

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**



**TESIS DOCTORAL**

**Efectos neurotóxicos del paraquat sobre el sistema nervioso  
central de rata y su implicación en el desarrollo de  
enfermedades neurodegenerativas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Javier Sanjuán López**

Directores

**Javier del Pino Sans**  
**Paula Moyano-Cires Ivanoff**  
**María Teresa Frejo Moya**

Madrid

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
FACULTAD DE VETERINARIA



**TESIS DOCTORAL**

**EFFECTOS NEUROTÓXICOS DEL PARAQUAT SOBRE EL SISTEMA  
NERVIOSO CENTRAL DE RATA Y SU IMPLICACIÓN EN EL  
DESARROLLO DE ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

JAVIER SANJUÁN LÓPEZ

DIRECTOR

Javier del Pino Sans, Paula Moyano-Cires Ivanoff, María Teresa Frejo Moya

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Programa De Doctorado En Veterinaria**

**Departamento De Farmacología y Toxicología**



**EFFECTOS NEUROTÓXICOS DEL PARAQUAT SOBRE  
EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE RATA Y SU  
IMPLICACIÓN EN EL DESARROLLO DE  
ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS**

**JAVIER SANJUÁN LÓPEZ**

**Javier del Pino Sans, Paula Moyano-Cires Ivanoff, María Teresa Frejo Moya**

**Madrid, 2021**

**Deseo expresar mi agradecimiento:**

- Al Prof. Dr. Javier del Pino Sans, por la dirección de esta Memoria y por todas las enseñanzas, los consejos y la ayuda recibida a lo largo de este período de formación que han conducido a la realización de esta Tesis Doctoral.
- A la Prof. Dra. María Teresa Frejo Moya, por la dirección de esta Memoria y por todas las enseñanzas, los consejos y la ayuda recibida a lo largo de este período de formación que han conducido a la realización de esta Tesis Doctoral.
- A la Prof. Dra. Paula Moyano-Cires Ivanoff, por la dirección de esta Memoria y por todas las enseñanzas, los consejos y la ayuda recibida a lo largo de este período de formación que han conducido a la realización de esta Tesis Doctoral.
- A toda mi familia, y muy especialmente a mis padres por su apoyo, cariño, ayuda y confianza durante esta etapa y toda mi vida, estando siempre a mi lado.

## LISTADO DE ACRÓNIMOS EMPLEADOS EN ESTA TESIS

- A $\beta$  –  $\beta$ -amiloidea
- AChE – Acetilcolinesterasa
- ACTB – Beta-actina
- ALDH – Aldehído-deshidrogenasa
- ALP – Vía de autofagia lisosomal
- AMC – Autofagia mediada por chaperonas
- ApoE – Apolipoproteína E
- ARNsi – ARN de silenciamiento
- ATP – Adenosín trifosfato
- $\beta$ APP – Proteína precursora de la Beta-amiloidea
- BDNF – Factor neurotrófico derivado del cerebro
- BHE – Barrera hematoencefálica
- BSA – Albúmina de suero bovino
- CD – Catepsina D
- C<sub>max</sub> – Concentración máxima
- CO<sub>2</sub> – Dióxido de carbono
- COX-1 – Ciclooxygenasa-1
- COX-2 – Ciclooxygenasa-2
- DAT – Transportador de dopamina
- DL<sub>50</sub> – Dosis letal 50
- DNPH – 2,4-dinitrofenilhidrazona
- DMEM – Medio Eagle modificado de Dulbecco
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- DOPAC – Ácido 3,4-dihidroxifenilacético
- DOPAL – 3,4-dihidroxifenilacetaldehído
- E2 – Estradiol
- EA – Enfermedad de Alzheimer
- EFSA – Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
- EP – Receptor de prostaglandina E2
- EPI – Equipo de protección individual
- ER – Receptor de estrógenos
- ERO – Especies reactivas de oxígeno
- FAO – Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
- Fe – Hierro
- FSH – Hormona folículo-estimulante
- GFAP – Proteína ácida fibrilar glial
- GPX – Glutatió-peroxidasa
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de hidrógeno
- HDAC – Histona desacetilasa
- HO1 – Hemooxygenasa-1
- HSP70 – Proteínas de choque térmico 70

- IDA – Ingesta diaria admisible
- LDH – Lactato deshidrogenasa
- LOEL – Nivel más bajo que produce efectos observables
- LH – Hormona luteinizante
- NAC – N-acetil cisteína
- NADP – Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
- NADPH – Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
- NMDAR – Receptor de N-metil-D-aspartato
- NO – Óxido nítrico
- NOAEL – Nivel sin efectos adversos observables
- NOEL – Nivel sin efectos observables
- NOX-2 – NADPH-oxidasa 2
- NRF2 – Factor eritroide nuclear 2
- MAP2 – Proteína asociada a microtúbulos-2
- MAPK – Proteína quinasa activada por mitógenos
- mBDNF – BDNF maduro
- MDA – Malondialdehído
- mTOR – Diana de rapamicina
- MTT – Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
- O<sub>2</sub> – Oxígeno
- OCT-3 – Transportador de cationes orgánicos 3
- OMS – Organización Mundial de la Salud
- P20S – Proteasoma 20S
- P75<sup>NTR</sup> – Receptor P75<sup>NTR</sup>
- PBS – Solución salina tamponada con fosfato
- PGE2 – Prostaglandina E2
- PGES-1 – Prostaglandina E2 sintasa
- PGH2 – Prostaglandina H2
- PKC – Proteína quinasa C
- PQ – Paraquat
- PRL – Prolactina
- proBDNF – Precursor del BDNF o BDNF inmaduro
- PSD95 – Proteína de densidad postsináptica 95
- pTau – Tau hiperfosforilada
- rBDNF – BDNF recombinante
- SOD1 – Superóxido dismutasa 1
- SPN – Espinofilina
- SYP – Sinaptofisina
- T<sub>3</sub> – Triyodotironina
- T<sub>4</sub> – Tiroxina
- TFEB – Factor de transcripción EB
- TH – Tirosina hidroxilasa
- T<sub>max</sub> – Tiempo en el que se alcanza C<sub>max</sub>

- tPA – Activador tisular del plasminógeno
- TrkB – Receptor quinasa B de la tropomiosina
- TRX – Tiorredoxina
- UE – Unión Europea
- USEPA – Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos

# ÍNDICE

SUMARY.....	8
RESUMEN.....	17
1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL TRABAJO.....	28
2. INTRODUCCIÓN.....	33
3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	38
3.1. Paraquat.....	39
3.2. Toxicocinética.....	41
3.2.1. Absorción	
3.2.2. Distribución	
3.2.3. Metabolismo y eliminación	
3.3. Mecanismo de acción.....	47
3.3.1. Mecanismo de acción neurotóxico	
3.4. Toxicidad.....	58
3.4.1. Toxicidad respiratoria	
3.4.2. Toxicidad digestiva	
3.4.3. Toxicidad hepática	
3.4.4. Toxicidad renal	
3.4.5. Toxicidad cardiovascular	
3.4.6. Toxicidad cutánea	
3.4.7. Toxicidad ocular	
3.4.8. Toxicidad fetal y perinatal	
3.4.9. Disrupción endocrina	
3.4.10. Genotoxicidad	
3.4.11. Neurotoxicidad	
3.4.12. Toxicidad medioambiental	
3.5. Normativa y Legislación.....	76
3.5.1. Regulación a nivel internacional	
3.5.2. Regulación a nivel europeo	
3.5.2.1. Reglamento (CE) 1272/2008	
3.5.2.2. Reglamento (CE) 396/2005	
3.5.2.3. Reglamento (UE) 520/2011	

	3.5.2.4. Reglamento (CEE) 315/93	
	3.5.2.5. Reglamento (CE) 1107/2009	
	3.5.2.6. Directiva 2006/61/CE	
	3.5.3. Regulación a nivel nacional	
	3.5.3.1. Real Decreto 971/2014	
	3.5.3.2. Plan Nacional de Control Oficial de la Cadena Alimentaria	
4.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	82
	4.1. Productos químicos	
	4.2. Preparación de los cultivos neuronales primarios de hipocampo	
	4.3. Diseño experimental	
	4.4. Ensayo de cuantificación de la activación del receptor de estrógenos	
	4.5. Cuantificación de la actividad de P20S	
	4.6. Cuantificación de la PGE2, proteínas Tau y $\beta$ -amiloideas	
	4.7. Cuantificación del nivel de peróxido de hidrógeno	
	4.8. Ensayo de peroxidación lipídica	
	4.9. Ensayo de oxidación proteica	
	4.10. Análisis PCR a tiempo real	
	4.11. Determinación de proteínas	
	4.12. Silenciamiento génico	
	4.13. Medición de la viabilidad celular	
	4.14. Análisis estadístico	
5.	RESULTADOS.....	96
	5.1. Análisis de la activación del receptor de estrógenos	
	5.2. Análisis de la vía NRF2	
	5.3. Cuantificación de las proteínas proBDNF y mBDNF	
	5.4. Análisis de la generación de estrés oxidativo	

5.5. Cuantificación de las proteínas P75 <sup>NTR</sup> , TrkB y tPA	
5.6. Análisis de la expresión de COX-2, PGE2 y EP1-4	
5.7. Cuantificación de la actividad de P20S, y expresión de TFEB y HSP70	
5.8. Análisis de la expresión de proteínas sinápticas	
5.9. Cuantificación de las proteínas $\beta$ -amiloideas y Tau	
5.10. Análisis de la expresión génica en los ensayos de eficacia del silenciamiento	
5.11. Efecto del PQ sobre la viabilidad celular	
6. DISCUSIÓN.....	124
7. CONCLUSIONES.....	144
8. BIBLIOGRAFÍA.....	148
9. ANEXO I.....	168

# SUMMARY

## SUMMARY

### **PARAQUAT NEUROTOXIC EFFECTS ON CENTRAL NERVOUS SYSTEM OF RAT AND ITS IMPLICATION IN NEURODEGENERATIVE DISEASES DEVELOPMENT**

#### INTRODUCTION

Paraquat (PQ) is a widely used herbicide that causes alterations at multiple organic levels, including pulmonary, endocrine and neurotoxic effects. In this regard, PQ has been reported to produce cognitive disorders after acute and repeated exposure similar to those observed in Alzheimer's disease (AD). However, the complete mechanisms through which PQ induces these deficits are unknown.

In relation with this, PQ was reported to induce reactive oxygen species (ROS) generation, which have been related to NRF2 pathway enzymes downregulation. In addition, estradiol (E2) administration has been reported to decrease cellular oxidative stress levels, and estrogen receptor (ER) activation has been reported to avoid cell death caused by  $\beta$ -amyloid (A $\beta$ ) and Tau proteins production after PQ exposure. Therefore, PQ could mediate these effects through its antiestrogenic action, leading to the memory and learning disorders described.

Likewise, PQ was described to produce dendritic spine number decline in hippocampal neurons, disrupting synaptic plasticity, which this could lead to the cognitive disorders indicated. The correct development of these spines, both in number, size and functionality, is due to several synaptic proteins, which are regulated by ER, so this may suggest that PQ antiestrogenic activity would also be able to mediate these effects in neurons.

Otherwise, PQ was reported to induce cyclooxygenase-2 (COX-2) expression, increasing prostaglandin E2 (PGE2) synthesis, which overproduction has been linked to cell death induction, synaptic plasticity alteration, oxidative stress generation,  $\beta$ -amyloid and Tau proteins production, and cognitive decline. However, there are no studies about the PQ effect on PGE2 production in the brain.

As well, PQ was reported to decrease brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in the hippocampus *in vivo*, which has been linked to oxidative stress level increase,  $\beta$ -amyloid and Tau proteins production and, consequently, hippocampal neuronal degeneration and cognitive alterations development. In addition, PGE2 synthesis and BDNF levels have been reported to be regulated by estrogen, so estrogenic disruption caused by PQ could also alter these signalling pathways, leading to neuronal cell death and alteration of memory and learning processes.

Furthermore, PQ was described to inhibit heat shock proteins (HSP70) and proteasome 20S (P20S) activity, which have been linked to  $\beta$ -amyloid and Tau proteins increase, so that inhibition could also take part in cell death induction and the cognitive process alterations observed.

Accordingly, firstly, we hypothesized that PQ could act as an estrogenic disruptor, inducing synaptic proteins alterations and neuronal cell death in hippocampus, produced through oxidative stress generation and  $\beta$ -amyloid and Tau proteins formation, after unique and repeated PQ exposure.

Secondly, we hypothesized that PQ could disturb PGE2 and BDNF signalling pathways through estrogenic disruption in hippocampus, which could also induce cell death in this brain region due to oxidative stress generated and  $\beta$ -amyloid and Tau proteins production, after single and repeated treatment.

Lastly, we hypothesized that PQ could downregulate P20S activity and alter HSP70 and TFEB expression, easing the accumulation of toxic proteins, like  $\beta$ -amyloid and Tau proteins, which could lead to cell viability reduction in hippocampus.

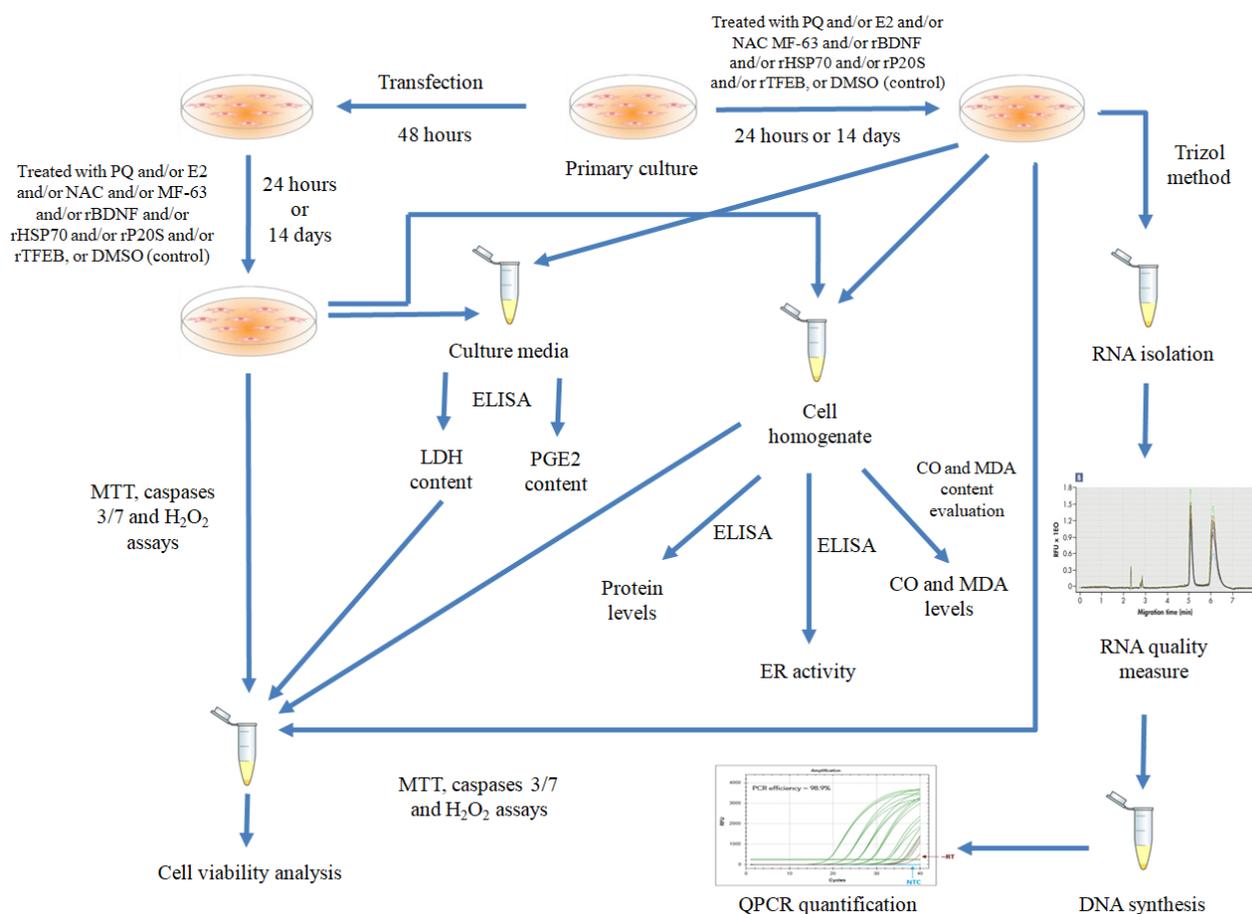
## **MATERIAL AND METHODS**

To test our hypothesis, we used primary hippocampal neuronal cultures to determine PQ toxic effects, after 24 hours and 14 days exposure, on cell viability, dendritic spine density and the mechanisms that mediate these effects in this brain region. In addition, we evaluated PQ effects, after 24 hours and 14 days treatment, on estrogenic activity, cellular PGE2 signalling pathway and growth factors involved in neuronal development and function (neurotrophins) signalling pathways, just as their effects on oxidative stress induction, cytotoxic proteins production and neuronal cell loss in the hippocampus, and the interrelationship between all these mechanisms.

With this aim, we employed primary neuronal cultures whose cells derived from hippocampus of foetuses taken from 17-18 days pregnant Wistar rats. Primary neuronal cultures cells, employed as experimental groups, were treated with PQ (0,1  $\mu$ M to 40  $\mu$ M) for 24 hours or 14 days, with or without N-acetyl cysteine (NAC; 1 mM) and with or without E2 (10 nM), to evaluate the toxic effects of PQ in hippocampus' ER expression and activity, the expression of the main genes that regulate synaptic plasticity (NMDAR1, PSD95, SYP and SPN) and those genes involved in the pathway that regulates oxidative stress level (NRF2, HO1, SOD1 and GPX); on cellular hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), malondialdehyde (MDA) and carbonyl groups content; on of BDNF precursor form (proBDNF) and mature BDNF (mBDNF) levels and gene expression that regulate their signalling pathways (TrkB, P75<sup>NTR</sup> and tPA), COX-2 and PGE2 levels, and PGE2 receptor subtypes (EP1-4) expression, expression levels of

genes that regulate abnormal proteins elimination (HSP70, TFEB, P20S and CD) and the effect of all these factors on  $\beta$ -amyloid and hyperphosphorylated Tau (pTau) proteins production, just as amyloid- $\beta$  precursor protein ( $\beta$ APP) and Tau gene silencing, prostaglandin E2 synthase 1 (PGES1) block or E2 and/or NAC co-treatment effects on cell viability, and the interaction of all these mechanisms with each other. Cells were seeded on glass coverslips at a density of  $10^6$  cells/mL. Each experiment was performed in triplicate, employing three different replicates in each one of them (n=9). A dimethyl sulfoxide (DMSO; 0,1%) group was used in parallel for each experiment as a control group.

PQ concentrations used were chosen taking into account the concentrations described in previous works to induce hippocampal cell death after single and repeated treatment in hippocampal primary neuron cultures (Del Pino et al., 2017) and after PQ intra-hippocampal injections in rats (Bagetta et al., 1992). Moreover, to evaluate the mechanisms through which PQ causes cell death, we used 10  $\mu$ M and 20  $\mu$ M PQ concentrations, which are the lowest concentrations that induce cell death through apoptosis and necrosis, respectively, after acute exposure in hippocampal primary neuronal cultures (Del Pino et al., 2017). Otherwise, we chose 10 nM E2 concentration to evaluate possible PQ anti-estrogenic effects, because that is the physiological concentration in rat's hippocampus (Prange-Kiel et al., 2006). We also chose 1 mM NAC concentration to investigate the oxidative stress effects on cell viability, because that is the lowest concentration that reverts oxidative stress completely. Figure 1 shows the protocol and experimental design followed in this investigation.



**Figure 1.** Summarizes the protocol and experimental design followed in this investigation.

## RESULTS AND DISCUSSION

The present study proves, for the first time, that PQ does not alter ER expression, but decrease its activation, which could either be due to blocking ER binding site, or to altering its conformation (Fawcett et al., 2002).

Besides, PQ induced, after unique and long-term exposure, ROS formation, resulting in oxidative stress generation, entailing lipid peroxidation and protein oxidation induction, which led to cell death and cognitive decline, as described previously (Chen et al., 2010). In addition, PQ co-treatment with E2 reduced partially ROS levels, which suggests that its increase could be mediated through ER activity alteration, supporting our hypothesis. Furthermore, our results showed that PQ reduces NRF2 factor

expression, as well as the antioxidant enzymes regulated by it (SOD1, HO1 y GPX), but only after continued exposure; these results are similar to another study performed *in vivo* (Li et al., 2016). For its part, E2 reverts its expression reduction, indicating that the inhibition of this mechanism is involved in oxidative stress generation, and the estrogenic disruption induced by PQ is mediating this effect, at least, partially. Therefore, there may be other mechanisms playing a role additionally.

On the other hand, we found that PQ diminishes proBDNF and mBDNF levels, after acute and long-term exposure, whereas tissue plasminogen activator (tPA) enzyme expression, which is involved in proBDNF to mBDNF processing (Greenberg et al., 2009), only decreased after continued treatment, which coincides with previously reported information on *in vivo* studies (Rudyk et al., 2019; Mangano et al., 2011). In this sense, tPA expression alteration seems to mediate the effects on BDNF by PQ repeated exposure. Moreover, estrogenic disruption, in part through tPA, and PGE2 is involved in BDNF levels alteration. Furthermore, we showed that PQ increases P75<sup>NTR</sup> receptor expression and decreases tropomyosin receptor kinase B (TrkB) expression, and we also showed that these effects are mediated through estrogenic alterations, partially and completely, respectively, leading to proBDNF and mBDNF signalling pathways dysfunction.

Our results prove, for the first time, that PQ increases PGE2 synthesis, as a result of COX-2 expression increment, induces PGE2 receptor subtypes (EP1 and EP3) and decreases EP2 subtype. We also showed that estrogenic disruption is involved, in part, in the induction of these effects, which agree with several studies that pointed out that estrogen inhibit COX-2 expression (Stacey et al., 2016; Menze et al., 2015) and decreases circulating PGE2 levels (Wang et al., 2014).

Otherwise, we showed that PQ unique and repeated exposure reduces HSP70 expression, P20S activity and TFEB expression, from 20  $\mu$ M concentration, which mediate chaperone mediated autophagy (CMA) and autophagy lysosomal pathway (ALP), respectively, which are cellular mechanisms through which cytotoxic proteins are eliminated, such as A $\beta$  and pTau. Related to these proteins, our results show that their levels increment induced by PQ, after acute and prolonged exposure, is mediated by estrogenic disruption, PGE2 and BDNF cellular signalling pathways alteration, oxidative stress induction and inhibition of the mechanisms involved in the elimination of toxic proteins, so they could explain the observed effects.

PQ also exerts, after acute and repeated exposure, a negative effect on neuron dendritic spines development, because PQ reduces synaptic proteins expression, like N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR1), postsynaptic density protein 95 (PSD95), synaptophysin (SYP) and spinophilin (SPN), which have been described as essential in synaptic plasticity (Glantz et al., 2007; Li et al., 2011). Therefore, this could be the cause of the spine growth dysfunction, density reduction and synaptic plasticity alteration.

Finally, PQ produced, after unique and repeated exposure, cell viability decrease in primary hippocampal neurons, inducing cell death through apoptosis and necrosis mechanisms, showing an increment of caspases 3/7 activation and lactate dehydrogenase (LDH), respectively. Our results also show that oxidative stress, estrogenic disruption, and the increase of A $\beta$  and Tau protein levels are involved in cell death induction in the hippocampus. We also observed that PQ produces PGE2 levels increase and mBDNF levels decrease, which is especially marked after repeated exposure, inducing, in both cases, part of the cell death caused by PQ. Lastly, our results show that PQ induces P20S activity inhibition, and TFEB and HSP70 expression

decrease, which are mediating, in part, cell death due to A $\beta$  and Tau proteins accumulation. However, these mechanisms are not able to explain completely cell death observed, so this indicates that other mechanisms may be involved.

## CONCLUSIONS

PQ induces cell death in hippocampal neurons mediated, partially, by ROS generation, and A $\beta$  and Tau proteins accumulation, which exert cytotoxic actions. The mBDNF levels reduction and TrkB receptor decrease exerting neuroprotective effect; P75<sup>NTR</sup> overexpression makes opposite effects to mBDNF; and PGE2 levels increase and EP1 and EP3 expression exerting negative effects on cell viability, are mediating, in turn, part of these effects. PQ also inhibits elimination mechanisms of these cytotoxic proteins. On the other hand, PQ reduces the expression of proteins that regulate development, density and function of neuron dendritic spines. All the described mechanisms that mediate cell death observed in hippocampal neurons are induced, in part, through estrogenic disruption caused by PQ.

All these effects could explain, in part, cognitive disorders, that affect to memory and learning processes, caused by PQ. However, the described mechanisms do not explain completely the cell death observed. Therefore, further studies should be developed in order to establish the rest of mechanisms involved on the observed effects and these results should be validated on *in vivo* studies. These results are interest because they provide new information about mechanisms that mediate cell death induction, which can explain the cognitive disorders described after PQ exposure, and they can help determine therapeutic targets, useful in PQ poisonings and neurodegenerative diseases treatment.

# **RESUMEN**

## RESUMEN

### EFFECTOS NEUROTÓXICOS DEL PARAQUAT SOBRE EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE RATA Y SU IMPLICACIÓN EN EL DESARROLLO DE ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

#### INTRODUCCIÓN

El paraquat (PQ) es un herbicida ampliamente utilizado capaz de causar alteraciones a múltiples niveles orgánicos, destacando sus efectos pulmonares, endocrinos y neurotóxicos. En este sentido, se ha descrito que la intoxicación aguda y crónica con este tóxico ocasiona alteraciones cognitivas, similares a las que se manifiestan en la enfermedad de Alzheimer (EA). Sin embargo, se desconocen los mecanismos completos a través de los cuales el PQ induce estos déficits.

A este respecto, se ha descrito que el PQ induce la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO), la cual se ha relacionado con la regulación negativa de la expresión de las enzimas antioxidantes de la vía NRF2. Además, se ha descrito que la administración de estrógenos disminuye el nivel de estrés oxidativo celular y que la activación del receptor estrogénico (ER) previene la muerte celular debida a la formación de proteínas  $\beta$ -amiloideas (A $\beta$ ) y Tau tras la exposición a PQ. Por lo tanto, el PQ podría mediar estos efectos a través de su actividad antiestrogénica, dando lugar a los déficits de memoria y aprendizaje descritos.

Asimismo, se ha descrito que el PQ produce una disminución del número de terminaciones dendríticas en las neuronas del hipocampo, alterando la plasticidad sináptica de las mismas, pudiendo esto derivar en los déficits cognitivos señalados. La correcta formación, tanto en número como en tamaño y funcionalidad, de estas terminaciones se debe a un conjunto de proteínas sinápticas, en cuya regulación se ha

observado que interviene el ER, lo cual puede sugerir que la actividad antiestrogénica del PQ sería también capaz de mediar estos efectos sobre las neuronas.

Por otra parte, se ha descrito que el PQ induce la expresión de la ciclooxygenasa-2 (COX-2), favoreciendo la síntesis de la prostaglandina E2 (PGE2), cuya sobreproducción se ha relacionado con la inducción de muerte celular, alteración de la plasticidad sináptica y desórdenes cognitivos derivados, junto a la generación de estrés oxidativo y la síntesis de proteínas  $\beta$ -amiloideas y Tau. Sin embargo, no existen estudios sobre el efecto del PQ sobre la producción de PGE2 en el cerebro.

También se ha descrito que el PQ disminuye los niveles del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en hipocampo en estudios *in vivo*, lo cual se ha relacionado con el incremento del nivel de estrés oxidativo, de la producción de proteínas A $\beta$  y Tau, y en consecuencia, de la degeneración neuronal en el hipocampo y la aparición de alteraciones cognitivas. A ello se suma que se ha descrito que la síntesis de PGE2 y los niveles de BDNF son regulados por los estrógenos, lo cual sugiere que la disrupción estrogénica producida por el PQ también podría alterar estas rutas de señalización derivando en muerte neuronal y en la aparición de disfunciones de los procesos de memoria y aprendizaje.

Asimismo, se ha descrito que el PQ inhibe la actividad de las proteínas de choque térmico (HSP70) y del proteasoma 20S (P20S), lo cual también se ha relacionado con el incremento de las proteínas  $\beta$ -amiloideas y Tau, por lo que dicha inhibición podría participar en la inducción de muerte neuronal y originar alteraciones de los procesos cognitivos.

En consecuencia, en primer lugar, hipotetizamos que el PQ puede actuar como disruptor estrogénico, induciendo alteraciones de las proteínas sinápticas y muerte celular en

neuronas del hipocampo, mediadas por la generación de estrés oxidativo y la formación de proteínas  $\beta$ -amiloidea y Tau fosforilada (pTau), tras la exposición única y repetida a este compuesto.

En segundo lugar, hipotetizamos que el PQ podría alterar las vías de señalización de PGE2 y BDNF a través de la disrupción estrogénica en el hipocampo, lo cual también podría inducir la muerte celular en esta región, debido al estrés oxidativo generado y a la producción de las proteínas  $\beta$ -amiloidea y Tau, tanto tras tratamiento único como repetido.

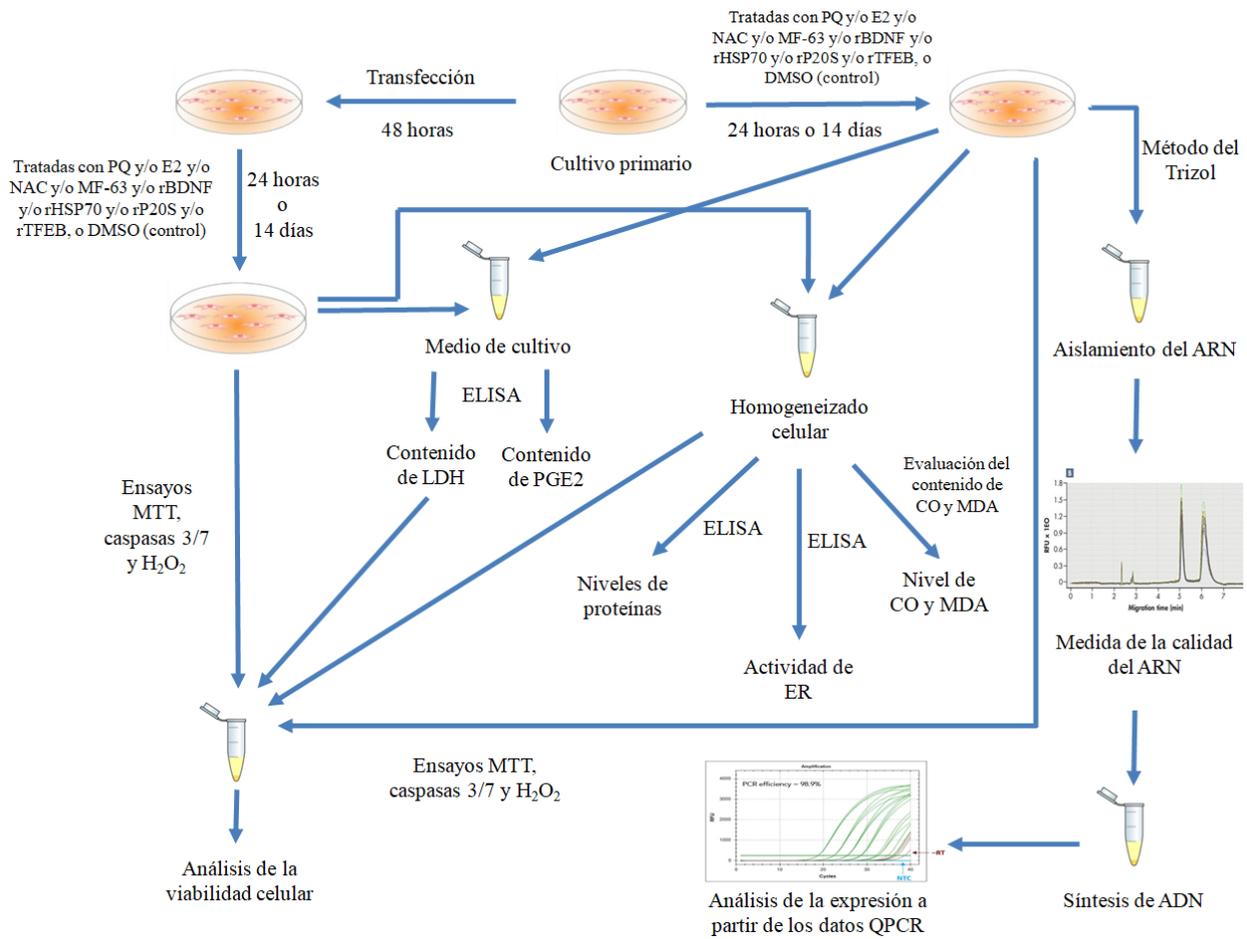
Finalmente, hipotetizamos que el PQ podría inhibir el proteasoma 20S y alterar la expresión de las HSP70 y de TFEB, favoreciendo la acumulación de proteínas tóxicas, como  $\beta$ -amiloideas y pTau, lo cual puede conducir a la reducción de la viabilidad de las neuronas del hipocampo.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

Para probar nuestras hipótesis, utilizamos cultivos primarios de neuronas de hipocampo transfectados o no con ARN de silenciamiento para las proteínas  $\beta$ -amiloideas y Tau o con proteínas recombinantes (rBDNF, rHSP70, rP20S, rTFEB) para evaluar los efectos tóxicos del PQ tras 24 horas y 14 días de exposición sobre la viabilidad celular de las neuronas, la densidad de sus espinas dendríticas y los mecanismos implicados que median estos efectos en esta región cerebral. Asimismo, se evaluaron los efectos del PQ tras 24 horas y 14 días de exposición sobre la actividad estrogénica y las rutas de señalización celular en las que participa la PGE2, y los factores implicados en el desarrollo y funcionalidad neuronal (neurotrofinas), al igual que la implicación de estos efectos en la inducción de estrés oxidativo, la producción de proteínas citotóxicas y la pérdida de neuronas en el hipocampo, así como las interrelaciones existentes entre ellos.

Con esta finalidad, se emplearon cultivos neuronales primarios a partir de células procedentes del hipocampo procedentes de fetos de ratas Wistar de 17-18 días de gestación. Las células de los cultivos primarios empleados como grupos experimentales fueron tratadas con PQ en un rango de concentraciones de entre 0,1  $\mu\text{M}$  y 40  $\mu\text{M}$ , durante 24 horas o 14 días, con o sin MF-63 (1  $\mu\text{M}$ ), con o sin N-acetilcisteína (NAC; 1 mM) y con o sin estradiol (E2; 10 nM), con el fin de evaluar los efectos tóxicos que ejerce el PQ en esta región cerebral sobre la expresión y actividad del ER, la expresión de los principales genes reguladores de la plasticidad sináptica (NMDAR1, PSD95, SYP y SPN) y de los genes implicados en la vía que regula el nivel de estrés oxidativo (NRF2, HO1, SOD1 y GPX), el contenido celular de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), de malondialdehído (MDA) y de grupos carbonilo, al igual que sobre los niveles del precursor del BDNF (proBDNF) y del BDNF maduro (mBDNF) y la expresión de genes que regulan sus rutas de señalización (TrkB, P75<sup>NTR</sup> y tPA), los niveles de COX-2, y de PGE2 y la expresión de los distintos subtipos de su receptor (EP1-4), los niveles de expresión de los genes que regulan la eliminación de proteínas anómalas (HSP70, TFEB, P20S y CD) y el efecto de todos estos factores sobre la generación de proteínas  $\beta$ -amiloideas y Tau fosforiladas (pTau), así como los efectos del silenciamiento de los genes del precursor de la proteína  $\beta$ -amiloidea ( $\beta\text{APP}$ ) y Tau, el bloqueo de la prostaglandina E2 sintasa 1 (PGES1), o el co-tratamiento con E2 y/o NAC sobre la viabilidad celular y de la interacción de todos estos mecanismos entre sí. Las células se sembraron en cubreobjetos de cristal con una densidad de  $10^6$  células/mL. Cada experimento se realizó por triplicado, empleando tres réplicas diferentes en cada uno de ellos (n=9). Por cada experimento, se utilizó un grupo tratado con dimetilsulfóxido (DMSO; 0,1%) en paralelo como grupo de control.

Las concentraciones de PQ utilizadas se seleccionaron teniendo en cuenta las concentraciones descritas en la literatura a las cuales el PQ induce muerte celular en las células del hipocampo tras el tratamiento único y repetido en cultivos celulares primarios de hipocampo (Del Pino et al., 2017) y tras inyecciones intra-hipocampales de PQ en ratas (Bagetta et al., 1992). Además, para evaluar los mecanismos mediante los cuales se produce la muerte celular se utilizó PQ a concentraciones de 10  $\mu$ M y 20  $\mu$ M, que son las concentraciones mínimas a partir de las cuales se ha descrito que el PQ induce muerte neuronal por apoptosis y necrosis, respectivamente, tras la exposición aguda en cultivos neuronales primarios de hipocampo (Del Pino et al., 2017). Por otra parte, elegimos la concentración de E2 10 nM para evaluar los posibles efectos anti-estrogénicos del PQ, porque es la concentración fisiológica presente en el hipocampo en ratas (Prange-Kiel et al., 2006). Además, se seleccionó la concentración de 1 mM de NAC para estudiar los efectos del estrés oxidativo sobre la viabilidad celular, ya que es la concentración mínima que revierte completamente el estrés oxidativo. La Figura 1 muestra el protocolo y el diseño experimental utilizado en esta investigación.



**Figura 1.** Representación esquemática del diseño experimental de la investigación.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El presente estudio demuestra, por primera vez, que el PQ no altera la expresión del ER, sino que el efecto del PQ sobre el ER se traduce en la reducción de su activación, que puede ser producida bien a través del bloqueo del sitio de unión, o bien debido a una alteración de su conformación (Fawcett et al., 2002).

Por otra parte, el PQ indujo, tras la exposición única y a largo plazo, la formación de ERO, resultando en la generación de estrés oxidativo, lo que conlleva la inducción de peroxidación lipídica y oxidación proteica, lo que deriva en la aparición de muerte neuronal y que puede conducir a alteraciones cognitivas, coincidiendo con lo descrito en la literatura (Chen et al., 2010). Además, el co-tratamiento con PQ y E2 redujo

parcialmente los niveles de ERO, lo cual sugiere que su incremento podría estar mediado por la alteración de la actividad del ER, apoyando nuestra hipótesis. Asimismo, nuestros resultados muestran que el PQ reduce la expresión del factor NRF2 y de las enzimas antioxidantes reguladas por este factor (SOD1, HO1 y GPX), pero solo tras la exposición continuada, coincidiendo con los resultados de otro estudio realizado *in vivo* (Li et al., 2016). Por su parte, el E2 revierte dicho efecto sobre la ruta NRF2, lo que indica que la inhibición de este mecanismo participa en la generación de estrés oxidativo y que la disrupción estrogénica inducida por el PQ se encuentra mediando dicho efecto, al menos, parcialmente. Por lo tanto, otros mecanismos deben actuar de forma complementaria.

Por otra parte, encontramos que el PQ disminuye los niveles de proBDNF y mBDNF tras la exposición aguda y a largo plazo, mientras que la expresión del activador tisular del plasminógeno (tPA), enzima implicada en el procesamiento de proBDNF a mBDNF (Greenberg et al., 2009), solamente se redujo tras el tratamiento continuado, lo que concuerda con lo descrito en estudios *in vivo* (Rudyk et al., 2019; Mangano et al., 2011). En este sentido, la alteración de la expresión de tPA parece mediar los efectos sobre BDNF por la exposición repetida al PQ. Además, la disrupción estrogénica, en parte a través de tPA, y el incremento de la PGE2 están implicados en la alteración de los niveles de BDNF. Asimismo, mostramos que el PQ incrementa la expresión del receptor P75<sup>NTR</sup> y disminuye la del receptor quinasa B de la tropomiosina (TrkB), y además, que estos efectos están mediados por la alteración a nivel estrogénico, parcialmente en el caso de P75<sup>NTR</sup> y completamente en el caso de TrkB, lo que conduce a la alteración de las vías de señalización de proBDNF y mBDNF.

Nuestros resultados demuestran, por primera vez, que el PQ incrementa la síntesis de PGE2 como consecuencia del aumento de la expresión de COX-2, induce la expresión

de los subtipos EP1 y EP3 del receptor de PGE2, y disminuye la del subtipo EP2. Además, mostramos que la disrupción estrogénica está implicada, en parte, en la inducción de estos efectos, lo cual concuerda con estudios que habían señalado que los estrógenos inhiben la expresión de COX-2 (Stacey et al., 2016; Menze et al., 2015) y reducen los niveles circulantes de la PGE2 (Wang et al., 2014).

Además, mostramos que la exposición única y repetida al PQ reduce la expresión de HSP70, a partir de la concentración de 20  $\mu$ M, la actividad de P20S y la expresión de TFEB, los cuales median la autofagia mediada por chaperonas (AMC) y la vía de autofagia lisosomal (ALP), respectivamente, que son mecanismos celulares por los cuales se eliminan proteínas citotóxicas, como las proteínas A $\beta$  y pTau. En relación a estas proteínas, nuestros resultados muestran que el aumento de los niveles de estas proteínas inducido por el PQ, tras la exposición única y prolongada, está mediado por la disrupción estrogénica, la alteración de las rutas de señalización celular en las que intervienen la PGE2 y el BDNF, la inducción del estrés oxidativo, y la inhibición de los mecanismos encargados de la eliminación de estas proteínas tóxicas, lo que podría explicar los efectos observados.

Por otra parte, el PQ también ejerce, tras la exposición aguda y reiterada, un efecto negativo sobre el desarrollo de las terminaciones dendríticas de las neuronas, ya que disminuye la expresión de las proteínas sinápticas, como el receptor de N-metil-D-aspartato 1 (NMDAR1), proteína de densidad postsináptica 95 (PSD95), sinaptofisina (SYP) y espinofilina (SPN), las cuales se han descrito como fundamentales en la plasticidad sináptica (Glantz et al., 2007; Li et al., 2011), por lo que, en definitiva, esta alteración puede ser la causa de disfunción de su formación, de la reducción de su densidad y del mecanismo de plasticidad sináptica.

Finalmente, el PQ produjo una disminución de la viabilidad de las células de los cultivos primarios, induciendo muerte neuronal a través de los mecanismos de apoptosis y los de necrosis, tras la exposición única y reiterada, manifestándose a través del aumento de la activación de las caspasas 3/7 y de la liberación de lactato-deshidrogenasa (LDH), respectivamente. Además, nuestros resultados indican que el estrés oxidativo, las alteraciones a nivel estrogénico y el incremento de los niveles de las proteínas  $\beta$ -amiloideas y pTau están involucrados en la inducción de la muerte celular en el hipocampo. Asimismo, observamos que el PQ produce un aumento de los niveles de PGE2, así como una disminución de los de mBDNF, especialmente marcada tras la exposición repetida, lo que induce, en ambos casos, en parte, la muerte celular originada por el PQ. Por último, nuestros resultados ponen de manifiesto que el PQ provoca la inhibición de la actividad del P20S y la disminución de la expresión de TFEB y HSP70, mediando también, en parte, la muerte celular, consecuencia de la acumulación de proteínas  $\beta$ -amiloideas y Tau. Sin embargo, estos mecanismos no son capaces de explicar en su totalidad la muerte celular observada, lo que nos indica que deben existir otros mecanismos implicados en su inducción.

## **CONCLUSIONES**

El PQ induce muerte celular de las neuronas del hipocampo, mediada, en parte, por la generación de ERO, que inducen un estado de estrés oxidativo celular en las neuronas, y la acumulación de proteínas  $\beta$ -amiloideas y Tau, las cuales ejercen acciones citotóxicas. Estos efectos, a su vez, están producidos por la disminución de los niveles del mBDNF y el receptor TrkB, mediante el cual realiza su acción neuroprotectora; la sobreexpresión de P75<sup>NTR</sup>, mediante el cual el proBDNF realiza un efecto antagónico a mBDNF; y por el aumento de los niveles de la PGE2 y de la expresión de subtipos EP1

y EP3 de su receptor, mediante los cuales ejerce un efecto negativo sobre la viabilidad celular. Además, el PQ inhibe los mecanismos de eliminación de estas proteínas, lo que también favorece su acumulación. Por otra parte, el PQ también reduce la expresión de las proteínas que regulan la formación, densidad y funcionalidad de las espinas dendríticas de las neuronas. Asimismo, todos estos mecanismos descritos que median la muerte celular observada en las neuronas del hipocampo están inducidos, en parte, a través de la disrupción estrogénica que provoca el PQ.

Todos estos efectos podrían explicar las alteraciones cognitivas en los procesos de memoria y aprendizaje descritas causadas por el PQ. Sin embargo, los mecanismos descritos no justifican la totalidad de la muerte celular observada. Por lo tanto, deben desarrollarse estudios posteriores para determinar el resto de los mecanismos implicados en los efectos observados y validar estos resultados *in vivo*. Estos resultados resultan de interés porque aportan nuevos datos acerca de los mecanismos que median la inducción de muerte celular y que puedan explicar los déficits cognitivos descritos tras la exposición al PQ, además de para determinar dianas terapéuticas útiles en el tratamiento de intoxicaciones con este herbicida y frente a enfermedades neurodegenerativas.

# **JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

## **DEL TRABAJO**

## **1. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DEL TRABAJO**

La exposición a ciertos herbicidas supone un riesgo para la salud de la población y de los animales, especialmente en cuanto a su posible implicación en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas. En el caso concreto del PQ, se ha probado que la intoxicación aguda y crónica con este tóxico ocasionan déficits de memoria y en el aprendizaje en ratones. Estas alteraciones cognitivas son similares a las que se producen en la enfermedad de Alzheimer (EA), por lo que la exposición al PQ puede suponer un factor de riesgo en el desarrollo de esta enfermedad. Sin embargo, los mecanismos por los cuales se generan estos efectos no están bien determinados.

Los procesos de memoria y aprendizaje están regulados por el sistema colinérgico, en el que intervienen neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal, que inervan el hipocampo, y la corteza frontal, mediando dichos procesos. Por lo tanto, una alteración en la transmisión colinérgica o la disminución del número de neuronas colinérgicas en estas regiones pueden inducir alteraciones cognitivas. En este sentido, se ha descrito que el PQ genera estrés oxidativo en las neuronas y astrocitos de varias regiones cerebrales, entre las que se incluye el hipocampo, lo que se ha relacionado a su vez con la producción de proteínas  $\beta$ -amiloideas y Tau, la muerte de estos tipos celulares y el desarrollo de déficits cognitivos. Asimismo, se ha descrito que el PQ inhibe la actividad de las proteínas de choque térmico (HSP70) y del proteasoma 20S (P20S), lo cual también se ha relacionado con el incremento de las proteínas  $\beta$ -amiloideas y Tau, y por lo tanto, dicha inhibición podría participar en la inducción de muerte neuronal y originar alteraciones de los procesos cognitivos. También se ha descrito que el PQ reduce los niveles de factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en el hipocampo de ratones tras exposiciones repetidas, lo cual se ha relacionado con una reducción de la viabilidad

de las neuronas del hipocampo, el incremento del estrés oxidativo y de la producción de proteínas  $\beta$ -amiloideas y Tau. Además, se ha descrito que el PQ induce la expresión de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) tras exposiciones agudas y repetidas, tanto *in vivo* como *in vitro*. La COX-2 participa en la síntesis de prostaglandina E2 (PGE2), cuya sobreproducción se ha relacionado también con la inducción de muerte neuronal en el hipocampo, estrés oxidativo y formación de proteínas  $\beta$ -amiloideas y Tau, por lo que podría influir en la generación de defectos cognitivos. Por otra parte, se ha descrito que el PQ produce alteraciones en el número, forma y densidad de las terminaciones dendríticas de las neuronas tras exposiciones repetidas a éste, lo que se ha relacionado con la aparición de desórdenes cognitivos, ya que las espinas de las terminaciones dendríticas intervienen en la correcta regulación de los procesos de plasticidad sináptica, y su alteración podría influir en el desarrollo de estos déficits en la memoria y el aprendizaje. Por último, se ha descrito que los estrógenos intervienen en la regulación de los niveles de enzimas antioxidantes y el nivel de BDNF, regulan los procesos de plasticidad sináptica y previenen la inducción de muerte neuronal evitando el aumento de las proteínas  $\beta$ -amiloideas y Tau. La administración conjunta de estrógenos y PQ se ha descrito que induce la disminución de los daños derivados del estrés oxidativo, sugiriendo un posible efecto anti-estrogénico del PQ y por tanto de la posible mediación de los mecanismos comentados a través de la disrupción estrogénica.

El interés de la presente tesis se enfoca en aportar información nueva sobre la toxicidad y los mecanismos de acción neurotóxicos a nivel molecular del PQ, que puedan explicar los efectos observados a nivel del sistema nervioso central (SNC) tras exposiciones a este herbicida y que son similares a los observados en enfermedades neurodegenerativas, como es la EA. Por otro lado, estos datos pueden resultar de utilidad en la realización de evaluaciones del riesgo para este compuesto en el futuro,

permitiendo un ajuste más preciso de las medidas de gestión del riesgo en relación a este compuesto. Además, este estudio puede permitir determinar dianas terapéuticas útiles en el tratamiento frente a intoxicaciones debidas al PQ, al igual que para la prevención y el desarrollo de tratamientos frente a enfermedades neurodegenerativas.

A partir de todo lo descrito, en primer lugar, hipotetizamos que el PQ puede actuar como disruptor estrogénico, induciendo alteraciones de las proteínas sinápticas y muerte celular en neuronas del hipocampo, mediadas por la generación de estrés oxidativo y la formación de proteínas  $\beta$ -amiloidea y Tau fosforilada, tras la exposición única y repetida a este compuesto.

En segundo lugar, hipotetizamos que el PQ podría alterar las vías de señalización de PGE2 y BDNF a través de la disrupción estrogénica en el hipocampo, lo cual derivaría en muerte celular, debida al estrés oxidativo generado y a la producción de las proteínas  $\beta$ -amiloidea y Tau, tanto tras tratamientos agudos como repetidos.

En tercer lugar, hipotetizamos que el PQ podría inhibir el proteasoma 20S y alterar la expresión de las HSP70 y de TFEB, favoreciendo la acumulación de proteínas tóxicas, como  $\beta$ -amiloidea y Tau fosforilada, lo que deriva en la pérdida de neuronas en el hipocampo.

Para comprobar estas hipótesis, nuestros objetivos consistieron en evaluar los efectos del PQ en neuronas procedentes de cultivos primarios de hipocampo, transfectadas o no con ARNsi frente a los genes que codifican  $\beta$ APP y Tau, tras 24 horas y 14 días de exposición sobre:

1. La actividad del receptor estrogénico.

2. La expresión génica y proteica de proteínas que regulan la morfología y número de las espinas dendríticas y la implicación de la disfunción del receptor estrogénico en la alteración de las mismas.
3. La generación de radicales oxidantes y estrés oxidativo, los mecanismos que conducen a su generación y en especial sobre la implicación de la disfunción del receptor estrogénico en su producción.
4. Los niveles de BDNF y PGE2, la expresión de los receptores de PGE2, los mecanismos que conducen a su generación y en especial sobre la implicación de la disfunción del receptor estrogénico.
5. La producción de proteínas  $\beta$ -amiloidea y Tau, los mecanismos que conducen a su generación y en especial sobre la implicación de la disfunción del receptor estrogénico sobre su producción.
6. La actividad del P20S y la expresión de HSP70 y TFEB.
7. La viabilidad neuronal y la influencia que los factores anteriores ejercen en la inducción de muerte neuronal, así como los mecanismos por los cuales se produce dicha muerte.

# **INTRODUCCIÓN**

## **2. INTRODUCCIÓN**

Desde mediados del siglo XIX se ha venido produciendo un importante desarrollo económico y demográfico a nivel mundial. Este hecho ha requerido un incremento notable de las necesidades de producción de alimentos con el fin de abastecer a una población cada vez más numerosa.

En definitiva, estas exigencias han derivado en la necesidad de mejorar los sistemas de producción de alimentos, no solo a nivel de la producción primaria, sino también a nivel de la transformación, almacenamiento y distribución de los mismos. Cabe añadir que, a la exigencia inicial de producir mayor cantidad de alimentos, se ha unido, en la actualidad, la exigencia sanitaria desde el punto de vista de la calidad y seguridad alimentaria.

Por lo tanto, la mejora de los sistemas de producción alimentaria debe aunar todos estos requisitos, consiguiendo un equilibrio entre el incremento de la cantidad de alimentos producidos, que deben ser seguros para el consumidor, y rentables para el productor, sin dejar al margen la sostenibilidad desde el punto de vista medioambiental.

A nivel de la producción primaria agrícola, y con el fin de alcanzar estos objetivos, es fundamental maximizar la producción y minimizar las pérdidas en los cultivos. Estas pérdidas pueden deberse a diversos factores, entre los que destacan los factores climáticos (temperaturas extremadamente bajas o altas, escasez de precipitaciones y otras condiciones meteorológicas adversas, como granizadas) y los factores bióticos que afectan a la viabilidad de los cultivos (plagas de insectos, roedores, aves, hongos, bacterias, virus, especies de plantas indeseables...).

Los efectos de estos últimos adquieren tal importancia, que se ha estimado a nivel mundial, que las pérdidas producidas por la acción de plagas y otros patógenos alcanzan el 21,5% en cultivos de trigo, 30% en cultivos de arroz, 22,5% en cultivos de maíz, 17,2% en los de patata y 21,4% en los de soja (Savary et al., 2019). Por este motivo, para combatir y reducir las pérdidas en la producción primaria debidas a estos factores bióticos, se ha hecho necesario el desarrollo de una serie de compuestos químicos denominados plaguicidas.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) entiende los plaguicidas como productos químicos utilizados para proteger los cultivos contra hongos, insectos, otros vegetales y otros tipos de plagas en el ámbito de la agricultura. Asimismo, se emplean para proteger la Salud Pública mediante su uso para el control de mosquitos y otros vectores transmisores de enfermedades.

Por su parte, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) ofrece una definición más completa, definiéndolos como *“cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo los vectores de enfermedades humanas o de los animales, las especies de plantas o animales indeseables que causan perjuicio o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y productos de madera o alimentos para animales, o que pueden administrarse a los animales para combatir insectos, arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos”*. El término incluye, entre otras, las sustancias destinadas a utilizarse como reguladoras del crecimiento de las plantas, y que se denominan como herbicidas. Entre las diferentes sustancias incluidas en el grupo de los herbicidas, se encuentra el dicloruro de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilo, más conocido como paraquat (PQ), el cual es objeto de estudio de la presente tesis.

En este punto es preciso indicar que, si bien se suele hablar generalmente de plaguicidas, el término más correcto desde el punto de vista técnico para definir a lo que se denomina comúnmente como “plaguicida” es el de “producto fitosanitario”. Este matiz se debe a que, normativamente, el término “plaguicida” se emplea para denominar a un grupo de biocidas, dentro de los cuales no se incluyen los productos fitosanitarios propiamente dichos.

Por todo lo indicado anteriormente, los productos fitosanitarios se constituyen como medios fundamentales en la producción agrícola, tanto en los sistemas convencionales de agricultura, como en los sistemas de agricultura integrada, ya que los daños potenciales que pueden ocasionar los diferentes tipos de plagas provocarían una reducción drástica de la producción de muchos cultivos en zonas de producción de gran interés económico y/o social e, incluso, podrían conllevar la imposibilidad de mantener almacenadas las materias primas recolectadas.

Sin embargo, a pesar de sus innegables beneficios e importantes y variadas utilidades, estos compuestos también son potencialmente tóxicos para la salud de los seres humanos y animales, pudiendo generar múltiples trastornos a nivel reproductivo, inmunitario o nervioso, o provocar la aparición de tumores, entre otros.

Tanto es así, que el uso extendido de estos productos ha generado problemas de salud e incluso muertes en muchas partes del mundo, consecuencia de la exposición laboral directa de los manipuladores que utilizan estos productos, o bien, de la intoxicación accidental o deliberada. En este sentido, múltiples estudios han relacionado la exposición a ciertos herbicidas con el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas. Es más, en el caso del PQ, se ha descrito que la exposición a este herbicida está asociada al desarrollo de la enfermedad de Parkinson, actuando como factor de riesgo.

Además, también se ha descrito que la exposición al PQ induce la aparición de déficits de memoria y aprendizaje, por lo que se ha sugerido que puede tener un papel importante en la enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, en la actualidad, poco se conoce acerca de los mecanismos a través de los cuales el PQ podría producir daño neuronal y promover la patogénesis de esta enfermedad.

Por otra parte, los productos fitosanitarios y sus residuos pueden quedar acumulados y persistir en el medio ambiente, produciendo contaminación ambiental, pudiendo llegar a aparecer en agua y alimentos como contaminantes y constituir una fuente de exposición indirecta para las personas a través de la ingestión de los mismos.

Independientemente de la vía de exposición, los plaguicidas tienen un impacto evidente en la salud mundial. A modo de ejemplo, según señaló la OMS en 2002, se ha calculado que el suicidio por ingestión prevenible de un plaguicida ha causado alrededor de 186.000 muertes, y ha supuesto 4.420.000 años de vida ajustados por discapacidad (DALY), es decir, el número de años perdidos debido a enfermedad, discapacidad o muerte prematura a nivel global, lo cual ilustra la trascendencia sanitaria de estos productos.

# **REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1. Paraquat**

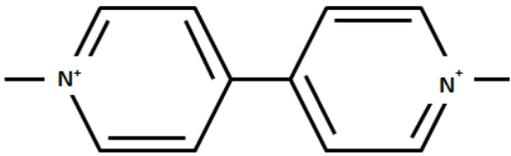
El paraquat (PQ) es un herbicida de contacto, no selectivo, desecante y de acción rápida ampliamente utilizado en el mundo (Smith and Heath, 1976; Lou et al., 2016). Este herbicida pertenece a la familia de los bipyridilos, dentro de la cual también se encuentra otro compuesto denominado diquat. Los herbicidas bipyridílicos se clasifican por su mecanismo de acción como desviadores del fotosistema 1 (Dinis-Oliveira et al., 2006), interfiriendo en la fotosíntesis y produciendo radicales libres que oxidan y dañan las proteínas de membrana de las células vegetales (Dinis-Oliveira et al., 2006; Wirdefeldt et al., 2011). Generalmente se utilizan como desecantes para el control de malezas antes o después de la plantación y se aplican por aspersión para que alcancen las partes aéreas de la planta por las cuales el compuesto se internaliza rápidamente (FAO, 2008; JMPR, 2003). Otra de sus características reside en que los bipyridilos son cationes que se fijan fuertemente a los coloides del suelo, lo cual implica su inactivación, no quedando residuos biológicamente activos en el suelo (Bonavía et al., 1991; Dinis-Oliveira et al., 2006; Watts, 2011).

Este compuesto fue sintetizado por primera vez en 1882 por Weidel y Russo (Serra et al., 2003) y sus propiedades como herbicida fueron descubiertas en 1955 (Serra et al., 2003; Sagar, 1987), aunque no fue hasta 1962 cuando se empezó a comercializar para uso agrícola bajo el nombre comercial de Gramoxone® (Serra et al., 2003; Dinis-Oliveira et al., 2008; Watts, 2011) en forma de dicloruro de paraquat en formulación del 20% (peso/volumen) (Serra et al., 2003), siendo China el mayor productor mundial de este producto, con más de 100.000 toneladas anuales (Watts, 2011). Actualmente, a pesar de que el uso de este herbicida está prohibido en la Unión Europea (UE) y, por

tanto en España, desde 2007 a partir de la sentencia del Tribunal de Primera Instancia de la CE que anuló la Directiva 2003/112/CE, el PQ sigue siendo utilizado en varios países, de entre los cuales cobra gran importancia Estados Unidos. Este hecho, junto al elevado volumen actual de comercio internacional de productos alimenticios de origen vegetal procedentes de estos países, suponen un riesgo para la población europea debido a las implicaciones toxicológicas que conlleva la exposición a dicho compuesto, aun no siendo utilizado en Europa.

El PQ como principio activo es una sustancia sólida, higroscópica, cristalina, blanca y no volátil (Watts et al., 2011; IPCS, 2012). Este compuesto no es inflamable en solución acuosa, aunque sí emite gases tóxicos e irritantes, descomponiéndose por encima de los 300°C. Una de sus propiedades más relevantes para abordar el estudio posterior de su toxicocinética y toxicidad es que posee una elevada solubilidad en agua (Serra et al., 2003; IPCS, 2012). En la Tabla 1 se muestran las propiedades físico-químicas principales del PQ.

**Tabla 1.** Principales propiedades físico-químicas del PQ. (IPCS, 2012, European Commission, 2016; Watts et al., 2011).

Nombre químico	1,1'-dimetil-4,4'-ion de biperidilo
Fórmula estructural	
Fórmula empírica	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
Peso molecular	257 g/mol
Solubilidad en agua (a 20°C)	620 g/L

**Tabla 1** (Continuación). Principales propiedades físico-químicas del PQ. (IPCS, 2012, European Commission, 2016).

Solubilidad en solventes orgánicos (a 20°C)	143 g/L en metanol <0,1 g/L en otros solventes (acetona, hexano...)
Densidad relativa (a 25°C)	1,13 g/cm <sup>3</sup>
Estabilidad en función del pH	Estable a pH ácido Estable a pH neutro Se hidroliza a pH alcalino
pH	6,4
Punto de fusión	340 °C aproximadamente
Punto de ebullición	340 °C aproximadamente
Termoestabilidad	Se descompone a 340°C
Presión de vapor	1 x 10 <sup>-9</sup> mmHg
Fotoestabilidad	Inestable en solución acuosa
Constante de disociación	Ión de paraquat no se disocia

### 3.2. Toxicocinética

#### 3.2.1. Absorción

Las principales vías de exposición, y por tanto, de absorción del PQ son la dérmica o cutánea, oral, inhalatoria y ocular. De estas vías, cobran especial relevancia dos de ellas. En primer lugar, la vía dérmica por exposición cutánea al compuesto, la cual destaca por ser la más frecuente. Sin embargo, la absorción de PQ por esta vía es mínima si la piel se encuentra intacta y no existe una patología dermatológica previa (Smith, 1988; Watts,

2011), alcanzando únicamente entre un 0,3% (Wester et al., 1984) y un 0,5% de la dosis inicial en las primeras 24 horas (Wirdefeldt et al., 2011).

Por otro lado, la vía oral, es la principal vía de intoxicación y la más efectiva, ya sea la ingestión accidental o voluntaria (Diss et al., 2016; Watts, 2011). En un estudio realizado en asas intestinales de rata, se observó una absorción del 47% y 37% de la dosis inicial de PQ en duodeno e íleon, respectivamente, tras 1 hora (Nagao et al., 1993). En otro estudio, se determinó que la absorción del PQ se produce principalmente en yeyuno (17%) e íleon (10%), seguidos de colon (5,7%) y duodeno (5,5%) (Heylings, 1991). Por el contrario, otro estudio realizado en ratones señala que el colon es la región del tracto gastrointestinal donde se absorbe el PQ en mayor medida respecto al resto de tramos (Diss et al., 2016).

La mayor eficacia de absorción mediante esta vía se debe a que el PQ se internaliza en los enterocitos a través de varios transportadores de membrana situados en su cara apical, como son el sistema transportador mediado por colina (Nagao et al., 1993; Silva et al., 2015) y otros transportadores de aminoácidos básicos (Silva et al., 2015).

Una vez absorbido, el pico de concentración ( $C_{max}$ ) en sangre se produce a los 20 minutos ( $T_{max}$ ) de administrarse la dosis por vía subcutánea, según un estudio realizado en ratas Sprague-Dawley (Dey et al., 1990). Sin embargo, en otro estudio realizado en ratones, a los cuales se les administró PQ vía intraperitoneal, el tiempo en alcanzarse la  $C_{max}$  en sangre fue de 12 minutos (Breckenridge et al., 2013). Por su parte, en otro estudio se mostró que la  $C_{max}$  se produjo a los 30-60 minutos tras la administración vía subcutánea, manteniéndose estable durante 32 horas (Daniel y Gage, 1966).

### 3.2.2. Distribución

Una vez que el PQ es absorbido y llega al torrente sanguíneo, se va a distribuir rápidamente por todo el organismo, llegando a todos los órganos y tejidos. El PQ no se liga a proteínas plasmáticas, lo cual hace que tenga un volumen de distribución elevado, de aproximadamente 1-2 L/kg (Serra et al., 2003).

Los órganos en los cuales se alcanzan concentraciones más elevadas de PQ son el riñón (359 nmol/g) y el pulmón (65 nmol/g), utilizando una dosis de 72  $\mu$ mol/kg (Dey et al., 1990). Sin embargo, uno de los órganos donde el PQ produce efectos de gran importancia, y que a su vez presenta unas características muy particulares, es el encéfalo.

En primer lugar, es importante destacar que la  $C_{max}$  en el tejido nervioso se alcanza a los 15 minutos tras la administración de cada dosis de PQ (Breckenridge et al., 2013), lo cual indica que el paso de este tóxico al SNC se produce rápidamente post-administración y da los primeros indicios de su gran afinidad por este tipo de tejido. Por otra parte, tal como reflejan las propiedades fisico-químicas (ver Tabla 1), el PQ se caracteriza por presentar una solubilidad muy superior en agua y solventes polares que en solventes orgánicos, es decir, destaca por poseer un carácter hidrofílico, el cual no facilitaría su paso al SNC a través de la barrera hematoencefálica (BHE). A pesar de ello, el PQ presenta un coeficiente de distribución o de partición elevado, que es propio de compuestos hidrofóbicos.

La explicación a este hecho reside en que esta gran afinidad por el tejido nervioso no viene determinada por una mayor lipofilia del compuesto o por una alteración funcional de la capacidad protectora de la BHE producida por el propio tóxico, sino que se debe a la presencia de diferentes tipos de transportadores en la BHE que facilitan su rápido

paso al encéfalo a través de ella, como son los transportadores de aminoácidos neutros dependiente de sodio (Shimizu et al., 2001), así como transportadores a nivel de la membrana plasmática de las neuronas que facilitan su entrada a las mismas, como se verá más adelante.

Además, se ha demostrado que la administración de dosis repetidas de PQ tiene como resultado la aparición de concentraciones más elevadas en el cerebro que la administración de dosis únicas, lo cual indica que este compuesto sufre un fenómeno de acumulación en este órgano (Widdowson et al., 1996).

Dentro del mismo, se pueden diferenciar dos compartimentos en el encéfalo según la cobertura de la BHE, estableciéndose un modelo bicompartimental para explicar la toxicocinética del PQ: por una parte, aquellas regiones cerebrales que se encuentran fuera de la BHE, y por otra, las regiones que se encuentran protegidas por ella, ya que van a presentar diferencias en cuanto a la distribución del tóxico debido al efecto protector y de filtro que ejerce la BHE ante el paso del PQ. En general, estructuras que se encuentran fuera, como el bulbo olfatorio o glándula pineal, se alcanzan concentraciones dos veces superiores a las de estructuras protegidas por la BHE, como el telencéfalo, mesencéfalo y cerebelo (Breckenridge et al., 2013).

En relación a esto, se han estudiado las diferentes concentraciones que se alcanzan en diferentes regiones cerebrales protegidas por la BHE en ratas. Transcurrida la primera hora tras la administración subcutánea de una dosis de 5 mg/kg, las concentraciones superiores inicialmente se determinan en hipotálamo (0,721 pg/g), corteza frontal (1,047 pg/g) e hipocampo (0,177 pg/g) (Corasaniti et al., 1998). Estos resultados están respaldados por los de otros estudios, indicando que este tóxico se acumula en el hipocampo y corteza frontal (Corasaniti et al., 1992; Corasaniti y Nistico, 1993; Prasad

et al., 2009), las cuales son regiones cerebrales fundamentales en el control de las funciones cognitivas (Preston y Eichenbaum, 2013).

Posteriormente, y también tras dosis repetidas, se observa un incremento de la concentración de PQ en ciertas regiones, como el hipocampo, mientras que disminuye en otras, lo que da indicios de procesos de redistribución dentro del cerebro (Corasaniti et al., 1998), lo que puede derivar en toxicidad selectiva en estas regiones específicas, o bien, en efectos tóxicos más pronunciados en dichas regiones.

Por otra parte, la edad puede ser un factor importante en el paso del PQ a través de la BHE, ya que se ha visto que se alcanzan concentraciones superiores de este herbicida en ratas muy jóvenes (menos de dos semanas de edad) y más mayores (de más 2 años de edad) en comparación a las encontradas en ratas adultas (3 meses de edad), lo cual sugiere que los cambios en la permeabilidad de la BHE dependientes de la edad juegan un papel importante en el acceso del compuesto al SNC (Corasaniti et al., 1991).

### **3.2.3. Metabolismo y eliminación**

En términos generales, el PQ no es metabolizado en el organismo, apareciendo sin modificar en la mayoría de los tejidos, y eliminándose directamente sin sufrir cambios en su estructura molecular (Serra et al., 2003); si bien en algunos estudios se han encontrado pequeñas cantidades de metabolitos derivados del PQ, tales como el 1-metil-(4'-piridil) en orina en ratas (Daniel y Gage, 1966; Lythgoe y Howard, 1995) y en hígado y riñón en gallinas, y el ión 1-metil-(4'-piridil) piridinio en hígado en cabras (JMPR, 2003).

La eliminación del PQ, de forma muy similar al resto de sustancias, se produce en dos fases. En primer lugar, se produce una fase inicial rápida en la cual se elimina una parte de la dosis inicial directamente desde la sangre. En segundo lugar, se produce el paso

lento y sostenido del PQ desde todos los tejidos hacia el torrente sanguíneo, dando lugar a la fase final lenta, para ser eliminado definitivamente desde la sangre posteriormente.

Por otra parte, la velocidad con la que ocurre cada una de estas fases viene determinada por la semivida de eliminación, entendida como el tiempo que transcurre hasta eliminar el 50% de la dosis absorbida. Por lo tanto, se ha requerido del cálculo de dos semividas de eliminación, una para cada una de las fases. En este sentido, se ha obtenido una semivida de eliminación de 17 minutos para la fase inicial (Breckenridge et al., 2013), mientras que en otro estudio se determinó una semivida de eliminación para esta fase más prolongada, de 40 horas aproximadamente (Dey et al., 1990).

Sin embargo, la segunda fase o fase final de eliminación desde los tejidos se produce a una velocidad notablemente inferior a la de la fase inicial. Esta diferencia es aún más acusada en el caso de la eliminación desde el tejido nervioso, donde se ha establecido que la semivida de eliminación del PQ del cerebro es de 24 días (Breckenridge et al., 2013), mientras que en otro estudio se determinó que esta semivida tenía una duración de alrededor de 30 días (Prasad et al., 2009). De esta forma, cabe deducir que para eliminar el 90% de la concentración en este órgano deben transcurrir 3,32 semividas de eliminación, y 6,64 para eliminar un 99% de la misma, es decir, 80 y 160 días desde la última dosis, respectivamente (Breckenridge et al., 2013).

El PQ es eliminado fundamentalmente a través de dos vías: urinaria (Serra et al., 2003; Daniel y Gage, 1966) y fecal (Daniel y Cage, 1966). Sin embargo, la proporción de PQ eliminado por cada una de estas vías varía en función de la vía por la cual es administrado. Así, por vía oral, entre el 75-90% de la dosis se elimina en heces, mientras solo un 10-20% se elimina en la orina. Por el contrario, en el caso de ser administrado vía subcutánea, la mayor parte de la dosis (73-88%) se elimina por la orina

y solo un 2-14% a través de las heces. También se ha visto que la excreción biliar es prácticamente nula (Daniel y Gage, 1966). En relación con el mecanismo de eliminación por vía urinaria, estudios realizados en ratas Wistar han demostrado que la eliminación del PQ se produce de forma activa por excreción mediante un sistema transportador de cationes en mayor medida que por filtración glomerular (Chan et al., 1997).

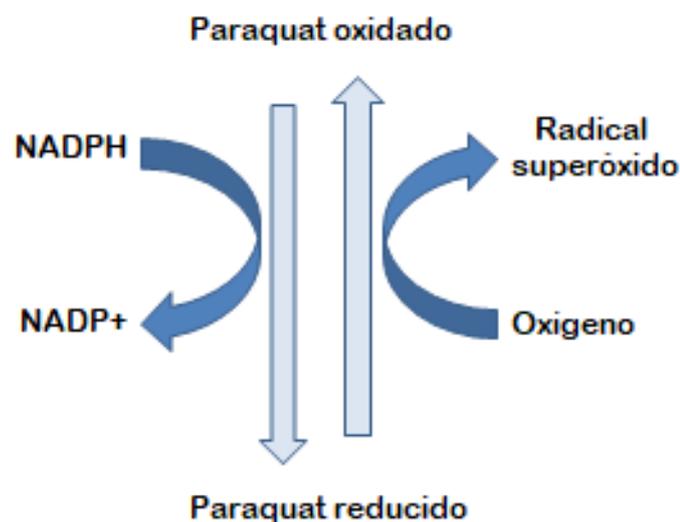
Respecto a su eficacia, un estudio señala que el 85% de la dosis es eliminada en orina transcurridos 7 días tras la administración, calculándose una semivida de eliminación de 40,9 horas (Dey et al., 1990). Sin embargo, otro estudio eleva este porcentaje de eliminación hasta más del 90% eliminado en tan solo 72 horas (Lythgoe y Howard, 1995).

### **3.3.Mecanismo de acción**

El mecanismo de acción del PQ como herbicida se basa en la generación de radicales superóxido que destruyen la membrana de las células, produciendo la desecación de las hojas. El PQ compite con la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP) por los electrones; de esta forma, el PQ se transforma en metilviógeno, que es un radical libre que reacciona con el oxígeno para regenerar el PQ, a la vez que se producen estas especies reactivas de oxígeno (ERO) (Bonavía et al., 1991).

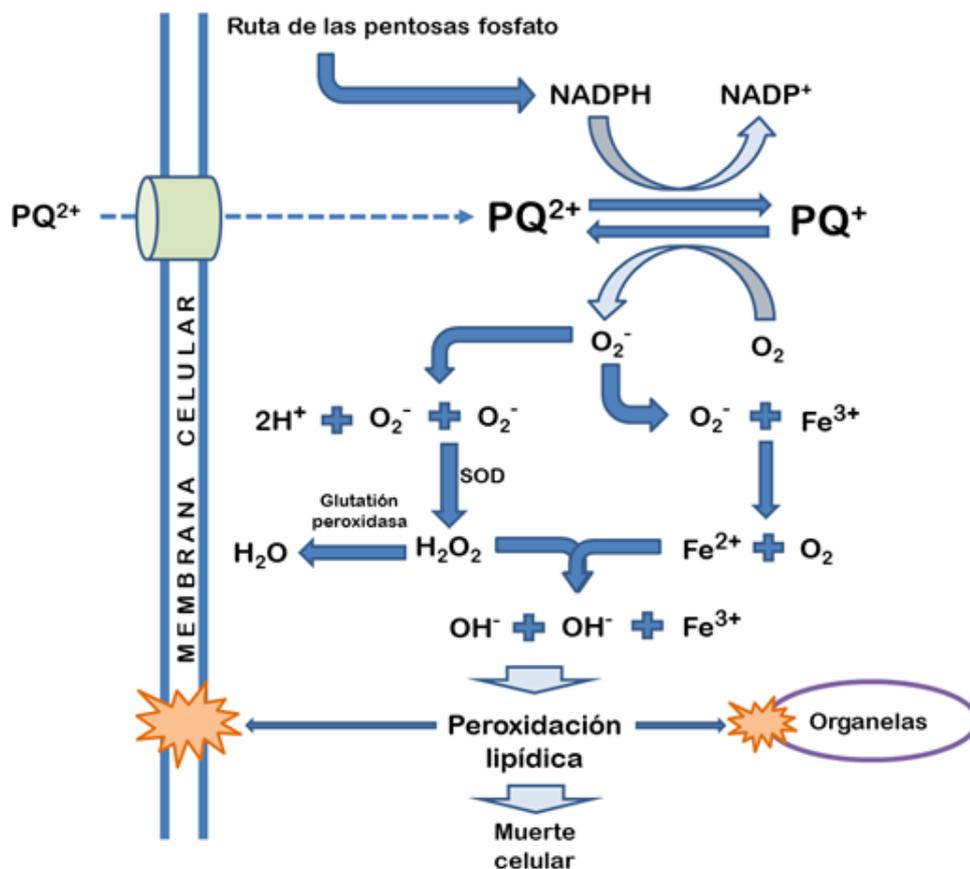
En vertebrados superiores, el PQ, reducido gracias al NADPH, se reoxida por medio del oxígeno, generando radicales superóxidos que oxidan y dañan los lípidos que conforman la membrana celular, lesionándolas. Este mecanismo, no solo lesiona las células, especialmente las alveolares, sino que también interfiere con la función surfactante pulmonar. El daño celular se manifiesta inicialmente por inflamación y edema, y finalmente, fibrosis. (Bonavía et al., 1991).

El mecanismo de acción tóxica del PQ a nivel pulmonar es el mejor estudiado. El PQ se transporta activamente mediante un sistema transportador de poliaminas, que se expresa abundantemente en la membrana de las células de Clara y los neumocitos tipo I y II (Dinis-Oliveira et al., 2008), acumulándose en sus interior (Fase 1). El PQ actúa como receptor de electrones reduciéndose, lo cual oxida el NADPH, aumentando la tasa de oxidación en estas células. A continuación, los radicales de PQ reducidos reaccionan con el oxígeno ( $O_2$ ), generando iones superóxido, los cuales son radicales muy inestables y de gran reactividad que producen daño tisular (Fase 2) (McKeag et al., 2002; Serra et al., 2003; Dinis-Oliveira et al., 2008). Este mecanismo se puede aplicar del mismo modo a los hepatocitos y células renales. Todas estas reacciones están catalizadas por la enzima reductasa microsomal del citocromo P450 (Serra et al., 2003).



**Figura 2.** Ciclo de oxidación-reducción del PQ (McKeag et al., 2002).

Como mecanismo de defensa, las células poseen una enzima denominada superóxido-dismutasa (SOD), la cual metaboliza los radicales superóxido a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) mediante la reacción de Haber-Weiss (Fase 3), que también lesiona la membrana plasmática de las células al producir una peroxidación de los lípidos de membrana (Fase 4) (Serra et al., 2003; Dinis-Oliveira et al., 2008). Además, no solo se lesiona la membrana plasmática, sino que también afecta a las membranas de las organelas y mitocondrias (Yamada y Fukushima, 1996). En este sentido, el PQ altera la permeabilidad de la membrana interna de las mitocondrias debido a su capacidad de desestabilizar la apertura de canales MTP presentes en esta membrana (Constantini et al., 1995).



**Figura 3.** Mecanismo de acción del PQ (Serra et al, 2003; Dinis-Oliveira et al., 2008).

Como consecuencia de las lesiones de los neumocitos alveolares, se produce una fibrosis crónica pulmonar generalizada (Fase 5) (Serra et al., 2003).

A nivel del sistema gastrointestinal, el PQ produce de forma selectiva una atenuación de las rutas de señalización en las que el óxido nítrico (NO) actúa como neurotransmisor, como ocurre en el plexo mioentérico, debido a su potencial oxidante. Esto se traduce en una disminución de la motilidad intestinal, ralentizando el tránsito digestivo y favoreciendo, a su vez, la absorción de mayor cantidad de PQ (Diss et al., 2016).

### **3.3.1. Mecanismo de acción neurotóxico**

Como se ha descrito anteriormente, el PQ penetra y se acumula en el SNC gracias a la facilidad con la que atraviesa la BHE, debido a la presencia de los transportadores de aminoácidos neutros dependientes de sodio, principalmente (Shimizu et al., 2001).

Una vez se encuentra en el tejido nervioso, el PQ es reducido mediante enzimas extracelulares como la NADPH-oxidasa 2 (NOX-2) de las células de microglía (Zhang et al., 2016). A continuación, la entrada del PQ reducido en las neuronas se puede producir a través de varios transportadores que tienen esta molécula como sustrato. Entre ellos, destacan el transportador de dopamina (DAT), especialmente importante en las neuronas dopaminérgicas, ya que es el transportador principal que media la entrada del PQ en este tipo de neuronas (Rappold et al., 2011; Shimizu et al., 2001) y el transportador de cationes orgánicos-3 (OCT-3) (Rappold et al., 2011; Prasad et al., 2009). El OCT-3 es un transportador bidireccional que se expresa en las neuronas y, con un nivel de expresión muy importante, en astrocitos y neuronas GABAérgicas de la sustancia negra y cuerpo estriado (Rappold et al., 2011). En relación a la participación del DAT, también se ha señalado que el PQ no es sustrato ni tiene afinidad por este transportador (Richardson et al., 2005); sin embargo, existen evidencias de que el DAT

sí está implicado, ya que se ha descrito que inhibidores selectivos del DAT disminuyen la captación de PQ en las neuronas dopaminérgicas (Rappold et al., 2011; Shimizu et al., 2003).

De este modo, el PQ reducido se acumula en el citoplasma neuronal y altera el equilibrio oxidación-reducción intracelular, derivando en la generación de especies reactivas de oxígeno y radicales superóxido, que van a inducir un estado de estrés oxidativo en las neuronas y astrocitos y que, en definitiva, va a desencadenar su degeneración debido a su efecto neurotóxico (Rappold et al., 2011; Chinta et al., 2018; Wu et al., 2013). Esta neurotoxicidad está relacionada con la disminución del nivel de glutatión reducido, el cual es el principal sistema antioxidante del SNC, y la alteración del metabolismo de la dopamina por la vía oxidativa (Kang et al., 2009). Varios estudios han señalado que este incremento de ERO está relacionado con la alteración de la vía del factor eritroide nuclear 2 (NRF2) y otras enzimas antioxidantes que ésta regula, como son la superóxido dismutasa 1 (SOD1), la glutatión-peroxidasa (GPX) o la hemooxigenasa 1 (HO1) (Izumi et al., 2015; Dou et al., 2015; Li et al., 2016; Wang et al., 2017). Además, se ha descrito que el PQ actúa directamente sobre el complejo mitocondrial I (NADPH deshidrogenasa), reduciendo su actividad (Fukushima et al., 1994), lo cual induce la disfunción de las mitocondrias de neuronas y astrocitos y, en consecuencia, la muerte celular de estas células por apoptosis (Zhang et al., 2016).

Las ERO, entre las que se incluyen los radicales superóxido e hidroxilo, causan modificaciones en la estructura de las proteínas, tanto en su estructura primaria aminoacídica como en su conformación (estructuras secundaria y terciaria), que las hacen más susceptibles a la fragmentación espontánea o a la proteólisis (Davies et al., 1987a y 1987b). En este mismo sentido, dichos radicales libres presentes en el citoplasma oxidan la forma citosólica de las tiorredoxinas (TRX) entre otras proteínas,

las cuales conforman un mecanismo antioxidante importante a nivel neuronal, y cuyas modificaciones son muy importantes para la acción neurotóxica del PQ (Ramachandiran et al., 2007).

Asimismo, el PQ también incrementa la producción de ERO en la microglía, mediante la inducción de la expresión de NOX-2, que a su vez también favorece la formación de PQ reducido, que continúa el ciclo de oxidación-reducción, de forma que cada vez se incrementen aún más los niveles de estrés oxidativo (Zhang et al., 2016). En este sentido, en otro estudio también se ha descrito que la actividad de la microglía se incrementa ante la exposición aguda a este herbicida. Esta activación se produce de forma más importante en las regiones del cuerpo estriado y la sustancia negra, siendo esta última región especialmente sensible al PQ por este motivo, ya que esta región es muy rica en células de microglía, que participan en los procesos inflamatorios en el SNC y, por tanto, intervienen en la aparición de neurotoxicidad (Wu et al., 2013).

Por otra parte, se ha descrito que el PQ es capaz de inducir la síntesis de NO en las neuronas mediante la activación de la enzima NO-sintasa. A continuación, el NO reacciona con los radicales superóxido previamente formados, dando lugar a aniones peroxinitrito, los cuales oxidan las proteínas, los lípidos y el ADN de las neuronas, además de inhibir la actividad de otras enzimas antioxidantes, incrementando aún más el estrés oxidativo (Zhang et al., 2016). Entre las enzimas antioxidantes, resulta especialmente relevante la enzima SOD, siendo otro de los principales mecanismos protectores endógenos frente a los radicales libres, cuya actividad es claramente inhibida por el PQ en las regiones del hipocampo, cuerpo estriado y mesencéfalo (Wu et al., 2013). Como resultado de la acción de dichos radicales libres, se detecta un incremento de metabolitos derivados de la peroxidación de los ácidos grasos, como es el malondialdehído (MDA), en el cerebro (Wu et al., 2013).

En relación al material genético de las neuronas, el PQ acaba produciendo la fragmentación del ADN y compactación de la cromatina en las neuronas, como se ha descrito en el hipocampo transcurridas 24 horas desde la exposición al mismo (Melchiorri et al., 1998).

Igualmente, el PQ induce alteraciones en la vía de las pentosas fosfato, alterando así el metabolismo energético de las neuronas y dando lugar a diferentes metabolitos, como glucosa-6-fosfato y glucono-1,5-lactona, que favorecen el ciclo redox del PQ (Zhang et al., 2016).

También se ha descrito que PQ incrementa la producción de proteínas  $\beta$ -amiloidea en la corteza cerebral (Chen et al., 2012 y 2015), sustancia negra y cuerpo estriado (Su y Niu, 2015), e induce la fosforilación de la proteína Tau en el cuerpo estriado de ratones (Wills et al., 2012), las cuales son tóxicas para las neuronas e inducen su muerte.

En relación al incremento de estas proteínas en las neuronas, se ha sugerido que este aumento puede estar mediado por la inhibición de la actividad del proteasoma 20S (P20S) y por la inactivación de la vía de autofagia lisosomal (ALP) a través del incremento de una proteína denominada diana de rapamicina (mTOR) (Wills et al., 2012; Su y Niu, 2015). El P20S es la subunidad catalítica del proteasoma 26S, que se encarga de la eliminación de proteínas aberrantes, tóxicas o que se han agregado, como las proteínas  $\beta$ -amiloideas y Tau hiperfosforiladas, y su inhibición se ha descrito que deriva en muerte neuronal (Cao et al., 2019).

La función de las proteínas de choque térmico (HSP) incluye la regulación del plegamiento de las proteínas con el fin de que sea el adecuado, evitando que se agreguen unas a otras por una conformación incorrecta, y cuando no es posible su reparación inducen su eliminación o autofagia a través de la vía ubiquitina-proteasoma,

previniendo que su acumulación induzca la muerte de las neuronas (Gumeni et al., 2017; Saibil, 2013). Entre estas proteínas cabe destacar el papel de las proteínas de choque térmico 70 (HSP70), la cual se ha señalado como la responsable de eliminar las proteínas Tau hiperfosforiladas y prevenir la generación y agregación de las proteínas  $\beta$ -amiloideas (Fernández-Fernández et al., 2017; Ou et al., 2014). Se ha descrito que la exposición al PQ incrementa los niveles de HSP70 en el cuerpo estriado de ratón, lo que sugiere que el PQ no obstaculiza la autofagia mediada por chaperonas (Wills et al., 2012; Su y Niu, 2015). Asimismo, el PQ también incrementa las HSP70 en el bulbo olfatorio de rata (Crum et al., 2015).

El PQ no reduce la eliminación de alfa-sinucleína en el mesencéfalo, la cual es eliminada mediante autofagia mediada por chaperonas (AMC) y cuya agregación anómala se ha relacionado con el desarrollo de la enfermedad de Parkinson, por lo que su acumulación parece deberse al aumento de su síntesis (Mak et al., 2010).

En el curso de enfermedades neurodegenerativas, como la EA, se produce la disfunción de la ALP, es decir, la vía regulada por P20S, lo que provoca la acumulación de proteínas anómalas y tóxicas, como las  $\beta$ -amiloideas y Tau hiperfosforiladas; todo ello deriva en pérdida neuronal y déficits cognitivos (Cao et al., 2019). Relacionado con esta vía, se encuentra el factor de transcripción EB (TFEB), siendo su principal factor regulador al controlar la expresión de genes que codifican para proteasas y otras enzimas de los lisosomas, como la catepsina-D (CD); por ello, alteraciones en su regulación también se han asociado a acumulación de proteínas tóxicas y neurodegeneración (Cortes y La Spada, 2019).

Por otra parte, se ha descrito que el PQ activa los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDAR), que son un subtipo de receptores de glutamato, cuya activación favorece la

generación de ERO (Zhang et al., 2016). Subtipos concretos de este receptor, como NMDAR1, están relacionados con el correcto crecimiento, tanto en densidad como en número, de las terminaciones dendríticas neuronales, fundamentales para el buen desarrollo del mecanismo de plasticidad neuronal (Zhang et al., 2016; Kannangara et al., 2014). En este sentido, se ha descrito que el PQ reduce la expresión del receptor NMDAR1 en neuronas primarias hipocampales tras exposiciones repetidas a éste (Del Pino et al., 2017). Además, existen otras proteínas, como son la sinaptofisina (SYP), espinofilina (SPN) y la proteína de densidad postsináptica 95 (PSD95), que participan en el adecuado establecimiento de las sinapsis entre las neuronas (Tarsa y Goda, 2002), en la regulación de la forma y la densidad de las espinas de las dendritas (Li et al., 2011; Glantz et al., 2007) y la disminución de su síntesis se traduce en la pérdida de terminaciones sinápticas y/o su funcionamiento inadecuado, apareciendo desórdenes cognitivos (Mi et al., 2017; Steiner et al., 2008; De Pins et al., 2019).

Como se ha introducido anteriormente, el PQ es capaz de alterar la vía oxidativa del catabolismo de la dopamina, reduciéndose los niveles de dopamina y ácido homovalínico (Kang et al., 2009). Se ha especulado que la acción específica del PQ en esta ruta metabólica se basa en la inhibición de la enzima aldehído-deshidrogenasa (ALDH) a causa de los productos resultantes de la peroxidación lipídica generados por la acción de los radicales oxidantes. Esta enzima regula el paso de 3,4-dihidroxifenilacetaldehído (DOPAL) a ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), los cuales son metabolitos intermedios del catabolismo de la dopamina hasta el ácido homovalínico. De esta forma, su inactivación produce una acumulación de DOPAL, el cual es un tóxico endógeno para las neuronas, favoreciendo también así la muerte de las neuronas, en este caso, dopaminérgicas principalmente. Del mismo modo, en este tipo de neuronas resulta de gran importancia la enzima tirosina hidroxilasa (TH), reguladora

de la síntesis de dopamina, y cuya actividad se ve reducida por la acción del PQ. Según se ha descrito, las especies reactivas de nitrógeno producen nitrógenación de la tirosina, lo cual inactiva a esta enzima, resultando en una disminución de los niveles de dopamina, afectando a la viabilidad de las neuronas dopaminérgicas (Zhang et al., 2016).

Otro aspecto a tener en consideración es que se ha descrito que el PQ induce la expresión de la COX-2 tras exposición aguda y repetida a este herbicida *in vitro* (Yang et al., 2010; De Oliveira et al., 2018) y tras exposición continuada *in vivo* (Mangano et al., 2012; Malekinejad et al., 2013). Esta enzima junto con la enzima ciclooxigenasa-1 (COX-1) sintetiza la prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>), a partir de la cual se sintetizan el tromboxano y los diferentes tipos de prostaglandinas (Resler et al., 2014; Luo et al., 2017), entre las cuales resulta especialmente trascendente la prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), la cual es sintetizada a partir de la PGH<sub>2</sub> por la enzima prostaglandina-E<sub>2</sub>-sintasa-1 (PGES1) (Resler et al., 2014). En relación con la PGE<sub>2</sub>, múltiples estudios han descrito que su sobreproducción y la consecuente activación de sus receptores inducen muerte neuronal y alteraciones en la plasticidad sináptica en el hipocampo, además de producir desórdenes cognitivos (Takadera et al., 2004; Hein y O'Banion, 2009; Cunningham y Skelly, 2012; Miyagishi et al., 2013; Fattahi y Mirshafiey, 2014; Han et al., 2016; Ni et al., 2016; Xiao et al., 2018). Además, la PGE<sub>2</sub> favorece la generación de estrés oxidativo celular (Liang et al., 2005; Saleem et al., 2007; Shi et al., 2012; Zhao et al., 2015), así como la producción de proteínas Tau y  $\beta$ -amiloideas (Pepicelli et al., 2005; Luo et al., 2011; Shi et al., 2012; Qin et al., 2016; Gabr et al., 2017; Cao et al., 2019). Sin embargo, no existen estudios acerca del efecto del PQ sobre la síntesis de PGE<sub>2</sub> en el cerebro.

Aparte de todo lo comentado anteriormente, se ha descrito que el PQ reduce los niveles de factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en el hipocampo de ratones tras exposiciones repetidas a este compuesto (Mangano et al., 2011). Este factor se expresa abundantemente en el hipocampo y forma parte del grupo de las neurotrofinas, proteínas fundamentales para la supervivencia de las neuronas (Scharfman y MacLusky, 2014). La forma madura del BDNF (mBDNF) se produce a partir del precursor de BDNF (proBDNF) gracias a la acción catalítica del activador tisular del plasminógeno (tPA) (Greenberg et al., 2009). El mBDNF es imprescindible para el mantenimiento de la viabilidad celular de las neuronas y los procesos de plasticidad sináptica de las neuronas en el hipocampo gracias a su actuación sobre el receptor quinasa B de la tropomiosina (TrkB) (Foltran y Díaz, 2016). De hecho, se ha descrito que en personas afectadas por la EA se observa una disminución de los niveles de BDNF, lo cual se ha asociado a la degeneración neuronal en el hipocampo y a alteraciones en la memoria (Hu et al., 2014; Song et al., 2015; Zhong et al., 2018). Por otro lado, el BDNF también participa en la prevención del estrés oxidativo, ya que su reducción incrementa los niveles de ERO en el hipocampo (Lee et al., 2019; Hacioglu et al., 2016). Además, deficiencias en el mecanismo de señalización en el que participan el mBDNF y TrkB también están relacionadas con la generación de proteínas  $\beta$ -amiloideas y Tau (Gerenu et al., 2017; Zhang et al., 2018; Wang et al., 2019).

Por su parte, se ha descrito que el pro-factor neurotrófico derivado del cerebro (proBDNF) o forma inmadura del BDNF, también participa en una vía de señalización celular, pero actúa de modo completamente contrapuesto a la forma madura del BDNF, promoviendo así la degeneración y muerte de las neuronas a través del receptor P75<sup>NTR</sup> (Nagahara y Tuszynski, 2011; Hempstead, 2015; Gerenu et al., 2017); por el contrario, en otros estudios se ha descrito que esta forma inmadura también presenta efectos

neuroprotectores (Hempstead, 2015; Foltran y Díaz, 2016), por lo que existe cierta controversia. El efecto final de este sistema de señalización depende del equilibrio entre ambos factores y sus interacciones con sus correspondientes receptores, pudiendo derivar en patologías neurológicas en caso de alterarse dicho equilibrio (Foltran y Díaz, 2016).

Finalmente, también se ha descrito que este tóxico induce mecanismos de autofagia, no como mecanismo de muerte, sino como mecanismo de supervivencia neuronal, ya que su incremento reduce la muerte por apoptosis (Zhang et al., 2016); sin embargo, el mecanismo exacto por el cual se produce este fenómeno no está completamente definido.

### **3.4. Toxicidad**

El PQ representa un problema de gran trascendencia para la Salud Pública (Watts, 2011). Uno de los factores que están involucrados en su peligrosidad reside en las condiciones en las que se realiza su aplicación, entre las que se pueden incluir condiciones de alta temperatura y humedad, falta de equipos de protección individual (EPIs), manejo incorrecto o no seguro del producto y uso repetido del mismo (Watts, 2011), lo cual puede conllevar la exposición directa al PQ de forma continuada, lo que unido a la falta de un tratamiento o antídoto específico, resulta en intoxicaciones graves muy frecuentes en países en desarrollo, tanto en personas (JMPR, 2003; Viales, 2014) como en animales de compañía (Bonavía et al., 1991).

Otro aspecto a tener en cuenta son los casos de intoxicación accidental debidos al almacenamiento inadecuado de productos a base de PQ en envases que previamente contenían bebidas y otros alimentos. A modo de ejemplo, este tipo de accidentes en

Estados Unidos han supuesto un total de más de 1400 casos entre 1998 y 2009 solo en California, sumando las intoxicaciones con PQ y otros plaguicidas (USEPA, 2019).

A pesar de ello, el número de intoxicaciones accidentales, frecuentemente por vía cutánea y vía oral, es relativamente bajo respecto al porcentaje de intoxicaciones derivadas de la ingestión voluntaria en intentos de suicidio (Serra et al., 2003).

Un estudio llevado a cabo en Francia comparó los casos de intoxicación accidental y los casos de intoxicación voluntaria previa y posteriormente a su prohibición en la UE en 2007, revelando que, tras ésta, el porcentaje de casos de intoxicación accidental disminuyó en mayor medida en comparación con los intentos de suicidio, mientras que estos últimos han seguido siendo un serio problema de salud en ciertas regiones de ese país (Kervégant et al., 2013).

En este marco, los casos de intoxicación aguda pueden ser divididos en (Serra et al., 2003):

- Fulminante, debida a la ingestión de una dosis muy elevada de PQ que produce edema pulmonar agudo, oliguria, insuficiencia hepática y múltiples alteraciones bioquímicas, muriendo en 1-4 días.
- Subaguda, desarrollando una fibrosis pulmonar mortal en 4 días, pudiendo alargarse varias semanas.

Desde el punto de vista de la sintomatología, las intoxicaciones agudas por PQ producen una gran variedad de síntomas, entre los que cabe destacar pérdida de apetito, letargia, quemaduras en la boca, epistaxis, insuficiencia respiratoria aguda junto a respiración acortada y superficial, taquicardia, dolor abdominal, sensación de sed,

síntomas digestivos (náuseas, vómito, diarrea...), dolor de cabeza, fiebre y dolor muscular (Watts, 2011).

En las intoxicaciones agudas por PQ estudiadas en ratas, durante los siguientes 3-7 días tras la exposición se observa un empeoramiento progresivo de los animales apareciendo anorexia e inactividad física, muriendo un 20% de ellos en los primeros 4-7 días. Además, en algunos animales aparecieron síntomas respiratorios, acompañados en algunos casos con epistaxis y sangrado en la boca (Wu et al., 2013).

El parámetro de toxicidad aguda más relevante es la dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>), es decir, la dosis que provoca mortalidad en el 50% de los individuos. A modo de ejemplo, en la Tabla 2 se muestran las DL<sub>50</sub> (expresadas en mg/kg) por vía oral, dérmica e inhalatoria determinadas en ratas, recogidas por la FAO en 2008 y por la Comisión Europea (CE) en 2003 (Watts, 2011).

**Tabla 2.** DL<sub>50</sub> (expresadas en mg/kg) recogidas por FAO (2008) y CE (2003) para el PQ en ratas (Watts, 2011).

	CE (2003)	FAO (2008)
Oral	93,4-113,5	93,4-113,5
Dérmica	200	>660
Inhalatoria	0,6-1,4	0,83-1,93

Por su parte, Kemi (2006) describe las DL<sub>50</sub> por vía oral en varias especies de animales, además de la rata, las cuales están recogidas en la Tabla 3.

**Tabla 3.** DL<sub>50</sub> (expresadas en mg/kg) por vía oral en distintas especies (Kemi, 2006).

Especie	DL <sub>50</sub> (mg/kg)
Rata	40-200
Ratón	120
Cerdo de Guinea	22-80
Conejo	49-100
Oveja	50-75
Gato	26-50
Perro	25-50
Mono	50
Ser humano	40-60

Por su parte, las intoxicaciones crónicas causadas por el PQ suelen cursar con una gran variedad de síntomas, como pueden ser la diarrea, pérdida de apetito, epistaxis e hipoquinesia (Minakata et al., 1995).

Además, este tipo de exposiciones más prolongadas en el tiempo se caracterizan por dar lugar a la aparición de neumonía intersticial, fibrosis de los conductos biliares en el hígado, formación de cataratas oculares, patologías renales tales como nefritis intersticial y degeneración tubular renal, además de quistes en las glándulas adrenales, disfunción miocárdica, anemia hemolítica y diversos tipos de neoplasias (Watts, 2011).

En relación a la pérdida de apetito y la consecuente pérdida de peso, estudios realizados en ratas muestran, en general, una disminución de la ganancia media diaria de peso de los animales. En un estudio realizado en ratas Wistar y Sprague-Dawley, a las cuales se administraba PQ vía oral e intravenosa, se observó que se producía una pérdida de peso

corporal en los animales y se determinó que existía una relación directamente proporcional entre esta disminución y la tasa de mortalidad y las concentraciones de PQ detectadas en los pulmones y riñones (Sharp et al., 1972).

Otro aspecto importante a tener en cuenta son los parámetros toxicológicos referentes a toxicidad crónica, siendo el parámetro de referencia para el PQ referente a la vía de intoxicación oral la ingesta diaria admisible (IDA), la cual está establecida en 0,004 mg/kg/día (USEPA, 2017).

La ingesta diaria admisible se calcula a partir de otro parámetro, denominado nivel sin efectos adversos observables (NOAEL), es decir, la cantidad diaria máxima de tóxico que no produce alteraciones funcionales o morfológicas en el organismo. En este sentido, la CE en 2003 estableció como NOAEL por vía oral un valor de 0,45 mg/kg/día y como NOAEL por vía inhalatoria un valor de 10  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ .

Aparte de estos parámetros, existen otros dos índices toxicológicos establecidos para este herbicida: el nivel sin efectos observable (NOEL), entendido como la dosis máxima de tóxico que no produce ningún efecto observable en el organismo; y el nivel más bajo que produce efectos observables (LOEL), que consiste en la dosis mínima de tóxico que produce efectos observables en el organismo. Los valores de ambos para el PQ en ratas fueron establecidos por la FAO en 2008. Así, el valor NOEL para este herbicida es de 1,25 mg/kg/día y el LOEL es de 3,75 mg/kg/día.

El PQ produce daños en multitud de órganos, como son los pulmones, el corazón, el hígado, el bazo, los riñones, las glándulas adrenales, el SNC y los músculos, causando fallo multiorgánico y muerte, si bien la muerte suele darse más frecuentemente tras intoxicaciones agudas pocos días después y a consecuencia de un fallo respiratorio (Watts, 2011).

A continuación, se describen los efectos tóxicos producidos por el PQ en algunos de los aparatos y sistemas orgánicos.

#### **3.4.1. Toxicidad respiratoria**

La exposición aguda al PQ, incluso siendo administrado por vía intraperitoneal (sistémica), se caracteriza por producir daño pulmonar acompañado de hemorragias focales que evolucionan a hemorragia difusa, y/o bronquitis (Wu et al., 2013). En intoxicaciones graves, aparece rápidamente edema pulmonar, produciendo dificultad respiratoria (disnea), lo que conduce a la aparición de hipoxemia. Posteriormente, las lesiones producidas en el parénquima pulmonar pueden evolucionar con el paso de los días a fibrosis pulmonar, que suele ser fatal en el plazo de 4 días o varias semanas (Serra et al., 2003).

En las necropsias se identifican macroscópicamente en los pulmones lesiones tales como congestión, edema, colapso y hemorragia, mientras que microscópicamente se observa fibrosis alveolar en un estadio inicial y pérdida de neumocitos alveolares (Darke et al., 1977).

En caso de que la exposición suceda por vía inhalatoria, estudios realizados con ratas han determinado que el PQ induce cambios y lesiones en las vías respiratorias, como metaplasia escamosa en la base del proceso epiglótico, ulceración, inflamación, necrosis e hiperplasia en la epiglotis y los aritenoides, mientras que en los cornetes nasales no se observan lesiones macroscópicas (JMPR, 2003).

### **3.4.2. Toxicidad digestiva**

En los casos de intoxicación aguda por vía oral, los primeros síntomas que se producen tras la ingestión consisten en náuseas, vómito, dolor abdominal y diarrea.

A nivel del aparato digestivo, dejando a un lado las lesiones que se producen en la mucosa oral y faríngea debido a su efecto cáustico, entre las que se incluyen edema, exudación, úlceras y formación de pseudo-membranas (Serra et al., 2003), se ha descrito que el PQ es capaz de inhibir la síntesis y liberación de NO en las neuronas que conforman del plexo mioentérico, atenuando de este modo las vías de señalización en las que participa dicho neurotransmisor; lo cual implica la disminución de la motilidad del colon, que ralentiza el tránsito digestivo aumentando así el tiempo de permanencia del tóxico en la luz intestinal y el contacto con la mucosa del colon, favoreciendo la absorción de un mayor porcentaje de PQ, incrementando de este modo su toxicidad (Diss et al., 2016).

### **3.4.3. Toxicidad hepática**

En el hígado, 24 horas tras la exposición, se observa un incremento de células de Kupffer. Posteriormente, a los 3 días se desarrolla inflamación en las venas centrales intralobulillares (Wu et al., 2013; Serra et al., 2003), que se acompaña de la degeneración de los hepatocitos de la zona periportal y necrosis celular en la región central de los lóbulos hepáticos. Debido a ello, se puede llegar a producir inflamación portal y colestasis, consecuencia del edema y la degeneración y necrosis de los canalículos biliares, tanto intra como extra hepáticos, y de la vesícula biliar (Serra et al., 2003).

En lo referente a la sintomatología, la toxicidad hepática del PQ se manifiesta clínicamente con elevación de las enzimas hepáticas e ictericia (Burk et al., 1980), es decir, síntomas completamente inespecíficos.

#### **3.4.4. Toxicidad renal**

Se ha descrito que el PQ se acumula en mayor medida en las células de los túbulos contorneados proximales, alterando los procesos de transferencia de electrones en sus mitocondrias, disminuyendo la actividad metabólica de estas células y, en consecuencia, comprometiendo la funcionalidad de las nefronas, lo cual determina la nefrotoxicidad de este herbicida (Serra et al., 2003; Ecker et al, 1975).

De forma paralela, consecuencia del desarrollo de edema pulmonar y de las pérdidas digestivas de líquidos por los vómitos y la diarrea causados por el tóxico, se puede llegar a la aparición de hipovolemia, lo que afecta de forma directa a los riñones, ya que son muy sensibles a disminuciones de la perfusión sanguínea. Por todo ello, es frecuente el desarrollo de insuficiencia renal aguda tras exposiciones graves a este herbicida (Serra et al., 2003).

#### **3.4.5. Toxicidad cardiovascular**

El PQ causa disfunción de la contractilidad del miocardio (Ge et al, 2010). También se han descrito miocarditis tóxicas asociadas a la exposición aguda al PQ, así como el desarrollo de arritmias y shock cardiovascular en los casos más graves (Serra et al., 2003).

Por otra parte, se ha descrito que se produce un descenso en el número de eritrocitos, hemoglobina, leucocitos y proteínas séricas, al mismo tiempo que genera un incremento de polimorfonucleados (USEPA, 1997).

### **3.4.6. Toxicidad cutánea**

Con el objetivo de determinar los efectos de la exposición dérmica del PQ sobre la propia piel, se llevó a cabo un estudio realizado en conejos albinos, el cual mostró que el PQ causa eritema que se mantiene en torno a 3-4 días, aunque puede prolongarse hasta 23 días en algunos casos. Asimismo, se observó que el tóxico produjo edema cutáneo, el cual puede persistir durante 4 días (JMPR, 2003). Sin embargo, en otro estudio se concluyó que el PQ no posee capacidad de sensibilización cutánea (JMPR, 2003).

También se han descrito otros síntomas a largo plazo, como engrosamiento, descamación e, incluso, desprendimiento de las capas superficiales de la epidermis (USEPA, 1997).

Posteriormente, la CE clasificó el PQ como irritante para la piel de categoría 2 (H315) según el Reglamento (CE) 1272/2008 (European Commission, 2016).

### **3.4.7. Toxicidad ocular**

En el pasado se han realizado estudios con el fin de evaluar los efectos de la exposición ocular al PQ en conejos, administrando soluciones con diferentes concentraciones de PQ aplicadas en el saco conjuntival. A concentraciones bajas, se observaron reacciones conjuntivales severas, con hiperemia y quemosis, y alguna lesión corneal ocasional (Sinow y Wei, 1973; JMPR, 2003), sin que se observen alteraciones en la cámara anterior y el cristalino (McKeag et al., 2002). Sin embargo, a concentraciones más elevadas, se produjeron lesiones más severas, entre las que se incluyeron congestión e hinchazón del iris y opacidad corneal (Sinow y Wei, 1973). Tras una exposición ocular única, pueden aparecer otros síntomas y lesiones, entre los que cabe destacar la

conjuntivitis pseudomembranosa con adherencias fibrinosas (McKeag et al., 2002).

A nivel histopatológico, se observa destrucción de la membrana basal del epitelio corneal y úlceras del estroma en función de la gravedad de la exposición, los cuales se asocian a la acción de los radicales libres (Nordquist et al., 1995).

Como resultado de estos estudios y observaciones, el PQ fue clasificado como irritante para los ojos de categoría 2 (H319) mediante el Reglamento (CE) 1272/2008 (European Commission, 2016).

#### **3.4.8. Toxicidad fetal y perinatal**

El PQ es capaz de atravesar la placenta y alcanzar la circulación fetal. Los efectos tóxicos dependerán de la etapa de gestación, pudiendo llegar a causar durante la organogénesis efectos tóxicos agudos en el feto, incluyendo la muerte del mismo; o bien, efectos crónicos persistentes en la etapa adulta (Watts, 2011).

Por otra parte, se ha indicado que el feto es capaz de tolerar bien la exposición al PQ si ésta se produce en una etapa temprana de la gestación. Sin embargo, si la exposición se produce a partir de la semana 30 de gestación, se desarrollan manifestaciones tóxicas rápidamente, lo cual se debe posiblemente a una mayor presencia de oxígeno en el feto. En esta línea, se ha sugerido que este hecho pueda estar relacionado con la ausencia de neumocitos tipo II hasta su aparición alrededor de las 28 y 32 semanas de gestación. Es decir, el pulmón se encuentra más protegido de la acción tóxica del PQ hasta este momento. A pesar de ello, la exposición al PQ suele ser fatal para el neonato por la aparición de un fallo multiorgánico tras el parto (Serra et al., 2003).

Vinculado a ello, también se ha descrito que existe relación entre la exposición prenatal al PQ y el desarrollo de malformaciones congénitas en neonatos (Watts, 2011).

Estudios realizados en ratones identificaron 3 efectos principales en sus crías (Ait-Bali et al., 2016):

- a. Se observó un retraso en la aparición de los reflejos innatos tras el nacimiento, así como déficits motores durante el crecimiento.
- b. Las crías sufrieron alteraciones de la fertilidad y un descenso de los parámetros reproductivos al alcanzar la madurez sexual.
- c. Se produjeron alteraciones cognitivas, manifestándose en la edad adulta, y modificaciones del comportamiento compatibles con un incremento del nivel de ansiedad.

#### **3.4.9. Disrupción endocrina**

El PQ forma parte del grupo de compuestos capaces de actuar como disruptores endocrinos.

Por un lado, se ha descrito que este compuesto disminuye los niveles de testosterona, hormona folículo-estimulante (FSH), hormona luteinizante (LH) y prolactina (PRL) en machos de rata (Watts, 2011). También se ha descrito que el PQ ejerce un efecto antiestrogénico, ya que la administración conjunta de estrógenos y PQ atenúa y disminuye los daños derivados del estrés oxidativo (Si et al., 2001).

Sin embargo, dicha acción antiestrogénica no está solo relacionada con el incremento de los niveles de ERO, ya que se han descrito otras relaciones en las

que la actividad del receptor de estrógenos (ER) podría intervenir en los efectos tóxicos del PQ, como las que se presentan a continuación.

En primer lugar, se ha descrito que la vía NRF2 está regulada por el ER, de tal forma que su activación incrementa la expresión de las enzimas antioxidantes que participan en esta vía, previniendo la muerte celular inducida por los ERO (Chen et al., 2013; Zhu et al., 2015).

En segundo lugar, se ha descrito que la activación del ER protege frente a la muerte de neuronas sometidas a un tratamiento con proteínas  $\beta$ -amiloideas y Tau hiperfosforiladas (Anukulthanakorn et al., 2013; Tang et al., 2018).

En tercer lugar, también se ha visto que el receptor de estrógenos regula los niveles de SYP, SPN, PSD95 y NMDAR1, interviniendo finalmente en la regulación de la densidad dendrítica y la plasticidad sináptica (Murphy et al., 1998; McEwen et al., 2001; Brake et al., 2001; Rune et al., 2002).

En cuarto lugar, los niveles de PGE2 están regulados por la actividad estrogénica, al igual que los subtipos EP1, EP2, EP3 y EP4 del receptor de PGE2 (Huang et al., 2015; Rage et al., 1997). En concreto, una reducción de los niveles de estradiol (E2), o bien, de la actividad del ER, ocasionan la sobreexpresión de COX-2 (Menze et al., 2015; Stacey et al., 2016) y el incremento de los niveles de PGE2 como resultado (Wang et al., 2014).

En quinto y último lugar, los estrógenos también regulan los niveles de BDNF y la expresión de TrkB (Scharfman y MacLusky, 2014), de forma que se ha asociado la reducción de la actividad estrogénica con la disminución de los

niveles de BDNF (Bora et al., 2005; Pan et al., 2010; Harte-Hargrove et al., 2013).

Por otra parte, estudios epidemiológicos han descrito los efectos que originan éste y otros pesticidas sobre la producción de hormonas tiroideas ( $T_3$  y  $T_4$ ) en el organismo (Goldner et al. 2010; Kongtip et al., 2019).

La exposición al PQ y a otros pesticidas, como organofosforados y piretroides, origina la disminución de la síntesis de tiroxina ( $T_4$ ) y triyodotironina ( $T_3$ ), habiendo sido relacionado con el desarrollo de hipotiroidismo, encontrándose una prevalencia superior en aquellos individuos que han estado expuestos de forma repetida a estos químicos. Análisis post-mortem realizados han determinado que se acumulan cantidades detectables de PQ en la glándula tiroidea en los individuos expuestos (Goldner et al., 2010). También se ha demostrado que existe una relación entre los niveles de hormonas tiroideas y ciertas regiones cerebrales, como el hipocampo; así, se ha descrito que las hormonas tiroideas inducen cambios en la arquitectura neuronal hipocampal para su correcta formación y desarrollo durante el crecimiento del individuo (Zanin et al., 2004).

Además, el PQ también ejerce efectos sobre las glándulas suprarrenales, produciendo necrosis de la corteza de estas glándulas (Serra et al., 2003).

Finalmente, otra enfermedad endocrina, en cuya patogenia podría participar el PQ, es la diabetes, especialmente en la diabetes tipo II. Se ha descrito que el PQ presenta un efecto inhibitorio sobre la acción de la insulina, en el cual interviene el estrés oxidativo, lo que termina generando resistencia a la insulina (Kimura et al., 2010).

#### **3.4.10. Genotoxicidad**

Existen evidencias de que exposiciones repetidas al PQ pueden tener efectos genotóxicos a largo plazo, concretamente relacionados con el desarrollo de cáncer y tumores, como el cáncer de piel. Además, en ratas se ha visto que este tóxico causa carcinomas de células escamosas (Watts, 2011).

El desarrollo de las distintas tipologías de tumores se debe a que se ha demostrado que el PQ produce daños en el ADN, mutaciones de todo tipo, y alteraciones en la hibridación de los cromátidas, generándose aberraciones en los cromosomas (Watts, 2011).

#### **3.4.11. Neurotoxicidad**

Como ha comentado anteriormente, el SNC es uno de los sistemas orgánicos donde el PQ ejerce efectos tóxicos más significativos y de mayor trascendencia. Tanto es así que la exposición a este herbicida ha sido relacionada con el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (Li et al., 2018), asociándose con el desarrollo de la enfermedad de Parkinson en múltiples estudios (Dinis-Oliveira et al., 2006; Prasad et al., 2009), actuando como factor de riesgo; mientras que en otras enfermedades neurodegenerativas, como en la EA, se ha sugerido que puede jugar un papel importante, debido a que la exposición única y repetida al PQ se ha asociado a la aparición de déficits de memoria y aprendizaje similares a los manifestados durante el curso de dicha enfermedad (Chen et al., 2010, 2012 y 2015; Lou et al., 2016). Sin embargo, la totalidad de los mecanismos por los cuales el PQ induce estas alteraciones cognitivas se desconoce.

Sintomatológicamente, la exposición a dosis elevadas provoca cuadros de ansiedad, convulsiones, ataxia y trastornos del sueño (Serra et al., 2003).

Los efectos neuropatológicos del PQ sobre el comportamiento que se producen en las primeras 24 horas tras la intoxicación aguda se inician con convulsiones a los pocos minutos de la exposición; de forma paralela se producen lesiones neuronales que afectan a las células piramidales de todas las capas de la corteza frontal (Bagetta et al., 1992). También se han descrito casos de leucoencefalitis hemorrágica que afecta a la totalidad del SNC, acompañada de desmielinizaciones focales (Serra et al., 2003).

En estudios de toxicidad crónica, dosificando durante dos semanas, se observa pérdida de los cuerpos de Nissl neuronales y una disminución del número de neuronas, así como un aumento de la reactividad glial en sustancia negra (Liou et al., 1996).

El PQ produce un cuadro neurológico central caracterizado por la aparición de marcha en círculos, nerviosismo, sacudidas corporales (síndrome del perro mojado), convulsiones clónicas, rigidez muscular, inclinación contralateral de la cabeza y el cuello y cifosis postural, manifestados junto a desincronización del electrocorticograma y picos epileptiformes de alto voltaje en el mismo (De Gori et al., 1988). Mediante la realización de estudios en ratas se han intentado relacionar estos síntomas observados con la estructura cerebral que se ve afectada mediante la infusión de PQ en cada una de ellas. Sin embargo, se ha determinado que la mayoría de los síntomas son comunes a la afección de todas las regiones y no se pueden asociar a lesiones en cada zona específicamente (Caló et al., 1990).

Como se ha introducido en apartados anteriores, se ha observado que el PQ induce muerte neuronal en el hipocampo. Esta región es una de las principales encargadas de la regulación de los procesos de memoria y aprendizaje. Por ello, se ha observado que una reducción de neuronas en dicha región, como ocurre durante el curso de la EA y otras demencias, da lugar a alteraciones cognitivas (Danysz y Parsons, 2012).

Una parte de la muerte neuronal ocasionada por el PQ se produce a través del mecanismo de apoptosis, desencadenado principalmente por el incremento de los niveles intracelulares de ERO, observándose neuronas apoptóticas de forma predominante en la sustancia negra y cuerpo estriado (Melchiorri et al., 1998; Wu et al., 2013) y en el hipocampo, tras exposiciones únicas y repetidas tanto *in vivo* (Melchiorri et al., 1998; Chen et al., 2010; Li et al., 2015) como *in vitro* (Del Pino et al., 2017). Asimismo, se ha descrito que la exposición aguda al PQ genera muerte de los astrocitos por apoptosis en el hipocampo y el cuerpo estriado; sin embargo, no se detectaron cambios morfológicos compatibles con apoptosis en los astrocitos de la corteza frontal (Wu et al., 2013).

Un estudio realizado con astrocitos humanos reveló que este tipo de células nerviosas es extremadamente sensible a la exposición al PQ a concentraciones de 200, 400 y 800  $\mu\text{mol/L}$  durante 12, 24 y 48 horas, respectivamente. Tras dicha exposición, los astrocitos mostraron signos de astrogliosis, caracterizada por una expresión mayor de proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y una disminución de la expresión de apolipoproteína E (ApoE) y de los niveles de colesterol, glutamato y adenosín trifosfato (ATP), que en conjunto alteran la funcionalidad sináptica de los astrocitos, lo que puede estar relacionado con el desarrollo de procesos neurodegenerativos (Li et al., 2018). En este sentido, se

ha señalado que el déficit de ApoE puede estar implicado en el desarrollo de la EA, ya que el silenciamiento del gen que codifica esta proteína en ratones provoca pérdida de la función sináptica y disfunción cognitiva, similares a los que se producen en esta enfermedad neurológica (Nunes et al., 2018).

Por otra parte, como se ha visto anteriormente, exposiciones agudas al PQ generan alteraciones a nivel de las dendritas de las neuronas, que se traducen en la disminución del número de espinas dendríticas, lo cual afecta al proceso de plasticidad sináptica (Caló et al., 1990). Este efecto tóxico a nivel de las neuronas del hipocampo y otras regiones, como el prosencéfalo basal, se ha asociado con la disfunción de las interconexiones neuronales involucradas en las funciones de memoria y aprendizaje (Baloyannis, 2015), y la aparición de alteraciones cognitivas (Mandolesi et al., 2008; Hains et al., 2015).

En estudios anteriores se ha determinado que la muerte celular de las neuronas hipocampales está mediada asimismo por la alteración que produce sobre las transmisiones glutamatérgica y colinérgica, resultado de la alteración de la expresión fisiológicamente normal de las diferentes variantes de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) (Del Pino et al., 2017).

Todo lo visto hasta este punto, junto a los mecanismos de acción que se desencadenan en el SNC, sugiere que el PQ ejerce sus efectos neurotóxicos a través de la intervención de un conjunto de mecanismos que se interrelacionan, de entre los cuales, el estrés oxidativo parece asumir un papel central, y que resulta en la muerte de las neuronas de regiones implicadas en los procesos de memoria y aprendizaje, derivando en la aparición de trastornos cognitivos.

### **3.4.12. Toxicidad medioambiental**

Aparte de todos los efectos adversos descritos en el ámbito de la salud humana asociados al PQ, también presentan gran importancia sus efectos sobre la fauna, flora y el medio ambiente en general.

A nivel ambiental, se han detectado restos de PQ en aguas superficiales, agua de bebida y algunos alimentos (Zhang et al., 2016), siendo este último punto una de las principales preocupaciones en materia de Salud Pública, ya que la presencia de residuos de PQ en alimentos de origen vegetal puede ser la principal fuente de exposición crónica a este tóxico.

Algunos estudios señalan que los efectos del PQ sobre la flora y fauna silvestre son escasos, debido a su fotosensibilidad y su elevada solubilidad en agua, además de la fijación a los minerales presentes en el suelo que sufre y que conduce a su inactivación (Serra et al., 2003). Por el contrario, también se han observado fenómenos de bioacumulación en tejidos de animales acuáticos como peces, anfibios y lombrices, en los cuales produce estrés y mortalidad en los casos más graves (Zhang et al., 2016). En esta misma dirección se encuadran las conclusiones de la última evaluación ambiental sobre el PQ realizada en 2019 por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (USEPA), indicando que existe riesgo de exposición de organismos terrestres y acuáticos a residuos de PQ. Además, señala que, aun utilizando correctamente este herbicida según las indicaciones del fabricante, su uso puede resultar en efectos adversos para la supervivencia, crecimiento y reproducción de organismos terrestres y acuáticos. De esta forma, concluye que todos los usos registrados del PQ conllevan potencialmente efectos adversos directos para aves, mamíferos, anfibios, reptiles, plantas terrestres y acuáticas y, en menor grado, para insectos

polinizadores, peces e invertebrados que habitan en el fondo de ecosistemas acuáticos (USEPA, 2019).

Finalmente, destaca la gran persistencia del PQ en el ambiente, por lo que resalta la importancia de respetar los tiempos de aplicación para prevenir la aparición de efectos reproductivos sobre vertebrados terrestres y sobre insectos polinizadores cuando se aplica en plantas en floración (USEPA, 2019).

### **3.5. Normativa y Legislación**

#### **3.5.1. Regulación a nivel internacional**

El uso del PQ ha sido prohibido o no está permitido en 33 países por razones de Salud Pública, entre los que se encuentran los 27 Estados Miembros de la UE, Reino Unido y otros países del panorama internacional, como son: Kuwait desde 1986, Camboya desde 2003, Costa de Marfil desde 2004, Siria desde 2005 y Emiratos Árabes Unidos desde 2006. Por otra parte, diferentes organizaciones y empresas internacionales han eliminado su utilización de sus sistemas de producción (Watts, 2011).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica el PQ como un tóxico de Clase 2 (moderadamente tóxico); sin embargo, debido a sus efectos tóxicos tanto agudos como crónicos o retardados, así como la falta de tratamiento específico, debería reclasificarse como tóxico de Clase 1.

Por su parte, la USEPA requiere desde 2016 el establecimiento de medidas de seguridad para el personal que maneje este producto, entre las que caben destacar a modo de ejemplo el uso de aplicadores certificados, uso de equipos de protección individual, sistemas de cierre seguro de los envases, la modificación de las etiquetas de los plaguicidas para resaltar su toxicidad y riesgos asociados,

así como capacitación especializada del personal (USEPA, 2017). Asimismo, esta Agencia ha emitido recomendaciones para el público general con el fin de mitigar la incidencia de accidentes relacionados con la ingesta de productos que contienen PQ. Algunas de estas medidas incluyen no trasvasar el producto a otros envases que previamente contenían alimentos, no almacenarlo en viviendas de particulares, mantener el producto fuera del alcance de los niños y no utilizarlo en jardines domésticos, escuelas, parques y áreas infantiles (USEPA, 2019).

### **3.5.2. Regulación a nivel europeo**

La Comisión Europea ha clasificado el PQ como muy tóxico por inhalación, tóxico en contacto con la piel y por ingestión, con riesgo de efectos nocivos graves para la salud en caso de exposición prolongada y, finalmente, como irritante para los ojos, el sistema respiratorio y la piel.

A pesar de ello, inicialmente a través de la Directiva 2003/112/CE, se modificó la Directiva 91/414/CEE, del 15 de julio de 1991, relativa a la comercialización de productos fitosanitarios, para incluir al PQ en el Anexo I de la Directiva 91/414/CEE, en el cual se establece la lista de sustancias activas autorizadas en la UE.

Sin embargo, el uso del PQ en la UE está prohibido desde el año 2007, a raíz del recurso planteado por Suecia ante el Tribunal de Primera Instancia de las Comunidades Europeas por el cual se pedía la anulación de la decisión de la CE de incluir el PQ en la mencionada lista de sustancias autorizadas en la UE, exponiendo motivos de protección de la salud y respeto al medio ambiente.

A continuación, se repasan algunos de los otros actos legislativos que afectan al PQ a nivel comunitario.

#### **3.5.2.1. Reglamento (CE) 1272/2008**

Según el Reglamento (CE) 1272/2008, sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas, el PQ está clasificado como irritante para la piel categoría 2 (H315) y para las ojos categoría 2 (H319), además de ser tóxico de forma aguda categorías 2 (H372) y 3 (H301 y H311) y para organismos acuáticos categoría 1 (H400).

#### **3.5.2.2. Reglamento (CE) 396/2005**

El Reglamento (CE) 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo, relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal, y que modifica la Directiva 91/414/CEE, recoge los límites máximos de residuos (LMRs) para el PQ, entre otros muchos compuestos en gran variedad de alimentos. Puesto que la Salud Pública debe estar por encima de la protección de la sanidad vegetal, este Reglamento establece como su principal objetivo que los residuos de las sustancias activas empleadas en los productos fitosanitarios no estén presentes en las materias primas y/o alimentos en niveles que conlleven un riesgo inaceptable para las personas y también para los animales. Así, en esta norma están establecidos LMRs para productos de origen vegetal o cultivables, como verduras, leguminosas, cereales, frutas, frutos secos, azúcar, hongos y algas, en los que se establece para el PQ un LMR de 0,02 mg/kg de producto. Sin embargo, para otras materias primas, como son café, té, infusiones, cacao y especias, se establece un LMR superior (0,05 mg/kg).



Reglamento regula la comercialización y el uso de los productos fitosanitarios. Entre sus pilares fundamentales se encuentra el principio consistente en que para poder usarse una sustancia activa en la fabricación de productos fitosanitarios, dicha sustancia debe haber demostrado beneficios claros para la producción vegetal, además de no tener efectos adversos en la salud de las personas o animales, ni presentar efectos inaceptables sobre el medio ambiente.

#### **3.5.2.6. Directiva 2006/61/CE**

La Directiva 2006/61/CE de 7 de julio de 2006, que modifica los anexos de las Directivas 86/362/CEE, 86/363/CEE y 90/642/CEE del Consejo por lo que respecta a los límites máximos de residuos de atrazina, azinfos-etil, ciflutrin, etefon, fention, metamidofos, metomilo, PQ y triazofos, recoge los mismos límites máximos de residuos y en los mismos alimentos que el Reglamento (CE) 396/2005 en el caso concreto del PQ.

#### **3.5.3. Regulación a nivel nacional**

##### **3.5.3.1. Real Decreto 971/2014**

El Real Decreto 971/2014 tiene entre sus objetivos adaptar el procedimiento de evaluación de productos fitosanitarios a nivel nacional. De esta forma, en España la competencia de la autorización para la comercialización de los productos fitosanitarios recae en el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación teniendo en consideración un informe preceptivo del Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad.

##### **3.5.3.2. Plan Nacional de Control Oficial de la Cadena Alimentaria (PNCOCA)**

En el contexto de la presente tesis, tiene importancia señalar el objetivo estratégico 2.3 del PNCOCA, que consiste en “reducir en lo posible y, en todo

caso a niveles aceptables, la exposición de los consumidores a los riesgos biológicos y químicos presentes en los alimentos”. Dicho objetivo se desarrolla mediante una serie de programas, como es el Programa de Control de Residuos de Plaguicidas en Alimentos. Su objetivo general es minimizar la aparición de riesgos asociados a la presencia de residuos de plaguicidas no autorizados o en niveles superiores a los establecidos en la normativa vigente. A su vez, este objetivo se desarrolla a través de tres objetivos operativos, que caben resumir en la realización de toma de muestras en función del riesgo, para su posterior análisis, con el fin de detectar en los alimentos la presencia de plaguicidas no autorizados o en niveles superiores a los marcados por la legislación para, posteriormente, adoptar medidas ante los incumplimientos detectados.

# **MATERIAL Y MÉTODOS**

## **4. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **4.1. Productos químicos**

Los productos de PQ (99,99%), estradiol, ácido ditionitrobenzoico, NS-398, poli-L-lisina, dimetil-sulfóxido (DMSO), y bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) fueron adquiridos de Sigma (Madrid, España). Los anticuerpos anti-proteína asociada a microtúbulos-2 (MAP2) y anti-proteína ácida fibrilar glial (GFAP) se adquirieron de Millipore (Madrid, España). MF-63 fue suministrado por Cayman (Madrid, España) y BDNF recombinante (rBDNF) se obtuvo de Abcam (Cambridge, RU). Todos los demás productos químicos fueron de grado reactivo de la pureza más alta disponible de laboratorio.

### **4.2. Preparación de los cultivos neuronales primarios de hipocampo**

Los procedimientos experimentales fueron realizados conforme a la normativa de la Unión Europea (2010/63/EU) y al Real Decreto 53/2013, sobre la protección de los animales de experimentación.

Se extrajeron fetos procedentes de ratas Wistar gestantes, de 17-18 días de gestación (Charles River, Barcelona, España), anestesiadas previamente con pentobarbital sódico, y a continuación sus cerebros se extrajeron y se diseccionaron con un estereomicroscopio (Olympus SZ51, Barcelona, España). La preparación de los cultivos primarios de neuronas se realizó siguiendo el protocolo de Del Pino et al. (2015). El hipocampo fue extraído y mantenido en medio Hibernate E (Life Technologies, Madrid, España); posteriormente fue separado mediante incubación durante 10 minutos a 37°C en 1 mL de solución tripsina-EDTA (0,25%; Invitrogen, Madrid, España) y 0,5 mL de solución de DNasa (Sigma, D4263, Madrid, España). Tras la acción de la tripsina, la solución de tripsina y DNasa se aspiró y seguidamente se añadieron 0,5 mL de albúmina

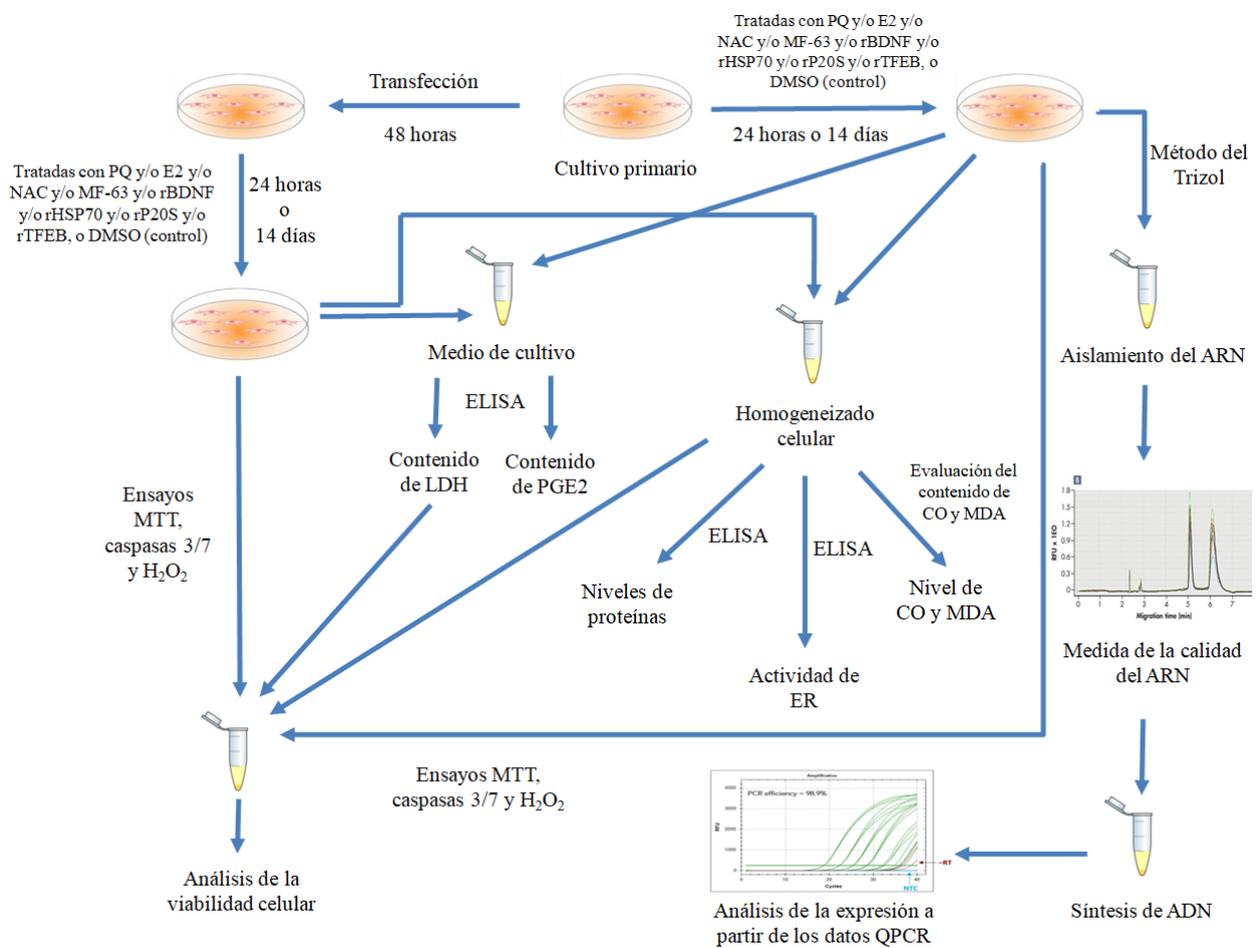
sérica bovina al 4% (BSA, Sigma, Madrid, España), 1 mL de medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM/F-12 con Glutamax-1, Life Technologies, Madrid, España) suplementado con suero fetal bovino al 20% (FBS, Sigma, Madrid, España), antibióticos (penicilina/estreptomicina 1 mL/L, Sigma, Madrid, España) y 2 mL de solución DNasa. Las células fueron separadas mediante una trituración suave usando una pipeta Pasteur de vidrio templado. La suspensión de células se centrifugó a 250 rpm (Eppendorf 5804R, Madrid, España) durante 5 minutos y el pellet resultante fue re-suspendido en medio de crecimiento y a continuación se hizo pasar a través de un filtro de nylon de 40 mm. Esta suspensión volvió a centrifugarse (250 rpm, 5 minutos) y se re-suspendió en medio de cultivo. La suspensión celular se cultivó con una densidad de  $1 \times 10^5$  células/mL en cubreobjetos de cristal de 22 mm de diámetro, recubiertos por poli-L-lisina a una concentración de 0,1 mg/mL, colocados en placas Petri de plástico de 35 mm de diámetro recubiertas con poli-L-lisina. Tras la incubación durante 12 horas a 37°C en una atmósfera humidificada compuesta por un 95% de aire y un 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), el medio se cambió por un medio nutritivo compuesto por DMEM, insulina (400 µl, Sigma, Madrid, España), transferrina (50 µL, Sigma, Madrid, España), progesterona (100 µL, Sigma, Madrid, España), putrescina (16 mg/L, Sigma, Madrid, España), selenito de sodio (100 µL, Merck, Madrid, España) y penicilina/estreptomicina.

La viabilidad de las células de los cultivos fue comprobada mediante el método de exclusión del colorante azul de tripano 0,4% (Sigma, Madrid, España), siendo ésta, de forma rutinaria, superior al 95%. El marcador neuronal MAP2 fue usado para caracterizar inmuno-histo-químicamente las células del cultivo y el marcador astrocítico GFAP para comprobar la pureza celular del cultivo. Se observó que las neuronas predominaban con un 92% del total de células presentes en el cultivo.

Tras 6-7 días, en el cultivo neuronal primario se formó una red funcional de sinapsis entre las neuronas, adquiriendo éstas las características de neuronas maduras. Las células permanecen viables durante 3 semanas en cultivo.

### 4.3. Diseño experimental

La Figura 4 representa el diseño experimental seguido en la investigación sobre el cultivo primario de neuronas procedentes del hipocampo.



**Figura 4.** Representación esquemática del diseño experimental de la investigación.

Al séptimo día, las células hipocampales fueron tratadas con PQ (0,1  $\mu$ M hasta 40  $\mu$ M), durante 24 horas o diariamente durante 14 días. Tras el tratamiento, se emplearon 3 pocillos por cada tratamiento. El rango de concentraciones de PQ utilizadas fue seleccionado según las concentraciones descritas a las cuales el PQ induce muerte

celular en las células del hipocampo tras el tratamiento único y repetido en cultivos celulares primarios de hipocampo (Del Pino et al., 2017) y tras inyecciones intra-hipocampales de PQ en ratas (Bagetta et al., 1992). Se eligieron concentraciones de 1 mM de N-acetilcisteína, que es la concentración mínima que revierte completamente el estrés oxidativo; 10 nM de estradiol, la cual es la concentración presente en el hipocampo fisiológicamente (Prange-Kiel et al., 2006); y 10  $\mu$ M y 20  $\mu$ M de PQ, es decir, las concentraciones mínimas con las cuales se ha observado que se induce muerte celular por apoptosis y necrosis, respectivamente, tras la exposición aguda en cultivos neuronales primarios de hipocampo (Del Pino et al., 2017), para estudiar los mecanismos a través de los cuales el PQ reduce la viabilidad celular.

Por otra parte, para comprobar los efectos del PQ sobre las vías de señalización de PGE2 y BDNF se emplearon NS-398 (10  $\mu$ M) y MF63 (1  $\mu$ M), los cuales son inhibidores selectivos de COX-2 y PGES1, respectivamente, y proteína recombinante de BDNF (rBDNF; 20  $\mu$ M). Se usó PQ a una concentración de 10  $\mu$ M para analizar las disfunciones que el PQ produce sobre dichas vías de señalización y la vía estrogénica y su relación en la inducción de la muerte celular por apoptosis.

Para determinar los efectos del PQ sobre la actividad del proteasoma 20S (P20S) y los niveles de HSP70 y TFEB, se utilizaron las proteínas recombinantes rP20S (10  $\mu$ M, Sigma, Madrid, España), rHSP70 y rTFEB (20  $\mu$ M, Abcam, Cambridge, RU). Se usó PQ a una concentración de 10  $\mu$ M para analizar la implicación de estas proteínas en los mecanismos propuestos. Se emplearon las proteínas recombinantes rHSP70, rTFEB y rP20S desnaturalizadas como control negativo para corroborar su inacción cuando son inactivadas. Se usó Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Madrid, España) para introducir las proteínas recombinantes rHSP70, rTFEB y rP20S en las células.

De forma paralela a cada experimento, se trató un grupo con DMSO al 0,1%, actuando como grupo control.

#### **4.4. Ensayo de cuantificación de la activación del receptor de estrógenos**

Las proteínas del núcleo celular se obtuvieron a partir de homogeneizados celulares usando un kit de extracción nuclear (Abcam, Cambridge, UK; ab113474), siguiendo las instrucciones del fabricante. En primer lugar, las proteínas del núcleo celular fueron obtenidas a partir de homogeneizados celulares usando un kit de extracción nuclear (ab113474; Abcam, Cambridge, UK) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La actividad del receptor estrogénico se determinó en los extractos nucleares mediante el kit colorimétrico de determinación del ER como factor de transcripción (ab207203; Abcam, Cambridge, UK), siguiendo las instrucciones del fabricante. En dicho kit se encuentra inmovilizada, en cada pocillo de una placa de 96 pocillos, una secuencia de ADN de doble hebra que contiene específicamente el sitio de unión consenso del receptor estrogénico (5'-GGTCACAGTGACC-3') al que se une como factor de transcripción. El receptor de estrógenos, activado previamente por su ligando y traslocado al núcleo celular, se encuentra presente en el extracto nuclear previamente obtenido y al añadirse al pocillo se une específicamente al oligonucleótido inmovilizado. A continuación, el ER unido al oligonucleótido es detectado por un anticuerpo primario que reconoce un epítipo del ER que solo está accesible cuando la proteína está activada y unida a su ADN diana. A continuación, un anticuerpo secundario conjugado con HRP proporciona una lectura colorimétrica sensible a una longitud de onda de 450 nm con un lector de microplacas (Fluoroskan Ascent FL Microplate Fluorometer and Luminometer, Thermo Fisher Scientific, Madrid, España), permitiendo su cuantificación.

Las concentraciones de proteínas se midieron mediante un kit BCA (Thermo Fisher Scientific, Madrid, España), siguiendo el protocolo del fabricante. Los resultados del kit ELISA fueron normalizados con la concentración de proteínas nucleares, para evitar interferencias de la cantidad de proteínas con los resultados obtenidos, y presentados como porcentaje respecto al control.

#### **4.5. Cuantificación de la actividad de P20S**

Se estudió la actividad del P20S dado que es la subunidad catalítica del proteasoma 26S que media la degradación de proteínas tóxicas, aberrantes o agregadas como A $\beta$  o Tau. El análisis de la actividad de P20S se llevó a cabo mediante un kit comercial (ab112154; Abcam, Madrid, España), según las instrucciones del fabricante, expresándose los resultados como porcentaje respecto al control. Brevemente, se añadieron 25  $\mu$ L de DMSO (componente C) al vial del sustrato de Proteasoma LLVY-R110 (componente A) y se mezcló bien; posteriormente se añadieron 25  $\mu$ L de esta solución preparada sobre 10 mL de la solución Buffer de ensayo (componente B) y se mezcló bien, obteniéndose la solución de ensayo de proteasoma. Después del último tratamiento sobre los cultivos, en cada pocillo (placa de 96 pocillos) se agregaron 100  $\mu$ L de solución de ensayo de proteasoma, y se incubó la placa a 37° C durante 1 hora en la oscuridad. La intensidad de la fluorescencia se leyó a una longitud de onda Ex/Em = 490/525 nm con un lector de microplacas (Fluoroskan Ascent FL Microplate Fluorometer and Luminometer, Thermo Fisher Scientific, Madrid, España).

#### **4.6. Cuantificación de la PGE2, proteínas Tau y $\beta$ -amiloideas**

Parte del medio de los cultivos control y tratados (procedente de 6 pocillos por cada muestra) fue recogido y preparado de acuerdo al protocolo de Del Pino et al. (2016). Se usaron kits ELISA disponibles comercialmente, siguiendo las instrucciones del

fabricante, para analizar lisados celulares con el fin de determinar los niveles de proteína  $\beta$ -amiloidea 1-40 (KMB3481; Invitrogen, Madrid, España) y proteína  $\beta$ -amiloidea 1-42 (KMB3441; Invitrogen, Madrid, España), y para analizar medios de cultivo con el fin de determinar los niveles de proteína Tau fosforilada (KMB7041; Invitrogen, Madrid, España) y PGE2 (ab133021, Abcam, Cambridge, RU). La lectura se realizó, a 450 nm para los kits de Invitrogen y a 405 nm para el kit de Abcam, con un lector de microplacas (Fluoroskan Ascent FL Microplate Fluorometer and Luminometer, Thermo Fisher Scientific, Madrid, España). Los valores resultantes del ELISA se obtuvieron en pg/ml y fueron corregidos por el total de proteínas intracelulares ( $\mu\text{g/ml}$ ), resultando en  $\text{pg}/\mu\text{g}$ , y presentados como porcentaje respecto al control.

#### **4.7. Cuantificación del nivel de peróxido de hidrógeno**

El contenido de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) fue medido usando un ensayo comercial de peróxido de hidrógeno (ab102500; Abcam, Cambridge, RU) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las células se recolectaron en el buffer del ensayo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a las 24 horas y 14 días tras el tratamiento con PQ y después fueron centrifugadas durante 15 minutos a 1000 rpm. El sobrenadante (50  $\mu\text{L}$ ) se combinó con la mezcla de reactivos (buffer: 46  $\mu\text{L}$ ; OxiRed Probe: 2  $\mu\text{L}$ ; HRP: 2  $\mu\text{L}$ ) y posteriormente fue incubado a temperatura ambiente durante 10 minutos. A continuación, se midió la absorbancia a 572 nm con un lector de microplacas (Fluoroskan Ascent FL Microplate Fluorometer and Luminometer, Thermo Fisher Scientific, Madrid, España). El contenido de peróxido de hidrógeno en las muestras fue expresado en  $\text{nmol/ml}$  y presentado como porcentaje respecto al control.

#### **4.8. Ensayo de peroxidación lipídica**

La concentración intracelular de malondialdehído (MDA), como marcador de peroxidación lipídica, se cuantificó a las 24 horas y 14 días de la exposición al PQ, usando un kit de ensayo de peroxidación lipídica (ab118970; Abcam, Cambridge, RU) siguiendo el protocolo del fabricante. Aproximadamente  $10^6$  células fueron homogeneizadas en hielo junto al buffer MDA de lisis (300  $\mu$ L) con 3  $\mu$ L de hidroxitolueno butilado (100X) y sometidas a centrifugación durante 10 minutos a 13.000 rpm para retirar la fracción insoluble. La muestra (200  $\mu$ L) o el blanco (200  $\mu$ L de MDA) se mezcló con 600  $\mu$ L de solución de ácido tiobarbitúrico, incubado a 95°C durante 50 minutos y atemperado a temperatura ambiente en una cubeta de hielo durante 10 minutos. Los blancos y las muestras (200  $\mu$ L) fueron cargados (por duplicado) en una placa de 96 pocillos y se midió la absorbancia a 532 nm usando un lector de microplacas (Fluoroskan Ascent FL Microplate Fluorometer and Luminometer, Thermo Fisher Scientific, Madrid, España). El contenido de malondialdehído se determinó como nmol/mg de proteína y presentado como porcentaje respecto al control.

#### **4.9. Ensayo de oxidación proteica**

El daño oxidativo fue medido también mediante la cuantificación de la carbonilación proteica. La derivatización de los grupos carbonilos con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), dando lugar a la formación de aductos estables de dinitrofenilhidrazona, se utilizó para medir la formación de grupos carbonilos. Tras 24 horas y 14 días de exposición al PQ, el contenido de proteínas carboniladas se cuantificó usando un kit de ensayo del contenido de proteínas carboniladas (ab126287; Abcam, Cambridge, RU), siguiendo los procedimientos del fabricante. Unas  $10^6$  células fueron recolectadas y

homogeneizadas en hielo con un buffer de lisis (100µL) y a continuación los lisados fueron derivatizados con DNPH. Los blancos y las muestras (100 µL) se cargaron (por duplicado) en una placa de 96 pocillos y se determinó la absorbancia a 370 nm usando un lector de microplacas (Fluoroskan Ascent FL Microplate Fluorometer and Luminometer, Thermo Fisher Scientific, Madrid, España). Los contenidos de proteínas carboniladas fueron determinados como nmol/mg de proteína y presentados como porcentaje respecto al control.

#### **4.10. Análisis PCR a tiempo real**

Para la realización de la determinación de los cambios en la expresión génica tras la exposición al PQ se realizó una reacción en cadena de la polimerasa semicuantitativa (qPCR). La totalidad del ARN fue extraída mediante el método del Trizol (Invitrogen, Madrid, España). La concentración de ARN se determinó con un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Madrid, España) y la calidad del ARN de las muestras se determinó usando un gel de electroforesis (Experion Lab Chip gel (Bio-Rad, Madrid, España). La síntesis de las hebras de ADN complementario al ARN mensajero se realizó partiendo de 1000 ng del ARN mensajero extraído mediante la utilización del kit de síntesis “PCR Array First Strand-Synthesis Kit” (C-02; Super Array Bioscience, Madrid, España), siguiendo las instrucciones del fabricante, e incluye un paso de eliminación de ADN genómico y controles externos de ARN. Después de la transcripción inversa, se ejecutó la PCR a tiempo real usando sets de cebadores prevalidados (SuperArray Bioscience) para los ARN mensajeros que codifican para NMDAR1 (PPR06847D), PSD95 (PPH01848A), SPN (PPM34114A), SYP (PPM03241A), NRF2 (PPR45094A), SOD1 (PPR43506A), HO1 (PPR57718A), GPX (PPR48980A), P75<sup>NTR</sup> (PPR45155A), TrkB (PPR45322B), tPA (PPR56502A), COX-2 (PPR4974F-), PGES1 (PPR45155A), EP1 (PPR45426A), EP2 (PPR44757A), EP3

(PPR44810A), EP4 (PPR46217A), HSP70 (PPR42362A), CD (PPR45222A), TFEB (PPR47250A),  $\beta$ -APP (PPR06788A), Tau (PPR42757D), ER $\alpha$  (PPR44939B), Er $\beta$  (PPR48980A) y ACTB (PPM02945B). Se utilizó el gen de la Beta-actina (ACTB) como control interno para la normalización. Las reacciones se realizaron en una CFX96, usando “Real-Time SYBR Green PCR master mix PA-012” (SuperArray Bioscience). Los parámetros del termociclador fueron de 95°C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 72°C durante 30 segundos. Los cambios relativos en la expresión génica fueron calculados usando el método Ct (cycle treshold). Los datos de expresión se presentaron como múltiplos de cambio reales (Livak y Schmittgen, 2001).

#### **4.11. Determinación de proteínas**

Para determinar las concentraciones y niveles de PSD95, NMDAR1, SYP, SPN, ER $\alpha$ , Er $\beta$ , NRF2, SOD1, HO1, GPX, P75NTR, TrkB, tPA, COX-2, PGES1, EP1, EP2, EP3, EP4, proBDNF, mBDNF, HSP70, TFEB y CD se utilizaron kits ELISA comerciales (MBS2019180, MBS9500425, MBS2088127, MBS908122, MBS029410, MBS2022938, MBS752046, MBS036924, MBS9303006, MBS727547, MBS762067, MBS2512413, MBS763372, MBS725633, MBS720955, MBS9334852, MBS011285, MBS722050, MBS2608396, MBS7606755, MBS175935, MBS8291440, MBS9346315 y MBS2885873, respectivamente, MyBiosource, CA, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizó un control negativo para determinar interferencias entre el PQ y los reactivos de los kits. Las concentraciones proteicas de cada gen diana se normalizaron con la concentración total de proteínas determinada mediante el kit BCA, con el fin de evitar desviaciones respecto al valor real del contenido de proteínas debidas a la reducción del número de células por muerte celular.

Los contenidos de las distintas proteínas se calcularon en ng/mg de proteína y sus valores fueron expresados como porcentaje del contenido de enzimas del control.

#### **4.12. Silenciamiento génico**

Las células del hipocampo fueron transfectadas con ARN de silenciamiento (ARNsi) en placas de 6 pocillos ( $10^6$  células/pocillo) usando el reactivo de transfección HiPerfect de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Qiagen, Barcelona, España). Se diseñó un conjunto de ARNsi dobles (Qiagen, Barcelona, España) homólogos a las secuencias de las proteínas  $\beta$ APP y Tau de rata usando el algoritmo de diseño de HiPerformance (Novartis AG) y comprados a Qiagen (números SI01488767 y SI02876027 del catálogo, respectivamente). Como control de la transfección, se usó el control negativo de ARNsi Stars (Qiagen, Barcelona, España). La eficiencia del silenciamiento de  $\beta$ APP y Tau mediante ARNsi se determinó mediante PCR a tiempo real una vez transcurridas 48 horas desde la transfección, usando cebadores específicos para el ARNm específicos de las proteínas  $\beta$ APP y Tau de rata (Qiagen, Barcelona, España). Los efectos de este silenciamiento en el daño celular fueron medidos mediante el ensayo MTT y la medición del contenido de LDH y la activación de las caspasas 3 y 7. Las células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) tras 24 horas de incubación con los ARNsi y después se incubaron otras 24 horas o 14 días en medio de cultivo con PQ acompañado o no de E2 o NAC.

#### **4.13. Medición de la viabilidad celular**

Para establecer la viabilidad de las células de cultivos primarios de hipocampo tras 24 horas y 14 días de tratamiento con PQ se usó el ensayo MTT, como se ha descrito por Del Pino et al. (2017). Este ensayo se basa en escisión de la sal de tetrazolio de color amarillo en cristales de formazán de color púrpura por la acción de la deshidrogenasa

mitocondrial. Las células se incubaron con 100  $\mu$ L de solución de MTT (concentración final 0,5 mg/mL) durante 4 horas, después del tratamiento con PQ. Transcurridas 4 horas a 37°C, el medio se retiró y el producto de formazán resultante se disolvió en 250  $\mu$ L de DMSO. La formación del producto de formazán solubilizado se midió con un espectrofotómetro a 570 nm (Fluoroskan Ascent FL Microplate Fluorometer and Luminometer, ThermoFisher Scientific, Madrid, España). La viabilidad de las células control tratadas con DMSO se tomó como referencia (100% viables).

Para determinar la inducción de apoptosis mediante la medida de la activación de las caspasas se empleó el kit Caspase-Glo 3/7 Luminiscence Assay (G8091; Promega, Madrid, España), de acuerdo al protocolo del fabricante. En resumen, al final del tratamiento, las células cultivadas se lavaron con PBS, se rasparon y recogieron las células en un tubo de microcentrífuga en oscuridad. A las células se les adicionaron volúmenes iguales de reactivo y de tampón lisis y se incubaron a temperatura ambiente en oscuridad durante 1 hora y la luminiscencia resultante se leyó en cada muestra.

Finalmente, se midió la concentración de LDH liberada en el medio de cultivo, la cual es un marcador de necrosis, utilizando el kit de ensayo de LDH (MAK066; Sigma-Aldrich, Madrid, España), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, el medio de cultivo se retiró y se pipeteó en placas de 96 pocillos. Se añadió la mezcla de reactivos maestra, y después de 3 minutos se determinó la intensidad colorimétrica a 450 nm cada 5 minutos utilizando un espectrofotómetro (Fluoroskan Ascent FL Microplate Fluorometer and Luminometer, ThermoFisher Scientific, Madrid, España).

#### **4.14. Análisis estadístico**

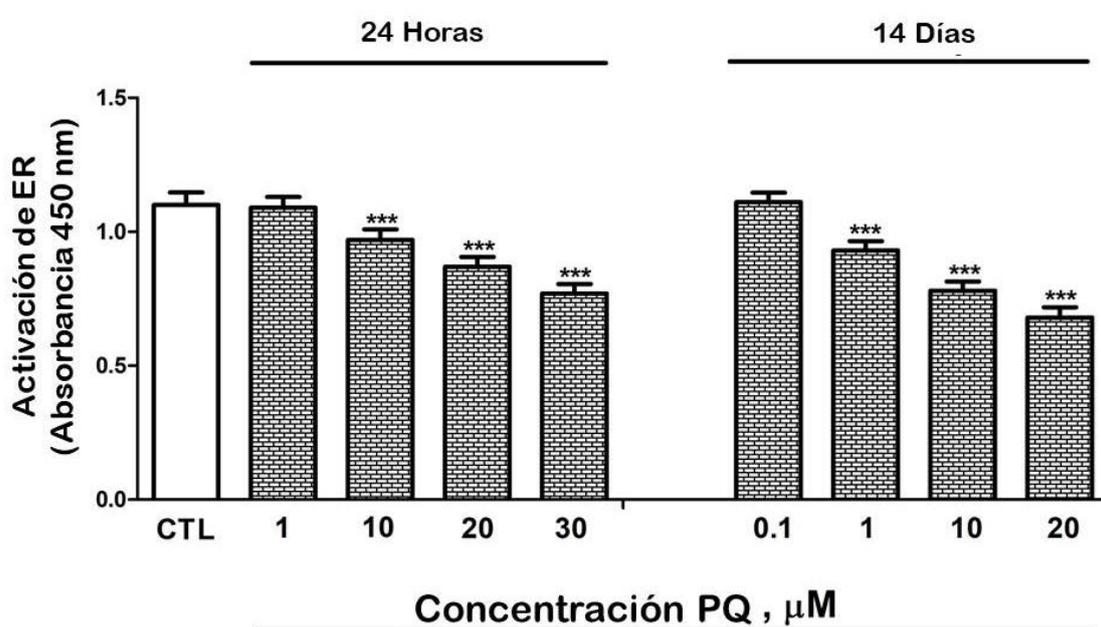
Por cada condición experimental, se hicieron 3 cultivos primarios separados, los cuales se obtuvieron a partir de 3 experimentos animales diferentes, y de cada uno de ellos se realizaron al menos 3 réplicas independientes (n=9). Los resultados presentados son representativos de estas réplicas. Los datos están representados como la media  $\pm$  desviación estándar. La comparación entre los grupos experimentales y los grupos control se realizó un análisis ANOVA de 2 factores (silenciamiento génico vs tratamiento) o un análisis ANOVA de 1 factor (análisis concentraciones de PQ-respuesta), seguido de la prueba de Tukey. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando  $p \leq 0,05$ . El análisis estadístico de los datos fue llevado a cabo por ordenador usando el programa GraphPad Prism 5 (San Diego, CA. EEUU).

# **RESULTADOS**

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Análisis de la activación del receptor de estrógenos

El tratamiento con PQ disminuyó la activación del subtipo  $\alpha$  del ER de forma concentración-dependiente tras la exposición de los cultivos primarios de neuronas del hipocampo al PQ durante un día o durante 14 días a una concentración de 10  $\mu\text{M}$  y 1  $\mu\text{M}$ , respectivamente, comparado con el grupo control (Figura 5).

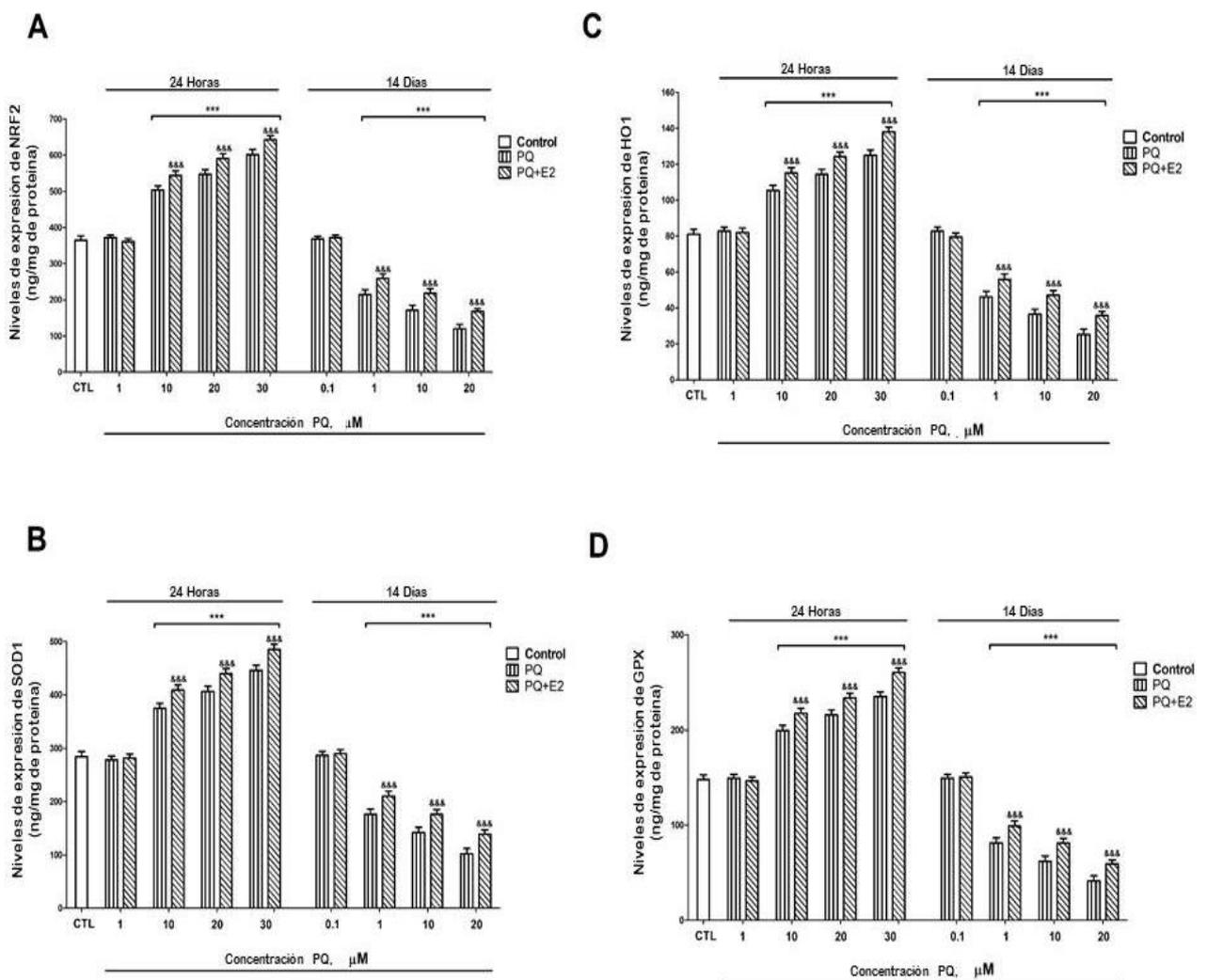


**Figura 5.** Efectos del PQ sobre la activación del receptor de estrógenos en cultivos primarios de neuronas del hipocampo determinados mediante ELISA tras 24 horas y 14 días de tratamiento. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar de la media de los resultados de tres experimentos independientes con células procedentes de diferentes cultivos, cada uno de ellos realizado por triplicado. Los resultados presentaron diferencias significativas respecto a su correspondiente grupo control. \*\*\*  $p \leq 0,001$  comparado con el control.

### 5.2. Análisis de la vía NRF2

Tras la incubación de los cultivos primarios de neuronas del hipocampo, durante 24 horas, con diferentes concentraciones de PQ, las expresiones de NRF2, SOD1, HO1 y GPX se incrementaron significativamente, de forma concentración-dependiente, a partir

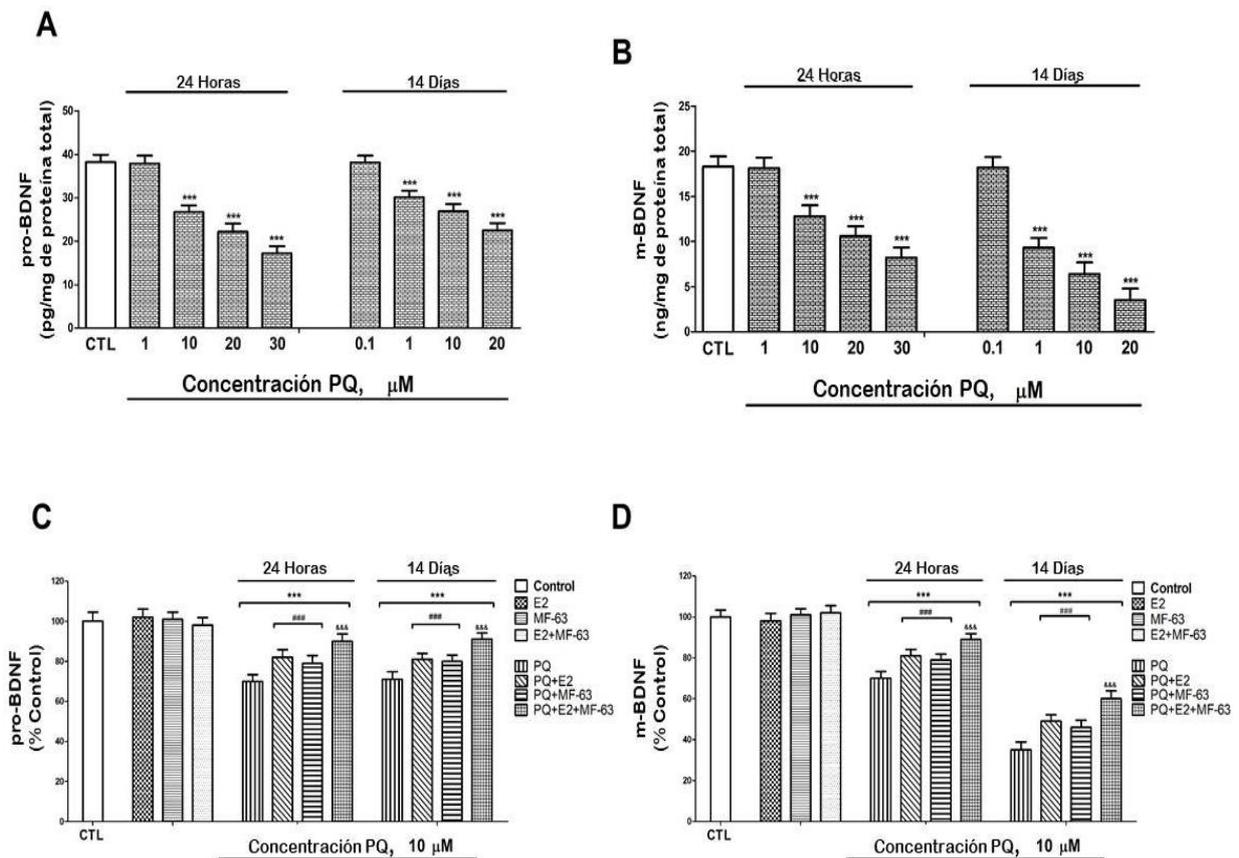
de una concentración de 10  $\mu\text{M}$ ; sin embargo, tras 14 días de exposición al PQ, se indujo, a partir de una concentración de 1  $\mu\text{M}$ , una reducción pronunciada de la expresión de estas proteínas (Figura 6). El tratamiento con E2 no alteró la expresión de estas enzimas. Por su parte, el co-tratamiento con E2 y PQ durante 24 horas indujo un incremento mayor de las expresiones de NRF2, SOD1, HO1 y GPX que el tratamiento solo con PQ, pero tras la exposición durante 14 días se revirtió parcialmente la disminución en la expresión de dichas proteínas producida por el PQ (Figura 6).



**Figura 6.** Efecto del tratamiento de PQ, con o sin E2, durante 24 horas y 14 días sobre la expresión de las proteínas NRF2 (A), SOD1 (B), HO1 (C) y GPX (D). Se compararon las expresiones de NRF2, SOD1, HO1 y GPX con los controles. Cada barra representa la media  $\pm$  error estándar de la media de los resultados de tres experimentos independientes con células de diferentes cultivos, cada uno de ellos realizado por triplicado. Los niveles se determinaron utilizando kits ELISA. \*\*\*  $p < 0,001$  comparado con el control; &&&  $p \leq 0,001$  comparado con el tratamiento con PQ.

### 5.3. Cuantificación de las proteínas proBDNF y mBDNF

El tratamiento con PQ produjo una disminución concentración-dependiente en los niveles de proBDNF (Figura 7A) y mBDNF (Figura 7B) tras la exposición a concentraciones de 10  $\mu\text{M}$  y 1  $\mu\text{M}$  durante un día y 14 días, respectivamente, de cultivos primarios de neuronas de hipocampo. La disminución observada en ambos niveles se inició a concentraciones más bajas, siendo esta reducción más pronunciada en los niveles de mBDNF que la reducción observada en los niveles de proBDNF tras exposiciones prolongadas (Figuras 7A y 7B).



**Figura 7.** Cuantificación del contenido de proBDNF (A) y mBDNF (B) generado tras la exposición al PQ (0,1-30  $\mu\text{M}$ ) durante 24 horas y 14 días. Cuantificación del contenido de proBDNF (C) y mBDNF (D) tras el co-tratamiento con PQ (10  $\mu\text{M}$ ) y/o E2 (10 nM) y/o MF-63 (1  $\mu\text{M}$ ) durante 24 horas o 14 días. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar de la media de los resultados de tres experimentos independientes con células de diferentes cultivos, cada uno de ellos realizado por triplicado. \*\*\* $p \leq 0,001$  comparado con el control; ### $p \leq 0,001$  comparado con el tratamiento de PQ; &&& $p \leq 0,001$  comparado con el tratamiento de PQ y MF-63.

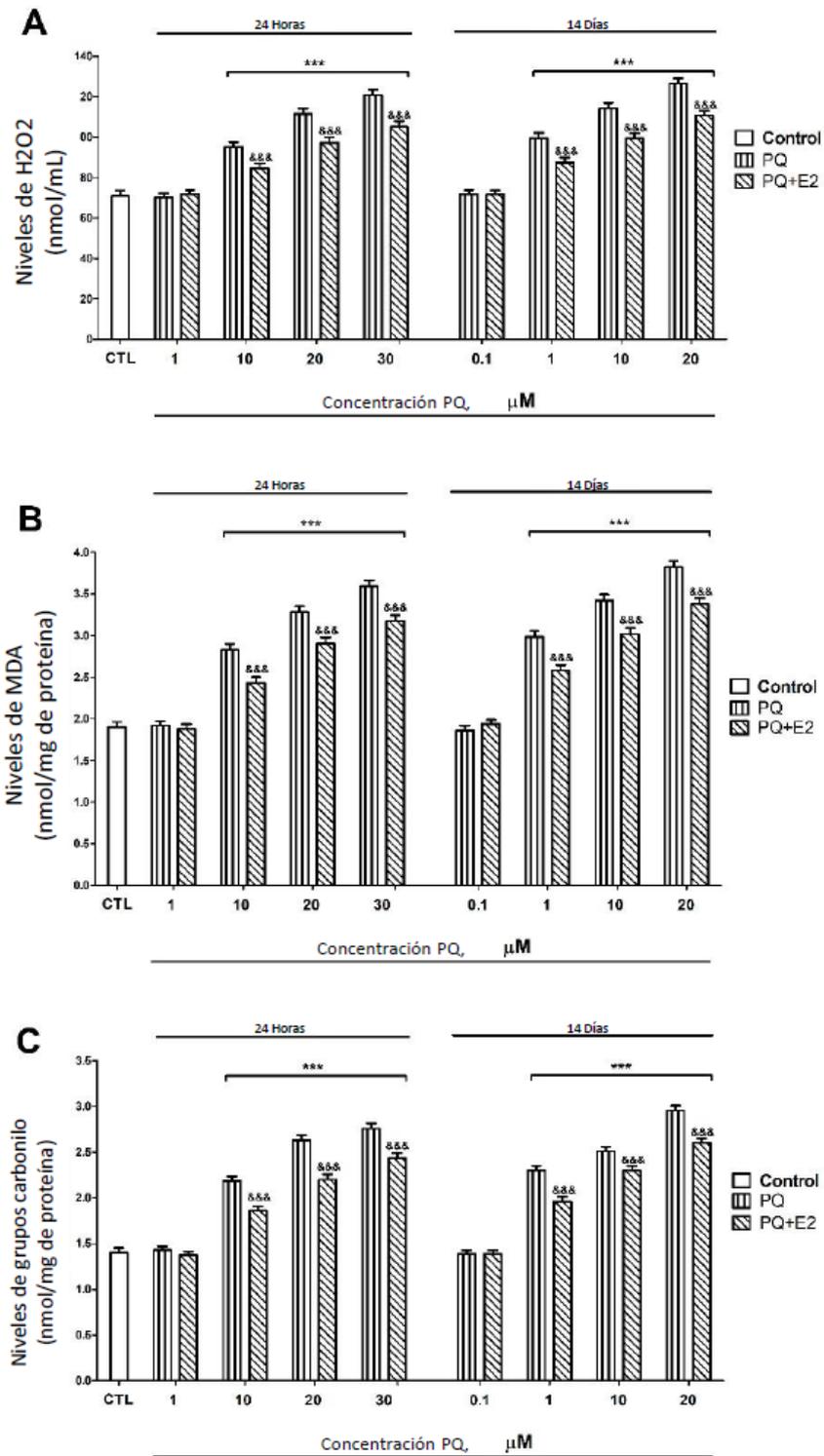
El co-tratamiento con E2 o MF-63 y PQ atenuó, parcialmente, la reducción de los niveles de proBDNF (Figura 7C) y de mBDNF (Figura 7D) producida tras la exposición única y continuada al PQ. El co-tratamiento de E2 y/o MF-63 con PQ atenuó la reducción de proBDNF y mBDNF observada tras el tratamiento único o repetido solo con PQ, pero no abolió esta reducción completamente (Figuras 7C y 7D). Ni E2 ni MF-63 o su combinación alteraron por sí mismos los niveles de proBDNF y mBDNF (Figuras 7C y 7D).

#### **5.4. Análisis de la generación de estrés oxidativo**

Los niveles de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), peroxidación lipídica y carbonilación proteica se determinaron en cultivos primarios de neuronas del hipocampo tras el tratamiento con PQ a una concentración de 10  $\mu M$  y 1  $\mu M$  durante uno y 14 días, respectivamente.

El PQ originó un incremento en los niveles de  $H_2O_2$  (Figura 8A), MDA (Figura 8B) y de la carbonilación de las proteínas (Figura 8C) transcurridos uno y 14 días de exposición, lo cual muestra que el PQ induce la carbonilación proteica y la peroxidación lipídica.

El tratamiento con E2 y PQ revirtió parcialmente el incremento del contenido de  $H_2O_2$  (Figura 8A), MDA (Figuras 8B) y grupos carbonilos (Figuras 8C) observado tras el tratamiento individual con PQ. Sin embargo, el tratamiento con NAC y PQ bloqueó completamente el incremento de  $H_2O_2$ , grupos carbonilo y MDA producido por el PQ (Figura 8).



**Figura 8.** Cuantificación del contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (A), MDA (B) y grupos carbonilo (C) generados tras el tratamiento con PQ, con o sin E2, durante 24 horas y 14 días. Los datos representan la media ± error estándar de la media de los resultados de tres experimentos independientes con células de diferentes cultivos, cada uno de ellos realizado por triplicado. \*\*\*p<0,001 comparado con el control; &&&p≤0,001 comparado con el tratamiento con PQ.

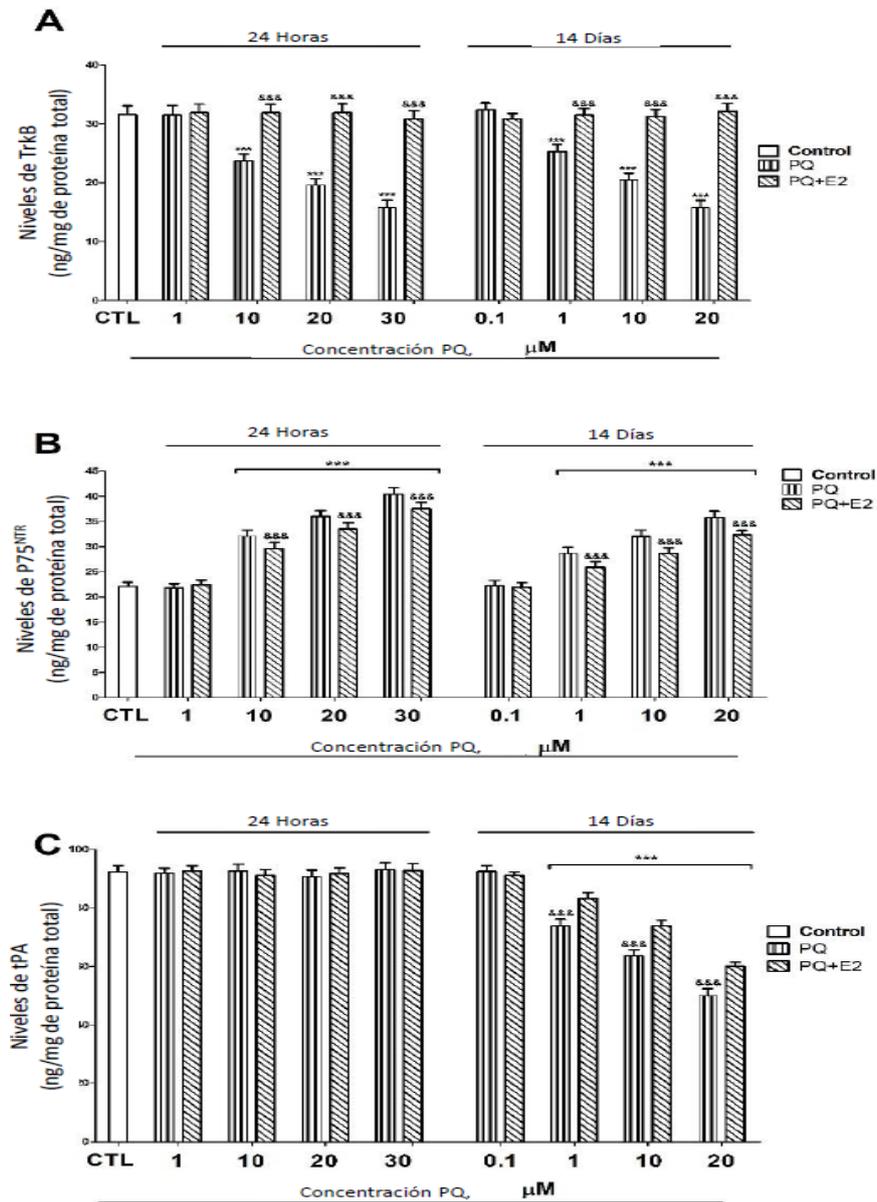


Por otra parte, el tratamiento de rBDNF o MF-63 con PQ atenuó, en parte, el incremento de la concentración de  $H_2O_2$  (Figura 9A), MDA (Figura 9B) y grupos carbonilos (Figura 9C), pero no se observaron diferencias significativas entre ambos co-tratamientos (Figura 9). El co-tratamiento con E2 y PQ atenuó parcialmente el incremento de los niveles de  $H_2O_2$ , grupos carbonilos y MDA resultantes tras la exposición al PQ (Figura 9). Además, el co-tratamiento con E2 y PQ indujo una atenuación significativamente más marcada que la producida por el co-tratamiento con rBDNF o MF-63 y PQ sobre el incremento de los niveles de  $H_2O_2$ , grupos carbonilos y MDA (Figura 9). El co-tratamiento conjunto con E2, rBDNF, MF-63 y PQ provocó una atenuación sobre los incrementos de  $H_2O_2$ , grupos carbonilos y MDA mucho mayor que la producida tras el co-tratamiento con PQ y E2, o rBDNF o MF-63 de forma individual, pero no los revirtió completamente (Figura 9). Por otra parte, ni el E2, NAC, rBDNF o MF-63 por separado ni conjuntamente alteraron los niveles de  $H_2O_2$ , grupos carbonilos y MDA (Figura 9).

### **5.5. Cuantificación de las proteínas P75<sup>NTR</sup>, TrkB y tPA**

El tratamiento con PQ produjo una reducción concentración-dependiente del nivel de TrkB (Figura 10A) y un incremento del nivel de P75<sup>NTR</sup> (Figura 10B) tras 24 horas o 14 días de exposición a partir de las concentraciones de 10  $\mu$ M y 1  $\mu$ M, respectivamente, en cultivos primarios de neuronas del hipocampo. La disminución de TrkB y el aumento de P75<sup>NTR</sup> comenzó a concentraciones más bajas y fue menos pronunciada tras el tratamiento prolongado (Figuras 10A y 10B). El tratamiento con PQ causó una disminución concentración-dependiente en los niveles de tPA únicamente tras la exposición durante 14 días a concentraciones de 1  $\mu$ M (Figura 10C). El co-tratamiento con E2 y PQ atenuó, en parte, la reducción de los niveles de TrkB (Figura 10A) y el

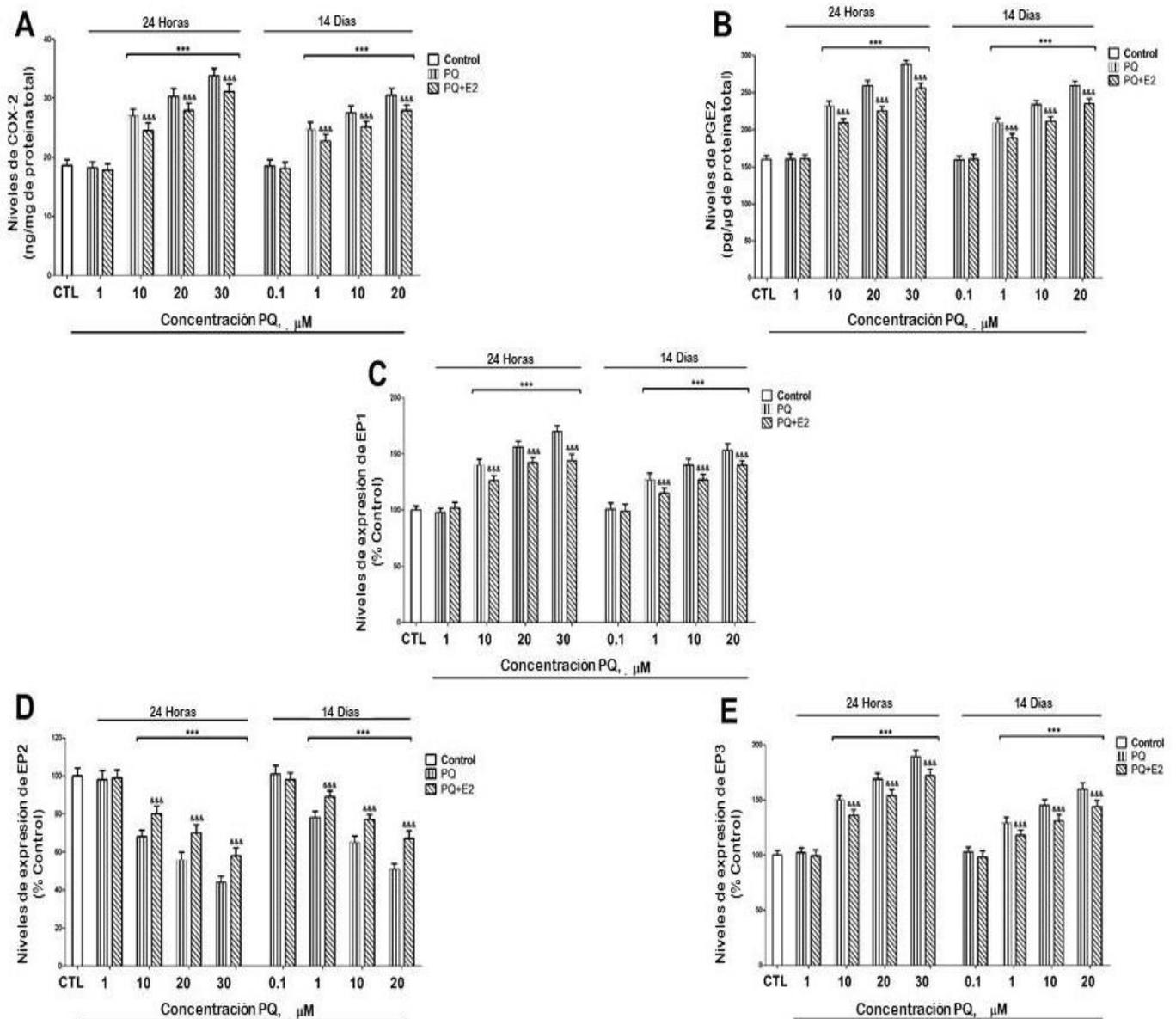
incremento de P75<sup>NTR</sup> (Figura 10B) que se produce tras el tratamiento único y prolongado solamente con PQ. El co-tratamiento con E2 y PQ revirtió completamente la reducción del nivel de tPA producida tras la exposición prolongada al PQ (Figura 10C). La exposición a E2 de forma individual no alteró los niveles de TrkB, P75<sup>NTR</sup>, y tPA.



**Figura 10.** Cuantificación del contenido de TrkB (A), P75<sup>NTR</sup> (B) y tPA (C) tras el tratamiento con PQ (0,1-30 μM) con o sin E2 (10 nM) durante 24 horas y 14 días. Los datos representan la media ± error estándar de la media de los resultados de tres experimentos independientes con células de diferentes cultivos, cada uno de ellos realizado por triplicado. \*\*\* p<0,001 comparado con el control; &&& p≤0,001 comparado con el tratamiento de PQ.

## 5.6. Análisis de la expresión de COX-2, PGE2 y EP1-4.

El tratamiento con PQ produjo un incremento concentración-dependiente de los niveles de COX-2 (Figura 11A), PGE2 (Figura 11B), EP1 (Figura 11C) y EP3 (Figura 11E) y una disminución asimismo concentración-dependiente en el nivel de EP2 (Figura 11D)



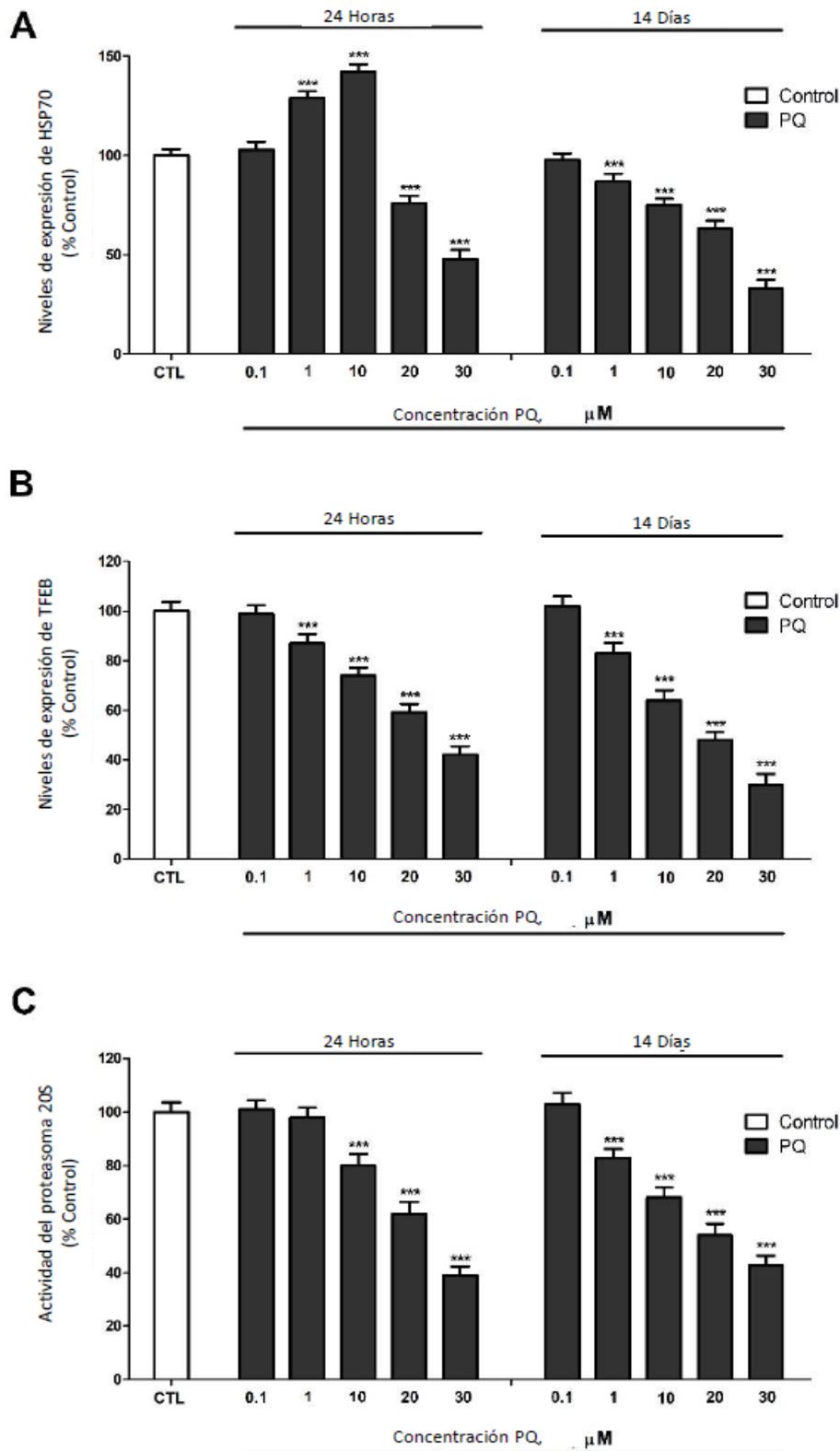
**Figura 11.** Cuantificación del contenido de COX-2 (A), PGE2 (B), EP1 (C), EP2 (D) y EP3 (E) tras el tratamiento con PQ (0,1-30  $\mu\text{M}$ ) con o sin E2 (10 nM) durante 24 horas y 14 días. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar de la media de los resultados de tres experimentos independientes con células de diferentes cultivos, cada uno de ellos realizado por triplicado. \*\*\* $p < 0,001$  comparado con el control; &&& $p \leq 0,001$  comparado con el tratamiento de PQ.

tras 24 horas y 14 días de exposición desde una concentración de 10  $\mu\text{M}$  y 1  $\mu\text{M}$ , respectivamente, en cultivos primarios de neuronas del hipocampo. El aumento de COX-2, PGE2, EP1 y EP3 y la reducción de EP2 se iniciaron a concentraciones más bajas, siendo menos pronunciadas tras el tratamiento continuado (Figura 11).

El co-tratamiento con E2 y PQ revirtió parcialmente el incremento de COX-2 (Figura 11A), PGE2 (Figura 11B), EP1 (Figura 11C) y EP3 (Figura 11E) y la reducción de EP2 (Figura 11D) producidos tras el tratamiento único y continuado solo con PQ. El co-tratamiento de NS-398 o MF-63 con PQ revirtió parcial y completamente, respectivamente, los niveles aumentados de PGE2, lo cual indica que la sobreexpresión de COX-2 medió parcialmente este incremento inducido por la exposición al PQ. El tratamiento individual con E2 no alteró los niveles de COX-2, PGE2, EP1, EP2 y EP3 (datos no mostrados).

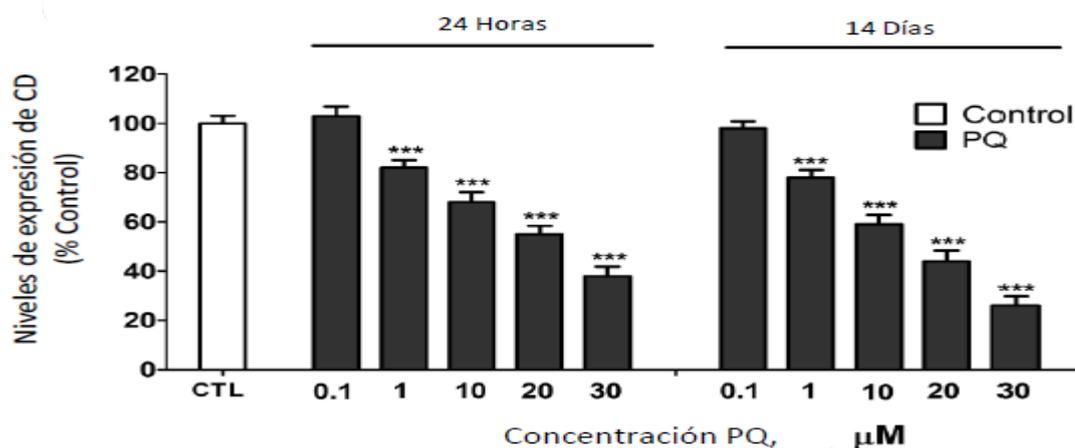
### **5.7. Cuantificación de la actividad de P20S, y de los niveles de expresión de TFEB y HSP70.**

La expresión de HSP70 se incrementó tras la exposición al PQ durante uno y 14 días a concentraciones entre 1 y 10  $\mu\text{M}$ , pero se redujo a partir de la concentración de 20  $\mu\text{M}$  (Figura 12A).



**Figura 12.** Análisis de la expresión de HSP70 (A) y TFEB (B) y de la actividad de P20S (C). Cada barra representa la media  $\pm$  error estándar de la media de los resultados de tres experimentos independientes con células de diferentes cultivos, cada uno de ellos realizado por triplicado. \*\*\*  $p \leq 0,001$ , significativamente diferente con respecto a los controles.

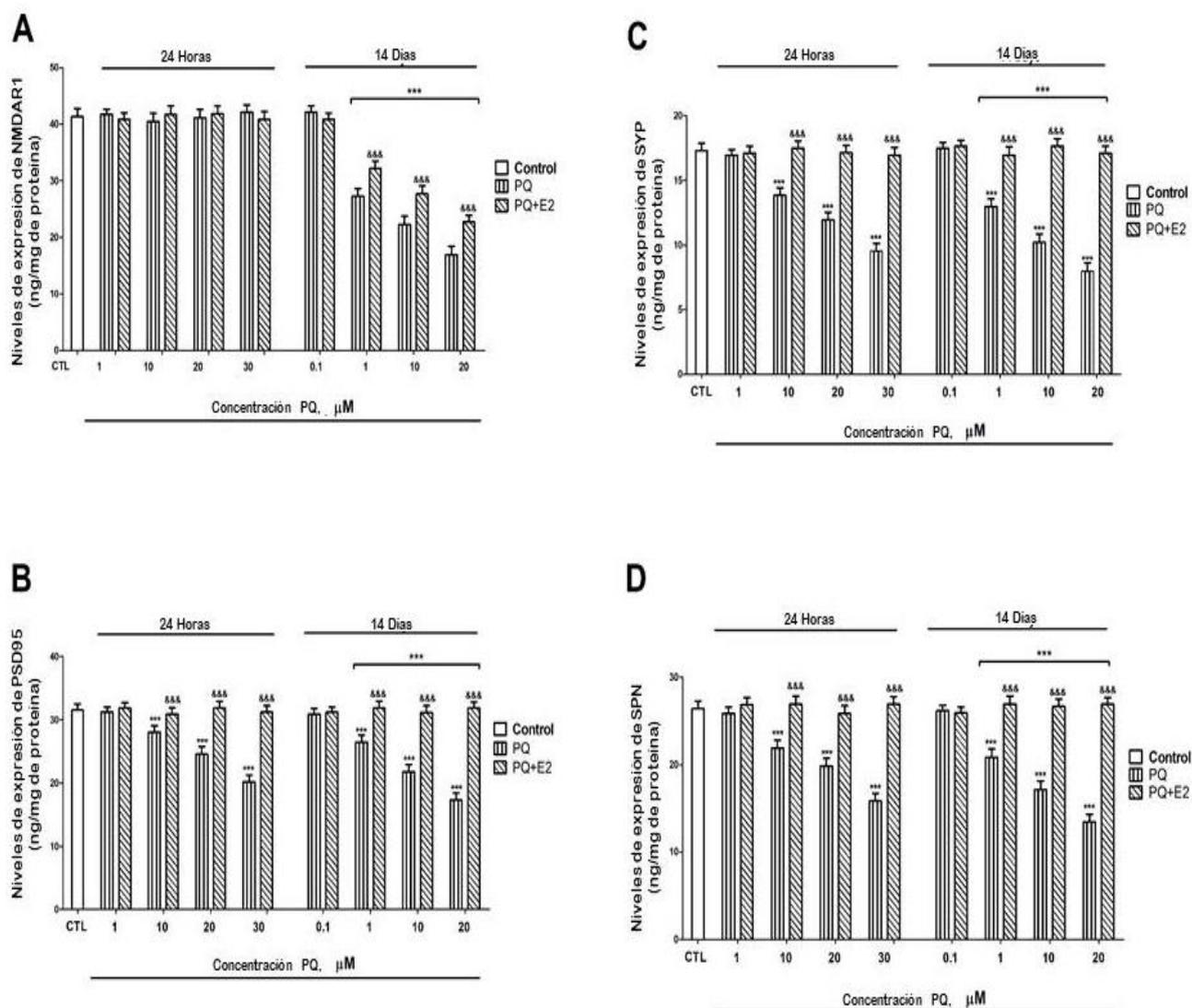
La expresión de TFEB (Figura 12B) y CD (Figura 13) y la actividad de P20S (Figura 12C) sufrieron una disminución concentración-dependiente a partir de las concentraciones de 1 y 10  $\mu\text{M}$ , respectivamente, tras 24 horas de exposición al PQ, y a partir de la concentración de 1  $\mu\text{M}$  tras el tratamiento durante 14 días.



**Figura 13.** Análisis de la expresión de la catepsina D (CD). Cada barra representa la media  $\pm$  error estándar de la media de los resultados de tres experimentos independientes con células de diferentes cultivos, cada uno de ellos realizado por triplicado. \*\*\*  $p \leq 0,001$ , significativamente diferente con respecto a los controles.

### 5.8. Análisis de la expresión de proteínas sinápticas

Las expresiones de NMDAR1 (Figura 14A), PSD95 (Figura 14B), SYP (Figura 14C) y SPN (Figura 14D) sufrieron una disminución marcada, de forma concentración-dependiente, tras la exposición única y repetida durante 14 días desde concentraciones de PQ de 10  $\mu\text{M}$  y 1  $\mu\text{M}$ , respectivamente, en cultivos primarios de neuronas del hipocampo. Por su parte, el tratamiento individual con E2 no alteró la expresión de estas proteínas. Además, el co-tratamiento con E2 y PQ revirtió completamente la disminución de la expresión de estas proteínas sinápticas generada tras el tratamiento solamente con PQ (Figura 14).

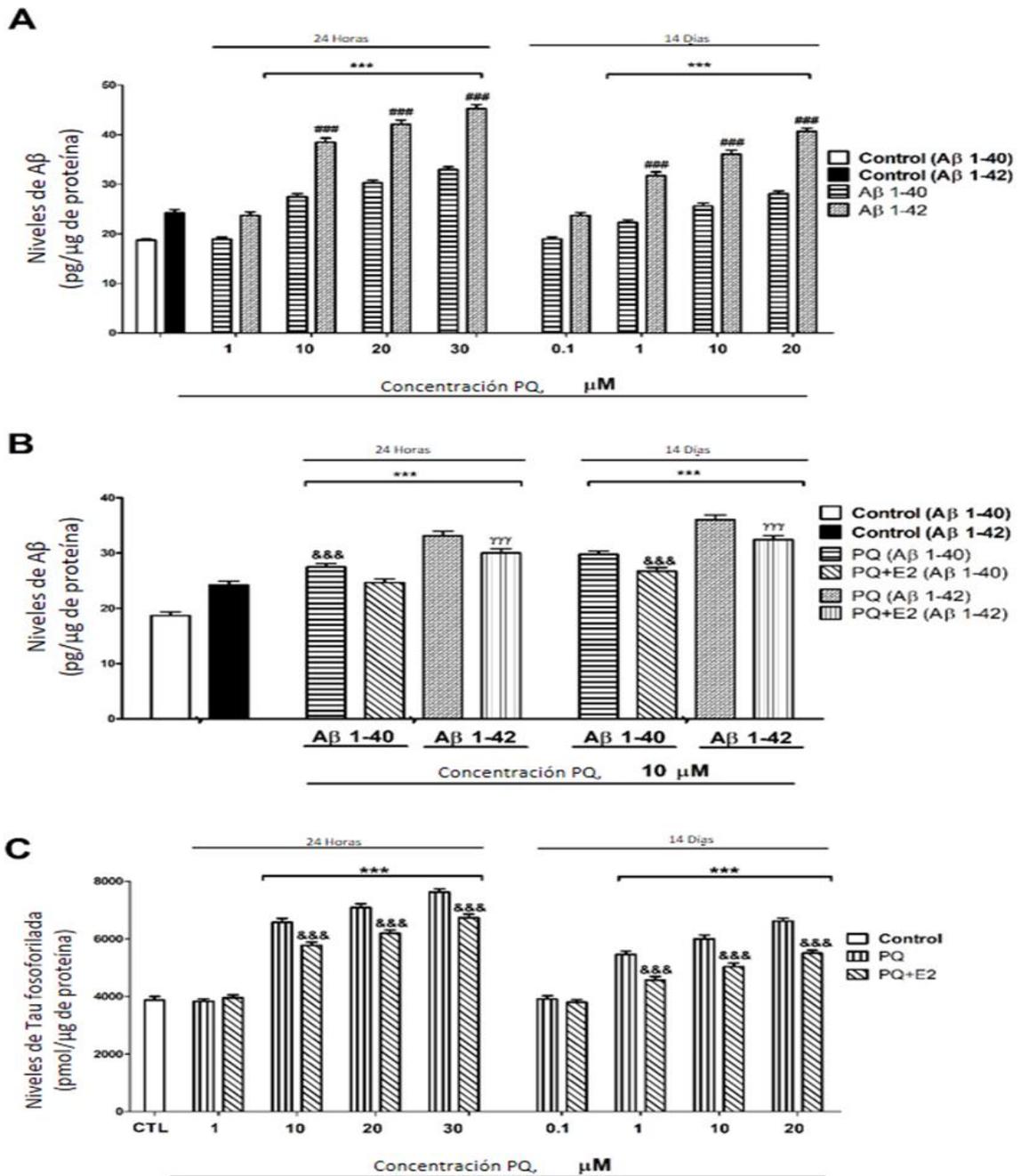


**Figura 14.** Efecto del tratamiento de PQ, con o sin E2, durante 24 horas y 14 días, sobre la expresión proteica de NMDAR1 (A), PSD95 (B), SYP (C) y SPN (D). Se compararon las expresiones de NMDAR1, PSD95, SYP y SPN con los controles. Cada barra representa la media  $\pm$  error estándar de la media de los resultados de tres experimentos independientes con células de diferentes cultivos, cada uno de ellos realizado por triplicado. Los niveles se determinaron utilizando kits ELISA. \*\*\*  $p < 0,001$  comparado con el control; &&&  $p \leq 0,001$  comparado con el tratamiento con PQ.

### 5.9. Cuantificación de las proteínas $\beta$ -amiloides y Tau

El tratamiento con PQ durante uno y 14 días produjo un incremento, concentración-dependiente, de las concentraciones de las proteínas A $\beta$  1-40 (Figura 15A), A $\beta$  1-42 (Figura 15A) y pTau (Figura 15C), en comparación con el grupo control, en cultivos primarios de neuronas de hipocampo. Además, observamos que el incremento de la

proteína A $\beta$  1-42 fue superior al de la proteína A $\beta$  1-40, tanto tras el tratamiento único como del repetido con PQ (Figura 15B).

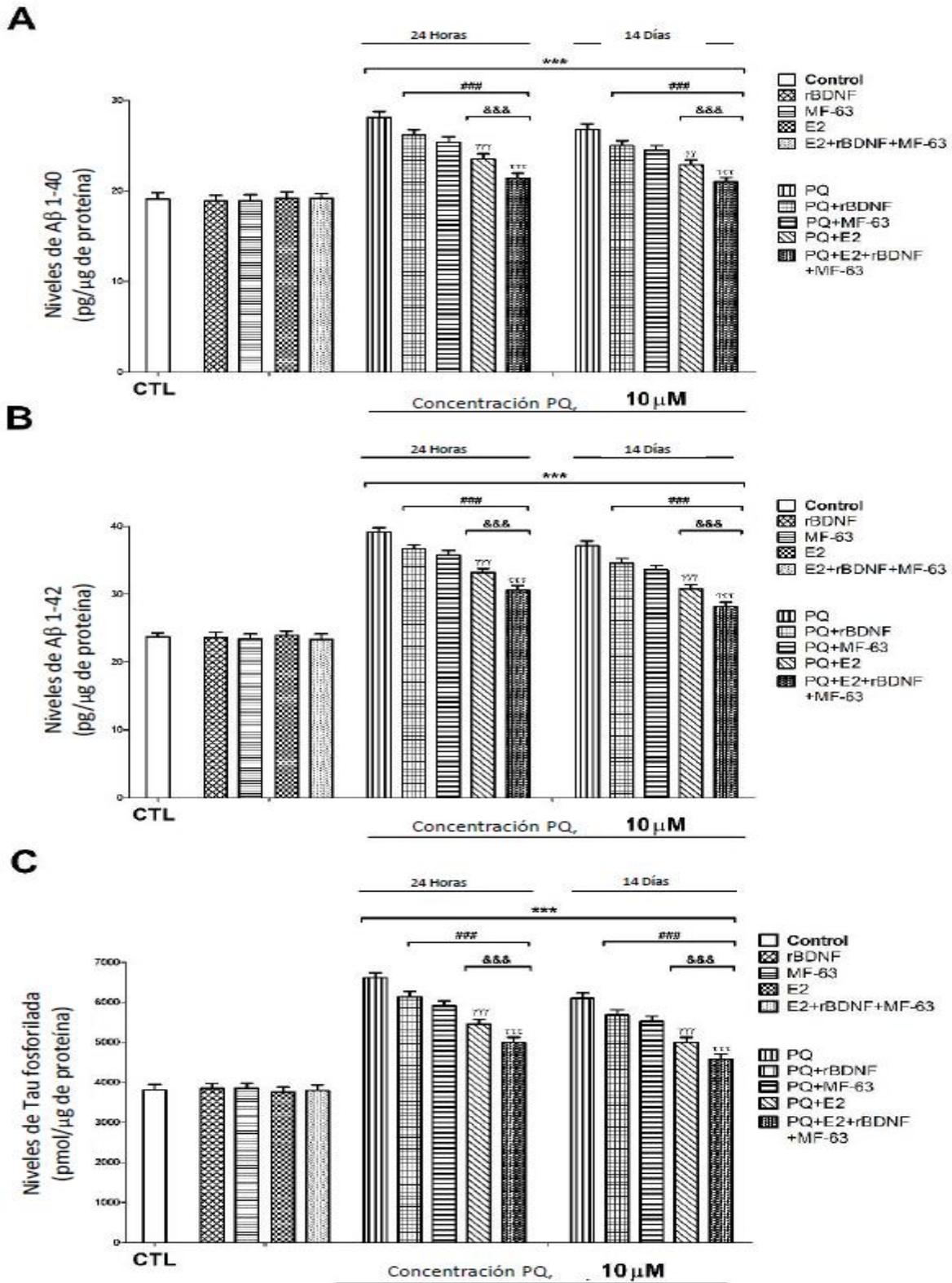


**Figura 15.** Efectos del tratamiento de PQ, acompañado o no de E2, sobre los niveles de las proteínas A $\beta$ 1-40 (A), A $\beta$ 1-42 (B) y Tau fosforilada (pS199) (C) en neuronas de hipocampo. Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar de los resultados de tres experimentos independientes con células procedentes de diferentes cultivos, cada uno de ellos realizado por triplicado. Los resultados se normalizaron mediante la concentración total de proteínas. \*\*\*  $p \leq 0,001$  comparado con el control; ###  $p \leq 0,001$  comparado con los niveles de A $\beta$ 1-40; &&&  $p \leq 0,001$  comparado con el tratamiento de PQ (A $\beta$ 1-40);  $\gamma\gamma\gamma$   $p \leq 0,001$  comparado con el tratamiento de PQ (A $\beta$ 1-42).

Por otra parte, el co-tratamiento de BDNF recombinante o MF-63 con PQ atenuó parcialmente el incremento en la concentración de A $\beta$  1-40 (Figura 16A), A $\beta$  1-42 (Figura 16B) y pTau (Figura 16C) observado tras el tratamiento solo con PQ, pero no hubo una diferencia significativa entre los efectos de cada co-tratamiento (Figura 16).

El co-tratamiento con PQ y E2 produjo una reversión parcial del incremento de los niveles de las proteínas pTau, A $\beta$  1-40 y A $\beta$  1-42 producida tras el tratamiento solo con PQ (Figura 16). Este co-tratamiento indujo una atenuación significativamente superior a la producida por los co-tratamientos de rBDNF o MF-63 con PQ sobre los niveles de las proteínas pTau, A $\beta$  1-40 y A $\beta$  1-42 (Figura 16). Por su parte, el co-tratamiento con E2, rBDNF, MF-63 y PQ indujo una atenuación significativamente superior a la producida tras los co-tratamientos de E2 o rBDNF o MF-63 con PQ sobre el incremento de los niveles de pTau, A $\beta$  1-40 y A $\beta$  1-42, pero, aun así, no fue revertida completamente (Figura 16). Además, no se observó ningún efecto sobre las concentraciones de pTau, A $\beta$  1-40 y A $\beta$  1-42 tras el tratamiento único o repetido con E2, rBDNF y/o MF-63, tanto de forma conjunta como cada uno de ellos individualmente en cultivos primarios de neuronas del hipocampo (Figura 16).

Los niveles totales de las proteínas Tau (Figura 17A) y pTau (Figura 17B) y de los péptidos A $\beta$  1-40 (Figura 18A) y A $\beta$  1-42 (Figura 18B) se incrementaron, de forma concentración-dependiente, tras el tratamiento único, a partir de 10  $\mu$ M, y repetido, a partir de 1  $\mu$ M. Sin embargo, el incremento de estas proteínas se revirtió parcialmente tras aplicarse tratamientos de PQ combinado con rHSP70, rP20S y/o rTFEB en cultivos primarios de neuronas del hipocampo (Figuras 17 y 18).



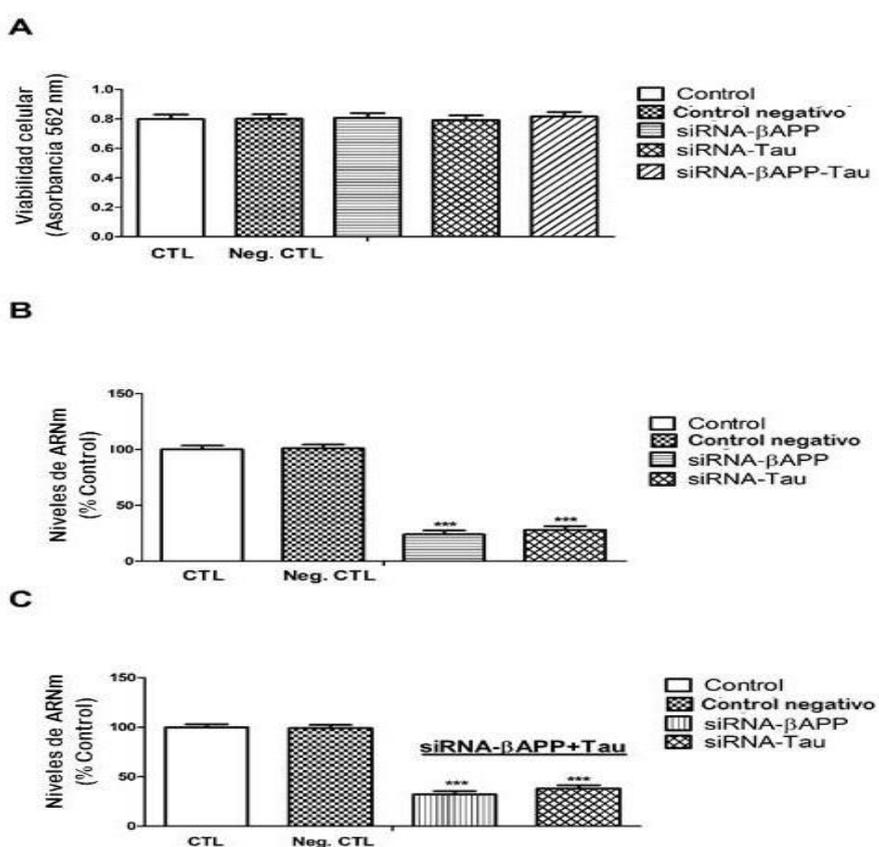
**Figura 16.** Cuantificación del contenido de Aβ1-40 (A), Aβ1-42 (B) y Tau fosforilada (pS199) (C) tras el co-tratamiento con PQ (10 μM) y/o E2 (10 nM) y/o MF-63 (1 μM) y/o rBDNF (20 μM) tras 24 horas y 14 días. Los datos representan la media ± error estándar de la media de los resultados de tres experimentos independientes con células de diferentes cultivos, cada uno de ellos realizado por triplicado. \*\*\* $p \leq 0,001$  comparado con el control; ### $p \leq 0,001$  comparado con el tratamiento de PQ; &&& $p \leq 0,001$  comparado con el tratamiento con PQ y rBDNF;  $\gamma\gamma\gamma p \leq 0,001$  comparado con el tratamiento con PQ y MF-63;  $\tau\tau\tau p \leq 0,001$  comparado con el tratamiento con PQ y E2.





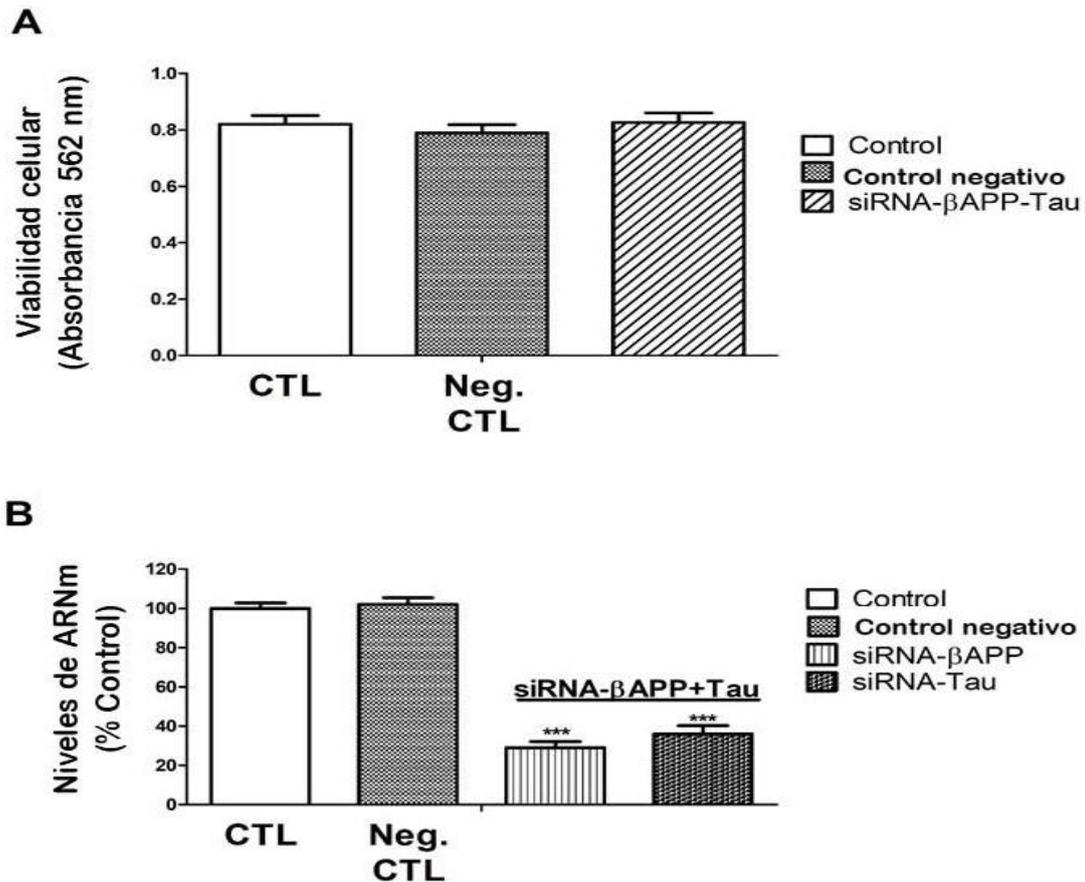
## 5.10. Análisis de la expresión génica en los ensayos de eficacia del silenciamiento

Las células transfectadas con el ARN de silenciamiento control no mostraron ninguna alteración en cuanto a la expresión de los genes que codifican para  $\beta$ APP y Tau. Sin embargo, la transfección con ARN de silenciamiento específico para estos genes provocó una disminución pronunciada de la expresión de las proteínas codificadas por estos genes (Figura 19B, 19C, 20B y 21). Aunque este silenciamiento no tuvo ningún efecto sobre la viabilidad celular (Figura 19A y 20A).

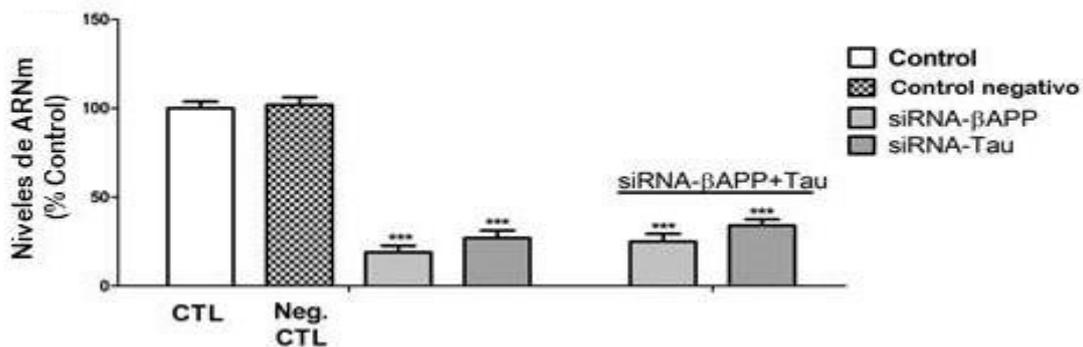


**Figura 19.** Determinación de la alteración de  $\beta$ APP y Tau y su impacto en la viabilidad celular y la expresión génica en cultivos primarios de neuronas del hipocampo. Control: células transfectadas sin ARNsi. Control negativo (Neg.): células transfectadas con una mezcla de ARNsi.  $\beta$ APP-ARNsi: transfección con ARNsi frente a  $\beta$ APP; Tau-ARNsi: transfección con ARNsi frente a Tau;  $\beta$ APP-Tau-ARNsi: transfección simultánea con ARNsi frente a  $\beta$ APP y Tau. (A) El test MTT muestra que la alteración de  $\beta$ APP y Tau no indujo un daño celular significativo tras 48 horas. (B) La alteración de  $\beta$ APP y Tau pudo detectarse mediante RT-PCR 48 horas después de la transfección. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar de la media de los resultados de tres experimentos independientes con células de diferentes cultivos, cada uno de ellos realizado por triplicado. \*\*\* $p \leq 0,001$  comparado con el control.

Por otra parte, transcurridos uno o 14 días, el tratamiento con PQ no alteró la expresión de los genes de PGES-1 y del subtipo del receptor de prostaglandinas EP4 en cultivos primarios de neuronas del hipocampo. Asimismo, la expresión de ER $\alpha$  y Er $\beta$  tampoco se vio alterada.



**Figura 20.** Determinación de la alteración de  $\beta$ APP y Tau en cultivos primarios de neuronas del hipocampo y su impacto en la viabilidad celular y la expresión génica. Control: células primarias transfectadas sin ARNsi. Control negativo (Neg.): células transfectadas con una mezcla de ARNsi.  $\beta$ APP-Tau-ARNsi: transfección simultánea con ARNsi frente a  $\beta$ APP y Tau. (A) El test MTT muestra que la alteración de  $\beta$ APP y Tau no indujo un daño celular significativo tras 48 horas. (B) La alteración de  $\beta$ APP y Tau pudo detectarse mediante RT-PCR 48 horas después de la transfección. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar de la media de los resultados de tres experimentos independientes con células de diferentes cultivos, cada uno de ellos realizado por triplicado. \*\*\*  $p \leq 0,001$  comparado con el control.

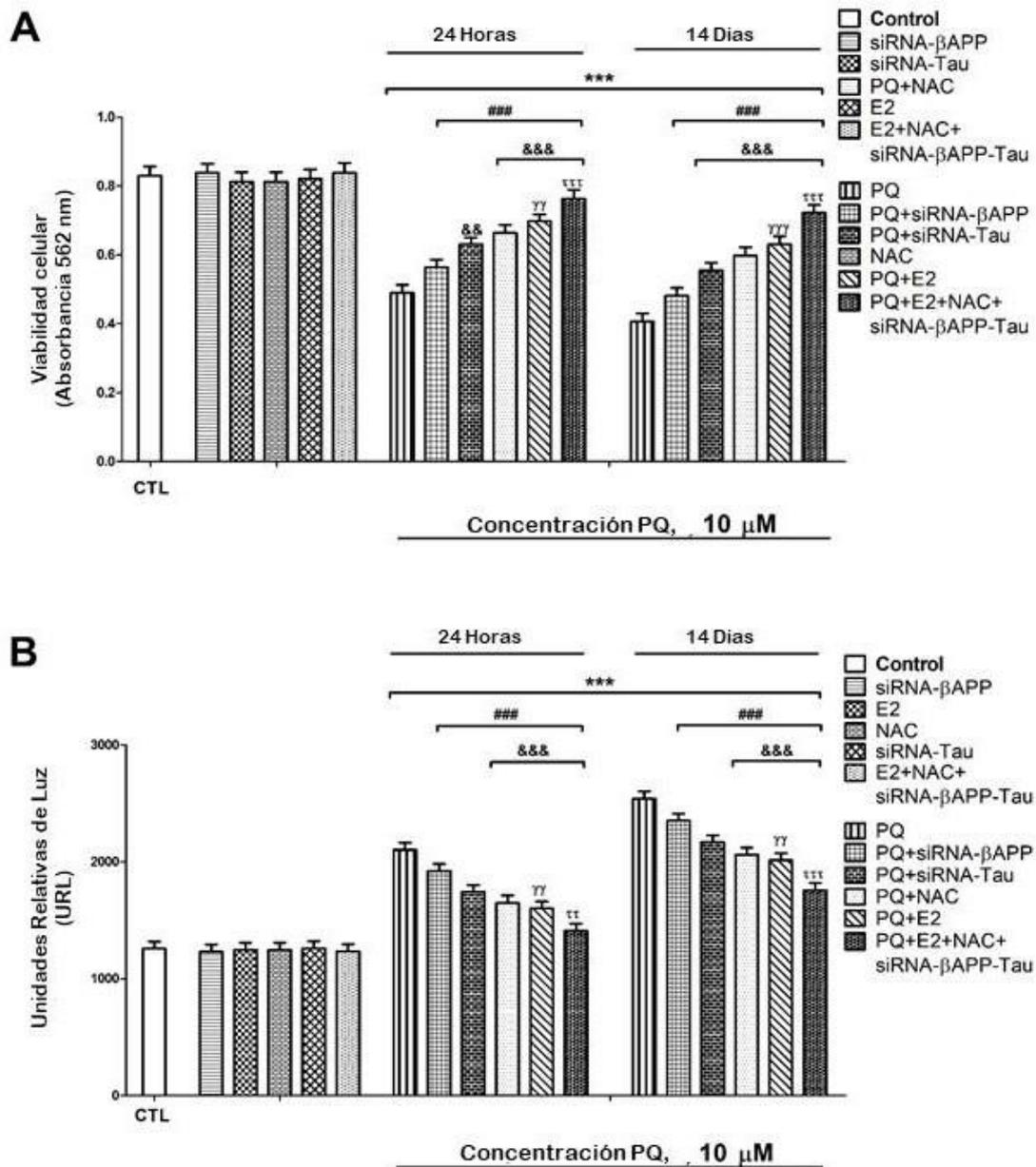


**Figura 21.** Determinación de la alteración de  $\beta$ APP y Tau en y su impacto en la expresión génica en cultivos primarios de neuronas del hipocampo. Control: células transfectadas sin ARNsi. Control negativo (Neg.): células transfectadas con una mezcla de ARNsi.  $\beta$ APP-Tau-ARNsi: transfección simultánea con ARNsi frente a  $\beta$ APP y Tau. La alteración de  $\beta$ APP y Tau pudo detectarse mediante RT-PCR 48 horas después de la transfección. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar de la media de los resultados de tres experimentos independientes con células de diferentes cultivos, cada uno de ellos realizado por triplicado. \*\*\*  $p \leq 0,001$  comparado con el control.

### 5.11. Efecto del PQ sobre la viabilidad celular

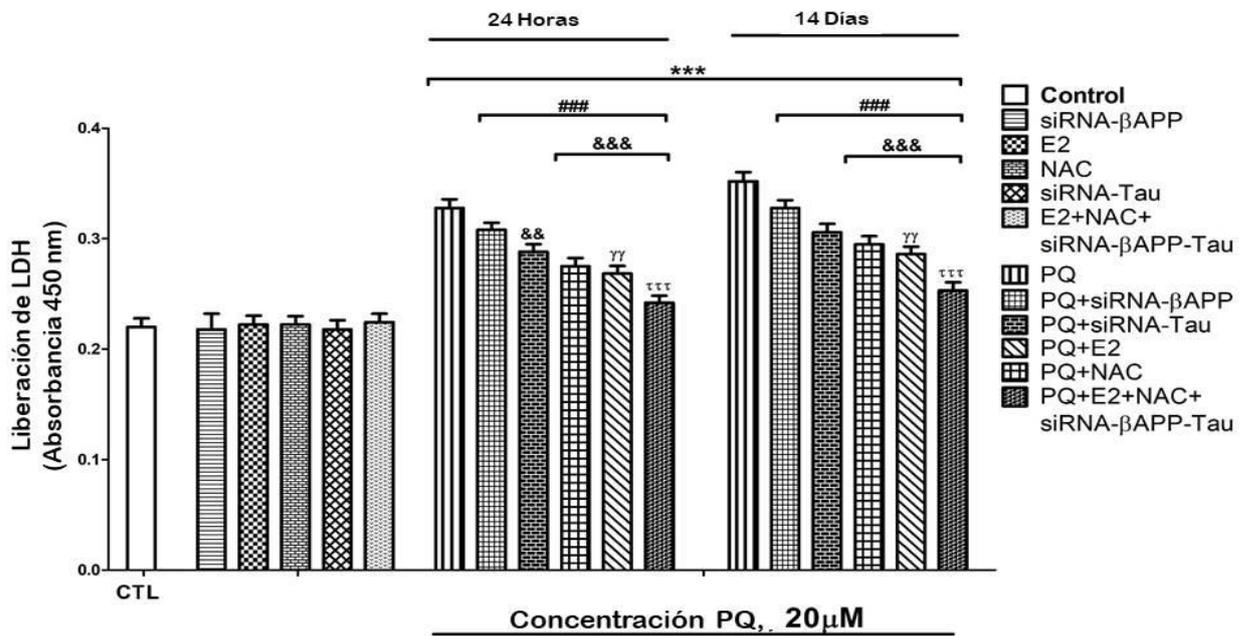
El ensayo MTT y el test de activación de las caspasas 3/7 se emplearon para evaluar la supervivencia celular y la inducción de muerte celular por apoptosis transcurridos uno y 14 días de exposición al PQ a una concentración de 10  $\mu$ M. Por otra parte, el ensayo de LDH se utilizó para determinar la presencia de muerte celular por el mecanismo de necrosis tras la exposición al PQ a una concentración de 20  $\mu$ M durante uno y 14 días.

Los resultados de los ensayos MTT y de activación de las caspasas 3/7 mostraron que los tratamientos con PQ durante uno y 14 días disminuyeron la viabilidad de las células e indujeron muerte celular por apoptosis, en comparación con el grupo control (Figuras 22, 24 y 25). Asimismo, la mortalidad celular fue más pronunciada tras el tratamiento repetido (Figuras 22, 23 y 24). Por su parte, el ensayo de LDH mostró un incremento de la liberación de LDH al medio de cultivo tras 24 horas y 14 días de tratamiento con PQ, comparado con los cultivos celulares que constituyen el grupo control (Figura 23).



**Figura 22.** Resultados del ensayo MTT (A) y el ensayo de actividad de las caspasas 3/7 (B) tras el co-tratamiento de PQ (10 μM), simultáneamente o no, con E2 o NAC, en células no transfectadas y en células silenciadas, individual o simultáneamente, para los genes βAPP y Tau. Los datos representan la media ± error estándar de la media de los resultados de tres experimentos independientes con células de diferentes cultivos, cada uno de ellos realizado por triplicado. \*\*\*  $p \leq 0,001$  comparado con el control; ###  $p \leq 0,001$  comparado con el tratamiento de PQ; &&&  $p \leq 0,001$  y &&  $p \leq 0,01$  comparado con las células con el gen de βAPP silenciado tratadas con PQ; γγγ  $p \leq 0,001$  y γγ  $p \leq 0,01$  comparado con las células con el gen de Tau silenciado tratadas con PQ; τττ  $p \leq 0,001$  y ττ  $p \leq 0,01$  comparado con las células no transfectadas co-tratadas con PQ y E2.

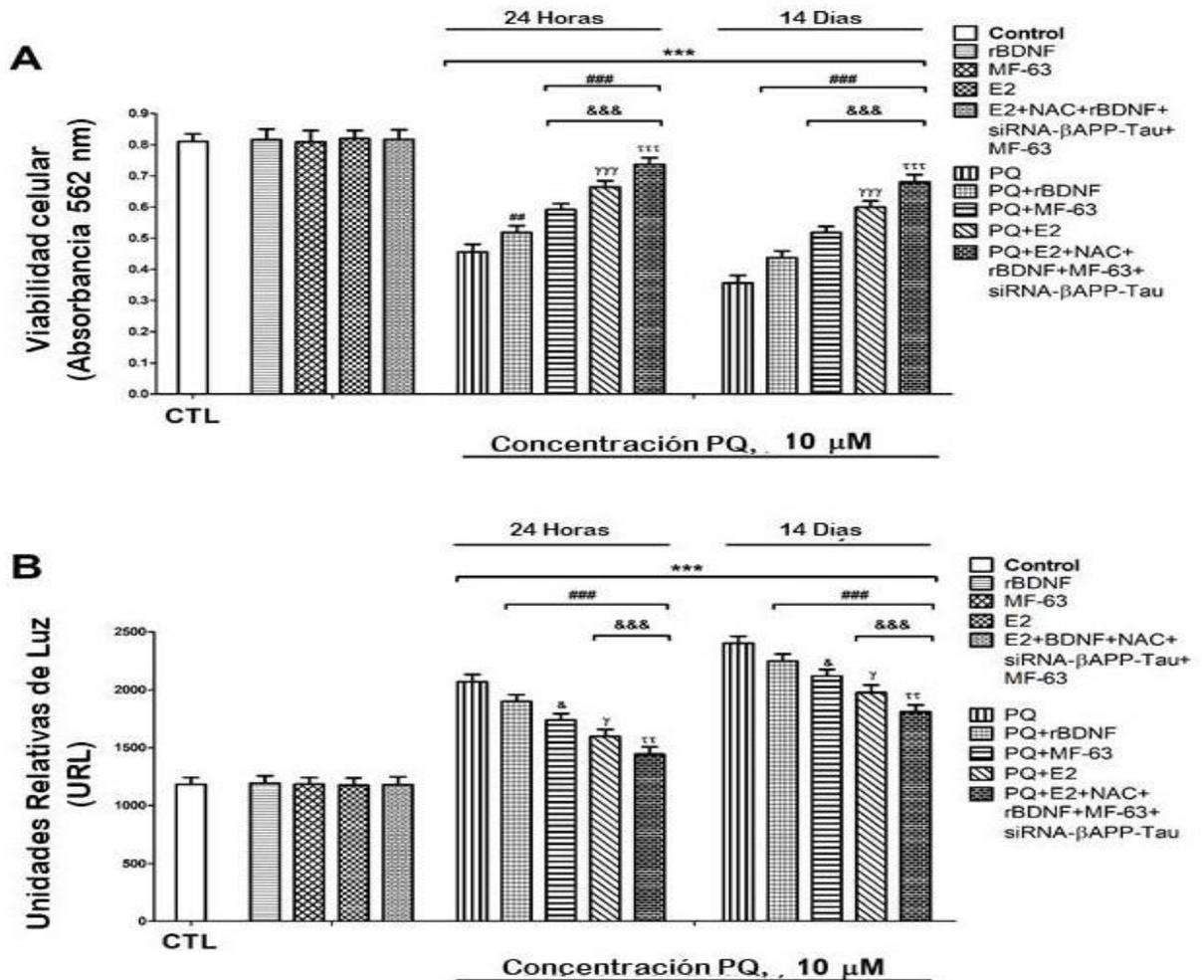
En este sentido, no se han observado efectos significativos sobre la viabilidad celular tras el silenciamiento simultáneo o individual de los genes Tau y  $\beta$ APP (Figuras 19, 20, 22, 23 y 25), ni tras el tratamiento con E2 o NAC (Figuras 22, 23 y 24). El tratamiento con PQ aplicado durante uno y 14 días sobre células transfectadas o células sin modificar tratadas conjuntamente con E2 o NAC produjo un aumento menos marcado de la muerte celular por apoptosis y necrosis en comparación con la generada por el PQ individualmente (Figuras 22, 23 y 24). Esta reversión parcial resultó ser más marcada con el co-tratamiento con E2 y PQ en cultivos celulares sin transfectar, en comparación con la observada en los cultivos celulares transfectados tras el tratamiento individual con PQ (Figuras 22 y 23). Se observaron diferencias significativas entre el efecto del tratamiento con PQ de células silenciadas para  $\beta$ APP y Tau en relación a la reversión de la inducción de muerte celular causada por el PQ (Figuras 22 y 23). Es más, el co-tratamiento único y repetido con PQ, E2 y NAC en células transfectadas para silenciar simultáneamente  $\beta$ APP y Tau produjo una reversión aún mayor de la inducción de muerte en comparación con los tratamientos descritos anteriormente; sin embargo, esta reversión continuó siendo incompleta (Figuras 22 y 23). No se detectaron diferencias significativas entre los datos de las células tratadas con vehículo y las células sin ningún tratamiento.



**Figura 23.** Efecto del PQ (20  $\mu$ M) en la liberación de LDH en células sin transfectar y células con los genes  $\beta$ APP y Tau silenciados, individual o simultáneamente, co-tratadas con E2 o NAC, determinado mediante el test LDH. Los resultados se expresan en porcentaje de liberación de LDH respecto al grupo control. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar de la media de los resultados de tres experimentos independientes con células de diferentes cultivos, cada uno de ellos realizado por triplicado. \*\*\* $p \leq 0,001$  comparado con el control; ### $p \leq 0,001$  comparado con el tratamiento de PQ; &&& $p \leq 0,001$  y && $p \leq 0,01$  comparado con las células con el gen de  $\beta$ APP silenciado tratadas con PQ;  $\gamma\gamma p \leq 0,01$  comparado con las células con el gen de Tau silenciado tratadas con PQ; ††† $p \leq 0,001$  comparado con las células no transfectadas co-tratadas con PQ y E2.

Por otra parte, tampoco se observaron cambios en la viabilidad celular tras los tratamientos con E2, rBDNF o MF-63 por separado o tras el co-tratamiento con E2, rBDNF y MF-63 aplicados sobre células silenciadas para los genes de  $\beta$ APP y Tau (Figura 24). De todas formas, tanto el co-tratamiento con rBDNF y PQ, como el co-tratamiento con MF-63 y PQ, aplicados durante uno o 14 días, disminuyeron

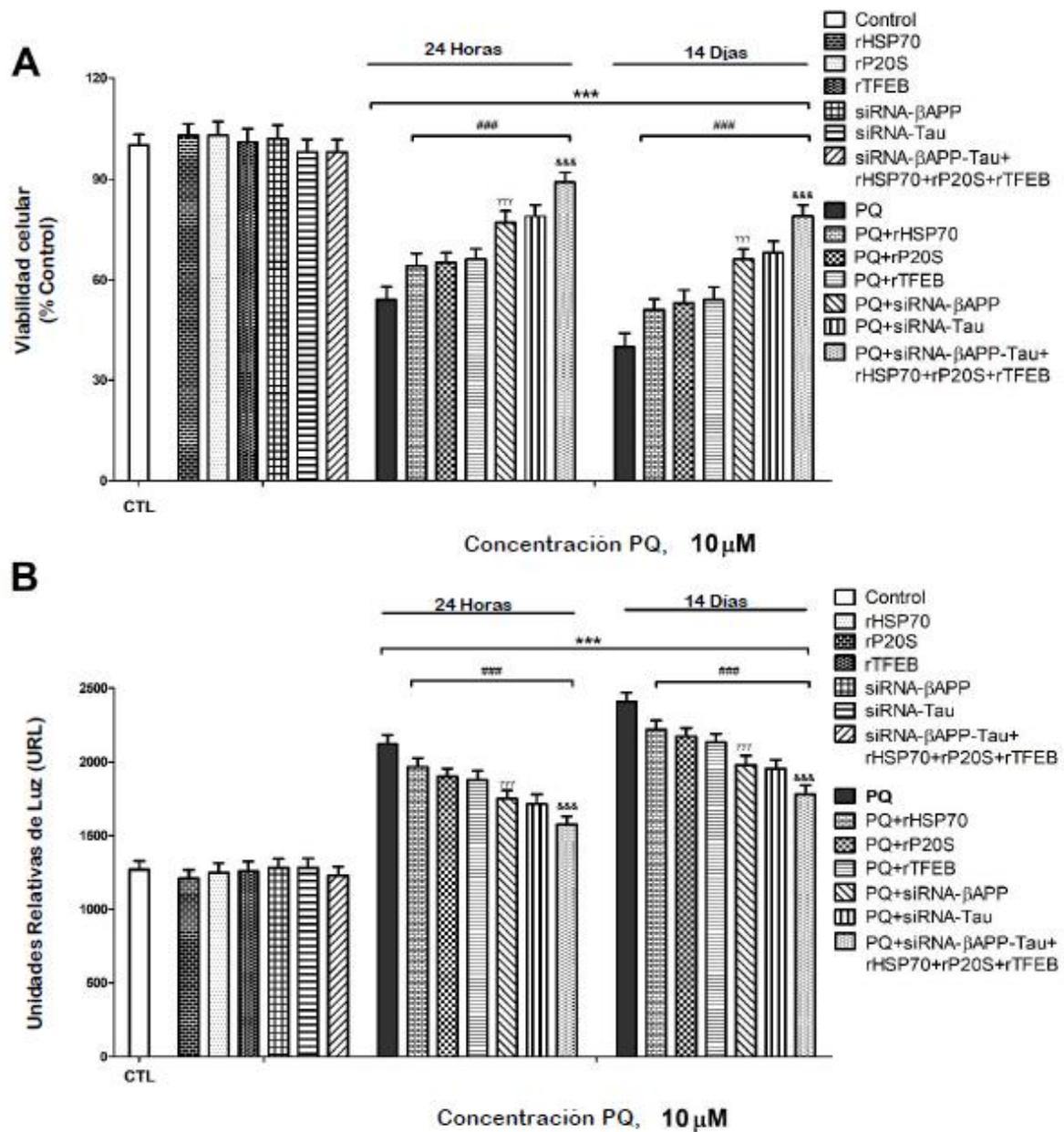
parcialmente la inducción de muerte celular mediante apoptosis causada por el tratamiento individual con PQ, siendo esta atenuación superior con el co-tratamiento con MF-63 y PQ. El co-tratamiento con E2 y PQ indujo una reducción mayor de la muerte por apoptosis producida por el tratamiento solo con PQ en comparación con la atenuación generada por los co-tratamientos de rBDNF o MF-63 con PQ (Figura 24).



**Figura 24.** Efectos del PQ (10 μM) sobre la viabilidad de las células sin transfectar y las células silenciadas simultáneamente para los genes de βAPP y Tau co-tratadas con o sin E2 (10 nM) y/o NAC (1 nM) y/o MF-63 (1 μM) y/o rBDNF (20 μM) determinados mediante el test MTT (A) y el ensayo de actividad de las caspasas 3/7 (B). Los datos representan la media ± error estándar de la media de los resultados de tres experimentos independientes con células de diferentes cultivos, cada uno de ellos realizado por triplicado. \*\*\*p≤0,001 comparado con el control; ###p≤0,001 y ##p≤0,01 comparado con el tratamiento de PQ; &&&p≤0,001 y &p≤0,05 comparado con el tratamiento con PQ y rBDNF; γγγp≤0,001 y γp≤0,05 comparado con el tratamiento con PQ y MF-63; τττp≤0,001 y ττp≤0,01 comparado con el tratamiento con PQ y E2.

Por último, el co-tratamiento único y prolongado de PQ con E2, rBDNF y MF-63 aplicado en células transfectadas para silenciar  $\beta$ APP y Tau produjeron la mayor disminución en la inducción de la muerte celular generada por el PQ, pero no llegó a revertirla completamente (Figura 24). No se detectaron diferencias significativas entre los datos de las células tratadas con vehículo y las células sin ningún tratamiento.

Finalmente, la inducción de muerte celular inducida por PQ también disminuyó, en parte, tras el co-tratamientos con PQ y rHSP70, rP20S y rTFEB, de forma única o simultánea en células con los genes de  $\beta$ APP y Tau silenciados (Figura 25).



**Figura 25.** Resultados de los test MTT (A) y de actividad de las caspasas 3/7 (B). Cada barra representa la media  $\pm$  error estándar de la media de los resultados de tres experimentos independientes con células de diferentes cultivos, cada uno de ellos realizado por triplicado. Los valores obtenidos se normalizaron usando la concentración total de proteínas. \*\*\*  $p \leq 0,001$  comparado con el control; ###  $p \leq 0,001$  comparado con el tratamiento de PQ;  $\tau\tau\tau$   $p \leq 0,001$  comparado con el tratamiento con PQ y rTFEB; &&&  $p \leq 0,001$  comparado con el silenciamiento de Tau en células primarias expuestas al PQ.

# DISCUSIÓN

## **6. DISCUSIÓN**

Los resultados de nuestra investigación muestran que el PQ no altera la expresión génica del ER, lo cual no se había descrito hasta la actualidad. Sin embargo, el tratamiento con PQ redujo la activación del ER, de forma concentración-dependiente, en cultivos neuronales primarios de hipocampo. Por otra parte, el tratamiento único y repetido con PQ incrementó, de forma concentración-dependiente, la producción de radicales superóxido y, en consecuencia, la peroxidación de los lípidos y la carbonilación de las proteínas. Nuestros hallazgos concuerdan con un estudio previo que muestra que la exposición prolongada al PQ favorece la producción de radicales oxidantes y la peroxidación lipídica en el hipocampo de ratón, dando lugar a muerte celular y alteraciones cognitivas (Chen et al., 2010). Además, la administración de NAC bloqueó el estrés oxidativo generado por el PQ completamente, lo cual concuerda con los resultados de trabajos que muestran que NAC, al ser un potente antioxidante, disminuye la generación de estrés oxidativo inducida tras la administración de PQ (Niraula y Kim, 2019). Además, otro estudio señala que los tratamientos antioxidantes previenen el menoscabo en los procesos de memoria y aprendizaje inducido por el PQ (Somayajulu-Nițu et al., 2009), lo que indica que el estrés oxidativo puede que medie los efectos cognitivos derivados de la exposición al PQ. Por su parte, el co-tratamiento con PQ y E2 revirtió parcialmente la producción de especies reactivas de oxígeno y las consiguientes peroxidación lipídica y oxidación proteica. Aunque no hay estudios acerca de los efectos del PQ sobre la acción de los estrógenos, algunos estudios previos han descrito que el E2 atenúa la disminución del número de neuronas y el incremento del estrés oxidativo observado tras la exposición al PQ (Robb y Stuart, 2011; Si et al., 2001). Esta información apoya nuestra hipótesis acerca de una posible acción anti-estrogénica del PQ relacionada con la generación de estrés oxidativo y muerte neuronal.

Puesto que el PQ no altera la expresión de las variantes alfa y beta del ER, el efecto del PQ sobre la activación del receptor podría ser debido al bloqueo del sitio de unión del receptor, o bien, a una alteración de su conformación causada por los radicales libres de oxígeno, como se ha descrito previamente (Fawcett et al., 2002). El bloqueo de la unión efectiva del E2 al ER también podría ejercer un efecto anti-estrogénico, provocando la disminución en el número de receptores activados que podrían internalizarse en el núcleo celular y realizar así su acción.

También, observamos que el tratamiento con PQ durante 24 horas incrementó la expresión del factor NRF2 y de las enzimas SOD1, HO1 y GPX; mientras que, por el contrario, la exposición al PQ durante 14 días redujo la expresión de estas proteínas, de forma concentración-dependiente, en ambos periodos de tratamiento. Previamente, se había descrito que el PQ aumenta la expresión del factor de transcripción NRF2 y de las enzimas antioxidantes reguladas por este factor, como son la SOD1, HO1 y GPX, tras la exposición aguda, tanto en animales como en cultivos celulares, como mecanismo de protección celular frente a la producción de radicales oxidantes ocasionada por el PQ (Dou et al., 2015; Izumi et al., 2015). Sin embargo, de forma similar a lo observado en nuestros resultados, la exposición prolongada al PQ disminuye la expresión de NRF2 y de las enzimas que regula *in vivo* (Li et al., 2016), lo cual corrobora nuestros resultados. En nuestro estudio, el co-tratamiento con PQ y E2 durante 24 h aumentó la expresión de NRF2, SOD1, HO1 y GPX con respecto al tratamiento con PQ, mientras que, tras la exposición prolongada, este co-tratamiento revirtió parcialmente la regulación negativa de la vía NRF2. Así, el tratamiento con E2 tras la exposición prolongada al PQ, podría reducir la producción de radicales oxidantes y el daño celular inducido por este. Es más, la sobreexpresión de las enzimas participantes en la vía NRF2 fue el objetivo de distintos tratamientos frente al estrés oxidativo causado por el PQ, resultando en una

reducción del estrés oxidativo y sus efectos tóxicos (Qin y Hou, 2016; Yan et al., 2017; Zhao et al., 2017). Por otra parte, se ha descrito que el E2 participa en la regulación de la vía NRF2 a través de la vía de señalización PI3K/AKT, la cual representa un mecanismo de protección frente a la síntesis de ROS (Chen et al., 2013; Zhu et al., 2015), lo que se asimila a nuestros resultados. Por lo tanto, la acción antiestrogénica del PQ debilita el mecanismo de defensa celular frente al estrés oxidativo, favoreciendo inicialmente la activación de la vía NRF2 ante la exposición aguda e incrementando su inactivación tras exposiciones prolongadas. Nuestros resultados sugieren que el PQ altera la vía NRF2 mediante la disrupción estrogénica que causa, aunque debe haber otros mecanismos involucrados. En este sentido, existen varias quinasas que fosforilan NRF2, como las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) y la proteína quinasa C (PKC), que regulan la expresión génica de diferentes enzimas antioxidantes, entre otros genes diana (Qin y Hou, 2016; Yan et al., 2017; Zhao et al., 2017). Además, se ha descrito que el PQ altera la expresión de PKC y MAPKs, lo que altera la vía de señalización de NRF2 (Dou et al., 2015; Zhao et al., 2017), por lo que su disfunción en neuronas del hipocampo es posible que participe en los efectos descritos.

El tratamiento con PQ durante 24 horas y 14 días también redujo los niveles de proBDNF y mBDNF en cultivos primarios de neuronas de hipocampo. En este sentido, nunca se han realizado estudios con el fin de determinar los efectos del PQ sobre los niveles de proBDNF y mBDNF. Aun así, se ha descrito que el PQ reduce la expresión del precursor de BDNF en el hipocampo (Rudyk et al., 2019; Mangano et al., 2011) y en el cuerpo estriado (Mangano et al., 2012) de ratones machos tras tratamientos repetidos, y en células SH-SY5Y después de tratamientos durante 24 horas (Alural et al., 2015). Estos datos concuerdan con nuestros resultados y sugieren que el efecto del PQ sobre proBDNF y mBDNF en las neuronas del hipocampo puede deberse a una

reducción de la expresión del precursor de BDNF, aunque no puede descartarse una disminución de la transformación del precursor en proBDNF. Además, el PQ redujo parcialmente la expresión de la enzima tPA, solamente tras tratamientos prolongados. Esta acción la medió a través de la disfunción estrogénica, lo que podría explicar que la reducción de los niveles de proBDNF sea superior tras el tratamiento repetido con PQ, lo cual se debe a la reducción del procesamiento de proBDNF en mBDNF. Hasta el momento, no se ha estudiado el efecto del PQ sobre la enzima tPA en el cerebro, pero se ha descrito que produce un incremento de sus niveles plasmáticos en pacientes afectados por una intoxicación aguda con este herbicida (Seok et al., 2011). Esta discrepancia con nuestros resultados podría ser explicada por tres factores: en primer lugar, las diferentes acciones que esta enzima ejerce en el cerebro y en el plasma; en segundo lugar, el tiempo y nivel de exposición; y por último, las diferencias existentes entre especies y los modelos usados *in vivo* e *in vitro*. Por otra parte, se ha descrito que los agonistas del receptor de estrógenos incrementan la expresión de tPA en células de la línea Hep89 (HepG2 transfectada para expresar ER $\alpha$  de forma estable) (Kelly et al., 2014), por lo que la reducción de la actividad de ER, como produce el PQ, podría reducir la expresión de tPA, corroborando nuestros resultados. Aun así, puede haber otros mecanismos involucrados. En este sentido, el PQ induce la expresión de MAPK en cultivos neuronales (Dou et al., 2015; Ju et al., 2019; Zhao et al., 2017) y se ha descrito que la inducción de esta enzima reduce la expresión de tPA (Son et al., 2002; Ulfhammer et al., 2006), por lo que esta acción podría contribuir a explicar el efecto observado.

Por otra parte, el tratamiento con PQ durante 24 horas y 14 días incrementó la expresión de P75<sup>NTR</sup> y disminuyó la expresión de TrkB en las células del cultivo primario de hipocampo, mediando dichos efectos completamente a través de la disfunción

estrogénica en el caso de TrkB, y parcialmente en el caso de P75<sup>NTR</sup>. Hasta el momento, no se han realizado estudios acerca del efecto del PQ sobre las expresiones génicas de P75<sup>NTR</sup> y TrkB. Sin embargo, se ha descrito que el PQ (0,1  $\mu$ M) induce muerte celular en la línea celular NSC-34, y este efecto se revirtió debido a la regulación negativa de P75<sup>NTR</sup> tras ser tratadas con clozapina y PQ (Turner et al., 2003), lo que sugiere que el PQ puede ejercer su efecto tóxico a través de P75<sup>NTR</sup>. También se ha descrito que la deficiencia de E2 en animales ovariectomizados disminuye la expresión de TrkB y aumenta la de P75<sup>NTR</sup> en el cerebro, y que la administración de E2 revierte este efecto (Hasan et al., 2005; Pan et al., 2010; Ping et al., 2002), apoyando así nuestros resultados. Sin embargo, la alteración de la expresión de P75<sup>NTR</sup> inducida por el PQ parece estar mediada por otros mecanismos adicionales. Con respecto a estos, se ha descrito que el PQ reduce la actividad de la enzima histona desacetilasa (HDAC), así como la expresión de HDAC2, 3, 4 y 7 en células N27, induciendo muerte celular por apoptosis (Song et al., 2011). También se ha descrito que HDAC regula la expresión de P75<sup>NTR</sup> y que la inhibición de su actividad o la reducción de la expresión de HDAC1 y 3 incrementan la expresión de P75<sup>NTR</sup> en células SH-SY5Y (Zhang et al., 2017). De esta forma, si el PQ reduce la actividad de HDAC o la expresión de sus subtipos en los cultivos primarios de neuronas de hipocampo, este mecanismo también podría contribuir a explicar el efecto observado.

Además, nuestro estudio muestra que el tratamiento con PQ durante uno y 14 días incrementó en cultivos neuronales primarios los niveles de PGE2 a través de la sobreexpresión de COX-2, e indujo la expresión de los subtipos EP1 y EP3, al mismo tiempo que redujo la expresión del subtipo EP2, todo ello de forma concentración-dependiente, lo cual no se había descrito hasta el momento. A pesar de que la expresión de la enzima PGES-1 no se vio afectada, no se puede descartar que el efecto del PQ

sobre PGE2 pueda estar mediado, en parte, a través de un incremento de la actividad de PGES-1, y también como consecuencia del aumento de la actividad o expresión de la COX-1, puesto que no hay constancia de que se hayan realizado estudios hasta este momento acerca del efecto del PQ sobre la expresión génica de los subtipos de los receptores EP, PGES-1 y COX-1. De todas formas, se ha descrito en estudios previos que el tratamiento único con PQ aumenta la expresión de COX-2 *in vitro* (De Oliveira et al., 2018; Yang et al., 2010), mientras que el tratamiento prolongado la incrementa *in vivo* (Malekinejad et al., 2013). Por su parte, el tratamiento único con PQ solamente incrementa los niveles plasmáticos de PGE2 en ratas (Giri et al., 1980). Todo ello, refrenda nuestros resultados. El co-tratamiento con PQ y E2 revirtió parcialmente el efecto del PQ sobre PGE2, COX-2 y los subtipos del receptor de EP, lo que sugiere que la alteración estrogénica inducida por el PQ media una parte de estos efectos, por lo que parece que otros mecanismos también deben estar implicados. Se ha descrito que la acción de los estrógenos regula negativamente la expresión de COX-2 en las neuronas, tanto en estudios *in vitro* (Stacey et al., 2016) como *in vivo* (Menze et al., 2015). Además, se ha descrito que los niveles de PGE2 en el cerebro se incrementan en ratas ovariectomizadas, que presentan niveles de estrógenos circulantes inferiores (Wang et al., 2014), lo cual apoya nuestros resultados. También se ha descrito que los estrógenos regulan la expresión de los subtipos del receptor de EP, presentando diferentes efectos en función del tejido estudiado (Huang et al., 2015; Rage et al., 1997), pero ninguno de los estudios fue realizado en el hipocampo. Por otra parte, el PQ incrementa la liberación de glutamato, activando los receptores NMDA (Del Pino et al., 2017), lo cual induce la sobreexpresión de COX-2 (Pepicelli et al., 2002) y la síntesis de PGE2 (Pepicelli et al., 2005), por lo que este mecanismo también podría contribuir a los efectos observados.

Las disfunciones de las rutas de señalización en las que participan los estrógenos y PGE2 median parte del efecto del PQ sobre proBDNF y mBDNF. Se ha observado que el promotor de BDNF presenta un elemento sensible al receptor de estrógenos (Sato et al., 2007; Sohrabji et al., 1995; Zhou et al., 2005). Se ha descrito que animales ovariectomizados presentan una menor expresión de BDNF en el hipocampo y otras regiones cerebrales, al mismo tiempo que la administración exógena de E2 revierte este déficit en su expresión (Bora et al., 2005; Harte-Hargrove et al., 2013; Pan et al., 2010). Además, la PGE2 ejerce una regulación negativa sobre la expresión de BDNF en el hipocampo de rata (Ajmone-Cat et al., 2006). A su vez, la sobreexpresión de COX-2 incrementa los niveles de PGE2 y la expresión del receptor EP3, a la vez que disminuye la expresión de BDNF en hipocampo de rata, mientras que su silenciamiento revierte estos efectos. Esto indica que PGE2 disminuye la expresión de BDNF a través de EP3 (Luo et al., 2017), lo cual confirma nuestros resultados y sugiere que PGE2 podría mediar, mediante la activación de EP3, el efecto que el PQ genera sobre BDNF. En relación a las disfunciones en las rutas de señalización en las que participan PGE2 y los estrógenos, además de los citados, deben participar otros mecanismos. En este sentido, se ha descrito que el bloqueo del receptor de NMDA genera una disminución de la expresión de BDNF (Tanqueiro et al., 2018; Yu et al., 2019). Además, como se ha señalado anteriormente, el tratamiento repetido con PQ reduce la expresión de NMDAR1 (Del Pino et al., 2017), lo que indica que este mecanismo podría jugar un papel en este efecto únicamente tras la exposición continuada al PQ.

Nuestros resultados también muestran que el nivel de expresión de HSP70 se incrementó tras la exposición al PQ durante 24 horas y 14 días, mientras que se redujo a partir de la concentración de 20  $\mu$ M. Se ha descrito que el tratamiento único con PQ incrementa los niveles de HSP70 en las neuronas del bulbo olfatorio de rata a

concentraciones que inducen estrés oxidativo como mecanismo protector, pero no muerte celular (Crum et al., 2015), lo cual apoya nuestros resultados. Sin embargo, también se ha descrito que el tratamiento repetido con PQ no afecta a la expresión de HSP70 en el cuerpo estriado de ratón. Estas diferencias podrían deberse a los diferentes modelos usados y al tiempo de exposición al PQ.

Por su parte, el nivel de actividad de P20S disminuyó tras la exposición al PQ durante 24 horas a partir de la concentración de 10  $\mu\text{M}$ , y durante 14 días a partir de la concentración de 1  $\mu\text{M}$ . Además, se ha descrito que el PQ inhibe la actividad de P20S en células PC12 y N27 de rata después de 48 horas de tratamiento a partir de concentraciones de 50  $\mu\text{M}$  y 500  $\mu\text{M}$ , respectivamente (Izumi et al., 2015; Chinta et al., 2008) o en células humanas SH-SY5Y tras 6 y 24 horas de tratamiento a concentraciones de 20  $\mu\text{M}$  y 500  $\mu\text{M}$ , respectivamente (Ding y Keller, 2001; Chen et al., 2017), apoyando así nuestros resultados. Las diferencias observadas en las concentraciones a partir de las cuales comienza el efecto pueden achacarse al modelo, tiempo de exposición o protocolo usados. Además, el PQ induce estrés oxidativo, oxidación proteica e incremento de los niveles de proteínas A $\beta$  y pTau (Moyano et al., 2020), cuya acumulación deriva en la inhibición de la actividad de P20S (Gillardon et al., 2007), lo que podría constituir la causa del efecto observado.

En relación con TFEB, observamos que el tratamiento único y repetido con PQ redujo su nivel de expresión. Se ha sugerido que el PQ disminuye la ALP a causa de la inducción de mTOR, el cual es inhibidor de la ALP, pero al mismo tiempo también se observa la inducción de marcadores de activación de la ALP (Wills et al., 2012). En este sentido, TFEB es el principal regulador de la ALP, y su inhibición, debida probablemente a la inducción de mTOR, junto a la CD, produce la inhibición de la

ALP, poniendo de manifiesto este efecto como uno de los mecanismos que dan lugar a la acumulación de proteínas tóxicas.

Por otra parte, el PQ influyó negativamente en la expresión de las proteínas sinápticas NMDAR1, PSD95, SYP y SPN, disminuyendo de forma concentración-dependiente, comenzando a una concentración de 10  $\mu\text{M}$  en caso del tratamiento único, y a 1  $\mu\text{M}$  en caso del tratamiento continuado. Las proteínas sinápticas, entre las que se incluyen NMDAR1, PSD95, SYP y SPN, regulan la formación de las terminaciones dendríticas, así como su forma, jugando también un papel fundamental en la plasticidad sináptica (Glantz et al., 2007; Li et al., 2011). En estudios previos se ha determinado que el PQ reduce la densidad de las espinas dendríticas en las neuronas del hipocampo de ratones tras exposiciones agudas (Calò et al., 1990). Además, también se ha descrito que el PQ reduce la expresión de NMDAR1 tras su administración única y repetida en cultivos primarios de neuronas de hipocampo (Del Pino et al., 2017). Esta información y los datos obtenidos sugieren que la alteración de estas proteínas podría intervenir en los efectos que el PQ produce sobre las terminaciones dendríticas de las neuronas y los trastornos de la memoria y aprendizaje descritos. La administración concomitante de PQ y E2 atenuó completamente la disminución de la síntesis de estas proteínas sinápticas producida tras la exposición al PQ individualmente. En este sentido, se ha descrito que el ER regula las funciones de memoria y aprendizaje y los procesos de plasticidad sináptica a través de la regulación de NMDAR1, PSD95, SYP y SPN (Brake et al., 2001; McEwen et al., 2001; Murphy et al., 1998; Rune et al., 2002), lo cual apoya nuestros resultados, y sugiere que la alteración de la expresión de estas proteínas es posible que derive en la disrupción de la plasticidad sináptica y en el desarrollo de desórdenes cognitivos. Además, observamos que la alteración de las proteínas

sinápticas fue superior tras exposiciones repetidas, lo que probablemente puede deberse a la reducción mayor de la actividad del ER a los 14 días de exposición al PQ.

Por su parte, la administración del PQ también indujo un incremento en los niveles de las proteínas pTau, A $\beta$  1-40 y A $\beta$  1-42 tras la administración única (a partir de una concentración de 10  $\mu$ M) y prolongada (a partir de una concentración de 1  $\mu$ M), siendo mayor la inducción de A $\beta$  1-42. Esto es importante porque se ha visto en estudios con animales que A $\beta$  1-42 causa mayor citotoxicidad (Klein et al., 1999). También se ha descrito que la administración de PQ a corto y largo plazo en ratones Tg2576, los cuales sobreexpresan APP, favorece la generación de proteínas A $\beta$  en la corteza cerebral (Chen et al., 2012, 2015) y pTau en el cuerpo estriado (Wills et al., 2012), lo cual apoya nuestros resultados. Además, la disminución de la actividad de ER medió en parte estos efectos. Estudios previos han señalado que la deficiencia de E2 o ciertos factores anti-estrogénicos inducen la producción de proteínas A $\beta$  y Tau, la reducción del número de neuronas y el desarrollo de deficiencias en la capacidad de memoria y aprendizaje (Anukulthanakorn et al., 2013; Bang et al., 2011; Tang et al., 2018), lo que apoya nuestros resultados. Esos efectos resultaron ser más marcados tras la exposición repetida al PQ, lo que podría ser debido a una reducción superior de la actividad de ER observada tras la exposición continuada.

La disrupción estrogénica inducida por el PQ medió el incremento de PGE2 y la disminución de BDNF, alteraciones que a su vez observamos que indujeron la producción de las proteínas A $\beta$  1-40, A $\beta$  1-42 y pTau, y la generación de estrés oxidativo inducido por el PQ. Se ha descrito que PGE2 incrementa la producción de proteínas A $\beta$  y Tau a través de la activación del receptor EP2 (Cao et al., 2019; Gabr et al., 2017). Sin embargo, nuestros resultados muestran que el PQ redujo la expresión de EP2, lo cual parece indicar que estos efectos no estarían mediados por este subtipo del

receptor. Por su parte, el receptor EP3 también está involucrado en la producción de las proteínas A $\beta$  y Tau (Cao et al., 2019; Shi et al., 2012). Por ello, la sobreexpresión y activación de EP3 por PGE2 producida por el PQ, podría mediar la producción de dichas proteínas. Además, el incremento de la expresión de COX-2 y del nivel de PGE2 se ha relacionado con la inducción de estrés oxidativo celular (Luo et al., 2011; Pepicelli et al., 2005; Qin et al., 2016), lo cual apoya nuestros resultados. En este mismo sentido, la activación de los subtipos EP1, EP2 y EP3 del receptor también se ha relacionado con el incremento de radicales oxidantes en las neuronas (Liang et al., 2005; Saleem et al., 2007; Shi et al., 2012; Zhao et al., 2015), por lo que el PQ podría mediar el incremento del estrés oxidativo a través la activación de los subtipos EP1 y EP3.

Asimismo, se ha descrito que la activación de la vía de señalización BDNF/TrkB reduce la generación de estrés oxidativo y la formación de proteínas A $\beta$  y Tau (Lee et al., 2019; Song et al., 2015; Wu et al., 2019), mientras que deficiencias en la vía mBDNF/TrkB dan lugar al aumento del estrés oxidativo y los niveles de A $\beta$  y Tau (Gerenu et al., 2017; Hacıoglu et al., 2016; Wang et al., 2019; Zhang et al., 2018). Por ello, la reducción observada en los niveles de mBDNF y en la expresión de TrkB podría causar las alteraciones descritas. Por otra parte, se ha descrito que proBDNF induce la formación de las proteínas A $\beta$  y Tau (Chen et al., 2017; Mañucat-Tan et al., 2019) y la generación de estrés oxidativo (Fleitas et al., 2018). El proBDNF realiza su actividad a través de la activación de P75<sup>NTR</sup>, la cual se ha descrito que induce la formación de proteínas Tau (Mañucat-Tan et al., 2019) y el incremento del estrés oxidativo, especialmente debida a la acción de las proteínas A $\beta$  cuando se une a ellas (Perini et al., 2002). Además, la activación de P75<sup>NTR</sup> gracias a las proneurotrofinas, reduce la actividad de TrkB y su efecto neuroprotector (Song et al., 2010). En consecuencia, el efecto final de proBDNF y mBDNF está regulado por la proporción de ambos factores y por la expresión de sus

receptores (Foltran y Díaz., 2016). Nuestros resultados muestran que el tratamiento único y repetido con PQ reduce los niveles de proBDNF, así que su contribución al efecto observado parece limitada. Sin embargo, su reducción fue inferior tras el tratamiento repetido con PQ debido a la disminución de su transformación en mBDNF, lo que incrementa la ratio proBDNF/mBDNF, así que proBDNF podría mediar los efectos producidos tras exposiciones continuadas. Además, también aumentó la expresión de P75<sup>NTR</sup>, y de esta forma puede compensarse la reducción de los niveles de proBDNF y bloquear la señalización mBDNF/TrkB, dando lugar a al efecto final observado.

Finalmente observamos que el incremento de la concentración de las proteínas Tau y A $\beta$  producido por el PQ tras administración única y prolongada fue mediado parcialmente a través de la alteración de la expresión de HSP70 y TFEB y de la actividad de P20S. En este sentido, se ha descrito que las HSPs regulan la desagregación y degradación de proteínas aberrantes, como A $\beta$  y Tau (Gumeni et al., 2017; Saibil, 2013), siendo HSP70 la principal representante de esta familia de proteínas (Fernández-Fernández et al., 2017). Además, en su eliminación también participan los proteasomas y la ALP (Cao et al., 2014). La inhibición de P20S se ha relacionado con el incremento de los niveles de proteínas A $\beta$  y Tau (Bonet-Costa et al., 2016), la muerte de neuronas en el hipocampo y el desarrollo de disfunciones cognitivas (Zhao et al., 2018), por lo que este mecanismo podría mediar los efectos observados. Por otra parte, se ha descrito que la disminución de TFEB está implicada en el aumento de estas proteínas tóxicas, estrés oxidativo, así como en la aparición de muerte celular y alteraciones cognitivas (Cortes y La Spada, 2019). Asimismo, se ha descrito que la sobreexpresión de TFEB reduce la acumulación de proteínas A $\beta$  y Tau, estrés oxidativo, neurodegeneración y déficits cognitivos (Cortes y La Spada, 2019), lo que apoya

nuestros resultados. HSP70 es el principal regulador de la degradación proteica, ya que regula el mecanismo de autofagia y la actividad proteasómica (Fernández-Fernández et al., 2017), por lo que la alteración de estos mecanismos de eliminación podría estar relacionada con la disfunción de HSP70, así como otros mecanismos no estudiados regulados por ella. Por su parte, TFEB está regulado por diferentes factores como mTOR, y se ha descrito que el PQ es capaz de inducirlo (Cortes y La Spada, 2019). De esta forma, este mecanismo puede estar detrás de la regulación negativa de TFEB, pero no puede descartarse que actúen otros mecanismos.

Sin embargo, otros mecanismos parecen estar implicados en la alteración de los niveles de las proteínas citotóxicas descritas. Por ello, es necesario realizar estudios complementarios con el fin de determinar el resto de mecanismos a través de los cuales el PQ altera las vías de aclaramiento de proteínas aberrantes y si su síntesis también está involucrada en su acumulación. En este sentido, los niveles de glutamato y de expresión de las variantes de la AChE se incrementaron tras 1 y 14 días de tratamiento con PQ en cultivos primarios de hipocampo (Del Pino et al., 2017). Se ha descrito que la variante AChE-S actúa como promotor de la síntesis de A $\beta$  y Tau (Berson et al., 2008; Toiber et al., 2009). Además, la hiperfosforilación de la proteína Tau se ha relacionado con la alteración de los niveles de glutamato en ratones 3xTg-AD. La recuperación de la homeostasis del glutamato disminuye las alteraciones de los niveles de proteína Tau y mejora la función cognitiva (Zumkehr et al., 2015). Las ERO también se han relacionado con la hiperfosforilación de Tau y la síntesis de proteínas A $\beta$  (Bond et al., 2006; Giraldo et al., 2014; Rojo et al., 2008; Tamagno et al., 2005; Wang et al., 2009), lo que también podría contribuir a explicar el efecto observado. Además, el estrés oxidativo induce la desnaturalización de las proteínas, incluidas HSP70, P20S y TFEB, reduciendo su funcionalidad, por lo que independientemente de sus niveles, pierden

parte de su actividad y pueden originar el incremento de los niveles de proteínas A $\beta$  y Tau como consecuencia de su acumulación. Sin embargo, no se puede excluir, que aparte de la alteración de los mecanismos de eliminación de estas proteínas, también puede existir la posibilidad de que la producción de estas proteínas esté incrementada. De esta forma, los mecanismos indicados pueden intervenir igualmente en las disfunciones descritas.

Acorde con estudios previos realizados en animales (Chen et al., 2010) y en cultivos primarios de neuronas de hipocampo (Del Pino et al., 2017), hemos determinado que la exposición al PQ durante 24 horas y 14 días induce la muerte de neuronas mediante necrosis y apoptosis en cultivos neuronales primarios procedentes del hipocampo. Nuestros resultados concuerdan con los de trabajos anteriores que indican que el PQ produce muerte celular por apoptosis y necrosis en el hipocampo tras administrarse de forma continuada en animales (Chen et al., 2010) y tras administrarse única y repetidamente en cultivos primarios de neuronas de hipocampo (Del Pino et al., 2017). La muerte celular inducida por la administración de PQ se redujo cuando se aplicó sobre células con los genes  $\beta$ APP y Tau silenciados o sobre células no transfectadas tratadas conjuntamente con PQ y E2 o NAC. Estos resultados sugieren que la disfunción del ER, la alteración de la producción de las proteínas  $\beta$ -amiloidea y pTau, y el estrés oxidativo generado, median la disminución del número de neuronas inducida por la exposición al PQ. Además, la muerte celular inducida resultó ser superior tras la administración repetida, posiblemente debido a una mayor inhibición de las enzimas antioxidantes, o bien, a que los mecanismos implicados en la muerte celular se activan en mayor medida por la exposición continuada al PQ. Por otra parte, se ha relacionado la desregulación de los mecanismos antioxidantes celulares con los déficits cognitivos, la muerte de neuronas y la enfermedad de Alzheimer (Anukulthanakorn et al., 2013; Auld et al.,

2002; Bang et al., 2011; Kar et al., 2004; Muller-Spahn y Hock, 1999; Tang et al., 2018).

La capacidad de E2 para bloquear la inducción de muerte celular tras la exposición al PQ fue superior a la producida mediante el silenciamiento de los genes  $\beta$ APP o Tau, y también a la producida en células no transfectadas tras la administración de PQ junto con NAC. Estos resultados sugieren que la alteración de la actividad de ER causada por el PQ genera además sus efectos a través de otros mecanismos diferentes a la producción de proteínas A $\beta$  y Tau o la generación estrés oxidativo, como podrían ser la alteración de la regulación las HSPs y factores de crecimiento relacionados con la viabilidad celular (García-Segura et al., 2001). En este sentido, en otros estudios posteriores para determinar otros mecanismos implicados, determinamos que la muerte celular inducida por el PQ está mediada por PGE2 y BDNF. Se ha descrito que PGE2 induce la muerte celular a través de la activación de su receptor, específicamente, de los subtipos EP1 (Liu et al., 2012; Zhen et al., 2012), EP2 (Miyagishi et al., 2013; Takadera et al., 2004) y EP3 (Han et al., 2016; Ni et al., 2016). Por lo tanto, la activación de los subtipos EP1 y EP3 podría contribuir a la muerte celular observada. Sin embargo, también se ha descrito que los subtipos EP2 y EP3 juegan un papel neuroprotector frente a agresiones tóxicas (Andreasson, 2010; Cunningham y Skelly, 2012). Este efecto contradictorio descrito en la literatura podría deberse a que ambos subtipos presentan a su vez diferentes variantes (Fröhlich et al., 2003; Pierce y Regan, 1998), pudiendo tener efectos opuestos en función de cuál de las variantes se exprese; aun así, se necesitan estudios posteriores para determinar la contribución exacta de estos receptores y sus variantes en el efecto citotóxico inducido por el PQ mediante la PGE2. También se ha descrito que mBDNF es un factor neuroprotector imprescindible para el mantenimiento de la viabilidad neuronal (Foltran y Díaz, 2016) y que su reducción induce muerte

celular (Hu et al., 2014; Zhong et al., 2018; Song et al., 2015), lo que apoya nuestros resultados. Asimismo, se ha descrito que la interacción de proBDNF con P75<sup>NTR</sup> induce muerte celular (Fleitas et al., 2018). La participación de proBDNF en la inducción de muerte celular parece limitarse a medida que su expresión se reduce, pero la sobreexpresión de P75<sup>NTR</sup> podría compensar parcialmente este defecto en su expresión. La disminución de mBDNF, especialmente significativa tras la exposición repetida al PQ, junto a la reducción de la expresión de TrkB, podría explicar el nivel de muerte celular observado, siendo más marcado tras la exposición continuada al PQ.

Finalmente, nuestros resultados demostraron que la inhibición de la actividad del P20S y la disminución de la expresión de TFEB y HSP70 también median en parte la muerte neuronal producida tras la exposición al PQ. En estudios previos se ha descrito que la sobreexpresión de HSP70 previene la degeneración inducida por el PQ en células de rata de la línea N18 (Donaire et al., 2005), lo cual apoya nuestros resultados. Tal como se ha comentado anteriormente, HSP70 media la eliminación de Tau, A $\beta$  y otras proteínas tóxicas a través de la actividad del proteasoma o la ALP (Fernández-Fernández et al., 2017), por lo que la disminución de sus actividades podría generar el aumento de los niveles de estas proteínas, dando lugar a la muerte celular observada en los cultivos primarios. Además, estos mecanismos desencadenan la vía de muerte celular cuando el daño celular es demasiado grande como para ser reparado (Cortes y La Spada, 2019), provocando este efecto independientemente del efecto que ejercen las proteínas tóxicas.

Por otra parte, en las células silenciadas para los genes  $\beta$ APP y Tau, el tratamiento combinado con PQ, E2 y NAC resultó ser incapaz de revertir completamente la muerte celular causada por el PQ. El tratamiento de PQ combinado con BDNF, MF-63, NAC y E2, en células transfectadas con ARNsi para  $\beta$ APP y Tau tampoco fue capaz de

bloquear completamente la aparición de muerte neuronal causada por el PQ. Finalmente, el tratamiento combinado con PQ, rHSP70, rP20S y rTFEB de células transfectadas con ARNsi para silenciar los genes de  $\beta$ APP y Tau, tampoco fue capaz de revertir completamente la muerte neuronal causada por el PQ, lo que indica que otros mecanismos podrían estar detrás de muerte celular observada, además de los mecanismos comentados previamente. En este sentido, el PQ es capaz de bloquear los receptores colinérgicos nicotínicos  $\alpha_2\beta_2$  de neuronas procedentes de la sustancia negra y cuerpo estriado del cerebro de ratón (Khwaja et al., 2007). El subtipo del receptor nicotínico expresado en mayor proporción en el hipocampo es el alfa 7 ( $\alpha_7$ -nAChR) y, precisamente, este receptor es importante en el mantenimiento de la funcionalidad de las neuronas y de las funciones de memoria y aprendizaje. Se ha observado que la reducción de  $\alpha_7$ -nAChR intensifica el daño producido en el hipocampo y las disfunciones cognitivas en ratones (Hernandez et al., 2010; Cheng y Yakel, 2015). De este modo, la alteración de  $\alpha_7$ -nAChR podría estar involucrada en la generación de las disfunciones cognitivas descritas. Además, la COX-2 media no solo la síntesis de PGE2, sino también de otras prostaglandinas y tromboxanos, cuyo incremento también se ha relacionado con el desencadenamiento de muerte neuronal (Iijima et al., 1996; Liu et al., 2013) y la inducción de alteraciones cognitivas (Guo et al., 2017; Van Kooten et al., 1999), por lo que la sobreexpresión de la COX-2 inducida por el PQ también podría estar involucrada en estos efectos a través de otras rutas de señalización. También, se ha descrito que el receptor P75<sup>NTR</sup> puede ser activado por diferentes proneurotrofinas (Schindowski et al., 2008) o por las proteínas A $\beta$  (Yaar et al., 1997), lo que conduce a alteraciones cognitivas (Zeng et al., 2011), por lo que podría también contribuir al efecto observado. Por último, se ha descrito que el PQ altera la ruta de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina (Zhao et al., 2018), la cual regula la formación de proteínas tóxicas, el

mantenimiento de la viabilidad celular, la plasticidad sináptica y los procesos de memoria y aprendizaje (Zhao et al., 2018; Tapia-Rojas e Inestrosa, 2018). Por ello, disfunciones que afectasen a la ruta Wnt/ $\beta$ -catenina también podrían causar las alteraciones observadas relacionadas con las proteínas tóxicas, la muerte celular y el déficit cognitivo descrito tras la exposición al PQ.

En función de todo lo expuesto, se puede concluir que la administración única y repetida de PQ produce disfunciones a nivel estrogénico, las cuales alteran las proteínas sinápticas, produciendo una reducción de la densidad de las espinas dendríticas que pueden conducir a las alteraciones cognitivas descritas. Además, la disrupción estrogénica altera las rutas de señalización PGE2/EP1-4 y BDNF/TrkB/P75<sup>NTR</sup> dando lugar a la inducción de estrés oxidativo en las neuronas, al incremento de los niveles de proteínas citotóxicas, como A $\beta$  y Tau, y desencadenando la inducción de muerte neuronal en el hipocampo a través de los mecanismos de apoptosis y necrosis, que también puede desencadenar las alteraciones cognitivas descritas. Finalmente, el PQ también medió la acumulación de proteínas A $\beta$  y Tau y la inducción de muerte neuronal en el hipocampo observada tras la exposición durante 24 horas y 14 días, mediante la alteración de la expresión de HSP70 y TFEB, y de la inhibición de la actividad de P20S.

Los resultados expuestos en la presente tesis, en caso de validarse en estudios *in vivo* podrían ser de gran interés para explicar los desórdenes neurodegenerativos y cognitivos observados tras la exposición al PQ. En este sentido, es necesario efectuar estudios posteriores para dilucidar el resto de mecanismos involucrados en el daño producido por el PQ en las neuronas del hipocampo, así como el papel ejercido por dichos mecanismos en la alteración de los procesos cognitivos de memoria y aprendizaje inducida por el PQ en animales. Además, estos datos pueden proporcionar información novedosa acerca de varios de los efectos tóxicos producidos tras la administración del PQ y, a su vez, una

manera de identificar nuevos enfoques útiles en la prevención y manejo clínico del daño neurológico observado en la toxicidad del PQ.

# **CONCLUSIONES**

## **7. CONCLUSIONES**

(1) Los resultados de nuestra investigación demuestran que el PQ, tras la exposición aguda (desde 10  $\mu\text{M}$ ) y repetida (desde 1  $\mu\text{M}$ ), disminuye la activación del ER sin alterar su expresión, de forma concentración-dependiente, en las neuronas de los cultivos primarios de hipocampo.

(2) El PQ induce, tras la exposición única (desde 10  $\mu\text{M}$ ) y repetida (desde 1  $\mu\text{M}$ ), la reducción de la expresión y la síntesis de las proteínas sinápticas a través de la disrupción estrogénica.

(3) El PQ produce, tras la exposición única (desde 10  $\mu\text{M}$ ) y repetida (desde 1  $\mu\text{M}$ ), la generación de ERO, peroxidación lipídica y carbonilación proteica mediadas, parcialmente, por la disrupción estrogénica que inhibe la vía antioxidante NRF2, así como por la disminución de los niveles del BDNF y el aumento de la síntesis de la PGE2 en las neuronas de los cultivos primarios del hipocampo.

(4) El PQ altera la ruta de señalización de BDNF al inducir la disminución concentración-dependiente de los niveles de proBDNF, de mBDNF y de TrkB, y el aumento de P75<sup>NTR</sup>, tras la exposición única (desde 10  $\mu\text{M}$ ) y repetida (desde 1  $\mu\text{M}$ ), así como también la disminución del tPA, únicamente tras la exposición repetida (desde 1  $\mu\text{M}$ ), en las neuronas de los cultivos primarios del hipocampo. Estos efectos son mediados a través de la disrupción estrogénica, completamente en el caso de TrkB y parcialmente en el caso del proBDNF, mBDNF, P75<sup>NTR</sup> y tPA, así como también a través de la acción de la PGE2, en el caso del proBDNF y del mBDNF.

(5) El PQ induce, tras la exposición aguda (desde 10  $\mu\text{M}$ ) y repetida (desde 1  $\mu\text{M}$ ), el incremento concentración-dependiente de los niveles de la COX-2, de la PGE2 y de los subtipos EP1 y EP3 del receptor de PGE2, así como la disminución del nivel del subtipo EP2, alterando esta ruta de señalización celular en las neuronas de los cultivos primarios del hipocampo. Estos efectos son mediados parcialmente por la disrupción estrogénica, la cual media su vez media el incremento de PGE2, también parcialmente, a través de la sobreexpresión de la COX-2.

(6) El PQ produce el aumento de la concentración de proteínas  $\beta$ -amiloideas y Tau, de forma concentración-dependiente, tras la exposición única (desde 10  $\mu\text{M}$ ) y repetida (desde 1  $\mu\text{M}$ ) en las células de los cultivos primarios del hipocampo. Además, nuestros resultados indican que la alteración en la actividad estrogénica se encuentra mediando su acumulación, al menos, parcialmente a través de la disminución de los niveles del BDNF y el aumento de la producción de la PGE2.

(7) El PQ induce una disminución concentración-dependiente de la expresión de la HSP70, del TFEB y de la CD, y de la actividad de P20S, tras la exposición única (desde 20  $\mu\text{M}$  en el caso de HSP70, desde 1  $\mu\text{M}$  en el caso del TFEB y desde 10  $\mu\text{M}$  en el caso de la CD) y repetida (desde 1  $\mu\text{M}$ ), en las neuronas de los cultivos primarios del hipocampo, mediando estos mecanismos, en parte, el aumento de la concentración de las proteínas  $\beta$ -amiloideas y Tau.

(8) El PQ induce muerte celular por apoptosis y necrosis, mediada parcialmente por la generación de estrés oxidativo, la alteración de las rutas de señalización del BDNF y de la PGE2 y la acumulación de proteínas  $\beta$ -amiloideas y Tau. Asimismo, nuestros

resultados indican que la disrupción estrogénica media, en parte, la inducción de todos los mecanismos descritos. Sin embargo, deben existir otros mecanismos involucrados en la inducción de muerte celular causada por el PQ en las neuronas del hipocampo.

(9) Se requieren estudios posteriores con el fin de identificar el resto de mecanismos implicados en los efectos observados en las neuronas del hipocampo, al igual que para comprobar la implicación de todos estos mecanismos en los déficits cognitivos *in vivo*.

# **BIBLIOGRAFÍA**

## **8. BIBLIOGRAFÍA**

Ait-Bali Y, Ba-M'hamed A, Bennis M. Prenatal Paraquat exposure induces neurobehavioral and cognitive changes in mice offspring. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2016; 48:53-62.

Ajmone-Cat MA, Iosif RE, Ekdahl CT, Kokaia Z, Minghetti L, Lindvall O. Prostaglandin E2 and BDNF levels in rat hippocampus are negatively correlated with status epilepticus severity: no impact on survival of seizure-generated neurons. *Neurobiol Dis*. 2006;23(1):23-35.

Alural B, Ozerdem A, Allmer J, Genc K, Genc S. Lithium protects against paraquat neurotoxicity by NRF2 activation and miR-34a inhibition in SH-SY5Y cells. *Front Cell Neurosci*. 2015;9:209.

Andreasson K. Emerging roles of PGE2 receptors in models of neurological disease. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2010;91(3-4):104-12.

Anukulthanakorn K, Malaivijitnond S, Kitahashi T, Jaroenporn S, Parhar I. Molecular events during the induction of neurodegeneration and memory loss in estrogen-deficient rats. *Gen Comp Endocrinol*. 2013; 181:316-323.

Auld DS, Kornecook TJ, Bastianetto S, Quirion R. Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to beta-amyloid peptides, cognition, and treatment strategies. *Prog Neurobiol*. 2002; 68; 209-245.

Bagetta G, Corasaniti MT, Iannone M, Nistico G, Stephenson JD. Production of limbic motor seizures and brain damage by systemic and intracerebral injections of paraquat in rats. *Pharmacol Toxicol*. 1992;71:443-448.

Baloyannis SJ. Brain capillaries in Alzheimer's disease. *Hell J Nucl Med*. 2015;1:152.

Bang Y, Lim J, Kim SS, Jeong HM, Jung KK, Kang IH, Lee KY, Choi HJ. Aroclor 1254 interferes with estrogen receptor-mediated neuroprotection against beta-amyloid toxicity in cholinergic SN56 cells. *Neurochem Int*. 2011; 59:582-590.

Berson A, Knobloch M, Hanan M, Diamant S, Sharoni M, Schuppli D, Geyer BC, Ravid R, Mor TS, Nitsch RM, Soreq H. Changes in readthrough acetylcholinesterase expression modulate amyloid-beta pathology. *Brain*. 2008; 131:109-119.

Bonavía R, Sáenz V, Guitart P, López C, Rodón J, Trilla V, Antonín J. Intoxicación por paraquat: revisión. *Clínica Veterinaria de Pequeños Animales*. 1991;11(3):137-158.

Bonet-Costa V, Pomatto LC, Davies KJ. The Proteasome and Oxidative Stress in Alzheimer's disease. *Antioxid Redox Signal*. 2016;25(16):886-901.

Bond CE, Patel P, Crouch L, Tetlow N, Day T, Abu-Hayyeh S, Williamson C, Greenfield SA. Astroglia up-regulate transcription and secretion of 'readthrough' acetylcholinesterase following oxidative stress. *Eur J Neurosci*. 2006;24:381-386.

- Bora SH, Liu Z, Kecojevic A, Merchenthaler I, Koliatsos VE. Direct, complex effects of estrogens on basal forebrain cholinergic neurons. *Exp Neurol*. 2005;194(2):506-22.
- Brake WG, Alves SE, Dunlop JC, Lee SJ, Bulloch K, Allen PB, Greengard P, McEwen BS. Novel target sites for estrogen action in the dorsal hippocampus: an examination of synaptic proteins. *Endocrinology*. 2001; 142:1284-1289.
- Breckenridge CB, Sturgess NC, Butt M, Wolf JC, Zadory D, Beck M, Mathews JM, Tisdell MO, Minnema D, Travis KZ, Cook AR, Botham PA, Smith LL. Pharmacokinetic, neurochemical, stereological and neuropathological studies on the potential effects of paraquat in the substantia nigra pars compacta and striatum of male C57BL/6J mice. *NeuroToxicology*. 2013;37:1-14.
- Burk RF, Lawrence RA, Lane JM. Liver necrosis and lipid peroxidation in the rat as the result of paraquat and diquat administration. *J. Clin. Invest*. 1980;65:1024-1031.
- Calò M, Iannone M, Passafaro M, Nisticò G. Selective vulnerability of hippocampal CA3 neurones after microinfusion of paraquat into the rat substantia nigra or into the ventral tegmental area. *J Comp Pathol*. 1990;103:73-78.
- Cao J, Zhong MB, Toro CA, Zhang L, Cai D. Endo-lysosomal pathway and ubiquitin-proteasome system dysfunction in Alzheimer's disease pathogenesis. *Neurosci Lett*. 2019;703:68-78.
- Chan BS, Seale JP, Duggin GG. The mechanism of excretion of paraquat in rats. *Toxicol Lett*. 1997;90(1):1-9.
- Chen CS, Tseng YT, Hsu YY, Lo YC. Nrf2-Keap1 antioxidant defense and cell survival signaling are upregulated by 17 $\beta$ -estradiol in homocysteine-treated dopaminergic SH-SY5Y cells. *Neuroendocrinology*. 2013;97:232-241.
- Chen J, Zhang T, Jiao S, Zhou X, Zhong J, Wang Y, Liu J, Deng J, Wang S, Xu Z. ProBDNF Accelerates Brain Amyloid- $\beta$  Deposition and Learning and Memory Impairment in APP<sup>swe</sup>PS1<sup>dE9</sup> Transgenic Mice. *J Alzheimers Dis*. 2017;59(3):941-949.
- Chen L, Na R, Boldt E, Ran Q. NLRP3 inflammasome activation by mitochondrial reactive oxygen species plays a key role in long-term cognitive impairment induced by paraquat exposure. *Neurobiol Aging*. 2015;36:2533-2543.
- Chen L, Yoo SE, Na R, Liu Y, Ran Q. Cognitive impairment and increased A levels induced by paraquat exposure are attenuated by enhanced removal of mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Neurobiol Aging*. 2012;33:432.e15-432.e26.
- Chen Q, Niu Y, Zhang R, Guo H, Gao Y, Li Y, Liu R. The toxic influence of paraquat on hippocampus of mice: Involvement of oxidative stress. *Neurotoxicology*. 2010;31:310-316.

- Cheng Q, Yakel JL. The effect of  $\alpha 7$  nicotinic receptor activation on glutamatergic transmission in the hippocampus. *Biochem Pharmacol.* 2015;97:439-444.
- Chinta SJ, Rane A, Poksay KS, Bredesen DE, Andersen JK, Rao RV. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program in dopaminergic cells: effect of paraquat. *Neuromolecular Med.* 2008;10(4):333-342.
- Chinta SJ, Woods G, Demaria M, Rane A, Zou Y, McQuade A. Cellular Senescence Is Induced by the Environmental Neurotoxin Paraquat and Contributes to Neuropathology Linked to Parkinson's Disease. *Cell Reports.* 2018;22(4):930-940.
- Constantini P, Petronilli V, Colona R y Bernardi P. On the effects of paraquat on isolated mitochondria. Evidence that paraquat causes opening of the cyclosporin A-sensitive permeability transition pore synergistically with nitric oxide. *Toxicology.* 1995; 99(1-2):77-88.
- Corasaniti, MT, Defilippo R, Rodino I, Nappi G, Nisticò G. Evidence that paraquat is able to cross the blood-brain barrier to a different extent in rats of various age. *Funct Neurol.* 1991;6:385-391.
- Corasaniti MT, Strongoli MC, Rotiroti D, Bagetta G, Nisticò G. Paraquat: a useful tool for the in vivo study of mechanisms of neuronal cell death. *Pharmacol toxicol.* 1998;83(1):1-7.
- Corasaniti MT, Nisticò, G. Determination of paraquat in rat brain by highperformance liquid chromatography. *J Chromatogr.* 1993;643:419-425.
- Corasaniti MT, Strongoli MC, Pisanelli A, Bruno P, Rotiroti D, Nappi G, Nisticò G. Distribution of paraquat into the brain after its systemic injection in rats. *Funct Neurol.* 1992;7:51-56.
- Cortes CJ, La Spada AR. TFEB dysregulation as a driver of autophagy dysfunction in neurodegenerative disease: molecular mechanisms, cellular processes, and emerging therapeutic opportunities. *Neurobiol Dis.* 2019;122:83-93.
- Crum TS, Gleixner AM, Posimo JM, Mason DM, Broeren MT, Heinemann SD, Wipf P, Brodsky JL, Leak RK. Heat shock protein responses to aging and proteotoxicity in the olfactory bulb. *J Neurochem.* 2015;133(6):780-794.
- Cunningham C, Skelly DT. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and cognitive function: are prostaglandins at the heart of cognitive impairment in dementia and delirium?. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2012;7(1):60-73.
- Daniel JW y Gage JC. Absorption and Excretion of Diquat and Paraquat in Rats. *Brit J Industr Med.* 1966;23:133-136.
- Danysz W, Parsons CG. Alzheimer's disease,  $\beta$ -amyloid, glutamate, NMDA receptors and memantine-searching for the connections. *Br J Pharmacol.* 2012;167:324-352.

- Darke PG, Gibbs C, Kelly DF, Morgan DG, Pearson H, Weaver BM. Acute respiratory distress in the dog associated with paraquat poisoning. *Vet Rec.* 1977;100(14):275-7.
- Davies KJ, Delsignore ME, Lin SW. Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. Modification of amino acids. *J Biol Chem.* 1987a;262(20):9902-7.
- Davies KJ, Delsignore ME, Lin SW. Protein damage and degradation by oxygen radicals. III. Modification of secondary and tertiary structure. *J Biol Chem.* 1987b;262(20):9908-13.
- De Gori N, Froio F, Strongoli MC, De Francesco A, Caló M, Nisticò G. Behavioural and electrocortical changes induced by paraquat after injection in specific areas of the brain of the rat. *Neuropharmacology.* 1988;27(2):201-207.
- De Oliveira MR, de Souza ICC, Fürstenau CR. Carnosic Acid Induces Anti-Inflammatory Effects in Paraquat-Treated SH-SY5Y Cells Through a Mechanism Involving a Crosstalk Between the Nrf2/HO-1 Axis and NF- $\kappa$ B. *Mol Neurobiol.* 2018;55(1):890-897.
- De Pins B, Cifuentes-Díaz C, Farah AT, López-Molina L, Montalban E, Sancho-Balsells A, López A, Ginés S, Delgado-García JM, Alberch J, Gruart A, Girault JA, Giralt A. Conditional BDNF Delivery from Astrocytes Rescues Memory Deficits, Spine Density, and Synaptic Properties in the 5xFAD Mouse Model of Alzheimer Disease. *J Neurosci.* 2019;39:2441-2458.
- Del Pino J, Frejo MT, Anadon MJ, Capo MA, Moyano P, García JM, Díaz MJ. Neuroprotective or neurotoxic effects of 4-aminopyridine mediated by KChIP1 regulation through adjustment of Kv 4.3 potassium channels expression and GABA-mediated transmission in primary hippocampal cells. *Toxicology.* 2015;333:107-117.
- Del Pino J, Moyano P, Díaz GG, Anadon MJ, Diaz MJ, García JM, Lobo M, Pelayo A, Sola E, Frejo MT. Primary hippocampal neuronal cell death induction after acute and repeated paraquat exposures mediated by AChE variants alteration and cholinergic and glutamatergic transmission disruption. *Toxicology.* 2017;390:88-99.
- Dey MS, Breeze RG, Hayton WL, Karara AH, Krieger RI. Paraquat pharmacokinetics using a subcutaneous toxic low dose in the rat. *Fund Appl Toxicol.* 1990;14(1):208-216.
- Ding Q, Keller JN. Proteasome inhibition in oxidative stress neurotoxicity: implications for heat shock proteins. *J Neurochem.* 2001; 77 (4):1010-1017.
- Dinis-Oliveira RJ, Duarte JA, Sánchez-Navarro A, Remiao F, Bastos ML, Carvalho F. Paraquat poisonings: mechanisms of lung toxicity, clinical features, and treatment. *Crit Rev Toxicol.* 2008;38(1):17-71.
- Dinis-Oliveira RJ, Remião F, Carmo H, Duarte JA, Sánchez Navarro A, Bastos ML, Carvalho F. Paraquat exposure as an etiological factor of Parkinson's disease. *NeuroToxicology.* 2006;27(6):1110-1122.

Diss L, Dyball S, Ghela T, Golding J, Morris R, Robinson S, Tucker R, Walter T, Young P, Allen M, Fidalgo S, Gard P, Mabley J, Patel B, Chatterjee P, Yeoman M. Acute paraquat exposure impairs colonic motility by selectively attenuating nitrenergic signalling in the mouse. *Auton Neurosci*. 2016;195:8-15.

Donaire V, Niso M, Morán JM, García L, González-Polo RA, Soler G, Fuentes, JM. Heat shock proteins protect both MPP(+) and paraquat neurotoxicity. *Brain Res Bull*. 2005;67(6):509-514.

Dou T, Yan M, Wang X, Lu W, Zhao L, Lou D, Wu C, Chang X, Zhou Z. Nrf2/ARE Pathway Involved in Oxidative Stress Induced by Paraquat in Human Neural Progenitor Cells. *Oxi Med Cell Longev*. 2015;2016:8923860

Ecker JL, Hook JB, Gibson JE. Nephrotoxicity of paraquat in mice. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1975;34:178-186.

European Commission [Internet] EU Pesticides database. 2016. Disponible en <http://www.ec.europa.eu/>.

European Commission [Internet] Review report for the active substance paraquat. SANCO/10382/2002-final. 3 October, 2003. Health & Consumer Protection Directorate-General, European Commission, Brussels. Disponible en: [http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/existactive/list\\_paraquat.pdf](http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/existactive/list_paraquat.pdf)

F.A.O. [Internet] FAO Specifications and Evaluations for Agricultural Pesticides. Paraquat dichloride 1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium dichloride. 2008. Food and Agriculture Organisation of the United Nations, Rome. Disponible en: <http://www.fao.org/ag/AGP/AGPP/Pesticid/Specs/docs/Pdf/new/paraquat08.pdf>.

Fattahi MJ, Mirshafiey A. Positive and negative effects of prostaglandins in Alzheimer's disease. *Psychiatry Clin Neurosci*. 2014;68(1):50-60.

Fawcett JR, Bordayo EZ, Jackson K, Liu H, Peterson J, Svitak A, Frey WH. Inactivation of the human brain muscarinic acetylcholine receptor by oxidative damage catalyzed by a low molecular weight endogenous inhibitor from Alzheimer's brain is prevented by pyrophosphate analogs, bioflavonoids and other antioxidants. *Brain Res*. 2002; 950:10-20.

Fernández-Fernández MR, Gragera M, Ochoa-Ibarrola L, Quintana-Gallardo L, Valpuesta JM. Hsp70 - a master regulator in protein degradation. *FEBS Lett*. 2017;591(17):2648-2660.

Fleitas C, Piñol-Ripoll G, Marfull P, Rocandio D, Ferrer I, Rampon C, Egea J, Espinet C. ProBDNF is modified by advanced glycation end products in Alzheimer's disease and causes neuronal apoptosis by inducing p75 neurotrophin receptor processing. *Mol Brain*. 2018;11(1):68.

Foltran RB, Diaz SL. BDNF isoforms: a round trip ticket between neurogenesis and serotonin? *J Neurochem*. 2016;138(2):204-21.

- Fröhlich O, Ibrahim NM, Young LG. EP2 splicing variants in rhesus monkey (*Macaca mulatta*) epididymis. *Biol Reprod.* 2003;69(1):294-300.
- Fukushima T, Yamada K, Hojo N, Isobe A, Shiwaku K, Yamane Y. Mechanism of cytotoxicity of paraquat: III. The effects of acute paraquat exposure on the electron transport system in rat mitochondria. *Pathology.* 1994;46(6):437-441.
- Gabr AA, Lee HJ, Onphachanh X, Jung YH, Kim JS, Chae CW, Han HJ. Ethanol-induced PGE2 up-regulates A $\beta$  production through PKA/CREB signalling pathway. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2017;1863(11):2942-2953.
- García-Segura LM, Azcoitia I, Don Carlos LL. Neuroprotection by estradiol. *Prog Neurobiol.* 2001;63:29–60.
- Ge W, Zhang Y, Han X, Ren J. Cardiac-specific overexpression of catalase attenuates paraquat-induced myocardial geometric and contractile alteration: Roles of ER stress. *Free Rad BiolMed.* 2010;49(12):2068-2077.
- Gerenu G, Martisova E, Ferrero H, Carracedo M, Rantamäki T, Ramirez MJ, Gil-Bea FJ. Modulation of BDNF cleavage by plasminogen-activator inhibitor-1 contributes to Alzheimer's neuropathology and cognitive deficits. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2017;1863(4):991-1001.
- Gillardon F, Kloß A, Berg M, Neumann M, Mechtler K, Hengerer B, Dahlmann B. The 20S proteasome isolated from Alzheimer's disease brain shows posttranslational modifications but unchanged proteolytic activity. *J Neurochem.* 2007;101:1483-1490.
- Giraldo E, Lloret A, Fuchsberger T, Viña J. Abeta and tau toxicities in Alzheimer's are linked via oxidative stress-induced p38 activation: protective role of vitamin E. *Redox Biol.* 2014;2:873–877.
- Giri SN, Hollinger MA, Schiedt MJ. The effects of ozone and paraquat on PGF2 alpha and PGE2 levels in plasma and combined pleural effusion and lung lavage of rats. *Environ Res.* 1980;21(2):467-476.
- Glantz LA, Gilmore JH, Hamer RM, Lieberman JA, Jarskog LF. Synaptophysin and postsynaptic density protein 95 in the human prefrontal cortex from mid-gestation into early adulthood. *Neuroscience.* 2007;149:582-591.
- Goldner WS, Sandler DP, Yu F, Hoppin JA, Kamel F, Levan TD. Pesticide use and thyroid disease among women in the Agricultural Health Study. *Am J Epidemiol.* 2010;17(4):455-464.
- Greenberg ME, Xu B, Lu B, Hempstead BL. New insights in the biology of BDNF synthesis and release: implications in CNS function. *J Neurosci.* 2009;29(41):12764-12767.
- Gumeni S, Evangelakou Z, Gorgoulis VG, Trougakos IP. Proteome stability as a key factor of genome integrity. *Int J Mol Sci.* 2017;18(10): E2036.

- Guo JW, Guan PP, Ding WY, Wang SL, Huang XS, Wang ZY, Wang P. Erythrocyte membrane-encapsulated celecoxib improves the cognitive decline of Alzheimer's disease by concurrently inducing neurogenesis and reducing apoptosis in APP/PS1 transgenic mice. *Biomaterials*. 2017;145:106-127.
- Hacioglu G, Senturk A, Ince I, Alver A. Assessment of oxidative stress parameters of brain-derived neurotrophic factor heterozygous mice in acute stress model. *Iran. J Basic Med Sci*. 2016;19(4):388-393.
- Hains AB, Yabe Y, Arnsten AFT. Chronic Stimulation of Alpha-2A Adrenoceptors With Guanfacine Protects Rodent Prefrontal Cortex Dendritic Spines and Cognition From the Effects of Chronic Stress. *Neurobiol Stress*. 2015;2:1-9.
- Han X, Lan X, Li Q, Gao Y, Zhu W, Cheng T, Maruyama T, Wang J. Inhibition of prostaglandin E2 receptor EP3 mitigates thrombin-induced brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2016;36(6):1059-1074.
- Harte-Hargrove LC, Maclusky NJ, Scharfman HE. Brain-derived neurotrophic factor-estrogen interactions in the hippocampal mossy fiber pathway: implications for normal brain function and disease. *Neuroscience*. 2013;239:46-66.
- Hasan W, Smith HJ, Ting AY, Smith PG. Estrogen alters trkA and p75 neurotrophin receptor expression within sympathetic neurons. *J Neurobiol*. 2005;65(2):192-204.
- Hein AM, O'Banion MK. Neuroinflammation and memory: the role of prostaglandins. *Mol Neurobiol*. 2009;40:15-32.
- Hempstead BL. Brain-Derived Neurotrophic Factor: Three Ligands, Many Actions. *Trans Am Clin Climatol Assoc*. 2015;126:9-19.
- Hernandez CM, Kaye R, Zheng H, Sweatt JD, Dineley KT. Loss of alpha7 nicotinic receptors enhances beta-amyloid oligomer accumulation, exacerbating early-stage cognitive decline and septohippocampal pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2010; 30:2442-2453.
- Heylings JR. Gastrointestinal absorption of paraquat in the isolated mucosa of the rat. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1991;107(3):482-93.
- Hu Y, Zhou XJ, Liu P, Dong XZ, Mu LH, Chen YB, Liu MY, Yu BY. Antidepressant and neuroprotective effect of the Chinese herb kaixinsan against lentiviral shRNA knockdown brain-derived neurotrophic factor-induced injury in vitro and in vivo. *Neuropsychobiology*. 2014;69(3):129-39.
- Huang N, Liu B, Dong Z, Mao W, Zhang N, Li C, Cao J. Prostanoid receptors EP2, EP4, and FP are regulated by estradiol in bovine oviductal smooth muscle. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2015;121(Pt B):170-175.
- Iijima T, Sawa H, Shiokawa Y, Saito I, Ishii H, Nakamura Z, Sankawa H. Thromboxane synthetase inhibitor ameliorates delayed neuronal death in the CA1 subfield of the

hippocampus after transient global ischemia in gerbils. *J Neurosurg Anesthesiol.* 1996;8(3):237-242.

International Programme on Chemical Safety (IPCS) [Internet] Paraquat dichloride: Programa internacional de seguridad química. 2001. Disponible en <http://www.inchem.org/>.

Izumi Y, Yamamoto N, Matsushima S, Yamamoto T, Takada-Takatori Y, Akaike A, Kume T. Compensatory role of the Nrf2-ARE pathway against paraquat toxicity: Relevance of 26S proteasome activity. *J Pharmacol Sci.* 2015;129:150-159.

Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues (JMPR). Paraquat. Food Standards Agency, London, England. 2003;203-266.

Ju DT, Sivalingam K, Kuo WW, Ho TJ, Chang RL, Chung LC, Day CH, Viswanadha VP, Liao PH, Huang CY. Effect of Vasicinone against Paraquat-Induced MAPK/p53-Mediated Apoptosis via the IGF-1R/PI3K/AKT Pathway in a Parkinson's Disease-Associated SH-SY5Y Cell Model. *Nutrients.* 2019;11(7):1655.

Kang MJ, Gil SJ, Koh HC. Paraquat induces alternation of the dopamine catabolic pathways and glutathione levels in the substantia nigra of mice. *Toxicol Lett.* 2009;188(2):148-152.

Kannagara TS, Bostrom CA, Ratzlaff A, Thompson L, Cater, RM, Gil-Mohapel J, and Christie, BR. Deletion of the NMDA receptor GluN2A subunit significantly decreases dendritic growth in maturing dentate granule neurons. *PLoS One.* 2014;9:e103155.

Kar S, Slowikowski SP, Westaway D, Mount HT. Interactions between beta-amyloid and central cholinergic neurons: implications for Alzheimer's disease. *J Psychiatry Neurosci.* 2004;29:427-441.

Kelly LA, Seidlova-Wuttke D, Wuttke W, O'Leary JJ, Norris LA. Estrogen receptor alpha augments changes in hemostatic gene expression in HepG2 cells treated with estradiol and phytoestrogens. *Phytomedicine.* 2014;21(2):155-158.

Kemi. 2006. Paraquat. Annex: Notification of final regulatory action on paraquat, Sweden. Rotterdam Convention on the Prior Informed Consent Procedure for Certain Hazardous Chemicals and Pesticides in International Trade, Chemical Review Committee, Fifth meeting, Rome, 23-27 March, 2009. UNEP/FAO/RC/CRC.5/8.

Kervégant M, Merigot L, Glaizal M, Schmitt C, Tichadou L, de Haro Luc. Paraquat Poisonings in France during the European Ban: Experience of the Poison Control Center in Marseille. *J Med Toxicol.* 2013;9(2):144-147.

Khawaja M, McCormack A, McIntosh JM, Di Monte DA, Quik M. Nicotine partially protects against paraquat-induced nigrostriatal damage in mice; link to alpha6beta2\*nAChRs. *J Neurochem.* 2007; 100:180-190.

- Kimura K, Katsumata Y, Ozawa T, Tawara S, Igarashi K, Cho Y, Shibata N, Hakuno F, Takahashi SI, Takenaka A. Effect of paraquat-induced oxidative stress on insulin regulation of insulin-like growth factor-binding protein-1 gene expression. *J Clin Biochem Nutr.* 2010;46:157-67.
- Klein AM, Kowall NW, Ferrante RJ. Neurotoxicity and oxidative damage of beta amyloid 1-42 versus beta amyloid 1-40 in the mouse cerebral cortex. *Ann NY Acad Sci.* 1999;893:314–320.
- Kongtip P, Nankongnab N, Kallayanatham N, Pundee R, Choochouy N, Yimsabai J, Woskie S. Thyroid Hormones in Conventional and Organic Farmers in Thailand. *Int J Environ Res Public Health.* 2019;16(15):2704.
- Lee BD, Yoo JM, Baek SY, Li FY, Sok DE, Kim MR. 3,3'-Diindolylmethane Promotes BDNF and Antioxidant Enzyme Formation via TrkB/Akt Pathway Activation for Neuroprotection against Oxidative Stress-Induced Apoptosis in Hippocampal Neuronal Cells. *Antioxidants (Basel).* 2019;9(1):3.
- Li HF, Zhao SX, Xing BP, Sun ML. Ulinastatin suppresses endoplasmic reticulum stress and apoptosis in the hippocampus of rats with acute paraquat poisoning. *Neural Regen Res.* 2015;10:467-472.
- Li S, Zhao G, Chen L, Ding Y, Lian J, Hong G, Lu Z. Resveratrol protects mice from paraquat-induced lung injury: the important role of SIRT1 and NRF2 antioxidant pathways. *Mol Med Rep.* 2016;13:1833–1838.
- Li Q, Deng Z, Zhang Y, Zhou X, Nagerl UV, Wong ST. A global spatial similarity optimization scheme to track large numbers of dendritic spines in time-lapse confocal microscopy. *IEEE Trans Med Imaging.* 2011;30:632-641.
- Li Z, Zheng J, Zhang XF. Detrimental Effects of Paraquat on Astrocytes-Regulating Synaptic Functions. *Dose Response.* 2018;16(2):1559325818761681.
- Liang X, Wang Q, Hand T, Wu L, Breyer RM, Montine TJ, Andreasson K. Deletion of the prostaglandin E2 EP2 receptor reduces oxidative damage and amyloid burden in a model of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 2005;25(44):10180-10187.
- Liou HH, Chen RC, Tsai YF, Chen WP, Chang YC, Tsai MC. Effects of paraquat on the substantia nigra of the Wistar rats: neurochemical, histological and behavioural studies. *J Appl Toxicol.* 1996;137:34-41.
- Liu H, Li W, Rose ME, Pascoe JL, Miller TM, Ahmad M, Poloyac SM, Hickey RW, Graham SH. Prostaglandin D2 toxicity in primary neurons is mediated through its bioactive cyclopentenone metabolites. *Neurotoxicology.* 2013;39:35-44.
- Liu ML, Zhang YQ, Zhang YN, Pei LC, Liu X. Prostaglandin E2 receptor 1 activity regulates cell survival following hypoxia in cultured rat cortical neurons. *Neurosci Lett.* 2012;508(1):31-36.

- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2(-Delta DeltaC(T)) Method. *Methods*. 2001;25:402-408.
- Lou D, Wang Q, Huang M, Zhou Z. Does age matter? Comparison of neurobehavioral effects of paraquat exposure on postnatal and adult C57BL/6 mice. *Toxicol Mech Methods*. 2016;26:667-673.
- Luo C, Urgard E, Vooder T, Metspalu A. The role of COX-2 and Nrf2/ARE in anti-inflammation and antioxidative stress: aging and anti-aging. *Med Hypotheses*. 2011;77:174-178.
- Luo Y, Kuang S, Li H, Ran D, Yang J. cAMP/PKA-CREB-BDNF signalling pathway in hippocampus mediates cyclooxygenase 2-induced learning/memory deficits of rats subjected to chronic unpredictable mild stress. *Oncotarget*. 2017;8(22):35558-35572.
- Lythgoe RE, Howard EF. Paraquat: Excretion and Tissue Retention of a Single Oral Dose (1mg/kg) in the Rat following Repeat Dosing. 1995. Disponible en [www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v2003pr08.htm#eva](http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v2003pr08.htm#eva).
- Mak SK, McCormack AL, Manning-Bog AB, Cuervo AM, Di Monte DA. Lysosomal degradation of alpha-synuclein in vivo. *J Biol Chem*. 2010; 285(18):13621-13629.
- Malekinejad H., Rezabakhsh A., Rahmani F., Razi M. Paraquat Exposure Upregulates Cyclooxygenase-2 in the Lungs, Liver and Kidneys in Rats. *Iran. J Pharm Res*. 2013;12(4):887-896.
- Mandolesi L, De Bartolo P, Foti F, Gelfo F, Federico F, Leggio MG, Petrosini L. Environmental enrichment provides a cognitive reserve to be spent in the case of brain lesion. *J Alzheimers Dis*. 2008;15:11-28.
- Mangano EN, Peters S, Litteljohn D, So R, Bethune C, Bobyn J, Clarke M, Hayley S. Granulocyte macrophage-colony stimulating factor protects against substantia nigra dopaminergic cell loss in an environmental toxin model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*. 2011;43(1):99-112.
- Mangano EN, Litteljohn D, So R, Nelson E, Peters S, Bethune C, Bobyn J, Hayley S. Interferon- $\gamma$  plays a role in paraquat-induced neurodegeneration involving oxidative and proinflammatory pathways. *Neurobiol. Aging*. 2012;33(7):1411-1426.
- Mañucat-Tan NB, Shen LL, Bobrovskaya L, Al-Hawwas M, Zhou FH, Wang YJ, Zhou XF. Knockout of p75 neurotrophin receptor attenuates the hyperphosphorylation of Tau in pR5 mouse model. *Aging*. 2019;11(17):6762-6791.
- McEwen B, Akama K, Alves S, Brake WG, Bulloch K, Lee S, Li C, Yuen G, Milner TA. Tracking the estrogen receptor in neurons: implications for estrogen-induced synapse formation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98:7093-7100.
- McKeag D, Maini R, Taylor HR. The ocular surface toxicity of paraquat. *Br J Ophthalmol*. 2002;86(3):350-351.

- Melchiorri D, Del Duca C, Piccirilli S, Trombetta G, Bagetta G, Nisticò G. Intrahippocampal injection of paraquat produces apoptotic cell death which is prevented by the lazaroid U74389G, in rats. *Life Sci.* 1998;62(21):1927-32.
- Menze ET, Esmat A, Tadros MG, Abdel-Naim AB, Khalifa AE. Genistein improves 3-NPA-induced memory impairment in ovariectomized rats: impact of its antioxidant, anti-inflammatory and acetylcholinesterase modulatory properties. *PLoS One.* 2015;10(2):e0117223.
- Mi Z, Abrahamson EE, Ryu AY, Fish KN, Sweet RA, Mufson EJ, Ikonovic MD. Loss of precuneus dendritic spines immunopositive for spinophilin is related to cognitive impairment in early Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2017;55:159-166.
- Minakata K, Suzuki O, Oh-Ishi S, Hayashi I, Saito S y Harada N. Acute-phase reactant proteins and antioxidants in rats intoxicated chronically with paraquat. *J Toxicol Environ Health.* 1995;44(1):29-41.
- Miyagishi H, Kosuge Y, Yoneoka Y, Ozone M, Endo M, Osada N, Ishige K, Kusama-Eguchi K, Ito Y. Prostaglandin E2-induced cell death is mediated by activation of EP2 receptors in motor neuron-like NSC-34 cells. *J Pharmacol Sci.* 2013;121(4):347-350.
- Moyano P, Garcia JM, Frejo MT, Lobo M, Garcia J, Del Pino J. Proteasome 20S and Rab5 Alteration after 24 h and 14 Days Chlorpyrifos Exposure Lead to  $\beta$ -Amyloid and Tau Protein Level Increases and SN56 Neuronal Cell Death. *Chem Res Toxicol.* 2019;32(10):1920-1924.
- Moyano P, Sanjuan J, García JM, Anadon MJ, Naval MV, Sola E, García J, Frejo MT, Pino JD. Dysregulation of prostaglandine E2 and BDNF signaling mediated by estrogenic dysfunction induces primary hippocampal neuronal cell death after single and repeated paraquat treatment. *Food Chem Toxicol.* 2020;144:111611.
- Muller-Spahn F, Hock C, Risk factors and differential diagnosis of Alzheimer's disease. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 1999;249:37-42.
- Murphy DD, Cole NB, Segal M. Brain-derived neurotrophic factor mediates estradiol-induced dendritic spine formation in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95:11412-11417.
- Nagahara AH, Tuszynski MH. Potential therapeutic uses of BDNF in neurological and psychiatric disorders. *Nat Rev Drug Discov.* 2011; 10(3):209-219.
- Nagao M, Sath H, Zhang WD, Iseki K, Yamada Y, Takatori T, Miyazaki K. Transport characteristics of paraquat across rat intestinal brush-border membrane. *Arch Toxicol.* 1993; 67:262-267.
- Ni H, Shen J, Song Y, Cao M, Liu X, Huang J, Zhang W, Xie L, Ning X, Ke K. EP3, Prostaglandin E2 Receptor Subtype 3, Associated with Neuronal Apoptosis Following Intracerebral Hemorrhage. *Cell Mol Neurobiol.* 2016; 36(6):971-980.

- Niraula P, Kim MS. N-Acetylcysteine extends lifespan of *Drosophila* via modulating ROS scavenger gene expression. *Biogerontology*. 2019; 20:533–543.
- Nordquist RE, Nguyen H, Poyer JL, Carubelli R. The role of free radicals in paraquat-induced corneal lesions. *Free Radic Res*. 1995; 23(1):61-71.
- Nunes VS, Cazita PM, Catanozi S, Nakandakare ER, Quintao ECR. Decreased content, rate of synthesis and export of cholesterol in the brain of apoE knockout mice. *J Bioenerg Biomembr*. 2018; 50(4):283-287.
- Ou JR, Tan MS, Xie AM, Yu JT, Tan L. Heat shock protein 90 in Alzheimer's disease. *BioMed Res Int*. 2014;796869.
- Pan M, Li Z, Yeung V, Xu RJ. Dietary supplementation of soy germ phytoestrogens or estradiol improves spatial memory performance and increases gene expression of BDNF, TrkB receptor and synaptic factors in ovariectomized rats. *Nutr Metab*. 2010;7:75.
- Pepicelli O, Fedele E, Berardi M, Raiteri M, Levi G, Greco A, Ajmone-Cat MA, Minghetti L. Cyclo-oxygenase-1 and -2 differently contribute to prostaglandin E2 synthesis and lipid peroxidation after in vivo activation of N-methyl-D-aspartate receptors in rat hippocampus. *J Neurochem*. 2005;93(6):1561-1567.
- Pepicelli O, Fedele E, Bonanno G, Raiteri M, Ajmone-Cat MA, Greco A, Levi G, Minghetti L. In vivo activation of N-methyl-D-aspartate receptors in the rat hippocampus increases prostaglandin E(2) extracellular levels and triggers lipid peroxidation through cyclooxygenase-mediated mechanisms. *J Neurochem*. 2002;81(5):1028-1034.
- Perini G, Della-Bianca V, Politi V, Della Valle G, Dal-Pra I, Rossi F, Armato U. Role of p75 neurotrophin receptor in the neurotoxicity by beta-amyloid peptides and synergistic effect of inflammatory cytokines. *J Exp Med*. 2002;195(7):907-918.
- Pierce KL, Regan JW. Prostanoid receptor heterogeneity through alternative mRNA splicing. *Life Sci*. 1998;62(17-18):1479-1483.
- Ping SE, Greferath U, Barrett GL. Estrogen treatment suppresses forebrain p75 neurotrophin receptor expression in aged, noncycling female rats. *J Neurosci Res*. 2002;69(1):51-60.
- Prange-Kiel J, Fester L, Zhou L, Lauke H, Carrétero J, Rune GM. Inhibition of hippocampal estrogen synthesis causes region-specific downregulation of synaptic protein expression in hippocampal neurons. *Hippocampus*. 2006;16:464-471.
- Prasad K, Tarasewicz E, Mathew J, Strickland PA, Buckley B, Richardson JR, Richfield EK. Toxicokinetics and toxicodynamics of paraquat accumulation in mouse brain. *Exp. Neurol*. 2009; 215(2):358-367.

- Preston AR, Eichenbaum H. 2013. Interplay of hippocampus and prefrontal cortex in memory. *Curr Biol*. 2013;23:764-773.
- Qin S, Hou DX, Multiple regulations of Keap 1/Nrf2 system by dietary phytochemicals. *Mol Nutr Food Res*. 2016; 60(8):1731-1755.
- Qin WS, Deng YH, Cui FC. Sulforaphane protects against acrolein-induced oxidative stress and inflammatory responses: modulation of Nrf-2 and COX-2 expression. *Arch Med Sci*. 2016;12:871-880.
- Rage F, Lee BJ, Ma YJ, Ojeda SR. Estradiol enhances prostaglandin E2 receptor gene expression in luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons and facilitates the LHRH response to PGE2 by activating a glia-to-neuron signaling pathway. *J Neurosci*. 1997;17(23):9145-9156.
- Ramachandiran S, Hansen JM, Jones DP, Richardson JR, Miller GW. Divergent mechanisms of paraquat, MPP+, and rotenone toxicity: oxidation of thioredoxin and caspase-3 activation. *Toxicol Sci*. 2007;95(1):163-171.
- Rappold PM, Cui M, Chesser AS, Tibbett J, Grima JC, Duan L, Sen N, Javitch JA, Tieu K. Paraquat neurotoxicity is mediated by the dopamine transporter and organic cation transporter-3. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108(51):20766-20771.
- Resler AJ, Makar KW, Heath L, Whitton J, Potter JD, Poole EM, Habermann N, Scherer D, Duggan D, Wang H, Lindor NM, Passarelli MN, Baron JA, Newcomb PA, Le Marchand L, Ulrich CM. Genetic variation in prostaglandin synthesis and related pathways, NSAID use and colorectal cancer risk in the Colon Cancer Family Registry. *Carcinogenesis*. 2014;35(9):2121-2126.
- Richardson JR, Quan Y, Sherer TB, Greenamyre JT, Miller GW. Paraquat neurotoxicity is distinct from that of MPTP and rotenone. *Toxicol Sci*. 2005;88(1):193-201.
- Robb EL, Stuart JA, Resveratrol interacts with estrogen receptor- $\beta$  to inhibit cell replicative growth and enhance stress resistance by upregulating mitochondrial superoxide dismutase. *Free Radic Biol Med*. 2011; 50:821-831.
- Rojo AI, Sagarra MR, Cuadrado A. GSK-3 $\beta$  down-regulates the transcription factor Nrf2 after oxidant damage: relevance to exposure of neuronal cells to oxidative stress. *J Neurochem*. 2008; 105:192-202.
- Rudyk C, Dwyer Z, McNeill J, Salmaso N, Farmer K, Prowse N, Hayley S. Chronic unpredictable stress influenced the behavioral but not the neurodegenerative impact of paraquat. *Neurobiol Stress*. 2019;11:100179.
- Rune GM, Wehrenberg U, Prange-Kiel J, Zhou L, Adelman G, Frotscher M. Estrogen up-regulates estrogen receptor alpha and synaptophysin in slice cultures of rat hippocampus. *Neuroscience*. 2002;113:167-175.
- Sagar GR. Uses and usefulness of paraquat. *Hum Toxicol*. 1987;6:7-11.

- Saibil, H. Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013;14(10):630-642.
- Saleem S, Li RC, Wei G, Doré S. Effects of EP1 receptor on cerebral blood flow in the middle cerebral artery occlusion model of stroke in mice. *J Neurosci Res.* 2007;85(11):2433-2440.
- Sato K, Akaishi T, Matsuki N, Ohno Y, Nakazawa K. Beta-Oestradiol induces synaptogenesis in the hippocampus by enhancing brain-derived neurotrophic factor release from dentate gyrus granule cells. *Brain Res.* 2007;1150:108-120.
- Savary S, Willocquet L, Pethybridge SJ, Esker P, McRoberts N, Nelson A. The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nat Ecol Evol.* 2019;3:430-439.
- Scharfman HE, MacLusky NJ. Differential regulation of BDNF, synaptic plasticity and sprouting in the hippocampal mossy fiber pathway of male and female rats. *Neuropharmacology.* 2014;76 Pt C (0 0):696-708.
- Schindowski K, Belarbi K, Buée L. Neurotrophic factors in Alzheimer's disease: role of axonal transport. *Genes Brain Behav* 7 Suppl. 2008;1(1):43-56.
- Serra A, Domingos F, Prata MM. Paraquat intoxication. *Acta Med Port.* 2003;16(1):25-32.
- Seok SJ, Kim SJ, Gil HW, Yang JO, Lee EY, Hong SY. Tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 levels in patients with acute paraquat intoxication. *J Korean Med Sci.* 2011;26(4):474-481.
- Sharp C, Ottolenghi A, Posner HS. Correlation of paraquat toxicity with tissue concentrations and weight loss of the rat. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 1972;22(2):241-251.
- Shi J, Wang Q, Johansson JU, Liang X, Woodling NS, Priyam P, Loui TM, Merchant M, Breyer RM, Montine TJ, Andreasson K. Inflammatory prostaglandin E2 signaling in a mouse model of Alzheimer disease. *Ann Neurol.* 2012;72(5):788-98.
- Shimizu K, Matsubara K, Ohtaki K, Shiono H. Paraquat leads to dopaminergic neural vulnerability in organotypic midbrain culture. *Neuroscience Research.* 2003;46(4):523-532.
- Shimizu K, Ohtaki K, Matsubara K, Aoyama K, Uezono T, Saito O, Suno M, Ogawa K, Hayase N, Kimura K, Shiono H. Carrier-mediated processes in blood-brain barrier penetration and neural uptake of paraquat. *Brain Research.* 2001;906:135-142.
- Si ML, Al-Sharafi B, Lai CC, Khardori R, Chang C, Su CY. Gender difference in cytoprotection induced by estrogen on female and male bovine aortic endothelial cells. *Endocrine.* 2001;15:255-262.

- Silva R, Carmo H, Vilas-Boas V, Barbosa DJ, Monteiro M, Guedes de Pinho P. Several transport systems contribute to the intestinal uptake of Paraquat, modulating its cytotoxic effects. *Toxicol Lett.* 2015;232(1):271-283.
- Sinow, J. & Wei, E. Ocular toxicity of paraquat. *Bull. Environ. Contam Toxicol.* 1973;9(3):163-168.
- Smith JG. Paraquat poisoning by skin absorption: a review. *Hum Toxicol.* 1988;7(1):15-9.
- Smith P, Heath D. Paraquat. *CRC Crit Rev Toxicol.* 1976; 4:411-445.
- Sohrabji F, Miranda RC, Toran-Allerand CD. Identification of a putative oestrogen response element in the gene encoding brain-derived neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.* 1995;92:11110-11114.
- Son H, Seuk Kim J, Mogg Kim J, Lee SH, Lee YS. Reciprocal actions of NCAM and tPA via a Ras-dependent MAPK activation in rat hippocampal neurons. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;298(2):262-268.
- Song C, Kanthasamy A, Jin H, Anantharam V, Kanthasamy AG. Paraquat induces epigenetic changes by promoting histone acetylation in cell culture models of dopaminergic degeneration. *Neurotoxicology.* 2011;32(5):586-595.
- Song JH, Yu JT, Tan L. Brain-Derived Neurotrophic Factor in Alzheimer's Disease: Risk, Mechanisms, and Therapy. *Mol Neurobiol.* 2015;52(3):1477-1493.
- Song W, Volosin M, Cragolini AB, Hempstead BL, Friedman WJ. ProNGF induces PTEN via p75NTR to suppress Trk-mediated survival signaling in brain neurons. *J Neurosci.* 2010;30(46):15608-15615.
- Somayajulu-Niṭu M, Sandhu JK, Cohen J, Sikorska M, Sridhar TS, Matei A, Borowy-Borowski H, Pandey S. Paraquat induces oxidative stress, neuronal loss in substantia nigra region and parkinsonism in adult rats: neuroprotection and amelioration of symptoms by water-soluble formulation of coenzyme Q10. *BMC Neurosci.* 2009;10:88.
- Stacey W, Bhave S, Uht RM. Mechanisms by Which 17 $\beta$ -Estradiol (E2) Suppress Neuronal cox-2 Gene Expression. *PLoS One.* 2016;11(9):e0161430.
- Steiner P1, Higley MJ, Xu W, Czervionke BL, Malenka RC, Sabatini BL. Destabilization of the postsynaptic density by PSD-95 serine 73 phosphorylation inhibits spine growth and synaptic plasticity. *Neuron.* 2008;60:788-802.
- Su C, Niu P. Low doses of single or combined agrichemicals induces  $\alpha$ -synuclein aggregation in nigrostriatal system of mice through inhibition of proteasomal and autophagic pathways. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(11):20508-20515.
- Takadera T, Shiraishi Y, Ohyashiki T. Prostaglandin E2 induced caspase-dependent apoptosis possibly through activation of EP2 receptors in cultured hippocampal neurons. *Neurochem Int.* 2004;45(5):713-719.

Tang Y, Min Z, Xiang XJ, Liu L, Ma YL, Zhu BL, Song L, Tang J, Deng XJ, Yan Z, Chen GJ. 2018. Estrogen-related receptor alpha is involved in Alzheimer's disease-like pathology. *Exp Neurol*. 2018;305:89-96.

Tanqueiro SR, Ramalho RM, Rodrigues TM, Lopes LV, Sebastião AM, Diógenes MJ. Inhibition of NMDA Receptors Prevents the Loss of BDNF Function Induced by Amyloid  $\beta$ . *Front. Pharmacol*. 2018;9:237.

Tamagno E, Parola M, Bardini P, Piccini A, Borghi R, Guglielmotto M, Santoro G, Davit A, Danni O, Smith MA, Perry G, Tabaton M. Beta-site APP cleaving enzyme up-regulation induced by 4-hydroxynonenal is mediated by stress-activated protein kinases pathways. *J Neurochem*. 2005; 92:628-636.

Tapia-Rojas C, Inestrosa NC. Wnt signaling loss accelerates the appearance of neuropathological hallmarks of Alzheimer's disease in J20-APP transgenic and wild-type mice. *J Neurochem*. 2018;144(4):443-465.

Tarsa L, Goda Y. Synaptophysin regulates activity-dependent synapse formation in cultured hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99:1012-1016.

Toiber D, Greenberg DS, Soreq H. Pro-apoptotic protein-protein interactions of the extended N-AChE terminus. *J. Neural Transm*. 2009; 116:1435-1442.

Turner BJ, Rembach A, Spark R, Lopes EC, Cheema SS. Opposing effects of low and high-dose clozapine on survival of transgenic amyotrophic lateral sclerosis mice. *J Neurosci Res*. 2003;74(4):605-613.

Ulfhammer E, Larsson P, Karlsson L, Hrafnkelsdóttir T, Bokarewa M, Tarkowski A, Jern S. TNF-alpha mediated suppression of tissue type plasminogen activator expression in vascular endothelial cells is NF-kappaB- and p38 MAPK-dependent. *J Thromb Haemost*. 2006;4(8):1781-1789.

USEPA: United States Environmental Protection Agency [Internet] Paraquat Dichloride. 2017. Disponible en <https://www.epa.gov/>.

USEPA: United States Environmental Protection Agency [Internet] Seguridad Laboral al Usar Pesticidas. Dicloruro de paraquat: un sorbo puede matar. 2019. Disponible en <https://www.epa.gov/>.

USEPA: United States Environmental Protection Agency [Internet] Preliminary Ecological Risk Assessment for the Registration Review of Paraquat. 2019.

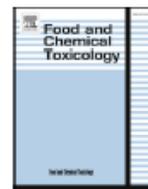
USEPA: United States Environmental Protection Agency [Internet] Paraquat dichloride. Registration Eligibility Decision (RED). Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, US Environmental Protection Agency, Washington, D.C. 1997.EPA 738-F-96-018. Disponible en <http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/0262red.pdf>.

- Van Kooten F, Ciabattini G, Koudstaal PJ, Grobbee DE, Kluft C, Patrono C. Increased thromboxane biosynthesis is associated with poststroke dementia. *Stroke*. 1999;30(8):1542-1547.
- Viales G. Intoxicación por Paraquat. *Medicina Legal de Costa Rica - Edición Virtual*. 2014;31(2):1409-0015.
- Wang D, Zhao J, Wang J, Li J, Yu S, Guo X. Deficiency of female sex hormones augments PGE2 and CGRP levels within midbrain periaqueductal gray. *J Neurol Sci*. 2014;346(1-2):107-111.
- Wang S, Zhu X, Xiong L, Ren J. Ablation of Akt2 prevents paraquat-induced myocardial mitochondrial injury and contractile dysfunction: Role of Nrf2. *Toxicol Lett*. 2017;269:1-14.
- Wang SH, Shih YL, Kuo TC, Ko WC, Shih CM. Cadmium toxicity toward autophagy through ROS-activated GSK-3beta in mesangial cells. *Toxicol Sci*. 2009; 108:124-131.
- Wang ZH, Xiang J, Liu X, Yu SP, Manfredsson FP, Sandoval IM, Wu S, Wang JZ, Ye K. Deficiency in BDNF/TrkB Neurotrophic Activity Stimulates  $\delta$ -Secretase by Upregulating C/EBP $\beta$  in Alzheimer's disease. *Cell Rep*. 2019;28(3):655-669.e5.
- Watts M. Paraquat. Monografía inédita. Pesticide Action Network Asia and the Pacific (PAN AP), Penang (Malaysia), 2011.
- Wester RC, Maibach HI, Bucks DA, Aufrere MB. In vivo percutaneous absorption of paraquat from hand, leg, and forearm of humans. *J Toxicol Environ Health*. 1984; 14:759-762.
- Widdowson PS, Farnworth MJ, Upton R, Simpson MG. No changes in behaviour, nigro-striatal systems neurochemistry or neuronal cell death following toxic multiple oral paraquat administration to rats. *Hum Exp Toxicol*. 1996;15:583-591.
- Wills J, Credle J, Oaks AW, Duka V, Lee JH, Jones J, Sidhu A. Paraquat, but not maneb, induces synucleinopathy and tauopathy in striata of mice through inhibition of proteasomal and autophagic pathways. *PLoS One*. 2012;7:e30745.
- Wirdefeldt K, Adami H-O, Cole P, Trichopoulos D, Mandel J. Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. *Eur J Epidemiol* 2011;26:S1-88.
- Wu B, Song B, Yang H, Huang B, Chi B, Guo Y, Liu H. Central nervous system damage due to acute paraquat poisoning: an experimental study with rat model. *NeuroToxicology*. 2013;35:62-70.
- Wu B, Wang Y, Shi C, Chen Y, Yu L, Li J, Li W, Wei Y, He R. Ribosylation-Derived Advanced Glycation End Products Induce Tau Hyperphosphorylation Through Brain-Derived Neurotrophic Factor Reduction. *J Alzheimers Dis*. 2019;71(1):291-305.

- Xiao JY, Xiong BR, Zhang W, Zhou WC, Yang H, Gao F, Xiang HB, Manyande A, Tian XB, Tian YK. PGE2-EP3 signaling exacerbates hippocampus-dependent cognitive impairment after laparotomy by reducing expression levels of hippocampal synaptic plasticity-related proteins in aged mice. *CNS Neurosci Ther.* 2018;24(10):917-929.
- Yaar M, Zhai S, Pilch PF, Doyle SM, Eisenhauer PB, Fine RE, Gilcrest BA. Binding of beta-amyloid to the p75 neurotrophin receptor induces apoptosis. A possible mechanism for Alzheimer's disease. *J Clin Invest.* 1997;100(9):2333-2340.
- Yan F, Chen Y, Azat R, Zheng X. Mulberry anthocyanin extract ameliorates oxidative damage in HepG2 cells and prolongs the lifespan of *Caenorhabditis elegans* through MAPK and Nrf2 pathways. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017 7956158.
- Yang W, Tiffany-Castiglioni E, Lee MY, Son IH. Paraquat induces cyclooxygenase-2 (COX-2) implicated toxicity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Toxicol Lett.* 2010;199(3):239-246.
- Yamada K, Fukushima T. Mechanism of cytotoxicity of paraquat: II. Organ specificity of paraquat-stimulated lipid peroxidation in the inner membrane of mitochondria. *Experimental and Toxicologic Pathology.* 1996;45(5-6):375-380.
- Yu W, Zhu M, Fang H, Zhou J, Ye L, Bian W, Wang Y, Zhu H, Xiao J, Zhu H, Li H. Risperidone Reverses the Downregulation of BDNF in Hippocampal Neurons and MK801-Induced Cognitive Impairment in Rats. *Front Behav Neurosci.* 2019;13:163.
- Zanin L, Gil E, Bortoli M. Atención y memoria: su relación con la función tiroidea. *Fundamentos en humanidades.* 2004;10: 31-42.
- Zeng F, Lu JJ, Zhou XF, Wang YJ. Roles of p75NTR in the pathogenesis of Alzheimer's disease: a novel therapeutic target. *Biochem Pharmacol.* 2011;82(10):1500-1509.
- Zhang J, Liu Z, Pei Y, Yang W, Xie C, Long S. MicroRNA-322 Cluster Promotes Tau Phosphorylation via Targeting Brain-Derived Neurotrophic Factor *Neurochem. Res.* 2018;43(3):736-744.
- Zhang J, Zhang R, Zhan Z, Li X, Zhou F, Xing A, Jiang C, Chen Y, An L. Beneficial Effects of Sulforaphane Treatment in Alzheimer's Disease May Be Mediated through Reduced HDAC1/3 and Increased P75NTR Expression. *Front Aging Neurosci.* 2017;9:121.
- Zhang X, Thompson M, Xu Y. Multifactorial theory applied to the neurotoxicity of paraquat and paraquat-induced mechanisms of developing Parkinson's disease. *Laboratory investigation.* 2016;96:496-507.
- Zhao L, Yan M, Wang X, Xiong G, Wu C, Wang Z, Zhou Z, Chang X. Modification of Wnt signaling pathway on paraquat-induced inhibition of neural progenitor cell proliferation. *Food Chem Toxicol.* 2018;121:311-325.

- Zhao X, Wang R, Xiong J, Yan D, Li A, Wang S, Xu J, Zhou J. JWA antagonizes paraquat-induced neurotoxicity via activation of Nrf2. *Toxicol Lett.* 2017; 277:32-40.
- Zhao X, Wu T, Chang CF, Wu H, Han X, Li Q, Gao Y, Li Q, Hou Z, Maruyama T, Zhang J, Wang J. Toxic role of prostaglandin E2 receptor EP1 after intracerebral hemorrhage in mice. *Brain Behav Immun.* 2015;46:293-310.
- Zhen G, Kim YT, Li RC, Yocum J, Kapoor N, Langer J, Dobrowolski P, Maruyama T, Narumiya S, Doré S. PGE2 EP1 receptor exacerbated neurotoxicity in a mouse model of cerebral ischemia and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2012;33(9):2215-2219.
- Zhong Y, Chen J, Li L, Qin Y, Wei Y, Pan S, Jiang Y, Chen J, Xie Y. PKACREB-BDNF signaling pathway mediates propofol-induced long-term learning and memory impairment in hippocampus of rats. *Brain Res.* 2018;1691:64-74.
- Zhou J, Zhang H, Cohen RS, Pandey SC. Effects of oestrogen treatment on expression of brain-derived neurotrophic factor and cAMP response element-binding protein expression and phosphorylation in rat amygdaloid and hippocampal structures. *Neuroendocrinology.* 2005;81:294-310.
- Zhu C, Wang S, Wang B, Du F, Hu C, Li H, Feng Y, Zhu R, Mo M, Cao Y, Li A, Yu X. 17 $\beta$ -Estradiol up-regulates Nrf2 via PI3K/AKT and estrogen receptor signaling pathways to suppress light-induced degeneration in rat retina. *Neuroscience.* 2015;304:328-339.
- Zumkehr J, Rodriguez-Ortiz CJ, Cheng D, Kieu Z, Wai T, Hawkins C, Kilian J, Lim SL, Medeiros R, Kitazawa M. Ceftriaxone ameliorates tau pathology and cognitive decline via restoration of glial glutamate transporter in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2015; 36(7):2260-2271.

# **ANEXO I**



# Primary hippocampal estrogenic dysfunction induces synaptic proteins alteration and neuronal cell death after single and repeated paraquat exposure

Paula Moyano<sup>a,1</sup>, Javier Sanjuan<sup>a,1</sup>, José Manuel García<sup>a</sup>, María José Anadón<sup>b</sup>, Margarita Lobo<sup>a</sup>, Adela Pelayo<sup>b</sup>, Jimena García<sup>c</sup>, María Teresa Frejo<sup>a</sup>, Javier del Pino<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Pharmacology and Toxicology, Veterinary School, Complutense University of Madrid, 28040, Madrid, Spain

<sup>b</sup> Department of Legal Medicine, Psychiatry and Pathology, Medical School, Complutense University of Madrid, 28041, Madrid, Spain

<sup>c</sup> Department of Pharmacology, Health Sciences School, Alfonso X University, 28691, Madrid, Spain

## ARTICLE INFO

### Keywords

Hippocampal neurons  
Paraquat  
A $\beta$  and Tau proteins  
ER  
Oxidative stress  
Cell death

## ABSTRACT

The extensively utilized herbicide Paraquat (PQ) was reported to generate cognitive disorders and hippocampal neuronal cell death after unique and extended exposure. Although, most of the mechanisms that mediate these actions remain unknown. We researched whether PQ induces synaptic protein disruption, Tau and amyloid beta protein formation, oxidative stress generation, and hippocampal neuronal cell loss through anti-estrogen action in primary hippocampal neurons, after day and two weeks PQ treatment, as a probable mechanism of such learning and memory impairment. Our results reveal that PQ did not alter estrogen receptors (ER $\alpha$  and ER $\beta$ ) gene expression, yet it decreased ER activation, which led to synaptic proteins disruption and amyloid beta proteins generation and Tau proteins hyperphosphorylation. Estrogenic signaling disruption induced by PQ also downregulated the NRF2 pathway leading to oxidative stress generation. Finally, PQ exposure induced cell death mediated by ER dysfunction partially through oxidative stress and amyloid beta proteins generation and Tau proteins hyperphosphorylation. The results presented provide a therapeutic strategy to protect against PQ toxic effects, possibly giving an explanation for the learning and memory impairment generated following PQ exposure.

## 1. Introduction

Paraquat (PQ; N,N'-dimethyl-4,4-bipyridinium dichloride) is a broad-spectrum contact herbicide used in over 100 countries (Huang et al., 2019). Single and long-term PQ exposure was involved with cognitive dysfunction (Chen et al., 2010, 2012; 2015; Lou et al., 2016). All the mechanisms that produce this effect after PQ exposure remain unclear.

PQ gathers primarily in hippocampus and frontal cortex (Corasaniti et al., 1992; Corasaniti and Nisticò, 1993; Prasad et al., 2009); which are both key cerebral areas involved in cognitive function control

(Preston and Eichenbaum, 2013). Besides, this compound concentrations tend to be redistributed, after 1 day of treatment, from the whole brain into the hippocampus between another areas, resulting in much higher levels than the ones determined three hours after PQ administration (Corasaniti et al., 1998), possibly pointing to a specific or higher cytotoxicity in hippocampus, mainly following extended exposure. Hippocampus is one of the main regions involved in the regulation of cognitive processes, and hippocampal neuronal cell death, as described in Alzheimer's disease (AD), may induce learning and retention impairment (Danysz and Parsons, 2012). PQ was observed to produce hippocampal neuronal cell loss following unique and extended

**Abbreviations:** A $\beta$ , amyloid-beta;  $\beta$ APP, amyloid-beta precursor protein; AChE, acetylcholine esterase; AD, Alzheimer's disease; DMSO, dimethylsulphoxide; GFAP, Glial fibrillary acidic protein; GPX, glutathione peroxidase; HO-1, heme oxygenase-1; HRP, horseradish peroxidase; LDH, lactate dehydrogenase; MAP2, microtubule-associated protein 2; MTT, 3-[4,5 dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide; NMDAR1, N-methyl-D-aspartate receptor; NRF2, nuclear factor erythroid 2-related factor 2; PBS, phosphate-buffered saline; PQ, paraquat; PSD95, postsynaptic density protein 95; pTau, Tau hyperphosphorylation; SOD1, superoxide dismutase 1; SPN, spinophilin; SYP, synaptophysin

\* Corresponding author. Departamento de Farmacología y Toxicología, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Avda. Puerta de Hierro s/n, 28040, Madrid, Spain.

E-mail address: [jdelpino@pdi.ucm.es](mailto:jdelpino@pdi.ucm.es) (J. del Pino).

<sup>1</sup> These authors have contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110961>

Received 4 August 2019; Received in revised form 5 November 2019; Accepted 8 November 2019

Available online 09 November 2019

0278-6915/ © 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.



## Dysregulation of prostaglandine E2 and BDNF signaling mediated by estrogenic dysfunction induces primary hippocampal neuronal cell death after single and repeated paraquat treatment

Paula Moyano<sup>a,1</sup>, Javier Sanjuan<sup>a,1</sup>, José Manuel García<sup>a,1</sup>, María José Anadon<sup>b</sup>,  
 Maria Victoria Naval<sup>d</sup>, Emma Sola<sup>b</sup>, Jimena García<sup>c</sup>, María Teresa Frejo<sup>a</sup>, Javier del Pino<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Pharmacology and Toxicology, Veterinary School, Complutense University of Madrid, 28040, Madrid, Spain

<sup>b</sup> Department of Legal Medicine, Psychiatry and Pathology, Medical School, Complutense University of Madrid, 28041, Madrid, Spain

<sup>c</sup> Department of Pharmacology, Health Sciences School, Alfonso X University, 28691, Madrid, Spain

<sup>d</sup> Department of Pharmacology, Pharmacognosy and Botany, Pharmacy School, Complutense University of Madrid, 28041, Madrid, Spain

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Hippocampal neurons

Paraquat

A $\beta$  and Tau proteins

ER

Oxidative stress

Cell death

PGE2

BDNF

### ABSTRACT

Paraquat (PQ) produces hippocampal neuronal cell death and cognitive dysfunctions after unique and continued exposure, but the mechanisms are not understood. Primary hippocampal wildtype or  $\beta$ APP-Tau silenced cells were co-treated with PQ with or without E2, N-acetylcysteine (NAC), NS-398 (cyclooxygenase-2 inhibitor), MF63 (PGES-1 inhibitor) and/or recombinant brain-derived neurotrophic factor (BDNF) during one- and fourteen-days to studied PQ effect on prostaglandin E2 (PGE2) and BDNF signaling and their involvement in hyperphosphorylated Tau (pTau) and amyloid-beta (A $\beta$ ) protein formation, and oxidative stress generation, that lead to neuronal cell loss through estrogenic disruption, as a possible mechanism of cognitive dysfunctions produced by PQ. Our results indicate that PQ overexpressed cyclooxygenase-2 that leads to an increase of PGE2 and alters the expression of EP1-3 receptor subtypes. PQ induced also a decrease of proBDNF and mature BDNF levels and altered p75<sup>NTR</sup> and tropomyosin receptor kinase B (TrkB) expression. PQ induced PGE2 and BDNF signaling dysfunction, mediated through estrogenic disruption, leading to A $\beta$  and pTau proteins synthesis, oxidative stress generation and finally to cell death. Our research provides relevant information to explain PQ hippocampal neurotoxic effects, indicating a probable explanation of the cognitive dysfunction observed and suggests new therapeutic strategies to protect against PQ toxic effects.

### 1. Introduction

Paraquat (PQ), a bipyridilium unselective herbicide worldwide used for weed and grass control, is extremely toxic to humans and animals (Yao et al., 2019). PQ accumulates, among other tissues, in the brain, leading to neurotoxic effects. In this sense, PQ unique or prolonged treatment was reported to induce cognitive disorder (Chen et al., 2010, 2012; 2015; Lou et al., 2016). Although different studies were performed to elucidate the mechanisms that lead to the memory and learning dysfunctions induced by PQ treatment, they remain not completely known.

PQ accumulation in the brain is mainly produced in hippocampus

and frontal cortex (Corasaniti et al., 1992; Corasaniti and Nistico, 1993; Prasad et al., 2009), two of the most important regions implicated in learning and memory process regulation (Preston and Eichenbaum, 2013). Moreover, PQ showed a tendency primarily towards hippocampus redistribution from the rest of the brain regions one day after the treatment, showing higher concentration compared to those observed 3 h after treatment (Corasaniti et al., 1998), suggesting a particular or sharper neurotoxic effect in hippocampus, mostly after long term treatment. Hippocampus neuronal cell loss, as observed in Alzheimer's disease (AD), could lead to cognitive dysfunctions (Danysz and Parsons, 2012). PQ treatment was described to induce cell death of hippocampal neuronal after unique and continued treatment in animals (Chen et al., 2010; Li et al., 2015) and in primary hippocampal cell culture (Del Pino

\* Corresponding author. Departamento de Farmacología y Toxicología, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Avda. Puerta de Hierro s/n 28040, Madrid, Spain.

E-mail address: [jdelpino@pdi.ucm.es](mailto:jdelpino@pdi.ucm.es) (J. Pino).

<sup>1</sup> These authors have contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111611>

Received 5 June 2020; Received in revised form 5 July 2020; Accepted 13 July 2020

Available online 30 July 2020

0278-6915/© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

# Paraquat Treatment Compromises the Clearance of $\beta$ -Amyloid and Tau Proteins and Induces Primary Hippocampal Neuronal Cell Death through HSP70, P20S, and TFEB Disruption

Paula Moyano,\* Javier Sanjuna, José Manuel Garcia, Jimena Garcia, María Teresa Frejo, María Victoria Naval, and Javier del Pino\*

Cite This: *Chem. Res. Toxicol.* 2021, 34, 1240–1244

Read Online

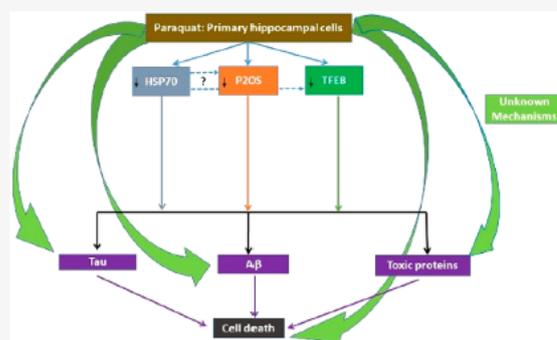
ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

**ABSTRACT:** The herbicide paraquat (PQ) induces hippocampal neuronal cell loss and cognitive dysfunction after one and repeated treatment. All the mechanisms involved in these effects are not well understood. Single and repeated PQ treatment increased  $A\beta$  and tau protein levels, through HSP70 and TFEB downregulation and proteasome 20S inhibition, producing cell death in primary hippocampal neurons associated with cognitive decline. Our results reveal the mechanisms through which PQ could induce the accumulation of abnormal proteins and neurodegeneration that could originate the cognitive decline produced by it and could help managing its degenerative effects.



Paraquat (PQ), a broadly used herbicide, accumulates mainly in the hippocampus,<sup>1</sup> especially after prolonged time following treatment,<sup>2</sup> leading to hippocampal neuronal cell death<sup>3,4</sup> and cognitive dysfunctions<sup>4,5</sup> after one and repeated treatment. The mechanisms that mediate these effects are not completely understood.

Hippocampus regulates the memory and learning process, and its neuronal reduction, as produced in Alzheimer's disease (AD) and other dementias, produces cognitive decline.<sup>6</sup> PQ induced hippocampal neuronal cell death, partly, through amyloid-beta ( $A\beta$ ) peptides and Tau hyperphosphorylated among other actions, pointing out that other mechanisms could also be involved.<sup>7</sup> PQ repeated treatment increased the  $\alpha$ -Synuclein and Tau protein levels in mice striatum.<sup>8,9</sup> The increment of these proteins was suggested to be mediated by proteasome 20S (P20S) activity inhibition and possibly by autophagy lysosomal pathway (ALP) downregulation through mTOR upregulation, as no effect on heat shock protein 70 (HSP70)/heat shock cognate 70 (HSC70) in chaperone mediated autophagy (CMA) was observed.<sup>8,9</sup> However,  $\alpha$ -Synuclein lysosomal clearance was not reduced in mice's midbrain after single PQ treatment, inducing its elimination through CMA, while protein accumulation seemed to be mediated through increased production.<sup>10</sup> Besides, PQ increased HSP70 in rat primary olfactory bulb neurons, inducing CMA.<sup>11</sup>

HSPs regulate proper proteins' folding, avoiding the permanent aggregation of noncorrect conformations, breaking them when they are assembled or, if it is not possible, inducing

the elimination of the toxic, aggregated, misfolded, or altered proteins through ubiquitin proteasome clearance or autophagy, preventing neuronal cell death.<sup>12,13</sup> HSP70 is a master regulator of protein degradation pathways,<sup>14</sup> reported to eliminate phosphorylated Tau proteins (pTau) and prevent the  $A\beta$  generation and assembly, avoiding neuronal loss.<sup>14,15</sup> P20S is the catalytic subunit of the proteasome 26S, which mediates the degradation of toxic, aberrant, or aggregated proteins like  $A\beta$  and pTau proteins, and its inhibition induces neuronal loss.<sup>16</sup> ALP dysfunction, as observed in AD, induces the accumulation of different toxic proteins such as  $A\beta$  and pTau proteins, producing cell death and cognitive decline.<sup>16</sup> TFEB (transcription factor EB), the key master of ALP, regulates the genes that mediate autophagy lysosomal biogenesis such as cathepsin-D (CD), the major lysosomal protease (lysosomal activity marker).<sup>17</sup> TFEB was reported to prevent the accumulation of toxic proteins as  $A\beta$  and pTau proteins, inducing their clearance, and its downregulation was associated with their accumulation and neurodegeneration.<sup>17</sup> Consequently, we hypothesized that PQ could inhibit P20S and alter the expression of HSP70 and TFEB, inducing the  $A\beta$

Special Issue: Neurotoxicology

Received: August 30, 2020

Published: November 6, 2020

