



UNIVERSIDAD DE LA HABANA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

Influencia del glutatión sobre el funcionamiento de la vía nigro-estriatal y la conducta motora de ratas.

Tesis presentada en opción al grado
científico de Doctor en Ciencias
Biológicas



Autora: MSc. Mei-Li Díaz Hung

CENTRO INTERNACIONAL DE RESTAURACIÓN NEUROLÓGICA
LA HABANA, 2017



UNIVERSIDAD DE LA HABANA
FACULTAD DE BIOLOGÍA

**“INFLUENCIA DEL GLUTATIÓN SOBRE EL FUNCIONAMIENTO DE
LA VÍA NIGRO-ESTRIATAL Y LA CONDUCTA MOTORA DE
RATAS.”**

Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Biológicas

Autora: MSc. Mei-Li Díaz Hung

Tutora: DrC. Lisette Blanco Lezcano

Asesora: DrC. Lourdes Lorigados Pedre



CENTRO INTERNACIONAL DE RESTAURACIÓN NEUROLÓGICA
LA HABANA, 2017

DEDICATORIA

A MI HIJA PAULA LUCÍA, LA PEQUEÑA LUZ QUE INSPIRA MI VIDA

*A MI ESPOSO JOAO GABRIEL MARTÍNEZ LÓPEZ POR SU AMOR Y APOYO A ESTE
TRABAJO.*

*A MIS PADRES EMÉRITO Y MEI-LI Y MI ABUELA IDA ELBA POR CADA SEGUNDO DE
DEDICACIÓN.*

AGRADECIMIENTOS

A TODA MI FAMILIA, POR EL APOYO DURANTE TODA MI VIDA.

A MI TUTORA DRC. LISETTE BLANCO LEZCANO, POR SU CONFIANZA Y COMPROMISO CON ESTE TRABAJO.

A MIS AMIGOS MSc. JENNY LAURA RUIZ, DRC. ALEXIS DÍAZ, MSc. ARIANNA YGLESIAS, DR. LUIS FERNANDO HERNÁNDEZ ZIMBRÓN, CUYA AYUDA FUE IMPRESCINDIBLE PARA LA REALIZACIÓN DE ESTA INVESTIGACIÓN.

A LA DRC. LOURDES LORIGADOS PEDRE, LA DRC. LIZETTE GIL DEL VALLE, EL DRC. ESTEBAN ALBERTI Y LA DRC. MARÍA DE LOS ÁNGELES ROBINSON POR LA EXHAUSTIVA REVISIÓN Y VALIOSOS APORTES A ESTE DOCUMENTO.

A DRC. SANDRA OROZCO, DR.C NANCY PAVÓN FUENTES, DR. RAÚL MACÍAS GONZÁLEZ, DRA. MARÍA ELENA GONZÁLEZ FRAGUELA, DRC. TERESA SERRANO, LIC. SUSANA, DRA. BÁRBARA ESTUPIÑÁN, LIC. ISABEL, MSc. RILDA LEÓN, MSc. YOAN ALEMÁN, LIC. GRETCHEN BERGADO, LIC. MAWY, MAGALY, MARCELA, ING. KARLA BATISTA, MSc. GRETEL, DR. ALAIN, EDUARDO, ASIEL Y TODOS LOS QUE DIRECTA O INDIRECTAMENTE HAN APOYADO ESTE TRABAJO.

SÍNTESIS

En el presente trabajo se evaluó la influencia de un desbalance transitorio en la concentración de glutatión sobre el funcionamiento de la vía nigro-estriatal y la conducta de ratas. Se emplearon 350 ratas Sprague-Dawley divididas aleatoriamente en tres grupos experimentales: sano, con inyección del inhibidor de la síntesis de glutatión L-butionina sulfoximina, o inyección de solución salina en la *substantia nigra pars compacta*. Junto a las evaluaciones conductuales, se determinaron indicadores de estrés oxidativo, neuroinflamación y expresión de genes relacionados con la plasticidad neuronal, así como marcadores de células dopaminérgicas, gliales y de muerte celular. Se encontró que la disminución transitoria en la concentración de glutatión está relacionada con un deterioro motor que se acompaña de una pérdida de neuronas dopaminérgicas y gliosis reactiva en la SNpc, y cambios en la expresión de los genes relacionados con la plasticidad nigro-estriatal. Además se observó una mayor actividad enzimática de la catalasa, síntesis del óxido nítrico, activación de c-Jun quinasa terminal, y mayor expresión y concentración de citocinas proinflamatorias en la *substantia nigra pars compacta*. Estos resultados sugieren que la disminución transitoria del GSH puede causar la disfunción de la *substantia nigra pars compacta* con las consiguientes alteraciones motoras, a través de modificaciones en la señalización redox, alteraciones en la concentración del óxido nítrico y la neuroinflamación.

ABREVIATURAS

6-OHDA: 6-hidroxidopamina

arc: proteína asociada al citoesqueleto con actividad regulada

BSO: L-butionina sulfoxima

BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro

CAT: catalasa

D₍₁₋₅₎: receptor dopaminérgico

EP: enfermedad de Parkinson

ERN: especies reactivas del nitrógeno

ERO: especies reactivas de oxígeno

EST: estriado

GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato

deshidrogenasa

GFAP: proteína fibrilar ácida de la glía

GPx: glutatión peroxidasa

GSH: glutatión

GSSG: glutatión oxidado

GRD: glutatión reductasa

JNK: c-Jun quinasa terminal

p-JNK: c-Jun quinasa terminal fosforilada

IL: interleuquina

Iba-1: molécula adaptadora de unión a calcio

iNOS: óxido nítrico sintasa inducible

MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetradidropiridina

NO: óxido nítrico

SNC: Sistema Nervioso Central

SNpc: *substantia nigra pars compacta*

SOD: superóxido dismutasa

TBARS: productos de reacción del ácido tiobarbitúrico

TH: tirosina hidroxilasa

TNF-α: factor de necrosis tumoral α

ÍNDICE

	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	6
1. Señalización redox y estrés oxidativo	6
2. Homeostasis y funciones del glutatión	10
3. Estrés oxidativo y las enfermedades neurodegenerativas	13
4. La inflamación en el Sistema Nervioso Central	14
5. Núcleos grises de la base y su relación con el sistema motor	16
6. Sistemas dopaminérgicos del cerebro medio. Receptores dopaminérgicos	21
7. Bases neurales de las alteraciones motoras asociados a las neuronas dopaminérgicas de la SNpc. Factores patogénicos	23
II. MATERIALES Y MÉTODOS	27
1. Materiales	27
1.1 Reactivos	27
1.2 Sujetos experimentales	28
1.3 Ética de la investigación	28
2. Diseño experimental	29
3. Administración de L-butionina sulfoximina	30
4. Evaluación conductual	31
4.1 Conducta exploratoria espontánea	31
4.2 Exploración de objetos	32
4.3 Prueba de la escalera	33
4.4 Prueba de estimulación táctil bilateral	34
4.5 Prueba de la barra transversal	34
5. Estudio morfológico	36
6. Estudio bioquímicos y moleculares	38
6.1 Obtención de muestras biológicas	38
6.2 Cuantificación de glutatión total	38

6.3 Ensayos de actividad enzimática de la glutatión peroxidasa y la glutatión reductasa	39
6.4 Ensayo de actividad enzimática de la catalasa	41
6.5 Cuantificación de productos de reacción del ácido tiobarbitúrico	42
6.6 Cuantificación de óxido nítrico	43
6.7 Cuantificación de proteínas totales	43
6.8 Extracción de ARN y proteínas con trizol	44
6.9 Cuantificación de citocinas	45
6.10 Análisis de western blot	46
6.11 RT-PCR y electroforesis en gel de agarosa	46
7. Procesamiento de los datos y análisis estadístico	48
III. RESULTADOS	49
1. Concentración de glutatión total	49
2. Alteraciones conductuales producidas por la disminución transitoria de la concentración de GSH	50
2.1 Conducta exploratoria espontánea	50
2.2 Exploración de objetos	51
2.3 Prueba de la escalera	52
2.4 Prueba de estimulación táctil bilateral	54
2.5 Prueba de la barra transversal	55
3. Efecto de la disminución de la concentración de GSH sobre la expresión de genes relacionados con la plasticidad del sistema nigro-estriatal	56
3.1 Expresión de los receptores dopaminérgicos	56
3.2 Expresión de los genes relacionados con la plasticidad <i>bdnf</i> y <i>arc</i>	57
4. Efecto de la disminución aguda de la concentración de GSH sobre la supervivencia celular de la SNpc	59
5. Efecto de la disminución transitoria de la concentración de GSH sobre los indicadores de estrés oxidativo	61
5.1 Actividad enzimática de la glutatión peroxidasa y la glutatión reductasa	61

5.2 Actividad enzimática de la catalasa	62
5.3 Concentración de productos de reacción del ácido tiobarbitúrico	63
5.4 Metabolismo del óxido nítrico	64
6. Efecto de la disminución de la concentración de GSH sobre los procesos de neuroinflamación en la SNpc	66
6.1 Marcadores de activación glial	66
6.2 Concentración de citocinas	67
6.3 Activación de c-Jun quinasa terminal	71
IV. DISCUSIÓN	73
1. Efecto de la administración de BSO sobre la concentración de glutatión total	73
2. Alteraciones motoras producidas por la disminución de la concentración de GSH nigral	74
3. Cambios en la expresión de genes relacionados con la plasticidad del sistema nigro-estriatal producto de la disminución de la concentración de GSH nigral	79
4. Pérdida de neuronas dopaminérgicas como consecuencia de la disminución transitoria de la concentración de GSH en la SNpc	84
5. Cambios en los indicadores de estrés oxidativo/nitrosativo producidos por la disminución transitoria de la concentración de GSH nigral	86
6. Neuroinflamación asociada a la disminución transitoria de la concentración de GSH nigral	93
7. Consideraciones finales	99
CONCLUSIONES	102
RECOMENDACIONES	104
BBLIOGRAFÍA	105
AUTOBIBLIOGRAFÍA	133

La enfermedad de Parkinson (EP) es una enfermedad neurodegenerativa que afecta aproximadamente 9,5/1000 personas mayores de 65 años. Los síntomas cardinales de la enfermedad incluyen bradicinesia, rigidez muscular, temblor en reposo e inestabilidad postural (Andersen *et al.*, 2015). Algunos síntomas no motores preceden el desarrollo de los síntomas motores clásicos como constipación, trastornos del sueño REM (del inglés *rapid eyes movement*), depresión, hiposmia, apatía, reacción lenta y dolor. Estos síntomas están asociados a la disfunción de estructuras no dopaminérgicas del Sistema Nervioso Central (SNC) (Bassetti, 2011). Se ha propuesto que la patología de la EP comienza en el tronco encefálico y estructuras olfatorias y progresiona siguiendo un patrón caudo-rostral (Kay *et al.*, 2015).

Aunque múltiples sistemas neuronales están implicados, las características neuropatológicas distintivas de la EP son la degeneración de las neuronas dopaminérgicas, la gliosis y la presencia de inclusiones intracitoplasmáticas (cuerpos de Lewy) en la *substantia nigra pars compacta* (SNpc) (Mhyre *et al.*, 2012). Esta área es el origen de las proyecciones dopaminérgicas al complejo caudado/putamen y su degeneración causa la disfunción del circuito motor de los núcleos basales (Carvalho *et al.*, 2013).

La enfermedad es principalmente esporádica aunque en una minoría de los casos está relacionada con mutaciones familiares. Muchas evidencias sugieren que la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo y la neuroinflamación son algunos de los mecanismos etiopatogénicos que contribuyen al desarrollo de la EP (Hirsch *et al.*, 2012; Rahimmi *et al.*, 2015).

El estrés oxidativo es una situación dinámica y compleja caracterizada por un desbalance entre la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y la disponibilidad y acción de los

antioxidantes (Butterfield, 2014). Durante el envejecimiento o en condiciones patológicas, la oxidación de las biomoléculas se incrementa (Kumar *et al.*, 2012a). El tejido nervioso está formado por células post-mitóticas y además, tiene un alto consumo de oxígeno, contenido de lípidos y actividad metabólica que hacen que sea particularmente susceptible al daño oxidativo. El estrés oxidativo en la EP puede estar relacionado con las propiedades pro-oxidantes de la dopamina y elevadas concentraciones de hierro libre que promueven la oxidación de la dopamina y la generación de ERO (Goldstein *et al.*, 2014).

Una de las alteraciones bioquímicas tempranas detectadas en asociación con la EP es la disminución de la concentración del glutatión (GSH), antioxidante de bajo peso molecular (Sian *et al.*, 1994a; Zhang y Forman, 2012) considerado como el tiol no proteico más importante en la biología celular (Aoyama *et al.*, 2008). Es sintetizado en el citoplasma de las neuronas y las células gliales en dos reacciones sucesivas cuyo paso limitante es catalizado por la enzima γ -glutamil-cisteína sintetasa (Smeyne y Smeyne, 2013). El GSH reacciona directamente con las ERO y actúa como cofactor de enzimas antioxidantes como la glutatión peroxidasa (GPx). Además, mantiene el potencial redox celular al preservar en estado reducido los grupos sulfidrilos de las proteínas y regula la señalización celular (Song *et al.*, 2014).

Se conoce que la magnitud de la disminución de GSH está en correspondencia con la severidad de la EP. El decremento de la concentración de GSH conduce a un aumento en la producción de óxido nítrico (NO) y la recaptura de hierro en células dopaminérgicas *in vitro* (Kaur *et al.*, 2009). Además se ha demostrado la inhibición del complejo I de la cadena de transporte mitocondrial luego del tratamiento con L-butionina sulfoximina (BSO), un inhibidor de la enzima γ -glutamil-cisteína sintetasa, y por tanto, de la síntesis de GSH (Hsu *et al.*, 2005).

Se ha planteado que la disminución del GSH por sí sola no conlleva la muerte de las células dopaminérgicas (Toffa *et al.*, 1997). No obstante, trabajos más recientes han demostrado que el mantenimiento de la concentración de GSH es esencial para proteger a la SNpc de la neurodegeneración (Chinta *et al.*, 2007) y que se requiere una fina regulación de la concentración de GSH para la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas nigrales (Garrido *et al.*, 2011). El efecto de la disminución del GSH puede ser complejo e involucrar daño inducido por estrés oxidativo y ruptura de la señalización redox (Chinta *et al.*, 2007). Sin embargo, el efecto directo de la disminución del GSH sobre la supervivencia de la célula dopaminérgica y la conducta motora no ha sido esclarecido *in vivo*.

Hipótesis

Las ratas con disminución transitoria de la concentración de glutatióón son susceptibles a presentar procesos de degeneración nigral y alteración en la conducta.

Objetivo general

Determinar el efecto de la disminución transitoria de la concentración de glutatióón sobre el funcionamiento de la *substantia nigra pars compacta* y la conducta motora de ratas.

Objetivos específicos

- I. Comprobar el efecto de la administración de L-butionina sulfoximina sobre la concentración de glutatióón nigral y estriatal de ratas.
- II. Evaluar la influencia de la disminución transitoria de la concentración de glutatióón sobre la conducta motora de ratas.

- III. Determinar el efecto de la pérdida de la homeostasis del glutatión sobre la supervivencia celular y la expresión de genes relacionados con la plasticidad en la *substantia nigra pars compacta* y el estriado de ratas.
- IV. Evaluar la consecuencia de la disminución transitoria de la concentración de glutatión sobre los indicadores de estrés oxidativo celulares en tejido estriatal y nigral en ratas.
- V. Analizar la repercusión de un estado de baja concentración de glutatión sobre los procesos de neuroinflamación en la *substantia nigra pars compacta* de ratas.

Novedad científica y aporte teórico

Debido a la alta incidencia y carácter progresivo de la EP, se hace necesaria la comprensión de los mecanismos moleculares involucrados en el daño neuronal que en la actualidad no están bien dilucidados, lo cual es imprescindible para la búsqueda de estrategias terapéuticas encaminadas a la neuroprotección o la neorrestauración del tejido dañado. Numerosas evidencias sugieren el papel de la pérdida de la concentración celular de GSH y el estrés oxidativo en la etiología y patogenia de esta enfermedad.

En este sentido, el presente trabajo demostró, por primera vez, que la disminución transitoria de la concentración de GSH conduce a alteraciones motoras que ocurren antes de una pérdida completa de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc. Además, los hallazgos morfológicos y moleculares en la SNpc y en el estriado demuestran la validez de este modelo para el estudio del papel de las ERO en la etiología de la EP.

Por otra parte, los resultados de esta investigación evidencian, por primera vez, la existencia de mecanismos inflamatorios como consecuencia de alteraciones en el contenido de GSH y la

possible contribución de ambos factores a los procesos neurodegenerativos, aspecto de intenso debate en la literatura.

Aporte práctico y social

La EP es una enfermedad neurodegenerativa asociada a la edad, que constituye la segunda causa de muerte por enfermedades de este tipo con incidencia creciente en Cuba (Dirección de registros Médicos y Estadísticas de Salud del Ministerio de Salud pública, 2016). Los signos y síntomas motores de esta enfermedad aparecen sólo cuando el 70% de las células dopaminérgicas de la SNpc han degenerado, por lo que en ocasiones el diagnóstico temprano de la enfermedad se dificulta. Múltiples evidencias experimentales sugieren que el GSH puede ser empleado como marcador de pronóstico temprano debido a que su concentración disminuye en estadios pre-sintomáticos de la enfermedad, y de acuerdo a los estudios post-mortem, la reducción de la concentración de GSH es específica del tejido nigral; estructura afectada en esta entidad (Bogdanov *et al.*, 2007).

El presente trabajo muestra que la disminución transitoria en la concentración de GSH en la SNpc puede inducir alteraciones motoras, por modificaciones en la señalización redox y la neuroinflamación, lo cual aporta un conocimiento básico para el diseño e implementación clínica de nuevos métodos diagnósticos y terapéuticos para la EP.

1. Señalización redox y estrés oxidativo.

La vida aeróbica depende de la combustión controlada para el suministro de energía. La oxidación de moléculas orgánicas y la transferencia de electrones al oxígeno molecular libera gran cantidad de energía libre, que es utilizada por los organismos aeróbicos para la producción de energía biológica (Deponte y Lillig, 2015). El oxígeno no sólo es un potente agente oxidante requerido para la respiración celular sino también un precursor de especies altamente reactivas formadas a partir de sus reacciones subsiguientes. Las ERO incluyen el superóxido (O_2^-), el hidroxilo ($OH\cdot$), el hidroperóxido (HO_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Valentine *et al.*, 1998).

La fuente endógena de ERO más importante es el sistema de transporte de electrones mitocondrial que utiliza casi el 90% del O_2 consumido para la fosforilación oxidativa, la cual involucra una lanzadera de electrones entre los complejos mitocondriales. Debido a este elevado flujo, es inevitable el escape de electrones que resulta en la formación de O_2^- fundamentalmente en el complejo I (NADH deshidrogenasa) y el complejo III (semiubiquinona) (Ren *et al.*, 2015).

El anión O_2^- se reduce espontáneamente a H_2O_2 . El H_2O_2 no es un radical libre pues no presenta electrones sin parear, es relativamente estable en solución y puede atravesar las membranas libremente o a través de canales acuaporinos y así difundir a un compartimiento diferente al que le dio origen. El anión O_2^- interactúa con el H_2O_2 (reacción de Haber-Weiss) y forma $OH\cdot$ y con el NO forma $ONOO^-$, la cual se incluye entre las especies reactivas del nitrógeno (ERN). Otra vía de generación del $OH\cdot$ transcurre mediante la reacción de Fenton en la que tiene lugar

I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

la reducción de H₂O₂ por iones metálicos como el hierro (Fe²⁺) y el cobre (Cu⁺) (Kudin *et al.*, 2012).

Las ERO/ERN median reacciones reversibles o irreversibles que participan en la regulación de procesos fisiológicos (Schieber y Chandel, 2014). La señalización redox es el término empleado para los mecanismos por los que un elemento redox específico transmite una señal, ya sea activadora o inactivadora (Jones, 2010). El circuito redox involucra un generador de señal, la señal redox (ejemplo H₂O₂), un sensor (proteínas como la tiorredoxina), un transductor y un efector (típicamente un gen diana) (Jones, 2006; Brigelius-Flohe y Flohe, 2011). En esta vía de señalización ocurre la modificación de una biomolécula diana por una ERO, a través de una reacción química reversible en la que la ERO/ERN actúa como un interruptor de encendido-apagado (Navarro-Yepes *et al.*, 2014).

El mecanismo de señalización redox mejor caracterizado involucra la oxidación mediada por H₂O₂ de los residuos de cisteínas de las proteínas a una forma sulfénica (Cys-SOH), lo cual causa cambios alostéricos dentro de las proteínas que alteran su función. La forma sulfénica puede ser reducida al anión tiolato (Cys-S⁻) por disulfito reductasas como la tiorredoxina y la glutarredoxina (Schieber y Chandel, 2014).

Numerosas evidencias indican que las ERO y las ERN actúan como moléculas de señalización en la modulación de una variedad de funciones celulares como la transcripción de genes, la síntesis de proteínas, el metabolismo, la proliferación celular y la apoptosis (Deponte y Lillig, 2015). Las cascadas de señalización en las que participan incluyen la activación de receptores tirosina quinasa, fosforilación-desfosforilación de proteínas, cierre (disminución de la probabilidad de apertura) de canales K_{ATP}, la cascada del fosfatidilinositol-3-quinasa y la

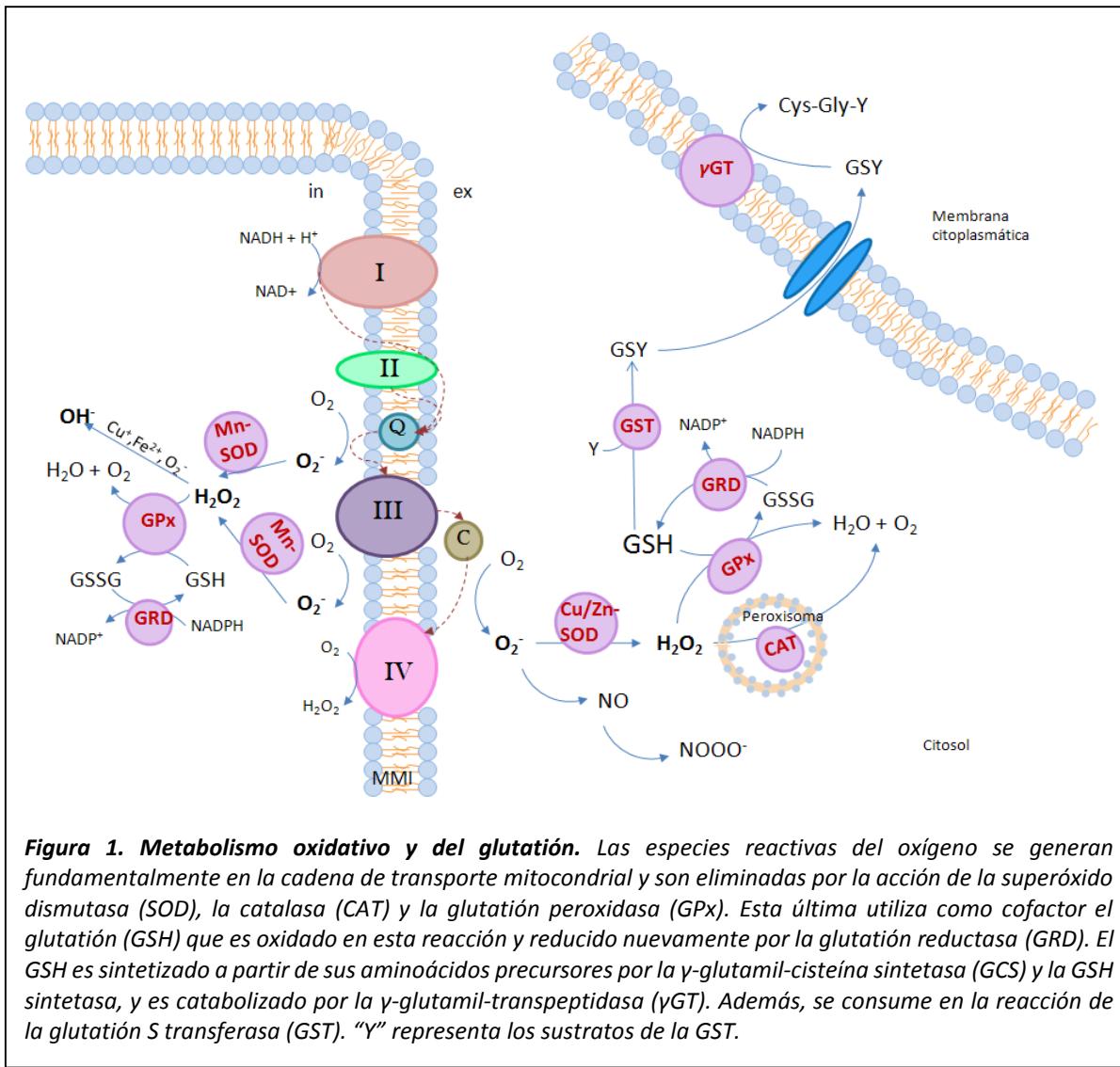
activación de proteína G. A estos eventos le continúan la activación de las MAPK (del inglés *mitogen-activated protein kinase*) y factores de transcripción como el factor nuclear κB (NF-κB) y el activador de proteína 1 (AP-1) (Ogura *et al.*, 2014).

Si este circuito redox es alterado, como ocurre en condiciones patológicas, estos mensajeros redox se acumulan, y ocurre la oxidación irreversible de las biomoléculas y el daño oxidativo (Hanschmann *et al.*, 2013). De este modo, el fenómeno de estrés oxidativo visto como “un exceso de producción de sustancias pro-oxidantes y un déficit de los mecanismos de defensa contra la oxidación, o ambos factores” (Jimenez-Jimenez *et al.*, 2006) ha sido redefinido en la literatura hacia un concepto más amplio, y es actualmente documentado como “el daño que proviene de la ruptura de la señalización y el control redox” (Jones, 2006; Gu *et al.*, 2015).

En condiciones fisiológicas, la homeostasis redox (Fig. 1) se mantiene gracias a sustancias de bajo peso molecular capaces de neutralizar espontáneamente las ERO y sus productos de reacción, y a enzimas con función antioxidante. Entre los compuestos antioxidantes se encuentran el β -caroteno, el ácido retinoico, el α -tocoferol, el ácido ascórbico, la coenzima Q, quelantes del hierro como la ferritina, la melatonina, el ácido úrico y tioles como el GSH (Biswas, 2016).

Entre las enzimas con función antioxidante están la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y las enzimas relacionadas con el metabolismo del GSH. La SOD cataliza la conversión del O_2^- en H_2O_2 , el cual es degradado en H_2O y O_2 por la CAT. La GPx cataliza con alta especificidad la descomposición del H_2O_2 a H_2O y de peróxidos orgánicos a los correspondientes alcoholes, utilizando el GSH como donador de electrones. La glutatión reductasa (GRD) cataliza la reducción del glutatión oxidado (GSSG) utilizando NADPH (del inglés *nicotinamide adenine*

dinucleotide phosphate reduced), lo que mantiene la concentración de GSH en la célula. Por último, la glutatión-S-transferasa conjuga el GSH con muchos compuestos orgánicos, puede reducir hidroperóxidos y también detoxifica el 4-hidroxinonenal, un producto de la peroxidación lipídica (Cardenas-Rodriguez *et al.*, 2013).



En elevadas cantidades, las ERO son altamente tóxicas debido a su reacción con los lípidos, las proteínas y los ácidos nucleicos. La correcta respuesta a la producción de ERO es crítica para prevenir el daño oxidativo y para mantener la supervivencia celular. El daño a los componentes

celulares puede desencadenar la muerte celular por procesos de apoptosis o necrosis, dependiendo de la magnitud del estrés oxidativo (Morgan y Liu, 2011).

2. Homeostasis y funciones del glutatión.

El tripéptido GSH (γ -L-glutamilo-L-cisteinil-glicina) es un tiol presente en concentraciones de hasta $12\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ en las células de los mamíferos. Se sintetiza *in vivo* por la acción consecutiva de dos enzimas que utilizan adenina-3-fosfato (ATP) (Fig. 1). La γ -glutamil-cisteína sintetasa utiliza glutamato y cisteína para formar el dipéptido γ -glutamil-cisteína que finalmente se combina con glicina en una reacción catalizada por la GSH sintetasa (Bavarsad *et al.*, 2014).

A pesar de ser sintetizado exclusivamente en el citosol, el GSH se encuentra distribuido en el retículo endoplasmático, el núcleo y la mitocondria. En cada uno de estos organelos la relación GSH/GSSG es diferente, lo que garantiza su función. En el núcleo, el GSH mantiene en su forma reducida a los grupos sulfidrilos de las proteínas necesarios para la reparación del ADN. En el retículo endoplasmático, se encuentra de manera predominante la forma GSSG, lo que permite la formación de puentes disulfuro y el correcto plegamiento de las proteínas durante su síntesis. En la mitocondria, la concentración de GSH es similar a la citosólica, lo cual es de gran importancia ya que este organelo está directamente expuesto a las ERO (Circu y Aw, 2012).

En condiciones fisiológicas, la concentración de GSH es regulada fundamentalmente por el control de su síntesis y exportación de las células; sin embargo, la concentración de GSH puede afectarse por agentes o condiciones que alteren el estado redox y por ruptura de la distribución entre los organelos (Johnson *et al.*, 2012). Durante el curso de la reacción de la GPx el GSH es reciclado por la GRD. En contraste, el GSH es consumido durante la generación

de glutatión-S-conjugados por la glutatión-S-transferasa en la eliminación de xenobióticos o compuestos endógenos, o por su liberación de la célula. Ambos procesos disminuyen la concentración de GSH total. Para mantener la concentración intracelular de GSH, el GSH consumido es remplazado por resíntesis a partir de sus aminoácidos precursores. El GSH extracelular y sus conjugados son sustrato de la enzima γ -glutamil-transpeptidasa (Fig. 1) (Smeyne y Smeyne, 2013).

En el SNC tiene lugar una interacción entre los astrocitos y las neuronas durante la síntesis de GSH que es de gran importancia para proteger a las neuronas de las reacciones de las ERO (Pizzurro *et al.*, 2014). Los astrocitos tienen mayor concentración y capacidad de secreción al espacio extracelular de GSH que las neuronas. Esta secreción sirve para suplir de GSH a otras células del cerebro, incluyendo las neuronas, mediante la γ -glutamil-transpeptidasa. La síntesis de GSH depende de la disponibilidad de la cisteína. La incorporación de este aminoácido ocurre en las neuronas a través de un transportador para aminoácidos excitatorios mientras que en los astrocitos ocurre a través del intercambiador cistina/glutamato (Johnson *et al.*, 2012).

El GSH es el principal antioxidante del cerebro con una concentración superior a la del plasma y el líquido cefalorraquídeo. Reacciona espontáneamente con las ERO y sirve como cofactor en la reacción de la GPx para la detoxificación del H₂O₂ y los hidroperóxidos (Liu *et al.*, 2014).

En esta reacción el GSH pasa a su forma oxidada GSSG, de manera que la relación GSH/GSSG sirve como indicador del ambiente redox celular (Jones, 2006). Participa en la señalización redox a través de reacciones de glutationilación (Zhang y Forman, 2012). También interviene en reacciones de detoxificación de xenobióticos, en la regulación del transporte de aminoácidos hacia la célula y en el mantenimiento de la estructura tridimensional de las

proteínas (Kojovic *et al.*, 2012). Además el GSH sirve como transporte/almacén de cisteína, la cual por sí misma tiene efectos neurotóxicos (Limon-Pacheco *et al.*, 2007).

Como neuromodulador/neurotransmisor el GSH se une a los receptores de glutamato tipo N-metil-D-aspartado y exhibe una acción dual (agonista/antagonista) en las respuestas neuronales mediadas por estos receptores. También sirve como reservorio endógeno de NO al formar S-nitrosoglutatión, compuesto que puede liberar el NO en ciertas condiciones y tiene un efecto protector en el cerebro en condiciones de estrés oxidativo. Además, el GSH se requiere para la proliferación celular y la diferenciación neuronal (Fitzpatrick *et al.*, 2012).

La concentración de GSH puede ser modificada experimentalmente empleando BSO, un inhibidor de la enzima γ -glutamil-cisteína sintetasa (Hashimoto *et al.*, 2008). El tratamiento con BSO disminuye la capacidad de protección antioxidant del organismo al aumentar la susceptibilidad neuronal al daño oxidativo por las ERO, de forma similar a lo que ocurre en el envejecimiento y en algunas enfermedades neurodegenerativas asociadas a este como la EP y la enfermedad de Alzheimer (Shukitt-Hale *et al.*, 1998). La ventaja de utilizar la BSO radica en su efecto de larga duración y baja toxicidad (Martensson *et al.*, 1991). No obstante, la BSO no atraviesa la barrera hematoencefálica en animales adultos por lo que debe administrarse directamente en el cerebro (Shukitt-Hale *et al.*, 1998). El uso de la BSO en modelos experimentales constituye una importante herramienta para la exploración de la influencia del glutatión en la función del sistema nervioso.

3. El estrés oxidativo y las enfermedades neurodegenerativas.

El cerebro consume el 20% del oxígeno inspirado y obtiene su energía casi exclusivamente del metabolismo aeróbico y la glucosa sanguínea, lo que conduce a una elevada generación de ERO. Es un órgano particularmente vulnerable al daño oxidativo debido a que posee una baja capacidad de defensa antioxidante y una elevada concentración de ácidos grasos polinsaturados, catecolaminas e iones de metales de transición como el hierro (Angelova *et al.*, 2015). Una desventaja adicional es la presencia de la barrera hematoencefálica, la cual protege el cerebro de toxinas al limitar su difusión dentro de las neuronas y la glia, pero también reduce la entrada de algunos antioxidantes como la vitamina E (Freeman y Keller, 2012).

Las enfermedades neurodegenerativas tienen en común una disfunción en la dinámica de las proteínas, con agregación y degradación defectuosas, estrés oxidativo, disfunción mitocondrial y neuroinflamación. Aunque es difícil establecer el orden en el que ocurren estos eventos, se ha observado que el daño oxidativo aparece en etapas tempranas (Cacciatore *et al.*, 2012). En estas entidades los marcadores de oxidación de proteínas (carbonilos proteicos y 3-nitrotirosina), peroxidación lipídica (malonildialdehído y 4-hidroxinonenal) y oxidación del ADN (8-hidroxi-2-desoxiguanosina) se encuentran elevados (Ramalingam y Kim, 2012).

La vulnerabilidad de las neuronas al estrés oxidativo varía de una región cerebral a otra. Un ejemplo de ello son las poblaciones de neuronas dopaminérgicas del cerebro medio. Aunque electrofisiológicamente similares, las neuronas dopaminérgicas de la SNpc son más susceptibles al estrés oxidativo que las del área tegmental ventral. Varios factores pueden contribuir a esta vulnerabilidad selectiva a las ERO, entre ellos, la demanda y producción de

ATP, la activación glial, la capacidad de reparación del ADN y la regulación del Ca²⁺ (Wang y Michaelis, 2010).

La activación de células gliales en respuesta al daño neuronal, incluyendo el daño oxidativo, involucra un amplio rango de respuestas, entre ellas expresión de genes relacionados con la síntesis del NO y la síntesis de citocinas. Estos agentes pueden contribuir a la neurodegeneración. El estrés oxidativo también puede desencadenar las señales intracelulares relacionadas con la muerte celular apoptótica. Se ha observado la activación de las caspasas por el NO en la esclerosis lateral amiotrófica y por la vía de señalización de la c-Jun quinasa terminal (JNK) en la EP. En esta misma enfermedad se ha observado que el daño oxidativo al ADN activa el gen p53 lo que pone en marcha las cascadas apoptóticas (Kim *et al.*, 2015).

4. La inflamación en el Sistema Nervioso Central

La inflamación es una reacción especializada frente a agentes infecciosos o daño tisular. El proceso inflamatorio en el SNC se denomina neuroinflamación y está presente en la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas (Lema Tomé *et al.*, 2013). La continua presencia de neuronas dañadas resulta en una activación constante de las células inmunes residentes del cerebro, la microglia y los astrocitos. También los macrófagos periféricos pueden entrar al SNC bajo ciertas condiciones, como se ha reportado en la esclerosis múltiple, donde las células B y T pueden cruzar la barrera hematoencefálica, entrar al parénquima cerebral y generar una respuesta inmune adaptativa que promueve neuroinflamación y neurodegeneración (Fischer y Maier, 2015).

I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Los astrocitos comprenden cerca del 35% de la población total de células del SNC y se encuentran en todas las regiones del cerebro. Forman parte esencial de la barrera hematoencefálica y participan activamente en el desarrollo del cerebro, la regulación de la maduración del SNC y la plasticidad neural; también liberan factores de crecimiento esenciales para la supervivencia y el mantenimiento de la homeostasis neural (Cheng *et al.*, 2013).

Los astrocitos reactivos expresan una variedad de citocinas (factor de necrosis tumoral α (TNF- α), interleuquinas (IL) IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-18), quimoquinas (tipos CC, CCX y CX3C), factores de estimulación de colonias tipo 1 y 2, y mediadores como la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1). En conjunto, estos mediadores están relacionados con la regulación de la migración, activación y proliferación de la microglia, regulación de la actividad microglial, proliferación y supervivencia astrocitaria, la transmisión y la plasticidad sináptica (More *et al.*, 2013).

Por otra parte, la microglia representa del 10-15% del total de células del SNC. Estas células mantienen un nivel bajo o no detectable de actividad y sólo inician una respuesta inmune ante una estimulación apropiada como por ejemplo α -sinucleína, neuromelanina, proteínas de choque térmico, proteínas S-100 de unión a calcio, entre otras (Von *et al.*, 2015). En dependencia del estímulo, la respuesta inflamatoria microglial puede iniciarse por receptores de reconocimiento de patrones como los receptores tipo Toll en el caso de patógenos, o receptores “basurero”, que están involucrados en la captura de proteínas y lípidos oxidados, células apoptóticas y también contribuyen a la señalización celular (Glass *et al.*, 2010).

La inflamación está estrechamente relacionada con el estrés oxidativo a través de la liberación de ERO y ERN durante el proceso inflamatorio. En particular, la microglia tiene altos niveles de

óxido nítrico sintasa y NADPH oxidasa que incrementan la cantidad de ERO/ERN. A su vez, estas especies inducen cambios en la señalización intracelular que resulta en la activación de factores de transcripción como el NF- κ B, el AP-1 y el factor nuclear relacionado con el factor E2 (Nrf-2), los cuales regulan la expresión de mediadores proinflamatorios como la ciclooxigenasa, TNF- α , IL-6 e IL-1 β y de enzimas antioxidantes (Urrutia *et al.*, 2014).

Contrario a la respuesta biológica de supervivencia celular mediada por NF- κ B, la activación del receptor del TNF- α induce la apoptosis a través de la proteína JNK y la caspasa-8. JNK es un miembro de la familia de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Li *et al.*, 2015a). El mecanismo por el cual JNK induce apoptosis no está bien establecido; se han identificado algunos factores de transcripción dependientes de JNK como por ejemplo FOXO3a. La fosforilación de JNK promueve la desfosforilación de FOXO3a y su translocación al núcleo. Uno de sus genes dianas es el promotor de la apoptosis Bim, el cual pertenece a la familia de las Bcl-2. Bim interactúa con el factor pro-apoptótico Bax para formar un complejo que se transloca a la membrana mitocondrial lo que promueve la liberación de citocromo C y la activación de la apoptosis dependiente de caspasas (Chen *et al.*, 2012).

5. Núcleos grises de la base y su relación con el sistema motor.

Los núcleos basales (ganglios basales) consisten en cuatro núcleos: el estriado (EST) subdividido en los núcleos caudado y putamen, el globo pálido con sus segmentos externo e interno, el núcleo subtalámico y la *sustantia nigra* en sus porciones reticulada y compacta (SNpc). Ellos están involucrados en circuitos segregados anatómicamente que funcionan en paralelo: “motor”, “oculomotor”, “asociativo” y “límbico” (Nelson y Kreitzer, 2014). Cada uno

de estos circuitos recibe aferencia de regiones corticales funcionalmente relacionadas. Por ejemplo, el circuito motor recibe de las áreas motora, premotora, motora suplementaria y somatosensorial. La eferencia de los ganglios basales es hacia una única región frontal; en el caso del circuito motor, hacia el área motora suplementaria (Lanciego *et al.*, 2012). El circuito motor está involucrado en el control del movimiento voluntario y la disfunción de los núcleos que conforman estos circuitos se relaciona con trastornos del movimiento como la EP (Galvan *et al.*, 2015).

La actividad de las neuronas de los núcleos basales tributa a diferentes parámetros del “plan motor” elaborado en las áreas motoras de la corteza como dirección, velocidad, amplitud, carga y fuerza muscular. Estos núcleos no están relacionados con un único movimiento, sino más bien con combinaciones de ellos y presentan una fina organización somatotópica (Tremblay *et al.*, 2015).

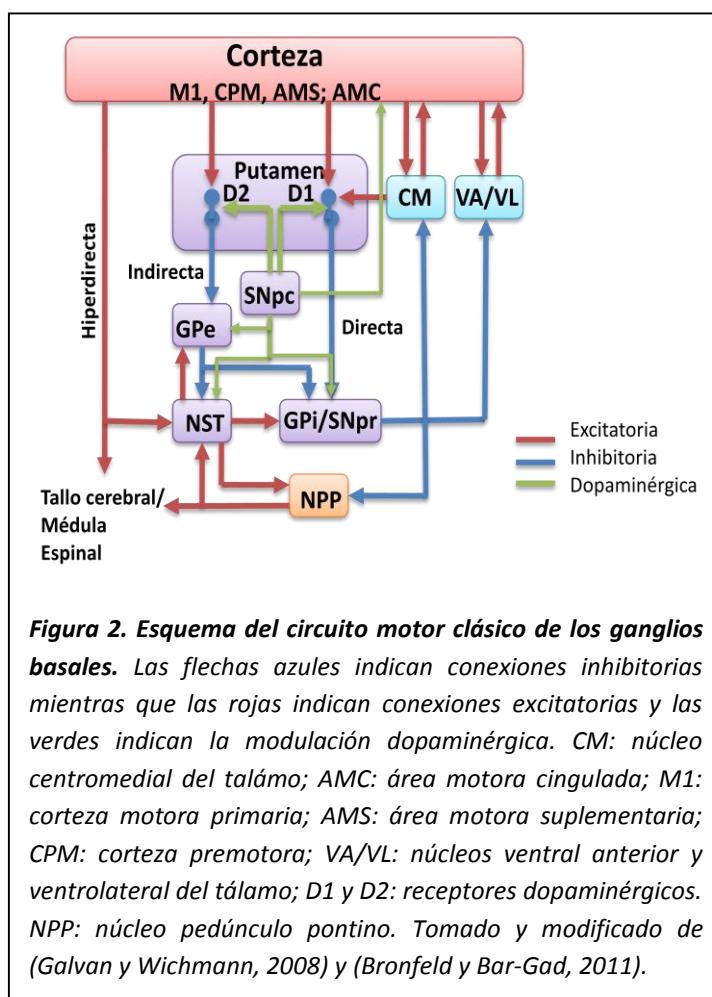
En el modelo clásico de los núcleos basales (Fig. 2) desarrollado en la década de 1980 por Albin, Young y Penney (Obeso y Lanciego, 2011) el EST (GABAérgico) recibe aferencias glutamatérgicas procedentes de áreas específicas de la corteza y del tálamo, y transfiere la información a los núcleos de salida, el globo pálido interno y la *substantia nigra reticulata* (GABAérgicos). De acuerdo a este modelo, las proyecciones entre el EST y el globo pálido interno/*substantia nigra reticulata* se dividen en dos vías separadas. Una “vía directa” (monosináptica) y una “vía indirecta” a través del globo pálido externo (GABAérgica) y el núcleo subtalámico (glutamatérgica). La eferencia del globo pálido interno/*substantia nigra reticulata* se dirige hacia los núcleos ventrolateral y ventral anterior del tálamo, el cual proyecta de regreso hacia la corteza cerebral (Galvan *et al.*, 2015). Simultáneamente el EST

también recibe una proyección dopaminérgica que se origina en la SNpc (vía nigro-estriatal) y modula la transmisión corticoestriatal (Braun *et al.*, 2015).

La “vía directa” se origina en las neuronas espinosas de talla mediana del EST que expresan receptores D₁, sustancia P y dinorfina y produce inhibición de las neuronas del globo pálido interno/*substantia nigra reticulata*. La inhibición de estos núcleos desinhibe los núcleos talámicos diana lo que activa las proyecciones tálamo-corticales y por tanto la función motora. Esta vía es facilitada por la transmisión dopaminérgica mediante los receptores D₁ (Calabresi *et al.*, 2014).

La “vía indirecta” se origina en las neuronas espinosas de talla mediana que expresan receptores D₂ y encefalinas y proyecta hacia el globo pálido interno/*substantia nigra reticulata* a través del globo pálido externo y el núcleo subtalámico. En este caso, las neuronas espinosas de talla mediana inhiben el globo pálido externo, esta inhibición “libera” el núcleo subtalámico que puede entonces estimular el globo pálido interno/*substantia nigra reticulata*. La actividad de estos últimos mantiene a los núcleos motores del tálamo y al tallo cerebral bajo un control inhibitorio que impide o detiene el movimiento. La acción de la dopamina inhibe la “vía indirecta” a través de los receptores D₂ (Obeso y Lanciego, 2011). Otras estructuras como el núcleo pedúnculo pontino parecen proveer una interfase entre el movimiento y las estructuras del cerebro anterior implicadas en la atención a los estímulos sensoriales y la actividad motivacional (Dautan *et al.*, 2014).

De acuerdo a este mapa sináptico, el plan motor que activa la vía directa produce una retroalimentación que facilita su ejecución, mientras la activación de la vía indirecta conduce a la cancelación de dichas acciones. Esta segregación es además reforzada por mecanismos de aprendizaje dentro de los núcleos basales lo que conduce en el tiempo a una selección más rápida de las rutinas motoras deseadas (Hwang, 2013a). En la actualidad se considera que los núcleos basales no sólo son codificadores de las habilidades motoras sino que también están involucrados en el aprendizaje de tales habilidades. La actividad recurrente y alternante de las neuronas de los núcleos basales constituye el sustrato de los procesos relacionados con el aprendizaje motor. Esto ocurre mediante sincronización de la actividad y composición de



secuencias entre diferentes microcircuitos neurales (Park y Rubchinsky, 2012). Recientemente el núcleo subtalámico se ha considerado como otra estación de entrada que recibe aferencia directa desde la corteza (“vía hiperdirecta”), el tálamo y el tallo cerebral. Junto a las proyecciones eferentes del núcleo subtalámico conocidas, se ha confirmado la presencia de proyecciones directas del núcleo

subtalámico al tálamo ventral. También se han reconocido conexiones recíprocas entre el globo pálido externo y el EST, y entre el EST y la SNpc. El núcleo subtalámico, el globo pálido externo y el globo pálido interno forman un microcircuito donde el globo pálido externo aparenta estar estratégicamente posicionado para controlar la actividad eferente de los núcleos basales. Asimismo, el sistema de proyección dopaminérgico inerva además del EST, estructuras como el núcleo subtalámico, el globo pálido externo y el globo pálido interno, así como áreas de corteza, núcleos del tálamo y estructuras del sistema límbico (Obeso y Lanciego, 2011).

Las vías “directa” e “indirecta” son co-activadas durante la iniciación del movimiento y se inactivan cuando el sujeto está en reposo. Además, la activación de ambas vías precede el inicio del movimiento (Carvalho *et al.*, 2013). Se ha planteado que cada acción motora posible está representada por un pequeño grupo de neuronas en las estructuras eferentes de los núcleos basales. La inhibición selectiva de un grupo facilita las neuronas corticales que codifican la acción motora seleccionada. Al mismo tiempo, la facilitación de otros grupos neuronales en el globo pálido interno/*substantia nigra reticulata* inhibe otras acciones motoras que compiten. De este modo, la “vía directa” desde el EST genera focos de inhibición en subpoblaciones neuronales del globo pálido interno/*substantia nigra reticulata* mientras que las proyecciones a través del núcleo subtalámico y el globo pálido externo (por las vía hiperdirecta e indirecta) exhibe excitación difusa del globo pálido interno/*substantia nigra reticulata*. El efecto combinado genera el patrón de activación (Tremblay *et al.*, 2015).

6. *Sistemas dopaminérgicos del cerebro medio. Receptores dopaminérgicos.*

Existen tres sistemas dopaminérgicos fundamentales en el cerebro. Los cuerpos celulares de la vía nigroestriatal se localizan en la SNpc y proyectan hacia el EST dorsal (caudado-putamen); la degeneración de esta vía resulta en el trastorno motor de la EP. La vía mesolímbica se origina en el área tegmental ventral y termina en el núcleo *acumbens*; una función de este sistema es la mediación de la satisfacción natural e inducida por drogas. La vía mesocortical también se origina en el área tegmental ventral y alcanza la corteza prefrontal regulando complejos procesos cognitivos como la atención selectiva y la memoria de trabajo (Alex y Pehek, 2007).

La liberación de dopamina tanto en el cerebro medio como en el cerebro anterior es regulada dinámicamente y localmente por el microcircuito que rodea el sitio de liberación. Los datos indican que la señal dopaminérgica puede ser inhibida o potenciada de manera independiente a la frecuencia por una variedad de factores que regulan la liberación axonal o somatodendrítica. Estos factores incluyen la recaptura de la dopamina mediada por el transportador localizado en la neurona dopaminérgica, los autorreceptores, el ion Ca^{2+} , los neurotransmisores glutamato, GABA y acetilcolina, opioides, cannabinoides, el H_2O_2 y el NO (Rice y Patel, 2015).

La acción de la dopamina en su sitio blanco es mediada por una familia de receptores acoplados a proteína G codificados por al menos 5 genes (d_1 , d_2 , d_3 , d_4 y d_5). Estos receptores están clasificados en dos subfamilias, los receptores tipo D₁ y los receptores tipo D₂ basado en la homología de secuencia y propiedades farmacológicas (Rangel-Barajas *et al.*, 2015). Los receptores de tipo D₁ (D_1 y D_5), están acoplados a proteína G_{as} que estimula la adenilato ciclase e incrementa la concentración de AMPc con la subsiguiente activación de proteína quinasa A (PKA) y quinasas dependientes de señales extracelulares. Los receptores de tipo D₂

(D₂, D₃ y D₄) están negativamente acoplados a esta señalización dependiente de AMPc/PKA (Truong *et al.*, 2006). La activación de estos receptores también estimula la hidrólisis del fosfatidil inositol por la fosfolipasa C a inositol-3-fosfato (IP₃), el cual moviliza el Ca²⁺ de los reservorios intracelulares (Vaarmann *et al.*, 2010).

La modulación dopaminérgica depende del subtipo del receptor, su localización en el sitio pre o postsináptico, la concentración de dopamina en el microambiente y el estado de actividad de la neurona blanco. En las neuronas espinosas de talla mediana estriatales convergen los axones de las neuronas dopaminérgicas de la vía nigro-estriatal y las proyecciones glutamatérgicas cortico-estriatales. Así, la activación del receptor D₁ facilita la transmisión cortico-estriatal a través de la “vía directa” mientras que la activación de los receptores D₂ inhibe la transmisión a través de la “vía indirecta” (Roberts *et al.*, 2009). Además, la dopamina liberada en el EST está implicada en los procesos de aprendizaje y plasticidad sináptica tales como la depresión a largo plazo o potenciación a largo plazo (Benazzouz *et al.*, 2014). La dopamina también tiene acción sobre otras estructuras de los núcleos basales además del EST. Los autoreceptores D₂ suprimen la liberación somatodendrítica de dopamina en la SNpc y la liberación axonal en el EST (Ford, 2014). En el globo pálido externo, la dopamina inhibe la transmisión GABAérgica procedente de las neuronas espinosas de talla mediana de la “vía indirecta” y estimula la liberación de glutamato procedente del n úcleo subtalámico, lo que resulta en un incremento de la actividad del globo pálido interno. La dopamina actúa sobre receptores D₂ localizados en las terminales presinápticas e inhibe la liberación de GABA en el n úcleo subtalámico, facilitando su actividad. En el globo pálido interno, actúa sobre los

receptores tipo D₁ en las terminales presinápticas y facilita la liberación de GABA (Benazzouz *et al.*, 2014).

7. Bases neurales de las alteraciones motoras asociados a las neuronas dopaminérgicas de la SNpc. Factores patogénicos.

Los núcleos basales han sido implicados en una amplia variedad de trastornos psicomotores como la EP, la esquizofrenia y la dependencia de drogas. La alteración de la regulación de las vías “directa” e “indirecta” por la dopamina parece ser un aspecto esencial en la mayoría de estas enfermedades. El ejemplo mejor caracterizado es la EP, en la que las neuronas dopaminérgicas de la SNpc degeneran. Los estudios en modelos experimentales de EP sugieren que la excitabilidad de las vías “directa” e “indirecta” se modifica luego de la disminución de los niveles de dopamina, creando un desbalance en la regulación de los núcleos motores del tálamo que favorece la supresión del movimiento (Ericsson *et al.*, 2013).

En el EST, diana principal de la inervación dopaminérgica, ocurren una serie de cambios celulares y sinápticos en respuesta a la deficiencia de dopamina. Se ha observado un incremento compensatorio en la respuesta de los receptores D₁ y D₂, así como un aumento en la actividad de las neuronas que proyectan en la “vía indirecta” del circuito motor (Kreitzer y Malenka, 2008). La modificación de la señalización mediada por los receptores D₁ y D₂ promueve los mecanismos de depresión a largo plazo en la “vía directa” y de potenciación a largo plazo en la “vía indirecta”, respectivamente. De modo que los cambios en la fortaleza sináptica dependientes de la actividad ocurren en paralelo a los cambios de excitabilidad que siguen a la disminución de la dopamina (Ericsson *et al.*, 2013).

El efecto neto de este desbalance entre las vía “directa” e “indirecta” es una elevada actividad de las neuronas inhibitorias del globo pálido interno que proyectan al tálamo. La inhibición de este centro premotor subyace a los síntomas de acinesia y bradicinecia de la EP, aunque no explican completamente el temblor, la rigidez y los síntomas axiales (Hutchison *et al.*, 2004).

Existen evidencias de actividad sincrónica en la frecuencia de oscilación entre el núcleo subtalámico, el globo pálido externo y la corteza motora. Esto podría conducir a una ruptura de la capacidad de las neuronas individuales de procesar y transmitir información específica y de este modo, controlar efectivamente movimientos complejos (Wichmann y Dostrovsky, 2011).

Además de la degeneración de las neuronas de la SNpc, es característico de la EP la presencia de cuerpos de inclusión citoplasmáticos eosinófilos (cuerpos de Lewy) formados principalmente por α -sinucleína fibrilar y ubiquitina. Estos están presentes en la SNpc y otras estructuras como el núcleo pedúnculo pontino, el bulbo olfatorio, núcleo rafe, *locus coeruleus* y neuronas post-ganglionares del Sistema Nervioso Autónomo. Estas lesiones contribuyen a los síntomas no motores de la enfermedad que generalmente aparecen temprano en el curso de la misma. Los síntomas motores aparecen cuando la concentración de dopamina es inferior al 70% de lo normal (Dias *et al.*, 2013; Mizuno *et al.*, 2008).

Los mecanismos involucrados en la neurodegeneración están poco dilucidados, sobre todo porque la mayoría de los casos de EP son de causa desconocida. Las evidencias actuales apoyan la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo y la acumulación de proteínas mal plegadas como factores desencadenantes de la muerte neuronal (Garcia-Garcia *et al.*, 2012).

Otros mecanismos que pueden contribuir al proceso degenerativo son la neuroinflamación y la excitotoxicidad, así como aspectos metabólicos y funcionales específicos de las células dopaminérgicas (Brichta y Greengard, 2014). La dopamina es una fuente de estrés oxidativo; aunque se almacena en vesículas, el exceso de dopamina citosólica se oxida espontánea y enzimáticamente con facilidad produciendo quinonas. Estas especies son capaces de modificar diversas proteínas y pueden conducir a la inactivación del transportador de dopamina, la enzima tirosina hidroxilasa (TH) y la cadena de transporte mitocondrial. La degradación de la dopamina por la monoamino oxidasa genera H₂O₂ que puede ser convertido rápidamente a OH· en presencia de metales de transición (Hwang, 2013b). La neuromelanina es otro producto de la oxidación de la dopamina que tiene la capacidad de almacenar y liberar grandes cantidades de hierro e induce la activación de la microglia (Michel *et al.*, 2006).

En la SNpc de pacientes de EP se ha observado un daño oxidativo en el ADN y en las proteínas, así como un incremento del producto más importante de la oxidación lipídica, el 4-hidroxi-2-nonenal (Dias *et al.*, 2013). Además, la actividad de la enzima monoamino-oxidasa está aumentada en la EP lo que implica estimulación del metabolismo dopaminérgico por la acción de esta enzima y una formación excesiva de H₂O₂. Por otro lado, la actividad de la enzima NOS se encuentra incrementada estimulando la producción NO lo que exacerbaba el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial (Nikam *et al.*, 2009). La disipación del potencial de membrana de la mitocondria y la liberación de citocromo C en el citoplasma pueden activar las cascadas apoptóticas (Mizuno *et al.*, 2008).

Debido a que las neuronas dopaminérgicas son generadoras de ERO y especialmente vulnerables al estrés oxidativo, cualquier evento que desencadene estos mecanismos puede

dañar a la célula (Hwang, 2013b). La disminución del GSH inhibe la actividad del complejo I y es una de las alteraciones bioquímicas más tempranas detectadas en asociación con la EP, como demostró la observación de que la pérdida de GSH ocurre en la enfermedad de cuerpos de Lewy incidental, considerada como un antecedente asintomático de la EP (Garcia-Garcia *et al.*, 2012).

La neuroinflamación es otro de los mecanismos que puede participar en la degeneración dopaminérgica nigral. Estas células expresan receptores a algunas citocinas como TNF- α , la IL-1 β y el interferón y las cuales pueden dañar las células dopaminérgicas induciendo enzimas como la óxido nítrico sintasa, la ciclo-oxigenasa y la NADPH oxidasa que generan ERO. Además, los agregados de α -sinucleína al ser liberados de las neuronas activan la microglia; esto conduce a la activación del NF- κ B, ERO/ERN y mediadores proinflamatorios que activan a los astrocitos. Los astrocitos también liberan citocinas que amplifican la respuesta inflamatoria y promueven más activación de la microglia. Los productos combinados promueven la neurotoxicidad (Glass *et al.*, 2010). Otro factor que contribuye a la patogénesis es la excitotoxicidad cuando se exacerba la señalización de glutamato proveniente del núcleo pedúnculo pontino y el núcleo subtalámico (Fu *et al.*, 2016).

1. *Materiales.*

1.1 *Reactivos*

La BSO, el glutatión (forma reducida), los anticuerpos para la tirosina hidroxilasa (TH) y para la proteína fibrilar ácida de la glia (GFAP), el hidroperóxido de cumeno (CuOOH) procedieron de la firma Sigma (EUA). La albúmina de suero bovino, el ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB), el ácido 5-sulfosalisílico, el ácido fosfórico glacial (H_3PO_4), la sal disódica del ácido etilendiaminotetracético (EDTANa₂), el hidróxido de sodio (NaOH), el ácido tiobarbitúrico, el reactivo de folin-Ciocalteau, el carbonato de sodio, el glicerol, el Tween 20, el tritón X-100, el ácido bórico, sodio duodecil sulfato (SDS), la proteinasa K, el isopropanol, el citrato de sodio y la azida sódica (NaN₃) se adquirieron de la firma BDH, Analar (Reino Unido).

Los hidrogenofosfatos sódicos y potásicos, el NADPH, el Tris-(hidroximetil)-metilamina (Tris), el hidrato de cloral, el ácido clorhídrico fumante (37%), el cloruro de sodio (NaCl), el ácido sulfanílico, el nitrito de sodio, el N(Naftil)etilendiamino, el sulfato de cobre pentahidratado y el etanol procedieron de la Merck (Alemania). El EDTA (ácido libre), la sacarosa y la GRD de levadura fueron suministrados por la Fluka (Suiza). El glutatión oxidado GSSG procedió de la Biochimica (Alemania). El tartrato de sodio se obtuvo de ICN Biochemicals (EUA).

El trizol y el sistema comercial de la reverso transcriptasa y los anticuerpos secundarios procedieron de Invitrogen, Life Technology (EUA), los anticuerpos para la óxido nítrico sintasa (iNOS), JNK, p-JNK y GAPDH se adquirieron de Santa Cruz Biotechnology (EUA); el anticuerpo para la molécula adaptadora de unión a calcio iónico 1 (Iba-1) se obtuvo de Biocare Medical (Holanda) y los sistemas comerciales de ensayo inmunoenzimático para TNF- α , IL-6, IL-1 β e IL-10 de la firma BD Biosciences (EUA).

II. MATERIALES Y MÉTODOS

El sistema comercial del ensayo de TUNEL se obtuvo de Roche Diagnostics (Alemania). Los cebadores se sintetizaron en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB, La Habana, Cuba), y el sistema comercial para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) procedió de Thermo Scientific (EUA).

1.2 Sujetos experimentales.

Se utilizaron un total de 350 ratas machos de la línea Sprague Dawley (*Rattus norvegicus*) procedentes del Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB; Mayabeque, Cuba) con un peso corporal entre 250-300 g al comienzo del experimento. Se excluyeron del experimento animales fuera del rango de peso corporal, cambios en la coloración del pelaje, lesiones en los ojos que les dificulten la visión y atrofia marcada de alguna extremidad.

Se mantuvo el cambio de encamado dos veces por semana a razón de cinco ratas por caja. La temperatura fue de 22-24°C y la humedad relativa del 60±5%. El ciclo de luz-oscuridad fue de 12 x 12 h y el acceso al agua y a la comida libre.

1.3 Ética de la investigación.

Durante todos los procedimientos experimentales se respetaron los principios éticos establecidos para la investigación con animales, así como los requerimientos ambientales para el mantenimiento de los roedores, incluidos en los procedimientos normativos de operación del vivario del Centro Internacional de Restauración Neurológica (CIREN) (PNO: 614.3.02), y las normas establecidas según Clark y col. (Clark *et al.*, 1998) y el Consejo Canadiense para el Cuidado Animal (CCAC) (Olferd *et al.*, 1997a; Olferd *et al.*, 1997b). Todos los procederes fueron aprobados por el Consejo Científico y el Comité de Ética del CIREN.

2. Diseño experimental.

Las ratas se dividieron aleatoriamente en tres grupos experimentales:

- Grupo sano: constituido por ratas sin tratar (n=115).
- Grupo vehículo: formado por ratas a las que se les administró solución salina fisiológica vía intracerebral (n=115).
- Grupo BSO: integrado por ratas con administración de BSO (1,8 mg/Kg de peso corporal) vía intracerebral (n=120).

Para dar cumplimiento a los objetivos específicos propuestos se realizaron una serie experimentos que se resumen en la tabla 1.

Tabla I. Diseño experimental de la tesis. Se relaciona el objetivo (columna izquierda) con los experimentos realizados para darle cumplimiento (columna derecha).

Objetivo	Experimento
I	Cuantificación de la concentración de GSH total (n=10 por grupo)
II	Evaluación de la conducta motora (n=45 por grupo). Evaluación de la expresión del ARNm de los receptores dopaminérgicos tipo D ₁ y D ₂ en la SNpc y el EST y de genes relacionados con la plasticidad cerebral (factor neurotrófico derivado del cerebro (<i>bdnf</i>) y proteína asociada al citoesqueleto con actividad regulada (<i>arc</i>)) (n=5 por grupo).
III	Evaluación histoquímica e inmunohistoquímica de la SNpc (n=5 por grupo).
IV	Determinación de la actividad de las enzimas GPX, GRD y CAT (n=10 por grupo). Determinación de la concentración de productos de peroxidación lipídica (n=10 por grupo) y óxido nítrico (n=10 por grupo).
V	Detección inmunohistoquímica de los marcadores gliales GFAP e iba-1 (n=5 por grupo). Determinación de la concentración de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias (n=10 por grupo). Determinación de la activación de proteínas relacionadas con la apoptosis (n=5 por grupo).

3. Administración de *L*-butionina sulfoximina

Las ratas correspondientes al grupo BSO fueron anestesiadas con hidrato de cloral (420 mg/kg de peso corporal, intraperitoneal) y colocadas en el marco de cirugía estereotáctica para roedores (David Kopf, EUA). Se realizó una incisión para exponer el punto Bregma del cráneo, a partir del cual se establecieron las coordenadas (mm) correspondientes a la SNpc (Paxinos y Watson, 1986): anteroposterior -4,90; mediolateral +1,70 y dorsoventral -8,10. En estas coordenadas se abrió un orificio en el cráneo utilizando un taladro y se introdujo la aguja de una jeringuilla Hamilton de 10 µL. Se inyectaron 4 µL de BSO a una velocidad de 1 µL/min. Una

vez concluida la inyección, la aguja se mantuvo 5 min en el lugar antes de ser retirada para evitar el reflujo. Posteriormente se suturó la incisión. El grupo vehículo se sometió al mismo procedimiento, pero se usó solución salina fisiológica en lugar de BSO. La lesión mecánica fue comprobada mediante la tinción de violeta de cresilo como se describe más adelante.

4. Evaluación conductual

4.1 Conducta exploratoria espontánea.

La actividad exploratoria se evaluó a partir de la conducta de las ratas frente a un ambiente novedoso 7 días después de la administración de BSO. Los sujetos experimentales ($n=15$ por grupo) fueron colocados en una caja cuadrada grande (100 cm de ancho, 100 cm de largo y 100 cm de alto) de madera cuyo piso está dividido en 9 cuadrículas dibujadas por líneas blancas, donde se pueden identificar zonas laterales, centrales y esquinas (Fig. 3). Durante todo el experimento la caja de evaluación se mantuvo bajo una iluminación indirecta con bombillas de 60 W. La información temporo-espacial sobre la ejecución de la rata fue procesada mediante el programa Spontaneous Motor Activity Recording Tracking (SMART, por sus siglas en inglés, versión 2.0, Copyright Panlab, España, 2001) cuyo flujo de salida registró las variables de interés.

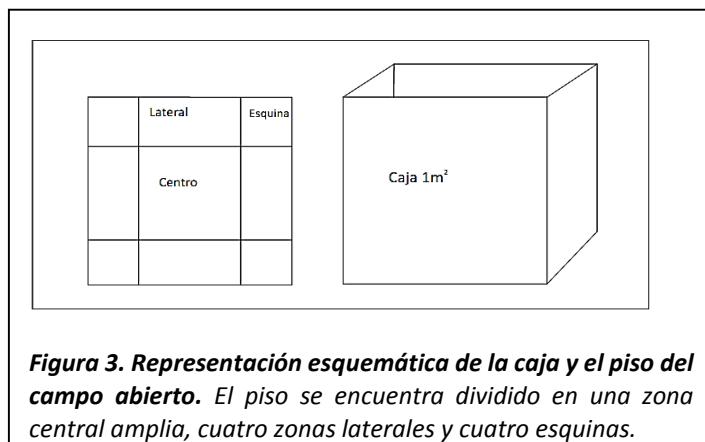
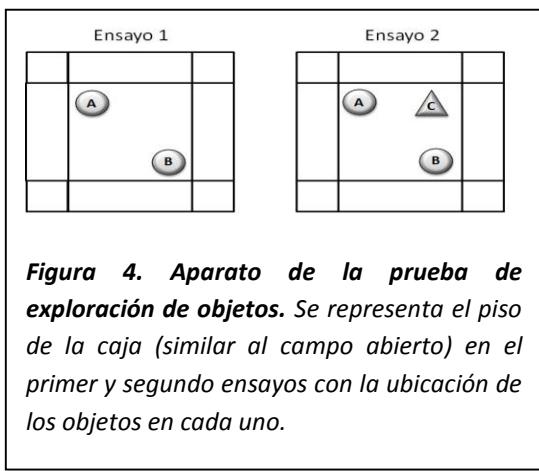


Figura 3. Representación esquemática de la caja y el piso del campo abierto. El piso se encuentra dividido en una zona central amplia, cuatro zonas laterales y cuatro esquinas.

La evaluación de cada animal se realizó en una única prueba de exploración en campo abierto (*Open Field* en inglés) de 5 min de duración. Las ratas fueron colocadas en el centro del campo, sin ningún objeto

adicional, y se cuantificó la distancia recorrida y el tiempo de reposo (definido como el tiempo en el que el sujeto se mueve a una velocidad inferior a 2,50 cm/s). Adicionalmente, se cuantificó por observación directa la cantidad de veces que el animal se elevó sobre las extremidades posteriores, lo cual se definió como actividad vertical.

4.2 Exploración de objetos



La prueba de exploración de objetos se realizó a los 7 días posteriores al procedimiento quirúrgico. Las ratas fueron colocadas en una caja similar a la utilizada para la prueba de conducta de exploración espontánea pero de dimensiones 50 x 50 x 60cm (largo x ancho x alto). Se realizaron dos ensayos en un único día de evaluación, con un

tiempo de espera de 1 hora entre cada ensayo. En el primer ensayo se colocaron dos objetos idénticos (objetos A y B) en las esquinas opuestas por la diagonal del cuadrante central mientras que en el segundo ensayo se adicionó un tercer objeto (objeto C) diferente a los dos primeros (Fig. 4). La rata se colocó en el centro de la caja, se le permitió la libre exploración durante 5 min y se contabilizó manualmente la cantidad de visitas realizadas a cada objeto (contacto con el hocico o las patas delanteras). Además, se calculó el índice de discriminación (ID) en el segundo ensayo según: $ID = \text{número de visitas al objeto C} / \text{número total de visitas (A+B+C)}$.

4.3 Prueba de la escalera.

Para la evaluación de las habilidades motoras de las extremidades anteriores se utilizó la prueba de la escalera, descrita previamente por Montoya y colaboradores (Montoya *et al.*, 1991).

Caja experimental

En la evaluación de la conducta motora en los animales de experimentación, se emplearon cajas de acrílico transparente (3 mm de espesor) de 28 cm de largo, 6,60 cm de ancho y 6,80 cm de altura (fabricadas en el Taller de Prototipo, CIREN). Aproximadamente los dos tercios anteriores de la caja, están ocupados por una plataforma central de 4,70 cm de alto y 2,90 cm de ancho, con espacios a ambos lados para insertar una escalerilla móvil de seis escalones en cada uno de los extremos. Cada escalón y el nivel inferior (piso de la caja) poseen una pequeña concavidad, donde se situaron dos trozos de alimento con sabor diferente al que normalmente ingieren. La base del extremo posterior de la caja posee una abertura que posibilita el acceso de la rata al compartimiento interior (Fig. 5).

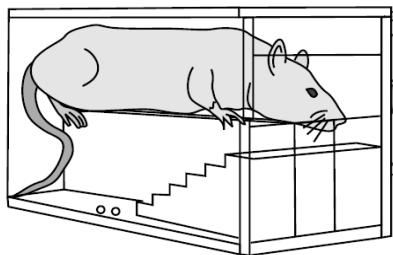


Figura 5. Representación esquemática del aparato de la prueba de habilidades motoras anteriores de Montoya y posición de la rata dentro de este.

Seis días antes de la realización de esta prueba las ratas se sometieron a un régimen de alimentación restringida (10-12 g de alimento diario por animal). Tres días después de comenzado este, los sujetos se colocaron dentro de las cajas experimentales una vez por día durante 15 min; con el propósito de que se familiarizaran con las condiciones experimentales.

Una vez comenzadas las sesiones experimentales las ratas fueron introducidas en las cajas de prueba, una vez al día, durante 15 min por 5 días consecutivos antes y 6 días después de la administración de la BSO. Al final de cada sesión se contaron los trozos de alimentos que fueron comidos, de cada lado (derecho e izquierdo) de manera independiente y se registró el nivel alcanzado definido como el escalón más bajo en el que alcanzaron el alimento.

4.4 Prueba de estimulación táctil bilateral

La prueba de estimulación táctil bilateral fue utilizada como una medida de la asimetría en el uso de las extremidades anteriores (Schallert y Whishaw, 1984). Esta prueba mide la sensibilidad del animal frente a un estímulo táctil que se aplica en la región distal de las extremidades anteriores (Rose *et al.*, 1987).

Como estímulo fueron utilizados parches pequeños con forma cuadrada de un material adhesivo (de 1 cm² aproximadamente) que se colocaron en el extremo distal radial de ambas extremidades anteriores. Una vez colocado el material adhesivo las ratas fueron retornadas a sus cajas habituales y se registró la extremidad por la que comenzaron la exploración; así como, el tiempo que demoraron en retirarse los pequeños parches (Barth *et al.*, 1990). Se realizaron dos ensayos 7 días después de la administración de BSO.

4.5 Prueba de la barra transversal.

La discapacidad motora que presentaron las ratas fue evaluada mediante la realización de la prueba de la barra transversal (Strome *et al.*, 2006; Allbutt y Henderson, 2007). En esta prueba se incrementó paulatinamente la dificultad de la tarea motora que ejecutaron los sujetos experimentales mediante la utilización de barras de sección transversal rectangular y circular de 60 cm de longitud que se colocaron en el siguiente orden: barra rectangular grande (2,50

cm de ancho), barra circular grande (2,50 cm de diámetro), barra rectangular pequeña (1 cm de ancho) y barra circular pequeña (1 cm de diámetro).

El estudio se realizó en dos días consecutivos, dos ensayos cada día por cada barra. La información temporo-espacial sobre la ejecución del animal fue procesada mediante el programa SMART (versión 2,0, Copyright Panlab, España, 2001) cuyo flujo de salida registró las variables de interés. La rata fue colocada en el punto medio de la barra que une dos plataformas de escape a una altura de 60 cm de una superficie de apoyo (Fig. 6) y se le permitió dirigirse libremente a cualquiera de las plataformas.

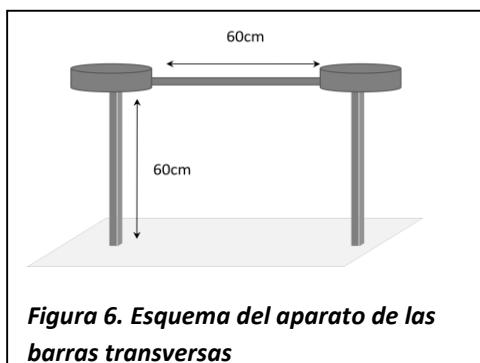


Figura 6. Esquema del aparato de las barras transversas

Cada ensayo tuvo una duración de 60 s y el sistema automatizado cuantificó la distancia recorrida como variable de interés. El sistema se detuvo automáticamente cuando: la rata alcanzó una de las dos plataformas o cuando pasados los 60 s del ensayo

la rata no alcanzó ninguna de las dos plataformas. Si durante el transcurso de los 60 s del ensayo la rata cayó de la barra se detuvo manualmente el conteo de tiempo y con ello finalizó el ensayo. Adicionalmente se evaluó la ejecución cualitativa de la prueba teniendo en cuenta si:

- el animal llegó a la plataforma (éxito de la prueba)
- el animal caminó los 60 s del ensayo en la barra sin llegar a la plataforma
- el animal estuvo los 60 s del ensayo sin moverse
- el animal cayó de la barra.

5. Estudio morfológico

Las ratas fueron anestesiadas (hidrato de cloral 7%, 420 mg/kg de peso corporal, i.p.) y perfundidas transcardiacamente con 500 mL de NaCl 0,90% y 500 mL de una solución fijadora consistente en paraformaldehído 4%. Los cerebros fueron extraídos y conservados en la solución fijadora por 24 h, lavados con fosfato de sodio 0,10 mol/L pH 7,4, crioprotegidos en sacarosa 7, 15 y 30% (24 h a cada concentración) y congelados en nitrógeno líquido. Se obtuvieron secciones coronales seriadas (100 µm entre cada una) de la SNpc (Fig. 7) y el EST de 20 µm de espesor (criostato Leitz, Wetzlar, Alemania) y se colocaron sobre láminas portaobjetos recubiertas con gelatina.

Las secciones se tiñeron con violeta de cresilo (tinción de Nissl), y alternadamente, se sometieron al procedimiento para la detección inmunohistoquímica de TH, iNOS, Iba-1 y GFAP. La violeta de cresilo tiñe los ácidos nucleicos y las cisternas del retículo endoplasmático rugoso, que son abundantes en las zonas somatodendríticas de las neuronas. Por su parte, TH es un marcador de células dopaminérgicas, Iba-1 es un marcador de microglia activa y la GFAP es un marcador de astrocitos reactivos (Peter, 1987).

Las secciones histológicas para la visualización de las células inmunoreactivas fueron colocadas en tampón fosfato de sodio (PBS) durante 30 min. A continuación, se incubaron durante 30 min con solución de permeabilización (PBS+ Tween 20 0,2%) y seguidamente se procedió al bloqueo con BSA 1% durante 1 hora. Luego se recubrieron con el anticuerpo polyclonal anti-GFAP 1:250 + monoclonal anti-TH 1:500, anti-Iba-1 1:500 y anti-iNOS 1:250 durante 24h, respectivamente. El revelado se realizó utilizando anticuerpos conjugados con rodamina o fluoresceína 1:100 durante 1h. Cada paso de incubación fue seguido de tres lavados con PBS

durante 10 min. Las secciones fueron montadas con Vectashield/DAPI para visualizar los núcleos celulares y observadas al microscopio de fluorescencia (Olympus, Tokyo, Japón).

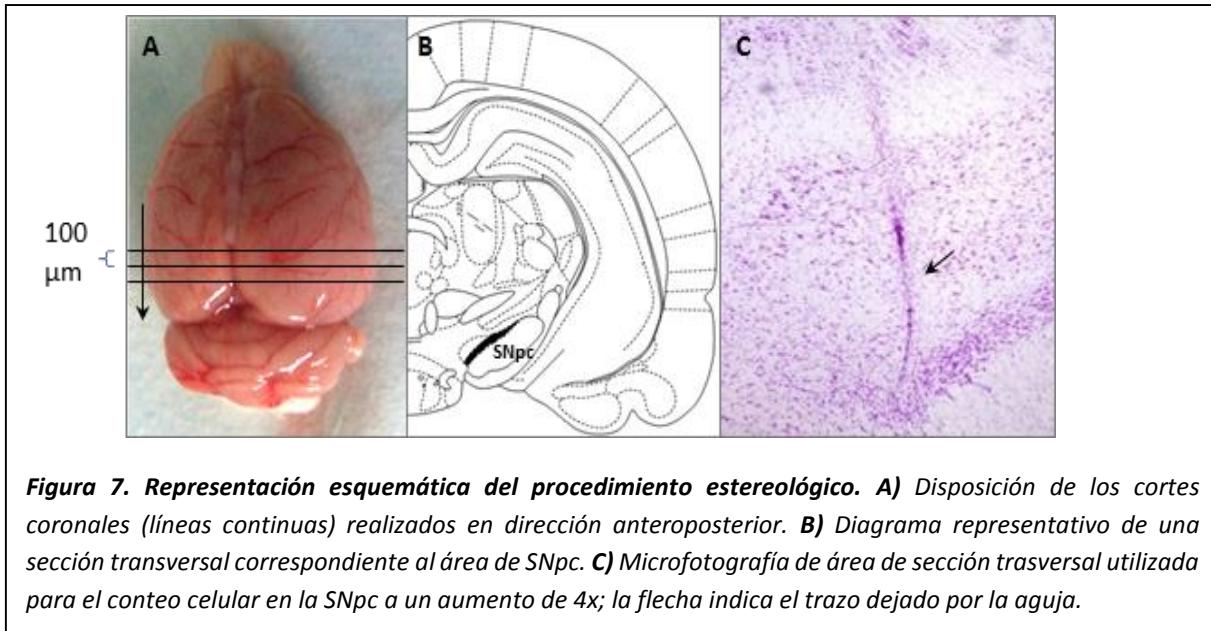


Figura 7. Representación esquemática del procedimiento estereológico. A) Disposición de los cortes coronales (líneas continuas) realizados en dirección anteroposterior. B) Diagrama representativo de una sección transversal correspondiente al área de SNpc. C) Microfotografía de área de sección trasversal utilizada para el conteo celular en la SNpc a un aumento de 4x; la flecha indica el trazo dejado por la aguja.

Se estimó el número de células dopaminérgicas, astrocitos, microglia y células positivas a iNOS en la SNpc usando el software Image J con un aumento de 20x. Se calculó la densidad celular ($\text{Densidad celular} = \text{Número total de células}/\text{Área de sección transversal } (\mu\text{m}^2)$) y el resultado se expresó como porcentaje respecto a los animales sanos. Sólo se contaron aquellas células en las que coincidió el marcaje nuclear (DAPI) con el citosólico (resto de los marcadores).

El ensayo de muerte celular con TUNEL (del inglés *transferase-mediated dUTP nick end labeling*) que determina fragmentación del ADN, se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las secciones histológicas fueron lavadas con PBS durante 15 min, incubadas con proteinasa K (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), permeabilizada con tritón X-100/citrato de sodio 0,1% e incubada con la mezcla de reacción de TUNEL durante 60min a 37°C. Cada paso fue seguido de tres

lavados con PBS durante 10 min cada uno. Finalmente, las secciones fueron contrateñidas con yoduro de propidio (YP) (20 μ g/mL).

6. Estudios bioquímicos y moleculares.

6.1 Obtención de muestras biológicas.

A las 24 horas y los 7 días posteriores a la cirugía, los animales fueron decapitados bajo sedación profunda con hidrato de cloral (840 mg/kg. de peso corporal, intraperitoneal) y los cerebros extraídos y lavados con solución salina fisiológica fría. Posteriormente se realizó la disección de las áreas cerebrales de interés (SNpc y EST) en ambos hemisferios según (Nissbrandt y Carlsson, 1987). Los tejidos se congelaron en nitrógeno líquido y se conservaron a -70°C hasta la realización de los análisis bioquímicos.

6.2 Cuantificación de glutatión total.

La fracción citosólica libre de proteínas se obtuvo mediante la homogenización del tejido en 500 μ L de ácido sulfosalísílico al 5% en un homogenizador Potter de Bioblock Scientific mediante 21 golpes a 1 000 rpm en baño de hielo. El homogenado resultante se centrifugó a 8160 g a 4°C durante 10 min y se extrajo el sobrenadante. El precipitado obtenido se incubó toda la noche a temperatura ambiente con 500 μ L de NaOH 1N y se resuspendió mediante vibroagitación durante varios minutos para la cuantificación de proteínas.

La concentración de GSH se cuantificó por el método de reciclaje enzimático de Tietze (Azbill *et al.*, 1997). En el ensayo se incubaron 50 μ L de solución estándar de GSH 1,20 mmol·L⁻¹, blanco ó muestra, en baño de agua durante 25 min a 37°C en 400 μ L de fosfato de sodio 143 mmol/L/EDTA 6,30 mmol·L⁻¹/NADPH 0,24 mmol·L⁻¹/DTNB 0,67 mmol·L⁻¹ a pH 7,50. Esta mezcla se añadió en la cubeta junto con 50 μ L de GRD 1U/mL. Se registró el aumento de la absorbancia

II. MATERIALES Y MÉTODOS

en un espectrofotómetro (Shimadzu, Japón) a 412 nm cada 3s durante 1 min. Se obtuvieron valores por duplicado.

La concentración de GSH se calculó según la expresión:

$$[GSH] = \frac{(\Delta D\text{O}/\Delta t)_{std} \cdot P}{(\Delta D\text{O}/\Delta t)_m \cdot [STD] \cdot V_h \cdot 1000}$$

Donde:

[GSH]: concentración de GSH expresado en nmol/mg proteínas;

[STD]: concentración del estándar de GSH (mM);

V_h: volumen de homogenización;

P: cantidad en mg de proteínas del tejido;

(ΔD_O/Δt)_m: variaciones de absorbancia promedio en la muestra (m) y el estándar (std).

6.3 *Ensayos de actividad enzimática de la glutatión peroxidasa y la glutatión reductasa.*

La fracción citosólica se obtuvo mediante la homogenización de las áreas cerebrales con 1 mL de solución Tris 50 mmol·L⁻¹/EDTA 0,10 mmol/L mmol·L⁻¹ a pH 7,60 en un homogenizador Potter de Bioblock Scientific mediante 30 golpes (con intervalos de 1 min cada 10 golpes) a 1 000 rpm en baño de hielo. La muestra resultante se centrifugó durante 15 min a 16 000 g a 4°C, se extrajo el sobrenadante y se congeló a -20°C hasta su procesamiento.

La actividad de la GPx se determinó mediante la cuantificación de la velocidad de oxidación del GSH por el hidroperóxido de cumeno (CuOOH), que es proporcional a la generación de GSSG, al consumo de este por la GRD presente en la mezcla de reacción y al consumo del NADPH

II. MATERIALES Y MÉTODOS

(Flohe y Gunzler, 1984). La actividad de la GRD fue determinada siguiendo el consumo de NADPH por la reacción de regeneración del GSH (Carlberg y Mannervik, 1975). Las especificaciones de cada ensayo se detallan en la tabla 1.

Cálculos:

$$AE = \frac{(\Delta DO / \Delta t) \cdot V_f}{V_e \cdot k \cdot P \cdot b} \times 10^3$$

Donde:

AE: Actividad específica ($\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$);

$\Delta DO / \Delta t$: Diferencia de las variaciones de la absorbancia en el tiempo entre la muestra y el blanco (min^{-1});

V_f : Volumen final en la cubeta (mL);

V_e : Volumen de muestra (mL);

k: Coeficiente de extinción ($\text{L mmol}^{-1} \text{cm}^{-1}$);

P: Concentración de proteína (mg mL^{-1});

b = 1.0 cm: ancho de la cubeta (cm).

Tabla II. Especificaciones técnicas de los ensayos de actividad enzimática de la GPx y la GRD por espectrofotometría. Se especifica el contenido de la mezcla de reacción en la cubeta, longitudes de onda, tiempo de ensayo, temperatura y coeficiente de extinción del NADPH.

Enzima	GPx	GRD
Mezcla de reacción	480 µL Solución X * 60 µL muestra o blanco** Incubación durante 5 min. 60 µL CuOOH 10 mmol L ⁻¹	480 µL NADPH 125 µmol L ⁻¹ 60 µL muestra o blanco** 60 µL GSSG*** 10 mmol L ⁻¹
λ (nm)	340	340
tiempo (s)	150	50
T (°C)	25	25
K (L mmol ⁻¹ cm ⁻¹)	$k_{NADPH} = 6,22$	$k_{NADPH} = 6,22$
Referencia.	(Flohe y Gunzler, 1984)	(Carlberg y Mannervik, 1975)

*Solución X: Fosfato de sodio 0,1 mol·L⁻¹ / GSH 125 µmol·L⁻¹ / NADPH 187,5 mmol·L⁻¹ /
GRD 0,3 U·ml⁻¹ / EDTA Na₂ 1 mmol·L⁻¹ / NaN₃ 2 mmol·L⁻¹.

** Blanco: Tris 50 mmol·L⁻¹ / EDTA 0,1 mmol·L⁻¹ pH 7,60

*** GSSG: glutatión oxidado

6.4 Ensayo de la actividad enzimática de la catalasa

Las áreas cerebrales se homogenizaron con solución Tris 1 mol·L⁻¹/ sacarosa 0,25 mol·L⁻¹ a pH 7,40 en una relación peso:volumen de 1:5 en un homogenizador Potter de Bioblock Scientific, mediante 21 golpes a 1000 rpm en baño de hielo. La muestra resultante se centrifugó durante 15 min a 16 000 g a 4°C, se extrajo el sobrenadante y se congeló a -20°C hasta su procesamiento.

La actividad de la CAT se determinó siguiendo la descomposición del H₂O₂ espectrofotométricamente según Aebi (Aebi, 1984). En el ensayo se utilizó un tampón fosfato (KH₂PO₄ 0,12 mol·L⁻¹/ K₂HPO₄ 0,12 mol·L⁻¹) a pH 7,40 y como solución sustrato, H₂O₂ a una concentración de 13 mmol·L⁻¹ en tampón fosfato.

En el ensayo se añadieron en la cubeta 375 µL de tampón fosfato, 204 µL de solución sustrato y 21 µL de homogenizado, se agitó y se midieron los valores de absorbancia a 240 nm cada 2 s

durante 1 min. La reacción se llevó a cabo en una celda con temperatura estabilizada a 37⁰C.

Se obtuvieron valores de absorbancia por duplicado.

Se consideró una unidad de actividad enzimática como la cantidad de enzima necesaria para transformar un μmol de H₂O₂ en un min a 37⁰C. Para determinar la actividad enzimática en unidades de la muestra se utilizó la siguiente ecuación:

$$AE = \frac{(\Delta DO/\Delta t) V_f}{V_e \cdot k \cdot b}$$

Donde:

AE= Actividad enzimática mmol·L⁻¹·s⁻¹;

$\Delta DO/\Delta t$: variación de la absorbancia a 240 nm en el tiempo;

Vf: volumen final de la mezcla de reacción;

Ve: volumen de la muestra;

k: coeficiente de extinción del H₂O₂ a 240 nm (0,0394 L·mmol⁻¹·cm⁻¹);

b: ancho de la cubeta (cm).

6.1 *Cuantificación de productos de reacción del ácido tiobarbitúrico*

La cuantificación de productos de reacción del ácido tiobarbitúrico (TBARS) como estimación de la peroxidación lipídica se basó en la capacidad del malonildialdehído de reaccionar con el ácido tiobarbitúrico (TBA) (Buege y Aust, 1978). El homogenado se obtuvo en condiciones similares al ensayo de CAT. En el ensayo se mezclaron mediante vibroagitación 200 μL de muestra con 400 μL de solución reactivo TBA 0,67% en una solución de HCl 0,20 mol·L⁻¹. Posteriormente, la mezcla se incubó durante 15 min en baño de agua a 100⁰C y se centrifugó a 2448 g durante 10 min. Se leyó la absorbancia del sobrenadante (200 μL de muestra con 400

II. MATERIALES Y MÉTODOS

μL de reactivo) contra el blanco (200 μL de H_2O con 400 μL de reactivo) a 535 nm en un espectrofotómetro (Shimadzu, Japón). La concentración de TBARS se calculó a partir de una curva de calibración con soluciones de malonildialdehído a concentraciones de 25; 12,5; 6,26; 3,125 y 1,56 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

6.2 Cuantificación de óxido nítrico

Las muestras de tejido fueron homogenizadas en un homogenizador Potter de Bioblock Scientific con ácido tricloroacético 10% en una relación peso: volumen 1:5 (mg: μL) mediante 21 golpes a 1 000 rpm en baño de hielo, seguido de centrifugación a 10 000 g durante 20min. Se empleó el método colorimétrico de Griess para la determinación de nitritos descrito previamente (Sun *et al.*, 2003). En cada pozo de una placa de 96 pocillos se mezclaron 50 μL de sobrenadante con 50 μL de ácido sulfanílico 1% (diluido en ácido fosfórico al 5%) y se incubó en la oscuridad durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadieron 50 μL de N-(naftil)etilendiamino 0,1% (diluido en ácido fosfórico al 2%) y se incubó en similares condiciones. Finalmente, se obtuvieron por duplicado los valores de absorbancia a 570nm en un lector ELISA Elx800uv (Bioteck Instruments, EUA). La concentración de NO fue calculada a partir de una curva estándar de NaNO_2 a concentraciones de 100; 50; 25; 12,5; 6,26; 3,125 y 1,56 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

6.3 Cuantificación de proteínas totales.

La concentración de proteínas totales fue determinada por el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Se mezclaron 100 μL muestra con 300 μL de una solución de ácido tartárico 8,50 mM/ Na_2CO_3 56,60 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ / NaOH 0,10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ / $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,04% y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. Luego se añadieron 30 μL de reactivo Folin-Ciocalteu (diluido 1:2) y

II. MATERIALES Y MÉTODOS

se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. Finalmente, se obtuvieron por duplicado los valores de absorbancia a 630 nm en un lector ELISA Elx800uv (Bioteck Instruments, EUA) y se calculó la concentración de proteínas a partir de una curva patrón de albúmina de suero bovino a concentraciones de 200, 180, 140, 100, 60 y 20 µg/mL.

6.4 Extracción de ARN y proteínas con trizol.

El tejido utilizado para la cuantificación de citocinas y RT-PCR fue homogenizado en un homogenizador Potter de Bioblock Scientific con 1 mL de trizol mediante 25 golpes por minuto a 650 rpm. Las muestras se mantuvieron en reposo durante 15min a 4°C y posteriormente se adicionaron 0,20 mL de cloroformo, se agitaron en vibroagitador durante 15 s y se dejaron en reposo de 3-5 min a temperatura ambiente. Luego se procedió a la separación de fases mediante centrifugación a 12 000 rpm durante 15 min a 4°C. La fase superior se extrajo para la posterior obtención del ARN mientras que de la fase inferior se obtuvieron las proteínas.

A la fase superior se le adicionó 0,50 mL de isopropanol, se incubó a temperatura ambiente durante 15 min y centrifugó a 12 000 rpm durante 10 min a 4°C. Se desechó el sobrenadante y se procedió a lavar dos veces con 1 mL de etanol al 75% preparado con H₂O calidad biología molecular. En cada caso se agitó con vibroagitador y se centrifugó a 7 500 rpm durante 5 min a 4°C. Se desechó el sobrenadante y el sedimento con el ARN se secó en baño de María a 55-65°C y posteriormente se resuspendió en 150 µL de H₂O y se determinó la concentración en un espectrofotómetro Eppendorf (Alemania).

A la fase inferior se le adicionaron 300 µL de etanol absoluto, se mezcló por inversión y se incubó durante 3 min a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a 2000 rpm durante 5 min a 4°C. Se tomó el sobrenadante y se adicionaron 500 µL de isopropanol, se

II. MATERIALES Y MÉTODOS

incubó a temperatura ambiente durante 10 min y sedimentaron las proteínas a 12 000 rpm durante 10 min a 4°C. Se desechó el sobrenadante y se procedió a tres lavados con 1mL de tiocianato de guanidina 0,30 mol·L⁻¹ preparado con etanol al 95%, incubación a temperatura ambiente durante 20 min y centrifugación a 7 500 rpm durante 5 min a 4°C y un lavado final en similares condiciones con etanol absoluto. Finalmente se desechó el sobrenadante, se secó el sedimento en baño de María a 55°C y se resuspendió en 150 µL de SDS al 1%.

6.5 Cuantificación de citocinas

La concentración de TNF-α, IL-6, IL-1β e IL-10 fue estimada en una alícuota de 50 µg/mL por el método de ELISA (del inglés *enzyme-linked immunosorbent assay*) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los micropozos fueron recubiertos con el anticuerpo de captura específico para cada citocina durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, se aspiró y lavó tres veces con PBS/Tween-20 0,05%. Luego se procedió a bloquear con suero bovino fetal en PBS al 10% durante 1 h a temperatura ambiente seguido de dos lavados en similares condiciones. Seguidamente se añadieron 100 µL de muestra, estándar o blanco y se incubó durante 2 h a temperatura ambiente, se realizaron cinco lavados y se añadieron 100 µL del anticuerpo de detección biotinilado, el cual fue incubado durante 1h a temperatura ambiente. Después de cinco lavados, se añadieron 100 µL de estreptavidina conjugada a peroxidasa de rábano, la cual fue incubada durante 30 min a temperatura ambiente, seguido de siete lavados. Finalmente se añadieron 100 µL de solución sustrato consistente en tretrametilbenzidina y H₂O₂; la reacción se detuvo a los 30 min con H₂SO₄ 2N y se determinó la absorbancia a 450 y 570 nm. La diferencia de absorbancia fue empleada para el cálculo de concentraciones a partir de la curva patrón de cada citocina.

6.6 Análisis de western blot

Las muestras se homogenizaron con 150 µL de una solución de lisis que contenía NaCl 137 mmol·L⁻¹/ Tris-HCl 20 mmol·L⁻¹/ Nonidet P-40 1%, glicerol 10%/ aprotinina 10 µg/ml / leupeptina 1µg/ml / vanadato de sodio 0,5 mmol·L⁻¹ / fenil-metil-sulfonil fluoruro 1 mmol·L⁻¹. Las proteínas (50 µg) fueron separadas por electroforesis en un gel de SDS-poliacrilamida al 10% durante 2 horas. Posteriormente, las proteínas fueron transferidas a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF). La membrana fue bloqueada con leche descremada al 2% en PBS-Tritón 0,20% durante 6 horas a temperatura ambiente para prevenir uniones inespecíficas. Posterior al bloqueo, la membrana fue incubada por separado durante toda la noche en agitación a 4⁰C con los anticuerpos para la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) producido en conejo y JNK total y fosforilada (p-JNK) producido en ratón, diluidos 1:500. La membrana fue lavada cinco veces con PBS-Tritón 0,20% seguido de incubación durante dos horas a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano a una dilución 1:1000. Finalmente, las bandas fueron visualizadas por quimioluminiscencia en una película de rayos X y cuantificadas por análisis densitométrico con el software ImageJ.

6.7 RT-PCR y electroforesis en gel de agarosa.

El ADN se obtuvo a partir de la transcripción reversa de 200 ng ARN total usando la mezcla de reacción para síntesis de ADN SuperScriptTM II RT a un volumen final de 20µL. La reacción tuvo lugar a una temperatura de 42⁰C durante 60 min seguido de inactivación por calor a 70⁰C durante 10 min. El producto de ADN complementario (1 µL) fue sometido a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de punto final usando los cebadores para los genes de interés

II. MATERIALES Y MÉTODOS

descritos en la Tabla III. El protocolo de PCR comprendió una desnaturación inicial a 95°C durante 3 min. La amplificación comprendió 35 ciclos que consistieron en: desnaturación a 95°C durante 30 s, hibridación a temperatura de fusión (Tf)-5 °C durante 30s y elongación a 72°C durante 30s. La elongación final se realizó a 72°C durante 5 min.

Tabla III. Secuencias de cebadores utilizados para el estudio de expresión de genes.

Gen	Secuencia 5'-3'	Tamaño (pb)	Tf (°C)
<i>d1</i>	CGC GTA GAC TCT GAG ATT CTG AAT T	77	66,7
	GAG TTA AGG AGC CAC CAC ATC AGT		68
<i>d2</i>	GTC CTC TAC AGC GCC TTC AC	180	68,2
	ATG AGG TCT GGC CTG CAT AG		66,5
<i>arc</i>	AGG AGA GCT GCC TGA GCA GG	472	63,4
	TGC TCC AGG GTC TTG GGG AGT		64,9
<i>bdnf</i>	TTG GCC TAC CCA GCT GTG CGG AC	130	66,7
	CTC TTC GAT CAC GTG CTC AAA AGT		57,4
<i>tnf-a</i>	ATG TGG AAC TGG CAG AGG AG	200	59,4
	GGC CAT GGA ACT GAT GAG AG		58,0
<i>il-16</i>	CTG GTA CAT CAG CAC CTC TCA A	176	59,8
	GAG ACT GCC CAT TCT CGA CAA		60,0
<i>il-6</i>	ATG TTG TTG ACA GCC ACT GC	199	59,3
	ACA GTG CAT CAT CGC TGT TC		58,9
<i>gapdh</i>	ACA GCA ACA GGG TGG TGG AC	252	68,2
	TTT GAG GGT GCA GCGA ACT T		64,8

El producto de PCR fue separado por electroforesis en gel de agarosa 2% (preparado en tampón de corrida Tris 0,44 mol·L⁻¹/ H₃BO₃ 0,44 mol·L⁻¹/ EDTA 0,50 mol·L⁻¹, pH 8), utilizando un patrón de peso molecular de 50 pares de bases. La electroforesis se realizó a un voltaje de 120 V/cm. El ADN fue teñido con bromuro de etidio (10 mg/mL) y visualizado con luz ultravioleta. El análisis densitométrico se realizó utilizando el software Image J para determinar

la expresión del ARNm de los genes de interés relativo al ARNm de la gliceraldehído- 3- fosfato deshidrogenasa (*gapdh*).

7. *Procesamiento de los datos y análisis estadístico.*

Los datos se muestran en gráficos confeccionadas al efecto utilizando el programa GraphPad Prism 5,0. El procesamiento de los datos de estrés oxidativo se realizó utilizando el programa de cálculo Origin 7,0. El análisis estadístico se realizó por medio del programa Statistic (Versión 8,0), Window7. Primero se verificó la distribución normal y la homogeneidad de varianza de los datos mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y de Levene, respectivamente. Para determinar la existencia de diferencias significativas entre todos los grupos se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Las variables que no cumplieron las premisas del ANOVA fueron analizadas mediante la prueba no paramétrica de comparación de grupos independientes de Kruskall-Wallis. El nivel de significación para las variables evaluadas fue de $p \leq 0,05$.

1. Concentración de glutatión total.

La administración de BSO directamente en la SNpc empleando la cirugía estereotáctica permitió obtener un estado transitorio de baja concentración tisular de GSH en el 100% de los sujetos experimentales analizados. El efecto bioquímico de la BSO se comprobó a las 24 horas posteriores a su administración tanto en la SNpc como en el EST teniendo en cuenta la relación anatómica entre ambos núcleos.

En la SNpc, el tratamiento con BSO provocó una disminución del 60% de la concentración de GSH a las 24h (Fig. 8A), la cual fue estadísticamente significativa comparado con los grupos vehículo y sano, respectivamente ($F_{(2, 23)}=23,2$; $p<0,001$). En el EST, se encontró una disminución de la concentración de GSH del 47% a las 24 horas, que alcanzó significación estadística con relación a los grupos controles ($F_{(2, 23)}=10,21$; $p<0,001$) (Fig. 8B).

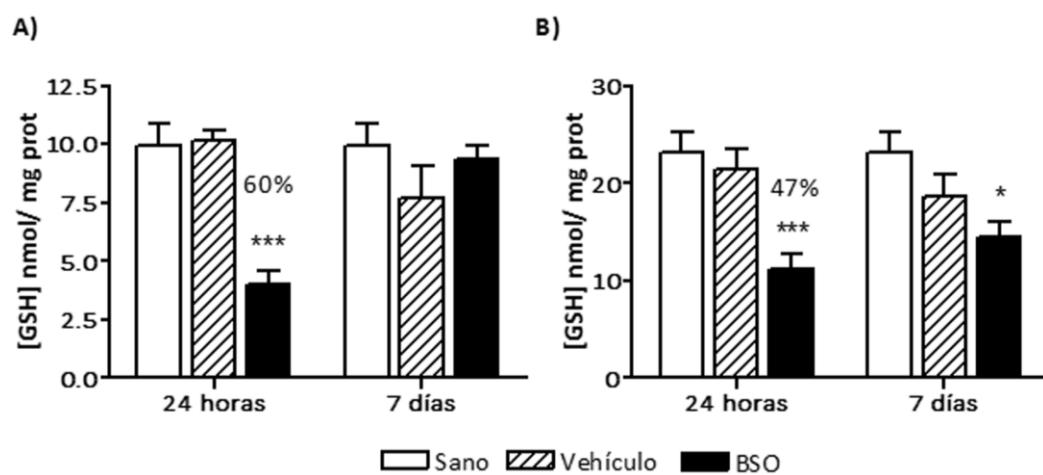


Figura 8. Concentración de glutatión total (nmol/mg proteínas) a las 24h y 7 días post-lesión. A) substantia nigra compacta B: estriado. Se muestra la media ± EEM de la concentración de glutatión (GSH) en los grupos sano, vehículo y BSO ($n=9$ en cada grupo experimental), así como los resultados del ANOVA y la prueba de Tukey. (**p<0,001); (*p<0,05).

Adicionalmente, se determinó la concentración de GSH a los 7 días posteriores a la lesión para comprobar el carácter transitorio de la misma. En la SNpc, la concentración de GSH se restableció y no se encontraron diferencias significativas entre los grupos estudiados ($F_{(2,24)}=1,39$; $p>0,05$) (Fig. 8A). En el EST, la concentración de GSH mostró una tendencia a la disminución aunque esta no fue estadísticamente significativa con respecto al grupo vehículo pero si con respecto al grupo sano ($F_{(2,21)}=4,4$; $p<0,05$) (Fig. 8B). En ningún caso se encontraron diferencias significativas entre los grupos vehículo y sano.

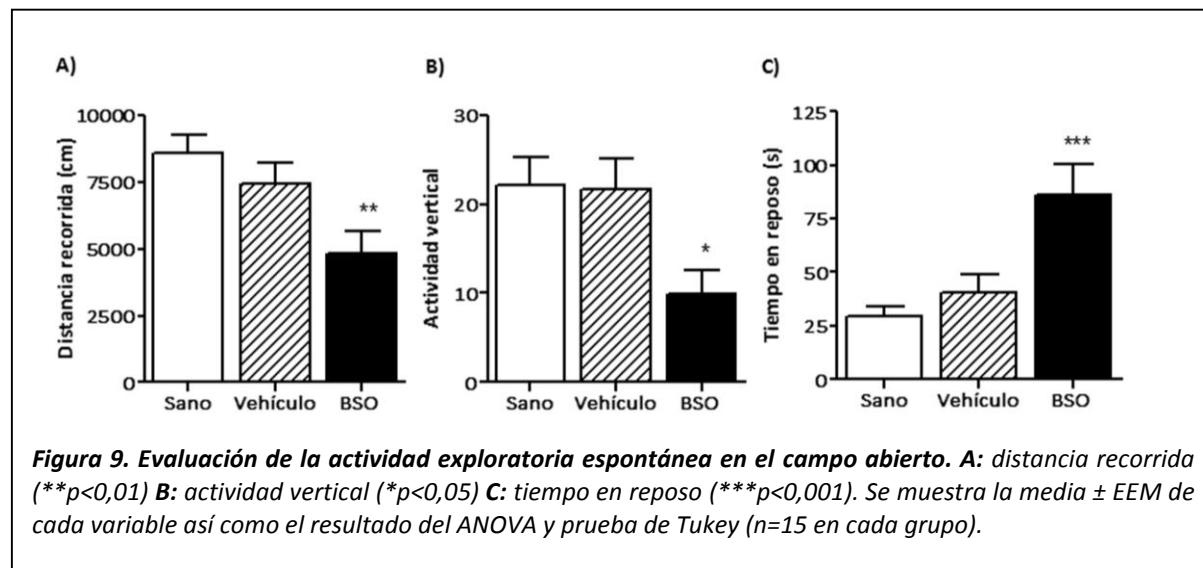
2. Alteraciones conductuales asociadas a la disminución transitoria de la concentración de GSH.

La conducta motora fue evaluada a partir de los 7 días posteriores a la lesión con BSO para determinar si el desbalance transitorio en la concentración tisular de GSH induce alteraciones motoras en las ratas.

2.1 Conducta exploratoria espontánea.

La prueba del campo abierto determina la actividad espontánea en roedores. En esta, las ratas con administración de BSO en la SNpc mostraron una disminución de la actividad exploratoria. Aunque todas las ratas manifestaron una mayor actividad en las zonas laterales del aparato con preferencia al centro del mismo, el repertorio de exploración de las ratas sanas y vehículo también incluyó el centro del mismo. A diferencia de estos grupos experimentales, las ratas BSO presentaron una marcada tendencia a permanecer y explorar sólo las esquinas del campo sin atravesar el centro.

En general las ratas del grupo BSO se mostraron menos activas y con pobres desplazamientos durante la exploración. Este grupo recorrió una distancia significativamente menor ($F_{(2, 42)}=6,31; p<0,01$) y mostró una disminución también significativa de la exploración vertical ($F_{(2, 41)}=4,87; p<0,05$) en comparación con los grupos controles. Asimismo, el grupo BSO evidenció un incremento significativo del tiempo en reposo, es decir en inactividad ($F_{(2, 42)}=8,27; p<0,001$) con respecto a los grupos controles (Fig. 9 A-C).



2.2 Exploración de objetos

En la prueba de exploración de objetos todos los animales mostraron una tendencia a visitar menos los objetos A y B en el segundo ensayo y prestaron mayor atención al objeto novedoso (C). En el caso del grupo tratado con BSO se observó una tendencia a una menor exploración de los objetos en todos los ensayos. Para los objetos A y B, no se encontraron diferencias significativas en el número de visitas realizadas a cada objeto (objeto A: $F_{2,40}=0,19; p>0,05$), (objeto B: $F_{2,40}=0,42; p>0,05$) en el grupo BSO con respecto a los sujetos pertenecientes al grupo vehículo o sano. En el caso del objeto novedoso C, se encontró una disminución

significativa en el número de visitas en el grupo BSO comparado con los controles ($F_{2,20}=7,03$; $p<0,01$). El ID no presentó diferencias significativas entre los grupos ($F_{2,26}=2,65$; $p>0.05$) (Fig. 10).

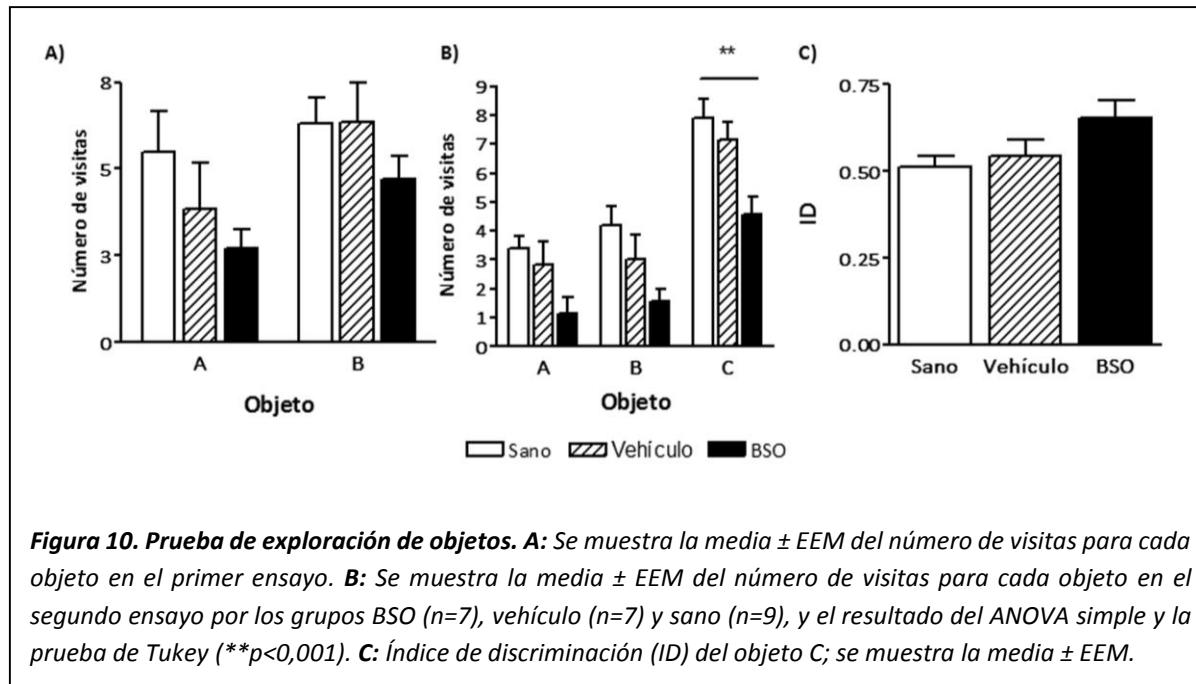
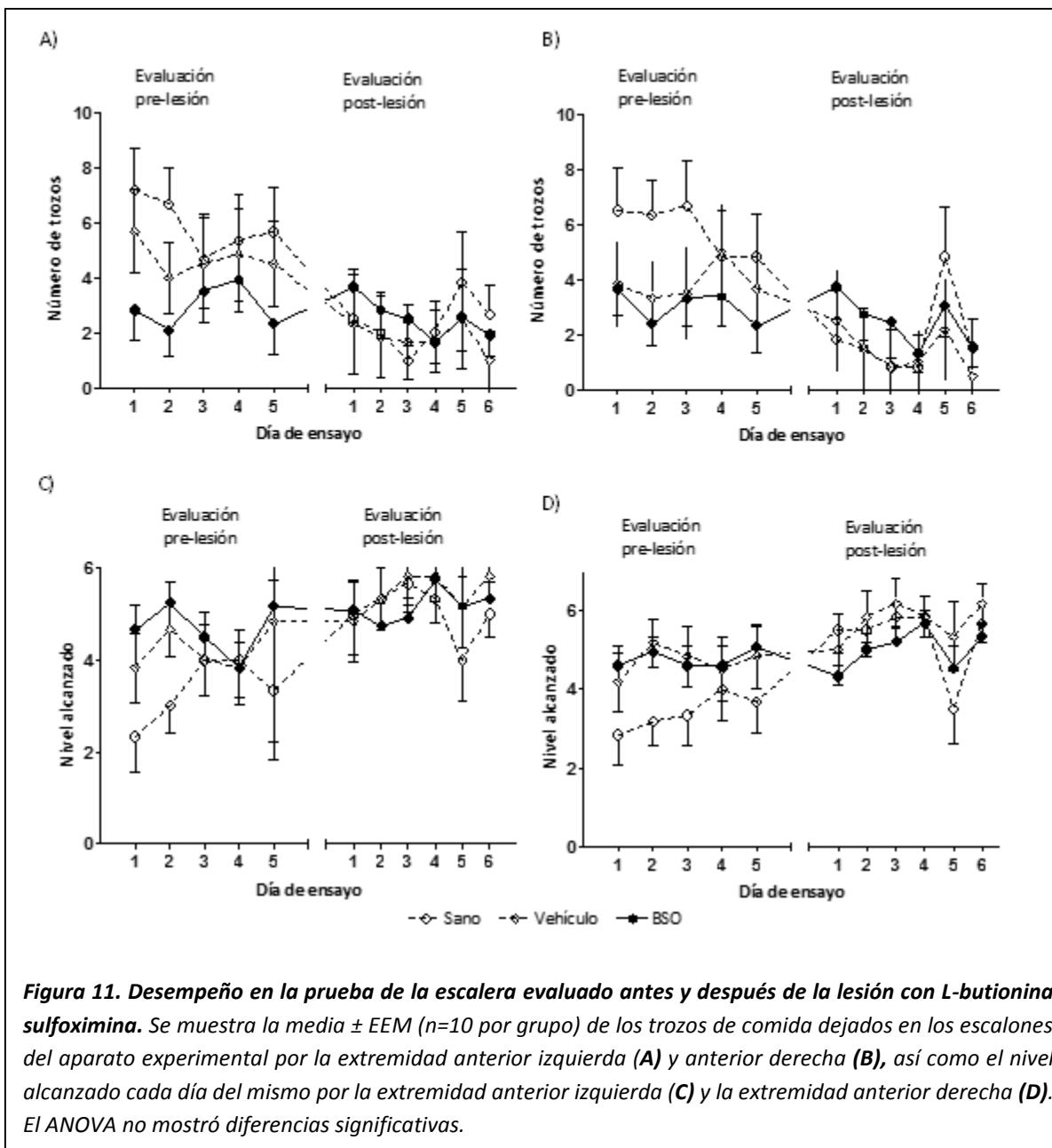


Figura 10. Prueba de exploración de objetos. A: Se muestra la media ± EEM del número de visitas para cada objeto en el primer ensayo. B: Se muestra la media ± EEM del número de visitas para cada objeto en el segundo ensayo por los grupos BSO ($n=7$), vehículo ($n=7$) y sano ($n=9$), y el resultado del ANOVA simple y la prueba de Tukey (** $p<0,001$). C: Índice de discriminación (ID) del objeto C; se muestra la media ± EEM.

2.3 Prueba de la escalera

En la prueba de la escalera realizada para la evaluación de las habilidades motoras de las extremidades anteriores, todos los animales mostraron un desempeño similar. En la etapa de entrenamiento, todos los animales disminuyeron la cantidad de trozos de comida dejados por ambas extremidades en los escalones del aparato experimental e incrementaron la capacidad de tomar los alimentos en los niveles más bajos, lo que evidenció la adquisición de habilidades motoras con el transcurso del entrenamiento (Fig. 11).



En la etapa de evaluación posterior a la lesión con BSO, no se observaron diferencias significativas en el número total de trozos de alimento dejados en la caja experimental (en la escalera y en el piso de la caja) entre los grupos experimentales ni en la extremidad derecha ($F_{(2, 30)}=0,20$; $p>0,05$) ni en la extremidad izquierda ($F_{(2, 30)}=0,30$; $p>0,05$) (Fig. 12).

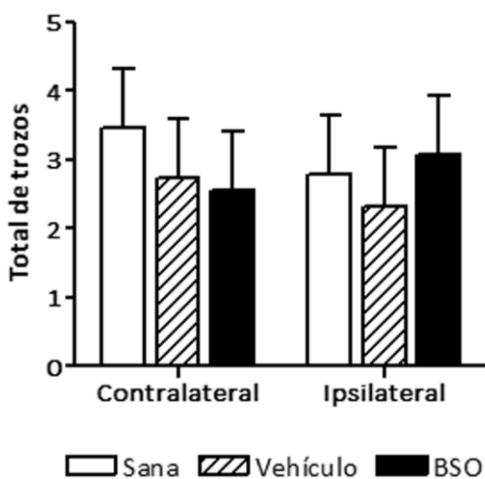


Figura 12. Evaluación posterior a la lesión con L-butyronina sulfoximina en la prueba de la escalera. Se muestra la media ± EEM del número total de trozos de comida dejados por la rata en cada grupo por extremidad ($n=11$). El ANOVA no mostró diferencias significativas

El análisis detallado de la ejecución de la prueba mostró que en esta etapa del experimento los animales lograron dejar menor número de trozos de comida en la escalera cada día de ensayo ($F_{(5)}=5,48$; $p<0,001$), sin que existieran diferencias significativas entre los grupos ($F_{(10)}=1,53$; $p>0,05$) o extremidades ($F_{(5)}=0,41$; $p>0,05$). Además mostraron tendencia a tomar los alimentos de los niveles de mayor dificultad

($F_{(5)}=7,99$; $p<0,001$) sin que existieran diferencias significativas entre los grupos ($F_{(10)}=1,85$; $p>0,05$) o entre las extremidades ($F_{(5)}=0,56$; $p>0,05$) (Fig. 11).

2.4 Prueba de estimulación táctil bilateral

La prueba de estimulación táctil bilateral fue empleada para evaluar la sensibilidad ante un estímulo no nocivo colocado en las extremidades anteriores. En esta prueba no se encontraron diferencias significativas en la latencia para retirar el parche adhesivo entre las extremidades en ninguno de los grupos experimentales (sano: $t=-2,01$; vehículo: $t=-1,24$ y BSO: $t=0,39$; $p>0,05$). No obstante, en las ratas controles se observó una marcada tendencia a comenzar la exploración por la extremidad izquierda mientras que en las ratas BSO la exploración comenzó indistintamente por cualquiera de las extremidades con una ligera tendencia a comenzar por la extremidad derecha (ipsilateral al tratamiento con BSO).

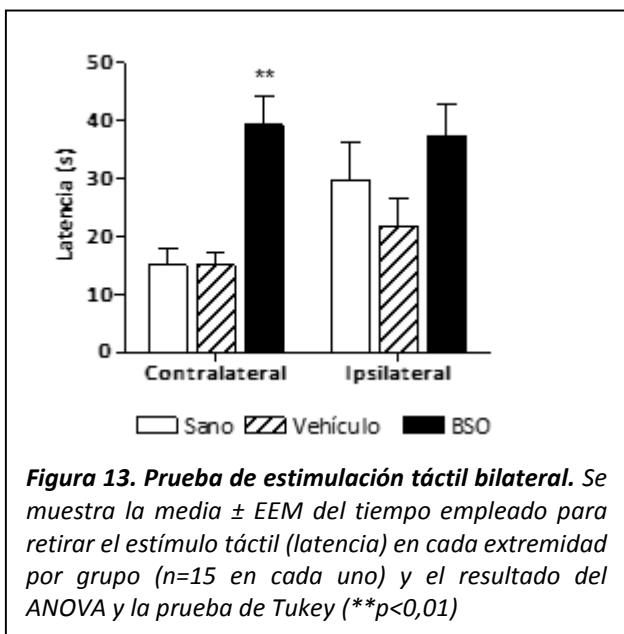


Figura 13. Prueba de estimulación táctil bilateral. Se muestra la media \pm EEM del tiempo empleado para retirar el estímulo táctil (latencia) en cada extremidad por grupo ($n=15$ en cada uno) y el resultado del ANOVA y la prueba de Tukey (** $p<0,01$)

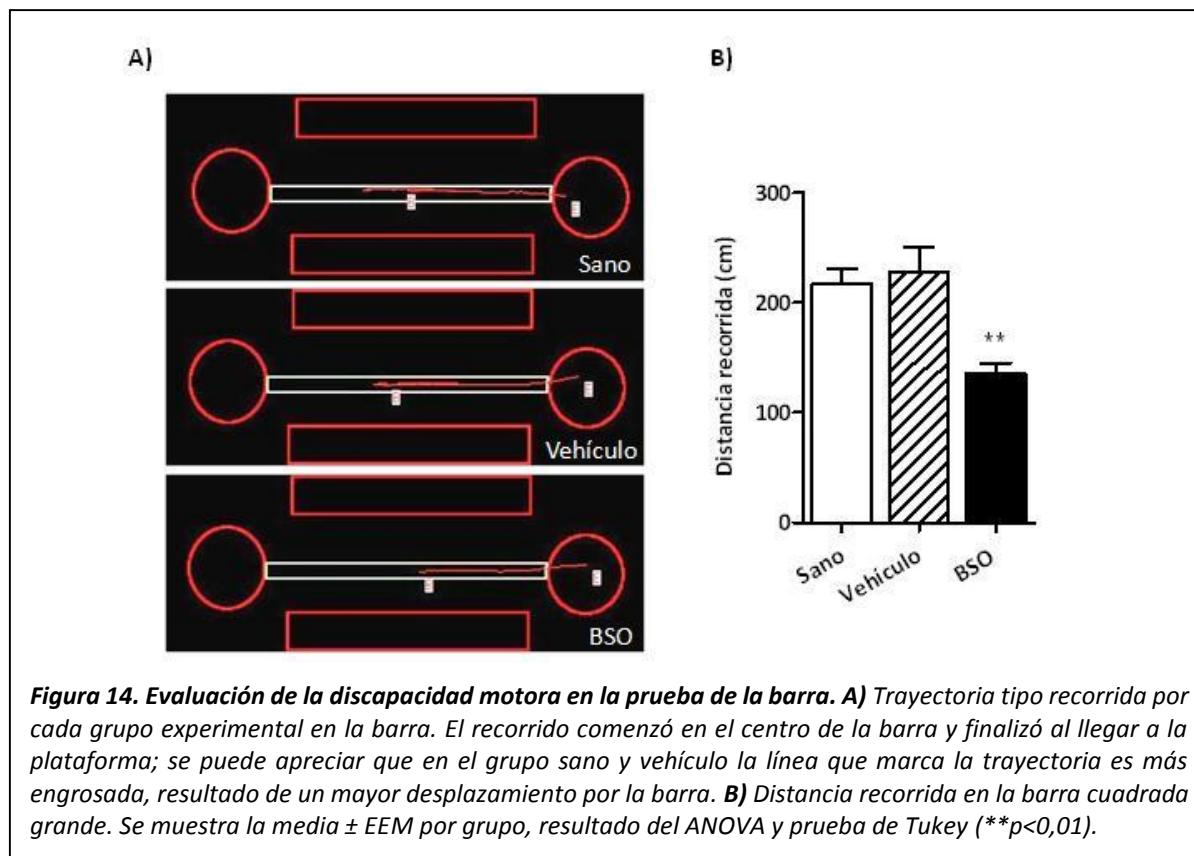
Al realizar el análisis entre los grupos por extremidad se comprobó que no existieron diferencias significativas en la latencia para retirar el adhesivo de la extremidad derecha ($F_{(2, 36)}=2,07$; $p>0,05$.) mientras que en la extremidad izquierda (contralateral a la lesión) la latencia tuvo un incremento significativo en el grupo BSO ($F_{(2, 36)}=14,48$; $p<0,01$) (Fig. 13).

2.5 Prueba de la barra transversal

La prueba de la barra transversal se empleó para la evaluación de la locomoción y el equilibrio en una superficie angosta. Desde el punto de vista cualitativo, no se observaron diferencias en el éxito de la prueba, apreciándose una tendencia en todos los animales a caerse de las barras redonda grande, redonda pequeña y cuadrada pequeña que imponen una mayor dificultad a la tarea motora. Por esta razón sólo se incluyeron en el estudio los datos correspondientes a los ensayos en los que las ratas mostraron una desempeño exitoso de la prueba (llegar a la plataforma) en la barra rectangular grande.

Los sujetos experimentales pertenecientes a los grupos sano y vehículo realizaron mayor exploración de la barra que une las dos plataformas antes de dirigirse a esta, como se observó en el engrosamiento que marca la línea de la trayectoria. En el grupo BSO no se observó actividad exploratoria en la barra y la trayectoria fue recta hacia la plataforma (Fig. 14A). Esta

observación concuerda con el análisis de la distancia recorrida en la barra, que mostró una disminución significativa en las ratas BSO (Fig. 14B) comparados con los grupos vehículo y sano (Tukey: $F_{(2, 22)}=7,05$; $p<0,01$).



3. Efecto de la disminución de la concentración de GSH sobre la expresión de genes relacionados con la plasticidad del sistema nigro-estriatal.

3.1 Expresión de los receptores dopaminérgicos

Con el propósito de determinar si la disminución transitoria en la concentración de GSH produce alteraciones en la expresión de los receptores dopaminérgicos, se evaluó por RT-PCR la expresión del ARNm que codifica para los receptores dopaminérgicos tipo 1 y tipo 2 a los 7 días posteriores a la lesión. En la SNpc, la administración de BSO provocó una disminución del

38% en la expresión del receptor dopaminérgico D₂ comparado con los sujetos de los grupos vehículo y sano, respectivamente (Fig. 15A).

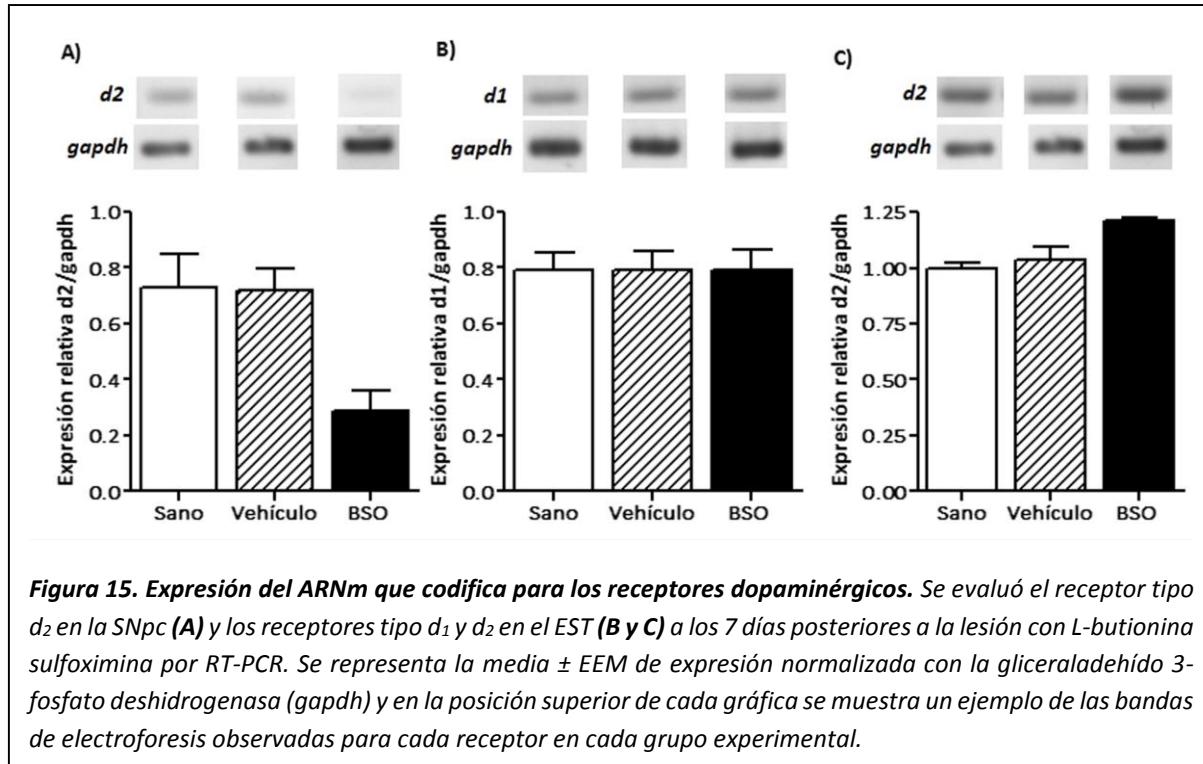


Figura 15. Expresión del ARNm que codifica para los receptores dopaminérgicos. Se evaluó el receptor tipo d₂ en la SNpc (A) y los receptores tipo d₁ y d₂ en el EST (B y C) a los 7 días posteriores a la lesión con L-buthionina sulfoximina por RT-PCR. Se representa la media ± EEM de expresión normalizada con la gliceraladehído 3-fosfato deshidrogenasa (gapdh) y en la posición superior de cada gráfica se muestra un ejemplo de las bandas de electroforesis observadas para cada receptor en cada grupo experimental.

Al mismo tiempo en el EST no se observó alteración de la expresión del ARNm del receptor dopaminérgico D₁ en el grupo BSO (Fig. 15B). Sin embargo, en este grupo experimental se observó un incremento del 20% en la expresión del receptor tipo D₂ comparado con los grupos controles (Fig. 15C).

3.2 Expresión de los genes relacionados con la plasticidad bdnf y arc.

Para evaluar el efecto de la administración de BSO sobre la expresión de genes relacionados con la plasticidad neuronal se determinó la expresión de los ARNm que codifican para el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, del inglés *brain-derived neurotrophic factor*) y la proteína asociada al citoesqueleto con actividad regulada (Arc, del inglés *activity-regulated*

III. RESULTADOS

cytoskeleton associated protein) en la SNpc y el EST a las 24 horas y 7 días posteriores a la inyección de BSO en la SNpc.

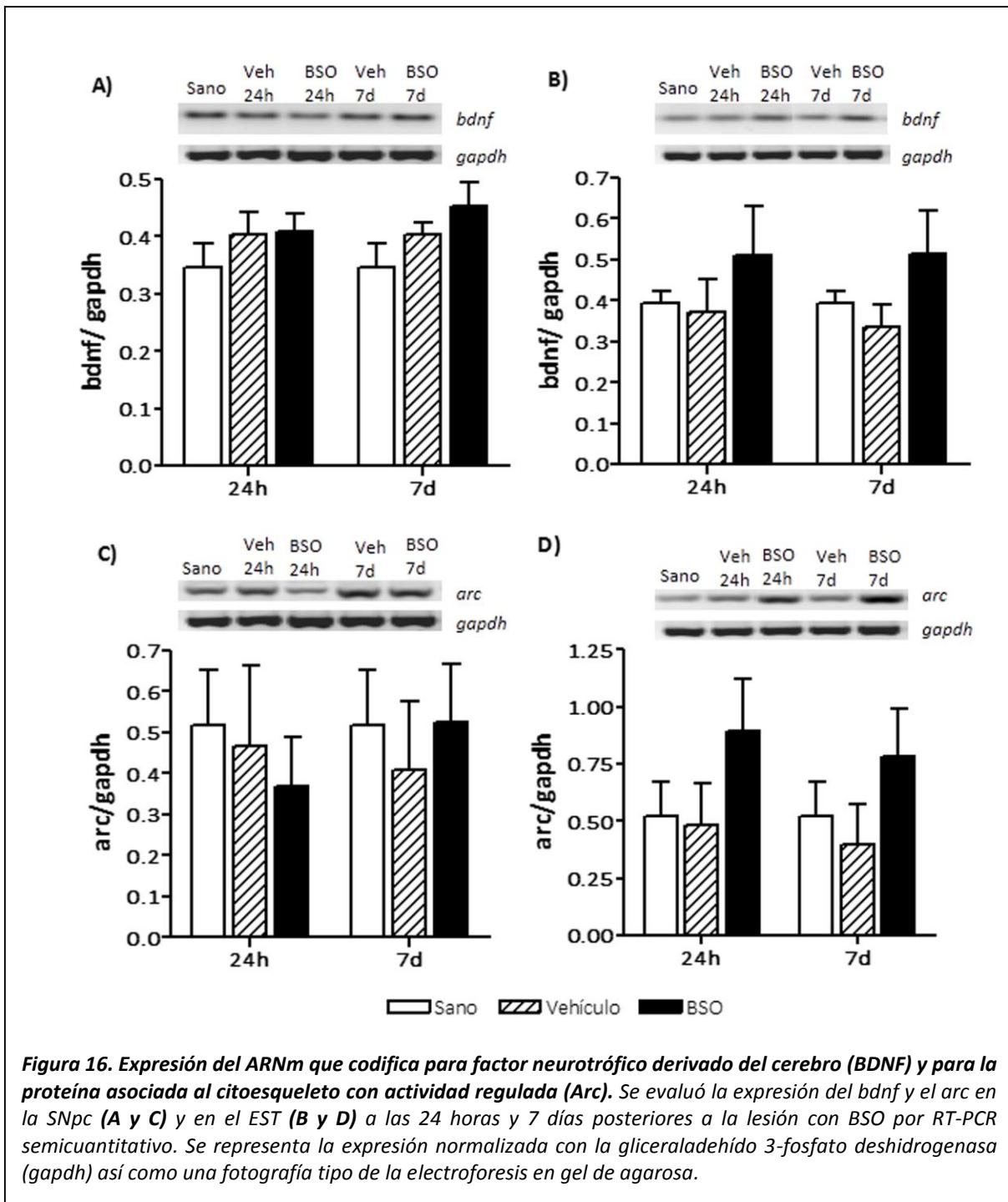


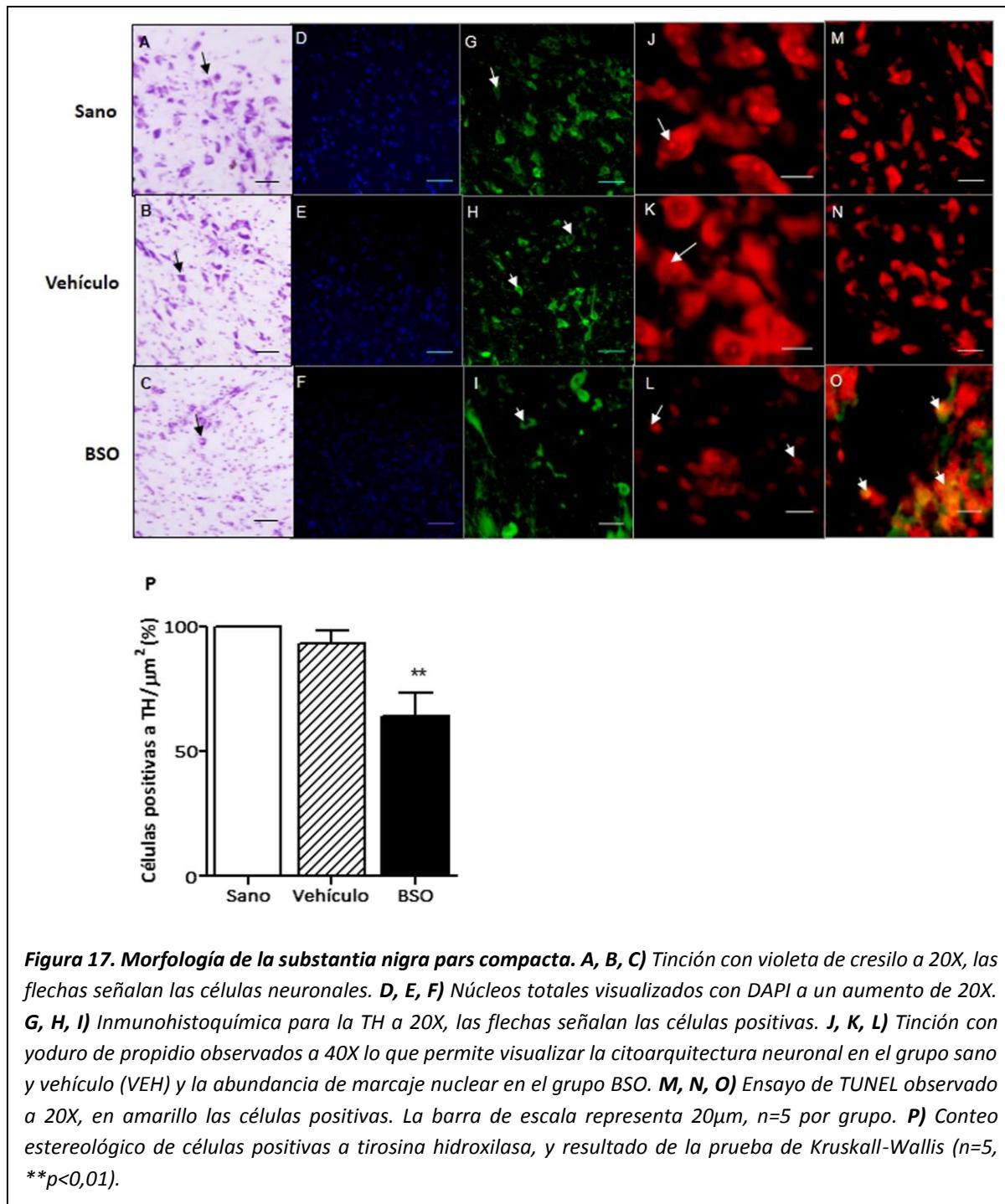
Figura 16. Expresión del ARNm que codifica para factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y para la proteína asociada al citoesqueleto con actividad regulada (Arc). Se evaluó la expresión del *bndf* y el *arc* en la SNpc (A y C) y en el EST (B y D) a las 24 horas y 7 días posteriores a la lesión con BSO por RT-PCR semicuantitativo. Se representa la expresión normalizada con la gliceraladehído 3-fosfato deshidrogenasa (*gapdh*) así como una fotografía tipo de la electroforesis en gel de agarosa.

Como se observa en la figura 16, el tratamiento con BSO no modifica la expresión del ARNm

que codifica para el BDNF en la SNpc pero provoca un incremento del 30% en la expresión en el EST tanto a las 24 horas como a los 7 días posteriores la lesión con respecto al grupo sano. Por otra parte, el tratamiento con BSO disminuye en un 30% la expresión del ARNm que codifica para el Arc a las 24 horas y se restablece a los 7 días con relación al grupo sano en la SNpc. En el EST, la expresión del Arc se incrementa en un 70% a las 24 horas y continúa incrementada en un 50% a los 7 días posteriores al tratamiento.

4. Efecto de la disminución aguda de la concentración de GSH sobre la supervivencia celular de la SNpc.

La figura 17 muestra el estudio morfológico de la SNpc, realizado a los 7 días posteriores a la lesión con BSO para determinar si esta lesión ocasiona daño celular en la SNpc. La tinción con violeta de cresilo en la SNpc reveló una pérdida de células neuronales así como atrofia de estas. El ensayo inmunohistoquímico mostró una disminución significativa ($H_{(2,N=15)}=11.54$; $p<0,01$) de células positivas a la TH en las ratas BSO en comparación con los grupos vehículo y sano. La tinción con yoduro de propidio mostró células con un núcleo y citoplasma bien definido en los grupos sano y vehículo; por el contrario, en el grupo lesionado con BSO predominó un marcaje nuclear. Al mismo tiempo, el ensayo de TUNEL para evaluar muerte celular mostró células positivas en el área circundante al sitio de lesión del grupo BSO a diferencia de los grupos vehículo y el grupo sano en los que no se encontraron células positivas a TUNEL. En el caso del EST, no se observaron células positivas a TUNEL en ninguno de los grupos experimentales.



5. Efecto de la disminución transitoria de la concentración de GSH sobre los indicadores de estrés oxidativo

5.1 Actividad enzimática de la glutatión peroxidasa y la glutatión reductasa.

Con el propósito de determinar si la disminución transitoria de GSH provoca cambios en las enzimas que participan en su metabolismo, se midió la actividad enzimática de la GPx y la GRD en la SNpc y el EST a las 24 horas y a los 7 días posteriores a la administración de la BSO.

La actividad enzimática de la GPx en la SNpc (Fig. 18A) no presentó cambios significativos ni a las 24h ($F_{(2, 28)}=0,20; p>0,05$) ni a los 7 días ($F_{(2, 33)}=0,40; p>0,05$) en el grupo BSO con respecto al resto de los grupos y este comportamiento fue similar en el EST (Fig. 18B), ($F_{(2, 29)}=0,06; p>0,05$ a las 24h y $F_{(2, 34)}=1,86; p>0,05$ a los 7 días). La actividad enzimática de la GRD (Fig. 18C) tampoco mostró diferencias significativas entre los grupos ni en la SNpc ($F_{(2, 27)}=0,55, p>0,05$ a las 24h y $F_{(2, 31)}=0,13$ a los 7 días) ni en el EST ($F_{(2, 29)}=1,92; p>0,05$ a las 24h y $F_{(2, 35)}=0,68$ a los 7 días) (Fig. 18D).

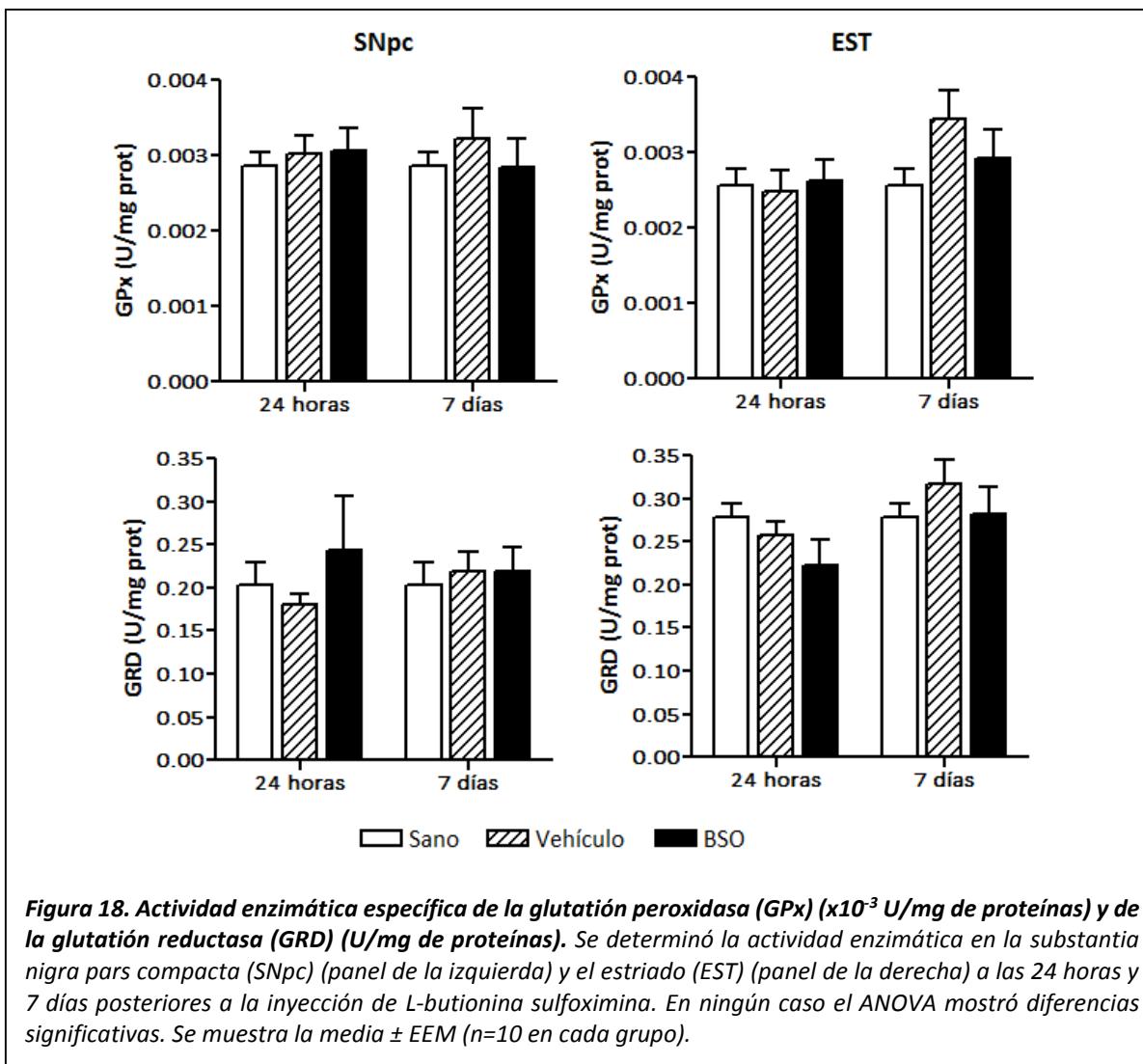
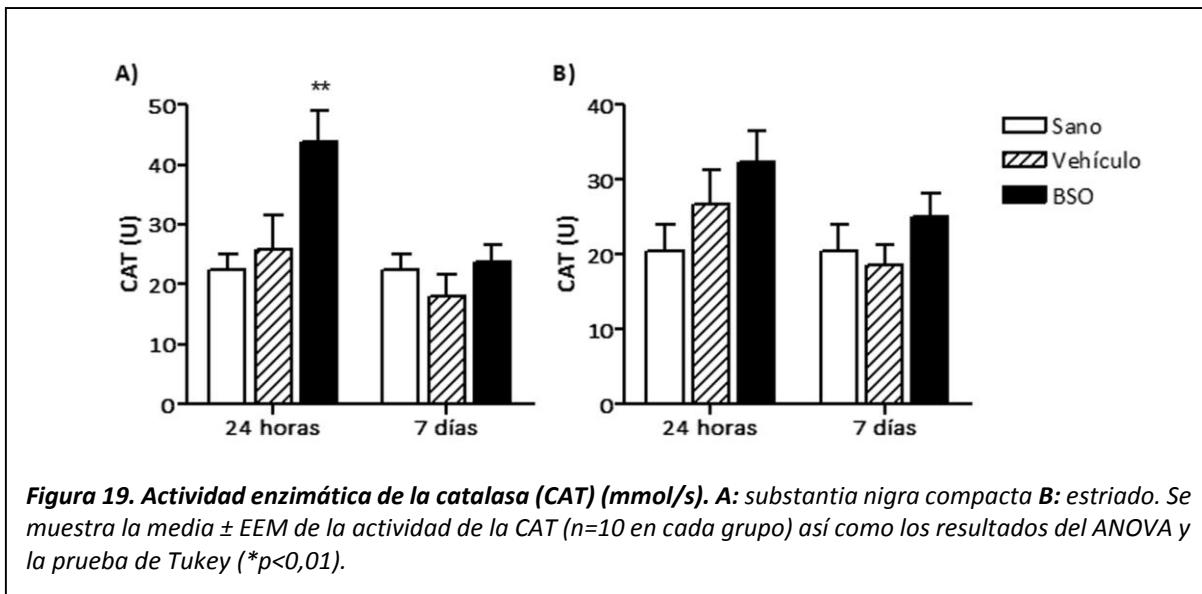


Figura 18. Actividad enzimática específica de la glutatión peroxidasa (GPx) ($\times 10^{-3}$ U/mg de proteínas) y de la glutatión reducasa (GRD) (U/mg de proteínas). Se determinó la actividad enzimática en la substantia nigra pars compacta (SNpc) (panel de la izquierda) y el estriado (EST) (panel de la derecha) a las 24 horas y 7 días posteriores a la inyección de L-butionina sulfoximina. En ningún caso el ANOVA mostró diferencias significativas. Se muestra la media ± EEM ($n=10$ en cada grupo).

5.2 Actividad enzimática de la catalasa.

Con el objetivo de conocer si la disminución transitoria de la concentración de GSH provoca cambios en el metabolismo oxidativo se determinó la actividad de la CAT en la SNpc y el EST a las 24 horas y 7 días posteriores al tratamiento con BSO. En la SNpc (Fig. 19A) la actividad de la CAT fue significativamente mayor a las 24 horas en el grupo BSO respecto a los grupos vehículo y sano ($F_{(2, 18)} = 6,66$ p<0,01). Después de 7 días se observó una disminución de la

actividad enzimática en el grupo BSO, la cual alcanzó valores similares a los grupos vehículo y sano ($F_{(2, 23)}=0,84$ $p>0,05$).



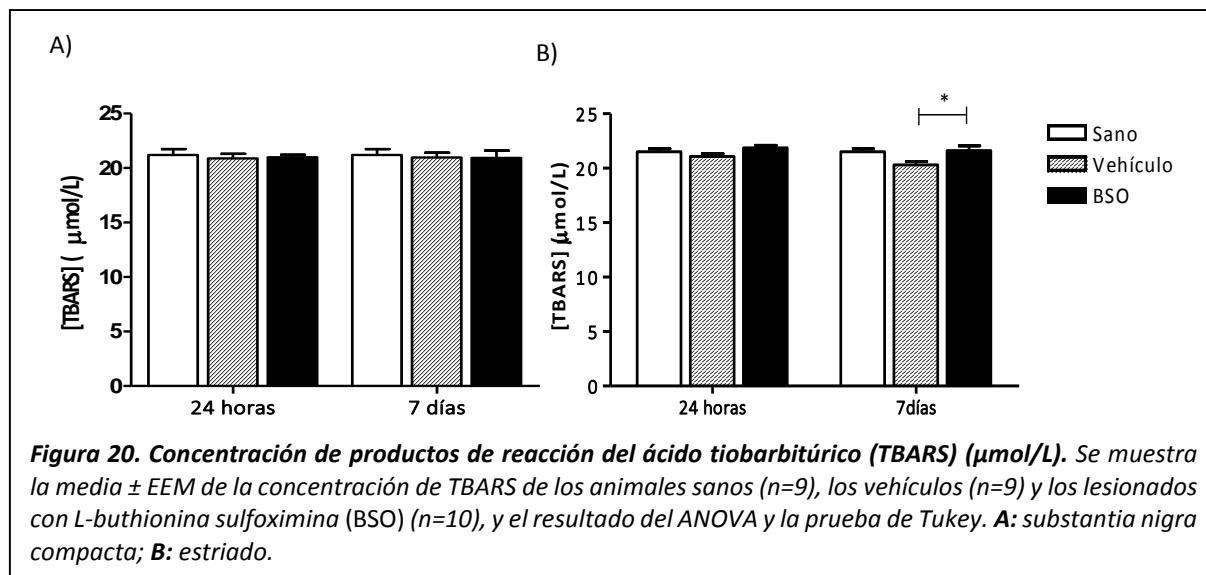
En el EST (Fig. 19B) se encontró un incremento no significativo de la actividad enzimática de la CAT tanto a las 24 horas como a los 7 días en el grupo BSO con respecto a los grupos experimentales controles, sin que la misma alcanzara significación estadística (24h: $F_{(2, 23)}=2,38$; $p>0,05$; 7 días: $F_{(2, 39)}=1,31$; $p>0,05$).

5.1 Concentración de productos de reacción del ácido tiobarbitúrico.

Como indicador de peroxidación lipídica y daño oxidativo se determinó la concentración de TBARS. En la SNpc (Fig. 20A) no hubo cambios significativos en la concentración de TBARS ni a las 24h ($F_{(2, 26)}=0,34$; $p>0,05$) ni a los 7 días ($F_{(2, 26)}=0,15$, $p>0,05$) en el grupo BSO comparado con los restantes. En el EST (Fig. 20B) no se encontraron diferencias significativas entre los grupos a las 24h ($F_{(2, 26)}=2,58$, $p>0,05$); sin embargo, a los 7 días se encontró una disminución

III. RESULTADOS

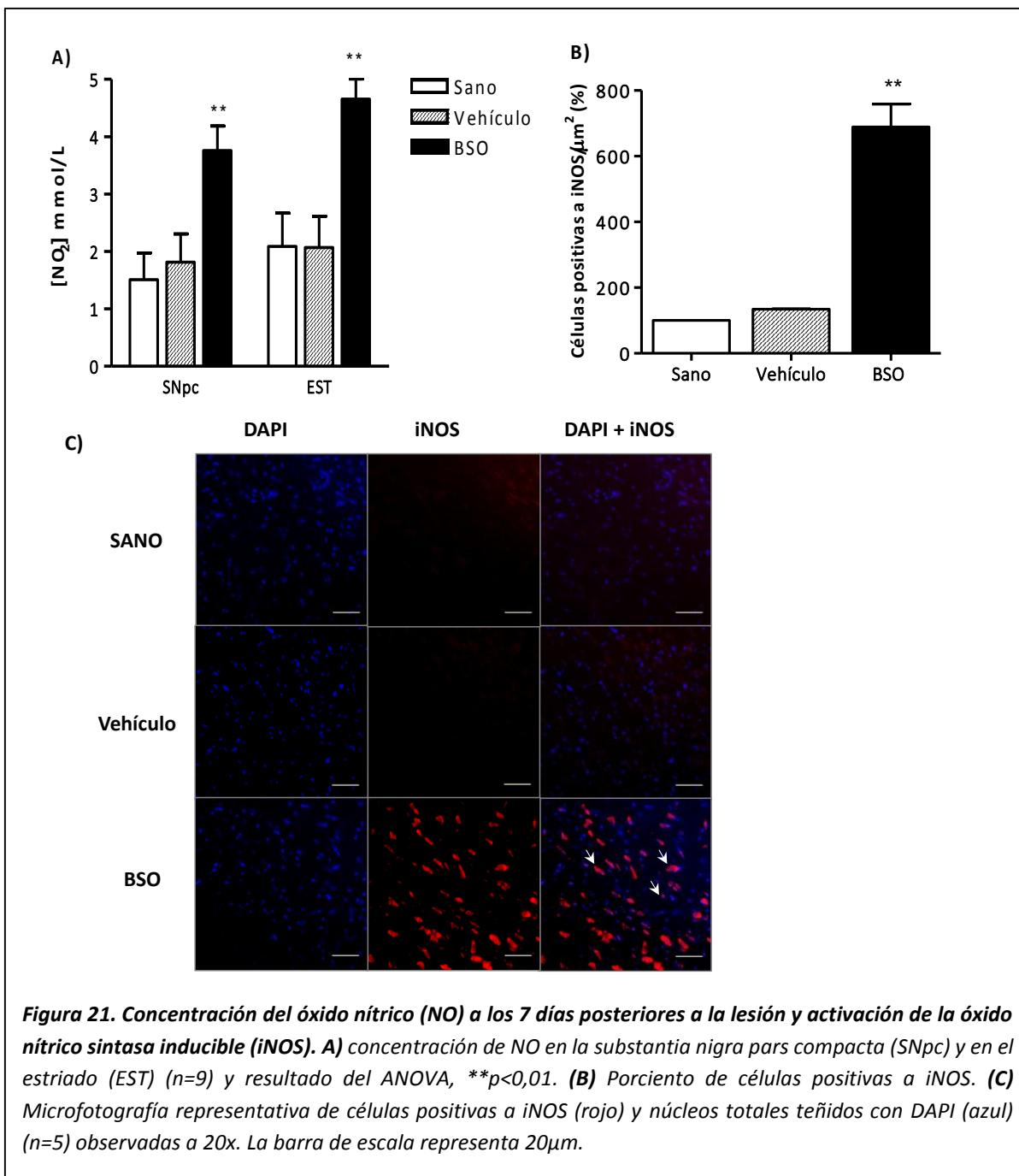
significativa en la concentración de TBARS ($F_{(2,25)}=4,13$ p<0.05) en el grupo vehículo comparado con el grupo BSO.



5.2 Metabolismo del óxido nítrico.

Con el propósito de evaluar si la disminución transitoria de GSH produce alteraciones en el metabolismo del NO se determinó la concentración de NO y la expresión de la iNOS a los 7 días en la SNpc y en el EST. La lesión con BSO produjo un incremento significativo de la concentración de NO en ese grupo experimental comparado con las ratas pertenecientes a los grupos vehículo y sano. Este efecto fue observado tanto en la SNpc ($F_{(2,18)}=6,21$ p<0,01) como en el EST ($F_{(2,17)}=8,57$ p<0,01) (Fig. 21A).

Además, se observó un incremento de células positivas a la iNOS en la SNpc de las ratas BSO ($H_{(2,N=13)}=10,74$ p<0.05) comparadas con las ratas vehículo y sanas (Fig. 21B-C). En el EST no se observaron células positivas a esta enzima (datos no mostrados).



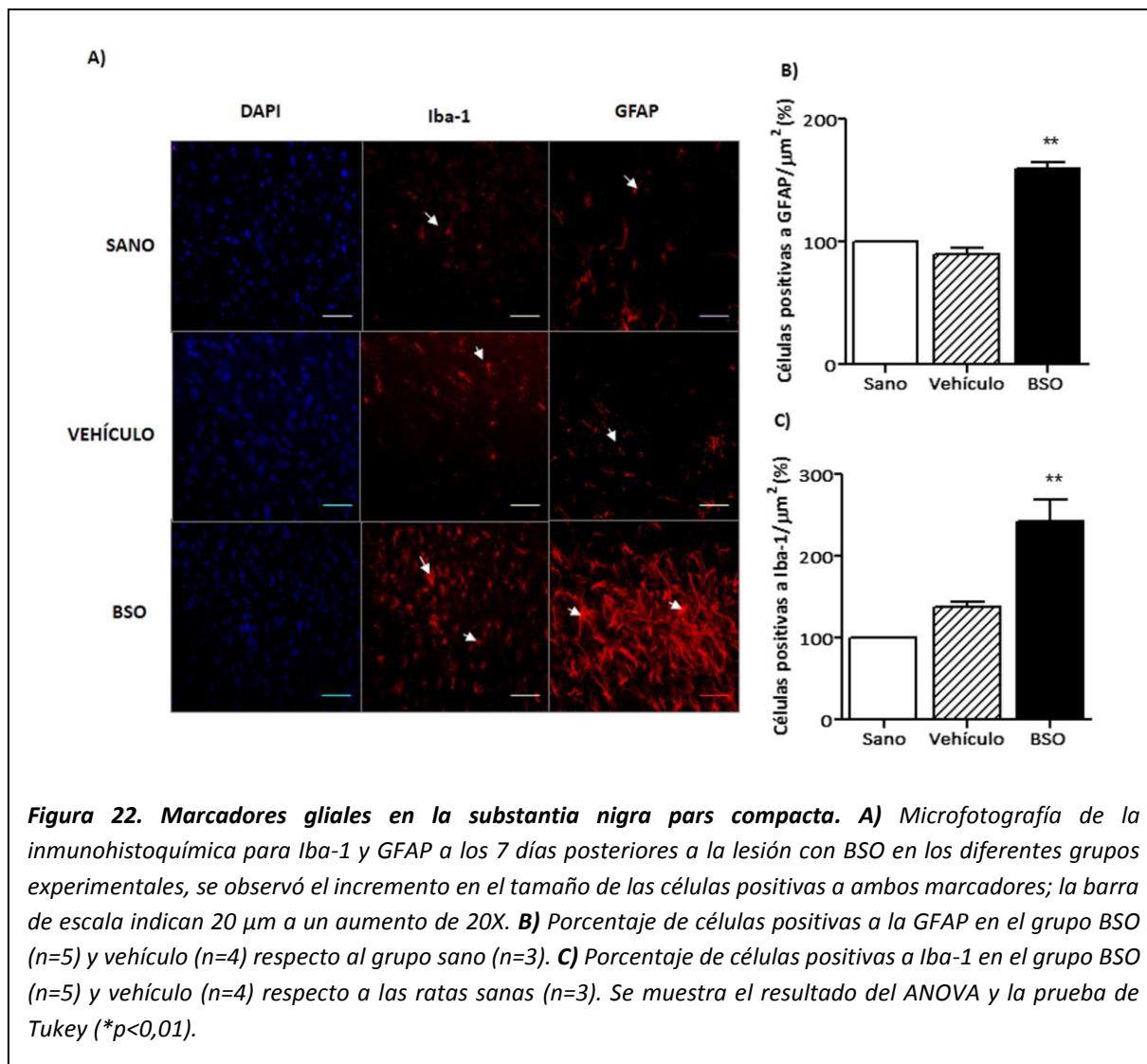
6. Efecto de la disminución de la concentración de GSH sobre los procesos de neuroinflamación en la SNpc.

6.1 Marcadores de activación glial GFAP E iba-1.

Para comprobar la presencia del linaje glial observado en la tinción con cresil violeta se determinó la expresión de GFAP e Iba-1 en las secciones coronales de la SNpc, ya que la expresión de estas proteínas es específica de los astrocitos y microglia, respectivamente, y ambos marcadores se sobre-expresan con la activación de estas células (Fig. 22A).

El estudio inmunohistoquímico evidenció un aumento significativo en el número de células positivas a la GFAP ($H_{(2,N=11)}=13,44 p<0,001$) (Fig. 22B) así como hipertrofia de los astrocitos y aumento del tamaño de sus prolongaciones en la SNpc de las ratas tratadas con BSO, en comparación con los sujetos pertenecientes a los grupos vehículo y sano.

Por otro lado, el marcaje específico para microglia también mostró un incremento significativo del número de células positivas a Iba-1 ($F_{(2,11)}=13,16 p<0,01$) (Fig. 22C) junto a un aumento en el tamaño de los cuerpos microgliales en el grupo BSO respecto a los restantes grupos experimentales.



6.2 Concentración de citocinas.

Para determinar si la deficiencia transitoria de GSH desencadena los mecanismos de neuroinflamación en la SNpc y el en el EST, se determinó la concentración de la citocina antiinflamatoria IL-10 y las citocinas proinflamatorias TNF- α , IL-1 β e IL-6.

La concentración de IL-10 se estudió a las 24 horas y a los 7 días posteriores a la inyección con BSO. El mismo no produjo cambios significativos en la concentración de IL-10 ni en la SNpc

III. RESULTADOS

($F_{(4,32)}=0.12$ p>0.05) ni en el EST ($F_{(4,39)}=0.54$ p>0.05) (Fig. 23A y B) respecto a los grupos controles.

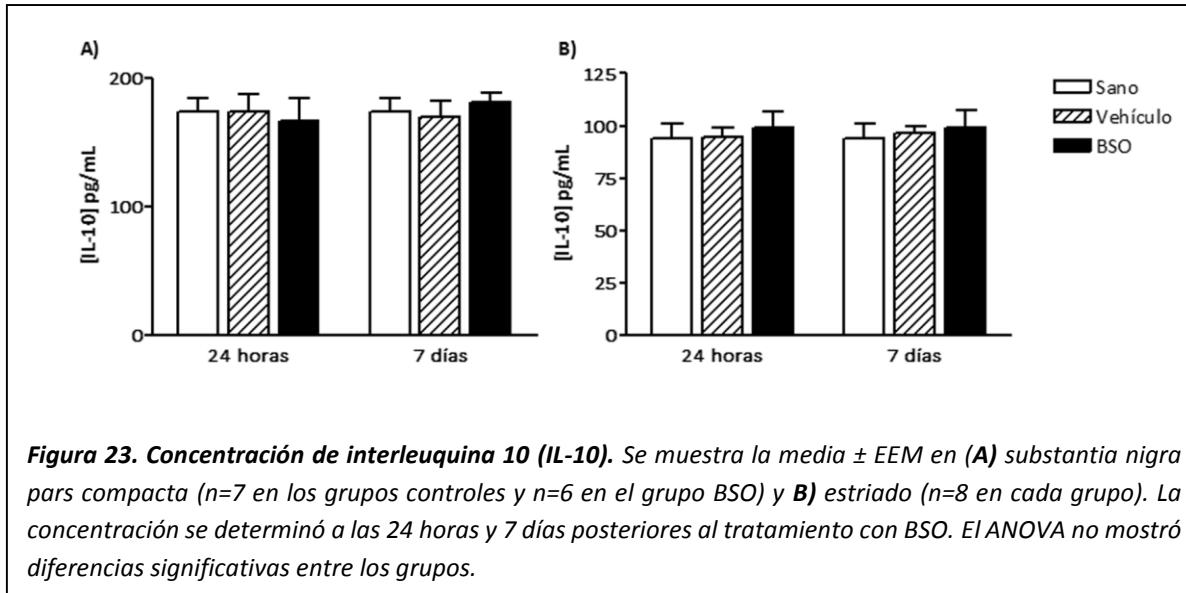
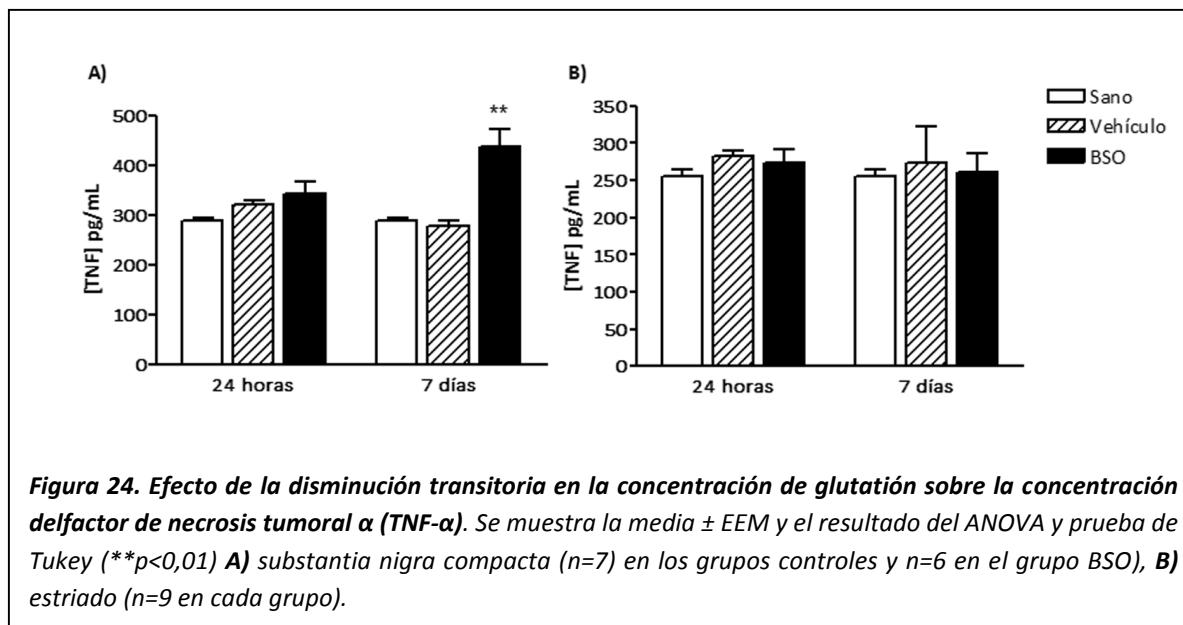
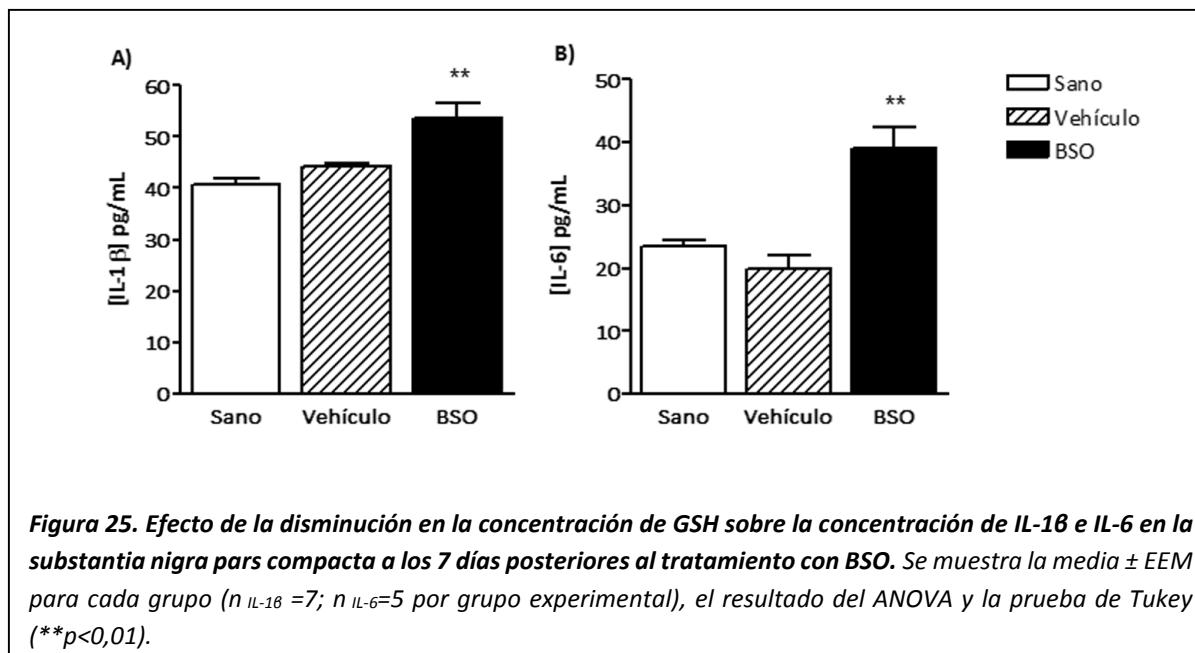


Figura 23. Concentración de interleuquina 10 (IL-10). Se muestra la media ± EEM en (A) substantia nigra pars compacta (n=7 en los grupos controles y n=6 en el grupo BSO) y (B) estriado (n=8 en cada grupo). La concentración se determinó a las 24 horas y 7 días posteriores al tratamiento con BSO. El ANOVA no mostró diferencias significativas entre los grupos.

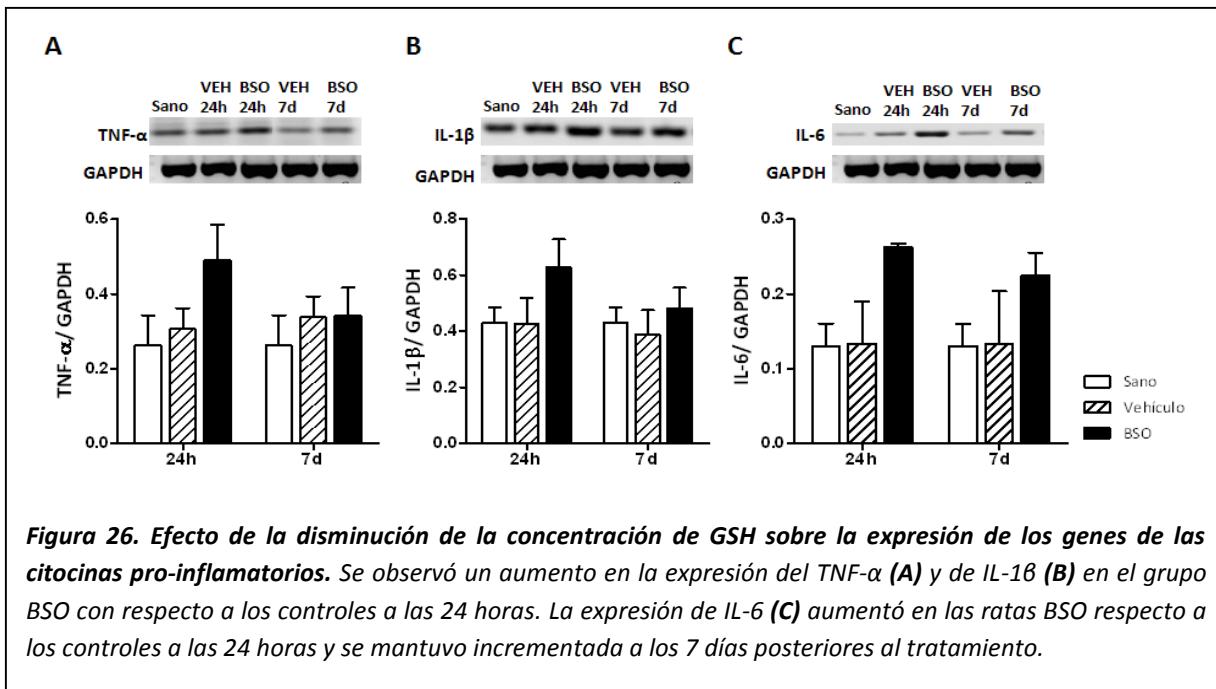
Por otra parte la inyección de BSO indujo un incremento no significativo en la concentración de TNF- α a las 24 horas en la SNpc en ese grupo experimental que llegó a ser estadísticamente significativo a los 7 días en el grupo BSO comparado con los grupos controles ($F_{(4,35)}=4,54$ p<0,01) (Fig. 24A). Por su parte en el EST, no se observaron cambios en la concentración de TNF- α entre los grupos en ninguno de los tiempos posteriores a la lesión analizados ($F_{(4,45)}=0,25$ p>0,05) (Fig. 24B).



En correspondencia con el incremento significativo de la concentración TNF- α a los 7 días en el grupo BSO, se estudió la concentración de las citocinas proinflamatorias IL-1 β e IL-6 en la SNpc en ese tiempo post-lesión. Se comprobó que el tratamiento con BSO indujo un incremento significativo de la concentración de ambas citocinas respecto a los grupos vehículo y sano (IL-1 β : $F_{(2,12)}=10,65$ p<0.01; IL-6: $F_{(2,15)}=18,96$ p<0.001) (Fig. 25 A y B).

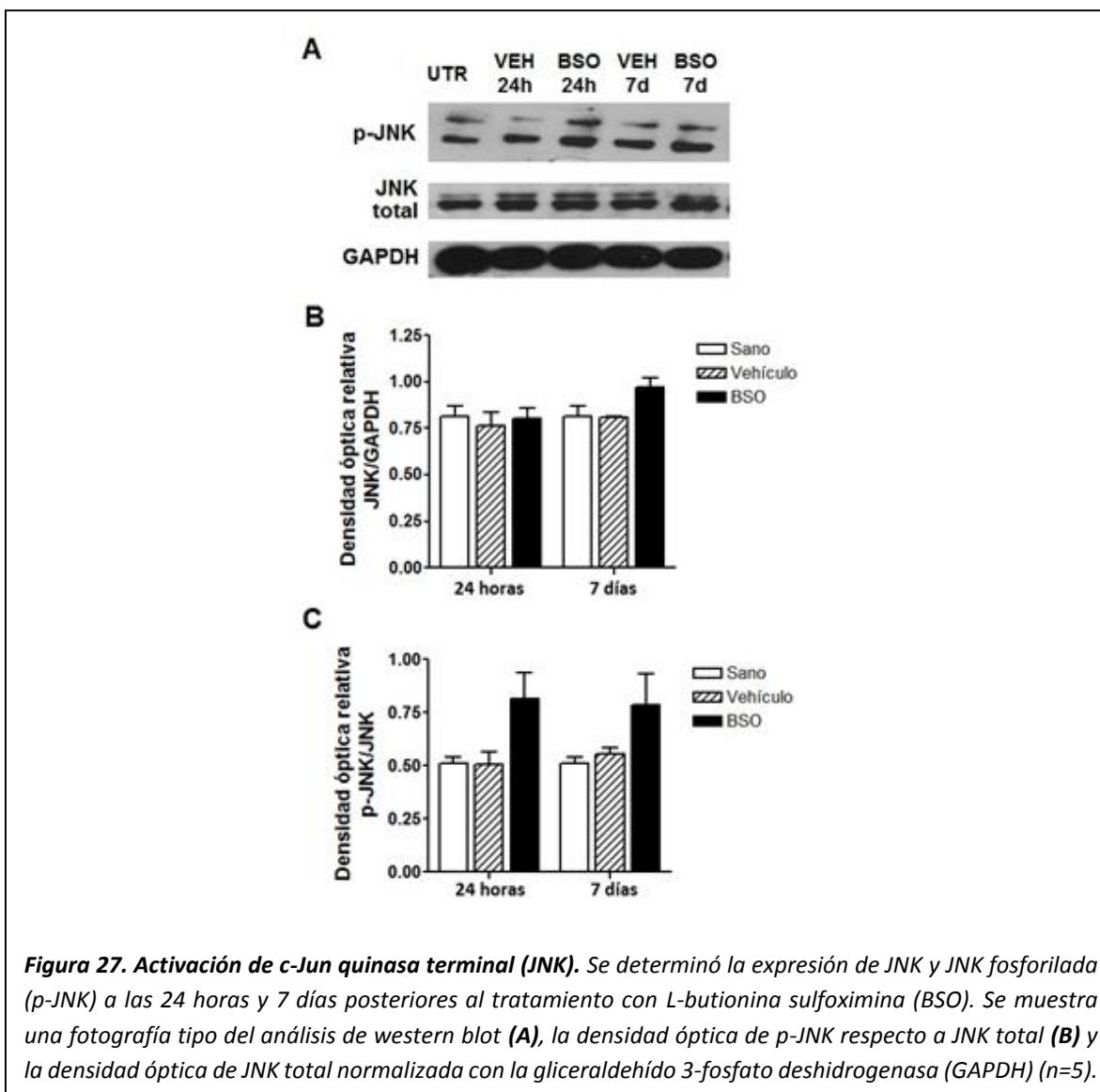


Adicionalmente se estudió la expresión de los genes que codifican para las citocinas proinflamatorias analizadas por RT-PCR a las 24 horas y 7 días post-lesión (Fig. 26 A-C). Se observó que la disminución transitoria en la concentración de GSH indujo un incremento de los niveles del ARNm de TNF- α (84%), IL-1 β (44%) e IL-6 (100%) en el grupo BSO comparado con las ratas controles a las 24 horas posteriores a la lesión. A los 7 días post-lesión se mantuvo la sobreexpresión de IL-6 (69%) en el grupo BSO mientras que la expresión del TNF- α y la IL-1 β retornó a los valores controles.



6.3 Activación de c-Jun quinasa terminal

Con el propósito de conocer si el tratamiento con BSO provoca activación de la vía de JNK, una quinasa relacionada con la activación de la apoptosis, se determinó la expresión de JNK y JNK fosforilada (p-JNK) por análisis de western blot en la SNpc a las 24 horas y los 7 días posteriores a la administración con BSO. Se encontró que el tratamiento con BSO no produjo cambios en la expresión de JNK a las 24 horas pero indujo un incremento del 18% a los 7 días. En cuanto a p-JNK, se encontró un incremento del 58% a las 24 horas y de un 52% a los 7 días con respecto al grupo sano (Fig. 27 A-C).



1. Efecto de la administración de BSO sobre la concentración de glutatión total

Existen dos tipos de agentes que disminuyen la concentración de GSH: los que eliminan el GSH y aquellos que inhiben su síntesis. A este último grupo pertenece la BSO (Watanabe *et al.*, 2003), la cual se ha utilizado frecuentemente para estudiar la relación del GSH con la muerte celular inducida por estrés oxidativo, ya que inhibe selectivamente la enzima γ -glutamil-cisteína sintetasa (Chi *et al.*, 2007). La γ -glutamil-cisteína sintetasa cataliza la reacción del glutamato con ATP para formar γ -glutamilfosfato cuya reacción con el α -amino de la cisteína completa el ciclo catalítico. Se ha descrito que la BSO es un inhibidor de la síntesis de GSH basado en el mecanismo de acción de la enzima aunque la unión a la misma no es covalente, y este proceso es rápido y dependiente de la dosis de BSO administrada. Además, este compuesto presenta una baja toxicidad (Griffith, 1982; Watanabe *et al.*, 2003).

En el presente trabajo la administración de BSO en la SNpc produjo una disminución de la concentración de GSH en la SNpc y en el EST a las 24 horas que se restableció a los 7 días, lo que demuestra el efecto transitorio de la misma (Fig. 8). La recuperación del GSH observada es consistente con el uso de otros agentes que disminuyen la concentración de GSH (Cruz-Aguado *et al.*, 2001). Aunque el efecto agudo constituye una limitación de este modelo, se ha descrito que el daño celular ocurre cuando la concentración de GSH es menor del 50 % respecto a los sujetos controles (Martensson *et al.*, 1991).

El daño oxidativo parece proceder de mecanismos autoperpetuantes, que duran más que el evento desencadenante (García *et al.*, 2008) por lo que este modelo puede ser útil para estudiar cambios tempranos a nivel molecular o las consecuencias celulares y conductuales a

largo plazo de un estrés oxidativo transitorio. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que en este trabajo no se determinó la relación GSSG/GSH, lo que impidió determinar el índice redox que ofrece mejor información sobre el balance antioxidantes/prooxidantes (Jones, 2006)

La infusión de BSO aguda o repetida debe realizarse por vía intracerebral pues la BSO no atraviesa la BHE en ratas adultas. La administración vía intracerebroventricular con bombas de infusión produce una disminución de la concentración de GSH tanto en la SNpc como en el EST (Toffa *et al.*, 1997). En el presente trabajo, la inyección de BSO se realizó directamente en la SNpc teniendo en cuenta que se ha descrito que la concentración de GSH está severamente afectado en este núcleo desde etapas tempranas de la EP (Clark *et al.*, 2010) mientras que en otras estructuras del cerebro la concentración de GSH no se modifica (Sian *et al.*, 1994a). No obstante, en el presente trabajo se observó una disminución del GSH en el EST que puede estar relacionada con un transporte anterógrado de la BSO por la vía nigro-estriatal aunque se recomienda verificar en estudios posteriores.

2. Alteraciones motoras producidas por la disminución de la concentración de GSH nigral.

La pérdida de la vía nigro-estriatal ha sido modelada en roedores tanto unilateral como bilateralmente, empleando una variedad de toxinas selectivas o por medio de manipulación genética. El objetivo de estos modelos ha sido replicar en roedores la discapacidad motora observada en los pacientes de EP (Blesa *et al.*, 2012).

Las pruebas conductuales han sido utilizadas para estimar la magnitud de la disfunción motora, caracterizar la extensión de la lesión o evaluar efectos terapéuticos (Iancu *et al.*, 2005). En este

estudio se administró la BSO directamente en la SNpc y se evaluaron diferentes modalidades de la conducta motora, de lo cual, hasta donde conocemos, no existen estudios previos. Por otra parte, los estudios conductuales se realizaron a los 7 días posteriores a la lesión teniendo en cuenta que en modelos animales de EP las alteraciones conductuales han sido reportadas a partir de los 15 días posteriores a la lesión (Truong *et al.*, 2006), pero desde los 7 días se han observado alteraciones motoras en modelos presintomáticos de EP (Jimenez-Martin *et al.*, 2015). En el resultado de los estudios de habilidades motoras influyen entre otros aspectos, el grado de pérdida de dopamina estriatal, el número de neuronas dopaminérgicas remanentes en la SNpc y la capacidad de compensación a la pérdida celular o del neurotransmisor (Meredith y Kang, 2006).

La prueba del campo abierto ha sido empleada comúnmente para estudiar la exploración y la locomoción, dos de los componentes más importantes de la actividad espontánea en roedores (Binukumar *et al.*, 2010) y que depende de las habilidades motoras y la motivación (Carvalho *et al.*, 2013). La actividad horizontal se ha encontrado disminuida en ratas tratadas con pesticidas organofosforados que causan degeneración nigro-estriatal (Binukumar *et al.*, 2010) así como en ratones tratados con paraquat y 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) (Ren *et al.*, 2009). En correspondencia con estos resultados, el grupo tratado con BSO mostró una disminución de la exploración horizontal y vertical lo que junto a un mayor tiempo en reposo, sugiere un deterioro en la actividad locomotora espontánea (Fig. 9).

La prueba de reconocimiento de objetos evalúa fundamentalmente la memoria asociativa, pues requiere que el sujeto experimental establezca una asociación entre un objeto y el lugar en el que estuvo situado previamente. Tiene la ventaja de no requerir reforzamiento ni largos

periodos de entrenamiento; y en ratas se ha utilizado ampliamente para evaluar la función cognitiva en modelos de esquizofrenia, adicción a drogas y deterioro cognitivo leve (Barker y Warburton, 2015). En este modelo, utilizamos esta prueba para evaluar si la inyección de BSO afecta las tareas cognitivas en estos animales, puesto que en pacientes con EP también se han descrito alteraciones de la memoria asociativa (MacDonald *et al.*, 2013).

Los ratas con administración BSO mostraron una menor exploración de todos los objetos con respecto a los grupos controles; sin embargo el ID no mostró diferencias entre los grupos experimentales (Fig.10). Este resultado es consistente con un déficit motor y una función de memoria intacta, puesto que se ha reportado que las alteraciones cognitivas están asociadas a una menor discriminación del objeto novedoso pero un tiempo de exploración similar a los grupos controles, a lo que subyace una alteración en el sistema colinérgico (Magen *et al.*, 2012). Las afectaciones en la discriminación de objetos se han asociado también con alteraciones en las proyecciones dopaminérgicas hacia el núcleo *acumbens* del estriado (Nelson *et al.*, 2010) que recibe aferencias fundamentalmente del área tegmental ventral (Darvas y Palmiter, 2010). Nuestros resultados coinciden con el estudio de Darvas (2014) que no encontró déficit de memoria en animales con una pérdida leve de dopamina en el estriado dorsal.

La prueba de las habilidades motoras anteriores (escalera) requiere que el sujeto experimental alcance trozos de comida ubicados en escalones descendentes. Los trozos de comida se ubican a diferentes distancias y las ratas deben usar ambas extremidades (Whishaw *et al.*, 1997). Esta prueba evalúa un daño en la función motora fina. El número de trozos de comida recuperado

mide la capacidad del animal de agarrar mientras que el nivel alcanzado en la escalerilla indica la habilidad para alcanzar o cambiar de lugar los trozos (Soleman *et al.*, 2010).

En el presente trabajo no se encontraron diferencias significativas en la ejecución de esta prueba en el grupo BSO comparado con los grupos controles (Figs. 11 y 12). Estos resultados contrastan con los encontrados en ratas hemi-parkinsonizadas en las que se ha reportado una pobre ejecución con la extremidad contralateral a la inyección de 6-OHDA. Sin embargo, se debe tener en cuenta que esta neurotoxina provoca la muerte selectiva y casi completa de las neuronas dopaminérgicas en la SNpc y la vía nigro-estriatal (Antala *et al.*, 2012).

Por otra parte, el efecto del entrenamiento antes de la inyección de BSO no debe ser descartado en el resultado obtenido en este paradigma conductual. Este tipo de prueba ha sido utilizada para investigar la neurobiología de la adquisición de habilidades y la naturaleza del “plan motor” (Klein *et al.*, 2012) ya que el éxito en las mismas requiere precisamente de la adquisición adecuada de habilidades motoras (Plowman *et al.*, 2014). Una vez que esto ocurre el plan motor se desarrolla de forma automática. Los núcleos basales son importantes no solo para la iniciación y mantenimiento del movimiento sino también para el aprendizaje de procedimientos (Torres *et al.*, 2011). Se ha encontrado que en ratas previamente entrenadas, la eliminación de las terminales dopaminérgicas en la corteza motora no afecta la ejecución de este tipo de tareas (Molina-Luna *et al.*, 2009).

En la prueba de estimulación táctil bilateral los sujetos experimentales con administración de BSO demoraron más tiempo en retirar el estímulo táctil en la extremidad contralateral a la inyección de BSO, lo que también sugiere una disfunción motora (Fig.13). Esta prueba examina la capacidad propioceptiva del animal y el componente motivacional de la acinesia, y es

sensible a una disminución sutil de dopamina (Meredith y Kang, 2006). El componente motor se evalúa a partir del tiempo demorado en retirar los parches (Schallert, 2006). Los resultados de un estudio en el que se emplearon dosis graduales de la neurotoxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA) en ratas mostraron que es posible encontrar cambios motores moderados aun cuando la muerte de las células dopaminérgicas es menor del 35% (Truong *et al.*, 2006).

En la prueba de la barra transversal otros autores señalan que ratones tratados con MPTP cuyos estudios morfológicos revelaron signos de degeneración nigro-estriatal demoraron más tiempo que los controles en cruzar la barra transversal (Patki *et al.*, 2009). Así mismo, en ratas lesionadas con 6-OHDA es posible encontrar una disfunción en el equilibrio y la postura incluso cuando la muerte de células dopaminérgicas es sólo del 40% (Truong *et al.*, 2006).

Contrario a estos resultados, nuestro estudio mostró que los sujetos del grupo BSO no presentaron diferencias en alcanzar el éxito de la prueba. Sin embargo, los sujetos lesionados con la BSO mostraron una disminución de la distancia recorrida en la barra respecto a las ratas sanas y vehículo lo que está en correspondencia con la observación de que estas últimas mostraron una tendencia a explorar la barra antes de dirigirse a la plataforma. Por el contrario, los sujetos del grupo BSO disminuyeron su actividad exploratoria en la barra lo cual pudiera estar relacionado con una estrategia para compensar el daño motor (Fig. 14). Este resultado es consistente con el de la prueba de actividad espontánea y aunque pudiera estar relacionado con procesos de aprendizaje (Meredith y Kang, 2006), la prueba de discriminación de objetos permitió descartar estos elementos en el presente modelo.

Los resultados conductuales aquí mostrados sugieren que la disminución transitoria de la concentración de GSH conduce a alteraciones en la conducta motora de ratas. Sin embargo,

se recomienda para futuros trabajos explorar otras modalidades como la marcha, también afectada en la EP y evaluar otras ventanas temporales para precisar si las alteraciones aquí mostradas se mantienen, mejoran o empeoran con el tiempo, lo que permitiría un mejor acercamiento a los síntomas y evolución temporal de la EP.

3. Cambios en la expresión de genes relacionados con la plasticidad del sistema nigroestriatal producto de la disminución de la concentración de GSH nigral.

La dopamina es crítica para la inducción de plasticidad estriatal a largo plazo; por ejemplo, potenciación y depresión a largo plazo mediadas por la activación de los receptores ionotrópicos de glutamato, α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazoepropionato y N-metil-D-aspartato, en la neurona espinosa de talla mediana (Rylander *et al.*, 2013). La plasticidad es la capacidad de una estructura de cambiar su forma y/o su función en respuesta a circunstancias cambiantes como crecimiento y desarrollo, o enfermedad, o trauma (Dennis *et al.*, 2013). La pérdida de la inervación dopaminérgica al EST causa un desbalance en los circuitos motores que estimulan o inhiben la iniciación del movimiento. En la EP, la pérdida del control dopaminérgico conduce a una hiperactividad de la vía inhibitoria que induce la bradicinesia (Rangel-Barajas *et al.*, 2015).

La activación de los receptores de la familia D₁ y la familia D₂ produce efectos opuestos en la cascada de señalización intracelular y la fisiología celular. Una función neurológica normal requiere un balance fisiológico entre la actividad de estos dos receptores, el cual es alterado en la EP y en una variedad de desórdenes neuro-psiquiátricos como la depresión, la esquizofrenia y la dependencia de drogas (Araki *et al.*, 2007). Por ello el estudio de la

abundancia relativa de estos receptores en la vía nigro-estriatal es importante para comprender el efecto de la disminución transitoria de la concentración de GSH nigral sobre este sistema neural.

Los receptores de la familia D₁ se expresan predominantemente en la membrana postsináptica mientras que los receptores de la familia D₂ aparecen en la membrana postsináptica, y en el área presináptica de la neurona dopaminérgica como autorreceptor (Boyd y Mailman, 2012). Siguiendo este criterio, se estudió la expresión del ARNm de los receptores D₁ y D₂ en el EST, y el receptor D₂ en la SNpc a los 7 días posteriores al tratamiento con BSO, en correspondencia con la evaluación conductual.

En modelos de EP en ratas, se ha descrito que la pérdida de la inervación dopaminérgica al estriado se acompaña de un aumento en la expresión del ARNm del receptor D₂ junto a una disminución del ARNm del receptor D₁ en esta área (Azdad *et al.*, 2009). El presente trabajo mostró que la disminución transitoria de la concentración de GSH nigral induce un incremento del ARNm del receptor D₂ aunque no se encontraron cambios en la expresión génica del receptor D₁ en el EST (Fig. 15). Este resultado sugiere que la sobre-expresión de los receptores tipo D₂ pudiera preceder las alteraciones en la expresión de los receptores de la familia D₁, en correspondencia con hallazgos previos que sugieren que el incremento en el ARNm del receptor D₂ ocurre en etapas tempranas en la EP (Gerfen *et al.*, 1990). La sobre-activación del receptor D₂ en el estriado pudiera relacionarse con una hiperactividad de la “vía indirecta” que suprime el movimiento, lo que sustenta a nivel molecular y celular las alteraciones motoras encontradas en este modelo.

Al mismo tiempo, se encontró una disminución en la expresión génica del autorreceptor D₂ en la SNpc (Fig. 15). La activación de estos autorreceptores provee una retroalimentación negativa que controla la descarga de la célula, y la síntesis, liberación y recaptura del neurotransmisor (Ford, 2014). Por tanto, este resultado sugiere de manera indirecta una pérdida de células dopaminérgicas y como mecanismo de compensación, una represión a nivel génico que disminuye la retro-inhibición dependiente de D₂, y favorece una mayor síntesis y liberación de DA por las neuronas remanentes (Baik *et al.*, 1995).

La plasticidad sináptica requiere la expresión génica *de novo* y la síntesis de proteínas para el desarrollo de modificaciones duraderas y cambios a largo plazo en la conducta (Rosi, 2011).

Previamente se ha indicado que bajas concentraciones de GSH puede deteriorar los mecanismos de plasticidad sináptica a corto y largo plazo (Almaguer-Melian *et al.*, 2000); sin embargo este tema permanece prácticamente inexplorado. En el presente trabajo se estudió la expresión de los genes que codifican para el BDNF y el Arc, ambos relacionados con la plasticidad neuronal (Almaguer-Melian *et al.*, 2015) en la SNpc y el EST a las 24 horas y 7 días posteriores al tratamiento con BSO.

El BDNF es un factor de crecimiento de la familia de las neurotrofinas que actúa a través de receptores tirosina quinasa tipo 2 (TrkB) (Tsiperson *et al.*, 2015). Las cascadas de señalización que subyacen a la activación de estos receptores conducen a la activación de diferentes factores de transcripción que regulan la expresión de genes codificadores de proteínas involucradas en la plasticidad neuronal, la neurogénesis, la resistencia al estrés y la supervivencia celular (Bathina y Das, 2015).

En tejidos *post-mortem* de pacientes de EP se han encontrado bajas concentraciones de BDNF tanto en la SNpc como en el EST por lo que se ha sugerido que esta neurotrofina tiene gran importancia para el mantenimiento de la homeostasis de la neurona dopaminérgica (Mogi *et al.*, 1999). Resultados similares, así como disminución en la expresión génica de BDNF han sido mostrados en los modelos experimentales clásicos de EP, 6-OHDA y MPTP (Nam *et al.*, 2015; Nie *et al.*, 2015).

En un modelo preclínico de EP realizado mediante la administración de bajas dosis de rotenona, no se encontraron cambios en la expresión del ARNm del BDNF en la SNpc (Johnson *et al.*, 2015). En correspondencia con este estudio, el análisis de la expresión del ARNm del BDNF en la SNpc no mostró diferencias en los sujetos del grupo tratado con BSO (Fig. 16), lo que sugiere que la disminución del ARNm del BDNF encontrados en la SNpc de pacientes de EP (Howells *et al.*, 2000) puede ocurrir en etapas más avanzadas del proceso neurodegenerativo. No obstante, se precisa estudiar las concentraciones de BDNF en esta estructura, que pudieran estar disminuidas producto de los cambios en el metabolismo oxidativo que pueden tener repercusión en la regulación post-transcripcional del BDNF (Ferreira *et al.*, 2014).

Además, el BDNF sintetizado en la SNpc es transportado anterógradamente hacia el EST a través de los axones nigro-estriatales (Murer *et al.*, 2001). La expresión del ARNm del BDNF en el EST es baja en condiciones fisiológicas (Baydyuk y Xu, 2014) aunque puede ser inducida en determinadas condiciones como daño estriatal o estimulación con agonistas dopaminérgicos (Murer *et al.*, 2001; Baydyuk y Xu, 2014). La disminución del soporte trófico al EST, o los

cambios en la transmisión dopaminérgica, pudieran explicar la sobre-expresión del ARNm del BDNF en esta estructura en los animales tratados con BSO (Fig.16).

El BDNF media procesos de reorganización sináptica incluyendo la formación y el mantenimiento de las espinas dendríticas (Baydyuk y Xu, 2014); lo cual pudiera ocurrir ante la pérdida de la inervación dopaminérgica en las ratas tratadas con BSO. Además, se ha observado una relación entre la señalización del BDNF y la activación de las neuronas espinosas de talla mediana de la vía indirecta (Besusso *et al.*, 2013).

El BDNF sintetizado en el EST pudiera actuar por mecanismos autocrinos como ha sido demostrado en neuronas hipocampales (Wang *et al.*, 2015) y activar los receptores TrkB. Las señales intracelulares mediadas por el receptor TrkB incluyen el incremento del Ca^{2+} intracelular, el cual media la activación de la expresión de Arc (Li *et al.*, 2015b). El Arc es necesario para el incremento del grosor de las espinas dendríticas y para los procesos de potenciación a largo plazo/depresión a largo plazo pues modula la dinámica del citoesqueleto y participa en los mecanismos de plasticidad neuronal (Korb y Finkbeiner, 2011).

Se ha observado que la neurogénesis en el giro dentado del hipocampo requiere de la síntesis de Arc (Kuipers *et al.*, 2016). Además, la activación de los receptores metabotrópicos de glutamato intracelulares en el EST conduce a la sobre-expresión del Arc, lo cual es relevante para la transmisión sináptica sostenida en esta estructura (Kumar *et al.*, 2012b). Sin embargo, la activación del Arc también ha sido relacionada con formas de plasticidad mal adaptativas como las discinesias inducidas por levodopa (Sgambato-Faure *et al.*, 2005). El análisis de la expresión del Arc en el presente modelo no mostró diferencias en los sujetos tratados con BSO comparado con los controles en la SNpc (Fig.16); sin embargo, se observó una sobre-expresión

en el EST de las ratas tratadas con BSO en los dos tiempos estudiados. Este resultado estuvo en correspondencia con la expresión del BDNF en ambas estructuras.

El incremento observado en la expresión del D₂ unido a la sobre-expresión del Arc sugiere que el tratamiento con BSO en la SNpc induce cambios plásticos en las neuronas estriatales. Es conocido que la disminución de la liberación dopamina de la SNpc induce potenciación a largo plazo en las neuronas espinosas de talla mediana estriato-palidales y remodelación sináptica, lo que constituye un cambio dependiente de actividad (Surmeier *et al.*, 2010). Por tanto, se requieren estudios posteriores para verificar si la disminución del GSH nigral provoca cambios en la actividad eléctrica intrínseca del EST.

4. Pérdida de neuronas dopaminérgicas como consecuencia de la disminución transitoria de la concentración de GSH en la SNpc.

Las neuronas dopaminérgicas de la SNpc reciben aferencia de varias estructuras en el diencéfalo y el telencéfalo y proyectan fundamentalmente al estriado. La vía nigro-estriatal participa en el control de los movimientos voluntarios y su degeneración resulta en los trastornos motores característicos de la EP (Thuret *et al.*, 2004).

Los estudios acerca de la deficiencia de GSH como factor etiológico en la degeneración de la SNpc muestran resultados heterogéneos. En cultivo mixto de neuronas y células gliales tratadas con BSO se observó una disminución del número de células positivas a la TH, un incremento de las células en apoptosis y activación glial (De Bernardo *et al.*, 2004). Además, se ha reportado también que la disminución parcial y transitoria de GSH induce tanto necrosis como apoptosis en células PC12 (Dasgupta *et al.*, 2012).

La limitación fundamental del estudio en cultivo es que se elimina la influencia trófica de las células diana a las neuronas dopaminérgicas necesaria para la formación de sus procesos axonales (Nakamura *et al.*, 2000a). Estudios *in vivo* demostraron que la disminución en la concentración de GSH que sigue a la infusión crónica de BSO en el ventrículo lateral del cerebro de ratas no causa daño a la vía nigro-estriatal (Toffa *et al.*, 1997) pero puede resultar en muerte celular si el sistema se encuentra metabólicamente comprometido, como ocurre cuando la BSO se inyecta en combinación con MPTP/MPP⁺(Wullner *et al.*, 1996).

Aunque la BSO no afecta específicamente las células dopaminérgicas como hace la toxina 6-OHDA (Gerlach y Riederer, 1996) y no ocasiona una muerte total de este tipo celular en la SNpc, el resultado de nuestro estudio morfológico reveló una escasa tinción de células neuronales en secciones que coincidentemente mostraron menor inmunoreactividad a la enzima TH (Fig. 17). Dichas secciones coronales pertenecen a cerebros extraídos del grupo de ratas tratadas con BSO que simultáneamente mostraron disfunción motora. Esta disminución en el número de células dopaminérgicas es comparable a una pequeña lesión (4μg) con 6-OHDA, como fue anteriormente mostrado por Truong *et al.* (2006).

Estos resultados coinciden con lo reportado por Garrido y colaboradores (2011) que señalaron degeneración de la SNpc y moderada astrogliosis debido a la inhibición de la síntesis del GSH. Sorprendentemente, estos autores también mostraron que la sobre-expresión de la γ-glutamil-cisteína sintetasa también puede iniciar la degeneración de las células dopaminérgicas, lo que sugiere que el metabolismo del GSH debe ser finamente controlado (Garrido *et al.*, 2011).

Por otra parte, en el presente trabajo se observaron células positivas al ensayo TUNEL y tinción nuclear con YP en el grupo tratado con BSO, lo cual es característico tanto de la apoptosis tardía como de la necrosis. El ensayo de TUNEL es usado como marcador de fragmentación nuclear mientras que el YP es utilizado para evaluar la permeabilidad de la membrana teniendo en cuenta que las membranas de las células vivas son impermeables a este colorante (Wlodkowic *et al.*, 2012).

No obstante, el procedimiento de tinción con YP en tejidos fijados con paraformaldehído seguido por la permeabilización de la membrana antes del procedimiento de tinción, permite observar los núcleos picnóticos de neuronas en proceso de muerte así como cuerpos celulares de células viables. De esta forma, es posible utilizar el YP para observar la citoarquitectura celular donde las neuronas se tiñen de forma predominante en el citoplasma mientras que en las células gliales predomina la tinción del núcleo con una escasa tinción de sus respectivos cuerpos celulares (Hezel *et al.*, 2012). Teniendo en cuenta estas consideraciones, se precisan más estudios de muerte celular en este modelo, que permitan dilucidar el proceso de muerte celular (apoptosis o necrosis) involucrado.

5. Cambios en los indicadores de estrés oxidativo producidos por la disminución transitoria de la concentración de GSH nigral.

El GSH es el antioxidante más abundante y efectivo en las células de los mamíferos (Dalton *et al.*, 2004). Debido a que la vía nigro-estriatal es rica en dopamina, se ha propuesto que la oxidación de este neurotransmisor pudiera influir en la disminución de la concentración de GSH mediante la interacción del GSH con las quinonas (Barnham y Bush, 2014). La disminución

del GSH puede resultar en una significativa inhibición de la actividad del complejo I mitocondrial mediada por NO, así como en una reducción de la actividad del complejo II y de la producción de ATP, lo que deviene en un aumento en la generación de ERO (Hsu *et al.*, 2005).

Entre todas las disfunciones mitocondriales descritas en las enfermedades neurodegenerativas, la deficiencia del complejo I parece ser relativamente específica de la EP (Hoepken *et al.*, 2007).

Nuestros resultados revelan que 24h después de la administración intranigral de BSO se produce una disminución de la concentración de GSH tanto en la SNpc como en el EST. Siete días después del tratamiento con BSO la concentración de GSH en la SNpc se encontró restablecida, no así en el EST que, aunque con tendencia al incremento, se mantuvo disminuida (Fig. 8). En conjunto, estos resultados muestran una menor capacidad antioxidante en ambas estructuras, por lo que debería generarse una respuesta compensatoria.

La eliminación rápida de ERO ocurre por la combinación de enzimas antioxidantes con una alta actividad catalítica, tales como la SOD, la CAT y la GPx (Groitl y Jakob, 2014). Los estudios acerca de los efectos de la disminución de GSH sobre las enzimas antioxidantes no han aportado resultados homogéneos. A este hecho contribuyen, en los experimentos realizados en modelos animales, las variaciones en cuanto a la especie, la raza, el sexo, las edades comparadas y el área cerebral seleccionada (González *et al.*, 2007).

Aunque en el presente estudio no se determinó la actividad de la SOD, en células Ht22 (derivadas del hipocampo de ratón) esta enzima ha respondido a la disminución del GSH de manera dependiente de la dosis de BSO (Chen *et al.*, 2005). Sin embargo, en estudios previos como el de Rougemont y colaboradores (Rougemont *et al.*, 2002) no se obtuvo la respuesta

compensatoria esperada de la GPx como resultado del incremento del H₂O₂ producido por la SOD. En correspondencia con este resultado, en el presente trabajo no se encontraron cambios en la actividad de las enzimas GPx y GRD ni en el EST ni en la SNpc luego de la administración de BSO (Fig. 18). Asimismo la literatura señala que en la SNpc de pacientes parkinsonianos la GPx tampoco se encuentra alterada (Sian *et al.*, 1994b).

La GPx utiliza el GSH como donador de electrones para catalizar la reducción del H₂O₂ e hidroperóxidos provenientes de la peroxidación lipídica y el metabolismo eicosanoide (Liddell *et al.*, 2006). El equilibrio entre el GSH y su forma oxidada (GSSG) es esencial para preservar el ambiente reductor citosólico (Brandes *et al.*, 2009) de ahí que es probable que la activación de la GPx dependa más de la concentración de reserva del GSH que de la cantidad de H₂O₂ generado.

La ausencia de cambios en la actividad de la GPx también pudiera atribuirse a una inhibición regulatoria y/o expresión de la actividad de la enzima que permita conservar la homeostasis redox al reducir el consumo de sulfidrilos por la reacción de la GPx (Cruz-Aguado *et al.*, 2001). Se ha planteado que la GPx presenta limitaciones en su actividad antioxidante como inestabilidad y escasa disponibilidad (Lv *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2005) y la disminución de la concentración de GSH puede provocar toxicidad neuronal de manera independiente a la GPx (Nakamura *et al.*, 2000b). En nuestro trabajo tampoco se encontraron cambios en la actividad de la GRD en las estructuras estudiadas lo que está en correspondencia con un bajo consumo del GSH en la reacción de la GPx en ambas estructuras.

En el presente estudio, la actividad de la CAT aumentó en la SNpc a las 24 horas y luego se restableció a los 7 días mientras que en el estriado no presentó ningún cambio (Fig.19). Aunque

se ha sugerido que la GPx tiene un papel más importante en el SNC, la CAT tiene una alta capacidad catalítica y baja afinidad por el sustrato, por lo que se requieren altas concentraciones de H₂O₂ para una actividad máxima (Jimenez-Martin *et al.*, 2015). La actividad de la CAT también es variable y al parecer específica de cada área cerebral y del tipo de daño ocasionado al tejido. En ratas envejecidas la actividad de la CAT disminuye en corteza y *septum* mientras que en el hipocampo y el EST aumenta (González *et al.*, 2007); sin embargo, en modelos de hipoxia (Castano Guerrero *et al.*, 2013; García *et al.*, 2008) y en ratas en desarrollo tratadas con BSO (Rougemont *et al.*, 2002) la actividad de esta enzima no sufre cambios.

La activación de la CAT en la SNpc a las 24 horas puede asociarse a un aumento del H₂O₂ por la disminución drástica del 60 % del GSH. Por otra parte, se ha reportado que en la SNpc la actividad enzimática de la CAT es mayor que la de la GPx (Avshalumov *et al.*, 2005). En el EST, es posible que la disminución del GSH (47%) no fuera suficiente para generar disfunción mitocondrial y por ello la cantidad de H₂O₂ no alcanzó el umbral necesario para activar la CAT. Sin embargo, la deficiencia de GSH puede generar estrés oxidativo y acumulación de peróxidos ya que como se ha mencionado anteriormente, el GSH es capaz de eliminar estas moléculas.

El H₂O₂ es relativamente estable en solución y puede atravesar fácilmente las membranas por difusión simple o a través de canales acuaporinos (Fisher, 2009). Su exceso en presencia de iones metálicos puede dar origen al radical OH; cuya única vía de eliminación es el continuo recambio celular de las moléculas dañadas, lo que implica que una vez que se forma esta especie, el daño celular es inminente (García *et al.*, 2008). Como consecuencia, se incrementa el daño oxidativo a las diferentes biomoléculas y aumenta la cantidad de lipoperóxidos y otros compuestos electrofílicos como aldehídos y quinonas (González *et al.*, 2007).

Según se ha planteado, cuando el GSH disminuye, el H₂O₂ producido por la monoamino oxidasa potencia la liberación de ácido araquidónico mediante la activación de la fosfolipasa A₂ de membrana. Los ácidos araquidónico, linoleico y linolénico potencian la formación de hidroperóxidos lipídicos (Higuchi, 2004). La disminución del GSH también se ha relacionado con un incremento en la recaptura del hierro en cultivo de células dopaminérgicas a partir de la traducción de la proteína transportadora. Este incremento se acompaña de un aumento en los niveles de radical OH· y es dependiente de H₂O₂ (Kaur *et al.*, 2009).

El radical OH· tiene una tiempo de vida media en el orden de los 10⁻⁹ s, no difunde a través de las membranas celulares y reacciona con las biomoléculas de su alrededor. En los ácidos grasos insaturados inicia la cadena de reacciones de la peroxidación lipídica. Como la mayoría de los peróxidos orgánicos son inestables, especialmente en presencia de hierro, esta cadena de reacciones resulta en la formación de aldehídos, tales como el malonildialdehído (Brunk y Terman, 2002) que constituye un indicador directo del daño de las ERO a la célula.

En el presente estudio no se encontró acumulación de TBARS en la SNpc (Fig. 20), el cual se ha utilizado para estimar la concentración de malonildialdehído (Andersen *et al.*, 1996; Rougemont *et al.*, 2002), lo que puede obedecer al aumento de la CAT a las 24h de administrado la BSO. Este resultado no está en correspondencia con lo observado previamente en este tipo de modelo (Andersen *et al.*, 1996) ni estudios previos en pacientes de EP en los que se ha encontrado un incremento de los productos de peroxidación lipídica malonildialdehído y 4-hidroxinonenal tanto en sangre como en tejido nigral (Dias *et al.*, 2013).

Con relación al EST, la concentración de TBARS en los grupos vehículo y BSO fue similar al grupo sano, lo cual es consistente con la menor disminución de GSH en esta área (Fig. 20).

Este resultado sugiere que la disminución de GSH en estas condiciones experimentales no genera daño oxidativo a los lípidos, aunque se requiere determinar otros marcadores de daño como el 4-hidroxinonenanal, los isoprostanos y lipoperóxidos, aunque se ha reportado que estos últimos se acumulan sólo en las etapas avanzadas de la EP (de Farias *et al.*, 2016). Previamente se ha mostrado en ratas tratadas con 6-OHDA que la disminución de dopamina en la SNpc no está relacionada con una acumulación de los productos de peroxidación lipídica (Smith y Cass, 2007) y se ha sugerido que el proceso neurodegenerativo puede iniciarse incluso si la función mitocondrial se recupera (Patki *et al.*, 2009). Las evidencias del presente trabajo sugieren que la muerte celular observada en la SNpc de las ratas BSO pudiera ocurrir sin la presencia de daño oxidativo pero nuestro estudio tiene la limitación de que no se determinaron marcadores de daño oxidativo a las proteínas y el ADN.

Nuestros datos muestran una acumulación de NO a los 7 días posteriores a la disminución transitoria de la concentración de GSH debido a un incremento en la expresión de la iNOS en la SNpc (Fig. 21), lo cual fue mostrado por un incremento en el número de células positivas a la iNOS en el grupo tratado con BSO mientras que en el grupo sano y vehículo no se detectó inmunopositividad a esta enzima. Por su parte en el EST también se encontró un incremento de la concentración de NO pero contrario a la SNpc, no se detectaron células positivas a la iNOS, lo que sugiere que la fuente del NO estriatal encontrado es la SNpc aunque pudiera deberse también a la activación de la isoforma neuronal de la óxido nítrico sintasa, no estudiada en el presente trabajo.

La isoforma iNOS es de localización predominantemente glial y es la fuente primaria del NO derivado de la microglia como resultado de la activación microglial (Contestabile *et al.*, 2012).

IV. DISCUSIÓN

También se ha planteado que la iNOS tiene un papel clave en la activación microglial porque se ha determinado que el NO incrementa la expresión de CD11b, una β integrina específica de la microlia activa (Roy *et al.*, 2006). El NO es una molécula difusible que participa en la señalización celular en condiciones fisiológicas. Sin embargo, es capaz de reaccionar con el anion O_2^- para formar peroxinitrito, el cual es un oxidante altamente reactivo que puede reaccionar con grupos ricos en electrones tales como los grupos sulfidrilos en el sitio activo de las tirosina fosfatases (Kar y Kavdia, 2013). Se ha propuesto además, que el desbalance en el metabolismo del NO y la consecuente activación de la vía del GMP cíclico por NO, es más importante en el deterioro de la homeostasis celular que la alteración del propio sistema redox del GSH (Aquilano *et al.*, 2011).

Además se ha observado que el NO puede mediar el daño mitocondrial a través de la S-nitrosilación/nitración de proteínas mitocondriales, evento que precede la neurodegeneración progresiva de las células dopaminérgicas del sistema nigro-estriatal (Choi *et al.*, 2009). El NO también induce la translocación del factor inductor de la apoptosis (AIF, según sus siglas en inglés), el cual migra hacia el núcleo luego de la alteración de la homeostasis mitochondrial y allí participa junto con una endonucleasa G en la fragmentación nuclear (Aquilano *et al.*, 2011). Aunque la acumulación de nitrotirosina no fue determinada en nuestro estudio, los datos del presente trabajo apoyan la participación del NO en el daño tisular a la SNpc luego del tratamiento con BSO.

6. Neuroinflamación asociada a la disminución transitoria de la concentración de GSH nigral

En la SNpc de las ratas tratadas con BSO se observó un incremento en el número de células positivas a la GFAP así como hipertrofia astrocítica (Fig.22), lo que indica reactividad glial en esta área a los 7 días posteriores al tratamiento. Los astrocitos tienen un importante papel en el suministro de GSH a las neuronas, pues sintetizan y exportan GSH (Martin y Teismann, 2009). Estudios previos indican que los astrocitos son activados por el tratamiento con BSO, y son responsables de los eventos que subyacen a la disminución de la concentración de GSH y que contribuyen a la degeneración celular en cultivos que contienen células gliales (De Bernardo *et al.*, 2004; Mytilineou *et al.*, 1999). Además, en muestras de SNpc de pacientes parkinsonianos se ha observado moderada astrogliosis con una sobre-expresión de la GFAP (Gao *et al.*, 2011).

Por otra parte, en el presente estudio también se observó un incremento en las células positivas a Iba-1 (Fig. 22), lo que sugiere que un desbalance abrupto del estado redox celular puede promover la microgliosis en la SNpc, incluso si este desbalance ocurre de manera transitoria. Este resultado está en correspondencia con datos previos que demuestran que los cambios en la concentración de GSH alteran el proceso de activación microglial (Rekha y Selvakumar, 2014).

La transición del estado de microglia en reposo a una microglia activa y fagocítica fue mostrado también previamente en animales con un estrés oxidativo crónico inducido por exposición diaria a dosis de 0,25 ppm de ozono durante 4 horas. Este estudio también mostró que este

cambio correlaciona con una alteración en la expresión del factor de transcripción NF-κB y degeneración en la SNpc (Rivas-Arancibia *et al.*, 2015).

La activación de la microglia se ha descrito en la SNpc de pacientes con EP, aunque también ha sido documentada en otras áreas. Por otra parte, se ha encontrado microglia activada en ratones y primates tratados con MPTP así como en modelos de 6-OHDA en ratas. Sin embargo, no está claro si la activación de la microglia ocurre sólo en una etapa tardía de la enfermedad como consecuencia de una pérdida sustancial de neuronas, o si es un evento temprano en la progresión de la enfermedad (Fan *et al.*, 2015). No obstante, hallazgos recientes proveen evidencia de que este evento puede causar cambios funcionales como pérdida de neuronas dopaminérgicas que resultan en deterioro conductual similar a la EP (Tanaka *et al.*, 2013). Los resultados del presente trabajo apoyan la microgliosis como un evento temprano en la neurodegeneración de esta estructura.

La microglia en reposo censa el ambiente circundante y se activa cuando se enfrenta a estímulos extracelulares como patógenos, proteínas alteradas y células muertas o en proceso de muerte, que inducen la respuesta pro-inflamatoria. Una vez activa, la microglia puede regular la respuesta inflamatoria por medio de la producción de mediadores que depuran la fuente del estímulo o perpetúan el daño (Peterson y Flood, 2012).

En este modelo, el estímulo inflamatorio puede atribuirse a un incremento en la concentración de H₂O₂ en el medio, lo cual se infiere del aumento en la actividad de la CAT a las 24 horas posteriores al tratamiento con BSO. El H₂O₂ es un mensajero difusible por lo que cuando se incrementa su nivel rápidamente puede escapar de las defensas antioxidantes intracelulares y afectar a las células vecinas (Whitton, 2007).

Evidencias recientes implican al H₂O₂ como una molécula de señalización intra e intercelular que influye en muchos procesos celulares incluyendo la actividad neuronal, la función de los organelos, la señalización neurona-glia y la comunicación interneuronal (Katsu *et al.*, 2010). El mecanismo incluye la oxidación de residuos de Cys dentro de proteínas como las MAP quinasas mediada por el H₂O₂ (Schieber y Chandel, 2014). El H₂O₂ ha sido propuesto también como un modulador de la activación microglial, y se ha demostrado que la expresión de CD11b es inducida por el tratamiento con H₂O₂ en cultivo celular (Hasel *et al.*, 2014). No obstante, otros estudios son necesarios para determinar el mecanismo involucrado en la activación microglial en este modelo.

El papel de los astrocitos y la microglia elaborando tanto respuestas proinflamatorias como antiinflamatorias y la modulación recíproca entre la microglia y los astrocitos en la gliosis reactiva ha sido extensamente revisado (Gao *et al.*, 2013). Previamente se mostró que la degeneración dopaminérgica se asocia a una polarización gradual de la microglia hacia un fenotipo proinflamatorio que predomina sobre el fenotipo antiinflamatorio en un modelo crónico de EP inducido con MPTP (Pisanu *et al.*, 2014). Para determinar la naturaleza antiinflamatoria o proinflamatoria de la gliosis en este modelo, se determinaron las concentraciones tisulares de las citocinas TNF-α, IL-10, IL-1β and IL-6 luego del tratamiento con BSO.

La IL-10 es una citocina antiinflamatoria cuya fuente en el cerebro es la microglia y cuyo efecto biológico es limitar la inflamación en el SNC. La IL-10 inhibe la liberación de mediadores proinflamatorios, inhibe la presentación antigénica y regula la fagocitosis (Koscsó *et al.*, 2012).

Se ha sugerido que ratas con una sobre-expresión de IL-10 en el sistema nigro-estriatal tienen

menor susceptibilidad a la neurodegeneración inducida por 6-OHDA (Latorre *et al.*, 2014). En el presente trabajo la concentración de IL-10 no se modificó ni a las 24 horas ni a los 7 días posteriores al tratamiento tanto en la SNpc como el EST (Fig. 23), lo que sugiere la ausencia de una respuesta antiinflamatoria en los animales tratados con BSO.

Con respecto a los niveles de TNF- α , en la SNpc se observó un ligero incremento a las 24 horas posteriores al tratamiento con BSO que corresponde al momento en que se encontraron disminuidos los niveles de GSH en el grupo tratado con BSO, mientras que aumentó significativamente a los 7 días (Fig. 24), cuando la concentración de GSH se restableció respecto a los controles. Este resultado sugiere que el proceso inflamatorio puede ser secundario a la disminución de la concentración de GSH y durar más tiempo y de una forma independiente al GSH. La ausencia de cambios en el EST sugiere que la disminución en la concentración de GSH en esta área no fue suficiente para generar una respuesta inflamatoria.

El TNF- α es un importante mediador de la inflamación que regula la producción de citocinas en las células inmunes. Entre sus efectos biológicos se le atribuyen la activación de la apoptosis a través de la caspasa 8 y JNK (Han *et al.*, 2009). Basados en el resultado del TNF- α , se estudiaron los niveles de IL-1 β e IL-6 a los 7 días posteriores al tratamiento con BSO para comprobar el proceso proinflamatorio en la SNpc y ambas citocinas se encontraron elevadas (Fig. 25).

La IL-1 β es una potente citocina proinflamatoria cuyos receptores se han encontrado en numerosos tipos celulares, incluidas las neuronas y la microglia (Koprich *et al.*, 2008). La IL-1 β fue involucrada en la degeneración de la SN a partir del hallazgo de que el déficit conductual que sigue al tratamiento subagudo con lipopolisacárido no ocurre en ratones con expresión

nula de IL-1 β , junto con el hecho de que este tratamiento atenúa la expresión del gen de la TH en ratones con fenotipo salvaje pero no en animales que no expresan la IL-1 β (Tanaka *et al.*, 2013).

Tanto el TNF- α como la IL-1 β pueden inducir IL-6, cuyos efectos se han descrito que pueden ser beneficiosos pero también dañinos para las células del SNC (Erta *et al.*, 2012). Aunque la sobreexpresión de IL-6 generalmente es perjudicial y puede ser un factor patogénico en muchas enfermedades del SNC, algunos estudios han indicado que también pudiera tener un papel neuroprotector en el sistema nigro-estriatal (Ciesielska *et al.*, 2003). De hecho, se ha sugerido que la IL-6 puede contribuir a la resistencia al MPTP, teniendo en cuenta que en ratones insensibles al MPTP se han encontrado altos niveles del mRNA de la IL-6 (Pattarini *et al.*, 2007).

Los altos niveles de citocinas encontrados indican la naturaleza proinflamatoria de la activación glial en este modelo como un evento que subyace a la disminución aguda de la concentración de GSH pero que puede ocurrir a largo plazo. Para esclarecer este fenómeno se estudió la expresión del ARNm que codifica para las citocinas proinflamatorias. Se encontró que la expresión de los genes del TNF- α , IL-1 β e IL-6 aumentó a las 24 horas posteriores al tratamiento con BSO (Fig. 26), lo que sugiere que la disminución de la concentración de GSH celular constituye un estímulo proinflamatorio. De las citocinas estudiadas, la sobre-expresión del gen de la IL-6 a los 7 días está en correspondencia con un estudio previo que sugirió una respuesta más prolongada de esta citocina al estímulo (Everhardt *et al.*, 2016). De conjunto, estos resultados están en correspondencia con estudios previos en animales tratados con MPTP y 6-

OHDA que muestran el papel central de la neuroinflamación en el proceso neurodegenerativo nigro-estriatal (Ciesielska *et al.*, 2003).

El papel del GSH en la apoptosis no está bien establecido y depende en gran medida del tipo celular. Se ha encontrado que el desbalance GSH/GSSG precede la pérdida de la integridad mitocondrial, la liberación de citocromo C y la activación de las caspasas. Estos eventos ocurren en corto tiempo y la recuperación del GSH no impide la apoptosis, lo que indica que la modificación de la señalización redox ocurre de manera temprana (Circu y Yee, 2008).

La disminución del GSH puede activar las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK2, de sus siglas en inglés) que a su vez activan factores de transcripción como el Nrf-2 y el NF-κB, los cuales están involucrados en la respuesta antioxidante (Ramirez-Latorre, 2012). La activación de las ERK puede tener un papel dual en la supervivencia y muerte celular y parece ser un factor crítico en la muerte neuronal inducida por la disminución del GSH (De Bernardo *et al.*, 2004).

El estudio de la vía de la JNK mostró que esta quinasa se activa desde las 24 horas siguientes al tratamiento con BSO y que permanece activa a los 7 días en el grupo tratado respecto a los grupos vehículo y sano (Fig. 27). Este resultado es consistente con el proceso de muerte celular encontrado en los animales del grupo BSO y sugiere un proceso de apoptosis relacionado directamente con la disminución en la concentración de GSH. JNK es una importante quinasa que responde al estrés, cuya fosforilación es necesaria para activar factores de transcripción que activan la expresión de genes pro-apoptóticos (Li *et al.*, 2015a). JNK es activada por una variedad de estímulos incluyendo la activación del receptor TNF (Han *et al.*, 2009) y cambios en el balance redox. Este último está mediado por la tiorredoxina, la cual en su forma reducida

inhibe la actividad de la kinasa reguladora de señales de apoptosis (ASK-1). Cuando los residuos de la tiorredoxina son oxidados, se disocia el complejo tiorredoxina-ASK, lo cual conduce a la fosforilación y activación de JNK (Garcia-Garcia *et al.*, 2012). En el presente modelo, esta parece ser la vía más probable de activación de JNK, lo cual ocurrió antes del incremento de TNF- α . De este modo, el incremento en los niveles de las citocinas proinflamatorias y la posible regulación a la alta de sus vías de señalización pudieran exacerbar la degeneración nigral iniciada por la inhibición de la síntesis de GSH.

7. Consideraciones finales

Los resultados del presente trabajo sugieren que la disminución transitoria de la concentración de GSH nigral puede conducir a la disfunción de esta estructura mediante ruptura de la señalización redox y procesos de neuroinflamación (Fig. 28).

La administración de BSO en la SNpc afectó la concentración de GSH en la SNpc y en el EST, probablemente debido a la conexión anatómica entre ambas estructuras; esta condición puede generar un desbalance oxidativo a favor de la acumulación de ERO y ERN. Aunque la disminución de la concentración de GSH no generó una respuesta compensatoria en las enzimas relacionadas con el metabolismo del GSH si desencadenó un aumento de la actividad enzimática de la CAT en la SNpc pero no en el EST. La CAT es una enzima que responde a altas cantidades de H₂O₂ y su aumento en la SNpc pero no en el EST puede estar relacionado con una menor afectación de la concentración de GSH en esta última estructura. El aumento en la actividad enzimática de la CAT representa un mecanismo compensatorio celular al incremento

de las ERO, las cuales ocasionan daño a los lípidos, a las proteínas y el ADN y pueden activar cascadas de señalización relacionadas con la muerte celular.

El hecho de que no se observara una acumulación de malonildialdehído pero si una activación de la vía de la JNK, sugiere que las modificaciones en la señalización redox pueden conducir a la muerte celular por apoptosis. Las ERO/ERN median la activación, a través de la señalización redox, de factores de transcripción que desencadenan los procesos de neuroinflamación. Aunque en este estudio no fueron determinados los factores de transcripción, si se observó un aumento en la expresión en los genes que codifican para las citocinas proinflamatorias TNF- α , IL-1 β e IL-6 desde las 24 horas posteriores al tratamiento con BSO, con el respectivo incremento de las concentraciones de estas citocinas a los 7 días. La respuesta inflamatoria en el SNC está confinada fundamentalmente a la microglia y los astrocitos, cuya reactividad se incrementó con el tratamiento con BSO. La activación de la microglia trae como consecuencia la expresión de iNOS y el aumento en las concentraciones de NO, que puede contribuir a la disfunción proteica por modificación de los residuos de tirosina.

La ruptura de la señalización redox, exacerbada por los efectos deletéreos de las citocinas pudo conducir a la muerte celular y la disfunción de la SNpc en este modelo. La disfunción nigral provocó en el EST cambios plásticos como el incremento en la expresión del receptor dopaminérgico D₂ y el Arc, que sugieren hiperactividad de la “vía indirecta”.

Un aumento en la actividad intrínseca de las neuronas estriato-palidales justificaría el deterioro motor y específicamente, la disminución en la actividad locomotora observada en las ratas tratadas con BSO.

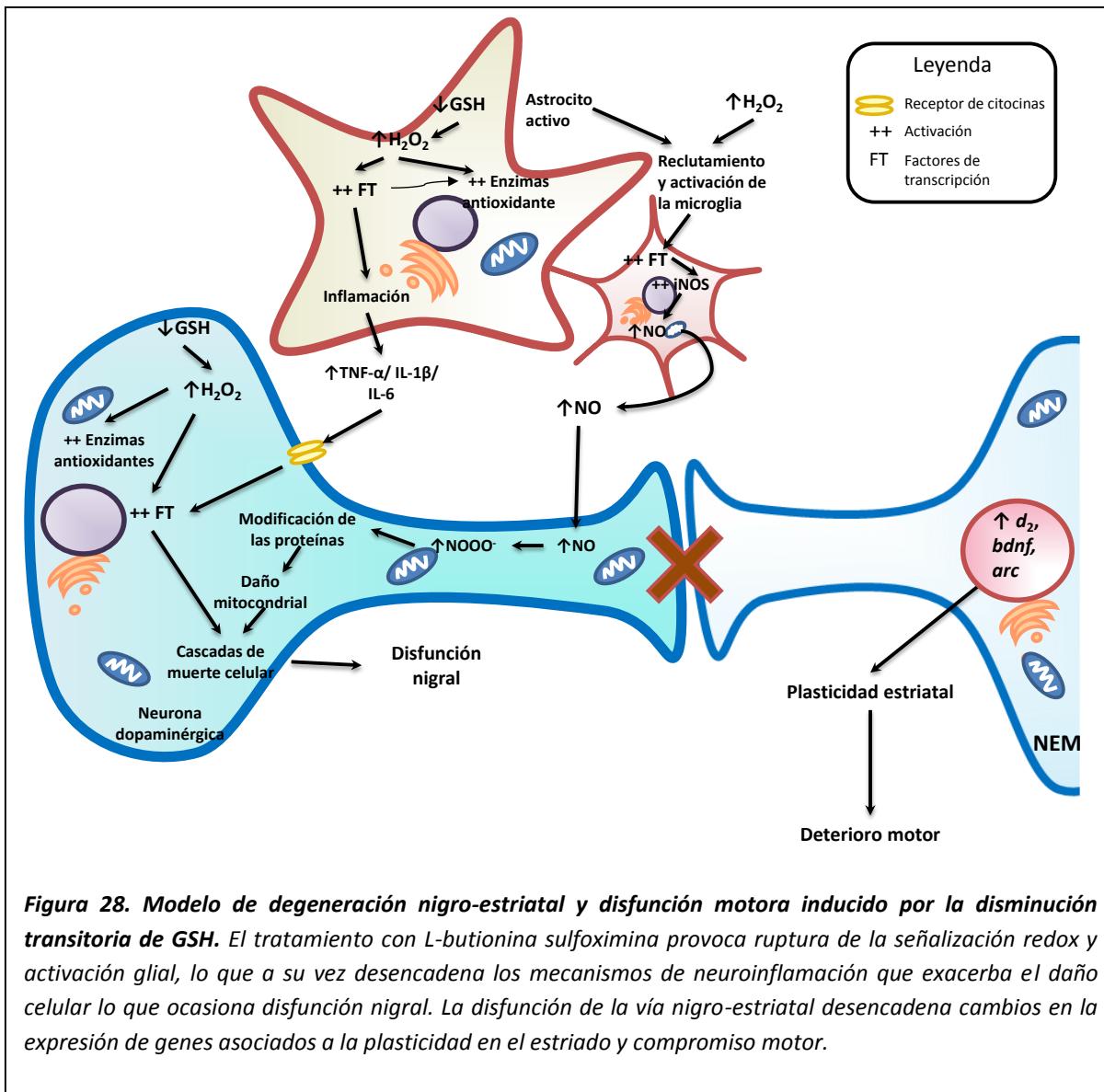


Figura 28. Modelo de degeneración nigro-estriatal y disfunción motora inducido por la disminución transitoria de GSH. El tratamiento con L-buthionina sulfoximina provoca ruptura de la señalización redox y activación glial, lo que a su vez desencadena los mecanismos de neuroinflamación que exacerbó el daño celular lo que ocasiona disfunción nigral. La disfunción de la vía nigro-estriatal desencadena cambios en la expresión de genes asociados a la plasticidad en el estriado y compromiso motor.

Conclusiones parciales

1. La administración única de L-butionina sulfoximina produce disminución transitoria de la concentración de glutatión nigral y estriatal, lo que constituye un modelo válido para estudiar la importancia de esta molécula en el Sistema Nervioso Central.
2. La disminución transitoria de la concentración de glutatión nigral produce alteraciones en la conducta motora de ratas, evidenciando la importancia de este antioxidante para el funcionamiento del sistema motor de ratas.
3. La disminución transitoria de la concentración de glutatión nigral conduce a la muerte de neuronas dopaminérgicas en esta estructura, lo cual conlleva cambios en la expresión de genes relacionados con la plasticidad del sistema nigro-estriatal.
4. La disminución transitoria de la concentración de glutatión genera una respuesta antioxidante temprana de la catalasa que evita la acumulación de productos de peroxidación lipídica pero resulta en una acumulación de óxido nítrico y alteración de la señalización redox hacia la activación de los mecanismos de apoptosis.
5. La disminución transitoria de la concentración de glutatión nigral resulta en un desbalance en los mecanismos de neuroinflamación que pueden contribuir a perpetuar el daño en esta estructura.

Conclusión general

La disminución transitoria de la concentración de GSH puede incrementar la susceptibilidad de la *substantia nigra pars compacta* a la degeneración con las

consiguientes alteraciones motoras, a través de modificaciones en la señalización redox, alteraciones en el metabolismo del óxido nítrico y neuroinflamación.

1. Evaluar la conducta motora a largo plazo en el modelo de disminución transitoria de la concentración de glutatión nigral.
2. Determinar la influencia de la disminución transitoria de glutatión nigral en la transmisión sináptica estriatal.
3. Determinar la presencia de neuroinflamación a largo plazo y su implicación en la degeneración nigral, así como activación de factores de transcripción que puedan conducir a la neuroinflamación en este modelo.
4. Determinar el efecto de la disminución crónica de la concentración de GSH nigral sobre los procesos de estrés oxidativo y neuroinflamación en el sistema nigro-estriatal.

- Aebi, H. (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol.*, 105:121-6., 121-126.
- Alex, K.D. and Pehek, E.A. (2007) Pharmacologic mechanisms of serotonergic regulation of dopamine neurotransmission. *Pharmacol Ther.*, 113, 296-320.
- Allbutt, H.N. and Henderson, J.M. (2007) Use of the narrow beam test in the rat, 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *J Neurosci Methods.*, 159, 195-202.
- Almaguer-Melian, W., Cruz-Aguado, R. and Bergado, J.A. (2000) Synaptic plasticity is impaired in rats with a low glutathione content. *Synapse.*, 38, 369-374.
- Almaguer-Melian, W., Mercerón-Martínez, D., Pavón-Fuentes, N., Alberti-Amador, E., León-Martínez, R., Ledón, N., Delgado, S., Bergado, J.A. (2015) Erythropoietin promotes neural plasticity and spatial memory recovery in fimbria-fornix-lesioned rats. *Neurorehabil. Neural Repair.*, 29, 979-988.
- Andersen, A.H., Smith, C.D., Slevin, J.T., Kryscio, R.T., Martin, C.A., Schmiitt, F.A., Blonder, X.L. (2015) Dopaminergic modulation of medial prefrontal cortex deactivation in Parkinson depression. *Parkinsons. Dis.*, 2015:513452. doi: 10.1155/2015/513452. Epub;%2015 Dec 17., 513452.
- Andersen, J.K., Mo, J.K., Hom, D.G., Lee, F.Y., Harnish, R.W., McNeill, T.H. (1996) Effect of buthionine sulfoximine, a synthesis inhibitor of the antioxidant glutathione, on the murine nigrostriatal neurons. *J Neurochem.*, 67, 2164-2171
- Angelova, P.R., Horrocks, M.H., Klenerman, D., Gandhi, S., Abramov, A.Y., Shchpinov, M.S. (2015) Lipid peroxidation is essential for alpha-synuclein-induced cell death. *J. Neurochem.*, 10.1111/jnc.13024

- Antala, B.V., Patel, M.S. Bhuva, SV, Gupta S, Rabadiya, S. and Lahkar M. (2012) Protective effect of methanolic extract of *Garcinia indica* fruits in 6-OHDA rat model of Parkinson's disease. *Indian J. Pharmacol.*, 44,683-687.
- Aoyama, K., Watabe, M. and Nakaki, T. (2008) Regulation of neuronal glutathione synthesis. *J Pharmacol Sci.*, 108, 227-238.
- Aquilano, K., Baldelli, S., Cardaci, S., Rotilio, G. and Ciriolo, M.R. (2011) Nitric oxide is the primary mediator of cytotoxicity induced by GSH depletion in neuronal cells. *J. Cell Sci.*, 124, 1043-1054.
- Araki, K.Y., Sims, J.R. and Bhide, P.G. (2007) Dopamine receptor mRNA and protein expression in the mouse corpus striatum and cerebral cortex during pre- and postnatal development. *Brain Res.*, 1156:31-45. Epub;%2007 Apr 22., 31-45.
- Avshalumov, M.V., Chen, B.T., Koos, T., Tepper, J.M. and Rice, M.E. (2005) Endogenous hydrogen peroxide regulates the excitability of midbrain dopamine neurons via ATP-sensitive potassium channels. *J Neurosci.*, 25, 4222-4231.
- Azbill, R.D., Mu, X., Bruce-Keller, A.J., Mattson, M.P. and Springer, J.E. (1997) Impaired mitochondrial function, oxidative stress and altered antioxidant enzyme activities following traumatic spinal cord injury. *Brain Res.*, 765, 283-290.
- Azdad, K., Chavez, M., Don Bishop, P., Wetzelaeer, P., Marescau, B., De Deyn, P.P., Gall, D. and Schiffmann, S.N. (2009) Homeostatic plasticity of striatal neurons intrinsic excitability following dopamine depletion. *PLoS One.*, 4, e6908.
- Baik, J.H., Picetti, R., Saiardi, A., Thriet, G., Dierich, A., Depaulis, A., LeMaur, M. and Borelli, E. (1995) Parkinsonian-like locomotor impairment in mice lacking dopamine D2 receptors. *Nature.*, 377, 424-428.

- Barker, G.R.I. and Warburton, E.C. (2015) Object-in-Place Associative Recognition Memory Depends on Glutamate Receptor Neurotransmission Within Two Defined Hippocampal-Cortical Circuits: A Critical Role for AMPA and NMDA Receptors in the Hippocampus, Perirhinal, and Prefrontal Cortices. *Cereb. Cortex.*, 25, 472-481.
- Barnham, K.J. and Bush, A.I. (2014) Biological metals and metal-targeting compounds in major neurodegenerative diseases. *Chem. Soc. Rev.*, 43, 6727-6749.
- Barth, T.M., Grant, M.L. and Schallert, T. (1990) Effects of MK-801 on recovery from sensorimotor cortex lesions. *Stroke.*, 21, III153-III157.
- Bassetti, C. (2011) Nonmotor disturbances in Parkinson's disease. *Neurodegenerative Dis.*, 8, 95-108.
- Bathina, S. and Das, U.N. (2015) Brain-derived neurotrophic factor and its clinical implications. *Arch. Med. Sci.*, 11, 1164-1178.
- Bavarsad, S.R., Harrigan, M.R. and Alexandrov, A.V. (2014) N-acetylcysteine (NAC) in neurological disorders: mechanisms of action and therapeutic opportunities. *Brain Behav.*, 4, 108-122.
- Baydyuk, M. and Xu, B. (2014) BDNF signaling and survival of striatal neurons. *Front Cell Neurosci.*, 8: doi:10.3389/fncel.2014.00254., doi.
- Benazzouz, A., Mamad, O., Abedi, P., Bouali-Benazzouz, R. and Chetrit, J. (2014) Involvement of dopamine loss in extrastriatal basal ganglia nuclei in the pathophysiology of Parkinson's disease. *Front Aging Neurosci.*, 6:87. doi: 10.3389/fnagi.2014.00087. eCollection;%2014., 87.
- Besusso, D., Geibel, M., Kramer, D., Schneider, T., Pendolino, V., Picconi, B., Calabresi, P., Bannerman, D.M. and Minichiello, L. (2013) BDNF-TrkB signaling in striatopallidal

neurons controls inhibition of locomotor behavior. *Nat. Commun.*, 4:2031. doi: 10.1038/ncomms3031., 2031.

Binukumar, B.K., Bal, A., Kandimalla, R.J. and Gill, K.D. (2010) Nigrostriatal neuronal death following chronic dichlorvos exposure: crosstalk between mitochondrial impairments, alpha synuclein aggregation, oxidative damage and behavioral changes. *Mol Brain.*, 3:35. doi: 10.1186/1756-6606-3-35., 35-3.

Biswas, S.K. (2016) Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox? *Oxid. Med. Cell Longev.*, 2016: Epub;%2016 Jan 5 doi:10.1155/2016/5698931., Epub.

Blesa, J., Phani, S., Jackson-Lewis, V. and Przedborski, S. (2012) Classic and new animal models of Parkinson's disease. *J Biomed Biotechnol.*, 2012:845618. doi: 10.1155/2012/845618. Epub;%2012 Mar 28., 845618.

Bogdanov, M., Matson, W.R, Wang, L., Matson, T., Saunders-Pullman, R., Bressman, S.S. and Flint, M. (2008). Metabolomic profiling to develop blood biomarkers for Parkinson's disease *Brain.*, 131, 389-396.

Boyd, K.N. and Mailman, R.B. (2012) Dopamine receptor signaling and current and future antipsychotic drugs. *Handb. Exp. Pharmacol.*, 53-86.

Brandes, N., Schmitt, S. and Jakob, U. (2009) Thiol-based redox switches in eukaryotic proteins. *Antioxid Redox Signal.*, 11, 997-1014.

Braun, A.A., Amos-Kroohs, R.M., Guetierrez, A., Lundgren, K.H., Seroogy, K.B., Skelton, M., Vorhees, C.V. and Williams, M.T. (2015) Dopamine depletion in either the dorsomedial or dorsolateral striatum impairs egocentric cincinnati water maze performance while sparing allocentric Morris Water Maze learning. *Neurobiol. Learn. Mem.*, 0:55-63. Epub;%2014 Nov 13 doi:10.1016/j.nlm.2014.10.009., 55-63.

- Brichta, L. and Greengard, P. (2014) Molecular determinants of selective dopaminergic vulnerability in Parkinson's disease: an update. *Front Neuroanat.*, 8:152. doi: 10.3389/fnana.2014.00152. eCollection;%2014., 152.
- Brigelius-Flohe, R. and Flohe, L. (2011) Basic principles and emerging concepts in the redox control of transcription factors. *Antioxid Redox Signal.*, 15, 2335-2381.
- Bronfeld, M. and Bar-Gad, I. (2011) Loss of specificity in Basal Ganglia related movement disorders. *Front Syst Neurosci.*, 5:38. doi: 10.3389/fnsys.2011.00038. eCollection;%2011., 38.
- Brunk, U.T. and Terman, A. (2002) The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging: accumulation of damaged mitochondria as a result of imperfect autophagocytosis. *Eur. J Biochem.*, 269, 1996-2002.
- Buege, J.A. and Aust, S.D. (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.*, 52:302-10., 302-310.
- Butterfield, D.A. (2014) The 2013 Discovery Award from the Society for Free Radical Biology and Medicine: Selected Discoveries from the Butterfield Laboratory of Oxidative Stress and Its Sequelae in Brain in Cognitive Disorders Exemplified by Alzheimer Disease and Chemotherapy Induced Cognitive Impairment. *Free Radic. Biol. Med.*, 0:157-74. Epub;%2014 Jul 1 doi:10.1016/j.freeradbiomed.2014.06.006., 157-174.
- Cacciatore, I., Baldassarre, L., Fornasari, E., Mollica, A. and Pinnen, F. (2012) Recent advances in the treatment of neurodegenerative diseases based on GSH delivery systems. *Oxid Med Cell Longev.*, 2012:240146. doi: 10.1155/2012/240146. Epub;%2012 Jun 3., 240146.
- Calabresi, P. Picconi, B, Tozzi, A., Ghiglieri, V. and Di Filippo, M. (2014) Direct and indirect pathways of basal ganglia: a critical reappraisal. *Nat. Neurosci.*, 17, 1022-1030.

- Cardenas-Rodriguez, N., Huerta-Gertrudis, B., Rivera-Espinosa, L., Montesinos-Correa, H., Bandala, C., Carmona-Apriceio, L. and Coballace-Urrutia, E. (2013) Role of oxidative stress in refractory epilepsy: evidence in patients and experimental models. *Int J Mol Sci.*, 14, 1455-1476.
- Carlberg, I. and Mannervik, B. (1975) Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J Biol Chem.*, 250, 5475-5480.
- Carvalho, M.M., Campos, F.L., Coimbra, B., Pego, J.M., Rodrigues, A.J., Sousa, N. and Salgado, A.J. (2013) Behavioral characterization of the 6-hydroxidopamine model of Parkinson's disease and pharmacological rescuing of non-motor deficits. *Mol Neurodegener.*, 8:14. doi:10.1186/1750-1326-8-14., 14-18.
- Castano Guerrero, Y., Gonzalez, M.E., Fernandez, I., Horruitiner, I. and Piedra,S. (2013) Changes in oxidative metabolism and memory and learning in an cerebral hypoperfusion model in rats. *Neurologia.*, 28, 1-8.
- Chen, J., Small-Howard, A., Yin, A. and Berry,M.J. (2005) The responses of Ht22 cells to oxidative stress induced by buthionine sulfoximine (BSO). *BMC. Neurosci.*, 6:10., 10.
- Chen, S.D., Yin, J.H., Hwang, C.S., Tang, C.M. and Yang, D.I. (2012) Anti-apoptotic and anti-oxidative mechanisms of minocycline against sphingomyelinase/ceramide neurotoxicity: implication in Alzheimer's disease and cerebral ischemia. *Free Radic. Res.*, 46, 940-950.
- Cheng, P., Alberts, I. and Li, X. (2013) The role of ERK1/2 in the regulation of proliferation and differentiation of astrocytes in developing brain. *Int. J. Dev. Neurosci.*, 31, 783-789.
- Chi, L., Ke, Y., Luo, C., Gozal, D. and Liu, R. (2007) Depletion of reduced glutathione enhances motor neuron degeneration in vitro and in vivo. *Neuroscience.*, 144, 991-1003.

- Chinta, S.J., Kumar, M.J., Hsu, M., Rajagopalan, S., Kaur, D., Rane, A., Nicholls, D.G., Choi, J. and Andersen, J.K. (2007) Inducible alterations of glutathione levels in adult dopaminergic midbrain neurons result in nigrostriatal degeneration. *J Neurosci.*, 27, 13997-14006.
- Choi, D.Y., Liu, M., Hunter, R.L., Cass, W.A., Pandya, J.D., Sullivan, P.G., Shin, E.J., Kim, H.C., Gash, D.M. and Bing, G. (2009) Striatal neuroinflammation promotes Parkinsonism in rats. *PLoS One.*, 4, e5482.
- Ciesielska, A., Joniec, I., Przybylkowski, A., Gromadzka, G., Kurkowska-Jastrzebska, I., Czlonkowska, A. and Czlonkowski, A. (2003) Dynamics of expression of the mRNA for cytokines and inducible nitric synthase in a murine model of the Parkinson's disease. *Acta Neurobiol. Exp. (Wars.)*, 63, 117-126.
- Circu, M.L. and Aw, T.Y. (2012) Glutathione and modulation of cell apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1823, 1767-1777.
- Circu, M.L. and Yee, A.T. (2008) Glutathione and apoptosis. *Free Radic. Res.*, 42, 689-706.
- Clark, J., Clore, E.L., Zheng, K., Adame, A., Masliah, E. and Simon, D.K. (2010) Oral N-acetyl-cysteine attenuates loss of dopaminergic terminals in alpha-synuclein overexpressing mice. *PLoS One.*, 5, e12333.
- Clark, J., Gebhart, G.F., Gonder, J.C., Keeling, M.E. and Kohn, D.F. (1998) The 1998 Guide for the care and use of laboratory animals: rodent. *ILAR J.*, 38, 1-35.
- de Farias, C.C., Maes, M., Bonifacio, K.L., Bortolasci, C.C., de Souza, N.A., Brinholi, F.F., Matsumoto, A.K., do Nascimento, M.A., de Melo, L.B., Nixdorf, S.L., Lavado, E.L., Moreira, E.G. and Barbosa, D.S. (2016) Highly specific changes in antioxidant levels and lipid peroxidation in Parkinson's disease and its progression: Disease and staging biomarkers and new drug targets. *Neurosci Lett*, 617, 66-71.

- Contestabile, A., Monti, B. and Polazzi, E. (2012) Neuronal-glial interactions define the role of nitric oxide in neural functional processes. *Curr. Neuropharmacol.*, 10, 303-310.
- Cruz-Aguado, R., Almaguer-Melian, W., Diaz, C.M., Lorigados, L. and Bergado,J. (2001) Behavioral and biochemical effects of glutathione depletion in the rat brain. *Brain Res Bull.*, 55, 327-333.
- Dalton, T.P., Chen, Y., Schneider, S.N., Nebert, D.W. and Shertzer, H.G.(2004) Genetically altered mice to evaluate glutathione homeostasis in health and disease. *Free Radic. Biol Med.*, 37, 1511-1526.
- Darvas, M., Henschen, C.W. and Palmiter, R.D. (2014) Contributions of signaling by dopamine neurons in dorsal striatum to cognitive behaviors corresponding to those observed in Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.*, 65:112-23. Epub;%2014 Feb 01 doi:10.1016/j.nbd.2014.01.017., 112-123.
- Darvas, M. and Palmiter, R.D. (2010) Restricting Dopaminergic Signaling to Either Dorsolateral or Medial Striatum Facilitates Cognition. *J. Neurosci.*, %20;30, 1158-1165.
- Dasgupta, A., Zheng, J. and Bizzozero, O.A. (2012) Protein carbonylation and aggregation precede neuronal apoptosis induced by partial glutathione depletion. *ASN. Neuro.*, 4, e00084.
- Dautan, D. Huerta-Ocampo, I., Witten IB, Deisseroth, K., Bolam, J.P, Gerdjikov, T. and Mena-Segovia J. (2014) A major external source of cholinergic innervation of the striatum and nucleus accumbens originates in the brainstem. *J. Neurosci.*, 34, 4509-4518.
- De Bernardo, S., Canals, S., Casarejos, M.J., Solano, R.M., Menendez, J. and Mena, M.A. (2004) Role of extracellular signal-regulated protein kinase in neuronal cell death induced by glutathione depletion in neuron/glia mesencephalic cultures. *J Neurochem.*, 91, 667-682.

- Dennis, M. Spiegler B.J., Juranek, J.J., Bigler, E.D., Snead, O.C. and Fletcher, J.M. (2013) Age, plasticity, and homeostasis in childhood brain disorders. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 37, Epub.
- Deponte, M. and Lillig, C.H. (2015) Enzymatic control of cysteinyl thiol switches in proteins. *Biol. Chem.*, 396, 401-413.
- Dias, V., Junn, E. and Mouradian, M.M. (2013) The role of oxidative stress in Parkinson's disease. *J. Parkinsons. Dis.*, 3, 461-491.
- Dirección de Registros Médicos y Estadísticas de Salud del Ministerio de Salud Pública de Cuba. Anuario estadístico de salud. 2016. La Habana. Disponible en <http://bvscuba.sld.cu/anuario-estadistico-de-cuba/> [Consultado: 17 de octubre de 2017]
- Ericsson, J. Stephenson-Jones, M., Pérez-Fernández, J., Robertson, B., Silberberg, G. and Grillner, S. (2013) Dopamine differentially modulates the excitability of striatal neurons of the direct and indirect pathways in lamprey. *J. Neurosci.*, 33, 8045-8054.
- Erta, M., Quintana, A. and Hidalgo, J. (2012) Interleukin-6, a major cytokine in the Central Nervous System. *Int. J. Biol. Sci.*, 8, 1254-1266.
- Everhardt, Q.A. Moerdyk-Schauwecker, M., McKee, L.M., Leamy, L.J. and Huet, Y.M. (2016) Differential expression of inflammatory cytokines and stress genes in male and female mice in response to a lipopolysaccharide challenge. *PLoS. One.*, 11, e0152289.
- Fan,Z., Aman Y, Ahmed I, Chetelat G, Landeau B, Ray Chaudhuri K, Brooks DJ, Edison P. (2015) Influence of microglial activation on neuronal function in Alzheimer's and Parkinson's disease dementia. *Alzheimers. Dement.*, 11, 608-621.
- Ferreira, G.K., Scaini, G., Jeremias, I.C., Carvalho-Silva, M., Goncalves, C.L., Pereira, T.C., Oliveira, G.M., Kist, L.W., Bogo, M.R., Schuck, P.F., Ferreira, G.C. and Streck, E.L.(2014)

- An evaluation of the effects of acute and chronic L-tyrosine administration on BDNF levels and BDNF mRNA expression in the rat brain. *Mol. Neurobiol.*, 49, 734-740.
- Fischer, R. and Maier, O. (2015) Interrelation of oxidative stress and inflammation in neurodegenerative disease: role of TNF. *Oxid. Med. Cell Longev.*, 2015:610813. doi: 10.1155/2015/610813. Epub;%2015 Mar 5., 610813.
- Fisher, A.B. (2009) Redox signaling across cell membranes. *Antioxid Redox Signal.*, 11, 1349-1356.
- Fitzpatrick, A.M., Jones, D.P. and Brown, L.A.S. (2012) Glutathione redox control of asthma: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid. Redox. Signal.*, 17, 375-408.
- Flohe, L. and Gunzler, W.A. (1984) Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.*, 105:114-21., 114-121.
- Ford, C.P. (2014) The role of D2-autoreceptors in regulating dopamine neuron activity and transmission. *Neuroscience.*, 282C:13-22. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.01.025., 13-22.
- Freeman, L.R. and Keller, J.N. (2012) Oxidative stress and cerebral endothelial cells: regulation of the blood-brain-barrier and antioxidant based interventions. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1822, 822-829.
- Fu, Y., Paxinos, G., Watson, C. and Halliday, G.M. (2016) The substantia nigra and ventral tegmental dopaminergic neurons from development to degeneration. *J. Chem. Neuroanat.*, 10.
- Galvan, A., Devergnas, A. and Wichmann, T. (2015) Alterations in neuronal activity in basal ganglia-thalamocortical circuits in the parkinsonian state. *Front Neuroanat.*, 9:, doi:10.3389/fnana.2015.00005., doi.

- Galvan, A. and Wichmann, T. (2008) Pathophysiology of parkinsonism. *Clin Neurophysiol.*, 119, 1459-1474.
- Gao, X.F., Wang, W., Yu, Q., Burnstock, G., Xiang, Z.H. and He, C. (2011) Astroglial P2X7 receptor current density increased following long-term exposure to rotenone. *Purinergic Signal.*, 7, 65-72.
- Gao, Z., Zhu, Q., Zhang, Y., Zhao, Y., Cai, L., Shields, C.B. and Cai, J. (2013) Reciprocal modulation between microglia and astrocyte in reactive gliosis following the CNS injury. *Mol. Neurobiol.*, 48, 690-701.
- García, R., González, M.E., Fernández, I., Castaño, Y., Díaz, M.L. and Alberti, E. (2008) Alteraciones conductuales y del metabolismo oxidativo en un modelo de hipoperfusión cerebral transitorio inducido en ratas. *Biotechnol Appl.*, 25, 332-338.
- Garcia-Garcia, A., Zavala-Flores, L., Rodriguez-Rocha, H. and Franco, R. (2012) Thiol-redox signaling, dopaminergic cell death, and Parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal.*, 17, 1764-1784.
- Garrido, M., Tereshchenko, Y., Zhevtsava, Z., Taschenberger, G., Bahr, M. and Kugler, S.. (2011) Glutathione depletion and overproduction both initiate degeneration of nigral dopaminergic neurons. *Acta Neuropathol.*, 121, 475-485.
- Gerfen, C.R., Engber, T.M., Mahan, L.C., Susel, Z., Chase, T.N., Monsma, F.J., Jr. and Sibley, D.R. (1990) D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science.*, 250, 1429-1432.
- Gerlach, M. and Riederer, P. (1996) Animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with the phenomenology of the disease in man. *J Neural Transm.*, 103, 987-1041.

- Glass, C.K., Saijo, K., Winner, B., Marchetto, M.C. and Gage, F.H. (2010) Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell.*, %19;140, 918-934.
- Goldstein, D.S., Kopin, I.J. and Sharabi,Y. (2014) Catecholamine autotoxicity. Implications for pharmacology and therapeutics of Parkinson disease and related disorders. *Pharmacol. Ther.*, 144, 268-282.
- González, M.E., Fernández, I. and Bauza, J.Y. (2007) Indicadores de estrés oxidativo en cerebros de ratas viejas con déficit cognitivo. *Bioteecnol Apl.*, 24, 145-150.
- Griffith, O.W. (1982) Mechanism of action, metabolism, and toxicity of buthionine sulfoximine and its higher homologs, potent inhibitors of glutathione synthesis. *J Biol Chem.*, 257, 13704-13712.
- Groitl, B. and Jakob, U. (2014) Thiol-based redox switches. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1844, 1335-1343.
- Gu, D.M., Lu, P.H., Zhang, K., Wang, X., Sun, M., Chen, G.Q. and Wang, Q. (2015) EGFR mediates astragaloside IV-induced Nrf2 activation to protect cortical neurons against in vitro ischemia/reperfusion damages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 457, 391-397.
- Han, D., Ybanez, M.D., Ahmadi, S., Yeh, K. and Kaplowitz, N. (2009) Redox regulation of tumor necrosis factor signaling. *Antioxid Redox Signal.*, 11, 2245-2263.
- Hanschmann, E.M., Godoy, J.R., Berndt, C., Hudemann, C. and Lillig,C.H. (2013) Thioredoxins, Glutaredoxins, and Peroxiredoxins-Molecular Mechanisms and Health Significance: from Cofactors to Antioxidants to Redox Signaling. *Antioxid. Redox. Signal.*, 19, 1539-1605.
- Hasel, P., Mckay, S., Qiu, J. and Hardingham, G.E. (2014) Selective dendritic susceptibility to bioenergetic, excitotoxic and redox perturbations in cortical neurons. *Biochim. Biophys. Acta.*, 10.

- Hashimoto, K., Takasaki, W., Yamoto, T., Manabe, S., Sato, I. and Tsuda, S. (2008) Effect of glutathione (GSH) depletion on DNA damage and blood chemistry in aged and young rats. *J Toxicol. Sci.*, 33, 421-429.
- Hezel, M., Ebrahimi, F., Koch, M. and Dehghani, F. (2012) Propidium iodide staining: a new application in fluorescence microscopy for analysis of cytoarchitecture in adult and developing rodent brain. *Micron.*, 43, 1031-1038.
- Higuchi, Y. (2004) Glutathione depletion-induced chromosomal DNA fragmentation associated with apoptosis and necrosis. *J Cell Mol Med.*, 8, 455-464.
- Hirsch, E.C., Vyas, S. and Hunot, S. (2012) Neuroinflammation in Parkinson's disease. *Parkinsonism. Relat Disord.*, 18 Suppl 1:S210-2. doi: 10.1016/S1353-8020, -7.
- Hoepken, H.H., Gispert, S., Morales, B., Wingerter, O., Del Turco, D., Mulsch, A., Nussbaum, R.L., Muller, K., Drose, S., Brandt, U., Deller, T., Wirth, B., Kudin, A.P., Kunz, W.S. and Auburger, G. (2007) Mitochondrial dysfunction, peroxidation damage and changes in glutathione metabolism in PARK6. *Neurobiol Dis.*, 25, 401-411.
- Howells, D.W., Porritt, M.J., Wong, J.Y., Batchelor, P.E., Kalnins, R., Hughes, A.J. and Donnan, G.A. (2000) Reduced BDNF mRNA expression in the Parkinson's disease substantia nigra. *Exp. Neurol.*, 166, 127-135.
- Hsu, M., Srinivas, B., Kumar, J., Subramanian, R. and Andersen, J. (2005) Glutathione depletion resulting in selective mitochondrial complex I inhibition in dopaminergic cells is via an NO-mediated pathway not involving peroxynitrite: implications for Parkinson's disease. *J Neurochem.*, 92, 1091-1103.
- Hutchison, W.D., Dostrovsky, J.O., Walters, J.R., Courtemanche, R., Boraud, T., Goldberg, J. and Brown, P. (2004) Neuronal oscillations in the basal ganglia and movement disorders: evidence from whole animal and human recordings. *J Neurosci.*, %20;24, 9240-9243.

- Hwang, E.J. (2013a) The basal ganglia, the ideal machinery for the cost-benefit analysis of action plans. *Front Neural Circuits.*, 7:. doi:10.3389/fncir.2013.00121., doi.
- Hwang, O. (2013b) Role of oxidative stress in Parkinson's disease. *Exp Neurobiol.*, 22, 11-17.
- Iancu, R., Mohapel, P., Brundin, P. and Paul, G. (2005) Behavioral characterization of a unilateral 6-OHDA-lesion model of Parkinson's disease in mice. *Behav Brain Res.*, 162, 1-10.
- Jimenez-Jimenez, F.J., Alonso-Navarro, H., Ayuso-Peralta, L. and Jabbour-Wadih, T. (2006) Oxidative stress and Alzheimer's disease. *Rev Neurol.*, 42, 419-427.
- Jimenez-Martin, J., Blanco-Lezcano, L., Gonzalez-Fraguela, M.E., Diaz-Hung, M.L., Serrano-Sanchez, T., Almenares, J.L. and Francis-Turner, L. (2015) Effect of neurotoxic lesion of pedunculopontine nucleus in nigral and striatal redox balance and motor performance in rats. *Neuroscience.*, %19;289:300-14. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.12.056. Epub;%2015 Jan 14., 300-314.
- Johnson, M.E. Lim, Y., Senthilkumaran, M., Zhou, X.F. and Bobrovskaya L. (2015) Investigation of tyrosine hydroxylase and BDNF in a low-dose rotenone model of Parkinson's disease. *J. Chem. Neuroanat.*, 70:33-41. doi: 10.1016/j.jchemneu.2015.11.002. Epub;%2015 Nov 10., 33-41.
- Johnson, W.M., Wilson-Delfosse, A.L. and Mieyal, J.J. (2012) Dysregulation of glutathione homeostasis in neurodegenerative diseases. *Nutrients.*, 4, 1399-1440.
- Jones, D.P. (2006) Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal.*, 8, 1865-1879.
- Jones, D.P (2010) Redox sensing: orthogonal control in cell cycle and apoptosis signalling. *J Intern Med.*, 268, 432-448.
- Kar, S. and Kavdia, M. (2013) Endothelial NO and O₂⁻ production rates differentially regulate oxidative, nitroxidative, and nitrosative stress in the microcirculation. *Free Radic. Biol.*

Med., 63:161-74. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.04.024. Epub;%2013 Apr 29., 161-174.

Katsu, M., Niizuma, K., Yoshioka, H., Okami, N., Sakata, H. and Chan, P.H.. (2010) Hemoglobin-induced oxidative stress contributes to matrix metalloproteinase activation and blood-brain barrier dysfunction in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab.*, 30, 1939-1950.

Kaur, D., Lee, D., Ragapolan, S. and Andersen, J.K. (2009) Glutathione depletion in immortalized midbrain-derived dopaminergic neurons results in increases in the labile iron pool: implications for Parkinson's disease. *Free Radic. Biol Med.*, 46, 593-598.

Kay, S., Josefina, M., Siswanto, S., Reijko, K., Helmut, H., Georg, A., Mohamed, B., Grinberg, L., Helmut, W., Horst-Werner, K., Wilfred, den D. and Udo, R. (2015) The brainstem pathologies of Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Brain Pathol.*, 25, 121-135.

Kim, G.H., Kim, J.E., Rhie, S.J. and Yoon, S. (2015) The role of oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Exp. Neurobiol.*, 24, 325-340.

Klein, A., Sacrey, L.A., Whishaw, I.Q. and Dunnett, S.B. (2012) The use of rodent skilled reaching as a translational model for investigating brain damage and disease. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 36, 1030-1042.

Kojovic, M., Bologna, M., Kassavetis, P., Murase, N., Palomar, F.J., Berardelli, A., Rothwell, J.C., Edwards, M.J. and Bhatia, K.P. (2012) Functional reorganization of sensorimotor cortex in early Parkinson disease. *Neurology.*, 78, 1441-1448.

Koprich, J.B., Reske-Nielsen, C., Mithal, P. and Isacson, O. (2008) Neuroinflammation mediated by IL-1 β increases susceptibility of dopamine neurons to degeneration in an animal model of Parkinson's disease. *J. Neuroinflammation.*, 5:8. doi:10.1186/1742-2094-5-8., 8-5.

- Korb, E. and Finkbeiner, S. (2011) Arc in synaptic plasticity: from gene to behavior. *Trends Neurosci.*, 34, 591-598.
- Koscsó, B., Csóka, B., Selmeczi, Z., Himer, L., Pacher, P., Virág, L., Haskö, G. (2012) Adenosine augments interleukin-10 production by microglial cells through an A2B adenosine receptor-mediated process. *J. Immunol.*, 188, 445-453.
- Kreitzer, A.C. and Malenka, R.C. (2008) Striatal plasticity and basal ganglia circuit function. *Neuron.*, 60, 543-554.
- Kudin, A.P., Augustynek, B., Lehmann, A.K., Kovacs, R. and Kunz, W.S. (2012) The contribution of thioredoxin-2 reductase and glutathione peroxidase to H₂O₂ detoxification of rat brain mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1817, 1901-1906.
- Kuipers, S.D., Trentani, A., Tiron, A., Mao, X., Kuhl, D. and Bramham, C.R. (2016) BDNF-induced LTP is associated with rapid Arc/Arg3.1-dependent enhancement in adult hippocampal neurogenesis. *Sci. Rep.*, 6: doi:10.1038/srep21222., doi.
- Kumar, H., Lim, H.W., More, S.V., Kim, B.W., Koppula, S., Kim, I.S. and Choi, D.K. (2012a) The role of free radicals in the aging brain and Parkinson's disease: convergence and parallelism. *Int J Mol Sci.*, 13, 10478-10504.
- Kumar, V., Fahey, P.G., Jong, Y.J.I., Ramanan, N. and O'Malley, K.L. (2012b) Activation of intracellular metabotropic glutamate receptor 5 in striatal neurons leads to up-regulation of genes associated with sustained synaptic transmission including Arc/Arg3.1 protein*. *J. Biol. Chem.*, 287, 5412-5425.
- Lanciego, J.L., Luquin, N. and Obeso, J.A. (2012) Functional neuroanatomy of the basal ganglia. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, 2, doi.

- Latorre, E., Matheus, N., Layunta, E., Alcalde, A.I. and Mesonero, J.E. (2014) IL-10 counteracts proinflammatory mediator evoked oxidative stress in caco-2 cells. *Mediators. Inflamm.*, 2014: Epub;%2014 Jul 23 doi:10.1155/2014/982639., Epub.
- Lema Tomé, C.M., Tyson, T., Rey, N.L., Grathwohl, S., Britschgi, M. and Brundin, P. (2013) inflammation and a-synuclein's prion-like behavior in parkinson's disease-is there a link? *Mol. Neurobiol.*, 47, 561-574.
- Li, D., Li, X., Wu, J., Li, J., Zhang, L., Xiong, T., Tang, J., Qu, Y. and Mu, D. (2015a) Involvement of the JNK/FOXO3a/Bim pathway in neuronal apoptosis after hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats. *PLoS. One.*, 10, e0132998.
- Li, Y., Pehrson, A.L., Waller, J.A., Dale, E., Sanchez, C. and Gulinello, M. (2015b) A critical evaluation of the activity-regulated cytoskeleton-associated protein (Arc/Arg3.1)'s putative role in regulating dendritic plasticity, cognitive processes, and mood in animal models of depression. *Front Neurosci.*, 9: doi:10.3389/fnins.2015.00279., doi.
- Liddell, J.R., Dringen, R.; Crack, P.J. and Robinson, S.R. (2006) Glutathione peroxidase 1 and a high cellular glutathione concentration are essential for effective organic hydroperoxide detoxification in astrocytes. *Glia.*, 54, 873-879.
- Limon-Pacheco, J.H., Hernandez, N.A., Fanjul-Moles, M.L. and Gonsebatt, M.E., (2007) Glutathione depletion activates mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways that display organ-specific responses and brain protection in mice. *Free Radic. Biol Med.*, 43, 1335-1347.
- Liu, Y., Hyde, A.S., Simpson, M.A. and Barycki, J.J. (2014) Emerging regulatory paradigms in glutathione metabolism. *Adv. Cancer Res.*, 122:69-101. doi:10.1016/B978-0-12-420117-0.00002-5., 69-101.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.

- Lv, S.W., Wang, X.G., Mu, Y., Zang, T.Z., Ji, Y.T., Liu, J.Q., Shen, J.C. and Luo, G.M. (2007) A novel dicyclodextrinyl diselenide compound with glutathione peroxidase activity. *FEBS J.*, 274, 3846-3854.
- MacDonald, A.A., Seergobin, K.N., Owen, A.M., Tamjeedi, R., Monchi, O., Ganjavi, H. and MacDonald, P.A. (2013) Differential effects of Parkinson's disease and dopamine replacement on memory encoding and retrieval. *PLoS One.*, 8, doi.
- Magen, I., Fleming, S.M., Zhu, C., Garcia, E.C., Cardiff, K.M., Dinh, D., De La Rosa, K., Sanchez, M., Torres, E.R., Masliah, E., Jentsch, J.D. and Chesselet, M.F. (2012) Cognitive deficits in a mouse model of pre-manifest Parkinson's disease. *Eur. J. Neurosci.*, 35, 870-882.
- Martensson, J., Jain, A., Stole, E., Frayer, W., Auld, P.A. and Meister, A. (1991) Inhibition of glutathione synthesis in the newborn rat: a model for endogenously produced oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A.*, 88, 9360-9364.
- Martin, H.L. and Teismann, P. (2009) Glutathione-a review on its role and significance in Parkinson's disease. *FASEB J.*, 23, 3263-3272.
- Meredith, G.E. and Kang, U.J. (2006) Behavioral models of Parkinson's disease in rodents: a new look at an old problem. *Mov Disord.*, 21, 1595-1606.
- Mhyre, T.R., Boyd, J.T., Hamill, R.W., Maguire-Zeiss, K.A. (2012) Parkinson's disease. *Subcell. Biochem.*, 65:389-455. doi:10.1007/978-94-007-5416-4_16., 389-455.
- Michel, P.P., Ruberg, M. and Hirsch, E. (2006) Dopaminergic neurons reduced to silence by oxidative stress: an early step in the death cascade in Parkinson's disease? *Sci STKE.*, 2006, e19.
- Mizuno, Y., Kume, T., Muto, C., Takada-Takatori, Y., Izumi, Y., Sugimoto, H. and Akaike, A. (2008) Progress in the pathogenesis and genetics of Parkinson's disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*, 363, 2215-2227.

- Mogi, M., Togari, A., Kondo, T., Mizuno, Y., Komure, O., Kuno, S., Ichinose, H. and Nagatsu, T. (1999) Brain-derived growth factor and nerve growth factor concentrations are decreased in the substantia nigra in Parkinson's disease. *Neurosci Lett.*, 270, 45-48.
- Molina-Luna, K., Pekanovic, A., Rohrich, S., Hertler, B., Schubring-Giese, M., Rioult-Pedotti, M.S. and Luft, A.R. (2009) Dopamine in motor cortex is necessary for skill learning and synaptic plasticity. *PLoS One.*, 4, e7082.
- Montoya, C.P., Campbell-Hope, L.J., Pemberton, K.D. and Dunnett, S.B. (1991) The "staircase test": a measure of independent forelimb reaching and grasping abilities in rats. *J Neurosci Methods.*, 36, 219-228.
- More, S.V., Kumar, H., Kim, I.S., Song, S.Y. and Choi, D.K. (2013) Cellular and molecular mediators of neuroinflammation in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Mediators Inflamm.*, 2013: Epub; %2013 Jun 27 doi:10.1155/2013/952375., Epub.
- Morgan, M.J. and Liu, Z.G. (2011) Crosstalk of reactive oxygen species and NF-kappaB signaling. *Cell Res.*, 21, 103-115.
- Murer, M.G., Yan, Q. and Raisman-Vozari, R. (2001) Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol.*, 63, 71-124.
- Mytilineou, C., Kokotos Leonardi, E.T., Kramer, B.C., Jamindar, T. and Olanow, C.W. (1999) Glial cells mediate toxicity in glutathione-depleted mesencephalic cultures. *J Neurochem.*, 73, 112-119.
- Nakamura, K., Wright, D.A., Wiatr, T., Kowlessur, D., Milstien, S., Lei, X.G. and Kang, U.J. (2000a) Preferential resistance of dopaminergic neurons to glutathione depletion in a reconstituted nigrostriatal system. *Brain Res.*, 873, 203-211.

- Nakamura, K., Won, L., Heller, A. and Kang, U.J. (2000b) Preferential resistance of dopaminergic neurons to the toxicity of glutathione depletion is independent of cellular glutathione peroxidase and is mediated by tetrahydrobiopterin. *J. Neurochem.*, 74, 2305-2314.
- Nam, J.H., Leem, E., Jeon, M.T., Jeong, K.H., Park, J.W., Jung, U.J., Kholodilov, N., Burke, R.E., Jin, B.K. and Kim, S.R. (2015) Induction of GDNF and BDNF by hRheb(S16H) transduction of SNpc neurons: neuroprotective mechanisms of hRheb(S16H) in a model of Parkinson's disease. *Mol. Neurobiol.*, 51, 487-499.
- Navarro-Yepes, J., Burns, M., Anandhan, A., Khalimonchuk, O., del Razo, L.M., Quintanilla-Vega, B., Pappa, A., Panayiotidis, M.I. and Franco, R. (2014) Oxidative Stress, redox signaling, and autophagy: cell death versus survival. *Antioxid. Redox. Signal.*, 21, 66-85.
- Nelson, A.B. and Kreitzer, A.C. (2014) Reassessing models of basal ganglia function and dysfunction. *Annu. Rev. Neurosci.*, 37:117-35. doi:10.1146/annurev-neuro-071013-013916., 117-135.
- Nelson, A.J.D., Thur, K.E., Marsden, C.A. and Cassaday, H.J. (2010) Dissociable roles of dopamine within the core and medial shell of the nucleus accumbens in memory for objects and place. *Behav. Neurosci.*, 124, 789-799.
- Nie, S., Xu, Y., Chen, G., Ma, K., Han, C., Guo, Z., Zhang, Z., Ye, K. and Cao, X. (2015) Small molecule TrkB agonist deoxygedunin protects nigrostriatal dopaminergic neurons from 6-OHDA and MPTP induced neurotoxicity in rodents. *Neuropharmacology.*, 99:448-58. doi: 10.1016/j.neuropharm.2015.08.016. Epub;%2015 Aug 14., 448-458.
- Nikam, S., Nikam, P., Ahaley, S.K. and Sontakke, A.V. (2009) Oxidative stress in Parkinson's disease. *Indian J Clin Biochem.*, 24, 98-101.
- Nissbrandt, H. and Carlsson, A. (1987) Turnover of dopamine and dopamine metabolites in rat brain: comparison between striatum and substantia nigra. *J Neurochem.*, 49, 959-967.

- Obeso, J.A. and Lanciego, J.L. (2011) Past, present, and future of the pathophysiological model of the Basal Ganglia. *Front Neuroanat.*, 5:39. doi: 10.3389/fnana.2011.00039. eCollection;%2011., 39.
- Ogura, Y., Sato, K., Kawashima, K., Kobayashi, N., Imura, S., Fujino, K., Kawaguchi, H. and Nedachi, T. (2014) Subtoxic levels of hydrogen peroxide induce brain-derived neurotrophic factor expression to protect PC12 cells. *BMC. Res. Notes.*, 7:840. doi: 10.1186/1756-0500-7-840., 840-847.
- Olferd, E., Cross, B.M., Mc Willian, D.V.M. and Mc Willian, A.A. (1997a) Guidelines for the use of animals in psychology. *Canadian Council on Animal Care (CCAC)*. Bradda Printing Services Inc, Ottawa, pp. 155-162.
- Olferd, E., Cross, B.M.; Mc Willian, D.V.M. and Mc Willian, A.A. (1997b) Guidelines for the use of animal in Neuroscience research. *Canadian Conuncil on Care (CCAC)*. Bradda Printing Services Inc, Ottawa, pp. 163-165.
- Park, C. and Rubchinsky, L.L. (2012) Potential mechanisms for imperfect synchronization in parkinsonian basal ganglia. *PLoS. One.*, 7, e51530.
- Patki, G., Che, Y. and Lau, Y.S. (2009) Mitochondrial dysfunction in the striatum of aged chronic mouse model of Parkinson's disease. *Front Aging Neurosci.*, 1:3. doi: 10.3389/neuro.24.003.2009. eCollection;%2009., 3.
- Pattarini, R., Smeyne, R.J. and Morgan, J.I. (2007) Temporal mRNA profiles of inflammatory mediators in the murine 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyrimidine model of Parkinson's disease. *Neuroscience.*, 145, 654-668.
- Paxinos, G. and Watson, C. (1986) The rat brain in stereotaxic coordinates. Second Academic Press.

- Peter, A. (1987) Neuroanatomical research techniques. In Adelman,A. (ed), *Encyclopedia of Neurosciences*. Pro Scientia Viva, pp. 764-766.
- Peterson, L.J. and Flood, P.M. (2012) Oxidative Stress and Microglial Cells in Parkinson's Disease. *Mediators. Inflamm.*, 2012: Epub;%2012 Mar 22 doi:10.1155/2012/401264., Epub.
- Pisanu, A., Lecca, D., Mulas, G., Wardas, J., Simbula, G., Spiga, S. and Carta, A.R. (2014) Dynamic changes in pro- and anti-inflammatory cytokines in microglia after PPAR-gamma agonist neuroprotective treatment in the MPTP mouse model of progressive Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.*, 71:280-91. doi: 10.1016/j.nbd.2014.08.011. Epub;%2014 Aug 15., 280-291.
- Pizzurro, D.M., Dao, K. and Costa, L.G. (2014) Astrocytes protect against diazinon- and diazoxon-induced inhibition of neurite outgrowth by regulating neuronal glutathione. *Toxicology.*, 318:59-68. Epub;%2014 Feb;%19 doi:10.1016/j.tox.2014.01.010., 59-68.
- Plowman, E.K. Maling, N., Thomas, N.J., Fowler, S.C. and Kleim, J.A. (2014) Targeted motor rehabilitation dissociates corticobulbar versus corticospinal dysfunction in an animal model of Parkinson's disease. *Neurorehabil. Neural Repair.*, 28, 85-95.
- Rahimmi, A., Khosrobakhsh, F., Izadpanah, E., Moloudi, M.R. and Hassanzadeh, K. (2015) N-acetylcysteine prevents rotenone-induced Parkinson's disease in rat: An investigation into the interaction of parkin and Drp1 proteins. *Brain Res. Bull.*, 113:34-40. doi: 10.1016/j.brainresbull.2015.02.007. Epub;%2015 Feb 28., 34-40.
- Ramalingam, M. and Kim, S.J. (2012) Reactive oxygen/nitrogen species and their functional correlations in neurodegenerative diseases. *J. Neural Transm.*, 119, 891-910.
- Ramirez-Latorre, J.A. (2012) Functional upregulation of Ca(2+)-activated K(+) channels in the development of substantia nigra dopamine neurons. *PLoS One.*, 7, e51610.

- Rangel-Barajas, C., Coronel, I. and Florán, B. (2015) Dopamine Receptors and Neurodegeneration. *Aging Dis.*, 6, 349-368.
- Rekha, K.R. and Selvakumar, G.P. (2014) Gene expression regulation of Bcl2, Bax and cytochrome-C by geraniol on chronic MPTP/probenecid induced C57BL/6 mice model of Parkinson's disease. *Chem. Biol. Interact.*, 217:57-66. doi: 10.1016/j.cbi.2014.04.010. Epub;%2014 Apr 24., 57-66.
- Ren, F., Wang, K., Zhang, T., Jiang, J., Nice, E.C. and Huang, C. (2015) New insights into redox regulation of stem cell self-renewal and differentiation. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1850, 1518-1526.
- Ren, J.P., Zhao, Y.W. and Sun, X.J. (2009) Toxic influence of chronic oral administration of paraquat on nigrostriatal dopaminergic neurons in C57BL/6 mice. *Chin Med J (Engl.)*, 122, 2366-2371.
- Rice, M.E. and Patel, J.C. (2015) Somatodendritic dopamine release: recent mechanistic insights. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.*, 370, 20140185.
- Rivas-Arancibia, S., Zimbron, L.F., Rodriguez-Martinez, E., Maldonado, P.D., Borgonio-Perez, G. and Sepulveda-Parada, M. (2015) Oxidative stress-dependent changes in immune responses and cell death in the substantia nigra after ozone exposure in rat. *Front Aging Neurosci.*, 7:65. doi: 10.3389/fnagi.2015.00065. eCollection;%2015., 65.
- Roberts, R.C., Roche, J.K., Conley, R.R. and Lahti, A.C. (2009) Dopaminergic synapses in the caudate of subjects with schizophrenia: relationship to treatment response. *Synapse.*, 63, 520-530.
- Rose, F.D., Davey, M.J., Love, S. and Dell, P.A. (1987) Environmental enrichment and recovery from contralateral sensory neglect in rats with large unilateral neocortical lesions. *Behav Brain Res.*, 24, 195-202.

- Rosi, S. (2011) Neuroinflammation and the plasticity-related immediate-early gene Arc. *Brain Behav. Immun.*, 25, S39-S49.
- Rougemont, M., Do, K.Q. and Castagne, V. (2002) New model of glutathione deficit during development: Effect on lipid peroxidation in the rat brain. *J Neurosci Res.*, 70, 774-783.
- Roy, A., Fung, Y.K., Liu, X. and Pahan, K. (2006) Up-regulation of microglial CD11b expression by nitric oxide. *J. Biol. Chem.*, 281, 14971-14980.
- Rylander, D., Bagetta, V., Pendolino, V., Zianni, E., Grelish, S., Gardoni, F., Di Luca, M., Calabresi, P., Cenci, M.A. and Picconi,B. (2013) Region-specific restoration of striatal synaptic plasticity by dopamine grafts in experimental parkinsonism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 110, E4375-E4384.
- Schallert, T. and Whishaw, I.Q. (1984) Bilateral cutaneous stimulation of the somatosensory system in hemidecorticate rats. *Behav Neurosci.*, 98, 518-540.
- Schallert, T (2006). Behavioral tests for preclinical intervention assessment. *NeuroRx.*, 3, 497-504
- Schieber, M. and Chandel, N.S. (2014) ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr. Biol.*, %19;24, R453-R462.
- Sgambato-Faure,V. Buggia, V., Gilbert, F., Lévesque, D., Benabid, A.L. and Berger, F. (2005) Coordinated and spatial upregulation of arc in striatonigral neurons correlates with L-dopa-induced behavioral sensitization in dyskinetic rats. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 64, 936-947.
- Shukitt-Hale, B., Erat, S.A. and Joseph, J.A. (1998) Spatial learning and memory deficits induced by dopamine administration with decreased glutathione. *Free Radic. Biol Med.*, 24, 1149-1158.

- Sian, J., Dexter, D.T., Lees, A.J., Daniel, S., Agid, Y., Javoy-Agid, F., Jenner, P. and Marsden, C.D. (1994a) Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. *Ann. Neurol.*, 36, 348-355.
- Sian, J., Dexter, D.T., Lees, A.J., Daniel, S., Jenner, P. and Marsden, C.D. (1994b) Glutathione-related enzymes in brain in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.*, 36, 356-361.
- Smeyne, M. and Smeyne, R.J. (2013) Glutathione metabolism and Parkinson's disease. *Free Radic. Biol. Med.*, 62:13-25. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.001. Epub; %2013 May 8., 13-25.
- Smith, M.P. and Cass, W.A. (2007) Oxidative stress and dopamine depletion in an intrastriatal 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Neuroscience.*, 144, 1057-1066.
- Soleman, S., Yip, P., Leisure, J.L. and Moon, L. (2010) Sustained sensorimotor impairments after endothelin-1 induced focal cerebral ischemia (stroke) in aged rats. *Exp Neurol.*, 222, 13-24.
- Song, J., Kang, S.M., Lee, W.T., Park, K.A., Lee, K.M. and Lee, J.E. (2014) Glutathione protects brain endothelial cells from hydrogen peroxide-induced oxidative stress by increasing nrf2 expression. *Exp Neurobiol.*, 23, 93-103.
- Strome, E.M., Cepeda, I.L., Sossi, V. and Doudet, D.J. (2006) Evaluation of the integrity of the dopamine system in a rodent model of Parkinson's disease: small animal positron emission tomography compared to behavioral assessment and autoradiography. *Mol Imaging Biol.*, 8, 292-299.
- Sun, J., Zhang, X., Broderick, M. and Fein, H. (2003) Measurement of nitric oxide production in biological systems by using griess reaction assay. *Sensors*, 3, 276-284.

- Surmeier, D.J., Shen, W., Day, M., Gertler, T., Chan, S., Tian, X. and Plotkin, J.L. (2010) The role of dopamine in modulating the structure and function of striatal circuits. *Prog. Brain Res.*, 183:149-67. doi:10.1016/S0079-6123,-0.
- Tanaka, S., Ishii, A., Ohtaki, H., Shioda, S., Yoshida, T. and Numazawa, S. (2013) Activation of microglia induces symptoms of Parkinson's disease in wild-type, but not in IL-1 knockout mice. *J. Neuroinflammation.*, 10:143. doi: 10.1186/1742-2094-10-143., 143-10.
- Thuret, S., Alavian, K.N., Gassmann, M., Lloyd, C.K., Smits, S.M., Smidt, M.P., Klein, R., Dyck, R.H. and Simon, H.H. (2004) The neuregulin receptor, ErbB4, is not required for normal development and adult maintenance of the substantia nigra pars compacta. *J Neurochem.*, 91, 1302-1311.
- Toffa, S., Kunikowska, G.M., Zeng, B.Y., Jenner, P. and Marsden, C.D. (1997) Glutathione depletion in rat brain does not cause nigrostriatal pathway degeneration. *J Neural Transm.*, 104, 67-75.
- Torres, E.B., Heilman, K.M. and Poizner, H. (2011) Impaired endogenously evoked automated reaching in Parkinson's disease. *J Neurosci.*, 31, 17848-17863.
- Tremblay, L., Worbe, Y., Thobois, S., Sgambato-Faure, V. and Féger, J. (2015) Selective dysfunction of basal ganglia subterritories: From movement to behavioral disorders. *Mov Disord.*, 30, 1155-1170.
- Truong, L., Allbutt, H., Kassiou, M. and Henderson, J.M. (2006) Developing a preclinical model of Parkinson's disease: a study of behaviour in rats with graded 6-OHDA lesions. *Behav Brain Res.*, 169, 1-9.
- Tsiperson, V., Huang, Y., Bagayogo, I., Song, Y., VonDran, MW., DiCicco-Bloom, E. and Dreyfus, CF. (2015) Brain-Derived Neurotrophic Factor Deficiency Restricts Proliferation of

- Oligodendrocyte Progenitors Following Cuprizone-Induced Demyelination. *ASN Neuro.*, 7, doi.
- Urrutia, P.J., Mena, N.P. and Nuñez, M.T. (2014) The interplay between iron accumulation, mitochondrial dysfunction, and inflammation during the execution step of neurodegenerative disorders. *Front Pharmacol.*, 5:.. doi:10.3389/fphar.2014.00038., doi.
- Vaarmann, A., Gandhi, S. and Abramov, A.Y. (2010) Dopamine induces Ca²⁺ signaling in astrocytes through reactive oxygen species generated by monoamine oxidase. *J Biol Chem.*, 285, 25018-25023.
- Valentine, J.S., Wertz, D.L., Lyons, T.J., Liou, L.L., Goto, J.J. and Gralla, E.B. (1998) The dark side of dioxygen biochemistry. *Curr. Opin. Chem Biol.*, 2, 253-262.
- Von, B.R., Eugenin-von, B.L. and Eugenin, J. (2015) Microglial cell dysregulation in brain aging and neurodegeneration. *Front Aging Neurosci.*, %20;7:124. doi: 10.3389/fnagi.2015.00124. eCollection;%2015., 124.
- Wang, L., Chang, X., She, L., Xu, D., Huang, W. and Poo M.M. (2015) Autocrine action of BDNF on dendrite development of adult-born hippocampal neurons. *J. Neurosci.*, 35, 8384-8393.
- Wang, X. and Michaelis, E.K. (2010) Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. *Front Aging Neurosci.*, 2:12. doi: 10.3389/fnagi.2010.00012., 12.
- Watanabe, T., Sagisaka, H., Arakawa, S., Shibaya, Y., Watanabe, M., Igarashi, I., Tanaka, K., Totsuka, S., Takasaki, W. and Manabe, S. (2003) A novel model of continuous depletion of glutathione in mice treated with L-buthionine (S,R)-sulfoximine. *J Toxicol. Sci.*, 28, 455-469.

- Whishaw, I.Q., Woodward, N.C., Miklyaeva, E. and Pellis, S.M.(1997) Analysis of limb use by control rats and unilateral DA-depleted rats in the Montoya staircase test: movements, impairments and compensatory strategies. *Behav Brain Res.*, 89, 167-177.
- Whitton, P.S. (2007) Inflammation as a causative factor in the aetiology of Parkinson's disease. *Br J Pharmacol.*, 150, 963-976.
- Wichmann, T. and Dostrovsky, J.O. (2011) Pathological basal ganglia activity in movement disorders. *Neuroscience.*, 198:232-44. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.06.048. Epub;%2011 Jun 22., 232-244.
- Włodkowic, D., Skommer, J. and Darzynkiewicz, Z. (2012) Cytometry of apoptosis. Historical perspective and new advances. *Exp. Oncol.*, 34, 255-262.
- Wullner, U., Loschmann, P.A.; Schulz, J.B., Schmid, A., Dringen, R., Eblen, F., Turski, L. and Klockgether, T. (1996) Glutathione depletion potentiates MPTP and MPP⁺ toxicity in nigral dopaminergic neurones. *Neuroreport.*, 7, 921-923.
- Yu, H., Liu, J.; Liu, X., Zang, T., Luo, G. and Shen, J. (2005) Kinetic studies on the glutathione peroxidase activity of selenium-containing glutathione transferase. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.*, 141, 382-389.
- Zhang, H. and Forman, H.J. (2012) Glutathione synthesis and its role in redox signaling. *Semin. Cell Dev Biol.*, 23, 722-728.

Publicaciones del tema de tesis

1. Díaz-Hung, M., González Fraguera, M.E. (2013) Oxidative stress in neurological diseases, cause or consequence? *Neurología*. DOI:10.1016/j.nrl.2013.06.022.
2. Díaz-Hung, M.L. Blanco, L., Pavon, N., León, R., Estupiñán, B., Orta, E., Martínez, K., and Jiménez, I (2014) Sensory-motor performance after acute glutathione depletion by L-buthionine sulfoximine injection into *substantia nigrapars compacta*. *Behavioural Brain Research*, 271:286-293.
3. Díaz-Hung, M.L., González Fraguera, M.E. and Blanco Lezcano, L. (2015) El sistema antioxidante del glutatión en la etiopatología de la disfunción nigro-estriatal. *Rev Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 34(2):168-186
4. Díaz-Hung, M.L. Yglesias-Rivera, A., Hernández-Zimbrón, L.F., Orozco-Suárez, S., Ruiz-Fuentes, J.L., Díaz-García, A., León-Martínez, R., Blanco-Lezcano, L., Pavón-Fuentes, N. and Lorigados-Pedre, L (2016). Transient glutathione depletion in the *substantia nigra compacta* is associated with neuroinflammation in rats. *Neuroscience*, 335:207-220.

Otras publicaciones

1. García, R. González, M.E., Fernández, I., Castaño, Y., Díaz, M.L., Alberti, E. (2008) Behavioral and oxidative metabolism disorders in a model of transient induced cerebral hypoperfusion in rats. *Biotecnología Aplicada*, 25: 339-344.
2. Diaz-Hung, M.L. González, M.E., Fernández, I., Horruitiner, I. and Piedra, S (2011) Oxidative damage alters memory consolidation in adult rats. *Biotecnología Aplicada*, 28: 250-254.
3. González, M.E. Díaz-Hung, M.L., Vera, H., Maragoto, C., Noris, E., Blanco, L., Galvizu, R. and Robinson, M. (2013) Oxidative Stress Markers in Children with Autism Spectrum Disorders. *British Journal of Medicine & Medical Research*, 3(2): 307-317.
4. González Fraguera, M.E.; Díaz Hung, M.L. and Lorigados Pedre, L. (2014). Monitoreo de fármacos antiepilepticos. En: Lineamientos para el tratamiento de las epilepsias farmacorresistentes en Cuba. La Habana: OPS; pp. 70-

5. Jimenez-Martin, J., Blanco-Lezcano, L., Gonzalez-Fraguela, M.E., Diaz-Hung, M.L., Serrano-Sánchez, T., Almenares, J.L. and Francis-Turner, L. (2015). Effect of neurotoxic lesion of pedunculopontine nucleus in nigral and striatal redox balance and motor performance in rats. *Neuroscience*, 289: 300–314.
6. Hernández-Zimbrón, L.F, Gorostieta-Salas, E., Díaz-Hung, M.L., Pérez-Garmendia, R., Gevorkian, G. and Quiroz-Mercado, H. (2016). Beta Amyloid Peptides: Extracellular and Intracellular Mechanisms of Clearance in Alzheimer's Disease, Update on Dementia, Dr. Davide Moretti (Ed.), InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/update-on-dementia/beta-amylid-peptides-extracellular-and-intracellular-mechanisms-of-clearance-in-alzheimer-s-disease>
7. Lorigados, L., Morales, L.M., Orozco-Suárez, S.; Gallardo, J.M., Díaz-Hung, M.L., González, M.E., Estupiñán, B., Pavón, N., Rocha, L. (2016) Oxidative stress in pharmacoresistant epilepsy. *Biotecnología Aplicada*, 33, 2101-2107
8. Blanco-Lezcano, B., Jimenez-Martin, J., Díaz-Hung, M.L., Alberti-Amador, E., Wong-Guerra, M., González-Fraguela, M.E., Estupiñán-Díaz, B., Serrano-Sánchez, T., Francis-Turner, L., Delgado-Ocaña, S., Núñez-Figueredo, Y., Vega-Hurtado, Y., Fernández-Jiménez, I. (2017) Motor dysfunction and alteration in glutathione concentration, Cholinesterase activity, and BDNF expression in substantia nigra pars compacta in rats with pedunculopontine lesion. *Neurosci.*, 348, 83-97.

Eventos Científicos y Avales de la tesis

- Forum de ciencia y técnica 2011. Mención a nivel de base
- Jornada Científica del Instituto de Neurología y Neurocirugía 2012
- Forum de ciencia y técnica 2013. Destacado a nivel de base
- 7th Congreso Anual de Neurociencias. Toronto, Canadá 2013.
- 4ta Conferencia Restauración Neurológica 2014. La Habana Cuba.
- IV Conferencia Internacional de estrés oxidativo 2014. La Habana Cuba
- Congreso Immunopharmacology 2015

- Informe de Investigación Terminada 2015. Aprobado por el Consejo Científico del CIREN
- Premio Anual de Salud 2015. Mención a nivel central
- FORUM de Ciencia y Técnica 2016. Relevante a nivel de base