



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

Facultad de Ciencias Químicas
Departamento de farmacia
Laboratorio de Neuroquímica

EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS ANTIOXIDANTES DEL PRAMIPEXOL EN UN MODELO DE ROTENONA

TESIS PROFESIONAL

Para obtener el grado de:
LICENCIATURA EN QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

Presenta

YARELI CABRERA SALVADOR

DIRECTORAS DE TESIS

D.C. Liliana Martínez Mendieta

Profesora-investigadora FCQ-BUAP

D.C. María Isabel Martínez García

Profesora-investigadora FCQ-BUAP

PUEBLA, PUE.

DICIEMBRE 2019

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES



A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, quien me ha permitido desarrollarme profesionalmente y realizar este proyecto



Vicerrectoría de Investigación
y Estudios de Posgrado

El presente trabajo de tesis fue apoyado por la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado de la BUAP a través de proyecto VIEP 2018 otorgado a la D.C. Liliana Martínez Mendieta

*Un agradecimiento especial a los animales de experimentación
utilizados en este trabajo, porque sin ellos no sería posible el
avance científico*



Los animales utilizados para el desarrollo de la presente tesis fueron proporcionados por el **Bioterio “Claude Bernard”** de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, bajo la dirección del **Dr. Carlos Escamilla Weinmann**

**A LA HONORABLE COMISIÓN REVISORA DEL
PRESENTE TRABAJO**

D.C. Ilhuicamina Daniel Limón Pérez de León

D.C. Victorino Gilberto Serafín Alatraste Bueno

M.C. Félix Luna Morales

Un agradecimiento especial por el tiempo dedicado a las revisiones, correcciones y aportaciones para que realizara este proyecto. Por formar parte de esta etapa y de mi desarrollo académico y profesional, mi respeto y admiración hacia ustedes.

A mis directoras de tesis:

D.C. Liliana Martínez Mendieta

D.C. María Isabel Martínez García

Por su apoyo incondicional, paciencia, enseñanzas y consejos que me brindaron durante el desarrollo de esta tesis. Por permitirme trabajar con ustedes en el laboratorio y enseñarme el valioso mundo de la investigación.

A la Dra. Francisca Pérez Severiano

Una enorme gratitud por permitirme trabajar en su laboratorio y por el apoyo incondicional para realizar las técnicas, pero sobre todo por abrirme las puertas de su casa y su familia, un gran respeto y admiración hacia usted y sus alumnos.

Al Dr. Sergio Montes López

Por permitirme aprender de usted y de sus alumnos, por sus consejos al realizar cada una de las técnicas, por acompañarme hasta que terminara de trabajar con una buena platica y por hacerme reír cuando las curvas de calibración no me salían, mi admiración hacia usted.

ÍNDICE

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 EL estrés oxidante: una visión general	1
1.2 El estrés oxidante en el cerebro	2
1.3 La generación de los radicales libres y las especies reactivas de oxígeno	3
1.4 Las principales especies reactivas de oxígeno	5
1.5 Las enzimas antioxidantes	7
1.6 Superóxido dismutasa (SOD)	7
1.7 Glutación peroxidasa (GPx)	9
1.8 Catalasa (CAT)	9
1.9 El daño de lípidos por especies reactivas de oxígeno	10
1.10 La rotenona como modelo de toxicidad mitocondrial	12
1.11 Mecanismo de acción de la rotenona	14
1.12 El pramipexol como agente antioxidante	15
2. JUSTIFICACIÓN	21
3. HIPÓTESIS	22
4. OBJETIVOS	22
4.1 Objetivo general	22
4.2 Objetivos particulares	22
5. DIAGRAMA DE TRABAJO	23
6. LÍNEA CRONOLÓGICA	24
7. METODOLOGÍA	25
Sujetos experimentales	25
Preparación de fármacos	26
7.1 Administración	26

7.2 Obtención de cerebros y áreas subcorticales-----	26
7.3 Determinación de proteínas por el método de ácido bicinconínico-----	27
7.4 Determinación de especies reactivas de oxígeno -----	28
7.5 Determinación de peroxidación de lípidos-----	28
7.6 Determinación de la actividad de la superóxido dismutasa-----	29
7.7 Determinación de la actividad de glutatión peroxidasa-----	29
7.8 Análisis de resultados-----	29
8. RESULTADOS-----	30
8.1 Efecto de la administración de pramipexol sobre los niveles de especies reactivas de oxígeno en el hipocampo, la corteza frontal y el estriado-----	30
8.2 Efecto de la administración de pramipexol sobre la peroxidación de lípidos en el hipocampo, la corteza frontal y el estriado-----	32
8.3 Efecto de la administración de pramipexol sobre la actividad de superóxido dismutasa en la corteza frontal y el estriado-----	34
8.4 Efecto de la administración de pramipexol sobre la actividad de la glutatión peroxidasa en el hipocampo, la corteza frontal y el estriado-----	36
9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS-----	38
10. CONCLUSIONES-----	41
11. REFERENCIAS-----	42
12. ANEXOS -----	50

ABREVIATURAS

6-OHDA	6-hidroxidopamina
ATP	Adenosin Trifosfato
BCA	Ácido bicinconínico
CAT	Catalasa
CI	Complejo respiratorio I
CII	Complejo respiratorio II
CIII	Complejo respiratorio III
COX	Ciclooxigenasa
Cu	Cobre
DCF	2',7'diclorofluoresceína
DCFH-DA	2',7'diclorodihidrofluoresceína
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTNB	5,5-ditio-bis-2-nitrobenzoico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EP	Enfermedad de Parkinson
ETC	Cadena de transporte de electrones
G6PH	Glucosa-6-fosfato
GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GST	Glutación transferasa
HOO	Hidroperoxilo

IP	Intraperitoneal
KCN	Cianuro de potasio
MAO	Monoamino oxidasa
Mn	Manganeso
MPP+	1-metil-4-fenilpiridinio
MPTP	1-metil-4-fenil-1, 2, 3, 6 tetrahidropiridina
NOX	NADPH Oxidasa
PEG	Polietilenglicol
PL	Peroxidación lipídica
PPX	Pramipexol
ROO	Radicales peroxilo
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SNC	Sistema Nervioso Central
SNpc	Sustancia nigra pars compacta
SOD	Superóxido dismutasa
UF	Unidades de fluorescencia
XO	Xantina Oxidasa
Zn	Zinc

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Esquema representativo del estrés oxidativo-----	1
Figura 2 Generación de las ROS en las neuronas-----	5
Figura 3 Reacción de Fenton y Haber-Weiss-----	6
Figura 4 Isoformas de la enzima SOD en los mamíferos-----	8
Figura 5 Las enzimas antioxidantes protegen a la célula de concentraciones elevadas de ROS-----	10
Figura 6 Proceso de peroxidación lipídica-----	11
Figura 7 Estructura química de la rotenona-----	13
Figura 8 Mecanismo de acción de la rotenona-----	14
Figura 9 Estructura química y propiedades del pramipexol-----	15
Figura 10 Mecanismo de acción del pramipexol-----	16
Figura 11 Efecto del pramipexol sobre el estrés oxidativo inducido por H ₂ O ₂ o rotenona en las células SH-SY5Y-----	18
Figura 12 Efecto del pramipexol sobre la formación de ·OH-----	19
Figura 13 Efectos de 6-OHDA, Hc-TeTx y pramipexol (PPX) en ROS y LPX en el cuerpo estriado--	20
Figura 14 Vivario del laboratorio de Neuroquímica-----	25
Figura 15 Curva de calibración de proteínas-----	27
Figura 16 Curva de calibración de ROS-----	28
Figura 17 Efecto de la administración de rotenona y pramipexol sobre los niveles de ROS-----	31
Figura 18 Efecto de la administración de rotenona y PPX sobre los niveles de peroxidación lipídica ---	33
Figura 19 La administración de rotenona y pramipexol modifica la actividad de SOD-----	35
Figura 20 La administración de rotenona y pramipexol modifica la actividad de GPx-----	37

RESUMEN

El pramipexol es un agonista de la subfamilia de receptores de dopamina D₂ con afinidad preferencial por el subtipo D₃. Desde 1998, este fármaco ha sido indicado para el tratamiento sintomatológico de la Enfermedad de Parkinson, sin embargo, estudios experimentales han demostrado que tiene un efecto antioxidante independiente a su acción agonista. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto antioxidante del pramipexol en un modelo de rotenona. Se utilizaron ratonas de la cepa CD1 (28-30 g), el grupo vehículo fue administrado con una mezcla de DMSO/PEG en una relación 1:1, el grupo rotenona con 0.8 mg/kg y el grupo rotenona / pramipexol con 0.8mg/kg y 1 mg/kg, todos los grupos por vía intraperitoneal durante 15 días consecutivos. 24 horas después de haber terminado su tratamiento los animales fueron perfundidos y se obtuvieron el estriado, la corteza frontal y el hipocampo para la medición de los niveles de especies reactivas de oxígeno, niveles de peroxidación lipídica y los niveles de la actividad enzimática de superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa. Los resultados encontrados demostraron que la administración con rotenona aumenta la generación de ROS y la peroxidación de lípidos en las tres áreas y que el tratamiento con PPX es capaz de disminuir estos efectos únicamente en el núcleo estriado. En cuanto a la actividad enzimática, los resultados también demostraron que rotenona es capaz de aumentar la actividad de SOD y GPx en las tres áreas evaluadas y que la administración de PPX únicamente puede disminuir la actividad de GPx en las mismas. En conclusión, el PPX mostro un efecto antioxidante en la generación de ROS y PL y modifica la actividad de GPx pero no la de SOD en el modelo de rotenona en ratonas.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El estrés oxidante: una visión general

El cuerpo humano mantiene un balance de óxido-reducción para preservar el equilibrio entre la producción de pro-oxidantes generados como resultado del metabolismo celular y los sistemas de defensa antioxidantes. La pérdida de este balance de óxido-reducción conlleva a un estado que se conoce como estrés oxidativo y este estado se caracteriza por un aumento en los niveles de radicales libres y especies reactivas, que no alcanzan a ser compensados por los sistemas de defensa antioxidantes (Dorado et al., 2003).

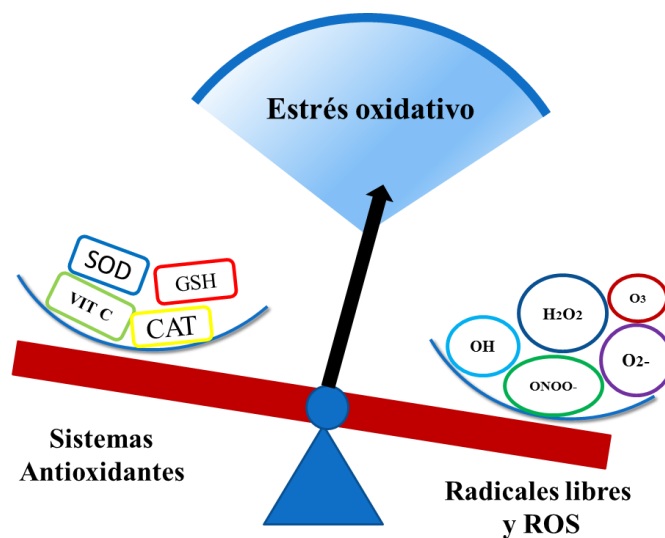


Figura 1. Esquema representativo del estrés oxidativo

Así mismo, la alteración de este balance entre pro-oxidantes y antioxidantes puede tener diversos grados de magnitud. El estrés oxidativo leve, donde las defensas antioxidantes bastan para restablecer dicho balance y el estrés oxidativo grave, que genera severas alteraciones en el metabolismo celular, como el rompimiento del ADN, aumento en la concentración de calcio intracelular, liberación de iones de Fe²⁺ y Cu⁺² catalíticos, daño a proteínas y peroxidación de lípidos (Valko et al., 2007). Además, este daño por estrés puede ser reversible o irreversible, dependiendo de factores como el tiempo que dure el proceso, la efectividad de las defensas antioxidantes, la edad del organismo, el estado nutricional y factores genéticos que codifican para los sistemas antioxidantes (Halliwell et al., 2015).

No obstante, las ROS son reconocidas por desempeñar un papel beneficioso para los sistemas vivos. Estos ocurren en concentraciones bajas e involucran roles fisiológicos en muchos procesos bioquímicos como la defensa contra agentes infecciosos o en la función de varios sistemas de señalización celular además las ROS también representan un componente del sistema inmune innato, y no solo están involucradas en el estallido respiratorio de neutrófilos, sino que también señalan la quimiotaxis celular inflamatoria en los sitios de inflamación (Bogdan et al., 2000), sin embargo, su sobreproducción se ha relacionado con una serie de enfermedades humanas, así como el en el proceso de envejecimiento (Valko et al., 2006).

1.2 El estrés oxidativo en el cerebro

Las células del SNC están expuestas a bajas concentraciones de ROS en condiciones fisiológicas, pero por protección antioxidante, sus efectos adversos son insignificantes. Sin embargo, las estructuras del SNC son particularmente sensibles a los efectos de ROS, debido a que tienen un metabolismo altamente activado, cuando 2–5% del O₂ utilizado se convierte en ROS en el proceso de respiración celular en las mitocondrias (Ames, 2000), otras características que también contribuyen a esta sensibilidad es que tienen altos niveles de ácidos grasos poliinsaturados, bajos niveles de antioxidantes y niveles relativamente altos de iones metálicos de transición redox. Por tanto, se ha descrito que el SNC tiene un potencial relativamente limitado para el metabolismo anaeróbico, lo que lo hace especialmente sensible a la hipoxia (Yokoyama et al., 2008) y que la acumulación de macromoléculas modificadas por oxidación, como el ADN, las proteínas o los lípidos, presenten funciones celulares alteradas como la pérdida del potencial de membrana en reposo, aumento de la permeabilidad de la membrana de las mitocondrias, conduciendo a la muerte celular progresiva (Lee et al., 2012).

También se ha demostrado que el tejido cerebral es más sensible a los daños descritos, en comparación con el tejido de la médula espinal o el sistema nervioso periférico. Esto podría ser en consecuencia del menor contenido del sistema tiol redox y las diferentes concentraciones de GSH, que además de participar en la reducción de ROS, reactiva las enzimas antioxidantes en el SNC mediante mecanismos independientes (Macco et al., 2013).

Por otro lado, dada la naturaleza heterogénea del cerebro que cuenta con varios tipos de células, ciertas áreas son más sensibles que otras a los cambios en el estrés oxidativo. Las neuronas y la glía tienen diversos tamaños, morfologías y características metabólicas y a pesar de producir menos mtROS, las neuronas son más sensibles que la glía al estrés oxidativo porque tienen menos

antioxidantes (Herrero-Mendez et al., 2009). Además, las neuronas son células postmitóticas, característica que hace que sean más sensibles a las alteraciones en la homeostasis celular, incluidos los cambios en el estado redox. Los diferentes tipos de neuronas también muestran diferencias en la topología, la mielinización y la cantidad de conexiones sinápticas, lo cual también puede alterar su sensibilidad a los cambios en los niveles de ROS. Este fenómeno se conoce como vulnerabilidad neuronal selectiva (Wang and Michaelis, 2010). En general, se ha observado que las neuronas grandes con axones largos tienen más probabilidades de morir en respuesta al aumento del estrés oxidativo. Algunas áreas del cerebro, como el hipocampo (Wang and Michaelis, 2010), las neuronas granulares del cerebelo, la amígdala, la corteza frontal (Radley et al., 2006), el área ventral tegmental y sustancia *nigra pars compacta* (SNpc), son más sensibles al estrés oxidativo. Dentro de estas áreas, algunas neuronas son más sensibles que otras, es decir, las neuronas CA1 en el hipocampo o las neuronas de la SNpc, en estas últimas poblaciones la misma autooxidación de la dopamina y sus metabolitos pueden conducir a la producción de ROS, que se ve agravada por el abundante contenido de hierro y cobre en esta región (Jenner et al., 1992).

1.3 La generación de los radicales libres y las especies reactivas de oxígeno

La cadena respiratoria mitocondrial, la xantina oxidasa, la NADPH oxidasa, la lipooxigenasa, la COX y los procesos no enzimáticos como la autooxidación de dopamina y noradrenalina son las fuentes de creación de ROS en el SNC. Sin embargo, las mitocondrias son la principal fuente de radicales de oxígeno en las neuronas, durante la producción de adenosin trifosfato (ATP) (Ljubisavljevic, 2016). Las mitocondrias usan aproximadamente el 80 % del O₂ inspirado y durante el curso de la fosforilación oxidativa, el O₂ se reduce a H₂O. Sin embargo, existe una pequeña pérdida de electrones de la cadena de transporte de electrones directamente al O₂ y se produce O₂⁻ (Sanders y Timothy Greenamyre, 2013).

Existen 11 sitios distintos donde se pueden producir ROS en mitocondrias aisladas (Brand, 2010). Sin embargo, solo tres de estos sitios han demostrado ser relevantes para la producción de ROS *in vivo*: el complejo respiratorio I (NADH: ubiquinona oxidorreductasa), complejo II (succinato deshidrogenasa) y Complejo III (también conocido como Ubiquinol: citocromo c reducta) (Ishii et al., 2005). Sorprendentemente, el complejo respiratorio IV (CIV, también conocido como citocromo c oxidasa), que reduce el oxígeno al agua, no produce ROS, lo que demuestra que la

fuga de electrones y la producción de ROS pueden prevenirse en el ETC (LeDoux et al., 2007). Todas las ROS producidas por CI están dirigidos a la matriz mitocondrial, mientras que los ROS producidos por CIII se dividen entre el espacio intermembrana y la matriz. Esta distinción podría ser importante para determinar por qué las ROS producidas en CI y CIII tienen diferentes efectos posteriores (Stefanatos and Sanz, 2018). Después de los complejos respiratorios mitocondriales, las NOX son probablemente el principal grupo enzimático que produce ROS. De hecho, son la única familia de enzimas cuya función específica es la producción de ROS (superóxido o peróxido de hidrógeno) (Drummond et al., 2011) y otros generadores de ROS como XO o MAO (Vida et al., 2011). Las NOX participan en diversas vías de señalización instrumentales para la regulación del crecimiento y la inflamación, mientras que su importancia en el envejecimiento y las enfermedades relacionadas con la edad está respaldada por varios estudios.

Finalmente, además de las mitocondrias, otros orgánulos aportan cantidades significativas de ROS lo que influye en los niveles totales de estas especies en la célula, esto tiene consecuencias para la señalización redox y puede desencadenar el estrés oxidativo. El peroxisoma es uno de los generadores y desintoxicantes más importantes de peróxido de hidrógeno en la célula. En consecuencia, la pérdida de la homeostasis redox dentro de los peroxisomas se correlaciona con el aumento de los niveles de peróxido de hidrógeno y la inducción de la muerte celular (Titorenko and Terlecky, 2011). Los lisosomas son instrumentales para la renovación de proteínas y orgánulos dañados. Sin embargo, la liberación involuntaria de contenido lisosómico, como los metales libres y los radicales libres puede promover el daño oxidativo.

Por otro lado, cabe mencionar que las ROS también pueden generarse a través de otras vías, como las interacciones directas entre metales redox activos a través de reacciones que incluyen las reacciones de Fenton y Haber- Weiss, o por vías indirectas que involucran la activación de enzimas como la óxido nítrico sintasa (NOS) (Dias et al., 2013).

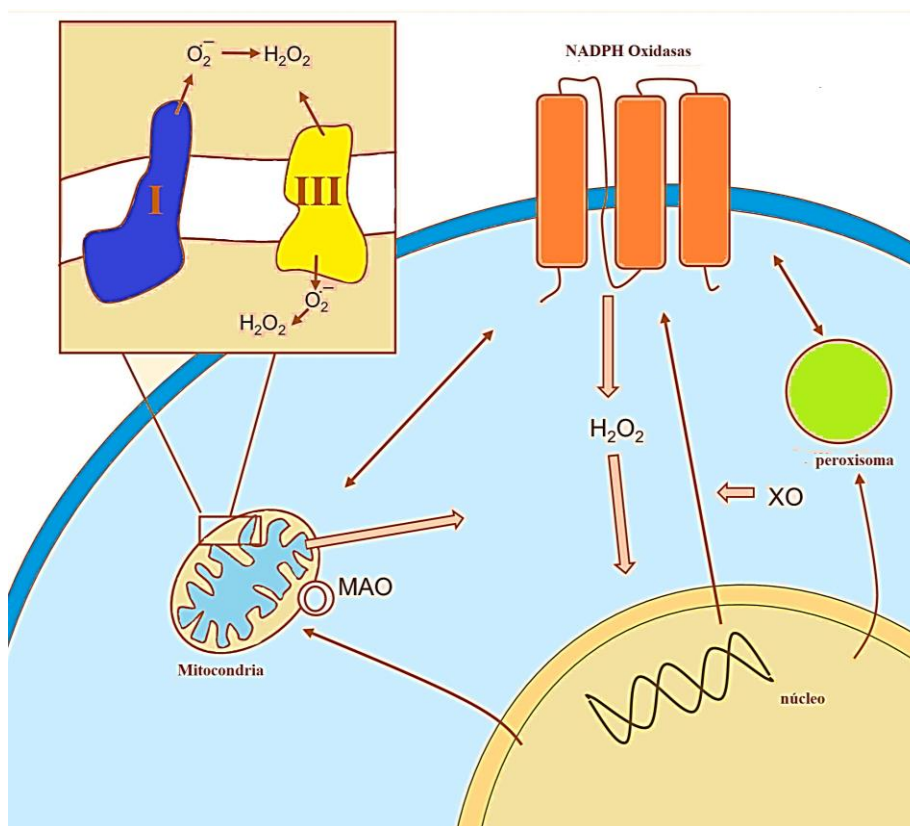


Figura 2. Generación de las ROS en las neuronas. Este esquema resalta las fuentes de ROS y su ubicación en la célula. En la membrana celular, encontramos NADPH oxidasas capaces de producir O_2^- y H_2O_2 . Los peroxisomas y las mitocondrias también son sitios de producción significativa de ROS. La XO se encuentra en el citosol, mientras que la MAO se encuentra en la membrana externa mitocondrial. Las flechas gruesas resaltan la señalización intracelular que las ROS específicas llevan a cabo para mantener la homeostasis redox. Las flechas finas describen la conversación cruzada entre los productores de ROS y el núcleo para regular las salidas de señalización redox. Tomado y modificado de (Stefanatos y Sanz, 2018).

1.4 Las principales especies reactivas de oxígeno

El radical anión superóxido (O_2^-)

La producción de superóxido ocurre principalmente dentro de las mitocondrias de las células a partir de los complejos I y III de la cadena de transporte de electrones. Durante la transducción de energía, un pequeño número de electrones se "filtran" al oxígeno prematuramente, formando el superóxido. Una vez en su forma aniónica puede atravesar fácilmente la membrana mitocondrial interna (Muller et al., 2004). Del O_2 producido, aproximadamente el 1 al 3 % puede formar O_2^- , sin embargo, esto puede ser una sobreestimación (St-Pierre et al., 2002). El radical superóxido,

carece de reactividad suficiente para atacar directamente a las macromoléculas aunque puede actuar como oxidante débil o como agente reductor (Valko et al., 2007).

El radical hidroxilo (-OH)

El radical hidroxilo es una de las especies más reactivas presentes en el organismo. De vida extremadamente corta (aproximadamente 10^{-9} segundos) (Pastor et al., 2000), su electrón desapareado puede reaccionar inespecíficamente con casi cualquier tipo de molécula (ADN, proteínas, enzimas). Además, es responsable de la propagación del daño oxidativo entre fracciones subcelulares, ya que puede atravesar membranas celulares y producir reacciones en cadena.

El peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

El consumo de oxígeno en el peroxisoma conduce a la producción de H₂O₂ que luego se utiliza para oxidar una variedad de moléculas. Este orgánulo también contiene catalasa, una enzima que descompone el peróxido de hidrógeno en H₂O y previene la acumulación de este compuesto tóxico (Muller et al., 2004).

Cuando los peroxisomas están dañados libera en el H₂O₂ al citosol, contribuyendo significativamente al estrés oxidativo. El H₂O₂ no es un radical libre, pero si se le considera el principal intermediario en el metabolismo de las especies reactivas del oxígeno. En presencia de trazas de catalizadores metálicos como el hierro, el cobre o de otros radicales libres puede dar lugar a la formación del radical •OH. A través de las reacciones de Fenton o Haber-Weiss (Dias et al., 2013).

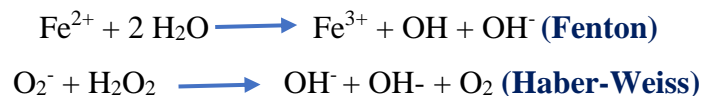


Figura 3. Reacción de Fenton y Haber-Weiss

Los radicales reactivos adicionales derivados del oxígeno que se pueden formar en los sistemas vivos son radicales peroxilo (ROO). El radical peroxilo más simple es HOO, que es la forma protonada de superóxido (O₂⁻) y generalmente se denomina radical hidroperoxilo o radical perhidroxilo (Valko et al., 2007).

1.5 Las enzimas antioxidantes

La exposición constante a los diferentes radicales libres generados como consecuencia a partir de diversas fuentes ha llevado a los organismos aerobios a desarrollar una serie de mecanismos de defensa. Los cuales implican: mecanismos preventivos, mecanismos de reparación y defensas antioxidantes. Dentro del mecanismo de defensa por medio de enzimáticas antioxidantes se incluyen enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), la glutatión peroxidasa (GPx) y la catalasa (CAT) que previenen significativamente la oxidación de proteínas, lípidos, hidratos de carbono y moléculas de ADN debido a que impiden que se unan al oxígeno, al reaccionar-interactuar más rápido con los radicales libres y las especies reactivas del oxígeno que con el resto de las moléculas presentes, en un determinado microambiente -membrana plasmática, citosol, núcleo o líquido extracelular (He et al., 2017). Por otra parte, los antioxidantes no enzimáticos están representados por ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), glutatión (GSH), carotenoides, flavonoides, ácido úrico y melatonina, que ofrecen funciones neutralizantes al causar quelación de metales de transición (Rizzo et al., 2010).

En condiciones normales, existe un equilibrio entre las actividades y los niveles intracelulares de estos antioxidantes. Este equilibrio es esencial para la supervivencia de los organismos y su salud.

1.6 Superóxido dismutasa

La mayor defensa celular contra O_2^- y el peroxinitrito es un grupo de oxidorreductasas conocidas como SOD, que catalizan la dismutación de O_2^- en oxígeno y H_2O_2 . Este mecanismo de dismutación implica una reducción alternativa y reoxidación de un metal de transición activo redox, como el cobre (Cu) y el manganeso (Mn) en el sitio activo de la enzima. Por lo tanto, esto indica que la actividad de SOD requiere un metal catalítico. En los mamíferos, existen tres isoformas de SOD, SOD 1 (SODCu/Zn) que se localiza principalmente en el citosol con una fracción más pequeña en el espacio intermembrana de las mitocondrias.

Se ha informado que también se puede localizar en núcleos, lisosomas y peroxisomas. Su actividad depende de la presencia de Cu y Zn, SOD 2 (SODMn) que se localiza en la matriz mitocondrial, aunque su síntesis se realiza en el citosol y se dirige a las mitocondrias por un péptido señal donde participa en la dismutación de O_2^- generado por la cadena respiratoria y SOD 3 (SODec) que es la SOD principal en el espacio extracelular, su distribución en los tejidos varía, pero se expresa altamente en vasos sanguíneos, el pulmón, el riñón, el útero y en menor medida el corazón. Cada

una es un producto de distintos genes y distintas localizaciones subcelulares, pero cataliza la misma reacción (Fukai y Ushio-Fukai, 2011).

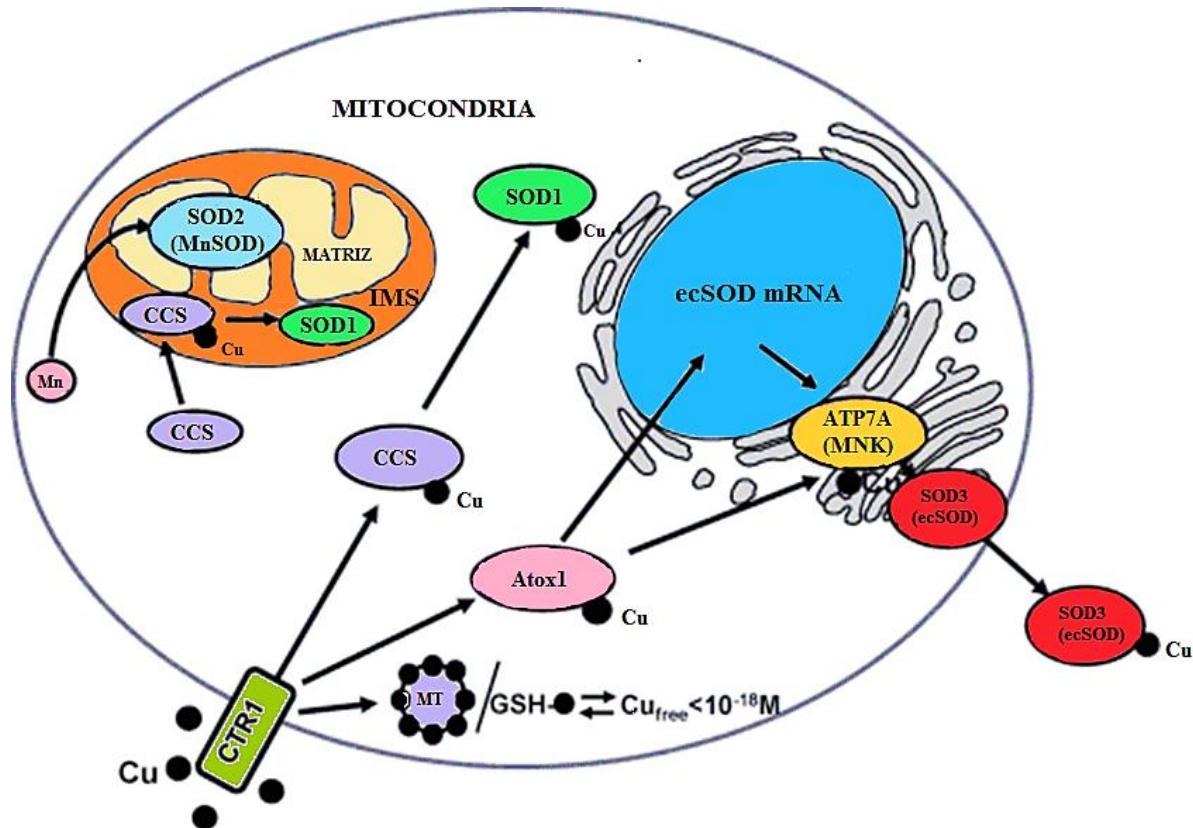


Figura 4. Isoformas de la enzima SOD en los mamíferos. Las diversas isoformas de SOD emplean cofactores metálicos como el cobre (Cu) y el manganeso (Mn) para llevar a cabo la desproporción de superóxido. Como en condiciones fisiológicas, el nivel de Cu libre intracelular está restringido, una vez captado por el transportador CTR1 se requiere proteínas citosólicas transportadoras de Cu denominadas chaperones Cu para el tráfico de Cu a las enzimas como CCS (Cu chaperona para SOD1), IMS (intermembrana mitocondrial) y Atox1 que suministra a ecSOD a través del transportador de cobre ATP7A en Golgi. Las concentraciones citosólicas de Cu libre se mantienen a niveles bajos de (10^{-18} M) mediante sistemas de eliminación de metales, incluidas las metalotioneínas (MT) y GSH. Tomado y modificado de Fukai y Ushio-Fukai, 2011.

1.7 Glutación peroxidasa

Las glutación (GPX) son un grupo de 8 enzimas (GPX1-8) que son importantes para reducir el peróxido de hidrógeno a agua. Los GPX son enzimas de selenocisteína que usan GSH como agente reductor y requieren selenio para su función antioxidante (Rotruck et al., 1973). En el cerebro, las selenoproteínas GPX-1-3 existen como proteínas tetraméricas, compuestas por cuatro subunidades idénticas y cada monómero tiene un peso molecular de 22–23 kDa, mientras que GPX4 tiene actividad como monómero. GPX1 y 4 se encuentran en la mitocondria, el núcleo y el citosol, y GPX1, también conocido como GSHPx, está presente tanto en las neuronas como en las células gliales (Margis et al., 2008). La sobreexpresión de GPx disminuye la pérdida de neuronas, reduce la acumulación de peróxido de hidrógeno y la peroxidación de lípidos en condiciones neurotóxicas (Wang et al., 2003). La glutación peroxidasa y la catalasa reducen el peróxido de hidrógeno cuando actúan solos, pero disminuyen eficazmente la toxicidad del peróxido de hidrógeno exógeno cuando actúan juntos (Smeyne y Smeyne, 2013).

1.8 Catalasa

Dentro de la célula, la catalasa (CAT) se encuentra principalmente en los peroxisomas, contrariamente a las mitocondrias, las proteínas ubicadas dentro de los peroxisomas son todas de origen nuclear y deben ser importadas. La catalasa se expresa en todos los órganos pero se han identificado niveles más altos de actividad en el hígado, los riñones y los glóbulos rojos (Glorieux y Calderon, 2017). La función de la catalasa es la descomposición de H_2O_2 en oxígeno y agua sin el consumo de equivalentes reductores endógenos, un papel importante en la defensa celular contra el daño oxidativo por H_2O_2 . Además de su actividad catalítica, la catalasa también puede actuar en la descomposición de sustratos pequeños como metanol, formiato, azida, hidroperóxidos y en el caso del etanol, también es capaz de oxidarlo a acetaldehído contribuyendo a su metabolismo hepático (Heinzelmann and Bauer, 2010).

Se ha informado que la catalasa puede descomponer el peroxinitrito, oxida el óxido nítrico a nitrito (Brunelli et al., 2001; Gebicka and Didik, 2009). Además, también exhibe una baja actividad oxidasa (oxidación dependiente de O_2 de sustratos orgánicos). Por lo tanto, la catalasa puede tener funciones adicionales, como la desintoxicación o activación de compuestos tóxicos y antitumorales. Por ejemplo, la catalasa se ha detectado en ovocitos de ratón para proteger el genoma del daño oxidativo durante la maduración meiótica (Park et al., 2016).

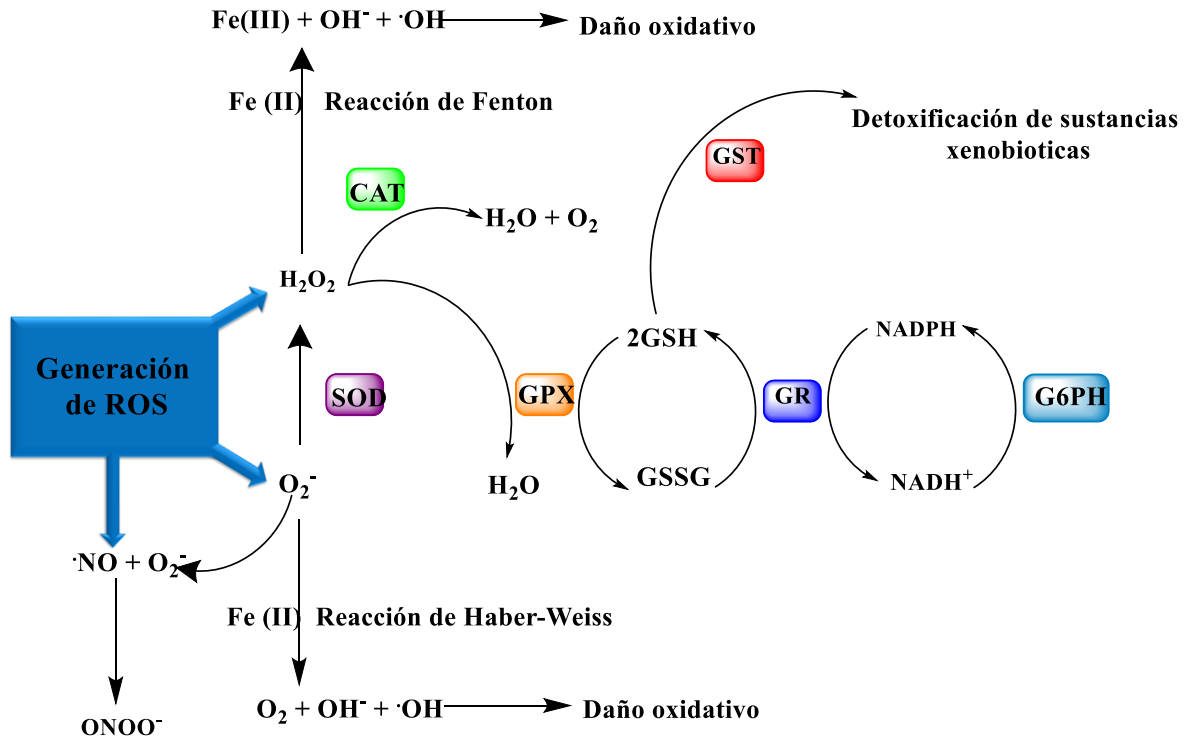


Figura 5. Las enzimas antioxidantes protegen a la célula de concentraciones elevadas de ROS. Las principales enzimas antioxidantes son superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatiox S-transferasa (GST), glutatiox reductasa (GR), glutatiox peroxidasa (GPx) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PH). Modificado de (Hermes-Lima and Zenteno-Savín, 2002).

1.9 El daño de lípidos por especies reactivas de oxígeno

El estrés oxidativo también puede alterar los lípidos de la membrana por la peroxidación, afectando la modulación de las cascadas de señalización que contribuyen al desarrollo, la diferenciación, la protección, la regeneración y la reparación de las neuronas (Butterfield et al., 2010). Las dos ROS más prevalentes que pueden afectar profundamente a los lípidos son principalmente el radical hidroxilo ($HO\cdot$) y el hidropéroxido (HO_2) y por consecuencia la formación de lípidos modificados por oxidación puede causar disfunción celular y la muerte. Este proceso provoca una disminución en la fluidez, reducción en el potencial electroquímico y el aumento de la permeabilidad de la membrana (Sanders y Timothy Greenamyre, 2013). La peroxidación tiene como resultado la formación de hidropéroxidos lipídicos en un sistema de propagación en cadena. Este proceso transcurre en tres etapas: La etapa de inicio, cuando los radicales libres como el radical hidroxilo capta un átomo de hidrógeno de un carbono metileno de

los ácidos grasos dejando un electrón no apareado en el carbono, formando un radical lipídico (L^{\bullet}). En la fase de propagación, el radical lipídico (L^{\bullet}) reacciona rápidamente con el oxígeno para formar un radical peroxi lipídico (LOO^{\bullet}) que extrae un hidrógeno de otra molécula lipídica generando una nueva L^{\bullet} y el hidroperóxido de lípido ($LOOH$). En la reacción de terminación, los antioxidantes como la vitamina E donan un átomo de hidrógeno a la LOO^{\bullet} formando un radical de vitamina E correspondiente que reacciona con otro LOO^{\bullet} , y finalmente se forman productos no radicales.

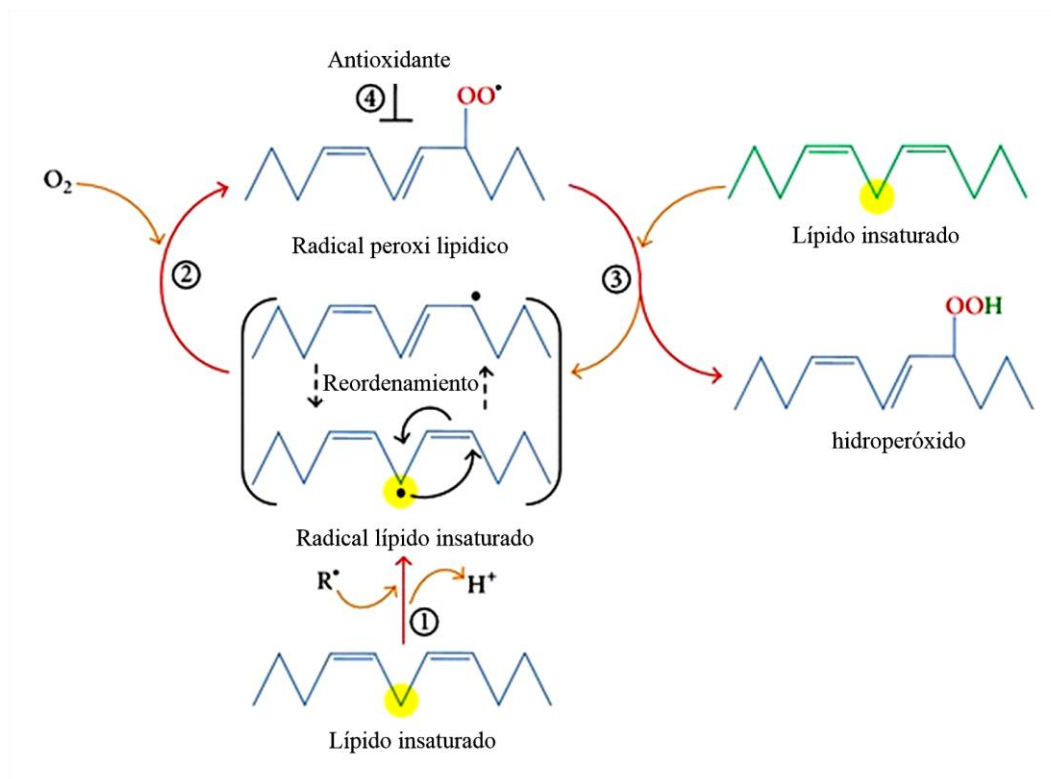


Figura 6. Proceso de peroxidación lipídica. En la iniciación, los prooxidantes abstraen el hidrógeno alílico y se forma un dieno conjugado (paso 1). En la propagación, el radical lipídico reacciona con oxígeno para formar un radical peroxi lipídico (paso 2) que extrae un hidrógeno de otra molécula lipídica generando un nuevo radical lipídico e hidroperóxido lipídico (paso 3). En la fase de terminación, los antioxidantes donan un átomo de hidrógeno al radical peroxi lipídico, lo que resulta en la formación de productos no radicales (paso 4). Tomado y modificado de Ayala et al., 2014.

Una vez que se inicia la peroxidación lipídica, se producirá una propagación de las reacciones en cadena hasta que se produzcan los productos de terminación (Ayala et al., 2014). Los peróxidos lipídicos resultantes son compuestos bastante estables pero su descomposición puede ser catalizada por metales de transición y complejos de metales dando lugar a nuevos radicales capaces de estimular más la peroxidación lipídica o a la formación de productos terminales de oxidación de toxicidad diversa como el malondialdehído (MDA), 4-hidroxinonenal (4-HNE), el propanal y el hexanal (Yin et al., 2011).

1.10 La rotenona como modelo de toxicidad mitocondrial

La rotenona es un insecticida y pesticida natural que se produce en las hojas, raíces y rizomas de las leguminosas tropicales de los géneros *Derris*, *Lonchocarpus* y *Tephrosia* (Betarbet et al., 2000). Desde hace muchos años se ha utilizado como insecticida en huertos y para el control de poblaciones de peces, aunque recientemente su exposición se ha relacionado con un mayor riesgo de la enfermedad de Parkinson (Tanner et al., 2011; Martínez y Greenamyre, 2012). La rotenona tiene la característica de ser altamente lipofílica y, por lo tanto, atraviesa fácilmente todas las membranas biológicas, incluida la barrera hematoencefálica sin necesidad de transportadores. Esta naturaleza permite su administración sistémica, lo que lo hace menos exigente técnicamente que los modelos como 6-OHDA, que requiere inyecciones estereotáxicas en el cerebro (Johnson y Bobrovskaya, 2015). Este insecticida se usó por primera vez en la investigación en la década de 1980, después del descubrimiento de que MPTP y durante la última década, Greenamyre y sus colaboradores han promovido su uso para modelar la EP *in vivo* y procesos de estrés oxidativo. Sin embargo, aunque la inyección estereotáxica fue el primer enfoque, la administración sistémica está proporcionando mejores resultados (Duty and Jenner, 2011). Después de una sola inyección intravenosa, la rotenona alcanza concentraciones máximas en el SNC en 15 minutos y se descompone a aproximadamente la mitad de este nivel en menos de 2 h. Además, su distribución cerebral es heterogénea, paralela a las diferencias regionales en el metabolismo oxidativo y también puede cruzar libremente todas las membranas celulares acumulándose en orgánulos subcelulares como las mitocondrias.

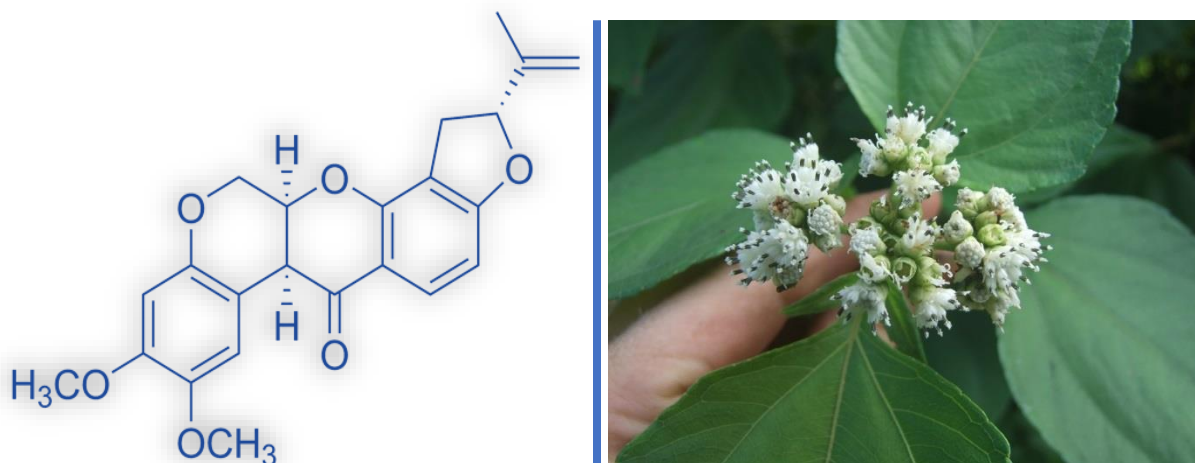


Figura 7. Estructura química de la rotenona

Desafortunadamente, además de su toxicidad central, la rotenona muestra un alto grado de toxicidad sistémica que produce altas tasas de mortalidad, aproximadamente 30% de los animales independientemente de la ruta de administración. También parece haber una resistencia intrínseca de algunos, ya que solo el 50% de los animales tratados muestran neurodegeneración. Por lo tanto, todos estos factores combinados dan como resultado la necesidad de utilizar un mayor número de animales al comienzo de cualquier estudio para garantizar que haya números relevantes disponibles para el análisis bioquímico e histológico (Betarbet et al., 2000).

Como modelo de neurodegeneración se ha utilizado para estudiar las características clínicas y patológicas relevantes de la enfermedad de Parkinson, así como procesos de estrés oxidativo en modelos celulares y animales (Betarbet et al., 2000, Liu et al., 2003). Este modelo de toxicidad tiene la capacidad de causar degeneración dopaminérgica, inclusiones de α -sinucleína y déficit motor. Las inyecciones diarias por vía intraperitoneal de 3 mg / kg de rotenona durante 6 a 10 días son suficientes para inducir una pérdida del 45% de las neuronas dopaminérgicas en el SNpc, el agotamiento de dopamina estriatal y síntomas motores como bradicinesia, inestabilidad postural y rigidez. La rotenona también puede inducir síntomas no motores como trastornos del sueño en ratas y acumulación de hierro nigral (Betarbet et al., 2006).

1.11 Mecanismo de acción de la rotenona

Su principal mecanismo de acción es a través de la inhibición del transporte de electrones en el complejo I mitocondrial. La rotenona deteriora la fosforilación oxidativa en las mitocondrias al inhibir la actividad reducida de nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) - ubiquinona reductasa a través de su unión a la subunidad PSST del complejo enzimático. Bloqueando la producción de ATP y en consecuencia afectando el metabolismo celular. Esta inhibición de la cadena respiratoria mitocondrial conduce a un aumento en la producción de ROS (Radad et al., 2006), tales como el peróxido de hidrógeno y el radical superóxido junto con la peroxidación de la membrana celular (Cabezas et al., 2012; Venkatesh Gobi et al., 2018). Además de su acción sobre la respiración mitocondrial, la rotenona también inhibe la formación de microtúbulos a partir de tubulina.

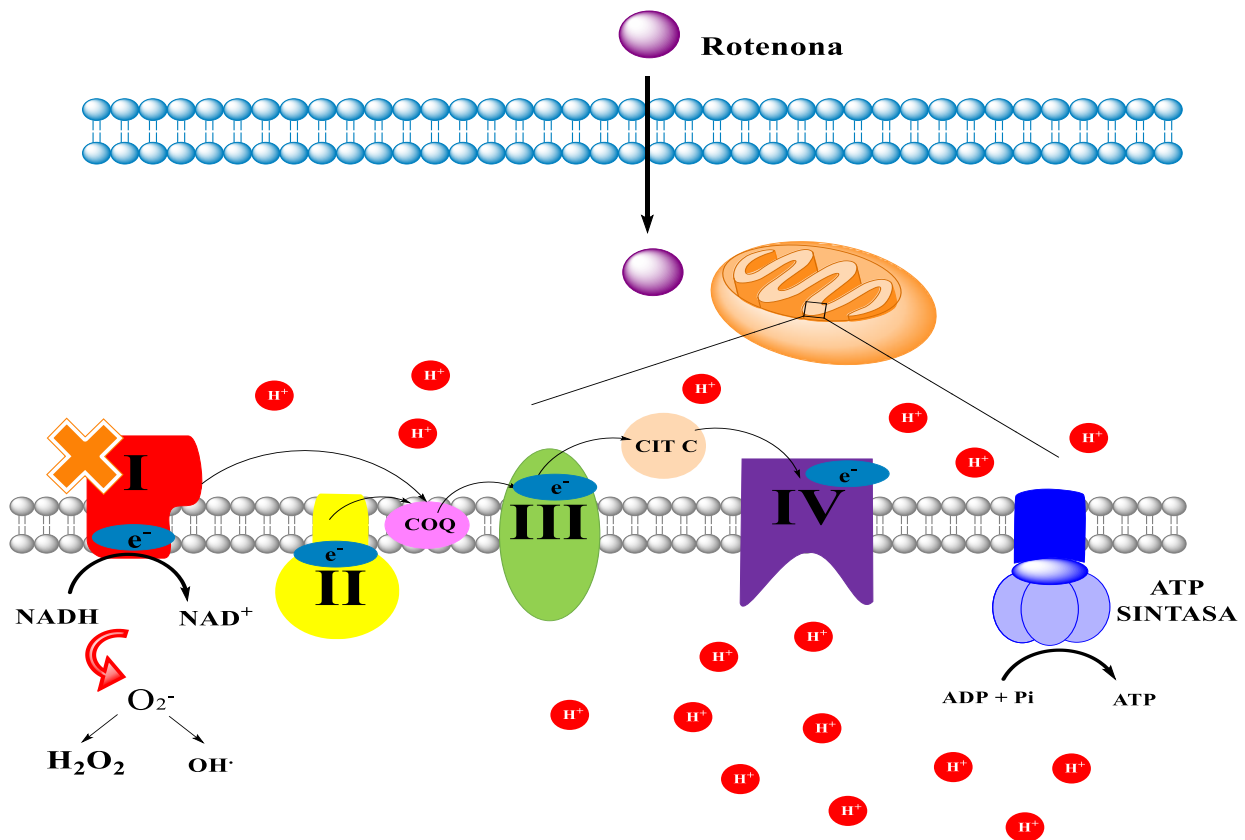
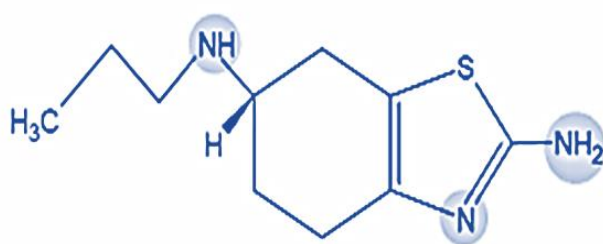


Figura 8. Mecanismo de acción de la rotenona. La rotenona atraviesa libremente las membranas celulares llegando a la mitocondria donde provoca la inhibición de la fosforilación oxidativa al impedir la actividad reducida de NADH-ubiquinona reductasa a través de su unión a la subunidad PSST del complejo enzimático. Bloqueando la producción de ATP y aumentando un aumento en la generación de ROS. Tomado y modificado de Sanders y Timothy Greenamyre, 2013.

1.12 El pramipexol como agente antioxidante

El Pramipexol (PPX) o 2-amino-4, 5, 6,7-tetrahidro-6-propilaminobenzotiazol, es un agonista pre y postsináptico en la subfamilia de receptores de dopamina D₂ (subtipos de receptores D₂ , D₃ , D₄) con afinidad preferencial por el subtipo de receptores de dopamina D₃ .(Kohno y Takeuchi, 2004). Estudios *in vitro* han demostrado que hay una afinidad preferencial por los receptores de dopamina D₃ de 6.6 a 7.8 veces mayor por los subtipos de receptores de dopamina D₂ (Dooley y Markham, 1998).

Aprobado desde 1998, el PPX está indicado para el tratamiento sintomático de la enfermedad de Parkinson , ya sea solo o en combinación con Levodopa durante todo el progreso de la enfermedad hasta etapas avanzadas y el síndrome de las piernas inquietas (Schapira et al., 2013).



Formula molecular	C10H17N3S
Solubilidad	Agua > 20% Metanol ~ 8% Etanol ~ 0.5%.
pKa	9.5 ± 0.2
PM	211.324 g/mol

Figura 9. Estructura química y propiedades del pramipexol

El PPX fue diseñado como un comprimido de liberación prolongada, la sustancia activa se libera por dos mecanismos diferentes: difusión y erosión y alcanza su concentración plasmática máxima (C_{máx}) aproximadamente 6 horas después de la administración oral. Tras su administración, el agente muestra una biodisponibilidad mayor del 90% e incluso estudios farmacocinéticos han observado un aumento en la C_{máx} con la ingesta de comida rica en grasas (Hametner et al., 2012). Tiene una unión a proteínas menor al 20% y se metaboliza solo en pequeña medida (10%), eliminándose predominantemente por excreción renal (90%) y al no ser metabolizado por el sistema enzimático del citocromo P450, no se considera que tenga efectos perjudiciales sobre el metabolismo hepático como otros medicamentos. Su vida media de eliminación varía de 8 horas en los jóvenes a 12 horas en los ancianos (Jenner et al., 2009).

Recientemente se ha demostrado que el PPX a parte de su mecanismo de acción, como agonista de los receptores de dopamina, tiene efectos neuroprotectores *in vitro* e *in vivo* como lo es el aumento de Bcl-2 y la supresión de la apoptosis, el aumento de factores neurotróficos y la inhibición antioxidante ante la generación de radicales libres. Sin embargo, aún no se ha podido describir porque mecanismo lo hace (Kohno and Takeuchi, 2004).

También se ha demostrado que el PPX puede proteger líneas celulares dopaminérgicas como la MES 23.5 contra 6-OHDA y peróxido de hidrógeno y esta neuroprotección no puede ser bloqueada por antagonistas selectivos D₂ o D₃. La incubación con PPX (5-20 µM) en cultivos celulares MES 23.5 aumentó los niveles celulares de glutatión y las actividades de glutatión peroxidasa y catalasa, pero solo un poco sobre la actividad SOD. Estos resultados indican que los efectos neuroprotectores del PPX probablemente están asociados con su propiedad antioxidante independiente de la activación del receptor D₂ / D₃ (Le et al., 2000).

En otros estudios se ha reportado que el PPX puede inhibir la peroxidación lipídica y reduce las lesiones en la SNpc en ratones con tratamiento con MPTP (Zou et al., 2000; Wang et al., 2018). Además, se ha sugerido que puede mostrar efectos neuroprotectores en la degeneración por isquemia o metanfetamina inducida en las neuronas de la SNpc *in vivo* (Hall et al., 1996) y en ratas tratadas con 3- acetilpiridina (Sethy et al., 1997; Wang et al., 2018). Por otra parte, se ha descrito también que el PPX se acumula en el cerebro y en las mitocondrias eliminando una variedad de radicales libres oxidativos y nitrativos (Danzeisen et al., 2006), demostrando así neuroprotección *in vitro* e *in vivo* contra los ataques mitocondriales y oxidativos (Abramova et al., 2002) sin embargo, sus mecanismos subyacentes son aún desconocidos.

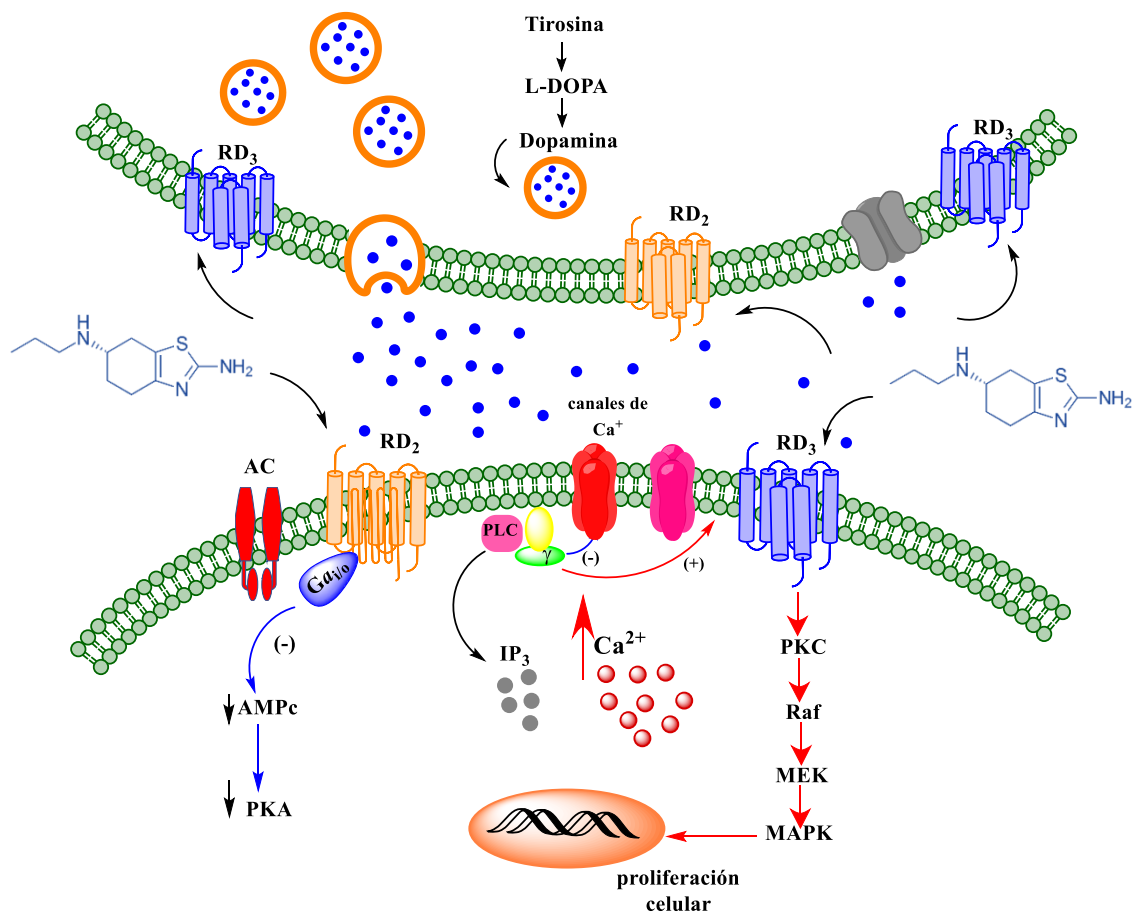


Figura 10. Mecanismo de acción del pramipexol. En el esquema se muestra la activación de la vía de señalización de los receptores D2 y D3, disminuyendo los niveles de AMPc, incrementando los niveles de calcio y la activación de las MAPK por medio del receptor D3. Tomado y modificado de Rangel-Barajas et al., 2015.

Estudios realizados por Masatoshi Inden y colaboradores en 2009 demostraron que PPX inhibe la muerte de neuronas dopaminérgicas y los déficits motores inducidos por rotenona a una dosis 30 mg/kg vía oral y el PPX a una dosis de 1 mg/kg vía intraperitoneal durante 28 días consecutivos en ratones de la cepa C57BL/6 (Inden et al., 2009).

El tratamiento con H₂O₂ (50 mM) y PPX durante 24 horas en células SH-SY5Y y SH-SY5Y DJ-1KD dio como resultado protección significativa contra la muerte celular de una manera dependiente de la concentración de PPX. En las células DJ-1KD, la muerte celular inducida también fue inhibida por el PPX, aunque la muerte H₂O₂ (50 mM) fue mayor en comparación con las células SH-SY5Y. De manera similar, el tratamiento simultáneo con 300 nM de rotenona y

PPX durante 48 h dio como resultado la disminución significativa de la muerte celular en una concentración dependiente.

Para examinar la actividad de eliminación de PPX hacia $\cdot\text{OH}$, se utilizó espectrometría ESR. La cual mostro una señal representativa de $\cdot\text{OH}$ caracterizada por cuatro ondas. La adición de PPX disminuyó significativamente la intensidad la señal de una manera dependiente de la concentración.

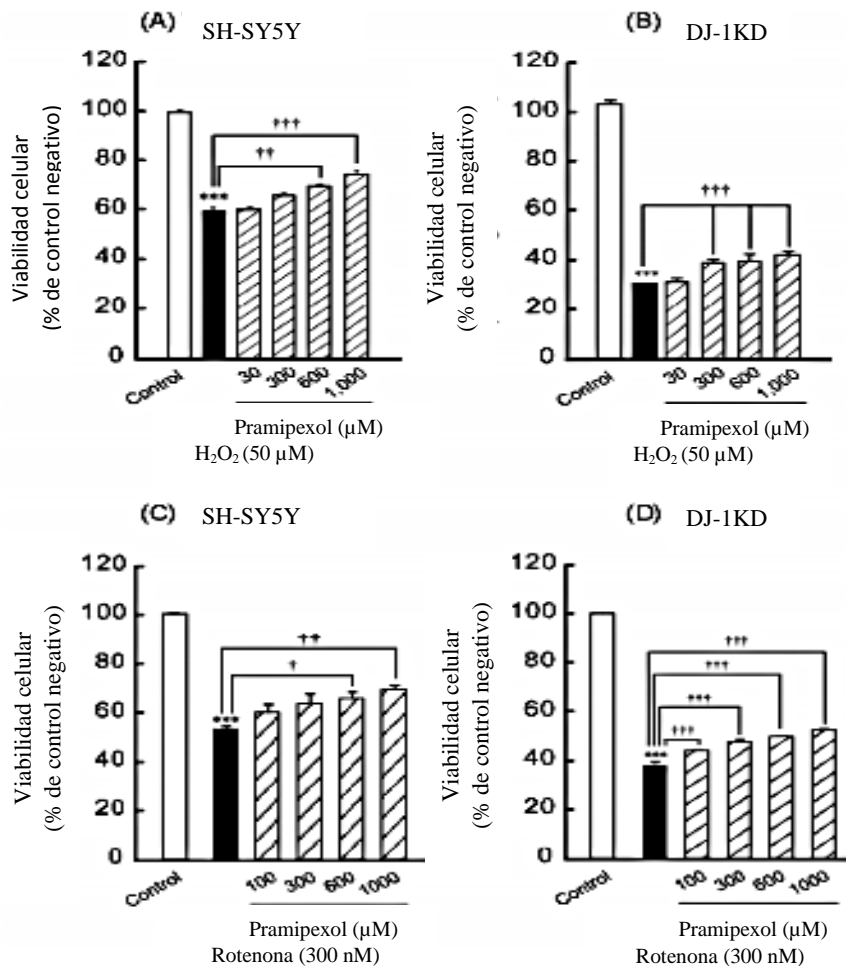


Figura 11. Efecto del pramipexol sobre el estrés oxidativo inducido por H₂O₂ o rotenona en las células SH-SY5Y (A y C) y SH-SY5Y DJ-1 (B y D). Prueba de Bonferroni / Dunn: *** p < 0.001. Tomado y modificado de Inden et al, 2009.

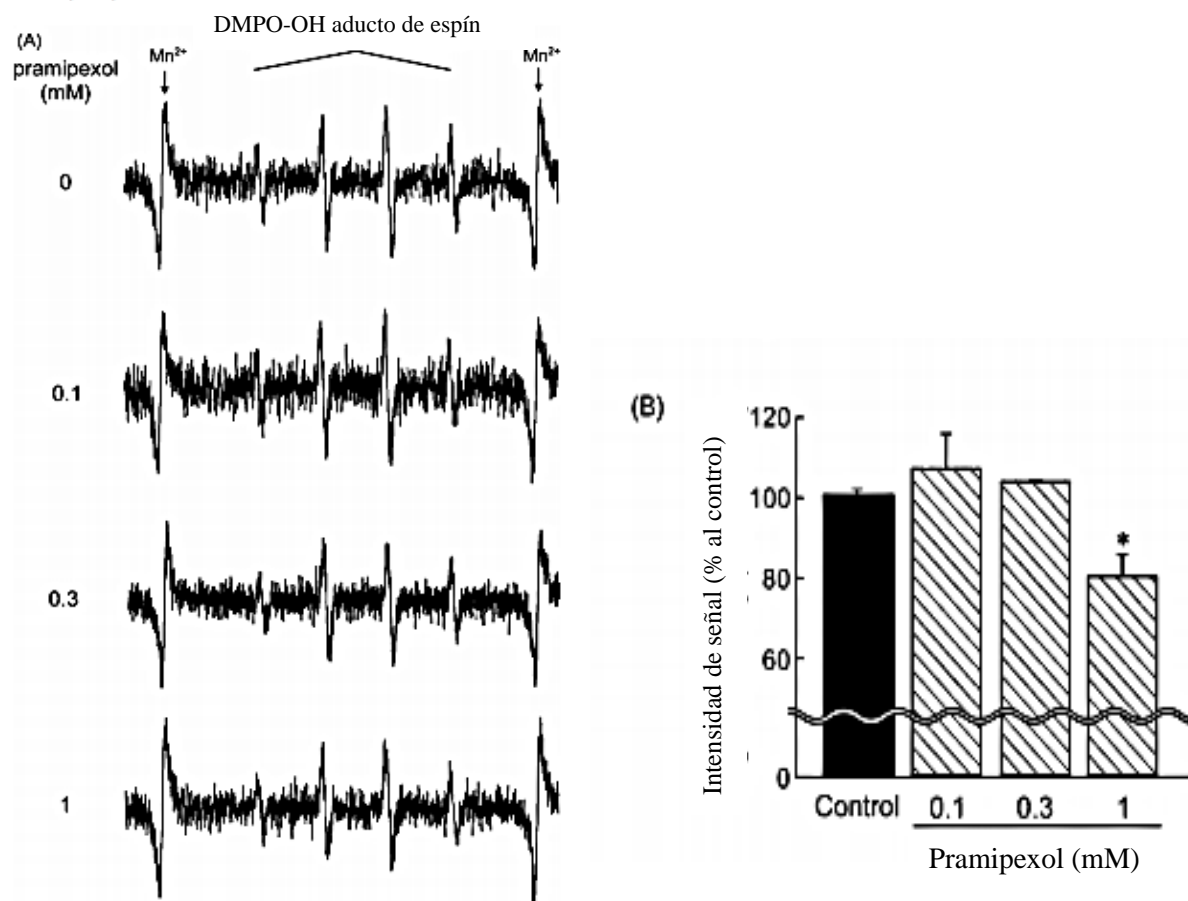


Figura 12. Efecto del pramipexol sobre la formación de $\cdot OH$. (A) espectros ESR representativos de aductos de espín de $\cdot OH$ en presencia o ausencia de pramipexol. (B) Dependencia- concentración de la actividad de eliminación de pramipexol en $\cdot OH$. La intensidad de la señal se presenta como un porcentaje. (Prueba de Bonferroni / Dunn): * $p < 0.05$, en comparación con el control. Tomado y modificado de Inden et al, 2009.

Por otro lado, estudios realizados por Patricio y colaboradores en 2019 evaluaron el efecto antioxidante de PPX (1 mg/kg vo, cada 12 h) durante 30 días y el fragmento Hc-TeTx (20 $\mu g/kg$ i.m cada 24 h) durante 3 días, solos y en combinación en ratas macho Wistar que fueron administradas con 6-OHDA en el cuerpo estriado dorsolateral. Para determinar el daño oxidativo en el estriado, se determinó los niveles de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y los niveles de la peroxidación lipídica (LPX). Los resultados mostraron que la administración de 6-OHDA aumento 2.5 veces los niveles de ROS y LPX y este aumento se redujo aproximadamente un 50% por Hc-TeTx y se normalizo por PPX y la combinación de ambas drogas (Patricio et al., 2019).

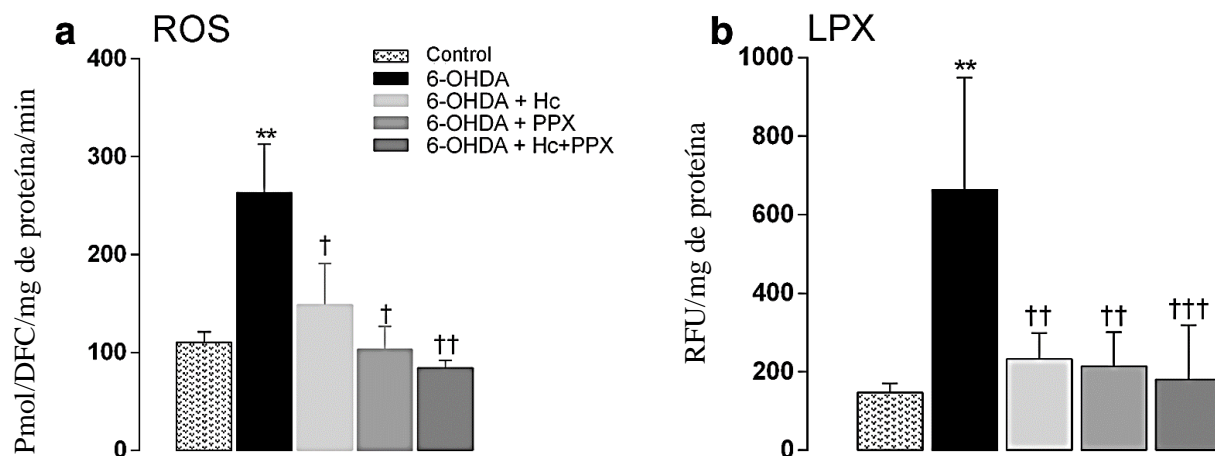


Figura 13. Efectos de 6-OHDA, Hc-TeTx (Hc) y pramipexol (PPX) en ROS y LPX en el cuerpo estriado. a) ROS (especies reactivas de oxígeno) y b) LPX (peroxidación lipídica). Los datos representan la media \pm SD, n = 4–5 por grupo. * p < 0.05, ** p < 0.01 vs control; † p < 0.05, †† p < 0.01, ††† p < 0.001 vs 6-OHDA. Tomado y modificado de Patricio et al, 2019.

2. JUSTIFICACIÓN

Los organismos aerobios son altamente susceptibles al estrés oxidativo por su propio metabolismo, debido a que las especies reactivas de oxígeno son principalmente producidas por las mitocondrias durante la respiración celular (Ames, 2000). El cerebro es particularmente vulnerable a esta generación de ROS, no solamente porque tiene un metabolismo de oxígeno altamente activado, sino que además tiene altos niveles de ácidos grasos poliinsaturados, bajos niveles de antioxidantes y niveles relativamente altos de iones metálicos de transición redox, y dada su naturaleza heterogénea, cuenta con varios tipos de células, de tal manera que ciertas áreas son más sensibles que otras a los cambios en este estrés oxidativo (Herrero-Mendez et al., 2009; Wang y Michaelis, 2010).

Por otro lado, estudios realizados con el modelo de rotenona, un pesticida con capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica, por su naturaleza lipofílica (Cabezas et al., 2012), han descrito que tiene la capacidad de acumularse dentro de los orgánulos subcelulares, y al unirse al complejo I mitocondrial (Venkatesh et al., 2018), inhibe la fosforilación oxidativa, a la vez que aumenta la generación ROS y con ello la peroxidación de la membrana celular (Radad et al., 2006). Otros estudios destacan que este neurotóxico puede inducir neurodegeneración del SNC causando la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la SNpc (Inden et al., 2009). Por estas razones, se sugieren que el modelo de rotenona es útil para dilucidar el mecanismo de la neurodegeneración por estrés oxidativo.

Por último, el pramipexol un agonista de los receptores de la familia D₂, empleado actualmente para el tratamiento sintomático de la enfermedad de Parkinson (Kohno y Takeuchi, 2004). Estudios recientes han demostrado que tiene acciones neuroprotectoras, teniendo la capacidad de proteger a las células neuronales DA contra diversas agresiones con MPP⁺, peróxido de hidrógeno (H₂O₂), rotenona (Inden et al., 2009) y glutamato (Gu et al., 2004). Por lo expuesto anteriormente, se considera relevante evaluar el efecto antioxidante de pramipexol sobre la neurotoxicidad provocada por rotenona.

3. HIPÓTESIS

La administración de pramipexol reduce el estrés oxidativo generado por la administración de rotenona en ratonas.

4. OBJETIVOS

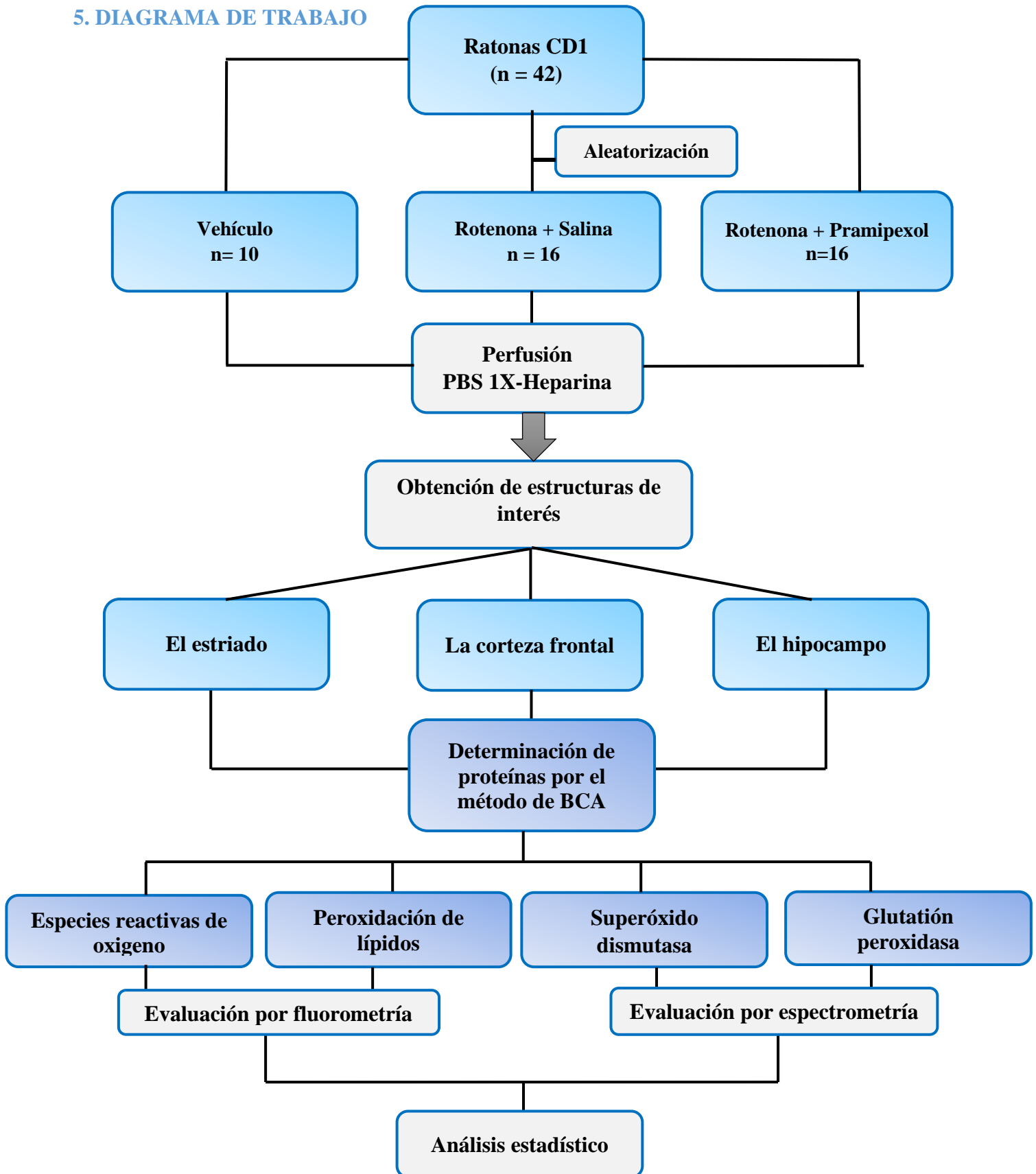
4.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto antioxidante del tratamiento con pramipexol en el modelo de toxicidad de rotenona en ratonas.

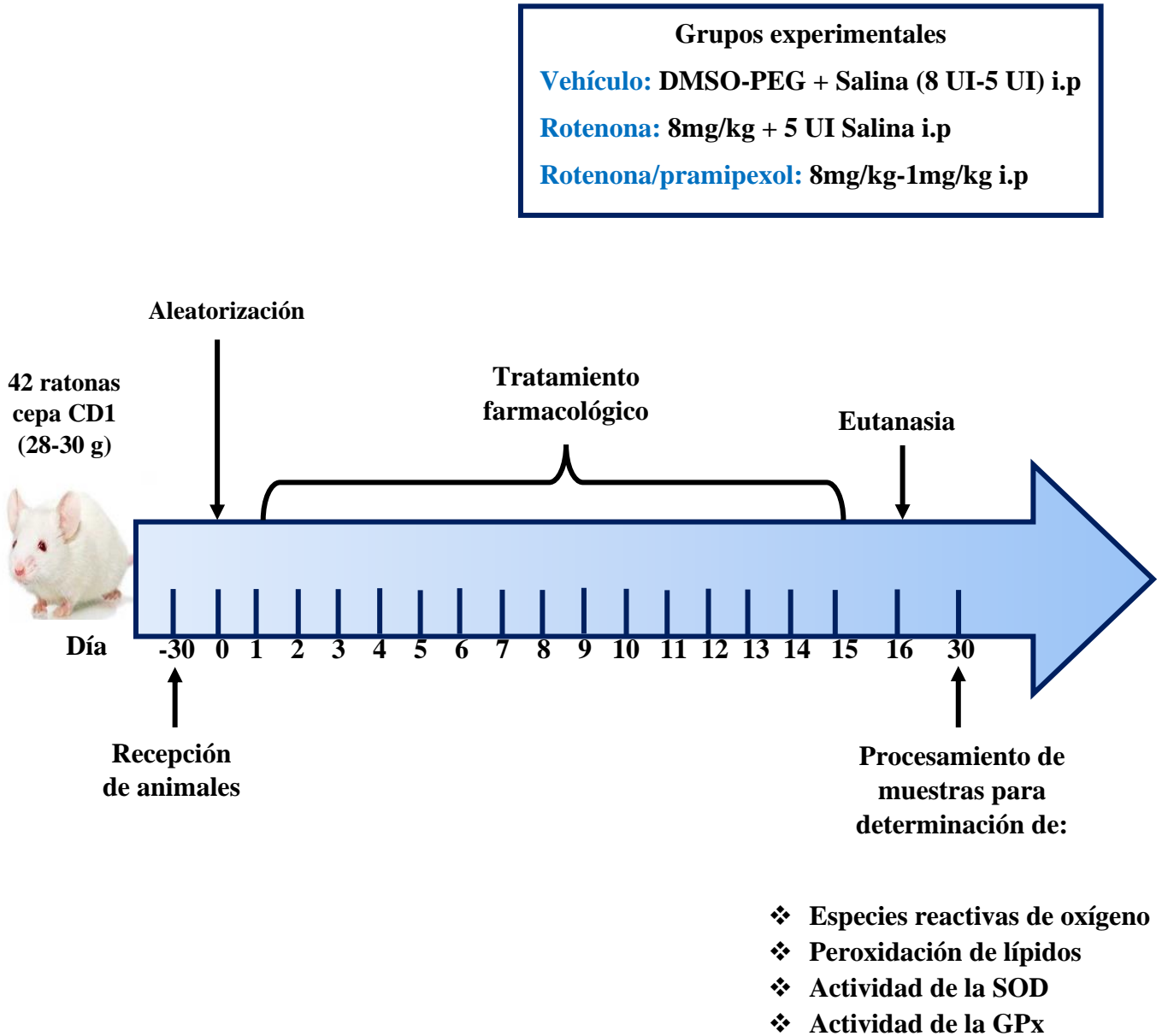
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el efecto antioxidante de pramipexol sobre los niveles de especies reactivas de oxígeno en el cuerpo estriado, la corteza frontal y el hipocampo de ratonas administradas con rotenona.
2. Valorar el efecto antioxidante de pramipexol sobre la peroxidación lipídica en el cuerpo estriado, la corteza frontal y el hipocampo de ratonas tratadas con rotenona.
3. Evaluar la actividad de la superóxido dismutasa y la glutatión peroxidasa en el cuerpo estriado, la corteza frontal y el hipocampo de ratonas administradas con pramipexol en el modelo de rotenona.

5. DIAGRAMA DE TRABAJO



6. LÍNEA CRONOLÓGICA



7. METODOLOGÍA

Sujetos experimentales

En el presente proyecto se emplearon ratonas de la cepa CD1 ($n = 42$), con un peso promedio de 28-30 g, los cuales fueron otorgados por el Bioterio "*Claude Bernard*" perteneciente a la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Los animales se mantuvieron alojados durante su crecimiento en cajas de plástico en el laboratorio de Neuroquímica FCQ-BUAP con las siguientes condiciones: temperatura (22 ± 3 °C), humedad relativa (50 ± 5 °C), agua y alimento *ad libitum* y con un ciclo de luz/oscuridad 12/ 12h. Una vez que los animales alcanzaron el peso de 30 g, se seleccionaron aleatoriamente en tres grupos experimentales para su posterior tratamiento: vehículo ($n= 10$), rotenona ($n= 16$) y rotenona/pramipexol ($n= 16$).

Cabe mencionar que los experimentos que se realizaron durante el presente trabajo se cumplieron a las reglamentaciones establecidas por la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

- ☛ **Temperatura 18-26c. Ideal 22c**
- ☛ **Humedad: 40-70%**
- ☛ **Cambios de aire: 15/hr.**
- ☛ **Ruido. No más de 85db**
- ☛ **Ciclos Luz oscuridad: 12/12**
- ☛ **Intensidad y tipo de luz 325Lx (30b)**
- ☛ **Espacio. 80cm²/25grs.**
- ☛ **Privación de agua y alimento 4-6 horas.**



Figura 14. Vivario del laboratorio de Neuroquímica

Preparación de fármacos

Rotenona

Se pesó 5.1 mg de rotenona (Abcam) y disolvió en 17 ml de la mezcla 1:1 de dimetilsulfóxido (DMSO)-Polietilenglicol (PEG) durante 30 minutos en condiciones de oscuridad. Inmediatamente se hicieron alícuotas de 1 ml que se almacenaron a -20 °C.

Pramipexol

Se preparó una solución con una concentración de 1mg/1 ml, pesándose 5 mg de pramipexol SIGMA-ALDRICH que se disolvieron en 5 ml de solución salina isotónica al 0.9%, posteriormente se almaceno a 4 °C.

7.1 Administración

La rotenona antes de ser administrada se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 60 minutos. Posteriormente se administró por vía intraperitoneal a una dosis de 0.8 mg/kg cada 24 horas durante 15 días consecutivos en un horario de 10:00-11:00 a.m.

Por otro lado, pramipexol fue administrado por vía intraperitoneal a una dosis de 1mg/kg cada 24 horas durante 15 días consecutivos, 30 minutos después de la administración de rotenona.

Los animales del grupo vehículo se administraron cada uno con 8 UI de la mezcla de dimetilsulfóxido (DMSO 100%)-Polietilenglicol (PEG 100%) en relación 1:1 por vía intraperitoneal durante 15 días.

7.2 Obtención de cerebros y áreas subcorticales

Para la obtención de los cerebros, los animales se sacrificaron 24 horas después de haber terminado el tratamiento farmacológico. Cada sujeto se perfundió con aproximadamente 80 ml de PBS 1X frío a un pH 7.4, con heparina.

Posteriormente por decapitación se obtuvieron los cerebros y en condiciones de frío con hielo seco se continuo a extraer y disectar las regiones cerebrales, el hipocampo, el estriado y la corteza frontal, los cuales se pesaron en una balanza analítica y se almacenaron a -80°C. (Apéndice 1)

7.3 Determinación de proteínas por el método de ácido bicinconónico

La determinación de proteínas se realizó por el método de Ácido bicinconónico (BCA), la cual nos permitió la normalización de los resultados obtenidos en la determinación de niveles de especies reactivas de oxígeno y peroxidación de lípidos.

Este método se basa en la determinación de la reacción de las proteínas con cobre oxidado Cu^{+2} en condiciones alcalinas para producir cobre reducido Cu^{+1} y esta conversión está influenciada por cuatro aminoácidos (cisteína, cistina, tirosina y triptófano). El BCA es un reactivo específico para Cu^{+1} . La cantidad de Cu^{+2} está en función de la concentración de proteínas y puede ser determinada espectrofotométricamente por un cambio en el color de la solución a púrpura. La absorbancia es directamente proporcional a la cantidad de proteína presente en la solución y puede ser estimada por comparación con un estándar de proteína conocido. (Apéndice 2)

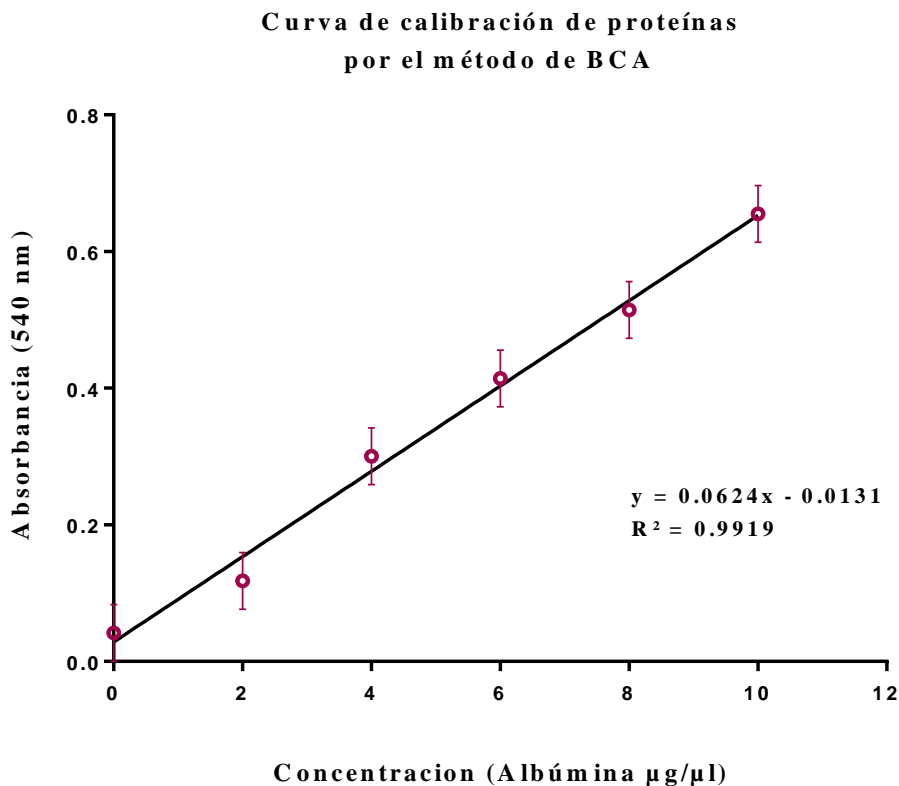


Figura 15. Curva de calibración de proteínas. Se muestra la absorbancia que emiten las proteínas con la reacción que provoca el BCA a diferentes concentraciones de ASB a una longitud de onda de 540 nm.

7.4 Determinación de especies reactivas de oxígeno

Para evaluar la formación de las ROS, se utilizó el método reportado por Pérez Severiano en 2004, basado en la oxidación y desacetilación del diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA), que se convierte en el compuesto fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) por actividad de las ROS. Utilizando un lector de microplacas de detección múltiple FLx800 (Biotek Instruments).

El cerebro se homogenizó en 3 ml de solución salina isotónica y los resultados se expresaron como el promedio de pmol de DCF formados por miligramo de proteína/ min. (Apéndice 3)

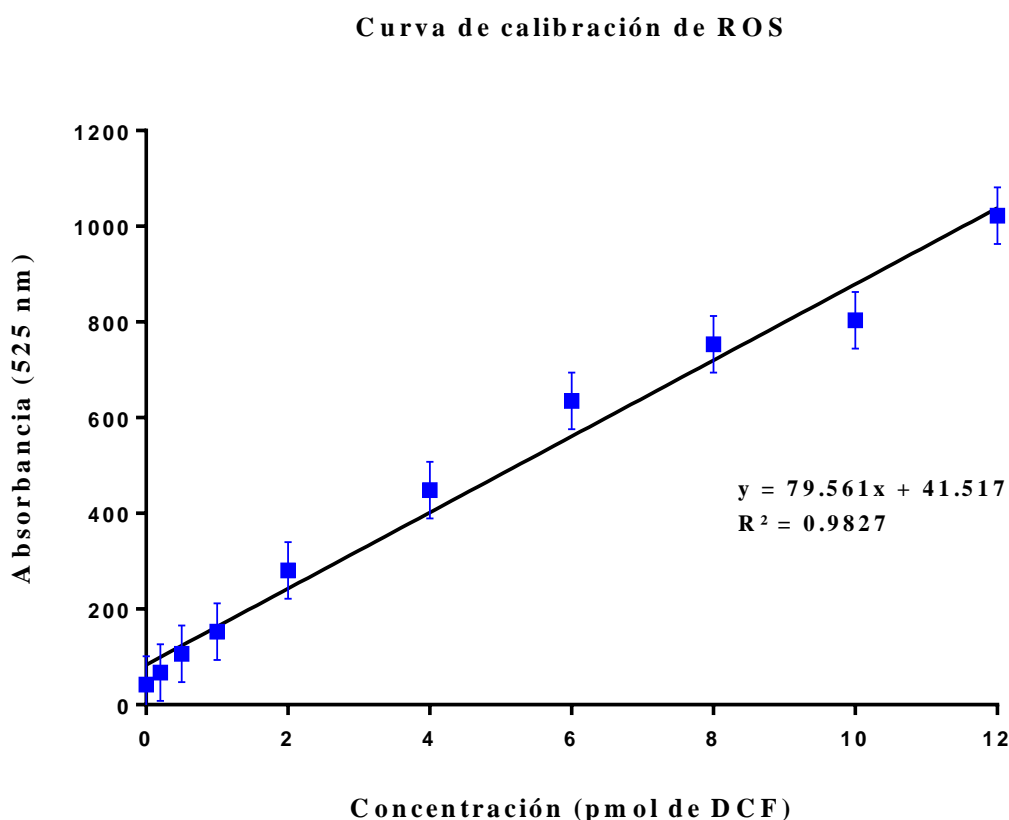


Figura 16. Curva de calibración de ROS. Se muestra la absorbancia de los niveles de fluorescencia que emite la diclorofluoresceína a diferentes concentraciones a una longitud de onda de 525 nm.

7.5 Determinación de peroxidación de lípidos

La medición de peroxidación de lípidos en tejido se evaluó mediante el análisis de productos lipídicos fluorescentes como lo estableció Triggs y Willmore en 1984.

Para llevar a cabo la técnica, el tejido cerebral se homogenizó en 3 ml de solución salina isotónica y los resultados se expresaron como el promedio de Unidades de Fluorescencia Relativa / mg de proteína. (Apéndice 4)

7.6 Determinación de la actividad de la superóxido dismutasa

La actividad de la SOD se determinó por medio de un método espectrofotométrico como lo reporta Schwartz y cols en 1998. El fundamento de la técnica se basa en la reducción que sufre el citocromo C por parte del superóxido que se deriva de la reacción de la xantina oxidasa sobre la xantina. Cuando la SOD convierte el superóxido en peróxido de hidrógeno inhibe la interacción del superóxido con el citocromo C. Para llevar a cabo la técnica, el tejido cerebral se homogenizó en buffer de carbonatos con 20 mM de bicarbonato de sodio que se ajustó a pH 10.2 y se le añadió tritón al 0.02% en una relación de peso volumen. Los resultados obtenidos fueron expresados como UI/mg de proteína. (Apéndice 5)

7.7 Determinación de la actividad de glutatión peroxidasa

La actividad de GPx fue medida empleando la técnica desarrollada por Hafman y colaboradores (1974), que consiste en evaluar la capacidad detoxificadora de la GPx reduciendo al H₂O₂ para producir H₂O y al mismo tiempo oxida al glutatión reducido (GSH). En esta técnica el GSH que queda después de la reacción en presencia del ácido 5,5-ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB) genera una reacción colorimétrica, que se lee a 412 nm. De tal manera que un color más intenso indica que hay una mayor actividad de la GPx. Los resultados obtenidos fueron reportados como mMoles de GSH consumido/g de tejido/minuto. (Apéndice 6)

7.8 Análisis de resultados

Los resultados obtenidos se graficaron como el promedio y el error estándar de la media. Finalmente, los datos de cada grupo se analizaron con una ANOVA de una vía con una prueba post-test Tukey. El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa GraphPad Prism 7.

8. RESULTADOS

8.1 Efecto de la administración de pramipexol sobre los niveles de especies reactivas de oxígeno en el estriado, la corteza frontal y el hipocampo.

Una vez terminado el tratamiento farmacológico de los grupos experimentales y la obtención de las áreas subcorticales, se evaluaron los niveles de especies reactivas de oxígeno en cada una de las áreas por el método de oxidación y desacetilación de la DCFH-DA, los cuales fueron ajustados con la determinación de proteínas totales por el método de BCA. En la figura 17 se muestran los resultados obtenidos expresados como el promedio de pmol de DCF formados por miligramo de proteína/ min y analizados con una ANOVA de una vía y una prueba pos-test de Tukey.

En los resultados se observa que la administración de rotenona a una dosis de 0.8mg/kg por vía intraperitoneal durante 15 días consecutivos genera un aumento estadísticamente significativo (**P<0.01) en los niveles de ROS en las tres áreas, el estriado (Figura 17 A), la corteza frontal (Figura 17 B) y el hipocampo (Figura 17 C) con respecto al grupo vehículo y que estos niveles aumentan mayormente en el estriado (**P<0.001). Así mismo, esta elevación de los niveles de ROS disminuye con el tratamiento de pramipexol a una dosis de 1 mg/kg por vía intraperitoneal en las tres áreas, pero de una manera estadísticamente significativa (##P<0.01) únicamente en el núcleo estriado (Figura 17A). Los resultados confirman que la rotenona promueve la generación de las ROS durante los 15 días de su administración y se encontró que PPX tiene un efecto antioxidante en el estriado a los mismos días.

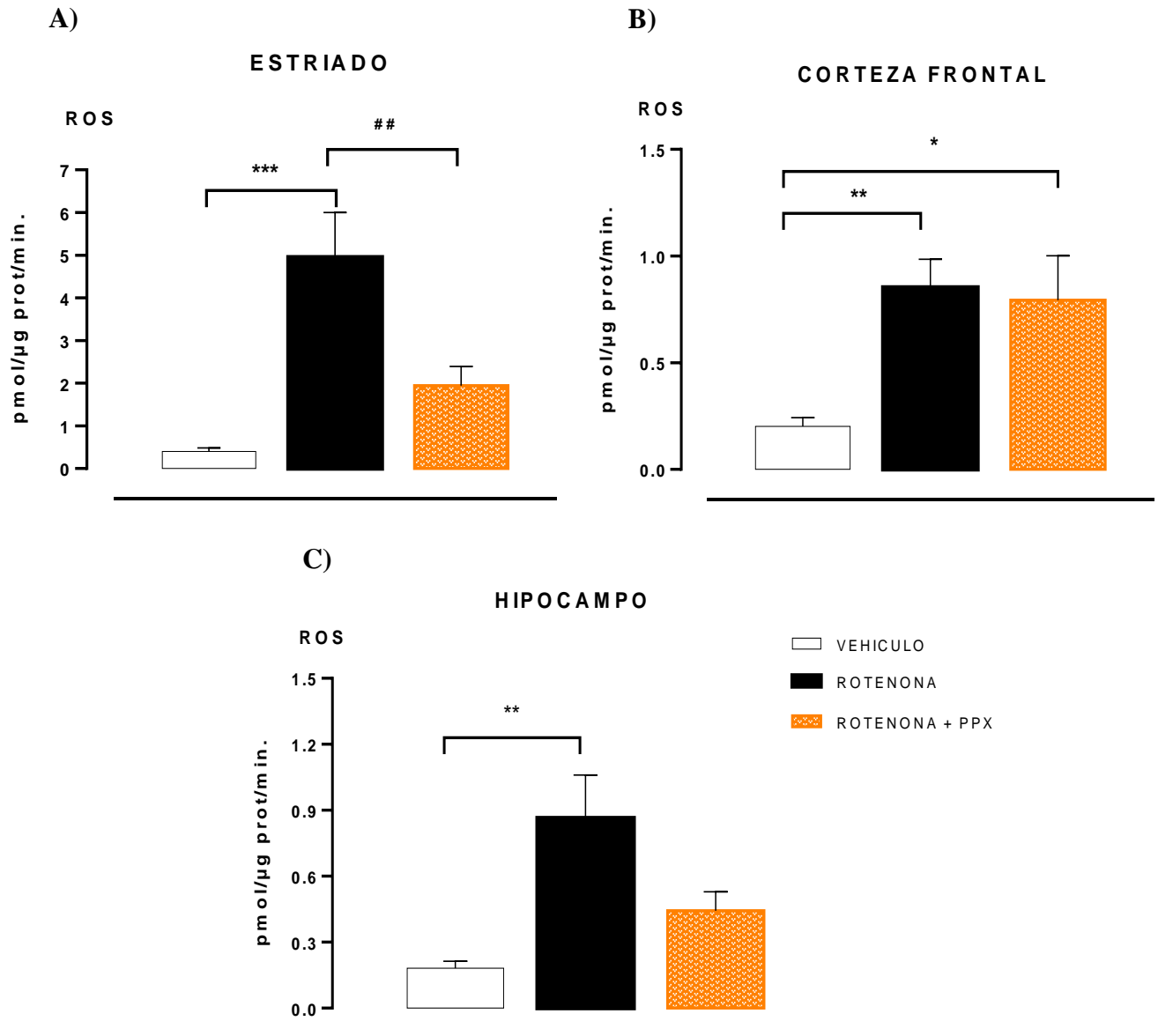


Figura 17. Efecto de la administración de rotenona y pramipexol sobre los niveles de ROS. En A) se muestran los niveles de ROS en el estriado. En B) se muestran los niveles de ROS en la corteza frontal. C) Se muestran los niveles de ROS en el hipocampo. Las barras muestran el promedio y el error estándar de la media \pm ESM (n=16), los datos fueron analizados con una ANOVA de una vía y una prueba pos-test de Tukey, $p < 0.05$. Vehículo vs rotenona * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$; rotenona vs rotenona + PPX # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$.

8.2 Efecto de la administración de pramipexol sobre la peroxidación de lípidos en el estriado, la corteza frontal y el hipocampo.

En la figura 18 se muestran los resultados obtenidos al evaluar los niveles de peroxidación lipídica en las tres áreas seleccionadas, el estriado (Figura 18 A), la corteza frontal (Figura 18 B) y el hipocampo (Figura 18 C), reportados en unidades relativas de fluorescencia por miligramo de proteína y de la misma manera, normalizados por la cuantificación de proteínas totales por BCA, que fueron analizados con una ANOVA de una vía y una prueba pos-test de Tukey.

Los resultados que se presentan a continuación demuestran que la administración de rotenona a una dosis de 0.8 mg/ kg por vía intraperitoneal de la misma manera tiene la capacidad de generar una elevación en los niveles de productos lipídicos de una manera estadísticamente significativa en comparación con el grupo vehículo en las tres áreas y que esta elevación es mayor en el estriado (**P<0.01) y el hipocampo (**P<0.01) si se compara con la corteza frontal (*P<0.05). Sin embargo, de una manera similar a los resultados anteriores en ROS, el tratamiento con pramipexol a una dosis de 1 mg/kg de manera intraperitoneal detiene estos niveles de peroxidación lipídica de una manera significativa (#P<0.05) únicamente en el núcleo estriado (Figura 18 A)

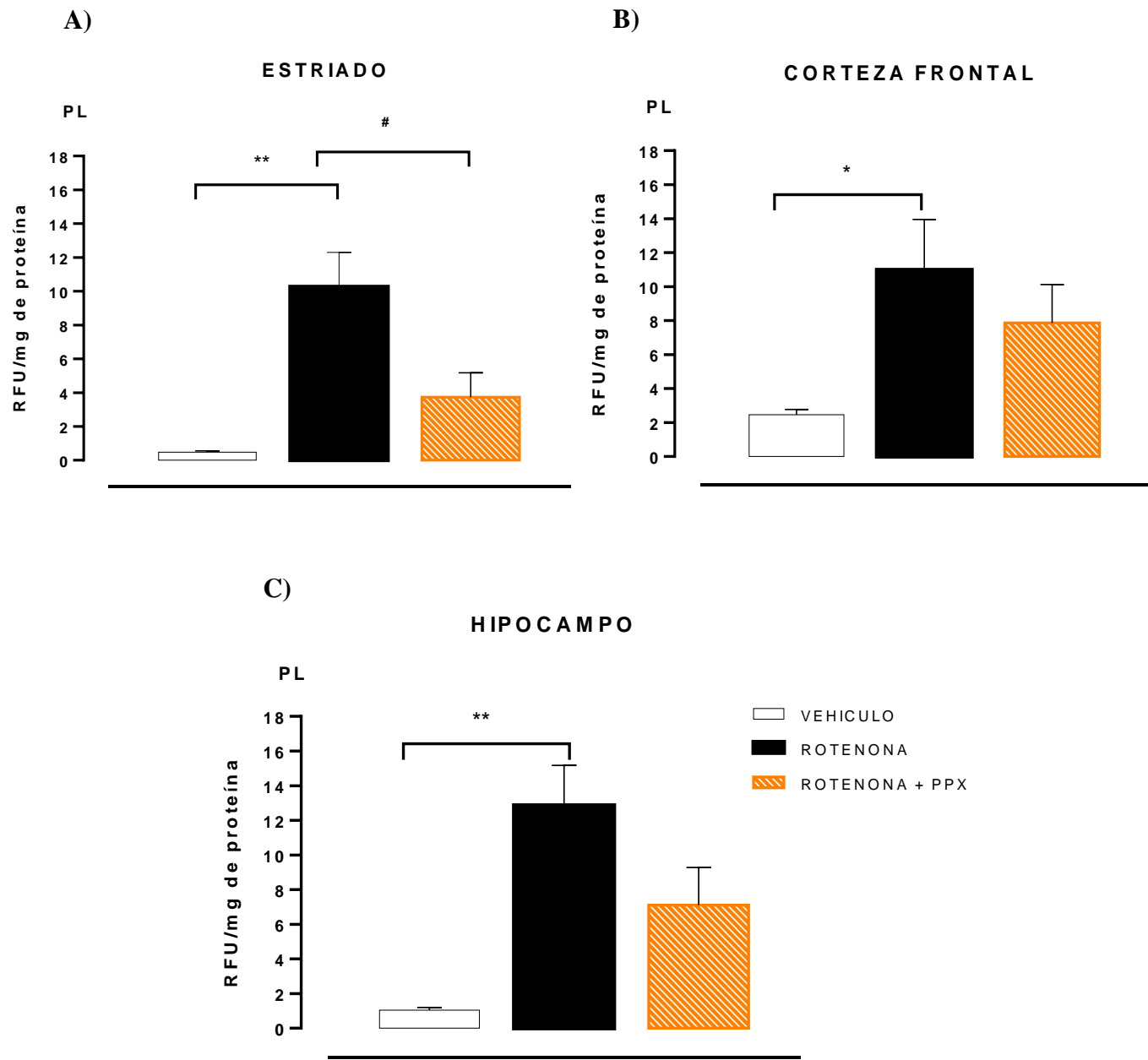


Figura 18. Efecto de la administración de rotenona y pramipexol sobre los niveles de peroxidación lipídica. En A) Se muestran los niveles de PL en el estriado. En B) se muestran los niveles de PL en la corteza frontal. En C) se muestran los niveles de PL en el hipocampo. Las barras muestran el promedio y el error estándar de la media \pm ESM (n=16), los datos fueron analizados con una ANOVA de una vía y una prueba pos-test de Tukey, $p < 0.05$. Vehículo vs rotenona * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$; rotenona vs rotenona + PPX # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$.

8.3 Efecto de la administración de pramipexol sobre la actividad de superóxido dismutasa en el estriado y la corteza frontal.

Para la evaluación de la actividad de la superóxido dismutasa se realizó una medición de la actividad de SOD Total y de las dos isoformas en las que se encuentra: SOD Mn y SOD-Cu/Zn.

En la figura 19 se muestran los resultados obtenidos sobre la actividad de SOD Total en el núcleo estriado (Figura 19 A), los cuales indican que la actividad de esta enzima aumenta de una manera estadísticamente significativa en los animales del grupo rotenona ($***P<0.001$) en comparación con el grupo vehículo y que esta actividad se mantiene elevada en el grupo experimental rotenona + PPX ($**P<0.01$) aun 15 días posteriores a su tratamiento en comparación con el vehículo. A su vez, los resultados también indican en la Figura 19 B que es la isoforma SOD-Mn quien se eleva significativamente ($**P<0.01$) en los grupos tratados con rotenona en comparación con el grupo vehículo y que la actividad de SOD-Cu/Zn (Figura 19 B) no se modifica.

Por otro lado, en la figura 19 C se muestran los resultados obtenidos en la corteza frontal, en donde se encuentra que la actividad de SOD Total también aumenta de una manera significativa en el grupo rotenona ($****P<0.0001$) en comparación con el grupo vehículo y que esta actividad se mantiene elevada en el grupo rotenona + PPX ($****P<0.0001$), sin embargo a diferencia del núcleo estriado, en la corteza frontal esta actividad tiene una pequeña disminución estadísticamente significativa ($\#P<0.05$) en comparación con el grupo experimental rotenona. Y de la misma manera la figura 19 D demuestra que esta actividad se encuentra elevada significativamente ($****P<0.0001$) por la isoforma SOD Mn en los grupos rotenona y rotenona + PPX en comparación con el vehículo y no se ve disminuida por el tratamiento con PPX a una dosis de 1 mg/kg y que la actividad de la isoforma SOD-Cu/Zn no se modifica (Figura 19 D).

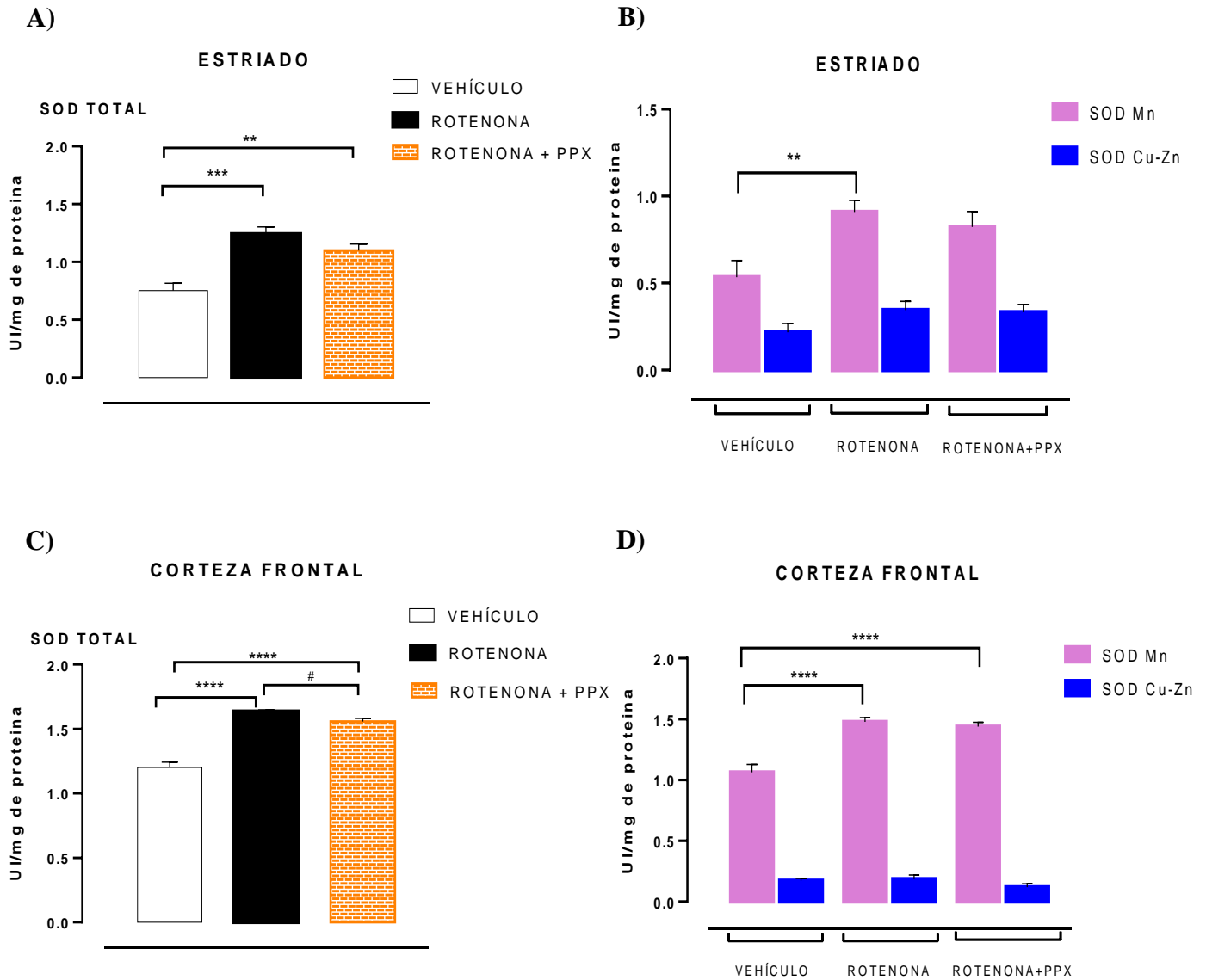


Figura 19. La administración de rotenona y PPX modifica la actividad de SOD. En A se muestran los niveles de la actividad de la SOD total en el estriado. En B se muestran los resultados de la actividad de la SOD-Mn y SOD-Cu/Zn en el estriado. En C se muestran los niveles de la actividad de la SOD total en la corteza frontal. En D se muestran los niveles de la actividad de la SOD-Mn y SOD-Cu/Zn en la corteza frontal. Las barras muestran el promedio y el error estándar de la media \pm ESM (n=16), los datos fueron analizados con una ANOVA de una vía y una prueba pos-test de Tukey, $p < 0.05$. Vehículo vs rotenona * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$; rotenona vs rotenona + PPX # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$.

8.4 Efecto de la administración de pramipexol sobre la actividad de la glutatión peroxidasa en el estriado, la corteza frontal y el hipocampo.

Por último, en la figura 20, se muestran los resultados obtenidos en la determinación de la actividad de GPx en el estriado (Figura 20 A), la corteza frontal (Figura 20 B) y el hipocampo (Figura 20 C) los cuales demuestran que la administración diaria por 15 días de rotenona tiene la capacidad de aumentar la actividad de GPx en las tres áreas subcorticales de una manera estadísticamente significativa ($****P<0.0001$) en los grupos experimentales de rotenona y los grupos experimentales de rotenona + PPX ($****P<0.0001$) en comparación con los grupos vehículo y que posterior a la administración de PPX 1 mg/kg intraperitoneal por 15 días esta actividad de GPx se ve disminuida en todas las áreas también de una manera significativa ($##P<0.01$) en comparación con el grupo rotenona.

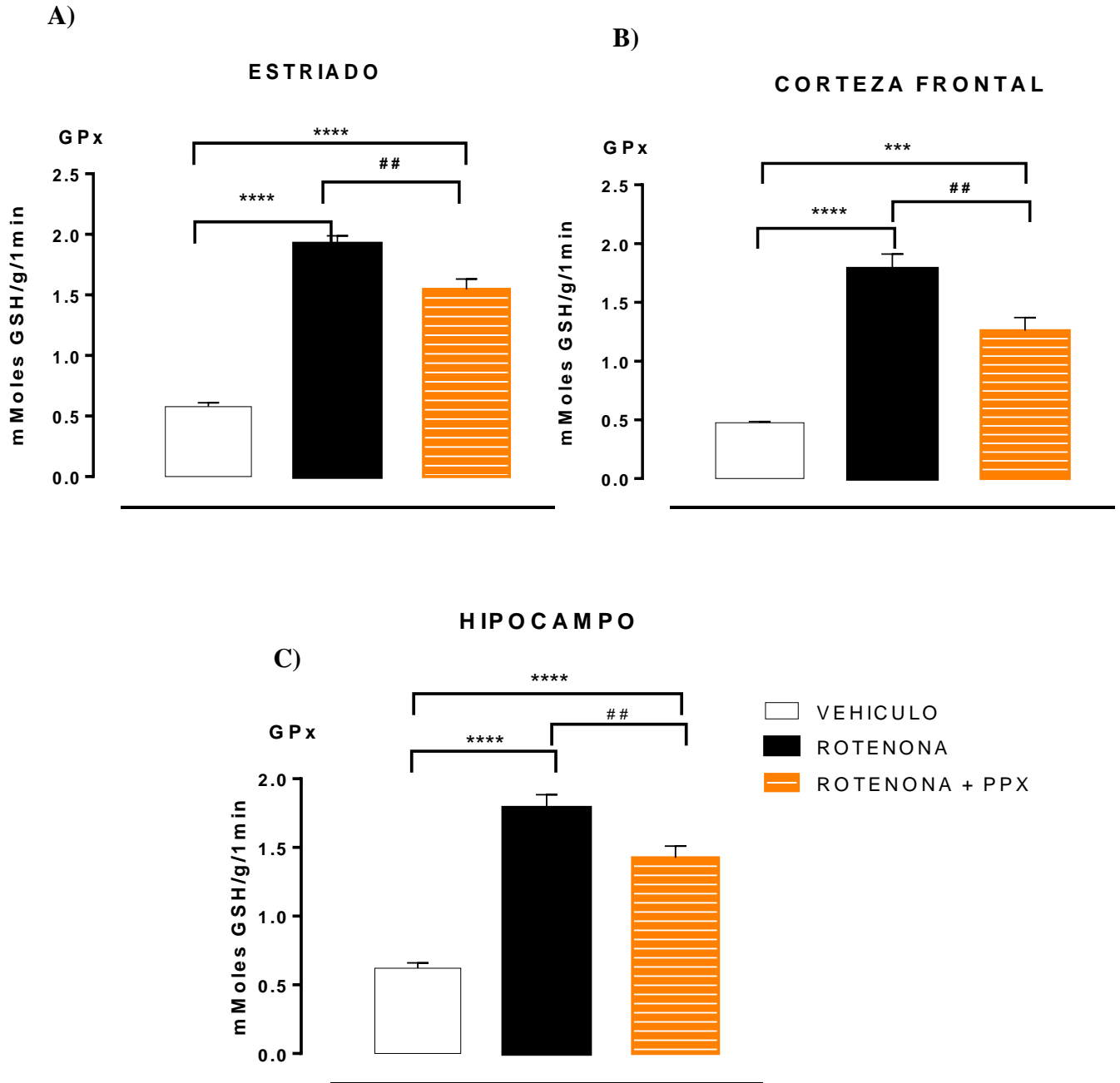


Figura 20. La administración de rotenona y pramipexol modifica la actividad de GPx. En A se muestran los niveles de actividad de GPx en el estriado. En B se muestran los niveles de la actividad de GPx en la corteza frontal. En C se muestran los niveles de la actividad de GPx en el hipocampo. Las barras muestran el promedio y el error estándar de la media \pm ESM (n=16), los datos fueron analizados con una ANOVA de una vía y una prueba pos-test de Tukey, $p < 0.05$. Vehículo vs rotenona * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$; rotenona vs rotenona+PPX # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$.

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Todos los seres vivos que dependen del consumo de oxígeno para realizar sus funciones metabólicas, durante el proceso liberan radicales libres y ROS de manera natural. Las cuales en bajas concentraciones desempeñan un papel beneficioso en la célula, sin embargo, su producción y acumulación excesiva llevará a la célula a un estado de estrés oxidativo, que si perdura por largo tiempo producirá su muerte, por lo cual, este estado de estrés oxidativo en los últimos años se ha descrito como un denominador común en muchas enfermedades neurodegenerativas y el envejecimiento (Halliwell et al., 2015; Valko et al., 2006). En el presente trabajo se evaluó el efecto antioxidante de la administración intraperitoneal de PPX sobre ratonas tratadas con rotenona. Diferentes investigadores en estudios realizados *in vivo* e *in vitro* han demostrado que la rotenona es un modelo útil para estudiar los procesos de estrés oxidativo y las características clínicas de la EP (Betarbet et al., 2000; Liu et al., 2003, Sanders y Timothy Greenamyre, 2013).

Debido a que la toxicidad de rotenona es principalmente por la generación excesiva de especies reactivas de oxígeno al inhibir las enzimas del complejo I mitocondrial, el primer objetivo fue evaluar los niveles de ROS en el núcleo estriado, la corteza frontal y el hipocampo. Los resultados obtenidos demuestran que la administración intraperitoneal de rotenona (0.8 mg/kg por 15 días) genera un aumento estadísticamente significativo de los niveles de ROS en las tres áreas de interés (Figura 17) siendo un aumento mayor en el núcleo estriado (Figura 17 A). Se sugiere que estos resultados podrían deberse a que las neuronas espinosas medianas (95%) y neuronas espinosas grandes que se encuentran en esta área, tienen mayor vulnerabilidad a cambios de estrés oxidativo, debido a que presentan proyecciones largas con un gran número de dendritas, lo cual favorece la formación de un gran número de sinapsis y requerimientos mayores de energía. Además hay mayor contenido de iones hierro y cobre que contribuye a la generación de ROS por medio de las reacciones de Fenton y Haber-Weiss (Dias et al., 2013, Jenner et al., 1992, Wang y Michaelis, 2010). Así mismo, la administración aguda de PPX (1mg/kg) hizo una reducción estadísticamente significativa estos niveles de ROS, pero esto ocurre únicamente en el núcleo estriado (Figura 17 A). Se sugiere que este resultado antioxidante podría deberse a su estructura molecular, debido que se trata de un tetrahidrobenzotiazol bicíclico fusionado que estaría neutralizando a los radicales libres y las ROS por medio de la liberación de un protón (H^+) de su grupo amino (NH_2), además la molécula también presenta dos aminas secundarias que también podrían donar pares de electrones para la estabilización de los radicales como se lo demostró Farias y colaboradores en

el 2014 en estudios *in vitro* (Farias et al., 2014, Le et al., 2000). Se ha descrito también que PPX puede tener un efecto antioxidante por su acción agonista sobre los receptores dopaminérgicos, específicamente sobre el receptor D3, posiblemente activando vías de señalización como las de las PKC o las MAPK que promuevan una neuroprotección ante el estrés oxidativo. Sin embargo, hasta el momento estos mecanismos por los que estaría realizando aún no se han descrito.

Cuando en la célula se genera una excesiva formación de ROS y a su vez una disminución en la eficacia de los sistemas antioxidantes de defensa, las ROS y los radicales libres reaccionan con las principales macromoléculas de la célula, como son las proteínas, los lípidos, los carbohidratos y los ácidos nucleicos dañando su estructura y su función biológica (Valko et al., 2007). De esta manera, el estrés oxidativo altera diversos procesos bioquímicos. El segundo objetivo fue evaluar los niveles de peroxidación lipídica midiendo los productos lipídicos fluorescentes. De una manera similar a los anteriores, los resultados obtenidos mostraron un aumento estadísticamente significativo de estos niveles de productos lipídicos en las tres áreas de interés (Figura 18 A, 18 B y 18 C) por tanto estos datos nos permiten sugerir que la administración consecutiva de rotenona por 15 días induce un daño a la membrana, debido a que la producción excesiva de las ROS desencadena la peroxidación y su reacción en cadena al interaccionar estas con los lípidos de la membrana, nuestro resultado hablaría de un estado de estrés oxidativo grave. Pero este daño a la membrana se ve estadísticamente disminuido por la administración de PPX durante 15 días únicamente en el núcleo estriado (Figura 18 A), por tanto, se sugiere que el PPX también tiene la capacidad de reducir la peroxidación lipídica en el estriado neutralizando los productos de la reacción como se ha reportado en otros estudios por Zou y colaboradores en el 2000. En el hipocampo y en la corteza frontal existe una disminución del daño por la administración de PPX sin ser significativa estadísticamente.

Ante la generación excesiva de ROS, existen en el organismo mecanismos de defensa, como el sistema antioxidante que incluye enzimas como la superóxido dismutasa, la glutatión peroxidasa, la catalasa y la glutatión reductasa, por mencionar algunas que previenen significativamente la oxidación de las macromoléculas (He et al., 2017, Rizzo et al., 2010). Por tanto, en este trabajo también se propuso evaluar la actividad de SOD total y de sus dos isoformas (SOD Mn y SOD-Cu/Zn) ante al daño oxidativo causado por el modelo de rotenona en la corteza frontal y el estriado. Los resultados anteriormente expuestos muestran que existe diferencias significativas a los 15 días del tratamiento en ambas áreas. En el núcleo estriado (Figura 19 A) los resultados confirman que

el efecto oxidante que causa la administración de rotenona aumenta significativamente los niveles de la actividad de SOD total (Figura 19 A) siendo la isoforma SOD-Mn quien más eleva su actividad (Figura 19 B) en comparación con la isoforma SOD-Cu/Zn, sin embargo, esta también se eleva de una manera no significativa. Y esta actividad se mantiene alta durante los 15 días del tratamiento con el tratamiento con PPX a 1 mg/kg (Figura 19 B). Por otro lado, en la corteza frontal (Figura 19 C) de manera similar se observa que la actividad de SOD Total aumenta significativamente en el grupo rotenona respecto al grupo vehículo, teniendo con mayor actividad también en la isoforma SOD-Mn y sin ningún cambio estadístico significativo en la isoforma SOD-Cu/Zn (Figura 19 D). Por tanto, se puede confirmar que SOD está reaccionando positivamente ante la generación de ROS, dismutando el O_2 generado por el complejo 1 mitocondrial al inhibirlo con rotenona en H_2O_2 , y que esta actividad se mantiene durante el tratamiento con PPX, principalmente en SOD-Mn. Se sugiere que estos resultados se pueden deber por el sitio de acción en el que se localizan cada enzima, SOD-Cu/Zn se encuentra en el citosol mientras que la SOD-Mn se encuentra en la matriz mitocondrial en donde también se da el proceso neurotóxico por rotenona (Fukai y Ushio-Fukai, 2011, Sanders y Timothy Greenamyre, 2013). No obstante, se encontró que existe una disminución significativa con PPX en la corteza frontal. Sugiriéndose que, al disminuir la producción de ROS, también disminuye la actividad de SOD.

Finalmente se evaluaron los niveles de actividad de la glutatión peroxidasa en las tres áreas de interés (Figura 20), teniendo como resultado que el tratamiento con rotenona también produce un aumento estadísticamente significativo en los niveles de actividad de esta enzima en todas las áreas evaluadas en comparación al grupo vehículo y de forma similar también en el grupo con rotenona + PPX (Figuras 20 A, 20 B y 20 C). Estos hechos nos permiten sugerir que la enzima también se modula al incrementar su actividad ante la toxicidad de la rotenona, convirtiendo el H_2O_2 en H_2O . y que este efecto se ve disminuido con el tratamiento de PPX (1 mg/kg) en las tres áreas evaluadas (Figuras 20 A, 20 B y 20 C). Se puede sugerir que la actividad de GPx se encuentra modulada debido a que esta enzima realiza su función a la par con la enzima catalasa.

Finalmente, los resultados indicaron que el tratamiento con PPX causa efectos antioxidantes ante el estrés oxidativo inducido por rotenona.

10. CONCLUSIONES

- La administración intraperitoneal de PPX a una dosis de 1mg/kg durante 15 días disminuye los niveles de especies reactivas de oxígeno y la peroxidación de lípidos en el núcleo estriado de ratonas tratadas con rotenona.
- La administración de rotenona aumenta actividad enzimática de la SOD en el estriado y la corteza frontal y el tratamiento con PPX 1 mg/kg no la disminuye.
- La administración de PPX 1 mg/kg intraperitoneal disminuye la actividad de GPx en el estriado, la corteza prefrontal y el hipocampo ratonas tratadas con rotenona.

11. REFERENCIAS

- Abramova NA, Cassarino DS, Khan SM, Painter TW, Bennett JP (2002) Inhibition by R (+) or S (-) pramipexole of caspase activation and cell death induced by methylpyridinium ion or beta amyloid peptide in SH-SY5Y neuroblastoma. *J Neurosci Res* 67:494-500.
- Ames A (2000) CNS energy metabolism as related to function. *Brain Res Brain Res Rev* 34:42-68.
- Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S (2014) Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev* 2014:360438.
- Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT (2000) Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci* 3:1301-1306.
- Betarbet R, Canet-Aviles RM, Sherer TB, Mastroberardino PG, McLendon C, Kim JH, Lund S, Na HM, Taylor G, Bence NF, Kopito R, Seo BB, Yagi T, Yagi A, Klinefelter G, Cookson MR, Greenamyre JT (2006) Intersecting pathways to neurodegeneration in Parkinson's disease: effects of the pesticide rotenone on DJ-1, alpha-synuclein, and the ubiquitin-proteasome system. *Neurobiol Dis* 22:404-420.
- Bogdan C, Röllinghoff M, Diefenbach A (2000) Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol* 12:64-76.
- Brand MD (2010) The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Exp Gerontol* 45:466-472.
- Brunelli L, Yermilov V, Beckman JS (2001) Modulation of catalase peroxidatic and catalatic activity by nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 30:709-714.
- Butterfield DA, Bader Lange ML, Sultana R (2010) Involvements of the lipid peroxidation product, HNE, in the pathogenesis and progression of Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 1801:924-929.

- Cabezas R, El-Bachá RS, González J, Barreto GE (2012) Mitochondrial functions in astrocytes: neuroprotective implications from oxidative damage by rotenone. *Neurosci Res* 74:80-90.
- Danzeisen R, Schwalenstoecker B, Gillardon F, Buerger E, Krzykalla V, Klinder K, Schild L, Hengerer B, Ludolph AC, Dorner-Ciossek C, Kussmaul L (2006) Targeted antioxidative and neuroprotective properties of the dopamine agonist pramipexole and its nondopaminergic enantiomer SND919CL2x [(+)-2-amino-4,5,6,7-tetrahydro-6-L-propylamino-benzothiazole dihydrochloride]. *J Pharmacol Exp Ther* 316:189-199.
- Dias V, Junn E, Mouradian MM (2013) The role of oxidative stress in Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis* 3:461-491.
- Dooley M, Markham A (1998) Pramipexole. A review of its use in the management of early and advanced Parkinson's disease. *Drugs Aging* 12:495-514.
- Drummond GR, Selemidis S, Griendling KK, Sobey CG (2011) Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* 10:453-471.
- Dorado, C., Rugerio, C. y Rivas, S. (2003). Estrés oxidativo y neurodegeneración; *Rev Fac Med UNAM* Vol. 46 No. 6
- Duty S, Jenner P (2011) Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease. *Br J Pharmacol* 164:1357-1391.
- Esterbauer H, Eckl P, Ortner A (1990) Possible mutagens derived from lipids and lipid precursors. *Mutat Res* 238:223-233.
- Fukai T, Ushio-Fukai M (2011) Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid Redox Signal* 15:1583-1606.
- Fujita Y, Izawa Y, Ali N, Kanematsu Y, Tsuchiya K, Hamano S, Tamaki T, Yoshizumi M (2006) Pramipexole protects against H₂O₂-induced PC12 cell death. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 372:257-266.
- Gebicka L, Didik J (2009) Catalytic scavenging of peroxynitrite by catalase. *J Inorg Biochem* 103:1375-1379.

- Glorieux C, Calderon PB (2017) Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. *Biol Chem* 398:1095-1108.
- Gu M, Irvani MM, Irvani M, Cooper JM, King D, Jenner P, Schapira AH (2004) Pramipexole protects against apoptotic cell death by non-dopaminergic mechanisms. *J Neurochem* 91:1075-1081.
- Hall ED, Andrus PK, Oostveen JA, Althaus JS, VonVoigtlander PF (1996) Neuroprotective effects of the dopamine D2/D3 agonist pramipexole against postischemic or methamphetamine-induced degeneration of nigrostriatal neurons. *Brain Res* 742:80-88.
- Hametner EM, Seppi K, Poewe W (2012) Role and clinical utility of pramipexole extended release in the treatment of early Parkinson's disease. *Clin Interv Aging* 7:83-88.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (2015) *Free radicals in biology and medicine*, Edition 5th, Clarendon Press, Oxford.
- He L, He T, Farrar S, Ji L, Liu T, Ma X (2017) Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. *Cell Physiol Biochem* 44:532-553.
- Heinzelmann S, Bauer G (2010) Multiple protective functions of catalase against intercellular apoptosis-inducing ROS signaling of human tumor cells. *Biol Chem* 391:675-693.
- Hermes-Lima M, Zenteno-Savín T (2002) Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 133:537-556.
- Herrero-Mendez A, Almeida A, Fernández E, Maestre C, Moncada S, Bolaños JP (2009) The bioenergetic and antioxidant status of neurons is controlled by continuous degradation of a key glycolytic enzyme by APC/C-Cdh1. *Nat Cell Biol* 11:747-752.
- Inden M, Kitamura Y, Tamaki A, Yanagida T, Shibaike T, Yamamoto A, Takata K, Yasui H, Taira T, Ariga H, Taniguchi T (2009) Neuroprotective effect of the antiparkinsonian drug pramipexole against nigrostriatal dopaminergic degeneration in rotenone-treated mice. *Neurochem Int* 55:760-767.

- Ishii T, Yasuda K, Akatsuka A, Hino O, Hartman PS, Ishii N (2005) A mutation in the SDHC gene of complex II increases oxidative stress, resulting in apoptosis and tumorigenesis. *Cancer Res* 65:203-209.
- Jenner P, Könen-Bergmann M, Schepers C, Haertter S (2009) Pharmacokinetics of a once-daily extended-release formulation of pramipexole in healthy male volunteers: three studies. *Clin Ther* 31:2698-2711.
- Jenner P, Dexter DT, Sian J, Schapira AH, Marsden CD (1992) Oxidative stress as a cause of nigral cell death in Parkinson's disease and incidental Lewy body disease. The Royal Kings and Queens Parkinson's Disease Research Group. *Ann Neurol* 32 Suppl: S82-87.
- Johnson ME, Bobrovskaya L (2015) An update on the rotenone models of Parkinson's disease: their ability to reproduce the features of clinical disease and model gene-environment interactions. *Neurotoxicology* 46:101-116.
- Kohno Y, Takeuchi S (2004) [Pharmacological profiles and clinical effects of antiparkinsonian agent, pramipexole]. *Nihon Yakurigaku Zasshi* 123:429-440.
- LeDoux SP, Druzhyna NM, Hollensworth SB, Harrison JF, Wilson GL (2007) Mitochondrial DNA repair: a critical player in the response of cells of the CNS to genotoxic insults. *Neuroscience* 145:1249-1259.
- Lee J, Giordano S, Zhang J (2012) Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling. *Biochem J* 441:523-540.
- Le WD, Jankovic J, Xie W, Appel SH (2000) Antioxidant property of pramipexole independent of dopamine receptor activation in neuroprotection. *J Neural Transm (Vienna)* 107:1165-1173.
- Liu B, Gao HM, Hong JS (2003) Parkinson's disease and exposure to infectious agents and pesticides and the occurrence of brain injuries: role of neuroinflammation. *Environ Health Perspect* 111:1065-1073.
- Ljubisavljevic S (2016) Oxidative Stress and Neurobiology of Demyelination. *Mol Neurobiol* 53:744-758.

- Macco R, Pelizzoni I, Consonni A, Vitali I, Giacalone G, Martinelli Boneschi F, Codazzi F, Grohovaz F, Zacchetti D (2013) Astrocytes acquire resistance to iron-dependent oxidative stress upon proinflammatory activation. *J Neuroinflammation* 10:130.
- Margis R, Dunand C, Teixeira FK, Margis-Pinheiro M (2008) Glutathione peroxidase family - an evolutionary overview. *FEBS J* 275:3959-3970.
- Martinez TN, Greenamyre JT (2012) Toxin models of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal* 16:920-934.
- Muller FL, Liu Y, Van Remmen H (2004) Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *J Biol Chem* 279:49064-49073.
- Park YS, You SY, Cho S, Jeon HJ, Lee S, Cho DH, Kim JS, Oh JS (2016) Eccentric localization of catalase to protect chromosomes from oxidative damages during meiotic maturation in mouse oocytes. *Histochem Cell Biol* 146:281-288.
- Pastor N, Weinstein H, Jamison E, Brenowitz M (2000) A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBP-DNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequence-specific binding. *J Mol Biol* 304:55-68.
- Patricio F, Parra I, Martínez I, Pérez-Severiano F, Montes S, Aguilera J, Limón ID, Tizabi Y, Mendieta L (2019) Effectiveness of Fragment C Domain of Tetanus Toxin and Pramipexole in an Animal Model of Parkinson's Disease. *Neurotox Res*.
- Pérez-Severiano F, Rodríguez-Pérez M, Pedraza-Chaverrí J, Maldonado PD, Medina-Campos ON, Ortiz-Plata A, Sánchez-García A, Villeda-Hernández J, Galván-Arzate S, Aguilera P, Santamaría A (2004) S-Allylcysteine, a garlic-derived antioxidant, ameliorates quinolinic acid-induced neurotoxicity and oxidative damage in rats. *Neurochem Int* 45:1175-1183.
- Radad K, Rausch WD, Gille G (2006) Rotenone induces cell death in primary dopaminergic culture by increasing ROS production and inhibiting mitochondrial respiration. *Neurochem Int* 49:379-386.

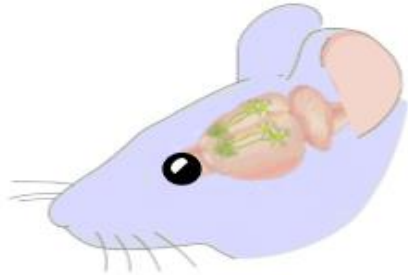
- Radley JJ, Rocher AB, Miller M, Janssen WG, Liston C, Hof PR, McEwen BS, Morrison JH (2006) Repeated stress induces dendritic spine loss in the rat medial prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 16:313-320.
- Rangel-Barajas C, Coronel I, Florán B (2015) Dopamine Receptors and Neurodegeneration. *Aging Dis* 6:349-368.
- Rizzo AM, Berselli P, Zava S, Montorfano G, Negroni M, Corsetto P, Berra B (2010) Endogenous antioxidants and radical scavengers. *Adv Exp Med Biol* 698:52-67.
- Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, Swanson AB, Hafeman DG, Hoekstra WG (1973) Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* 179:588-590.
- Sanders LH, Timothy Greenamyre J (2013) Oxidative damage to macromolecules in human Parkinson disease and the rotenone model. *Free Radic Biol Med* 62:111-120.
- Schapira AH, McDermott MP, Barone P, Comella CL, Albrecht S, Hsu HH, Massey DH, Mizuno Y, Poewe W, Rascol O, Marek K (2013) Pramipexole in patients with early Parkinson's disease (PROUD): a randomised delayed-start trial. *Lancet Neurol* 12:747-755.
- Sethy VH, Wu H, Oostveen JA, Hall ED (1997) Neuroprotective effects of the dopamine agonists pramipexole and bromocriptine in 3-acetylpyridine-treated rats. *Brain Res* 754:181-186.
- Smeyne M, Smeyne RJ (2013) Glutathione metabolism and Parkinson's disease. *Free Radic Biol Med* 62:13-25.
- St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand MD (2002) Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem* 277:44784-44790.
- Stefanatos R, Sanz A (2018) The role of mitochondrial ROS in the aging brain. *FEBS Lett* 592:743-758.
- Tanner CM, Kamel F, Ross GW, Hoppin JA, Goldman SM, Korell M, Marras C, Bhudhikanok GS, Kasten M, Chade AR, Comyns K, Richards MB, Meng C, Priestley B, Fernandez HH,

- Cambi F, Umbach DM, Blair A, Sandler DP, Langston JW (2011) Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. *Environ Health Perspect* 119:866-872.
- Titorenko VI, Terlecky SR (2011) Peroxisome metabolism and cellular aging. *Traffic* 12:252-259.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 160:1-40.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39:44-84.
- Venkatesh Gobi V, Rajasankar S, Ramkumar M, Dhanalakshmi C, Manivasagam T, Justin Thenmozhi A, Essa MM, Chidambaram R (2018) *Agaricus blazei* extract attenuates rotenone-induced apoptosis through its mitochondrial protective and antioxidant properties in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Nutr Neurosci* 21:97-107.
- Vida C, Rodríguez-Terés S, Heras V, Corpas I, De la Fuente M, González E (2011) The aged-related increase in xanthine oxidase expression and activity in several tissues from mice is not shown in long-lived animals. *Biogerontology* 12:551-564.
- Wang H, Cheng E, Brooke S, Chang P, Sapolsky R (2003) Over-expression of antioxidant enzymes protects cultured hippocampal and cortical neurons from necrotic insults. *J Neurochem* 87:1527-1534.
- Wang X, Michaelis EK (2010) Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. *Front Aging Neurosci* 2:12.
- Wang Y, Yu X, Zhang P, Ma Y, Wang L, Xu H, Sui D (2018) Neuroprotective effects of pramipexole transdermal patch in the MPTP-induced mouse model of Parkinson's disease. *J Pharmacol Sci* 138:31-37.
- Yin H, Xu L, Porter NA (2011) Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chem Rev* 111:5944-5972.

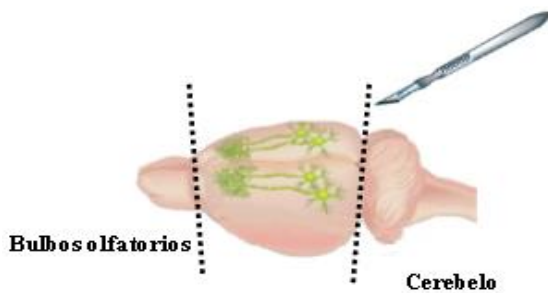
Yokoyama H, Yano R, Aoki E, Kato H, Araki T (2008) Comparative pharmacological study of free radical scavenger, nitric oxide synthase inhibitor, nitric oxide synthase activator and cyclooxygenase inhibitor against MPTP neurotoxicity in mice. *Metab Brain Dis* 23:335-349.

Zou L, Xu J, Jankovic J, He Y, Appel SH, Le W (2000) Pramipexole inhibits lipid peroxidation and reduces injury in the substantia nigra induced by the dopaminergic neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine in C57BL/6 mice. *Neurosci Lett* 281:167-170.

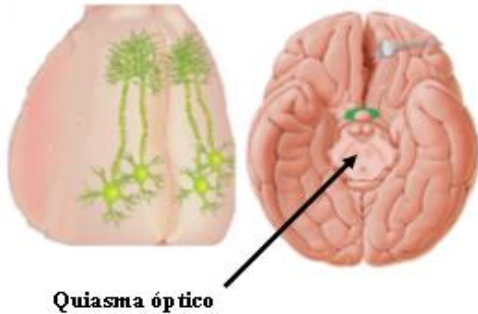
12. ANEXOS
APÉNDICE 1
OBTENCIÓN DE ÁREAS SUBCORTICALES



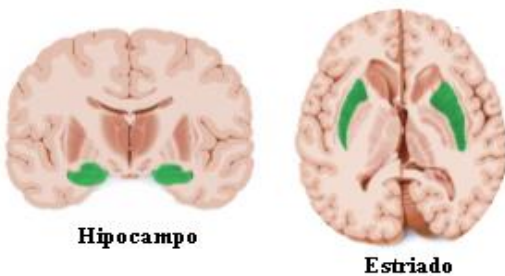
Después de la decapitación, se obtuvo el cerebro de la ratona y se lavó con SSI para la remoción de sangre superficial.



El cerebro se colocó sobre una platina que estaba en un recipiente con hielo seco y posteriormente se realiza dos cortes coronales para retirar los bulbos olfatorios y el cerebelo.



Se realizó la identificación del quiasma óptico y se continuo a identificar y extraer el hipocampo, el estriado y la corteza frontal, una vez obtenidos se pesaron y se almacenaron a -80C.



Hipocampo

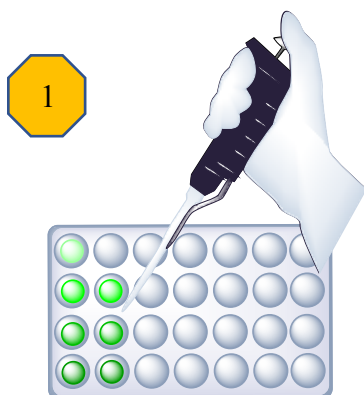
Estriado



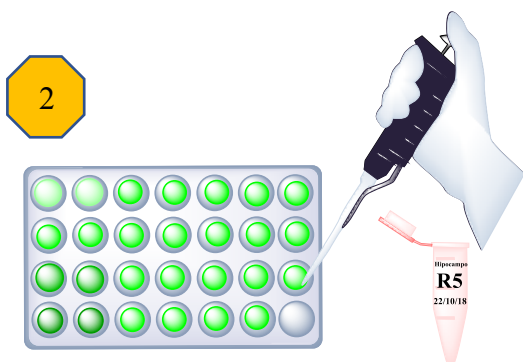
Corteza Frontal

APÉNDICE 2

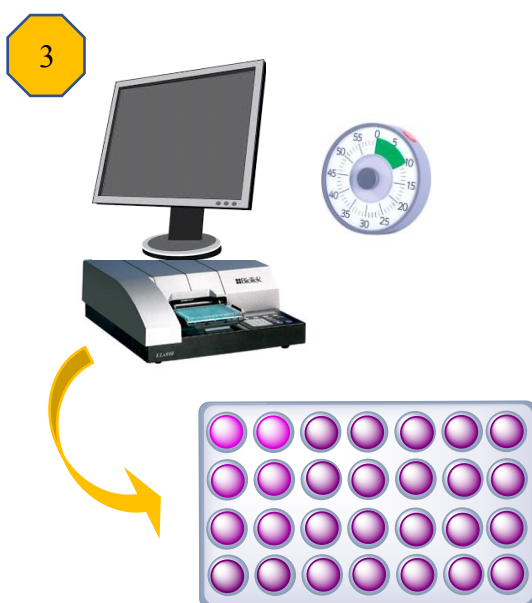
DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE ÁCIDO BICINCONÍNICO



Como primer paso se realizó una curva de calibración con estándares de albúmina sérica bovina de diferente concentración (0, 2, 4, 6, 8, 10 ug/ul) en una microplaca, adicionándose agua desionizada y 100 µl de BCA



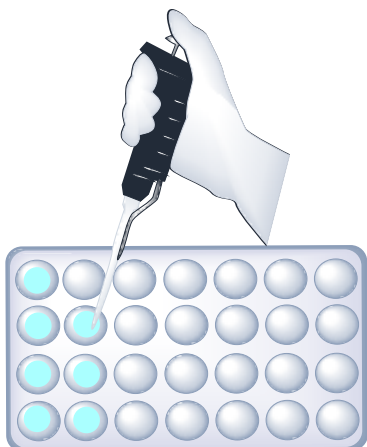
Posteriormente para las muestras, se utilizó 1 µl de muestra más 99 µl de agua desionizada y 100 µl de BCA. Cada estándar y muestra se realizó por duplicado.



Terminada de realizar la placa, inmediatamente se determinó la absorbancia mediante un lector automático de microplacas de Elisa a una longitud de onda de **540 nm**.

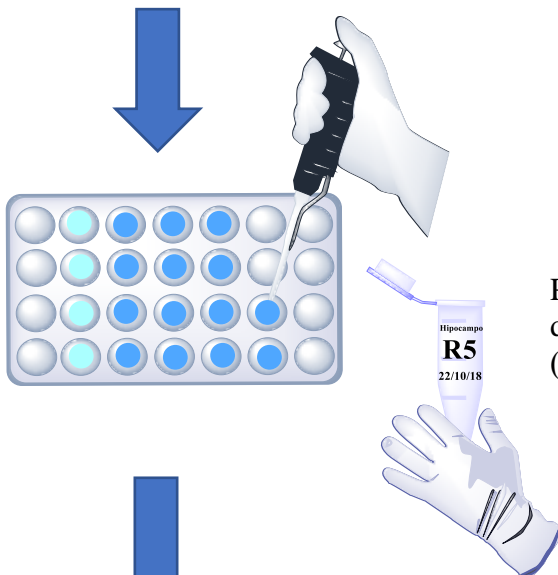
APÉNDICE 3

DETERMINACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO



En primer lugar, se realizó una curva estándar con concentraciones crecientes de DCF (100 nM).

(0.2, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 pmol)



Para la preparación de las muestras se agregó 5 μ l de cada muestra a 145 μ l de tampón TRIS: HEPES (18:1) y 50 μ l de DCFH-DA (50 μ M).

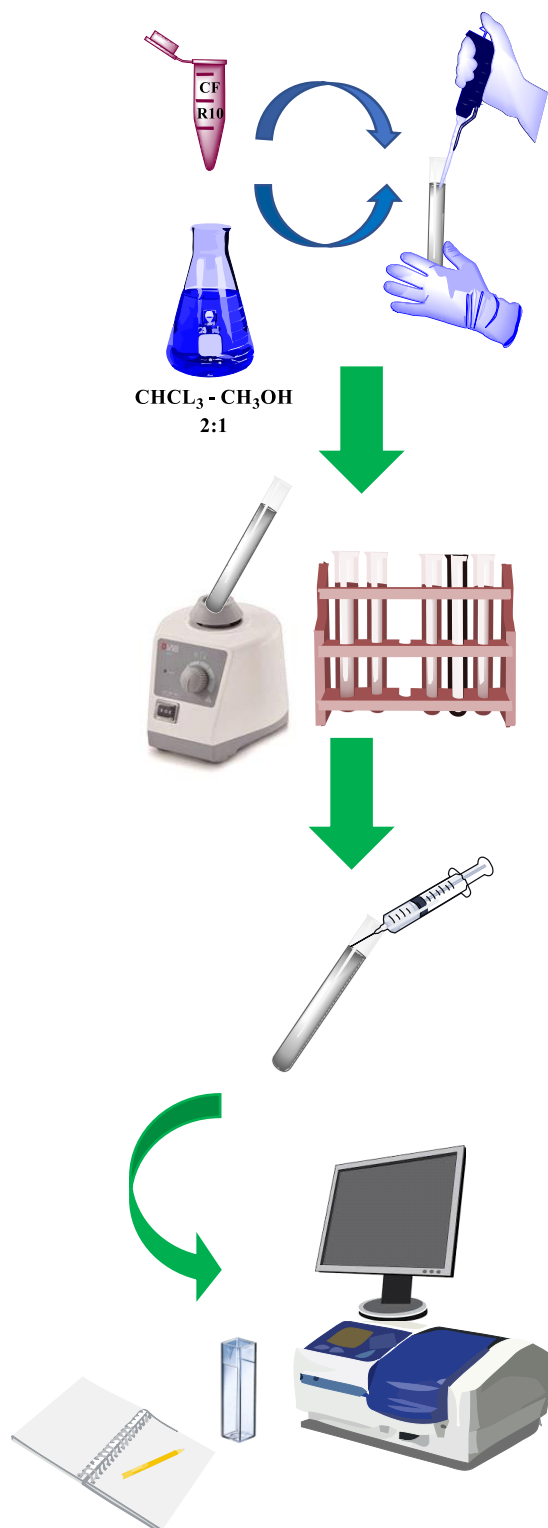


Por último, se incubó a **37 °C** durante **60 minutos** en oscuridad, e inmediatamente se empezaron a leer a **525 nm**.

FLx800 (Biotek Instruments)

APÉNDICE 4

DETERMINACIÓN DE PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS



En un tubo de ensayo se pasó 1 ml de homogeneizado y se le añadió 4 ml de una mezcla de cloroformo-metanol (2:1). Los tubos deben forrarse con papel aluminio antes de iniciar.

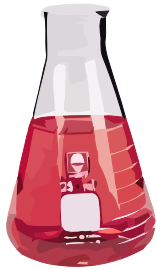
Posteriormente los tubos después de pasarlos 5 segundos por el vortex se incubaron a 4 °C durante 30 minutos en oscuridad.

Terminado el tiempo de incubación, se eliminó el sobrenadante teniendo cuidado de no mezclar las fases obtenidas.

Finalmente, en una celda se tomaron 2 ml de la fase y se le añadió 200 μ l de metanol, leyéndose en un espectrofotómetro de luminiscencia **Perkin-Elmer LS50-B** a 430 nm. Previo a la lectura de las muestras se realizó la calibración del equipo, ajustándose a una señal fluorescente de 300 unidades de fluorescencia (UF) con una solución estándar de quinina (0.1 μ g/ml).

APÉNDICE 5

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA SUPERÓXIDO DISMUTASA



Para llevar a cabo la reacción se preparó un buffer de carbonatos con 20 mM de bicarbonato de sodio que se ajustó a pH 10.2 y se le añadió tritón al 0.02%. Finalmente, a este buffer se le agregó Citocromo C (10 μ M), Azida de sodio (10 μ M), Xantina (100 μ M) y EDTA (1mM) y se mantuvo a 37 °C hasta su uso.



Para generar la reacción enzimática se empleó la Xantina oxidasa con EDTA (0.1 mM). *Se mantiene en hielo durante su uso.

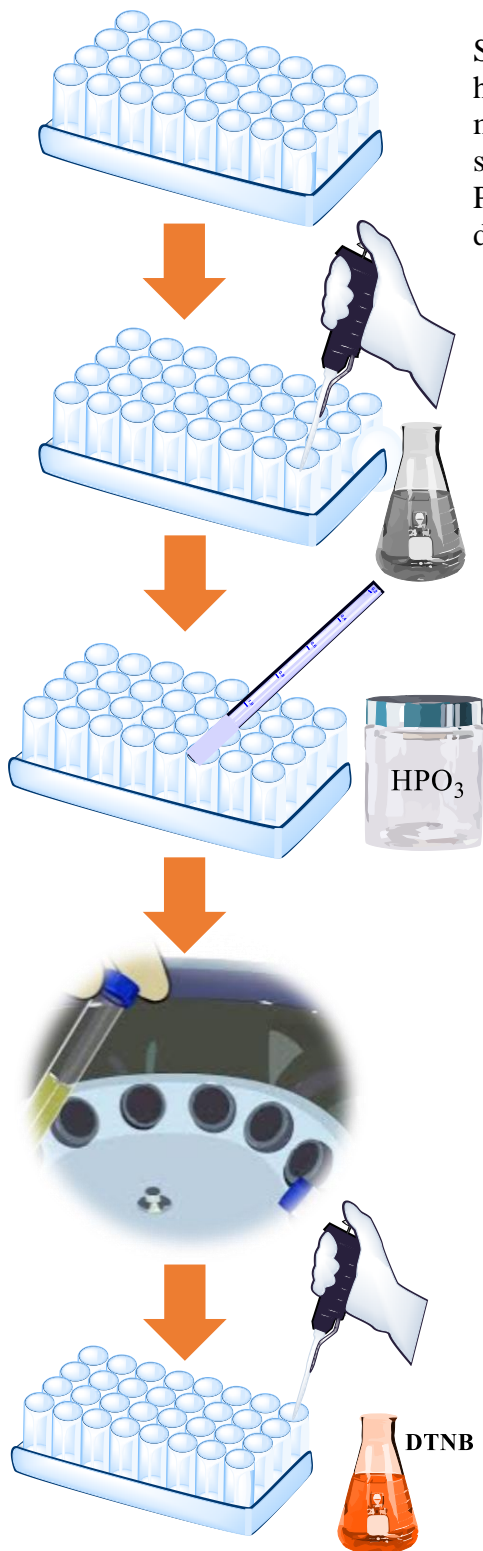


Los tejidos se homogenizaron en 5 volúmenes de buffer de carbonatos y se inició el ensayo de la actividad midiéndose la reacción **cada 30 segundos durante** 3 minutos a **550 nm** con uso de espectrofotómetro UV y el programa de **SODXO Time Drive**.

En primer lugar, se determinó la actividad de SOD total, posteriormente para determinar la actividad de Mn-SOD, se le agregó KCN (1mM) a cada muestra. La diferencia entre la total y la Mn-SOD es la actividad correspondiente a la Cu-Zn SOD.

APÉNDICE 6

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE GLUTATIÓN PEROXIDASA



Se depositaron en tubos de ensayo 60 μl del homogeneizado y se les adicióno 0.25 ml de GSH 20 mM, 0.25 ml de PB-EDTA pH= 8, 100 μl de azida de sodio 0.01 M y 120 μl de agua desionizada. Posteriormente, los tubos fueron incubados a **37 °C** durante **5 minutos**.

Terminado el tiempo de incubación se le agrego 0.25 ml de H_2O_2 (1.25 mM) incubándose nuevamente **5 minutos más**.

Posteriormente a cada uno de los tubos se les agrego 1 ml de ácido metafosfórico.

Los tubos se centrifugaron a **14,000 rpm** durante 20 minutos a **4°C**.

Finalmente, se les adiciónó 500 μl de ácido 5,5-ditio-bis-2-nitrobenzoico (**DTNB**) e inmediatamente se determinó la absorbancia de la muestra y el blanco una longitud de **412 nm**. Bajo las mismas condiciones, se realizó a la par una curva calibración utilizando concentraciones conocidas de GSH (50 mg/5ml).