22:331-68.
538. Lee SB, Kim W, Lee S, Chung J. Loss of LRRK2/PARK8 induces degeneration of dopaminergic neurons in *Drosophila*. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;358(2):534-9.
539. Wang D, Tang B, Zhao G, Pan Q, Xia K, Bodmer R, et al. Dispensable role of *Drosophila* ortholog of LRRK2 kinase activity in survival of dopaminergic neurons. *Molecular Neurodegeneration.* 2008;3(1):3.
540. Imai Y, Gehrke S, Wang H-Q, Takahashi R, Hasegawa K, Oota E, et al. Phosphorylation of 4E-BP by LRRK2 affects the maintenance of dopaminergic neurons in *Drosophila*. *The EMBO journal.* 2008;27(18):2432-43.
541. Liu Z, Wang X, Yu Y, Li X, Wang T, Jiang H, et al. A *Drosophila* model for LRRK2-linked parkinsonism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(7):2693-8.
542. Tain LS, Mortiboys H, Tao RN, Ziviani E, Bandmann O, Whitworth AJ. Rapamycin activation of 4E-BP prevents parkinsonian dopaminergic neuron loss. *Nat Neurosci.* 2009;12(9):1129-35.
543. Stetka B. Parkinson's Disease and Pesticides: What's the Connection? 2014; 310(14). Available from: <https://www.scientificamerican.com/article/parkinsons-disease-and-pesticides-whats-the-connection/>.
544. Slanzi A, Iannoto G, Rossi B, Zenaro E, Constantin G. In vitro Models of Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in Cell and Developmental Biology.* 2020;8.
545. Huang Y, Wei J, Cooper A, Morris MJ. Parkinson's disease: From genetics to molecular dysfunction and targeted therapeutic approaches. *Genes & Diseases.* 2023;10(3):786-98.

546. Marín I. The Parkinson disease gene LRRK2: evolutionary and structural insights. *Mol Biol Evol.* 23. United States2006. p. 2423-33.
547. Steger M, Tonelli F, Ito G, Davies P, Trost M, Vetter M, et al. Phosphoproteomics reveals that Parkinson's disease kinase LRRK2 regulates a subset of Rab GTPases. *Elife.* 2016;5.
548. Gloeckner CJ, Kinkl N, Schumacher A, Braun RJ, O'Neill E, Meitinger T, et al. The Parkinson disease causing LRRK2 mutation I2020T is associated with increased kinase activity. *Hum Mol Genet.* 15. England2006. p. 223-32.
549. Palmer EL, Miller AD, Freeman TC. Identification and characterisation of human apoptosis inducing proteins using cell-based transfection microarrays and expression analysis. *BMC Genomics.* 2006;7:145.
550. Musiwaro P, Smith M, Manifava M, Walker SA, Ktistakis NT. Characteristics and requirements of basal autophagy in HEK 293 cells. *Autophagy.* 9. United States2013. p. 1407-17.
551. Sun WC, Jin L, Cao Y, Wang LZ, Meng F, Zhu XZ. Cloning, expression, and functional analysis of human dopamine D1 receptors. *Acta Pharmacol Sin.* 26. United States2005. p. 27-32.
552. Wang Q, Jolly JP, Surmeier JD, Mullah BM, Lidow MS, Bergson CM, et al. Differential dependence of the D1 and D5 dopamine receptors on the G protein gamma 7 subunit for activation of adenylylcyclase. *J Biol Chem.* 276. United States2001. p. 39386-93.
553. Kim S, Pajarillo E, Nyarko-Danquah I, Aschner M, Lee E. Role of Astrocytes in Parkinson's Disease Associated with Genetic Mutations and Neurotoxicants. *Cells.* 2023;12(4).
554. Soto-Mercado V, Mendivil-Perez M, Velez-Pardo C, Lopera F, Jimenez-Del-Rio M. Cholinergic-like neurons carrying PSEN1 E280A mutation from familial Alzheimer's disease reveal intraneuronal sAPP β fragments accumulation, hyperphosphorylation of TAU, oxidative stress, apoptosis and Ca²⁺ dysregulation: Therapeutic implications. *PLOS ONE.* 2020;15(5):e0221669.
555. Soto-Mercado V, Mendivil-Perez M, Jimenez-Del-Rio M, Velez-Pardo C. Multi-Target Effects of the Cannabinoid CP55940 on Familial Alzheimer's Disease PSEN1 E280A Cholinergic-Like Neurons: Role of CB1 Receptor. *J Alzheimers Dis.* 2021;82(s1):S359-s78.
556. Skaper SD. Neurotrophic Factors: An Overview. *Methods Mol Biol.* 2018;1727:1-17.
557. Farooq M, Khan AW, Kim MS, Choi S. The Role of Fibroblast Growth Factor (FGF) Signaling in Tissue Repair and Regeneration. *Cells.* 2021;10(11).
558. Sinha S, Chen JK. Purmorphamine activates the Hedgehog pathway by targeting Smoothened. *Nat Chem Biol.* 2006;2(1):29-30.
559. Gantner CW, Cota-Coronado A, Thompson LH, Parish CL. An Optimized Protocol for the Generation of Midbrain Dopamine Neurons under Defined Conditions. *STAR Protoc.* 2020;1(2):100065.

560. Kriks S, Shim JW, Piao J, Ganat YM, Wakeman DR, Xie Z, et al. Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease. *Nature*. 2011;480(7378):547-51.
561. Niclis JC, Gantner CW, Alsanie WF, McDougall SJ, Bye CR, Elefanty AG, et al. Efficiently Specified Ventral Midbrain Dopamine Neurons from Human Pluripotent Stem Cells Under Xeno-Free Conditions Restore Motor Deficits in Parkinsonian Rodents. *Stem Cells Transl Med*. 2017;6(3):937-48.
562. Singh M, Vaishnav PK, Dinda AK, Mohanty S. Evaluation of Priming Efficiency of Forskolin in Tissue-Specific Human Mesenchymal Stem Cells into Dopaminergic Neurons: An In Vitro Comparative Study. *Cells*. 2020;9(9).
563. Catoni C, Cali T, Brini M. Calcium, Dopamine and Neuronal Calcium Sensor 1: Their Contribution to Parkinson's Disease. *Frontiers in molecular neuroscience*. 2019;12:55.
564. Roede JR, Jones DP. Thiol-reactivity of the fungicide maneb. *Redox Biol*. 2014;2:651-5.
565. Jimenez-Del-Rio M, Velez-Pardo C. The Bad, the Good, and the Ugly about Oxidative Stress.
566. Del Rio MJ, Velez-Pardo C. Monoamine neurotoxins-induced apoptosis in lymphocytes by a common oxidative stress mechanism: involvement of hydrogen peroxide (H₂O₂), caspase-3, and nuclear factor kappa-B (NF-kappaB), p53, c-Jun transcription factors. *Biochem Pharmacol*. 63. England2002. p. 677-88.
567. Avila-Gomez IC, Velez-Pardo C, Jimenez-Del-Rio M. Effects of insulin-like growth factor-1 on rotenone-induced apoptosis in human lymphocyte cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2010;106(1):53-61.
568. Mendivil-Perez M, Jimenez-Del-Rio M, Velez-Pardo C. Glucose starvation induces apoptosis in a model of acute T leukemia dependent on caspase-3 and apoptosis-inducing factor: a therapeutic strategy. *Nutr Cancer*. 2013;65(1):99-109.
569. Turner J, Garnovskaya M, Raymond J. Serotonin 5-HT_{1A} receptor stimulates c-Jun N-terminal kinase and induces apoptosis in Chinese hamster ovary fibroblasts. *Biochimica et biophysica acta*. 2007;1773:391-9.
570. See WZC, Naidu R, Tang KS. Cellular and Molecular Events Leading to Paraquat-Induced Apoptosis: Mechanistic Insights into Parkinson's Disease Pathophysiology. *Mol Neurobiol*. 2022;59(6):3353-69.
571. Luo C-L, Huang Y-C, Huang B, Lu T, Fu Y-S. Caffeine may affect apoptosis and autophagy activity to promote dopaminergic cells survival under the rotenone induced Parkinson disease model. *The FASEB Journal*. 2017;31(S1):659.8-.8.
572. Psenakova K, Hexnerova R, Srb P, Obsilova V, Veverka V, Obsil T. The redox-active site of thioredoxin is directly involved in apoptosis signal-regulating kinase 1 binding that is modulated by oxidative stress. *Febs j*. 2020;287(8):1626-44.
573. Lee FS, Hagler J, Chen ZJ, Maniatis T. Activation of the IkappaB alpha kinase complex by MEKK1, a kinase of the JNK pathway. *Cell*. 1997;88(2):213-22.

574. Ichijo H, Nishida E, Irie K, ten Dijke P, Saitoh M, Moriguchi T, et al. Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science*. 1997;275(5296):90-4.
575. Wang C, Youle RJ. The role of mitochondria in apoptosis*. *Annu Rev Genet*. 2009;43:95-118.
576. Jänicke RU, Sprengart ML, Wati MR, Porter AG. Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J Biol Chem*. 1998;273(16):9357-60.
577. Kamata H, Manabe T, Oka S, Kamata K, Hirata H. Hydrogen peroxide activates I κ B kinases through phosphorylation of serine residues in the activation loops. *FEBS Lett*. 2002;519(1-3):231-7.
578. Choi WS, Abel G, Klintworth H, Flavell RA, Xia Z. JNK3 mediates paraquat- and rotenone-induced dopaminergic neuron death. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2010;69(5):511-20.
579. Kamienieva I, Duszyński J, Szczepanowska J. Multitasking guardian of mitochondrial quality: Parkin function and Parkinson's disease. *Translational Neurodegeneration*. 2021;10(1):5.
580. Harper JW, Ordureau A, Heo J-M. Building and decoding ubiquitin chains for mitophagy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2018;19(2):93-108.
581. Ge P, Dawson VL, Dawson TM. PINK1 and Parkin mitochondrial quality control: a source of regional vulnerability in Parkinson's disease. *Mol Neurodegener*. 2020;15(1):20.
582. Shiba-Fukushima K, Imai Y, Yoshida S, Ishihama Y, Kanao T, Sato S, et al. PINK1-mediated phosphorylation of the Parkin ubiquitin-like domain primes mitochondrial translocation of Parkin and regulates mitophagy. *Sci Rep*. 2012;2:1002.
583. Kondapalli C, Kazlauskaitė A, Zhang N, Woodroof HI, Campbell DG, Gurlay R, et al. PINK1 is activated by mitochondrial membrane potential depolarization and stimulates Parkin E3 ligase activity by phosphorylating Serine 65. *Open Biol*. 2012;2(5):120080.
584. Barazzuol L, Giamogante F, Brini M, Cali T. PINK1/Parkin Mediated Mitophagy, Ca(2+) Signalling, and ER-Mitochondria Contacts in Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci*. 2020;21(5).
585. Bonello F, Hassoun SM, Mouton-Liger F, Shin YS, Muscat A, Tesson C, et al. LRRK2 impairs PINK1/Parkin-dependent mitophagy via its kinase activity: pathologic insights into Parkinson's disease. *Hum Mol Genet*. 2019;28(10):1645-60.
586. Bakir S, Catalkaya G, Ceylan FD, Khan H, Guldiken B, Capanoglu E, et al. Role of Dietary Antioxidants in Neurodegenerative Diseases: Where are We Standing? *Curr Pharm Des*. 2020;26(7):714-29.

