



Efecto de la deficiencia transitoria de glutatión sobre el funcionamiento de la vía nigro-estriatal y la conducta motora de ratas

ENTIDAD EJECUTORA PRINCIPAL: Centro Internacional de Restauración Neurológica (CIREN); La Habana, Cuba

Entidades participantes: Instituto de Medicina Tropical Pedro Kouri (IPK); Laboratorios Biológicos Farmacéuticos (LABIOFAM); Facultad de Medicina; Universidad Autónoma de México (UNAM); Hospital de especialidades. Centro Médico Nacional Siglo XXI (CMN, SXXI), México

AUTORES PRINCIPALES: Mei-Li Díaz Hung¹, Lisette Blanco Lezcano¹

Otros autores: María Elena González Fraguela¹, Rilda León Martínez¹, Nancy Pavón Fuentes¹, Lourdes Lorigados Pedre¹, Bárbara Estupiñán Díaz¹, Esteban Alberti Amador¹

Colaboradores: Luis Fernando Hernández Zimbrón⁴, Sandra Orozco Suárez⁵, Arianna Yglesias Rivera³, Jenny Laura Ruiz Fuentes², Alexis Díaz García³, Isabel Fernández Jiménez¹, Eduardo Orta Soto¹

Filiación: ¹Centro Internacional de Restauración Neurológica (CIREN). ²Instituto de Medicina Tropical Pedro Kouri (IPK). ³Laboratorios Biológicos Farmacéuticos (LABIOFAM). ⁴Facultad de Medicina; Universidad Autónoma de México (UNAM). ⁵Hospital de especialidades. Centro Médico Nacional siglo XXI (CMN, SXXI), México.

RESUMEN

Palabras clave

enfermedad de Parkinson; glutatión; *substantia nigra*

La enfermedad de Parkinson (EP) es una enfermedad neurodegenerativa que afecta aproximadamente 9,5/1000 personas mayores de 65 años. Es una enfermedad con una incidencia creciente en Cuba y una de las primeras causas de atención médica en el CIREN. Debido a su carácter progresivo se hace necesaria la comprensión de los mecanismos moleculares involucrados en el daño neuronal que en la actualidad no están bien dilucidados. Trabajos recientes han demostrado que el mantenimiento de la concentración de GSH es esencial para proteger a la SNpc de la neurodegeneración. Sin embargo, el efecto directo de la disminución del GSH sobre la supervivencia de la célula dopaminérgica y la conducta motora no ha sido esclarecido *in vivo*. De ahí que el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de la disminución transitoria de la concentración de glutatión sobre el funcionamiento de la *substantia nigra pars compacta* (SNpc) y la conducta motora de ratas. La administración única por cirugía estereotáctica de L-butionina sulfoximina en la SNpc produjo disminución transitoria de la concentración de glutatión nigral y estriatal, lo que constituye un modelo válido para estudiar el papel de esta molécula en el sistema nervioso central. La evaluación conductual demostró, por primera vez, que la disminución transitoria de la concentración de glutatión nigral produce alteraciones en la conducta motora de ratas, lo que evidenció la importancia de este antioxidante para el funcionamiento del sistema motor de ratas. Estos cambios conductuales se acompañaron de muerte de neuronas dopaminérgicas en la SNpc y cambios en la expresión de genes relacionados con la

plasticidad del sistema nigro-estriatal. Por otra parte, la disminución transitoria de la concentración de glutatión resulta en una acumulación de óxido nítrico y alteración de la señalización redox hacia la activación de los mecanismos de apoptosis, así como un desbalance en los mecanismos de neuroinflamación que pueden contribuir a perpetuar el daño en esta estructura.

La enfermedad de Parkinson (EP) es una enfermedad neurodegenerativa que afecta aproximadamente 9,5/1000 personas mayores de 65 años. Los síntomas cardinales de la enfermedad incluyen bradicinesia, rigidez muscular, temblor en reposo e inestabilidad postural [1]. Aunque múltiples sistemas neuronales están implicados, las características neuropatológicas distintivas de la EP son la degeneración de las neuronas dopaminérgicas, la gliosis y la presencia de inclusiones intracitoplasmáticas (cuerpos de Lewy) en la *substantia nigra pars compacta* (SNpc) [2]. Esta área es el origen de las proyecciones dopaminérgicas al complejo caudado/putamen y su degeneración causa la disfunción del circuito motor de los núcleos basales [3].

Muchas evidencias sugieren que la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo y la neuroinflamación son algunos de los mecanismos etiopatogénicos que contribuyen al desarrollo de la EP [4].

Una de las alteraciones bioquímicas tempranas detectadas en asociación con la EP es la disminución de los niveles del tiol antioxidante de bajo peso molecular glutatión (GSH) [5, 6]. Se ha planteado que la disminución del GSH por sí sola no conlleva la muerte de las células dopaminérgicas [7]. No obstante, trabajos más recientes han demostrado que el mantenimiento del nivel de GSH es esencial para proteger a la SNpc de la neurodegeneración y que se requiere una fina regulación de los niveles de GSH para la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas nigrales [8]. El efecto de la disminución del GSH puede ser complejo e involucrar daño inducido por estrés oxidativo y ruptura de la señalización redox [9].

Sin embargo, el efecto directo de la disminución del GSH sobre la supervivencia de la célula dopaminérgica y la función sensorimotora no está esclarecido *in vivo*. Por ello, el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de la disminución transitoria de la concentración de glutatión sobre el funcionamiento de la SNpc y la conducta motora de ratas.

Resultados y discusión

En el resultado de los estudios de habilidades motoras influyen entre otros aspectos, el grado de pérdida de dopamina estriatal, el número de neuronas dopaminérgicas remanentes en la SNpc y la capacidad de compensación a la pérdida celular o del neurotransmisor [10]. En este trabajo

se realizó la evaluación conductual de ratas con inyección unilateral de L-butionina sulfoximina (BSO) en la SNpc, a los 7 días del procedimiento de cirugía estereotáctica. La prueba del *open field* mostró una pobre exploración horizontal y vertical por parte de las ratas del grupo BSO que recorrieron menor distancia y tuvieron un mayor tiempo en reposo comparado con los grupos controles. Similar resultado se obtuvo en la prueba de la barra transversal donde las ratas BSO describieron una trayectoria recta hacia la plataforma de escape y recorrieron menor distancia comparada controles. Estos resultados demostraron un deterioro de la actividad locomotora en las ratas BSO [11]. Es importante destacar que la prueba de exploración de objetos, usualmente empleada para evaluar la memoria en ratas, permitió descartar alteraciones de memoria a corto plazo en las ratas BSO [12].

En la SNpc, la administración de BSO provocó una disminución del 38 % en la expresión del ARNm que codifica para el receptor dopaminérgico tipo D2 mientras que en el estriado (EST) la expresión del ARNm de este receptor aumentó un 20% [13]. En el EST, se observó un aumento en la expresión del ARNm que codifica para el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, de sus siglas en inglés) (30 %) y la proteína asociada al citoesqueleto de actividad regulada (Arc, de sus siglas en inglés) (70 %) a las 24 h, y un aumento en la expresión de Arc (50 %) a los 7 días posteriores a la lesión en el EST [12] debido al tratamiento con BSO. Estos resultados sugieren que las alteraciones conductuales en las ratas BSO se acompañan de cambios en la expresión de genes relacionados con la plasticidad del sistema nigro-estriatal, que pudieran traducirse como hiperactividad de las neuronas estriato-palidales del estriado.

Por otra parte, la tinción con violeta de cresilo en la SNpc reveló una pérdida de células neuronales así como atrofia de estas en las ratas lesionadas con BSO. El análisis inmunohistoquímico también mostró una disminución significativa de células positivas a la tirosina hidroxilasa (TH) en las ratas BSO comparadas con las controles. La tinción con yoduro de propidio mostró un predominio de marcaje nuclear en el grupo lesionado con BSO y células positivas en el ensayo de TUNEL. Estos resultados demostraron que la disminución transitoria que la concentración de GSH nigral causa la muerte de neuronas dopaminérgicas [13] en un grado comparable a una pequeña lesión (4 µg) con 6-OHDA, como fue anteriormente mostrado por Truong *et al.* (2006) [14].

Los marcadores de estrés oxidativo se estudiaron en la SNpc y el EST a los 7 días posteriores a la lesión. La administración de BSO en la SNpc afectó la concentración de GSH en la SNpc y en el EST a las 24 posteriores a la cirugía, probablemente debido a la conexión anatómica entre ambas estructuras y se restableció a los 7 días posteriores a la lesión. Esta condición puede generar un desbalance oxidativo a favor de la acumulación de especies reactivas del oxígeno (ERO) y especies reactivas del nitrógeno (ERN). La disminución de la concentración de GSH no generó una respuesta compensatoria en las enzimas relacionadas con el metabolismo del GSH, la glutatión peroxidasa (GPx) y la glutatión reductasa (GRD), pero desencadenó un aumento de la actividad enzimática de la CAT a las 24 h posteriores a la lesión en la SNpc. La CAT es una enzima que responde a altas cantidades de H_2O_2 y su aumento en la SNpc pudo estar relacionado con la afectación de la concentración de GSH en esta última estructura. El aumento en la actividad enzimática de la CAT representa un mecanismo compensatorio celular al incremento de las ERO, las cuales pueden ocasionar daño a las biomoléculas. El hecho de que no se observara una acumulación de malondialdehído sugirió que el daño oxidativo puede no ser necesario para la ocurrencia de muerte celular y alteraciones motoras en ratas [11].

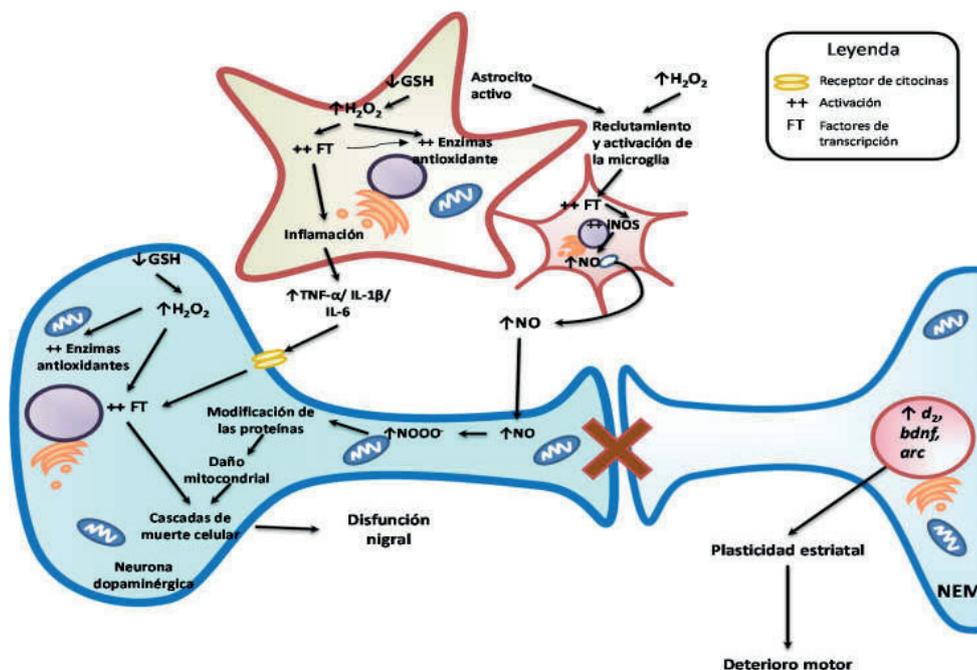
Sin embargo, la disminución transitoria en la concentración de GSH nigral produjo un aumento de la fosforilación de la c-Jun quinasa terminal (JNK) a las 24 h y 7 días posteriores a la lesión, indicador de activación de esta vía, lo que sugiere que la muerte celular observada en este modelo experimental ocurrió por un mecanismo de apoptosis inducido por modificaciones en la señalización redox [13]. Las ERO/

ERN median, además, la activación a través de la señalización redox, de factores de transcripción que desencadenan los procesos de neuroinflamación [15]. En este estudio se observó un aumento en la expresión en los genes que codifican para las citocinas proinflamatorias TNF- α (84 %), IL-1 β (44 %) e IL-6 (100 %) desde las 24 h posteriores al tratamiento con BSO, con el respectivo incremento de las concentraciones de estas citocinas a los 7 días. Este resultado demostró que la disminución de GSH en la SNpc constituye un estímulo proinflamatorio.

La respuesta inflamatoria en el SNC está confinada fundamentalmente a la microglía y los astrocitos, cuya reactividad se incrementó con el tratamiento con BSO en la SNpc. La activación de la microglía pudo tener como consecuencia el aumento en expresión de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y el respectivo aumento en las concentraciones de NO a los 7 días posteriores a la inyección de BSO, que puede contribuir a la disfunción proteica por modificación de los residuos de tirosina [16]. La ruptura de la señalización redox, exacerbada por los efectos deletéreos de las citocinas pudo conducir a la muerte celular y la disfunción de la SNpc en este modelo.

En conclusión, la disminución transitoria de la concentración de GSH puede incrementar la susceptibilidad de la SNpc a la degeneración a través de modificaciones en la señalización redox, alteraciones en el metabolismo del óxido nítrico y neuroinflamación. La disfunción nigral provocó en el EST cambios plásticos que sugieren hiperactividad de la "vía indirecta" del circuito motor de los núcleos basales y que justificaría la disminución en la actividad locomotora observada en las ratas tratadas con BSO (figura 1).

Figura 1. Modelo de degeneración nigro-estriatal y disfunción motora inducido por la disminución transitoria de GSH. El tratamiento con L-butionina sulfoximina provoca ruptura de la señalización redox y activación glial, lo que a su vez desencadena los mecanismos de neuroinflamación que exacerbó el daño celular. La disfunción de la vía nigro-estriatal provoca cambios en la plasticidad en el estriado y compromiso motor.



Referencias bibliográficas

1. Andersen, A.H., et al., Dopaminergic Modulation of Medial Prefrontal Cortex Deactivation in Parkinson Depression. *Parkinsons Dis.*, 2015. 2015:513452. doi: 10.1155/2015/513452. Epub; 2015 Dec 17.: p. 513452.
2. Mhyre, T.R., et al., Parkinson's Disease. *Subcell. Biochem.*, 2012. 65:389-455. doi:10.1007/978-94-007-5416-4_16. p. 389-455.
3. Carvalho, M.M., et al., Behavioral characterization of the 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease and pharmacological rescuing of non-motor deficits. *Mol Neurodegener.*, 2013. 8:14. doi:10.1186/1750-1326-8-14.: p. 14-18.
4. Rahimmi, A., et al., N-acetylcysteine prevents rotenone-induced Parkinson's disease in rat: An investigation into the interaction of parkin and Drp1 proteins. *Brain Res.Bull.*, 2015. 113:34-40. doi: 10.1016/j.brainresbull.2015.02.007. Epub; 2015 Feb 28.: p. 34-40.
5. Sian, J., et al., Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. *Ann. Neurol.*, 1994. 36(3): p. 348-355.
6. Zhang, H. and H.J. Forman, Glutathione synthesis and its role in redox signaling. *Semin. Cell Dev Biol.*, 2012. 23(7): p. 722-728.
7. Toffa, S., et al., Glutathione depletion in rat brain does not cause nigrostriatal pathway degeneration. *J Neural Transm.*, 1997. 104(1): p. 67-75.
8. Garrido, M., et al., Glutathione depletion and overproduction both initiate degeneration of nigral dopaminergic neurons. *Acta Neuropathol.*, 2011. 121(4): p. 475-485.
9. Chinta, S.J., et al., Inducible alterations of glutathione levels in adult dopaminergic midbrain neurons result in nigrostriatal degeneration. *J Neurosci.*, 2007. 27(51): p. 13997-14006.
10. Meredith, G.E. and U.J. Kang, Behavioral models of Parkinson's disease in rodents: a new look at an old problem. *Mov Disord.*, 2006. 21(10): p. 1595-1606.
11. Diaz-Hung, M.L., et al., Sensory-motor performance after acute glutathione depletion by L-buthionine sulfoximine injection into substantia nigra pars compacta. *Behav Brain Res*, 2014. 271: p. 286-93.
12. Diaz-Hung, M.L., et al., Impairment in exploratory behavior is associated with arc gene overexpression in the dorsolateral striatum of rats with nigral injection of L- buthionine sulfoximine. *Neuroscience Letters*, 2018. 687: p. 26-30.
13. Diaz-Hung, M.L., et al., Transient glutathione depletion in the substantia nigra compacta is associated with neuroinflammation in rats. *Neuroscience*, 2016. 335:p. 207-20.
14. Truong, L., et al., Developing a preclinical model of Parkinson's disease: a study of behaviour in rats with graded 6-OHDA lesions. *Behav Brain Res.*, 2006. 169(1): p. 1-9.
15. Urrutia, P.J., N.P. Mena, and M.T. Nuñez, The interplay between iron accumulation, mitochondrial dysfunction, and inflammation during the execution step of neurodegenerative disorders. *Front Pharmacol.*, 2014. 5:doi:10.3389/fphar.2014.00038.: p. doi.
16. Choi, D.Y., et al., Striatal neuroinflammation promotes Parkinsonism in rats. *PLoS One.*, 2009. 4(5): p. e5482.

AUTOR PARA LA CORRESPONDENCIA

Dr. C. Lisette Blanco Lezcano. *Departamento de Neurofisiología Experimental del CIREN. Ave 25 No 15805 % 158 y 160. Cubanacan. Playa. La Habana. Cuba CP 11300. Correo electrónico: lblanco@neuro.ciren.cu*