



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**EFFECTO DE LA ROTENONA SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE
GLUTATIÓN Y ENZIMAS RELACIONADAS CON SU
METABOLISMO EN CULTIVOS PRIMARIOS DE ASTROCITOS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

OMAR FUENTES LUGO



**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. MARISOL OROZCO IBARRA
CIUDAD DE MÉXICO, 2019**



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.

HOJA DE DATOS DEL JURADO

1. DATOS DEL ALUMNO

Fuentes

Lugo

Omar

16 75 56 49

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

312110112

2. DATOS DEL TUTOR

Dra.

Marisol

Orozco

Ibarra

3. DATOS DEL SINODAL 1

Dr.

Luis Bernardo

Tovar

Y Romo

4. DATOS DEL SINODAL 2

Dra.

Silvia

Guzmán

Beltrán

5. DATOS DEL SINODAL 3

Dr.

Octavio César

García

González

6. DATOS DEL SINODAL 4

Dr.

Félix

Morales

Flores

7. DATOS DE LA TESIS

Efecto de la rotenona sobre la concentración de glutatión y enzimas relacionadas con su metabolismo en cultivos primarios de astrocitos.

39 p.

2019

Agradecimientos

El presente trabajo se realizó bajo la tutoría de la Dra. Marisol Orozco Ibarra en el Laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suarez” (INNNMVS). Forma parte del proyecto “Intercambio de metabolitos entre neuronas y células gliales durante la inhibición del transporte de electrones” con número de registro 19/17. El protocolo se evaluó y aprobó por el Comité Científico y el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL-INNN) del INNN.

“Nuestros objetivos sólo se pueden alcanzar a través del vehículo de un plan, en el cual debemos creer fervientemente, y por el cual debemos actuar vigorosamente. No hay ninguna otra ruta hacia el éxito.”

Pablo Picasso

ABREVIATURAS

SNC	Sistema nervioso central
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
GR	Glutación reductasa
GPx	Glutación peroxidasa
ERO	Especies reactivas de oxígeno
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotido fosfato
SOD	Superóxido dismutasa
CAT	Catalasa
mCB	mono cloro bimano
GST	Glutación S-transferasa
DIV	Días in vitro
PBS	Amortiguador de fosfatos
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
LDH	Lactato deshidrogenasa
ANOVA	Análisis de varianza
DMSO	Dimetilsulfóxido
ATP	Adenosin trifosfato
NO	Óxido nítrico
OH·	Radical hidroxilo
O ₂ ⁻	Anión superóxido
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
Nrf2	Factor nuclear eritroide 2- relacionado al factor 2
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
ELA	Esclerosis lateral amiotrófica
EH	Enfermedad de Huntington
EA	Enfermedad de Alzheimer
EP	Enfermedad de Parkinson
nM	nanómetro
DOI	Densidad Óptica Integrada
-SH	Sulfhidrilo
γGT	gamma-glutamil transpeptidasa
PGC 1α	Coactivador 1-alfa del Receptor γ Activado por Proliferadores de Peroxisomas
γGCL	gamma-glutamil-cisteín ligasa
γGCLc	gamma-glutamil-cisteín ligasa (subunidad catalítica)
γGCLm	gamma-glutamil-cisteín ligasa (subunidad moderatoria)
EO	Estrés oxidante

CONTENIDO

Resumen	1
Introducción	2
- Astrocitos	2
- Neurodegeneración	5
- Modelos de neurodegeneración	6
- Rotenona.	6
- Estrés oxidante	7
- El sistema antioxidante	8
- Glutación	9
- El glutación en los astrocitos	11
- El sistema antioxidante en las enfermedades neurodegenerativas	11
Enfermedad de Parkinson (EP).	12
Enfermedad de Alzheimer (EA).	12
Enfermedad de Huntington (EH).	12
Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA).	13
Justificación	14
Hipótesis	14
Objetivo General	14
Objetivos particulares	14
Metodología	15
Resultados	19
Discusión	26
Conclusión	29
Perspectivas	29
Referencias	30

Resumen

Introducción: Diversos grupos de investigación hacen énfasis en la importancia del correcto funcionamiento de los astrocitos. Se ha reportado que alteraciones funcionales y metabólicas en los astrocitos conllevan a pérdida de células gliales y neuronales, fenómeno asociado con neurodegeneración. Dentro de las alteraciones reportadas se encuentran el aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno y la disminución del glutatión. El glutatión (GSH) es un tripéptido, y es el principal antioxidante endógeno de las células. Una manera farmacológica de disminuir la concentración de GSH *in vitro* es exponer células a agentes oxidantes como la rotenona. El GSH en los astrocitos es fundamental, ya que estos son los principales productores y liberadores de GSH del sistema nervioso, por lo que las reservas neuronales de GSH dependen directamente de la función óptima de los astrocitos.

Objetivo: Determinar la citotoxicidad de la rotenona y si ésta induce cambios en la concentración de GSH intra y extracelular, así como en la expresión de las enzimas gamma-glutamil-cistein ligasa (γ -GCL), glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GR) en cultivos primarios de astrocitos.

Material y Métodos: Se prepararon cultivos primarios de astrocitos a partir de ratas Wistar P9, y se trataron con rotenona 0, 0.1, 1, 10, 50 y 100 μ M por 24 h. Se determinó: 1) la viabilidad celular por liberación de LDH, 2) la concentración de GSH por un método fluorométrico, y 3) la expresión de las enzimas γ -GCL, GPx y GR por inmunocitoquímica.

Resultados: En forma dependiente a la concentración, la rotenona indujo 1) la muerte de los astrocitos (con significancia estadística en concentraciones desde 10 μ M) y 2) la disminución intra y extracelular de glutatión.

Discusión: Al exponer los astrocitos a rotenona el GSH no se exporta al medio extracelular y la disminución de GSH dentro de los astrocitos parece ser la respuesta, por lo que al haber menor cantidad de GSH intracelular se hubiera esperado cambios en las enzimas que lo metabolizan. A pesar de esto, ninguna de las enzimas evaluadas presentó cambios en su expresión, por lo que queda determinar sí su actividad presenta cambios.

Conclusión: Estos resultados sugieren que la disminución en la concentración de glutatión durante la exposición a rotenona no se ve influenciada por la expresión de las enzimas γ -GCL, GPx y GR.

Introducción

El Sistema Nervioso Central (SNC) es un sistema complejo compuesto por diversos tipos celulares; en el cual, la colaboración de cada tipo celular contribuye a diversas funciones fisiológicas¹. El tipo celular más estudiado son las neuronas, se caracterizan por su capacidad de generar potenciales de acción, de esta manera junto con la liberación de neurotransmisores es cómo se transfieren una serie de señales e información a través de un gran número de neuronas en muy poco tiempo². Sin embargo, las neuronas no se encuentran aisladas del resto de células en el SNC, sino que interactúan con células como la microglía, la cual se caracteriza por su función de macrófagos³; los oligodendrocitos, identificados claramente por su papel de mielinización y optimización de los potenciales de acción⁴ y los astrocitos, el tipo de glía más abundante del cerebro de los mamíferos⁵.

- Astrocitos

La investigación acerca de los astrocitos comenzó a finales siglo XIX y de acuerdo con los estudios clásicos basados en la morfología se clasifican en dos tipos: protoplasmáticos y fibrosos⁶. Las diferencias entre ambos recaen en la ubicación y en la morfología que presentan. Los astrocitos protoplasmáticos se caracterizan por tener muchas ramificaciones y encontrarse en la materia gris, se encargan de envolver las terminales neuronales con sus procesos presinápticos para generar el medio adecuado para la sinapsis. Por su parte, los astrocitos fibrosos localizados en la materia blanca, se asocian a la presencia de axones mielinizados e interactúan con los nodos de Ranvier^{7,8}.

Fisiología

A diferencia de las neuronas, los astrocitos no son células excitatorias; sin embargo, se comunican con las células circundantes por medio de corrientes internas de calcio (Ca^{2+}). Estas corrientes se generan por un aumento en las concentraciones de Ca^{2+} en el citoplasma en respuesta a una estimulación mecánica, unión de ligandos externos, o liberación de neurotransmisores durante la actividad sináptica^{9,10}. Se postulan diferentes vías por las cuales se libera el calcio de la mitocondria al citoplasma. Entre las que se encuentra, que un estímulo sea recibido en la membrana celular por medio de una proteína G, lo cual empleará al inositol-trifosfato (IP_3), como mensajero para que se dé la liberación de Ca^{2+} ¹¹ y con ello se liberen gliotransmisores al medio extracelular, tanto inhibitorios como excitatorios que promuevan la liberación de Ca^{2+} al citoplasma de las células gliales cercanas^{12,13}.

A partir de diversos reportes se sugiere que las corrientes de calcio se presentan antes de la liberación de gliotransmisores, los cuales posterior a su liberación participan tanto en la gliotransmisión como en las sinapsis, tales como: ATP¹⁰, GABA¹², acetilcolina¹⁴ y glutamato¹⁵. Por lo que, las corrientes de Ca^{2+} parecen ser

la forma en que los astrocitos generan estímulos y transportan la información a lo largo del sistema nervioso¹¹.

Funciones

Cuando se describieron por primera vez se creía que su función era como soporte estructural de las redes neuronales. Sin embargo, en las últimas décadas se han descrito diversas funciones como: soporte trófico y metabólico para las neuronas¹⁶, reguladores del flujo sanguíneo¹⁷, productores de moléculas antioxidantes como el GSH¹⁸, participación en la barrera hematoencefálica¹⁹, captación de neurotransmisores en el espacio perisináptico²⁰ (Tabla 1). Los astrocitos y las neuronas se mantienen estrechamente relacionados, ya que los astrocitos contribuyen con la neurogénesis y la migración neuronal durante el desarrollo, además de la maduración de las sinapsis mediante la regulación de la concentración de iones y neurotransmisores entre otras moléculas^{21,22}.

Tabla 1. Funciones de los astrocitos en el SNC.

Función	Descripción	Referencia
Desarrollo del sistema nervioso	Las primeras poblaciones celulares del SNC se generan a partir de la gliogénesis (microglía y astrocitos), la cual es precedida por la neurogénesis. Las células gliales juegan un papel importante de soporte y señalización durante la migración de los precursores neuronales. De igual manera, participan en la formación de vasculatura cerebral mediante los procesos de vasculogénesis y angiogénesis. Una vez establecido el inicio de las redes sanguíneas, los astrocitos, la microglía y otras células dan paso a la formación de la barrera hematoencefálica.	23
Regulación de la sinapsis	Como consecuencia de la gliotransmisión ocasionada por las elevaciones de Ca ²⁺ se da la liberación de gliotransmisores (D-serina, ATP, glutamato y GABA) que a su vez también funcionan como neurotransmisores, y activan diferentes receptores y respuestas neuronales. Paralelamente, se encargan de tomar los neurotransmisores del espacio sináptico para prevenir una sobre estimulación en las terminales postsinápticas.	24
Reservorio de energía (glucógeno)	Los astrocitos almacenan glucógeno como molécula energética; a diferencia de la	25

	glucosa, éste se puede utilizar sin gastar ATP. A pesar de que las neuronas poseen las enzimas glucogénicas, la acumulación de glucógeno provoca en ellas el inicio de la apoptosis. Por lo tanto, se postula que el glucógeno se usa para generar lactato en los astrocitos, liberándolo al espacio extracelular y sirve como neuroprotector ante la excitotoxicidad.	
Barrera hematoencefálica	Las células endoteliales de la barrera hematoencefálica mantienen una estrecha comunicación con los procesos terminales “endfeet” de los astrocitos. Estos procesos terminales son el vínculo entre el flujo sanguíneo de las células endoteliales y las neuronas.	19
Neurogénesis en adultos	Durante la neurogénesis del hipocampo adulto, los astrocitos presentan plasticidad para modificar sus procesos terminales y así permitir que las neuronas recién diferenciadas expandan sus procesos celulares. De igual manera, los astrocitos generan el ambiente celular óptimo para la formación de las sinapsis entre las neuronas ya establecidas y las de reciente diferenciación.	26
Soporte metabólico de neuronas	Los astrocitos liberan moléculas para las neuronas, como la glutamina y el dipéptido CysGly. Empleadas para la formación de glutamato y glutatión respectivamente.	27,28

Se sabe que los astrocitos generan una respuesta a diferentes tipos de daño en el SNC conocida como astrogliosis, la cual se da mediante un cambio morfológico, molecular y funcional²⁹. Durante las astrogliosis se liberan una gran variedad de moléculas al medio extracelular, como moduladores inflamatorios, citocinas y quimiocinas y factores neurotróficos³⁰. Para la astrogliosis se postulan tres niveles de severidad: El primero, es un estado leve o moderado caracterizado por un aumento en la expresión de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y la hipertrofia del cuerpo y proyecciones celulares. El segundo nivel, es un estado severo y difuso ocasionado por lesiones focales severas, infecciones o áreas de neurodegeneración crónica, en el cual es más evidente la sobreexpresión de la GFAP y la hipertrofia de los astrocitos. Además, se da la proliferación de astrocitos, lo que a largo plazo

ocasionará dificultades al reorganizar el tejido dañado. El tercer nivel, estado severo de gliosis con formación de cicatrices gliales, donde la hipertrofia y la sobreexpresión de GFAP son más pronunciados, además se da la formación de una cicatriz formada por astrocitos reactivos en el área afectada, que a su vez impide la regeneración axonal y la migración celular³¹.

Diversos reportes evidenciaron que el mal funcionamiento de los astrocitos genera efectos neurotóxicos. Por lo que su disfunción se asocia a diferentes desórdenes y afectaciones en el SNC relacionadas con la neurodegeneración^{32,33}.

- Neurodegeneración

La degeneración celular es una marca distintiva de las enfermedades neurológicas, la cual se entiende como cualquier condición patológica en la que se vean afectadas principalmente las neuronas y que provoque su muerte asincrónica. Dentro de las enfermedades neurodegenerativas más estudiadas se encuentran la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Huntington y la esclerosis lateral amiotrófica, ya que presentan mayor prevalencia en la población. El origen de la neurodegeneración no queda del todo claro, ya que la etiología de las enfermedades neurodegenerativas es evidente hasta que el daño en las regiones cerebrales es irreversible y las neuronas restantes en la zona afectada han cambiado de forma drástica al presentar alteraciones en el tamaño y forma del soma y núcleo, la fragmentación de organelos, la vacuolización del citoplasma y la condensación de la cromatina³⁴.

Dentro de los procesos presentes en la neurodegeneración se encuentran: la muerte neuronal, la cual se da por apoptosis, necrosis, autofagia y paraptosis³⁵; la disfunción mitocondrial³⁶ y el estrés oxidante (EO)³⁷. En los últimos años, la evidencia apunta a que tanto la disfunción ubiquitina-proteosoma y mitocondrial como la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ERO), tienen un papel importante en la neurodegeneración³⁸. La mitocondria es un organelo ubicuo encargado del metabolismo energético oxidativo, proceso en el cual se lleva a cabo la fosforilación

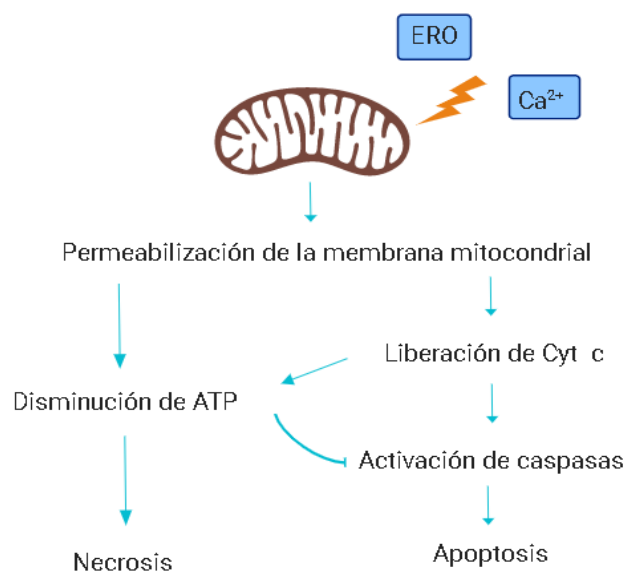


Figura 1. Muerte celular ocasionada por la permeabilización de la membrana mitocondrial. Fricker et al. 2018

oxidativa que produce la mayor cantidad de ATP en la célula³⁹. Alteraciones en la función mitocondrial generan una disminución energética por falta de ATP; desequilibrio de la homeostasis de calcio y el aumento de las especies reactivas de

oxígeno³⁶. Mientras que, la presencia de EO es una característica de la progresión de las enfermedades neurodegenerativas, ya que el aumento de especies reactivas se vincula con la muerte de células neuronales y gliales⁴⁰ (Figura 1).

Diversos reportes sugieren que las enfermedades neurodegenerativas no se caracterizan exclusivamente por la pérdida neuronal, sino que resaltan el papel complejo que podrían representar las células gliales en la neurodegeneración⁴¹, ya que sugieren que la disfunción de los astrocitos podría contribuir a la muerte neuronal⁴². Esto se debe a que los astrocitos reactivos liberan diversas moléculas (IL-1 β , TNF- α , NO, citocinas y quimiocinas) las cuales pueden ser neuroprotectoras o neurotóxicas⁴³.

- Modelos de neurodegeneración

Ante la necesidad de entender los procesos que ocurren durante las enfermedades neurodegenerativas, se ha trabajado con diferentes modelos experimentales que asemejan las marcas distintivas de cada enfermedad en ratas, ratones, moscas y nematodos⁴⁴. Si bien, es cierto que no hay un modelo que asemeje la enfermedad por completo como sucede en los humanos, algunos modelos reproducen la gran mayoría de las marcas patológicas distintivas, que nos permiten observar y cuantificar diferentes procesos celulares en condiciones patológicas⁴⁴.

Los modelos experimentales se pueden clasificar en: *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro*. Los modelos *in vivo* son los más utilizados para el estudio de estas patologías; sin embargo, los modelos *in vitro* ofrecen ventajas en algunos aspectos sobre los modelos *in vivo*. Ya que los modelos *in vitro* permiten estudiar la función de células aisladas en un entorno específico, con lo que es posible comprender de mejor manera los mecanismos asociados a las condiciones patológicas⁴⁵.

Los modelos para estudiar las enfermedades neurodegenerativas *in vivo*, se clasifican en dos tipos: los modelos inducidos genéticamente, a los cuales se les añade o elimina uno o más genes, y los modelos farmacológicos, a los cuales se exponen o suministran a diversas sustancias químicas. Diversas neurotoxinas son empleadas para inducir modelos farmacológicos de neurodegeneración, como: la 6-hidroxi dopamina (6-OHDA), el 1-metil-4-fenilperidinio (MPP+) y la rotenona, por mencionar algunas.

- Rotenona.

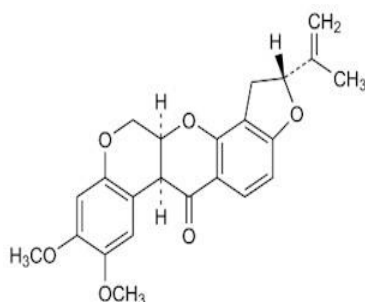


Figura 2. Estructura química de la rotenona

La rotenona es un compuesto que se obtiene de las plantas del género *Lonchocarpus* y se usa principalmente para fines agrícolas y acuícolas, ya que se utiliza ampliamente como plaguicida⁴⁶ (Figura 2). En modelos *in vitro*, se demostró que la rotenona tiene una alta toxicidad selectiva sobre neuronas dopaminérgicas, mismas neuronas que se ven atrofiadas durante la enfermedad de Parkinson⁴⁷.

La rotenona se ha empleado para generar un modelo experimental de Parkinson debido a que produce la mayoría de los síntomas motores acompañados de cuerpos de Lewy, característicos de esta enfermedad⁴⁸. Se emplea la rotenona porque es un selectivo y poderoso inhibidor del complejo I de la cadena transportadora de electrones mitocondrial, con lo cual se generan ERO⁴⁹, lo que resulta importante ya que el grupo de Betarbet (2000)³⁷ asoció la deficiencia mitocondrial del complejo I con la neurodegeneración.

Los efectos de la rotenona a nivel celular han sido evaluados por varios grupos de investigación, como el de Arnold (2011)⁵⁰, que reportó un aumento en: 1) las tasas de fusión y fisión mitocondriales y 2) la expresión de las caspasas 3 y 9, y 3) la disminución de la tubulina; componente de los microtúbulos.

El mecanismo de acción de la rotenona se da mediante la unión irreversible a la quinona de la NADH deshidrogenasa (complejo I mitocondrial), que genera una menor producción de ATP y un aumento de ERO⁵¹. Al aumentar las ERO dentro de la mitocondria se provoca la despolarización de la membrana mitocondrial y a su vez la liberación del Ca^{2+} presente en la mitocondria, lo que genera la activación de la vía intrínseca de la apoptosis mediante la liberación del citocromo C⁵².

- Estrés oxidante

Las ERO son utilizadas por las células para generar respuestas inflamatorias y estresantes que favorecen los procesos de supervivencia celular⁵³. Pero al ser moléculas altamente reactivas; si aumenta exacerbadamente su concentración dentro de la célula generan lo que se conoce como EO, condición que se define como el desbalance entre las moléculas oxidantes y antioxidantes⁵⁴⁻⁵⁶.

El daño por EO ocurre a diferentes niveles, ya que puede afectar a proteínas, lípidos y ADN. Dentro de los cambios generados en la célula por el aumento de las ERO, Halliwell⁵⁵ reporta que posterior al daño en las cadenas de ADN, se generan alteraciones en la cadena transportadora de electrones que conllevan a la disminución de ATP y de GSH, y provocan la muerte celular.

La producción de especies reactivas en el cerebro se da mediante la exposición a factores externos, como la radiación ionizante o por factores internos, mediante el funcionamiento de los complejos mitocondriales I y III; al liberar protones al espacio intermembrana y la actividad de las enzimas NADPH oxidasa, oxidasas peroxisomales y la superóxido dismutasa³⁵ (Figura 3). La mitocondria genera la mayor cantidad de ERO, ya que se estima que cerca del 2% de O_2 utilizado en su metabolismo se convierte en ERO^{54,55}. Se sabe que el EO está presente durante el proceso patológico de inicio y progresión de las enfermedades neurodegenerativas. Tanto en la enfermedad de Parkinson como en la enfermedad de Alzheimer tiene un papel importante, ya que se asocia a la formación de agregados proteicos que caracteriza a cada enfermedad⁵⁴. De la misma manera, el fallo en la función mitocondrial se relaciona al aumento de las ERO en la enfermedad de Huntington. Dicho aumento se da cuando la huntingtina mutante (mHTT) interacciona con la

membrana mitocondrial, alterando componentes de la cadena transportadora de electrones y la homeostasis del calcio⁵⁷.

En condiciones fisiológicas normales, las ERO son neutralizadas por una serie de moléculas y enzimas que presentan características antioxidantes, las cuales se encargan de mantener el equilibrio redox dentro de la célula⁵⁸.

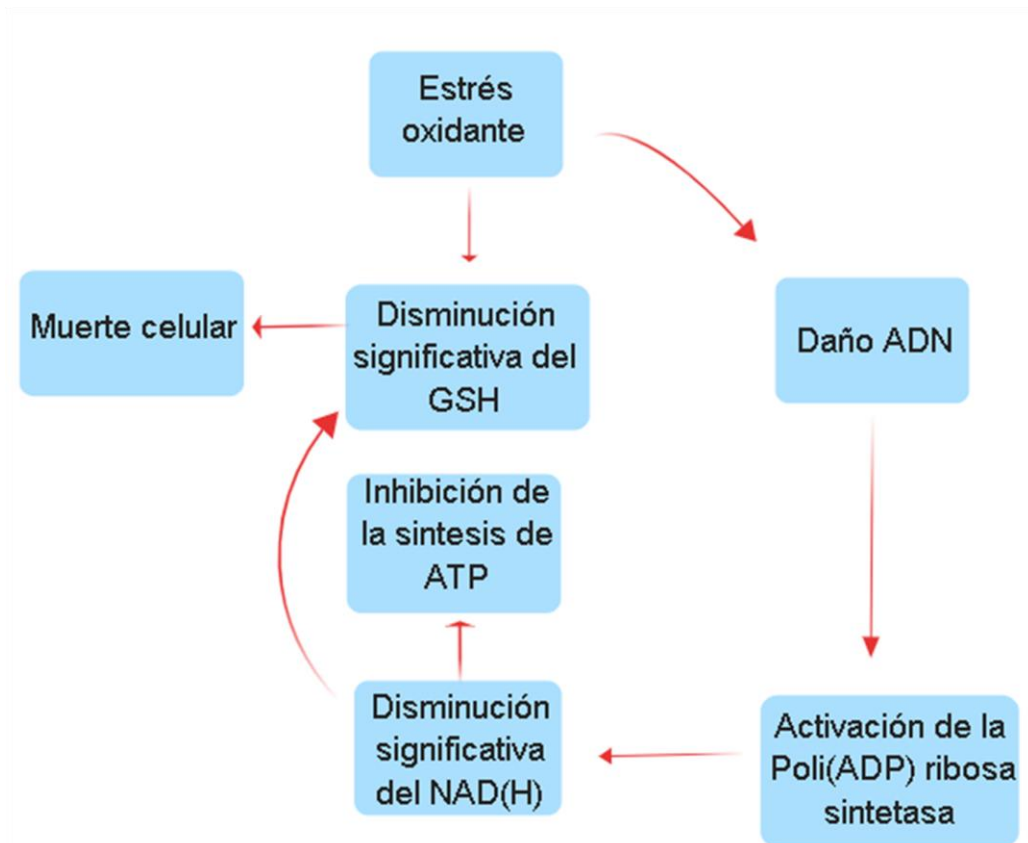


Figura 3. Daño ocasionado por la presencia de estrés oxidante. Modificado de Halliwell (1992)

- El sistema antioxidante

La batería de defensas antioxidantes está compuesta por diversas enzimas y moléculas que se encargan de neutralizar las ERO. La neutralización de ERO se da por mecanismos enzimáticos y no enzimáticos⁵⁹. La neutralización enzimática se lleva a cabo por las enzimas: catalasa (CAT), superóxido dismutasa, con centros catalíticos de manganeso (MnSOD) y cobre-zinc (CuZnSOD), glutatión-S-transferasa (GST), tioredoxinas / peroxiredoxinas, hemoxigenasa-1 (HO-1), glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GR). Estas enzimas se encargan de la degradación de agentes potencialmente tóxicos para las células; tales como el radical superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2)⁶⁰. Por su parte, la neutralización no enzimática se lleva a cabo por moléculas como el ascorbato

(vitamina C), los tocoferoles (vitamina E), los carotenoides y el glutati3n (GSH) (Figura 4) . Estas mol3culas se encargan de la degradaci3n de mol3culas m3s peque1as como el 3xido n3trico (NO) y el radical hidroxilo (OH \cdot)⁵⁹. El GSH es conocido por ser la mol3cula antioxidante por excelencia, debido a que es el antioxidante end3geno m3s abundante dentro de las c3lulas⁵⁸.

El GSH juega un papel importante en el cerebro, ya que las defensas antioxidantes del cerebro no son iguales a las del resto de los tejidos. La enzima catalasa tiene baja presencia en algunas regiones cerebrales, siendo el hip3t3lamo y en la *sustancia nigra* las regiones que m3s la expresan, mientras que el cerebelo y la corteza cerebral son regiones en las que su expresi3n es casi nula⁶¹.

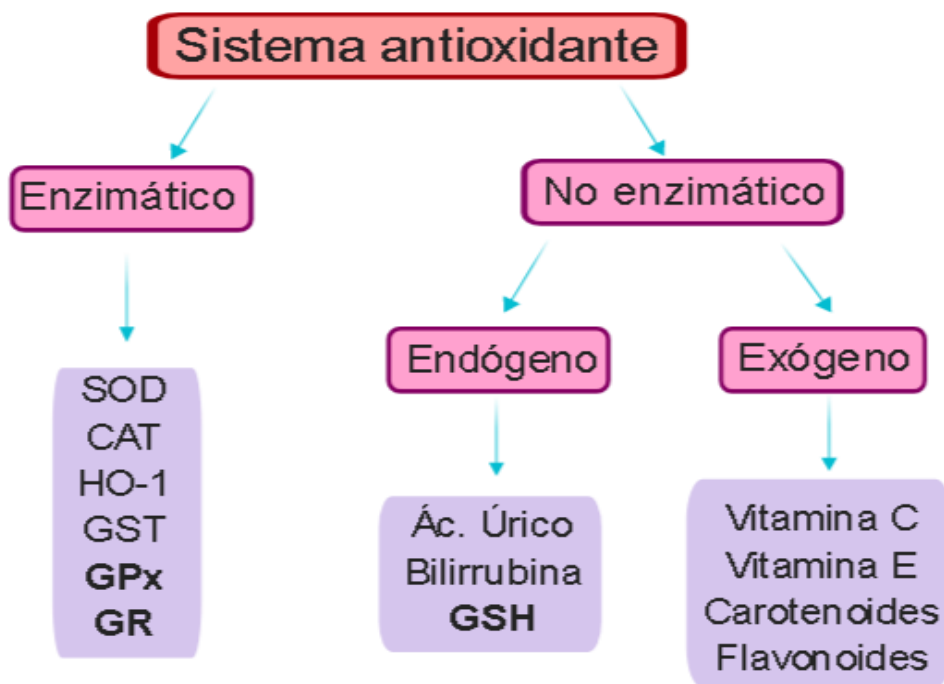


Figura 4. Clasificaci3n del sistema antioxidante celular.

- Glutati3n

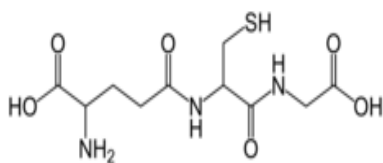


Figura 5. Esquema de la estructura del GSH

El GSH (L- γ -glutamil-L-cisteinil-glicina) es un tript3ptido no proteico esencial que se encuentra presente en todas las c3lulas; formado por los amino3cidos glutamato (G), cisteína (S) y glicina (H) (Figura 5). Su funci3n dentro de las c3lulas es evitar que biomol3culas interact3en directamente con ERO y especies reactivas de nitr3geno (ERN)⁶².

El GSH se caracteriza por tener un grupo sulfhidrilo

(-SH) en el aminoácido cisteína; este grupo es capaz de oxidarse y reducirse de manera reversible, dicha condición le permite mantener el equilibrio redox celular⁶³. El GSH se encuentra compartimentado dentro de las células en la mitocondria, el núcleo y retículo endoplásmico, también lo podemos encontrar fluyendo a lo largo del organismo por medio de la sangre⁶⁴. La concentración intracelular de GSH puede variar, pero se estiman concentraciones intracelulares de entre 1-10 mM y la tasa de GSH/GSSG en el citosol va de 30:1-100:1⁶⁵. El GSH forma parte del ciclo γ -glutamil y su formación ocurre en el citoplasma por dos reacciones consecutivas dependientes de ATP. La primera reacción está catalizada por la enzima γ -glutamil-cisteín ligasa (γ -GCL); la cual se encarga de la unión de los primeros dos aminoácidos glutamato y cisteína. La segunda reacción ocurre por la enzima glutatión sintetasa, la cual añade la glicina^{18,66}.

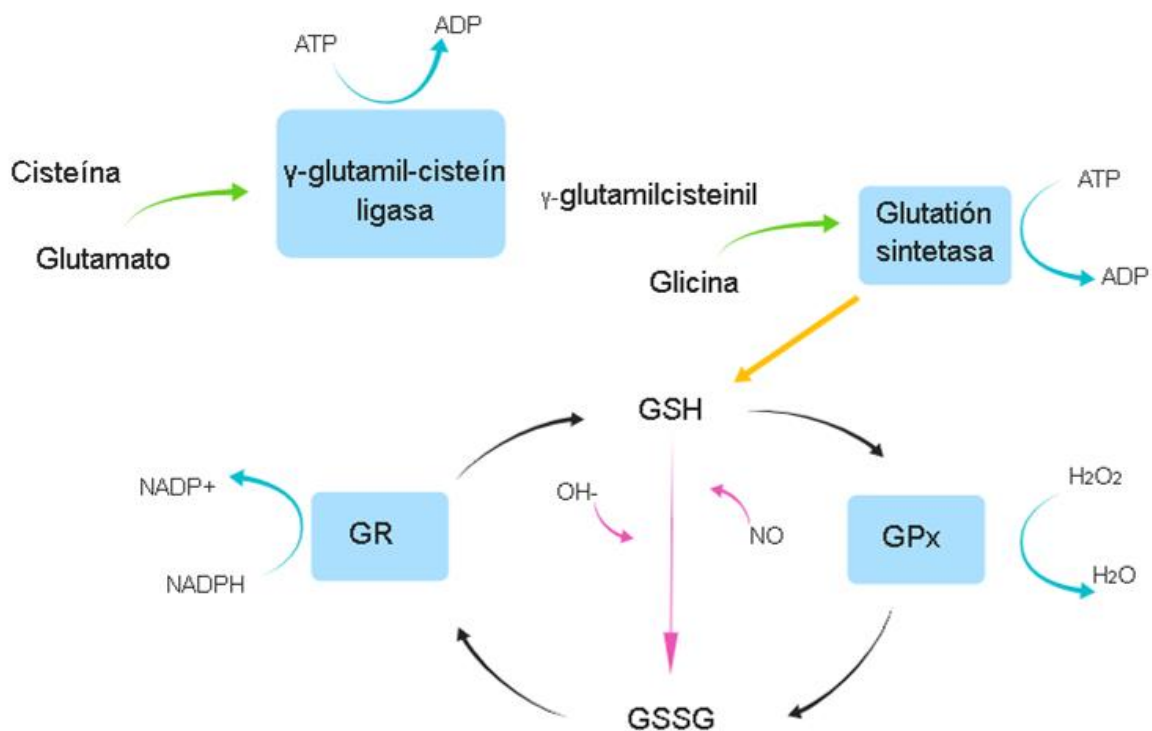


Figura 6. Ciclo glutamilo. Se esquematiza la formación de novo y metabolismo antioxidante por vía enzimática y no enzimática del glutatión.

La actividad antioxidante del GSH se da mediante el mecanismo enzimático y el no enzimático. En el primero, en respuesta al EO generado por peróxido de hidrógeno, la glutatión peroxidasa (GPx) emplea dos moléculas de GSH como donadoras de electrones y las oxida para neutralizar las especies reactivas⁶⁷. En el segundo, el GSH neutraliza moléculas más pequeñas de forma no enzimática, lo que quiere decir que el GSH forma aductos con moléculas como los radicales hidroxilo ($OH\cdot$) y el óxido nítrico (NO).

Una vez que el glutatión neutraliza a las moléculas oxidantes, se obtiene el glutatión disulfuro o glutatión oxidado (GSSG)⁵⁸. El GSSG es incapaz de reaccionar ante la

presencia de especies reactivas, por lo que es necesaria la función de la enzima glutatión reductasa (GR), la cual se encarga de recibir electrones provenientes del NADPH y cederlos al GSSG, de esta manera se obtiene de nuevo en su forma de GSH (Figura 6). Por lo tanto, la reserva de GSH depende de la disponibilidad de aminoácidos para la γ -glutamil-cisteín ligasa en su síntesis de novo, así como de la función coordinada de la GPx y GR⁶².

Las maneras más comunes de consumir las reservas de GSH intracelular es mediante la formación de glutatión-S-conjugados, la actividad de la enzima GPx y principalmente, la liberación de GSH al medio celular⁶⁸. Coppola (2000)⁵⁸ muestra que la expulsión masiva del GSH al medio extracelular posterior a un daño celular es un proceso que ocurre durante la apoptosis. Mientras que Pias & Aw (2002)⁶⁹ encontraron que la disminución de las reservas de GSH conducen a la muerte celular siempre y cuando exista un estímulo que genere EO.

Diversos reportes mencionan la importancia que pueden estar teniendo las enzimas que mantienen la homeostasis del GSH (GPx y GR). Kim et al, (2010)⁷⁰ abordaron la importancia de la GR ante un estímulo de EO, encontrando que en la apoptosis ocasionada por ERO la actividad de la enzima disminuye mientras que la cantidad de GSSH aumenta. Damier et al, (1993)⁷¹ y Trépanier et al, (1996)⁷², reportaron un aumento en la expresión de la GPx ante la pérdida de neuronas dopaminérgicas en pacientes con Parkinson.

- El glutatión en los astrocitos

En el cerebro, se reporta que la concentración de GSH es de 2 mM aproximadamente y los astrocitos (3.8 mmol_{GSH}/L) son los que presentan un mayor contenido de éste con respecto a las neuronas (2.5 mmol_{GSH}/L)⁷³. Esto se debe a que en el cerebro las células con la maquinaria enzimática para sintetizar GSH *de novo* son los astrocitos, de tal forma que éstos son los que proveen de precursores de GSH a las neuronas¹⁸. Se demostró que los astrocitos tanto en cultivo como en tejido cerebral liberan GSH al medio extracelular⁷⁴, una vez liberado, el GSH servirá de sustrato para la ectoenzima γ -glutamyl-transpeptidasa (γ -GT), mientras que dentro de la célula se sintetiza el equivalente de GSH liberado. Al interactuar con la γ -GT se obtiene el dipéptido Cys-Gly, el cual ingresa a las neuronas por el transportador Pept2⁷⁵; dicho péptido es la principal fuente de cisteína para la síntesis de GSH dentro de las neuronas⁷⁶.

- El sistema antioxidante en las enfermedades neurodegenerativas

Las enfermedades neurodegenerativas son multifactoriales, presentan diversos síntomas y afecciones en diversas zonas cerebrales. No obstante, enfermedades como el Parkinson, Alzheimer y ELA convergen en mecanismos moleculares que incluyen defectos en el sistema ubiquitina-proteosoma, disfunción mitocondrial y aumento del EO^{77,78}.

El cerebro utiliza aproximadamente el 20% del total consumido, lo que representa una gran cantidad para el volumen que representa en el organismo (4%)⁵⁵. Ya que el cerebro tiene una mínima presencia de la enzima CAT, el GSH juega un papel importante en la respuesta antioxidante del cerebro. Sin embargo, la alteración de la homeostasis de GSH y la disfunción de las enzimas dependientes de éste, aunado al aumento de ERO contribuyen a la etiología y progresión de diversas enfermedades neurodegenerativas⁷⁶.

Enfermedad de Parkinson (EP).

La enfermedad de Parkinson se caracteriza por presentar una pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas de la *sustancia nigra pars compacta* acompañada de la acumulación de fibras de α -sinucleína, cuerpos de Lewy y de astrogliosis en la zona afectada. Durante la enfermedad de Parkinson se generan ERO; lo cual se asume a partir de muestras de cerebros humano post-mortem que mostraron un alto grado de lipoperoxidación, lo que sugiere una alteración en los mecanismos de defensa antioxidante⁷⁸. Sofic et al, (1992)⁷⁹ comprobaron que durante el desarrollo de la enfermedad se da una disminución del GSH inversamente proporcional al aumento del GSSG. De igual manera, la disminución de las enzimas antioxidantes se asocia a que en etapas tempranas de la patología los astrocitos disminuyen la expresión del factor transcripcional Nrf-2 (factor nuclear eritroide 2- relacionado al factor 2) el cual se activa en presencia de EO y regula la respuesta antioxidante⁸⁰.

Enfermedad de Alzheimer (EA).

La enfermedad de Alzheimer es la causa de demencia más común, caracterizada por la pérdida de conexiones neuronales en la corteza cerebral, área entorrinal, hipocampo, cuerpo estriado ventral y prosencéfalo debido a la acumulación de la proteína β -amiloide.

Diversos reportes sugieren que la acumulación de la proteína β -amiloide aunada al aumento en las ERO, conlleva a la progresión de la enfermedad de Alzheimer⁷⁷. El elevado EO durante la enfermedad se evidencia mediante la oxidación de proteínas y ADN y la disminución de los niveles de GSH, en modelos *in vitro* expuestos a proteína β -amiloide y en muestras post mortem de pacientes con Alzheimer. La disminución de GSH se apreció mediante variaciones en la tasa GSH/GSSG, la cual disminuye conforme avanza la enfermedad⁸¹. De igual manera, estudios post-mortem en humanos demuestran aumento en el mRNA de las enzimas glutatión peroxidasa y glutatión reductasa en el cerebelo y lóbulo parietal inferior, lo cual se sugiere como un mecanismo compensatorio ante el agotamiento del glutatión^{82,83}.

Enfermedad de Huntington (EH).

La enfermedad de Huntington es una enfermedad neurodegenerativa progresiva y fatal causada por una mutación puntual en el gen de la huntingtina, que ocasiona pérdida neuronal en el cuerpo estriado, generando corea y deterioro cognitivo.

Dentro de la enfermedad de Huntington se han descrito diversos mecanismos disfuncionales dentro de los cuales se encuentra el EO, el cual se origina a partir de la disfunción mitocondrial⁸⁴. La presencia de EO se probó en cerebros post-mortem de pacientes con esta enfermedad que presentaron daño oxidante en el ADN y proteínas⁸⁵. Por su parte, Gil-Mohapel⁸⁶(2014) y Cui ⁸⁷(2006) reportan que la mHTT reduce la expresión del Coactivador 1-alfa del Receptor y Activado por Proliferadores de Peroxisomas (PGC-1 α), lo cual provoca la disminución de la expresión de enzimas antioxidantes y la cantidad de mitocondrias en el cuerpo estriado. Mientras que el equipo de Ribeiro⁸⁴ (2012) reportó en un modelo in vitro de mHTT completa, el aumento tanto del ARNm de las enzimas de batería antioxidante como en los niveles de GSSG en el cuerpo estriado.

Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA).

La ELA es la enfermedad más común de las enfermedades motoras en adultos, caracterizada por la degeneración de las neuronas motoras en la corteza cerebral y la medula espinal. Ocurre debido a una mutación en el cromosoma 21 que produce la enzima disfuncional de superóxido dismutasa 1 (Cu/ZnSOD1), lo que trae consigo una disminución en la respuesta antioxidante⁸⁸.

Al igual que en el resto de las enfermedades neurodegenerativas en la ELA la presencia de EO genera la pérdida de células neuronales y gliales. Esto se puede atribuir a la disminución en los componentes antioxidantes, como la disminución del GSH y la actividad de la GPx en tejido⁸⁹ y sangre⁹⁰.

Con la información recapitulada hasta ahora se puede decir que hay diferentes mecanismos moleculares comunes en las enfermedades neurodegenerativas, como alteraciones en la función mitocondrial y del balance redox intracelular, y la muerte celular. Sin embargo, aún quedan muchas preguntas sin resolver dentro de su origen y etiología; ya que su estudio se ha enfocado principalmente en las neuronas, puesto que son las células más afectadas durante la neurodegeneración. Dejando en un segundo plano al resto poblaciones celulares del SNC, tal como los astrocitos los cuales también mueren en presencia del desbalance redox presente de estas afecciones. A pesar de esto, no queda del todo claro cómo se da la respuesta antioxidante por parte de los astrocitos y que procesos participan para desencadenar la muerte en estos; ya que estos podrían ser de las primeras poblaciones celulares afectadas en el inicio de la patogénesis.

Justificación

Diversos reportes han sugerido que la producción exacerbada de ERO, la alteración de la homeostasis del glutatión y las alteraciones en las enzimas dependientes de éste, son factores determinantes para el inicio y progresión de las enfermedades neurodegenerativas. No obstante, los procesos asociados con el aumento de las ERO y la manera en que se lleva a cabo la respuesta antioxidante en la neurodegeneración no quedan del todo claros. Es por ello, que el presente trabajo pretende contribuir en la comprensión de la respuesta antioxidante mediante el glutatión y las enzimas glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y γ -glutamyl-cistein ligasa, en presencia de rotenona en las células astrogiales, con el fin de conocer el papel de estas células durante el daño oxidativo.

Hipótesis

Al exponer a los astrocitos a una molécula oxidante como la rotenona, la homeostasis del GSH se verá afectada, dicha alteración podría ser resultado de cambios en la expresión de las enzimas γ -GCL, GPx y GR.

Objetivo General

Determinar alteraciones en el sistema antioxidante de los astrocitos expuestos a rotenona, mediante cambios en la concentración de GSH y en la expresión de las enzimas γ -GCL, GPx y GR.

Objetivos particulares

En cultivos de astrocitos tratados con diferentes concentraciones de rotenona:

- Evaluar la viabilidad celular.
- Determinar los cambios en la concentración de GSH intracelular y extracelular.
- Cuantificar expresión de las enzimas γ -GCL, GPX y GR.

Metodología

Materiales y reactivos. La poli-D-lisina (PDL), rotenona, mCB, glutatión-S-transferasa, tripsina, placas de cultivo y placas negras se adquirieron de Sigma Aldrich Co. (St. Louis, Missouri, E.E.U.U). El suero fetal bovino (SFB), la penicilina/estreptomocina y el medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) se adquirieron de Life Technologies (Carlsbad, California, E.E.U.U). Los anticuerpos primarios anti-glutatión peroxidasa 1 y anti-glutatión reductasa se adquirieron de Abcam (Cambridge, Inglaterra, Reino Unido) y el estuche comercial LSAB 2 System-HRP se adquirió de Dako North America Inc (Carpinteria, CA, E.E.U.U.). La diaminobencidina se obtuvo de Biogenex (Fremont, CA, E.E.U.U.). El estuche comercial para medir LDH se adquirió de Roche (Brighton, MA; E.E.U.U). También se utilizaron reactivos y sales grado reactivo analítico adquiridos de empresas como Golden Bell reactivos (Anaheim, California, E.E.U.U), Sigma-Aldrich, y Amresco (Fountain Parkway, Ohio, E.E.U.U). Se utilizó un lector de placas multimodal Sinergy HT (Biotek, Winooski, VT, E.E.U.U).

Animales. Los cultivos primarios de astrocitos se aislaron del cerebelo de ratas de la especie *Rattus norvegicus* cepa Wistar P9, las cuales se obtuvieron del Departamento de Bioterio del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez". Los animales se mantuvieron bajo condiciones ambientales controladas con agua y alimentación *ad libitum*. Todos los procedimientos realizados se apegaron a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 "Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio". El protocolo se evaluó y aprobó por el comité científico y el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los animales de laboratorio (CICUAL-INNN) del INNN (Num. Reg. 19/17). También se observaron las recomendaciones de la NOM-087-ECOL-1995 para la disposición de residuos biológicos. La manipulación de los animales se realizó siempre procurando minimizar el sufrimiento animal.

Diseño experimental. Se trabajó a partir de cultivos primarios de astrocitos, de los cuales se obtuvieron tres tipos de muestras: lisados celulares para cuantificar el GSH intracelular, medios de cultivo para determinar LDH y GSH extracelular y células fijadas sembradas en vidrio para inmunocitoquímica de γ -GCL, GPx y GR. Esto se resume en la figura 7.

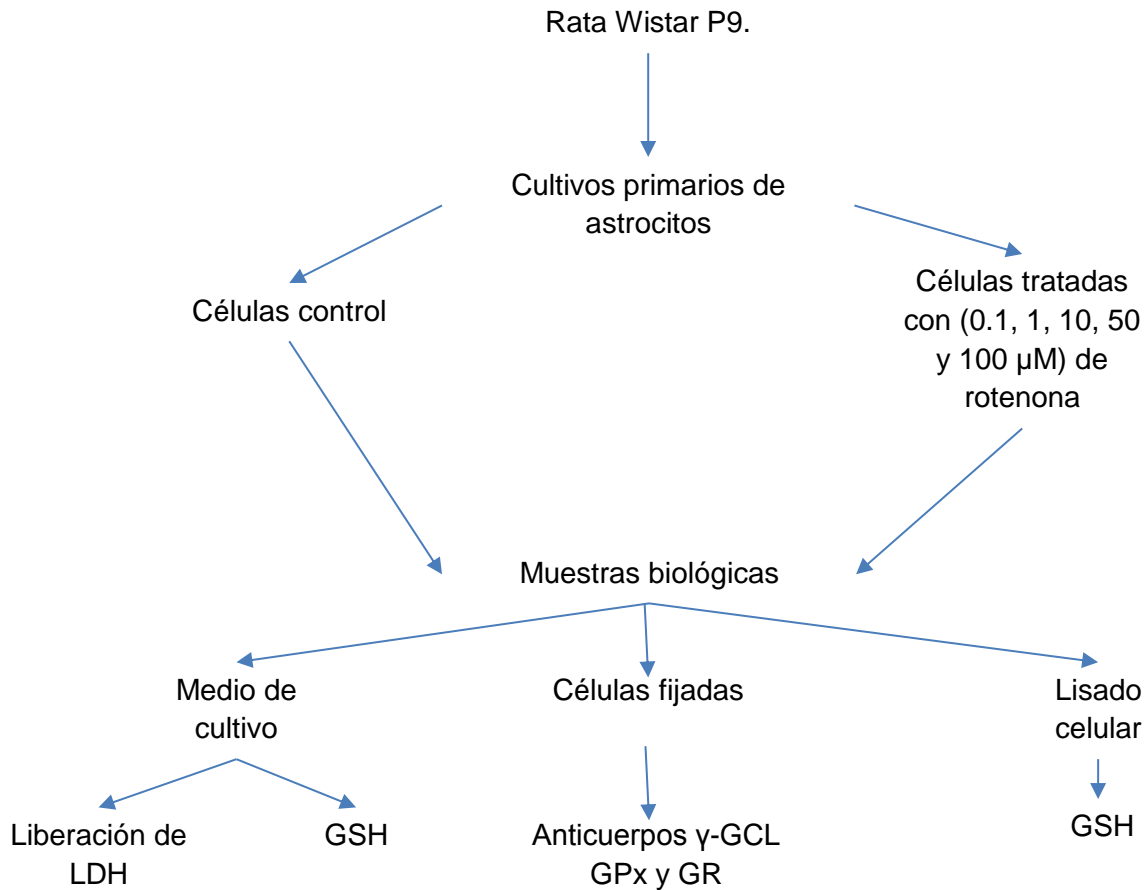


Figura 7. Diseño experimental.

Preparación de cultivos primarios de astrocitos. Se utilizó un protocolo previamente reportado⁹¹. Se extrajo el cerebro de la cavidad craneal y se colocó en solución Tyrode, para posteriormente disecar el cerebelo. Éste se disgregó de forma mecánica con jeringas de calibre 21G y 22G, para después incubar el tejido por 15 minutos para su autodigestión a 37°C en una atmósfera con 5%CO₂/95%O₂. Enseguida, se centrifugó a 556xg durante 5 minutos, y el pellet resultante se suspendió en medio DMEM suplementado con SFB al 10% y antibacteriano-antimicótico al 1%. Esta suspensión se colocó en un frasco de 75 cm² previamente tratado con poli-D-lisina durante 3 minutos. El medio se cambió 24 h después de la siembra y posteriormente dos veces por semana durante 20-23 días. Pasado este tiempo, el frasco se agitó a 200 rpm durante 24 h a 37°C y 5%CO₂/95%O₂ para promover la suspensión de todas las células que no fueran astrocitos. Posteriormente, los astrocitos (que se mantuvieron adheridos al frasco) se despegaron del frasco con una solución de tripsina al 0.5% y agitación por tres min a 37°C. Los astrocitos se contabilizaron mediante tinción con azul de tripano, y se sembraron en placas de 6 o de 24 pozos a una densidad de 1.6x10⁴ astrocitos/cm². El tratamiento con rotenona consistió en retirar el medio de cultivo y añadir medio DMEM fresco con las diferentes concentraciones de rotenona, esto se realizó 48 h después una vez alcanzada la confluencia. Las muestras obtenidas de las placas de

24 pozos se usaron para medir LDH y GSH extracelular. En contraparte, las placas de 6 pozos sirvieron para medir GSH intracelular.

Preparación de rotenona y tratamiento de los cultivos. La rotenona se diluyó en DMSO para preparar una solución stock 100 mM a partir de la cual se obtuvieron diluciones seriadas de rotenona en DMEM (0.1, 1, 10, 50 y 100 μ M). Estas diluciones se utilizaron para tratar los astrocitos, colocando 0.3 ml en cada pozo de las placas de 24 y 3 ml en cada pozo de las placas de 6. Las células se dejaron expuestas a rotenona por 24 h a 37°C en una atmósfera con 5%CO₂/95%O₂.

Ensayo de citotoxicidad. La muerte celular se determinó mediante la liberación de LDH al medio de cultivo. La LDH es una enzima citosólica estable presente en las células de mamíferos que se libera de la célula ante el daño de la membrana celular. La liberación de LDH se considera un evento que ocurre en las primeras etapas de la necrosis, mientras que se considera un evento tardío en la apoptosis⁹². Después del tratamiento con rotenona, se colectó el medio de cultivo de las células tratadas y la LDH se cuantificó utilizando el kit comercial *Citotoxicity Detection Kit* (Roche, Num. Cat 11-644-793-0001), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para esto, en una placa de 96 pozos se preparó una mezcla consistente en 45% solución salina, 5% de medio de cultivo y 50% de la mezcla de reacción del kit, que se incubó por 30 minutos a 24°C. La absorbancia se leyó a 490 nm en un lector de placas multimodal (Sinergy HT, Biotek). Los resultados se expresaron como la relación del máximo de LDH que se podía liberar por las células y la LDH presente en cada muestra.

Cuantificación de GSH. Se utilizó un protocolo previamente reportado por Cano-Ramírez et al, (2012)⁹³, que se basa en la formación de aductos GS-monoclorobimano. El monoclorobimano (mCB) es un compuesto altamente específico al grupo sulfhídrido del GSH; la técnica consiste en formar un aducto de GS-monoclorobimano por medio de una transferasa, de tal manera que el aducto es cuantificable por medio de fluorescencia. Para esto, se preparó una mezcla compuesta por 60% de amortiguador Krebs-Henseleit pH=7.4, 10% de monoclorobimano, 10% de muestra (medio de cultivo o lisado celular) y 20% de enzima glutatión S-transferasa (1 U/ml). Se dejó incubar por 60 minutos a 37°C y el producto de la reacción se midió en un lector de placas multimodal (Sinergy HT, Biotek Instrumens) a una $\lambda_{ex/em}$ =380/461 nm.

Inmunocitoquímica. Se utilizó un protocolo previamente reportado por Glynn & McAllister (2006)⁹⁴, con algunas modificaciones. Pasadas las 24 h del tratamiento con rotenona se retiró el medio de cultivo, las células se lavaron con PBS y enseguida se fijaron con paraformaldehído 4% en PBS por 20 minutos a 4°C. Después, para permeabilizar la membrana celular se añadió una solución de PBS con Tritón X-100 al 0.01% durante 10 minutos y para bloquear los sitios de unión no específicos se agregó albumina 2% en PBS durante una hora. Los anticuerpos

primarios anti-glutación peroxidasa 1 (Abcam, número de catálogo AB59546) y anti-glutación reductasa (Abcam, número de catálogo AB16801), se prepararon en una concentración 1:300 en PBS y se incubaron por 48 h a 4 °C. Después de este tiempo, se retiró el anticuerpo primario, se hicieron tres lavados con PBS y se incubó por una hora con el anticuerpo secundario biotinilado del estuche comercial LSAB 2 System-HRP de Dako (número de catálogo K0609). Después, se hicieron tres lavados con PBS y se incubó por 40 minutos con la estreptavidina-HRP del mismo estuche. Posteriormente, se hicieron tres lavados más y se reveló con diaminobencidina (número de catálogo HK520). Finalmente, las muestras se montaron en portaobjetos para su observación en el microscopio óptico de campo claro Eclipse E200 adaptado software Q-Capture Pro-7 (Nikon Inc., Melville, NY, EUA). Posteriormente, se realizó una cuantificación de la expresión de cada enzima al estimar la Densidad Óptica Integrada (DOI) y dividirla entre el total de células en cada condición. El marcaje de cada enzima se hizo en escala de grises con el software Image J 1.50 (National Institutes of Health, Maryland, EE.UU).

Análisis estadístico. El análisis comparativo entre los grupos experimentales y el grupo control se realizó por medio de un ANOVA de una vía, usando la prueba de Dunnett como prueba *post-hoc*. Los datos se analizaron usando Prism 5.0 (Graphpad Software, San Diego, California, USA) y se presentaron los promedios obtenidos de por lo menos cuatro experimentos independientes con su error estándar de la media ($X \pm EEM$).

Resultados

- Tratamiento con rotenona

En la figura 8 se muestran los astrocitos posterior al tratamiento con rotenona por 24 h. El tratamiento provocó tanto la pérdida celular como un cambio en la morfología de los astrocitos, conforme se aumentó la concentración de rotenona. La disminución de astrocitos fue más visible a partir de 50 μM y el cambio en la morfología a partir de 1 μM , donde se observó un nuevo aspecto con forma de estrella.

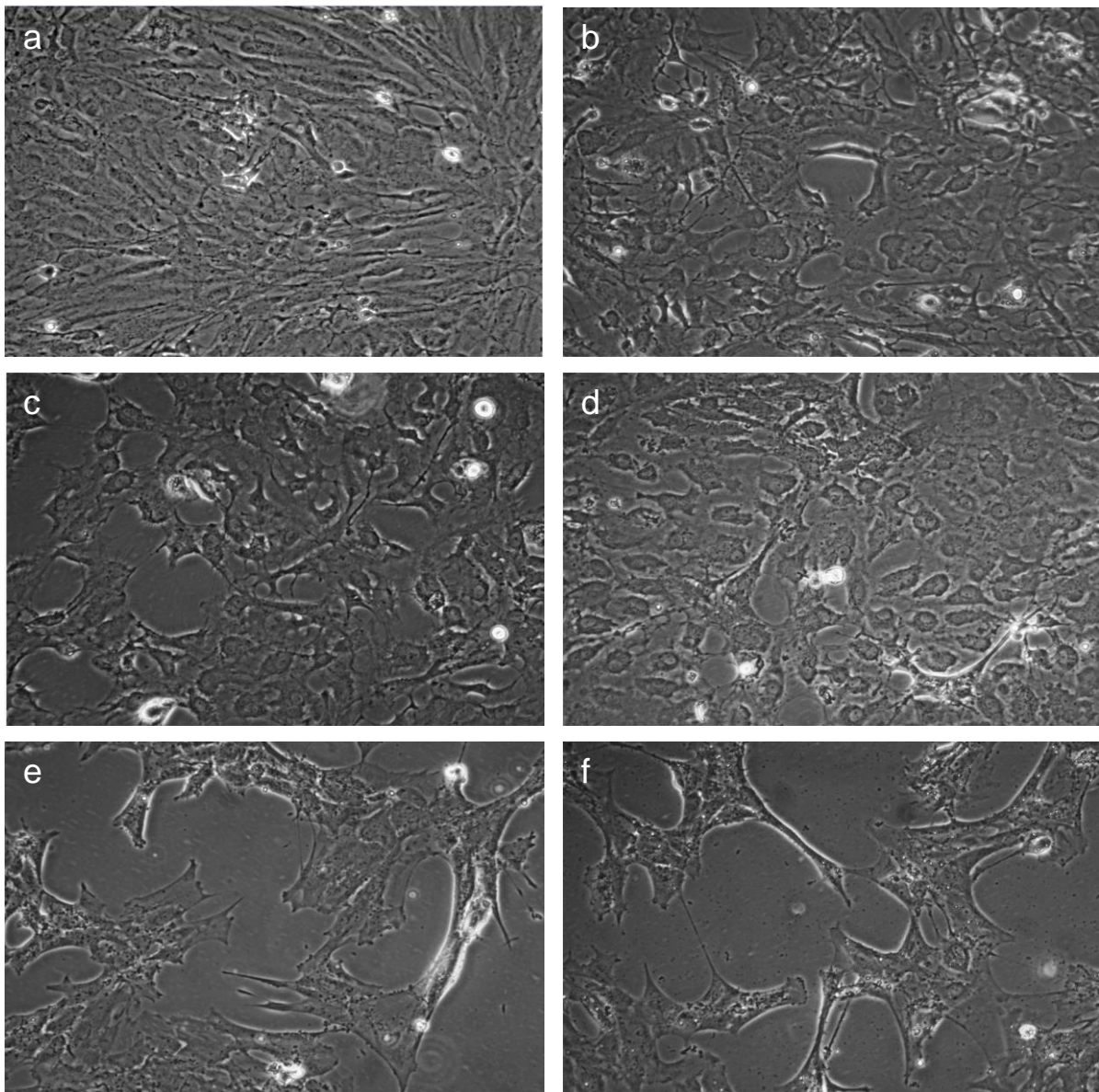


Figura 8. Efecto de la rotenona sobre cultivos primarios de astrocitos. Los astrocitos fueron tratados con rotenona durante 24 h. a) 0 μM b) 0.1 μM c) 1 μM d) 10 μM e) 50 μM y f) 100 μM . Imágenes tomadas con el microscopio de campo claro.

- Muerte celular

Posterior al tratamiento con rotenona se observó un aumento en la muerte celular (figura 9), mayor conforme se aumentó la concentración de rotenona. La muerte celular se aprecia desde las concentraciones más bajas (0.1 y 1 μM) con alrededor del 10%, mientras que en las concentraciones de 10 a 100 μM oscila entre el 25 y 30%, siendo significativamente diferente respecto al control ($F_{(5,23)} = 11.75$, $P < 0.001$).

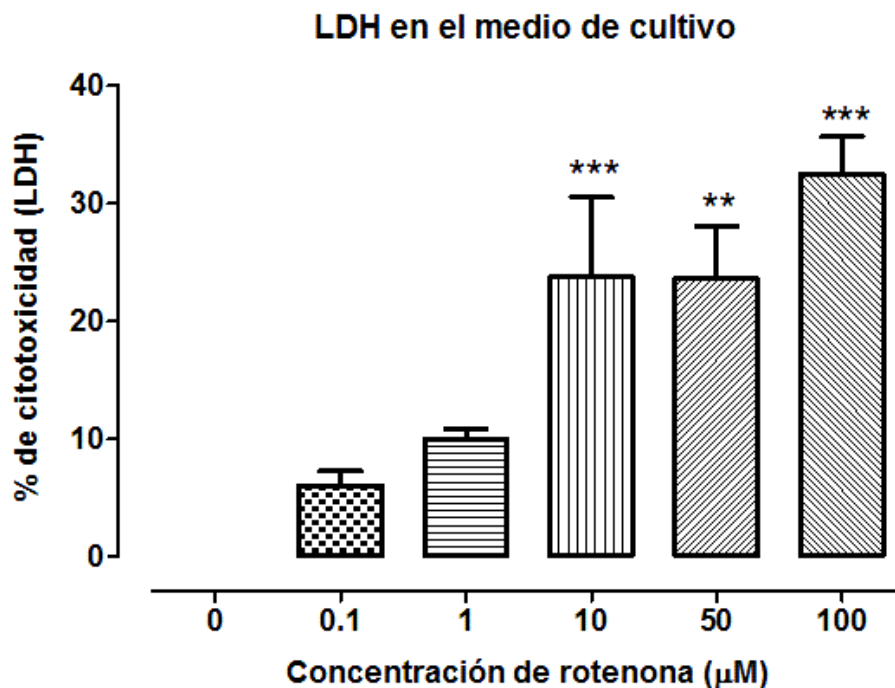


Figura 9. Citotoxicidad inducida por rotenona en astrocitos. Los astrocitos se incubaron por 24 h con rotenona, produciendo la liberación de LDH en forma dependiente de la concentración. Los datos se presentan como el promedio \pm EEM, $n=4$ experimentos independientes, cada uno medido por triplicado. Los asteriscos indican las diferencias significativas con respecto al control, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$. ANOVA de una vía seguida de Dunnett.

- Glutación intra y extracelular

En la figura 10, panel A, se observa una disminución en la cantidad de GSH extracelular que se encontró posterior al tratamiento con rotenona, la cual es dependiente de la concentración. El glutati3n tiende a disminuir desde las primeras condiciones experimentales (0.1, 1 y 10 μM) presentando de 40-35 $\mu\text{mol/ml}$, mientras que en las concentraciones de 50 y 100 μM presentan entre 30-17 $\mu\text{mol/ml}$, siendo significativamente diferente respecto al control s3lo el grupo tratado con 100 μM ($F_{(5,27)} = 2.75$, $P = 0,0824$).

En cuanto al panel B, al igual que en el medio de cultivo la disminución de GSH intracelular se da de forma dependiente de la concentración de rotenona. Mientras que el control presentó 369 $\mu\text{mol}_{\text{GSH}}/\text{mg}$ de proteína, la disminución del GSH es evidente desde las primeras concentraciones del tratamiento (0.1 y 1 μM) presentando entre 250 - 200 $\mu\text{mol}_{\text{GSH}}/\text{mg}$ de proteína y las concentraciones de (10, 50 y 100 μM) presentan entre 160-80 $\mu\text{mol}_{\text{GSH}}/\text{mg}$ de proteína, siendo estas tres condiciones diferentes significativamente con respecto al control ($F_{(5, 17)} = 5.494$, $P = 0.0074$).

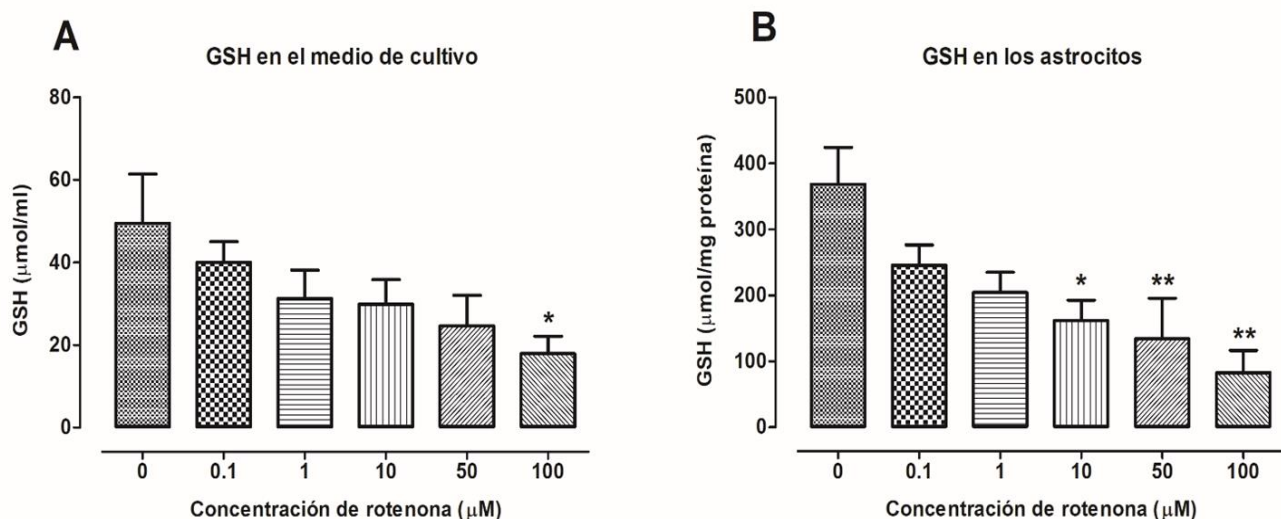


Figura 10. La rotenona disminuye la concentración de GSH. A) GSH en el medio de cultivo de astrocitos tratados con rotenona. Los astrocitos se incubaron por 24 h con rotenona, la cantidad de GSH detectado en medio de cultivo disminuyó conforme se incrementó la concentración. $n=4-5$ experimentos independientes, cada uno medido por triplicado. B) GSH contenido en los astrocitos tratados con rotenona. Posterior a la incubación con rotenona por 24 h, la cantidad de GSH detectado en los lisados celulares disminuyó de forma dependiente de la concentración. $n=3$ experimentos independientes, cada uno medido por duplicado. Promedio \pm EEM, ANOVA de una vía seguida de Dunnett. Los asteriscos indican las diferencias significativas con respecto al control, * $p<0.05$ y ** $p<0.01$.

- Expresión enzimática

Los cambios en la expresión de las enzimas GPx, GR y γGCL , se estimaron mediante inmunocitoquímica y una posterior cuantificación de la expresión. En la figura 11 se muestra la cuantificación realizada a partir de las fotografías de campo claro, panel A: γGCL , B: GPx y C: GR. La inmunocitoquímica también evidenció la notable pérdida celular en las mayores concentraciones de rotenona. La expresión de la γGCL (figura 12) se mantiene sin cambios. Mientras en las células control su expresión se limita al citoplasma, desde 0.1 μM del tratamiento se comenzó a encontrar marca en los núcleos. Por su parte, la GPx (figura 13), aumenta su expresión y distribución a lo largo de la célula a la par que se aumenta la concentración de rotenona, aunque el incremento no resulta significativo con

respecto al control. Esta enzima se encuentra presente en el núcleo celular en todas las concentraciones. Sin embargo, a partir de 1 μM es evidente el aumento de esta enzima en el citoplasma. Finalmente, la GR (figura 14), pareciera que la distribución de su expresión se mantiene sin cambios; tanto en el núcleo como en el citoplasma, a lo largo de las diferentes condiciones experimentales.

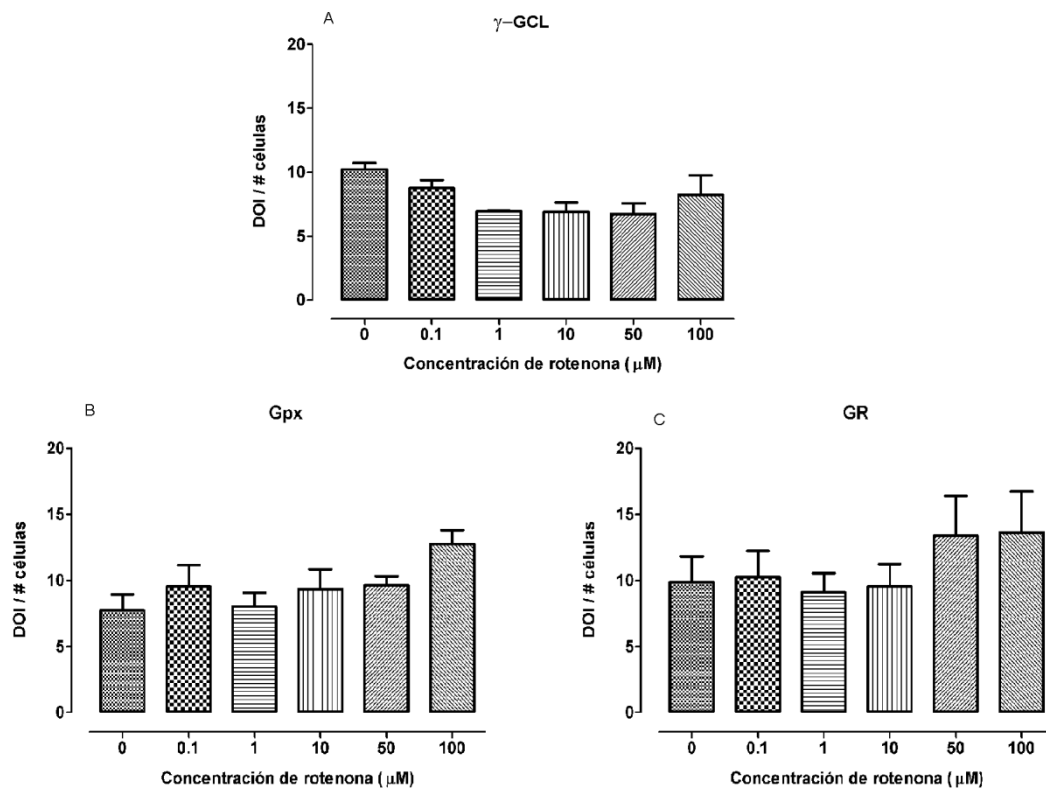


Figura 11. Cuantificación de la expresión de las enzimas γ GCL GPx y GR posterior tratamiento con rotenona. A: γ GCL la expresión se mantuvo constante a lo largo del tratamiento, B: GPx la expresión tiene a aumentar de forma dependiente al tratamiento C: GR la expresión se mantiene estable a lo largo del tratamiento. Las barras representan el promedio \pm EEM de tres experimentos independientes, ANOVA de una vía seguida de Dunnett.

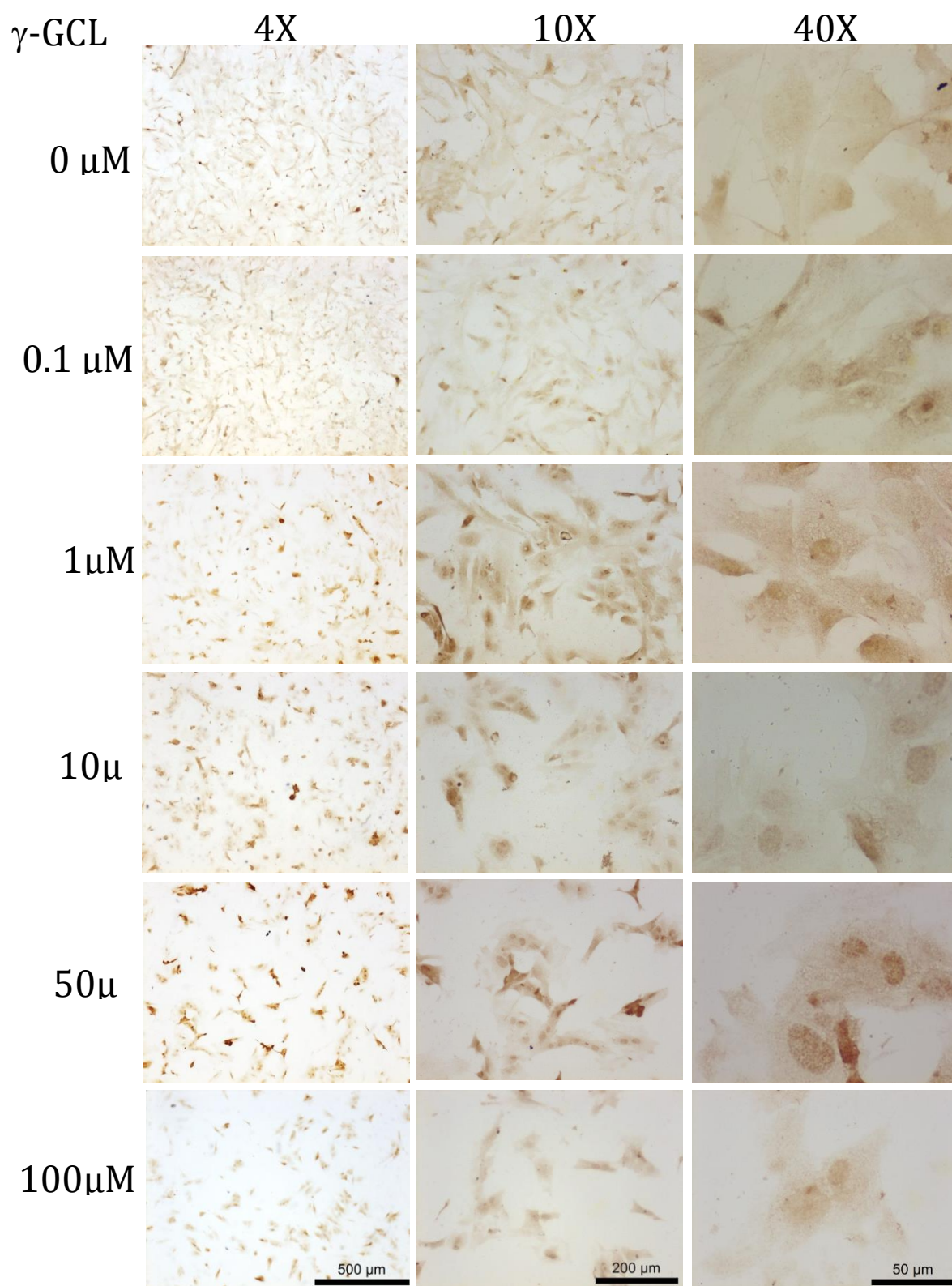


Figura 12. Expresión de la enzima gamma glutamil cisteín ligasa (GCL), posterior al tratamiento con rotenona. Se muestran fotografías representativas de campo claro, observadas con los objetivos 4X, 10X y 40X en las diferentes condiciones experimentales. Observaciones realizadas en tres experimentos independientes.

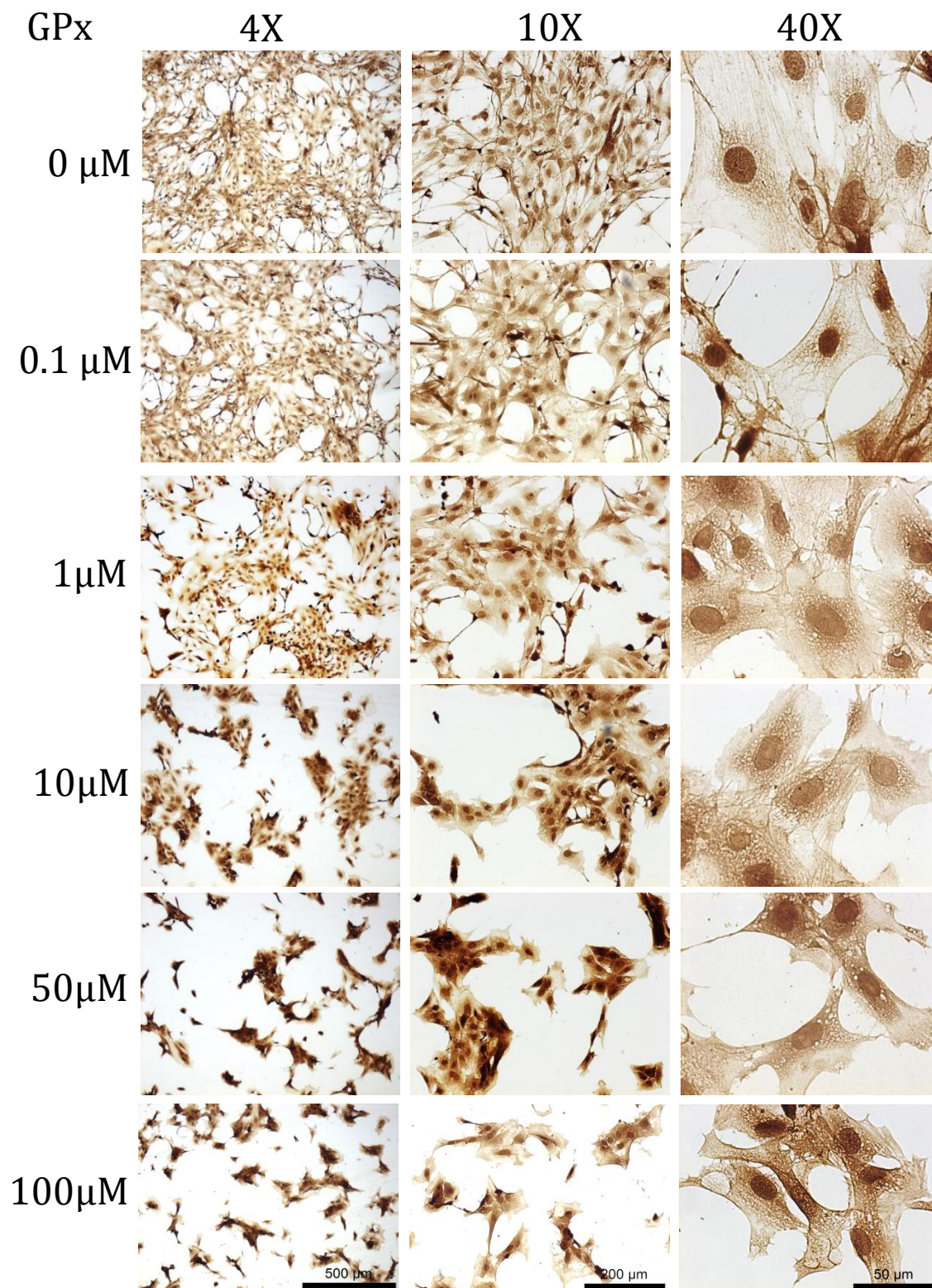


Figura 13. Expresión de la enzima Glutación Peroxidasa (GPx), posterior al tratamiento con rotenona. Se muestran fotografías de campo claro representativas, observadas con los objetivos 4X, 10X y 40X en las diferentes condiciones experimentales. Observaciones realizadas en tres experimentos independientes.

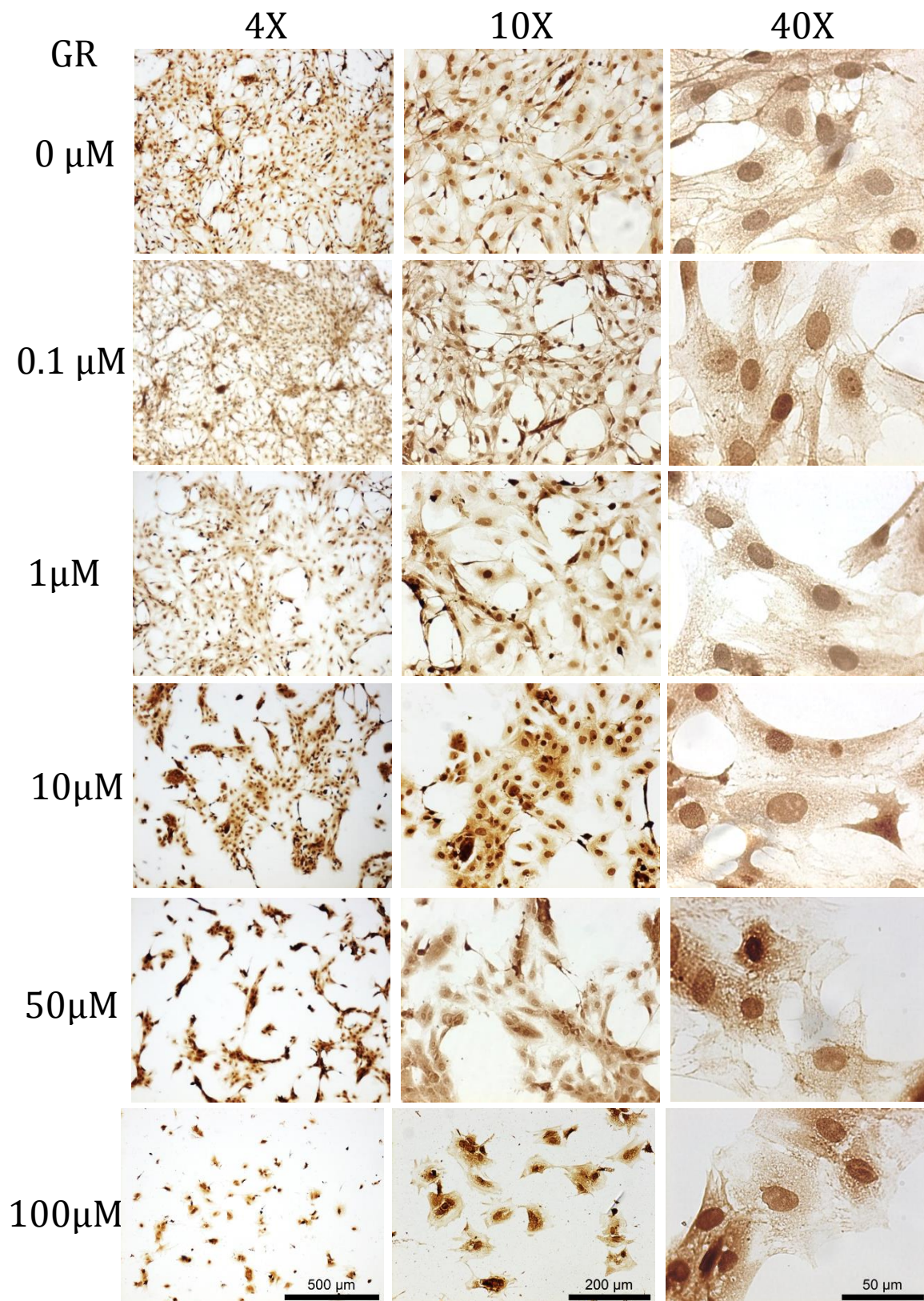


Figura 14. Expresión de la enzima Glutación Reductasa (GR), posterior al tratamiento con rotenona. Se muestran fotografías de campo claro representativas, observadas con los objetivos 4X, 10X y 40X en las diferentes condiciones experimentales. Observaciones realizadas en tres experimentos independientes.

Discusión

El presente estudio muestra que el tratamiento con rotenona a una concentración $\geq 10 \mu\text{M}$ durante 24 h provoca muerte celular, modifica la concentración de GSH intra y extracelular; sin generar cambios en la expresión de las enzimas evaluadas.

Los cultivos primarios de astrocitos fueron obtenidos a partir del cerebelo, debido a que esta es una región que tiene una nula expresión de la enzima CAT y por lo tanto el GSH juega un papel importante en la desintoxicación del H_2O_2 ⁶¹.

Las concentraciones de rotenona empleadas en este trabajo se propusieron a partir de reportes previos en los que se utilizaron diversos tipos de células neuronales. Esto debido a que los estudios del efecto de la rotenona sobre la supervivencia celular se enfocan principalmente en las neuronas; dejando de lado a los astrocitos y las posibles implicaciones que el tratamiento con rotenona pueda tener sobre estos.

Al observar las fotografías en campo claro la disminución celular en los astrocitos pareciera evidente; a pesar de esto, al cuantificar la pérdida celular resultó que la muerte celular no fue tan severa. Esto es contrario a lo esperado, ya que la cantidad de LDH obtenida debe ser proporcional a la cantidad de células lisadas con el tratamiento. Sin embargo, el método de LDH es usado para determinar la muerte celular por necrosis, ya que es un método que necesita de la ruptura de la membrana celular^{95,96}. Lo que podría sugerir que durante el tratamiento con rotenona, la pérdida de los astrocitos no se da exclusivamente por necrosis; sino que, podrían estar sucediendo varios procesos de muerte, como: apoptosis, autofagia y paraptosis³⁵.

Por su parte, el cambio morfológico podría asociarse al hecho que la rotenona degrada componentes del citoesqueleto, tales como los microtúbulos de tubulina y los microfilamentos de actina. Tal como lo reportan Zagoura (2017)⁹⁷ y Charnivec (2018)⁹⁸, ambas proteínas al estar expuestas a rotenona pierden la capacidad de formar estructuras complejas y se les encuentra en su forma libre, quizás el cambio más importante es el de los microtúbulos ya que son estos los que confieren estabilidad y forma a las células. La despolimerización de los microtúbulos se reporta en neuronas; pero de igual manera, los astrocitos podrían presentar cambios en el citoesqueleto. Una manera en la que se podría determinar esto es por medio de inmunocitoquímica para las proteínas en su forma libre y polimerizada y así evidenciar si hay cambios en la tubulina y la actina.

Investigaciones previas demuestran la importancia del GSH en la sobrevivencia celular, ya que reportan que la disminución del GSH intracelular por sí sola no conlleva a procesos de muerte, sino que la muerte en las células se presenta

cuando el GSH disminuye y las ERO aumentan, tal como sucede en las enfermedades neurodegenerativas⁹⁹. En este trabajo, las mediciones de GSH se realizaron utilizando el ensayo enzimático de GST + mCB, un compuesto a fin a los grupos tiol y altamente específico al GSH. De acuerdo a Kamencic¹⁰⁰, este método ofrece la misma exactitud que los métodos más sofisticados como la HPLC (cromatografía líquida de alta eficacia); ya que, durante el proceso de cuantificación no parece darse la autooxidación del GSH y los valores obtenidos entre ambos métodos son muy similares. A pesar de esto, el método no permite cuantificar el GSSG.

La disminución de GSH intracelular es congruente con lo que Sherer^{101,37} reporta en un modelo *in vitro* con células de neuroblastoma (SK-N-MC) al exponerlas a rotenona. Este autor observó que la rotenona induce condiciones de EO debido a la inhibición del complejo I, con lo que se ocasiona la disminución del GSH intracelular en al menos el 40% de la cantidad total.

Previamente Ghibelli(1995)⁹⁹ y Alessio (2003)¹⁰² en sus trabajos con la línea celular U937 reportan la liberación de GSH durante la muerte celular. En oposición a los resultados previos, los resultados obtenidos en este trabajo mostraron la disminución del GSH en el medio extracelular. Por lo que se podría sugerir que la liberación de GSH no se da en los astrocitos durante los procesos de muerte celular; sino que, el GSH se estaría utilizando dentro de la célula y almacenando como GSSG. Las diferencias entre los resultados obtenidos en este trabajo y los ya reportados podrían deberse a diferencias fisiológicas entre ambos tipos celulares; ya que se están comparando astrocitos contra células U937 las cuales presentan fisiología de macrófago.

También, podría ser que la cantidad de GSH extracelular disminuya al ser sustrato de la enzima γ GT, la cual lo separa en el dipéptido Cys-Gly y Glu; aunque cabe la posibilidad de que el mCB detecte el grupo tiol del Cys-Gly. Chinta¹⁰³ reporta que tanto la inhibición del complejo I como la disminución significativa del GSH intracelular, aumentan la actividad de la ectoenzima γ GT. Por lo que sería indispensable determinar en los astrocitos si se presenta un cambio tanto en actividad como en la expresión de esta enzima.

Otro factor importante que no fue evaluado en este estudio es la concentración del GSSG, el cual podría darnos información acerca de qué está sucediendo con el GSH, ya que si la cantidad de GSSG aumenta dentro de la célula pero no en el medio de cultivo, esto indicaría que el GSH se está oxidando en lugar de ser liberado por las células. Tal como sucede en el reporte de Quintana (2012)¹⁰⁴, en el cual en un modelo *in vitro* de neuronas corticales de rata Wistar, reporta que la exposición a 4 h a rotenona genera un aumento en la concentración de GSSG y disminución de la concentración de GSH.

Al verse disminuido el GSH en el medio y dentro de las células; surge la pregunta de qué está pasando con el GSH dentro de la célula y cómo es que se está usando. Es por ello que resulta de suma importancia determinar la expresión de las enzimas que participan tanto en su formación como en su metabolismo.

Para determinar la expresión de las enzimas GPx, GR y γ GCLc (en su subunidad catalítica), se realizó una inmunodetección por inmunocitoquímica.

La γ GCLc no presentó cambios, estos resultados concuerdan con el reporte de Correa (2011)¹⁰⁵, quien muestra en astrocitos corticales expuestos a lipopolisacárido, que no es la γ GCLc la que presenta cambios en presencia de la disminución de GSH. Sino por el contrario, el aumento en la expresión se aprecia en la subunidad moderatoria (γ GCLm); encargada de reducir el gasto energético en la unión del glutamato y la cisteína. Por lo que sería pertinente evaluar si la γ GCLm es la que está cambiando su expresión durante la exposición a rotenona.

Los reportes de Molina (2005)¹⁰⁶ y Tamilselvam (2013)¹⁰⁷ muestran que al exponer células de neuroblastoma (SK-N-SH) a rotenona se aumenta la actividad y la expresión de la GPx; de igual manera, Damier (1993)⁷¹ reporta en muestras *post mortem* de pacientes con la enfermedad de Parkinson un aumento en la expresión de la GPx. A pesar de que en el presente trabajo no se reportan diferencias significativas, la expresión presentó una tendencia a aumentar, lo que podría sugerir un aumento en consumo de GSH. Una observación importante es que la marca se hizo evidente en el núcleo, lo que quizás podría ser un mecanismo para evitar o reducir el posible daño en el ADN nuclear.

Por su parte, la GR se mantuvo constante a lo largo del tratamiento, siendo congruente con lo reportado por Molina (2005)¹⁰⁶, que no reporta cambios ni en la actividad ni en la expresión de ésta enzima. Lo que podría explicar la disminución de GSH dentro de las células, ya que la GPx estaría generando más GSSG y la GR al no presentar cambios originaría un desbalance en las tasas de GSH/GSSG; tal como lo reporta Quintana (2012)¹⁰⁴.

Para determinar la actividad de estas enzimas se recomienda estandarizar métodos utilizando lisados celulares de astrocitos.; ya que los propuestos por Carlberg y Mannervick (1975)¹⁰⁸ y Lawrence y Burk (1976)¹⁰⁹ se estandarizaron con homogenados de tejido.

Conclusión

Los resultados sugieren que los astrocitos presentan alteraciones en el sistema antioxidante que los hacen vulnerables a las concentraciones más altas de rotenona. Al mismo tiempo, que pudieran dejar de exportar el GSH y priorizar su uso dentro de la célula. Todo esto podría implicar que las alteraciones en el sistema antioxidante de los astrocitos sería una de las causas de la muerte glial en las primeras etapas de las enfermedades neurodegenerativas. Es por ello que sería importante determinar en este modelo otras marcas distintivas de las enfermedades neurodegenerativas como: la presencia de fallas mitocondriales y aumento en las ERO.

Perspectivas

La respuesta antioxidante mediada por el GSH en el cerebro es fundamental, por ello es esencial determinar:

- La actividad de las enzimas γ GCLm, γ GT, GR, GPx.
- La expresión y actividad del transportador de aminoácidos excitatorios 1 (EAAT1).
- La cantidad de GSSG intracelular.
- La expresión del Nrf2/Keap1

Referencias

1. Hu, X., Yuan, Y., Wang, D. & Su, Z. Heterogeneous astrocytes: Active players in CNS. *Brain Res. Bull.* **125**, 1–18 (2016).
2. Achour, S. Ben & Pascual, O. Astrocyte-neuron communication: Functional consequences. *Neurochemical Research* (2012). doi:10.1007/s11064-012-0807-0
3. Suzumura, A. Neuron-Microglia Interaction in Neuroinflammation Microglia are double-edged sword. *Curr. Protein Pept. Sci.* (2013). doi:CPPS_14_1_16 [pii]
4. Doretto, S. *et al.* Oligodendrocytes as regulators of neuronal networks during early postnatal development. *PLoS One* (2011). doi:10.1371/journal.pone.0019849
5. Allen, N. J. & Eroglu, C. Cell Biology of Astrocyte-Synapse Interactions. *Neuron* (2017). doi:10.1016/j.neuron.2017.09.056
6. Kettenmann, H. & Verkhratsky, A. Neuroglia: the 150 years after. *Trends Neurosci.* (2008). doi:10.1016/j.tins.2008.09.003
7. Sofroniew, M. V. & Vinters, H. V. Astrocytes: Biology and pathology. *Acta Neuropathologica* (2010). doi:10.1007/s00401-009-0619-8
8. Bushong, E. A., Martone, M. E., Jones, Y. Z. & Ellisman, M. H. Protoplasmic Astrocytes in CA1 Stratum Radiatum Occupy Separate Anatomical Domains. *J. Neurosci.* (2018). doi:10.1523/jneurosci.22-01-00183.2002
9. Guerra-Gomes, S., Sousa, N., Pinto, L. & Oliveira, J. F. Functional Roles of Astrocyte Calcium Elevations: From Synapses to Behavior. *Front. Cell. Neurosci.* (2018). doi:10.3389/fncel.2017.00427
10. Navarrete, M. *et al.* Astrocyte calcium signal and gliotransmission in human brain tissue. *Cereb. Cortex* (2013). doi:10.1093/cercor/bhs122
11. Navarrete, M. *et al.* Astrocytes mediate in vivo cholinergic-induced synaptic plasticity. *PLoS Biol.* (2012). doi:10.1371/journal.pbio.1001259
12. Mariotti, L., Losi, G., Sessolo, M., Marcon, I. & Carmignoto, G. The inhibitory neurotransmitter GABA evokes long-lasting Ca²⁺ oscillations in cortical astrocytes. *Glia* (2016). doi:10.1002/glia.22933
13. Sherwood, M. W. *et al.* Astrocytic IP3Rs: Contribution to Ca²⁺ signalling and hippocampal LTP. *Glia* (2017). doi:10.1002/glia.23107
14. Pabst, M. *et al.* Astrocyte Intermediaries of Septal Cholinergic Modulation in the Hippocampus. *Neuron* (2016). doi:10.1016/j.neuron.2016.04.003
15. Panatier, A. *et al.* Astrocytes are endogenous regulators of basal transmission at central synapses. *Cell* (2011). doi:10.1016/j.cell.2011.07.022
16. Banker, G. A. Trophic interactions between astroglial cells and hippocampal neurons in culture. *Science* (80-.). (1980). doi:10.1126/science.7403847
17. Macvicar, B. A. & Newman, E. A. Astrocyte regulation of blood flow in the brain. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* (2015). doi:10.1101/cshperspect.a020388
18. Dringen, R., Gutterer, J. M. & Hirrlinger, J. Glutathione metabolism in brain: Metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *Eur. J. Biochem.* **267**, 4912–4916 (2000).
19. Cardona-Gomez, G. P. *et al.* Astrocytic modulation of blood brain barrier: perspectives on Parkinson's disease. *Front. Cell. Neurosci.* (2014). doi:10.3389/fncel.2014.00211
20. Murphy-Royal, C., Dupuis, J., Groc, L. & Oliet, S. H. R. Astroglial glutamate transporters in the brain: Regulating neurotransmitter homeostasis and synaptic transmission. *J. Neurosci. Res.* **95**, 2140–2151 (2017).
21. Lim, D. A. & Alvarez-Buylla, A. Interaction between astrocytes and adult subventricular zone precursors stimulates neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1999).
22. Clarke, L. E. & Barres, B. A. Emerging roles of astrocytes in neural circuit development. *Nature Reviews Neuroscience* (2013). doi:10.1038/nrn3484
23. Reemst, K., Noctor, S. C., Lucassen, P. J. & Hol, E. M. The Indispensable Roles of Microglia and Astrocytes during Brain Development. *Front. Hum. Neurosci.* (2016). doi:10.3389/fnhum.2016.00566
24. Araque, A. *et al.* Gliotransmitters travel in time and space. *Neuron* (2014). doi:10.1016/j.neuron.2014.02.007
25. Brown, A. M. *et al.* Astrocyte glycogen metabolism is required for neural activity during aglycemia or intense stimulation in mouse white matter. in *Journal of Neuroscience Research* (2005). doi:10.1002/jnr.20335
26. Cassé, F., Richetin, K. & Toni, N. Astrocytes' Contribution to Adult Neurogenesis in Physiology and Alzheimer's Disease. *Front. Cell. Neurosci.* (2018). doi:10.3389/fncel.2018.00432
27. Turner, D. A. & Adamson, D. C. Neuronal-astrocyte metabolic interactions: Understanding the transition into abnormal astrocytoma metabolism. *Journal of Neuro pathology and Experimental Neurology* (2011). doi:10.1097/NEN.0b013e31820e1152
28. Dringen, R., Pfeiffer, B. & Hamprecht, B. Synthesis of the Antioxidant Glutathione in Neurons: Supply by Astrocytes of CysGly as Precursor for Neuronal Glutathione. *J. Neurosci.* (2018). doi:10.1523/jneurosci.19-02-00562.1999

29. Anderson, M. A., Ao, Y. & Sofroniew, M. V. Neuroscience Letters Heterogeneity of reactive astrocytes. *Neurosci. Lett.* **565**, 23–29 (2014).
30. Voskuhl, R. R. *et al.* Reactive Astrocytes Form Scar-Like Perivascular Barriers to Leukocytes during Adaptive Immune Inflammation of the CNS. *J. Neurosci.* (2009). doi:10.1523/JNEUROSCI.1514-09.2009
31. Guillamón-Vivancos, T., Gómez-Pinedo, U. & Matías-Guiú, J. Astrocytes in neurodegenerative diseases (I): function and molecular description. *Neurol. (English Ed.)* (2015). doi:10.1016/j.nrleng.2014.12.005
32. Gallardo, G. *et al.* An α 2-Na/K ATPase/ α -adducin complex in astrocytes triggers non-cell autonomous neurodegeneration. *Nat. Neurosci.* (2014). doi:10.1038/nn.3853
33. Auregan, G. *et al.* The JAK/STAT3 Pathway Is a Common Inducer of Astrocyte Reactivity in Alzheimer's and Huntington's Diseases. *J. Neurosci.* **35**, 2817–2829 (2015).
34. Phatnani, H. & Maniatis, T. Astrocytes in neurodegenerative disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **7**, 1–18 (2015).
35. Fricker, M. *et al.* Neuronal cell death. *Physiol Rev* **98**, 813–880 (2018).
36. Schon, E. A. & Manfredi, G. Neuronal degeneration and mitochondrial dysfunction. *J. Clin. Invest.* (2003). doi:10.1172/jci200317741
37. Betarbet, R. *et al.* Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat. Neurosci.* (2000). doi:10.1038/81834
38. Tan, S. H. *et al.* Emerging pathways to neurodegeneration: Dissecting the critical molecular mechanisms in Alzheimer's disease, Parkinson's disease. *Biomed. Pharmacother.* **111**, 765–777 (2019).
39. Toescu, E. C. Mitochondria and Ca²⁺ signaling. *J. Cell. Mol. Med.* (2007). doi:10.1111/j.1582-4934.2000.tb00114.x
40. Ischiropoulos, H. & Beckman, J. S. Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: Cause, effect, or association? *J. Clin. Invest.* (2003). doi:10.1172/jci200317638
41. Ilieva, H., Polymenidou, M. & Cleveland, D. W. Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders: ALS and beyond. *Journal of Cell Biology* (2009). doi:10.1083/jcb.200908164
42. Liddel, S. A. & Barres, B. A. Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. *Immunity* (2017). doi:10.1016/j.immuni.2017.06.006
43. Olmos, G. & Lladó, J. Tumor Necrosis Factor Alpha: A Link between Neuroinflammation and Excitotoxicity. *Mediators Inflamm.* (2014). doi:10.1155/2014/861231
44. Gitler, A. D., Dhillon, P. & Shorter, J. Neurodegenerative disease: models, mechanisms, and a new hope. *Dis. Model. Mech.* (2017). doi:10.1242/dmm.030205
45. Schlachetzki, J. C. M., Saliba, S. W. & de Oliveira, A. C. P. Studying neurodegenerative diseases in culture models. *Rev. Bras. Psiquiatr.* (2013). doi:10.1590/1516-4446-2013-1159
46. Gómez-Chavarrín, M. *et al.* Developmental effects of rotenone pesticide exposure on the rat Nigro-Striatal dopaminergic system. *Salud Ment.* (2013).
47. Huang, J. *et al.* Involvement of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in rotenone-induced cell apoptosis: Relevance to protein misfolding and aggregation. *Brain Res.* (2009). doi:10.1016/j.brainres.2009.05.011
48. Jagmag, S. A., Tripathi, N., Shukla, S. D., Maiti, S. & Khurana, S. Evaluation of models of Parkinson's disease. *Frontiers in Neuroscience* (2016). doi:10.3389/fnins.2015.00503
49. Karlsson, M. *et al.* Changes in energy metabolism due to acute rotenone-induced mitochondrial complex I dysfunction – An in vivo large animal model. *Mitochondrion* (2016). doi:10.1016/j.mito.2016.10.003
50. Arnold, B., Cassady, S. J., VanLaar, V. S. & Berman, S. B. Integrating multiple aspects of mitochondrial dynamics in neurons: Age-related differences and dynamic changes in a chronic rotenone model. *Neurobiol. Dis.* (2011). doi:10.1016/j.nbd.2010.09.006
51. Fato, R. *et al.* Differential effects of mitochondrial Complex I inhibitors on production of reactive oxygen species. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* (2009). doi:10.1016/j.bbabi.2008.11.003
52. Wu, C.-C. & Bratton, S. B. Regulation of the Intrinsic Apoptosis Pathway by Reactive Oxygen Species. *Antioxid. Redox Signal.* (2012). doi:10.1089/ars.2012.4905
53. Zuo, L., Zhou, T., Pannell, B. K., Ziegler, A. C. & Best, T. M. Biological and physiological role of reactive oxygen species - the good, the bad and the ugly. *Acta Physiologica* (2015). doi:10.1111/apha.12515
54. Halliwell, B. Reactive Oxygen Species and the Central Nervous System. *J. Neurochem.* (1992). doi:10.1111/j.1471-4159.1992.tb10990.x
55. Halliwell, B. Oxidative stress and neurodegeneration: Where are we now? *Journal of Neurochemistry* (2006). doi:10.1111/j.1471-4159.2006.03907.x
56. Betteridge, D. J. What is oxidative stress? in *Metabolism: Clinical and Experimental* (2000). doi:10.1016/S0026-0495(00)80077-3
57. Ross, C. A. & Tabrizi, S. J. Huntington's disease: From molecular pathogenesis to clinical treatment. *The Lancet Neurology* (2011). doi:10.1016/S1474-4422(10)70245-3
58. Coppola, S. & Ghibelli, L. GSH extrusion and the mitochondrial pathway of apoptotic signalling. *Biochem. Soc. Trans.* (2015). doi:10.1042/bst0280056
59. Margis, R., Dunand, C., Teixeira, F. K. & Margis-Pinheiro, M. Glutathione peroxidase family - An evolutionary overview. *FEBS J.* (2008). doi:10.1111/j.1742-4658.2008.06542.x
60. Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S. & Kalayci, O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal* (2012). doi:10.1097/WOX.0b013e3182439613
61. Halliwell, B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: Therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs and Aging* (2001). doi:10.2165/00002512-200118090-00004

62. Couto, N., Wood, J. & Barber, J. The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. *Free Radical Biology and Medicine* (2016). doi:10.1016/j.freeradbiomed.2016.02.028
63. Ortega-Herrero, R. Metabolismo del Glutatión y enzimas antioxidantes frente al estrés por metal(oid)es y otros agentes, en el ciliado-modelo *Tetrahymena thermophila*. *Univ. Complut. Madrid* (2015).
64. Giustarini, Daniela; Colombob, G, Garavagliab, M.L , Astorib, E, Portinaroc, N , Reggianid, F ,Badalamentid, S, Aloisia, A , Santuccie, A, Rossif, R, Milzanib, A, Dalle-Donneb, I. Assessment of glutathione/glutathione disulphide ratio and S -glutathionylated proteins in human blood, solid tissues, and cultured cells. *Free Radic. Biol. Med.* (2017).
65. Zhang, H. *et al.* Glutathione-dependent reductive stress triggers mitochondrial oxidation and cytotoxicity. *FASEB J.* (2012). doi:10.1096/fj.11-199869
66. Fujita, H. *et al.* α -Lipoic acid suppresses 6-hydroxydopamine-induced ROS generation and apoptosis through the stimulation of glutathione synthesis but not by the expression of heme oxygenase-1. *Brain Res.* (2008). doi:10.1016/j.brainres.2008.01.081
67. Arthur, J. R. The glutathione peroxidases. *Cell. Mol. Life Sci.* (2006). doi:10.1007/pl00000664
68. Akerboom, T. & Sies, H. Glutathione transport and its significance in oxidative stress. in *Glutathione: Metabolism and Physiological Functions* (2017). doi:10.1201/9780203713372
69. Pias, E. K. & Aw, T. Y. Early redox imbalance mediates hydroperoxide-induced apoptosis in mitotic competent undifferentiated PC-12 cells. *Cell Death Differ.* (2002). doi:10.1038/sj.cdd.4401064
70. Jung, H.-J. *et al.* Glutathione reductase plays an anti-apoptotic role against oxidative stress in human hepatoma cells. *Biochimie* **92**, 927–932 (2010).
71. Damier, P., Hirsch, E. C., Zhang, P., Agid, Y. & Javoy-Agid, F. Glutathione peroxidase, glial cells and Parkinson's disease. *Neuroscience* (1993). doi:10.1016/0306-4522(93)90175-F
72. Trépanier, G., Furling, D., Puymirat, J. & Mirault, M. E. Immunocytochemical localization of seleno-glutathione peroxidase in the adult mouse brain. *Neuroscience* (1996). doi:10.1016/0306-4522(96)00222-9
73. Rice, M. E. & Russo-Menna, I. Differential compartmentalization of brain ascorbate and glutathione between neurons and glia. *Neuroscience* (1997). doi:10.1016/S0306-4522(97)00347-3
74. Sagara, J., Makino, N. & Bannai, S. Glutathione Efflux from Cultured Astrocytes. *J. Neurochem.* (2010). doi:10.1046/j.1471-4159.1996.66051876.x
75. Lu, S. C. Regulation of glutathione synthesis. *Molecular Aspects of Medicine* (2009). doi:10.1016/j.mam.2008.05.005
76. Johnson, W. M., Wilson-Delfosse, A. L. & Mieyal, J. J. Dysregulation of glutathione homeostasis in neurodegenerative diseases. *Nutrients* (2012). doi:10.3390/nu4101399
77. Saharan, S. & Mandal, P. K. The emerging role of glutathione in alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis.* **40**, 519–529 (2014).
78. Smeyne, M. & Smeynen, R. J. Glutathione metabolism and Parkinson's disease. *Free Radical Biology and Medicine* (2013). doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.001
79. Sofic, E., Lange, K. W., Jellinger, K. & Riederer, P. Reduced and oxidized glutathione in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* (1992). doi:10.1016/0304-3940(92)90355-B
80. Lastres-Becker, I. *et al.* α -synuclein expression and Nrf2 deficiency cooperate to aggravate protein aggregation, neuronal death and inflammation in early-stage Parkinson's disease. *Hum. Mol. Genet.* **21**, 3173–3192 (2012).
81. Zhang, C., Rodriguez, C., Spaulding, J., Aw, T. Y. & Feng, J. Age-dependent and tissue-related glutathione redox status in a mouse model of Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis.* (2012). doi:10.3233/JAD-2011-111244
82. Pocernich, C. B. & Butterfield, D. A. Elevation of glutathione as a therapeutic strategy in Alzheimer disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* (2012). doi:10.1016/j.bbadis.2011.10.003
83. Aksenov, M. Y. *et al.* The expression of key oxidative stress-handling genes in different brain regions in Alzheimer's disease. *J. Mol. Neurosci.* (1998). doi:10.1385/JMN:11:2:151
84. Ribeiro, M. *et al.* Glutathione redox cycle dysregulation in Huntington's disease knock-in striatal cells. *Free Radic. Biol. Med.* (2012). doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.09.004
85. Polidori, M. C.; Mecocci, P.; Browne, S. E.; Senin, U.; Beal, M. F. Oxidative damage to mitochondrial DNA in Huntington's disease parietal cortex. *Neurosci. Lett.* **272**, 53–56 (1999).
86. Gil-Mohapel, J., Brocardo, P. & Christie, B. The Role of Oxidative Stress in Huntington's Disease: Are Antioxidants Good Therapeutic Candidates? *Curr. Drug Targets* (2014). doi:10.2174/1389450115666140115113734
87. Cui, L. *et al.* Transcriptional Repression of PGC-1 α by Mutant Huntingtin Leads to Mitochondrial Dysfunction and Neurodegeneration. *Cell* (2006). doi:10.1016/j.cell.2006.09.015
88. Rosen, D. R. *et al.* Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* (1993). doi:10.1038/362059a0
89. A., C., A., C. & A.A., T. Reduced glutathione in amyotrophic lateral sclerosis: an open, crossover, randomized trial. *Italian journal of neurological sciences* (1998).
90. Moumen R, Nouvelot A, Duval D, Lachevalier B, V. F. & J. Plasma superoxide dismutase and glutathione peroxidase activity in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* **151**, 35–39 (1997).
91. García-Serafín, A. Estudio de los complejos I y II de la cadena de transporte de electrones en cultivos

- primarios de astrocitos. (UNAM, 2016).
92. Parhamifar, L., Andersen, H. & Moghimi, S. M. Lactate dehydrogenase assay for assessment of polycation cytotoxicity. *Methods Mol. Biol.* (2013). doi:10.1007/978-1-62703-140-0_2
 93. Cano-Ramírez, D. *et al.* Effect of glycolysis inhibition on mitochondrial function in rat brain. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* (2012). doi:10.1002/jbt.21404
 94. Glynn, M. W. & McAllister, A. K. Immunocytochemistry and quantification of protein colocalization in cultured neurons. *Nat. Protoc.* (2006). doi:10.1038/nprot.2006.220
 95. Chan, F. K. M., Moriwaki, K. & De Rosa, M. J. Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase activity. *Methods Mol. Biol.* (2013). doi:10.1007/978-1-62703-290-2_7
 96. Maes, M. *et al.* Measurement of apoptotic and necrotic cell death in primary hepatocyte cultures. in *Methods in Molecular Biology* (2015). doi:10.1007/978-1-4939-2074-7_27
 97. Zagoura, D., Canovas-Jorda, D., Pistollato, F., Bremer-Hoffmann, S. & Bal-Price, A. Evaluation of the rotenone-induced activation of the Nrf2 pathway in a neuronal model derived from human induced pluripotent stem cells. *Neurochem. Int.* (2017). doi:10.1016/j.neuint.2016.09.004
 98. Chernivec, E., Cooper, J. & Naylor, K. Exploring the Effect of Rotenone—A Known Inducer of Parkinson’s Disease—On Mitochondrial Dynamics in Dictyostelium discoideum. *Cells* (2018). doi:10.3390/cells7110201
 99. Ghibelli, L. *et al.* Non-oxidative loss of glutathione in apoptosis via GSH extrusion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1995). doi:10.1006/bbrc.1995.2626
 100. Kamencic, H., Lyon, A., Paterson, P. G. & Juurlink, B. H. J. Monochlorobimane fluorometric method to measure tissue glutathione. *Anal. Biochem.* (2000). doi:10.1006/abio.2000.4765
 101. Sherer, T. B. *et al.* Mechanism of toxicity in rotenone models of Parkinson’s disease. *J. Neurosci.* (2003).
 102. D’Alessio, M. *et al.* Apoptotic GSH Extrusion Is Associated with Free Radical Generation. in *Annals of the New York Academy of Sciences* (2003). doi:10.1196/annals.1299.082
 103. Chinta, S. J., Kumar, J. M., Zhang, H., Forman, H. J. & Andersen, J. K. Up-regulation of γ -glutamyl transpeptidase activity following glutathione depletion has a compensatory rather than an inhibitory effect on mitochondrial complex I activity: implications for Parkinson’s disease. *Free Radic. Biol. Med.* (2006). doi:10.1016/j.freeradbiomed.2005.12.023
 104. Quintana-Cabrera, R. *et al.* γ 3-Glutamylcysteine detoxifies reactive oxygen species by acting as glutathione peroxidase-1 cofactor. *Nat. Commun.* (2012). doi:10.1038/ncomms1722
 105. Correa, F. *et al.* The Nrf2-inducible antioxidant defense in astrocytes can be both up- and down-regulated by activated microglia: Involvement of p38 MAPK. *Glia* (2011). doi:10.1002/glia.21151
 106. Molina-Jiménez, M. F., Sánchez-Reus, M. I., Cascales, M., Andrés, D. & Benedí, J. Effect of fraxetin on antioxidant defense and stress proteins in human neuroblastoma cell model of rotenone neurotoxicity. Comparative study with myricetin and N-acetylcysteine. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* (2005). doi:10.1016/j.taap.2005.04.009
 107. Tamilselvam, K. *et al.* Neuroprotective Effects of Hesperidin, a Plant Flavanone, on Rotenone-Induced Oxidative Stress and Apoptosis in a Cellular Model for Parkinson’s Disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* (2013). doi:10.1155/2013/102741
 108. Carlberg, I. & Mannervik, B. [59] Glutathione reductase. *Methods Enzymol.* (1985). doi:10.1016/S0076-6879(85)13062-4
 109. Lawrence, R. A. & Burk, R. F. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1976). doi:10.1016/0006-291X(76)90747-6