

**Análisis de la actividad de las principales
enzimas antioxidantes en diferentes
regiones cerebrales en un modelo de
ratón de la enfermedad de Parkinson**

**Analysis of the activity of main antioxidant
enzymes in different brain regions of a
Parkinson's disease mouse model**

TRABAJO DE FIN DE GRADO

RAQUEL MENDOZA RODRÍGUEZ

**Tutorizado por Antonio Lorenzo Hernández y Fátima Mesa Herrera
Grado en Biología.**

Julio 2018

Índice de abreviaturas

ATP:	Adenosín trifosfato
Ca:	Corteza anterior
CAT:	Catalasa
Ce:	Cerebelo
DAQ:	Quinonas de dopamina
DOPAC:	3,4-dihidroxifenilacético
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético
EP:	Enfermedad de Parkinson
ERO:	Especie reactivas del oxígeno
GPx:	Glutación peroxidasa
GPx4:	Glutación peroxidasa 4
GR:	Glutación reductasa
GSH:	Glutación reducido
GSSG:	Glutación oxidado
H₂O₂:	Peróxido de hidrógeno
HCl:	Ácido clorhídrico
K₂HPO₄:	Fosfato dipotásico
KH₂PO₄:	Fosfato potásico monobásico
MAO:	Monoamino oxidasa
MPP+:	1-metil-4-fenilperidinio
MPTP:	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
NADPH:	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
O₂⁻:	Radical superóxido
OH⁻:	Radical hidroxilo
ROS:	Reactive oxygen species
Se:	Septum-hipocampo
SNpc:	Sustancia nigra pars compacta
SOD:	Superóxido dismutasa
SOD1 o Cu-Zn-SOD:	Superóxido dismutasa citoplasmática
SOD2 o Mn-SOD:	Superóxido dismutasa mitocondrial
SPSS:	Statistical Package for Social Science

Índice

Resumen	1
Abstract	1
Introducción	2
1. Enfermedad de Parkinson.....	2
2. Etiología de la enfermedad.....	3
2.1 Sistema clásico.....	6
2.2 Sistema del glutatión.....	7
Objetivos	9
Material y métodos	10
1. Modelo experimental.....	10
2. Obtención de las muestras de tejido.....	10
3. Homogenización de las muestras.....	10
4. Determinación de las actividades enzimáticas.....	11
4.1 Superóxido dismutasa (SOD).....	11
4.2 Catalasa (CAT).....	12
4.3 Glutatión peroxidasa 4 (GPx4).....	12
5. Determinación de la concentración de proteína total.....	13
6. Análisis estadístico.....	13
Resultados	14
1. Efecto del envejecimiento.....	14
1.1 Enzima superóxido dismutasa (SOD).....	14
1.2 Enzima catalasa (CAT).....	15
1.3 Enzima glutatión peroxidasa 4 (GPx4).....	16
2. Efecto del envejecimiento junto con la neurotoxina MPTP.....	17
2.1 Enzima superóxido dismutasa (SOD).....	17
2.2 Enzima catalasa (CAT).....	17
2.3 Enzima glutatión peroxidasa 4 (GPx4).....	18
Discusión	19
Conclusiones	21
Conclusions	21
Agradecimientos	22
Bibliografía	23

Resumen

Resumen

La enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda neurodegeneración más frecuente en el mundo. Se caracteriza, principalmente, por la pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas y por la acumulación de los cuerpos de Lewy en determinadas regiones del cerebro. Existen evidencias de que durante el desarrollo de la EP puede producirse una alteración del estado redox en el tejido cerebral. El presente trabajo tiene como objetivo general evaluar la actividad antioxidante de las enzimas superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa en diferentes regiones cerebrales afectadas por EP. Para ello se utilizó un modelo murino con diferentes edades al que se le administró la neurotoxina MPTP para reproducir parte de la sintomatología de la EP. El estudio reveló que la actividad de antioxidantes se vio alterada por el envejecimiento de forma independientemente de la administración de la neurotoxina, y que estos cambios eran diferentes según la región cerebral estudiada.

Palabras claves: Enfermedad de Parkinson, envejecimiento, enzimas antioxidantes, MPTP, regiones cerebrales.

Abstract

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegeneration in the world. It is mainly characterized by the progressive loss of dopaminergic neurons and by the accumulation of Lewy bodies in certain regions of the brain. There is evidence that during the development of PD there may be an alteration of the redox state of brain tissue. The general objective of this study is to evaluate the antioxidant activity of the enzymes superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in different brain regions affected by PD. A murine model treated with the neurotoxin MPTP was used to reproduce part of the symptomatology of PD at different ages. The study revealed that antioxidant activity was altered by aging independently of neurotoxin, and that these changes were different depending on the brain region studied.

Keywords: Parkinson's disease, aging, antioxidant enzymes, MPTP, brain regions.

Introducción

Introducción

Los trastornos neurodegenerativos forman un grupo heterogéneo de enfermedades que se caracterizan por la disfunción, degeneración o muerte de una población de neuronas específicas en determinadas regiones del sistema nervioso (Kovecs, 2016). Actualmente el número de casos ronda los 44 millones en todo el mundo, y se estima que la tendencia seguirá en aumento a medida que la población mundial vaya envejeciendo. La Organización Mundial de la Salud (OMS) prevé que para 2040 los casos de enfermedades neurodegenerativas superarán al cáncer, convirtiéndose en la segunda causa de muerte después de las enfermedades cardiovasculares (Gammon, 2014).

1. Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno neurodegenerativo multifactorial y progresivo que se asocia con la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra pars compacta del cerebro (SNpc). La EP se corresponde con la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente después de la enfermedad de Alzheimer (revisado en Martínez-Fernández *et al.*, 2016). Aunque la EP presenta una distribución universal, se han observado diferencias interétnicas habiendo un mayor riesgo en poblaciones hispanas (Van Den Eeden *et al.*, 2003). La prevalencia de la enfermedad de Parkinson parece más alta en Europa, América del Norte y América del Sur en comparación con los países africanos y asiáticos (Tabla 1) (Kalia y Lang *et al.*, 2015).

LUGAR	PREVALENCIA BRUTA ESTIMADA
Europa	66-1.500 por 100.000 habitantes.
América del Norte	111-329 por 100.000 habitantes.
América del Sur	31-470 por 100.000 habitantes.
África	10-43 por 100.000 habitantes.
Asia	15-119 por 100.000 habitantes.

Tabla 1. Prevalencias brutas estimadas para todas las edades en diferentes regiones geográficas (adaptada de Kalia y Lang *et al.*, 2015).

La enfermedad de Parkinson cursa con la aparición de *síntomas motores* tales como bradicinesia, temblor en reposo, rigidez e inestabilidad postural, así como *síntomas no motores* como trastornos del sueño, depresión y déficits cognitivos (Rodríguez-Oroz *et al.*, 2009). Generalmente, los primeros síntomas clínicos comienzan a aparecer a partir de los 60 años, aunque pueden ser diagnosticados con antelación, incluso antes de los 50 años (Kidd, 2000). La prevalencia aumenta exponencialmente con la edad, apareciendo un pico después de los 80 años (Tabla 2) (Pringsheim *et al.*, 2014). Esto supone un problema puesto que, el envejecimiento de la población sumado al aumento de la esperanza de vida en el mundo, se espera que la cantidad de personas afectadas por la enfermedad de Parkinson aumente en más del 50% para el año 2030 (Dorsey *et al.*, 2007).

RANGO DE EDAD (AÑOS)	PREVALENCIA
40 - 49	41 por 100.000 habitantes.
50 - 59	107 por 100.000 habitantes.
60 - 69	428 por 100.000 habitantes.
70 - 79	1087 por 100.000 habitantes.
> 80	1903 por 100.000 habitantes.

Tabla 2. Datos de la prevalencia de la enfermedad de Parkinson según la edad (adaptado de Pringsheim *et al.*, 2014).

Etiología de la enfermedad

La etiología exacta de la EP sigue siendo difícil de determinar y aún no se han identificado los mecanismos precisos que causan esta enfermedad (Obeso *et al.*, 2010). Sin embargo, diferentes estudios apuntan a que pueden deberse a una combinación de factores ambientales y factores genéticos (Martínez-Fernández *et al.*, 2016; Kalia y Lang, 2015; Gaki y Papavassiliou, 2014; Jin *et al.*, 2014; Pringsheim *et al.*, 2014). A nivel celular, la EP se caracteriza principalmente por la pérdida prematura de neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra pars compacta (SNpc) del cerebro medio o mesencéfalo, lo que tiene como resultado una significativa reducción de los niveles de dopamina en el núcleo estriado. La reducción en los niveles del neurotransmisor

dopamina hace que disminuya la comunicación entre el cerebro y los músculos. Esto afecta a la coordinación del movimiento muscular, provocando así la incapacidad de iniciar o parar un movimiento. Esta hipótesis inicial permite explicar los síntomas motores clásicos, sin embargo, existe la necesidad de explicar la sintomatología más compleja y generalizada de la misma (Romuk *et al.*, 2017). En este sentido, han surgido estudios que asocian la etiología de la enfermedad con la presencia de neuritas y cuerpos de Lewy distribuidos por todo el sistema nervioso.

Los cuerpos de Lewy son inclusiones intracelulares compuestas principalmente por la proteína α -sinucleína anormalmente plegada. En este estado, la proteína disminuye su solubilidad y provoca la formación de agregados. Los cuerpos de Lewy aparecen como cuerpos densos rodeados de un halo pálido de filamentos radiados, mientras que las neuritas de Lewy recuerdan más a la morfología de un hilo (Dunning *et al.*, 2011).

La α -sinucleína se caracteriza por su capacidad de ser transmitida de neurona a neurona mediante endocitosis o por penetración de la membrana plasmática mediante exosomas (revisado en Gallegos *et al.*, 2015). Esta capacidad provoca la propagación de la enfermedad hacia la médula espinal y el sistema nervioso periférico (nervio vago, ganglios simpáticos, plexo cardíaco, glándulas salivales, etc) (revisado en Kalia y Lang, 2015). Otra característica de esta proteína es que proporciona, sobre todo cuando está en estado oligomérico, citotoxicidad a las células receptoras causando disfunción mitocondrial, estrés oxidativo, alteración de la membrana plasmática y formación de poros, los cuales provocan la activación de procesos apoptóticos y la consiguiente muerte celular (Gallegos *et al.*, 2015).

Los mecanismos por los cuales se comienzan a perder las neuronas dopaminérgicas aún no están esclarecidos. Sin embargo, varios estudios han evidenciado que pueden estar relacionados con alteraciones en el metabolismo de las catecolaminas, con modificaciones en la función de la cadena transportadora de electrones mitocondriales (CTEM), con la mejora de la deposición de hierro en la SNpc, excitotoxicidad, procesos inflamatorios, así como un exceso de producción de especies reactivas del oxígeno (ERO) (Yuan *et al.*, 2007; Schapira y Jenner, 2011; Rodriguez *et al.*, 2014).

Cuando los sistemas antioxidantes del cerebro son insuficientes o la producción de EROs es excesiva nos encontramos en un estado de estrés oxidativo, el cual induce daño a las neuronas dopaminérgicas. Esta es una de las hipótesis que pretenden explicar el

origen de la neurodegeneración, que señala la degeneración de la dopamina como posible causa de la presencia de niveles altos de hierro, o bien por la catalización mediada por monoamino oxidasa (MAO) que provoca la formación de compuestos tóxicos (Yuan *et al.*, 2007). En un primer paso, MAO cataliza la transformación de dopamina en DOPAC (3,4-dihidroxifenilacético), generando peróxido de hidrógeno (H₂O₂). El peróxido de hidrógeno no es nocivo en sí mismo sino debido a su capacidad de generar radicales hidroxilos (OH⁻) en presencia de metales y radicales libres derivados del oxígeno (Figura 1). Estos compuestos provocan peroxidación lipídica y/o alteración en la fluidez de la membrana, que generan alteraciones celulares que pueden representar el primer paso para el desarrollo de la EP (Barnham *et al.*, 2004).

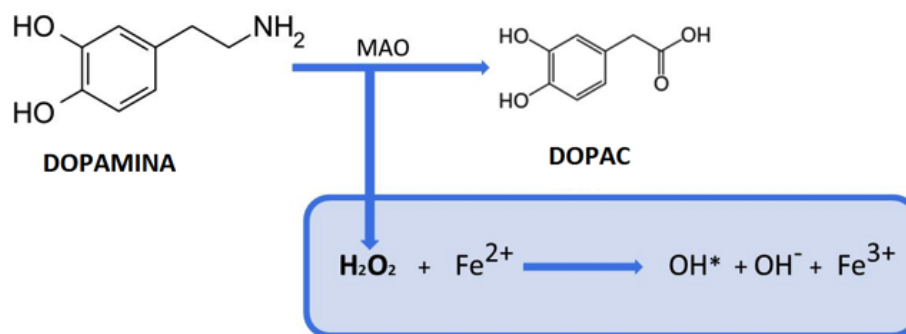


Figura 1. Oxidación de la dopamina por acción de la MAO y formación de peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno reacciona con el hierro a través de la reacción de Fenton provocando la producción de otras especies reactivas del oxígeno (OH* y OH⁻).

El anillo fenólico que presenta la estructura de la dopamina le proporciona a ésta gran susceptibilidad oxidativa produciéndose quinonas de dopamina (DAQ). Las quinonas de dopamina son tóxicas y pueden provocar daños directamente en la cadena respiratoria mitocondrial de las neuronas, a través de la producción de residuos que disminuyen la producción de ATP (Santiago y Rivas, 2008).

Así mismo, hay factores externos que inician o favorecen el daño oxidativo, como puede ser la exposición a la neurotoxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), la cual se consigue como subproducto de la síntesis química de un análogo de meperidina (analgésico opiáceo) con potentes efectos similares a la heroína. En humanos produce de manera severa e irreversible casi todas las características de la EP, donde la mayor fase de neurodegeneración se consigue en apenas días (revisado en Przedborski y Vila, 2003). En experimentación se emplea ampliamente en ratones, donde los datos neuropatológicos revelan daños específicos en la vía dopaminérgica

nigroestriatal, idéntica a la observada en la enfermedad de Parkinson, siendo por tanto el mejor modelo experimental de EP (revisado en Przedborski *et al.*, 2001).

El MPTP, al ser altamente lipofílico, cruza rápida y libremente la barrera del cerebro, siendo detectable en él un minuto después de la inyección (revisado en Przedborski *et al.*, 2001). A nivel cerebral, diferentes estudios han mostrado que reduce la capacidad antioxidante del tejido cerebral, haciéndolo más vulnerable a los daños oxidativos (Kidds, 2000).

En condiciones fisiológicas normales las células eliminan estas moléculas perjudiciales y previenen el estrés oxidativo mediante diferentes *sistemas antioxidantes*. Para ello se establece un equilibrio entre su actividad antioxidante y la producción de ERO. La rápida eliminación de estos compuestos en exceso es esencial para el correcto funcionamiento de las células y por ende para la supervivencia del organismo (Halliweel, 2012). Los sistemas antioxidantes pueden estar compuestos por moléculas enzimáticas y por moléculas no enzimáticas. Los sistemas antioxidantes más importantes que tratamos en este trabajo son el *sistema clásico* y el *sistema del glutatión*.

4.1. Sistema clásico

El sistema antioxidante clásico incluye a superóxido dismutasa (SOD) y a catalasa (CAT), que constituyen la primera barrera de defensa contra ERO. Ambas ejercen su efecto beneficioso al convertir estos compuestos tóxicos primero en peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y luego en oxígeno (O₂) y agua (H₂O).

La SOD se encarga de dismutar el radical superóxido (O₂⁻) en O₂ y H₂O₂ (Figura 2) y puede incluir varias metaloproteínas. La enzima SOD1 contiene zinc y cobre (Cu-Zn-SOD) y se encuentra ubicada en el citoplasma de la célula. SOD también puede contener manganeso (MnSOD) constituyendo la enzima SOD2 que se encuentra en la matriz mitocondrial (Messner *et al.*, 2012).

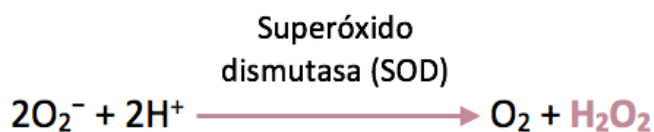


Figura 2. Reacción de la enzima SOD del sistema antioxidante clásico.

La CAT dentro de las células se localizan principalmente en los peroxisomas, donde hay muchas enzimas productoras de H₂O₂, y en las mitocondrias, donde se puede encontrar de forma soluble o unidas a la membrana (Djordjević, 2004). Se encarga de transformar el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en agua (H₂O) y oxígeno (O₂) (Figura 3), evitando la conversión a radicales hidroxilo y otras ERO más tóxicas.

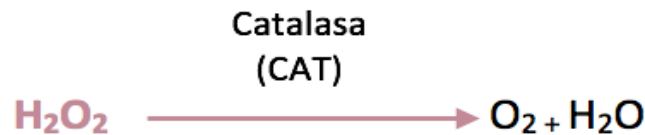


Figura 3. Reacción de la enzima CAT del sistema antioxidante clásico.

4.2. Sistema del glutatión

El sistema del glutatión se encuentra formado por moléculas enzimáticas como la glutatión peroxidasa (GPx) y por moléculas no enzimáticas como el glutatión (γ -L-glutamyl-L-cisteinyl-glycine), el cual es esencial al actuar como cofactor para las enzimas del sistema.

El glutatión es un tripéptido del que hay dos formas: forma oxidada (GSSG) y forma reducida (GSH). La GPx es una enzima antioxidante que utiliza como cofactor el selenio y se encarga de reducir el H₂O₂ y los peróxidos lipídicos a la vez que oxida el glutatión reducido (GSH) a glutatión disulfuro (GSSG) (Tabet y Touyz, 2007) (Figura 4). Es más efectivo que la catalasa para niveles bajos de peróxido de hidrógeno (Messner *et al.*, 2012).



Figura 4. Reacción de la enzima GPx del sistema antioxidante del glutatión.

Dentro de la familia de la glutatión peroxidasa se encuentra la glutatión peroxidasa 4 (GPx4). Difiere de las otras glutatión peroxidases en que puede degradar hidroperóxidos encontrados en lipoproteínas y lípidos complejos como los derivados del colesterol, ésteres de colesterilo y fosfolípidos (revisado en Lustgarten *et al.*, 2011).

Todas las enzimas descritas actúan de manera específica degradando las ERO a moléculas menos nocivas mediante mecanismos bioquímicos. El proceso comienza con la acción de SOD que dismuta el radical superóxido (O₂⁻) a H₂O₂, para ser

transformado por la acción de la CAT y la GPx en agua (Sánchez-Valle y Méndez-Sánchez, 2013).

Objetivos

Objetivos

El objetivo de este trabajo consiste en la detección de posibles cambios en la actividad enzimática de un conjunto de enzimas antioxidante celulares (SOD, CAT y GPx4), en diferentes regiones cerebrales en animales control (no tratados) y animales tratados con la neurotoxina MPTP a diferentes edades. El fin es estudiar si el envejecimiento *per se* y el efecto de la toxina MPTP alteran la actividad antioxidante de estas enzimas, y por otro lado averiguar qué regiones cerebrales estudiadas se ven más afectadas por el efecto del envejecimiento y por la neurotoxina.

Material y métodos

Material y métodos

1. Modelo experimental

Como modelo animal de la enfermedad de Parkinson se utilizaron ratones hembra de la cepa C57BL/6, la cual es sensible a la administración de MPTP (Meredith y Rademacher, 2011).

Al grupo experimental se le administró la neurotoxina MPTP, previamente diluida en suero salino a una concentración final de 10 mg/ml, mediante una inyección intraperitoneal a razón de 20 mg/kg/día durante 10 días consecutivos. Al grupo control, se le administró la cantidad equivalente de solución salina en las mismas. Posteriormente previo al sacrificio, los animales se mantuvieron durante 10 días sin ningún tipo de manipulación para evitar que presenten estrés.

Los animales fueron mantenidos en un ciclo de 12 h de luz-oscuridad con acceso libre a comida y agua en el Estabulario y Animalario de la Universidad de La Laguna. Se mantuvieron así hasta que se les administró el tratamiento en el laboratorio de Fisiología Animal de la Universidad de La Laguna, manteniéndolos en las mismas condiciones descritas previamente hasta el momento del sacrificio a los 6 o 14 meses de edad.

Los animales fueron tratados mediante procedimientos autorizados por el Comité de Ética para manipulación de animales de laboratorio de la Universidad de La Laguna, siguiendo las directrices del Consejo de la Comunidad Europea (Directiva 86/609/EEC).

2. Obtención de las muestras de tejido

Todos los ratones fueron sacrificados mediante dislocación cervical. La disección de todas las áreas de estudio se realizó en frío. Las regiones que se estudiaron en este trabajo corresponden con septum-hipocampo (Se), cerebelo (Ce) y corteza anterior (Ca). En total se extrajeron 4 réplicas biológicas de tejido cerebral por cada tratamiento y edad: 4 ejemplares hembra control de 6 y 14 meses y 4 ejemplares hembra de 6 y 14 meses tratados con MPTP. Una vez extraídas, las muestras se conservaron a una temperatura de -80°C hasta su tratamiento.

3. Homogenización de las muestras

Las muestras de las distintas regiones del cerebro (Se, Ce y Ca) fueron homogenizadas mediante rotura mecánica con microperlas empleando tubos eppendorf de 1.5 ml y las regiones cerebrales correspondientes enteras. Para ello, se añadió 500 µl

buffer de homogeneización frío (Tris HCl 20 mM pH 7.4 con inhibidor de proteasas Complete (Roche 1X) en los tubos eppendorf donde se trasladaron los cerebros aún congelados, de tal manera que la descongelación se produjo directamente en el buffer. Posteriormente se procedió a la disgregación del tejido, que consistió en realizar cortes a los cerebros con tijeras de disección facilitando así la rotura posterior. Se añadió una proporción determinada de microperlas completando el proceso con vortex durante 1 min a 3000 r.p.m. Después de cada agitación las muestras se depositaron en hielo durante 1 min para finalmente someterlas a otro ciclo de vortex en las mismas condiciones descritas anteriormente. Posteriormente se aisló la solución de las microperlas mediante centrifugación durante 1 min a 3000 r.p.m., seguido de otra centrifugación de la solución aislada durante 1 min a 7000 r.p.m. obteniéndose así dos fracciones, una fracción sobrenadante y una fracción pellet. La fracción sobrenadante se extrajo, alicuotó y conservó a -80°C hasta la realización de los ensayos.

4. Determinación de las actividades enzimáticas

4.1. Superóxido dismutasa (SOD)

La determinación de la actividad de SOD se llevó a cabo utilizando una modificación del método desarrollado por Marklund y Marklund (1974) cuyo fundamento se basa en la autooxidación del pirogalol (1,2,3-bencenotriol o ácido pirogálico), un compuesto que en soluciones alcalinas se autooxida rápidamente generando radicales superóxido en el medio, los cuales aceleran la autooxidación de éste (Marklund y Marklund, 1974). Cuando el radical superóxido se acumula y produce la autooxidación del pirogalol da lugar a la formación de purpurogalina, un compuesto amarillo-marrón con un pico máximo de absorbancia de luz a 420 nm y coeficiente de extinción molar $2640 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Cuando hay SOD presente en el medio, la enzima compite con el pirogalol por el radical superóxido, inhibiéndose la reacción de autooxidación, lo que implica menor formación de purpurogalina. La formación de purpurogalina es susceptible de ser medida espectrofotométricamente en el tiempo, con lo que se puede aprovechar el fenómeno para cuantificar la actividad SOD de una muestra problema midiendo la inhibición de la autooxidación del pirogalol respecto de un control.

Se realizaron los ensayos con las siguientes condiciones: buffer tris-cacodílico pH 8.2, 0.3 mM de pirogalol y 37°C de temperatura. En todos los ensayos, para un volumen total de reacción de 1.0 ml, se utilizaron 100 µl de muestra, sustituida en el blanco y en el control por 100 µl del buffer de homogenización. El grado de inhibición de la

autooxidación del pirogallol permitió evaluar la cantidad de enzima presente en la muestra.

La actividad específica de SOD se expresó en unidades/mg proteína.

4.2. Catalasa (CAT)

La determinación de la actividad CAT se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Claiborne (1985) cuyo fundamento se basa en la capacidad que tiene la enzima CAT de transformar el H_2O_2 en H_2O y O_2 , fenómeno que es susceptible de ser medido espectrofotométricamente en el tiempo, a 240 nm.

Se realizaron los ensayos con las siguientes condiciones: buffer fosfato potásico (10 mM KH_2PO_4 – 10 mM K_2HPO_4) pH 7.0, 5 mM H_2O_2 y 100 μl de muestra, sustituida en el blanco y en el control por 100 μl del buffer de homogenización. La reacción se inició mediante la adición de H_2O_2 y los cambios de absorbancia se midieron a 240 nm en cubetas de cuarzo.

La actividad específica de la enzima se expresa en nmoles/min/mg proteína utilizando como coeficiente de extinción molar para el H_2O_2 de $42.6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

4.3. Glutación peroxidasa 4 (GPx4)

La determinación de la actividad glutación peroxidasa 4 se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Scheerer (Scheerer *et al.*, 2007). Para ello se utilizó tert-butyl hidroperóxido, el cual es reducido por acción de la GPx4 en presencia de glutación reducido (GSH). Esta reacción se acopla a la reducción del glutación oxidado (GSSG), obtenido en la reacción anterior, por la glutación reductasa (GR), la cual utiliza el NADPH como poder reductor para reciclar la GSH.

Para llevar a cabo la determinación de la actividad GPx4, la mezcla de reacción contuvo: buffer de reacción (0.1 M Tris HCl, 5 mM EDTA y 0.1% Tritón, pH 7.4) glutación reducido (2 mM GSH), glutación reductasa (1 U/ml GR), nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (0.24 mM NADPH), tert-butyl hidroperóxido (25 μM) y 100 μl de muestra, sustituida por buffer de homogenización en la cubeta correspondiente al blanco y al control. Una vez se añadió la cantidad de muestra en los ensayos pertinentes y antes de añadir tert-butyl hidroperóxido, la mezcla de reacción se sometió a un periodo de incubación dentro del espectrofotómetro durante 5 minutos a 37°C. Posteriormente, tras añadir el tert-butyl-hidroperóxido, se llevó a cabo la determinación de la cinética de este proceso midiendo la oxidación del NADPH durante

5 min a 340 nm. En los cálculos de la actividad enzimática se usó un coeficiente de extinción molar de $6.22 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y se expresó como mol NADPH oxidado/min/mg proteína.

5. Determinación de la concentración de proteína total

Para normalizar las actividades enzimáticas a miligramo de proteína, el contenido en proteína de las muestras fue determinado por el método de Bradford (Bradford, 1976) usando albúmina de suero bovino como proteína estándar para la recta patrón. Las lecturas se realizaron a 595 nm en una placa de 96 pocillos en un lector de multiplacas AppliSkan (Thermo).

6. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el software estadístico IBM Statistical Package for Social Science (SPSS) versión 21. La normalidad de los resultados se verificó utilizando la prueba de Kolmogorov-Smirnov, mientras que la prueba de Levene se utilizó para verificar la homogeneidad de las varianzas y la prueba de ANOVA de una vía para determinar la igualdad entre las varianzas. Los datos se analizaron utilizando la prueba no paramétrica de U de Mann-Whitney y t-student en función de la normalidad y homocedasticidad de los datos. El valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

Resultados

Resultados

En el presente trabajo se estudiaron las actividades enzimáticas de las proteínas que componen dos de los sistemas antioxidantes principales de la célula: el sistema clásico, integrado por la superóxido dismutasa y la catalasa (CAT) y el sistema del glutatión, del cual solo se determinó la GPx4. Dentro de cada área cerebral se realizaron comparaciones entre ratones sin tratamiento de 6 y 14 meses para evaluar el efecto del envejecimiento y posteriormente se evaluó la actividad enzimática de las tres regiones en ratones de 6 y 14 meses de edad con y sin tratamiento MPTP (control), con el objetivo de detectar variaciones en la actividad enzimáticas debidas al envejecimiento y por la influencia de la neurotoxina MPTP.

1. Efecto del envejecimiento

Para llevar a cabo la evaluación del efecto del envejecimiento, se evaluó la actividad de las tres enzimas antioxidantes (SOD, CAT y GPx4) en las tres regiones de estudio para animales de 6 y 14 meses control.

1.1. Enzima superóxido dismutasa (SOD)

Para evaluar la actividad de la SOD ligada al envejecimiento se comparó la actividad de esta enzima para las tres regiones en ratones de 6 y 14 meses sin tratamiento (figura 4). Los valores obtenidos para la *septum-hipocampo* fueron de $1,365 \pm 0,095$ U/mg de proteína en ratones de 6 meses y $3,753 \pm 0,309$ U/mg de proteína en ratones de 14 meses; para *cerebelo* de $1,343 \pm 0,103$ U/mg de proteína en ratones de 6 meses y $1,844 \pm 0,101$ U/mg de proteína en ratones de 14 meses, y para *corteza anterior* de $1,084 \pm 0,060$ U/mg de proteína en 6 meses y $1,211 \pm 0,078$ U/mg de proteína en 14 meses, observándose un aumento de la actividad SOD estadísticamente significativo ($p < 0,05$) para las regiones de septum-hipocampo y cerebelo en ratones envejecidos.

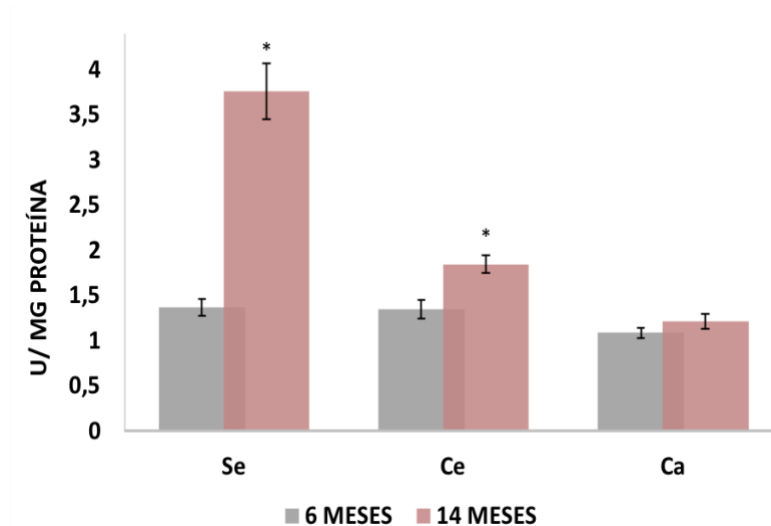


Figura 4. Media y desviación estándar de la actividad SOD (U/mg proteína) en septum-hipocampo (Se), cerebelo (Ce) y corteza anterior (Ca) en animales de 6 y 14 meses sin tratamiento (* $p < 0,05$).

1.2. Enzima catalasa (CAT)

En la evaluación de la actividad de la CAT ligada al envejecimiento los valores obtenidos para *septum-hipocampo* fueron de $27,486 \pm 1,936$ nmol/min/mg de proteína en ratones de 6 meses y $40,133 \pm 4,005$ nmol/min/mg de proteína en ratones de 14 meses; para *cerebelo* de $30,288 \pm 1,457$ nmol/min/mg de proteína en ratones de 6 meses y $32,504 \pm 0,685$ nmol/min/mg de proteína en ratones de 14 meses, y para *corteza anterior* de $29,454 \pm 1,497$ nmol/min/mg de proteína en 6 meses y $25,597 \pm 3,055$ nmol/min/mg de proteína en 14 meses. Se observó un aumento en la actividad de la CAT estadísticamente significativo ($p < 0,05$) para la región de septum-hipocampo.

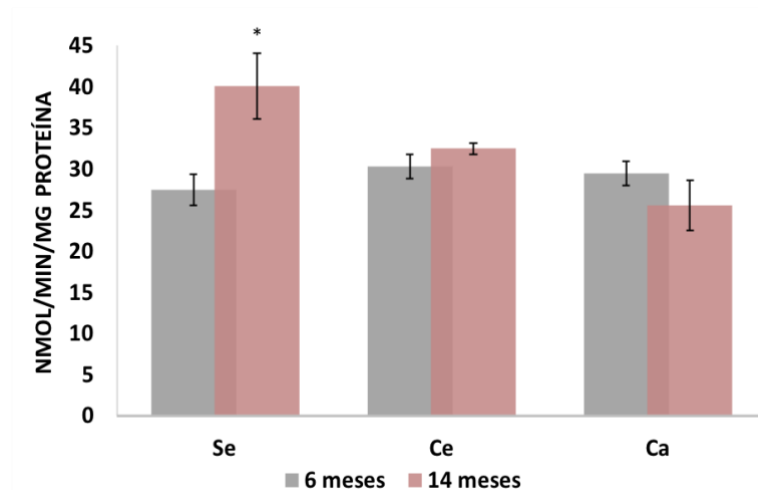


Figura 5. Media y desviación estándar de la actividad CAT (nmol/min/mg de proteína) medido en septum-hipocampo (Se), cerebelo (Ce) y corteza anterior (Ca) en animales de 6 y 14 meses sin tratamiento (* $p < 0,05$).

1.3 Enzima glutatión peroxidasa 4 (GPx4)

Para la evaluación de la actividad de la GPx4 ligada al envejecimiento los valores obtenidos para *septum-hipocampo* fueron de $1,278 \pm 0,044$ mol/min/mg de proteína en ratones de 6 meses y $1,365 \pm 0,088$ mol/min/mg de proteína en ratones de 14 meses; para *cerebelo* de $0,974 \pm 0,036$ mol/min/mg de proteína en ratones de 6 meses y $1,006 \pm 0,047$ mol/min/mg de proteína en ratones de 14 meses, y para *corteza anterior* de $0,968 \pm 0,064$ mol/min/mg de proteína en 6 meses y $1,110 \pm 0,147$ mol/min/mg de proteína en 14 meses. No se observaron cambios en la actividad de GPx4 estadísticamente significativos ($p < 0,05$) en ninguna de las regiones.

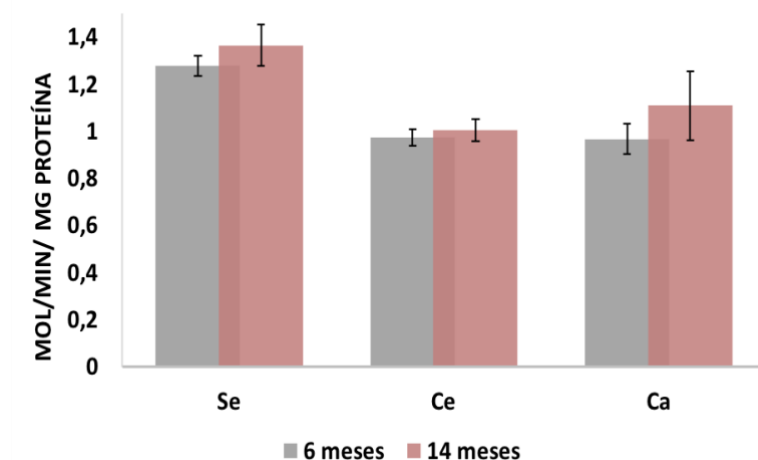


Figura 6. Media y desviación estándar de la actividad GPx4 (mol/min/mg de proteína) medido en septum-hipocampo (Se), cerebelo (Ce) y corteza anterior (Ca) en animales de 6 y 14 meses sin tratamiento.

2. Efecto del envejecimiento junto con la neurotoxina MPTP

Posteriormente, tras evaluar el efecto propio del envejecimiento en las diferentes áreas cerebrales, se evaluó el efecto del neurotóxico MPTP en la inducción de la actividad antioxidante.

2.1 Enzima superóxido dismutasa

Los valores obtenidos en el estudio del efecto del neurotóxico MPTP y del envejecimiento en la inducción de la actividad de superóxido dismutasa en ratones de 6 y 14 meses en las tres regiones cerebrales se recogen en la tabla 3.

SOD (U/mg de proteína)				
REGIÓN	Wild Type 6 meses	MPTP Type 6 meses	Wild Type 14 meses	MPTP Type 14 meses
Septum hipocampo	1,365 ± 0,095	1,178 ± 0,079	3,753 ± 0,309	1,335 ± 0,050*
Cerebelo	1,343 ± 0,103	1,383 ± 0,061	1,844 ± 0,101	1,257 ± 0,057*
Corteza anterior	1,084 ± 0,060	1,211 ± 0,060	1,211 ± 0,078	1,173 ± 0,105

Tabla 3. Valores de la actividad SOD en las diferentes regiones cerebrales de animales de 6 y 14 meses con y sin tratamiento (* $p < 0,05$).

En los valores de septum-hipocampo y de cerebelo de 14 meses se observó una disminución de la actividad de la SOD en los ratones tratados con MPTP. En el resto de áreas cerebrales y actividades antioxidantes no se apreciaron diferencias significativas.

2.2 Enzima catalasa

Los valores obtenidos en el estudio del efecto del neurotóxico MPTP en la inducción de la actividad de la CAT en ratones de 6 y 14 meses en las tres regiones cerebrales se recogen en la tabla 4.

CAT (nmol/min/mg de proteína)				
REGIÓN	Wild Type 6 meses	MPTP Type 6 meses	Wild Type 14 meses	MPTP Type 14 meses
Septum hipocampo	27,486 ± 1,936	36,430 ± 2,017*	40,133 ± 4,005	32,006 ± 0,915
Cerebelo	30,288 ± 1,457	30,630 ± 0,594	32,504 ± 0,685	30,729 ± 1,064
Corteza anterior	29,454 ± 1,497	34,277 ± 1,375	25,597 ± 3,055	26,624 ± 1,236

Tabla 4. Valores de la actividad CAT en las diferentes regiones cerebrales de animales de 6 y 14 meses con y sin tratamiento. (* $p < 0,05$).

En los valores de septum-hipocampo de 6 meses se observaron diferencias entre los grupos con un aumento de la actividad de CAT en los ratones tratados con MPTP. En el resto de casos no se apreciaron diferencias significativas en la actividad de la enzima para ninguna de las regiones.

2.3. Enzima glutatión peroxidasa 4 (GPx4)

Los valores obtenidos en el estudio del efecto del neurotóxico MPTP y del envejecimiento en la actividad de la GPx4 en ratones de 6 y 14 meses de edad se recogen en la tabla 5.

GPx4 (mol/min/mg de proteína)				
REGIÓN	Wild Type 6 meses	MPTP Type 6 meses	Wild Type 14 meses	MPTP Type 14 meses
Septum hipocampo	1,278 ± 0,044	1,198 ± 0,058	1,365 ± 0,088	1,277 ± 0,038
Cerebelo	0,974 ± 0,036	1,154 ± 0,057*	1,006 ± 0,047	1,049 ± 0,019
Corteza anterior	0,968 ± 0,064	1,087 ± 0,130	1,110 ± 0,147	1,142 ± 0,068

Tabla 5. Valores de la actividad GPx4 en las diferentes regiones cerebrales de animales de 6 y 14 meses con y sin tratamiento. (* $p < 0,05$).

En el cerebelo de los ratones de 6 meses se observa un incremento de la actividad de GPx4 estadísticamente significativo ($p < 0,05$) en los ratones tratados con MPTP respecto a los ratones no tratados.

Discusión

Discusión

El equilibrio del sistema oxidativo-antioxidante en enfermedades neurodegenerativas ha sido objeto de intensos estudios experimentales y clínicos realizados en los últimos años. Las abundantes evidencias sugieren que el envejecimiento celular y la neurodegeneración progresiva están estrechamente relacionados con el estrés oxidativo (Finkel y Holbrook, 2000). Aunque la causa definitiva de la pérdida de neuronas de la dopamina nigral sigue siendo desconocida, el estrés oxidativo es el mayor factor de riesgo para la EP.

En nuestro trabajo se ha evaluado la actividad enzimática de tres enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx4) en tres áreas cerebrales las cuales se han descrito previamente como regiones vulnerables a la afección del EP: el cerebelo (Wu & Hallett, 2013), la corteza anterior (Marin et al., 2017) y el septum-hipocampo (Surmeier et al., 2017). En este sentido, el *septum* es una estructura importante relacionada con la EP, ya que tiene proyecciones hacia los ganglios basales y el hipocampo, teniendo por tanto funciones motoras y cognitivas a corto y a largo plazo. Por otra parte, el *cerebelo* junto con los ganglios basales se consideran una estructura subcortical con funciones tanto motoras como no motoras y cognitivas (Strick et al., 2009). De hecho, el cerebelo recibe proyecciones dopaminérgicas del SNpc (Melchitzky et al., 2000). Además, se ha descubierto una degeneración dopaminérgica en el cerebelo de pacientes con EP y en modelos animales (Rolland et al., 2007).

El aumento significativo en la actividad SOD y CAT observado en individuos controles envejecidos puede deberse probablemente a la necesidad de hacer frente al incremento de especies reactivas asociadas al envejecimiento. En este sentido, algunas investigaciones indican que la sobreexpresión de SOD puede proteger eficientemente contra la pérdida de neuronas dopaminérgicas (Iglesias-González et al., 2012).

Los datos observados, muestran que en individuos jóvenes hay un aumento de la actividad de enzimas antioxidantes en las regiones de septum-hipocampo y cerebelo cuando se exponen a la neurotoxina MPTP. Este aumento puede deberse a la necesidad de combatir la producción de ERO producida por la acción del MPTP. Diferentes estudios han mostrado que el primer metabolito activo del MPTP, el 1-metil-4-fenilperidinio (MPP+), actúa en las mitocondrias bloqueando la respiración mitocondrial. Esto tiene dos efectos inmediatos: el bloqueo de la producción de ATP y, por consiguiente, una consecuente crisis energética; y un aumento de la producción de

especies reactivas del oxígeno (Williams y Ramsden, 2005). Además de ello, también se ha observado que la administración de MPTP contribuye a la activación de la microglia y de la enzima NADPH-oxidasa, las cuales contribuyen a un aumento de la producción de ERO (Pong et al., 2000; Przedborski et al., 2001; Tieu et al., 2003).

Por otro lado, un hecho interesante fue la reducción de la actividad antioxidante en septum-hipocampo y cerebelo de ratones envejecidos y tratados con MPTP, ya que cabría esperar un aumento ligado al envejecimiento y al daño producido por la propia neurotoxina MPTP. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que la dopamina quinona, un producto de la oxidación que lleva a la producción de ERO, puede llevar a cabo una reducción de la expresión de enzimas antioxidantes (Hauser et al., 2013). Estos datos concuerdan con los obtenidos previamente en nuestro laboratorio al estudiar el patrón de expresión génica de los sistemas antioxidantes en animales envejecidos y tratados con MPTP, donde se observó una disminución de la expresión génica de los genes codificantes para las enzimas antioxidantes de nuestro estudio (González-Martín, 2017). Por otra parte, algunos estudios han demostrado que independientemente de cómo se inicie el proceso de formación de radicales libres, estos pueden propagarse indefinidamente en presencia de oxígeno hasta alcanzar una alta concentración haciendo que reaccionen el uno con el otro y producir una especie no radical, lo que explicaría una disminución de la expresión génica de los sistemas antioxidantes y por ende de la actividad de las enzimas antioxidantes (Gutteridge y Halliwell, 2000).

Conclusiones

Conclusiones:

1. El efecto del envejecimiento parece incrementar la actividad del sistema clásico antioxidante (SOD y CAT) en las regiones del cerebro de septum-hipocampo y cerebelo.
2. El efecto de MPTP en individuos jóvenes incrementa las actividades de las enzimas CAT y GPx4 en septum-hipocampo y cerebelo, respectivamente.
3. El efecto del MPTP en individuos envejecidos disminuye la actividad SOD en septum-hipocampo y cerebelo.
4. A nivel de actividad enzimática, las regiones más afectadas por el envejecimiento y por el tratamiento con la neurotoxina MPTP son el septum-hipocampo y el cerebelo, mientras que la corteza anterior no se ve afectada.

Conclusions:

1. Aging *per se* in the septum-hippocampus and cerebellum regions of untreated animals increases classical antioxidant system (SOD and CAT) activity.
2. MPTP effect in young individuals increase the activities of the enzymes CAT and GPx4 in septum-hippocampus and cerebellum, respectively.
3. MPTP effects in aging individuals decreases SOD activity in septum-hippocampus and cerebellum.
4. At the level of enzyme activity, the most affected region by aging and treatment with the neurotoxin MPTP are septum-hippocampus and cerebellum while the anterior cortex is not affected.

Agradecimientos

Agradecimientos

Quisiera expresar mi agradecimiento al Dr. Mario Díaz González por permitirme trabajar en su laboratorio con la ayuda de su equipo. También al Dr. Antonio Lorenzo Hernández por aceptar la propuesta de ser mi tutor, así como dedicar su tiempo en la supervisión de este trabajo.

A Fátima Mesa por la preocupación, dedicación, entrega y tiempo invertido en mi. Por escuchar cada una de mis dudas, teniendo siempre una respuesta para ellas. Por el apoyo.

A David Quinto muchas gracias por la confianza, así como por la orientación, compañía y ayuda brindada en cada momento que lo necesité, sobre todo en la etapa inicial de laboratorio.

A mi familia, por empujarme en cada tramo. En especial a mis padres, quienes pensando que no tenían mucho para darme me regalaron un sueño, un camino y un ejemplo en la vida. A David, mi hermano, mi incondicional compañero de equipo. A Loyi. A ti Adrián, y a mis tres B.

Bibliografía

Bibliografía

- **Barnham K.J., Masters C.L. y Bush A.I.** 2004. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat. Rev. Drug Discov.* **3**(3): 205-214. DOI: 10.1038 / nrd1330.
- **Claiborne A.** 1985. Catalase activity, p. 283-284. *En: Greenwald R.A., CRC Handbook of methods for oxygen radical research.* Boca Raton, Florida.
- **Djordjević V.B.** 2004. Free radicals in cell biology. *Int. Rev. Cytol.* **237**: 57-89. DOI: 10.1016/S0074-7696(04)37002-6.
- **Dorsey E.R., Constantinescu R., Thompson J.P., Biglan K.M., Holloway R.G. et al.** 2007. Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. *Neurology.* **68**(5): 384-386. DOI: 10.1212/01.wnl.0000247740.47667.03.
- **Dunning C., Reyes J.F., Steiner J.A. y Brundin P.** 2012. Can Parkinson's disease pathology be propagated from one neuron to another? *Prog. Neurobiol.* **97**: 205-219. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2011.11.003.
- **Finkel T. y Holbrook N.J.** 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature.* **408**(6809): 239-247. DOI: 10.1038/35041687.
- **Gaki G.S y Papavassiliou A.G.** 2014. Oxidative stress-induced signaling pathways implicated in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neuromolecular Med.* **16**(2): 217-230. DOI: 10.1007/s12017-014-8294-x.
- **Gallegos S., Pacheco C., Peters C., Opazo C.M., y Aguayo L.G.** 2015. Features of alpha-synuclein that could explain the progression and irreversibility of Parkinson's disease. *Front. Neurosci.* **9**: 9-59. DOI: 10.3389/fnins.2015.00059.
- **Gammon K.** 2014. Neurodegenerative disease: brain windfall. *Nature.* **515** (7526): 299-300.
- **González-Martín M.J.** 2017. Análisis de la expresión de los principales genes antioxidantes en diferentes regiones cerebrales en un modelo de ratón de la enfermedad de Parkinson (Trabajo de Fin de Grado). Universidad de La Laguna, Tenerife, España.
- **Gutteridge J.M. y Halliwell B.** 2000. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann. N Y Acad. Sci.* **899**(1): 136-147. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb06182.x.
- **Halliwell B.** 2012. Free radicals and antioxidants: Updating a personal view. *Nutr. Rev.* **70**(5): 257-265. DOI: 10.1111/j.1753-4887.2012.00476.x.
- **Hauser D.N., Dukes A.A., Mortimer A.D. y Hastings T.G.** 2013. Dopamine quinone modifies and decreases the abundance of the mitochondrial selenoprotein

glutathione peroxidase 4. *Free Radic. Biol. Med.* **65**: 419-427. DOI: 10.1016 / j.freeradbiomed.2013.06.030.

- **Iglesias-González J., Sánchez-Iglesias S., Méndez-Álvarez E., Rose S, Hikima A. et al.** 2012. Differential toxicity of 6-hydroxydopamine in SH-SY5Y human neuroblastoma cells and rat brain mitochondria: Protective role of catalase and superoxide dismutase. *Neurochem. Res.* **37**(10): 2150-2160. DOI: 10.1007 / s11064-012-0838-6.
- **Jin H., Kanthasamy A., Ghosh A., Anantharam V., Kalyanaraman B. et al.** 2014. Mitochondria-targeted antioxidants for treatment of Parkinson's disease: Preclinical and clinical outcomes. *Biochim. Biophys. Acta.* **1842**(8): 1282-1294. DOI: 10.1016/j.bbadis.2013.09.007.
- **Kalia L.V. y Lang A.E.** 2015. Parkinson's disease. *Lancet.* **386**: 896–912. DOI: 10.1016/S0140-6736(14)61393-3.
- **Kidd P.M.** 2000. Parkinson's disease as multifactorial oxidative neurodegeneration: Implications for integrative management. *Altern. Med. Rev.* **5**(6): 502-529.
- **Kovacs G.G.** 2016. Molecular pathological classification of neurodegenerative diseases: turning towards precision medicine. *Int. J. Mol. Sci.* **17**(2): 189. DOI: 10.3390/ijms17020189.
- **Lustgarten M., Muller F.L., Van Remmen H.** 2011. An objective appraisal of the free radical theory of aging, p. 177-202. *En: Masoro E.J. y Austad S.N., Handbook of the Biology of Aging* (Seventh Edition). Elsevier Inc. DOI: 10.1016/B978-0-12-378638-8.00008-7.
- **Marin R., Fabelo N., Martín V., Garcia-Esparcia P., Ferrer I., et al.** 2017. Anomalies occurring in lipid profiles and protein distribution in frontal cortex lipid rafts in dementia with Lewy bodies disclose neurochemical traits partially shared by Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Neurobiol. Aging.* **49**: 52-59. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2016.08.027.
- **Marklund S. y Marklund G.** 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* **47**(3): 469-474.
- **Martínez-Fernández R., Gasca-Salas C., Sánchez-Ferro A. y Obeso J.A.** 2016. Actualización en la enfermedad de Parkinson. *Rev. Med. Clin. Las Condes.* **27**(3): 363-379. DOI: 10.1016/j.rmclc.2016.06.010.
- **Melchitzky D.S. y Lewis D.A.** 2000. Tyrosine hydroxylase- and dopamine transporter-immunoreactivity axons in the primate cerebellum. Evidence for a lobular-and laminar-specific dopamine innervation. *Neuropsychopharmacology.* **22**(5): 466-472. DOI: 10.1016/S0893-133X(99)00139-6.
- **Meredith G.E y Rademacher D.J.** 2011. MPTP mouse models of Parkinson's disease: An update. *J.cParkinsons Dis.* **1**(1): 19-33. DOI: 10.3233/JPD-2011-11023.

- **Messner D. J., Murray K. F., y Kowdley K. V.** 2012. Mechanisms of Hepatocyte Detoxification, p.1507–1527. *En: Said H., Physiology of the Gastrointestinal Tract*. DOI: 10.1016/B978-0-12-382026-6.00055-5.
- **Obeso J. A., Rodriguez-Oroz M. C., Goetz C. G., Marin C., Kordower J. H., et al.** 2010. Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle. *Nature Medicine*. **16**: 653–661. DOI: 10.1038/nm.2165.
- **Pong, K., Doctrow, S. R., and Baudry, M.** 2000. Prevention of 1-methyl-4-phenylpyridinium- and 6-hydroxydopamine-induced nitration of tyrosine hydroxylase and neurotoxicity by EUK-134, a superoxide dismutase and catalase mimetic, in cultured dopaminergic neurons. *Brain Res*. **881**(2): 182-189.
- **Pringsheim T., Jette N., Frolkis A. y Steeves T.D.L.** 2014. The prevalence of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. *Mov. Disord*. **29**(13): 1583–1590. DOI: 10.1002/mds.25945.
- **Przedborski S. y Vila M.** 2003. The 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine Mouse Model: a tool to explore the pathogenesis of Parkinson's disease. *Ann. N Y Acad. Sci*. **991**: 189-198.
- **Przedborski S., Jackson-Lewis V., Naini A.B., Jakowec M., Petzinger G. et al.** 2001. The parkinsonian toxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): a technical review of its utility and safety. *J. Neurochem*. **76**(5): 1265-1274.
- **Rodriguez M., Morales I., Rodriguez-Sabate C., Sanchez A., Castro R., et al.** 2014. The degeneration and replacement of dopamine cells in Parkinson's disease: the role of aging. *Front. Neuroanat*. **8**: 80. DOI: 10.3389/fnana.2014.00080.
- **Rodriguez-Oroz M. C., Jahanshahi M., Krack P., Litvan I., Macias R. et al.** 2009. Initial clinical manifestations of Parkinson's disease: features and pathophysiological mechanisms. *Lancet Neurol*. **8**(12): 1128–1139. DOI: 10.1016/S1474-4422(09)70293-5.
- **Rolland A.S., Herrero M.T., Garcia-Martínez V., Ruberg M., Hirsch E.C., et al.** 2007. Metabolic activity of cerebellar and basal ganglia-thalamic neurons is reduced in parkinsonism. *Brain*. **130**: 265-275. DOI: 10.1093/brain/awl337.
- **Romuk, E.B., Szczurek, W., Oleś, M., Gabrysiak, A., Skowron, M. et al.** 2017. The evaluation of the changes in enzymatic antioxidant reserves and lipid peroxidation in chosen parts of the brain in an animal model of Parkinson disease. *Adv. Clin. Exp. Med*. **26**(6): 953–959. DOI: 10.17219/acem/63999.
- **Sánchez-Valle V. y Méndez-Sánchez N.** 2013. Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedad. *Rev. Invest. Med. Sur Mex*. **20**(3): 161-168.
- **Santiago D. y Rivas S.** 2008. Estrés oxidativo metabolitos oxidados de dopamina y enfermedad de Parkinson. *Rev. Fac. Med. UNAM*. **51**(3): 104-107.

- **Schapira A.H, Jenner P.** 2011. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Mov. Disord.* **26**(6):1049-55. DOI: 10.1002/mds.23732.
- **Siderowf A. y Lang A.E.** 2012. Premotor Parkinson's disease: concepts and definitions. *Mov. Disord.* **27**(5): 608–616. DOI: 10.1002/mds.24954.
- **Strick P.L., Dum R.P. y Fiez J.A.** 2009. Cerebellum and nonmotor function. *Annu. Rev. Neurosci.* **32**: 413-434. DOI: -10.1146/annurev.neuro.31.060407.125606.
- **Surmeier D.J., Obeso J.A. y Halliday G.M.** 2017. Selective neuronal vulnerability in Parkinson disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **18**(2): 101-113. DOI: 10.1038 / nrn.2016.178.
- **Tabet F. y Touyz R.M.** 2007. Pathogenesis: renal and neurohumoral mechanisms: Reactive Oxygen Species, Oxidative Stress, and Vascular Biology in Hypertension, p. 337-347. *En: Lip, G. y Hall J., Comprehensive Hypertension.* Elsevier Inc. DOI: 10.1016/B978-0-323-03961-1.50033-7.
- **Tieu K., Ischiropoulos H., y Przedborski S.** 2003. Nitric oxide and reactive oxygen species in Parkinson's disease. *IUBMB Life.* **55**(6): 329-335. DOI: 10.1080 / 1521654032000114320.
- **Van Den Eeden S.K., Tanner C.M., Bernstein A.L., Fross R.D., Leimpeter A. et al.** 2003. Incidence of Parkinson's disease: variation by age, gender, and race/ethnicity. *Am. J. Epidemiol.* **157**(11): 1015-22.
- **Williams A.C. y Ramsden D.B.** 2005. Autotoxicity, methylation and a road to the prevention of Parkinson's disease. *J. Clin. Neurosci.* **12**(1): 6-11. DOI: 10.1016/j.jocn.2004.10.002.
- **Wu T. y Hallet M.** 2013. The cerebellum in Parkinson's disease. *Brain.* **136**: 669-709. DOI: 10.1093 / brain / aws360.
- **Yan M.H., Wang X. y Zhu X.** 2013. Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease. *Free Radic. Biol. Med.* **62**: 90–101. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.11.014.
- **Yuan H., Zheng J.C., Liu P., Zhang S.F., Xu J.Y. et al.** 2007. Pathogenesis of Parkinson's disease: oxidative stress, environmental impact factors and inflammatory processes. *Neurosci. Bull.* **23**(2): 125-130. DOI: 10.1007 / s12264-007-0018-x.