



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina

EFFECTO DEL ESTADO DEL ESTRÉS  
OXIDATIVO SOBRE LA PLASTICIDAD  
SINÁPTICA DE LA VÍA NIGRO  
ESTRIATAL

## TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
(EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

César Ricardo Gallegos Ríos

Tutora Principal: Dra. Selva Lucia Rivas Arancibia

Comité Tutoral: Dra. María De La Luz Navarro Angulo  
Dra. Gina Lorena Quirarte



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
**Director General de Administración Escolar, UNAM**  
**Presente**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 13 de junio de 2011, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del alumno **GALLEGOS RIOS CESAR RICARDO** con número de cuenta **510007874** con la tesis titulada **"EFECTO DEL ESTADO DEL ESTRÉS OXIDATIVO SOBRE LA PLASTICIDAD SINÁPTICA DE LA VÍA NIGROESTRIATAL"**, realizada bajo la dirección de la :  
**DRA. SELVA LUCIA RIVAS ARANCIBIA.**

Presidente:	DR.	LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
Vocal:	DRA.	LUZ MARÍA NAVARRO ANGULO
Secretario:	DRA.	YOLANDA LÓPEZ VIDAL
Suplente:	DR.	CAMILO RIOS CASTAÑEDA
Suplente:	DRA.	GINA LORENA QUIRARTE

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**  
Cd. Universitaria, D.F., a 14 de septiembre de 2011

*María del Coro Arizmendi*  
**Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga**  
**Coordinadora del Programa**

## **AGRADECIMIENTOS**

Al programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por la oportunidad de realizar estudios de excelencia

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca con número de registro 240107 otorgada para la realización de estos estudios de posgrado.

Al Programa de Apoyo a Estudiantes de Posgrado por su apoyo para la asistencia a congresos internacionales.

Agradezco especialmente a la Dra. Selva Lucia Rivas Arancibia por la confianza otorgada y por todo el apoyo académico recibido, no solo en la realización de este trabajo sino en mi formación como persona. Pero sobre todo por su amistad y cariño incondicional.

También agradezco a la Dra. Ma. De la Luz Navarro Angulo y a la Dra. Gina Lorena Quirarte, miembros del Comité Tutoral, por sus valiosos e indispensables comentarios durante la elaboración de esta tesis.

A la Dra. Ana Erika Rodríguez Martínez porque sin ella esta aventura no hubiera sido realidad y no tendría sentido. ¡Mil gracias por todo!

A la Dra. Nancy Gómez por ser un ejemplo a seguir y por sus múltiples consejos.

A mis compañeros de laboratorio por su ayuda y por todo el apoyo en los momentos en que más lo necesite. Gracias Fanny, Dona, Pame y Oscar.

Al Biol. Alfredo Miranda por sus conocimientos, su ayuda y su tiempo.

A Jennifer porque siempre has sido parte de este sueño.

*A mis papas, los culpables de todo.*

*A mi familia por siempre estar a mi lado.*

## Lista de abreviaturas

**4HNE:** 4-hidroxi-2,3-trans-nonenal  
**AA:** Ácido araquidónico  
**AH2:** Ácido ascórbico  
**ATP:** Adenosin trifosfato  
**CNS:** Sistema nervioso central  
**COMT:** Catecol-o-metiltransferasa  
**D1:** Receptor a dopamina tipo 1  
**D2:** Receptor a dopamina tipo 2  
**DA:** Dopamina  
**DNA:** Ácido desoxirribonucleico  
**DPS:** Densidad Postsináptica  
**EP:** Enfermedad de Parkinson  
**GB:** Ganglios basales  
**GPe:** Globo pálido externo  
**GPi:** Globo pálido interno  
**GPx:** Glutación peroxidasa  
**GSH:** Glutación  
**L-DOPA:** L-3,4-dihidroxifenilalanina  
**LOPs:** Radicales lipídicos generados durante la ozonación  
**MAO:** Monoamino-oxidasa  
**MDA:** Malondialdehído  
**MUFA:** Ácidos grasos monoinsaturados  
**NADPH:** Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato  
**NE:** Norepinefrina  
**NFκB:** Factor nuclear kappa B  
**NMDAr:** Receptor a glutamato tipo NMDA  
**NO:** Óxido nítrico  
**NOS:** Óxido nítrico sintasa  
**PGH:** Prostaglandina  
**PUFA:** Ácido graso poliinsaturado  
**RNS:** Especies reactivas de nitrógeno  
**ROS:** Especies reactivas de oxígeno  
**SN:** *Substantia nigra*  
**SNc:** *Substantia nigra pars compacta*  
**SNr:** *Substantia nigra pars reticulata*  
**SOD:** Superóxido dismutasa  
**Sph:** Espinofilina  
**STN:** Núcleo subtalámico  
**STR:** Cuerpo estriado  
**Syp:** Sinaptofisina

# ÍNDICE

Resumen	pag 3
Abstract	pag 4
1. Introducción	pag 5
2. Radicales libres	pag 7
2.1 Números cuánticos	pag 8
3. Especies Reactivas de Oxígeno	pag 10
3.1 Superóxido	pag 11
3.2 Peróxido de hidrógeno	pag 12
3.3 Radical hidroxilo	pag 13
3.4 El papel fisiológico de las ROS	pag 14
4. Enfermedades neurodegenerativas	pag 16
4.1 Enfermedad de Parkinson	pag 17
5. Antioxidantes	pag 18
6. Señalización redox	pag 18
6.1 Pérdida del balance redox	pag 19
7. Ozono	pag 21
7.1 El ozono como modelo de estrés oxidativo	pag 23
8. Ganglios Basales	pag 24
8.1 Vías de entrada/salida	pag 26
8.2 Pérdida de función en los circuitos específicos de los ganglios basales	pag 28
8.3 Vía nigroestriatal	pag 28
9. Sistema dopaminérgico	pag 29
9.1 La dopamina como fuente de ROS en el SNC	pag 30
9.2 La autooxidación de la dopamina	pag 31
10. Teoría redox	pag 32
11. Hipótesis	pag 34



12. Objetivo	pag 35
13. Metodología	pag 36
13.1 Procedimiento general	pag 36
13.2 Determinación de proteínas oxidadas	pag 36
13.3 Inmunohistoquímica	pag 37
13.4 Western Blot	pag 38
13.5 Análisis de los datos	pag 38
14. Resultados	pag 40
14.1 Proteínas oxidadas en la <i>substantia nigra</i>	pag 40
14.2 Proteínas oxidadas en el estriado	pag 41
14.3 Tirosina hidroxilasa en la <i>substantia nigra</i>	pag 42
14.4 Tirosina hidroxilasa en el estriado	pag 44
14.5 Sinaptofisina en la <i>substantia nigra</i>	pag 46
14.6 Sinaptofisina en el estriado	pag 48
14.7 DARPP32 en la <i>substantia nigra</i>	pag 50
14.8 DARPP32 en el estriado	pag 52
14.9 Espinofilina	pag 54
15. Discusión	pag 55
16. Conclusiones	pag 63
17. Bibliografía	pag 64

## RESUMEN

El sistema nervioso central (CNS) es especialmente sensible a los pro-oxidantes debido a su alto contenido de lípidos, su elevado consumo de oxígeno y bajos niveles de enzimas antioxidantes. La *substantia nigra* y el estriado son particularmente vulnerables al estrés oxidativo debido a que el metabolismo normal de la dopamina involucra muchas reacciones oxidativas. En un estado de balance redox, la oxidación de la dopamina no altera el metabolismo normal, sin embargo, la pérdida de este balance causa su oxidación y se produce una cadena de eventos en los cuales, en su vía de síntesis y de metabolismo, en presencia de metales de transición, generan superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo. Se incrementa entonces aún más, el estado de estrés oxidativo, haciendo a la vía nigroestriatal mucho más vulnerable al daño en comparación con otras estructuras cerebrales.

Cuando el ozono es inhalado, produce especies reactivas de oxígeno (ROS) que, dependiendo de la dosis, puede sobrepasar el sistema de defensas antioxidantes en el pulmón. Entonces las ROS pueden alcanzar el sistema nervioso central a través del torrente sanguíneo, produciendo un estado de estrés oxidativo.

El objetivo de este trabajo fue estudiar las alteraciones causadas por el efecto del estrés oxidativo, producido por bajas dosis crónicas de ozono, sobre las sinapsis de la vía nigroestriatal.

Para este fin se utilizaron ratas macho de la cepa wistar las cuales fueron expuestas a 0.25 ppm de ozono durante 4 horas diarias por 7, 15, 30 y 60 días. Una vez finalizado el experimento las ratas fueron procesadas para realizar técnicas de inmunohistoquímica y western blot tanto en la *substantia nigra* como en el estriado. Se analizaron proteínas características de la vía nigroestriatal (tirosina hidroxilasa), de las presinapsis (sinaptofisina), de las postsinapsis (espinofilina) y para poder observar la fosforilación generalizada de receptores a dopamina (DARPP32). Asimismo se realizó la medición de proteínas oxidadas para analizar los niveles de estrés oxidativo.

Nuestros resultados muestran que, el efecto del estrés oxidativo crónico altera la plasticidad sináptica de la vía nigroestriatal ya que, dependiendo del tiempo de exposición a ozono, se produce una eliminación de sinapsis y se activan mecanismos compensatorios que inducen el crecimiento de nuevas conexiones en las neuronas dopaminérgicas que sobreviven al daño oxidativo.

## ABSTRACT

The central nervous system (CNS) is especially sensitive to the pro-oxidant due to its high lipid content, its high oxygen consumption and low levels of antioxidant enzymes. The *substantia nigra* and the striatum are particularly vulnerable to oxidative stress because the normal metabolism of dopamine involves many oxidative reactions. In a state of redox balance, the oxidation of dopamine does not alter the normal metabolism, however, the loss of this balance causes oxidation and produces a chain of events which, in their route of synthesis and metabolism in presence of transition metals, generating superoxide, hydrogen peroxide and hydroxyl radical. It then increased further, the state of oxidative stress, making the route much more vulnerable to nigrostriatal damage compared to other brain structures.

When ozone is inhaled, it produces reactive oxygen species (ROS) which, depending on the dose, can exceed the antioxidant defense system in the lung. ROS can then reach the central nervous system through the bloodstream, producing a state of oxidative stress.

The aim of this work was to study the alterations caused by the effect of oxidative stress, produced by low chronic doses of ozone on the nigrostriatal pathway synapses. For this purpose we used male rats of the Wistar strain which were exposed to 0.25 ppm ozone for 4 hours a day for 7, 15, 30 and 60 days. After the experiment the rats were processed for immunohistochemistry and Western blot in both the substantia nigra and the striatum. Proteins were analyzed characteristics of the nigrostriatal pathway (tyrosine hydroxylase), the presynapsis (synaptophysin), the postsynapsis (sphinophilin) and to observe the widespread phosphorylation of receptors to dopamine (DARPP32). It also performed the measurement of oxidized proteins to analyze the levels of oxidative stress.

Our results show that the effect of chronic oxidative stress alters synaptic plasticity nigrostriatal pathway because, depending on time of exposure to ozone, there is an elimination of synapses and activate compensatory mechanisms that induce the growth of new connections in the surviving dopaminergic neurons to oxidative damage.

# 1. INTRODUCCIÓN

El cerebro es un órgano extremadamente plástico, de ahí su increíble capacidad de aprendizaje y memoria. Esta neuroplasticidad, o plasticidad sináptica, permite a las células del sistema nervioso modificarse estructural y funcionalmente después de estar sujetas a influencias ambientales o del desarrollo (Kass y Jain, 2000). Es un proceso continuo que se produce debido a la actividad, daño neuronal, muerte y génesis, el cual involucra la modulación estructural y procesos funcionales de axones, dendritas y sinapsis (Brael-Jungerman et al., 2011).

Las sinapsis que se forman entre las neuronas están altamente organizadas, son estructuras específicas que aseguran interacciones rápidas y altamente selectivas entre las células. La transmisión sináptica involucra la liberación de neurotransmisores desde las neuronas presinápticas y su detección por un receptor específico en la superficie membranal de la neurona postsináptica. Los análisis proteómicos muestran que para la formación y funcionamiento de las sinapsis, están involucradas cerca de 2000 proteínas en los cerebros de mamíferos. Estas proteínas existen como parte de un complejo proteico altamente organizado conocido como densidad postsináptica (DPS) (Brezhestovskii, 2010).

Por otro lado, en un organismo en homeostasis redox existe un balance entre las moléculas antioxidantes y las pro-oxidantes. La pérdida del control oxidativo en el organismo, ya sea por un exceso de pro-oxidantes o por un déficit en las defensas antioxidantes, se caracteriza por altos niveles de especies reactivas, las cuales incluyen a los radicales libres, así como también a los compuestos que no lo son, pero que son productos secundarios del metabolismo de éstos, como el peróxido de hidrógeno y el peroxinitrito, que también producen daño celular.

Las especies reactivas producen oxidación de lípidos, proteínas y DNA en la célula. La oxidación de las moléculas que conforman la membrana celular, altera su

permeabilidad selectiva, lo que conduce a una pérdida de equilibrio osmótico. A esta pérdida de balance redox se le llama estado de estrés oxidativo.

El estrés oxidativo juega un papel importante en el proceso normal de envejecimiento así como en la fisiopatología de muchas enfermedades neurodegenerativas (Delanty y Dichter, 1998). En los últimos años se ha encontrado que el estrés oxidativo está relacionado con la muerte de neuronas dopaminérgicas en la enfermedad de Parkinson (Sevcsik et al., 2011).

Se sabe que el sistema nervioso central (CNS) es especialmente sensible al daño oxidativo debido a su alto contenido de lípidos, su elevado consumo de oxígeno y bajos niveles de enzimas antioxidantes como SOD, glutatión peroxidasa y casi ausencia de catalasa (Rivas-Arancibia et al., 2010; Santiago-López et al., 2010).

Las neuronas dopaminérgicas en la *substantia nigra* son las que se ven afectadas en la enfermedad de Parkinson. Participan en diferentes funciones como por ejemplo: procesos de memoria, de aprendizaje, control motor, etc. Con una pérdida de equilibrio redox, estas neuronas fácilmente sufren daño oxidativo y se empieza a producir una cadena de eventos, en los cuales la vía de síntesis y de metabolismo de la dopamina contribuyen a incrementar aún más el estado de estrés oxidativo, esto debido a su oxidación en presencia de metales de transición con la formación de superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo, haciendo a la vía nigroestriatal mucho más vulnerable al daño en comparación con otras estructuras cerebrales (Santiago-López et al., 2010).

Smythies (1999) formulo la hipótesis redox de aprendizaje y neurocomputación. Esta sugiere que, un importante mecanismo involucrado en la plasticidad cerebral puede ser el control redox del crecimiento y eliminación de las espinas dendríticas de las sinapsis, en donde las propiedades antioxidantes de las catecolaminas pueden estar interviniendo.

## 2. RADICALES LIBRES

Los radicales libres son moléculas que poseen un electrón desapareado, esta característica las vuelve inestables y por lo tanto altamente reactivas. (McCord, 2000; Hernández-Saavedra, 2007).

Un radical libre es una especie con capacidad de existir de forma independiente (de aquí el término libre) que contiene uno o más electrones desapareados (Halliwell, 2006 y 2007). Los radicales libres son altamente reactivos, pero a pesar de su reactividad química, ésta varía dentro de un gran espectro. Considerando esta amplia definición, podemos darnos cuenta de que existen muchos radicales libres en química y en biología.

El primer radical libre orgánico, identificado por Moses Gomberg en 1900, fue el radical trifenil metilo. Fueron descritos en sistemas vivos hace ya más de 50 años, en trabajos clásicos como el de Commoner y Townsed publicado en Nature (1954). Posteriormente, se propuso que los radicales libres de oxígeno (o especies reactivas de oxígeno), podían ser formados como productos de las reacciones enzimáticas del metabolismo celular. En ese momento se consideró que las especies reactivas de oxígeno (ROS) podían ser la causa directa de muchos males, entre ellos el cáncer y casi cualquier proceso neurodegenerativo (Harman, 1956). Hacia la década de los 60 y 70, los radicales libres se empezaron a considerar como elementos importantes para los sistemas biológicos. Entre otros hallazgos, se descubrió la enzima superóxido dismutasa (SOD) que convierte el radical libre superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) en peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (McCord y Fridovich, 1969), con este hallazgo se probó de forma convincente la importancia de los radicales libres en los sistemas biológicos.

El más simple de los radicales libre es el átomo de hidrógeno con un solo protón y un solo electrón, el cual por consecuencia está desapareado. Por lo tanto, la eliminación del átomo de hidrógeno de una molécula biológica nos deja un electrón

desapareado en el átomo al cual estaba unido originalmente el hidrógeno (Friedman, 2011).

La molécula diatómica del oxígeno  $O_2$  se considera como un radical debido a que tiene dos electrones desapareados, cada uno localizado en diferentes orbitales pero los dos con el mismo espín: esta es la razón por la cual el  $O_2$  por si mismo tiene relativamente baja reactividad en contraste con otros radicales altamente reactivos (Montero, 1999).

Los radicales pueden ser formados por la pérdida de un solo electrón a partir de un no radical o por la ganancia de un solo electrón por parte de un no radical. Un radical podría donar su electrón desapareado a otra molécula o también podría atrapar un electrón de otra molécula.

## **2.1 Números cuánticos**

En la estructura de los átomos y las moléculas, los electrones se asocian usualmente en pares, cada uno moviéndose en regiones definidas alrededor del núcleo. Este espacio se le conoce como orbital atómico.

Se requiere de tres números cuánticos para describir la distribución espacial de los electrones en los átomos. Con objeto de describir completamente a un electrón en un átomo, se debe especificar un cuarto número cuántico,  $m_s$ , llamado número cuántico del espín. Esto se debe a que cada electrón está asociado con un número magnético, el cual se encuentra cuantizado en una de dos posibles orientaciones: paralelo u opuesto a un campo magnético aplicado.

Los valores permitidos para el número cuántico del espín son  $\pm 1/2$ . Para un átomo con dos electrones, los espines pueden encontrarse ya sea paralelos ( $S=1$ ) u opuestos y, por tanto, se anulan ( $S=0$ ). En esta última situación se dice que los electrones están *apareados*. Los átomos que tienen todos sus electrones apareados

( $S=0$ ) son repelidos ligeramente cuando se sitúan en un campo magnético y se denominan *diamagnéticos*. Los átomos que tienen uno o más electrones no apareados ( $S\neq 0$ ) son atraídos fuertemente por un campo magnético y reciben el nombre de *paramagnéticos* (Huheey et al., 2003).

Los electrones que tienen el mismo espín se repelen fuertemente entre si y tienden a ocupar posiciones diferentes en el espacio. Esto es consecuencia de una ley fundamental de la naturaleza conocida como el *principio de exclusión de Pauli*. Brevemente, esto significa que si dos electrones tienen el mismo espín, deben presentar diferentes funciones de onda espaciales (por ejemplo, ocupar diferentes orbitales) y si se sitúan en el mismo orbital, deben tener espines apareados. El principio y las llamadas fuerzas repulsivas de Pauli son de suma importancia y pueden enunciarse como sigue: *En un átomo dado, no puede haber dos electrones cuyos cuatro números cuánticos sean idénticos*. Esto significa que en un orbital dado, el cual se encuentra especificado por  $n$ ,  $l$  y  $m_s$ , pueden existir un máximo de dos electrones ( $m_s = +1/2$  y  $m_s = -1/2$ ) (Huheey et al., 2003).



### 3. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS)

Existen moléculas reactivas de oxígeno las cuales se forman como productos intermedios del metabolismo biológico del  $O_2$  que no entran en la definición de radicales libres por lo que, radicales o no, son llamadas especies reactivas de oxígeno (Beckman y Ames, 1998).

Aproximadamente hace 60 años no se pensaba que las ROS tuvieran parte de las reacciones en los sistemas biológicos debido a su alta reactividad y su poca selectividad.

Más del 90% del oxígeno que entra en las células humanas es usado para la producción de energía. La mitocondria produce más del 80% del adenosin trifosfato (ATP) necesario en las células animales. Durante este proceso, cuatro electrones son agregados a cada molécula de  $O_2$ , resultando la formación de dos moléculas de  $H_2O$ . Se estima que del 1-5% del  $O_2$  usado por la mitocondria, vía complejo I y III, durante el proceso de fosforilación oxidativa se escapará de la cadena respiratoria para formar el anión superóxido (Buetler et al., 2004).

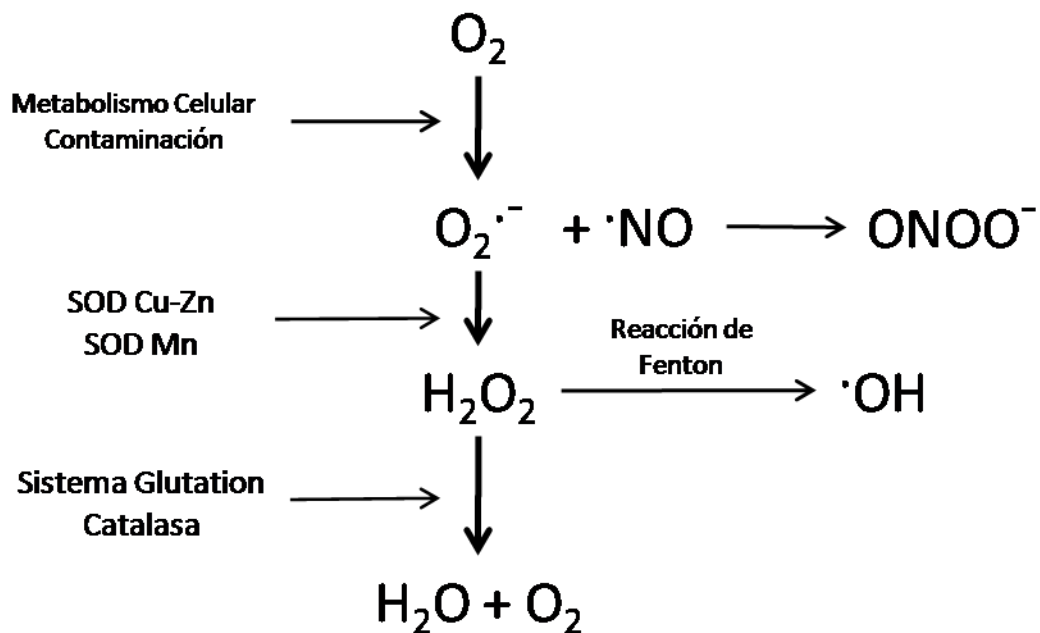


Figura 1. Esquema que muestra la formación de las principales ROS.

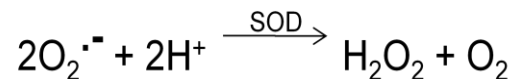
Frecuentemente, diferentes ROS coexisten en un mismo ambiente y dificultan la identificación inequívoca de un agente como responsable de un efecto biológico dado.

### **3.1 Superóxido**

El superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) es un radical libre de oxígeno el cual es producido *in vivo* de diversas formas, la mayor fuente de producción es la cadena transportadora de electrones en la mitocondria (Sohal, 1997). Este proceso está mediado enzimáticamente por NADPH/Xantina oxidasas (Behar et al., 1979; Korycka-Dahi y Richardson, 1981), y no enzimáticamente por compuestos reactivos a oxígeno, como la cisteína (Sáez et al., 1982) o la riboflavina como sucede en la cadena transportadora de electrones (Boveris y Chance, 1972).

El NADPH oxidasa, presente en la membrana celular de fibroblastos, células endoteliales y células musculares lisas y particularmente fagocitos, producen directamente  $O_2^{\cdot-}$ . Otras enzimas tales como la óxido nítrico sintasa (NOS), la xantina oxidasa, citocromo P450, lipoxigenasas e incluso las hemo oxigenasas, durante situaciones anormales, por ejemplo, isquemia-reperfusión o inflamación inicial, pueden estar involucradas en la producción de  $O_2^{\cdot-}$  (Maia et al., 2007).

El  $O_2^{\cdot-}$  es poco reactivo con sustratos biológicos en un ambiente acuoso. Una vez formado el  $O_2^{\cdot-}$  es rápidamente dismutado para formar  $H_2O_2$ . Esta reacción es acelerada principalmente por la SOD mitocondrial (Mn), citosólica (Cu/Zn) y extracelular (Fridovich, 1989; Deby, 1990; Ibrahim et al., 2000), que catalizan la dismutación del  $H_2O_2$  como sigue:

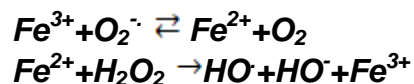


Por lo tanto, la SOD es generalmente considerada como una importante enzima antioxidante (Touati, 1989). Además de la SOD existen una variedad de enzimas que generan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en los tejidos humanos.

### **3.2 Peróxido de hidrógeno**

El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no es una molécula radical debido a que tiene electrones apareados pero ha sido incluida dentro de las ROS debido a que es una molécula oxidante por naturaleza (Halliwell et al., 2000). Por sí mismo no es especialmente tóxico a menos que se presente en altas concentraciones dentro de las células. Su relativa estabilidad permite su medición en plasma: en sujetos normotensos su concentración es de 2.5 μM (Lacy et al., 1998). Notablemente, tiene una vida media de 1-2" en plasma pero menos de 1" cuando se genera en sangre (Boci et al., 1998). En este caso la concentración del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracelular puede ser al menos de 0.25 μM mientras que la concentración intracelular máxima que puede ser generada para propósitos de señalización puede alcanzar 0.5-0.7 μM (Stone y Yang, 2006). El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> difunde rápidamente a través de la membrana celular en la presencia de un gradiente citosólico extracelular pero la concentración intracelular es de solo 1/10 de la extracelular (Antunes y Cadenas, 2000; Stone y Yang, 2006), puede llegar a lugares distantes del sitio donde fue generado. También, en presencia de metales de transición, tales como Fe<sup>2+</sup> y Cu<sup>1+</sup>, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es reducido al radical hidroxilo (OH<sup>•</sup>) ya sea por la vía de Haber Weiss o por la reacción de Fenton (Imlay et al., 1988; Yamazaki et al., 1991; Chance et al., 1979; Liu et al., 2007).

La reacción de Fenton, ilustra lo anterior:



En la mayoría de las células el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es transformado en productos inocuos por la acción de dos importantes enzimas antioxidantes, la catalasa y la glutatión peroxidasa dependiente de selenio (GPx) (Mills, 1957; Dringen et al., 2005). La GPx utiliza los hidroperóxidos del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como sustrato durante la conversión de glutatión reducida

(GSH) a sulfuro (GSSG) (Jain et al., 1991). En la reacción de la glutatión peroxidasa, el glutatión es oxidado a un disulfuro de glutatión, que puede regresar a glutatión por la glutatión reductasa en un proceso que consume NADPH (Aon et al., 2007).

Dependiendo de su concentración local y tipo celular, el  $H_2O_2$  puede tanto inducir proliferación o muerte celular (Urschel, 1997; Stone y Collins, 2002; Ardanaz y Pagano, 2006). Puede regular el tono vascular causando vasoconstricción o vasodilatación aunque sigue siendo incierto si actúa como factor endotelial derivado de la hiperpolarización (Matoba et al., 2002).

### **3.3 Radical hidroxilo**

Se conoce ampliamente que, una vez formado el radical  $OH^\cdot$ , este reacciona rápidamente con cualquier molécula situada a pocos angstroms del sitio donde se produjo. Debido a su alta reactividad, se estima que su tiempo de vida media a  $37^\circ C$  está en el orden de  $10^{-9}$  s. El  $OH^\cdot$  daña fácilmente el DNA nuclear y mitocondrial, lípidos de membrana y carbohidratos (Cochrane, 1991). Existen al menos dos formas por las cuales se daña el DNA. En muchos casos la mutación del DNA es dada por que el  $H_2O_2$  reacciona con el  $Fe^{2+}$  o con el  $Cu^{2+}$  que están unidos a las moléculas cercanas al DNA. Entonces, cuando el radical  $OH^\cdot$  se forma, su primer blanco son los ácidos nucleicos adyacentes (Halliwell y Aruoma, 1991). Alternativamente, durante la estimulación excitatoria de los neurotransmisores, el alto incremento intracelular de  $Ca^{2+}$  activa enzimas nucleares, lo que resulta en la formación de  $OH^\cdot$ , el cual subsecuentemente llevará al daño en el DNA (Orrenius et al., 1989). El  $OH^\cdot$  también interactúa con los lípidos de membrana para desencadenar la peroxidación de lípidos. Esta reacción es llevada a cabo cuando el  $OH^\cdot$  remueve el  $H^+$  de un ácido graso poliinsaturado (PUFA), lo que resulta en una reacción en cadena en donde la peroxidación de lípidos se autopropaga (Halliwell y Gutteridge, 1990).

### **3.4 El papel fisiológico de las ROS**

Los radicales libres son normalmente generados por el metabolismo celular en la obtención de energía. Los mecanismos de oxido-reducción y los radicales libres desempeñan un papel importante en la fisiología de la célula (Kovacik y Pozos, 2006), abarcan desde renovación de membranas, fenómenos plásticos celulares, migración celular, síntesis y liberación de algunas hormonas, aumento en la transcripción de citocinas durante procesos inflamatorios, hasta la participación en señalización celular (Stone y Yang, 2006; Biniert et al., 2006) y mecanismos de segundos mensajeros (Smythies y Galzinga, 1998; Chiarugi y Fiaschi, 2007)

Existen evidencias de que los organismos vivos no solo se han adaptado a coexistir con los radicales libres sino que han desarrollado varios mecanismos para utilizar los radicales libres en diversas funciones fisiológicas (Halliwell, 2007; Kirkwood, 2005).

En organismos aeróbicos saludables existe un balance entre la producción de varias ROS y las defensas antioxidantes. Los organismos vivos no solo se han adaptado a coexistir con los radicales libres sino que han desarrollado diversos mecanismos para aprovecharlos en diversas funciones fisiológicas.

Las ROS se caracterizan por su carácter dual, teniendo tanto efectos dañinos como benéficos los cuales, dependen en la mayoría de los casos de la concentración. Se ha sugerido que los principales efectos de las ROS en la célula son a través de sus acciones en las vías de señalización y no por sus acciones directas en las macromoléculas (Maher, 2000), sin embargo, ambos fenómenos coexisten. En un estado de homeostasis la célula tiene la posibilidad, a través de los sistemas antioxidantes, de contrarrestar la producción de ROS. De hecho, las bajas concentraciones continuas de ROS inducen la expresión de enzimas antioxidantes y mecanismos de defensa relacionados. A altas concentraciones de ROS, existen

efectos perjudiciales, en concentraciones bajas las ROS están involucradas en diversas funciones fisiológicas en la respuesta celular a estímulos nocivos.

Las enfermedades infecciosas fueron un mecanismo de selección natural en las épocas tempranas de la civilización humana. De hecho las ROS participan directamente en la defensa contra las infecciones induciendo un estallido respiratorio y son importantes coordinadores de la inflamación. La microglía residente en el cerebro en situaciones normales es inducida por ROS y su papel en el cerebro es contrarrestar el daño celular (Gemma, 2010).

En los animales, las especies reactivas están regulando distintas funciones fisiológicas. Entre éstas se encuentran la regulación del tono vascular, el monitoreo de la presión de oxígeno y la ampliación de la transducción de señales. La transducción de señales mediada por especies reactivas, regulan la respuesta al propio estrés oxidativo, que mantiene el balance redox dentro de parámetros homeostáticos (Droge, 2002). Por todo esto, la regulación homeostática del balance de óxido-reducción, ha tenido una especial importancia, ya que se debe mantener el delicado equilibrio, entre las ventajas adaptativas del uso biológico de los radicales libres y sus efectos dañinos.

El termino de señales oxidativas, es comúnmente utilizado para describir procesos reguladores en los cuales la señal es derivada del balance redox. Los radicales libres, las especies reactivas de oxígeno y las especies reactivas de nitrógeno (RNS), se encuentran en células y tejidos en concentraciones bajas pero cuantificables. Sus concentraciones son determinadas mediante el balance entre sus tasas de producción y sus tasas de desactivación por las defensas antioxidantes (Gutteridge y Halliwell, 1989).

Uno de los descubrimientos más importantes, es que las ROS pueden regular la expresión génica, varios genes bacterianos son inducidos por  $H_2O_2$  (Christman et al., 1985). En el caso de los mamíferos, se encontró que pequeñas cantidades de  $O_2^{\cdot -}$  y

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> incrementan la producción de la interleucina 2 (IL-2), la cual es un importante factor de crecimiento linfocitario, posiblemente como respuesta a la activación del factor nuclear κB (NFκB) la cual se da en presencia de ROS (Schreck et al., 1992).

También se ha sugerido que normalmente las ROS participan en muchas señalizaciones de las vías de transducción que son esenciales para muchas funciones en el cerebro tales como la memoria y el aprendizaje. Con la edad, cuando el equilibrio redox se altera, esas vías también alteran su señalización, lo que causa una acumulación de altas concentraciones de ROS, lo que conlleva a la presencia de procesos neurodegenerativos asociados a la edad (Sugawara, 2004).

#### **4. ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS**

Las enfermedades neurodegenerativas (enfermedades en las cuales las neuronas degeneran y mueren) tienen una variedad de síntomas, afectan diferentes partes del cerebro, sus causas son multifactoriales y aun no están del todo claras. Tienen en común que la función mitocondrial está alterada, un daño oxidativo incrementado, defectos en el sistema ubiquitin-proteasoma, presencia de agregados anormales de proteínas, cambios en el metabolismo del hierro y cierta participación de inflamación y de excitotoxicidad. Todos estos hechos forman un círculo vicioso y pueden iniciar la muerte celular y reclutar rápidamente a otras células en su propósito destructivo (Luo y Roth, 2000).

Las proteínas oxidadas son usualmente eliminadas por el proteasoma. La inhibición del proteasoma por alteración del estado redox lleva a una acumulación de proteínas anormales y producción de ROS. Finalmente los agentes productores de ROS pueden iniciar la neurodegeneración debido a que las ROS dañan las mitocondrias, producen un aumento del Ca<sup>2+</sup> e inhiben la función del proteasoma. El hierro contenido en varias áreas del cerebro se incrementa con la edad y junto con

otros metales promueve la oxidación y con esto la agregación de diversas proteínas (Friedman, 2011).

#### **4.1 Enfermedad de Parkinson**

La iniciación y el desarrollo del proceso neurodegenerativo en la enfermedad de Parkinson (EP) es todavía incierto. La fisiopatología es compleja y en muchos casos multifactorial además difiere entre los individuos afectados. Un gran número de estudios han proporcionado evidencia de que la pérdida de regulación redox contribuye a todas las formas de EP, aunque aún no se ha determinado si las ROS son un evento primario o una consecuencia de los factores patogénicos. Sin embargo la sobreproducción de ROS es algo incuestionable como un importante mediador en la muerte celular en la EP (Berg et al., 2004). La EP es el resultado de la neurodegeneración en áreas específicas del cerebro (*substantia nigra pars compacta* y putamen) dando como resultado una disminución de la dopamina (Cui et al., 2004).

Los factores que involucran la dopamina, la neuromelanina, el incremento en los depósitos de hierro de la *substantia nigra*, una disminución de ferritina y de glutatión (GSH), una deficiencia en la función del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, disfunción mitocondrial y excitotoxicidad pueden ser causa o resultado de las ROS. Toxinas como el MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina) que bloquea la actividad de la MAO (Ambrosio, 1988), el paraquat, que genera ROS (Moretto y Colosio, 2011), y la rotenona, que inhibe el complejo mitocondrial I (Tanner et al., 2011), han demostrado que incrementan el riesgo de EP en humanos. Estudios con células y modelos animales revelan propiedades oxidativas e inflamatorias de estas toxinas y su capacidad para activar células gliales que posteriormente destruyen a las neuronas dopaminérgicas vecinas (Jenner y Olanow, 1998, Vila et al., 2001).

La actividad del complejo I mitocondrial es deficiente en la *substantia nigra* en la EP y puede ser asociado con una anomalía genética del mismo o ser el resultado del



propio estrés oxidativo (Abou-Sleiman et al., 2006). Sin embargo el postulado de un defecto en el DNA mitocondrial todavía es incierto. Se ha demostrado que la disminución de glutatión en las células dopaminérgicas en cultivo resulta de la pérdida selectiva en la actividad del complejo I mitocondrial (una característica importante de la EP).

## **5. ANTIOXIDANTES**

Gracias a la presencia del oxígeno, la evolución ha sido forzada a desarrollar mecanismos para la protección de los organismos vivos en contra de las ROS. Los antioxidantes son sustancias biológicas que son capaces de competir por sustratos oxidables e inhibir su oxidación (Halliwell y Gutteridge, 1984). Los sistemas antioxidantes se pueden dividir en enzimáticos y no enzimáticos (Somogyi et al., 2007). Dentro de los primeros están la SOD, glutatión peroxidasa, catalasa y tiorredoxina. Los de tipo no enzimático incluyen a las vitaminas y también a las proteínas y aminoácidos, que son menos reactivos pero que están en mayor concentración a diferencia de los atrapadores enzimáticos, estos presentan una alta reactividad con las ROS, pero se encuentran en concentraciones más bajas.

## **6. SEÑALIZACIÓN REDOX**

El proceso de eliminación de electrones es llamado oxidación y la sustancia que recibe los electrones se reduce. Estas reacciones involucradas en la transferencia de electrones son llamadas reacciones redox.

El término “señalización redox” se usa para describir un proceso de regulación en el cual intervienen procesos de oxidación y reducción. Este tipo de señalización es utilizada por una amplia gama de microorganismos incluyendo bacterias, y su utilización más

común es la inducción de defensas antioxidantes que restablecen el estado original de homeostasis redox tras una exposición temporal a ROS (Droge, 2002).

La interacción de varios componentes de los sistemas antioxidantes (Mendiratta et al., 1998a, 1998b), se hace muy eficaz por el reciclado de sus componentes y es suficiente para hacer frente al estrés debido a las ROS por largos periodos en la vida del organismo (Soberman, 2003). Sin embargo el envejecimiento y particularmente enfermedades crónicas inflamatorias causan un descontrol en los mecanismos de mantenimiento del estado redox que agravan progresivamente la patología.

### **6.1 Pérdida del balance redox**

La pérdida del control oxidativo en el organismo, ya sea por un exceso de pro-oxidantes o por un déficit en las defensas antioxidantes (Soffler, 2007), se caracteriza por altos niveles de ROS (Halliwell y Gutteridge, 1984) y RNS.

Las especies reactivas producen oxidación de lípidos, proteínas y DNA en la célula. La oxidación de las moléculas que conforman la membrana celular, altera su permeabilidad selectiva, lo que conduce a una pérdida de equilibrio osmótico. Todo lo anterior lleva a una entrada no controlada de  $\text{Na}^+$  y  $\text{H}_2\text{O}$ , alterando las concentraciones de electrolitos. Cuando los propios mecanismos celulares no pueden contrarrestar estos cambios, se inicia una cadena de reacciones que involucran alteraciones de los canales iónicos, aumento en la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  (Halliwell y Gutteridge, 1984; Hool y Corry, 2007) y en la producción de NO. Mantener el control de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  es crucial para la célula, por lo tanto, esta lo atrapa en el retículo endoplásmico y en la mitocondria, pero cuando esta respuesta no es suficiente para contrarrestar este aumento de calcio, se forma un poro de transición en la mitocondria que la destruye, produciendo un déficit de ATP que incrementa el estado de estrés oxidativo y lleva la muerte celular (Rivas-Arancibia et al., 2010).

Como los radicales libres interactúan con otros componentes celulares como las proteínas, el DNA y los lípidos, se forman múltiples productos catabólicos. Un ejemplo de estos, es la peroxidación de lípidos que produce hidroperóxidos de lípidos y aldehídos que interactúan con grupos sulfhidrilo de las proteínas, provocando la pérdida de su funcionalidad y perpetuando de esta forma el daño celular.



Figura 2. Mecanismos del estrés oxidativo

El aumento en los niveles de calcio y NO estimula la producción de interleucinas inflamatorias causando gliósis e incrementando el estado de estrés oxidativo. Esto causa daño y muerte celular (Sugaya et al., 1998; Ryter et al., 2007), estableciéndose así un ciclo a través de una cadena de reacciones oxidativas que involucran tanto a las neuronas como a la glía, en el mantenimiento del daño que se extiende hacia las células de los tejidos adyacentes.

## 7. OZONO

El ozono ( $O_3$ ) es un contaminante secundario producto de la reacción entre hidrocarburos y óxidos de nitrógeno en presencia de la luz ultravioleta. La formación del ozono depende de las concentraciones atmosféricas de sus precursores, óxidos de nitrógeno e hidrocarburos, cuyas principales fuentes son las emisiones generadas por la combustión incompleta de combustibles, el uso de solventes orgánicos en procesos industriales y comerciales, procesos de refinación de petróleo y fuentes naturales de estos (EPA, 2010).

El ozono es un gas incoloro, de olor acre que se caracteriza por ser un poderoso oxidante altamente reactivo (Devlin et al., 1996). Dado estas características, una vez inhalado el ozono reacciona con distintas moléculas presentes en el fluido del revestimiento epitelial, conformado principalmente por agua, sales, una mezcla de fosfolípidos con actividad surfactante, proteínas de bajo peso molecular y antioxidantes (lipofílicos e hidrofóbicos) (Bocci, 2006).

La reactividad del ozono evita que penetre directamente a los tejidos pulmonares (Pryor, 1994). Sin embargo, al reaccionar con los antioxidantes y los ácidos grasos poliinsaturados presentes en la interfase aire-fluido del revestimiento epitelial, se producen ROS (p.e.  $H_2O_2$  y  $OH\cdot$ ) (Paz y Bazan-Pencins, 1992), aldehídos y una mezcla heterogénea de radicales lipídicos entre los que se encuentran hidroperóxidos, isoprostanos, radicales lipoperóxido, el malondialdehído (MDA) y el 4-hidroxi-2,3-trans-nonenal (4HNE). Es a través de la formación de estos subproductos que el ozono induce daño no solo pulmonar sino sistémico (Bocci, 2006; Pryor y Squadrito, 1995).

La exposición al ozono induce la generación de ROS (Chen y Qu, 1997; Saintot et al., 1999) y la formación de subproductos relativamente estables (Bocci, 2006; Pryor et al., 1995) capaces de oxidar el ADN, proteínas (Kanofsky y Sima, 1993) y lípidos de membrana (Postlethwait et al., 1998) lo que de no ser contrarrestado induce daño y

muerte celular. Por otro lado, el fluido del revestimiento epitelial se caracteriza por altas concentraciones de antioxidantes, principalmente ácido ascórbico y glutatión (GSH) (Bocci, 2006). Al reaccionar con estos antioxidantes una porción del ozono inhalado es destruido, sin embargo este mecanismo de defensa puede resultar contraproducente. La reacción entre el ozono y el ácido ascórbico induce la formación de radicales libres que a su vez inducen daño oxidativo a lípidos de membrana (Ballinger et al., 2005).

Finalmente, el mecanismo de toxicidad del ozono se explica como una cascada de reacciones (Pryor et al., 1995), en la cual el ozono inhalado reacciona con las moléculas del fluido del revestimiento epitelial generando ROS y subproductos tóxicos, que a su vez son capaces de iniciar otras reacciones (Bocci, 2006). Por lo tanto, cuando las defensas antioxidantes pulmonares son sobrepasadas, se inicia una cadena de reacciones químicas que conduce a la formación de ROS secundarias a la exposición a ozono que pasan a la sangre, y a través del flujo sanguíneo llegan a todos los órganos produciendo un estado de estrés oxidativo generalizado (Rivas-Arancibia et al., 2000, 2003).



Figura 3. Mecanismo de formación del ozono. El ozono es un contaminante secundario que se forma a partir de la reacción entre hidrocarburos y óxidos de nitrógeno presentes en la atmósfera en presencia de luz ultravioleta.

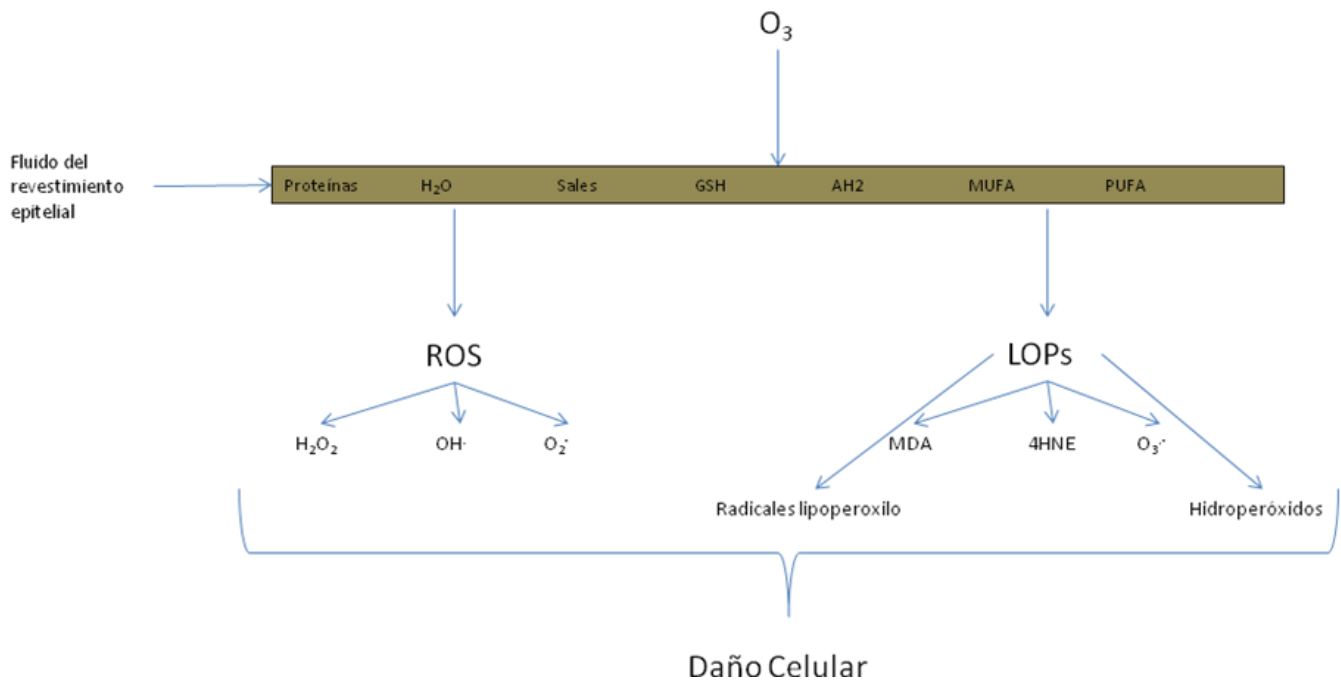


Figura 4. Mecanismo de toxicidad del ozono. Al ser inhalado el ozono reacciona con las moléculas presentes en el fluido del revestimiento epitelial generando ROS y subproductos tóxicos que son los que a su vez inducen daño a DNA, proteínas y lípidos de membrana. (Modificado de Bocci, 2008).

### 7.1 El ozono como modelo de estrés oxidativo

Se han utilizado diversos métodos para abordar el estudio del estrés oxidativo y su significado biológico en el organismo que van desde el nivel molecular y modelos en animales hasta estudios clínicos.

En modelos animales se han utilizado lesiones por toxinas que al actuar sobre el metabolismo mitocondrial bloquean la producción de ATP de la cadena respiratoria, como es el caso del ácido 3-nitropropiónico (Binieda y Kim, 1997) o la exposición a contaminantes ambientales como el ozono (Cross et al, 1992), el cual, dependiendo de la dosis o del tiempo de exposición, produce estrés oxidativo (Lechuga-Guerrero et al., 1999).

Aunque la mayoría de los estudios sobre los efectos del monóxido de carbono, de los dióxidos de azufre y de nitrógeno, así como del ozono, se han efectuado en

animales, advierten del daño en humanos causado por la creciente contaminación atmosférica.

El estrés oxidativo causado por la exposición aguda o prolongada a ozono, ocasiona alteraciones plásticas cerebrales que se manifiestan a nivel conductual por déficit en el aprendizaje, la memoria, la conducta y la actividad motora (Rivas-Arancibia et al., 2000). Sin embargo la exposición crónica a bajas dosis de ozono causa un proceso de neurodegeneración progresiva (Angoa-Pérez et al., 2006; Pereyra-Muñoz et al., 2006).

El aumento en los niveles de lípidos peroxidados por aumento en las ROS en el tejido cerebral, se debe a su alto contenido de ácidos grasos poli insaturados, los cuales son altamente susceptibles a la oxidación. Es importante señalar que las diferentes estructuras cerebrales, presentan diferencias en su respuesta al daño oxidativo (Hermida-Ameijeiras et al., 2004).

## **8. GANGLIOS BASALES**

Los ganglios basales (GB) son núcleos cerebrales implicados en diversas funciones como: aprendizaje basado en recompensa, conducta exploratoria, comportamiento orientado a metas, preparación motora, memoria de trabajo, sincronización, acciones de bloqueo, acciones de selección, fatiga y apatía.

Los ganglios basales consisten en siete núcleos subcorticales extensamente conectados: el núcleo caudado, putamen, globo pálido (interno, GPi, y externo, GPe), núcleo subtalámico (STN) y la *substantia nigra* (*pars compacta*, SNc, y *pars reticulada*, SNr). El caudado y putamen constituyen juntos el cuerpo estriado (STR), el cual es el núcleo de entrada de los ganglios basales. La *substantia nigra compacta* proyecta axones de neuronas dopaminérgicas sobre el estriado. El GPi y la *substantia nigra*

*reticulata* constituyen los núcleos de salida de los ganglios basales enviando proyecciones GABAérgicas hacia el tálamo. Las proyecciones de la *substantia nigra compacta* hacia el estriado dorsal se cree que están involucradas en los movimientos voluntarios en los hábitos de aprendizaje (Keath et al., 2007).

El conocimiento de la anatomía, fisiología y disfunciones de los ganglios basales ha sufrido cambios significativos con el tiempo. Anteriormente se pensaba que los ganglios basales eran centros de convergencia masiva de la información cortical, ahora se sabe que estas estructuras procesan información de manera muy específica, participando en funciones anatómicas y funcionales que involucran a la corteza y el tálamo. También se veía a las conexiones GB-talamocorticales como exclusivamente relacionadas con el control del movimiento, estas estructuras son vistas en la actualidad como esenciales para un mayor nivel de control del comportamiento, por ejemplo, en la regulación del aprendizaje de hábitos y en la selección de acciones (DeLong y Wichmann, 2009).

Se ha propuesto que, los ganglios basales seleccionan la entrada apropiada y envían la orden hacia la corteza motora. Anteriormente se creía que las salidas de los ganglios basales y del cerebelo convergían a nivel talámico. Este concepto ha sido reemplazado por el de “circuitos separados” en el cual los ganglios basales son componentes de una familia de lazos de retroalimentación en paralelo, sobre la cual la información, enviada desde las áreas corticales, es procesada de forma específica y sin que se sobrepongan los territorios de los ganglios basales y después es regresada a su respectiva área de origen en el lóbulo frontal vía el tálamo (DeLong y Wichmann, 2009).

Los ganglios basales juegan un papel importante en el movimiento voluntario normal (Gerfen y Wilson, 1996). Sin embargo, no tienen conexiones directas con la medula espinal. Estos núcleos reciben su entrada primaria desde la corteza cerebral y



envían sus salidas hacia el tronco cerebral y, vía el tálamo, de regreso hacia la corteza prefrontal, premotora y motora (Chakravarthy et al., 2010).

### 8.1 Vías de entrada y de salida

Los ganglios basales reciben entradas de la mayoría de las áreas sensoriales-motoras de la corteza cerebral, incluyendo áreas somatosensoriales primarias y secundarias, corteza motora primaria (M1) y una variedad de áreas premotoras incluyendo áreas suplementarias y áreas premotoras ventrales y dorsales.

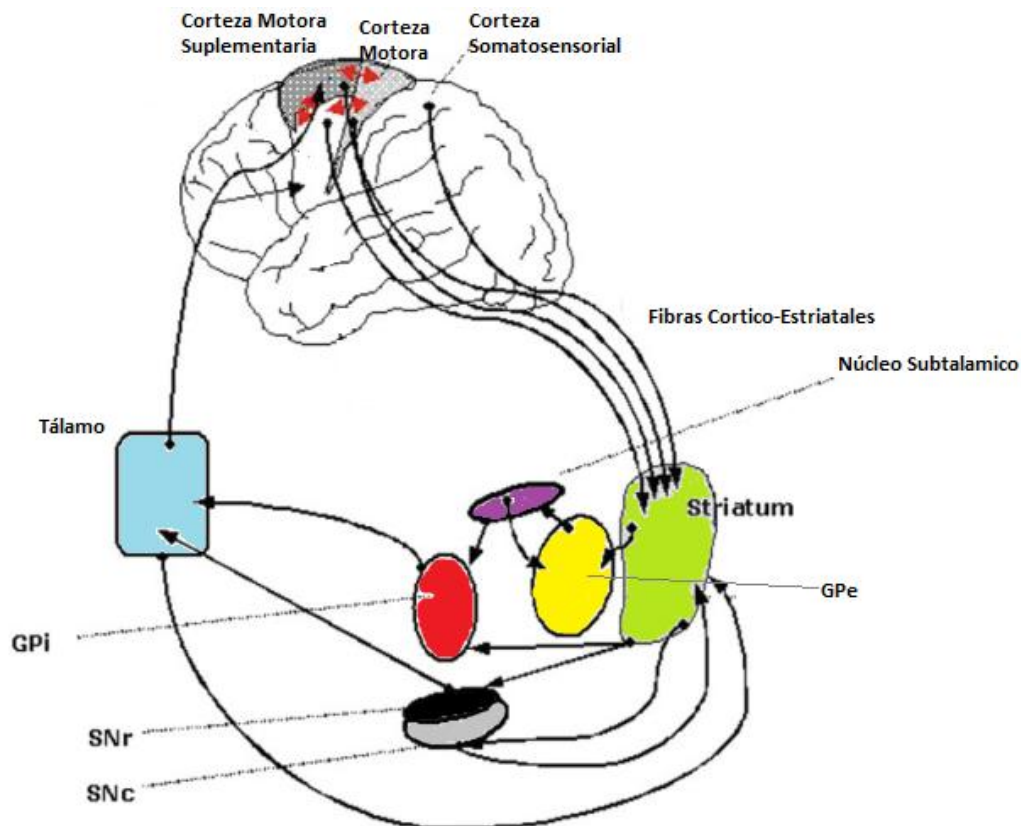


Figura 5. Vías de entrada y salida de los ganglios basales.

El estriado sirve como blanco para las entradas de la corteza hacia los ganglios basales. Las proyecciones de salida estriales forman dos diferentes canales paralelos

dentro de las vías cortico-estriato-palidal de los ganglios basales. Estas proyecciones son llamadas vía directa e indirecta debido a su efecto en el núcleo blanco, el tálamo.

La activación de las neuronas de la vía directa conduce a una inhibición. Cuando se da la activación de las neuronas de la vía indirecta se produce una desinhibición de las neuronas de GPi/SNr. Debido a que la salida de los ganglios basales es inhibitoria, la reducción de esta a través de la activación de la vía directa desinhibe la actividad talamocortical. Conceptualmente, la vía directa puede ser vista como una “puerta” normalmente cerrada al movimiento. Esta puerta se abre por la actividad estriatal lo que inhibe la salida palidal permitiendo movimientos de emergencia.

La vía indirecta está formada por proyecciones inhibitorias hacia el GPe lo cual se piensa que genera un efecto contrario al de las neuronas del GPi en la vía directa, incrementan la inhibición de las proyecciones talamocorticales. La actividad en la vía indirecta tiende a aumentar la actividad de las células del GPi, y por lo tanto cierra la “puerta” desinhibiendo el núcleo subtalámico. Estas vías pueden estar involucradas en la modulación de los parámetros de movimiento (Contreras-Vidal y Stelmach, 1996). Las vías directa e indirecta difieren en otros aspectos. La vía directa expresa sustancia P mientras que las neuronas de la vía indirecta contienen encefalina. Además, las neuronas de la vía directa expresan los receptores a dopamina de la familia D1 mientras que las neuronas de la vía indirecta expresan los receptores de la familia D2 (Gerfen et al., 1990).

Las neuronas estriatales tienen dos tipos de receptores dopaminérgicos: D1 y D2 (Clark et al., 2005). La vía directa es activada cuando los receptores D1 son activados por señales dopaminérgicas de la *substantia nigra compacta*. Similarmente, la vía indirecta se activa cuando los receptores D2 son activados. Además, el incremento de la dopamina en el estriado inclina el equilibrio hacia la vía directa, lo que incrementa la actividad motora en general. Por lo tanto la vía indirecta es la vía activa

normalmente. El balance cambia justo antes de la aparición del movimiento, cuando la dopamina liberada en el estriado activa la vía directa (Clark et al., 2005).

## **8.2 Pérdida de la función en circuitos específicos de los ganglios basales**

Cuando los modelos de los circuitos directo e indirecto fueron formulados inicialmente, las implicaciones para las alteraciones del movimiento estaban implícitos (Albin et al., 1989; DeLong, 1990). Esencialmente en esas explicaciones estaba el efecto diferencial de la dopamina en las vías directa e indirecta. Fue propuesto que las neuronas estriatales que dan lugar a la vía indirecta se volvían hiperactivas debido a la pérdida de la inhibición dopaminérgica, resultando una reducción de actividad en el GPe. Esto a su vez, se pensaba que desinhibía el eje STN-GPi y conducía a una mayor salida del GPi hacia el tálamo.

Este modelo permite unir el desarrollo de características de la enfermedad de Parkinson con un incremento en la salida (inhibitoria) desde el GP hacia el tálamo (DeLong et al., 2009).

## **8.3 Vía nigroestriatal**

La vía nigroestriatal dopaminérgica se extiende desde la *substantia nigra compacta* hacia el estriado dorsal a través del haz medio prosencefálico. La liberación somatodendrítica de dopamina en la *substantia nigra compacta*, así como la liberación axonal de dopamina en el estriado es necesaria para el comportamiento motor mediado por los ganglios basales (Timmerman y Abercrombie, 1996). Los transportadores para dopamina (DATs) son expresados exclusivamente por neuronas dopaminérgicas y son encontrados extrasinápticamente en axones dopaminérgicos en el estriado y en el soma y dendritas en el cerebro medio (Ciliax et al., 1995; Hersch et al., 1997). Por otra parte los receptores a dopamina son extrasinápticos (Hersch et al., 1995; Khan et al., 1998) esto implica que la comunicación intercelular por dopamina requiere difusión basada en la transmisión por volumen (Fuxe y Agnati, 1991), lo cual es definido como

“una asociación funcionalmente significativa de liberación y sitios de receptores vía difusión extrasináptica” (Rice, 2000).

## **9. SISTEMA DOPAMINÉRGICO**

La dopamina es una catecolamina que juega un papel importante en el cerebro humano como un neurotransmisor inhibitorio, particularmente involucrado en la regulación de la función motora. Se sintetiza en las terminales nerviosas de las neuronas dopaminérgicas a partir de la tirosina, su aminoácido precursor.

La síntesis comienza con la formación de L-DOPA a partir del aminoácido tirosina, mediante la acción de la tirosina hidroxilasa (TH) y las bipteridinas. La TH es la enzima limitante en la síntesis de dopamina, motivo por el cual, la actividad de la misma está rigurosamente controladas. La L-DOPA es inmediatamente metabolizada para formar dopamina por la acción de la DOPA descarboxilasa. En las terminales nerviosas, la dopamina es almacenada en vesículas sinápticas cuyo contenido ácido previene la auto oxidación del neurotransmisor hasta que éste sea liberado.

La acción de la dopamina termina con la recaptura de la misma por un transportador de membrana, y la subsecuente reutilización o catabolismo por las enzimas monoamino-oxidasa (MAO) o la catecol-o-metiltransferasa (COMT).

En el cerebro, los sistemas dopaminérgicos intervienen en procesos de motivación, memoria, aprendizaje, control motor, y se estima que la dopamina constituye más del 80% del contenido total de catecolaminas en el cerebro (Feldman et al., 1997).

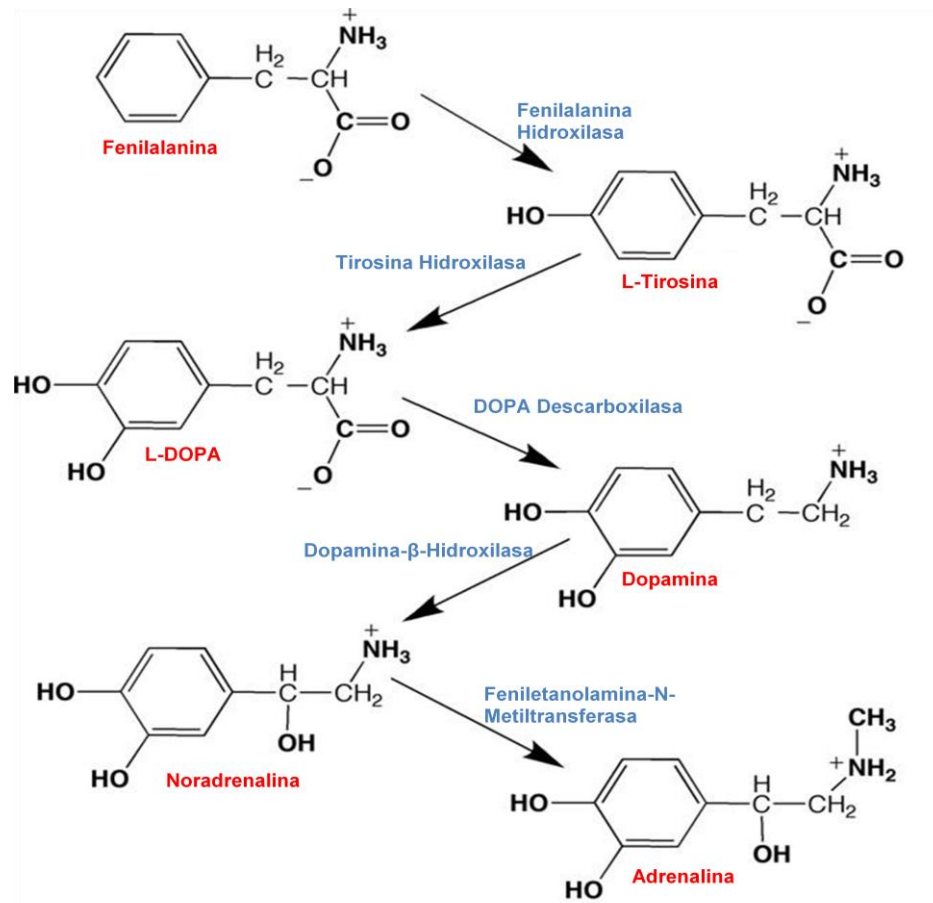


Figura 6. Vía de formación de catecolaminas.

### 9.1 La dopamina como fuente de ROS en el SNC

Se han propuesto mecanismos por medio de los cuales la dopamina estimula la producción de ROS. Estos dependen de la presencia o ausencia de mediadores enzimáticos. Se sabe que la dopamina en la *substantia nigra* y en el estriado es desaminada por la enzima MAO, que se localiza en la membrana externa de la mitocondria. Esta reacción da como resultado la producción de radicales superóxido e hidroxilo, además de peróxido de hidrógeno (Graham, 1978).

El salsolinol es uno de los derivados de la dopamina más estudiados por dos razones: está presente en el cerebro humano y se puede transformar fácilmente en una neurotoxina capaz de causar la muerte celular. Se ha propuesto que este compuesto

puede formarse mediante una vía enzimática que involucra una sintasa o por vía no enzimática, mediante la condensación de la dopamina con acetaldehído (Naoi et al., 1996).

Otro derivado de la dopamina es la tetrahidropapaverolina (THP), que se obtiene del catabolismo enzimático. Se ha reportado que la THP por sí misma es capaz de inducir necrosis en células de neuroblastoma y está relacionada con la patogénesis de la enfermedad de Parkinson (Soto-Otero et al., 2006).

Los derivados del metabolismo de la dopamina actúan como pro neurotoxinas en el desarrollo de la EP. Ciertos componentes del humo de tabaco pueden reaccionar con estas proneurotoxinas impidiendo su activación. Este hecho puede explicar el efecto benéfico del hábito de fumar en la incidencia de Parkinson (Hermida-Ameijeiras et al., 2004).

## **9.2 La autooxidación de la dopamina**

Otro mecanismo por medio del cual la dopamina puede contribuir a la formación de ROS es la autooxidación espontánea. La dopamina es una molécula con un grupo catecol, el cual puede oxidarse fácilmente de manera no enzimática para formar una serie de especies electroquímicas tipo quinoides.

El paso inicial en la oxidación de la dopamina involucra una reacción con el oxígeno molecular para formar DA-o-quinona y dos moléculas de anión superóxido. La formación de los aniones superóxido durante la autooxidación de la dopamina lleva a la producción de peróxido de hidrógeno por la dismutación del superóxido.

La DA-o-quinona luego sufre una ciclización intramolecular para formar 5,6-dihidroxiquinolina, que es subsecuentemente oxidada por la DA-o-quinona para formar dopaminocromo. Este compuesto sufre un rearrreglo para formar 5,6-dihidroxiindol, que a su vez se oxida en una quinona de indol. El siguiente proceso de polimerización lleva finalmente a la generación de un pigmento oscuro denominado neuromelanina. La apariencia oscura de la *substantia nigra* se debe a la presencia de este pigmento, que contiene productos derivados de la oxidación de la cisteinil-DA.

Cuando la auto oxidación de la dopamina tiene lugar en presencia de L-cisteína, la DA-o-quinona sufre un ataque nucleofílico por el grupo tiol del aminoácido para formar cisteinil-DA. Este hecho difiere de la oxidación normal de la dopamina para formar neuromelanina (Hermida-Ameijeiras et al., 2004).

## 10. TEORÍA REDOX

Una sinapsis Hebbiana es aquella en la cual la eficiencia se incrementa si la activación de la sinapsis coincide con la despolarización de la membrana postsináptica. El rol del reforzamiento en el aprendizaje se piensa que está dado por la extensión, la liberación de neuromoduladores, particularmente dopamina y posiblemente norepinefrina (NE), a cambio de un estímulo de recompensa (Lanau, 1997; Rebec, 1997), actuando por la vía de sus propios receptores para modificar la liberación de neurotransmisores presinápticos y cascadas postsinápticas. Ha sido sugerido que el fenómeno de potenciación de largo plazo y de depresión de largo plazo basado en la actividad del receptor a glutamato NMDA (NMDAr) media este proceso (Riedel, 1996; Sagratela, 1996; Tsien, 1996). Este receptor es un buen candidato de sinapsis Hebbiana que solo se activa cuando la membrana postsináptica se despolariza y expelle un ion  $Mg^{2+}$  que normalmente bloquea su canal de iones.

La teoría de Smythies explica que los mecanismos redox que regulan la sinapsis glutamatérgica lo hacen por medio de tres tipos de receptores: 1) AMPAr, 2) NMDAr y 3) mGlurs.

Existen dos cascadas postsinápticas principales que se generan debido al influjo de  $Ca^{2+}$  iniciado por la activación de los NMDAr: 1) Activación de fosfolipasa A2 que lleva a la liberación de AA (ácido araquidónico) y a la activación de la sintasa H de la prostaglandina (PGH). 2) Activación de la sintasa de óxido nítrico.

La activación de estas dos enzimas, particularmente la PGH, lleva a la liberación de grandes cantidades de ROS, principalmente de  $H_2O_2$ . Las prostaglandinas están involucradas en la reorganización rápida del citoesqueleto de actina y por lo tanto, influyen en el cambio de la forma de las espinas y las dendritas.

El destino de una sinapsis depende, en parte, del balance redox. Si el ambiente es pro-oxidante, las ROS causarían una eliminación de espinas. Si el ambiente es antioxidante, el efecto de las ROS será neutralizado y la sinapsis tenderá a conservarse (Smythies, 1999).



## **11. HIPÓTESIS**

Si la regulación redox participa en los cambios plásticos que ocurren en el cerebro, entonces en un estado de estrés oxidativo produce pérdida de sinapsis en la vía nigroestriatal.

## 12. OBJETIVO GENERAL

Estudiar como la pérdida del equilibrio de oxido-reducción produce una alteración en la plasticidad sináptica de la vía nigroestriatal.

### *Objetivos Particulares*

1. Demostrar que el estado de estrés oxidativo causa pérdida de espinas dendríticas en las neuronas.
2. Demostrar que el estado de estrés oxidativo causa pérdida de sinapsis en estriado entre las proyecciones neuronales dopaminérgicas que vienen de la nigra.
3. Demostrar que el estado de estrés oxidativo crónico causa una fosforilación generalizada de receptores a dopamina en estriado, alterando la neurotransmisión.

## 13. METODOLOGÍA

### 13.1 Procedimiento general

Ratas Wistar macho de 250-300 g (n=80) fueron separadas individualmente en cajas de acrílico con libre acceso de agua y comida, y puestas en un cuarto de aire limpio. Se dividieron aleatoriamente en 5 grupos experimentales (cada uno de n=16). Grupo 1: ratas que se expusieron a aire libre de ozono por 4 h; Grupo 2: ratas que se expusieron por 7 días a ozono; Grupo 3: ratas que se expusieron por 15 días a ozono; Grupo 4: ratas que se expusieron por 30 días a ozono; Grupo 5: ratas que se expusieron por 60 días a ozono. La exposición a ozono se llevo a cabo diariamente por 4 h a una dosis de 0.25 ppm.

### 13.2 Determinación de proteínas oxidadas

El contenido de proteínas oxidadas se determinó midiendo los niveles de proteína carbonilo en el tejido mediante el procedimiento de Reznick y Packer (1994), evaluando la formación de proteína hidrazona por la reacción con DNPH. Los homogenados de *substantia nigra* y estriado fueron incubados con sulfato de estreptomicina (10%), para eliminar los ácidos nucleicos, toda la noche y centrifugados a 21,000 g por 40 min a 48 °C. Además los homogenados fueron tratados con DNPH 10 nM (en HCl 2.5 M) por 1 hr a temperatura ambiente, se agregó ácido tricloroacético (10%) y se centrifugó a 2,500 g a 48 °C por 10 min. El precipitado fue lavado tres veces con etanol/acetato etílico (1:1), disuelto con hidrocloreuro de guanidina 6 M (en PBS 20 mM, pH 7.4), incubado por 10 min a 37 °C y centrifugado a 5,000 g a 48 °C por 3 min para eliminar el material insoluble. La absorbancia fue medida a 370 nm. Los niveles de proteína carbonilo fueron expresados en nmol carbonilo/mg proteína, utilizando el coeficiente molar de absorción de DNPH (22,000 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>). Las concentraciones totales de proteína fueron obtenidas leyendo la densidad óptica a 280 nm en tubos

blanco preparados en paralelo (tratados solo con HCl) utilizando una curva estándar de albumina sérica bovina (0.25 mg/ml) preparada en guanidina-HCl 6M.

### **13.3 Inmunohistoquímica**

Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico y perfundidos con paraformaldehído al 4%. Se extrajo el cerebro y se incluyó en parafina para posteriormente cortar secciones de 5 µm de espesor. Las laminillas que contienen la *substantia nigra* y el estriado se desparafinaron y se pusieron en una solución de recuperación de antígenos (Biocare) e introducidas dentro de una olla eléctrica de presión (Decloacking Chamber, Biocare) por 15 min; Después se lavaron con agua destilada y se trataron con peróxido de hidrógeno 30% (diluido 1:10; Baker) por 5 min; Las secciones se trataron con un bloqueador de proteínas inespecíficas (Background Sniper, 4plus Detection Component, Biocare) por 1 hr; después se lavaron con TBS e incubaron por 15 min a 37 °C con anti-TH (anticuerpo policlonal purificado de conejo, diluido 1:200, Santa Cruz Biotechnology), anti sinaptofisina (anticuerpo policlonal purificado de cabra, diluido 1:200, Santa Cruz Biotechnology), anti DARPP-32 (anticuerpo policlonal purificado de conejo, diluido 1:2000, Biotecnología Santa Cruz); Las secciones se lavaron con TBS+Tween 20 (0.05%) y trataron con anticuerpo biotilado secundario (Trekkie Universal Link, Biocare) por 15 min a 37 °C, lavadas con TBS+Tween 20 (0.05%), posteriormente se trataron con enzima estreptavidin conjugada (Trekavidin-HRP, Biocare) por 15 min a 37 °C y se lavaron con TBS+Tween 20 (0.05%). El anticuerpo fijado fue visualizado usando 3,3-diaminobenzidina (DAB Substrate Kit, Biocare) como cromógeno. Los cortes se lavaron con agua bidestilada y se contrastaron con una solución de buffer-hematoxilina por 3 min. Cada IHQ se repitió en 6 ocasiones. Las secciones representativas de cerebro de cada grupo se procesaron en paralelo. Las secciones se examinaron con un microscopio Olympus H605T y se fotografiaron para posteriormente ser analizadas.

### **13.4 Western blot**

La *substantia nigra* y el estriado fueron extraídos después de decapitar a las ratas y el tejido fue homogenizado y centrifugado. En el caso de la *substantia nigra* se utilizó un pool de ésta.

Las muestras correspondientes fueron utilizadas para analizar por Western blot los niveles de proteína de tirosina hidroxilasa, sinaptofisina, DARP32 y espinofilina.

La proteína fue separada por electroforesis en un gel de SDS-poliacrilamida (10%) (Sigma-Aldrich), y transferida a membranas de PVDF (Sigma-Aldrich). Las membranas que contenían las muestras de los diferentes tratamientos fueron bloqueadas con 5% de leche descremada en una solución de TBS con 0.01% Tween 20 (Sigma-Aldrich) toda la noche a 4 °C, se lavaron con TBS y fueron incubadas individualmente con el anticuerpo correspondiente toda la noche a 4°C. Las membranas se lavaron tres veces por 10 minutos e incubadas con el anticuerpo biotinilado secundario (Trekkie Universal Link, Biocare) por 1 hr, lavadas con TBS+Tween 20 (.05%, Sigma-Aldrich), tratadas con enzima estreptavidin conjugada (Trekavidin-HRP, Biocare) por 30 min y lavadas con TBS+Tween 20 (.05%, Sigma-Aldrich). El anticuerpo fijado se visualizo usando 3,3-diaminobenzidina (DAB Substrate Kit, Biocare) como cromógeno. Cada western blot se repitió en 4 ocasiones.

### **13.5 Análisis de los datos**

Las imágenes fueron analizadas con el software *Image J*. A las imágenes se les realizó una reducción de color con el algoritmo de Wu y solo se utilizaron 9 colores. Todas las imágenes tienen un total de 1,081,600 píxeles, y fueron graficadas en el espacio de color RGB. El valor que se tomó como inmunoreactividad positiva fue el color café oscuro; los datos graficados corresponden al número de píxeles de este color.

Los resultados del número de píxeles se analizaron estadísticamente con pruebas no paramétricas (n=6). Se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis

para encontrar diferencias entre tratamientos y posteriormente una prueba de U. de Mann-Whitney para determinar entre que grupos existieron diferencias. El nivel de significación estadística fue asumido como  $p < 0.05$ . El software estadístico utilizado para el procesamiento de los resultados fue el SPSS versión 17.0 en español.

## 14. RESULTADOS

### 14.1 Proteínas oxidadas en *substantia nigra*

Los resultados indican un incremento de proteínas oxidadas medido en nmol de DNPH por mg de proteína. La exposición a ozono causó un aumento de proteínas oxidadas en la *substantia nigra*, el cual fue máximo a los 15 días de exposición. En este experimento, dada la cantidad de la muestra se utilizó un pool de *substantia nigra* (n=6).

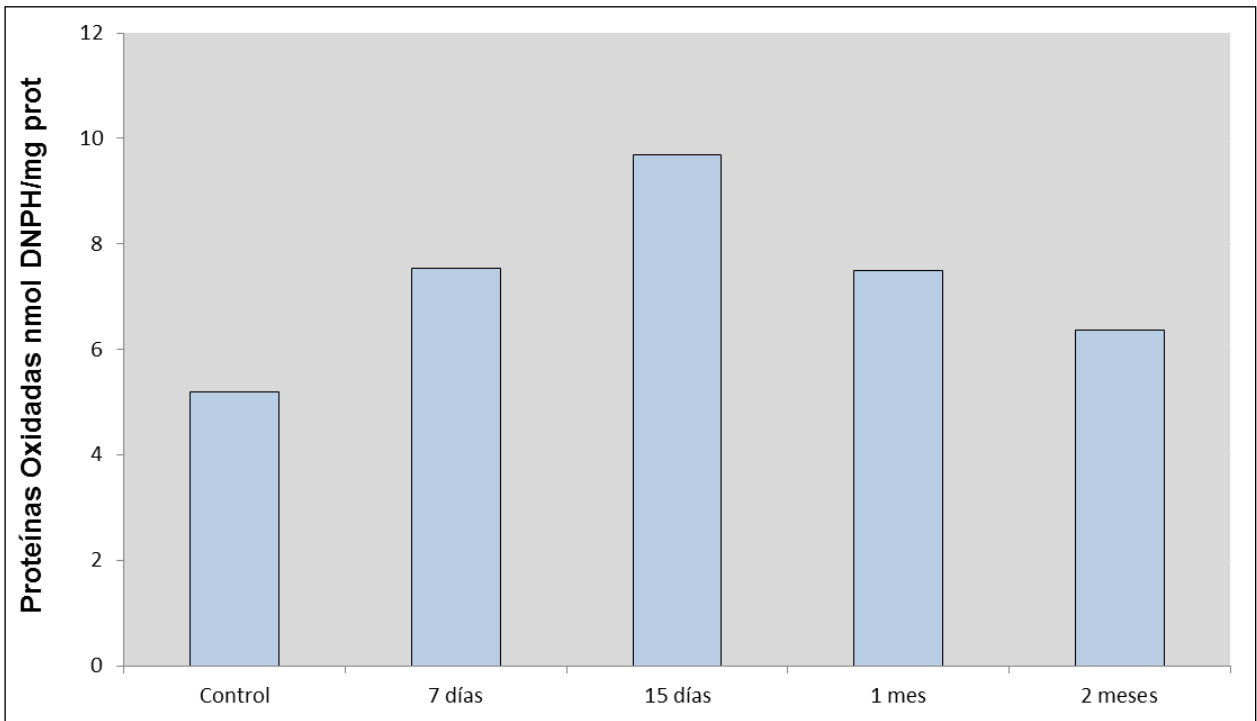


Figura 7. Efecto de la administración de bajas dosis de ozono en ratas sobre los niveles de proteínas oxidadas en la *substantia nigra*. Observamos los niveles de proteínas oxidadas indicadas en nmol DNPH/mg proteína graficados contra los diferentes tiempos del tratamiento.

## 14.2 Proteínas oxidadas en estriado

La exposición a ozono causó un aumento de proteínas oxidadas en el estriado, el cual fue máximo a los 15 días de exposición. El análisis estadístico realizado (Kruskal Wallis seguida de U. de Mann-Whitney) reveló diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los grupos de 7 días, 15 días, 1 mes y 2 meses de exposición a ozono comparados con el grupo control.

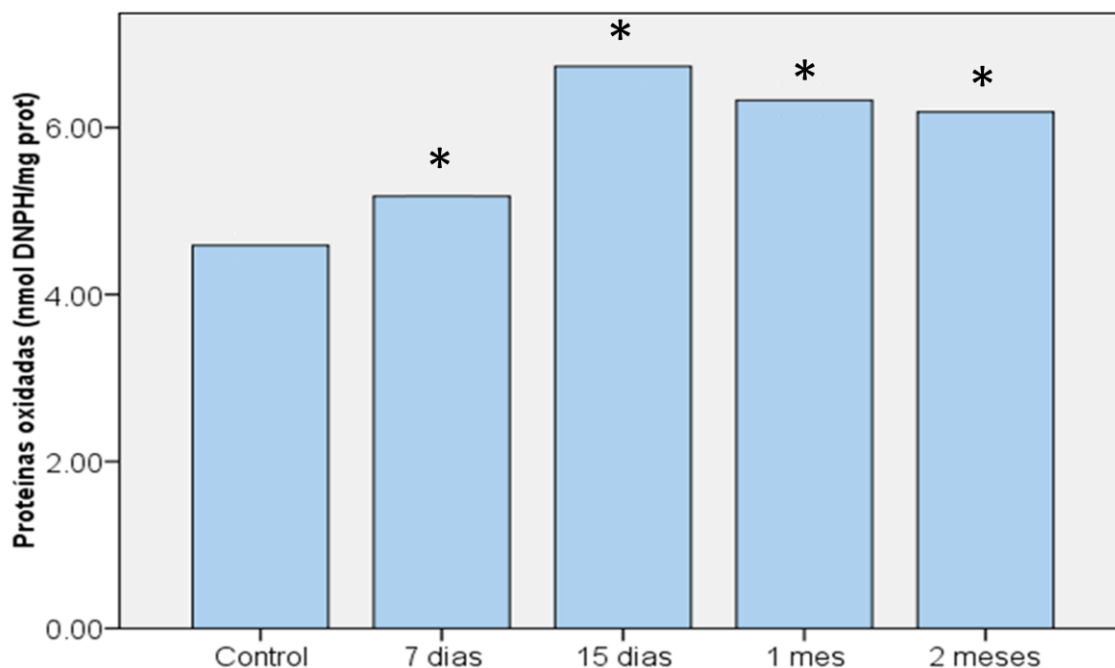


Figura 8. . Efecto de la administración de bajas dosis de ozono en ratas sobre los niveles de proteínas oxidadas en el estriado. Observamos los niveles de proteínas oxidadas indicado en nmol DNPH/mg proteína graficados contra los diferentes tiempos del tratamiento (\* $p < 0.05$ ) contra el grupo control.



### 14.3 Tirosina hidroxilasa en *substantia nigra*

Podemos observar en la IHQ contra TH que en la *substantia nigra* existen cambios morfológicos en las células dopaminérgicas, daño en las proyecciones de las células y pérdida progresiva de la vía a partir de los 15 días de exposición a ozono, asimismo observamos que se van formando cúmulos de TH a partir del mes de exposición a ozono.

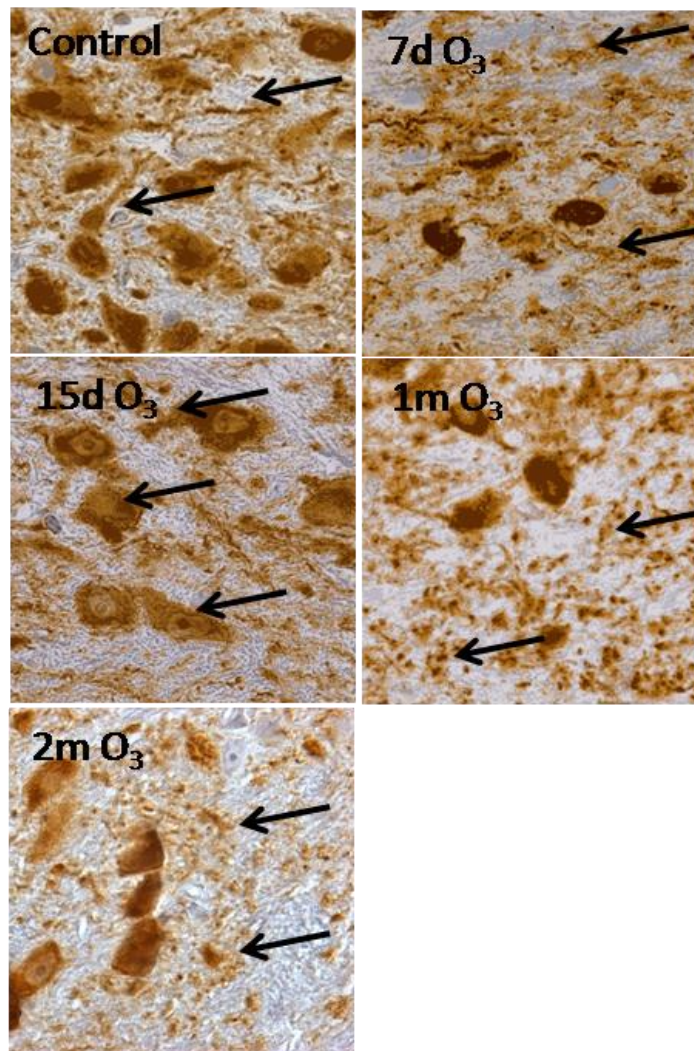


Figura 9. Micrografía que muestra la IHQ contra TH en *substantia nigra*. Las flechas señalan las proyecciones de las células dopaminérgicas, podemos apreciar cómo va cambiando su morfología con el paso de los días del tratamiento (100x).

El análisis estadístico realizado (Kruskal Wallis seguido de U. de Mann-Whitney) sobre la inmunorreactividad, medida en pixeles con el software *Image J*, no muestra cambios significativos de ningún grupo con respecto al control.

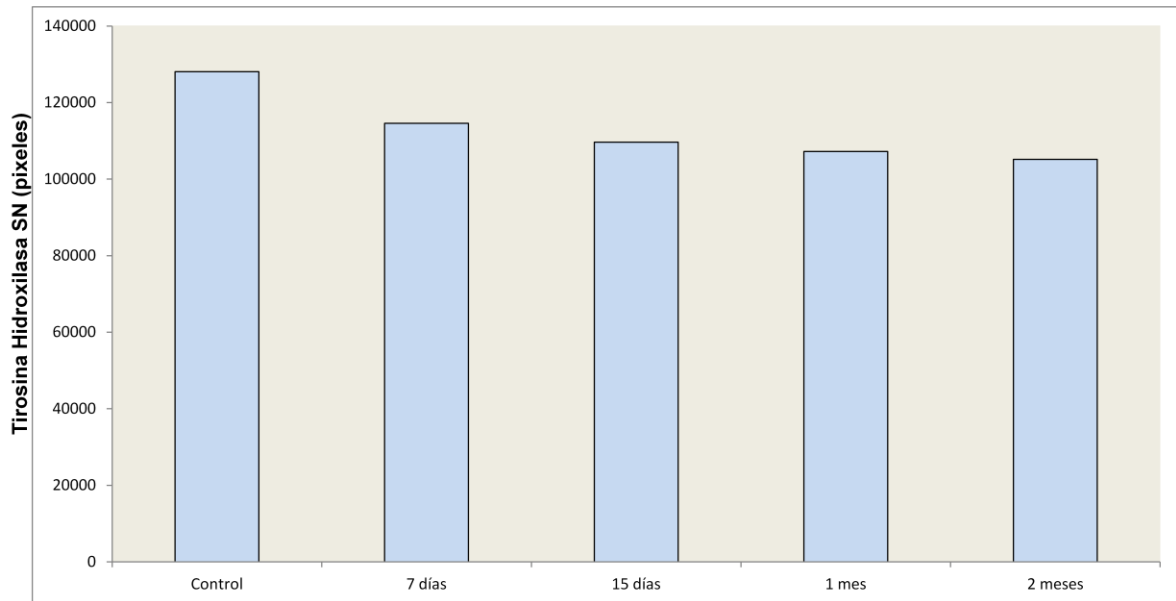


Figura 10. Efecto de la exposición a bajas dosis de ozono en la inmunorreactividad de TH en la *substantia nigra*, medida en pixeles (ordenadas), en los diferentes tiempos del tratamiento (abscisas). ( $p > 0.05$  contra el grupo control).

Por otro lado, en el Western Blot se observa una disminución progresiva en la inmunorreactividad a partir del grupo expuesto a 7 días de ozono.

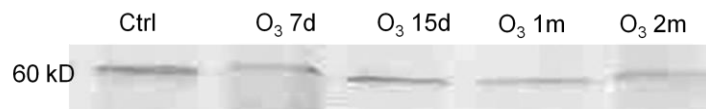


Figura 11. Western blot que muestra los cambios en la cantidad de TH en la *substantia nigra* en los diferentes tiempos de exposición a ozono ( $n=4$ ).

#### 14.4 Tirosina hidroxilasa en estriado

Observamos en la IHQ contra TH que en el estriado existen cambios morfológicos en las terminaciones de las células dopaminérgicas, existe una desorganización en la distribución de la TH a partir de los 15 días de exposición a ozono. A los dos meses de exposición podemos observar que el patrón de organización se perdió por completo.

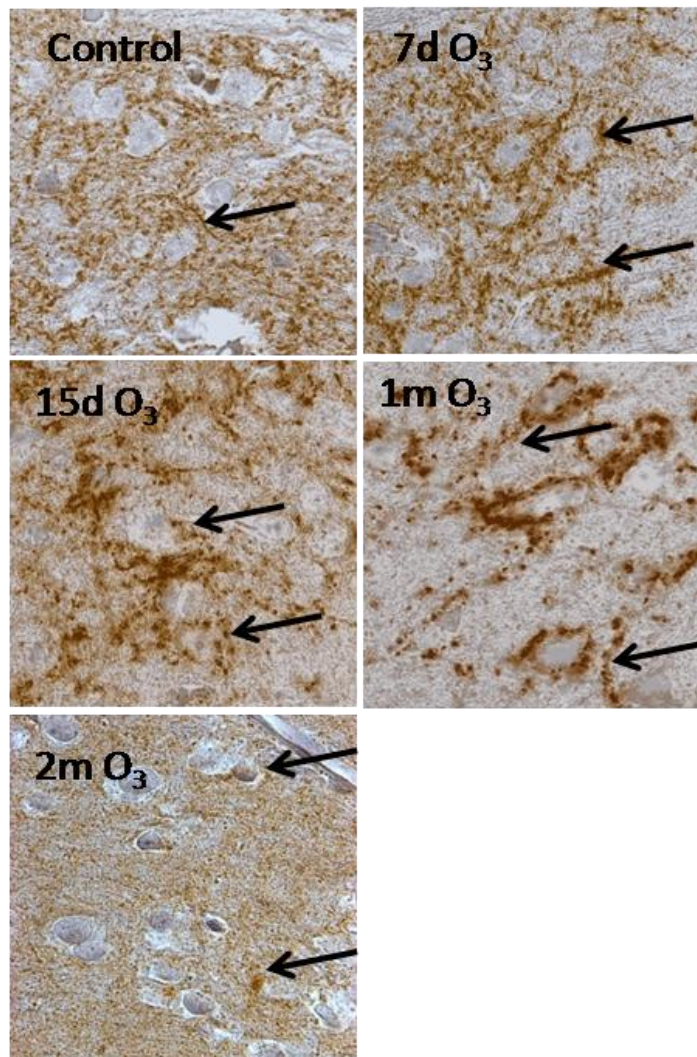


Fig 12. Micrografía que muestra la IHQ contra TH en el estriado. Las flechas señalan los cambios en la distribución de la TH de las células dopaminérgicas, podemos apreciar cómo se va modificando este patrón con el paso de los días del tratamiento (100x).

El análisis estadístico realizado (Kruskal Wallis seguido de U. de Mann-Whitney) sobre la inmunorreactividad de la TH en el estriado, medida en pixeles con el software *Image J*, muestra cambios significativos ( $p < 0.05$ ) en los grupos de 1 mes y dos meses de exposición a ozono comparados con el grupo control. Podemos observar que existe una disminución en la inmunorreactividad en estos grupos.

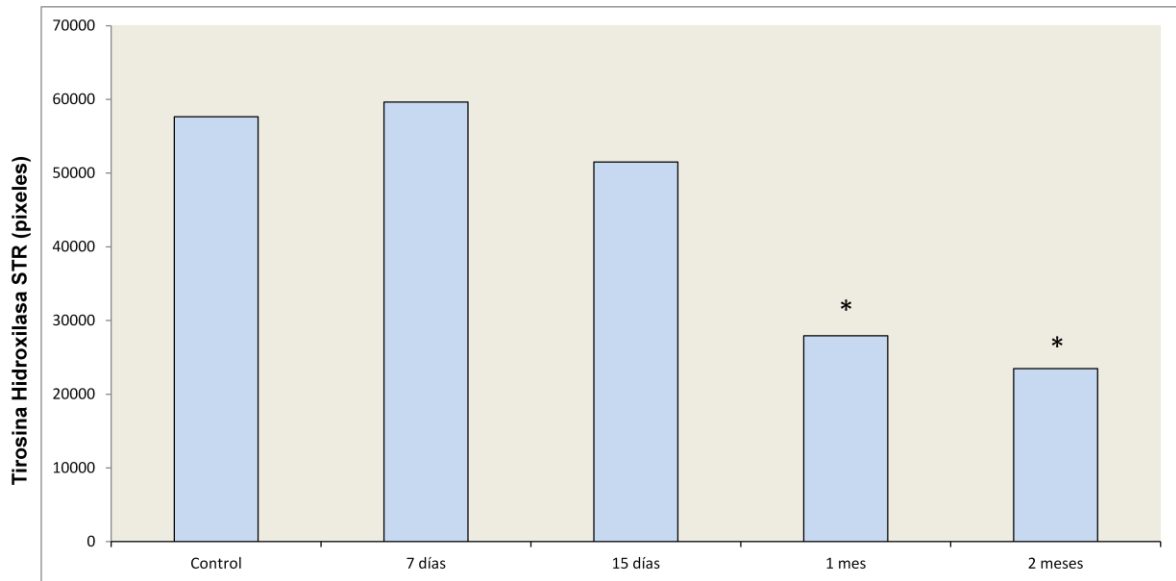


Figura 13. Efecto de la exposición a ozono en la inmunorreactividad de la TH en el estriado, medida en pixeles (ordenadas), en los diferentes tratamientos (abscisas). (\* $p < 0.05$  contra el grupo control).

En el Western Blot podemos observar un incremento en la cantidad de TH en los grupos de 7 y 15 días de exposición a ozono y disminuye en los grupos de 1 mes y 2 meses del tratamiento.

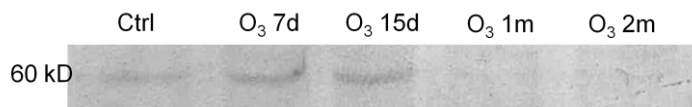


Figura 14. Western blot que muestra los cambios en la cantidad de TH en el estriado en los diferentes tiempos de exposición a ozono ( $n=4$ ).



### 14.5 Sinaptofisina en *substantia nigra*

En la IHQ contra sinaptofisina en la *substantia nigra*, podemos observar que la exposición a ozono causó una disminución de sinaptofisina a medida que transcurren los días de tratamiento. Esta disminución se observa notoriamente al mes y dos meses de exposición.

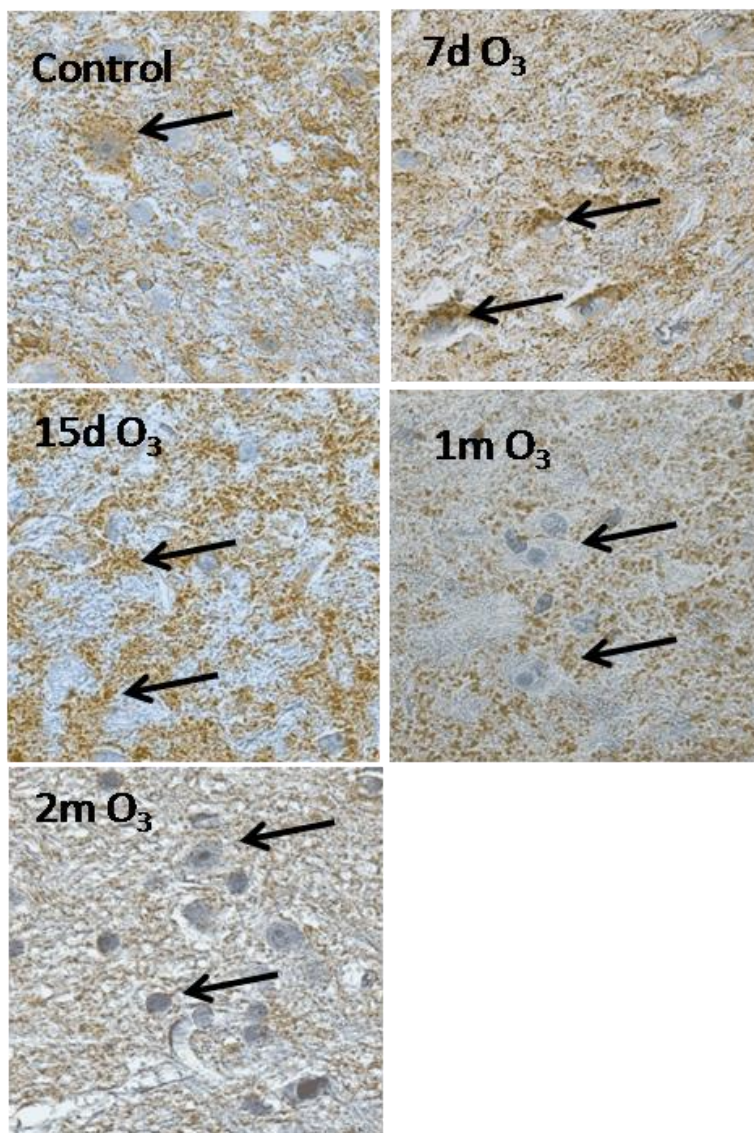


Figura 15. Micrografía que muestra la IHQ contra sinaptofisina en la *substantia nigra*. Las flechas señalan algunas zonas en donde se aprecian las presinapsis y cómo cambia el número de estas con el paso de los días de tratamiento con ozono (100x).

Realizando el análisis estadístico (Kruskal Wallis seguido de U. de Mann-Whitney) sobre la inmunorreactividad de la sinaptofisina en la *substantia nigra*, medida en pixeles con el software *Image J*, observamos que existen cambios significativos ( $p < 0.05$ ) en los grupos de 1 mes y dos meses de exposición a ozono comparados con el grupo control. En estos grupos existe una disminución en la inmunorreactividad contra sinaptofisina.

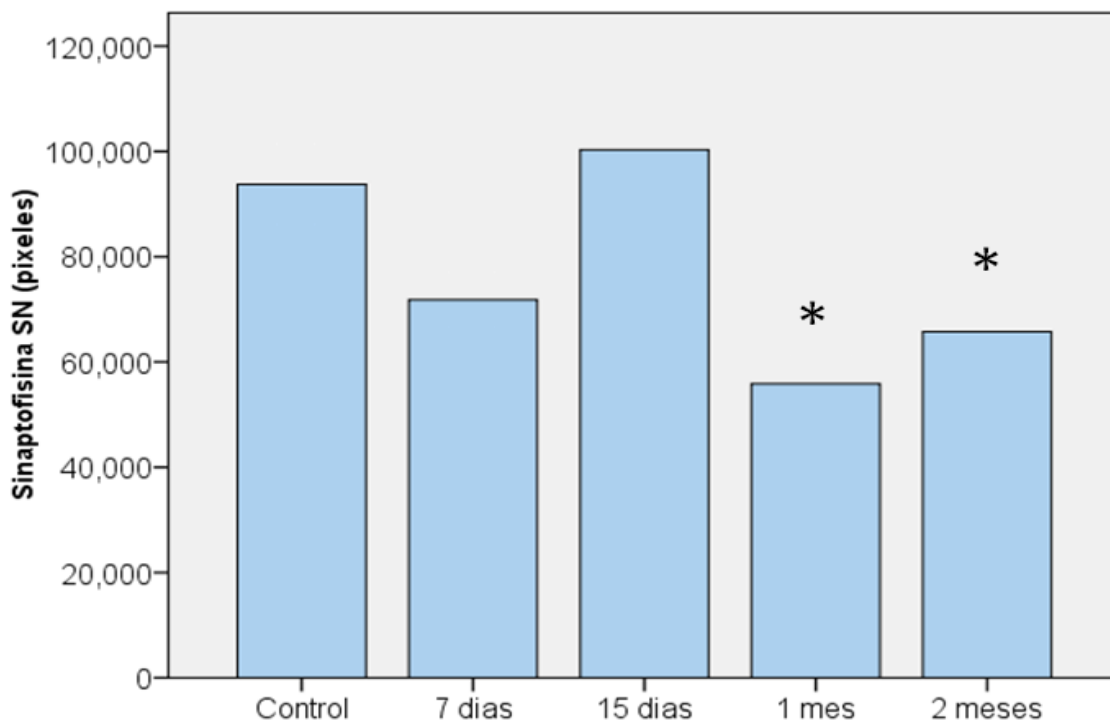


Figura 16. Efecto de la exposición a bajas dosis de ozono en la inmunorreactividad de la sinaptofisina en la *substantia nigra*, medida en pixeles (ordenadas), en los diferentes días de tratamiento (abscisas) (\* $p < 0.05$  contra el grupo control).

Los resultados del western blot realizado muestra un patrón similar en la cantidad de sinaptofisina en *substantia nigra*. Podemos observar una disminución progresiva a partir del grupo expuesto 15 días a ozono.

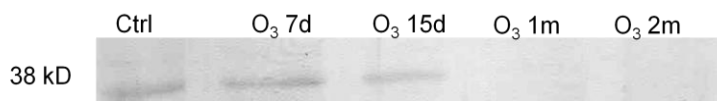


Figura 17. Western blot que muestra los cambios en la cantidad de sinaptofisina en la *substantia nigra* a los diferentes días de tratamiento ( $n=4$ ).

### 14.6 Sinaptofisina en estriado

Podemos observar en la IHQ contra sinaptofisina que en el estriado existen cambios en las presinapsis de las proyecciones de las células dopaminérgicas. Existe un aumento de la proteína a partir de los 15 días de exposición a ozono y a los dos meses disminuye notablemente.

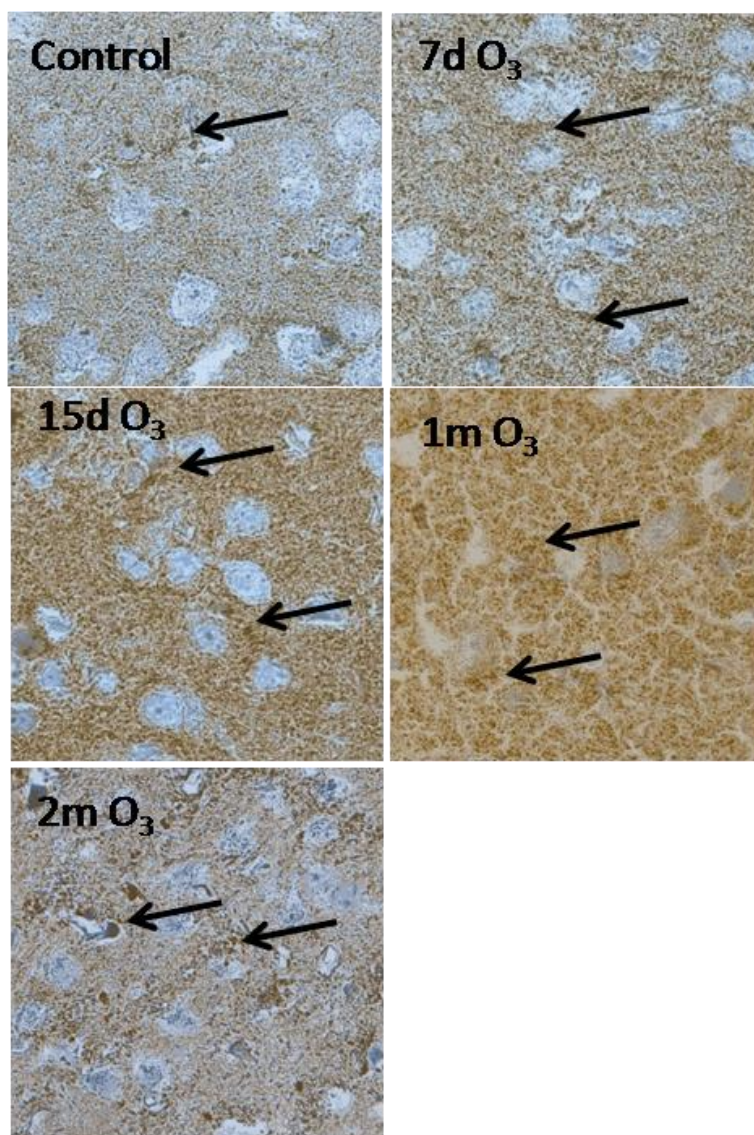


Figura 18. Micrografía que muestra la IHQ contra sinaptofisina en el estriado. Las flechas señalan algunas zonas en donde se aprecian las presinapsis y cómo cambia el número de estas con el paso de los días de tratamiento con ozono (100x).

Al aplicar un análisis estadístico (Kruskal Wallis seguido de U. de Mann-Whitney) sobre la inmunorreactividad de la sinaptofisina en el estriado, medida en pixeles con el software *Image J*, observamos que existe un cambio significativo ( $p < 0.05$ ) en el grupo de 1 mes de exposición a ozono comparados con el grupo control. En este grupo existe un aumento en la inmunorreactividad contra sinaptofisina.

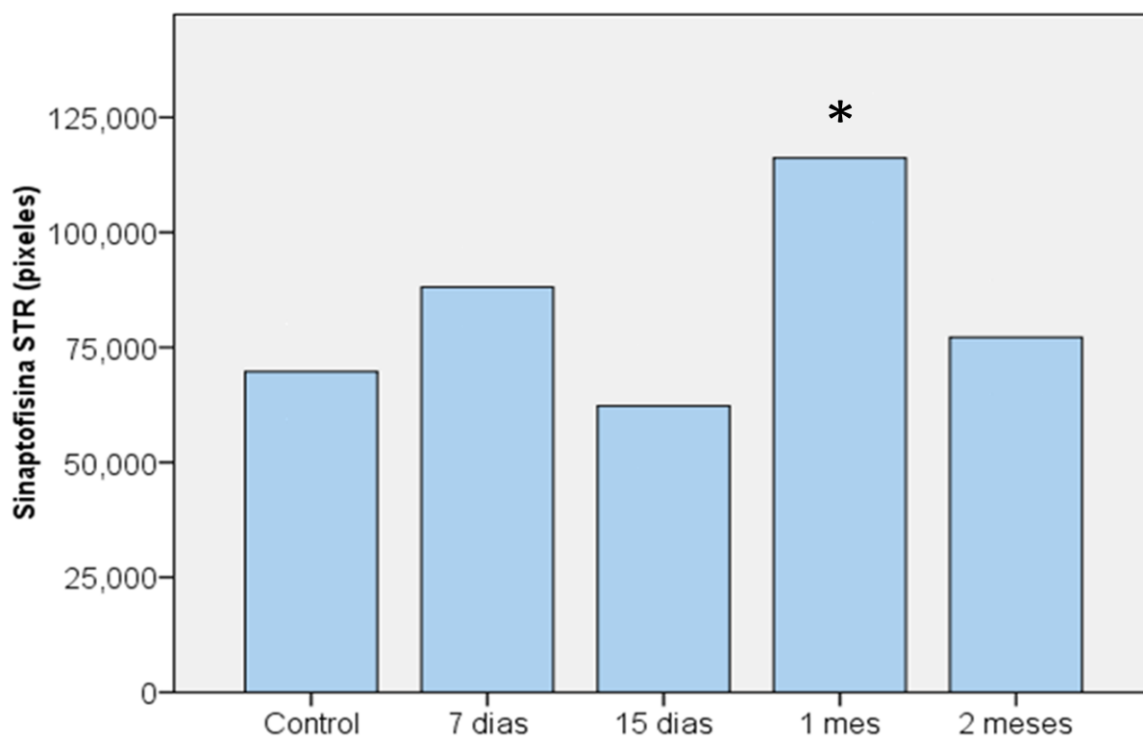


Figura 19. Efecto de la exposición a bajas dosis de ozono sobre la inmunorreactividad de la sinaptofisina en el estriado, medida en pixeles (ordenadas), en los diferentes días de tratamiento (abscisas) (\* $p < 0.05$  contra el grupo control).

En el Western Blot realizado observamos un incremento en la cantidad de sinaptofisina en el estriado, el cual es mayor en el grupo de un mes de tratamiento. Pero disminuye nuevamente en el grupo expuesto 2 meses a ozono.

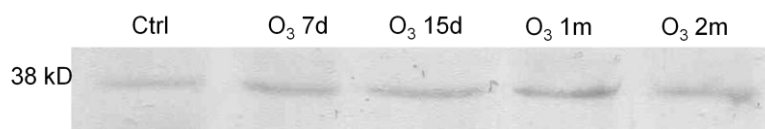


Figura 20. Western blot que muestra los cambios en la cantidad de sinaptofisina en los diferentes días de tratamiento (n=4)



### 14.7 DARPP32 en *substantia nigra*

En la IHQ contra DARPP32 en la *substantia nigra*, la exposición a ozono causo un incremento en la inmunorreactividad de esta proteína, la cual fue mayor al mes de tratamiento.

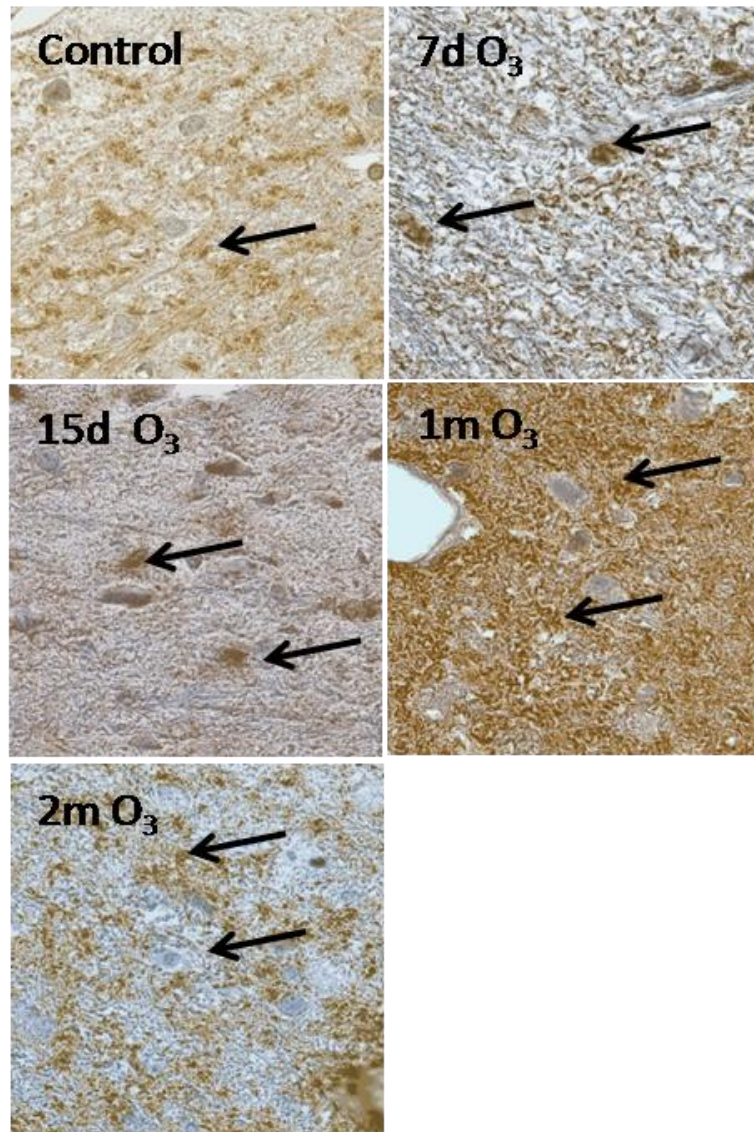


Figura 21. Micrografía que muestra la IHQ contra DARPP32 en la *substantia nigra*. Las flechas señalan núcleos de células dopaminérgicas y observamos cómo cambia la inmunorreactividad alrededor de estos (100x).

Realizando un análisis estadístico (Kruskal Wallis seguido de U. de Mann-Whitney) sobre la inmunorreactividad del DARPP32 en la *substantia nigra*, medida en pixeles con el software *Image J*, observamos que existe un cambio significativo ( $p < 0.05$ ) en el grupo de 1 mes de exposición a ozono comparados con el grupo control. En este grupo existe un aumento en la inmunorreactividad contra DARPP32.

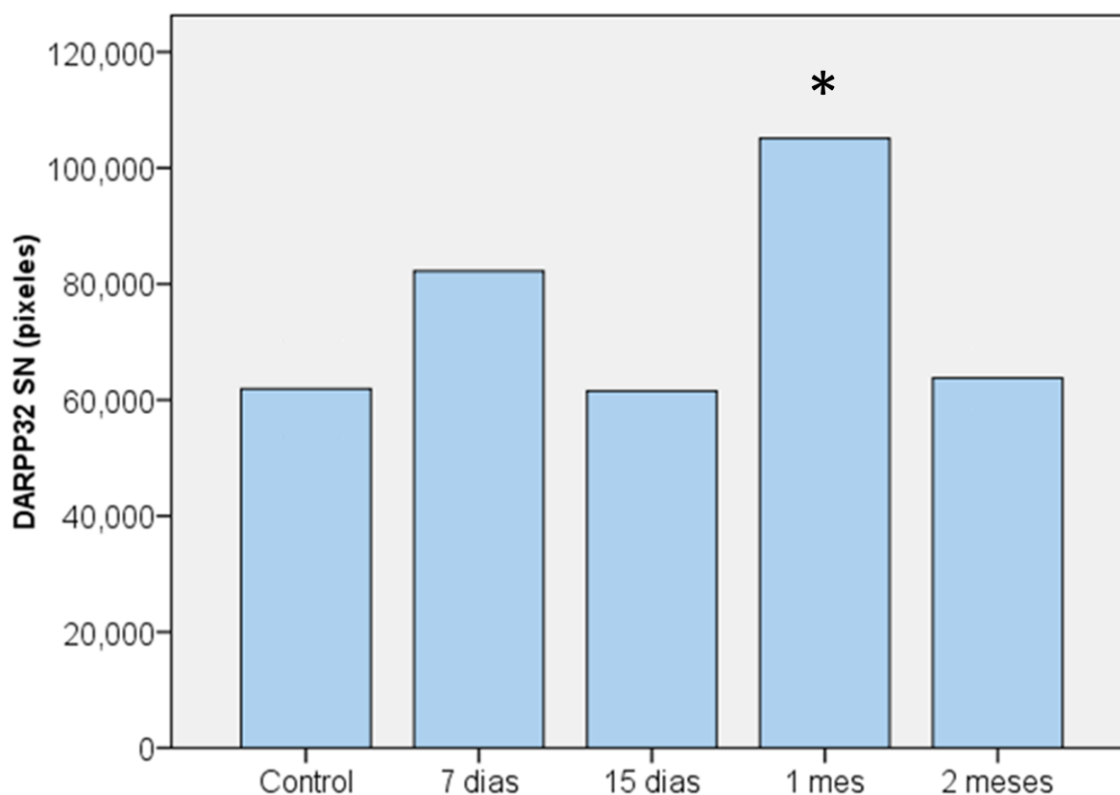


Figura 22. Efecto de la exposición a bajas dosis de ozono sobre la inmunorreactividad del DARPP32 en la *substantia nigra*, medida en pixeles (ordenadas), en los diferentes días de tratamiento (abscisas) (\* $p < 0.05$  contra el grupo control).

Por otro lado, en el Western Blot realizado observamos una disminución en la cantidad de DARPP32 en la *substantia nigra* en el grupo de 15 días de tratamiento.

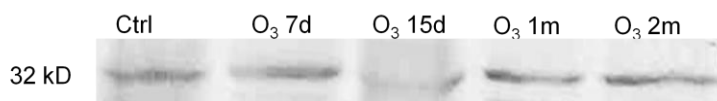


Figura 23. Western blot que muestra los cambios en la cantidad de DARPP32 en la *substantia nigra* a los diferentes días de tratamiento (n=4).

### 14.8 DARPP32 en estriado

En la IHQ contra DARPP32 en el estriado observamos que existe un incremento en la inmunorreactividad a esta proteína al mes de exposición a ozono mientras que en el grupo de dos meses disminuye notablemente.

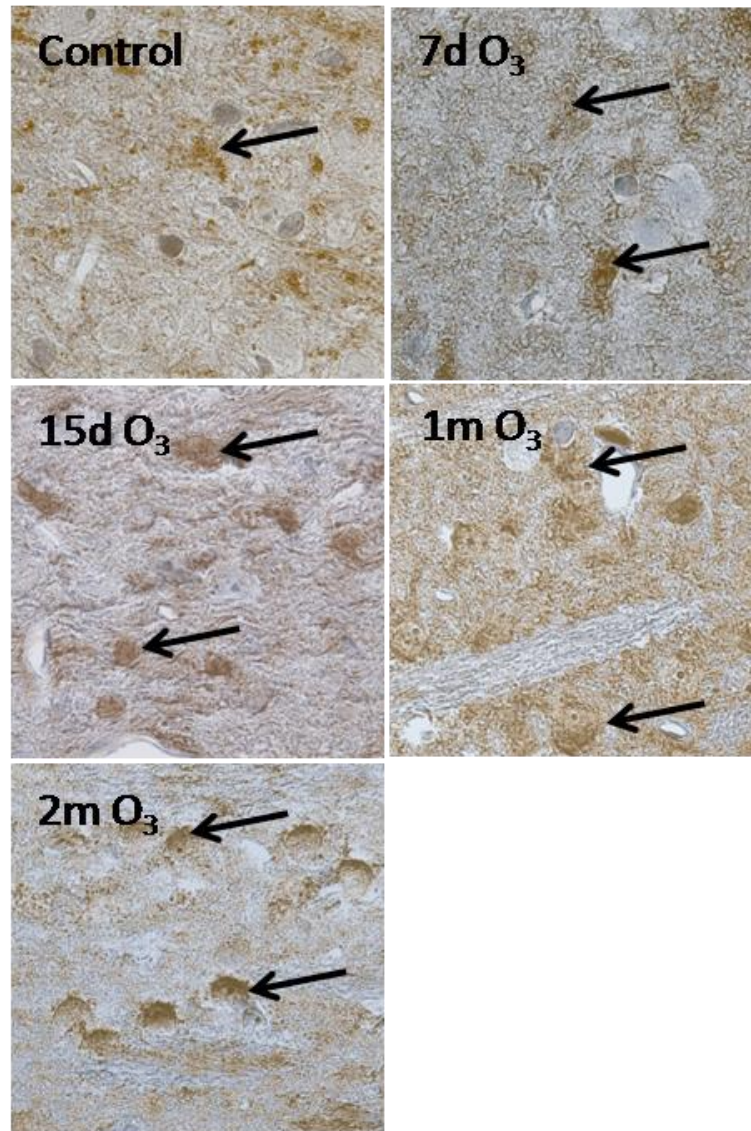


Figura 24. Micrografía que muestra la IHQ contra DARPP32 en la *substantia nigra*. Las flechas señalan núcleos de células dopaminérgicas y observamos cómo cambia la inmunorreactividad alrededor de estos (100x).

Al aplicar el análisis de estadístico (Kruskal Wallis seguido de U. de Mann-Whitney) sobre la inmunorreactividad del DARPP32 en el estriado, medida en pixeles con el software *Image J*, observamos que existe un incremento significativo ( $p < 0.05$ ) en los grupos de 7 días y 1 mes de de exposición a ozono comparados con el grupo control.

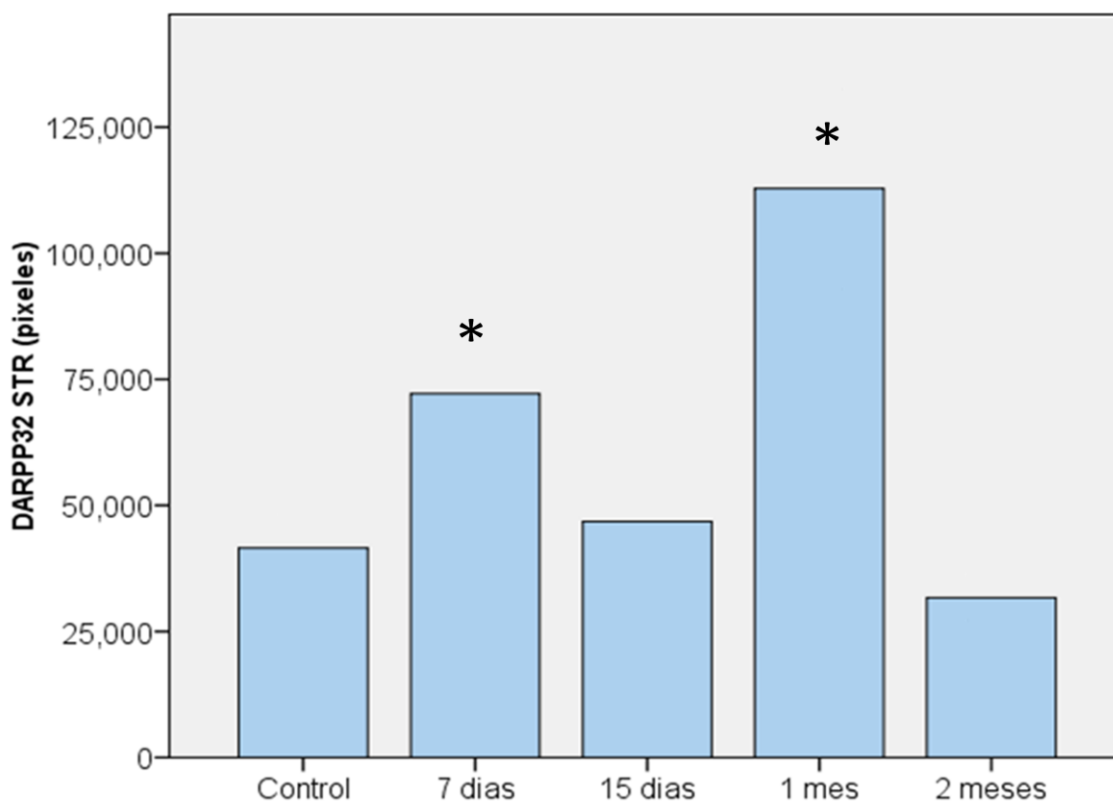


Figura 25. Efecto de la exposición a ozono sobre la inmunorreactividad de DARPP32 en la *substantia nigra*, medida en pixeles (ordenadas), en los diferentes días de tratamiento (abscisas) (\* $p < 0.05$  contra el grupo control).

Por otro lado, en el western blot se observa una ligera disminución en la inmunorreactividad a los 7 días de tratamiento y se incrementa de forma progresiva hasta los dos meses del tratamiento.

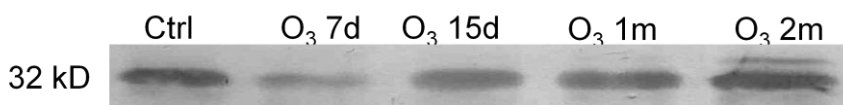


Figura 26. Western blot que muestra los cambios en la cantidad de DARPP32 en el estriado a los diferentes días de tratamiento (n=4).

## 14.9 Espinofilina

Al realizar el western blot contra espinofilina en la *substantia nigra*, observamos un incremento en la cantidad de proteína a partir de los 7 días de exposición a ozono, sin embargo ésta disminuye al mes y dos meses del tratamiento.

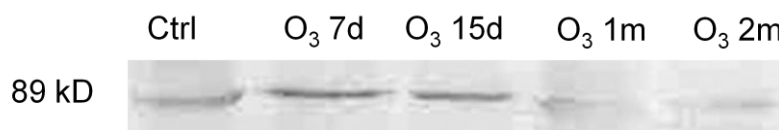


Figura 27. Western blot que muestra los cambios en la cantidad de espinofilina en la *substantia nigra* a los diferentes días de tratamiento (n=4).

Por otro lado, al realizar el western blot contra espinofilina en el estriado, observamos que existe un incremento en la cantidad de proteína a partir del grupo de 7 días de exposición a ozono y ésta se incrementa de manera progresiva hasta los dos meses del tratamiento.



Figura 28. Western blot que muestra los cambios en la cantidad de espinofilina en el estriado a los diferentes días de tratamiento (n=4).

## 15. DISCUSIÓN

El estado de estrés oxidativo está presente en la EP y contribuye a la progresión de esta enfermedad. La EP está caracterizada por la neurodegeneración progresiva de las células dopaminérgicas, una disminución en la concentración de dopamina y pérdida de neuromelanina. En esta enfermedad las neuronas de la *substantia nigra compacta* son las que se afectan principalmente (Cui et al., 2004).

Resultados previos en nuestro laboratorio han mostrado que la exposición crónica a ozono (0.25 ppm) causa un estado estrés oxidativo en diferentes estructuras cerebrales (Rivas-Arancibia et al., 2003). Este modelo se ha utilizado para estudiar las diversas etapas del daño neurodegenerativo en el tejido cerebral así como el daño oxidativo y muerte celular.

### ***Proteínas oxidadas***

La oxidación de proteínas es un marcador confiable del estado de estrés oxidativo (Friedman et al., 2004), debido a que produce daño directo sobre estas, generando diversos productos oxidantes y dañando diferentes estructuras celulares.

Nuestros resultados sugieren que la exposición crónica a bajas dosis de ozono, está generando un incremento de proteínas oxidadas en *substantia nigra* a partir de los 7 días de exposición a ozono (figura 7). Asimismo en el estriado existe un incremento significativo de proteínas oxidadas con respecto al grupo control en todos los tratamientos (figura 8).

Con estos datos podemos concluir que este incremento de Proteínas oxidadas se presenta conforme se va estableciendo un estado de estrés oxidativo en la vía nigroestriatal.

Resultados previos en nuestro laboratorio, indican que la actividad de los sistemas antioxidantes (p.e. SOD Cu/Zn) va disminuyendo a medida que transcurre el

tiempo de exposición a ozono, siendo significativa esta disminución al mes y dos meses de tratamiento. Lo anterior indica que a los 7 y 15 días existe un incremento importante de las ROS, sin embargo, a partir del mes de exposición a ozono se establece un estado crónico de estrés oxidativo irreversible.

### ***Tirosina hidroxilasa***

La tirosina hidroxilasa, una proteína de 58 kD, es la enzima limitante en la síntesis de catecolaminas. Cataliza la hidroxilación de tirosina a L-DOPA. Cuando existe una demanda del neurotransmisor en la sinapsis catecolaminérgicas, la TH genera más DOPA la cual, después de ser descarboxilada a dopamina, es transferida dentro de las vesículas sinápticas por el transportador vesicular monoamina (VMAT). La entrada de  $Ca^{2+}$  causa el vaciado de las vesículas en el espacio sináptico (Daubner et al., 2011).

Nuestros resultados muestran que la TH en la *substantia nigra*, modifica su distribución en los procesos de las neuronas dopaminérgicas a partir del mes de exposición a ozono, debido probablemente a que se va perdiendo la organización del citoesqueleto (Adam-Vizi y Starkov, 2010). Estos cambios se establecen dependiendo del tiempo de exposición a ozono a medida que el estrés oxidativo se vuelve crónico (figura 9).

Sin embargo aunque se presentan cambios morfológicos, cuando analizamos estas imágenes con el software *Image J* y realizamos pruebas estadísticas, la expresión de la inmunorreactividad no cambia de forma significativa con respecto al control (figura 10). Este patrón se observa también en los resultados obtenidos por western blot (figura 11). Esto se debe probablemente a que, aunque los cambios morfológicos son evidentes, la cantidad de esta enzima se conserva debido a un mecanismo compensatorio por parte de las neuronas que sobreviven (Calne y Zigmond, 1991).



En el estriado, mediante IHQ, encontramos una distribución morfológica de la TH similar a la observada en la *substantia nigra*, sin embargo esta aparece a partir de los 15 días de tratamiento (figura 12). También se observa morfológicamente una desorganización generalizada en las fibras dopaminérgicas, y con el análisis estadístico realizado a los resultados obtenidos con el software *Image J*, una disminución significativa de la TH al mes y dos meses de exposición a ozono con respecto al control (figura 13), lo que se observa también en los resultados adquiridos por western blot (figura 14). Por consiguiente suponemos que se pierden progresivamente las proyecciones de las neuronas dopaminérgicas. Esta disminución de TH en el estriado está relacionada con alteraciones de la vía dopaminérgica y muerte de estas neuronas (Santiago-López et al., 2010).

El estado de estrés oxidativo causado por la exposición crónica a bajas dosis de ozono produce cambios en la distribución de TH que pueden estar asociados a cambios morfológicos en el citoesqueleto (Adam-Vizi y Starkov, 2010).

### ***Sinaptofisina***

La sinaptofisina (syp) es una proteína de 38 kD característica de las vesículas sinápticas, por este motivo es utilizada ampliamente como marcador de terminales presinápticas (Kwon y Chapman, 2011). Resultados recientes sugieren que juega un papel importante en la regulación de la transmisión sináptica en los circuitos neurales involucrados en el aprendizaje y la memoria (Schmitt et al., 2009).

En nuestros resultados observamos, en la *substantia nigra* con IHQ, que existe una disminución en la inmunorreactividad al mes y dos meses de tratamiento (figura 15). Realizando el análisis con el software *Image J* y aplicando pruebas estadísticas a los resultados, vemos que existe una diferencia significativa en estos grupos con respecto al control (figura 16). El western blot muestra una disminución en la



inmunorreactividad para sinaptofisina con el mismo patrón (figura 17). Esta disminución de sinaptofisina coincide con el incremento del estado de estrés oxidativo tal como lo describe Smythies (Smythies, 1999).

Sin embargo en el estriado la IHQ contra sinaptofisina, muestra un incremento en la inmunorreactividad (figura 18). Utilizando el software *Image J* y aplicando pruebas estadísticas, observamos que existe un incremento significativo al mes de tratamiento con respecto al grupo control (figura 19). Asimismo en el Western Blot también se observa un incremento de la sinaptofisina en el mismo grupo experimental (figura 20).

Esto sugiere que el estrés oxidativo está jugando un papel importante en el crecimiento y eliminación de las sinapsis en la vía nigroestriatal, ya que aunque existe una disminución de la sinaptofisina en la *substantia nigra*, en el estriado el aumento al mes de exposición a ozono puede ser un mecanismo compensatorio, ya que al disminuir la TH (debido a la muerte de las neuronas dopaminérgicas), las células que sobreviven incrementan el número de sinapsis.

### **DARPP32**

Por otro lado el DARPP32, una proteína de 32 kD, se encuentra localizado en las neuronas que contienen receptores a dopamina y es un potente inhibidor de la proteína fosfatasa 1, la cual tiene un papel central en la señalización dopaminérgica y glutamatérgica, y en la integración de la actividad de estas dos vías. La dopamina, actuando a través de los receptores D1 y la proteína G adenilato ciclasa estimuladora  $G_S/G_{Olf}$ , activa la adenilato ciclasa activando con ello a la proteína cinasa A (PKA) que median la fosforilación de DARPP32. En contraste, actuando a través del receptor D2 y las proteínas adenilato ciclasa inhibitorias  $G_i$ , la dopamina reduce la fosforilación de DARPP32 (Gould, 2005).

Los resultados de la IHQ muestran que la expresión de DARPP32 en la *substantia nigra* se incrementa al mes de exposición a ozono (figura 21). Aplicando el software *Image J* y analizando estadísticamente estos resultados observamos que existe un incremento significativo en este grupo con respecto al control (figura 22). Estos resultados indican que los receptores D1 se están activando, esto conlleva a una mayor actividad de PP1 que está relacionada con un incremento de espinas dendríticas (Brown et al., 2008).

En la IHQ realizada podemos observar que en el estriado existe un incremento al mes de exposición a ozono. Sin embargo, al analizar las imágenes con *Image J* y aplicar pruebas estadísticas, encontramos que a los 7 días y al mes de exposición a ozono existe un incremento significativo (figura 24). Por otro lado el Western Blot indica una disminución a los 7 días y después existe un incremento progresivo (figura 26).

### ***Espinofilina***

Por otro lado, se realizó western blot contra espinofilina (Sph). La espinofilina también denominada Ppp1r9b, es una proteína de 89 kD y se denomina así por su localización en las espinas dendríticas. Es una proteína multifuncional que a través de su unión a numerosas proteínas, como F-actina, regula el citoesqueleto y la transducción de señales (Sarrouilhe et al., 2006). También regula la actividad de determinadas enzimas como la proteína fosfatasa 1 (PP1) facilitando su unión al sustrato y su actividad, regula la actividad de determinados GEFs y RGS y por tanto la señalización de las proteínas G también regula la señalización de determinados receptores de membrana como los glutamatérgicos y por tanto la neurotransmisión glutamatérgica, regula el estado de fosforilación y la función de determinados canales iónicos y parece intervenir en el proceso de supresión del crecimiento a través de su unión a ARF. Por otro lado, se ha descrito que espinofilina se une a la proteína doblecortina (DCX). Se ha visto que la espinofilina es un mediador imprescindible de la

supresión del crecimiento independiente de anclaje producida por DCX (Santra et al., 2006).

La proteína cinasa dependiente de calcio/calmodulina II (CaMKII) y la PP1 son críticas para la plasticidad sináptica. La autofosforilación de CaMKII en la Thr286 es requerida para la potenciación a largo plazo y por lo tanto para la memoria y el aprendizaje. La PP1 desfosforila selectivamente a CaMKII que está asociada con la densidad postsináptica. La inhibición de PP1 promueve la autofosforilación en la Thr286 y la inducción de la potenciación a largo plazo (Brown et al., 2000). Así que la regulación coordinada de CaMKII y PP1 es fundamental en la fisiología normal de las sinapsis (Brown et al., 2008).

Se piensa que muchos de los efectos agudos de la dopamina requieren la inhibición de PP1 en el estriado por la forma fosforilada de DARPP32 (Pisani et al., 2005; Svenningsson et al., 2004), aunque la reducción en la actividad de PP1 no ha sido demostrada directamente. La regulación de la localización de la PP1 por espinofilina y neurabina es crítica para la plasticidad sináptica normal y para la morfología de las espinas dendríticas (Allen et al., 2006; Hu et al., 2006; Wu et al., 2008).

Se ha demostrado que la pérdida selectiva crónica de dopamina en el estriado decrementa la actividad de la isoforma PP1 $\gamma$ 1, aparentemente mejorando su asociación con espinofilina. Esta reducción en la actividad de PP1 puede permitir una mayor fosforilación de múltiples proteínas estriatales, incluyendo CaMKII, por lo tanto tiene un papel importante en la mediación de cambios de la morfología y función de las sinapsis (Brown et al., 2008).

Los resultados de western blot muestran que en la *substantia nigra* la expresión de espinofilina se incrementa a los 7 días de exposición a ozono pero disminuye al mes del tratamiento (figura 27). Sin embargo en el estriado, encontramos que existe un pequeño aumento de espinofilina a los 7 días, 1 mes y 2 meses de exposición a ozono (figura 28).

Estos datos nos indican que, el estado de estrés oxidativo induce la eliminación de los procesos neuronales de las células dopaminérgicas a partir del mes de exposición a ozono en la *substantia nigra*, sin embargo, en el estriado, al mes de exposición a ozono se incrementa la inmunorreactividad de espinofilina, lo que nos puede indicar que existe un mecanismo compensatorio que incrementa el número de espinas dendríticas.

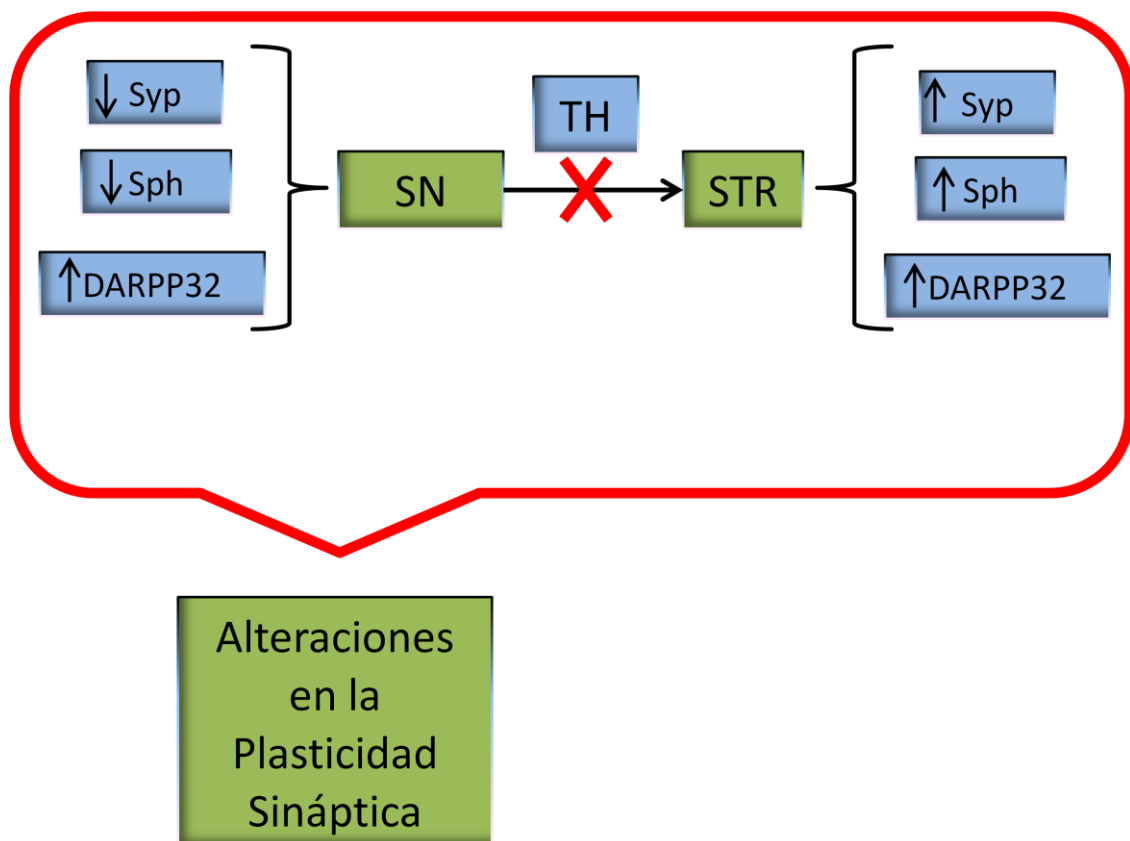


Figura 29. Efecto del estado de estrés oxidativo sobre la plasticidad sináptica de la vía nigroestriatal cuando se ha establecido un estado de estrés oxidativo (1 mes de exposición a ozono).

Por lo tanto podemos concluir que el efecto del estrés oxidativo crónico altera la plasticidad sináptica de la vía nigroestriatal ya que, dependiendo del tiempo de exposición a ozono, se produce una pérdida de sinapsis y se activan mecanismos

compensatorios que inducen el crecimiento de nuevas conexiones en las neuronas dopaminérgicas que sobreviven al daño oxidativo.

## 16. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos indican que, bajo las condiciones experimentales anteriormente descritas, podemos concluir lo siguiente:

- La exposición crónica a bajas dosis de ozono causan un estado de estrés oxidativo, que dependiendo del tiempo de exposición, produce alteraciones en la plasticidad sináptica de la vía nigroestriatal.
- Un estado de estrés oxidativo induce cambios morfológicos en la distribución de la TH de las neuronas dopaminérgicas.
- El estado de estrés oxidativo genera modificaciones en las presinapsis de las neuronas de la vía nigroestriatal.
- El estado de estrés oxidativo altera la señalización de los receptores a dopamina D1, provocando la fosforilación de DARPP32 y alterando por consiguiente a PP1 y CaMKII.
- Un estado de estrés oxidativo modifica la plasticidad sináptica de la vía nigroestriatal, induciendo crecimiento y eliminación de sinapsis en la misma.

## 17. BIBLIOGRAFÍA

- Abou-Sleiman, P. M., Mugit, M. M. K., Wood, W., *Expanding insights of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease*. (2006) *Nat Revs Neurosci* 7:207-19.
- Adam-Vizi, V., Starkov, A. *Calcium and mitochondrial reactive oxygen species generation: how to read the facts*. (2010) *J Alzheimers Dis* 20(2):S413–S42.
- Albin, R. L., Young A., B., Penney J. B., *The functional anatomy of basal ganglia disorders*. (1989) *Trends Neurosci* 12:366–75.
- Allen, P. B., Zachariou, V., Svenningsson, P., Lepore, A. C., Centonze, D., Costa, C., Rossi, S., Bender, G., Chen, G., Feng, J.; *Distinct roles for spinophilin and neurabin in dopamine-mediated plasticity*. (2006) *Neuroscience* 140, 897–911.
- Ambrosio, S., *Alteraciones en el sistemas catecolaminergics induides per la 1-metil-4-fenil-1,2,3,6- tetrahidropiridina (mptp) i pel catio 1-metil-4-fenilpiridini (mpp+): aproximacio experimental a la malaltia de parkinson*. (1988) Tesis Doctoral de la Facultad de Medicina, Universidad de Barcelona.
- Angoa-Pérez, M., Jiang, H., Rodriguez, A., Lemini, C., Levine, R. A., Rivas-Arancibia, S.; *Estrogen counteracts ozone-induced oxidative stress and nigral neuronal death*; (2006) *Neuroreport*. Apr 24;17(6):629-33.
- Antunes, F., Cadenas E. *Estimation of H2O2 gradients across biomembranes*. (2000) *FEBS Lett* 475:121–126.
- Aon, M. A., Cortassa, S., Maack, C., O'rourke, B., *Sequential opening of mitochondrial ion channels as function of glutathione redox thiol status*. (2007) *J Biol Chem* 283:21889-21900.
- Ardanaz, N., Pagano P.J. *Hydrogen peroxide as a paracrine vascular mediator: Regulation and signaling leading to dysfunction*. (2006) *Proc Soc Exp Biol Med* 231:237–251.
- Ballinger, C. A., Cueto, R., Squadrito, G., Coffin, J. F., Velsor, L. W., Pryor, W. A., Postlethwait, E. M., *Antioxidant-mediated augmentation of ozone-induced membrane oxidation*. (2005) *Free Radic Biol Med*. 15;38(4):515-26.
- Beckman, K. B., Ames, B. N., *The free radical theory of aging matures*. (1998) *Physiol. Rev* 78, 547-581.
- Behar, D., Czapski, G., Rabami, J., Dorfman, I. M., Schwarz, H. A., *The acid dissociation constant and decay kinetics of parthydroxyl radical*. (1979) *J. Phys. Chem*, 72, pp. 3209-3215.
- Berg, D, Youdim, M. B, Riederer, P., *Redox imbalance*. (2004) *Cell Tissue Res* 318:201 13.
- Bineda, Z., Kim, C. S., *Increase in levels of total free acids in rat brain region following 3-nitropropionic acid administration*. (1997) *Neurosci Lett* 230:199-201.
- Biniert, G. P., Schjoerring, J. K., Jahn, T. P., *Membrane transport of hydrogen peroxide*. (2006) *Biochim Biophys Acta* 1758:994-1003.
- Bocci, V., Valacchi G., Corradeschi F., Aldinucci C., Silvestri S., Paccagnini E., Gerli R. *Studies on the biological effects of ozone: 7. Generation of reactive oxygen species (ROS) after exposure of human blood to ozone*. (1998) *J Biol Regul Homeost Agents* 12:67–75.

- Bocci V., *Is it true that ozone is always toxic? The end of a dogma.* (2006) *Toxicol Appl Pharmacol.* Nov 1;216(3):493-504.
- Bocci, V., *The Question of Balance: The Interaction Between Blood and Ozone.* (2008) *Oxidants in Biology*, Ed. Springer 13:155-166
- Boveris, A., Chance, B., *The mitochondrial generation of hydrogen peroxide.* (1973) *Biochem J* 134, pp. 707-716.
- Brezhestovskii, P. D., *Physiology of synapse: from molecular modules to retrograde modulation.* (2010) *Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova.* 96(9):841-60.
- Brown, A. M., Baucum, A. J., Bass, M. A., Colbran, R. J.; *Association of Protein Phosphatase 1 $\gamma$ 1 with Spinophilin Suppresses Phosphatase Activity in a Parkinson Disease Model.* (2008) *J. of Bio Chem* 283 21:14286-14294.
- Brown, G. P., Blitzer, R. D., Connor, J. H., Wong, T., Shenolikar, S., Iyengar, R., and Landau, E. M., *Long-Term Potentiation Induced by  $\hat{I}$ , Frequency Stimulation Is Regulated by a Protein Phosphatase-1-Operated Gate.* (2000) *J. Neurosci* 20, 7880 – 7887
- Bruel-Jungerman, E. Lucassen, P.J. Francis, F. (2011). Cholinergic influences on cortical development and adult neurogenesis. *Behav Brain Res*, 10, 221, 2, pp. 379-88.
- Buetler, T. M., Krauskopf A., Ruegg U. T. *Role of superoxide as a signaling molecule.* (2004) *News Physiol Sci* 19:120–123.
- Calne, D. B., Zigmond, M. J., *Compensatory mechanisms in degenerative neurologic diseases. Insights from parkinsonism.* (1991) *Arch Neurol* 48:361-363.
- Chakravarthy, V. S., Denny, J., Bapi, R. S., *What do the basal ganglia do? A modeling perspective.* (2010) *Biol Cybern* 103:237–253.
- Chance, B., Sies, H., Boveris, A., *Hydroperoxide metabolism in mammalian organs.* (1979) *Physiol Rev* 56:527-605.
- Chen, L. C., Qu, Q., *Formation of intracellular free radicals in guinea pig airway epithelium during in vitro exposure to ozone.* (1997) *Toxicol Appl Pharmacol.* 143(1):96-101.
- Chiarugi, P., Fiaschi, T., *Redox signalling in anchorage-dependent cell growth.* (2007) *Cell Signal* 19:672-682.
- Christman, M. F., Morgan, R. W., Jacobson, F. S., Ames, B. N., *Positive control of a regulon for defences against oxidative stress and some heat-shock proteins in Salmonella typhimurium.* (1985) *Cell* 41(3):753-62.
- Ciliax, B. J., Heilman, C., Demchyshyn, L. L., Pristupa, Z. B., Ince, E., Hersch, S. M., Niznik, H. B., Levey, A. I., *The dopamine transporter: immunochemical characterization and localization in brain.* (1995) *J Neurosci.* Mar;15(3 Pt 1):1714-23.
- Clark, D., Boutros, N., Mendez, M., *The brain and behavior.* (2005) Cambridge University Press, Cambridge.
- Cochrane, C. G., *Mechanisms of oxidant injury of cells.* (1991) *Mol Aspects Med* 12:137 47.
- Commoner, B., Townsend, J., Pake, G. E., *Free radicals in biological materials.* (1954) *Nature* 9;174(4432):689-91.
- Contreras-Vidal, J. L., Stelmach, G. E., *Effects of Parkinsonism on motor control.* (1996) *Life Sci* 58:165–176.



Cross, C. E., Rznick, A. Z., Packer, L., Davis, P. A., Susuki, Y. J., Halliwell, B., *Oxidative damage to human plasma proteins by ozone free radicals.* (1992) *Res Commun* 15:347-352.

Cui, K., Luo, X., Xu, K., Ven Murthy, M. R., *Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants.* (2004) *Prog Neuro psychopharmacol Biol Psychiatry* 28:771-99.

Daubner, S. C., Le, T., Wang, S., *Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis.* (2011) *Arch of Biochem and Biophys* 508:1–12

Deby, C., Groutier, R., *New perspectives on the biochemistry of superoxide anion and the efficiency of superoxide dismutases.* (1990) *Biochem Pharmacol* 39:399-405.

Delanty, N., Dichter, M. A., *Oxidative injury in the nervous system.* (1998) *Acta Neurol. Scand.* 98, 145-153.

DeLong, M. R., *Primate models of movement disorders of basal ganglia origin.* (1990) *Trends Neurosci* 13:281–5.

DeLong, M., Wichmann, T.; *Update on models of basal ganglia function and dysfunction.* (2009) *Parkinsonism and Related Disorders* 15S3 S237–S240

Devlin, R. B., McDonnell, W. F., Becker, S., Madden, M. C., McGee, M. P., Perez, R., Hatch, G., House, D. E., Koren, H. S., *Time-dependent changes of inflammatory mediators in the lungs of humans exposed to 0.4 ppm ozone for 2 hr: a comparison of mediators found in bronchoalveolar lavage fluid 1 and 18 hr after exposure.* (1996) *Toxicol Appl Pharmacol.* 138(1):176-85.

Dringen R, Pawlowski PG, Hirrlinger J., *Peroxide detoxification by brain cells.* (2005) *J. Neurosci Res.* 79(1-2):157-65.

Droge, W., *Free radicals in the physiological control of cell function.* (2002) *Physiol Rev* 82(1):47-95.

EPA, U.S. Environmental Protection Agency, (2011) <http://www.epa.gov/air/ozonepollution>

Feldman, D. J., Frank, R. A., Kehne, J. H., Flannery, R., Brown, D., Soni, S., Byrd, G., Shah, S., *Mixed D2/5-HT2 antagonism differentially affects apomorphine- and amphetamine-induced stereotyped behavior.* (1997) *Pharmacol Biochem Behav.* 58(2):565-72.

Fridovich, I., *Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas.* (1989) *J Biol Chem* 264:7761-4.

Friedman, J., *Oxidative Stress and Free Radical Damage in Neurology.* (2011) Human Press 1-18.

Friedman, J. S., Lopez, M. F., Fleming, M. D., Rivera, A., Martin, F. M., Welsh, M. L., Boyd, A., Doctrow, S. R., Burakoff, S. J.; *SOD2-deficiency anemia: protein oxidation and altered protein expression reveal targets of damage, stress response, and antioxidant responsiveness.* (2004) *Blood.* 15;104(8):2565-73.

Fuxe, K., Agnati, L. F., Rosén, L., Bjelke, B., Cintra, A., Bortolotti, F., Tinner, B., Andersson, C., Hasselroth, U., Steinbusch, H., et al. *Computer-assisted image analysis techniques allow a characterization of the compartments within the basal ganglia. Focus on functional compartments produced by d-amphetamine activation of the c-fos gene*

- and its relationship to the glucocorticoid receptor. (1991) *J Chem Neuroanat.* 4(5):355-72.
- Gemma, C., Bachstetter, A. D., Bickford, P. C., *Neuron-Microglia Dialogue and Hippocampal Neurogenesis in the Aged Brain.* (2010) *Aging Dis.* 1;1(3):232-244
- Gerfen, C. R., Engber, T. M., Mahan, L. C., Susel, Z., Chase, T. N., Monsma, Jr. F. J., Sibley, D. R., *D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons.* (1990) *Science* 250:1429–32.
- Gerfen, C. R., Wilson, C. J., *Handbook of chemical neuroanatomy Vol 12: Integrated systems of the CNS, Part III.* (1996) Ed Swanson, L. W., Bjorklund, A. and Hokfelt, T. 371-468
- Gomberg, M., *Preparation of Triphenylchloromethane.* (1900) *J. Am. Chem. Soc.,* 22 (12): 815-815
- Gould, T. T., Manji, H. K., *DARPP32: A molecular Switch Add the nexus of reward pathway plasticity.* (2005) *PNAS* January 11 (102) 2:253-254
- Graham., D. G., *Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinines.* (1978) *Mol Pharmacol* 14, 633-643.
- Gutteridge, J. M., Halliwell, B., *Iron toxicity and oxygen radicals.* (1989) *Baillieres Clin Hematol* 2(2):195-256.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M., *Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and antioxidant therapy.* (1984) *Lancet* 23:1396-98.
- Halliwell, B., Aruoma, O. I., *DNA damage by oxygen derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems.* (1991) *FEBS Lett* 28:9 19.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M., *Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview.* (1990) *Methods Enzymol* 186:1 85.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C., *Free radicals in biology and medicine.* (2007) 4th ed Oxford University Press, Oxford,
- Halliwell, B., *Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?* (2006) *J Neurochem* 97:1634 58.
- Halliwell, B., Clement, M. V., Long, L. H., *Hydrogen peroxide in the human body.* (2000) *FEBS Lett* 486:10–13.
- Harman, D., *Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry.* (1956) *J. Gerontol* 11(3):298-300.
- Hersch, S. M., Ciliax, B. J., Gutekunst, C. A., Rees, H. D., Heilman, C. J., Yung, K. K., Bolam, J. P., Ince, E., Yi, H., Levey, A. I., *Electron microscopic analysis of D1 and D2 dopamine receptor proteins in the dorsal striatum and their synaptic relationships with motor corticostriatal afferents.* (1995) *J Neurosci.* 15(7 Pt 2):5222-37.
- Hersch, S. M., Yi, H., Heilman, C. J., Edwards, R. H., Levey, A. I., *Subcellular localization and molecular topology of the dopamine transporter in the striatum and substantia nigra.* (1997) *J Comp Neurol.* 17;388(2):211-27
- Hermida-Ameijeiras, A., Méndez-Álvarez, E., Sánchez-Iglesias, S., Sanmartín-Suárez, C., Soto-Otero, R., *Autoxidation and MAO-mediated metabolism of dopamine as potential cause of oxidative stress: role of ferrous and ferric ions.* (2004) *Neurochem Int* 45, 103-116.

Hernández-Saavedra, D., McCord, J. M., *Evolution and free radicals. Importance of oxidative stress in human pathology.* (2007) *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 45(5):477-84.

Hool, L. C., Corry, B., *Redox control of calcium channels: from mechanisms to therapeutic opportunities.* (2007) *Antioxid Redox Signal* 9:409-435.

Hu, X. D., Huang, Q., Roadcap, D. W., Shenolikar, S. S., Xia, H., *Actin-associated neurabin-protein phosphatase-1 complex regulates hippocampal plasticity.* (2006) *J Neurochem* 98, 1841–1851.

Huheey, J. E., Keiter, E. A., Keiter, R. L., *QUIMICA INORGANICA Principios de estructura y reactividad.* (2003) Oxford University Press, 4th Ed 24-25.

Ibrahim, W., Lee, U. S., Yen, H. C., St Claire, D. K., Chow, C. K., *Antioxidant and oxidative status in tissues of manganese superoxide dismutase transgenic mice.* (2000) *Free Radic Biol Med* 28:397-402.

Imlay, J. A., Chin, S. M., Linn, S., *Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro.* (1988) *Science* 240:1302 9.

Jain, A., Martensson, J., Stole, E., Auld, P. A., Meister, A., *Glutathione deficiency leads to mitochondrial damage in brain.* (1991) *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:1913 7.

Jenner, P., Olanow, C.W., *Understanding cell death in Parkinson's disease.* (1998) *Ann Neurol* 44, S72-S84.

Kanofsky, J. R., Sima, P. D., *Singlet-oxygen generation at gas-liquid interfaces: a significant artifact in the measurement of singlet-oxygen yields from ozone-biomolecule reactions.* (1993) *Photochem Photobiol.* 58(3):335-40.

Kass, J. H., Jain, N., *Neuroscience Secrets.* (2000) Hanley and Belfus 373-383.

Keath, J. R., Lacoviello, M. P., Barrett, L. E., Mansvelder, H. D., McGehee, D. S., *Differential modulation by nicotine of substantia nigra versus ventral tegmental area dopamine neurons.* (2007) *J Neurophysiol* 98:3388–3396.

Khan, Z. U., Gutiérrez, A., Martín, R., Peñafiel, A., Rivera, A., De La Calle, A., *Differential regional and cellular distribution of dopamine D2-like receptors: an immunocytochemical study of subtype-specific antibodies in rat and human brain.* (1998) *J Comp Neurol.* 21;402(3):353-71.

Kirkwood, T. B., *Understanding the odd science of aging.* (2005) *Cell* 120:437 47.

Korycka-Dahi, M., Richardson, T., *Initiation of oxidative changes in foods.* (1981) Symposium: oxidative changes in milk. *J. Dairy. Sci.*, 63, pp. 1181-1208.

Kovacic, P., Pozos, R. S., *Cell signaling (mechanism and reproductive toxicity): redox chains, radicals, electrons, relays, conduit, electrochemistry, and other medical implications.* (2006) *Birth Defects Res C Embryo Today* 78:333-344.

Kwon, S.E., Chapman, E. R., *Synaptophysin Regulates the Kinetics of Synaptic Vesicle Endocytosis in Central Neurons.* (2011) *Neuron* 70, 847–854.

Lacy, F., O'Connor, D. T., Schmid-Schonbein, G. W., *Plasma hydrogen peroxide production in hypertensives and normotensive subjects at genetic risk of hypertension.* (1998) *J Hypertens* 16:291–303.

Lanau, F., Zenner, M. T., Civelli, O., Hartman, D. S., *Epinephrine and norepinephrine acts as potent agonist at the recombinant human dopamine D4 receptor.* (1997) *J Neurochem* 68:804-12.

Lechuga-Guerrero, A., Dorado-Martínez, C., Rodríguez, I. A., Pedroza-Ríos, K., Borgonio-Pérez, G., Rivas, Arancibia, S., *Effects of vitamin E on ozone induced memory deficits and lipid peroxidation in rats.* (1999) *Neuro Report* 10:1689-1692.

Liu, H., Wang, C., Li, X., Xuan, X., Jiang, C., Cui, H., *A novel electrofenton process for water treatment: reaction-controlled pH adjustment and performance assessment.* (2007) *Environ Sci Technol* 41:2937-2942.

Luo, Y., Roth, G.S., *The roles of dopamine oxidative stress and dopamine receptor signalling in aging and age-related neurodegeneration.* (2000) *Antioxid Redox Signal* 2, 449-460.

Maher, P., Schubert, D., *Signaling by reactive oxygen species in the nervous system.* (2000) *Cell Mol Life Sci.* 57:1287-305.

Maia, L., Duarte, R. O., Ponces-Freire, A., Moura, J. J., Mira, L., *NADH oxidase activity of rat and human liver xanthine oxidoreductase: potential role in superoxide production.* (2007) *J Biol Inorg Chem* 12:777-787.

Matoba, T., Shimokawa, H., Kubota, H., Morikawa, K., Fujiki, T., Kunihiro, I., Mukai, Y., Hirakawa, Y., Takeshita, A., *Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in human mesenteric arteries.* (2002) *Biochem Biophys Res Commun* 290:909-913.

McCord, J. M., *Evolution of free radicals and oxidative stress.* (2000) *Am J Med* 108:652-659.

McCord, J. M., Fridovich, I., *The utility of superoxide dismutase in studying free radicals reaction. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen.* (1969) *J Biol Chem* 244(22):6056-63.

Mendiratta, S., Qu, Z. C., May J. M., *Erythrocyte ascorbate recycling: antioxidant effects in blood.* (1998a) *Free Radic Biol Med* 24:789-797.

Mendiratta, S., Qu, Z. C., May, J. M., *Enzyme-dependent ascorbate recycling in human erythrocytes: role of thioredoxin reductase.* (1998b) *Free Radic Biol Med* 25:221-228.

Mills, G. C., *Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, and erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown.* (1957) *J Biol Chem* 229(1):189-97.

Montero, M., *Los radicales libres y las defensas antioxidantes.*(1999) *Anales de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional Mayor de San Marcos* Vol. 57, No4 - 1996

Moretto, A., Colosio, C., *Biochemical and toxicological evidence of neurological effects of pesticides: the example of Parkinson's disease.* (2011) *Neurotoxicology.* 32(4):383-91.

Naoi, M., Maruyama, W., Dostert, P., Hashizume, Y., Nakahara, D., Takahashi, T., Ota, M., *Dopamine-derived endogenous 1(R),2(N)-dimethyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, N-methyl-(R)-salsolinol, induced parkinsonism in rat: biochemical, pathological and behavioral studies.* (1996) *Brain Res.* 19;709(2):285-95.

Orrenius, S., McConkey, D.J., Bellomo, G., Nicotera, P., *Role of Ca<sup>2+</sup> in toxic cell killing.* (1989) *Trends Pharmacol Sci* 10:281-5.

Paz, C., Bazan-Pencins, B., *Sleep-wake disorganization in rats exposed to ozone.* (1992) *Neurosci Lett* 40:270-272.

Pereyra-Muñoz, N., Rugerio-Vargas, C., Angoa-Pérez, M., Borgonio-Pérez, G., Rivas-Arancibia, S., *Oxidative damage in substantia nigra and striatum of rats chronically exposed to ozone.* (2006) *J Chem Neuroanat* 31(2):114-23.

Pisani, A., Centonze, D., Bernardi, G., Calabresi, P., *Striatal synaptic plasticity: implications for motor learning and Parkinson's disease.* (2005) *Movement Disorders* 24, 395– 402.

Postlethwait, E. M., Cueto, R., Velsor, L. W., Pryor, W. A., *O<sub>3</sub>-induced formation of bioactive lipids: estimated surface concentrations and lining layer effects.* (1998) *Am J Physiol.* 274(6 Pt 1):L1006-16.

Pryor, W. A., *Mechanisms of radical formation from reactions of ozone with target molecules in the lung.* (1994) *Free Radic Biol Med* 17:451–465.

Pryor, W. A., Squadrito, G. L., Friedman, M., *A new mechanism for the toxicity of ozone.* (1995) *Toxicol Lett.*82-83:287-93.

Rebec, G. V., Grabner, C. P., Johnson, M., Pierce, R. C., Bardo, M. T., *Transient increases in catecholaminergic activity in medial prefrontal cortex and nucleus accumbens shell during novelty.* (1997) *Neuroscience* 76:707-714.

Rice, M. E., *Distinct regional differences in dopamine-mediated volume transmission.* (2000) *Prog Brain Res.* 125:277-90.

Riedel, G., Reymann, K. G., *Metabotropic glutamate receptors in hippocampal long-term potentiation and learning and memory.* (1996) *Acta Physiol Scand* 157:1-19.

Rivas-Arancibia, S., Dorado-Martinez, C., Borgonio-Pérez, G., Hiriart-Urdanivia, M., Verdugo-Díaz, L., Durán-Vázquez, A., Colín-Barenque, L., Ávila-Costa, M,R., *Effects of taurine on ozone-induced memory déficits and lipid peroxidation levels in brain of young, mature and old rats.* (2000) *Environ Res* 82, 7-17.

Rivas-Arancibia, S., Dorado-Martinez, C., Colín-Barenque, L., Kendrick, K. M., de la Riva, C., Guevara-Guzmán, R., *Effect of acute ozone exposure on locomotor behavior and striatal function.* (2003) *Pharm Biochem Beh* 74:891-900.

Rivas-Arancibia S, Guevara-Guzmán R, López-Vidal Y, Rodríguez-Martínez E, Zanardo-Gomes M, Angoa-Pérez M, Raisman-Vozari R. *Oxidative stress caused by ozone exposure induces loss of brain repair in the hippocampus of adult rats.* (2010) *Toxicol Sci.* 113(1):187-97.

Ryter, S. W., Kim, H. P., Hoetzel, A., Park, J. W., Nakahira, K., Wang, X., Choi, A. M., *Mechanisms of cell death in oxidative stress.* (2007) *Antiox Redox Signal* 9:49-89.

Sáez, G., Tornalley, P. J., Hill, H. A. O., Hems, R., Bannister, J. V., *The production of free radicals during the autoxidation of cysteine and their effecto on isolated Hepatocytes.* (1982) *Biochem. Biophys. Acta*, 719, pp. 24-31.

Sagratella, S., de Carolis, A. S., Domenici, M. R., Lorenzini, P., Fortuna, S., Michalek, H., *Glutamate-dependent mechanisms in the introduction of calcium long-term potentiation-like phenomena.* (1996) *Br Res Bull* 41:193-200.

Saintot, M., Bernard, N., Astre, C., Gerber, M., *Ozone exposure and blood antioxidants: a study in a periurban area in Southern France.* (1999) *Arch Environ Health.* 54(1):34-9.

Santiago-López, D., Bautista-Martínez, J. A., Reyes-Hernandez, C. I., Aguilar-Martínez, M., Rivas-Arancibia, S., *Oxidative stress, progressive damage in the*

*substantia nigra and plasma dopamine oxidation, in rats chronically exposed to ozone.* (2010) *Toxicol Lett.* 1;197(3):193-200.

Santra, M., X., Zhang, S., Santra, F., Jiang, M., Chopp., *Ectopic doublecortin gene expression suppresses the malignant phenotype in glioblastoma cells.* (2006) *Cancer Res* 66:11726-35.

Sarrouilhe, D., di Tommaso, A., Metaye, T., Ladeveze, V., *Spinophilin: from partners to functions.* (2006) *Biochimie* 88:1099-113.

Schmitt, U., Tanimoto, N., Seeliger, M., Schaeffel, F., Leube, R. E., *Detection of behavioral alterations and learning deficits in mice lacking synaptophysin.* (2009) *Neuroscience* 162, 234–243.

Schreck, R., Albermann, K., Baeuerle, P. A., *Nuclear factor kappa B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review).* (1992) *Free Radic Res Commun* 17(4):221-37.

Sevcsik, E. Trexler, AJ. Dunn, JM. Rhoades, E. (2011).Allostery in a disordered protein: oxidative modifications to  $\alpha$ -synuclein act distally to regulate membrane binding. *J Am Chem Soc*, 133, 18, pp.7152-8.

Smythies J, Galzigna L. *The oxidative metabolism of catecholamines in the brain: a review.* (1998) *Biochim Biophys Acta.* 1380(2):159-62.

Smythies, J. R., *The neurochemical basis of learning and neurocomputation: the redox theory.* (1999) *Behav Brain Res*;99:17-25.

Soberman, R. J., *The expanding network of redox signaling: new observations, complexities, and perspectives.* (2003) *J Clin Invest* 111:571–574.

Soffler, C., *Oxidative stress.* (2007) *Vet Clin North Am Equine Pract* 23:135-157.

Sohal, R. S., *Mitochondria generate superoxide anion radicals and hydrogen peroxide.* (1997) *FASEB J* 11:1269 70.

Somogyi, A., Rosta, K., Pusztai, P., Tulassay, Z., Nagy, G., *Antioxidant measurements.* (2007) *Physiol Meas* 28:R41-55.

Soto-Otero, R., Sanmartín-Suárez, C., Sánchez-Iglesias, S., Hermida-Ameijeiras, A., Sánchez-Sellero, I., Méndez-Alvarez, E., *Study on the ability of 1,2,3,4-tetrahydropapaveroline to cause oxidative stress: Mechanisms and potential implications in relation to parkinson's disease.* (2006) *J Biochem Mol Toxicol.* 20(5):209-20.

Stone, J. R., Collins, T., *The role of hydrogen peroxide in endothelial proliferative responses.* (2002) *Endothelium* 9:231–238.

Stone, J. R., Yang, S., *Hydrogen peroxide: a signaling messenger.* (2006) *Antioxidants & Redox Signaling* 8:243–270.

Sugawara, T., Fujimura, M., Noshita, N., Kim, G. W., Saito, A., Hayashi, T., Narasimhan, P., Maier, C. M., Chan, P. H., *Neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia.* (2004) *NeuroRx* 1:17 25.

Sugaya, K., Chou, S., Xu, S., McKinney, M., *Indicator of glial activation and brain oxidative stress after intraventricula infusion of an endotoxin.* (1998) *Mol Brain Res.* 58:1-9.

Svenningsson, P., Nishi, A., Fisone, G., Girault, J. A., Nairn, A. C., Greengard, P., *Annu.* (2004) *Rev. Pharmacol Toxicol* 44, 269 –296.

Tanner, C. M., Kamel, F., Ross, G. W., Hoppin, J. A., Goldman, S. M., Korell, M., Marras, C., Bhudhikanok, G. S., Kasten, M., Chade, A. R., et al., *Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease*. (2011) *Environ Health Perspect.* 119(6):866-72

Timmerman, W., Abercrombie, E. D., *Amphetamine-induced release of dendritic dopamine in substantia nigra pars reticulata: D1-mediated behavioral and electrophysiological effects*. (1996) *Synapse.* 23(4):280-91.

Touati, D., *The molecular genetics of superoxide dismutase in E. coli. An approach to understanding the biological role and regulation of SOD in relation to other elements of the defense system against oxygen toxicity*. (1989) *Free Radic Biol Med* 8:19.

Tsien, J. Z., Huerta, P. T., Tonegawa, S., *The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory*. (1996) *Cell* 87:1327-38.

Urschel, H. C., *Cardiovascular effects of hydrogen peroxide: current status* (1967) *Dis Chest* 51:180–192.

Vila, M., Jackson-Lewis, V., Guegan, C., Chu Wu, D., Teismann, P., Choi, D.K., Tieu, K., Przedborski, S., *The role of glial cells in Parkinson's disease*. (2001) *Curr Opin Neurol* 14, 483-489.

Wu, L. J., Ren, M., Wang, H., Kim, S. S., Cao, X., Zhuo, M., *Neurabin contributes to hippocampal long-term potentiation and contextual fear memory*. (2008) *Plos ONE* 3, e1407.

Yamazaki I, Piette, L. H., *EPR spin trapping study on the oxidizing species formed in the reaction of the ferrous ion with hydrogen peroxide*. (1991) *J Am Chem Soc* 113:7588-93.