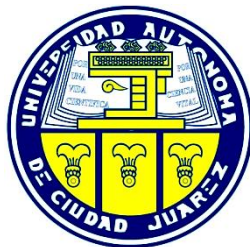


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CIUDAD JUÁREZ**  
**INSTITUTO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS**  
**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**



**IMPACTO DEL DISTRÉS PSICOLÓGICO EN EL METABOLISMO  
ENERGÉTICO Y EN LA DEFENSA ANTIOXIDANTE DE LOS SISTEMAS  
NERVIOSO E INMUNE: IMPLICACIONES EN ENFERMEDAD DE  
PARKINSON**

**TESIS**

**Que para obtener el grado de**

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**QUÍMICO BIOLÓGICAS**

**Presenta**

**MARIANA GRIGORUȚĂ**

**Cd. Juárez, Chih., México**

**Junio de 2020**

## **APROBACIÓN DE LA TESIS**

“Impacto del estrés psicológico en el metabolismo energético y en la defensa antioxidante de los sistemas nervioso e inmune: implicaciones en enfermedad de Parkinson”, reporte de investigación preparado por Mariana Grigoruță, como requisito parcial para obtener el grado de

### **DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**

ha sido aprobado y aceptado por:

---

**Dr. Alejandro Martínez Martínez**  
DIRECTOR DE TESIS

---

**Dr. Ángel Gabriel Díaz Sánchez**  
ASESOR

---

**Dra. Kristin Gosselink**  
ASESORA

---

**Dr. Bonifacio Alvarado Tenorio**  
ASESOR

---

**Dr. Joaquín Rodrigo García**  
ASESOR

## **DECLARACIÓN INSTITUCIONAL**

### **IMPACTO DEL DISTRÉS PSICOLÓGICO EN EL METABOLISMO ENERGÉTICO Y EN LA DEFENSA ANTIOXIDANTE DE LOS SISTEMAS NERVIOSO E INMUNE: IMPLICACIONES EN ENFERMEDAD DE PARKINSON**

Se permite el uso académico de información contenida en esta tesis, siempre y cuando se otorgue el crédito correspondiente al autor. Para la reproducción parcial o total de este documento con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de las autoridades que avalan esta tesis.

---

**Dr. Juan Pedro Flores Margez**

**COORDINADOR DE DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**

---

**Dr. José Alberto López Díaz**

**JEFE DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**

---

**C.D. Salvador Nava Martínez**

**DIRECTOR DEL INSTITUTO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS**

## DEDICATORIA

*Dedico este trabajo a las personas más importantes en mi vida, mis padres, mi hermana y mi amado esposo.*

## AGRADECIMIENTOS

Mi más profunda gratitud a mi comité de tesis por su apoyo y conocimiento, gracias por creer en mí y motivarme, gracias Dr. Alejandro Martínez Martínez, Dr. Ángel Gabriel Díaz Sánchez, Dr. Kristin Gosselink, Dr. Bonifacio Alvarado Tenorio y Dr. Joaquín Rodrigo García. Sin lugar a duda, todas sus recomendaciones, comentarios e ideas fueron un pilar básico para la culminación exitosa del presente trabajo y que sin su apoyo no hubiera sido posible lograrlo.

Un agradecimiento especial al Dr. Rubén Dagda de la Universidad de Nevada en Reno. Incluso si no forma parte de mi comité de tesis, él tuvo un rol muy importante en el desarrollo de este trabajo. Gracias por haberme dado la oportunidad de trabajar en su laboratorio bajo su guía, conocimiento y motivación. Gracias también a todos los miembros del laboratorio del Dr. Dagda por su apoyo y amistad: Raúl y Marisela Dagda, Ria, Smijin, Kelly, Maryann S, Mitchel, David, Mariana T and Melanie. Gracias, Ria por tu amistad, por tu cariñosa compañía, tu inocencia y alma bella, tu eres mi hermana de Reno. Gracias Dr. Robert Renden por su paciencia, guía y conocimiento.

Gracias a los miembros del laboratorio de la Dra. Gosselink de la Universidad de Texas en El Paso, por todo su apoyo y amistad: Jorge, Akshita, Athulya, Sonia, Roxana, Jameel. Gracias también al Dr. Armando Varela por todo el apoyo y la amistad.

Gracias a mis colegas del laboratorio del Dr. Martínez, por su amistad y apoyo: Marbella, Manuel, Juanito, Luis, Eloy and Dr. Naum Lobo.

Aprovecho la oportunidad para agradecer a toda mi familia que siempre ha sido mi inspiración y, gracias a ellos, soy la persona que ahora soy. Gracias a mi esposo Jona por tu amor, confianza, paciencia y por ser mi mejor amigo. Mi más profunda gratitud a mis padres, por su amor y sacrificios, por la educación que nos brindaron a mi hermana y a mí, gracias, gracias, gracias. Gracias Oana, por ser la mejor hermana que pude haber deseado, mi mejor amiga y confidente. Gracias Dany por tu amistad, por amar y cuidar a mi hermana. También, quiero agradecer sinceramente a mi familia de México, Sr. Nicolas, Sra. Cristina, Irais, Diana, José Luis, Sra. Amalia y Sr. Gustavo por su amor y por aceptarme desde el principio. Gracias a toda mi familia quienes son una parte importante de mi corazón y que siempre los amaré y querré a todos ustedes.

Gracias a todos los profesores que participaron en mi evolución durante la maestría y el doctorado. Todos ustedes son parte de todo este trabajo.

Gracias a mis compañeros de clase, Jasmin y Héctor, por su amistad, consejos y compañía. Les deseo a ambos todo el éxito en sus carreras que estoy segura les traerán felicidad y plenitud.

Un agradecimiento especial a Kris, David y Priya, de Reno. Kris y David, gracias por su hospitalidad, por su amistad y por cuidarme, por escucharme y por sus preciosos consejos. Priya, gracias por recibirme en tu casa, por cuidarme, por tu amabilidad y por introducirme a tu bella cultura de la India. Gracias Maria Elena y Berta por su amistad y por nuestras cortas charlas en el laboratorio. Espero verlos de nuevo, ustedes fueron mi familia americana.

Finalmente, pero no menos importante, gracias a mis amigos de Juárez: Roxana, Jorge, Marisela, Marianela, Juan Pablo, Raquel, José, Brenda, Emmanuel, Maria José y Alejandro; siempre han estado presentes y sin lugar a duda su amistad ha sido una herramienta para no decaer y seguir siempre hacia adelante.

## RESUMEN

### IMPACTO DEL DISTRÉS PSICOLÓGICO EN EL METABOLISMO ENERGÉTICO Y EN LA DEFENSA ANTIOXIDANTE DE LOS SISTEMAS NERVIOSO E INMUNE: IMPLICACIONES EN ENFERMEDAD DE PARKINSON

Mariana Grigoruță

El estrés psicológico afecta el eje neuroinmune y contribuye al desarrollo de enfermedades como neuropatologías. El estrés psicológico induce estrés oxidativo, inflamación sistémica y altera la estructura y las funciones de las neuronas. La enfermedad de Parkinson (PD) es un desorden neurodegenerativo causado por la edad, factores genéticos y/o toxinas, se caracteriza por la pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas y disfunción mitocondrial. En el presente estudio, hipotetizamos que el estrés psicológico fenocopia los síntomas y la patología celular de la PD y acelera la evolución de esta enfermedad en un modelo genético (PINK1-KO).

En un modelo murino joven, encontramos que el distrés psicológico induce ansiedad, déficit motor, alteración en la energía metabólica (disminución de la fosforilación oxidativa y glucólisis), cambios en la expresión de proteínas antioxidantes y del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) así como una disminución del contenido mitocondrial en el cerebro. Además, las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) mostraron cambios en el perfil bioquímico, en la expresión de proteínas antioxidantes, BDNF, y daño de DNA, pero sin cambios en la energía metabólica. La falta de la proteína quinasa 1 putativa dependiente de fosfatasa y de homólogo de tensina (PINK1), una quinasa implicada en la regulación de la mitofagia, induce la alteración del

metabolismo mitocondrial en las PBMCs pero no en la corteza prefrontal (PFC) o en la *substantia nigra* (SN), en ratas jóvenes. También, el estrés en la edad temprana tiene efectos negativos a distintas edades sobre el ciclo celular de los PBMCs y sus mitocondrias.

Nuestro trabajo fortalece la idea de que el estrés psicológico impacta negativamente el eje neuroinmune, participando en el desarrollo de neuropatologías, y propone el estudio de las PBMCs y de varios biomarcadores sanguíneos como sensores de la alteración de la homeóstasis en el cerebro.

## CONTENIDO

|  |            |
|--|------------|
| <b>ÍNDICE DE CUADROS</b> .....   | <b>XI</b>  |
| <b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....   | <b>XII</b> |
| <b>ABREVIATURAS</b> .....  | <b>XV</b>  |
| <b>GLOSARIO</b> .....  | <b>XIX</b> |
| <b>INTRODUCCIÓN</b> .....  | <b>1</b>   |
| <b>ANTECEDENTES</b> .....  | <b>4</b>   |
| ESTRÉS .....   | 4          |
| <i>Definición de estrés y clasificación</i> .....                                      | 4          |
| <i>Estrés psicológico</i> .....  | 6          |
| <i>Sistema nervioso (NS) en estrés</i> .....   | 8          |
| <i>Resiliencia</i> .....   | 10         |
| <i>Sistema inmune (IS) en estrés</i> .....   | 12         |
| <i>Sistema oxidante-antioxidante</i> .....   | 17         |
| Radicales libres .....   | 17         |
| Enzimas antioxidantes.....   | 20         |
| MITOCONDRIA.....   | 23         |
| <i>Estructura y las funciones de la mitocondria</i> .....                              | 23         |
| <i>Sistema de la oxidación fosforilativa (OXPHOS)</i> .....                            | 23         |
| <i>Mitocondria en estrés</i> .....   | 25         |
| <i>Energía del metabolismo</i> .....   | 26         |
| NEURODEGENERACIÓN EN ENFERMEDAD DE PARKINSON .....                                     | 27         |
| <i>Enfermedad de Parkinson</i> .....   | 28         |
| <i>Quinasa 1 putativa dependiente de homólogo de fosfatasa y tensina (PINK1)</i> ..... | 29         |
| <i>DJ1</i> .....   | 31         |
| <i>Factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF)</i> .....                            | 33         |
| NOOTROPICOS. PIRACETAM .....   | 35         |
| <i>Rol del Piracetam en animales y humanos</i> .....                                   | 35         |
| <i>Mecanismo de acción</i> .....   | 39         |
| <i>Rol del Piracetam en el estrés oxidativo</i> .....                                  | 40         |
| <b>HIPÓTESIS</b> .....   | <b>49</b>  |
| <b>OBJETIVOS</b> .....   | <b>50</b>  |
| <b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....  | <b>51</b>  |
| DISEÑO EXPERIMENTAL.....   | 51         |
| <i>Estudio 1</i> .....   | 51         |
| <i>Estudio 2</i> .....   | 53         |
| <i>Estudio 3</i> .....   | 54         |

|  |           |
|--|-----------|
| <i>Estudio 4</i> .....   | 56        |
| <i>Estudio 5</i> .....   | 57        |
| ADMINISTRACION DEL FÁRMACO .....   | 58        |
| EXPOSICIÓN AL ESTRÉS .....   | 58        |
| <i>Prueba de evitamiento de olor por ocultamiento</i> .....  | 58        |
| <i>Prueba de separación materna</i> .....  | 60        |
| PRUEBAS DE DISFUNCIÓN MOTORAL Y DE CONDUCTA .....  | 61        |
| <i>Prueba del laberinto en cruz elevado</i> .....  | 61        |
| <i>Prueba rotarod</i> .....  | 62        |
| <i>Prueba de fuerza de agarre</i> .....  | 62        |
| <i>Prueba de la barra transversal</i> .....  | 62        |
| COLECCIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE E AISLAMIENTO DE PBMCs .....   | 65        |
| CULTIVO PRIMARIO DE NEURONAS CORTICALES.....   | 66        |
| ENSAYOS METABOLICOS AGILENT SEAHORSE XF24 EN CEREBRO, EN PBMCs Y EN<br>NEURONAS PRIMARIOS CORTICALES ..... | 67        |
| <i>Ensayos metabolicos en cerebro</i> .....  | 70        |
| <i>Ensayos metabolicos en PBMCs</i> .....  | 72        |
| <i>Ensayos metabolicos en neuronas primarios corticales</i> .....  | 72        |
| ENSAYOS DE WESTERN BLOT .....  | 73        |
| ENSAYOS DE INMUNOFLUORECENCIA .....  | 75        |
| ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMATICA EN PBMCs, CEREBRO E HIGADO .....   | 76        |
| <i>Preparación de muestra</i> .....  | 76        |
| <i>Ensayo de la actividad de la superoxido dismutasa (SOD)</i> .....                                       | 77        |
| Ensayo de la actividad de la SOD total .....   | 77        |
| Ensayo de la actividad de la SOD mitocondrial (SOD2) .....   | 78        |
| Ensayo de la actividad de la SOD citosolico (SOD1) .....   | 79        |
| <i>Ensayo de la actividad de la catalasa (CAT)</i> .....   | 79        |
| <i>Ensayo de la actividad de la glutation S-transferasa (GST)</i> .....                                    | 80        |
| <i>Ensayo de la actividad de la glutation reductasa (GR)</i> .....   | 81        |
| <i>Ensayo de la actividad de la glutation peroxidasa (GPx)</i> .....                                       | 82        |
| ENSAYO SR- $\mu$ FTIR.....   | 83        |
| ENSAYO COMETA .....  | 84        |
| CITOMETRIA DE FLUJO .....  | 85        |
| <i>Análisis del ciclo de las PBMCs</i> .....   | 85        |
| <i>Análisis de la mitocondria activada en PBMCs utilizando MitoTracker Red<br/>    CMXRos</i> .....        | 86        |
| <i>Inducción de estrés in vitro in PBMCs utilizando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></i> .....                   | 87        |
| ENSAYO ELISA PARA LA MEDICIÓN DEL NIVEL DE CORTICOSTERONA EN PLASMA<br>.....                               | 88        |
| CUANTIFICACIÓN DE PROTEINA TOTAL (ENSAYO DE BRADFORD).....   | 88        |
| ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR (ENSAYO ALAMARBLUE) .....   | 89        |
| ANALISIS ESTADISTICO .....   | 89        |
| <b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>  | <b>91</b> |

|   |            |
|---|------------|
| CONDUCTA Y FUNCIÓN MOTORA DE LAS RATAS .....  | 91         |
| ANÁLISIS DE LA ENERGÍA METABÓLICA EN CEREBRO .....  | 96         |
| ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE BDNF Y PROTEÍNAS ANTIOXIDANTE EN CEREBRO .                                    | 105        |
| ANÁLISIS DE LA ENERGÍA METABÓLICA EN PBMCS .....  | 109        |
| ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS ANTIOXIDANTE EN PBMCS.....  | 114        |
| DAÑO DE DNA EN PBMCS .....  | 117        |
| EEFECTOS DEL ESTRÉS A EDAD TEMPRANA EN EL CICLO CELULAR Y EN ACTIVACION<br>DE MITOCONDRIAS EN PBMCS ..... | 119        |
| EFFECTOS DEL PIRACETAM EN EXPERIMENTOS EN VIVO.....   | 124        |
| <i>Comportamiento.....</i>  | 124        |
| <i>Actividad de la SOD total y GST en PFC, HC, talamo and hipotálamo en<br/>    hembras y machos.....</i> | 131        |
| <i>Peso corporal y parámetros bioquímicos en plasma en hembras y<br/>    machos.....</i>                  | 133        |
| <i>Actividad de SOD, CAT, GST, GR y GPx en hígado de hembras .....</i>                                    | 137        |
| <i>Espectra de FTIR en PBMCS.....</i>   | 138        |
| Region de lípidos (3050 cm <sup>-1</sup> – 2800 cm <sup>-1</sup> ) .....                                  | 140        |
| Region de proteínas (1700 cm <sup>-1</sup> – 1500 cm <sup>-1</sup> ).....                                 | 145        |
| <i>Expresión y actividad de proteínas antioxidante en PBMCS .....</i>                                     | 148        |
| EFFECTOS DEL PIRACETAM EN EXPERIMENTOS IN VITRO .....   | 151        |
| <i>Ensayo AlamarBlue en neuronas primarias tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> .....</i>              | 152        |
| <i>Ensayos metabólicos en neuronas primarias .....</i>  | 153        |
| <i>Expresión de BDNF y proteína antioxidante en neuronas primarias.....</i>                               | 157        |
| <b>CONCLUSIONES.....</b>  | <b>162</b> |
| <b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>   | <b>164</b> |
| <b>ANEXO 1 .....</b>  | <b>195</b> |
| <b>ANEXO 2 .....</b>  | <b>196</b> |
| <b>ANEXO 3 .....</b>  | <b>198</b> |
| <b>ANEXO 4 .....</b>  | <b>199</b> |
| <b>ANEXO 5 .....</b>  | <b>200</b> |

## ÍNDICE DE CUADROS

|   |     |
|---|-----|
| Tabla 1. Clasificación del estrés.....  | 5   |
| Tabla 2. Clasificación y características de las células inmunes en mamíferos.....   | 13  |
| Tabla 3. Clasificación de los radicales más comunes.....  | 20  |
| Tabla 4. Efecto del Piracetam en pacientes humanos.....   | 36  |
| Tabla 5. Efecto del Piracetam en la conducta de los animales .....  | 37  |
| Tabla 6. Efecto del Piracetam en el estrés oxidativo .....  | 42  |
| Tabla 7. Volúmenes de las soluciones usadas en cada pozo del blanco y muestra, en los ensayos SOD total.....                        | 78  |
| Tabla 8. Volúmenes de las soluciones usadas en cada pozo del blanco y muestra, en los ensayos SOD2 .....                            | 78  |
| Tabla 9. Volúmenes de las soluciones usadas en cada pozo del blanco y muestra, en los ensayos CAT .....                             | 79  |
| Tabla 10. Volúmenes de las soluciones usadas en cada pozo del blanco y muestra, en los ensayos GST .....                            | 81  |
| Tabla 11. Volúmenes de las soluciones usadas en cada pozo del blanco y muestra, en los ensayos GR.....                              | 82  |
| Tabla 12. Volúmenes de las soluciones usadas en cada pozo del blanco y muestra, en los ensayos GPx .....                            | 83  |
| Tabla 13. El estrés psicológico altera las proteínas antioxidantes y los niveles del BDNF en PFC, cerebro medio, HC y striatum..... | 106 |
| Tabla 14. Actividad de SOD total y GST en cerebro de hembras (corteza prefrontal, hipocampo, tálamo, hipotálamo).....               | 132 |
| Tabla 15. Actividad de SOD total y GST en cerebro de machos (corteza prefrontal, hipocampo, tálamo, hipotálamo).....                | 132 |
| Tabla 16. Parámetros bioquímicos en sangre en hembras. ....   | 135 |
| Tabla 17. Parámetros bioquímicos en sangre en machos.....   | 136 |
| Tabla 18. Actividad de enzimas antioxidantes en hígado de hembras.....  | 138 |
| Tabla 19. Proteínas antioxidantes en PBMCs de ratas hembra y macho  | 149 |
| Tabla 20. Resumen de resultados de experimentos <i>in vivo</i> acerca del efecto de Piracetam en el manejo del estrés.....          | 150 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figure 1. Posibles patologías y cambios moleculares inducidas por el estrés psicológico a través del tiempo .....  | 8  |
| Figure 2. El efecto del estrés psicológico agudo y crónico en sistema nervioso .....   | 10 |
| Figure 3. La relación bidireccional entre el Sistema Inmune Periférico y Sistema Nervioso Central .....  | 16 |
| Figure 4. El sistema oxidante-antioxidante .....   | 18 |
| Figure 5. Estructura química y el mecanismo de acción del Piracetam .....  | 40 |
| Figure 6. Diseño de Estudio 1 .....  | 52 |
| Figure 7. Diseño de Estudio 2 .....  | 54 |
| Figure 8. Diseño de Estudio 3 .....  | 56 |
| Figure 9. Diseño de Estudio 4 .....  | 57 |
| Figure 10. Diseño de Estudio 5 .....   | 58 |
| Figure 11. Prueba de evitamiento de olor por ocultamiento .....  | 60 |
| Figure 12. Modelo de estrés por separación materna .....   | 61 |
| Figure 13. Pruebas de comportamiento y función motriz .....  | 64 |
| Figure 14. Imagen de microscopía de campo claro 40X de PBMCs aisladas.   | 66 |
| Figure 15. Imagen de microscopía de campo brillante 20x and 40X de neuronas corticales primarias después de dos días de cultivo .....  | 67 |
| Figure 16. Principio del ensayo metabólico y parámetros estudiados.....  | 70 |
| Figure 17. Localización de PFC y SN en secciones coronales de cerebro de rata según el atlas estereotáxico de Paxinos and Watson.....  | 71 |
| Figure 18. Promedio total de los espectros SR- $\mu$ FTIR en segunda derivada .  | 83 |
| Figure 19. Imagen representativa de DNA intacto y dañado de un PBMC visto y analizado usando CaspLab software .....  | 85 |
| Figure 20. Histograma representativo que muestra las 4 puertas cuales representan el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular evaluado por el contenido de DNA ..... | 86 |
| Figure 21. Histograma representativo de dos parámetros representando las poblaciones de PBMCs con mitocondria activa.....  | 87 |
| Figure 22. Análisis de comportamiento en ratas WT y PINK1-KO y nivel de corticosterona en plasma .....   | 93 |
| Figure 23. Deficiencia motriz y comportamiento de ansiedad en ratas WT y PINK1-KO.....   | 95 |
| Figure 24. Disfunciones motrices severas en ratas PINK1-KO de 7 meses de edad .....  | 96 |
| Figure 25. Efecto agudo del estrés psicológico en PFC de machos sobre la energía del metabolismo.....  | 98 |
| Figure 26. Efecto agudo del estrés psicológico en SN de machos sobre la energía del metabolismo.....   | 99 |

|  |     |
|--|-----|
| Figure 27. Efecto agudo del estrés psicológico agudo en PFC de hembras sobre la energía del metabolismo.....   | 100 |
| Figure 28. Efecto del estrés psicológico agudo en SN de hembras sobre la energía del metabolismo.....  | 101 |
| Figure 29. Efectos a largo plazo del estrés psicológico en PFC de machos sobre la energía del metabolismo.....                                       | 102 |
| Figure 30. Efectos a largo plazo del estrés psicológico sobre SN de machos en la energía del metabolismo.....  | 103 |
| Figure 31. Ensayo de inmunofluorescencia para la detección de la expresión de tirosina hidroxilasa (TH) en SN de machos (efecto agudo).              | 108 |
| Figure 32. Resumen de figuras: El estrés puede inducir falla mitocondrial conduciendo a una fenocopia de la enfermedad de Parkinson en ratas WT..... | 109 |
| Figure 33. OCR y ECAR para PBMCs de ratas PINK1-KO y WT hembras y macho no estresadas.....   | 111 |
| Figure 34. Parámetros bioenergéticos de PBMCs de ratas PINK1-KO y WT hembra y macho estresadas y no estresadas.....                                  | 112 |
| Figure 35. OCR/ECAR de WT y PINK1-KO PBMCs.....  | 114 |
| Figure 36. Parámetros antioxidantes (DJ-1, SOD1 y SOD2), contenido mitocondrial (TOM20) en PBMCs de ratas PINK1-KO y WT hembras y machos.....        | 11  |
| Figure 37. Nivel de mBDNF en PBMCs de ratas PINK1-KO y WT hembras y macho.....   | 117 |
| Figure 38. Daño de DNA en PBMCs inducido por estrés psicológico.....   | 118 |
| Figure 39. Efectos de MatSep sobre el ciclo de las PBMCs.....  | 122 |
| Figure 40. Efectos de MatSep sobre actividad mitocondrial de PBMCs ...   | 123 |
| Figure 41. Análisis de comportamiento durante 5 días de estrés.....  | 126 |
| Figure 42. Nivel de corticosterona en plasma.....  | 127 |
| Figure 43. Efecto del estrés y Piracetam sobre el comportamiento de ansiedad usando la prueba del laberinto en cruz elevado.....                     | 128 |
| Figure 44. Diferencias de sexo en el comportamiento en ratas expuestas a olor a gato.....  | 131 |
| Figure 45. Cambios de peso corporal inducido por la exposición a 5 días de estrés y 6 días de tratamiento con Piracetam.....                         | 134 |
| Figure 46. Peso de glándulas adrenales.....  | 137 |
| Figure 47. Efecto del estrés y Piracetam sobre el espectrograma de FTIR de la PBMCs.....   | 140 |
| Figure 48. PCA en la región de lípidos.....  | 142 |
| Figure 49. Relaciones de lípidos y proteínas en PBMCs.....   | 144 |
| Figure 50. PCA en región de proteínas.....   | 147 |
| Figure 51. Viabilidad de neuronas primarias tratadas con diferentes concentraciones de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....                           | 153 |
| Figure 52. OCRs y ECARs en células neuronales primarias estresadas..   | 154 |

|  |     |
|--|-----|
| Figure 53. Parámetros bioenergéticos de neuronas primarias estresadas y tratadas con Piracetam .....                                       | 157 |
| Figure 54. Imagen representativa de bandas WB para todas las proteínas estudiadas en cultivos celulares primarios .....                    | 159 |
| Figure 55. Nivel de expresión de DJ-1, TOM20, SOD1, SOD2 y BDNF maduro en las neuronas primarias estresadas y tratadas con Piracetam ..... | 160 |

## ABREVIATURAS

|       |  |
|-------|--|
| aCSF  | Líquido cerebroespinal artificial (Artificial Cerebrospinal Fluid)   |
| ACTH  | Hormona adrenocorticotropa (Adrenocorticotropic Hormone)   |
| ATP   | Adenosina trifosfato (Adenosine Triphosphate)  |
| BBB   | Barrera hematoencefálica (Blood Brain Barrier)   |
| BDNF  | Factor neurotrófico derivado de cerebro (Brain-Derived Neurotrophic Factor)                                  |
| BSA   | Albumina de suero bovino (Bovine Serum Albumin)  |
| CAT   | Catalasa (Catalase)  |
| CNS   | Sistema nervioso central (Central Nervous System)  |
| DAPI  | 4',6-Diamidino-2-Fenilindol Dihidroclorido (4',6-Diamidino-2-Phenylindole Dihydrochloride)                   |
| DMEM  | Medio de Eagle modificado por Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle Medium)                                    |
| DNA   | Ácido desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic Acid)  |
| DTPA  | Ácido dietilentriaminopentaacético (Dietilentriaminopentaacetic Acid)  |
| ECAR  | Tasa de acidificación extracelular (Extracellular Acidification Rate)  |
| EDTA  | Ácido etilendiaminetetraacético (Ethylenediaminetetraacetic Acid)  |
| ESRF  | Laboratorio Europeo de Radiación Sincrotrón (European Synchrotron Radiation Facility)                        |
| ELISA | Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)                              |
| ETC   | Cadena de transporte de electrones (Electron transport chain)  |
| FBS   | Suero fetal bovino (Fetal Bovine Serum)  |
| FCCP  | Carbonilo cianuro 4-(trifluorometoxi) fenilhidrazona (Carbonyl Cyanide 4-(trifluoromethoxy) Phenylhydrazone) |
| GABA  | Ácido gamma aminobutírico (Gamma Aminobutyric Acid)  |
| GPx   | Glutación peroxidasa (Glutathione Peroxidase)  |

|        |  |
|--------|--|
| Gr     | Glutación reductasa (Glutathione Reductase)  |
| GR     | Receptores para glucocorticoides (Glucocorticoids receptors)   |
| GSH    | Glutación reducido (Reduced Glutathione)   |
| GST    | Glutación S-transferasa (Glutathione-S-Transferase)  |
| IHC    | Imunohistoquímica (Immunohistochemistry)   |
| IS     | Sistema inmune (Immune System)   |
| HPA    | Eje hipotálamo-pituitario-adrenal (Hypotalamo-Pituitary-Adrenal Axis)  |
| kDa    | Kilodalton (Kilodalton)  |
| MatSep | Separación materna (Maternal Separation)   |
| MDA    | Malondialdehído (Malondialdehyde)  |
| MMP    | Potencial de la membrana mitocondrial (Mitochondrial Membrane Potential)   |
| NaCN   | Cianuro de sodio (Sodium Cyanide)  |
| OCR    | Tasa de consumo de oxígeno (Oxygen Consumption Rate)   |
| OCT    | Temperatura óptima para cortar (Optimal Cutting Temperature)   |
| PBS    | Solución buffer de fosfato (Phosphate Buffer Solution)   |
| PBMCs  | Células mononucleares de sangre periférica (Pheripheral Blood Mononuclear Cells)   |
| PFC    | Corteza prefrontal (Prefrontal Cortex)   |
| PC1    | Componente principal 1 (Principal Component 1)   |
| PC2    | Componente principal 2 (Principal Component 2)   |
| PCA    | Análisis de componentes principales (Principal Component Analysis)   |
| PD     | Enfermedad de Parkinson (Parkinson´s Disease)  |
| PINK1  | Proteína quinasa 1 putativa dependiente de fosfatasa y de homólogo de tensina (Phosphatase and tensin homolog (PTEN)-Induced Kinase 1) |

|                |  |
|----------------|--|
| PDVF           | Membrana de fluoruro de polivinilideno (Polyvinylidene difluoride membrane)  |
| PFA            | Paraformaldehido (Paraformaldehyde)  |
| PMSF           | Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (Phenylmethylsulfonyl Fluoride)  |
| PND            | Día postnatal (Postnatal Day)  |
| ROS            | Especies reactivas de oxígeno (Reactive Oxygen Species)  |
| rpm            | Rotaciones por minuto (Rotations Per Minute)   |
| S+             | Grupo estresado  |
| S+P-           | Grupo estresado, sin tratamiento con Piracetam   |
| S+P+           | Grupo estresado, en tratamiento con Piracetam  |
| S-             | Grupo no estresado   |
| S-P-           | Grupo no estresado, sin tratamiento con Piracetam  |
| S-P+           | Grupo no estresado, en tratamiento con Piracetam   |
| SDS            | Sodio dodecil sulfato (Sodium Dodecyl Sulfate)   |
| SDS-PAGE       | Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)      |
| SEM            | Error estandar de la media (Standard Error of the Mean)  |
| SN             | Substantia Nigra   |
| SR- $\mu$ FTIR | Microespectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (Synchrotron Radiation Fourier Transform Infrared Microspectroscopy) |
| SOD1           | Superóxido dismutasa citosólica (Cytosolic Superoxide Dismutase)   |
| SOD2           | Superóxido dismutasa mitocondrial (Mitochondrial Superoxide Dismutase)   |
| TH             | Tirosina hidroxilasa (Thyroxine Hydroxylase)   |
| TOM20          | Translocasa de la membrana externa 20 (Translocase of Outer Membrane 20)   |
| UNR            | Universidad de Nevada en Reno (University of Nevada in Reno)   |

|      |  |
|------|--|
| UTEP | Universidad de Texas en el Paso (University of Texas in El Paso) |
| WB   | Western Blot   |
| WT   | Silvestre (Wild Type)  |

## GLOSARIO

|                         |  |
|-------------------------|--|
| Acinesia                | Perdida de habilidad de iniciar movimientos  |
| Ataxia                  | Perdida de coordinación de movimientos voluntarios   |
| Autosómico recesivo     | Condición cuando un individuo recibe un gen mutado de los dos progenitores   |
| Bradicinesia            | Ejecución lenta de movimientos   |
| Cerebro medio           | También denominado mesencéfalo, es una región cerebral formado por tectum y tegmentum, y es implicado especialmente en coordinación de los movimientos motoras |
| Chaperona               | Proteína que ayuda en el plegamiento de otras proteínas  |
| Cinasa                  | Enzima que cataliza el transfiere de grupos fosfato  |
| Conjugación             | Estabilidad ganada por una molécula a través de la superposición de tres o más orbitales p   |
| Distrés                 | Estrés que tiene efectos negativos por alterar deferentes vías metabólicas   |
| Epigenética             | Estudio de los cambios hereditarios en expresión de genes que no implica alteraciones en la secuencia de ADN   |
| Estrés oxidante         | Desequilibrio creado por altos niveles de radicales libres y baja cantidad de antioxidantes  |
| Eustrés                 | Estrés que estimula positivamente el cuerpo.   |
| Factor neurotrófico     | Biomolécula que promueve la sobrevivencia, crecimiento y la diferenciación de las neuronas   |
| Fosforilación oxidativa | Proceso metabólico en donde los electrones son transferidos desde NADH o FADH <sub>2</sub> a O <sub>2</sub> para formar ATP                                    |
| Glicólisis              | Proceso metabólico que convierte glucosa en dos moléculas de piruvato  |

|                         |   |
|-------------------------|---|
| Hipocinesia             | Reducción de movimientos  |
| Metabolismo             | Complejo de todas las reacciones bioquímicas implicadas en producción y síntesis de moléculas |
| Neurodegeneración       | Pérdida progresiva y permanente de neuronas y sinapsis  |
| Neuronas dopaminérgicas | Neuronas que sintetizan el neurotransmisor dopamina   |
| Nootropico              | Substantia sintética creada para aumentar las habilidades mentales                            |
| Radicales libres        | Moléculas que presentan electrones no apareados en un orbital atómico                         |
| Rata knock-out          | Rata genéticamente modificada que tiene uno o más genes inactivos                             |

## INTRODUCCIÓN

*"Lo que pasa en la mente del hombre siempre es reflejado en las enfermedades del cuerpo."*

René Jules Dubos

El estrés psicológico agudo puede tener efectos perjudiciales sobre la mente y el cuerpo (Pfau and Russo, 2015; Sierra-Fonseca and Gosselink, 2018), sin embargo, la exposición crónica al estrés los altera por largos periodos o permanentemente. Es bien conocido que el estrés psicológico altera el sistema hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA) y la actividad del sistema nervioso autónomo, induciendo inflamación del cerebro (Vargas-Caraveo, Perez-Ishiwara and Martinez-Martinez, 2015), retracción de dendritas y alteración de las conexiones sinápticas (McEwen, Nasca and Gray, 2016), estrés oxidativo, neurodegeneración, comportamiento depresivo y déficit de memoria, tanto en roedores como en humanos (Lupien *et al.*, 1998; Zhang, Zhao and Wang, 2015).

La respuesta al estrés es la suma de todas las experiencias a través de las cuales un individuo transita hasta ese momento. Estudios han mostrado que la exposición al estrés en la vida temprana induce un estrés residente en la adultez. Experiencias estresantes de intensidad leve en la edad temprana atenúan la respuesta a estrés futuro, el cuerpo se adapta fácilmente a una nueva situación y consecuentemente el impacto negativo es menor (Pfau and Russo, 2015). Sin embargo, el estrés prolongado en la vida temprana puede causar irregularidades de los sistemas nervioso e inmune, ligadas a modificaciones en la expresión de genes implicados en la reactividad del estrés, tales como la alteración de la síntesis de

corticosteroides y de sus receptores, lo que aumentan la vulnerabilidad a situaciones de estrés en el futuro (Fogelman and Canli, 2019).

Dado que la exposición crónica a niveles altos de glucocorticoides puede contribuir a la neurodegeneración y estrés oxidante, en este estudio se hipotetizó que el estrés psicológico altera la conducta, la función motriz, la energía metabólica y la abundancia de proteínas antioxidantes en el cerebro así como en las células mononucleares circulantes (PBMCs, por sus siglas en inglés), y que debido al daño oxidante subyacente a las neuropatologías, el daño oxidante inducido por estrés psicológico crónico haría una fenocopia de la enfermedad de Parkinson (PD, por sus siglas en inglés), misma que tiene su correlato en el estrés oxidante. El estrés psicológico fue inducido en ratas silvestres (WT, por sus siglas en inglés) y knock-out (KO) de la proteína quinasa 1 putativa dependiente de fosfatasa y de homólogo de tensina (PINK1, por sus siglas en inglés, un modelo parkinsoniano de rata), a olor de depredador (Dielenberg and McGregor, 2001; Vargas-Caraveo *et al.*, 2014; Vargas-Caraveo, Perez-Ishiwara and Martinez-Martinez, 2015); o por separación materna (MatSep), un modelo de estrés en vida temprana, exitosamente usado en numerosas investigaciones como paradigma del efecto del estrés en el largo plazo (Lupien *et al.*, 2009). Para confirmar que la metodología utilizada induce estrés psicológico, se midieron parámetros bioquímicos en plasma y nivel de corticosterona y se estudió el comportamiento durante y posteriormente a la exposición al estrés. Después, se evaluó el desarrollo motriz, la fosforilación oxidativa (OXPHOS, por sus siglas en inglés) y glicólisis en corteza prefrontal (PFC, por sus siglas en inglés), *substantia nigra* (SN) y en PBMCs, y se midieron la expresión y la actividad de diversas enzimas antioxidantes, el nivel de factor neurotrópico derivado del cerebro (BDNF, por sus siglas en inglés), contenido mitocondrial y la presencia de neuronas dopaminérgicas en la SN. Según nuestro conocimiento, este estudio es el primero que muestra que el estrés psicológico induce alteraciones de la energía metabólica del cerebro empleando ensayos *in vivo* con el analizador de flujo extracelular (Agilent Seahorse XF24 Metabolic), que

cuantifica en tiempo real el consumo de oxígeno (OCRs, por sus siglas en inglés) y de acidificación extracelular (ECARs, por sus siglas en inglés) en células y tejidos. Estas alteraciones del cerebro fueron asociadas con disfunciones motrices y ansiedad, esto se mostró exponiendo a las ratas a la prueba de evitamiento de olor por ocultamiento, la prueba del laberinto en cruz elevado, la prueba de la barra transversal, prueba rotarod y prueba de fuerza de agarre.

El nootrópico Piracetam se usó *in vivo* e *in vitro* para un mejor entendimiento del daño oxidante en los sistemas nervioso e inmune y la reversibilidad de este insulto. Piracetam es usado como potenciador cognitivo en personas sanas o en neuropatologías (Malykh and Sadaie, 2010a; Corazza *et al.*, 2014), Piracetam es un acelerador metabólico ya que incrementa la producción de ATP y el potencial de la membrana mitocondrial (MMP, por sus siglas en inglés) en el cerebro (Keil *et al.*, 2006; Kurz *et al.*, 2010). Usando Microespectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (SR- $\mu$ FTIR, por sus siglas en inglés) con fuente sincrotrón, este estudio mostró que el miedo y la ansiedad inducidos por estrés psicológico inducen alteración de los grupos funcionales en las células inmunes; las PBMCs de ratas estresadas mostraron peroxidación lipídica y daño en la estructura de las proteínas.

Además, usando la técnica de citometría de flujo, se demostró que el estrés en la vida temprana altera la función de las PBMCs en etapas posteriores a lo largo de la vida; las ratas adolescentes y adultas estresadas por MatSep mostraron activación crónica de mitocondrias y ciclos celulares alterados en las PBMCs y mayor neuroinflamación en la adultez.

Los resultados de esta tesis abren nuevas hipótesis en el estudio de los sistemas inmune y nervioso, la relación entre ellos en respuesta al estrés psicológico y a las implicaciones en la progresión de enfermedades neurodegenerativas. Además, este estudio ofrece pistas sobre el posible uso de diferentes biomarcadores sanguíneos (como BDNF, PINK1 y DJ1) en el diagnóstico y/o evolución del tratamiento de PD o simplemente en el estudio del estatus oxidante del cuerpo.

## ANTECEDENTES

### ESTRÉS

#### *Definición de estrés y clasificación*

En 1936, el médico y Doctor en endocrinología Hans Selye acuñó el término “estrés” como la respuesta adaptativa de las células u organismos expuestos a factores que alteran su homeostasis (Selye, 1936, 1956). Su trabajo lo convirtió en pionero en el estudio fisiológico del estrés, siendo el primero que abordó el eje hipotalámico pituitario (o hipofisiario) adrenal (HPA o HHA por sus siglas en inglés) desde un punto de vista biológico. Describió tres fases a través de las cuales el cuerpo atraviesa cuando se encuentra expuesto a estrés y las nombro “el síndrome general de adaptación”. La primera fase es la denominada “alarma”, también llamada como respuesta “lucha o huida”, inducida por la liberación de adrenalina y noradrenalina, es caracterizada por el incremento de la energía metabólica, reducción del volumen del timo, bazo, glándulas linfáticas e hígado, disminución del peristaltismo en el tracto digestivo y baja temperatura corporal. Posteriormente, el organismo entra en la segunda fase denominada “resistencia” mediada por el cortisol/corticosterona que se caracteriza por el incremento en el volumen de las glándulas adrenales, atrofia de gónadas, producción aumentada de glucosa en el hígado, disminución del factor de crecimiento y prolactina. Además, esta fase es caracterizada por el incremento de la velocidad respiratoria y cardíaca, fatiga y problemas de apetito o sueño. Si el organismo no resuelve el conflicto con su estresor, llega a la tercera fase que es el “agotamiento” como resultado de un estrés prolongado que no logró evadir el estresor y es cuando se desarrollan patologías crónicas (Selye, 1936, 1956). Tanto el estrés agudo como el crónico pueden tener impactos negativos en la fisiología del cuerpo y son asociados con muchas patologías como desórdenes neurológicos (depresión, ansiedad, desórdenes bipolares, esquizofrenia), diabetes tipo dos, enfermedades

cardiovasculares, cáncer, enfermedades autoinmunes o neurodegenerativas (Selye, 1975; Szabo, 1998; Schiavone *et al.*, 2013).

Hay muchas formas de clasificar el estrés que son adecuaciones al área de estudio, pero obedecen en su mayoría y en concordancia a lo descrito por Selye. Basándose en el tipo de origen de los estresores, el estrés puede ser psicológico, físico o químico. De acuerdo al efecto que tiene sobre el cuerpo, el estrés es llamado eustrés, cuando estimula positivamente al cuerpo, y distrés, cuando tiene efectos negativos debido a la alteración de las vías metabólicas. En base al tiempo de exposición, se le llama estrés agudo, cuando la exposición al estrés es corta, y estrés crónico, cuando el tiempo de exposición es largo (Tabla 1). (Selye, 1975; Szabo, 1998). Sin embargo, cualquiera que sea la clasificación que se use desde cada disciplina o modelo, la realidad es que en términos fisiológicos todas ellas activan el eje HPA también llamado eje del estrés, en este sentido, el estrés es simplemente estrés y es una respuesta adaptativa a las demandas del medio (Bienertova-Vasku, Lenart and Scheringer, 2020).

**Tabla 1. Clasificación del estrés** (Selye, 1975; Szabo, 1998).

| Parámetros                      | Clasificación del estrés        | Ejemplos  |
|---------------------------------|---------------------------------|---|
| <b>Origen de los estresores</b> | Estrés psicológico              | Perdida de familiares/amigos, aislamiento, problemas financieros, inseguridad, etc              |
|                                 | Estrés físico                   | Temperatura, ruido, hipoglicemia, hipoxia, enfermedad, agentes infecciosos, lesión física, etc. |
|                                 | Estrés químico                  | Fármacos, sustancias químicas de productos de limpieza, intoxicación con alcohol, etc.          |
| <b>Tiempo de exposición</b>     | Agudo                           | Periodo corto de exposición al estrés.  |
|                                 | Subagudo (episódico o repetido) | Exposición repetida a episodios cortos de estrés.   |
|                                 | Crónico                         | Periodo largo de exposición al estrés.  |

|               |         |  |
|---------------|---------|--|
| <b>Efecto</b> | Eustrés | Exámenes, competiciones, nuevos retos                                      |
|               | Distrés | Perdida de familiares/amigos, pérdida de trabajo, intoxicación con drogas. |

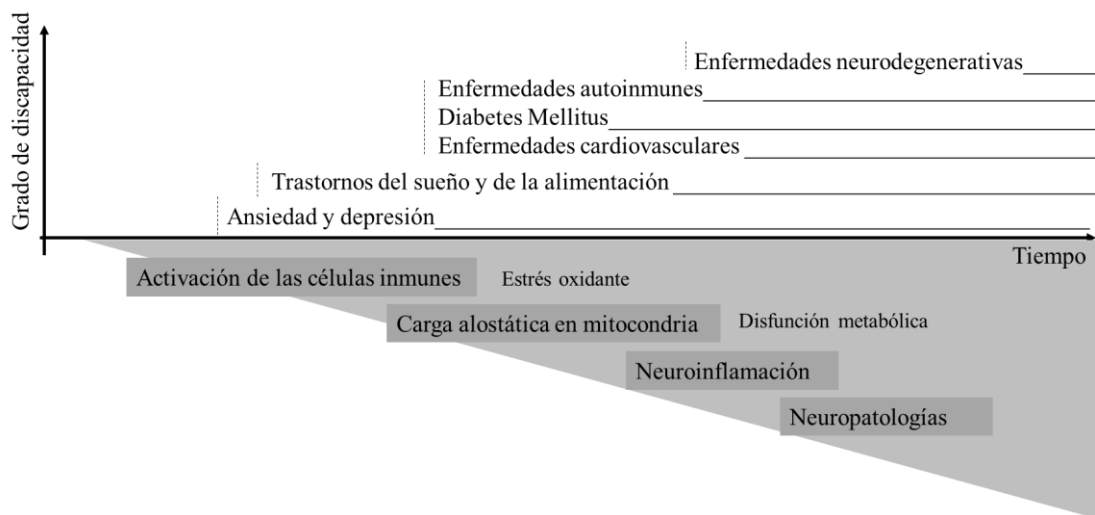
### *Estrés psicológico*

El estrés psicológico es definido como una respuesta de un organismo a estresores mentales, reales o imaginarios. Implica todo un proceso interno fisiológico necesario para adaptarse al ambiente (Selye, 1956; Monroe, 2001; Bienertova-Vasku, Lenart and Scheringer, 2020).

El estrés psicológico puede ser inducido por eventos traumáticos únicos, repetitivos o crónicos, en cualquier caso contribuye al incremento del estrés oxidante en el cerebro promoviendo neuropatologías (Sierra-Fonseca and Gosselink, 2018). Mientras el incremento temporal de cortisol puede ser benéfico, la exposición al estrés crónico induce liberación continua de cortisol y contribuye a la inflamación crónica en todo el organismo incluyendo el sistema inmune, el cerebro y los tejidos periféricos. La activación crónica del eje HPA incluye la liberación de corticosterona/cortisol y la inhibición del sistema inmune, las hormonas en cuestión y el sistema inmune alterado puede afectar adversamente los circuitos neuronales por medio de citosinas que inducen cambios en el volumen y la estructura de las neuronas, inflamación crónica de las meninges, alteraciones de vías metabólicas mediadas por ROS/NOS, procesos llamados “neuropatología del estrés” (Lucassen *et al.*, 2014). Varios estudios muestran que el HPA se encuentra alterado y desbalanceado en enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson (PD, por sus siglas en inglés) y conlleva a un incremento crónico significativo en el nivel de cortisol (Höschl and Hajek, 2001; Zhang *et al.*, 2017). Debido a que niveles altos de corticoides puede contribuir a la neurodegeneración y el estrés oxidante (Herrero *et al.*, 2015), es concebible que el estrés psicológico crónico puede exacerbar la patología de la PD.

Por su parte, el estrés en vida temprana representa un factor de riesgo para alteraciones temporales o permanentes de la homeostasis del cerebro (Fagundes and Way, 2014; Ganguly and Brenhouse, 2015). El cuidado materno es un requerimiento esencial para la vida de los recién nacidos en mamíferos, su privación afecta el comportamiento y desarrollo del futuro adulto y predispone a enfermedades crónicas por modificaciones genéticas y epigenéticas. Los primeros días posnatales son caracterizados por una alta plasticidad cerebral y actividad neuroendocrina en el sistema inmune inmaduro, y cualquier alteración compromete el desarrollo neuronal (Kuhn and Schanberg, 1998; Ganguly and Brenhouse, 2015). La separación materna neonatal (MatSep) causa múltiples efectos en el funcionamiento neuronal y del comportamiento así como en la programación neuroendocrina y neuroinmune, tanto en corto como a largo plazo (Huot *et al.*, 2002; Zhang, Qin and Zhao, 2013; Brenhouse, Danese and Grassi-Oliveira, 2018). Además, los efectos del estrés son dependientes de la frecuencia y duración de este, así como del sexo y edad (Gracia-Rubio *et al.*, 2016; Bereshchenko, Bruscoli and Riccardi, 2018; De Melo *et al.*, 2018).

El estrés psicológico induce estrés oxidante y causa daños orgánicos que pueden llevar a patologías como ansiedad y depresión, desórdenes de apetito y sueño, enfermedades autoinmunes, diabetes mellitus, enfermedades cardiovasculares, desórdenes neurodegenerativos como PD, enfermedad de Alzheimer o demencia. Dentro de las células, el estrés induce daño oxidante en lípidos, proteína y DNA, desregula la maquinaria transcripcional, altera la actividad y expresión de proteínas antioxidantes (CAT, SOD1, SOD2, DJ1), induce carga alostática en la mitocondria, inflamación, neuroinflamación y neurodegeneración (Fig. 1). Colectivamente, estos cambios bioquímicos afectan adversamente los sistemas nervioso e inmune (Mejia-Carmona *et al.*, 2014, 2015; Grigoruță *et al.*, 2018).

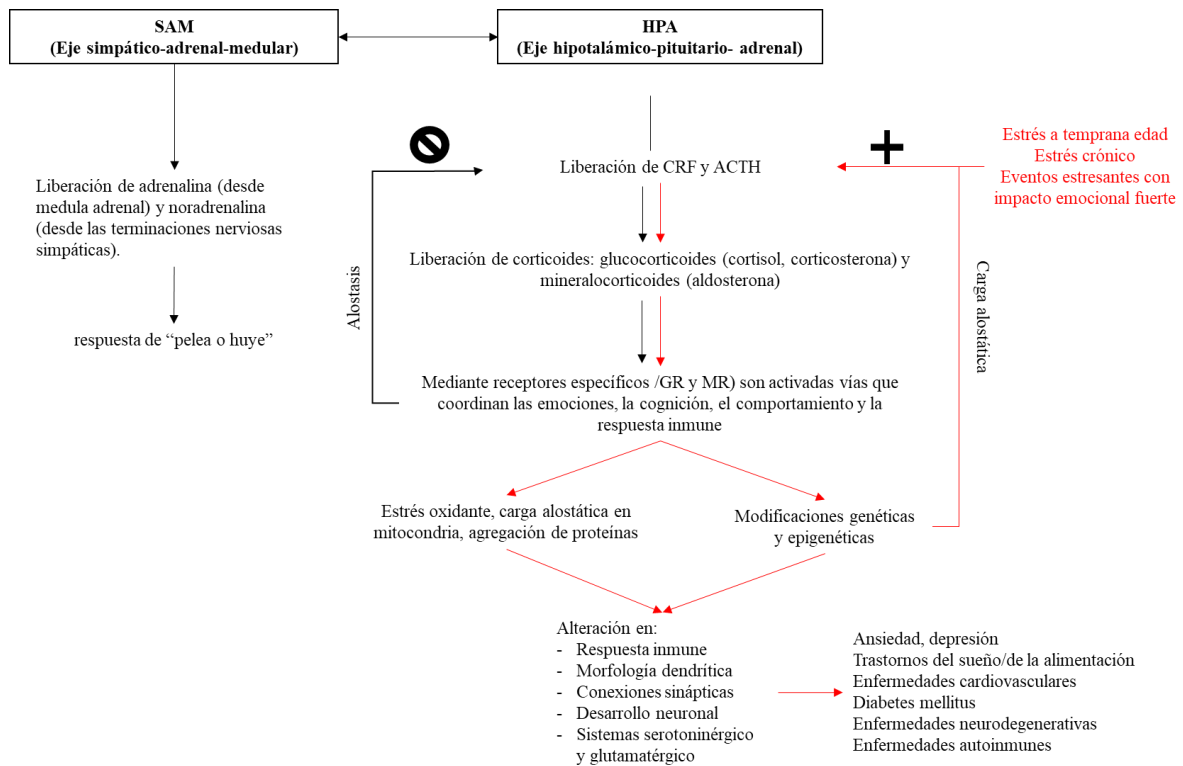


**Figura 1. Posibles patologías y cambios moleculares inducidas por el estrés psicológico a través del tiempo** (Mejia-Carmona *et al.*, 2014, 2015; Grigoruță *et al.*, 2018; Picard and McEwen, 2018).

### *Sistema nervioso (NS) en estrés*

El estrés psicológico induce la liberación de neurotransmisores y neurohormonas activando el eje simpático adrenomedular (SAM, por sus siglas en inglés) y el eje HPA. Como una rápida respuesta al estrés, la vía SAM es activada, y la adrenalina y noradrenalina son liberadas por cortos periodos de tiempo de la médula adrenal y las terminales nerviosas simpáticas, respectivamente. De esta forma, el cuerpo se encuentra en un estado de alarma, conocido como respuesta de “pelea o huye”, caracterizada por taquicardia, incremento de la velocidad respiratoria, vasoconstricción periférica, sudoración, cambios en el tono de la voz, entre otros. Posteriormente, la cascada HPA es activada, y la incapacidad para regularla puede contribuir a condiciones patológicas (Sierra-Fonseca and Gosselink, 2018). La acetilcolina, serotonina o noradrenalina activan las neuronas del hipotálamo, las cuales sintetizan el factor de liberación de la corticotropina (CRF, por sus siglas en inglés) y la hormona arginina vasopresina (AVP, por sus siglas en inglés). Las CRF y AVP estimulan el lóbulo anterior de la glándula pituitaria la cual libera la hormona adrenocorticotrópica (ACTH, por sus siglas en inglés). Posteriormente, la ACTH

estimula la corteza adrenal que sintetiza los glucocorticoides (cortisol y corticosterona), que activan las vías metabólicas relacionadas con las proteínas inflamatorias y que regulan la respuesta inmune y el metabolismo de la glucosa, o mineralocorticoides (aldosterona) implicados en el mantenimiento electrolítico y balance de los fluidos en la célula. Otras hormonas como la hormona del crecimiento, el glucagón, la renina y la angiotensina, también participan activamente en la respuesta del cuerpo al estrés (Black, 2002). La actividad del eje HPA es mediada a través de receptores específicos para glucocorticoides (GR, por sus siglas en inglés) y para mineralocorticoides (MR, por sus siglas en inglés). En el cerebro, esos receptores son ubicuos y hacen a las neuronas una diana importante del estrés. Además, como un sistema de retroalimentación negativa, los glucocorticoides regulan la cascada neuroendocrina inhibiendo la liberación de CRF y ACTH. Sin embargo, largos tiempos de exposición al estrés alteran la expresión de GR o MR, lo que impide el apagado del eje HPA y expone las células a altas concentraciones de corticosteroides de manera continua (Fig. 2) (Lucassen *et al.*, 2014).



**Figura 2. El efecto del estrés psicológico agudo y crónico en sistema nervioso.** Como respuesta rápida al estrés, se activa el eje SAM caracterizado por la liberación de adrenalina y noradrenalina e inducción del estado de "pelea o huye". Posteriormente, el eje HPA es activado, las hormonas corticoides son liberados hasta que se resuelve el conflicto con el estresor. Cuando el estresor es crónico o de alto impacto, la realimentación negativa del eje HPA deja de funcionar, lo que lleva a daño oxidante, carga alostática en mitocondria, agregación de proteínas, entre otras (Lucassen *et al.*, 2014; Sierra-Fonseca and Gosselink, 2018). CRF: factor de liberación de la corticotropina; ACTH: hormona adrenocorticotropa; GR: receptores a glucocorticoides; MR: receptores a mineralocorticoides.

## Resiliencia

La resiliencia ocurre cuando el cerebro es capaz de responder positivamente a una situación de estrés y trabaja en beneficio de todo el cuerpo, adaptándose al estrés del cual puede obtener efectos positivos. La resiliencia se trata de una activación eficiente del eje neuroinmune caracterizado por un balance óptimo entre corticoides liberados y sus receptores. Esta adaptación al estrés es mediada por la buena coordinación entre el eje HPA y la vía SAM para mantener la homeostasis en todo el cuerpo. Este proceso es llamado alostasis y envuelve todos los

neurotransmisores y hormonas que trabajan para mantener el equilibrio de los sistemas nervioso e inmune. Cuando este sistema es sobrecargado la regulación es alterada, la alostasis es cargada y sobrecargada. La pérdida de la resiliencia está ligada a la ansiedad y depresión, afecta el comportamiento y la cognición, e incrementa el riesgo de desarrollo de enfermedades crónicas (McEwen and Wingfield, 2003).

El cerebro es el objetivo clave de la respuesta al estrés, resiliencia o carga alostática. En el estrés agudo o crónico, el cerebro muestra cambios estructurales y funcionales, tales como morfología dendrítica y conexiones sinápticas alteradas, que los animales jóvenes fácilmente recuperan después de resolver las situaciones de estrés. Sin embargo, este estado de recuperación es diferente al estado inicial, cualquier impacto sobre el cerebro tiene efectos permanentes a este nivel (Goldwater *et al.*, 2009). Tanto en ratas como en humanos, el estrés en la vida temprana induce alteraciones genéticas y epigenéticas para proteínas relacionadas a la actividad del eje HPA. El estrés en la vida temprana altera la expresión de los GR en diferentes regiones del cerebro causando irregularidades en la vía de inhibición para el eje HPA. Además, el estrés induce hipometilación del gen GR (McGowan *et al.*, 2009; Kurek *et al.*, 2018) que se expresan en el cerebro y en sistema inmune, entre otros tejidos y órganos. La liberación descontrolada de cortisol/corticosterona, alteración de la expresión de grelina y leptina ligadas a la alteración de la ingesta de alimentos, anorexia, bulimia nerviosa u obesidad, asimismo, incrementa el riesgo de síndrome metabólico en adultos. También, el incremento de la liberación de ACTH, la exposición crónica de células a altas concentraciones de corticosteroides y la alteración de sistemas serotoninérgico y glutamatérgico apuntan hacia las cargas alostáticas en los sistemas cardiovasculares, metabólicas o inmunes (Fogelman and Canli, 2019; Malik and Spencer, 2019). Además, la desregulación del sistema dopaminérgico (polimorfismos de dopamina D2, receptores de genes D3 o genes de catecol o metiltransferasa, entre otros), del sistema serotoninérgico (polimorfismo de

transportador de serotonina o receptor de genes codificantes), del sistema GABAérgico (polimorfismos en el receptor GABA) o del sistema complemento (variantes genéticas de factores complemento B, H e I) fueron fuertemente ligados con depresión o desórdenes de estrés postraumático. Por otro lado, mutaciones en genes relacionados a apoptosis (para caspasa o proteínas Bcl2, por ejemplo) o genes relacionados con neurotransmisión y neuromodulación (como genes codificadores de factores neurotróficos relacionados al crecimiento neuronal y plasticidad) fueron encontrados en pacientes con estrés postraumático (Boyajyan *et al.*, 2015). Incluso, en animales estresados se ha encontrado patrones diferenciales de metilación de regiones promotoras o reguladoras de diferentes genes relacionados con el aumento de la hipertensión o disfunción endotelial (Vidrascu *et al.*, 2019).

#### *Sistema inmune (IS por siglas en inglés) en el estrés*

El IS representa un conjunto coordinado de células y hormonas responsables del mantenimiento de la homeostasis del cuerpo cuando es expuesto a antígenos externos, las células inmunes son generadas en la médula ósea y tienen diferentes sitios de maduración y residencia. Las células hematopoyéticas (generadas en médula ósea) son progenitores de la célula madre multipotencial llamada hemocitoblasto, que se diferencia asimétricamente en dos linajes, uno representado por las células madre mieloides y otro por las células madre linfoides. Los progenitores mieloides son los precursores de los granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos), los monocitos/macrófagos, las células dendríticas-mieloides, los mastocitos, los eritrocitos, y las plaquetas; Por su parte, las células madre linfoides forman los linfocitos (células T, células B y células Natural-killer o células NK). Los monocitos, encontrados en sangre circulante, se diferencian en macrófagos en el tejido. Incluso, las células dendríticas y los mastocitos se diferencian y cumplen sus funciones en los tejidos. Dependiendo de la forma de

los núcleos, las células inmunes circulantes son clasificadas como células mononucleares (linfocitos, monocitos y macrófagos) y células polimorfonucleares (granulocitos), descritas en la Tabla 2 (McComb *et al.*, 2013).

**Tabla 2. Clasificación y características de las células inmunes en mamíferos (McComb *et al.*, 2013).**

| Tipo de célula                    |  | Sitio de maduración  | Sitio de residencia       | Función  |
|-----------------------------------|--|--|---------------------------|--|
| <b>Células mononucleares</b>      |  |  |                           |  |
| Linfocitos                        | Células B  | Medula ósea  | Sangre y tejido linfático | Producción de anticuerpos (inmunidad humoral, respuesta inmune adaptativa).  |
|                                   | Células T <ul style="list-style-type: none"> <li>• colaboradoras</li> <li>• citotóxicas</li> </ul> | Timo   | Sangre y tejido linfático | Estimulan el crecimiento y la activación de las células B (inmunidad humoral). Activa los macrófagos vía liberación de citocinas (inmunidad celular, respuesta inmune adaptativa). |
|                                   |  |  |                           | Destruyen las células infectadas por virus, células tumorales o extrañas (inmunidad celular, respuesta inmune adaptativa).   |
|                                   | Asesina natural o natural killer (NK)  | Sangre   | Sangre y tejido linfático | Destruyen las células infectadas por virus o células tumorales (acción dependiente de anticuerpos).  |
| <b>Monocitos/ Macrófagos</b>      |  | Los monocitos, células inmaduras, son transportados por la sangre llegando a los tejidos donde se diferencian en macrófagos. |                           | Presentación de antígeno a las células T, fagocitosis, producción de citocinas (conectan las respuestas inmunes innatas y adaptativas).  |
| <b>Células dendríticas</b>        |  | Tejidos linfáticos   | Tejidos                   | Presentación de antígeno a las células T (conectan las respuestas inmunes innatas y adaptativas).  |
| <b>Mastocitos</b>                 |  | Tejidos  | Tejidos                   | Liberación de mediadores inflamatorios como citocinas, serin-proteasas, histamina, enzimas lisosomales, ROS (parte de la inmunidad innata)   |
| <b>Células polimorfonucleares</b> |  |  |                           |  |
| <b>Neutrófilos</b>                |  | Medula ósea  | Sangre y tejidos          | Fagocitosis (parte de la inmunidad innata).  |

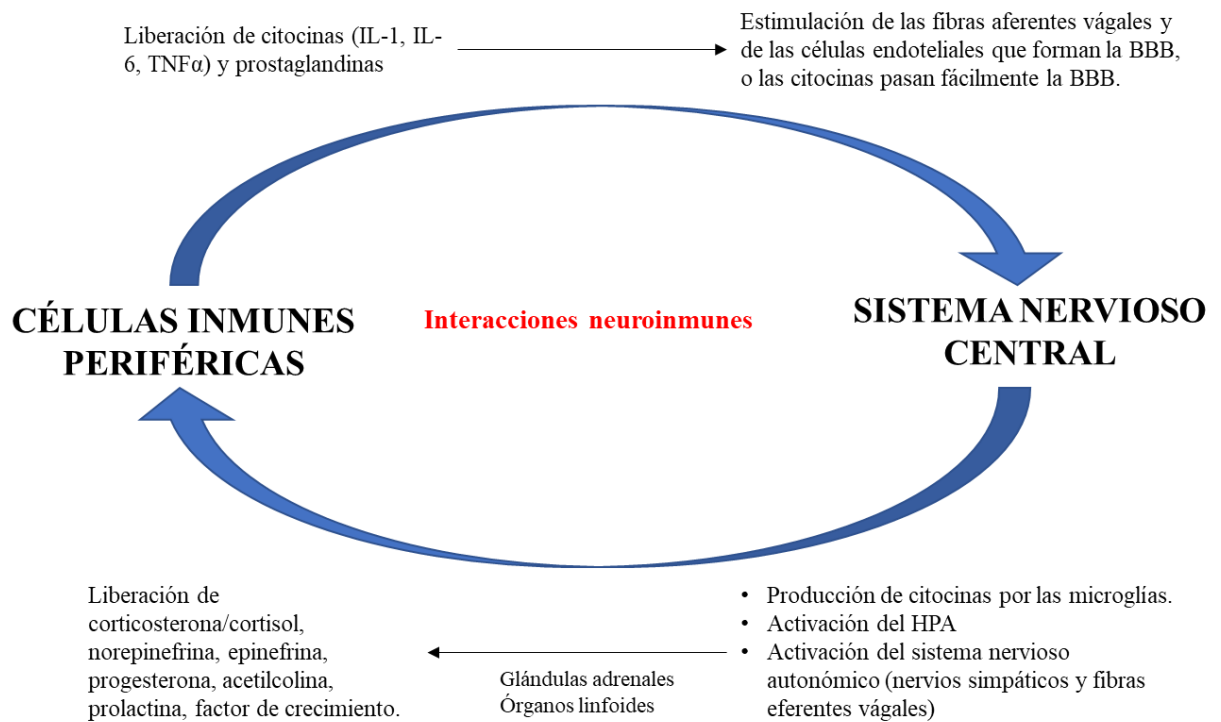
|                    |             |                  |  |
|--------------------|-------------|------------------|--|
| <b>Eosinófilos</b> | Medula ósea | Sangre y tejidos | Liberación de mediadores inflamatorios como citocinas, ROS, mediadores lipídicos, factores de crecimiento (rol en la defensa ante la infección parasitaria y alergias).    |
| <b>Basófilos</b>   | Medula ósea | Sangre y tejidos | Liberación de mediadores inflamatorios como heparina, histamina y regulación de la conducta de las células T (rol en la defensa ante la infección parasitaria y alergias). |

La respuesta innata o natural inmune es una respuesta rápida a un antígeno e incluye a las células polimorfonucleares, las células fagocíticas (neutrófilos, monocitos y macrófagos) y las células NK. La respuesta innata no requiere una exposición previa al antígeno y es caracterizada por la liberación inmediata de mediadores inflamatorios como citocinas e interferones, destrucción de células infectadas o ingestión y destrucción de los antígenos (McComb *et al.*, 2013).

La respuesta inmune adaptativa es una respuesta retardada que para la activación requiere de interacción previa con el antígeno y es representado por los linfocitos, conocidos también como células blancas, e incluye las células T y B (McComb *et al.*, 2013). Los linfocitos T actúan como células efectoras y son clasificadas en dos principales grupos de acuerdo con el tipo de receptores expresados en su membrana citoplasmática: los CD4 (células T ayudadoras o colaboradoras), que median la respuesta inmune de macrófagos y células B, y las CD8 (células T citotóxicas) las cuales liberan moléculas tóxicas que destruyen a la célula objetivo. Los linfocitos B expresan receptores inmunoglobulina sobre la superficie de la célula que están usando para reconocer epítopos antigénicos específicos y liberan anticuerpos en la sangre y en otros fluidos para inhibir a los antígenos (LaRosa and Orange, 2008).

Los sistemas nervioso e inmune están bidireccionalmente conectados por hormonas y neurotransmisores para mantener la homeostasis del cuerpo. El eje HPA y la vía SAM provocan una respuesta inflamatoria mediante el incremento de

la producción de citocinas proinflamatorias como interferón-gamma, interleucinas o factor de necrosis tumoral alfa, la activación del factor nuclear de transcripción NF-kB o la estimulación de proteínas de la fase aguda, entre otros. Un proceso generalizado de inflamación afecta la homeostasis de las células o tejidos mediante el incremento del estrés y daño oxidante (Danese *et al.*, 2007; Fogelman and Canli, 2019). Las células inmunes producen moléculas proinflamatorias o pueden sintetizar hormonas y neurotransmisores como acetilcolina, melatonina, ACTH, TSH, prolactina, hormonas de crecimiento, las cuales son capaces de permear la barrera hematoencefálica (BBB, por sus siglas en inglés), estimulan aferencias vagales o células endoteliales que forman la BBB, y alcanzan el cerebro. En el cerebro, la microglía es estimulada liberando citocinas que inducen neuroinflamación. Además, el eje HPA y el sistema nervioso autónomo (nervios simpáticos y eferentes vagales) liberan corticosterona/cortisol, norepinefrina, progesterona, acetilcolina, entre otros. Estas hormonas y neurotransmisores interactúan con receptores específicos encontrados sobre la superficie de células inmunes y señalan las vías que activan la respuesta inmune innata y adaptativa (Dantzer, 2018). La relación entre estos dos sistemas ha sido ampliamente explorada, sin embargo, no está claro si el daño oxidante lo altera de la misma forma. Asumiendo que ambos sistemas son afectados por el estrés al mismo tiempo y de formas similares, las células inmunes pueden ser un sensor para la alteración de la homeostasis del cerebro (Fig. 3).



**Figura 3. La relación bidireccional entre el Sistema Inmune Periférico y Sistema Nervioso Central (Glaser and Kiecolt-Glaser, 2005).**

El ambiente tiene un rol crucial en el desarrollo del sistema neuroinmune y la reactividad al estrés depende de la interacción entre factores ambientales y hereditarios, lo cual comienza desde el útero y continúa hasta la muerte. Situaciones estresantes y no estresantes o actividades diarias, como ejercicio, lectura o interacción social, modulan el desarrollo y la actividad neuronal (McEwen and Gianaros, 2011). Estudios previos han mostrado que el estrés en la vida temprana induce activación crónica y cambios morfológicos y funcionales de la microglía con consecuencias de larga duración en su reactividad. La microglía es esencial en el mantenimiento de una conexión neuronal sana y participa en el desarrollo de CNS. Además, se ha encontrado que la citosina TNF-  $\alpha$ , sintetizada por la microglía, en el cerebro juega un rol importante en la sinapsis, regulando la expresión de receptores AMPA y GABA, controlando la liberación de glutamato en neuronas y astrocitos. Por otro lado, las microglías interactúan con células

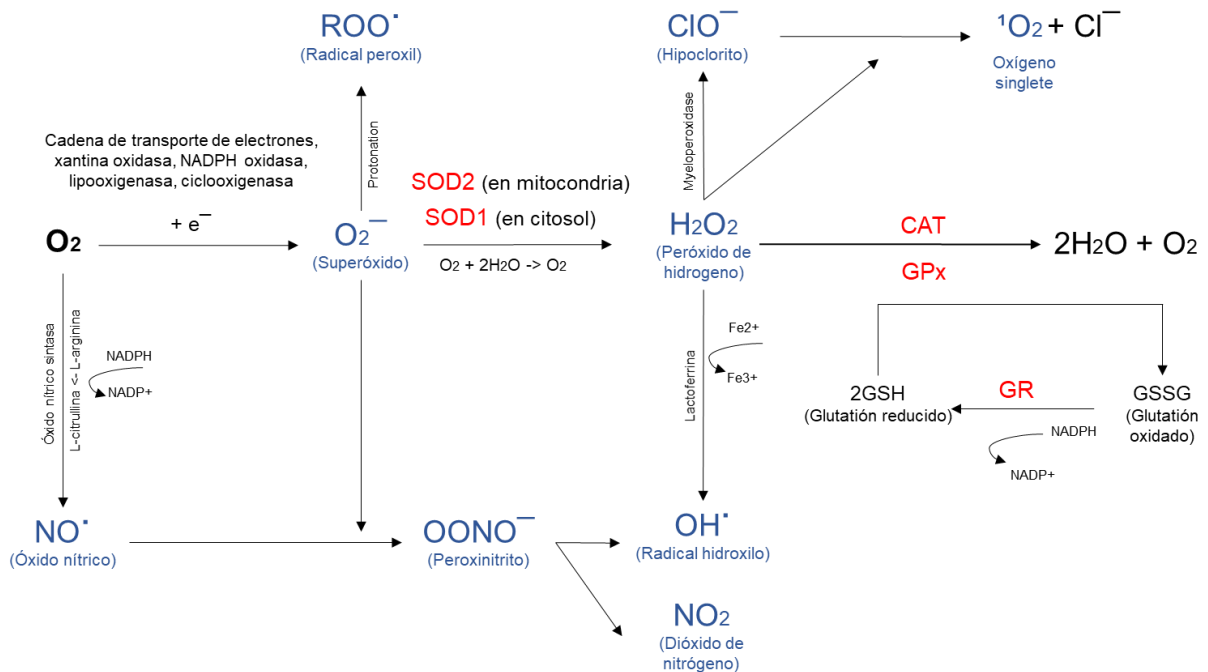
neuronales vía la cascada complemento o por vías que implican quimiocinas. La microglía está implicada en la activación de diferentes vías relacionadas con la proliferación y supervivencia de neuronas (Olmos and Lladó, 2014; Posfai, Csere and Orsolits, 2018). La inflamación crónica y el estrés oxidante altera la plasticidad del cerebro, morfología o volumen, modifica dendritas, sinapsis y neurotransmisión en diferentes regiones del cerebro como el hipocampo, corteza prefrontal, amígdala o ganglio basal, que está envuelto en el desarrollo de desórdenes mentales tales como la disminución cognitiva, disturbios en la memoria y el sueño, desórdenes por el uso de sustancias, ansiedad y depresión (Schiavone *et al.*, 2013; Catale *et al.*, 2020).

### *Sistema oxidante-antioxidante*

A nivel molecular, el estrés es caracterizado por una ambivalencia entre el incremento de prooxidantes (radicales libres) y la disminución de la actividad del sistema antioxidante. La incapacidad de las células para afrontar un estrés oxidante alto lleva al desarrollo de patologías celulares que pueden alterar la salud (Valko *et al.*, 2007; Massaad and Klann, 2011).

### Radicales libres

Los radicales libres son cualquier átomo, solo o en una molécula, con electrones reactivos no apareados. El término “libre” fue introducido para indicar que el radical es un átomo presente en una molécula difusible. Hoy en día, la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC por sus siglas en inglés) establece que “libre” no debería ser usado para radicales y el nombre apropiado es solo “radical” por sí solo. En la naturaleza, cuando el oxígeno es el aceptor clave de electrones en la cadena respiratoria, los radicales son principalmente derivados del oxígeno, generando especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), y del nitrógeno (especies reactivas de nitrógeno, RNS, por sus siglas en inglés) (Fig. 4) (Phaniendra, Jestadi and Periyasamy, 2015).



**Figura 4. El sistema oxidante-antioxidante.** Reacciones químicas de las vías antioxidantes donde son implicadas: la superóxido dismutasa citosólica (SOD1), la superóxido dismutasa mitocondrial (SOD2), la catalasa (CAT), la glutatión peroxidasa (GPx) y la glutatión reductasa (Gr). NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato,  $ROO^{\cdot}$ : radical peroxil,  $ClO^-$ : hipoclorito,  $^1O_2$ , oxígeno singlete,  $O_2^{\cdot -}$ : superóxido,  $H_2O_2$ : peróxido de hidrogeno,  $NO^{\cdot}$ : óxido nítrico,  $OONO^-$ : peroxinitrito,  $OH^{\cdot}$ : radical hidroxilo,  $NO_2$ : dióxido de nitrógeno (Phaniendra, Jestadi and Periyasamy, 2015).

La mitocondria es la principal fuente de radicales, durante la producción de ATP, algunos electrones se escapan de la cadena de transporte de electrones e interactúan con las moléculas de oxígeno formando el radical superóxido, uno de los más inestables que genera la producción de otras especies reactivas (Fig. 4). Además, la xantina-oxidasa, NADPH oxidasa, lipoxigenasa o ciclooxigenasa son también importantes fuentes de radicales superóxidos. Los ROS pueden ser radicales (radical peroxi, superóxido, radicales hidroxilos) muy reactivos e inestables, o no radicales, que tienen alta capacidad para iniciar reacciones de

oxidación (oxígeno sencillo, peróxido de hidrógeno). También, las especies reactivas de nitrógeno (RNS por sus siglas en inglés) contienen nitrógeno con electrones no apareados altamente reactivos y la mayoría son moléculas inestables de óxido nítrico y dióxido de nitrógeno (Tabla 3) (Valko *et al.*, 2007; Phaniendra, Jestadi and Periyasamy, 2015). ROS y RNS pueden inducir alteraciones muy a menudo irreversibles en la estructura y las funciones de las proteínas, lípidos o ácidos nucleicos, que son bases moleculares de la patogénesis. Sin embargo, estas moléculas altamente reactivas son benéficas para las células siendo parte de muchas rutas de señalización relacionadas con la sobrevivencia celular, crecimiento y diferenciación, participan en la regulación de la respuesta inmune, mitosis, plasticidad sináptica y circuitaría neuronal (Valko *et al.*, 2007; Massaad and Klann, 2011).

Muchos estudios han mostrado que el estrés psicológico es traducido a la producción de ROS/RNS y estrés oxidativo. Eventos de estrés severo han mostrado afectaciones en la homeostasis del eje HPA a través de diferentes mecanismos moleculares como la alteración de receptores de glucocorticoides que cambian la regulación de otros neurotransmisores y hormonas implicadas en el mantenimiento del equilibrio redox, alteración en el metabolismo del glutamato, alteración del RNA, entre otras. Esos cambios activan rutas moleculares diferentes que llevan al estrés oxidativo, modificaciones de la morfología del cerebro, inflamación y desarrollo de enfermedades (Schiavone *et al.*, 2013; Lucassen *et al.*, 2014).

**Tabla 3. Clasificación de los radicales más comunes** (Valko *et al.*, 2007; Gruhlke and Slusarenko, 2012; Phaniendra, Jestadi and Periyasamy, 2015)

| <b>Especies reactivas de oxígeno (ROS)</b>  |  |
|---|--|
| Radicales   | No-radicales   |
| Superóxido ( $O_2^{\bullet}$ )<br>Hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ )<br>Alcoxilo ( $RO^{\bullet}$ )<br>Peroxilo ( $ROO^{\bullet}$ ) | Peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ )<br>Oxígeno singlet ( $^1O_2$ )<br>Ozone ( $O_3$ )<br>Peróxido orgánico (ROOH)<br>Ácido hipoclorito (HOCl)<br>Ácido hipobromito (HOBr)   |
| <b>Especies reactivas de nitrógeno (RNS)</b>  |  |
| Radicales   | No-radicales   |
| Óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ )<br>Dióxido de nitrógeno ( $NO_2^{\bullet}$ )   | Peroxinitrito ( $ONOO^-$ )<br>Cation nitrosilo ( $NO^+$ )<br>Anión nitrosilo ( $NO^-$ )<br>Trióxido de dinitrógeno ( $N_2O_3$ )<br>Tetraóxido de dinitrógeno ( $N_2O_4$ )<br>Ácido nitroso ( $HNO_2$ )<br>Ácido peroxinitroso ( $ONOOH$ )<br>Cloruro de nitrosilo ( $NO_2Cl$ ) |
| <b>Especies reactivas de azufre (RSS)</b>   |  |
| Radicales   | No-radicales   |
| Radical tiilo ( $RS^{\bullet}$ )  | Tiol (RSH)<br>Disulfuro (RSSR)<br>Ácido sulfénico (RSOH)<br>Tiosulfinato $RS(O)SR$<br>Tiosulfonato $RS(O)_2SR$   |

### Enzimas antioxidantes

El estudio de los radicales libres *in vivo* está limitado por la vida media tan corta de éstos (fracciones de segundo), por ello, en Biomedicina, es útil el estudio de las huellas moleculares que éstos dejan (Valko *et al.*, 2007; Phaniendra, Jestadi and Periyasamy, 2015), así como la activación de los sistemas antioxidantes los cuales pueden ser estudiados en el largo plazo. Cada célula tiene su propio sistema de protección contra radicales libres. Las enzimas antioxidantes transforman el radical superóxido en peróxido de hidrógeno, oxígeno molecular y agua (Fig. 4), y son buenos marcadores en el estudio del estrés oxidante.

*Superóxido dismutasa.* Las enzimas superóxido dismutasa (SOD) son consideradas la primera línea de protección contra los radicales libres ya que catalizan la dismutación del anión superóxido (Fig. 4), un radical muy reactivo, en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular usando procesos redox y un metal en el sitio activo. Han sido identificadas 3 formas de SOD: la SOD cobre-zinc (CuZnSOD o SOD1) predominante en el citosol pero también encontrada en el espacio intermembranal de la mitocondria, núcleo, lisosomas, peroxisoma y microsomas; la SOD de manganeso (MnSOD o SOD2) encontrada en mitocondria y poco en peroxisomas; y la extracelular Cu,ZnSOD (SOD3) especialmente encontrada en la matriz extracelular y sobre la superficie de la célula (Campos-Shimada *et al.*, 2018).

*Catalasa (CAT)* es parte de la segunda línea de defensa contra ROS ya que metaboliza el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular (Fig. 4). Esta enzima usa un metal en el sitio activo y NADPH como enzima cofactor, y es principalmente encontrada en el peroxisoma y en el citosol. Se han descrito 3 tipos de catalasas: la catalasa típica y la catalasa-peroxidasa, ambos tipos con un átomo de hierro en el sitio activo, y la catalasa de manganeso. Sólo la catalasa típica es encontrada en mamíferos. Esta forma tiene 62 kDa y está formada por 4 subunidades idénticas y cada subunidad tiene 4 dominios y un grupo prostético hemo (Glorieux and Calderon, 2017).

*Glutación reductasa (Gr)* es una enzima antioxidante de 100 a 120 kDa que cataliza la reducción del glutación disulfuro (GSSG) a glutación reducido (GSH) mediado por NADPH (Fig. 4). El incremento de la actividad y la expresión de Gr en estrés es asociado con un sistema antioxidante funcional (Ithayaraja, 2011). El GSH es un tripéptido que dona fácilmente un nitrógeno y tiene un rol crucial en la disminución del estrés oxidante asociado a reacciones metabólicas incluyendo síntesis y transporte de proteínas, fosforilación, estabilización de estructuras o plegamiento y procesos de transcripción, entre otros. GSH es sintetizado de glutamina, cisteína y glicina por glutación sintasa o es formado en las reacciones redox de GSSG. GSH

es encontrado predominantemente en el citosol y representa alrededor del 90 % del glutatión total en la célula, mientras que GSSG es solo el 10 %. Un incremento de la relación entre GSSG y GSH es un indicador del incremento del estrés oxidante (Forman, Zhang and Rinna, 2009; Ithayaraja, 2011).

*Glutati3n S transferasa (GST)*. Esta familia de enzimas est1 implicada en diferentes rutas metab3licas para disminuir el estr3s oxidante y para inhibir los efectos de metabolitos reactivos provenientes de reacciones redox o las consecuencias de diferentes mol3culas t3xicas como drogas, pesticidas o contaminantes ambientales. Las GSTs conjugan mol3culas externas con GSH y las hacen menos reactivas y peligrosas para las c3lulas. La familia GST est1 clasificada de acuerdo con la localizaci3n: la GST citos3lica (clasificada como GST alpha, zeta, theta, mu, pi, sigma y omega), la GST mitocondrial (conocida como GST kappa) y la GST microsomal (conocida como "prote3nas asociadas a membrana, implicadas en el metabolismo de los eicosanoides y del glutati3n") (Hayes, Flanagan and Jowsey, 2005; Allocati *et al.*, 2018).

*Glutati3n Peroxidasa (GPx)* cataliza la reducci3n de per3xido de hidr3geno a agua inhibiendo la peroxidaci3n lip3dica principalmente usando GSH y selenio como cofactores, finalmente resultando en GSSG. (Fig. 4). Hay ocho formas de GPx en los mam3feros (GPx1-8) pero la m1s abundante es la GPx1 que puede ser encontrada en el citosol, mitocondria y peroxisomas. Niveles bajos de esta enzima est1n asociados con alteraci3n de la protecci3n antioxidante de la c3lula (Lubos, Loscalzo and Handy, 2011).

Dependiendo de la duraci3n y de la intensidad del estr3s, se ha observado variaci3n en la actividad y la expresi3n de SOD, CAT, GPx, Gr y GST. Estas enzimas antioxidantes incrementan su actividad cuando los radicales libres son liberados, pero disminuyen o pierden la funci3n en un estr3s intenso o por largos periodos. Por ejemplo, SOD, GST and CAT muestran una disminuci3n en la actividad en isquemia cerebral inducida (73), en estr3s inducido por AlCl<sub>3</sub> (Abdel-

Salam and Hamdy, 2016), por una solución de fructosa al 60 % (Mamchur *et al.*, 2015), por escopolamina (Swathi *et al.*, 2015), por bromuro de etidio (O. M. E. Abdel-Salam and Nada, 2011) o por hipoxia (Solanki *et al.*, 2011).

## MITOCONDRIA

### *Estructura y funciones de la mitocondria*

La mitocondria es un organelo subcelular con forma ovoidal y doble membrana: la membrana externa, semipermeable para moléculas grandes y pequeñas, una membrana interna que es más selectiva, y ambas rodeadas de la matriz mitocondrial que contiene el DNA mitocondrial (mDNA) y donde se lleva a cabo todas las reacciones químicas necesarias para la síntesis de ATP (Freya and Mannellab, 2000).

La mitocondria regula la actividad celular siendo la fuente principal de energía para las células y juega un rol crucial en la homeostasis redox, apoptosis y señalización de calcio, entre otras. Estos procesos implicados en la función celular y su supervivencia son alcanzados a través de cambios en la morfología mitocondrial como la fusión (la unión de dos o más mitocondrias) y fisión (el rompimiento en dos o más mitocondrias), colectivamente conocida como dinámicas mitocondriales. La mitocondria migra y sufre transiciones morfológicas como respuesta al estrés oxidante, está muy relacionada con la regulación celular y rutas de señalización como la homeostasis redox o la muerte controlada (Su *et al.*, 2010; Picard *et al.*, 2013).

### *El sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS)*

El sistema de fosforilación oxidativa se encuentra en la mitocondria y está formado por la coenzima Q, el citocromo c, electrones y complejos de 5 proteínas (I-V) las cuales contienen las herramientas para la producción de ATP, el sustrato principal

implicado en la fosforilación de proteínas para todos los procesos metabólicos. La membrana interna de la mitocondria contiene la cadena de transporte de electrones (ETC, por sus siglas en inglés), conocida también como cadena respiratoria, la cual está formada por cuatro complejos de proteínas descritas a continuación:

- Complejo I (NADH: ubiquinona oxidoreductasa) cataliza la deshidrogenación de la nicotinamina adenina dinucleótido (NADH a NAD<sup>+</sup>), mientras que los electrones son transportados hacia la coenzima Q.
- Complejo II (succinato: ubiquinona oxidoreductasa) oxida al succinato a fumarato, como parte del ciclo de Krebs, mientras los electrones son transportados de flavin adenina dinucleotido (FADH<sub>2</sub>) a la ubiquinona.
- Complejo III (ubiquinona: citocromo c oxidasa) cataliza la transferencia de electrones de ubiquinol a citocromo c mientras los protones son traslocados a través de la membrana mitocondrial interna de la matriz al espacio intermembranal.
- Complejo IV (citocromo c oxidasa a O<sub>2</sub>) transloca protones a través de la membrana mitocondrial interna por la transferencia de electrones del citocromo c al oxígeno reduciéndolo a agua.

Por cada par de electrones transferidos al O<sub>2</sub>, cuatro protones pasan a través del complejo I, cuatro protones a través del complejo III y dos protones a través del complejo IV. El potencial electroquímico transmembrana (la fuerza protón-motriz), generado por el transporte exergónico de electrones a través de los cuatro complejos de proteínas, impulsa a los protones a regresar hacia la matriz a través del poro asociado a F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP sintasa (Complejo V) y también el transporte del ADP citosólico y Pi de la matriz mitocondrial usados para formar ATP.

La fuerza protón-motriz es esencial para la síntesis de ATP. Cuando el flujo de protones hacia la matriz mitocondrial a través de F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP sintasa es bloqueado (por oligomicina, por ejemplo), la síntesis del ATP también es bloqueada; no hay

ruta para regresar los electrones hacia la matriz, mientras que continúa un incremento en el gradiente de protones que es generado por la cadena respiratoria. En esta situación, la fuerza protón-motriz permanece trabajando hasta que la energía usada para bombear a los protones hacia fuera de la matriz es igual o mayor a la energía necesaria para transferir los electrones hacia el oxígeno, esto finalmente bloquea la transferencia de electrones. Además, los electrones pueden ser transferidos de succinato o NADH a O<sub>2</sub> sin la síntesis de ATP. Un fármaco utilizado para estudiar el OXPHOS es la carbonilcianida-ptrifluorometoxifenilhidrazona (FCCP) que desacopla la oxidación de la fosforilación. FCCP es una molécula hidrofóbica que cruza las membranas mitocondriales, entra en la matriz en su forma protonada, libera protones y disipa el gradiente del protón. De esta forma, esta molécula incrementa el consumo de oxígeno creando un potencial electroquímico artificial de la fuerza protón-motriz (Van Den Heuvel and Smeitink, 2001; Nelson and Cox, 2012; Picard *et al.*, 2013, 2018).

### *Mitocondria en estrés*

La disfunción mitocondrial juega un rol central en la patogénesis de enfermedades crónicas como la diabetes mellitus (Lowell and Shulman, 2005), enfermedades cardiovasculares (Ballinger, 2005) o enfermedades neurodegenerativas (Lin and Beal, 2006). Un balance equilibrado entre la biogénesis mitocondrial y la mitofagia es la clave en el mantenimiento de una energía metabólica adecuada en la célula. Cualquier evento que cambie este balance induce daño severo en la dinámica mitocondrial y su homeostasis (Palikaras, Lionaki and Tavernarakis, 2015).

La mitocondria es la principal fuente de ROS en la célula. En el estudio del estrés oxidativo, los cambios bioquímicos a este nivel ofrecen información valiosa acerca de la respuesta celular al estrés. La producción de ATP, el potencial de la membrana mitocondrial (MMP, por sus siglas en inglés), el nivel de ROS, la

actividad de SOD2 o la actividad deshidrogenasa mitocondrial son guías importantes para el estudio de la actividad de la mitocondria. En las enfermedades neurodegenerativas o de daño cerebral, los complejos I y IV de la cadena respiratoria están disfuncionales (Mattson, Gleichmann and Cheng, 2008), el poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP, por sus siglas en inglés) que se encuentra en la membrana interna está abierto (Du *et al.*, 2008), lo que determina la disminución de la MMP y de la producción de ATP, incremento del nivel de ROS y la activación de factores proapoptóticos. En las neuronas, la alteración de la función y dinámica mitocondrial lleva al daño acumulado de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, acumulación de oligómeros amiloide  $\beta$ -péptido y placas, disfunción sináptica, neurodegeneración y finalmente la muerte celular (Mattson and Magnus, 2006).

### *Energía del metabolismo*

En los organismos vivos, la energía se encuentra en dos formas, como calor y como energía química (ATP), ambas son vitales para mantener la homeostasis de las células y el cuerpo, en cualquier caso, la mitocondria es la mayor fuente (Picard *et al.*, 2018). En reposo, en células de mamíferos la OXPHOS es la principal fuente de ATP. La glucosa se separa en dos moléculas de piruvato el cual es transportado hacia la mitocondria en condiciones aeróbicas, donde es transformado en acetil-coenzima A (Ac-CoA) que es oxidada en ácido tricarbóxico (ciclo de Krebs) y genera NADH y FADH<sub>2</sub>. Esto se reducen en equivalentes entrando en el ETC para finalmente producir de 30 a 32 moléculas de ATP/mol glucosa (Nelson and Cox, 2012).

Cuando la mitocondria está dañada, las células cambian hacia glicólisis como principal fuente de energía, fenómeno llamado “efecto Warburg”, bien descrito en células cancerosas (Warburg, 1925; Koppenol, Bounds and Dang, 2011). El piruvato es deshidrogenado a lactato, entra en la ruta pentosa-fosfato y finalmente

dos moléculas de ATP/mol glucosa son producidas (Nelson and Cox, 2012). Sin embargo, estudios recientes mostraron que la presencia de células cancerosas que usan ATP de la glicólisis como principal combustible están influenciadas también por otros factores como disfunciones o supresores tumorales, activación de oncogenes, mutaciones de mDNA o microambientes hipóxicos (Zheng, 2012). Sorpresivamente, hay células normales que en condiciones de estrés cambian su principal fuente de energía hacia glicólisis, incluso cuando ellas tienen una función mitocondrial intacta. Para generar ATP en estado de reposo, las células inmunes están usando principalmente la OXPHOS, sin embargo, cuando son activadas las células cambian el combustible hacia glucólisis, como una fuente de energía rápida (Macintyre and Rathmell, 2013; Cheng, Joosten and Netea, 2014; Cheng *et al.*, 2016). La glucólisis puede proveer ATP necesario, pero también mantiene el MMP y previene la apoptosis. La sobreestimulación de la ruta pentosa-fosfato, incrementa la producción de glucosa y la disminución de OXPHOS incrementa la producción de ROS que proporciona actividad bactericida a las células (O'Neill and Grahame Hardie, 2013). A pesar de que no es una fuente eficiente de energía (de una molécula de glucosa son obtenidas sólo dos moléculas de ATP), la glucólisis es preferida por las células proliferativas o células con alta demanda de energía porque es una ruta rápida para obtener ATP. Adoptar un metabolismo glucolítico ayuda a la célula adaptarse fácilmente a un ambiente hipóxico, ya que muchos procesos donde las células inmunes participan son caracterizados por baja disponibilidad de oxígeno; también, el incremento de la producción de glucosa propicia la producción de metabolitos como NADPH, implicado en la activación de las células inmunes y su crecimiento (Macintyre and Rathmell, 2013).

## NEURODEGENERACIÓN EN LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

El proceso de neurodegeneración se refiere a la pérdida progresiva y permanente de neuronas y sinapsis causada por envejecimiento, factores genéticos o

ambientales. La muerte neuronal está asociada, a nivel molecular, con estrés oxidativo, disfunción mitocondrial, alteración de la energía metabólica, proteínas mal plegadas o inflamación, que finalmente determina condiciones patológicas como la PD, enfermedad de Alzheimer o demencia (Jellinger, 2010).

### *Enfermedad de Parkinson (PD)*

La PD es un desorden neurodegenerativo progresivo multifactorial caracterizado por la pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas en la *substancia nigra* (SN), la disfunción mitocondrial y la acumulación de agregados de proteínas (especialmente  $\alpha$ -sinucleína) llamados cuerpos de Lewy. Más allá del sistema dopaminérgico, las neuronas colinérgicas, catecolaminérgicas y serotoninérgicas son también afectadas llevando a disfunción locomotora como la hipocinesia, rigidez muscular, bradicinesia, acinesia, pérdida del balance y síntomas no motores como ansiedad, depresión, constipación o desórdenes del sueño (Sulzer and Surmeier, 2014). Además del daño del cerebro medio, la PD también afecta la corteza cerebral, el striatum y el hipocampo (HC) debido a la pérdida de dendritas y acumulación de cuerpos de Lewy que afectan el proceso cognitivo y contribuyen a la disfunción motora (Hurtig *et al.*, 2000; Narayanan, Rodnitzky and Uc, 2013; Herz *et al.*, 2014).

PD es una enfermedad multifactorial causada por el envejecimiento (> 65 años), factores ambientales como la exposición a toxinas o una dieta deficiente. Sin embargo, mientras que la mayoría de los casos son esporádicos (por causas desconocidas), aproximadamente 10 % de los casos son causados por homocigosidad de mutaciones en más de 18 genes, incluyendo mutaciones en la proteína quinasa 1 putativa dependiente de fosfatasa y de homólogo de tensina (PINK1), Parkin y DJ1/PARK7 (Valente *et al.*, 2004; Poewe *et al.*, 2017).

*Proteína quinasa 1 putativa dependiente de fosfatasa y de homólogo de tensina (PINK1)*

PINK1 es una cinasa serina/treonina de cadena larga, de 63 kDa, que se encuentra en la mitocondria y en el citosol y tiene rol esencial en la regulación de la calidad mitocondrial. PINK1 con la E3 ubiquitín ligasa Parkin tienen un rol importante en la estimulación de la mitofagia y del flujo de calcio en la mitocondria, y la alteración de esta ruta lleva a degeneración y disfunción mitocondrial (Dagda *et al.*, 2009; Heeman *et al.*, 2011). Para mantener la concentración adecuada de esta proteína en la célula, PINK1 es transportada hacia la mitocondria sana a través de la maquinaria general de importación mitocondrial (el complejo de translocación TIM/TOM) y es degradada por proteasas mitocondriales específicas. La forma cortada de PINK1 es regresada al citosol dónde es degradada completamente por el proteasoma. Cuando la mitocondria se encuentra dañada por alteración del MMP o agregación de proteínas, PINK1 se acumula en la membrana mitocondrial externa, se dimeriza y autofosforila, y recluta y activa Parkin del citosol. El Parkin fosforilado cataliza la ubiquinación de proteínas de la membrana externa y empieza la degradación mitocondrial por medio de la vía 26S proteasoma (Truban *et al.*, 2017).

PINK1 es esencial para la homeostasis neuronal, la pérdida de esta proteína está asociada con el incremento del estrés oxidante, niveles alterados de enzimas antioxidantes, alteración mitocondrial, reducción del desarrollo neuronal de neuronas corticales, pérdida progresiva de dendritas y varios síntomas de PD (Dodson and Guo, 2007; Das Banerjee *et al.*, 2017). Las ratas y ratones PINK1-KO, usados como modelos murinos genéticos para PD, desarrollan, desde edad temprana, síntomas motores y cognitivos, como son: pérdida de neuronas dopaminérgicas y disfunción mitocondrial (Creed and Goldberg, 2018). A los dos meses de edad, las ratas PINK1-KO manifiestan deficiencias vocales y locomotoras progresivas (Grant *et al.*, 2015), alteración de la función motriz (Marquis, Lettenberger and Kelm-Nelsona, 2020), incremento del metabolito

neuroquímico glutamina (el cual es tóxico en altas concentraciones) en striatum y aumento en el volumen de los ventrículos cerebrales (Ren *et al.*, 2019). Sin embargo, no han sido encontrados datos acerca de la función del sistema dopaminérgico o el estado mitocondrial del cerebro en esta edad temprana en ratas PINK1-KO. La falta de Parkin induce alteraciones en neurotransmisión dopaminérgica en ratas KO de dos meses de edad (Gemechu *et al.*, 2018). Un mes después, las ratas PINK1-KO presentan alteraciones bioenergéticas y proteómicas en mitocondrias aisladas del striatum (Stauch *et al.*, 2016). Además, las ratas PINK1-KO de 3 meses de edad muestran disminución del glutatión y nivel de SOD, alteración del OXPHOS con la disminución del citocromo c oxidasa y del nivel de NADH y ATP en diferentes regiones del cerebro (Ferris *et al.*, 2018). Sin embargo, a esta edad no se encontró disfunción motora en la prueba de la barra transversal y la prueba de rotarod y no se encontró deterioro cognitivo (Ferris *et al.*, 2018). Después de 4 meses de edad, las ratas PINK1-KO desarrollan síntomas progresivos motores y no motores de PD causados por la neurodegeneración progresiva en SN y striatum y daño oxidante del cerebro (Dave *et al.*, 2014; Grant *et al.*, 2015; Villeneuve *et al.*, 2016; Creed *et al.*, 2019; Ren *et al.*, 2019). Aunado a eso, la falta de PINK1 causa la disminución basal de la tasa de consumo de oxígeno (OCR, por sus siglas en inglés), eficiencia de acoplamiento y producción de ATP en striatum de ratones mayores de edad (Zhi *et al.*, 2018).

Las neuronas parecen ser las células más afectadas por la deficiencia de PINK1, sin embargo, esta vulnerabilidad depende de la función celular y el contenido mitocondrial. PINK1 regula la respuesta inmune innata en infecciones virales (Zhou *et al.*, 2019), participa en la ruta de presentación del antígeno mitocondrial, y la falta de PINK1 puede provocar respuestas autoinmunes inflamatorias (Matheoud *et al.*, 2016). Por otro lado, PINK1 regula la actividad de las células gliales, inhibe las rutas de apoptosis en neuroinflamación (Sun *et al.*, 2018) y controla la producción de ROS mediada por la ruta MAPK en células hepáticas (Cang *et al.*, 2016).

## DJ-1

DJ-1 (PARK 7) es una proteína de 22 kDa y fue descrita por primera vez en 1997 como un oncogén junto con *ras* (Nagakubo *et al.*, 1997). Estudios posteriores mostraron que DJ-1 participa en diferentes rutas de señalización (PI3K/Akt, MAPK, p53, HIF-1, Nrf-2), es chaperona, proteasa, deglicasa, coactivador transcripcional, está implicada en la regulación de la actividad mitocondrial y de las rutas de antioxidantes, participa en procesos de fertilización y en el control del ciclo celular. Dependiendo del tipo de célula, esta proteína regula los procesos que son determinantes en la supervivencia celular (Cao *et al.*, 2015).

El mecanismo de acción de DJ-1 es complejo. Esta proteína es ubicua en todos los tejidos de los mamíferos, se encuentra en el citosol, mitocondria, núcleo y puede ser encontrada asociada al retículo endoplasmático, aparato de Golgi y vesículas sinápticas (Usami *et al.*, 2011). En la mitocondria, DJ-1 funciona en todos los compartimentos, pero no está bien comprendido el rol que juega en cada localización (Canet-Avilés *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005; Hayashi *et al.*, 2009).

Bajo estrés oxidativo, DJ-1 pasa del citosol al núcleo y a la mitocondria donde actúa como antioxidante (Junn *et al.*, 2009). DJ-1 disminuye significativamente los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y otras toxinas por vía de la oxidación de residuos de cisteínas de su estructura (Cys46, Cys56 y Cys106), los grupos sulfhídrido apaga los radicales libres, siendo el Cys106 el más sensible. DJ-1 excesivamente oxidado es considerado inactivo y mutaciones de Cys106 son asociadas con aumento en estrés oxidante en la célula (Taira *et al.*, 2004; Wilson, 2011). Sin embargo, es considerado que la función antioxidante más importante de DJ-1 es como sensor del estado de oxidación celular, ejerciendo su efecto a través de la regulación de los factores de transcripción que regulan la expresión de enzimas como GPx y SOD, mejorando la defensa antioxidante secundaria de las células (Miyama *et al.*, 2011; Giroto *et al.*, 2014) y manteniendo la homeostasis celular bajo estrés

oxidante. DJ-1 controla la ruta de la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK1/2, por sus siglas en inglés) a través de la cual muchos factores de transcripción son activados, tal es el caso de c-Jun, AP-1, c-Myc, Nurr1, entre otros, implicados en la defensa ante el estrés oxidante y en la homeostasis de dopamina. También, DJ-1 inhibe la apoptosis de la ruta de la quinasa regulada por señales de apoptosis (ASK1, por sus siglas en inglés), conduciendo a la inhibición de la apoptosis bajo condiciones de estrés oxidante (Oh and Mouradian, 2018). La viabilidad celular disminuye entre 30 y 40 % en las neuronas con falta de DJ-1. Incluso, se ha encontrado disminución de GSH e incremento de GSSG, lo que significa que la pérdida de DJ-1 induce a una regeneración insuficiente de GSH y la falta de mecanismos alternativos detox de la célula. Por otro lado, la falta de DJ-1 induce la alteración del flujo de carbono, disminuye la producción de NADPH, disminuye la síntesis de glutamina y serina, cambios que pueden conducir a la muerte de las neuronas dopaminérgicas (Meiser *et al.*, 2016).

DJ-1 interactúa con  $\alpha$ -sinucleína y modula su actividad (Zondler *et al.*, 2014) y las mutaciones de esta proteína están asociadas con el desarrollo temprano de PD (Bonifati *et al.*, 2003). Estudios *in vivo* e *in vitro* han mostrado que la sobreexpresión de DJ-1 inhibe la agregación de  $\alpha$ -sinucleína. La actividad como chaperona es estimulada por la presencia de ROS y por la alteración del estado redox en el citosol (Shendelman *et al.*, 2004).

En el cerebro, DJ-1 predomina en la corteza motora, hipotálamo y *locus coeruleus* (Kotaria *et al.*, 2005). Recientemente, nuestro equipo de trabajo ha observado que en PFC, bajo estrés psicológico, DJ-1 está localizada principalmente en el citosol y se redistribuye al núcleo en condiciones de estrés psicológico, lo cual es consistente con la función de sensor del estrés oxidativo, factor de transcripción o chaperona (Balderrama-Gutiérrez, 2015). Además, nuestro equipo de trabajo mostró que DJ-1 tiene también una función esterasa, asociada con la hidrólisis de ésteres carboxílicos y fenoles, y esta actividad es causada por la oxidación de la Cys106 (Vázquez-Mayorga *et al.*, 2016).

En sangre circulante, DJ-1 es encontrado en eritrocitos (> 95 %), plaquetas (1-4 %), linfocitos, y plasma (>1 %) pero no se conoce la importancia de esta distribución y el posible rol en el diagnóstico temprano de enfermedades neurodegenerativas como PD (Shi *et al.*, 2011). Diferentes isoformas de DJ-1 han sido identificadas en sangre total de personas con PD (Lin *et al.*, 2012).

### *Factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF)*

El BDNF es una neurotrofina que tiene como rol principal el mantenimiento de la homeostasis en el CNS. BDNF es sintetizado principalmente en el cerebro, pero también puede ser encontrado en células inmunes (células T y B y monocitos), células endoteliales y miocitos. BDNF es sintetizado como precursor de proBDNF en RE y es transportado hacia el aparato de Golgi dónde es cortado y convertido en proBDNF. Posteriormente, el proBDNF es convertido en BDNF maduro (mBDNF) por endoproteasas, en la red del trans-Golgi, por la proteína furina, y en las vesículas intracelulares, por convertasas. Además, mBDNF es formado extracelularmente por plasminas y metaloproteasas de la matriz. Otra forma de BDNF, llamada BDNF truncado, fue identificada con funciones que aún no están bien entendidas (Palasz *et al.*, 2020).

proBDNF juega un rol esencial en el desarrollo del cerebro y la actividad de mBDNF está enfocada en la neuroprotección y plasticidad cerebral. Su actividad está mediada principalmente a través de la tirosina quinasa B (TrkB), del receptor para neurotrofina p75 (p75NTR) y sortilina. El proBDNF tiene alta afinidad por p75NTR y sortilina y activa diferentes rutas de señalización que controlan la apoptosis, crecimiento celular y supervivencia, como la del c-Jun N-terminal (JNK), Ras familia de genes homólogos, el miembro A (RhoA), y las rutas de factor nuclear kappa B (NF-κB). Por otro lado, mBDNF tiene mayor afinidad por receptores TrkB que llevan a la estimulación de rutas que controlan el crecimiento dendrítico, desarrollo de sinapsis y supervivencia neuronal como las rutas Ras/ proteína

quinasa activada por mitógeno (MAPK), fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K)/proteína quinasa B (Akt) o fosfolipasa C- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ) (Palasz *et al.*, 2020).

La alteración de la expresión de BDNF ha sido encontrada en cerebro, PBMCs, suero o plasma en muchos estudios relacionados con depresión y otros desordenes de la conducta (Lee and Kim, 2010; Jin *et al.*, 2019) o PD (Mogi *et al.*, 1999; Howells *et al.*, 2000; Porritt, Batchelor and Howells, 2005; Scalzo *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2017; Rahmani *et al.*, 2019), llevando a cabo un rol esencial en las rutas de dopamina, diferenciación neuronal, desarrollo y mantenimiento (Berton *et al.*, 2006; Leggio *et al.*, 2013). Un bajo nivel de BDNF en el suero y cerebro está correlacionado con la progresión de PD, presumiblemente debido a la habilidad de este factor neurotrófico en controlar la supervivencia neuronal y el mantenimiento de las dendritas de las neuronas dopaminérgicas de la SN (Mogi *et al.*, 1999; Howells *et al.*, 2000; Porritt, Batchelor and Howells, 2005; Rahmani *et al.*, 2019). Consistente con este concepto, un nivel bajo de BDNF en la SN ha sido observado en tejido de cerebro post mortem de pacientes con PD (Mogi *et al.*, 1999; Howells *et al.*, 2000).

Por otro lado, el sistema inmune es un importante recurso de BDNF (Kerschensteiner *et al.*, 1999). PBMCs expresa BDNF y su receptor específico, el TrkB, lo que conecta fuertemente los sistemas nervioso e inmune (Kerschensteiner *et al.*, 1999; Lee and Kim, 2010). La disminución del nivel de BDNF en PBMCs está asociada con neuroprotección alterada en enfermedades neuroinflamatorias como la esclerosis múltiple (Azoulay, Urshansky and Karni, 2008) u otras lesiones inflamatorias del cerebro (Kerschensteiner *et al.*, 1999). BDNF tiene una función autocrina en células B y juega un rol esencial en la regulación de la ruta de apoptosis en condiciones de estrés (Fauchais *et al.*, 2008). Este factor neurotrófico tiene alta capacidad para pasar a través de BBB y es considerado como un marcador terapéutico potencial para desórdenes del comportamiento, enfermedades neurodegenerativas o lesiones cerebrales (Mercado *et al.*, 2017; Jin *et al.*, 2019), y ejercicio físico (Brunelli *et al.*, 2012). La disminución del nivel de

BDNF en plasma ha sido asociada con la discapacidad motriz (Scalzo *et al.*, 2010) y depresión (Wang *et al.*, 2017) en PD o desórdenes psiquiátricos como la esquizofrenia (Xiu *et al.*, 2009) o desórdenes bipolares (Machado-Vieira *et al.*, 2007). Algunas drogas antidepresivas (Leggio *et al.*, 2013) modulan y mejoran el nivel de BDNF en plasma y células inmunes. Esto confirma que BDNF puede ser un biomarcador importante en la supervisión de neuropatologías.

## EL NOOTROPICO PIRACETAM

Un incremento en el estrés oxidante lleva a la alteración de la actividad neuronal la cual ha sido asociada al déficit cognitivo y enfermedades neurodegenerativas. Para disminuir los efectos negativos del estrés, psicoestimulantes y nootrópicos han sido ampliamente usados sin prescripción médica en varios países (Corazza *et al.*, 2014). Los nootrópicos es una clase de droga en la cual los científicos han mostrado gran interés. Fármacos como Piracetam, Oxiracetam, Aniracetam y Pramiracetam son buenos antioxidantes, previenen el declive cognitivo y no tienen importantes efectos adversos (Gouliakov and Senning, 1994). El nombre de “nootrópico” viene del griego “*noos*” que significa mente y “*tropein*” que significa “avance” (Giurgea and Salama, 1977).

Piracetam fue la primera droga nootrópica descrita (Giurgea, 1973) y a pesar de ser una 2-oxo-1-pirrolidina-acetamida, un derivado del ácido gamma amino butírico (GABA), tiene principalmente afinidad por receptores colinérgicos y glutamatérgicos (Winblad, 2005).

### *Rol del Piracetam en animales y humanos*

Los primeros estudios con este fármaco se enfocaron en observaciones clínicas sobre el comportamiento y las funciones de la memoria (Tabla 4 y 5) y, después los investigadores se concentraron en las respuestas celulares (Tabla 6).

Piracetam ha mostrado ser un neuroestimulador (Tabla 4) por mejorar la función cognitiva en pacientes adultos mayores con afasia (Chouinard *et al.*, 1983; Huber *et al.*, 1997; Kessler *et al.*, 2000a), después de una cirugía de bypass coronario (Holinski *et al.*, 2008) o por incrementar la memoria y la cognición en voluntarios sanos (Alkuraishy *et al.*, 2014).

**Tabla 4. Efecto del Piracetam en pacientes humanos.**

| Modelo experimental  | Número de pacientes      | Dosis  | Métodos  | Efecto   | Referencias                          |
|--|--------------------------|--|--|--|--------------------------------------|
| Función en la capacidad psicomotora, cognitiva y de memoria, en voluntarios sanos      | 30 (20-24 años de edad)  | 800 mg/día, oral, 4 días                     | Prueba psicomotora de Leeds<br>Critical fusion -flicker threshold<br>Computerized N-Back Task  | Neuroestimulador   | (Alkuraishy <i>et al.</i> , 2014)    |
| El tiempo de reacción simple en voluntarios sanos.                                     | 30                       | 800 mg, dosis única                          | Ruler dropper test   | ↓ tiempo de reacción simple  | (Alkuraishy, Mahdi and Ashoor, 2012) |
| Función cognitiva después de cirugía abierta de corazón                                | 88 (promedio de edad 67) | 12 g, dosis única, antes de la cirugía       | SKT, ADAS  | Ningún efecto cerebroprotector   | (Holinski <i>et al.</i> , 2011)      |
| Función cognitiva después de la cirugía de bypass coronario                            | 120                      | 12 g, dosis única, i.v., antes de la cirugía | SKT, ADAS  | Cerebroprotector   | (Holinski <i>et al.</i> , 2008)      |
| Performance en la capacidad lingüística en pacientes con afasia causada por un infarto | 24 (18-75 años de edad)  | 2400 mg, dos veces diario por 6 semanas      | test battery: verbal fluency task with the letters F, A, and S, Corsi's block span test, a modified laterally score after Oldfield, tests for apraxia, progressive matrices of Raven and the Benton test.<br>-Aachen Aphasia Test<br>-other tests: repetition, written language, naming on confrontation, comprehension, and Token test. | Mejora diferentes funciones lingüísticas y mejora la microcirculación en el hemisferio izquierdo | (Kessler <i>et al.</i> , 2000b)      |
| Función lingüística en afasia  | 66                       | 4.8 g/día, 6 semanas                         | AAT  | Mejora el lenguaje escrito   | (Huber <i>et al.</i> , 1997)         |
| Comportamiento y función cognitiva   | 60                       | 2.4 y 4.8 g/día, oral, 12 semanas            | SCAG, CGRT, CGI, BPRS,   | Neuroestimulador   | (Chouinard <i>et al.</i> , 1983)     |

|   |  |  |  |
|---|--|--|--|
| en pacientes psiquiátricos mayores de edad. |  | Wechsler Adult Intelligence Scale and the Wechsler Memory Scale, extrapyramidal symptoms |  |
|---|--|--|--|

syndrome Kurz Test (SKT), Alzheimer's disease assessment scale (ADAS), Sandoz clinical assessment geriatric scale (SCAG), Crichton geriatric rating scale (CGRS), 6-point clinical global improvement (CGI) rating scale, Brief psychiatric rating scale (BPRS), Aachen aphasia test (AAT).

En ratas y ratones, el Piracetam protege el cerebro contra la alteración de las funciones de memoria y cognitivas por agentes físicos y químicos (Tabla 5) (Gupta *et al.*, 2009; Abdel-Salam *et al.*, 2011; Kosta *et al.*, 2011; Muley *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2016). Las aplicaciones clínicas del Piracetam han sido bien descritas en varias revisiones (Winblad, 2005; Malykh and Sadaie, 2010b).

**Tabla 5. Efecto del Piracetam en la conducta de los animales.**

| Modelo experimental  | Dosis de Piracetam                                | Métodos   | Resultados  | Referencias                    |
|--|---|---|---|--------------------------------|
| Ratas macho Charles-Foster albino (180 ± 20 g) con encefalopatía inducida por DM utilizando streptozotocina (45 mg/kg, i.p.) 15 min después de la administración de nicotinamida (110 mg/kg, i.p.) | 25, 50 y 100 mg/kg, i.p.                          | Y-Maze Test<br>Morris Water Maze Test             | ↑SAB<br>↓tiempo que tarda para escapar<br>↑tiempo de estancia en el espacio diana | (Pandey and Garabadu, 2016)    |
| Ratones C57 de 7 días de edad tratados con propofol  | 100 mg/kg, 50 mg/kg y 25 mg/kg, i.p., dosis única | Fear conditioning test                            | ↑ tiempo de congelamiento   | (Wang, Li and Chen, 2016)      |
| Ratas macho albino (6 semanas de edad) con síndrome metabólico inducido por 60 % de solución de fructosa (en lugar de agua), por 8 semanas   | 500 mg/kg/día, oral, 14 días                      | Passive avoidance test                            | ↑latencia   | (Mamchur <i>et al.</i> , 2015) |
| Ratas Albino Wistar tratadas con scopolamina (1 mg/kg) i.p.  | 150 mg/kg, i.p.                                   | Elevated plus maze, Y-maze, Morris water maze     | ↓latencia de inflexión<br>↓% alternación<br>↑latencia de escape                   | (Swathi <i>et al.</i> , 2015)  |
| Ratas macho Sprague-Dawley (200–220 g) tratadas con heroína (5.5 mg/kg)  | 5.5 mg/kg, i.p.                                   | Conditioned place preference test                 | ↑índice de preferencia  | (Xu <i>et al.</i> , 2015)      |
| Ratas macho Wistar (80–250 g) con dolor neuropática inducida   | 50, 100 y 200 mg/ kg/día, i. p., 2 semanas        | Hot-Plate Test<br>Tail Flick Test<br>Acetone Test | ↑ latencia<br>↑latencia en retiro de la cola<br>↓latencia de retiro de la pata    | (Mehta <i>et al.</i> , 2014)   |
| Ratas macho Wistar (160-200 g), sanas  | 200 mg/kg, i.p., 6 días                           | Elevated plus maze                                | ↓latencia de transferencia  | (Himani <i>et al.</i> , 2013)  |

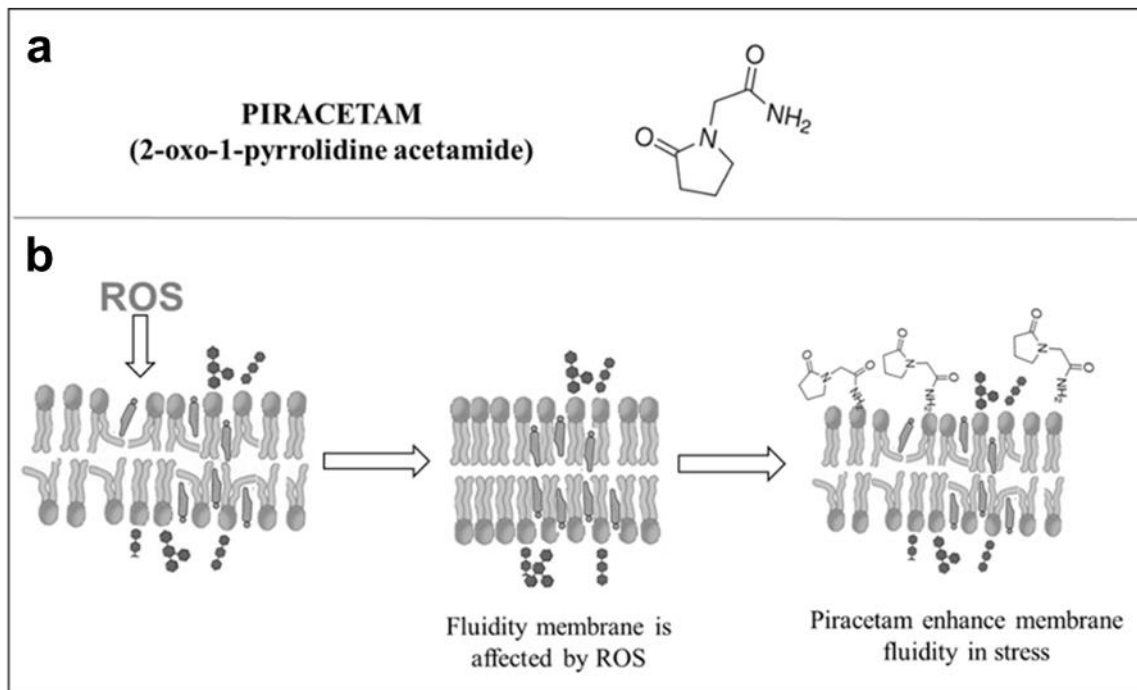
|  |  |  |   |   |
|--|--|--|---|---|
| Ratas macho Wistar (230–250 g) tratadas con scopolamina (1 mg/kg), i.p. después del entrenamiento                      | 0.02 $\mu$ mol/5 $\mu$ L, i.c.v., 60 min, antes del entrenamiento  | Inhibitory Avoidance<br>Open Field<br>Foot Shock Sensitivity Test<br>Object Recognition Task | ↑latencia<br>↑ índice de discriminación   | (Marisco <i>et al.</i> , 2013)            |
| Ratas Wistar (150–180 g) con oclusión bilateral de la arteria carótida comun por 30 min                                | 500 mg/kg, i.p., diario por 3 días, 22 h después de la cirugía   | Elevated plus maze<br>Rotarod-performance test<br>Resistance to lateral push                 | ↓latencia de transferencia<br>↑latencia de caída  | (Muley <i>et al.</i> , 2013)              |
| Ratas macho Wistar (200-250 g) tratadas con fosfamidón (1.74 mg/kg/día, p. o.), 6 semanas                              | 600 mg/kg/día, p.o, 2 semanas  | Passive avoidance apparatus<br>Elevated plus maze  | ↓ latencia de paso fuera<br>↑ latencia de transferencia<br>Protección de las funciones cognitivas | (Kosta <i>et al.</i> , 2012)              |
| Ratas macho Albino (200-260 g) tratadas con rotenona (1.5 mg/kg/48 h/6 dosis, s.c.),                                   | 100 y 200 mg/kg/día, p.o.  | Open field<br>Pole test  | -Duración e la movilización<br>↓t-turn<br>↓t-total  | (Zaitone, Abo-elmatty and Elshazly, 2012) |
| Ratones macho Swiss albino (20–22 g) tratados con haloperidol (2 mg/kg, i.p.)  | 50, 150 o 300 mg/ kg, i.p, dosis única   | Morris water maze  | ↓latencia   | (O. M. E. Abdel-Salam and Nada, 2011)     |
| Ratones macho Swiss albino (20-22 g) tratados con haloperidol (2 mg/kg, i.p.)  | 100, 150, o 300 mg/kg, i.p.  |  | ↓catalepsia   | (O. Abdel-Salam and Nada, 2011)           |
| Ratas Wistar de ambos sexos (120-200 g) tratadas con propoxur 10 mg/kg, p. o., diario, por 6 semanas                   | 0.5ml/100g, i.p., una semana después del tratamiento con Propoxur  | Continuous avoidance apparatus<br>Elevated plus maze   | ↓latencia de paso fuera<br>↑latencia de transferencia<br>Protección de las funciones cognitivas   | (Gupta <i>et al.</i> , 2009)              |
| Ratas con el cerebro hipooxigenado por 30 días   | 600 mg/kg, dosis unica por 30 dias   | Morris water maze  | ↓latencia   | (He <i>et al.</i> , 2008)                 |
| Ratas Sprague-Dawley (edad 6 meses, 150–200 g) tratadas con AIC3 (100 mg/kg), diario, por 8 semanas (disuelto en agua) | 5 mg/kg, diario, disuelto en agua, por 30 días   | Passive avoidance test<br>Active avoidance test  | ↑ latencia de retención<br>↓tiempo de adquisición<br>↓intentos de no escapar                      | (Nehru <i>et al.</i> , 2006)              |
| Ratas macho Wistar (200-250 g)   | 100, 200 y 400 mg/kg, i.p. 30 min antes de la prueba   | Caja abierta hecha de madera con objetos de vidrio, plástico o metal.                        | ↓latencia   | (Ennaceur <i>et al.</i> , 1989)           |
| Ratas macho Fischer 344 (20-29 meses de edad)  | 100, 200 mg/kg/day, disuelto en agua por una semana, y 100, 200 mg/kg, i.p., 30 min antes de la prueba de conducta | Passive avoidance task   | ↑ latencia de retención   | (Bartus <i>et al.</i> , 1981)             |

diabetes mellitus (DM), intraperitoneal (i.p.), subcutáneo (s.c.), prioral (p. o.), intracerebroventricular (i. c. v.), ↓ = disminución significativa comparado con el grupo control, ↑ = aumento significativo comparado con el grupo control, - = cambios no significativos.

### *Mecanismo de acción*

El mecanismo de acción del Piracetam aún no está bien comprendido. Este fármaco no tiene capacidad antioxidante, solo si es administrado en concentraciones 10 veces mayores que la dosis terapéutica para humanos (Bentue-Ferrer *et al.*, 1989; Horvath *et al.*, 2002), y el mecanismo de acción está directamente relacionada con su efecto sobre las membranas celulares.

Los primeros estudios con este nootrópico fueron enfocados en su efecto en la neurotransmisión. El Piracetam no tiene un receptor específico conocido, pero ha mostrado que influye principalmente en la neurotransmisión colinérgica (Pilch and Muller, 1988) y glutamatérgica (Copani *et al.*, 1992) incrementando la densidad de sus receptores específicos, especialmente en enfermedades neurodegenerativas y envejecimiento. El incremento en la disponibilidad de estos receptores se debe a la capacidad del Piracetam para interactuar con las cabezas polares de los fosfolípidos de las membranas celulares. Esta droga cambia la organización de los lípidos y recupera la fluidez de la membrana afectada por el estrés oxidante (Fig. 5) (Peuvot *et al.*, 1995). Mediante el mejoramiento de la fluidez de la membrana, el Piracetam incrementa el transporte de membrana y la secreción, mejora la actividad de enzimas y la disponibilidad de diferentes receptores (Crews, 1982). Parece ser que la mitocondria es el objetivo principal de este fármaco. El Piracetam promueve la fluidez de la membrana mitocondrial (Müller *et al.*, 1997), incrementa los niveles de ATP y mejora el MMP (Keil *et al.*, 2006; Kurz *et al.*, 2010), así como la utilización e ingreso de glucosa (Abdel-Salam *et al.*, 2011; Abdel-Salam, Salem and El-shamarka, 2013; Pandey and Garabadu, 2016). Todos estos efectos benéficos hacen a este fármaco un promotor metabólico y un neuroprotector.



**Figura 5. Estructura química y el mecanismo de acción propuesto del Piracetam a)** Estructura química del Piracetam **b)** Mecanismo de acción del Piracetam. Piracetam interactúa con las cabezas polares de los fosfolípidos que se encuentran en las membranas celulares. Este fármaco cambia la organización de los lípidos y recupera la fluidez de las membranas afectadas por el estrés oxidante (Peuvot *et al.*, 1995).

El mecanismo de acción de este fármaco está también relacionado con el transporte de calcio en la célula. *In vitro*, el Piracetam tiene alta afinidad por receptores de ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico (AMPA) y facilita el ingreso de flujo de calcio en neuronas (Copani *et al.*, 1992), esta observación incrementa las dudas sobre el rol de este fármaco en la protección de las células.

#### *Rol del Piracetam en el estrés oxidante*

En la última década, estudios de Piracetam se han enfocado sobre los efectos de este fármaco a nivel celular (Tabla 6). El Piracetam incrementa significativamente los niveles de ATP y MMP y mejora la actividad de las deshidrogenasas

mitocondriales en el estrés, pero no tiene efecto sobre sujetos no expuestos a estrés, lo que significa que el mecanismo de acción de este fármaco está relacionado con daño oxidante. El Piracetam recupera 60 % de MMP y 127 % de la producción de ATP, disminuye la producción de ROS con 129 % e inhibe la toxicidad celular en un 29 % en células tratadas con péptido  $\beta$ -amiloide (Kim *et al.*, 2017a). Existen otros estudios donde el Piracetam incrementa el ATP (Keil *et al.*, 2006; Kurz *et al.*, 2010) o el MMP (Keil *et al.*, 2006; Kurz *et al.*, 2010; Singh, Goswami, Swarnkar, Pratap, *et al.*, 2011; Solanki *et al.*, 2011; Costa *et al.*, 2013; Gupta *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2017a; Tripathi, Paliwal and Krishnamurthy, 2017a) y disminuye el ROS (Singh, Goswami, Swarnkar, Pratap, *et al.*, 2011; Solanki *et al.*, 2011; Gupta *et al.*, 2014) inducido por diferentes tipos de estrés (Tabla 6).

Debido a que mejora la fluidez de las membranas en el estrés, el Piracetam modula la actividad de diferentes enzimas antioxidantes (Tabla 6). Dependiendo de la duración y la intensidad del estrés, se han encontrado variaciones en la actividad de SOD, CAT y de las enzimas del ciclo redox GSH, como GPx y GST. Esas enzimas han mostrado un incremento en la actividad en presencia de estrés oxidante, pero pueden perder la función si el estrés se vuelve intenso y por largos periodos. SOD, GST and CAT presentan disminución de la actividad en isquemia cerebral (Unger and Himasaila, 2016), en estrés inducido por  $AlCl_3$  (Abdel-Salam and Hamdy, 2016), por 60 % de fructosa (Mamchur *et al.*, 2015), por escopolamina (Swathi *et al.*, 2015), por bromuro de etidio (O. M. E. Abdel-Salam and Nada, 2011) o por hipoxia (Solanki *et al.*, 2011). En todos esos casos, el Piracetam incrementa la actividad de estas enzimas. Sin embargo, hay estudios donde el tratamiento con Piracetam no cambia la actividad de enzimas antioxidantes (Abdel-Salam *et al.*, 2011; Abdel-Salam, Salem and El-shamarka, 2013; Muley *et al.*, 2013) o las disminuye (Keil *et al.*, 2006). El GSH incrementa en ratas estresadas tratadas con Piracetam (Abdel-Salam *et al.*, 2011; Kalkan *et al.*, 2011; Solanki *et al.*, 2011; Abdel-Salam and Hamdy, 2016), pero también hay estudios donde no se encontró un cambio significativo en el nivel de GSH (Abdel-Salam *et al.*, 2011; Zaitone, Abo-

elmatty and Elshazly, 2012; Abdel-Salam, Salem and El-shamarka, 2013; Muley *et al.*, 2013). Estas variaciones son causadas por las diferentes concentraciones usadas de este fármaco, junto con el tipo de estresor y tiempo de exposición (Tabla 6).

Por otro lado, los lípidos poliinsaturados de las membranas celulares son los primeros afectados por los radicales libres. El malondialdehído (MDA) es el principal producto de la peroxidación de lípidos y el Piracetam ha mostrado que inhibe este proceso en el cerebro mediante la disminución de los niveles de MDA (Gupta *et al.*, 2009; Kosta *et al.*, 2012; Marisco *et al.*, 2013; Mamchur *et al.*, 2015; Swathi *et al.*, 2015; Verma *et al.*, 2015; Abdel-Salam and Hamdy, 2016; Unger and Himasaila, 2016; Tripathi, Paliwal and Krishnamurthy, 2017a). Sin embargo, MDA no cambia (Zaitone, Abo-elmatty and Elshazly, 2012; Muley *et al.*, 2013) o, sorpresivamente, incrementa bajo el tratamiento con Piracetam en estrés (Abdel-Salam *et al.*, 2011; Abdel-Salam, Salem and El-shamarka, 2013).

**Tabla 6. Efecto del Piracetam en el estrés oxidativo.**

| Modelo de estrés   | Animales                            | Tejido                             | Dosis de Piracetam   | Estudios bioquímicos  | Resultados  | Referencias                                  |
|--|-------------------------------------|------------------------------------|--|---|---|--|
| Péptido $\beta$ -amiloide  |                                     | HT-22<br>(células del HC de ratón) | 5 $\mu$ M  | MMP<br>ATP<br>ROS<br>Viabilidad celular   | $\uparrow$<br>$\uparrow$<br>$\downarrow$<br>$\uparrow$                                      | (Kim <i>et al.</i> , 2017b)                  |
| Solución LPS (1 $\mu$ g/ $\mu$ l, flujo 1 $\mu$ l/min por 5 min) en los ventrículos cerebrales laterales | Ratas macho albino Wistar 220–260 g | HC<br>PFC                          | 50, 100, y 200 mg/kg i.p., administrado 30 min antes de la infusión de LPS, 9 días | Actividad de los complejos I, II, III, IV, V<br>MMP<br>SOD<br>Nivel de nitrito<br>MDA | $\uparrow$<br>$\uparrow$<br>$\uparrow$<br>$\downarrow$<br>$\downarrow$<br>dosis dependiente | (Tripathi, Paliwal and Krishnamurthy, 2017b) |

|   |  |                     |  |  |  |                                   |
|---|--|---------------------|--|--|--|-----------------------------------|
| AlCl <sub>3</sub> , i.p.  | Ratas macho Sprague–Dawley (edad 10–11 semanas)        | Cerebro             | 100-300 mg/kg, i.p., diario en dosis única por 45 días | MDA<br>Óxido nítrico<br>GSH<br>Paraoxonasa 1   | ↓<br>↓<br>↑<br>↑                           | (Abdel-Salam and Hamdy, 2016)     |
| Encefalopatía inducida por T2DM-con estreptozotocina (45 mg/kg, i.p.) 15 min después de la administración de nicotinamida (110 mg/kg, i.p.) | Ratas macho Charles-Foster albino (180 ± 20 g)         | Plasma<br>HC<br>PFC | 25, 50 y 100 mg/kg, i.p.                               | Glucosa<br>Insulina<br>AchE<br>BDNF<br>GSK- 3β | ↓<br>↓<br>↓<br>↑<br>↓<br>dosis dependiente | (Pandey and Garabadu, 2016)       |
| Isquemia cerebral inducida por oclusión lateral de la arteria carótida por 30 min   | Ratas macho Wistar (200-250g)                          | Cerebro             | 600 mg/kg, p. o., antes de la inducción de la isquemia | MDA<br>SOD<br>CAT<br>GST<br>Tioles totales     | ↓<br>↑<br>↑<br>↑<br>↑                      | (Unger and Himasaila, 2016)       |
| Solución de fructosa 60% (en lugar de agua), por 8 semanas  | Ratas macho albino (edad 6 semanas), 180-220 g         | Suero               | 500 mg/kg/día, p.o., 14 días                           | SOD<br>MDA<br>APH<br>KPH                       | ↑<br>↓<br>-<br>-                           | (Mamchur <i>et al.</i> , 2015)    |
| Aβ(25–35), 10, 20, 40 mM  | Cultivos primarios de neuronas del HC                  |                     | 50, 100, 300 mM  | LDH<br>Neuronas muertas                        | ↓<br>↓<br>dosis dependiente                | (Sendrowski <i>et al.</i> , 2015) |
| Scopolamina (1 mg/kg) i.p.  | Ratas Albino Wistar                                    | Cerebro             | 150mg/kg, i.p  | Actividad de la AChE<br>SOD<br>GPx<br>MDA      | ↓<br>↑<br>↓<br>↓                           | (Swathi <i>et al.</i> , 2015)     |
| Isquemia testicular por torsión/detorsión   | Ratas macho Wistar albino (6 meses de edad, 250–300 g) | Sangre              | 200 mg/kg, i.p., 60 min antes de la detorsión          | TAC<br>TOS<br>OSI                              | ↑<br>-<br>↓                                | (Tuglu <i>et al.</i> , 2015)      |

|   |  |  |  |  |  |  |
|---|--|--|--|--|--|--|
| Rotenona (12 µg, i.c.v.)                              | Ratas macho Sprague–Dawley (170–220 g) | Homogenado de cerebro, cerebro medio, HC y PFC           | 600 mg/kg, p.o., 7 días antes de la administración de rotenona | GST<br>MDA   | ↑<br>↓<br>Dosis dependiente                | (Verma <i>et al.</i> , 2015)               |
| Rotenona (1 mM, 2 mM y 4 mM)                          |  | Homogenado de cerebro, cerebro medio, HC y PFC           | 10 mM, 1 h   |  |  |  |
| LPS (10, 50, y 100 µg/ml) por 1 h                     |  | Línea celular C6 astrocitos de rata                      | 1, 5, y 10 mM por 1 h  | LDH<br>Ensayo MTT<br>MMP<br>ROS<br>Daño de DNA             | ↓<br>↑<br>↑<br>↓<br>↓<br>Dosis dependiente | (Gupta <i>et al.</i> , 2014)               |
| Extracto de <i>Cannabis sativa</i> , s.c.             | Ratones macho Swiss albino (20-22 g)   | Cerebro  | 150 mg/ kg, s.c., dosis unida diaria por un mes                | MDA<br>Óxido nítrico<br>Glucosa<br>GSH                     | ↑<br>↑<br>↑<br>-                           | (Abdel-Salam, Salem and El-shamarka, 2013) |
| Simvastatina<br>60 mM, 2 h                            |  | Líneas celulares de cáncer de próstata humanas PFC3      | 1-12 µM, 2 h   | Muerte celular<br>SO<br>MMP                                | ↓<br>↓<br>↑<br>Dosis dependiente           | (Costa <i>et al.</i> , 2013)               |
| Scopolamina (1 mg/kg), i.p. después del entrenamiento | Ratas macho Wistar (230–250 g)         | Aislamiento de sinaptosomas del córtex cerebral y del HC | 0.02 µmol/5 µL, i.c.v., 60 min, antes del tratamiento          | Actividad de la NTPDase y la 50-Nucleotidasa<br>ADA<br>MDA | ↑<br>↑<br>↓                                | (Marisco <i>et al.</i> , 2013)             |
| Oclusión bilateral de la carótida comun por 30 min    | Ratas Wistar (150–180 g)               | Cerebro  | 500 mg/kg, i.p., diario por 3 días, 22 h después de la cirugía | SOD<br>GSH<br>CAT  | -<br>-<br>-<br>-                           | (Muley <i>et al.</i> , 2013)               |

|   |   |   |  |  |   |   |
|---|---|---|--|--|---|---|
|   |   |   |  | MDA<br>Nitrito<br>Dimensión del infarto<br>Contenido de agua | -<br>-<br>↓   |   |
| Fosfamidón (1.74 mg/kg/día p. o.), 6 semanas        | Ratas macho Wistar (200-250 g)              | Cerebro   | 600 mg/kg/día, p.o, 2 semanas                                  | MDA<br>NP-SH   | ↓<br>↑  | (Kosta <i>et al.</i> , 2012)                            |
| Rotenona (1.5 mg/kg/48 h/6 dosis, s.c.)             | Ratas macho Albino (200-260 g)              | Cerebro   | 100 y 200 mg/kg/día, p.o.                                      | Dopamina en el striatum<br>MDA<br>GSH<br>TNF- $\alpha$       | ↑<br>-<br>-<br>↓  | (Zaitone, Aboelmatty and Elshazly, 2012)                |
| Bromuro de etidio, intracerebral                    | Ratas macho Sprague Dawley (130 $\pm$ 10 g) | Cerebro<br>-Corteza (C),<br>- HC<br>-striatum (S)           | 150 mg/kg<br><br>i.p., dosis única diaria por 7 días           | MDA<br>TAC<br>GSH<br>Glucosa<br>AChE                         | ↓ (C, H, S)<br>↓ (C, H, S)<br>-<br>↓ (C, H, S)<br>↑ (H, S)            | (Abdel-Salam <i>et al.</i> , 2011)                      |
|   |   |   | 300 mg/kg,<br><br>i.p., dosis única diaria por 7 días          | MDA<br>TAC<br>GSH<br>Glucosa<br>AChE                         | ↑ (C, H, S)<br>↓ (C, H, S)<br>↑ (H, S)<br>↓ (C, H, S)<br>↑ (C), - (S) |   |
| Isquemia y reperfusión la medula espinal            | Conejos macho New Zealand (2.15–2.8 kg)     | Médula espinal (L1-L3)                                      | 250 mg/kg, i.p. (antes de la cirugía y continuada por 6 horas) | MDA<br>GSH-Px<br>Actividad XO<br>Nitrito y nitrato<br>MPO    | ↓<br>↑<br>↓<br>↓<br>-   | (Kalkan <i>et al.</i> , 2011)                           |
| LPS (10 mg/kg, i.p.), dosis única                   | Ratas macho Sprague Dawley (110–120 g)      | Leucocitos periféricos (PL)<br>Macrófagos peritoneales (PM) | 600 mg/kg, p.o., antes de la inyección de LPS                  | Viabilidad celular   | -(PL, PL <i>ex vivo</i> )<br>↑ (PM, M)                                | (Singh, Goswami, Swarnkar, Singh, <i>et al.</i> , 2011) |
| LPS (10 $\mu$ g/ml, 50 $\mu$ g/ml y 100 $\mu$ g/ml) |   | Leucocitos periféricos (PL <i>ex vivo</i> )                 | 1 mM y<br>10 mM  | ROS<br>MMP   | ↓<br>↑ (PL)   |   |

|   |  |   |  |  |   |                                |
|---|--|---|--|--|---|--------------------------------|
|   |  | Líneas celulares de macrófagos J774A.1 (M)<br>Células PFC12 (P)                   |  | Daño de DNA  | - (PM, PM <i>ex vivo</i> , M,P)<br>↓<br>Dosis dependiente |                                |
| Hipoxia (95% N <sub>2</sub> , 5% CO <sub>2</sub> ) por 3 h                  |  | Cultivo primario de neuronas de HC de ratas Sprague-Dawley (0 días de edad, 10 g) | 1 mM   | Viabilidad celular<br>LDH<br>AChE<br>MMP<br>ROS<br>GSH<br>GSSG | ↑<br>↓<br>↓<br>↑<br>↓<br>↑<br>↓                           | (Solanki <i>et al.</i> , 2011) |
| Péptido β-amiloide Aβ <sub>1-42</sub> (10 nM), 24 h                         |  | Células PFC12 y HEK   | Adicionado 30 min después de administrar Aβ <sub>1-42</sub>  |  |   |                                |
| Adición de Aβ <sub>1-42</sub> (50 nM)<br>o Aβ <sub>25-35</sub> (25 mM), 4 h | Ratones hembra jóvenes (2-3 meses) y viejas (22-24 meses) NMRI | Células disociadas de cerebro   | 0.1, 0.25 o 0.5 g/kg, p.o. dosis única diaria por dos semanas<br>Adicionado en el medio 1 h después de la exposición al estrés | MMP<br>Niveles de ATP  | ↑<br>↑  | (Kurz <i>et al.</i> , 2010)    |
| Propoxur, 10 mg/kg, p.o., diario por 6 semanas                              | Ratas Wistar de ambos sexos (120-200 g)                        |   | 400 mg/kg, i.p., diario, una semana después de 6 semanas de administración de Propoxur   | MDA<br>NP-SH   | ↓<br>↑  | (Gupta <i>et al.</i> , 2009)   |
| SNP, 0.5 mM, 24 h o 30 min  |  | Células PFC12   | 100, 500 y 1000 μM, 30 min o 23 h  | MMP<br>Niveles de ATP<br>Actividad de la caspasa 9             | ↑<br>↑<br>↓   |                                |
| SNP, 2 mM   | Ratones hembra jóvenes (2-                                     | Tratamiento <i>In vitro</i> , células   | 100, 250 y 500 mg/kg, p.o.   | MMP  |   | (Keil <i>et al.</i> , 2006)    |

|  |   |   |   |                                  |                  |  |
|--|---|---|---|----------------------------------|------------------|--|
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 2 mM, 4 o 6 h                                  | 3 meses) y viejas (22–24 meses)                   | disociadas de cerebro                           | diario por 2 semanas.                         |                                  | -                |  |
|  |   | Tratamiento <i>In vivo</i> , células de cerebro |   | MMP<br>SOD<br>GPx<br>GR          | ↑<br>↓<br>↓<br>↓ |  |
| AlCl <sub>3</sub> (100 mg/kg), diario por 8 semanas (disuelto en agua)         | Ratas Sprague-Dawley (6 meses de edad, 150–200 g) | Cortex<br>Cerebelo                              | 5 mg/kg, diario, disuelto en agua por 30 días | AChE<br>Mg <sup>2+</sup> -ATPasa | ↑<br>↑           | (Nehru <i>et al.</i> , 2006)             |
| Infarto de miocardio inducido por la ligación de la arteria coronaria anterior | Perros Mongrel                                    | Miocardio                                       | 20 mg/kg, i.p., 6 días                        | MDA                              | ↓                | (Kresyun, Kravchenko and Kadyrova, 1989) |

Intraperitoneal (i.p.), subcutánea (s.c.), per oral (p. o.), intracerebroventricular (i. c. v.), malondialdehyde (MDA), reduced glutathione (GSH), glutathione S-transferase (GST), total antioxidant capacity (TAC), catalase (CAT), acetylcholinesterase activity, (AChE), myeloperoxidase (MPO), xanthine oxidase (XO), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), lipopolysaccharide (LPS), lactate dehydrogenase (LDH), mitochondrial dehydrogenase activity assay (MTT assay), mitochondrial membrane potential (MMP), superoxide (SOD), non-protein thiol (NP-SH), sodium nitroprusside (SNP), aldehydephenylhydrazones (APH), ketophenylhydrazones (KPH), adenosine deaminase activity (ADA), phenazine methosulphate (PMS),  $\beta$ -amyloid peptide (A $\beta$ ), brain-derived neurotropic factor (BDNF), glycogen synthase kinase-3 $\beta$  (GSK- 3 $\beta$ ), lactate dehydrogenase (LDH), lipopolysaccharide (LPS), total oxidant status (TOS), diabetes mellitus (DM), oxidative stress index (OSI), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), ↓ = disminución significativa comparada con el grupo control, ↑ = aumento significativo comparada con el grupo control; - = sin cambios significativos.

Por las razones mencionadas anteriormente, el Piracetam es un fármaco nootrópico controversial que tiene efectos prometabólicos y neuroprotectores. A pesar de ello, el mecanismo de su acción aún no es muy bien conocido y hay muchas preguntas por ser respondidas acerca de su eficiencia y seguridad. Además, el Piracetam es uno de los nootrópicos más usados y es considerado ser una droga “inteligente” siendo usada excesivamente por individuos sanos para mejorar la memoria y el desarrollo físico (Corazza *et al.*, 2014). En el 2010, la Administración de Alimentos y Drogas (FDA, por sus siglas en inglés) prohibió el

uso de Piracetam como un suplemento alimenticio en Estados Unidos de América, estableciendo que no hay estudios concluyentes que prueben que esta droga es segura y efectiva (<http://www.fda.gov/ICECI/EnforcementActions/WarningLetters/ucm225605.htm>).

A pesar de ello, los efectos positivos sobre la memoria y el desarrollo cerebral en pacientes adultos mayores y en personas jóvenes sanas, así como la falta de efectos adversos significantes, han motivado el uso continuo de este nootrópico en varios países.

## HIPÓTESIS

El estrés psicológico altera el comportamiento, la función motriz, la energía del metabolismo en el cerebro, y la expresión de proteínas antioxidantes y del BDNF conduciendo a una fenocopia de la enfermedad de Parkinson.

El estrés psicológico y la falta de PINK1 promueven alteraciones energéticas en las PBMCs.

El estrés en vida temprana altera el ciclo celular e induce la activación crónica de la mitocondria en las PBMCs.

Piracetam disminuye el estrés oxidativo en cerebro y protege las PBMCs ante el daño inducido por el estrés psicológico a nivel de lípidos y proteínas.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

El objetivo de este estudio fue evaluar el comportamiento, la función motriz, el metabolismo energético, la expresión de proteínas antioxidantes y su función en el cerebro y PBMCs de ratas WT y parkinsonianas (PINK1-KO), hembras y machos, expuestas a estrés psicológico.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el comportamiento, función motriz y corticosteroides en plasma bajo estrés.
2. Evaluar la energía del metabolismo y la expresión de proteínas antioxidantes en PFC Y SN bajo estrés.
3. Evaluar la energía del metabolismo, expresión de proteínas antioxidantes y daño de ADN en PBMCs bajo estrés.
4. Evaluar el efecto del estrés psicológico y del Piracetam en el peso corporal, bioquímica sanguínea y actividad de enzimas antioxidantes en el cerebro, PBMCs e hígado.
5. Evaluar el efecto del estrés psicológico y del Piracetam sobre el perfil bioquímico de PBMCs.
6. Evaluar *in vitro* el efecto del Piracetam sobre la energía del metabolismo y expresión de proteínas antioxidantes en condiciones ligadas a estrés oxidativo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### DISEÑO EXPERIMENTAL

#### *Estudio 1*

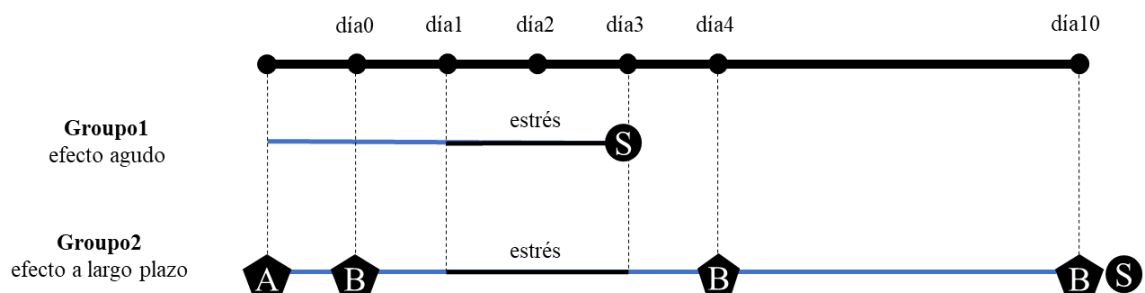
Para investigar como el estrés psicológico y/o cómo la falta de PINK1 afecta la producción de energía en el cerebro y en las células inmunes, el perfil bioenergético (fosforilación oxidativa y glicólisis) fue evaluado en PFC, SN y PBMCs usando el analizador de flujo extracelular XF24<sup>e</sup> Seahorse en ratas jóvenes, wild type (WT) y parkinsonianas (PINK1-KO) expuestas a estrés psicológico inducido por olor a depredador. También, para correlacionar la producción de energía en el cerebro y en las PBMCs con alteraciones en la función mitocondrial y sistema de defensa antioxidante, así como en la señalización neurotrófica, se analizó por WB el nivel de proteína DJ-1, contenido mitocondrial (TOM20), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y enzimas antioxidantes, como superóxido dismutasa citosólica (SOD1), superóxido dismutasa mitocondrial (SOD2) y catalasa (CAT).

Después de recibir la aprobación del Instituto de Cuidados Animales y el Comité Para el Uso de Animales (IACUC) de la Universidad de Nevada en Reno, ratas Long-Evans macho y hembra (WT y PINK1-KO, Horizon Discovery), de 9 a 11 semanas de edad y peso de 250 a 350 g, fueron empleadas para este estudio. Los animales fueron mantenidos bajo temperatura controlada de 25 a 26 °C, 12/12 h en ciclos de luz/oscuridad, comida y agua *ad libitum* y enjauladas individualmente 3 días antes de los ensayos de comportamiento.

El diseño experimental de este estudio se muestra en la Fig. 4. Dos cohortes de animales fueron usadas. Primero, para el estudio del efecto del estrés a corto plazo fueron usados: 20 machos (10 ratas WT y 10 PINK1-KO, 5 estresadas y 5 no estresadas para cada genotipo) y 20 hembras (10 ratas WT y 10 PINK1-KO, 5 estresadas y 5 no estresadas para cada genotipo). Las ratas fueron estresadas por

3 días y sacrificadas al tercer día para obtener el cerebro y el tejido sanguíneo (Fig. 6).

Para analizar el efecto a largo plazo del estrés emocional, una segunda cohorte de 18 ratas macho fue utilizada: 8 ratas WT y 10 PINK1-KO, estresadas y no estresadas para cada genotipo. Estos experimentos se llevaron a cabo en periodos de 10 días. Anterior a la exposición al estrés psicológico, los animales fueron entrenados y sus funciones motoras probadas por medio de la prueba rotarod, prueba de fuerza de agarre, prueba de la barra transversal y prueba de evitamiento de olor por ocultamiento. Los animales fueron estresados durante 3 días; al día siguiente (día 4) y 7 días posteriores a la exposición al estrés (día 10), las ratas fueron probadas en cuanto a su función motriz y comportamiento de ansiedad. Entre el día 4 y el día 10, los animales descansaron en sus aulas sin ser expuestas a otros experimentos o tratamientos adicionales. En el día 10, después de haber sido expuestas a pruebas de comportamiento, las ratas fueron sacrificadas y los tejidos fueron colectados y procesados.



**Figura 6. Diseño de Estudio 1.** Se utilizaron dos cohortes de animales: cohorte 1 donde las hembras (10 WT, 10 PINK1-KO) y machos (10 WT, 10 PINK1-KO), fueron distribuidos en 4 condiciones (WT S-, WT S+, PINK1-KO S-, PINK1-KO S+) de 5 animales por grupo y cohorte 2 formada por machos (8 WT, 10 PINK1-KO). Cohorte 1 (para el estudio del efecto del estrés a corto plazo) fueron estresados por 3 días y la recolección de tejido fue hecha al tercer día. Cohorte 2 (para el estudio del efecto del estrés a largo plazo) fueron entrenadas y probadas para el comportamiento y función motriz; posteriormente fueron estresadas por 3 días (día 1 a día 3), probadas otra vez en cuanto a comportamiento y función motriz en el día 4, descanso por 7 días y finalmente aprobadas por 3ª vez para comportamiento y función motriz y, finalmente, el tejido fue colectado en el día 10. A: entrenamiento para prueba rotarod, prueba de la barra transversal; B: prueba para rotarod, prueba de fuerza de agarre, prueba de la barra transversal y prueba de

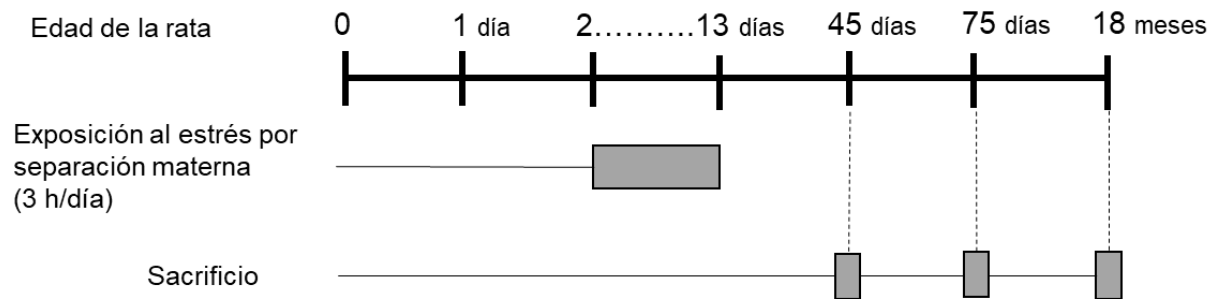
evitamiento de olor por ocultamiento; S: Sacrificio, colección de tejido, ensayo metabólico Seahorse XF24.

Las pruebas de conducta se llevaron a cabo después de varios entrenamientos con las ratas WT y PINK1-KO, y se estableció un orden de pruebas de mayor a menor estrés. En el día 0, día 4 y día 10 (alrededor de 7 am), a los animales se les permitió descansar y ambientarse al cuarto experimental durante 40 minutos y, posteriormente, se llevó a cabo primero la prueba de fuerza de las extremidades anteriores y posteriores usando la prueba de fuerza de agarre, se observó en las pruebas de entrenamiento que ésta, es la menos estresantes de todas ellas. Después de aproximadamente 30 minutos de descanso, los animales fueron evaluados en el aparato rotarod para el estudio de la coordinación motora y se le permitió al animal descansar otros 30 minutos antes de la prueba de evitamiento de olor por ocultamiento. Después de 20 minutos de libre exploración en la caja de claro/oscuras, el animal descansó otros 30 minutos en su jaula hogar y, finalmente, se realizó la prueba de equilibrio y coordinación motriz fina en la prueba de la barra transversal. Es importante mencionar que todos los animales fueron manipulados de igual manera y el orden de las pruebas de conducta se llevaron a cabo en periodos no activos (ciclo de luz) de 7 am a 11 am, y fueron los mismos para todos los grupos experimentales.

### *Estudio 2*

Para estudiar el efecto crónico del estrés en vida temprana sobre el ciclo celular y la actividad mitocondrial de las PBMCs, fue usado un modelo de estrés de separación materna (MatSep). Las camadas fueron separadas de la madre por 13 días posnatales consecutivos (PND). Los animales fueron sacrificados a los 45 días (adolescentes), 75 días (adultos jóvenes) y 18 meses de edad (adultos viejos), fue extraída la sangre y las PBMCs fueron aislados (Fig. 7).

Las ratas Wistar fueron compradas y albergadas en jaulas estándar con acceso agua y comida ad libitum y mantenidas en ciclos 12/12 h de oscuridad /luz en una temperatura controlada. Todos los experimentos fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado Animal de la Universidad de Texas en El Paso, USA. Las camadas fueron asignadas aleatoriamente en dos grupos: control (S-) y estresadas (S+). Después del procedimiento experimental los grupos S- y S+ fueron mantenidos bajo condiciones similares hasta el sacrificio.



**Figura 7. Diseño de Estudio 2.** La inducción del estrés por MatSep inició en PND 2 y terminó en PND 13. MatSep consistió en la privación de la camada de la madre por un período de 3 horas/día (de 8 am a 11 am) por 13 días. Los animales fueron sacrificados a los 45 días (adolescentes), 75 días (jóvenes adultos) y 18 meses de edad (adultos mayores).

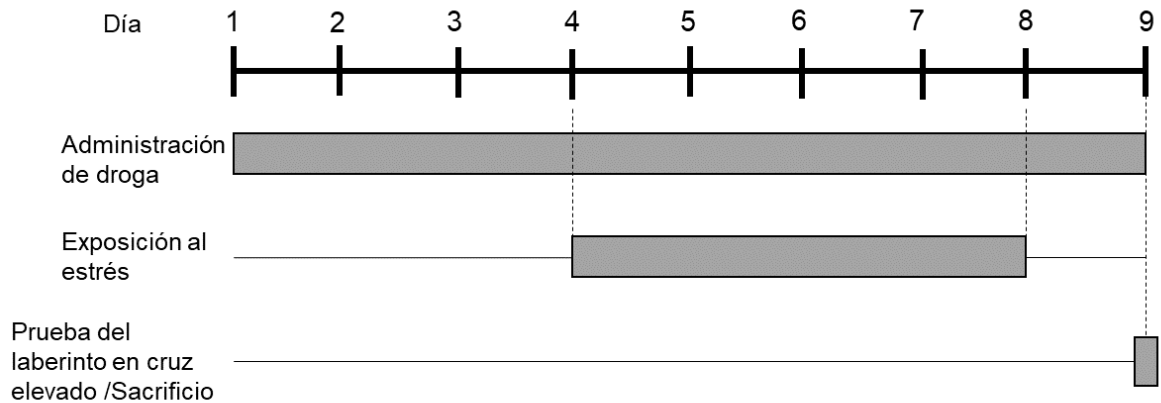
### *Estudio 3*

Para el análisis del perfil bioquímico de las PBMCs utilizando SR- $\mu$ FTIR, las células fueron extraídas de ratas estresadas por 5 días para evaluar el efecto del fármaco Piracetam (600 mg/kg) sobre la composición bioquímica de todo el ambiente celular. También, el efecto del estrés y del Piracetam sobre el comportamiento y la concentración de corticosterona en plasma fueron estudiados. El diseño de este estudio se muestra en la Fig. 8.

Todos los experimentos fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Ciudad Juárez, Chihuahua, México, De acuerdo a las guías internacionales (NIH Publicación No. 8023, revisado en 1978) y normas oficiales mexicanas (NOM-062-ZOO-1999). Fueron utilizadas ratas Sprague-Dawley, hembras y machos, con peso de 200 a 240 g y edades de 9 a 11 semanas. Todas las ratas fueron mantenidas a 23-26 °C, ciclos de luz/oscuridad de 12/12 h, con agua y comida disponible *ad libitum* y fueron enjauladas de manera individual durante una semana antes de los experimentos. Los animales fueron adquiridos de Charles River (Rismart, México).

Durante 9 días consecutivos, las ratas recibieron Piracetam (600 mg/kg), administrado oralmente usando una cánula, en dosis única, a las 8 am. Desde el día 4 y hasta el día 8, los animales fueron expuestos a estrés psicológico (a las 9 am, después de la administración del fármaco). En el día 9, algunas ratas fueron probadas para ansiedad en la prueba del laberinto en cruz elevado y otro grupo fue sacrificado para el aislamiento de PBMCs y plasma.

Las ratas fueron separadas en 4 grupos: sin estrés y sin Piracetam (S-P-); sin estrés con Piracetam (S-P+); con estrés sin Piracetam (S+P-); y con estrés y con Piracetam (S+P+). En el caso de los grupos experimentales sin Piracetam, fue administrada agua en lugar del fármaco.



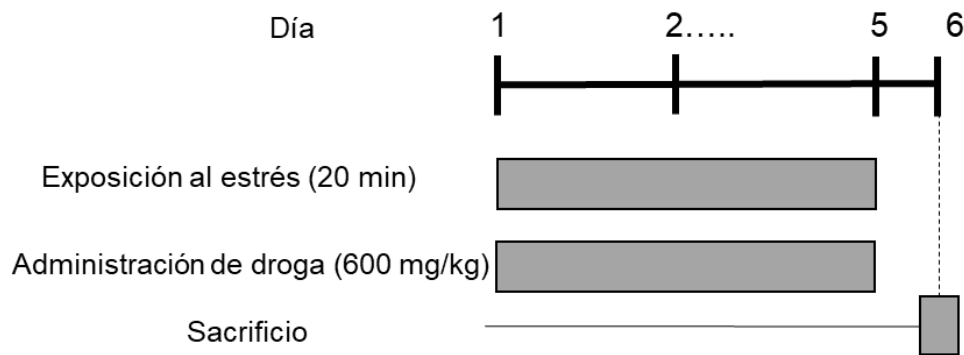
**Figura 8. Diseño de Estudio 3.** Durante 9 días consecutivos, las ratas recibieron Piracetam (600 mg/kg). Del día 4 hasta el día 8, los animales fueron expuestos a estrés (a las 9 am, después de la administración del fármaco). En el día 9, algunas ratas fueron probadas para ansiedad en la prueba del laberinto en cruz elevado y otro grupo fue sacrificado para el aislamiento de PBMCs y plasma.

#### *Estudio 4*

En el estudio 4 fue analizado: el comportamiento, la actividad enzimática de proteínas antioxidantes en el cerebro, hígado y PBMCs, expresión de proteínas en PBMCs y cambios en el peso corporal y en las glándulas adrenales. Durante 6 días consecutivos, las ratas recibieron Piracetam (600 mg/kg), administrado oralmente usando una cánula, en dosis única, a las 8 am. Del día 1 hasta el día 5, los animales fueron expuestos a estrés (a las 9 am, después de la administración del fármaco). En el día 6, los animales fueron sacrificados (Fig. 9). Las ratas fueron separadas en 4 grupos sin estrés y sin Piracetam (S-P-); sin estrés con Piracetam (S-P+); sin estrés y sin Piracetam (S+P-); y sin estrés y con Piracetam (S+P+). En el caso del grupo experimental sin Piracetam, fue administrada agua en lugar del fármaco.

Todos los experimentos fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Ciudad Juárez, Chihuahua, México, siguiendo guías internacionales (NIH Publicación No. 8023, revisado 1978) y normas oficiales mexicanas (NOM-062-ZOO-1999). Ratas hembras y machos

Sprague-Dawley de 200 - 240 g de peso y edades de 9 - 11 a semanas fueron utilizadas. Todas las ratas fueron mantenidas a 23 - 26 °C, ciclos 12/12 h luz/oscuridad, Con agua y alimento disponible *ad libitum* y fueron enjauladas individualmente durante una semana antes de los experimentos.



**Figura 9. Diseño de Estudio 4.** Durante 6 días consecutivos las ratas recibieron Piracetam (600 mg/kg). Del día uno y hasta el día 5, los animales fueron expuestos a estrés. En el día 6, los animales fueron sacrificados.

### *Estudio 5*

Fueron realizados experimentos *in vitro* usando cultivos primarios de neuronas corticales de raton para estudiar el efecto del Piracetam en condiciones ligadas al estrés oxidativo. Las células fueron tratadas con 0.5 M y 1 M de Piracetam por 24 horas. Posteriormente, fue inducido el estrés usando 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 1 h (Fig. 10). La energía del metabolismo, contenido mitocondrial, proteínas antioxidantes y expresión de BDNF fueron estudiados.

| 4 días                 | 24 h                                       | 1 h   | Análisis |
|------------------------|--|---|----------|
| Cultivación de células | Tratamiento con 0.5 mM y 1 mM de Piracetam | Estrés con 1 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> |          |

**Figura 10. Diseño de Estudio 5.** Ensayos *in vitro* usando cultivos primarios de neuronas corticales para estudiar el efecto de Piracetam en condiciones ligadas al estrés oxidativo. Las células fueron tratadas con 0.5 M and 1 M de Piracetam por 24 h. El estrés fue inducido usando 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 1 h. Posteriormente se llevaron a cabo diferentes ensayos.

## ADMINISTRACIÓN DEL FÁRMACO

El Piracetam (Nootropil, [1 g/5mL], UCB Pharma Belgium) o agua fueron oralmente administrados usando una cánula de metal. El Piracetam fue administrado en dosis unicas de 600 mg/kg, a la misma hora (8 am), todos los días durante 6 días (Fig. 9) y durante 9 días (Fig. 8), dosis que se ha reportado en previos estudios como efectiva para disminución del estrés oxidante en cerebro y en otros tejidos (Verma *et al.*, 2015; Unger and Himasaila, 2016).

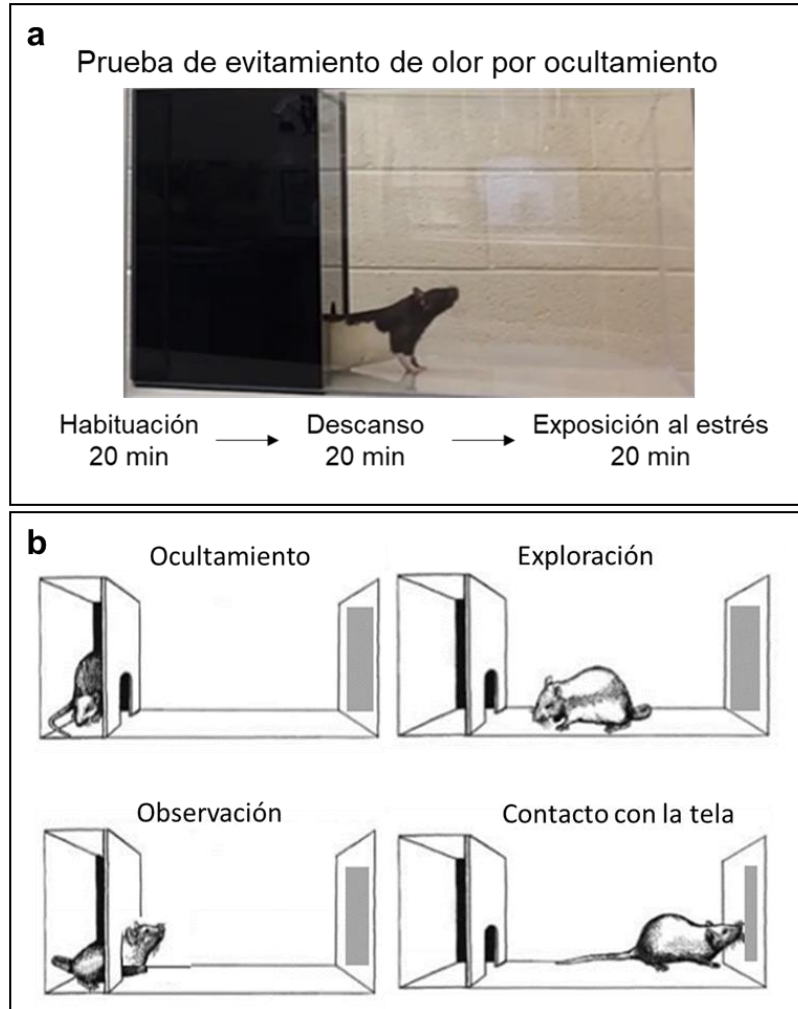
## EXPOSICIÓN AL ESTRÉS

### *Prueba de evitamiento de olor por ocultamiento*

Para inducir el estrés psicológico, las ratas fueron expuestas a orina de gato por 3 (Fig. 6) o por 5 (Fig. 8 and Fig. 9) días consecutivos durante 1 hora (entre 9 y 11 am) como se describe más adelante. Previo a la exposición al estrés, las ratas fueron habituadas durante 20 minutos en la jaula experimental (con dimensiones de 60 X 27 X 35 cm, hecha de plástico, con una porción opaca y dos porciones translúcidas), luego fueron regresadas otros 20 minutos en su jaula hogar para relajación y después fueron de nuevo transferidas en la jaula experimental por 20

minutos donde previamente fue colocada una pieza de tela con o sin orina/olor de gato (Fig. 11a). La pieza de tela fue usada previamente (o no) como cama de un gato doméstico durante una semana (para el estudio 3 y 4) o fue utilizada orina de gato (obtenida directamente de la punción de vejiga de 3 diferentes gatos) de la cuál 0.5 mL fueron agregados (para el estudio 1) en piezas de algodón (20 X 30 cm) y almacenadas a -20 °C hasta su uso (Dielenberg and McGregor, 2001; Vargas-Caraveo, Pérez-Ishiwara and Martínez-Martínez, 2015).

En el estudio 1, para cuantificar la ansiedad inducida por el estrés psicológico, el comportamiento de los animales en las aulas experimentales fue filmado durante 20 minutos antes de la exposición al estresor (día 0) y después de los episodios de estrés (días 4 y 10). Los vídeos fueron analizados para obtener el tiempo promedio que el animal estaba escondiéndose, explorando, y aproximándose a la pieza de tela (Fig 11b). Para lograr lo anterior, fue empleado el software JWatcher™ (version 0.9).



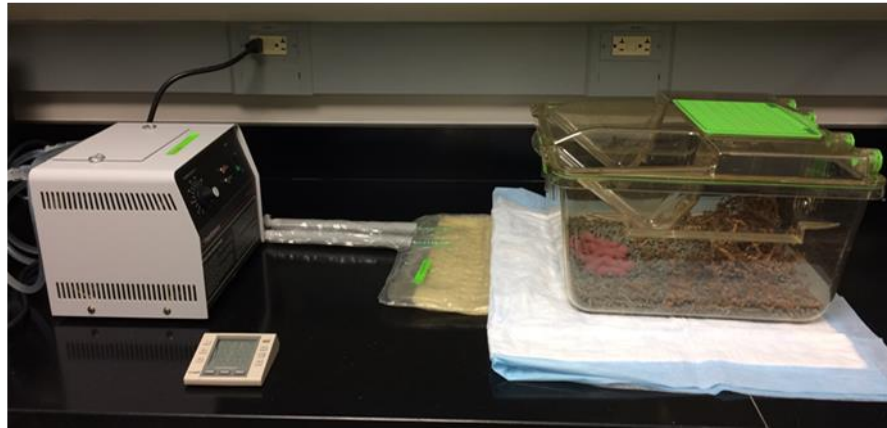
**Figura 11. Prueba de evitamiento de olor por ocultamiento o prueba de rechazo al olor a depredador.** a. Imagen representativa de la caja claro/oscuro donde se llevó a cabo la prueba de rechazo al olor de depredador. La jaula de prueba tuvo dimensiones de 60 X 27 X 35 cm, fue hecha de plástico y tuvo una porción opaca donde el animal podía esconderse y dos porciones translúcidas donde fue colocada la tela. b. Los 4 comportamientos estudiados en la prueba de rechazo al olor a depredador fueron los siguientes: el tiempo que la rata está escondida, explorando, que permanece en posición de defensa (cabeza de fuera) y el tiempo en que la rata se aproxima a la tela (aproximación) (Dielenberg, Arnold and McGregor, 1999; Dielenberg and McGregor, 2001).

*Modelo de estrés por separación materna*

Las camadas fueron estresadas durante 13 días, desde la edad de dos días hasta el día 13, cuando fueron separadas de la madre por 3 horas/día (de 8 am a 11 am). Las camadas fueron colocadas cuidadosamente en una jaula nueva sobre una

superficie templada para evitar el estrés inducido por hipotermia (Fig.12). En el día 21, todas las camadas fueron separadas de la madre y hospedadas en pares por jaula hasta el sacrificio. Para este estudio, fueron usadas las siguientes edades de ratas hembra: adolescentes (45 a 50 días de edad), adultos (75 a 80 días de edad) y adultos mayores (18 meses de edad). Los animales fueron anestesiados usando pentobarbital sódico intraperitoneal (45 mg/kg) y sacrificados por decapitación después de la obtención de sangre mediante una punción cardiaca.

## Modelo de estrés por separación materna



**Figura 12. Modelo de estrés por separación materna.** Las camadas fueron separadas de su madre durante 3 h/día por 13 días. Las camadas fueron colocadas en una nueva jaula sobre una superficie templada para evitar el estrés inducido por hipotermia.

## PRUEBAS DE COMPORTAMIENTO Y FUNCIÓN MOTRIZ

### *Prueba del laberinto en cruz elevado*

En el estudio 3 (Fig. 8), en el día 9, a los animales se le midió la ansiedad en un laberinto de madera elevado con 4 brazos simétricos (40 cm de largo y 10 cm de ancho, paredes de 30 cm para los brazos cerrados). El centro cuadrado tuvo 10 cm<sup>2</sup> y todo el laberinto tuvo una altura de 50 cm (Fig. 13). El animal exploró el

aparato por 5 minutos. El experimento se llevó a cabo en un cuarto con luz y videocámara localizadas en el centro del techo (Pellow *et al.*, 1985).

#### *Prueba de rotarod*

La prueba rotarod es un procedimiento que miden la capacidad del animal para mantener el equilibrio sobre una varilla en constante rotación y velocidad progresiva y este método a menudo es usado para evaluar el déficit motriz en estudios para la eficiencia de fármacos (Rozas and Labandeira García, 1997; Carter, Morton and Dunnett, 2001; Dave *et al.*, 2014). En el estudio 1 (Fig. 6), un aparato rotarod acelerado fue utilizado (Panlab Harvard Apparatus, 76-0772) (Fig. 13). En el primer día, el animal fue entrenado durante dos minutos a la velocidad de 20 rpm. Después de 10 minutos de descanso en su jaula hogar, el animal fue probado de nuevo y la velocidad incrementó gradualmente de 4 a 40 rpm. En el segundo día, se realizó el mismo procedimiento y el tiempo de latencia sobre la varilla fue determinado. El mismo ensayo (sin entrenamiento) fue repetido un día después de la exposición al estrés (día 4), y después de 7 días siguientes al estrés (día 10).

#### *Prueba de fuerza de agarre*

La prueba de fuerza de agarre (Fig. 13) es una prueba usada para medir la fuerza muscular en roedores (Cabe *et al.*, 1978; Maurissen *et al.*, 2003; Dave *et al.*, 2014). En el estudio 1 (Fig. 6), 3 pruebas consecutivas fueron realizadas y el valor más alto fue registrado para medir la fuerza muscular máxima. La fuerza de agarre fue calculada como la fuerza máxima (g) dividida entre el peso del animal (g). La prueba de fuerza fue aplicada separadamente para las extremidades anteriores y posteriores. Esta prueba fue realizada antes de la exposición al estrés (día 0), en un día después de la exposición al estrés (día 4) y después de 7 días posteriores al estrés (día 10).

#### *Prueba de la barra transversal o prueba de equilibrio*

La prueba de la barra transversal es un método para medir el equilibrio y la coordinación motriz fina sobre una viga con diferentes anchuras (Carter, Morton and Dunnett, 2001; Dave *et al.*, 2014). En el estudio 1 (Fig. 6), fue usado un aparato con viga de equilibrio (Panlab Harvard Apparatus) compuesto de una caja negra y una viga (de 2 o de 6 cm) montada sobre dos triples en un ángulo de 15° del suelo (el punto más alto fue de 90 cm del suelo, donde se encuentra de la caja). Para la seguridad del animal, fue colocada una repisa debajo de la viga. También, una fuente de luz fue colocada en el otro extremo de la viga para motivar al animal a escalar la viga hasta la caja objetivo (Fig. 13). Los animales recibieron un entrenamiento sobre ambas vigas, 3 trayectos por viga, con uno a dos minutos de tiempo de descanso en la caja objetivo entre los trayectos. El tiempo de cruce de cada viga y el número de resbalones fueron contados usando el software JWatcher™ software (versión 0.9). La prueba de equilibrio fue realizada antes de la exposición al estrés (día 0), en un día después de la exposición al estrés (día 4) y después de 7 días posteriores al estrés (día 10).



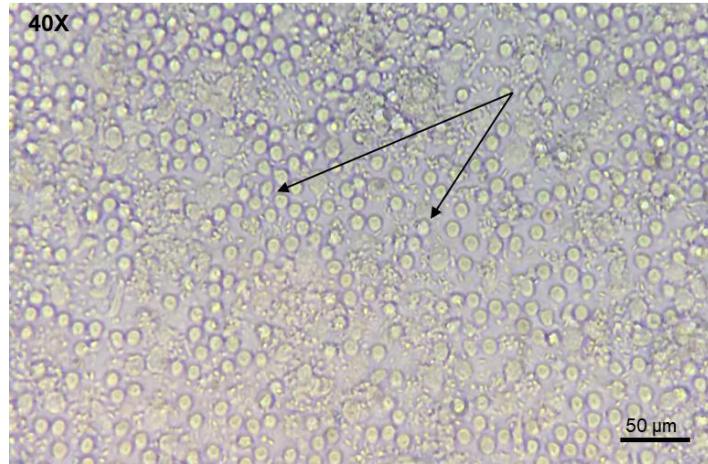
**Figura 13. Pruebas de comportamiento y función motriz:** Prueba de rechazo al olor a gato, prueba de plus maze elevado, prueba rotarod, prueba de fuerza de agarre, prueba de la barra transversal (Cabe *et al.*, 1978; Pellow *et al.*, 1985; Rozas and Labandeira García, 1997; Dielenberg, Arnold and McGregor, 1999; Carter, Morton and Dunnett, 2001; Maurissen *et al.*, 2003).

## COLECCIÓN DE SANGRE Y AISLAMIENTO DE PBMCS

Cuando los animales fueron completamente anestesiados, la sangre fue obtenida por punción cardiaca usando tubos vacutainer con EDTA. La sangre completa fue diluida con PBS-EDTA 1:1 (137 mM NaCl, 8.2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3.2 mM KCl, y 4 mM EDTA, pH 7.4). Esta disolución fue colocada lentamente en 40 % sobre un lecho de PBS-EDTA, 57.3 % Percoll™, 2.7 % 10X PBS (con una relación final 9:1). Después de centrifugación a 1000 g por 30 min, las células mononucleares fueron recuperadas y lavadas 3 veces por centrifugación a 800 g, por 10 min cada uno, con 1X PBS conteniendo 4 mM EDTA (Fig. 14).

Para el análisis de SR-μFTIR (Estudio 3), las PBMCS fueron fijadas en 300 μL de formaldehído al 1 % en 1X PBS por 20 min a temperatura ambiente. Finalmente, las células fijadas fueron lavadas dos veces con 1 mL de agua desionizada y resuspendidas con 200 μL de agua desionizada (Vargas-Caraveo *et al.*, 2014). Las muestras a temperatura ambiente fueron llevadas al beamline ID21 en el European Synchrotron Radiation Facility (ESRF), Grenoble, Francia, para ser analizadas por SR-μFTIR.

Para los ensayos metabólicos (estudio 1), después de la centrifugación a 1000 g por 30 minutos, las PBMCS fueron lavadas dos veces (600 g por 10 min) con 1X PBS suplementado con 25 mM de glucosa y 0.1 % BSA. Las células fueron resuspendidas en medio DMEM templado suplementado con 10 % FBS y 2 mM de Glutamina.



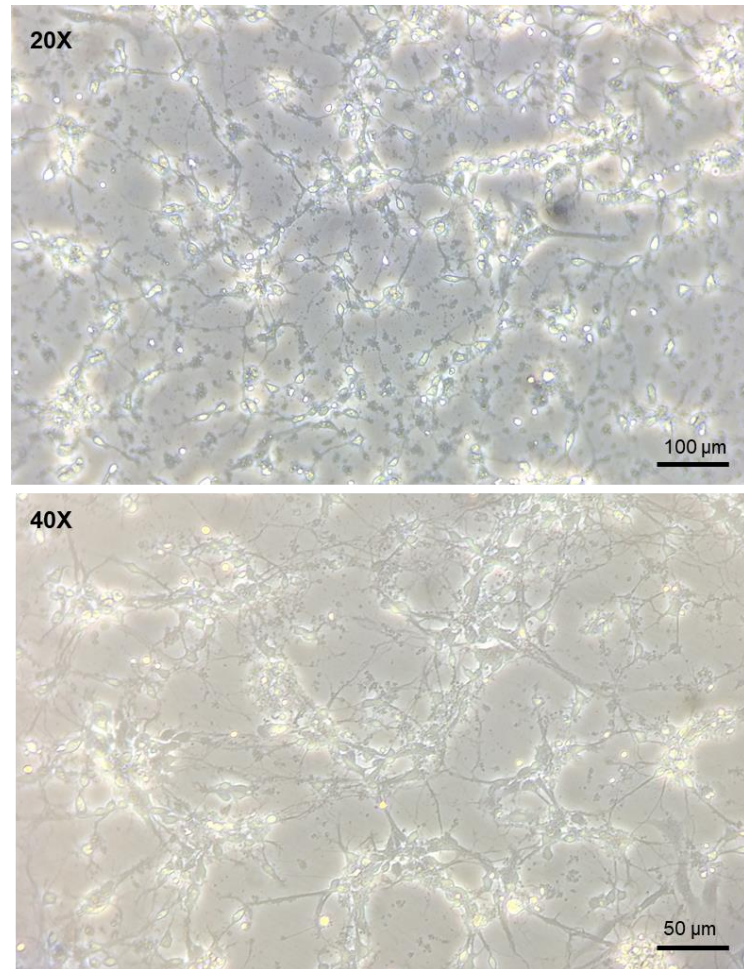
**Figura 14. Imagen de microscopía de campo claro 40X de PBMCs aislado usando gradiente de 60% Percoll.** Según el trabajo publicado de nuestro equipo de laboratorio (Vargas-Caraveo *et al.*, 2014), utilizando el gradiente de 60 % Percoll para aislar las PBMCs se obtuvo 90 % linfocitos, 4.5 % monocitos, 4.1 % neutrófilos y 0.4 % eosinófilos.

## CULTIVOS PRIMARIOS DE NEURONAS CORTICALES

Los cultivos primarios de neuronas corticales fueron preparados de embriones de 14 a 16 días de edad a partir del tiempo de embarazo de ratones WT C57BL/6.

El ratón fue anestesiado con 5 % de isoflurano vía inhalatoria, los embriones fueron removidos y guardados en DMEM frío (suplementados con 10 % FBS y 2 mM L-glutamina). La región de la corteza fue cuidadosamente aislada del cerebro de cada embrión de ratón y colocado en medio de cultivo (Gibo-GRL, cat. 21103-049) frío suplementado con 2 % B27 (Gibo-BRL, cat. 10889-038), 2 % FBS (Invitrogen, cat. 10438-026), 25 μM ácido glutámico (Calbiochem, cat. 3510) y 2 mM L-glutamina (Invitrogen, cat. 35050-061). Las células fueron separadas mecánicamente usando una micropipeta. Posteriormente, las células fueron contadas y 700 000 células por pozo fueron resuspendidas en 500 μL de medio de cultivo en placas de 6 pozos (para el ensayo WB) o 70 000 células por pozo resuspendidas en 500 μL de medio de cultivo en microplacas de 24 pozos (Seahorse XF24 Cell Culture Microplates) previamente tratadas con poly-D-lisina estéril (Sigma, P-7280), para estudios metabólicos.

En el cuarto día después del aislamiento de células, el medio de cultivo fue cambiado con medio de mantenimiento (suplementado con 2 % B27 and 2 mM L-glutamina).



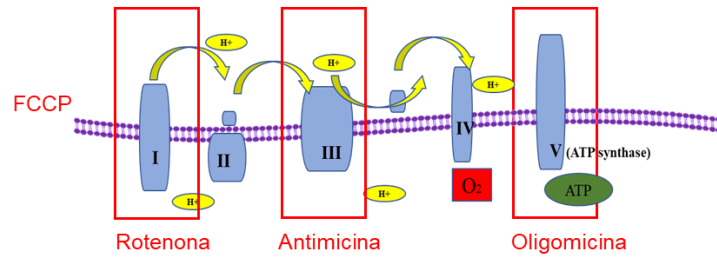
**Figura 15. Imagen de microscopía de campo brillante 20x and 40X de neuronas corticales primarias después de dos días de cultivo.**

ENSAYOS METABÓLICOS CON AGILENT SEAHORSE XF24<sup>e</sup> EN CEREBRO, PBMCs Y CULTIVOS PRIMARIOS DE NEURONAS CORTICALES.

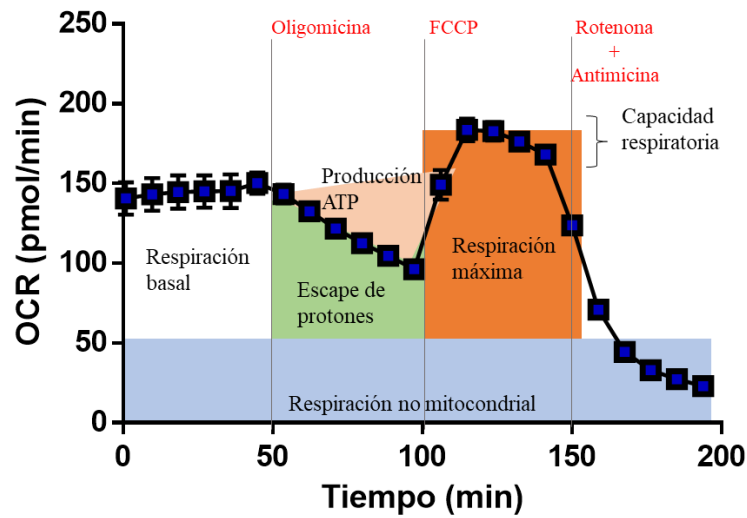
Usando un analizador de flujo extracelular XF24<sup>e</sup> fueron analizadas en tiempo real la tasa de consumo de oxígeno (OCRs, por sus siglas en inglés) y la tasa de

acidificación extracelular (ECARs, por sus siglas en inglés), que aproximan la función mitocondrial y la glicólisis respectivamente, en cerebro, PBMCs y cultivos primarios de neuronas corticales. Los siguientes parámetros bioenergéticos fueron evaluados (Fig. 16): la OCR no mitocondrial (calculada como la OCR mínima después de la inyección de rotenona y antimicina-A), la respiración basal (calculada como la última medición de OCR antes de la inyección de oligomicina), la respiración máxima (considerada como la tasa máxima después de la inyección de FCCP), el escape de protones (H<sup>+</sup>) (calculado como el valor mínimo de OCR posterior a la inyección de oligomicina) y la capacidad respiratoria (evaluada por el cálculo de la respiración máxima menos el valor basal de OCR). Adicionalmente, los siguientes parámetros de ECARs fueron analizados: el glicólisis basal (calculada como la última medición antes de la inyección de oligomicina), y la capacidad glicolítica (calculada como la diferencia entre el ECAR máximo seguido de la inyección de FCCP y la última medición antes de la inyección de oligomicina). También, fue calculada la relación basal OCR/ECAR (la relación entre el promedio de todas las mediciones de OCR previo a la primera inyección y el promedio de todas las mediciones de ECAR previo a la primera inyección) y la relación máxima OCR/ECAR (la relación entre el promedio de todas las medidas de OCR después de la inyección de FCCP y el promedio de todas las mediciones de ECAR después de la inyección de FCCP previo a la inyección de rotenona y antimicina-A).

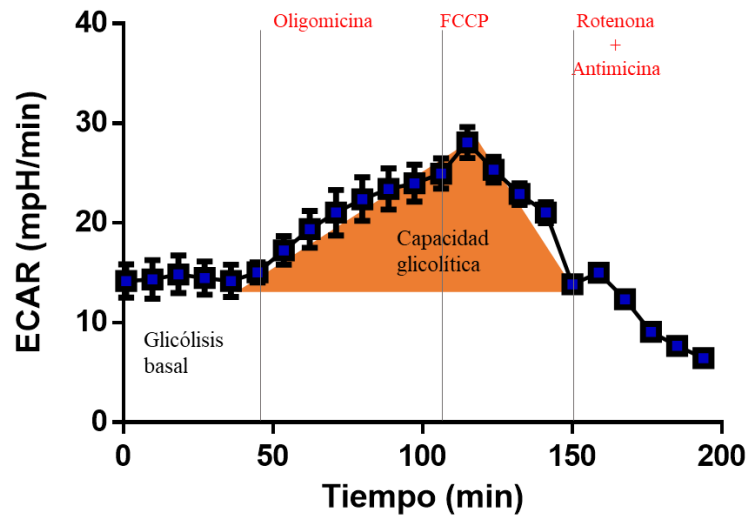
**a** Cadena de transporte de electrones



**b** Data OCR



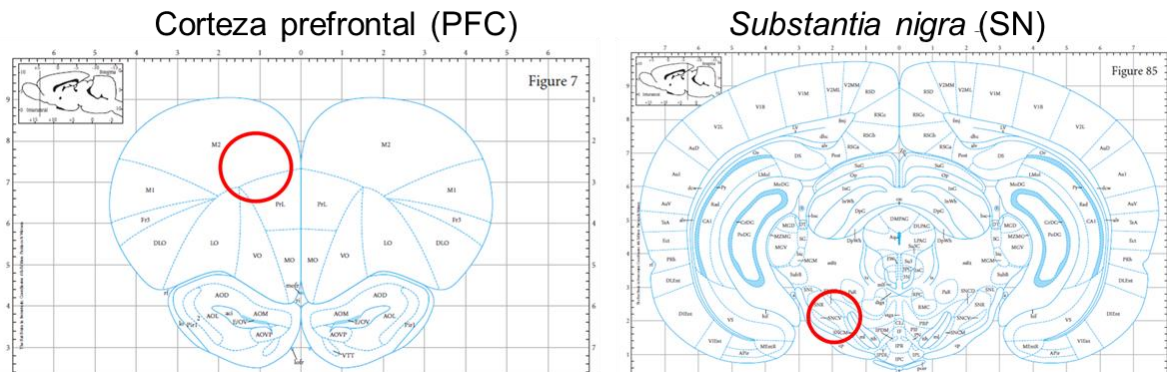
**c** Data ECAR



**Figura 16. Principio del ensayo metabólico y parámetros estudiados.** a) Figura representativa del efecto de oligomicina, carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP), rotenona y antimicina sobre la cadena de transporte de electrones. Oligomicina inhibe el complejo V, FCCP es un protonóforo que estimula la capacidad máxima de la cadena respiratorio para producir ATP, rotenona inhibe el complejo I y la antimicina inhibe el complejo III. b) Gráfica representativa de los parámetros estudiados para los datos de OCR obtenidos de los ensayos metabólicos. c) Gráfica representativa de los parámetros estudiados de los datos de ECAR obtenidos de los ensayos metabólicos.

### *Ensayos metabólicos en cerebro*

En el estudio 1, las ratas fueron anestesiadas con la inhalación de isofluorano al 5% y perfundidas transcardíacamente con 100 mL (10 mL/min) de fluido cerebroespinal artificial (aCSF, por sus siglas en inglés) (120 mM NaCl, 3.5 mM KCl, 1.3 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 mM HEPES, 10 mM Glucosa, pH 7.4) a 37 °C. Los cerebros fueron aislados e inmersos en aCSF oxigenado a 37 °C. Los hemisferios derechos fueron seccionados coronalmente usando un vibratomo (VT 1200S, Leica Microsystems, Germany) a 150 µm de grosor, a 0.1 mm/s de velocidad y amplitud de 1 mm. Los PFC y SN fueron localizados usando el atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (Fig. 17) (Paxinos and Watson, 2007). Las secciones de cerebro fueron mantenidas en el mismo aCSF oxigenado a 37 °C mientras eran montadas en la microplaca de captura (XF24 islet capture microplate, Seahorse Bioscience), como fue descrito previamente (Fried *et al.*, 2014).



**Figura 17. Localización de PFC y SN en secciones coronales de cerebro de rata según el atlas estereotáxico de Paxinos and Watson (Paxinos and Watson, 2007).**

De cada animal fueron analizados los perfiles bioenergéticos en cinco cortes de cerebro que fueron colocados en pozos de la microplaca, siguiendo un protocolo publicado previamente con mínimos ajustes (Fried *et al.*, 2014). De forma breve, biopsias de 1.2 mm de diámetro de cada región del cerebro fueron cuidadosamente aisladas y montadas en el fondo de cada pozo de la placa. Las pantallas de captura, previamente sumergidas en XF Base Medium, fueron cuidadosamente montadas sobre el tejido y 700  $\mu$ L de medio Agilent Seahorse XF Base Medium (suplementado con 2 mM L-glutamina, 1 mM Na piruvato, 10 mM glucosa y 4 mg/mL BSA, pH 7.4) fue agregado en cada pozo. Después, tres diluciones de reactivos farmacológicos fueron preparados en XF Medium: 25  $\mu$ M de oligomicina de *Streptomyces diastatochromogenes* (1404-19-9, Sigma Aldrich), 15  $\mu$ M de carbonil cianide 4-(trifluorometoxi) fenilhidrazona (FCCP, 370-86-86, Sigma Aldrich) y una mezcla de 20  $\mu$ M antimicina-A de *Streptomyces sp.* (1397-94-0, Sigma Aldrich) con 20  $\mu$ M de rotenona (R8875, Sigma Aldrich). Los reactivos fueron precargados en el cartucho sensor del equipo Agilent Seahorse XFe24, el cual fue pre hidratado con una solución de calibración, a 37 °C, en la noche previa al experimento. Un volumen de 75  $\mu$ L de cada fármaco fueron inyectados sucesivamente en un volumen final de 925  $\mu$ L en cada pozo. Cuatro pozos, uno por línea, fueron empleados como pozo blanco para cada microplaca. Los siguientes parámetros de ensayos de estrés mitocondrial fueron establecidos de acuerdo a publicaciones previas (Fried *et al.*, 2014), pero con alguna de las siguientes modificaciones. Cada ciclo de medida fue programado para consistir en 3 minutos de mezcla, 3 minutos de espera, y la medición de las OCRs y ECARs fue realizada por dos minutos. Adicionalmente, fueron empleados 5 ciclos para analizar la línea base de OCR, 7 ciclos fueron usados para evaluar la OCR dependiente de la producción de ATP (oligomicina), 5 medidas fueron usadas para

medir la OCR (FCCP) máxima, y 6 ciclos para evaluar la OCR dependiente de la mitocondria.

#### *Ensayos metabólicos en PBMCs*

La función mitocondrial (OCRs) y la glicólisis (ECARs) en las PBMCs fueron medidas usando un analizador de flujo extracelular XF24<sup>e</sup>. Después del aislamiento, las células fueron contadas y se agregaron 700 000 células en cada pozo de la microplaca, diluidas en 100 µL de medio DMEM suplementado con 10 % de FBS y 2 mM de L-glutamina. Cinco pozos por animal fueron usados. Después de 2 h de incubación a 37 °C, con CO<sub>2</sub>, las células fueron lavadas dos veces con medio XF suplementado con 25 mM de glucosa, 2 mM L-glutamina y 1 mM de piruvato de sodio, pH 7.4. Las células fueron incubadas durante una hora a 37 °C, sin CO<sub>2</sub> en un volumen final de 630 µL. Después de este tiempo, en cada pozo fueron inyectados 70 µL de 1 µM oligomicina, 75 µL de 1.5 µM FCCP y 85 µL de una mezcla de 1 µM antimicina-A con 100 nM rotenona. Los reactivos fueron precargados en un cartucho sensor del instrumento Agilent Seahorse XFe24, el cual fue pre hidratado con solución de calibración a 37 °C, en la noche previa al experimento. El volumen final de cada pozo fue 860 µL y 4 pozos blancos por cada microplaca fueron utilizados. El ciclo de medida consistió en 3 minutos de mezcla, 3 minutos de espera y dos minutos de medida de OCRs y ECARs. Fueron usados 4 ciclos para evaluar la línea base de OCR, 5 ciclos fueron utilizados para evaluar la OCR dependiente de ATP, 5 ciclos fueron usados para medir el OCR máximo y 3 ciclos fueron usados para evaluar la OCR dependiente de la mitocondria.

#### *Ensayos metabólicos en neuronas corticales primarias*

Las placas de cultivo celular Seahorse XF24<sup>e</sup> previamente cubiertas con poli-D-lisina estéril fueron usadas con 70.000 neuronas corticales primarias por pozo,

resuspendidas en 500  $\mu$ L de medio de cultivo. Después de 5 días desde el aislamiento, las células fueron tratadas con 0.5 and 1 mM de Piracetam (Sigma-Aldrich, P5295) por 24 horas y después de este tiempo las células fueron estresadas con 1 mM  $H_2O_2$  (Sigma-Aldrich, H1009) por 1 h. Seis grupos experimentales fueron obtenidos: S-P- (sin estrés, sin Piracetam), S-P+ (0.5 mM) [sin estrés, con 0.5 mM Piracetam], S-P+ (1 mM) [sin estrés, con 1 mM Piracetam], S+P- (con estrés, con Piracetam), S+P+ (0.5 mM) [con estrés, con 0.5 mM Piracetam], S+P+ (1 mM) [con estrés, con 1 mM Piracetam], y de 3 a 4 pozos por tratamiento fueron usados.

Después del tratamiento, las células fueron lavadas dos veces con medio XF tibio suplementado con 25 mM glucosa, 2 mM L-glutamina y 1 mM sodio piruvato, pH 7.4. Las células fueron incubadas por 1 h a 37 °C, sin  $CO_2$ , en un volumen final de 525  $\mu$ L. Después de este tiempo, en cada pozo fueron inyectados 75  $\mu$ L de 1  $\mu$ M oligomicina, 75  $\mu$ L de 1  $\mu$ M FCCP y 75  $\mu$ L de una mezcla de 1  $\mu$ M antimicina-A con 1  $\mu$ M rotenona. Los reactivos fueron precargados en un cartucho sensor Agilent Seahorse XFe24, el cual fue pre hidratado con solución de calibración a 37 °C, la noche antes del experimento. El volumen final de cada pozo fue 750  $\mu$ L y 4 pozos blanco para cada microplaca fueron usados. El ciclo de medida consistió en 3 minutos de mezcla, 3 minutos de espera y 2 minutos de medida de OCRs and ECARs. Fueron usados 4 ciclos para evaluar la línea base de OCRs, 5 ciclos fueron usados para evaluar la OCR dependiente de ATP, 5 ciclos fueron usados para medir el OCR máximo y 3 siglos para evaluar la OCR dependiente de la mitocondria.

## ENSAYOS DE WESTERN BLOT

El tejido del cerebro fue homogeneizado en solución amortiguadora RIPA fría (150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 0.5 % Sodio Deoxicholate, 0.1 % SDS, 50 mM Tris Base, 2 mM PMSF, pH 8) y los restos de tejido fueron removidos por centrifugación

del lisato a 19,000 g por 20 min a 4 °C. Aproximadamente 20 µg de proteína total del sobrenadante resultante fue electroforizada en un gel al 12 % de SDS-PAGE, a 100 V, usando un sistema de minigel Biorad. Las proteínas fueron subsecuentemente transferidas del gel de agarosa a las membranas PVDF en condiciones semisecas usando un aparato de transferencia semiseco (Biorad). Posteriormente, las membranas PVDF fueron bloqueadas en leche diluida al 4 % en 1X TBST (19.8 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.05 % Tween-20, pH 7.6), lavadas en 1X TBST, e incubadas por 12 h con el anticuerpo primario: DJ-1 (Abcam, anticuerpo de conejo anti-PARK7/DJ1 [EP2815Y], ab76008, 1:5000, 23 kDa), SOD1 (Abcam, anticuerpo de conejo anti-SOD1, ab16831, 1:2000, 17 kDa), SOD2 (Abcam, anticuerpo de conejo anti-SOD2/MnSOD, ab13533, 1:5000, 25 kDa), CAT (Abcam, anticuerpo de conejo anti-CAT, ab16731, 1:2000, 55 kDa), BDNF (Abcam, anticuerpo de conejo anti-BDNF [EPR1292], ab108319, 1:500, 14 and 28 kDa), TOM20 (Santa Cruz Biotechnology, anticuerpo de conejo anti-TOM20 (FL-145), sc11415, 1:500, 17 kDa). Como control interno fue usada β-tubulina (Abcam, anticuerpo de ratón Anti-β-Tubulina [1E1-E8-H4], ab131205, 1:5000, 50 kDa). Después, las membranas PDVF fueron incubadas con su respectivo anticuerpo secundario de peroxidasa de rábano (HRP)-conjugada (Invitrogen, anticuerpo de cabra anti- IgG de conejo, 65-6120, e Invitrogen anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón, 62-6520) por 2 h a temperatura ambiente (25 °C), y finalmente analizados por detección quimioluminiscente (ChemiDoc™ MP Imaging System (170-8280), Bio-Rad).

Se llevó a cabo un análisis densitométrico de bandas inmunoreactivas para todas las réplicas de cada marcador de proteína de interés usando NIH ImageJ 1.50i software (Bethesda, MD) como se ha publicado previamente (Das Banerjee *et al.*, 2017). La densidad integrada para cada banda fue normalizada por β-tubulina.

## ENSAYO DE INMUNOFLUORESCENCIA

El inmunoetiquetado indirecto de cortes de cerebro fue realizado de acuerdo a publicaciones previas (Das Banerjee *et al.*, 2017) con las siguientes modificaciones menores. Brevemente, los hemisferios cerebrales izquierdos de ratas estresadas y no estresadas fueron fijados con formaldehído al 4 % (PFA, w/v), deshidratadas usando solución de sucrosa al 30 %, integrada en una mezcla de OCT con solución de sucrosa al 30 %, congelada a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  y posteriormente seccionada utilizando un criostato (Leica CM1510-S). Los cortes de cerebro de  $12\text{ }\mu\text{m}$  de la SN (las coordenadas estereotáxicas de (Paxinos and Watson, 2007)) fueron: 2.88 mm a 4.32 mm de la línea interaural y -6.12 mm a -4.64 mm del bregma, y fueron colectados en láminas de vidrio precubiertas (Superfrost Plus Gold Microscope Slides, Fisher Scientific) y, finalmente, almacenados a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Después del bloqueo con albúmina sérica de bovino (BSA) al 5 % durante 30 minutos, el tejido de cerebro fue incubado por 2 h con el anticuerpo anti-tirosina hidroxilasa (TH) (Thermo Fisher Scientific P21962, 1:200). Posteriormente, los cortes de cerebro fueron lavados con 1X PBST y después incubados con anticuerpo secundario (Alexa Fluor 647, cabra anti-IgG de conejo, 1:1000). Finalmente, los núcleos fueron visualizados por la exposición de los cortes de cerebro al ácido nucleico 4',6-diamidino-2-fenilindole dihidrocloruro (DAPI), mezclado en una solución de glicerol al 70 % en una concentración final de  $1.25\mu\text{g}/\text{mL}$ . Los cortes de cerebro fueron entonces cubiertos y las imágenes fueron obtenidas usando un sistema EVOS-FL Cell Imaging System (Life Technologies) con un objetivo 4X. Las imágenes obtenidas fueron analizadas usando el software ImageJ 1.50i.

La densidad integrada fue normalizada al número total de células en el SN basado por el marcaje DAPI. La relación de la densidad integrada de TH por el número de núcleos es utilizada para evaluar la neurodegeneración de las neuronas viables del cerebro medio, como se ha publicado previamente (Callio, Oury and Chu, 2005; Xavier *et al.*, 2005; Giguère *et al.*, 2019). También es importante mencionar que el

SN completo fue analizado incluyendo el SN *pars compacta*, SN *pars reticulata* y SN *pars lateralis* como un método validado para evaluar la neurodegeneración de las neuronas dopaminérgicas en modelos con PD, como se ha publicado con anterioridad (Mulcahy *et al.*, 2012; Dave *et al.*, 2014; Kozina *et al.*, 2014; Salvatore *et al.*, 2019).

## ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN PBMCS, EN CEREBRO E HÍGADO

### *Preparación de muestras*

Las muestras fueron homogeneizadas (peso/volumen 1:10) en solución amortiguadora fría de fosfato 50 mM (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), pH 7.4, con 1 % PMSF. Después de la homogenización, las muestras fueron sonicadas 3 veces durante 30 segundos, con un minuto de pausa entre cada una, siempre sobre hielo. Cada muestra fue separada en dos tubos Eppendorf: un tubo fue centrifugado a 50 xg por 20 min a 4 °C (para ensayo de la actividad de CAT) y el otro tubo fue centrifugado a 20 000 xg por 30 min a 4 °C (para ensayos de la actividad de SOD, GST, GPx, GR). En ambos casos, el sobrenadante fue guardado a -80 °C hasta su uso (Mejia-Carmona *et al.*, 2014, 2015).

La actividad enzimática fue medida por espectrofotometría usando un lector de microplaca FLUOstar Omega (BMG) para placas de 96 pozos. Los ensayos se realizaron para establecer la concentración de proteínas en la muestra que se ajusta para cada curva blanco, y 0.13 mg/mL de proteína total fue considerada para cada ensayo. Para las muestras de hígado, los datos fueron normalizados por el peso del tejido húmedo. El volumen de la muestra ( $V_{muestra}$ ) fue calculado usando la siguiente fórmula:

$$V_{muestra} = \frac{(C_{esperada})(V_{final})}{C_{proteína\ total}}$$

Donde  $C_{esperada}$  es la concentración ideal de proteína considerada siempre 0.13 mg/mL,  $V_{final}$  representa el volumen final en el pozo y  $C_{proteína\ total}$  representa la concentración total de proteína de la muestra cuantificada usando el método de Bradford.

En el presente estudio, fueron evaluadas algunas de las principales enzimas que están directamente implicadas en la defensa antioxidante de la célula (Fig. 4): superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión S-transferasa (GST), glutatión peroxidasa (GPx) and glutatión reductasa (GR).

#### *Ensayo de actividad de superóxido dismutasa (SOD)*

El método está basado en la disponibilidad del pirogalol para la auto oxidación, capturando el radical superóxido a pH 8.2, desarrollando un color amarillo, el cual puede ser detectado espectrofotométricamente. SOD elimina los radicales del medio e inhibe la oxidación del pirogalol (Mejia-Carmona *et al.*, 2015).

#### Ensayo de actividad de SOD total

La actividad total de SOD fue medida usando como medio oxidante 50 mM TrisHCl y 1 mM ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), pH 8.2, y fue agregada 0.13 mg/mL de proteína total de la muestra. Finalmente, una solución de pirogalol fue automáticamente inyectada por el lector de microplaca, alcanzando una concentración final de 4 mM en un volumen total de 300  $\mu$ L (como se muestra en la Tabla 7) y la medida cinética fue obtenida a 450 nm (40 ciclos, 20 seg cada ciclo, a 37 °C).

**Tabla 7. Volúmenes de las soluciones usadas en cada pozo del blanco y muestra, en los ensayos SOD total.**

|         | <b>Medio oxidante</b> | <b>Pirogalol</b> | <b>Muestra</b>       | <b>H<sub>2</sub>O</b>        |
|---------|-----------------------|------------------|----------------------|------------------------------|
| Blanco  | 200 µL                | 20 µL            | -                    | 80 µL                        |
| Muestra | 200 µL                | 20 µL            | V <sub>muestra</sub> | 80 µL - V <sub>muestra</sub> |

Ensayo de actividad de SOD mitocondrial (SOD2)

La actividad de la SOD mitocondrial (SOD2) fue medida usando el mismo medio oxidante (50 mM TrisHCl y 1 mM DTPA, pH 8.2) pero también fueron agregados 110 mM de cianida de sodio (NaCN) para inhibir la actividad específica del SOD citosólico (SOD1). 0.13 mg/mL de proteína total de cada muestra fueron agregados y finalmente, la solución de pirogalol fue automáticamente inyectada por el lector de microplaca alcanzando una concentración final de 4 mM en un volumen total de 300 µL (como se muestra en la Tabla 8) y la medida cinética fue obtenida a 450 nm (80 ciclos, 20 seg por ciclo, a 37 °C).

**Tabla 8. Volúmenes de las soluciones usadas en cada pozo del blanco y muestra, en los ensayos SOD2.**

|         | <b>Medio oxidante</b> | <b>Pirogalol</b> | <b>NaCN</b> | <b>Muestra</b>       | <b>H<sub>2</sub>O</b>        |
|---------|-----------------------|------------------|-------------|----------------------|------------------------------|
| Blanco  | 200 µL                | 20 µL            | 3 µL        | -                    | 77 µL                        |
| Muestra | 200 µL                | 20 µL            | 3 µL        | V <sub>muestra</sub> | 77 µL - V <sub>muestra</sub> |

Una unidad del SOD fue considerada como la concentración de enzima usada para inhibir 50 % de autooxidación de pirogalol. El porcentaje de oxidación de pirogalol inhibida por la enzima (% inhibición) fue determinada usando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{(Abs_{blanco} - Abs_{muestra}) \times 100}{Abs_{blanco}}$$

Donde  $Abs_{blanco}$  representa la absorbancia obtenida del pozo blanco y  $Abs_{muestra}$  representa la absorbancia obtenida de la muestra en el pozo.

Posteriormente, la actividad enzimática específica del SOD total y SOD2 fue calculada usando la siguiente ecuación:

$$\frac{U_{SOD}}{proteina (mg)} = \frac{\% inhibición}{50} \times \frac{V_{final}}{V_{muestra}} \times \frac{1}{C_{proteina total}}$$

#### Ensayo de actividad de SOD citosólico (SOD1)

La actividad enzimática específica de SOD1 fue calculada como la diferencia entre la actividad enzimática de SOD total y SOD2.

#### *Ensayo de actividad de catalasa (CAT)*

El método está basado en la capacidad de la CAT para disminuir la concentración de  $H_2O_2$  en el medio. Como medio oxidante fue usado 14 mM de  $H_2O_2$  (Sigma-Aldrich, H1009) en 0.1 M buffer de fosfato ( $K_2HPO_4$ ,  $KH_2PO_4$ ), pH 7.4, y 0.13 mg/mL de proteína total de la muestra fueron agregados en un volumen final de 220  $\mu$ L (como se muestra en la Tabla 9). La medida cinética fue obtenida a 240 nm (50 ciclos, 23 seg cada ciclo, a 37 °C) (Mejia-Carmona *et al.*, 2014).

**Tabla 9. Volúmenes de las soluciones usadas en cada pozo del blanco y muestra, en los ensayos CAT.**

|         | <b>Medio oxidante</b> | <b>Muestra</b> | <b>H<sub>2</sub>O</b>      |
|---------|-----------------------|----------------|----------------------------|
| Blanco  | 200 $\mu$ L           | -              | 20 $\mu$ L                 |
| Muestra | 200 $\mu$ L           | $V_{muestra}$  | 20 $\mu$ L - $V_{muestra}$ |

La actividad enzimática específica de CAT fue obtenida usando la siguiente ecuación:

$$\frac{U_{CAT}}{\text{proteína (mg)}} = \frac{\frac{Abs_{blanco} - Abs_{muestra}}{0.0394} \times 1000 \times \frac{V_{final}}{C_{muestra}}}{C_{proteína\ total}}$$

Dónde  $Abs_{blanco}$  representa la absorbancia obtenida de los pozos blanco,  $Abs_{muestra}$  representa la absorbancia obtenida de la muestra en el pozo,  $V_{final}$  representa el volumen final en el pozo,  $C_{muestra}$  representa la concentración de proteína en la muestra y  $0.0394 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  representa el coeficiente de extinción molar del  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

#### *Ensayo de actividad de glutatión S-transferasa (GST)*

El método está basado en la capacidad del glutatión para combinarse con 1-cloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) formando el complejo glutatión-CDNB. Se usaron dos soluciones como sustrato. La primera, con 0.1 M CDNB (Sigma, 237329) en 99 % metanol fue diluida en una solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), pH 6.5, para obtener una solución final de 2.25 mM CDNB. En segundo término, 2.25 mM de una solución de glutatión reducida (GSH, 98 %, Sigma-Aldrich, G4251) fue preparada en solución amortiguadora de fosfato 0.1 M buffer ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), pH 6.5. Finalmente, ambas soluciones fueron combinadas y se obtuvo 1.125 mM de solución de sustrato. 0.13 mg/mL de proteína total de la muestra diluida en 25  $\mu\text{L}$  fueron agregados sobre la solución sustrato en un volumen final de 225  $\mu\text{L}$  (como se muestra en la Tabla 10). Las medidas cinéticas fueron obtenidas a 340 nm (90 ciclos, 26 seg por ciclo, a 37 °C) (Mejia-Carmona *et al.*, 2015).

**Tabla 10. Volúmenes de las soluciones usadas en cada pozo del blanco y muestra, en los ensayos GST.**

|         | <b>Solución de sustrato</b> | <b>Muestra</b>       | <b>H<sub>2</sub>O</b>        |
|---------|-----------------------------|----------------------|------------------------------|
| Blanco  | 200 µL                      | -                    | 25 µL                        |
| Muestra | 200 µL                      | V <sub>muestra</sub> | 25 µL - V <sub>muestra</sub> |

La actividad enzimática específica de GST fue obtenida usando la siguiente ecuación:

$$\frac{U_{GST}}{\text{proteína (mg)}} = \frac{(Abs_{muestra} - Abs_{blanco}) \times 0.82549 \times \frac{V_{final}}{C_{muestra}}}{C_{proteína\ total}}$$

Donde Abs<sub>blanco</sub> representa la absorbancia obtenida de los pozos blanco, Abs<sub>muestra</sub> representa la absorbancia obtenida de la muestra en el pozo, V<sub>final</sub> representa el volumen final en el pozo, C<sub>muestra</sub> representa la concentración de proteína de la muestra y 0.82549 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> representa el coeficiente de extinción molar del complejo GS-CDNB.

#### *Ensayo de actividad de glutatión reductasa (GR)*

La glutatión reductasa transforma el glutatión oxidado (GSSG) en dos moléculas de glutatión reducido (GSH), como se muestra en la Fig. 4.

Este método está basado en la medición de la oxidación NADPH, como se ha mostrado previamente, con pocas modificaciones (Weiss, Maker and Lehrer, 1980).

Fueron preparadas soluciones al momento: 20 mM GSSG (Abcam, ab141393) diluido en agua destilada y 2 mM NADPH (Sigma-Aldrich, N5130) diluido en 10 mM TrisHCl, pH 7. Como medio oxidante fue usado 0.1 M de solución amortiguadora

de fosfato ( $K_2HPO_4$ ,  $KH_2PO_4$ ) con 2 mM EDTA, pH 7.4. Todas las soluciones fueron agregadas en cada pozo como se muestra en la Tabla 11, en un volumen final de 300  $\mu$ L; la solución NADPH fue la última en ser agregada. La medida cinética fue obtenida a 340 nm (50 ciclos, 23 seg cada ciclo, a 30 °C).

**Tabla 11. Volúmenes de las soluciones usadas en cada pozo del blanco y muestra, en los ensayos GR.**

|         | <b>Medio oxidante</b> | <b>NADPH</b> | <b>GSSG</b> | <b>Muestra</b> | <b>H<sub>2</sub>O</b>      |
|---------|-----------------------|--------------|-------------|----------------|----------------------------|
| Blanco  | 200 $\mu$ L           | 20 $\mu$ L   | 20 $\mu$ L  | -              | 60 $\mu$ L                 |
| Muestra | 200 $\mu$ L           | 20 $\mu$ L   | 20 $\mu$ L  | $V_{muestra}$  | 60 $\mu$ L - $V_{muestra}$ |

*Ensayo de actividad de glutatión peroxidasa (GPx)*

La glutatión peroxidasa transforma moléculas de GSH en el GSSG como se muestra en Fig. 4. Este método está basado en la medida de la desaparición de NADPH, como se ha mostrado previamente, con pocas modificaciones (Weiss, Maker and Lehrer, 1980).

Fueron preparadas en el momento soluciones de sustrato conteniendo: 1.4 U glutatión reductasa (Roche, 10105678001), 1 mM GSH, 0.2 mM NADPH, 0.5 mM  $H_2O_2$  (Sigma-Aldrich, H1009) y 1 mM NaCN diluido en búfer de fosfatos 0.1 M ( $K_2HPO_4$ ,  $KH_2PO_4$ ) con 2 mM EDTA, pH 7.4. La solución sustrato y la muestra fueron agregados en cada pozo como se muestra en la Tabla 12, en un volumen final de 300  $\mu$ L. La medida cinética fue obtenida a 340 nm (50 ciclos, 23 seg cada ciclo, a 30 °C).

Tabla 12. Volúmenes de las soluciones usadas en cada pozo del blanco y muestra, en los ensayos GPx.

|         | Solución de sustrato | Muestra              | H <sub>2</sub> O                  |
|---------|----------------------|----------------------|-----------------------------------|
| Blanco  | 250 $\mu$ L          | -                    | 50 $\mu$ L                        |
| Muestra | 250 $\mu$ L          | V <sub>muestra</sub> | 50 $\mu$ L - V <sub>muestra</sub> |

### ENSAYO SR- $\mu$ FTIR

Las medidas de SR- $\mu$ FTIR se llevaron a cabo en el ESRF de Grenoble, Francia. Se utilizó un microscopio Thermo Nicolet Continuum IR microscope (Thermo Scientific, Madison, WI, USA) equipado con un objetivo 32x acoplado a un espectrómetro Thermo Nicolet Nexus FTIR (Thermo Scientific, Madison, WI, USA) usando una fuente IR sincrotrón. El microscopio IR fue enfriado con nitrógeno líquido con 50  $\mu$ m de mercurio, cadmio y telurio en el detector. Los espectros fueron colectados en el intervalo 4000 – 800  $\text{cm}^{-1}$  (Fig. 18), con un tamaño de haz de 8 X 8  $\mu\text{m}^2$ , examinado a 6  $\text{cm}^{-1}$  de resolución y obtenido con un promedio de 256 barridos. 10  $\mu$ L de muestra fueron colocados en láminas de BaF<sub>2</sub> con 1 mm de altura y se permitió el secado a temperatura ambiente. Se llevaron a cabo dos mapeos para cada muestra (cada mapa contuvo de 2 a 3 células) y para cada mapa fueron obtenidos 21 espectros de puntos aleatorios (Vargas-Caraveo *et al.*, 2014).

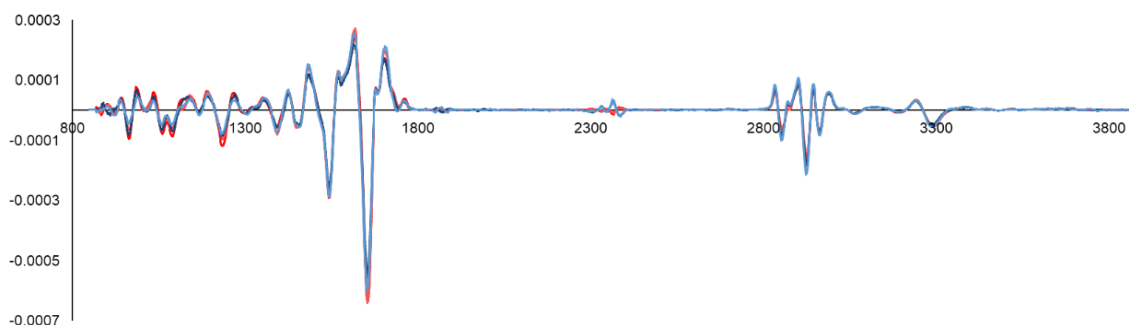


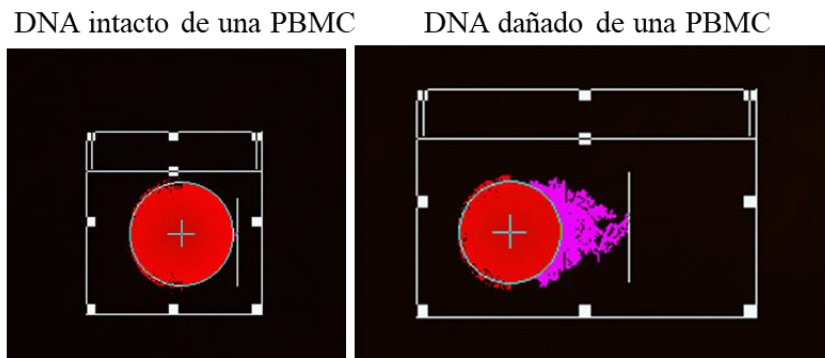
Figura 18. Promedio total de los espectros SR- $\mu$ FTIR en segunda derivada. Bandas rojas: grupos estresados; bandas azules: grupos no estresados.

## ENSAYO COMETA

El daño de DNA en PBMCs inducido por estrés psicológico fue estudiado por ensayo cometa, método basado en la microelectroforesis del contenido de DNA de las células (Nandhakumar *et al.*, 2011).

Sobre una laminilla de microscopio fueron agregados 300  $\mu$ L de 1.5 % de gel de agarosa a 100 °C y después fue cubierta con cubreobjetos para una distribución uniforme. Después de 5 minutos a 4 °C, el cubreobjetos fue removido, y la laminilla fue secada a 50 °C durante aproximadamente 15 minutos en una estufa. Las células fueron mezcladas con 400  $\mu$ L de 0.5 % de agarosa gelificada a 37 °C, colocados sobre el primer gel sobre la laminilla y de nuevo la laminilla fue cubierta con un cubreobjetos para una distribución uniforme. Después de 20 minutos a 4 °C, el cubreobjetos fue removido y la laminilla fue sumergida en una solución de lisis (137 mM NaCl, 2.7 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 10) por 1 h a 4 °C. Posteriormente, la laminilla fue colocada en una cámara de electroforesis horizontal y dejada para equilibrar en el buffer de electroforesis (300 mM NaOH, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 13), por 20 minutos, a 4 °C, en la oscuridad. Posteriormente, la laminilla fue secada a temperatura ambiente por 10 minutos, protegida de la luz y lavada 3 veces con un buffer para neutralización (0.4 M Tris-HCl, pH 7.5), a 4 °C, 5 min cada vez. Después, la laminilla fue secada a temperatura ambiente por 20 minutos y deshidratada usando metanol puro por 5 minutos. Finalmente, las hebras de DNA fueron marcadas con 20  $\mu$ g/mL de solución de bromuro de etidio y las laminillas fueron cubiertas con cubreobjetos y analizadas usando un microscopio de epifluorescencia.

Tres laminillas por rata fueron preparadas, dos ratas por grupo fueron usadas y 100 células por rata fueron analizadas. Fueron evaluados los siguientes parámetros: el momento de cola oliva, longitud de cola, momento de cola y la cola de DNA, usando el software CaspLab (Fig. 19).



**Figura 19. Imagen representativa de DNA intacto y dañado de una PBMC visto y analizado usando CaspLab software.** El color rojo representa el núcleo de la célula (considerado la cabeza del cometa) y la parte rosa representa las hebras de DNA rotas (considerada la cola del cometa).

## ENSAYO DE CITOMETRÍA DE FLUJO

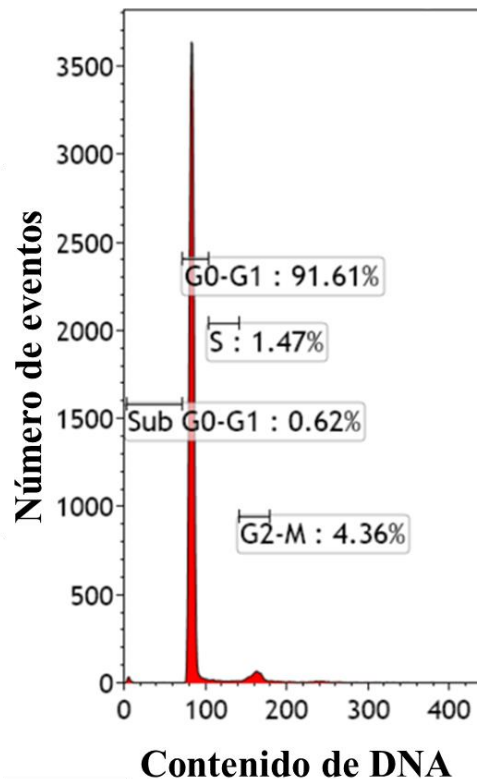
El ciclo celular y la energía mitocondrial en PBMCs fueron estudiados usando un citómetro de flujo Gallios (Beckman Coulter, Miami, FL, USA). Los datos fueron analizados usando el software Kaluza flow cytometry (Beckman Coulter) (Villanueva *et al.*, 2018).

### *Análisis de ciclo de PBMCs*

Las PBMCs fueron resuspendidas en 100  $\mu$ L de 1X PBS y 200  $\mu$ L de medio de aislamiento nuclear (NIM)-DAPI (NPE Systems, Inc. Pembroke Pines, and Beckman Coulter). La suspensión de células fue incubada por 3 minutos a temperatura ambiente. Después de este tiempo, el contenido de DNA fue analizado en 50 000 eventos por animal a 405 nm.

Los datos obtenidos se muestran como 4 puertas que representan el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular evaluado por el contenido de DNA Sub G0/G1 representa la población de células hipodiploides asociadas con una población apoptótica o células dañadas. La fase G0/G1 representa las células

diploides, en fase S están representadas las células hiperdiploides y en la fase G2/M son mostradas la población de células tetraploides (Fig. 20).



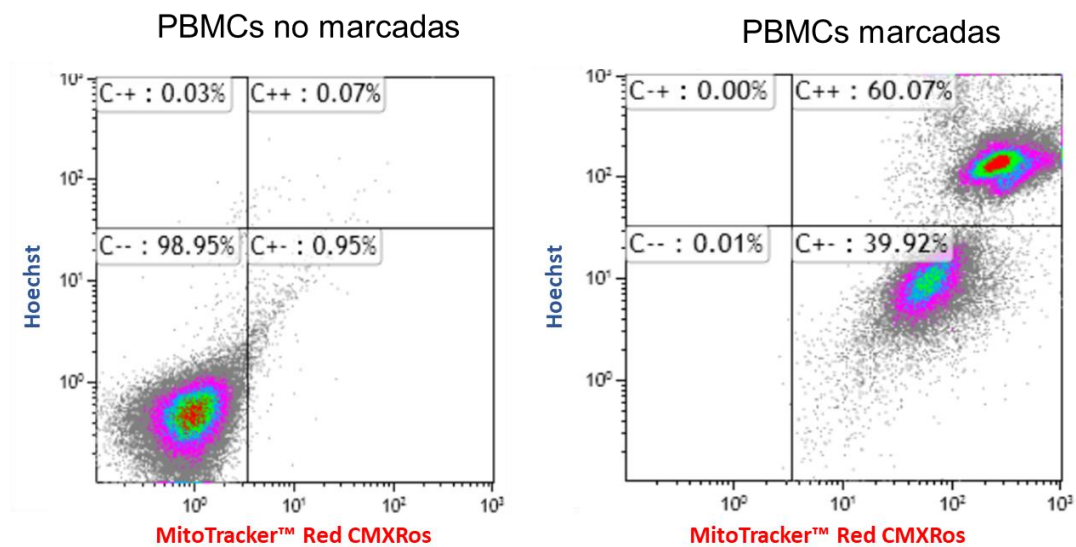
**Figura 20. Histograma representativo que muestra las 4 puertas cuales representan el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular evaluado por el contenido de DNA.** Sub G0/G1 representa la población celular hidiploide asociada con una subpoblación apoptótica. G0/G1 representa las células diploides, en la fase S son representadas las células hiperdiploides y en la fase G2/M se muestran las poblaciones celulares tetraploides.

#### *Análisis de mitocondria activa en PBMCs usando MitoTracker™ Red CMXRos*

Las PBMCs fueron resuspendidas en una solución conteniendo Hoechst 33342 (Thermo Scientific™, 62249) (1:1000) diluida en 1X PBS suplementado con 25 mM de Glucosa y 0.1 % BSA. Después de 30 min de incubación a 37 °C, se agregó MitoTracker™ Red CMXRos (Invitrogen™, M7512) con Hoechst 33342 (1:1000) diluido en 1X PBS con 25 mM de Glucosa y 0.1 % BSA, para una concentración

final de MitoTracker™ Red CMXRos de 100 nM. Después de 45 minutos de incubación a 37 °C y protegidas de la luz, las PBMCs fueron analizados a 579 nm en 50 000 eventos por animal. El MitoTracker™ Red CMXRos (Invitrogen, USA) fue disuelto en una solución de DMSO 1 mM y almacenado a -20 °C.

Los datos obtenidos representan el porcentaje de las células marcadas que fueron distribuidas en dos regiones: baja y alta fluorescencia de MitoTracker, la cual fue asociada a las células con baja o alta actividad mitocondrial (Fig. 21).



**Figura 21. Histograma representativo de dos parámetros representando las poblaciones de PBMCs con mitocondria activa** usando MitoTracker™ Red CMXRos (100 nM), un colorante catiónico fluorescente el cual se acumula en la mitocondria activa y Hoechst (1:1000), el cual provee un número estimado de células. En el primer histograma son representadas las células no marcadas. En el segundo histograma, las células marcadas fueron distribuidas en dos grupos: baja y alta fluorescencia de MitoTracker, el cual fue asociado con células con baja y alta actividad mitocondrial.

#### *Inducción de estrés en PBMCs in vitro usando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>*

Las PBMCs de ratas viejas fueron incubadas por una hora a 37 °C con 0.2 mM y 1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich, H1009), diluidas en 1X PBS suplementado con 25 mM de glucosa y 0.1 % BSA. Después de este periodo, las células fueron lavadas

una vez con 1X PBS, 800 g por 5 min. Posteriormente, el ciclo celular y la mitocondria activa fueron analizados.

#### ENSAYO DE ELISA PARA NIVEL DE CORTICOSTERONA EN PLASMA

Los niveles de corticosterona fueron medidos en plasma sanguíneo obtenido de ratas en el día de sacrificio vía punción intracardiaca y colectada en tubos vacutainer conteniendo 7.2 mg de EDTA-potasio ( $K_2EDTA$ ). La sangre fue centrifugada a 1000 x g por 10 min, a temperatura ambiente, y el plasma fue almacenado a  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  hasta que se requirió. El nivel de corticosterona en muestras de plasma fue medido usando un kit comercial de inmunoensayo enzimático.

En el estudio 1, fue usado el kit Cayman Corticosterone ELISA (Cayman chemical, Cat No. 501320; Ann Arbor, MI, USA), el cual tuvo un intervalo de detección de 8.2 – 5000 pg/mL y sensibilidad de 30 pg/mL. Las muestras fueron leídas a 412 nm usando un lector de microplaca (SpectraMax M3, Molecular Devices).

En el estudio 3, para medir el nivel de corticosterona en plasma en ratas tratadas con Piracetam, otro kit comercial de inmunoensayo enzimático fue usado siguiendo las instrucciones del proveedor (ALPco, Cat No. 55-CORMS-E01, Salem, NH). El intervalo de detección del kit es 6.1 to 2250 ng/mL. La absorbancia fue medida con un lector de microplaca FLUOstar Omega (BMG) a 450 nm.

#### CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES (ENSAYO DE BRADFORD)

El ensayo de Bradford fue usado para medir el contenido total de proteínas en el cerebro y muestras de PBMCs. Este método está basado en la capacidad de las moléculas de proteínas de enlazarse con el colorante azul brillante Coomassie G-250 resultando en un cambio de color de café a azul, identificado por espectrofotometría (Bradford, 1976).

En el presente estudio el reactivo de Bradford fue obtenido del Quick Start™ Bradford protein assay o preparado usando 10 % de azul brillante Coomassie Brilliant Blue G-250, 5 % de etanol y 10 % de ácido fosfórico. La curva de calibración fue realizada usando diluciones desde BSA de 1 mg/mL. La absorbancia fue medida con un lector de microplaca FLUOstar Omega (BMG) o SpectraMax M3, Molecular Devices, a 595 nm.

#### ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR (ALAMARBLUE® ASSAY)

El reactivo AlamarBlue (conteniendo principalmente resazurin, un compuesto no tóxico) es usado para estudiar la viabilidad celular y el método está basado en la capacidad de las células viables para convertir resazurin (color azul) a resorufin (color rojo) (Rampersad, 2012).

Para este ensayo fue usado el reactivo AlamarBlue™ Cell Viability Reagent (Invitrogen, DAL1025). En una microplaca de 96 pozos fueron cultivadas previamente 25.000 células/pozo diluidas en 100 µL de medio de cultivo de mantenimiento, en el cual fue añadido 10 µL/pozo de 10X de reactivo AlamarBlue. Las células fueron incubadas por 4 h a 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>. Después de este periodo, la absorbancia fue medida en un lector de microplacas (SpectraMax M3, Molecular Devices) a 570 nm, en diferentes intervalos de tiempo.

#### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos de comportamiento, resultados de actividad enzimática, datos de ensayo cometa, datos de citometría de flujo, datos de peso corporal y de glándulas adrenales son expresados como el promedio ± SEM y fueron analizados empleando prueba de t de Student (dos colas). Para comparaciones por parejas, usando el software GraphPad Prism (version 6.0), los valores de p menores que 0.05 fueron considerados estadísticamente significantes. Para analizar el

comportamiento de la prueba del laberinto en cruz elevado y el nivel de corticosterona en plasma fueron usados diagramas box plot con media e intervalo de intercuartil. Cada caja muestra el valor del percentil 50<sup>th</sup>, la línea horizontal es el valor medio y las barras indican los valores máximo y mínimo.

Los datos de WB están expresados como la media  $\pm$  SD de al menos 3 experimentos independientes y fueron analizados empleando la prueba t de Student (dos colas) por comparación de parejas.

Para los ensayos metabólicos fueron usadas comparaciones de grupos múltiples y fueron realizadas empleando ANOVA de dos vías seguido por prueba de Tukey con corrección de Bonferroni; para ello se usó GraphPad Prism software (version 6.0), los valores de p menores de 0.05 fueron considerados estadísticamente significantes.

Los espectros de absorbancia FTIR fueron normalizados usando una normalización unitaria de vector y fue convertido en su segunda derivada con el algoritmo de Savitzky-Golay con 15 puntos de ventana y un segundo orden polinomial usando Unscrambler X 10.3 (Camo). Así mismo, fue empleado Unscrambler X 10.3 (Camo) para realizar un análisis de componentes principales (PCA) de los espectros. Herramientas estadísticas de Excel (Office 2016) como el promedio, error estándar y prueba de t fueron usadas para analizar la segunda derivada normalizada del espectro y los diagramas de box plot con mediana e intervalos intercuartiles fueron usados para analizar las relaciones lipídicas.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### COMPORTAMIENTO Y FUNCIÓN MOTRIZ

**Hipótesis:** El estrés psicológico y la falta de PINK1 altera el comportamiento y la función motriz de ratas hembra y macho.

**Objetivos:**

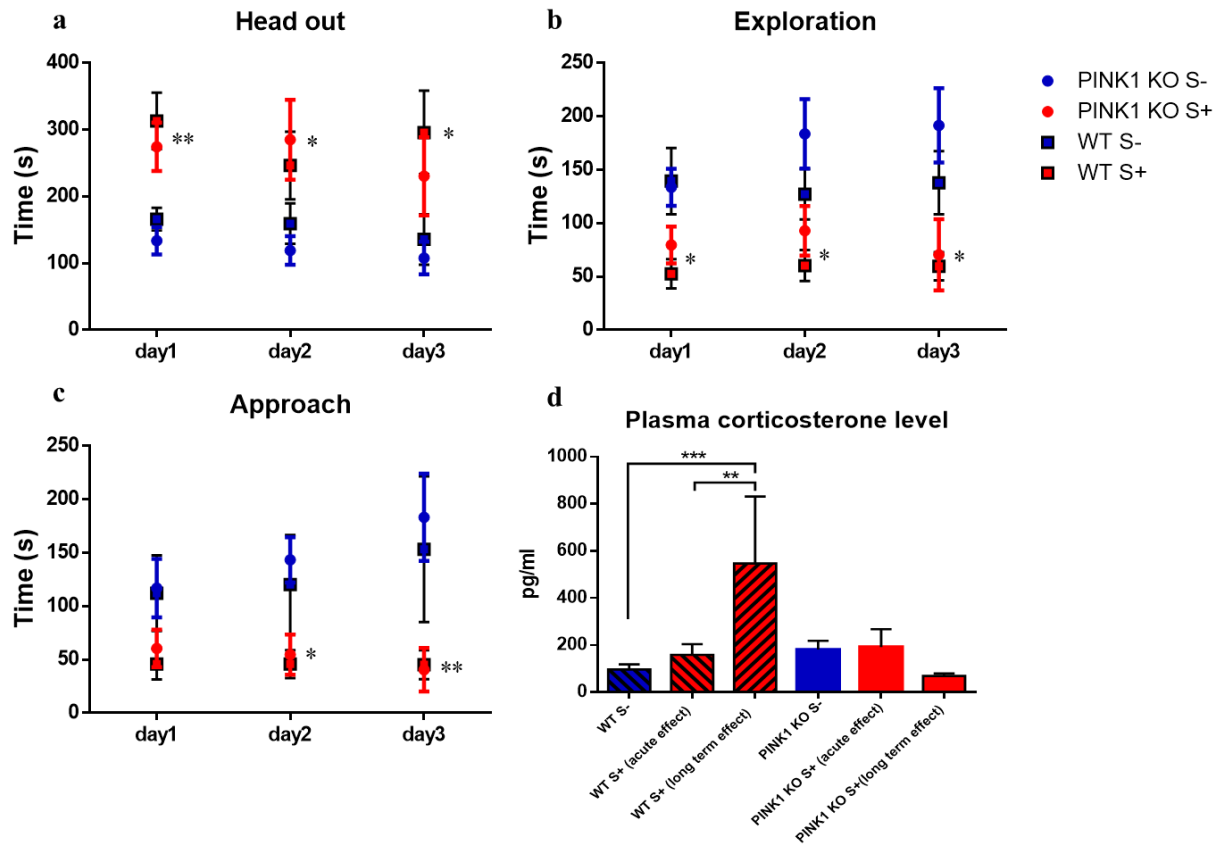
- Evaluar el comportamiento de ratas hembra y macho WT y PINK1-KO mientras son expuestas a estrés psicológico usando la prueba de evitamiento de olor por ocultamiento.
- Evaluar el efecto agudo y a largo plazo del estrés psicológico sobre el comportamiento y función motriz de ratas hembra y macho WT y PINK1-KO usando la prueba de evitamiento de olor por ocultamiento, prueba de rotarod, prueba de fuerza de agarre y prueba de la barra transversal.
- Evaluar el efecto del estrés psicológico agudo y a largo plazo en niveles de corticosterona en plasma de ratas hembra y macho WT y PINK1-KO.
- Evaluar la función motriz de ratas PINK1-KO de 7 meses de edad usando pruebas de fuerza de agarre y prueba de la barra transversal.

**Resultados and discusión:**

El estrés psicológico inducido por orina de gato induce ansiedad. Las ratas estresadas WT y PINK1-KO exploraron significativamente menos (tiempo de exploración), sacaron la cabeza afuera de la caja obscura como una posición de defensa (tiempo con la cabeza afuera), y se aproximaron a la tela impregnada con orina de gato significativamente menos (aproximación) comparadas con ratas WT no estresadas (Fig. 22a, Fig. 22b and Fig. 22c). No se observaron diferencias

significativas relacionadas al sexo en las pruebas del comportamiento en respuesta a exposición al estrés (día 1 a día 3). Este comportamiento de ansiedad duró una semana después de la exposición al estresor, ya que las ratas invirtieron casi el doble de tiempo en una posición defensiva (Fig. 23a), lo que muestra que este modelo de estrés tiene efectos negativos a largo plazo. Además, la falta de PINK1 no alteró el desempeño en la prueba de evitamiento de olor por ocultamiento (Fig. 22, 23a). Estudios previos mostraron que las ratas PINK1-KO exhibieron un comportamiento ansioso en las pruebas de campo abierto realizadas a los 4 meses de edad (Dave *et al.*, 2014).

Adicionalmente, las ratas WT estresadas psicológicamente mostraron un incremento en el nivel de corticosterona en plasma inmediatamente después del estrés, pero no significativo. El nivel de esta hormona incrementó significativamente una semana después de la exposición al estrés. Las ratas estresadas PINK1 KO mostraron un incremento no significativo en la concentración de corticosterona en plasma (Fig. 22d), presumiblemente se debió a que tienen el eje HPA desacoplado como lo han mostrado estudios previos (Agnihotri *et al.*, 2019; Creed *et al.*, 2019). Incluso, se observó que no existen diferencias significativas de género en el nivel de corticosterona en plasma, tanto en ratas WT como PINK1-KO.

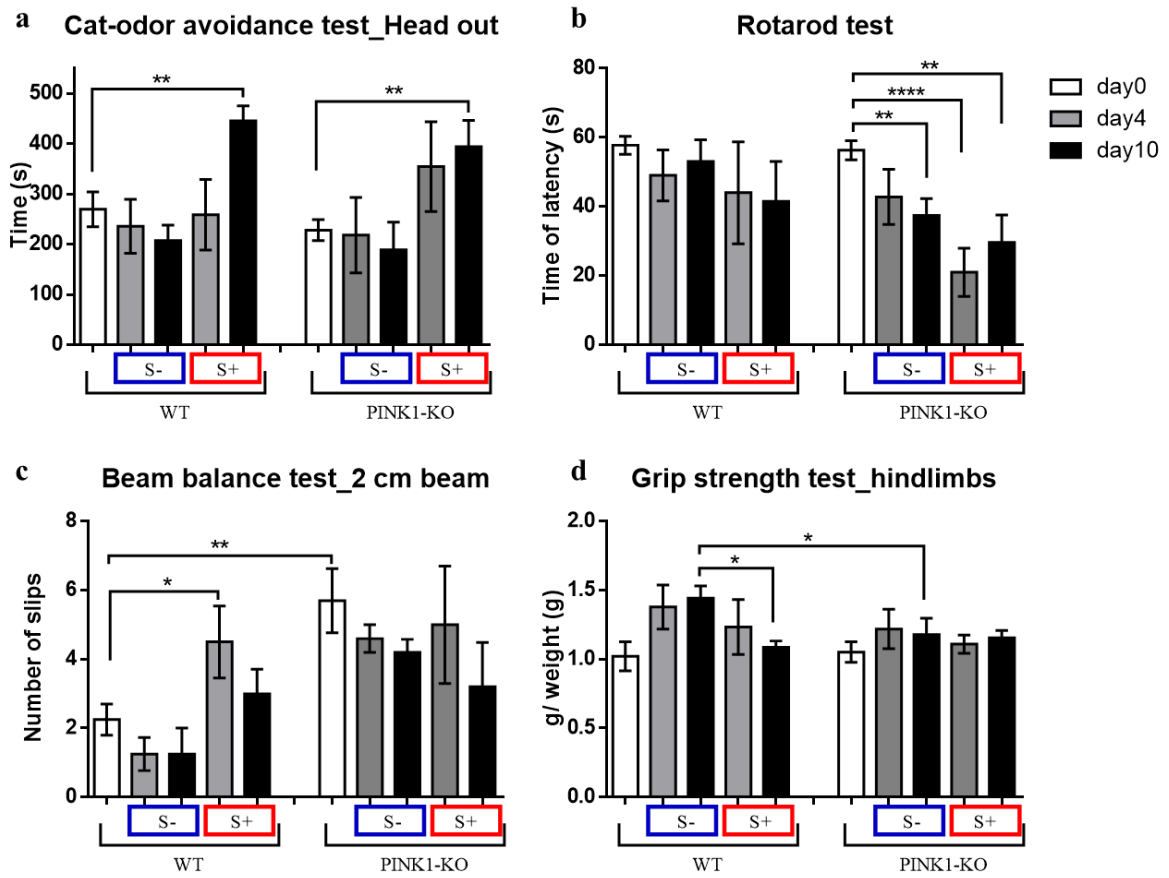


**Figura 22. Análisis de comportamiento en ratas WT y PINK1-KO y nivel de corticosterona en plasma** **a)** Tiempo estado en la posición con la cabeza afuera (comportamiento de alerta), para el día 1:  $**p \leq 0.01$ , WT S+ comparado con WT S- y PINK1-KO S+ comparado con PINK1-KO S-; para el día 2:  $*p \leq 0.05$ , PINK1-KO S+ comparado con PINK1-KO S-; para día 3:  $*p \leq 0.05$ , WT S+ comparado con WT S-. **b)** Tiempo de exploración en la parte abierta de la caja claro/oscuro (exploración),  $*p \leq 0.05$ , WT S+ comparado con WT S- and PINK1-KO S+ comparado con PINK1-KO S-. **c)** Tiempo de examinación de la pieza de algodón impregnada (o no) con orina de gato (aproximación),  $*p \leq 0.05$ ,  $**p \leq 0.01$ , PINK1-KO S+ comparado con PINK1-KO S-.  $n = 10$  por grupo. Los datos son expresados como la media  $\pm$  SEM. Prueba t desapareada; **d)** Nivel de corticosterona en plasma en ratas macho y hembra,  $n = 4-10$  por grupo. Los datos son expresados como la media  $\pm$  SEM.  $**p \leq 0.01$ ,  $***p \leq 0.001$ . Color rojo: grupos estresados; color azul: grupos no estresados.

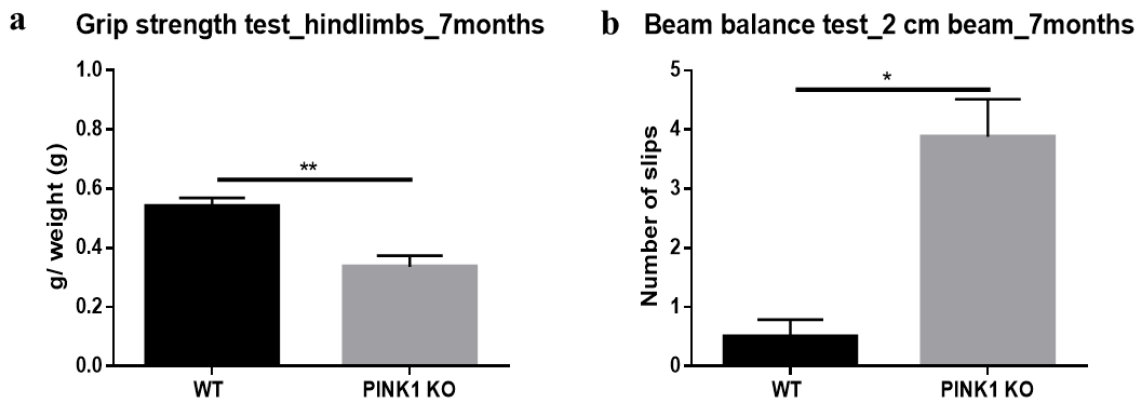
Estudios previos han mostrado que la implicación de cortisol o corticosterona en la patología de PD es controversial. Altos niveles de estas hormonas han sido asociados con la evolución de la disfunción motriz (Smith *et al.*, 2008) y discapacidad cognitiva (Lara *et al.*, 2013). Pacientes con PD mostraron un aumento (Hartmann *et al.*, 1997) o disminución (Bellomo *et al.*, 1991) del nivel de

cortisol en plasma, incluso un incremento del cortisol salival (Djamshidian *et al.*, 2011), o ninguna relación ha sido encontrada entre estos dos (Volpi *et al.*, 1997). Estudios recientes mostraron que la deficiencia de PINK1 induce alteración de la integridad del eje HPA, ya que los ratones PINK1-KO estresados no exhiben cambios en el nivel sérico de corticosterona, pero los receptores de glucocorticoides en el HC disminuyeron significativamente dos semanas posteriores a la exposición al estrés (Agnihotri *et al.*, 2019). Además, las ratas PINK1-KO mostraron dopamina alterada y niveles de glutamato y acetilcolina en striatum después de 4 meses de edad (Creed *et al.*, 2019).

Inesperadamente, las ratas PINK1-KO mostraron deficiencias motrices (Fig. 23), patología que nunca había sido observada en edades jóvenes. De hecho, se observó una reducción significativa del desempeño motriz (~30%) (Fig. 23b), coordinación motriz fina y equilibrio (Fig. 23c) y fuerza en las extremidades traseras (Fig. 23d) en ratas PINK1-KO jóvenes, de manera similar como fue reportado previamente para ratas PINK1-KO de 7 meses de edad (Fig. 24). Adicionalmente, las ratas PINK1-KO estresadas exhibieron casi un 50 % de reducción en el desempeño de la prueba rotarod, sugiriendo que el estrés exacerba los síntomas parkinsonianos. Por otro lado, el estrés psicológico induce una ligera disminución en el desempeño de las ratas WT en la prueba rotarod (Fig. 23b). Sin embargo, el estrés psicológico induce una disminución significativa en la fuerza de agarre de las extremidades traseras en ratas WT (Fig. 23d) y un declive de la coordinación motriz fina y el equilibrio fue evidente por el incremento del tiempo de cruce (datos no mostrados) y un incremento en el número de resbalones sobre la viga de 2 cm (Fig. 23c). El estrés psicológico no produjo cambios significativos en la fuerza de las extremidades anteriores (datos no mostrados).



**Figura 23. Deficiencia motriz y comportamiento de ansiedad en ratas WT y PINK1-KO.** a) tiempo invertido en posición de alerta (tiempo con la cabeza afuera; b) tiempo de latencia para caer en el aparato rotarod acelerado; c) número de resbalones de los extremidades posteriores en la viga de equilibrio de 2 cm; d) fuerza de agarre de extremidades posteriores, en machos antes de la exposición al estrés (día 0), después de la exposición al estrés (día 4) y después de 7 días de reposo (día 10), n = 4-5 por grupo. Datos en medias  $\pm$  SEM. \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , test t no pareado. Color rojo: grupos estresados; color azul: grupos no estresados.



**Figura 24. Disfunciones motrices severas en ratas PINK1-KO de 7 meses de edad. a)** fuerza de agarre de extremidades posteriores; **b)** número de resbalones de extremidades posteriores en la viga de equilibrio de 2 cm, n = 8 ratas WT y 15 ratas PINK1-KO. Datos en medias  $\pm$  SEM. \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , test t no pareado.

## ANÁLISIS DE ENERGÍA DEL METABOLISMO EN EL CEREBRO DE RATAS

**Hipótesis:** El estrés psicológico y la deficiencia de PINK1 alteran la energía del metabolismo en el cerebro de ratas.

### Objetivos:

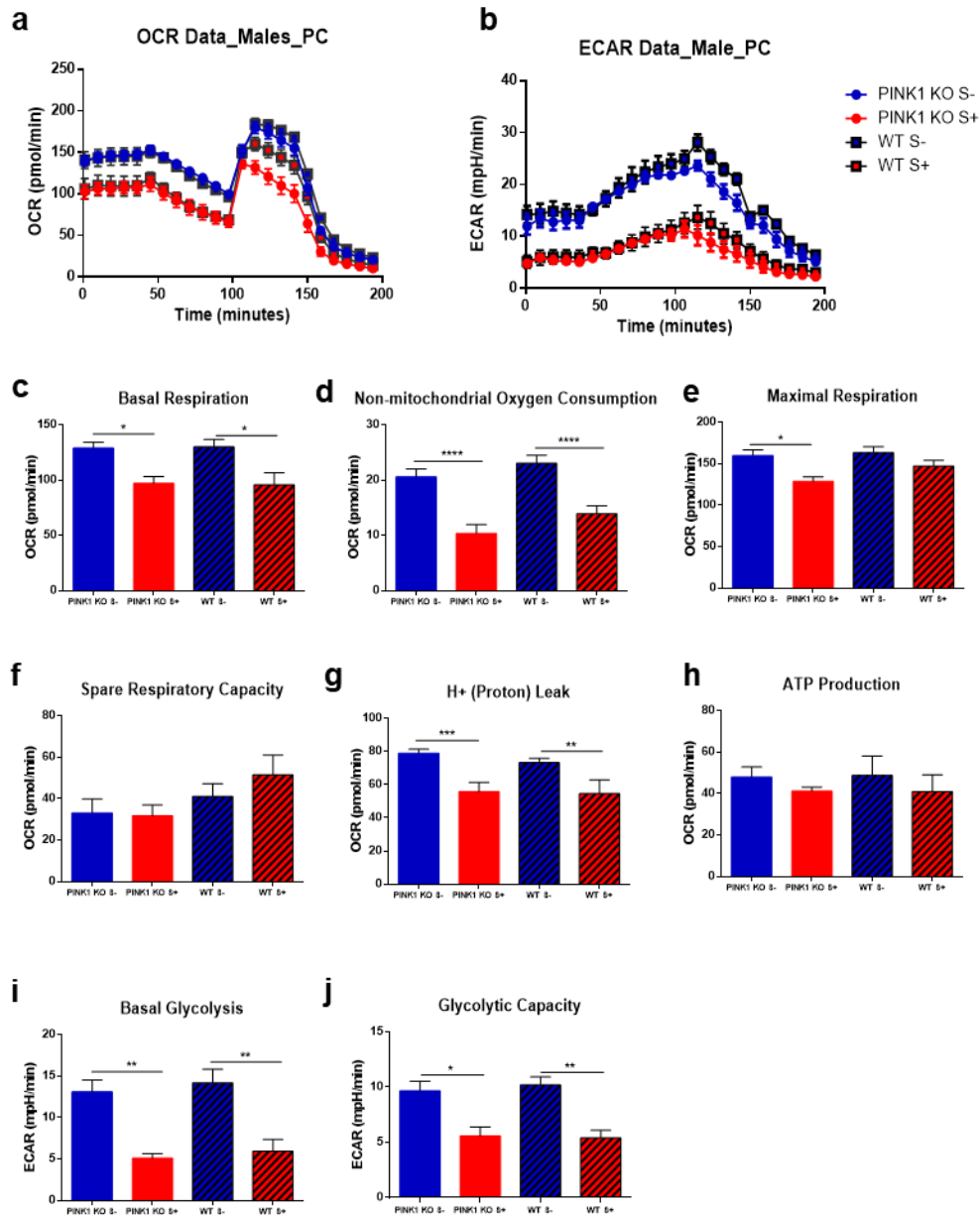
- Evaluar el efecto agudo y a largo plazo del estrés psicológico sobre la energía del metabolismo (OXPHOS y glicólisis) en cerebros de ratas hembra y macho WT y PINK1-KO (en PFC y SN) usando el analizador de flujo extracelular Agilent Seahorse XF24e.

### Resultados and discusión:

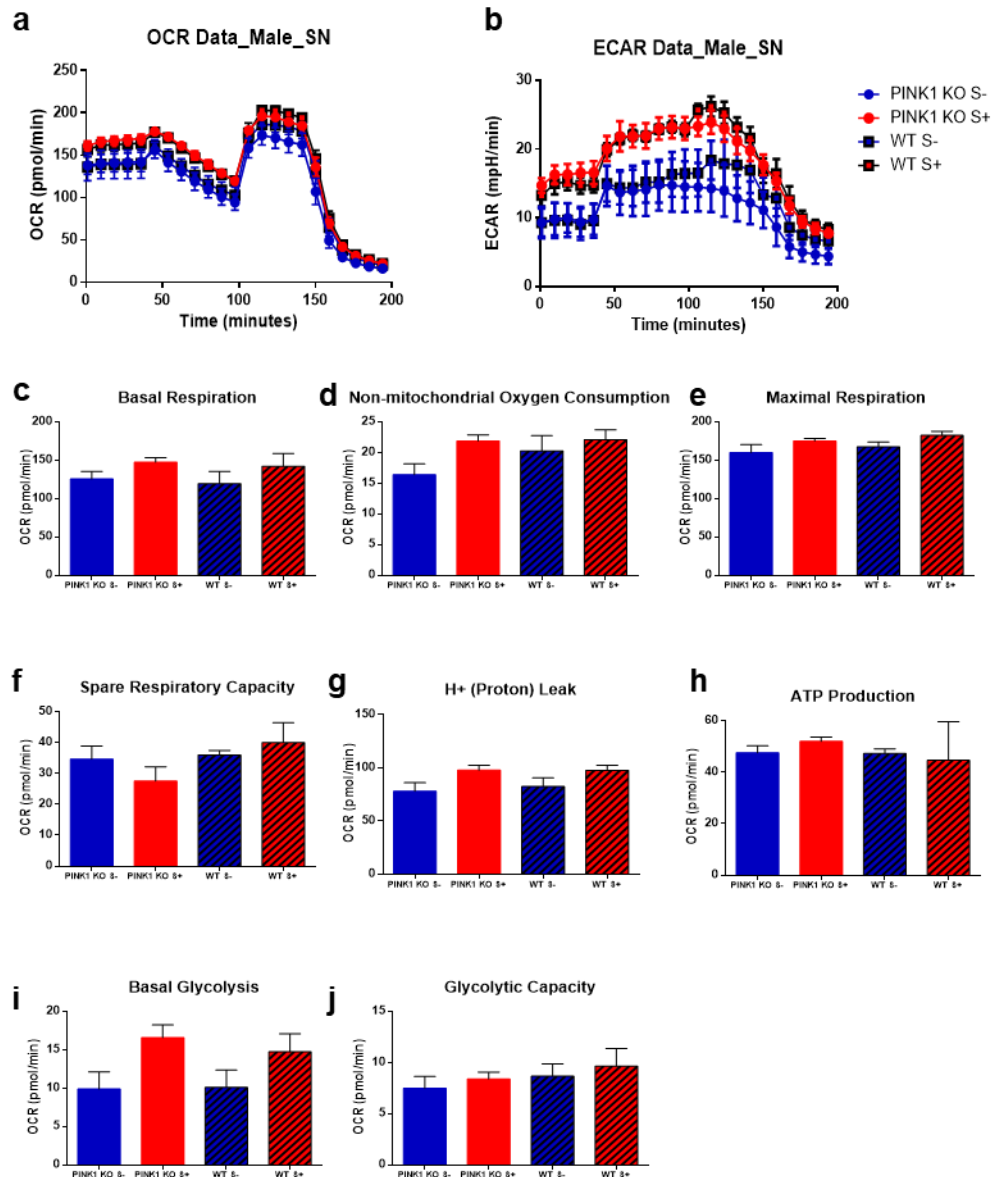
La energía del metabolismo (OCRs y ECARs) en el cerebro es alterada por el estrés psicológico. Usando un analizador de flujo extracelular XF24e para medir el metabolismo neuronal *ex vivo*, se observó que la exposición tanto de ratas WT y PINK1-KO a estrés psicológico por 3 días es suficiente para reducir significativamente la energía del metabolismo en PFC y SN (Fig. 25-28).

En el PFC, el estrés psicológico causó una reducción significativa en OCR no mitocondrial y OCR basal ( $p \leq 0.05$ ), y una disminución significativa en la pérdida de protones ( $p \leq 0.001$ ), en ratas WT y PINK1-KO. También, se observó una disminución significativa en el OCR máximo en el PFC de ratas PINK1-KO machos y hembras. Adicionalmente, la glicólisis basal y la capacidad glicolítica disminuyeron significativamente en machos y en hembras (Fig. 25 and Fig. 27). Cabe resaltar que las alteraciones bioenergéticas en el cerebro inducidas por el estrés psicológico fueron más prominentes en la PFC de machos que en hembras (Fig. 25 and Fig. 27), un efecto que persistió después de 7 días posteriores a la exposición al estrés (Fig. 29). Por todo lo anterior, estos datos sugieren que el estrés psicológico puede tener efectos negativos a largo plazo en esta región del cerebro (Fig. 28).

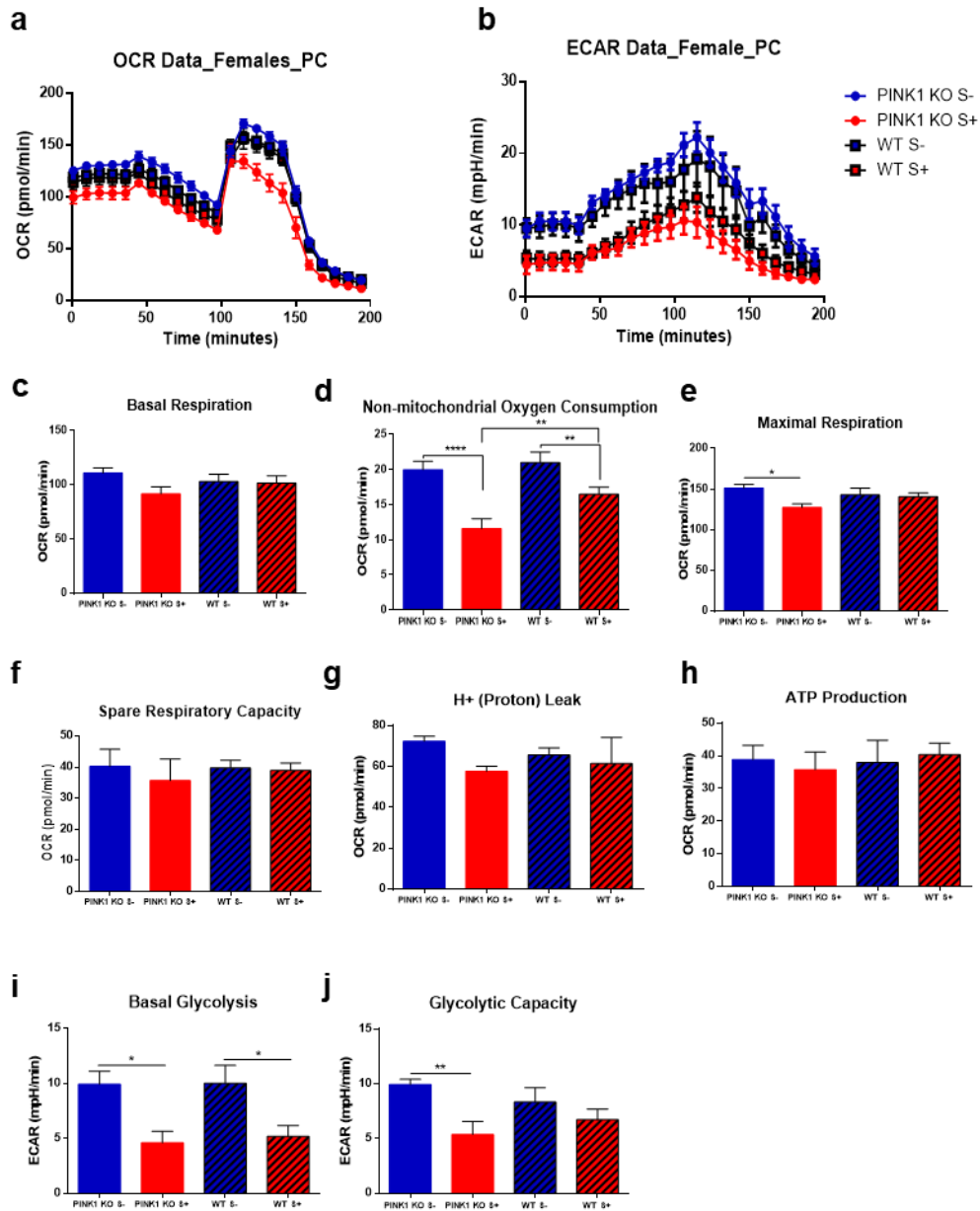
A diferencia del PFC, el SN mostró un incremento en la demanda de energía inmediatamente después del estrés psicológico, presumiblemente como una respuesta al estrés oxidante e inflamación (Lee, Tran and Tansey, 2009; Kayser, Sedensky and Morgan, 2016; Yin *et al.*, 2017). Un estudio previo mostró que las ratas estresadas tienen neuroinflamación, que se hace evidente por una acumulación de microglía y reclutamiento de leucocitos en *area postrema* (Vargas-Caraveo, Perez-Ishiwara and Martinez-Martinez, 2015), un fenómeno que contribuye a la neurodegeneración (Lee, Tran and Tansey, 2009). OCRs y ECARs tienden a incrementar tanto en machos como en hembras de ratas WT o PINK1-KO estresadas (Fig. 26, Fig. 28). Además, el estrés psicológico induce efectos a largo plazo sobre el SN, un incremento significativo en OCR no mitocondrial en ratas WT y PINK1-KO fue observado 7 días posteriores a la exposición al estrés, así como un incremento basal y respiración máxima en PINK1-KO SN ( $p \leq 0.01$ ) (Fig. 30).



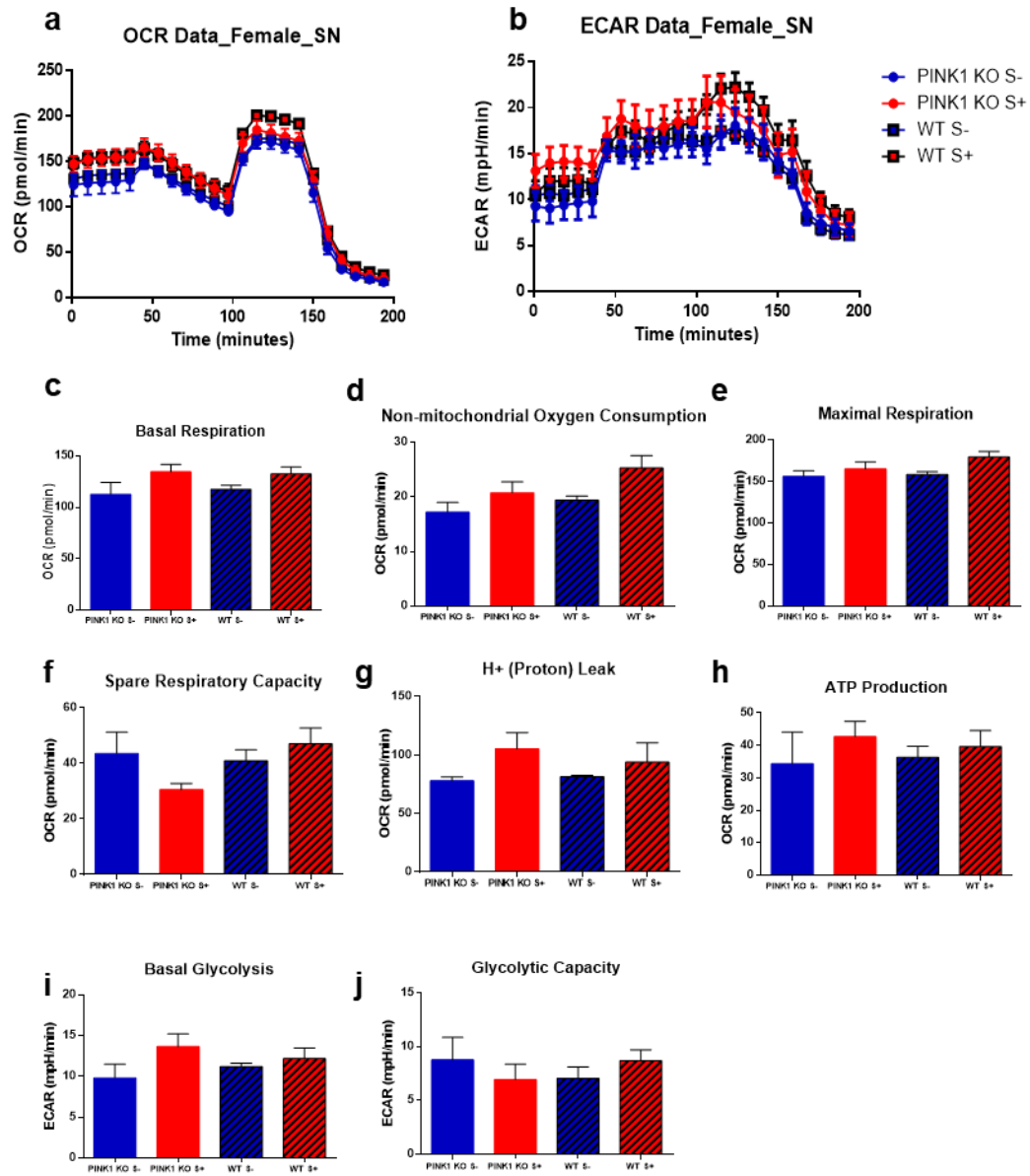
**Figura 25. Efecto agudo del estrés psicológico en PFC de machos sobre la energía del metabolismo: a)** tasa de consumo de oxígeno (OCR), **b)** tasa de acidificación extracelular (ECAR), **c)** Respiración Basal, **d)** Consumo de oxígeno No-mitocondrial, **e)** Respiración máxima, **f)** Capacidad respiratoria, **g)** Pérdida de H<sup>+</sup> (Protón), **h)** Producción de ATP, **i)** Glicolisis Basal, **j)** Capacidad Glicolítica. Para el ensayo fue usado: 25  $\mu$ M de Oligomicina, 15  $\mu$ M de FCCP, 20  $\mu$ M de Antimicina, 20  $\mu$ M de Rotenona. Datos expresados como medias  $\pm$  SEM. n = 5 ratas \* p  $\leq$  0.05, \*\* p  $\leq$  0.01, \*\*\* p  $\leq$  0.001, \*\*\*\* p  $\leq$  0.0001, ANOVA de dos vías con prueba de comparación múltiple de Bonferroni. Color rojo: grupos estresados; color azul: grupos no estresados.



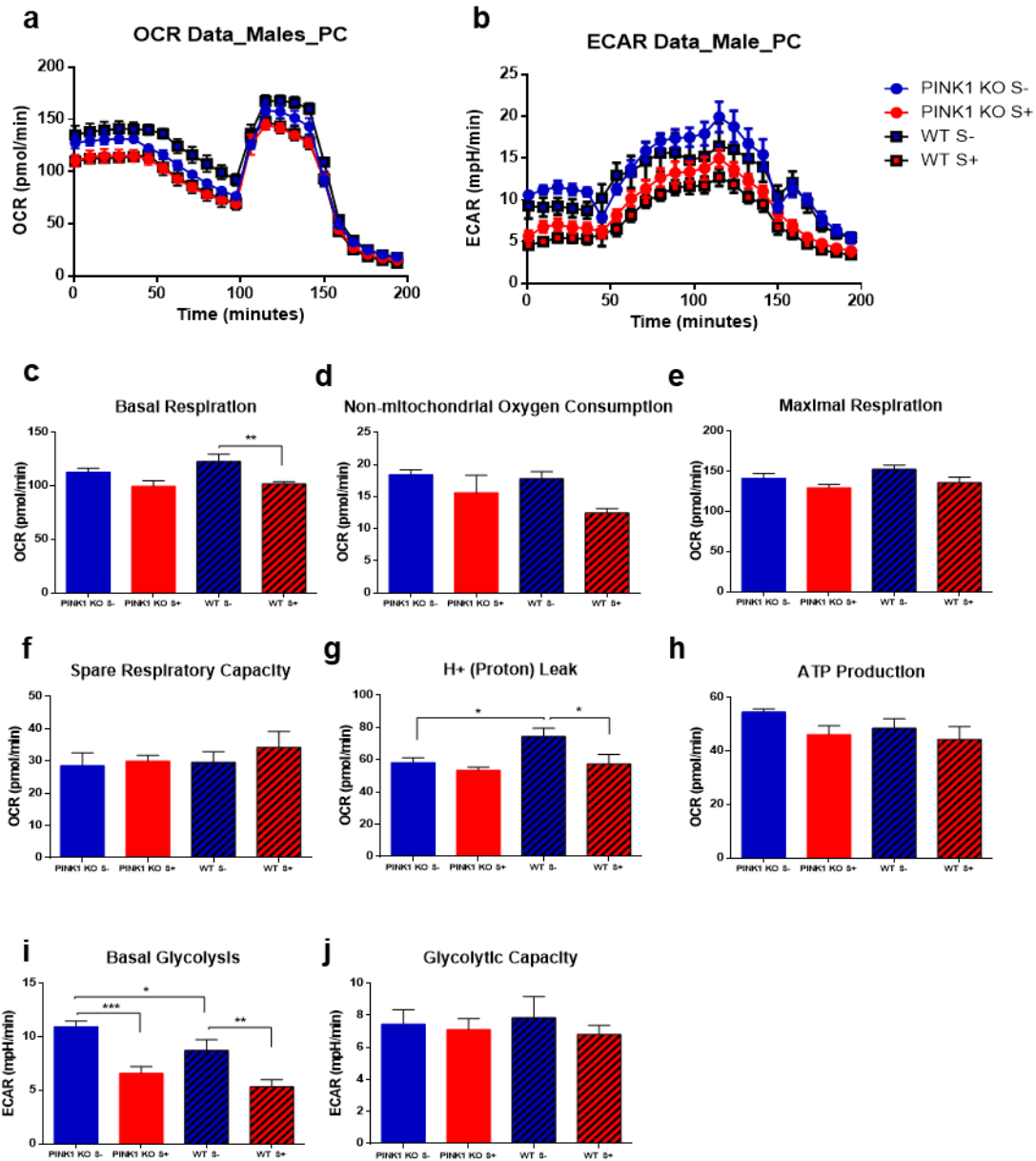
**Figura 26. Efecto agudo del estrés psicológico en SN de machos sobre la energía del metabolismo: a)** tasa de consumo de oxígeno (OCR), **b)** tasa de acidificación extracelular (ECAR), **c)** Respiración Basal, **d)** Consumo de oxígeno No-mitocondrial, **e)** Respiración máxima, **f)** Capacidad respiratoria, **g)** Pérdida de H<sup>+</sup> (Protón), **h)** Producción de ATP, **i)** Glicolisis Basal, **j)** Capacidad Glicolítica. Para el ensayo fue usado: 25  $\mu$ M de Oligomicina, 15  $\mu$ M de FCCP, 20  $\mu$ M de Antimicina, 20  $\mu$ M de Rotenona. Datos expresados como medias  $\pm$  SEM. \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ , \*\*\*\*  $p \leq 0.0001$ , ANOVA de dos vías con prueba de comparación múltiple de Bonferroni. Color rojo: grupos estresados; color azul: grupos no estresados.



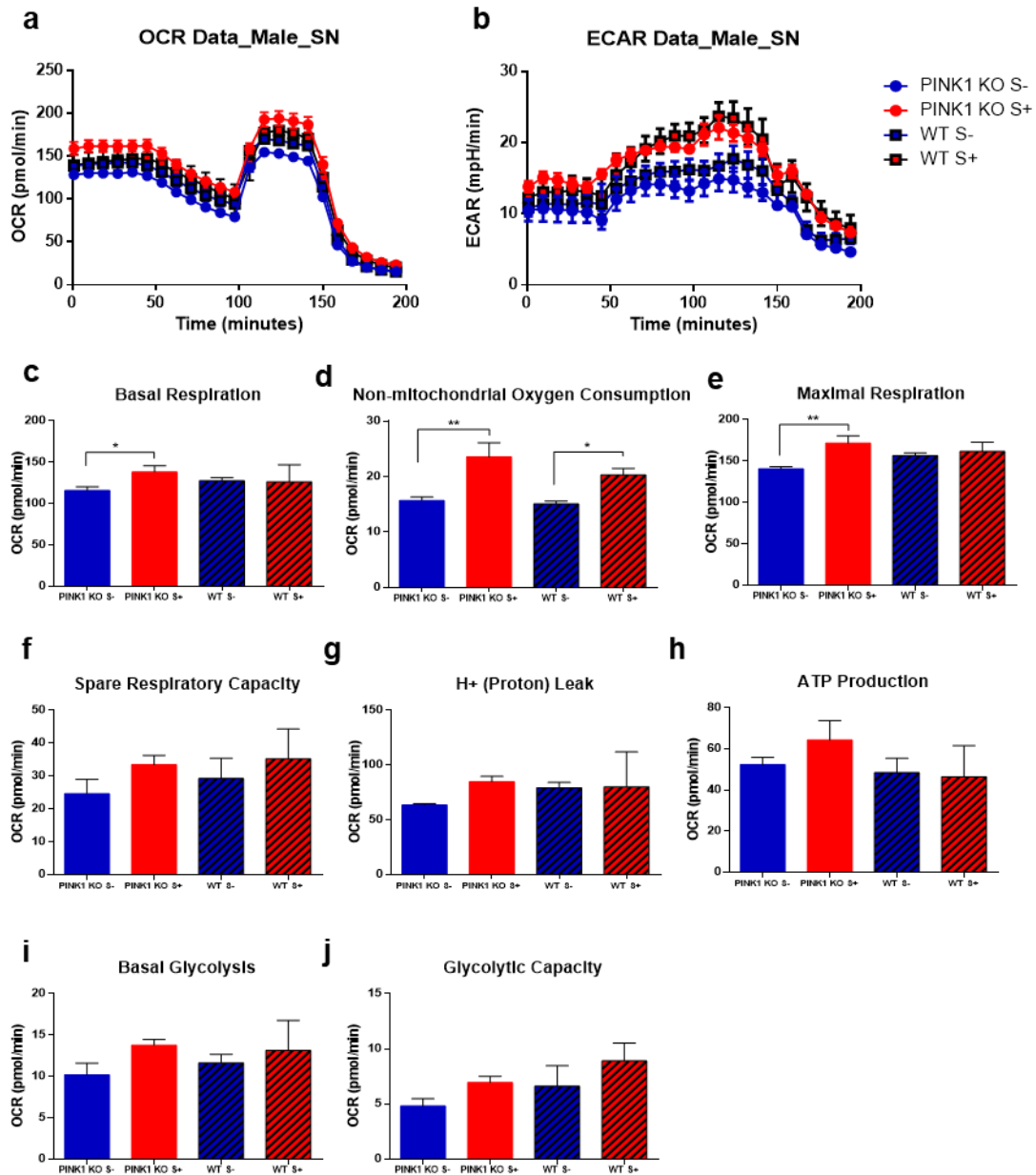
**Figura 27. Efecto agudo del estrés psicológico en PFC de hembras sobre la energía del metabolismo** **a)** tasa de consumo de oxígeno (OCR), **b)** tasa de acidificación extracelular (ECAR), **c)** Respiración Basal, **d)** Consumo de oxígeno No-mitocondrial, **e)** Respiración máxima, **f)** Capacidad respiratoria, **g)** Pérdida de H<sup>+</sup> (Protón), **h)** Producción de ATP, **i)** Glicolisis Basal, **j)** Capacidad Glicolítica. Para el ensayo fue usado: 25  $\mu$ M de Oligomicina, 15  $\mu$ M de FCCP, 20  $\mu$ M de Antimicina, 20  $\mu$ M de Rotenona. Datos expresados como medias  $\pm$  SEM. \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ , \*\*\*\*  $p \leq 0.0001$ , ANOVA de dos vías con prueba de comparación múltiple de Bonferroni. Color rojo: grupos estresados; color azul: grupos no estresados.



**Figura 28. Efecto del estrés agudo en SN de hembras sobre la energía del metabolismo:** **a)** tasa de consumo de oxígeno (OCR), **b)** tasa de acidificación extracelular (ECAR), **c)** Respiración Basal, **d)** Consumo de oxígeno No-mitocondrial, **e)** Respiración máxima, **f)** Capacidad respiratoria, **g)** Pérdida de H<sup>+</sup> (Protón), **h)** Producción de ATP, **i)** Glicolisis Basal, **j)** Capacidad Glicolítica. Para el ensayo fue usado: 25  $\mu$ M de Oligomicina, 15  $\mu$ M de FCCP, 20  $\mu$ M de Antimicina, 20  $\mu$ M de Rotenona. Datos expresados como medias  $\pm$  SEM. \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ , \*\*\*\*  $p \leq 0.0001$ , ANOVA de dos vías con prueba de comparación múltiple de Bonferroni. Color rojo: grupos estresados; color azul: grupos no estresados.



**Figure 29. Efectos a largo plazo del estrés psicológico en PFC de machos sobre la energía del metabolismo:** **a)** tasa de consumo de oxígeno (OCR), **b)** tasa de acidificación extracelular (ECAR), **c)** Respiración Basal, **d)** Consumo de oxígeno No-mitocondrial, **e)** Respiración máxima, **f)** Capacidad respiratoria, **g)** Pérdida de H<sup>+</sup> (Protón), **h)** Producción de ATP, **i)** Glicolisis Basal, **j)** Capacidad Glicolítica. Para el ensayo fue usado: 25  $\mu$ M de Oligomicina, 15  $\mu$ M de FCCP, 20  $\mu$ M de Antimicina, 20  $\mu$ M de Rotenona. Datos expresados como medias  $\pm$  SEM. \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ , \*\*\*\*  $p \leq 0.0001$ , ANOVA de dos vías con prueba de comparación múltiple de Bonferroni. Color rojo: grupos estresados; color azul: grupos no estresados.



**Figura 30. Efectos a largo plazo del estrés psicológico sobre SN de machos en la energía del metabolismo** **a)** tasa de consumo de oxígeno (OCR), **b)** tasa de acidificación extracelular (ECAR), **c)** Respiración Basal, **d)** Consumo de oxígeno No-mitocondrial, **e)** Respiración máxima, **f)** Capacidad respiratoria, **g)** Pérdida de H<sup>+</sup> (Protón), **h)** Producción de ATP, **i)** Glicolisis Basal, **j)** Capacidad Glicolítica. Para el ensayo fue usado: 25  $\mu$ M de Oligomicina, 15  $\mu$ M de FCCP, 20  $\mu$ M de Antimicina, 20  $\mu$ M de Rotenona. Datos expresados como medias  $\pm$  SEM. \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ , \*\*\*\*  $p \leq 0.0001$ , ANOVA de dos vías con prueba de comparación múltiple de Bonferroni. Color rojo: grupos estresados; color azul: grupos no estresados.

Las ratas PINK1-KO no mostraron alteraciones bioenergéticas en el PFC y SN comparadas con ratas WT (Fig. 25-30). Este resultado contrasta con estudios previos que mostraron una alteración de la actividad ETC y de la expresión de proteínas relacionadas con la respiración mitocondrial en striatum de ratas PINK1-KO de 3 meses de edad (Stauch *et al.*, 2016), e incluso, se ha observado una disminución de la expresión de proteínas mitocondriales (NADH y citocromo C oxidasa) y del nivel de ATP en PFC, SN, striatum y núcleo cerebelar profundo (Ferris *et al.*, 2018). Además, estudios recientes en ratones jóvenes PINK1-KO encontraron disminución en la eficiencia de acoplamiento, sin cambios basales en la producción de OCR o ATP en cortes estriatales (Zhi *et al.*, 2018). Sin embargo, una alteración en la energía del metabolismo del cerebro fue observada posteriormente al estrés psicológico tanto en animales WT como en PINK1-KO. Por lo tanto, este estudio sugiere que eventos altamente estresantes pueden afectar adversamente la producción de energía en el cerebro.

Tanto el estrés psicológico como el envejecimiento contribuyen a la disminución de la producción de energía en el cerebro. La disminución de OXPHOS y la glicólisis pueden ser causadas por el envejecimiento debido a una reducción de la utilización de glucosa (disminución de la actividad glicolítica o del ciclo enzimático TCA) o una disminución en la utilización de glucosa en el cerebro, eventos patológicos que pueden contribuir a la neurodegeneración relacionada con la edad (Hoyer, 1982). Es por ello, que tanto el estrés psicológico y el envejecimiento pueden afectar la energía del metabolismo del cerebro y las rutas de respuesta antioxidante. Los datos bioenergéticos obtenidos sugieren que el estrés psicológico puede tener efectos detrimentales de largo periodo sobre la producción de energía del cerebro (Fig. 29, Fig. 30), lo cual puede representar un factor de riesgo que contribuye a la neuropatología en PD.

## ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE BDNF Y PROTEÍNAS ANTIOXIDANTES

**Hipótesis:** El estrés psicológico y la deficiencia de PINK1 altera la BDNF y las proteínas antioxidantes en el cerebro de rata.

### **Objetivos:**

- Evaluar el efecto del estrés psicológico agudo y a largo plazo sobre la expresión de BDNF, expresión del contenido mitocondrial (TOM20), SOD1, SOD2, CAT, DJ-1 en cerebro de rata WT y PINK1-KO (en PFC, SN, Striatum y HC) usando ensayo WB.
- Evaluar el efecto agudo del estrés psicológico sobre la expresión de TH en SN de ratas WT y PINK1-KO usando ensayo de inmunofluorescencia.

### **Resultados y discusión:**

El estrés psicológico altera las enzimas antioxidantes (SOD1, SOD2, CAT), la expresión de BDNF y DJ-1 y el nivel de contenido mitocondrial (TOM20) en el PFC, cerebro medio, HC y striatum (Table 13).

En ratas estresadas macho WT, se observó un incremento en SOD2 y disminución del DJ-1 así como la expresión de TOM20 en el PFC, disminución en la CAT, TOM20, BDNF maduro (mBDNF), y en la relación en la expresión de BDNF maduro e inmaduro (mBDNF/proBDNF) en el cerebro medio, disminución significativa de la expresión de TOM20 en striatum y algunos cambios modestos en el HC. Además, el cerebro medio de ratas macho PINK1-KO mostró reducción en la expresión de CAT, TOM20 and BDNF, de manera similar que las ratas WT psicológicamente estresadas ( $p \leq 0.05$ ). También, en el HC de las ratas macho PINK1-KO se observó un incremento significativo en los niveles de CAT, DJ-1 y BDNF ( $p \leq 0.05$ ).

Las ratas hembras WT fueron menos afectadas por el estrés ya que se encontró que sólo la expresión de SOD2 disminuyó e incrementó la expresión de BDNF en PFC; también, disminuyó la expresión de SOD1 y SOD2 en striatum. Estos datos

son consistentes con los datos bioenergéticos (Fig. 25-28), donde las ratas hembra ya sean WT o PINK1-KO, fueron más resilientes a los cambios en respuesta al estrés comparadas con ratas macho. En animales PINK1-KO hembra, se observó una disminución del nivel de SOD2 y CAT en el PFC, una disminución en la expresión de DJ-1 en el HC y una disminución en el nivel de SOD1, SOD2 y BDNF en el striatum ( $p \leq 0.05$ ). Las hembras tuvieron rutas alternativas para modular el estrés siendo menos afectadas por el estrés psicológico, presumiblemente debido a los efectos neuroprotectores e inmunomodulatorios del estrógeno (Maggioli *et al.*, 2016).

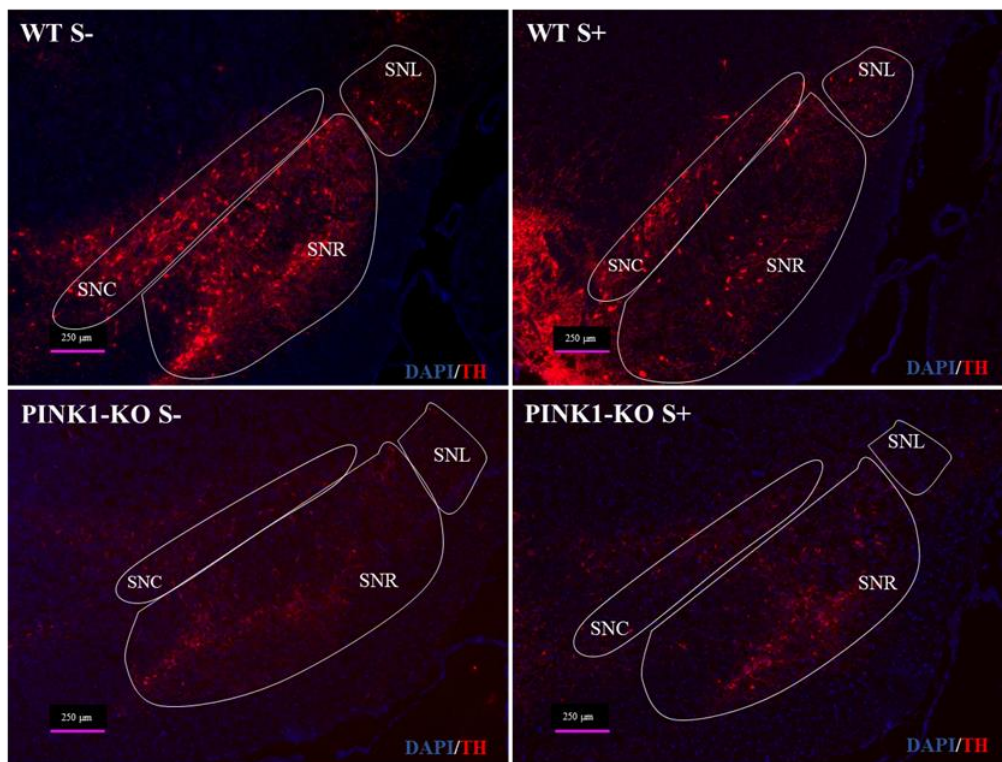
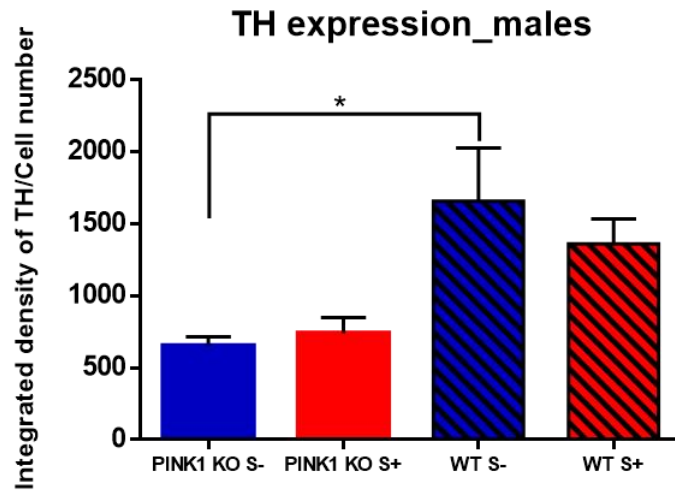
Por otro lado, nuestros datos de WB no mostraron cambios significativos en el nivel de la mitocondria, factores neurotróficos y antioxidantes en el cerebro de ratas PINK1-KO estresadas, incluso si ellas mostraron discapacidad en la energía del metabolismo (Fig. 25-28), disfunción motriz (Fig. 23b) e incremento de la ansiedad (Fig. 23a). La deficiencia de PINK1 activa las rutas de señalización en otras regiones del cerebro que promueven la neurodegeneración en el SN. El HC mostró un incremento en los niveles cerebrales de CAT, DJ-1 and BDNF, presumiblemente como una respuesta al estrés oxidante inducido por la falta de PINK1 (Dagda *et al.*, 2009; Das Banerjee *et al.*, 2017; Ferris *et al.*, 2018), y la cual puede llevar a cambios en la morfología neuronal incluyendo la retracción y la eventual pérdida de las redes dendríticas (Lakshminarasimhan and Chattarji, 2012).

**Tabla 13. El estrés psicológico altera las proteínas antioxidantes, los niveles del BDNF en PFC, cerebro medio, HC y striatum en ratas machos y hembras WT and PINK1-KO después de 3 días de exposición a estrés (efecto agudo).** Las hembras parecen ser menos afectadas por el estrés que los machos. Fueron analizados: superóxido dismutasa citosólica (SOD1), superóxido dismutasa mitocondrial (SOD2), catalasa (CAT), DJ-1, contenido mitocondrial (TOM20), factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) en forma madura (mBDNF) y la relación entre mBDNF y el precursor de BDNF (proBDNF), mBDNF/proBDNF. S- representa el grupo no estresado y S+ representa el grupo estresado. Datos obtenidos por WB y normalizados usando los grupos sin estrés (WT S-) como una unidad.  $n = 5$  por grupo. Datos expresados como media  $\pm$  SD. \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ , \*\*\*\*  $p \leq 0.0001$  comparados con WT S-, †  $p \leq 0.05$  comparados con PINK1-KO S-, ANOVA de una vía con prueba de Fisher LSD.

|                          | MALES |                  |                  |               | FEMALES |                |                  |               |
|--------------------------|-------|------------------|------------------|---------------|---------|----------------|------------------|---------------|
|                          | WT    |                  | PINK 1 KO        |               | WT      |                | PINK 1 KO        |               |
|                          | S-    | S+               | S-               | S+            | S-      | S+             | S-               | S+            |
| <b>Prefrontal cortex</b> |       |                  |                  |               |         |                |                  |               |
| SOD1                     | 1     | 1.06 ± 0.26      | 0.98 ± 0.13      | 1.06 ± 0.11   | 1       | 0.95 ± 0.19    | 0.97 ± 0.33      | 0.76 ± 0.24   |
| SOD2                     | 1     | 1.16 ± 0.18 *    | 1.02 ± 0.12      | 1.07 ± 0.11   | 1       | 0.72 ± 0.1 *** | 0.65 ± 0.15 **** | 0.54 ± 0.08   |
| CAT                      | 1     | 1.16 ± 0.12      | 1.14 ± 0.2       | 1.38 ± 0.18 † | 1       | 0.8 ± 0.26     | 0.53 ± 0.14 **   | 0.77 ± 0.26   |
| DJ1                      | 1     | 0.81 ± 0.17 *    | 0.87 ± 0.16      | 0.91 ± 0.09   | 1       | 0.98 ± 0.16    | 0.95 ± 0.23      | 0.9 ± 0.16    |
| TOM20                    | 1     | 0.79 ± 0.17 *    | 0.96 ± 0.15      | 0.99 ± 0.07   | 1       | 0.8 ± 0.21     | 0.88 ± 0.19      | 0.84 ± 0.23   |
| mBDNF                    | 1     | 0.8 ± 0.39       | 1.23 ± 0.31      | 1.2 ± 0.7     | 1       | 1.46 ± 0.54 *  | 0.85 ± 0.2       | 0.96 ± 0.34   |
| mBDNF/proBDNF            | 1     | 0.75 ± 0.37      | 1.15 ± 0.34      | 1.48 ± 0.9    | 1       | 1.27 ± 0.55    | 0.75 ± 0.13      | 0.83 ± 0.24   |
| <b>Midbrain</b>          |       |                  |                  |               |         |                |                  |               |
| SOD1                     | 1     | 0.85 ± 0.29      | 0.77 ± 0.22      | 0.72 ± 0.13   | 1       | 0.87 ± 0.19    | 1.08 ± 0.36      | 1.41 ± 0.65   |
| SOD2                     | 1     | 0.92 ± 0.23      | 0.95 ± 0.15      | 0.93 ± 0.08   | 1       | 0.95 ± 0.14    | 0.98 ± 0.43      | 0.68 ± 0.15   |
| CAT                      | 1     | 0.43 ± 0.15 **** | 0.48 ± 0.21 **** | 0.68 ± 0.17   | 1       | 1.23 ± 0.24    | 0.89 ± 0.26      | 0.54 ± 0.15 † |
| DJ1                      | 1     | 0.9 ± 0.14       | 0.99 ± 0.25      | 1.05 ± 0.31   | 1       | 1.09 ± 0.18    | 1.33 ± 0.53      | 1.13 ± 0.4    |
| TOM20                    | 1     | 0.69 ± 0.06 ***  | 0.76 ± 0.16 **   | 0.71 ± 0.13   | 1       | 0.83 ± 0.24    | 0.91 ± 0.28      | 0.75 ± 0.18   |
| mBDNF                    | 1     | 0.68 ± 0.22 **   | 0.79 ± 0.17 *    | 0.7 ± 0.15    | 1       | 0.9 ± 0.25     | 0.93 ± 0.45      | 0.61 ± 0.24   |
| mBDNF/proBDNF            | 1     | 0.62 ± 0.18 ***  | 0.44 ± 0.1 ****  | 0.49 ± 0.12   | 1       | 0.82 ± 0.16    | 0.73 ± 0.35      | 0.55 ± 0.25   |
| <b>Hipocampus</b>        |       |                  |                  |               |         |                |                  |               |
| SOD1                     | 1     | 0.91 ± 0.21      | 0.99 ± 0.11      | 0.86 ± 0.24   | 1       | 0.92 ± 0.42    | 0.88 ± 0.37      | 0.85 ± 0.23   |
| SOD2                     | 1     | 0.98 ± 0.13      | 1.09 ± 0.06      | 0.999 ± 0.19  | 1       | 0.96 ± 0.24    | 0.94 ± 0.18      | 0.83 ± 0.16   |
| CAT                      | 1     | 1.37 ± 0.21      | 1.66 ± 0.46 **   | 1.5 ± 0.27    | 1       | 0.79 ± 0.18    | 1.03 ± 0.26      | 0.88 ± 0.2    |
| DJ1                      | 1     | 1.88 ± 0.69      | 2.49 ± 1.2 *     | 2.37 ± 1.16   | 1       | 0.9 ± 0.23     | 0.81 ± 0.09 *    | 0.66 ± 0.05   |
| TOM20                    | 1     | 1.29 ± 0.33      | 1.63 ± 0.33      | 1.76 ± 0.85   | 1       | 0.93 ± 0.34    | 0.94 ± 0.16      | 0.82 ± 0.21   |
| mBDNF                    | 1     | 1.21 ± 0.17      | 1.39 ± 0.29 *    | 1.31 ± 0.4    | 1       | 1.09 ± 0.46    | 0.97 ± 0.5       | 0.99 ± 0.76   |
| mBDNF/proBDNF            | 1     | 1.12 ± 0.13      | 1.33 ± 0.2 *     | 1.37 ± 0.41   | 1       | 0.75 ± 0.45    | 0.71 ± 0.18      | 0.86 ± 0.32   |
| <b>Striatum</b>          |       |                  |                  |               |         |                |                  |               |
| SOD1                     | 1     | 0.95 ± 0.09      | 0.97 ± 0.09      | 0.97 ± 0.08   | 1       | 0.77 ± 0.18 ** | 0.73 ± 0.09 **   | 0.77 ± 0.17   |
| SOD2                     | 1     | 0.94 ± 0.09      | 0.95 ± 0.13      | 1.04 ± 0.08   | 1       | 0.81 ± 0.07 *  | 0.78 ± 0.12 *    | 0.84 ± 0.22   |
| CAT                      | 1     | 0.91 ± 0.07      | 1.12 ± 0.22      | 1.13 ± 0.28   | 1       | 0.74 ± 0.23    | 0.75 ± 0.23      | 0.82 ± 0.24   |
| DJ1                      | 1     | 0.999 ± 0.06     | 1.03 ± 0.15      | 1.02 ± 0.08   | 1       | 1.03 ± 0.09    | 0.95 ± 0.09      | 1.21 ± 0.37   |
| TOM20                    | 1     | 0.79 ± 0.18 *    | 0.91 ± 0.07      | 0.88 ± 0.22   | 1       | 0.8 ± 0.18     | 0.83 ± 0.27      | 0.97 ± 0.17   |
| mBDNF                    | 1     | 0.99 ± 0.44      | 1.01 ± 0.09      | 1.16 ± 0.35   | 1       | 0.85 ± 0.25    | 0.78 ± 0.28      | 0.68 ± 0.17   |
| mBDNF/proBDNF            | 1     | 1.197 ± 0.48     | 0.99 ± 0.13      | 1.46 ± 0.64   | 1       | 0.89 ± 0.3     | 0.67 ± 0.14 *    | 0.64 ± 0.14   |

Los cambios en la bioenergética de la PFC y de la SN inducidos por estrés pudieron ocurrir como una respuesta a la ruta antioxidante alterada y el nivel de señalización neurotrófica (BDNF) encontrado en diferentes regiones del cerebro (Tabla 13), lo cual puede inducir el proceso de neurodegeneración y por ende alterar el comportamiento y funciones motrices (Fig. 23). Más adelante, se hipotetizó que el estrés psicológico contribuye a la degeneración de neuronas de la SN. Se observó que la expresión de tirosina hidroxilasa (TH) en la SN no fue alterada en respuesta al estrés psicológico (Fig. 31), sugiriendo que el modelo de estrés psicológico usado en este estudio no induce la neurodegeneración. Por otro lado, las ratas PINK1-KO mostraron disminución significativa en la expresión de TH

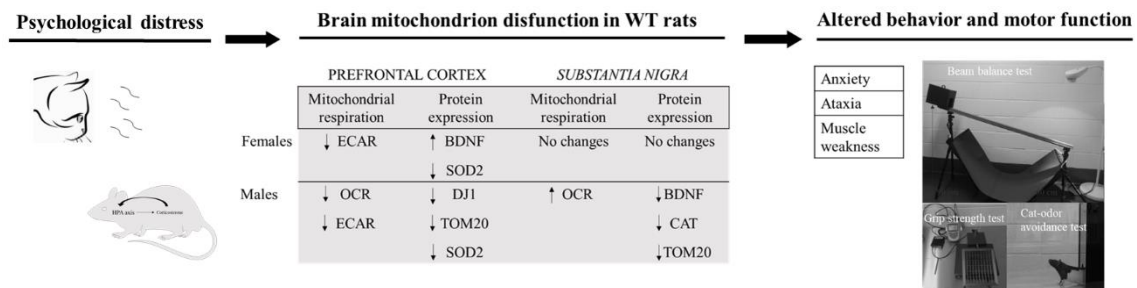
comparado con ratas WT ( $p \leq 0.05$ ), lo cual es consistente con el déficit motriz observado en ratas PINK1-KO no estresadas (Fig. 23c).



**Figura 31. Ensayo de inmunofluorescencia para la detección de la expresión de tirosina hidroxilasa (TH) en SN de machos (efecto agudo).** Pérdida de neuronas dopaminérgicas en SN de ratas PINK1-KO, sin cambios en ratas WT. Ensayo de inmunofluorescencia para la detección de la expresión de TH en todas las áreas del SN de ratas macho (efecto agudo).  $n = 5$  por grupo. Datos expresados como media de la relación entre la densidad integrada y el número total de células en

SN  $\pm$  SEM. \*  $p \leq 0.05$ , ANOVA de una vía con prueba de Fisher's LSD. SNC: *substantia nigra* pars compacta, SNR: *substantia nigra* pars reticulata, SNL: *substantia nigra* pars lateralis, abreviaciones después (Paxinos and Watson, 2007). Color rojo: grupos estresados; color azul: grupos no estresados.

La reducción en la energía metabólica del cerebro (Fig. 25 y 26), el declive en el contenido mitocondrial, la expresión de proteínas antioxidantes alteradas, el bajo nivel de BDNF en el PFC y en el cerebro medio (Tabla 13), cambios inducidos por la exposición al estrés psicológico están relacionadas con la alteración de la función motriz y el comportamiento de ansiedad, como síntomas motrices de PD (Fig. 32).



**Figura 32. Resumen de figuras: El estrés puede inducir falla mitocondrial conduciendo a una fenocopia la enfermedad de Parkinson en ratas WT.** El estrés psicológico induce la disfunción mitocondrial caracterizada por disminución de OCRs y ECARs en PFC, incremento de OCR en SN, cambio en la expresión de antioxidantes y BDNF, y disminución del contenido mitocondrial en ambas regiones. Esta lesión del cerebro lleva a una disfunción motriz y comportamiento de ansiedad.

## ANÁLISIS DE ENERGÍA DEL METABOLISMO EN PBMCS

**Hipótesis:** El estrés psicológico y la falta de PINK1 altera la energía metabólica en PBMCS de ratas.

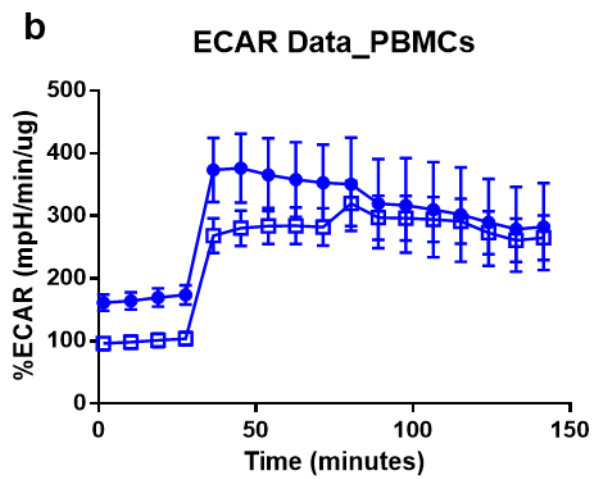
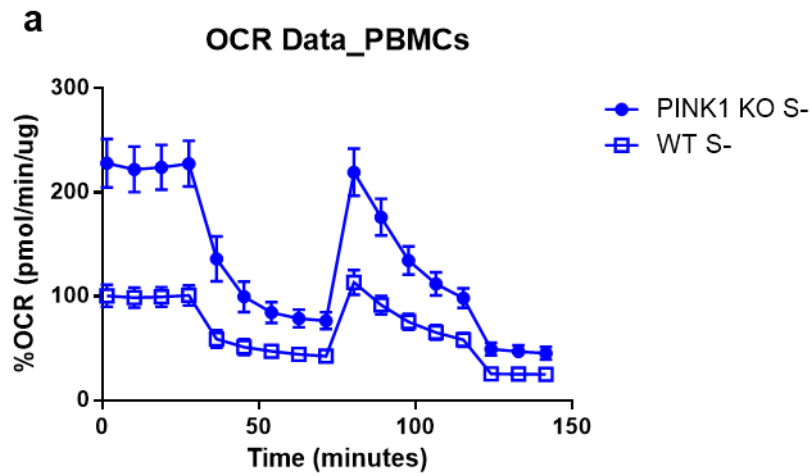
**Objetivos:**

- evaluar el efecto agudo y a largo plazo del estrés psicológico sobre la energía metabólica (OXPHOS y glicólisis) de ratas WT y PINK1-KO usando el analizador de flujo extracelular Agilent Seahorse XF24<sup>e</sup>.

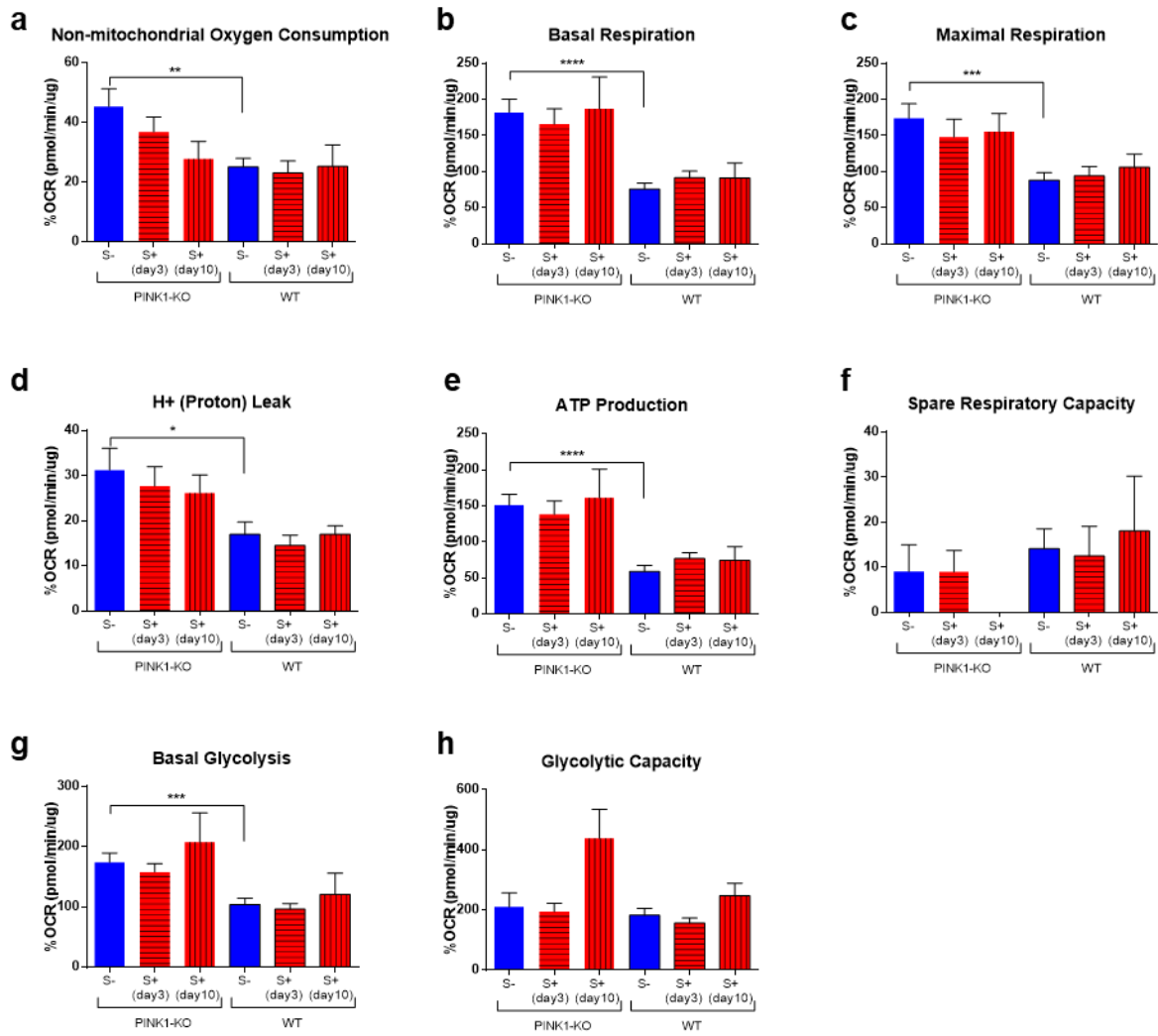
### **Resultados and discusión:**

Se demostró que la falta de PINK1 induce la disfunción crónica del metabolismo mitocondrial en PBMCs e incrementa concomitantemente el requerimiento energético en respuesta al estrés psicológico. La presencia de PINK1 es indispensable para el mantenimiento de la homeostasis del metabolismo mitocondrial en PBMCs.

PINK1-KO PBMCs mostraron un incremento significativo en la energía metabólica (OXPHOS y glicólisis), casi al doble comparado con células de ratas WT (Fig. 33), como se esperaría en una respuesta inmune robusta, la cual juega un rol importante en la patología de la PD (Kannarkat, Boss and Tansey, 2013). El incremento crónico de la energía metabólica de PBMCs puede estar asociado con la patogénesis de otras enfermedades como el incremento de consumo de oxígeno mitocondrial en PBMCs de pacientes con diabetes mellitus (Hartman *et al.*, 2014). La ausencia de PINK1-KO aumenta el consumo de oxígeno no mitocondrial ( $p \leq 0.01$ ), incremento de la respiración basal ( $p \leq 0.0001$ ), incremento de la respiración máxima ( $p \leq 0.001$ ), incremento en la salida de protones ( $p \leq 0.05$ ) y producción de ATP ( $p \leq 0.0001$ ), y un incremento significativo de la glicólisis basal comparada con WT PBMCs ( $p \leq 0.001$ , Fig. 34).



**Figura 33. a) OCR y b) ECAR para PBMCs de ratas PINK1-KO y WT hembras y macho no estresadas.** Datos expresados como porcentaje promedio  $\pm$  SEM; n = 14 por grupo.

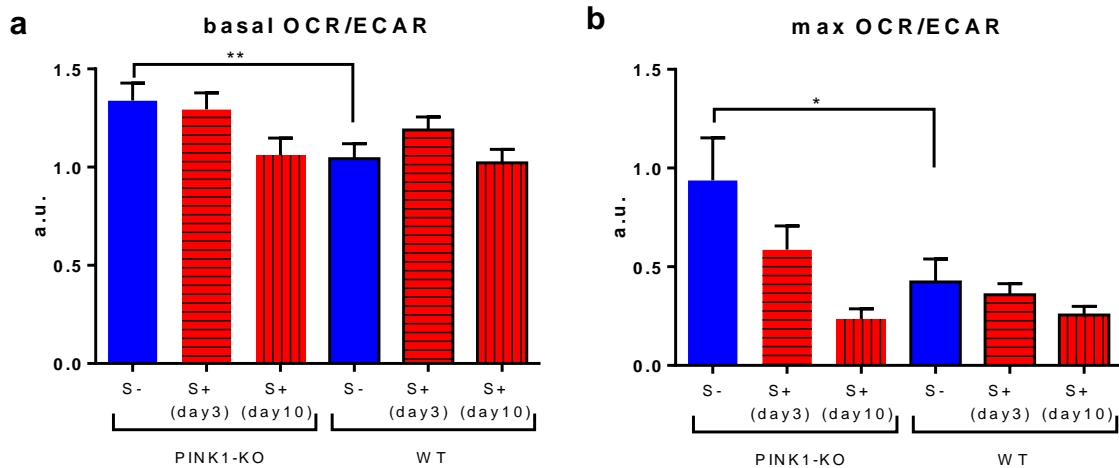


**Figura 34. Parámetros bioenergéticos de PBMCs de ratas PINK1-KO y WT hembra y macho estresadas y no estresadas.** **a)** Consumo de oxígeno No-mitochondrial, **b)** Respiración Basal, **c)** Respiración máxima, **d)** Pérdida de H<sup>+</sup> (Protón), **e)** Producción de ATP, **f)** Capacidad respiratoria **g)** Glicolisis Basal, **h)** Capacidad Glicolítica. Para el ensayo se usó: 1  $\mu$ M Oligomicina, 1.5  $\mu$ M FCCP, 1  $\mu$ M Antimicina, 100 nM Rotenona. Para grupos control (S-) n = 14 por grupo, para grupos estresados sacrificados en el día 3, el n = 10 por grupo, y en el día 10 el n = 4 por grupo. S- ratas no estresadas, S+ ratas estresadas. datos expresados como porcentaje promedio  $\pm$  SEM; \*p  $\leq$  0.05, \*\*p  $\leq$  0.01, \*\*\*p  $\leq$  0.001, \*\*\*\*p  $\leq$  0.0001, test t no pareado.

Para conocer cuál ruta bioenergética (glicólisis o OXPHOS) es más impactada en PINK1-KO-PBMCs, se graficó la relación de OCRs para ECARs en estado basal (OCR/ECAR basal, Fig. 35a) y cuándo el MMP es abatido por la exposición a

FCCP (OCR/ECAR maximal, Fig. 35b), para cada cohorte y condición experimental. Se observó que PINK1-KO-PBMCs usan más energía de la OXPHOS (OCR/ECAR basal tiene valores mayores de 1) que de la glicólisis (Fig. 35a). WT-PBMCs predominantemente usan ATP producido a través de la glicólisis como principal fuente de energía cuando el MMP es abatido (Fig. 35b), como se ha reportado en estudios previos (Macintyre and Rathmell, 2013; Cheng, Joosten and Netea, 2014), mientras que, PINK1-KO-PBMCs no mostraron cambios. Sin embargo, PINK1-KO-PBMCs de ratas estresadas tendieron a la glicólisis, aunque no significativamente ( $p = 0.07$ , Fig. 35).

La disminución de la relación OCR/ECAR máxima (Fig. 35b) significa la preferencia de esas células para usar la glicólisis como principal productora de energía cuando el gradiente de protones está abatido y el MMP está alterado (causado por FCCP) esto puede ser atribuido a la particularidad de las propiedades metabólicas de esas células (O'Neill and Grahame Hardie, 2013). Estos datos están en concordancia con estudios previos donde, en fase aguda de una infección, la OXPHOS como fuente principal de ATP, usada por los PBMCs humanos en el estado basal de reposo, fue cambiada por glicólisis, como un mecanismo fisiológico de defensa (Cheng *et al.*, 2016). La glicólisis es una marca en la respuesta inflamatoria, a pesar de ello, esto no ocurre en PINK1-KO-PBMCs (Fig. 35b), lo que quiere decir que la falta de PINK1 podría disminuir la capacidad del sistema inmune para proteger contra antígenos externos o estimulantes inflamatorios. Estos datos soportan estudios previos acerca de la implicación de PINK1 en la respuesta inmune (Matheoud *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2019).



**Figura 35. OCR/ECAR de WT y PINK1-KO PBMCs.** a) OCR/ECAR Basal y b) OCR/ECAR maximal en ratas PINK1-KO y WT PBMCs hembras y macho. Datos expresados como porcentaje promedio de unidades arbitrarias (a.u.)  $\pm$  SEM. Para grupos control (S-) n = 14 por grupo, para grupos sacrificados en el día 3 el n = 10 por grupo, y en el día 10 el n = 4 por grupo. \*p  $\leq$  0.05, \*\*p  $\leq$  0.01, test t no pareado.

Las ratas PINK1-KO exhibieron deficiencias motrices severas y neurodegeneración después de 8 meses de edad (Dave *et al.*, 2014). Como no fueron encontrados cambios en la energía del metabolismo del cerebro en ratas KO jóvenes (ver ensayos de energía del metabolismo del cerebro), el incremento del metabolismo encontrado en PINK1-KO-PBMCs podría ser un marcador temprano para patologías incluida la neurodegeneración.

## ANÁLISIS DE PROTEÍNAS ANTIOXIDANTES EN PBMCs

**Hipótesis:** El estrés psicológico y la ausencia de PINK1 altera la expresión de proteínas antioxidantes en PBMCs.

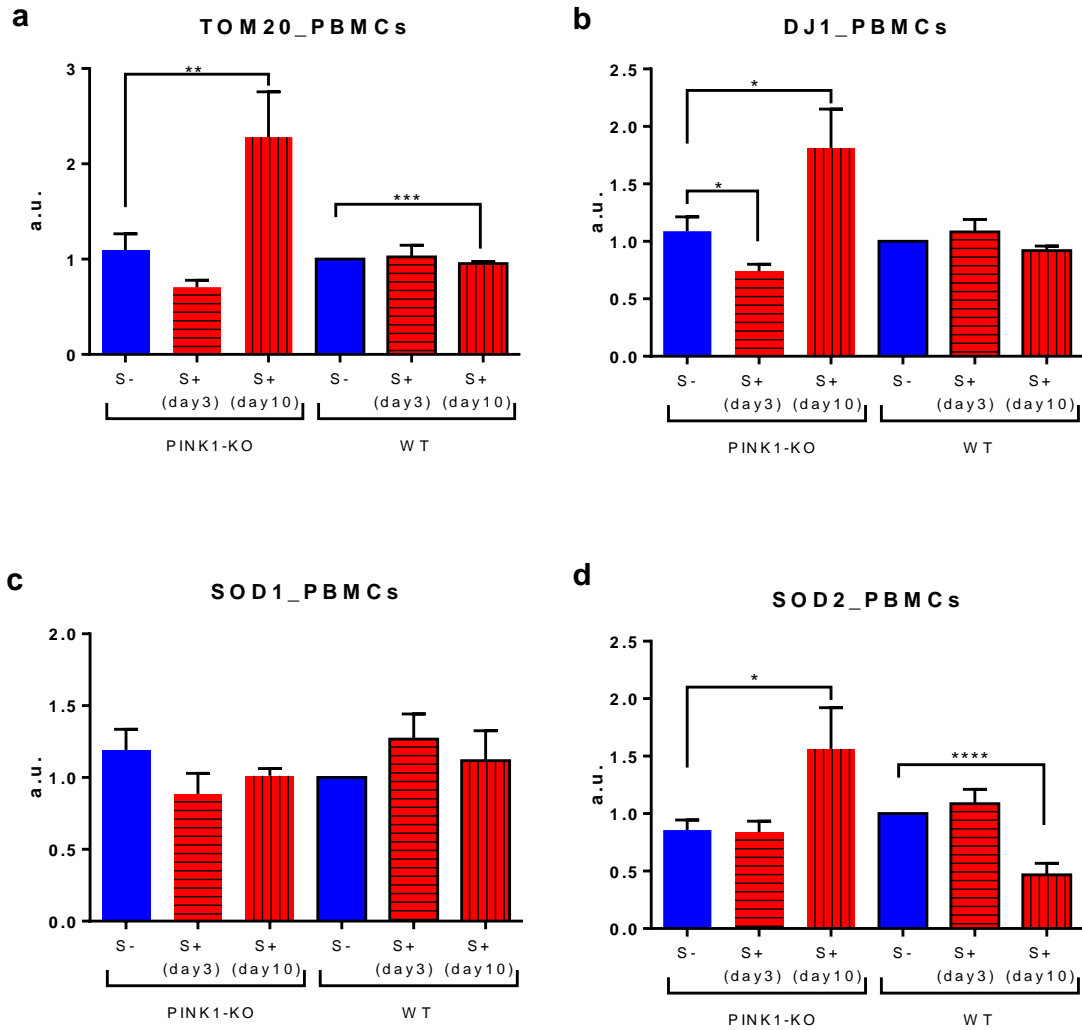
**Objetivos:**

- Evaluar el efecto del estrés psicológico agudo y a largo plazo sobre la expresión de DJ1, SOD1 y SOD2, contenido mitocondrial (TOM20) y expresión de BDNF de ratas WT y PINK1-KO usando ensayo WB.

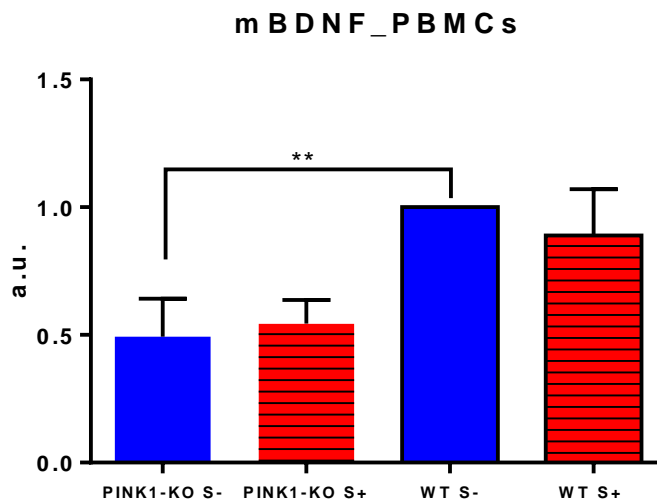
### **Resultados y discusión:**

Los resultados del ensayo metabólico fueron fortalecidos por los datos de WB, los cuales mostraron que la eficiencia mitocondrial de PBMCs en estrés está relacionada con PINK1. 7 días posteriores a la exposición al estrés, las células PINK1-KO mostraron un incremento en el contenido mitocondrial (incremento de la expresión de TOM20,  $p \leq 0.01$ , Fig. 36a) e incremento de la capacidad antioxidante (incremento de la expresión de SOD2 y DJ-1,  $p \leq 0.05$ , Fig. 36b y Fig. 36d), sin embargo, la principal fuente de energía para las células PINK1-KO fue cambiado a la glicólisis, significando que el estrés psicológico indujo la disminución de la eficiencia mitocondrial como una consecuencia de la pérdida de PINK1. De manera similar, las WT-PBMCs mostraron disminución significativa en contenido mitocondrial y expresión de SOD2 ( $p \leq 0.001$ , Fig. 36). A pesar de eso, no se observaron cambios en la energía metabólica de las células WT (Fig. 35). El hecho de que la energía metabólica en WT-PBMCs no fue afectada por el estrés muestra que la falta de PINK1 hace a las células que tengan una mayor sensibilidad al estrés oxidante.

Dado que BDNF ha sido propuesto como modulador de OXPHOS y de leucocitos, la menor eficiencia bioenergética observada en las PINK1-KO PBMCs podría estar asociada con el bajo nivel de BDNF ( $p \leq 0.01$ , Fig. 37). Asimismo, se encontró un bajo nivel de BDNF en el cerebro medio de ratas PINK1-KO jóvenes que mostraron disfunción motriz y ansiedad. Esto confirma que BDNF del plasma puede ser un importante biomarcador en la supervisión de neuropatologías.



**Figura 36. Parámetros antioxidantes (DJ-1, SOD1 y SOD2), contenido mitocondrial (TOM20) en PBMCs de ratas PINK1-KO y WT hembras y machos. a) Nivel de TOM20; b) Nivel de DJ-1; c) Nivel de SOD1; d) Nivel de SOD2.** Datos de WB fueron normalizados usando WT S- como grupo control. Para grupos control (S-) n = 14 por grupo, para grupos estresados sacrificados en el día 3 el n = 9 por grupo, y en el día 10 el n = 4 por grupo. S- ratas no estresadas, S+ ratas estresadas. datos expresados como la media  $\pm$  SEM; \*p  $\leq$  0.05, \*\*p  $\leq$  0.01, \*\*\*p  $\leq$  0.001, \*\*\*\*p  $\leq$  0.0001, test t no pareado.



**Figura 37. Nivel de mBDNF en PBMCs de ratas PINK1-KO y WT hembras y macho sacrificadas en el día 3.** Datos de WB fueron normalizados usando WT S- como grupo control. S- ratas no estresadas, S+ ratas estresadas. N=9 por grupo. Datos expresados como la media  $\pm$  SEM; \* $p \leq 0.01$ , test t no pareado.

La implicación de PINK1 en la neurodegeneración ha sido fuertemente descrita, sin embargo, aún no está claro el rol de esta proteína en otro tipo de células. El presente estudio mostró que PINK1 juega un rol crucial en el metabolismo mitocondrial de las PBMCs en estado de reposo, pero también en situaciones con un incremento de la demanda energética. Inesperadamente, la falta de PINK1 determinó un incremento significativo en la energía metabólica en PBMCs, usando como fuente de ATP tanto de OXPHOS como de glicólisis. Consideramos que estudios futuros pueden proponer esta proteína como un marcador importante para la prognosis o diagnóstico temprano de enfermedades neurodegenerativas.

#### DAÑO DE DNA EN PBMCs

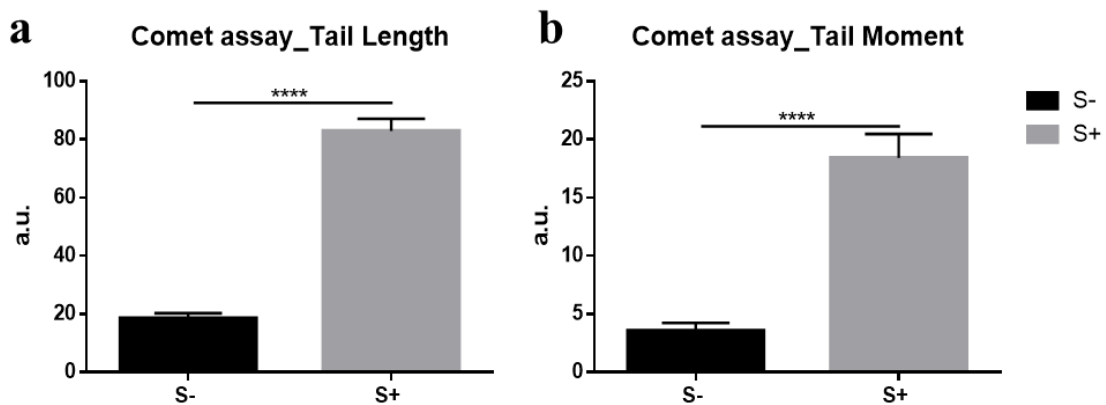
**Hipótesis:** El estrés psicológico induce a daño de DNA en PBMCs de ratas.

**Objetivos:**

- Evaluar el efecto del estrés psicológico sobre el DNA de PBMCs usando el ensayo cometa.

### Resultados y discusión:

El estrés psicológico induce daño oxidante de proteínas y lípidos en células inmunes, como se demostró en el estudio del perfil bioquímico usando la técnica de FTIR con fuente sincrotrón, e incluso de ADN como fue previamente publicado de nuestro grupo de trabajo (Vargas-Caraveo *et al.*, 2014). Usando el ensayo cometa, se mostró que 5 días de exposición a estrés inducen daño de ADN severo en PBMCs. Se observó un incremento significativo en la longitud de la cola y el momento de la cola en PBMCs de ratas estresadas (Fig. 38). Sin embargo, más sujetos por grupo son necesarios para completar el ensayo y sostener una conclusión definitiva.



**Figura 38. Daño de DNA en PBMCs inducido por estrés psicológico.** Usando el ensayo cometa se observó que PBMCs de ratas estresadas mostraron un aumento en la **a)** longitud de la cola **b)** el momento de la cola. La longitud de la cola representa la longitud de la migración del DNA ( $\mu\text{m}$ ) y el momento de la cola representa el producto de la longitud de la cola y el porcentaje del DNA total en la cola. S- ratas no estresadas, S+ ratas estresadas. Datos expresados como media  $\pm$  SEM; \*\*\*\* $p \leq 0.0001$ ; t-test.  $n = 2$  ratas por grupo, 100 células por rata.

## EFFECTOS DEL ESTRÉS EN VIDA TEMPRANA SOBRE EL CICLO CELULAR Y MITOCONDRIA ACTIVA DE PBMCs

**Hipótesis:** El estrés en vida temprana altera el ciclo celular e induce la activación crónica de mitocondria en PBMCs de rata.

### **Objetivos:**

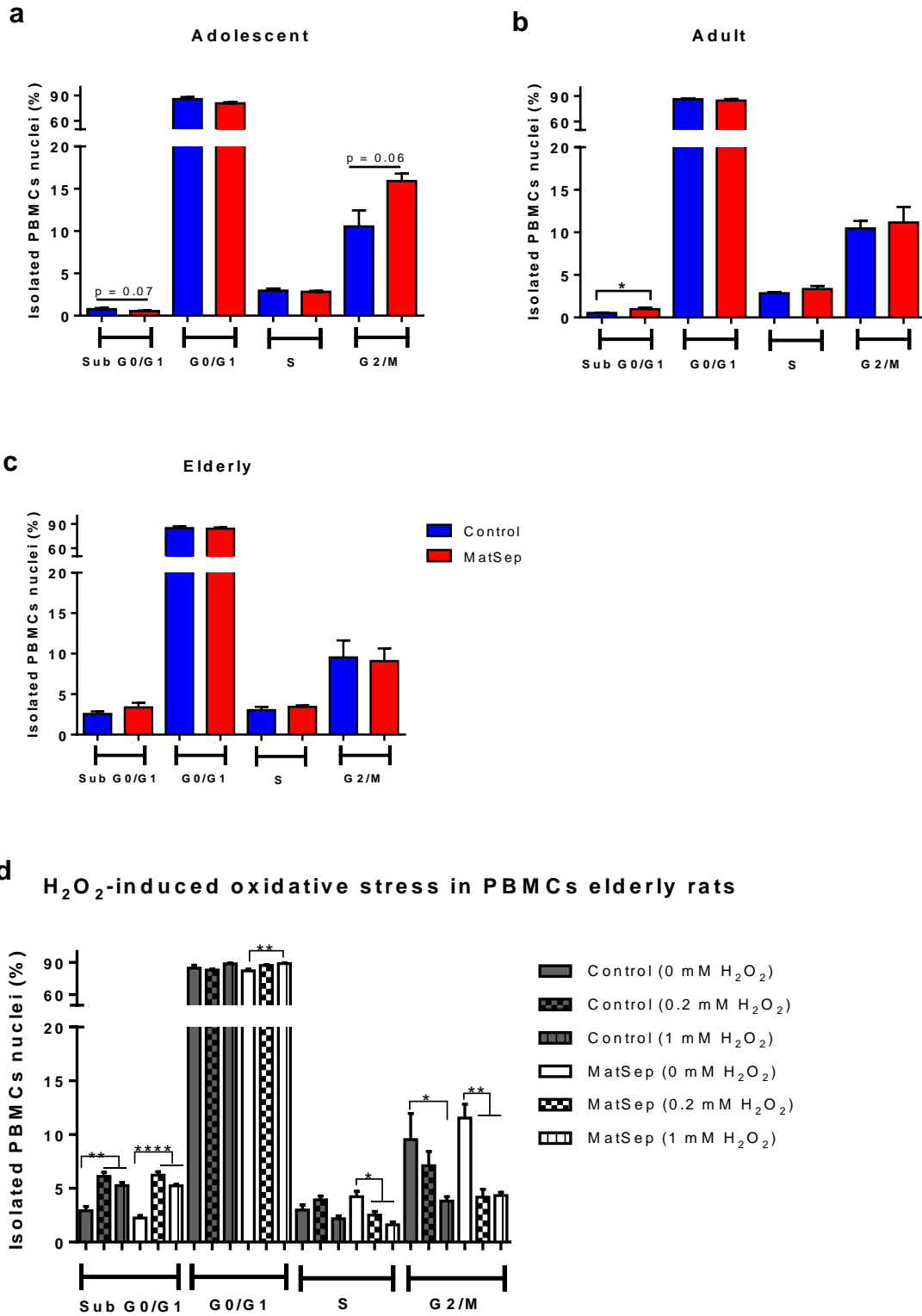
- Evaluar el efecto de estrés en vida temprana sobre el ciclo de PBMCs usando citometría de flujo.
- Evaluar el efecto de estrés en vida temprana sobre la actividad mitocondrial en PBMCs de rata usando citometría de flujo.

### **Resultados y discusión:**

A edades tempranas, los sistemas nervioso e inmune se encuentran aún inmaduros, y cualquier estresor puede impactar en el desarrollo del cerebro y causar efectos negativos de larga duración (Hensch, 2005). La separación materna aguda y crónica (MatSep) a edades tempranas está asociada con alteraciones morfológicas y fisiológicas en las estructuras cerebrales de varios mamíferos (Huot *et al.*, 2002; Andersen and Teicher, 2004; Mirescu, Peters and Gould, 2004; Fabricius, Wörtwein and Pakkenberg, 2008). El presente estudio mostró que la MatSep induce alteraciones a largo plazo en la respuesta inmune.

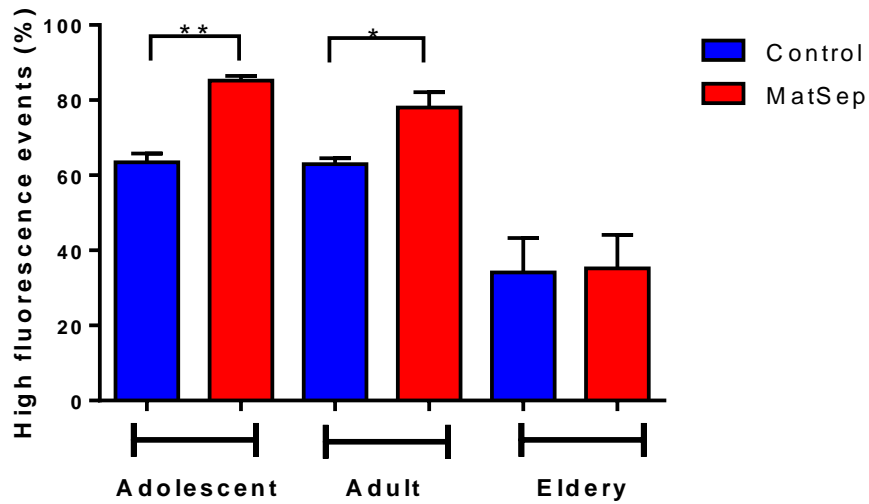
El grupo de adolescentes MatSep mostró disminución en la población celular con DNA dañado, las células apoptóticas (disminución de Sub G0/G1,  $p = 0.07$ ) probablemente causado por la alta capacidad de esas células para proliferar (incremento de G2/M,  $p = 0.06$ ) (Fig. 39a). Sin embargo, la población en Sub G0/G1 incrementó en la etapa adulta (Fig. 39b,  $p \leq 0.05$ ) y no mostró cambios en ratas adultas mayores (Fig. 39c). Adicionalmente, las PBMCs de ratas adultas mayores no estresadas fueron menos afectadas por el estrés inducido *in vitro* por la exposición a  $H_2O_2$  comparado con el grupo MatSep, mostrando un daño mayor a 1 mM  $H_2O_2$ : aumento de Sub G0/G1 ( $p \leq 0.01$ ) y disminución de G2/M ( $p \leq 0.05$ ).

El grupo MatSep respondió de igual manera a la exposición a 0.2 mM y a 1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: incremento de subG0/G1 ( $p \leq 0.0001$ ), disminución de S ( $p \leq 0.05$ ) y disminución de G2/M ( $p \leq 0.01$ ) (Fig. 39d).



**Figura 39. Efectos de MatSep sobre el ciclo de las PBMCs.** Porcentajes de aislamiento de núcleos de PBMCs en cada ciclo celular de **a)** adolescentes, **b)** adultos y **c)** adultos mayores. **d)** porcentajes de núcleos de PBMCs aislados expuestos a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en cada fase del ciclo celular del grupo de adultos mayores para control o MatSep. Sub G0/G1 representa las células hipodiploides asociadas con una población celular apoptótica. G0/G1 representa las células diploides, en la fase S están representadas las células hiperdiploides y en la fase G2/M están mostradas las poblaciones de células tetraploides. Los valores representan los porcentajes promedios  $\pm$  SEM, n = 3-5 por grupo. Datos analizados por test t no pareado, \* p  $\leq$  0.05, \*\* p  $\leq$  0.01, \*\*\* p  $\leq$  0.001, \*\*\*\* p  $\leq$  0.0001.

Además, se investigó la posible implicación de la mitocondria en el mecanismo de la respuesta inmune por medio de la identificación de la mitocondria activa usando MitoTracker™ Red CMXRos, un colorante catiónico fluorescente que es sensible a MMP (Pendergrass, Wolf and Pool, 2004). El estrés en vida temprana induce un incremento crónico del metabolismo mitocondrial en PBMCs mostrando un incremento de la población celular con alta fluorescencia de MitoTracker en ratas adolescentes (p  $\leq$  0.01) y adultas (p  $\leq$  0.05), pero no se encontraron cambios en ratas adultas mayores (Fig. 40). Sin embargo, las ratas adultas mayores mostraron una disminución fisiológica de la mitocondria activa en PBMCs comparada con las ratas jóvenes y no hubo cambios significativos en este nivel cuando las células fueron estresadas *in vitro* (datos no mostrados). Estos datos sugieren que el estrés en vida temprana induce un incremento crónico en la demanda de energía en PBMCs, un resultado que concuerda con los cambios encontrados en el perfil del ciclo celular en ratas adolescentes y adultas. Nuestros resultados concuerdan con estudios previos donde se encontró un incremento de la actividad mitocondrial y la demanda de energía en PBMCs, un incremento del número de PBMCs e incremento de los biomarcadores inflamatorios y producción de ROS en suero de humanos adultos expuestos a maltrato durante la niñez (Danese *et al.*, 2007; Boeckx *et al.*, 2016).



**Figura 40. Efectos de MatSep sobre actividad mitocondrial de PBMCs.** Porcentajes de PBMCs con alta fluorescencia de MitoTracker de adolescentes, adultos y adultos mayores para ratas MatSep y control. Los valores representan el porcentaje promedio  $\pm$  SEM,  $n = 3-5$  por grupo. los datos fueron analizados por test t no pareado, \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ .

Estudios previos mostraron que el estrés en vida temprana determina consecuencias a largo plazo sobre el desarrollo del eje HPA (Schmidt, 2010), neuroinflamación (Gracia-Rubio *et al.*, 2016), incremento crónico de marcadores inflamatorios en suero (Danese *et al.*, 2007; Boeckx *et al.*, 2016) y cambios permanentes en la señalización neuroinmune y en el potencial adaptativo a nuevas experiencias (Brenhouse, Danese and Grassi-Oliveira, 2018). En el presente estudio, esos efectos a largo plazo del estrés sobre el sistema inmune fueron asociados con posibles modificaciones epigenéticas inducidas por estrés oxidativo, lo que significa que la exposición a otro evento estresante puede inducir un nuevo estado de reactividad inmunológica.

## EFFECTO DE PIRACETAM EN EXPERIMENTOS *IN VIVO*

### *Comportamiento*

**Hipótesis:** El Piracetam disminuye la ansiedad inducida por estrés psicológico en ratas hembra y macho.

### **Objetivos:**

- Evaluar el efecto del Piracetam sobre el comportamiento de ratas expuestas a estrés psicológico usando la prueba de evitamiento de olor por ocultamiento.
- Evaluar el efecto de Piracetam sobre la ansiedad en ratas estresadas en la prueba del laberinto en cruz elevado.
- Evaluar el efecto del estrés y Piracetam sobre los niveles de corticosterona en plasma.

### **Resultados y discusión**

El estrés psicológico y los 9 días de tratamiento con Piracetam cambiaron el comportamiento de las ratas. En la Fig. 41 están representados 4 de los comportamientos más comunes observados en los 5 días de la aplicación de la prueba de evitamiento de olor por ocultamiento, presentados como el gasto de tiempo completo en la posición específica: tiempo invertido en la parte oscura de la caja (tiempo de escondimiento), tiempo de exploración en la parte abierta de la caja experimental (tiempo de exploración), tiempo invertido en la entrada de la parte oculta (tiempo con la cabeza afuera) y tiempo de examinación de la pieza de algodón impregnada (o no) con olor a gato (tiempo de aproximación).

Se observó que las ratas estresadas (S+P-) invirtieron significativamente más tiempo escondiéndose que las no estresadas (S-P-),  $p \leq 0.0001$ , este último grupo mostró una tendencia de aumento en el tiempo de esconderse a partir del tercer día, teniendo un máximo en el cuarto día. Por otro lado, S-P+ fue el grupo que invirtió menos tiempo escondiéndose a lo largo de todos los días de

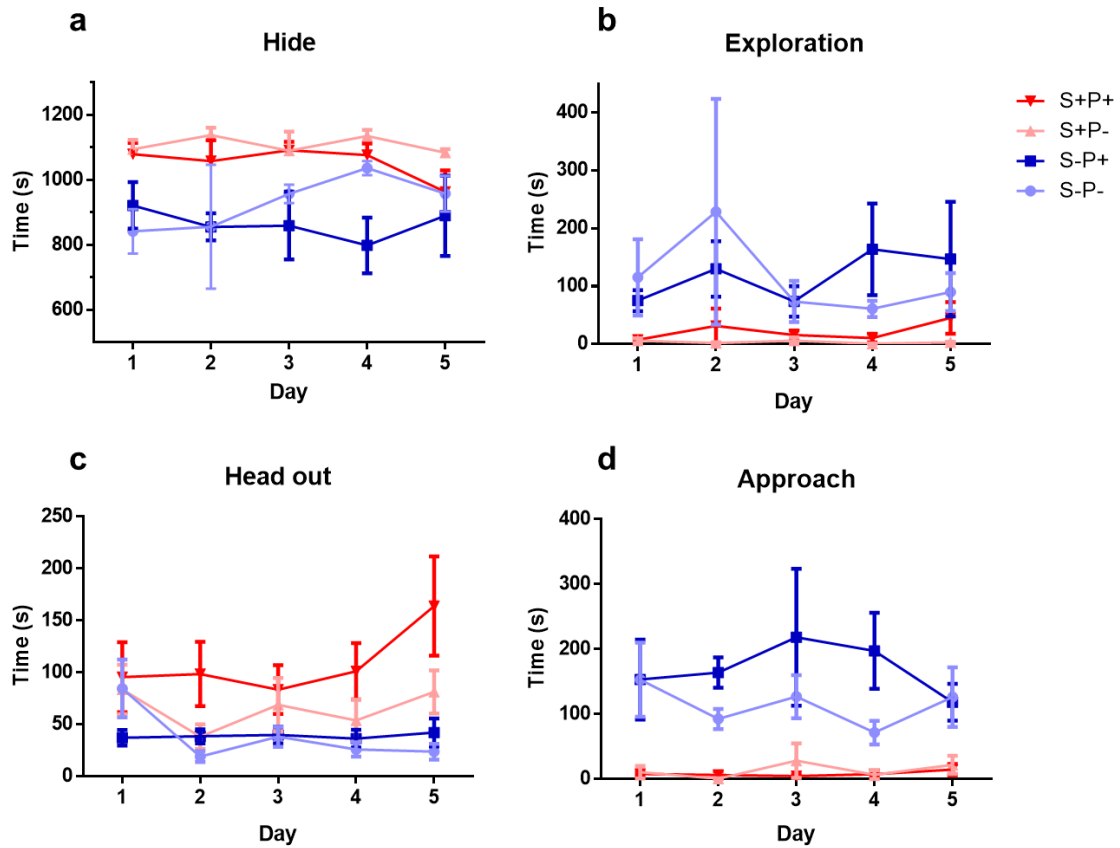
experimentación. El grupo S+P+ tuvo un tiempo de escondimiento similar que S+P-, excepto en el quinto día donde S+P+ mostró una tendencia a gastar menos tiempo escondiéndose que S+P- ( $p = 0.23$ ) (Fig. 41a).

S+P- fue el grupo que invirtió menos tiempo en exploración ( $p \leq 0.02$ , comparado con S-P-), lo que significa que las ratas están reconociendo el estímulo. El Piracetam incrementó el tiempo de exploración después del tercer día en S-P+ y en ratas estresadas (S+P+) tiende a rescatar el tiempo de exploración en el 5º día ( $p = 0.3$ , comparado con S+P-) (Fig. 41b).

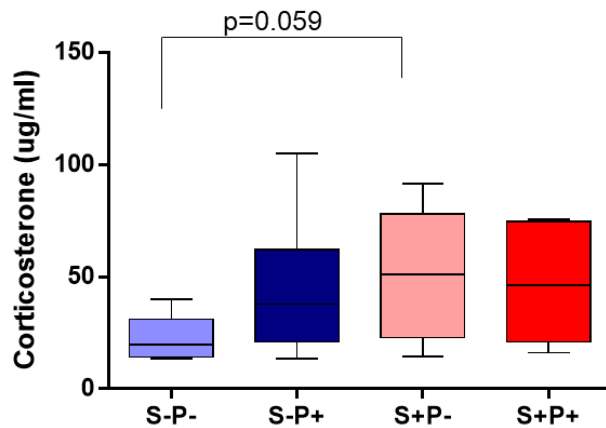
Además, S+P- mostró un incremento significativo en el tiempo invertido en la posición con la cabeza afuera, comparado con todos los grupos del quinto día ( $p \leq 0.02$ , comparado con S-P-) (Fig. 41c).

El tiempo de aproximación confirma de nuevo que las ratas reconocieron el estímulo. Los grupos S+P- and S+P+ se aproximaron a la pieza de tela solo por pocos segundos. Sin embargo, los grupos S-P- and S-P+ se aproximaron a la tela en cada una de las 5 sesiones e incluso interactuaron con ella ( $p \leq 0.0001$ , S-P- vs S+P-) (Fig. 41d).

Los cambios en el comportamiento se vieron reflejados en el nivel de corticosterona en plasma. Esta hormona incrementó en situación de estrés, pero también en ratas no estresadas tratadas con Piracetam, aunque no fue significativo (Fig. 42).

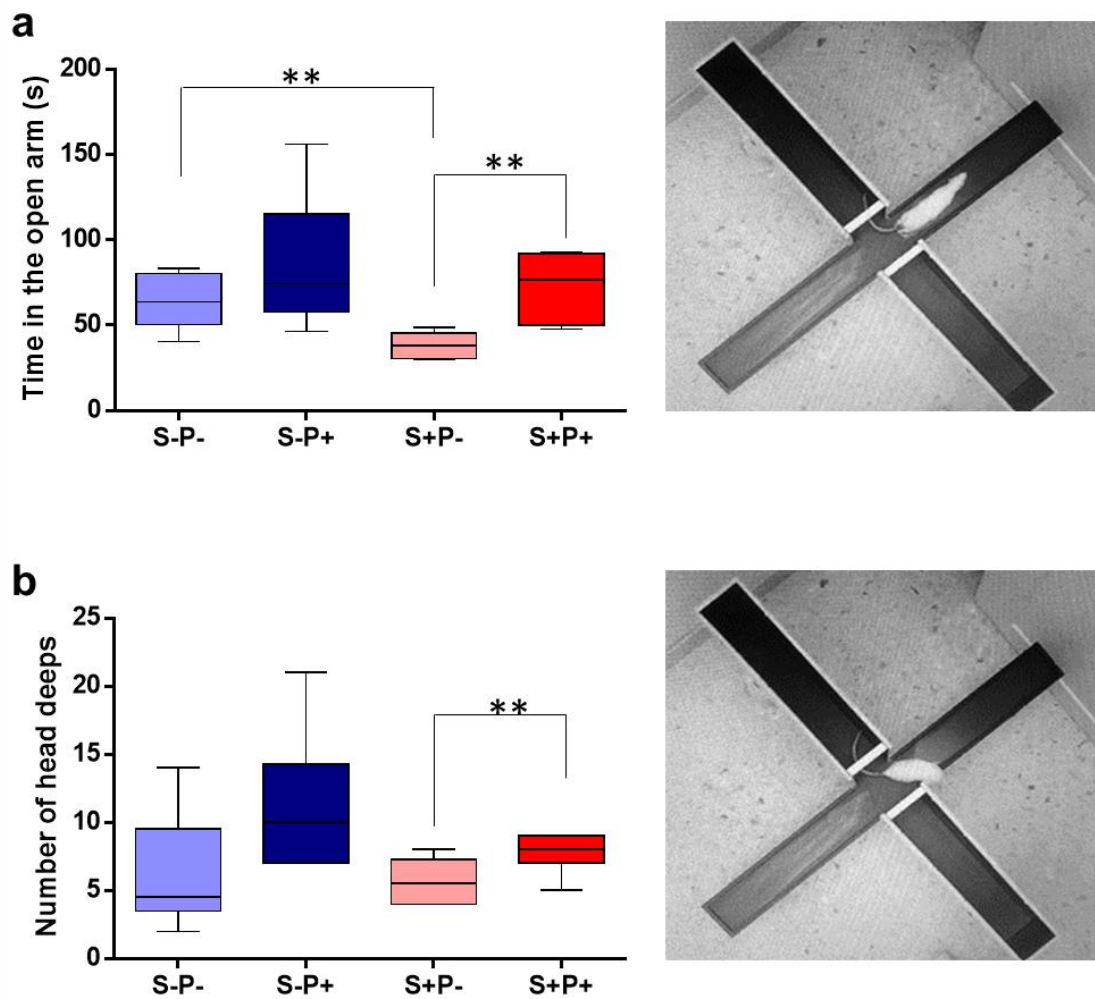


**Figura 41. Análisis de comportamiento durante 5 días de estrés.** Las ratas fueron expuestas a olor a gato como estresor por 5 días consecutivos y tratadas con 600 mg/kg de Piracetam por 9 días. **a)** Tiempo invertido en la parte oculta de la caja (escondimiento); **b)** Tiempo de exploración en la parte abierta de la caja experimental (exploración); **c)** Tiempo invertido en la entrada de la parte oculta de la caja (cabeza afuera); **d)** Tiempo de examinación de la pieza de algodón impregnada (o no) con olor a gato (aproximación). S-P- ratas no expuestas a estrés sin tratamiento con Piracetam; S-P+ ratas no expuestas a estrés, pero con tratamiento con Piracetam; S+P- ratas expuestas a estrés sin tratamiento con Piracetam; S+P+ ratas expuestas a estrés y tratadas con Piracetam. n = 6-7 por grupo. Puntajes en promedio  $\pm$  SEM.



**Figura 42. Nivel de corticosterona en plasma.** La concentración de corticosterona en plasma fue medida en el día 9 del experimento. S-P- ratas no expuestas a estrés sin tratamiento con Piracetam; S-P+ ratas no expuestas a estrés, pero con tratamiento con Piracetam; S+P- ratas expuestas a estrés sin tratamiento con Piracetam; S+P+ ratas expuestas a estrés y tratadas con Piracetam. n = 5-6 por grupo. Cada caja muestra el valor del percentil 50th, las líneas horizontales es el valor de la media y las barras indican los valores máximo y mínimo.

Posteriormente, la prueba del laberinto en cruz elevado fue usada para evaluar el comportamiento de ansiedad inducida por estrés (Fig. 43). En esta prueba, entre menos ansiedad tiene el animal más tiempo gasta explorando en el brazo abierto o escalando con la cabeza hacia abajo (Pellow *et al.*, 1985). Las ratas estresadas invirtieron menos tiempo en los brazos abiertos comparadas con las no estresadas ( $p = 0.007$ , Fig. 43a). El Piracetam incrementó significativamente este comportamiento en ratas estresadas ( $p = 0.002$ , vs S+P-). Incluso, las ratas estresadas escalaron con la cabeza hacia abajo menos que las no estresadas y el Piracetam incrementó significativamente este tiempo ( $p \leq 0.05$ , Fig. 43b).



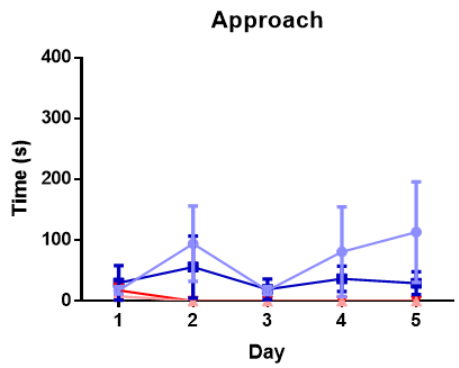
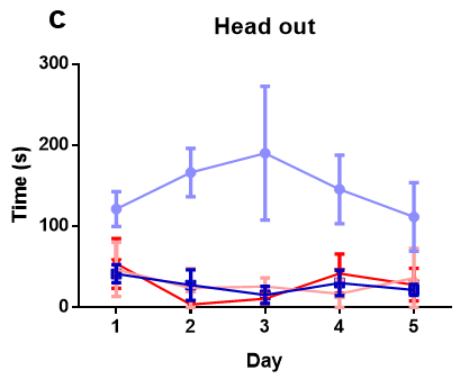
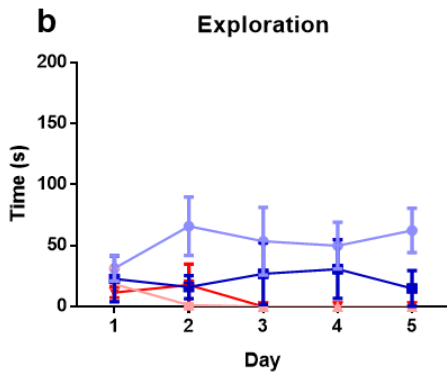
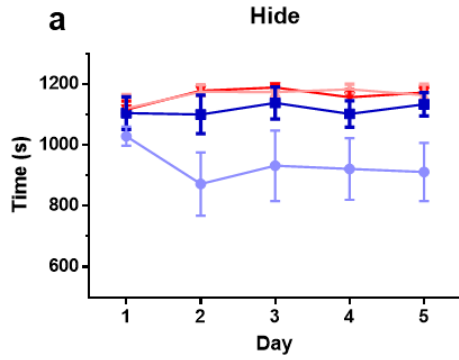
**Figura 43. Efecto del estrés y Piracetam sobre el comportamiento de ansiedad usando la prueba del laberinto en cruz elevado. a) tiempo invertido en el brazo abierto; b) número de bajadas de la cabeza. S-P- ratas no expuestas a estrés y sin tratamiento con Piracetam; S-P+ ratas no expuestas a estrés, pero con tratamiento con Piracetam; S+P- ratas expuestas a estrés sin tratamiento con Piracetam; S+P+ ratas expuestas a estrés y tratadas con Piracetam. n = 5-6 por grupo. Cada caja muestra el valor del percentil 50th, las líneas horizontales es el valor de la media y las barras indican los valores máximo y mínimo. \*p ≤ 0.05**

Las ratas expuestas al olor a gato reconocieron el estímulo y mostraron importantes respuestas defensivas: mayor ocultamiento y menos exploración, incremento en la posición con la cabeza afuera y menos tiempo de latencia en la aproximación para oler la tela con olor a gato.

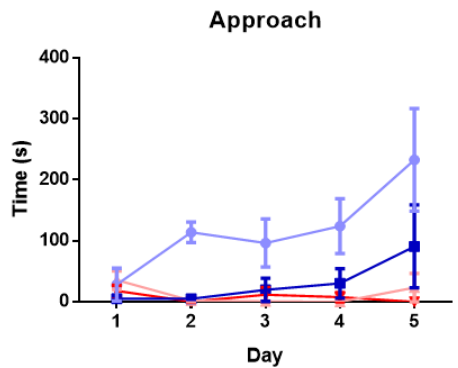
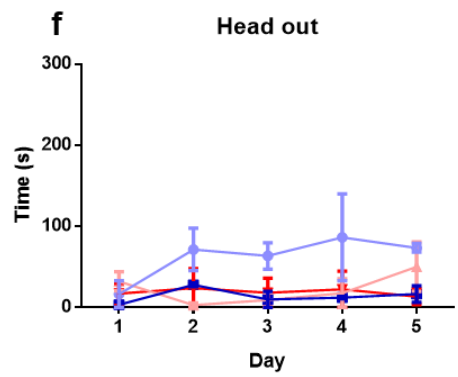
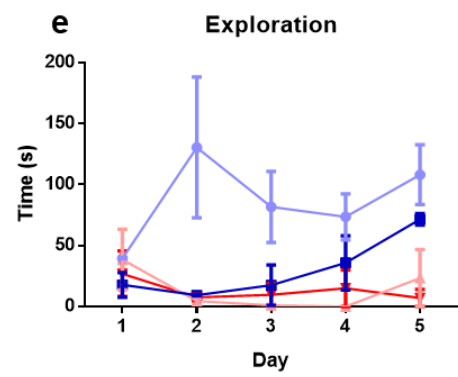
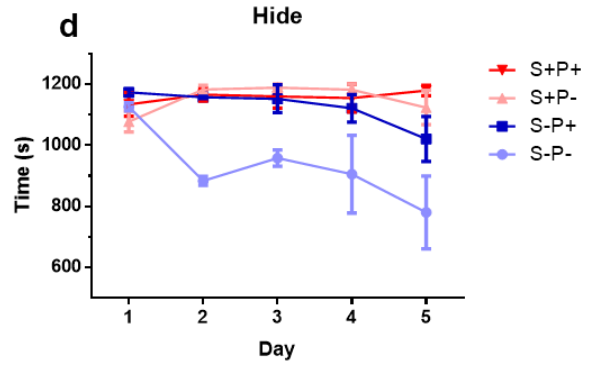
La reacción inicial continúa a lo largo de todos los días del experimento y culmina con comportamientos significantes de ansiedad. Las ratas estresadas tratadas con Piracetam reducen el miedo y los comportamientos de ansiedad, como han mostrado estudios previos que usaron este fármaco para mejorar el tiempo de latencia de transferencia de las ratas en la prueba del laberinto en cruz elevado (Gupta *et al.*, 2009; Kosta *et al.*, 2012; Muley *et al.*, 2012). Sin embargo, el grupo S-P+ se mostró más activo que el S-P-, observación que no es consistente con estudios previos (Gupta *et al.*, 2009; Kosta *et al.*, 2012).

Se estudió también el efecto del Piracetam con solo 6 días de administración (del día uno al día 6), como se presentó en el estudio 4, y se compararon los comportamientos de hembras y machos. Se observó que los machos no estresados exploran más que las hembras, pero las hembras exhibieron niveles más altos de comportamiento defensivo invertido mayor tiempo con la posición de la cabeza afuera. Al igual que en el estudio 3, en estrés, todos los animales exploraron menos, se esconden más tiempo y casi no tocan la pieza de tela (Fig. 44). Por otra parte, el Piracetam no tiene efecto sobre ratas estresadas, pero induce a un comportamiento defensivo en ratas no estresadas en el día 5, igual como se observó en la Fig. 41. Se piensa que los efectos positivos significativos de este fármaco pueden ser obtenidos después de al menos 9 días de administración.

## Females



## Males



**Figura 44. Diferencias conductuales en la respuesta al olor a gato asociadas al sexo.** Fueron analizados en hembras (**a-c**) y en machos (**d-f**) el tiempo invertido en la parte oscura de la caja (ocultamiento), el tiempo de exploración en la parte abierta de la caja experimental (exploración), el tiempo invertido en la entrada de la caja (cabeza afuera) y el tiempo de examinación de la pieza de algodón impregnada (o no) con olor a gato (aproximación). S-P- ratas no expuestas a estrés y sin tratamiento con Piracetam; S-P+ ratas no expuestas a estrés, pero con tratamiento con Piracetam; S+P- ratas expuestas a estrés sin tratamiento con Piracetam; S+P+ ratas expuestas a estrés y tratadas con Piracetam. Datos son la media. n = 3-4 machos por grupo y 6-7 hembras por grupo. Se presentan los promedios aritméticos y errores estándar asociados.

*Actividad de SOD Total y GST en PFC, HC, tálamo e hipotálamo en ratas hembra y macho*

**Hipótesis:** El Piracetam mejora la actividad de SOD y GST en PFC, HC, tálamo e hipotálamo de ratas estresadas.

**Objetivos:**

- Evaluar el efecto de Piracetam sobre la actividad SOD y GST en PFC, HC, tálamo e hipotálamo de ratas estresadas hembra y macho.

**Resultados and discusión:**

Seis días de tratamiento con Piracetam no fueron suficientes para cambiar la ansiedad inducida por los cinco días de estrés (Fig. 44). Sin embargo, se presupone que el estrés oxidante en el cerebro inducido por estrés psicológico puede ser atenuado por este fármaco. Para esto, se analizó la actividad de SOD total y GST, dos de las enzimas antioxidantes más comunes en PFC, HC, tálamo e hipotálamo de ratas hembra y macho. Se encontraron resultados interesantes en este nivel, sin embargo, no fueron significativos. En PFC y HC, el estrés incrementó la actividad de la GST en machos. También, la actividad GST disminuyó en el tálamo tanto en ratas macho como en hembras, pero incrementó en el hipotálamo de machos (tabla 14 y 15). El Piracetam no mostró efectos a este nivel.

**Tabla 14. Actividad de SOD total y GST en cerebro de hembras (corteza prefrontal, hipocampo, tálamo, hipotálamo).** Las ratas fueron expuestas por 5 días a estrés y el Piracetam fue administrado por 6 días (estudio 4). S-P- ratas no expuestas a estrés y sin tratamiento con Piracetam; S-P+ ratas no expuestas a estrés, pero con tratamiento con Piracetam; S+P- ratas expuestas a estrés sin tratamiento con Piracetam; S+P+ ratas expuestas a estrés y tratadas con Piracetam. Datos son la media. n = 6-7 por grupo. Datos en media  $\pm$  SD; ANOVA de una vía, LSD de Fisher.

|   | <b>Corteza prefrontal</b> | <b>Hipocampo</b>    | <b>Tálamo</b>       | <b>Hipotálamo</b>   |
|---|---------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| <b>Actividad de SOD total (U/mg proteína)</b> |                           |                     |                     |                     |
| S-P-  | 278.47 $\pm$ 94.81        | 288.72 $\pm$ 83.8   | 325.74 $\pm$ 44.97  | 368.49 $\pm$ 154.50 |
| S-P+  | 270.38 $\pm$ 121.03       | 312.03 $\pm$ 81.56  | 319.98 $\pm$ 84.3   | 368.48 $\pm$ 88.95  |
| S+P-  | 257.72 $\pm$ 110.19       | 184.36 $\pm$ 146.64 | 349.15 $\pm$ 96.89  | 368.25 $\pm$ 147.39 |
| S+P+  | 316.48 $\pm$ 212.71       | 281.36 $\pm$ 83.38  | 296.38 $\pm$ 103.86 | 327.22 $\pm$ 121.89 |
| <b>Actividad de GST (U/mg proteína)</b>       |                           |                     |                     |                     |
| S-P-  | 25.78 $\pm$ 9.03          | 27.79 $\pm$ 4.46    | 17.4 $\pm$ 4.85     | 21.3 $\pm$ 15.99    |
| S-P+  | 21.84 $\pm$ 6.13          | 29.92 $\pm$ 9.81    | 16.53 $\pm$ 6.36    | 38.46 $\pm$ 25.14   |
| S+P-  | 27.78 $\pm$ 11.1          | 27.76 $\pm$ 5.6     | 12.04 $\pm$ 8.71    | 21.09 $\pm$ 12.79   |
| S+P+  | 24.63 $\pm$ 7.74          | 31.11 $\pm$ 5.2     | 10.98 $\pm$ 9.23    | 19.55 $\pm$ 17.36   |

**Tabla 15. Actividad de SOD total y GST en cerebro de machos (corteza prefrontal, hipocampo, tálamo, hipotálamo).** Las ratas fueron expuestas por 5 días a estrés y el Piracetam fue administrado por 6 días (estudio 4). S-P- ratas no expuestas a estrés y sin tratamiento con Piracetam; S-P+ ratas no expuestas a estrés, pero con tratamiento con Piracetam; S+P- ratas expuestas a estrés sin tratamiento con Piracetam; S+P+ ratas expuestas a estrés y tratadas con Piracetam. Datos son la media. n = 3-4 por grupo. Datos en media  $\pm$  SD; ANOVA de una vía, LSD de Fisher.

|   | <b>Corteza prefrontal</b> | <b>Hipocampo</b>    | <b>Tálamo</b>      | <b>Hipotálamo</b>   |
|---|---------------------------|---------------------|--------------------|---------------------|
| <b>Actividad de SOD total (U/mg proteína)</b> |                           |                     |                    |                     |
| S-P-  | 320.9 $\pm$ 136.34        | 371.07 $\pm$ 155.4  | 409.93 $\pm$ 18.21 | 357.62 $\pm$ 126.41 |
| S-P+  | 347.67 $\pm$ 158.14       | 345.09 $\pm$ 101.81 | 289.52 $\pm$ 86.98 | 259.92 $\pm$ 124.49 |
| S+P-  | 384.95 $\pm$ 201.88       | 376.86 $\pm$ 99.72  | 305.39 $\pm$ 92.35 | 409.35 $\pm$ 153.97 |
| S+P+  | 277.02 $\pm$ 71.94        | 264.93 $\pm$ 84.77  | 281.64 $\pm$ 47.42 | 342.41 $\pm$ 83.12  |

| Actividad de GST (U/mg proteína) |              |              |              |              |
|----------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| S-P-                             | 17.51 ± 2.07 | 22.15 ± 2.39 | 14.07 ± 4.51 | 12.49 ± 9.58 |
| S-P+                             | 24.33 ± 5.21 | 25.88 ± 6.27 | 9.52 ± 4     | 9.25 ± 9.17  |
| S+P-                             | 23.18 ± 4.81 | 27.4 ± 7.41  | 9.78 ± 7.05  | 22.8 ± 5.7   |
| S+P+                             | 23.03 ± 2.84 | 29.56 ± 3.3  | 14.37 ± 2.18 | 27.86 ± 1.12 |

*Peso corporal y parámetros bioquímicos en sangre de ratas hembra y macho*

**Hipótesis:** El Piracetam protege el peso corporal y los parámetros bioquímicos en sangre alterados por el estrés.

**Objetivos:**

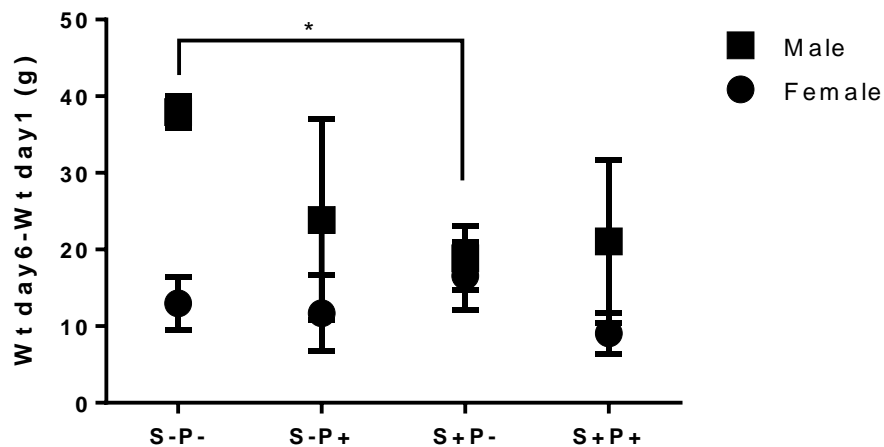
- Evaluar el efecto de Piracetam sobre el peso corporal y los parámetros bioquímicos en ratas estresadas hembra y macho.
- Evaluar el efecto del estrés y Piracetam sobre el peso de glándulas adrenales en ratas estresadas hembra y macho.

**Resultados and discusión:**

Se analizó el peso corporal y los parámetros bioquímicos en sangre de ratas hembra y macho expuestas durante 5 días a estrés y tratadas con Piracetam por 6 días (Estudio 4).

Los machos estresados tuvieron una pérdida de peso significativa ( $p \leq 0.05$ ), sin embargo, las hembras estresadas tendieron a ganar peso (Fig. 45) y el Piracetam no tuvo ningún efecto. Estos datos se encuentran en concordancia con los parámetros bioquímicos en sangre, donde, en estrés las hembras mostraron disminuciones del nivel de glucosa y triglicéridos, pero los machos exhibieron un incremento de ambos (Tabla 16 y 17). Estudios previos han mostrado que la sensación de hambre es controlada por el nivel de glucosa en la sangre y la actividad de la insulina y esto está directamente conectado con los cambios en el

peso corporal (Sprague and Arbeláez, 2011). El Piracetam regula la glucosa en sangre en el estrés, tanto en machos como en hembras, a pesar de eso, los animales no estresados mostraron niveles alterados cuando fueron tratados con este fármaco (Table 16 and 17). De hecho, estudios previos mostraron que el Piracetam cambia los niveles de glucosa en diferentes modelos experimentales (Abdel-Salam *et al.*, 2011; Abdel-Salam, Salem and El-shamarka, 2013; Pandey and Garabadu, 2016).



**Figura 45. Cambios de peso corporal inducido por la exposición a 5 días de estrés y 6 días de tratamiento con Piracetam.** S-P- ratas no expuestas a estrés y sin tratamiento con Piracetam; S-P+ ratas no expuestas a estrés, pero con tratamiento con Piracetam; S+P- ratas expuestas a estrés sin tratamiento con Piracetam; S+P+ ratas expuestas a estrés y tratadas con Piracetam. Datos son la media. n = 3-4 machos por grupo y 6-7 hembras por grupo. Datos en medias  $\pm$  SEM; ANOVA de una vía, LSD de Fisher; \*  $p \leq 0.05$ .

Además, se encontraron ligeros cambios en los parámetros funcionales de hígado y riñones. Sin embargo, no fueron significativos, la bilirrubina directa e indirecta fue disminuida, y el aspartato aminotransferasa (AST) y la alanina aminotransferasa (ALT) fueron incrementadas en animales estresados y el Piracetam tendió a recuperar esos niveles. Además, el estrés alteró ligeramente la función renal y el Piracetam actúa especialmente en hembras donde el grupo S+P+ mostró una

disminución significativa de urea, creatinina y nitrógeno de urea en sangre (BUN), S-P+ mostró disminución significativa de niveles de creatinina (Tabla 16 and 17).

**Tabla 16. Parámetros bioquímicos en sangre en hembras.** Las ratas fueron expuestas durante 5 días a estrés y el Piracetam fue administrado por 6 días (estudio 4). S-P- ratas no expuestas a estrés y sin tratamiento con Piracetam; S-P+ ratas no expuestas a estrés, pero con tratamiento con Piracetam; S+P- ratas expuestas a estrés sin tratamiento con Piracetam; S+P+ ratas expuestas a estrés y tratadas con Piracetam. Datos son la media. n= 6-7 hembras por grupo. Datos en medias  $\pm$  SEM; ANOVA de una vía, LSD de Fisher; \*  $p \leq 0.05$ . comparado con S-P-; †  $p \leq 0.05$  comparado con S+P-; ‡  $p \leq 0.09$  c comparado con S+P-. Química de suero sanguíneo fue estudiada usando un analizador clínico Beckman Coulter AU480 (Olympus Life Science).

|                                | <b>S-P-</b>      | <b>S-P+</b>        | <b>S+P-</b>       | <b>S+P+</b>        |
|--------------------------------|------------------|--------------------|-------------------|--------------------|
| Glucosa (mmol/L)               | 14.49 $\pm$ 2.43 | 10.41 $\pm$ 4.59 * | 10.67 $\pm$ 1.7 * | 14.14 $\pm$ 3.71 ‡ |
| Triglicéridos (mmol/L)         | 1.19 $\pm$ 0.27  | 1.27 $\pm$ 0.69    | 0.88 $\pm$ 0.09   | 1.26 $\pm$ 0.63    |
| Colesterol (mmol/L)            | 1.68 $\pm$ 0.27  | 1.68 $\pm$ 0.2     | 1.62 $\pm$ 0.16   | 1.65 $\pm$ 0.32    |
| <b>FUNCIÓN de HÍGADO</b>       |                  |                    |                   |                    |
| Bilirrubina directa (umol/L)   | 0.46 $\pm$ 0.25  | 0.35 $\pm$ 0.13    | 0.32 $\pm$ 0.13   | 0.4 $\pm$ 0.16     |
| Bilirrubina indirecta (umol/L) | 1.27 $\pm$ 0.58  | 0.73 $\pm$ 0.37    | 0.94 $\pm$ 0.62   | 0.65 $\pm$ 0.51    |
| Bilirrubina total (umol/L)     | 1.73 $\pm$ 0.66  | 1.25 $\pm$ 0.44    | 1.3 $\pm$ 0.51    | 1.2 $\pm$ 0.84     |
| AST (U/L)                      | 50.4 $\pm$ 5.93  | 51.77 $\pm$ 8.39   | 57.36 $\pm$ 19.05 | 53.13 $\pm$ 9.06   |
| ALT (U/L)                      | 34.17 $\pm$ 7.22 | 33.07 $\pm$ 3.44   | 34.24 $\pm$ 7.67  | 34.96 $\pm$ 6.6    |
| Albumina (g/L)                 | 36.47 $\pm$ 1.72 | 36.04 $\pm$ 1.51   | 35.73 $\pm$ 2.57  | 35.78 $\pm$ 2.37   |
| Proteína total (g/dL)          | 65.17 $\pm$ 8.43 | 64.43 $\pm$ 10.09  | 62.03 $\pm$ 9.53  | 63.86 $\pm$ 11.21  |
| <b>FUNCIÓN de RIÑONES</b>      |                  |                    |                   |                    |
| Urea (mmol/L)                  | 5.46 $\pm$ 0.86  | 5.68 $\pm$ 1.12    | 5.8 $\pm$ 0.89    | 4.63 $\pm$ 0.65 †  |
| Creatinina (umol/L)            | 24.71 $\pm$ 3.65 | 19.24 $\pm$ 5.06 * | 22.9 $\pm$ 5.37   | 21.67 $\pm$ 4.96   |
| BUN (mmol/L)                   | 2.59 $\pm$ 0.37  | 2.64 $\pm$ 0.54    | 2.71 $\pm$ 0.42   | 2.16 $\pm$ 0.3 †   |

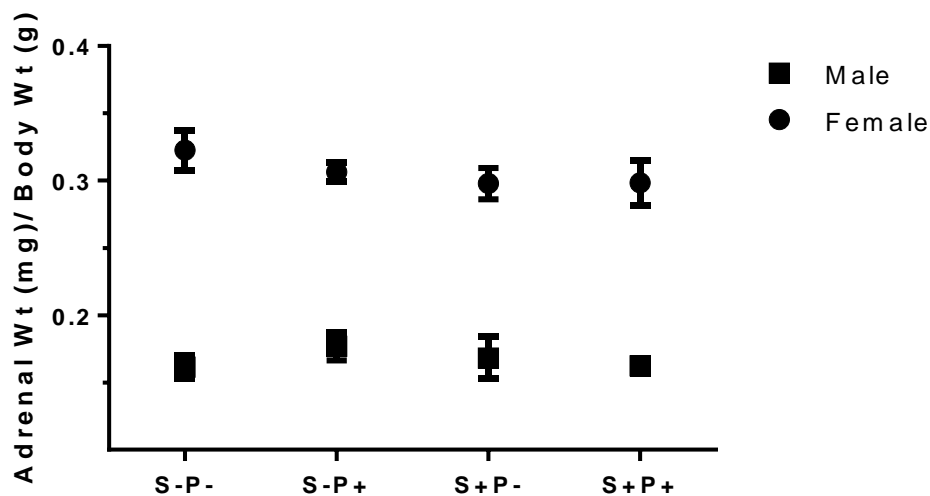
aspartate aminotransferase (AST); alanine aminotransferase (ALT), blood urea nitrogen (BUN)

**Table 17. Parámetros bioquímicos en sangre en machos.** Las ratas fueron expuestas durante 5 días a estrés y el Piracetam fue administrado por 6 días (estudio 4). S-P- Ratas ya sea expuestas o no a estrés con tratamiento con Piracetam; S-P+ ratas no expuestas a estrés, pero con tratamiento con Piracetam; S+P- ratas expuestas a estrés sin tratamiento con Piracetam; S+P+ ratas expuestas a estrés y tratadas con Piracetam. Datos son la media. n= 3-4 machos por grupo. Datos en medias  $\pm$  SEM; ANOVA de una vía, LSD de Fisher; \*  $p \leq 0.05$ . comparado con S-P-; †  $p \leq 0.05$  comparado con S+P-; ‡  $p \leq 0.09$  c comparado con S+P-. Química de suero sanguíneo fue estudiada usando un analizador clínico Beckman Coulter AU480 (Olympus Life Science).

|                                | <b>S-P-</b>      | <b>S-P+</b>        | <b>S+P-</b>       | <b>S+P+</b>      |
|--------------------------------|------------------|--------------------|-------------------|------------------|
| Glucosa (mmol/L)               | 11.58 $\pm$ 2.21 | 15.68 $\pm$ 1.44 * | 15.2 $\pm$ 4.3    | 13.26 $\pm$ 1.29 |
| Triglicéridos (mmol/L)         | 0.88 $\pm$ 0.21  | 1.07 $\pm$ 0.11    | 1.13 $\pm$ 0.47   | 1.34 $\pm$ 0.09  |
| Colesterol (mmol/L)            | 1.59 $\pm$ 0.39  | 1.49 $\pm$ 0.26    | 1.57 $\pm$ 0.34   | 1.64 $\pm$ 0.33  |
| <b>FUNCIÓN de HÍGADO</b>       |                  |                    |                   |                  |
| Bilirrubina directa (umol/L)   | 0.35 $\pm$ 0.07  | 0.45 $\pm$ 0.35    | 0.4 $\pm$ 0.14    | 0.45 $\pm$ 0.07  |
| Bilirrubina indirecta (umol/L) | 1.47 $\pm$ 0.28  | 1.41 $\pm$ 0.01    | 0.675 $\pm$ 0.18  | 1.95 $\pm$ 0.45  |
| Bilirrubina total (umol/L)     | 1.7 $\pm$ 0.57   | 1.77 $\pm$ 0.29    | 1.03 $\pm$ 0.46   | 2.1 $\pm$ 0.5    |
| AST (U/L)                      | 49.5 $\pm$ 4.42  | 62.87 $\pm$ 30.34  | 57.03 $\pm$ 11    | 46.83 $\pm$ 2.9  |
| ALT (U/L)                      | 37.43 $\pm$ 7.43 | 54 $\pm$ 25.58     | 48.38 $\pm$ 11.32 | 34.93 $\pm$ 2.01 |
| Albumina (g/L)                 | 34.99 $\pm$ 1.17 | 34.28 $\pm$ 1.95   | 34.82 $\pm$ 1.06  | 34.49 $\pm$ 1.21 |
| Proteína total (g/dL)          | 56.68 $\pm$ 6.43 | 54.23 $\pm$ 7.41   | 62.45 $\pm$ 3.83  | 64.73 $\pm$ 4.56 |
| <b>FUNCIÓN de RIÑONES</b>      |                  |                    |                   |                  |
| Urea (mmol/L)                  | 7.23 $\pm$ 2.12  | 6.05 $\pm$ 1.14    | 5.88 $\pm$ 0.44   | 5.38 $\pm$ 0.68  |
| Creatinina (umol/L)            | 25.55 $\pm$ 1.28 | 29.13 $\pm$ 15.33  | 27.28 $\pm$ 9.79  | 24.6 $\pm$ 11.97 |
| BUN (mmol/L)                   | 3.38 $\pm$ 0.99  | 2.82 $\pm$ 0.53    | 2.75 $\pm$ 0.2    | 2.51 $\pm$ 0.32  |

aspartate aminotransferase (AST); alanine aminotransferase (ALT), blood urea nitrogen (BUN)

También, se midió el peso adrenal en todos los grupos experimentales. El estrés y el Piracetam no afectaron a este nivel, sin embargo, se observó que las glándulas adrenales de hembras son casi dos veces más pesadas comparadas con las de los machos (Fig. 46).



**Figura 46. Peso de glándulas adrenales.** Las ratas fueron expuestas durante 5 días a estrés y el Piracetam fue administrado por 6 días (estudio 4). S-P- ratas no expuestas a estrés y sin tratamiento con Piracetam; S-P+ ratas no expuestas a estrés, pero con tratamiento con Piracetam; S+P- ratas expuestas a estrés sin tratamiento con Piracetam; S+P+ ratas expuestas a estrés y tratadas con Piracetam. Datos en medias  $\pm$  SEM. n= 3-4 machos por grupo y 6-7 hembras por grupo.

#### *Actividad de SOD, CAT, GST, GR y GPx en hígado de hembras*

**Hipótesis:** El Piracetam mejora la actividad SOD, CAT, GST, GR y GPx en hígado de ratas hembra estresadas.

#### **Objetivos:**

- Evaluar el efecto de Piracetam sobre la actividad de SOD, CAT, GST, GR y GPx en hígado de ratas hembra estresadas.

#### **Resultados and discusión**

Se observó que el estrés y el Piracetam cambian ligeramente la bioquímica de la sangre relacionada con las funciones hepáticas (Tabla 16 y 17). Posteriormente, se analizó la actividad enzimática de SOD, CAT, GST, GR y GPx en el hígado de ratas hembra. Se observó que el estrés disminuyó significativamente la actividad

de la GR e incrementó la actividad de la GPx ( $p \leq 0.05$ ) y el Piracetam no tuvo efecto alguno. Por otra parte, este fármaco parece actuar sobre la función de la CAT disminuyendo su actividad en los dos grupos S-P+ y S+P+ (Tabla 18).

**Tabla 18. Actividad de enzimas antioxidantes en hígado de hembras.** Las ratas fueron expuestas durante 5 días a estrés y el Piracetam fue administrado por 6 días (estudio 4). S-P- ratas no expuestas a estrés y sin tratamiento con Piracetam; S-P+ ratas no expuestas a estrés, pero con tratamiento con Piracetam; S+P- ratas expuestas a estrés sin tratamiento con Piracetam; S+P+ ratas expuestas a estrés y tratadas con Piracetam. Datos en medias  $\pm$  SEM; Datos son la media. n= 6-7 hembras por grupo.; \*  $p \leq 0.05$  comparado con S-P-, †  $p \leq 0.09$  comparado con S+P-

| U/mg tejido húmedo | S-P-                              | S-P+                                | S+P-                             | S+P+                                |
|--------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|
| SOD total          | 3305 $\pm$ 438.5                  | 3326 $\pm$ 164.4                    | 3228 $\pm$ 159.4                 | 3379 $\pm$ 488.7                    |
| SOD1               | 2236 $\pm$ 446.6                  | 2356 $\pm$ 178.1                    | 2169 $\pm$ 306.9                 | 2238 $\pm$ 633.9                    |
| SOD2               | 1068.5 $\pm$ 179.6                | 970.3 $\pm$ 132                     | 1059 $\pm$ 184.6                 | 1140 $\pm$ 150.4                    |
| CAT                | 2.22 $\pm$ 0.48 * 10 <sup>8</sup> | 1.68 $\pm$ 0.23 * 10 <sup>8</sup> * | 2.29 $\pm$ 0.6 * 10 <sup>8</sup> | 1.82 $\pm$ 0.36 * 10 <sup>8</sup> † |
| GST                | 223.6 $\pm$ 19.4                  | 219.5 $\pm$ 18.79                   | 227.3 $\pm$ 14.87                | 230.9 $\pm$ 20.34                   |
| GR                 | 3.62 $\pm$ 1.09                   | 3.22 $\pm$ 1.15                     | 2.44 $\pm$ 0.51 *                | 3.1 $\pm$ 0.73                      |
| GPx                | 4898 $\pm$ 1085                   | 5998 $\pm$ 1744                     | 9517 $\pm$ 4029 *                | 8195 $\pm$ 3389                     |

### *Espectro FTIR de PBMCs*

**Hipótesis:** El Piracetam protege los lípidos y las proteínas ante el estrés oxidante en las PBMCs de ratas hembra estresadas.

### **Objetivos**

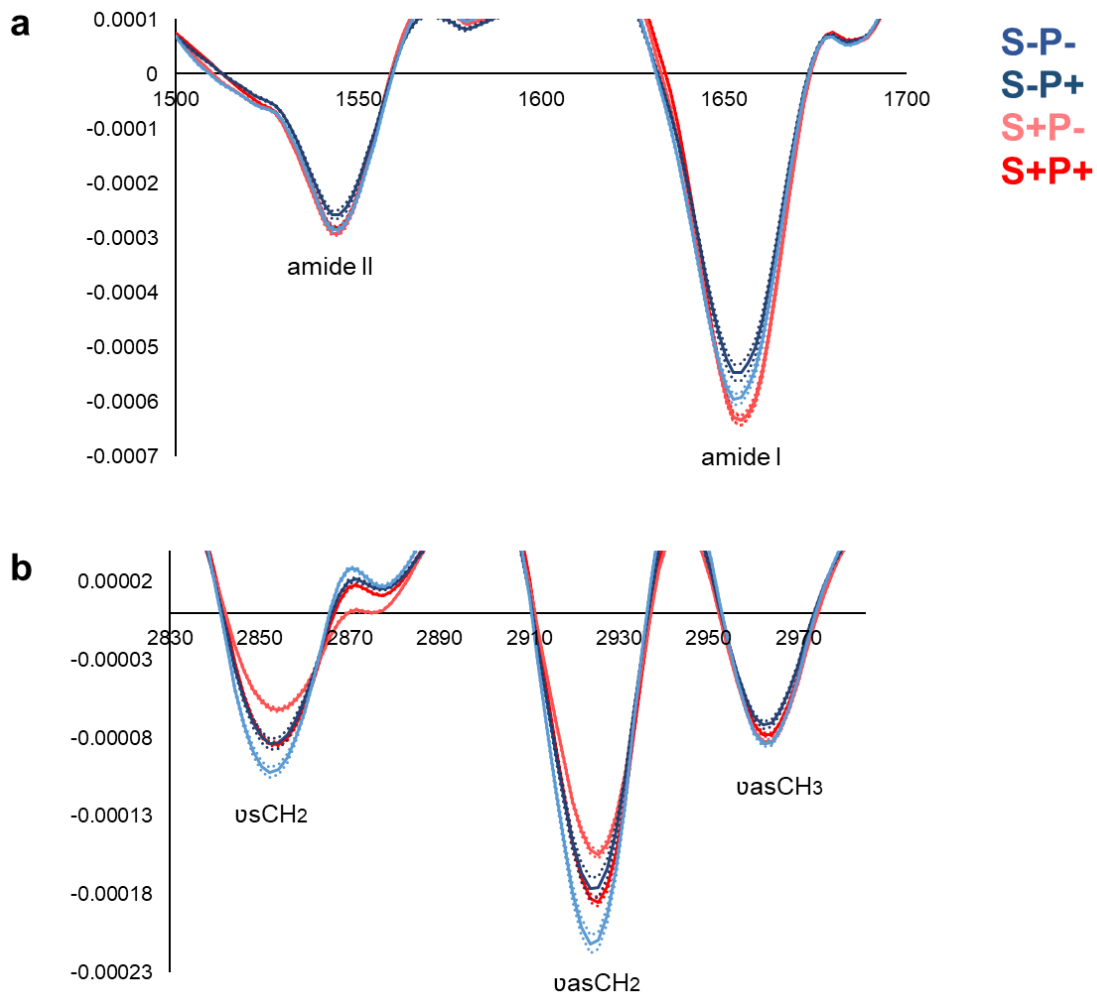
- Evaluar el efecto del estrés y Piracetam sobre los lípidos y perfil proteico de PBMCs ratas hembra estresadas usando microFTIR.

### **Resultados and discusión**

Usando tecnología sincrotrón basada en microespectroscopía con transformada de Fourier (SR- $\mu$ FTIR), el presente estudio provee información valiosa sobre el efecto del estrés y Piracetam en las PBMCs de ratas expuestas a estrés psicológico crónico.

Los resultados de SR- $\mu$ FTIR mostraron que el miedo y la ansiedad (Fig. 41-43) son reflejados por la alta peroxidación lipídica y daño en la estructura de las proteínas en PBMCs, lo que significa que una ruta por la cual el estrés psicológico puede estar relacionado con desórdenes clínicos es el efecto que este tienen sobre las células.

Solos o combinados, el Piracetam y el estrés cambian el perfil bioquímico de las PBMCs (Fig. 47).



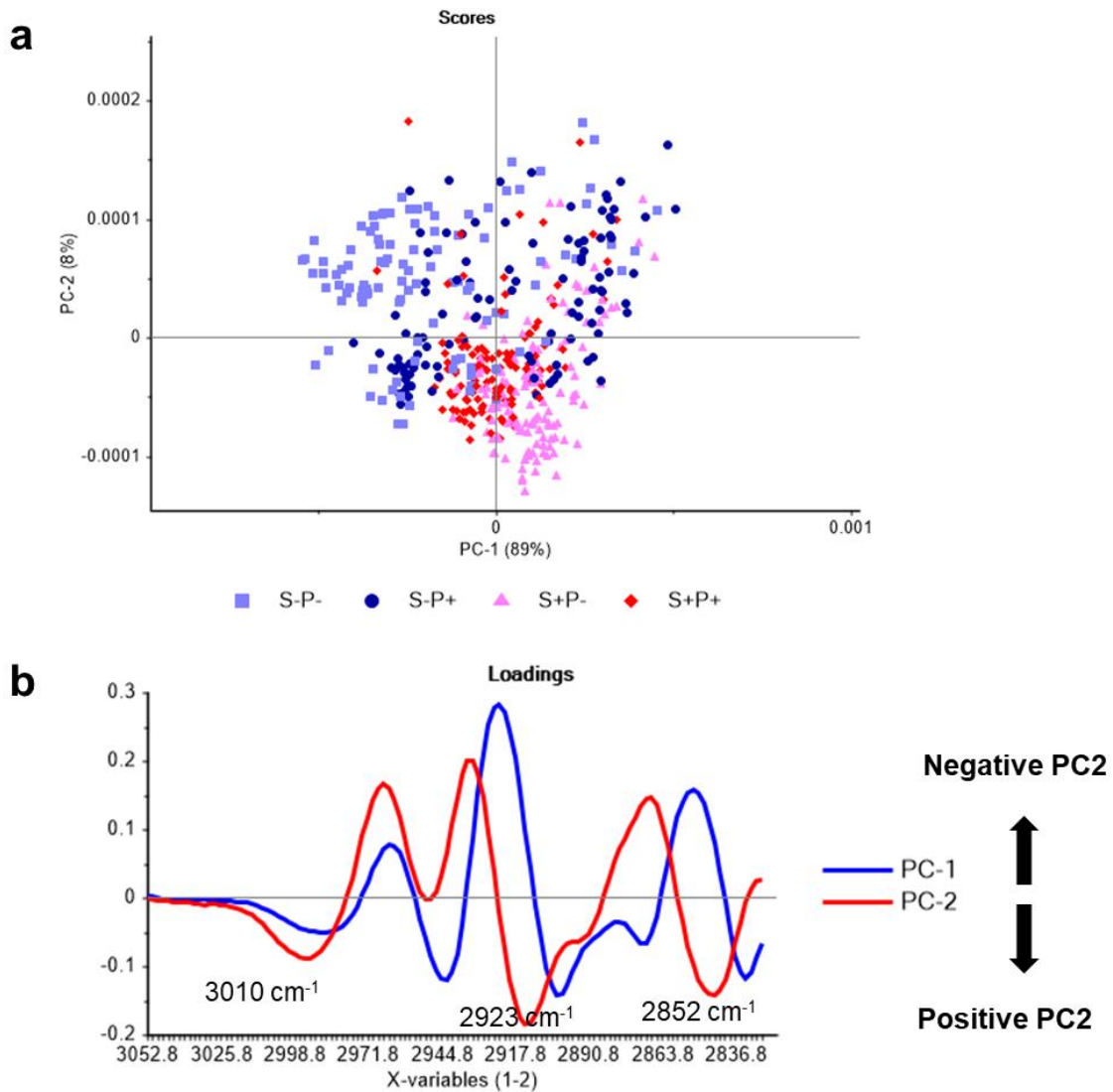
**Figura 47. Efecto del estrés y Piracetam sobre el espectrograma de FTIR de la PBMCs. a)** SR- $\mu$ FTIR espectro con segunda derivada en la región 2980–2830  $\text{cm}^{-1}$ ; **b)** SR- $\mu$ FTIR espectro con segunda derivada en la región 1700–1500  $\text{cm}^{-1}$ . S–P– PBMCs de ratas no expuestas a estrés y sin Piracetam; S–P+ PBMCs de ratas no expuestas a estrés pero tratadas con Piracetam; S+P– PBMCs de ratas expuestas a estrés sin tratamiento con Piracetam; S+P+ PBMCs de ratas expuestas a estrés y tratadas con Piracetam. Las líneas sólidas son el promedio de 42 espectros de dos mapas, líneas punteadas son el promedio  $\pm$  SEM; n = 3 por grupo.

### Región de lípidos (3050 $\text{cm}^{-1}$ - 2800 $\text{cm}^{-1}$ )

El espectro de la segunda derivada SR- $\mu$ FTIR en la región de lípidos (3050  $\text{cm}^{-1}$  - 2800  $\text{cm}^{-1}$ ) mostró 3 bandas fuertes cercanas a 2852  $\text{cm}^{-1}$  (asignadas a vibraciones de estiramientos de  $\nu\text{sCH}_2$  simétricos de lípidos), 2923  $\text{cm}^{-1}$  (asignado a

vibraciones de estiramiento de  $\nu_{as}CH_2$  asimétrico de lípidos) y  $2962\text{ cm}^{-1}$  (asignado a vibraciones de estiramiento de  $\nu_{as}CH_3$  asimétrico de lípidos y proteínas). S-P- tuvo un incremento de la intensidad de bandas en  $2852\text{ cm}^{-1}$  y  $2923\text{ cm}^{-1}$  comparado con los otros grupos experimentales, especialmente con S+P- ( $p \leq 0.0001$ ), el cual tuvo la absorción más débil. S+P+ mostró un incremento en la absorción de las bandas  $2852$  and  $2923\text{ cm}^{-1}$  comparado con S+P- ( $p \leq 0.0001$ , Fig. 47b). Sin embargo, S-P+ mostró una menor absorción que S-P- en esas bandas ( $p = 0.002$ ).

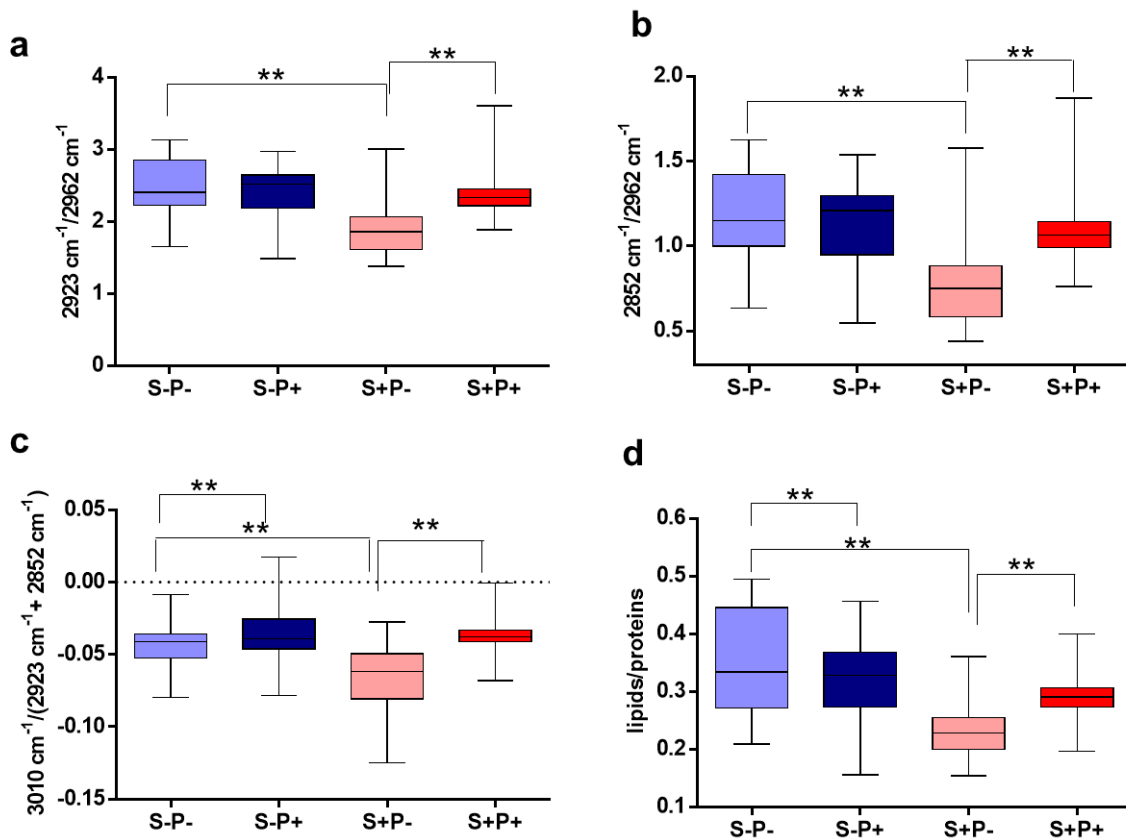
PCA fue usada para estudiar la variación entre el espectro de segunda derivada SR- $\mu$ FTIR de la región de lípidos. PC1 y PC2 explicaron juntos el 97 % de la variación de los datos (Fig. 48a). S-P- y S+P- formaron dos regiones separadas. S+P+ tuvo una menor variación con los grupos no estresados (S-P- y S-P+) y S-P+ mostró menor variación con los grupos estresados (S+P- and S+P+). Se obtuvo una separación relativa de los grupos experimentales y las diferencias entre ellos se encontraron principalmente por el PC2 (8 %). La carga del PC2 (Fig. 48b) indica que la variación entre los tratamientos es debida a varias bandas como  $3010\text{ cm}^{-1}$  (asignada a doble enlace cis C=C-H de lípidos insaturados),  $2923\text{ cm}^{-1}$  (asignada a vibraciones de estiramiento de  $\nu_{as}CH_2$ ) y  $2852\text{ cm}^{-1}$  (asignada a las vibraciones de estiramiento de lípidos de  $\nu_{s}CH_2$ ). Debido a que los datos están en forma de segunda derivada, mientras más negativos son, los valores son mayores (Fig. 48b). Bajo condiciones sin estrés (S-P- and S-P+) se mostró un incremento en la absorción de aquellas tres bandas donde PC2 es positivo. Los grupos estresados son caracterizados por una disminución importante en aquellas bandas, las cuales representan una disminución significativa de lípidos poliinsaturados (Klementieva *et al.*, 2014; Demir *et al.*, 2015).



**Figura 48. PCA en la región de lípidos. a)** Curvas de puntuación de PC1 y PC2; **b)** Curvas de carga de PC1 y PC2. S-P- PBMCs de ratas no expuestas a estrés y sin Piracetam; S-P+ PBMCs de ratas no expuestas a estrés, pero tratadas con Piracetam; S+P- PBMCs de ratas expuestas a estrés sin tratamiento con Piracetam; S+P+ PBMCs de ratas expuestas a estrés y tratadas con Piracetam. Datos de 42 espectros provenientes de dos mapas por rata; n = 3 por grupo.

Potenciales artefactos experimentales en el análisis SR- $\mu$ FTIR fueron disminuidos usando varias relaciones de intensidades de bandas en el análisis de datos. Estas relaciones ofrecen información valiosa sobre la composición bioquímica y

estructura de las células (Klementieva *et al.*, 2014; Demir *et al.*, 2015). El grado de saturación de lípidos fue calculado usando la relación  $2923\text{ cm}^{-1}/2962\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{as}}\text{CH}_2/\nu_{\text{as}}\text{CH}_3$ , Fig. 49a) y  $2852\text{ cm}^{-1}/2962\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{s}}\text{CH}_2/\nu_{\text{as}}\text{CH}_3$ , Fig. 49b). Esas dos relaciones fueron disminuidas en S+P- comparado con S-P- ( $p \leq 0.001$ ), pero en S+P+ se encontró un incremento de ambas ( $p \leq 0.001$ , comparado con S+P-), casi al mismo nivel como en condiciones sin estrés. También, se encontró una leve disminución de estas relaciones en S-P+ comparado con S-P- ( $p \leq 0.06$ ), lo cual puede ser explicado por una condición de estrés inducido por el Piracetam en este grupo. Ya que la relación  $\nu_{\text{as}}\text{CH}_2/\nu_{\text{as}}\text{CH}_3$  es también un indicador de la longitud de la cadena de ácidos grasos (Demir *et al.*, 2015), es posible que el estrés cause un acortamiento de los lípidos en PBMCs.



**Figura 49. Relaciones de lípidos y proteínas en PBMCs.** **a)** Ratio  $\nu_{asCH_2}/\nu_{asCH_3}$  ( $2923\text{ cm}^{-1}/2962\text{ cm}^{-1}$ ); **b)** Ratio  $\nu_{sCH_2}/\nu_{asCH_3}$  ( $2852\text{ cm}^{-1}/2962\text{ cm}^{-1}$ ); **c)** Ratio  $\nu_{C=C}/H/(\nu_{asCH_2} + \nu_{asCH_3})$  ( $3010\text{ cm}^{-1}/(2923\text{ cm}^{-1} + 2852\text{ cm}^{-1})$ ); **d)** Ratio  $(\nu_{asCH_2} + \nu_{asCH_3})/(\nu_{C=O} + \nu_{NH})$  ( $(2923\text{ cm}^{-1} + 2852\text{ cm}^{-1})/(1654\text{ cm}^{-1} + 1544\text{ cm}^{-1})$ ). S-P- PBMCs de ratas no expuestas a estrés y sin Piracetam; S-P+ PBMCs de ratas no expuestas a estrés, pero tratadas con Piracetam; S+P- PBMCs de ratas expuestas a estrés sin tratamiento con Piracetam; S+P+ PBMCs de ratas expuestas a estrés y tratadas con Piracetam. Datos de 42 espectros provenientes de dos mapas por rata; n = 3 por grupo. Cada caja muestra el valor del percentil 50, la línea horizontal es el valor medio y las barras indican los valores máximo y mínimo. \*\*p ≤ 0.001.

La insaturación de lípidos (Fig. 49c) fue calculada usando la relación  $3010\text{ cm}^{-1}/(2923\text{ cm}^{-1} + 2852\text{ cm}^{-1})$  ( $\nu_{C=C}/H/(\nu_{asCH_2} + \nu_{asCH_3})$ ), donde  $3010\text{ cm}^{-1}$  representa los lípidos insaturados y  $2923\text{ cm}^{-1} + 2852\text{ cm}^{-1}$  representa los lípidos saturados (también considerados como lípidos totales). Este estudio revela una reducción significativa de esta relación en S+P- comparada con S-P- ( $p \leq 0.001$ ), lo que significa que las células en estrés están significativamente perdiendo lípidos insaturados. El Piracetam, en estrés, inhibe este daño ( $p \leq 0.001$ , comparado con S+P-) e incluso S-P+ muestra un incremento importante de lípidos insaturados ( $p \leq 0.001$ , comparado con S-P-).

La oxidación lipídica es un parámetro importante en el análisis del daño oxidante de las células, el cual puede ser estudiado por la medición de la pérdida de ácidos grasos insaturados o por la cuantificación de los productos de peroxidación (Ayala, Muñoz and Argüelles, 2014). Varios estudios han encontrado un incremento en los dobles enlaces HC=CH (en  $3012\text{ cm}^{-1}$ ) en células expuestas a radiación (Cakmak *et al.*, 2011; Demir *et al.*, 2015), plaquetas en pacientes con diabetes (Liu, Bose and Mantsch, 2002), tejido cerebral de ratas estresadas (Türker-Kaya *et al.*, 2016), o en espectro de placa amiloide de cerebro humano con enfermedad de Alzheimer (Klementieva *et al.*, 2014). Los autores han asociado el incremento en la absorción de enlaces olefinicos con el incremento de los productos de peroxidación lipídica, los cuales son ricos en dobles enlaces de carbono (malondialdehído, dienos conjugados, hidroperóxidos) (Ayala, Muñoz and Argüelles, 2014). Sin embargo, la banda cercana a  $3012\text{ cm}^{-1}$  es característica de cis HC=CH de cadenas

poliinsaturadas acil y peroxidación, en eritrocitos mostrando una disminución significativa de esta banda (Moore, Sills and Mendelsohn, 1995). Por otra parte, una disminución de este pico fue obtenido en tejido cerebral de un modelo de rata con enfermedad de Huntington (Bonda *et al.*, 2011) y en tejido de corazón de ratas diabéticas (Severcan, 2003). Una disminución de la intensidad de bandas oleofínicas de HC=CH indica una disminución en el contenido de lípidos insaturados en las membranas celulares. En el presente estudio el estrés psicológico crónico induce una disminución en la cuantificación de enlaces oleofínicos (cis HC=CH) de lípidos poliinsaturados y el Piracetam inhibe este proceso.

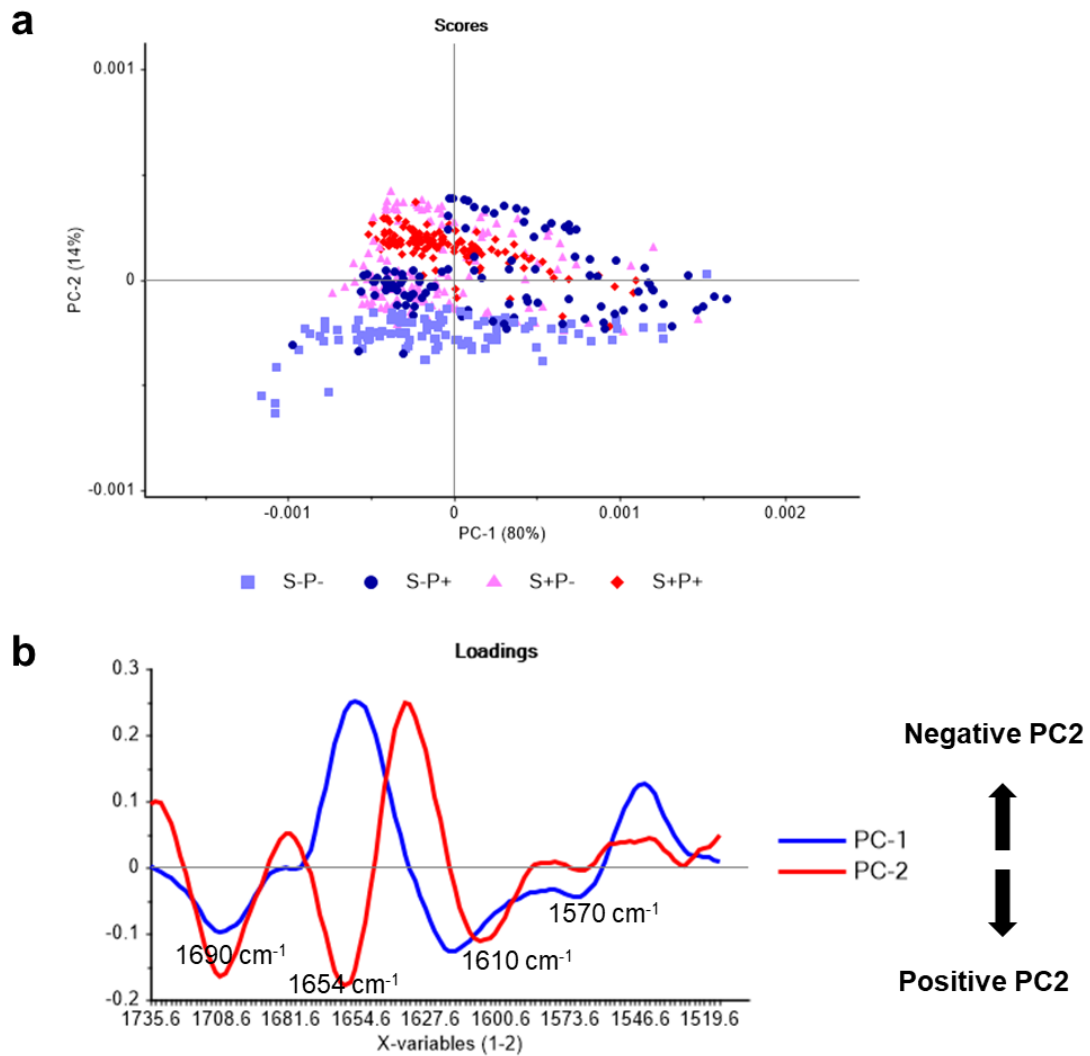
Los cambios en la cantidad de la composición lipídica y proteica en las células fueron obtenidos por el cálculo de la relación lípidos/proteínas totales (Fig. 49d). El contenido de lípidos totales fue obtenido sumando la intensidad de las bandas de absorción de  $\nu_s\text{CH}_2$  (cercano a  $2852\text{ cm}^{-1}$ ) con  $\nu_{as}\text{CH}_2$  (cercano a  $2923\text{ cm}^{-1}$ ). Las proteínas totales representan la suma entre la intensidad de las bandas de absorción de amida I (banda máxima cercana a  $1654\text{ cm}^{-1}$ ) y amida II (banda máxima cercana a  $1544\text{ cm}^{-1}$ ). S+P- mostró una relación lípido/proteína menor que S-P- ( $p \leq 0.001$ ), lo que significa, que en estrés, los lípidos totales son disminuidos o las proteínas totales incrementadas, lo que puede dar lugar a un metabolismo alterado (Cakmak *et al.*, 2011). El Piracetam en estrés impide este daño ( $p \leq 0.001$ , S+P+ vs S+P-) pero por sí mismo, en condiciones sin estrés, disminuye esta relación ( $p \leq 0.001$ , S-P+ vs S-P-). La disminución de la relación lípido/proteína también fue inducida por efectos tóxicos de herbicidas (Dakhakhni, Raouf and Qusti, 2016) o por radiaciones ionizantes (Cakmak *et al.*, 2011) en cultivos de células de rata.

#### Región de proteínas ( $1700\text{ cm}^{-1}$ - $1500\text{ cm}^{-1}$ )

El espectro SR- $\mu$ FTIR en segunda derivada en la región de proteínas ( $1700\text{ cm}^{-1}$  -  $1500\text{ cm}^{-1}$ ) mostró dos bandas fuertes cercanas a  $1654\text{ cm}^{-1}$  (asignada a amida I

causada por vibración de proteínas  $\nu\text{C=O}$  y  $\nu\text{CN}$  o estructuras  $\beta$ -sheet) y cercanas a  $1544\text{ cm}^{-1}$  (asignadas a amida II causadas por vibración de proteínas  $\delta\text{NH}$  y  $\nu\text{CN}$  o estructuras de  $\alpha$ -hélice). La banda amida II no cambia en estrés. Sin embargo, ambos grupos estresados (S+P- and S+P+) mostraron una mayor absorción de la banda de amida I que los grupos no estresados ( $p \leq 0.0001$ , Fig. 47a). S-P+ tuvo la absorción más débil de ambas bandas entre todos los grupos ( $p \leq 0.0001$ ).

PCA del espectro SR- $\mu$ FTIR en segunda derivada en la región de proteínas mostró PC1 y PC2 los cuales explicaron juntos el 94 % de la variación de los datos (Fig. 50a). S-P- y S+P- formaron regiones separadas y sus puntajes están distribuidos en partes negativas y positivas, respectivamente, de PC2 (14 %). S+P+ está distribuido en la región de S+P-, y S-P+ incluye tanto los grupos estresados como no estresados. La variación entre los tratamientos es debida a varias bandas mostradas en los gráficos de carga de PC2:  $1710 - 1690\text{ cm}^{-1}$  (asignado al estiramiento del éster  $-\text{C=O}$  de lípidos de las estructuras de proteínas hoja  $\beta$  antiparalela),  $1654\text{ cm}^{-1}$  (asignada a estructuras hoja  $\beta$  paralelas) y  $1610\text{ cm}^{-1}$ , asignada al desdoblamiento de proteínas desnaturalizadas o agregadas (Jackson and Mantsch, 1995; Miller, Bourassa and Smith, 2013). S-P+, S+P- y S+P+ mostraron incremento de absorción en esas tres bandas (Fig. 48b).



**Figura 50. PCA en región de proteínas.** a) Curvas de puntuación de PC1 y PC2; b) Curvas de carga de PC1 y PC2. S-P- PBMCs de ratas no expuestas a estrés y sin Piracetam; S-P+ PBMCs de ratas no expuestas a estrés, pero tratadas con Piracetam; S+P- PBMCs de ratas expuestas a estrés sin tratamiento con Piracetam; S+P+ PBMCs de ratas expuestas a estrés y tratadas con Piracetam. Datos de 42 espectros provenientes de dos mapas por rata; n = 3 por grupo.

Las proteínas fueron también alteradas por el estrés y el Piracetam. Las alteraciones espectrales de proteínas están asociadas con diferentes enfermedades como aterosclerosis, epilepsia, enfermedad de Alzheimer o PD

(Tidy *et al.*, 2016). El incremento en las bandas de absorción cercanas a  $1610\text{ cm}^{-1}$  y cercanas a  $1690\text{ cm}^{-1}$  son características de patologías con desdoblamiento de proteínas en muestras preparadas en solución acuosa (Purcell and Susi, 1984; Tidy *et al.*, 2016). PCA de la región de proteínas del presente estudio muestra un incremento en aquellas bandas en grupos estresados lo que significa que el estrés psicológico puede inducir la desnaturalización de proteínas o agregación anormal en PBMCs. Además, el Piracetam no tiene efectos en el estrés sobre proteínas, pero las altera en condiciones sin estrés. S-P+ mostró una menor expresión de proteínas que todos los grupos y casi la misma distribución en el PCA como en los grupos estresados. Estudios previos mostraron que este fármaco parece estar implicado en el metabolismo de proteínas específicas (Pilch and Muller, 1988; Copani *et al.*, 1992; Gupta *et al.*, 2014) y en la expresión de proteínas totales en hígado y cerebro (Platt, Hering and Hering, 1973).

#### *Expresión de proteínas antioxidantes y actividad en PBMCs*

**Hipótesis:** El Piracetam mejora la expresión de SOD1 and DJ1 y la actividad de SOD total y GST en PBMCs de ratas estresadas hembra y macho

#### **Objetivos:**

- Evaluar el efecto de Piracetam en la expresión de SOD1 y DJ1 en PBMCs de ratas estresadas hembra y macho.
- Evaluar el efecto de Piracetam en la actividad de SOD total y GST en PBMCs de ratas estresadas hembra y macho.

#### **Resultados y discusión:**

Fue analizada la expresión de SOD1 y DJ-1 y la actividad de SOD total y GST en PBMCs en ratas macho y hembra (Tabla 19). El resultado más destacado de estos ensayos es la disminución significativa de la expresión de DJ-1 en ratas hembra estresadas ( $p \leq 0.01$ ) y Piracetam la protegió ante este daño ( $p \leq 0.05$ ).

**Tabla 19. Proteínas antioxidantes en PBMCs de ratas hembra y macho.** n = 6-7 por grupo de hembras y n= 3-4 por grupo de machos. Datos en promedio  $\pm$  SD; test t; \*\* p  $\leq$  0.01 comparado con S-P-, † p  $\leq$  0.05 comparado con S+P-

|  | <b>S-P-</b>       | <b>S-P+</b>       | <b>S+P-</b>         | <b>S+P+</b>        |
|--|-------------------|-------------------|---------------------|--------------------|
| <b>HEMBRAS</b>                         |                   |                   |                     |                    |
| Expresión de SOD1 (a.u.)               | 0.31 $\pm$ 0.07   | 0.33 $\pm$ 0.19   | 0.43 $\pm$ 0.13     | 0.43 $\pm$ 0.16    |
| Expresión de DJ1 (a.u.)                | 0.66 $\pm$ 0.16   | 0.78 $\pm$ 0.14   | 0.38 $\pm$ 0.16 **  | 0.61 $\pm$ 0.14 †  |
| Actividad de SOD total (U/mg proteína) | 98.25 $\pm$ 55.66 | 43.1 $\pm$ 39.48  | 41.11 $\pm$ 37.93   | 57.13 $\pm$ 30.73  |
| Actividad de GST (U/mg proteína)       | 6.52 $\pm$ 1.63   | 7.28 $\pm$ 1.83   | 6.27 $\pm$ 2.45     | 6.69 $\pm$ 3.15    |
| <b>MACHOS</b>                          |                   |                   |                     |                    |
| Expresión de SOD1 (a.u.)               | 0.55 $\pm$ 0.28   | 0.55 $\pm$ 0.2    | 0.68 $\pm$ 0.13     | 0.68 $\pm$ 0.38    |
| Expresión de DJ1 (a.u.)                | 0.8 $\pm$ 0.24    | 0.97 $\pm$ 0.38   | 0.98 $\pm$ 0.22     | 0.71 $\pm$ 0.18    |
| Actividad de SOD total (U/mg proteína) | 51.06 $\pm$ 45.86 | 91.72 $\pm$ 82.48 | 191.28 $\pm$ 189.56 | 125.19 $\pm$ 69.11 |
| Actividad de GST (U/mg proteína)       | 5.79 $\pm$ 2.53   | 6.69 $\pm$ 2.35   | 8.68 $\pm$ 5.95     | 8.2 $\pm$ 1.8      |

En conclusión, los experimentos de Piracetam *in vivo* tienen efectos protectores en ratas estresadas psicológicamente, como se muestra en la Tabla 20, sin embargo, el efecto de este fármaco mostró ser dependiente del tiempo de tratamiento debido a que los resultados más importantes fueron obtenidos después de 9 días de administración sobre el comportamiento y el perfil de lípidos y proteínas de PBMCs en estrés. Por otra parte, los efectos inesperados de este fármaco, cuando los animales no fueron expuestos a estrés, conducen a dudas acerca de la seguridad de su uso. Posteriormente, se llevaron a cabo algunos estudios *in vitro* usando cultivos primarios de neuronas para entender mejor el mecanismo de acción del Piracetam.

**Tabla 20. Resumen de resultados de experimentos *in vivo* acerca del efecto de Piracetam en el manejo del estrés.**

| <b>Resultados obtenidos relacionados con el efecto del Piracetam en experimentos <i>in vivo</i></b> |                             |   |
|---|-----------------------------|---|
| <b>Parámetros</b>   | <b>Presencia del estrés</b> | <b>Efecto del Piracetam</b>   |
| Peso corporal   | -                           | Ningún efecto.  |
|   | +                           | Ningún efecto.  |
| Comportamiento  | -                           | Leve incremento en la conducta ansiosa.   |
|   | +                           | Disminución del comportamiento ansioso.   |
| Parámetros bioquímicos en plasma  | -                           | Disminución en el nivel sérico de la glucosa y la creatinina en hembras. Incremento en el nivel sérico de la glucosa en machos.                           |
|   | +                           | Recuperación de los niveles séricos de la glucosa, urea y urea nitrógeno en hembras.  |
| Peso de las glándulas adrenales   | -                           | Ningún efecto.  |
|   | +                           | Ningún efecto.  |
| Actividad de SOD y GST en cerebro   | -                           | Ningún efecto.  |
|   | +                           | Ningún efecto.  |
| Actividad de SOD, CAT, GST, GR y GPx en hígado  | -                           | Disminución de la actividad de CAT.   |
|   | +                           | Recuperación de la actividad de CAT.  |
| Perfil bioquímico en PBMCs  | -                           | Aumento de lípidos insaturados. Disminución de cantidad de proteínas y cambios en la estructura proteica (posibles alteraciones: agregaciones anormales). |
|   | +                           | Disminución de la peroxidación lipídica (aumento de los lípidos insaturados).   |
| Expresión de SOD1 y DJ1 en PBMCs  | -                           | Ningún efecto.  |
|   | +                           | Recuperación de la expresión de DJ1.  |
| Actividad de SOD total y GST en PBMCs   | -                           | Ningún efecto.  |
|   | +                           | Ningún efecto.  |

## EFFECTO DEL PIRACETAM EN ENSAYOS *IN VITRO*

**Hipótesis:** El Piracetam mejora la función mitocondrial en cultivos primarios de neuronas expuestas al estrés.

### **Objetivos**

- Establecer la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que disminuye la viabilidad celular alrededor de 50 %.
- Evaluar el efecto de Piracetam sobre la energía del metabolismo (fosforilación oxidativa y glicólisis) en neuronas primarias estresadas.
- Evaluar el efecto de Piracetam sobre la expresión de proteínas antioxidantes (DJ1, SOD1, SOD2), contenido mitocondrial (TOM20) y expresión del factor neurotrófico (BDNF) en neuronas primarias estresadas.

### **Resultados y discusión**

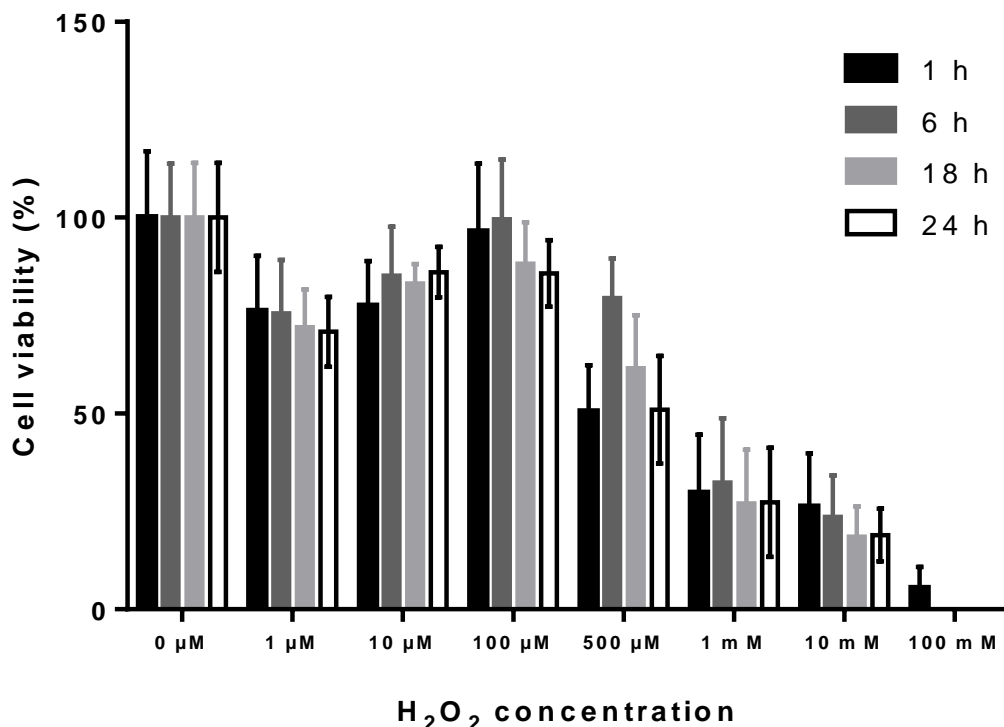
El Piracetam es un nootrópico usado en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y lesiones cerebrales como neuroprotector y neuroestimulador. Este fármaco actúa como protector de la membrana celular, especialmente en la mitocondria, y estimula el metabolismo de la glucosa y el consumo de oxígeno en la presencia de estrés oxidativo, pero algunos estudios muestran resultados contradictorios acerca de su eficiencia y seguridad. En este estudio se mostró que el Piracetam disminuye la ansiedad e inhibe la peroxidación lipídica en PBMCs de ratas estresadas psicológicamente. Sin embargo, leve comportamiento ansioso, incremento de lípidos insaturados y agregación anormal de proteínas fueron observadas en PBMCs de ratas no estresadas tratadas con este fármaco.

En el presente estudio se evaluó el efecto del Piracetam (tratamiento con 0.5 mM y 1 mM por 24 h) sobre la bioenergética de neuronas corticales primarias estresadas *in vitro* (1 h de exposición a 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) usando un analizador de flujo

extracelular (Fig. 9). Además, fueron cuantificadas las proteínas antioxidantes (SOD1, SOD2 and DJ-1) y la expresión de BDNF.

#### *Ensayo AlamarBlue® en neuronas primarias tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>*

Para crear el mismo perfil que se observó en el cerebro de ratas estresadas, se estableció una concentración apropiada de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para alcanzar una viabilidad de neuronas de alrededor del 50 % después de 1 h de estrés usando el ensayo AlamarBlue®. Los cultivos de neuronas primarias en placas de 96 pozos fueron tratados con 0  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 500  $\mu$ M, 1 mM, 10 mM, 100 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y fueron medidos espectrofotométricamente después de 1 h, 6 h, 18 h y 24 h. Se observó que 1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue suficiente para obtener alrededor de 50 % de neuronas viables después de 1 h de incubación, y este número permaneció constante en las siguientes horas (Fig. 51).

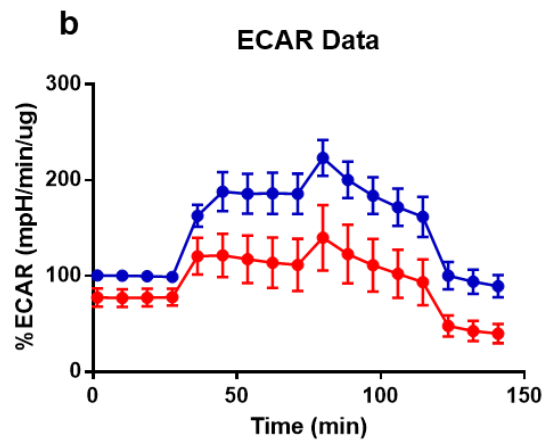
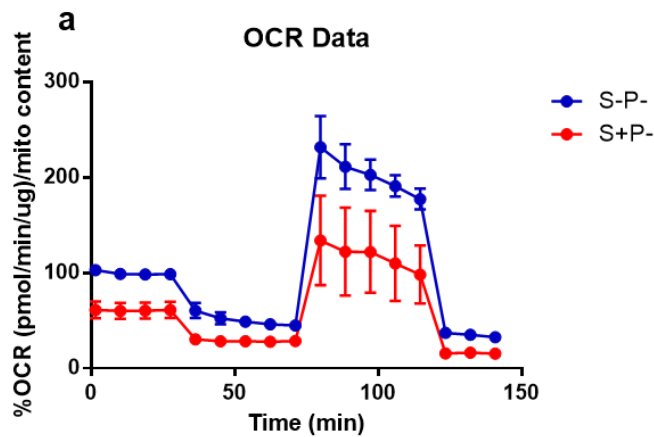


**Figura 51. Viabilidad de neuronas primarias tratadas con diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 500  $\mu$ M, 1 mM, 10 mM, 100 mM) después de 1 h, 6 h, 18 h y 24 h de**

incubación at 37 C, 5 % de CO<sub>2</sub>. 25 000 células por pozo fueron cultivadas en placas de 96 pozos. Datos en promedio ± SEM de tres ensayos diferentes.

### *Ensayo metabólico extracelular en neuronas primarias*

Las neuronas primarias fueron cultivadas en microplacas de cultivo de 24 pozos Seahorse XF24 y fueron incubadas por 24 h con 0.5 mM y 1 mM de Piracetam. La energía del metabolismo disminuyó solo alrededor de 25 % después de la exposición por 1 h a 1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fig. 52 and 53). Los datos de OCR fueron normalizados al contenido de proteínas (usando el ensayo de Bradford) y el contenido mitocondrial (representado por la cuantificación de TOM20 usando ensayos WB), y los datos de ECAR fueron normalizados al contenido de proteínas.

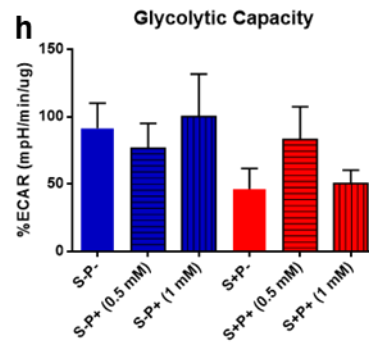
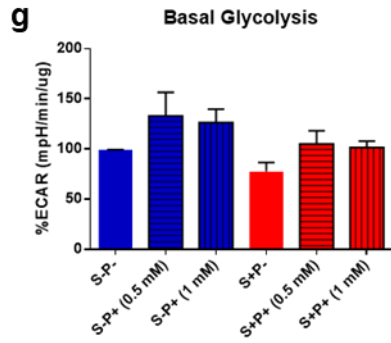
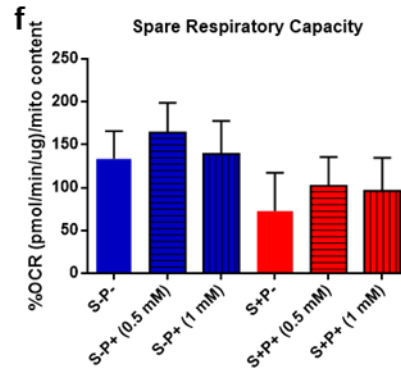
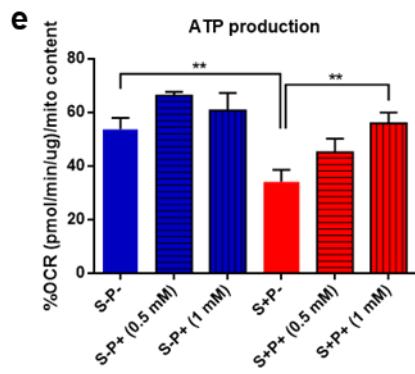
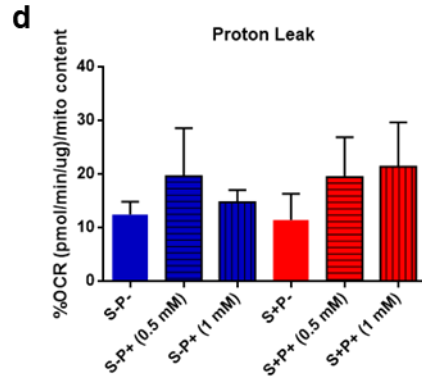
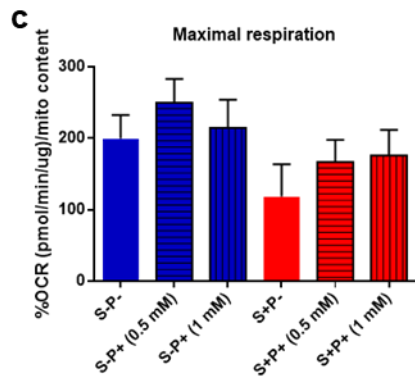
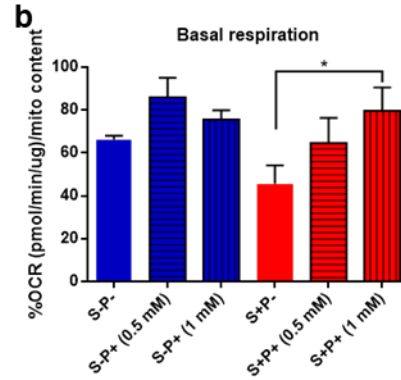
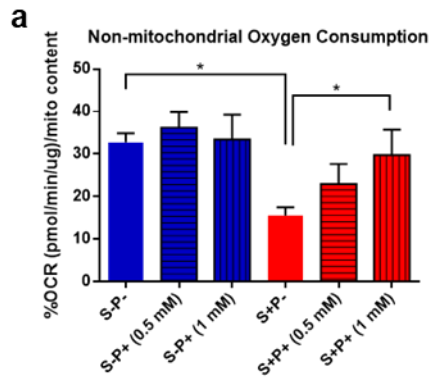


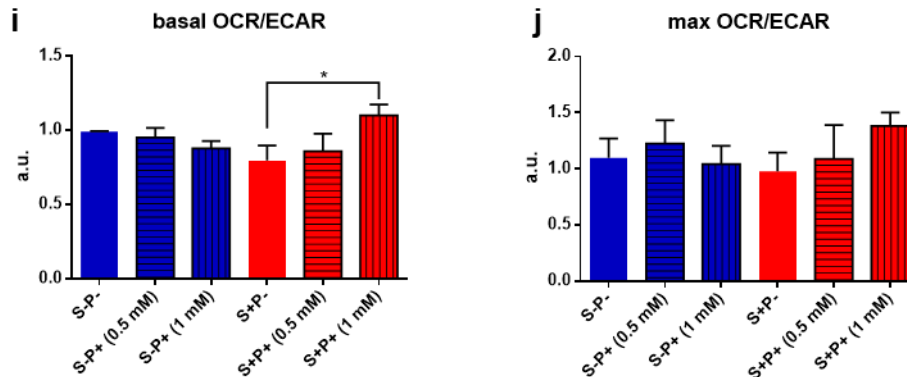
**Figura 52. a) OCRs y b) ECARs en células neuronales primarias estresadas.** Se llevaron a cabo 4 diferentes ensayos, en cada ensayo fueron analizados de 4 a 5 pozos por grupo. 70 000 células por pozo fueron cultivadas en una placa de 24 pozos Seahorse XF24. Datos en promedio  $\pm$  SEM. Los datos de OCR fueron normalizados al contenido de proteínas y contenido mitocondrial y los datos de ECAR fueron normalizados al contenido de proteínas. Color rojo: grupos estresados; color azul: grupos no estresados.

Solo el consumo de oxígeno no mitocondrial y la producción de ATP disminuyeron significativamente por efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La glicólisis basal y la capacidad glicolítica fueron disminuidas, aunque no significativas. El Piracetam incrementó la respiración basal, la producción de ATP y el consumo de oxígeno no mitocondrial en células estresadas y no tuvo efecto sobre la glicólisis. También, el Piracetam no mostró efecto sobre las células no estresadas (Fig. 53).

Por otro lado, se calculó la relación entre OCR y ECAR en condiciones basales (OCR/ECAR basal) y después que fue agregado el FCCP (OCR/ECAR maximal). Se observó que las células en ambas situaciones están usando como combustible de manera similar la OXPHOS y la glicólisis, en una relación de aproximadamente igual, y esto no se vio afectado por el estrés. Sin embargo, las células estresadas tratadas con Piracetam usaron energía en mayor medida de la OXPHOS que de la glicólisis, mostrando que este fármaco mejora la actividad mitocondrial en la presencia de estrés oxidativo. No fueron observados cambios en células no estresadas y tratadas con Piracetam a este nivel (Fig. 53). Nuestros resultados confirman estudios previos *in vitro* e *in vivo* en células neuronales estresadas donde el Piracetam las protegió contra la oxidación por medio del incremento de la producción de ATP (Keil *et al.*, 2006; Kurz *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2017b) y MMP (Keil *et al.*, 2006; Kurz *et al.*, 2010; Singh, Goswami, Swarnkar, Singh, *et al.*, 2011; Solanki *et al.*, 2011; Costa *et al.*, 2013; Gupta *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2017b; Tripathi, Paliwal and Krishnamurthy, 2017a) y disminución de la producción de ROS (Singh, Goswami, Swarnkar, Singh, *et al.*, 2011; Solanki *et al.*, 2011; Gupta *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2017b).

Aunado a ello, la poca respuesta de las células al estrés y al Piracetam puede ser causada por diferentes factores como la dosis de fármaco, el tiempo de exposición de la célula al fármaco o al estrés, la disponibilidad intracelular del fármaco o la salud de la célula, los cuales pueden ser evaluados en futuros experimentos.





**Figura 53. Parámetros bioenergéticos de neuronas primarias estresadas y tratadas con Piracetam.** **a)** Consumo de oxígeno No-mitocondrial, **b)** Respiración Basal, **c)** Respiración máxima, **d)** Pérdida de H<sup>+</sup> (Protón), **e)** Producción de ATP, **f)** Capacidad respiratoria **g)** Glicolisis Basal, **h)** Capacidad Glicolítica, **i)** OCR/ECAR basal, **j)** OCR/ECAR max. Para el ensayo se usó: 1  $\mu$ M Oligomicina, 1.5  $\mu$ M FCCP, 1  $\mu$ M Antimicina, 100 nM Rotenona. Fueron realizados 4 ensayos diferentes y en cada ensayo fueron analizados de 4 a 5 pozos por grupo. 70 000 células por pozo fueron cultivadas en placas de 24 pozos Seahorse XF24. Los datos son expresados como porcentajes promedio  $\pm$  SEM. Los datos OCR fueron normalizados al contenido de proteínas y contenido mitocondrial y los datos de ECAR fueron normalizados al contenido de proteínas. \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , ANOVA de una vía. color rojo: grupos estresados; color azul: grupos no estresados.

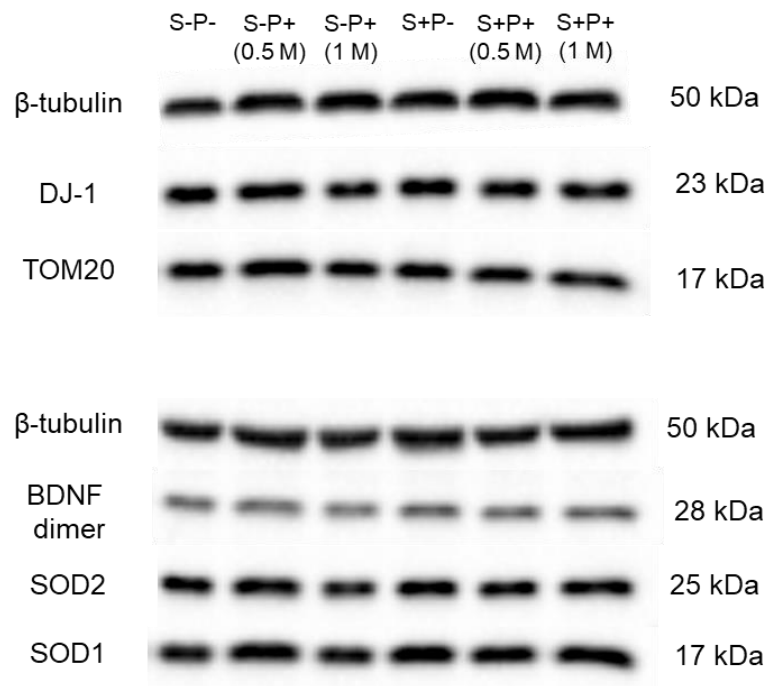
### *BDNF y expresión de proteínas antioxidantes en neuronas primarias*

El Piracetam interactúa con las cabezas polares de fosfolípidos de las membranas celulares, cambia la organización de lípidos y recupera la fluidez de la membrana afectada por el estrés oxidante (Peuvot *et al.*, 1995). Esta función convierte al Piracetam como un importante antioxidante para la célula y su alta afinidad por receptores de glutamato motivan su uso para la mejora física, cognitiva y de la memoria (Corazza *et al.*, 2014). Previos estudios han mostrado resultados contradictorios sobre la eficiencia de este fármaco en células neuronales expuestas a estrés oxidativo. En estrés, el Piracetam incrementa la expresión de SOD, CAT y GST (O. Abdel-Salam and Nada, 2011; Solanki *et al.*, 2011; Mamchur *et al.*, 2015; Swathi *et al.*, 2015; Abdel-Salam and Hamdy, 2016; Unger and

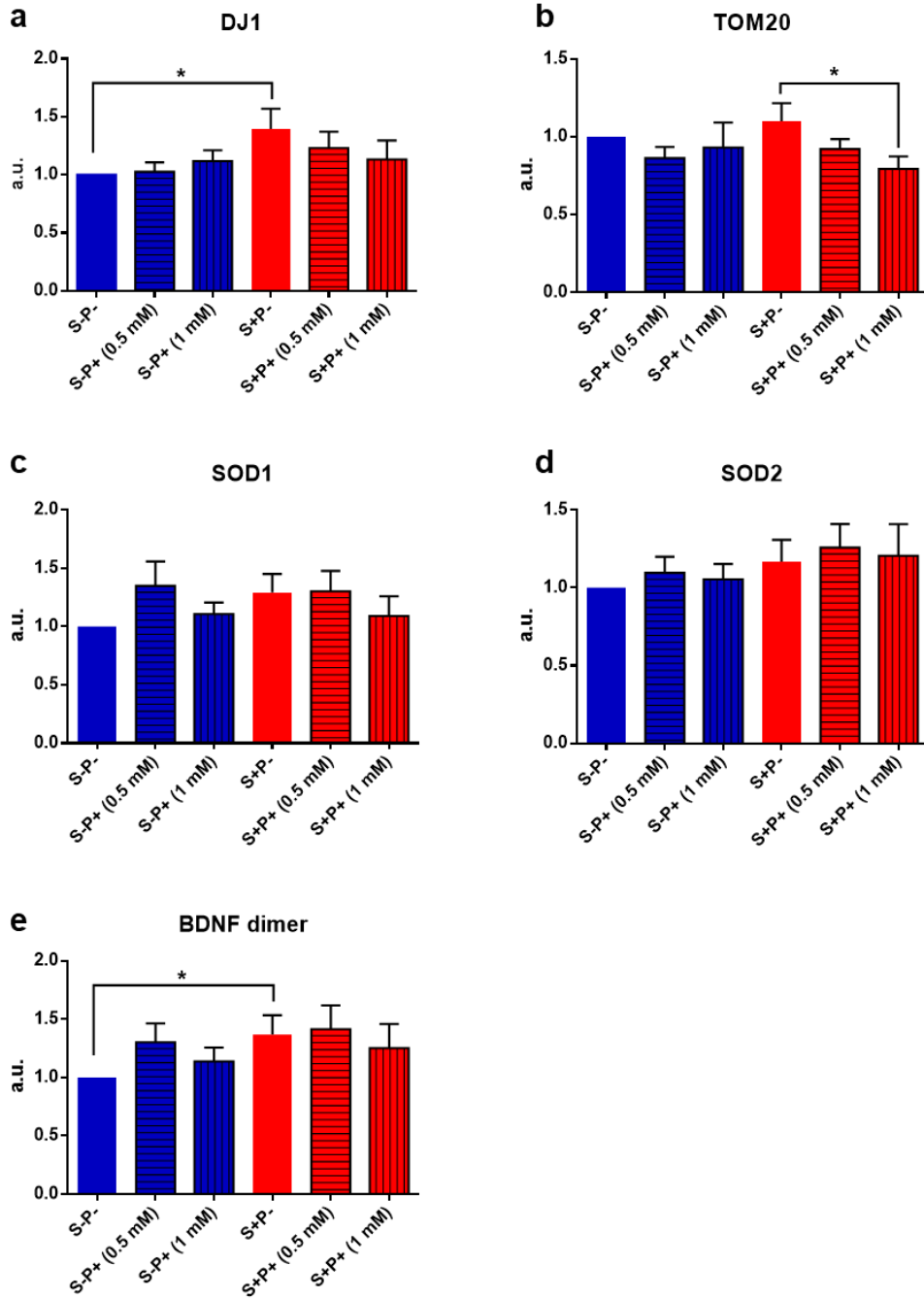
Himasaila, 2016), no tiene efecto (Abdel-Salam *et al.*, 2011; Abdel-Salam, Salem and El-shamarka, 2013; Muley *et al.*, 2013) o las disminuye (Keil *et al.*, 2006). Incluso, no ha mostrado efectos sobre GSH (Abdel-Salam *et al.*, 2011; Zaitone, Abo-elmatty and Elshazly, 2012; Abdel-Salam, Salem and El-shamarka, 2013; Muley *et al.*, 2013) o lo disminuye (Abdel-Salam *et al.*, 2011; Kalkan *et al.*, 2011; Solanki *et al.*, 2011; Abdel-Salam and Hamdy, 2016). MDA fue incrementado por el Piracetam en estrés (Abdel-Salam *et al.*, 2011; Abdel-Salam, Salem and El-shamarka, 2013), no fue cambiado (Zaitone, Abo-elmatty and Elshazly, 2012; Muley *et al.*, 2013) o fue disminuido (Mamchur *et al.*, 2015; Verma *et al.*, 2015; Abdel-Salam and Hamdy, 2016; Unger and Himasaila, 2016; Tripathi, Paliwal and Krishnamurthy, 2017b).

En el presente estudio, inesperadamente, los datos de WB muestran ligeros cambios en la expresión de SOD1, SOD2, DJ1, TOM20 and BDNF (Fig. 54 y 55). El estrés induce incremento significativo sólo en DJ-1 y la expresión de BDNF maduro. Además, la expresión de SOD1 and SOD2 incrementa en estrés, aunque no significativamente. El Piracetam no tuvo un efecto importante a este nivel.

De manera interesante, el Piracetam disminuyó el contenido mitocondrial (disminución de la expresión de TOM20) en estrés significando que este fármaco disminuye la necesidad de energía lo cual puede ser causado por una disminución de la producción de ROS.



**Figura 54. Imagen representativa de bandas WB para todas las proteínas estudiadas en cultivos celulares primarios.** 700 000 células por pozo fueron cultivadas en placas de 6 pozos.



**Figura 55. Nivel de expresión de a) DJ-1, b) TOM20, c) SOD1, d) SOD2 y e) BDNF maduro en las neuronas primarias estresadas y tratadas con Piracetam.** Se llevaron a cabo 6 diferentes ensayos, en cada ensayo 3 réplicas por grupo en diferentes placas de cultivo de 6 pozos. 700 000 células por pozo fueron cultivadas en placas de 6 pozos. Datos expresados como promedio  $\pm$  SEM; \* $p \leq 0.05$ , ANOVA de una vía. Color rojo: grupos estresados; color azul: grupos no estresados.

El presente estudio mostró la eficiencia del Piracetam en estimular la actividad mitocondrial en neuronas primarias estresadas con  $H_2O_2$ , pero no se observaron cambios en la expresión de proteínas antioxidantes. Futuros estudios de largos periodos *in vitro* e *in vivo* son necesarios para entender el mecanismo de acción de este fármaco.

## CONCLUSIONES

En el presente estudio se evaluaron los cambios inducidos por el estrés psicológico en sistemas nervioso e inmune que llevan una fenocopia de la PD. Se enfocó en la bioenergética y defensa antioxidante en cerebro y PBMCs, comportamiento y función motriz.

Los datos presentados sugieren que el estrés psicológico lleva a la alteración de la producción de energía (OXPHOS y glicólisis) en el PFC y SN, modifica la respuesta antioxidante y la señalización neurotrófica y disminuye el contenido mitocondrial, patología celular que está asociada con el envejecimiento y enfermedades neurodegenerativas (Poewe *et al.*, 2017).

Por otro lado, el estrés psicológico induce ansiedad y deficiencias motrices de manera similar en la PD, en ausencia de la degeneración de neuronas dopaminérgicas en SN. Esta neuropatología está asociada con alteración en la respuesta inmune: activación crónica de PBMCs, daño oxidante de lípidos y de ADN, estrés oxidante y agregación de proteínas.

Adicionalmente, el estrés psicológico y la disfunción mitocondrial inducidas por la ausencia de PINK1, exacerban los síntomas de PD. Estudios previos mostraron que la ausencia de PINK1 afecta la estructura y la función mitocondrial, e induce estrés oxidante en las neuronas (Das Banerjee *et al.*, 2017). El presente estudio resalta la importancia de esta proteína en la sobrevivencia y funcionalidad de las neuronas dopaminérgicas. Incluso, se muestra que PINK1 desarrolla un rol crítico en la respuesta inmune en estado de reposo, pero también en estrés, datos que garantizan futuros estudios para analizar su rol potencial en la modulación de la reactividad del sistema neuroinmune.

Por otra parte, los hallazgos de la presente investigación tienen importantes implicaciones en la investigación futura acerca de la relación entre el estrés

psicológico, el comportamiento, las neuropatologías y PBMCs. Los datos reportados en este trabajo proveen pistas sobre el uso de PBMCs como marcador para la alteración de la homeostasis cerebral inducida por estrés emocional. Además, este trabajo recomienda el estudio de biomarcadores en sangre (como BDNF, PINK1 y DJ1) para conectar el daño oxidante de la periferia con la progresión de neuropatologías.

## REFERENCIAS

Abdel-Salam, O. M. E. *et al.* (2011) 'Oxidative Stress in a Model of Toxic Demyelination in Rat Brain : The Effect of Piracetam and Vinpocetine', *Neurochem Res*, 36, pp. 1062–1072. doi: 10.1007/s11064-011-0450-1.

Abdel-Salam, O. M. E. and Hamdy, S. M. (2016) 'Effect of piracetam , vincamine , vinpocetine , and donepezil on oxidative stress and neurodegeneration induced by aluminum chloride in rats', *Comp Clin Pathol*, 25, pp. 305–318. doi: 10.1007/s00580-015-2182-0.

Abdel-Salam, O. M. E. and Nada, S. A. (2011) 'Effect of Piracetam , Vinpocetine and - Ginkgo Biloba Extract on Antipsychotic- Induced Impairment of Learning and Memory Účinnost piracetamu , vinpocetinu a Ginkgo biloba', *Cesk Slov Neurol N*, 107(1), pp. 29–35.

Abdel-Salam, O. M. E., Salem, N. A. and El-shamarka, M. E. (2013) 'Cannabis-induced impairment of learning and memory: effect of different nootropic drugs', *EXCLI Journal*, 12, pp. 193–214.

Abdel-Salam, O. and Nada, S. (2011) 'Piracetam reverses haloperidol-induced catalepsy in mice', *Turk J Med Sci*, 41(4), pp. 693–699. doi: 10.3906/sag-1006-870.

Agnihotri, S. K. *et al.* (2019) 'PINK1 deficiency is associated with increased deficits of adult hippocampal neurogenesis and lowers the threshold for stress-induced depression in mice', *Behavioural Brain Research*, 363, pp. 161–172. doi: 10.1016/j.bbr.2019.02.006.

Alkuraishy, H. M. *et al.* (2014) 'Modulation Effects of Piracetam and Ginkgo Biloba on the Cognitive and Working Memory Functions : Psychometric Study', *J Neurol Neurophysiol*, 5(5). doi: 10.4172/2155-9562.1000234.

Alkuraishy, H., Mahdi, A. and Ashoor, A. (2012) 'Piracetam (2-Oxo-Pyrrolidone) Advance and Modulate Central Processing Reaction Time in Normal Healthy

Volunteers: Randomized Experimental Study; Single Blind Clinical Trial', *WebmedCentral-Clinical Trials*, pp. 1–15.

Allocati, N. *et al.* (2018) 'Glutathione transferases: substrates, inhibitors and pro-drugs in cancer and neurodegenerative diseases', *Oncogenesis*, 7(8), pp. 1–15. doi: 10.1038/s41389-017-0025-3.

Andersen, S. L. and Teicher, M. H. (2004) 'Delayed effects of early stress on hippocampal development', *Neuropsychopharmacology*, 29(11), pp. 1988–1993. doi: 10.1038/sj.npp.1300528.

Ayala, A., Muñoz, M. F. and Argüelles, S. (2014) 'Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal', *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, pp. 1–31. doi: 10.1155/2014/360438.

Azoulay, D., Urshansky, N. and Karni, A. (2008) 'Low and dysregulated BDNF secretion from immune cells of MS patients is related to reduced neuroprotection', *Journal of Neuroimmunology*, 195(1–2), pp. 186–193. doi: 10.1016/j.jneuroim.2008.01.010.

Balderrama-Gutiérrez, G. (2015) 'Efecto del estrés crónico en la distribución celular de Dj-1 y NRF2 en Sistema Nervioso Central', *Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez*, 1(1), pp. 1–77.

Ballinger, S. W. (2005) 'Mitochondrial dysfunction in cardiovascular disease', *Free Radical Biology and Medicine*, 38, pp. 1278–1295.

Das Banerjee, T. *et al.* (2017) 'PINK1 regulates mitochondrial trafficking in dendrites of cortical neurons through mitochondrial PKA', *Journal of Neurochemistry*, 142(4), pp. 545–559. doi: 10.1111/jnc.14083.

Bartus, R. T. *et al.* (1981) 'Profound Effects of Combining Choline and Piracetam on Memory Enhancement and Cholinergic Function in Aged Rats ', *Neurobiology of Aging*, 2, pp. 105–111.

- Bellomo, G. *et al.* (1991) 'Plasma profiles of adrenocorticotrophic hormone, cortisol, growth hormone and prolactin in patients with untreated parkinson's disease', *Journal of Neurology*, 238(1), pp. 19–22. doi: 10.1007/BF00319704.
- Bentue-Ferrer, D. *et al.* (1989) 'Comparative Evaluation of Scavenger Properties of Exifone, Piracetam and Vinburnine', *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 3(4), pp. 323–328. doi: 10.1111/j.1472-8206.1989.tb00673.x.
- Bereshchenko, O., Bruscoli, S. and Riccardi, C. (2018) 'Glucocorticoids, sex hormones, and immunity', *Frontiers in Immunology*. doi: 10.3389/fimmu.2018.01332.
- Berton, O. *et al.* (2006) 'Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress', *Science*, 311(5762), pp. 864–868. doi: 10.1126/science.1120972.
- Bienertova-Vasku, J., Lenart, P. and Scherlinger, M. (2020) 'Eustress and distress: neither good nor bad, but rather the same?', *BioEssays*, 1900238. doi: 10.1002/bies.201900238.
- Black, P. H. (2002) 'Stress and the inflammatory response: A review of neurogenic inflammation', *Brain, Behavior, and Immunity*. Elsevier, 16(6), pp. 622–653. doi: 10.1016/S0889-1591(02)00021-1.
- Boecka, C. *et al.* (2016) 'Inflammation in adult women with a history of child maltreatment: The involvement of mitochondrial alterations and oxidative stress', *Mitochondrion*, 30, pp. 1–9. doi: .1037//0033-2909.126.1.78.
- Bonda, M. *et al.* (2011) 'Synchrotron Infrared Microspectroscopy Detecting the Evolution', *Analytical Chemistry*, pp. 7712–7720.
- Bonifati, V. *et al.* (2003) 'Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism.', *Science (New York, N.Y.)*, 299(5604), pp. 256–259. doi: 10.1126/science.1077209.
- Boyajyan, A. *et al.* (2015) 'Genetics of Posttraumatic Stress Disorder — Candidate

Genes and Their Implication in the Disease-Associated Molecular Pathomechanisms', *Intech*, i, p. 13. doi: 10.1016/j.colsurfa.2011.12.014.

Bradford, M. M. (1976) 'A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding', *Analytical Biochemistry*, 72, pp. 248–254.

Brenhouse, H. C., Danese, A. and Grassi-Oliveira, R. (2018) 'Neuroimmune impacts of early-life stress on development and psychopathology', in *Current Topics in Behavioral Neurosciences*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 1–25. doi: 10.1007/7854\_2018\_53.

Brunelli, A. *et al.* (2012) 'Acute exercise modulates BDNF and pro-BDNF protein content in immune cells', *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 44(10), pp. 1871–1880. doi: 10.1249/MSS.0b013e31825ab69b.

Cabe, P. A. *et al.* (1978) 'A simple recording grip strength device', *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 8(1), pp. 101–102. doi: 10.1016/0091-3057(78)90131-4.

Cakmak, G. *et al.* (2011) 'Screening of Protective Effect of amifostine on radiation - induced structural and functional variations in rat liver microcosmal membranes by FT-IR Spectroscopy', *Analytical chemistry*, 83, pp. 2438–2444.

Callio, J., Oury, T. D. and Chu, C. T. (2005) 'Manganese superoxide dismutase protects against 6- hydroxydopamine injury in mouse brains', *Journal of Biological Chemistry*, 280(18), pp. 18536–18542. doi: 10.1038/jid.2014.371.

Campos-Shimada, L. B. *et al.* (2018) 'Superoxide dismutase: a review and a modified protocol for activities measurements in rat livers', *Archives of Physiology and Biochemistry*, pp. 1–8. doi: 10.1080/13813455.2018.1520891.

Canet-Avilés, R. M. *et al.* (2004) 'The Parkinson's disease protein DJ-1 is neuroprotective due to cysteine-sulfinic acid-driven mitochondrial localization.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,

101(24), pp. 9103–9108. doi: 10.1073/pnas.0402959101.

Cang, X. *et al.* (2016) 'PINK1 alleviates palmitate induced insulin resistance in HepG2 cells by suppressing ROS mediated MAPK pathways', *Biochemical and biophysical research communications*, 478, pp. 431–438.

Cao, J. *et al.* (2015) 'DJ-1 as a human oncogene and potential therapeutic target', *Biochemical Pharmacology*, 93(3), pp. 241–250. doi: 10.1016/j.bcp.2014.11.012.

Carter, R. J., Morton, J. A. and Dunnett, S. B. (2001) 'Motor coordination and balance in rodents', *Current Protocols in Neuroscience*, (8), pp. 1–14. doi: 10.1002/0471142301.ns0812s15.

Catale *et al.* (2020) 'Microglial Function in the Effects of Early-Life Stress on Brain and Behavioral Development', *Journal of Clinical Medicine*, 9(2), p. 468. doi: 10.3390/jcm9020468.

Cheng, S.-C. *et al.* (2016) 'Broad defects in the energy metabolism of leukocytes underlie immunoparalysis in sepsis', *Nature Immunology*, 17(4), pp. 406–413. doi: 10.1038/ni.3398.

Cheng, S.-C., Joosten, L. A. B. and Netea, M. G. (2014) 'The interplay between central metabolism and innate immune responses', *Cytokines and Growth Factor Reviews*, 25, pp. 707–713.

Chouinard, G. *et al.* (1983) 'Piracetam in Elderly Psychiatric Patients with Mild Diffuse Cerebral Impairment', *Psychopharmacology*, 81, pp. 100–106.

Copani, A. *et al.* (1992) 'Nootropic drugs positively modulate alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid-sensitive glutamate receptors in neuronal cultures', *J Neurochem*, 58(4), pp. 1199–1204. doi: 10.1111/j.1471-4159.1992.tb11329.x.

Corazza, O. *et al.* (2014) 'The diffusion of Performance and Image-Enhancing Drugs (PIEDs) on the Internet: The Abuse of the Cognitive Enhancer Piracetam.', *Substance Use & Misuse*, 49(14), pp. 1–8. doi: 10.3109/10826084.2014.912232.

- Costa, R. A. P. *et al.* (2013) 'Protective effects of L -carnitine and piracetam against mitochondrial permeability transition and PC3 cell necrosis induced by simvastatin', *European Journal of Pharmacology*, 701, pp. 82–86. doi: 10.1016/j.ejphar.2013.01.001.
- Creed, R. B. *et al.* (2019) 'Basal and evoked neurotransmitter levels in Parkin, DJ-1, PINK1 and LRRK2 knockout rat striatum', *Neuroscience*, 409, pp. 169–179. doi: 10.1016/j.neuroscience.2019.04.033.
- Creed, R. B. and Goldberg, M. S. (2018) 'New developments in genetic rat models of Parkinson's disease', *Movement Disorders*, 33(5), pp. 717–729. doi: 10.1002/mds.27296.
- Crews, F. T. (1982) 'Effects of membrane fluidity on secretion and receptor stimulation', *Psychopharmacology Bulletin*, 18(4), pp. 135–143. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0020431294&partnerID=tZOtx3y1>.
- Dagda, R. K. *et al.* (2009) 'Loss of PINK1 function promotes mitophagy through effects on oxidative stress and mitochondrial fission', *Journal of Biological Chemistry*, 284(20), pp. 13843–13855. doi: 10.1074/jbc.M808515200.
- Dakhakhni, T. H., Raouf, G. A. and Qusti, S. Y. (2016) 'Evaluation of the toxic effect of the herbicide 2, 4-D on rat hepatocytes: an FT-IR spectroscopic study', *European Biophysics Journal*, 45(4), pp. 311–320. doi: 10.1007/s00249-015-1097-7.
- Danese, A. *et al.* (2007) 'Childhood maltreatment predicts adult inflammation in a life-course study', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(4), pp. 1319–1324. doi: 10.1073/pnas.0610362104.
- Dantzer, R. (2018) 'Neuroimmune interactions: From the brain to the immune system and vice versa', *Physiological Reviews*, 98(1), pp. 477–504. doi: 10.1152/physrev.00039.2016.
- Dave, K. D. *et al.* (2014) 'Phenotypic characterization of recessive gene knockout

rat models of Parkinson's disease', *Neurobiology of Disease*. Elsevier B.V., 70, pp. 190–203. doi: 10.1016/j.nbd.2014.06.009.

Demir, P. *et al.* (2015) 'Ionizing Radiation Induces Structural and Functional Damage on the Molecules of Rat Brain Homogenate Membranes: A Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectroscopic Study', *Applied spectroscopy*, 69(1), pp. 154–164. doi: 10.1366/13-07154.

Dielenberg, R. A., Arnold, J. C. and McGregor, I. S. (1999) 'Low-dose midazolam attenuates predatory odor avoidance in rats', *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 62(2), pp. 197–201. doi: 10.1016/S0091-3057(98)00064-1.

Dielenberg, R. A. and McGregor, I. S. (2001) 'Defensive behavior in rats towards predatory odors: A review', *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 25(7–8), pp. 597–609. doi: 10.1016/S0149-7634(01)00044-6.

Djamshidian, A. *et al.* (2011) 'Salivary cortisol levels in Parkinson's disease and its correlation to risk behaviour', *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 82(10), pp. 1107–1111. doi: 10.1136/jnnp.2011.245746.

Dodson, M. W. and Guo, M. (2007) 'Pink1, Parkin, DJ-1 and mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease', *Current Opinion in Neurobiology*, 17(3), pp. 331–337. doi: 10.1016/j.conb.2007.04.010.

Du, H. *et al.* (2008) 'Cyclophilin D deficiency attenuates mitochondrial and neuronal perturbation and ameliorates learning and memory in Alzheimer's disease', *Nature Medicine*, 14(10), pp. 1097–1105. doi: 10.1038/nm.1868.

Ennaceur, A. *et al.* (1989) 'A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats . II: effects of piracetam and pramiracetam', *Behavioural Brain Research*, 33, pp. 197–207.

Fabricius, K., Wörtwein, G. and Pakkenberg, B. (2008) 'The impact of maternal separation on adult mouse behaviour and on the total neuron number in the mouse hippocampus', *Brain Structure and Function*. doi: 10.1007/s00429-007-0169-6.

- Fagundes, C. P. and Way, B. (2014) 'Early-life stress and adult inflammation', *Current Directions in Psychological Science*. doi: 10.1177/0963721414535603.
- Fauchais, A.-L. *et al.* (2008) 'Role of endogenous brain-derived neurotrophic factor and sortilin in B cell survival', *The Journal of Immunology*, 181(5), pp. 3027–3038. doi: 10.4049/jimmunol.181.5.3027.
- Ferris, C. F. *et al.* (2018) 'Evidence of neurobiological changes in the presymptomatic PINK1 knockout rat', *Journal of Parkinson's Disease*, 8(2), pp. 281–301. doi: 10.3233/JPD-171273.
- Fogelman, N. and Canli, T. (2019) 'Early life stress, physiology, and genetics: A review', *Frontiers in Psychology*, 10(JULY). doi: 10.3389/fpsyg.2019.01668.
- Forman, H. J., Zhang, H. and Rinna, A. (2009) 'Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis', *Molecular Aspects of Medicine*, 30(1–2), pp. 1–12. doi: 10.1016/j.mam.2008.08.006.
- Freya, T. G. and Mannellab, C. A. (2000) 'The internal structure of mitochondria', *Trends in Biochemical Sciences*, 25(7), pp. 319–324. doi: 10.1016/S0968-0004(00)01609-1.
- Fried, N. T. *et al.* (2014) 'Functional mitochondrial analysis in acute brain sections from adult rats reveals mitochondrial dysfunction in a rat model of migraine', *Am J Physiol Cell Physiol*, 307, pp. 1017–1030. doi: 10.1152/ajpcell.00332.2013.
- Ganguly, P. and Brenhouse, H. C. (2015) 'Broken or maladaptive? Altered trajectories in neuroinflammation and behavior after early life adversity', *Developmental Cognitive Neuroscience*. doi: 10.1016/j.dcn.2014.07.001.
- Gemechu, J. M. *et al.* (2018) 'Characterization of Dopaminergic System in the Striatum of Young Adult Park2 *-/-* Knockout Rats', *Scientific Reports*, 8(1), pp. 1–19. doi: 10.1038/s41598-017-18526-0.
- Giguère, N. *et al.* (2019) 'Increased vulnerability of nigral dopamine neurons after expansion of their axonal arborization size through D2 dopamine receptor

conditional knockout', *PLOS Genetics*, 15(8), pp. 1–26. doi: 10.1371/journal.pgen.1008352.

Giroto, S. *et al.* (2014) 'DJ-1 Is a copper chaperone acting on SOD1 activation', *Journal of Biological Chemistry*, 289(15), pp. 10887–10899. doi: 10.1074/jbc.M113.535112.

Giurgea, C. (1973) 'The "nootropic" approach to the pharmacology of the integrative activity of the brain 1, 2', *Conditional reflex: a Pavlovian journal of research & therapy*, 8(2), pp. 108–115. doi: 10.1007/BF03000311.

Giurgea, C. and Salama, M. (1977) 'Nootropic drugs', *Progress in Neuro-Psychopharmacology*, 1(3–4), pp. 235–247. doi: 10.1016/0364-7722(77)90046-7.

Glaser, R. and Kiecolt-Glaser, J. K. (2005) 'Stress-induced immune dysfunction: implications for health', *Nature Reviews Immunology*, 5(3), pp. 243–251. doi: 10.1038/nri1571.

Glorieux, C. and Calderon, P. B. (2017) 'Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach', *Biological Chemistry*, 398(10), pp. 1095–1108. doi: 10.1515/hsz-2017-0131.

Goldwater, D. S. *et al.* (2009) 'Structural and functional alterations to rat medial prefrontal cortex following chronic restraint stress and recovery', *Neuroscience*, 164(2), pp. 798–808. doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.08.053.

Gouliaev, A. H. and Senning, A. (1994) 'Piracetam and other structurally related nootropics', *Brain Research Reviews*, 19(2), pp. 180–222. doi: 10.1016/0165-0173(94)90011-6.

Gracia-Rubio, I. *et al.* (2016) 'Maternal separation induces neuroinflammation and long-lasting emotional alterations in mice', *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. Elsevier Inc., 65, pp. 104–117. doi: 10.1016/j.pnpbp.2015.09.003.

Grant, L. M. *et al.* (2015) 'Evidence for early and progressive ultrasonic vocalization

- and oromotor deficits in a PINK1 gene knockout rat model of Parkinson's disease', *Journal of Neuroscience Research*, 93(11), pp. 1713–1727. doi: 10.1002/jnr.23625.
- Grigoruță, M. *et al.* (2018) 'Blood mononuclear cells as speculum of emotional stress analyzed by synchrotron infrared spectroscopy and a nootropic drug', *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 204, pp. 475–483. doi: 10.1016/j.saa.2018.06.075.
- Gruhlke, M. C. H. and Slusarenko, A. J. (2012) 'The biology of reactive sulfur species (RSS)', *Plant Physiology and Biochemistry*, 59, pp. 98–107.
- Gupta, S. *et al.* (2009) 'Reversal of propoxur-induced impairment of step-down passive avoidance, transfer latency and oxidative stress by piracetam and ascorbic acid in rats', *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 28, pp. 403–408. doi: 10.1016/j.etap.2009.06.007.
- Gupta, S. *et al.* (2014) 'The metabolic enhancer piracetam attenuates mitochondrion-specific endonuclease G translocation and oxidative DNA fragmentation', *Free Radical Biology and Medicine*, 73, pp. 278–290. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.05.014.
- Hartman, M. L. *et al.* (2014) 'Relation of mitochondrial oxygen consumption in peripheral blood mononuclear cells to vascular function in type 2 diabetes mellitus', *Vascular Medicine (United Kingdom)*, 19(1), pp. 67–74. doi: 10.1177/1358863X14521315.
- Hartmann, A. *et al.* (1997) 'Twenty-four hour cortisol release profiles in patients with Alzheimer's and Parkinson's disease compared to normal controls: Ultradian secretory pulsatility and diurnal variation', *Neurobiology of Aging*, 18(3), pp. 285–289. doi: 10.1016/S0197-4580(97)80309-0.
- Hayashi, T. *et al.* (2009) 'DJ-1 binds to mitochondrial complex I and maintains its activity', *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Elsevier Inc., 390(3), pp. 667–672. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.10.025.

- Hayes, J. D., Flanagan, J. U. and Jowsey, I. R. (2005) 'Glutathione Transferases', *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45(1), pp. 51–88. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095857.
- He, Z. *et al.* (2008) 'Piracetam improves cognitive deficits caused by chronic cerebral hypoperfusion in rats.', *Cellular and molecular neurobiology*, 28(4), pp. 613–27. doi: 10.1007/s10571-007-9165-x.
- Heeman, B. *et al.* (2011) 'Depletion of PINK1 affects mitochondrial metabolism, calcium homeostasis and energy maintenance', *Journal of Cell Science*, 124, pp. 1115–1125. doi: 10.1242/jcs.078303.
- Hensch, T. K. (2005) 'Critical period plasticity in local cortical circuits', *Nature Reviews Neuroscience*, 6, pp. 877–888. doi: 10.1038/nrn1787.
- Herrero, M.-T. *et al.* (2015) 'Inflammation in Parkinson's disease: role of glucocorticoids', *Frontiers in Neuroanatomy*, 9, pp. 1–12. doi: 10.3389/fnana.2015.00032.
- Herz, D. M. *et al.* (2014) 'Levodopa reinstates connectivity from prefrontal to premotor cortex during externally paced movement in Parkinson's disease', *NeuroImage*, 90, pp. 15–23. doi: 10.1016/j.neuroimage.2013.11.023.
- Van Den Heuvel, L. and Smeitink, J. (2001) 'The oxidative phosphorylation (OXPHOS) system: Nuclear genes and human genetic diseases', *BioEssays*, 23(6), pp. 518–525. doi: 10.1002/bies.1071.
- Himani *et al.* (2013) 'An experimental study to evaluate the effects of Aegle Marmelos and its comparison with Piracetam on learning and memory in Wistar rats', *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 4(4), pp. 1591–1597.
- Holinski, S. *et al.* (2008) 'Cerebroprotective effect of piracetam in patients undergoing coronary bypass surgery', *Med Sci Monit*, 14(11), pp. 53–57.
- Holinski, S. *et al.* (2011) 'Cerebroprotective Effect of Piracetam in Patients

Undergoing Open Heart Surgery', *Ann Thorac Cardiovasc Surg*, 17(2), pp. 137–142.

Horvath, B. *et al.* (2002) 'In Vitro Antioxidant Properties of Pentoxifylline, Piracetam, and Vinpocetine', *Clinical Neuropharmacology*, 25(1), pp. 37–42.

Höschl, C. and Hajek, T. (2001) 'Hippocampal damage mediated by corticosteroids — a neuropsychiatric research challenge', *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 251(S2), pp. 81–88. doi: 10.1007/bf03035134.

Howells, D. W. *et al.* (2000) 'Reduced BDNF mRNA expression in the Parkinson's disease substantia nigra', *Experimental Neurology*, 166, pp. 127–135.

Hoyer, S. (1982) 'The young-adult and normally aged brain. Its blood flow and oxidative metabolism. A review - part I', *Geriatr., Arch. Gerontol.*, 1, pp. 101–116. doi: 10.1016/0167-4943(82)90021-8.

Huber, W. *et al.* (1997) 'Piracetam as an Adjuvant to Language Therapy for Aphasia: A Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Pilot Study', *Arch Phys Med Rehabil*, 78, pp. 245–250.

Huot, R. L. *et al.* (2002) 'Neonatal maternal separation reduces hippocampal mossy fiber density in adult Long Evans rats', *Brain Research*. doi: 10.1016/s0006-8993(02)02985-2.

Hurtig, H. I. *et al.* (2000) 'Alpha-synuclein cortical Lewy bodies correlate with dementia in Parkinson's disease', *Neurology*, 54(10), pp. 1916–1921. doi: 10.1212/wnl.54.10.1916.

Ithayaraja, C. M. (2011) 'Mini-review: Metabolic functions and molecular structure of glutathione reductase', *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 9(2), pp. 104–115.

Jackson, M. and Mantsch, H. H. (1995) 'The use and misuse of FTIR Spectroscopy in the determination of protein structure', *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 30(2), pp. 95–120. doi: 10.3109/10409239509085140.

- Jellinger, K. A. (2010) 'Basic mechanisms of neurodegeneration: A critical update', *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14(3), pp. 457–487. doi: 10.1111/j.1582-4934.2010.01010.x.
- Jin, Y. *et al.* (2019) 'The role of BDNF in the neuroimmune axis regulation of mood disorders', *Frontiers in Neurology*, 10, pp. 1–10. doi: 10.3389/fneur.2019.00515.
- Junn, E. *et al.* (2009) 'Mitochondrial localization of DJ-1 leads to enhanced neuroprotection', *Journal of Neuroscience Research*, 87(1), pp. 123–129. doi: 10.1002/jnr.21831.
- Kalkan, E. *et al.* (2011) 'Effects of iloprost and piracetam in spinal cord ischemia – reperfusion injury in the rabbit', *Spinal Cord*, 49, pp. 81–86. doi: 10.1038/sc.2010.76.
- Kannarkat, G. T., Boss, J. M. and Tansey, M. G. (2013) 'The role of innate and adaptive immunity in Parkinson's disease', *Journal of Parkinson's Disease*, 3(4), pp. 493–514. doi: 10.3233/JPD-130250.
- Kayser, E., Sedensky, M. M. and Morgan, P. G. (2016) 'Region-specific defects of respiratory capacities in the Ndufs4 (KO) Mouse Brain', *PLoS ONE*, 4, pp. 1–18. doi: 10.1371/journal.pone.0148219.
- Keil, U. *et al.* (2006) 'Piracetam improves mitochondrial dysfunction following oxidative stress', *British Journal of Pharmacology*, 147, pp. 199–208. doi: 10.1038/sj.bjp.0706459.
- Kerschensteiner, B. M. *et al.* (1999) 'Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation?', *Journal of Experimental Medicine*, 189(5), pp. 865–870.
- Kessler, J. *et al.* (2000a) 'Piracetam improves activated blood flow and facilitates rehabilitation of poststroke aphasic patients', *Stroke*, pp. 2112–2117.
- Kessler, J. *et al.* (2000b) 'Piracetam Improves Activated Blood Flow and Facilitates

- Rehabilitation of Poststroke Aphasic Patients', *Stroke*, 31, pp. 2112–2117.
- Kim, T. *et al.* (2017a) 'Discovery of benzimidazole derivatives as modulators of mitochondrial function: A potential treatment for Alzheimer's disease'. doi: 10.1016/j.ejmech.2016.11.017.
- Kim, T. *et al.* (2017b) 'Discovery of benzimidazole derivatives as modulators of mitochondrial function: A potential treatment for Alzheimer's disease', *European Journal of Medicinal Chemistry*, 125, pp. 1172–1192. doi: 10.1016/j.ejmech.2016.11.017.
- Klementieva, O. *et al.* (2014) 'Microspectroscopy ( $\mu$  FTIR) Reveals Co-localization of Lipid Oxidation and Amyloid Plaques in Human Alzheimer Disease Brains', *Analytical Chemistry*, 86, pp. 12047–12054.
- Koppenol, W. H., Bounds, P. L. and Dang, C. V. (2011) 'Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism', *Nature Reviews Cancer*, 11(5), pp. 325–337. doi: 10.1038/nrc3038.
- Kosta, P. *et al.* (2011) 'Effect of piracetam and vitamin E on phosphamidon-induced impairment of memory and oxidative stress in rats.', *Human and Experimental Toxicology*, 30(10), pp. 1626–1634. doi: 10.3109/01480545.2011.649093.
- Kosta, P. *et al.* (2012) 'Effect of piracetam and vitamin E on phosphamidon-induced impairment of memory and oxidative stress in rats', *Drug and Chemical Toxicology*, pp. 1–7. doi: 10.3109/01480545.2011.649093.
- Kotaria, N. *et al.* (2005) 'Localization of DJ-1 protein in the murine brain', *Cell and Tissue Research*, 322(3), pp. 503–507. doi: 10.1007/s00441-005-0023-1.
- Kozina, E. A. *et al.* (2014) 'Tyrosine hydroxylase expression and activity in nigrostriatal dopaminergic neurons of MPTP-treated mice at the presymptomatic and symptomatic stages of parkinsonism', *Journal of the Neurological Sciences*, 340(1–2), pp. 198–207. doi: 10.1016/j.jns.2014.03.028.
- Kresyun, V. I., Kravchenko, L. S. and Kadyrova, L. L. (1989) 'Effect of Litonit and

Piracetam on the course of experimental myocardial infarction', *Biull Eksp Biol Med*, 108(11), pp. 569–571.

Kuhn, C. M. and Schanberg, S. M. (1998) 'Responses to maternal separation: Mechanisms and mediators', *International Journal of Developmental Neuroscience*, 16(3–4), pp. 261–270. doi: 10.1016/S0736-5748(98)00034-3.

Kurek, A. *et al.* (2018) 'Regulators of glucocorticoid receptor function in an animal model of depression and obesity', *Journal of Neuroendocrinology*, 30(5), pp. 1–13. doi: 10.1111/jne.12591.

Kurz, C. *et al.* (2010) 'The metabolic enhancer piracetam ameliorates the impairment of mitochondrial function and neurite outgrowth induced by  $\beta$ -amyloid peptide', *British journal of pharmacology*, 160, pp. 246–257. doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.00656.x.

Lakshminarasimhan, H. and Chattarji, S. (2012) 'Stress leads to contrasting effects on the levels of brain derived neurotrophic factor in the hippocampus and amygdala', *PLoS ONE*, 7(1), pp. 1–6. doi: 10.1371/journal.pone.0030481.

Lara, V. P. *et al.* (2013) 'High cortisol levels are associated with cognitive impairment no-dementia (CIND) and dementia', *Clinica Chimica Acta*, 423, pp. 18–22. doi: 10.1016/j.cca.2013.04.013.

LaRosa, D. F. and Orange, J. S. (2008) '1. Lymphocytes', *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 121(2 SUPPL. 2), pp. 364–369. doi: 10.1016/j.jaci.2007.06.016.

Lee, B. H. and Kim, Y. K. (2010) 'BDNF mRNA expression of peripheral blood mononuclear cells was decreased in depressive patients who had or had not recently attempted suicide', *Journal of Affective Disorders*, pp. 369–373. doi: 10.1016/j.jad.2010.01.074.

Lee, J.-K., Tran, T. and Tansey, M. G. (2009) 'Neuroinflammation and Parkinson's Disease', *J Neuroimmune Pharmacol*, 4, pp. 419–429. doi: 10.1007/978-1-4614-

5836-4\_6.

Leggio, G. M. *et al.* (2013) 'Dopamine D3 receptor as a new pharmacological target for the treatment of depression', *European Journal of Pharmacology*, 719(1–3), pp. 25–33. doi: 10.1016/j.ejphar.2013.07.022.

Lin, M. T. and Beal, M. F. F. (2006) 'Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases', *Nature*, 443(7113), pp. 787–795. doi: nature05292 [pii]r10.1038/nature05292.

Lin, X. *et al.* (2012) 'DJ-1 isoforms in whole blood as potential biomarkers of Parkinson disease.', *Scientific reports*, 2, p. 954. doi: 10.1038/srep00954.

Liu, K.-Z., Bose, R. and Mantsch, H. H. (2002) 'Infrared spectroscopic study of diabetic platelets', *Vibrational Spectroscopy*, 28(1), pp. 131–136. doi: 10.1016/S0924-2031(01)00163-1.

Lowell, B. B. and Shulman, G. I. (2005) 'Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes', *Science*, 307, pp. 384–387. doi: 10.1007/s11892-005-0006-3.

Lubos, E., Loscalzo, J. and Handy, D. E. (2011) 'Glutathione peroxidase-1 in health and disease: From molecular mechanisms to therapeutic opportunities', *Antioxidants and Redox Signaling*, 15(7), pp. 1957–1997. doi: 10.1089/ars.2010.3586.

Lucassen, P. J. *et al.* (2014) 'Neuropathology of stress', *Acta Neuropathologica*, 127(1), pp. 109–135. doi: 10.1007/s00401-013-1223-5.

Lupien, S. J. *et al.* (1998) 'Cortisol levels during human aging predict hippocampal atrophy and memory deficits', *Nature Neuroscience*, 1(1), pp. 69–73. doi: 10.1038/271.

Lupien, S. J. *et al.* (2009) 'Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition', *Nature Reviews Neuroscience*, 10(6), pp. 434–445. doi: 10.1038/nrn2639.

- Machado-Vieira, R. *et al.* (2007) 'Decreased plasma brain derived neurotrophic factor levels in unmedicated bipolar patients during manic episode', *Biological Psychiatry*, 61(2), pp. 142–144. doi: 10.1016/j.biopsych.2006.03.070.
- Macintyre, A. N. and Rathmell, J. C. (2013) 'Activated lymphocytes as a metabolic model for carcinogenesis', *Cancer & Metabolism*, 1(5), pp. 1–12. doi: 10.1186/2049-3002-1-5.
- Maggioli, E. *et al.* (2016) 'Estrogen protects the blood – brain barrier from inflammation-induced disruption and increased lymphocyte trafficking', *Brain, Behavior, and Immunity*. Elsevier Inc., 51, pp. 212–222. doi: 10.1016/j.bbi.2015.08.020.
- Malik, S. and Spencer, S. J. (2019) 'Early life stress and metabolism', *Current Opinion in Behavioral Sciences*, 28, pp. 25–30. doi: 10.1016/j.cobeha.2019.01.016.
- Malykh, A. G. and Sadaie, M. R. (2010a) 'Piracetam and piracetam-like drugs: From basic science to novel clinical applications to CNS disorders', *Drugs*, 70(3), pp. 287–312. doi: 10.2165/11319230-000000000-00000.
- Malykh, A. G. and Sadaie, M. R. (2010b) 'Piracetam and piracetam-like drugs: From basic science to novel clinicMalykh, A.G., Sadaie, M.R., 2010. Piracetam and piracetam-like drugs: From basic science to novel clinical applications to CNS disorders.', *Drugs*, 70(3), pp. 287–312. doi: 10.2165/11319230-000000000-00000.
- Mamchur, V. *et al.* (2015) 'Effect of Piracetam , resveratrol and propylene glycol extract of Royal jelly on behavioral functions and markers of oxidative stress in rats with experimental metabolic syndrome', *The Pharma Innovation Journal*, 4(8), pp. 72–76.
- Marisco, P. C. *et al.* (2013) 'Piracetam Prevents Scopolamine-Induced Memory Impairment and Decrease of NTPDase , 5 0 -Nucleotidase and Adenosine Deaminase Activities', *Neurochem Res*, 38, pp. 1704–1714. doi: 10.1007/s11064-013-1072-6.

- Marquis, J. M., Lettenberger, S. E. and Kelm-Nelson, C. A. (2020) 'Early-onset Parkinsonian behaviors in female Pink1<sup>-/-</sup> rats', *Behavioural Brain Research*, 377, pp. 1–15. doi: 10.1016/j.bbr.2019.112175.
- Massaad, C. and Klann, E. (2011) 'Reactive oxygen species in the regulation of synaptic plasticity and memory.', *Antioxidants & redox signaling*, 14(10), pp. 2013–2054. doi: 10.1089/ars.2010.3208.
- Matheoud, D. *et al.* (2016) 'Parkinson's disease-related proteins PINK1 and Parkin repress mitochondrial antigen presentation', *Cell*, 166(2), pp. 314–327. doi: 10.1016/j.cell.2016.05.039.
- Mattson, M. P., Gleichmann, M. and Cheng, A. (2008) 'Mitochondria in Neuroplasticity and Neurological Disorders', *Neuron*. Elsevier Inc., 60(5), pp. 748–766. doi: 10.1016/j.neuron.2008.10.010.
- Mattson, M. P. and Magnus, T. (2006) 'Aging and Neuronal Vulnerability', *Nature Reviews Neuroscience*, 7(4), pp. 278–294. doi: 10.1038/nrn1886.Aging.
- Maurissen, J. P. J. *et al.* (2003) 'Factors affecting grip strength testing', *Neurotoxicology and Teratology*, 25(5), pp. 543–553. doi: 10.1016/S0892-0362(03)00073-4.
- McComb, S. *et al.* (2013) 'Introduction to the Immune System', *Methods in molecular biology*, 1061, pp. 1–20. doi: 10.1007/978-1-62703-589-7.
- McEwen, B. S. and Gianaros, P. J. (2011) 'Stress- and Allostasis-Induced Brain Plasticity', *Annual Review of Medicine*, 62(1), pp. 431–445. doi: 10.1146/annurev-med-052209-100430.
- McEwen, B. S., Nasca, C. and Gray, J. D. (2016) 'Stress effects on neuronal structure: hippocampus, amygdala, and prefrontal cortex', *Neuropsychopharmacology*. Nature Publishing Group, 41(1), pp. 3–23. doi: 10.1038/npp.2015.171.
- McEwen, B. S. and Wingfield, J. C. (2003) 'The concept of allostasis in biology and

biomedicine', *Hormones and Behavior*, 43(1), pp. 2–15. doi: 10.1016/S0018-506X(02)00024-7.

McGowan, P. O. *et al.* (2009) 'Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse', *Nature Neuroscience*, 12(3), pp. 342–348. doi: 10.1038/nn.2270.

Mehta, A. K. *et al.* (2014) 'Analgesic Effect of Piracetam on Peripheral Neuropathic Pain Induced by Chronic Constriction Injury of Sciatic Nerve in Rats', *Neurochem Res*, 39, pp. 1433–1439. doi: 10.1007/s11064-014-1329-8.

Meiser, J. *et al.* (2016) 'Loss of DJ-1 impairs antioxidant response by altered glutamine and serine metabolism', *Neurobiology of Disease*, 89, pp. 112–125. doi: 10.1016/j.nbd.2016.01.019.

Mejia-Carmona, G. E. *et al.* (2014) 'Evaluation of antioxidant enzymes in response to predator odor stress in prefrontal cortex and amygdala', *Neurochemical Journal*, 8(2), pp. 125–128. doi: 10.1134/S181971241402007X.

Mejia-Carmona, G. E. *et al.* (2015) 'Oxidant/antioxidant effects of chronic exposure to predator odor in prefrontal cortex, amygdala, and hypothalamus', *Molecular and Cellular Biochemistry*, 406(1–2), pp. 121–129. doi: 10.1007/s11010-015-2430-2.

De Melo, S. R. *et al.* (2018) 'Neonatal stress has a long-lasting sex-dependent effect on anxiety-like behavior and neuronal morphology in the prefrontal cortex and hippocampus', *Developmental Neuroscience*, 40(2). doi: 10.1159/000486619.

Mercado, N. M. *et al.* (2017) 'BDNF in the aged brain: translational implications for Parkinson's disease', *Austin Neurol Neurosci.*, 2(2), pp. 1–18. doi: 10.1038/s41598-019-39414-9.

Miller, L. M., Bourassa, M. W. and Smith, R. J. (2013) 'FTIR spectroscopic imaging of protein aggregation in living cells', *Biochimica et biophysica acta*, 1828(10), pp. 2339–2346. doi: 10.1016/j.bbamem.2013.01.014.FTIR.

Mirescu, C., Peters, J. D. and Gould, E. (2004) 'Early life experience alters

response of adult neurogenesis to stress', *Nature Neuroscience*. doi: 10.1038/nn1290.

Miyama, A. *et al.* (2011) 'Oxidation of DJ-1 induced by 6-hydroxydopamine decreasing intracellular glutathione', *PLoS ONE*, 6(11). doi: 10.1371/journal.pone.0027883.

Mogi, M. *et al.* (1999) 'Brain-derived growth factor and nerve growth factor concentrations are decreased in the substantia nigra in Parkinson's disease', *Neuroscience letters*, 270, pp. 45–48.

Monroe, S. M. (2001) 'Stress: psychological perspectives', *International Encyclopedia of the Social & Behavioral Sciences: Second Edition*, pp. 15198–15201. doi: 10.1016/B978-0-08-097086-8.25038-1.

Moore, D. J., Sills, R. H. and Mendelsohn, R. (1995) 'Peroxidation of erythrocytes: FTIR spectroscopy studies of extracted lipids, isolated membranes, and intact cells', *Biospectroscopy*, 1(2), pp. 133–140. doi: 10.1002/bspy.350010207.

Mulcahy, P. *et al.* (2012) 'Development and characterisation of a novel rat model of Parkinson's disease induced by sequential intranigral administration of AAV- $\alpha$ -synuclein and the pesticide, rotenone', *Neuroscience*, 203, pp. 170–179. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.12.011.

Muley, M. M. *et al.* (2012) 'Silymarin improves the behavioural, biochemical and histoarchitecture alterations in focal ischemic rats: A comparative evaluation with piracetam and protocatechuic acid', *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. Elsevier Inc., 102(2), pp. 286–293. doi: 10.1016/j.pbb.2012.05.004.

Muley, M. M. *et al.* (2013) 'Amelioration of cognitive, motor, endogenous defense functions with silymarin, piracetam and protocatechuic acid in the cerebral global ischemic rat model', *Life Sciences*, 93, pp. 51–57. doi: 10.1016/j.lfs.2013.05.020.

Müller, W. E. *et al.* (1997) 'Effects of piracetam on membrane fluidity in the aged mouse, rat, and human brain', *Biochemical Pharmacology*, 53(2), pp. 135–140. doi:

10.1016/S0006-2952(96)00463-7.

Nagakubo, D. *et al.* (1997) 'DJ-1, a novel oncogene which transforms mouse NIH3T3 cells in cooperation with ras.', *Biochemical and biophysical research communications*, 231(2), pp. 509–513. doi: 10.1006/bbrc.1997.6132.

Nandhakumar, S. *et al.* (2011) 'Evaluation of DNA damage using single-cell gel electrophoresis (Comet Assay)', *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*, 2(2), pp. 107–111. doi: 10.4103/0976-500X.81903.

Narayanan, N. S., Rodnitzky, R. L. and Uc, E. (2013) 'Prefrontal dopamine signaling and cognitive symptoms of Parkinson's Disease', *Rev Neurosci.*, 24(3), pp. 1–17. doi: 10.1515/revneuro-2013-0004.Prefrontal.

Nehru, B. *et al.* (2006) 'Comparison of 1- ( 2- naphthyloxymethylcarbonyl ) pyrrolidine , PP-20 / DPJ , newly synthesized compound with the nootropic drug piracetam in normal and aluminum-induced neurotoxic state', *Toxicological & Environmental Chemistry*, 88(2), pp. 301–307. doi: 10.1080/02772240600688299.

Nelson, D. L. and Cox, M. M. (2012) *Lehninger principles of biochemistry: 6th Edition*.

O'Neill, L. A. J. and Grahame Hardie, D. (2013) 'Metabolism of inflammation limited by AMPK and pseudo-starvation', *Nature*, 493(7432), pp. 346–355. doi: 10.1038/nature11862.

Oh, S. E. and Mouradian, M. M. (2018) 'Redox biology cytoprotective mechanisms of DJ-1 against oxidative stress through modulating ERK1/2 and ASK1 signal transduction', *Redox Biology*, 14, pp. 211–217. doi: 10.1016/j.redox.2017.09.008.

Olmos, G. and Lladó, J. (2014) 'Tumor necrosis factor alpha: A link between neuroinflammation and excitotoxicity', *Mediators of Inflammation*, 2014. doi: 10.1155/2014/861231.

Palasz, E. *et al.* (2020) 'BDNF as a promising therapeutic agent in parkinson's disease', *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3). doi:

10.3390/ijms21031170.

Palikaras, K., Lionaki, E. and Tavernarakis, N. (2015) 'Balancing mitochondrial biogenesis and mitophagy to maintain energy metabolism homeostasis', *Cell Death and Differentiation*. Nature Publishing Group, 22(9), pp. 1399–1401. doi: 10.1038/cdd.2015.86.

Pandey, S. and Garabadu, D. (2016) 'Piracetam facilitates the anti-amnesic but not anti-diabetic activity of metformin in experimentally induced type-2 diabetic encephalopathic rats', *Cellular and Molecular Neurobiology*. Springer US. doi: 10.1007/s10571-016-0418-4.

Paxinos, G. and Watson, C. (2007) *The Rat Brain in stereotaxic coordinates*. 6th edn, *Technology*. 6th edn.

Pellow, S. *et al.* (1985) 'Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat', *Journal of Neuroscience Methods*, 14(3), pp. 149–167. doi: 10.1016/0165-0270(85)90031-7.

Pendergrass, W., Wolf, N. and Pool, M. (2004) 'Efficacy of MitoTracker Green™ and CMXRosamine to measure changes in mitochondrial membrane potentials in living cells and tissues', *Cytometry Part A*, 61(2), pp. 162–169. doi: 10.1002/cyto.a.20033.

Peuvot, J. *et al.* (1995) 'Piracetam-induced changes to membrane physical properties. A combined approach by <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance and conformational analysis.', *Biochemical pharmacology*, 50(8), pp. 1129–34. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7488225>.

Pfau, M. L. and Russo, S. J. (2015) 'Peripheral and central mechanisms of stress resilience', *Neurobiology of Stress*. Elsevier Inc, 1(1), pp. 66–79. doi: 10.1016/j.ynstr.2014.09.004.

Phaniendra, A., Jestadi, D. B. and Periyasamy, L. (2015) 'Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases', *Indian Journal of Clinical*

*Biochemistry*, 30(1), pp. 11–26. doi: 10.1007/s12291-014-0446-0.

Picard, M. *et al.* (2013) 'Mitochondrial morphology transitions and functions: implications for retrograde signaling?', *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 304, pp. R393–R406. doi: 10.1152/ajpregu.00584.2012.

Picard, M. *et al.* (2018) 'An energetic view of stress: Focus on mitochondria', *Frontiers in Neuroendocrinology*, 49, pp. 72–85. doi: 10.1016/j.yfrne.2018.01.001.An.

Picard, M. and McEwen, B. S. (2018) 'Psychological Stress and Mitochondria: A Conceptual Framework', *Psychosomatic Medicine*, 80(2), pp. 126–140. doi: 10.1097/PSY.0000000000000544.

Pilch, H. and Muller, W. E. (1988) 'Piracetam elevates muscarinic cholinergic receptor density in the frontal cortex of aged but not of young mice', *Psychopharmacology*, 94(1), pp. 74–78. doi: 10.1007/BF00735884.

Platt, D., Hering, H. and Hering, F. J. (1973) 'Age dependent determination of lysosomal enzyme activities in the liver and brain as well as the measurements of cytoplasmic enzyme activities in the blood of piracetam pre-treated rats', *Exp. Geront.*, 8, pp. 315–324.

Poewe, W. *et al.* (2017) 'Parkinson disease', *Nature*, 3, pp. 1–21. doi: 10.1038/nrdp.2017.13.

Porritt, M. J., Batchelor, P. E. and Howells, D. W. (2005) 'Inhibiting BDNF expression by antisense oligonucleotide infusion causes loss of nigral dopaminergic neurons', *Experimental Neurology*, 192, pp. 226–234.

Posfai, B., Csere, C. and Orsolits, B. (2018) 'New insights into microglia – neuron interactions: a neuron's perspective', *Neuroscience*.

Purcell, J. M. and Susi, H. (1984) 'Solvent denaturation of proteins as observed by resolution-enhanced Fourier transform infrared spectroscopy', *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 9, pp. 193–199.

- Rahmani, F. *et al.* (2019) 'Plasma levels of brain-derived neurotrophic factor in patients with Parkinson disease: a systematic review and meta-analysis', *Brain Research*, 1704, pp. 127–136.
- Rampersad, S. N. (2012) 'Multiple applications of alamar blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays', *Sensors*, 12(9), pp. 12347–12360. doi: 10.3390/s120912347.
- Ren, X. *et al.* (2019) 'Profiles of brain oxidative damage, ventricular alterations, and neurochemical metabolites in the striatum of PINK1 knockout rats as functions of age and gender: Relevance to Parkinson disease', *Free Radical Biology and Medicine*, 143(August), pp. 146–152. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.08.008.
- Rozas, G. and Labandeira García, J. L. (1997) 'Drug-free evaluation of rat models of parkinsonism and nigral grafts using a new automated rotarod test', *Brain Research*, 749(2), pp. 188–199. doi: 10.1016/S0006-8993(96)01162-6.
- Salvatore, M. F. *et al.* (2019) 'Tyrosine hydroxylase inhibition in substantia nigra decreases movement frequency', *Molecular Neurobiology*, 56(4), pp. 2728–2740. doi: 10.1007/s12035-018-1256-9.
- Scalzo, P. *et al.* (2010) 'Serum levels of brain-derived neurotrophic factor correlate with motor impairment in Parkinson's disease', *Journal of Neurology*, 257, pp. 540–545. doi: 10.1007/s00415-009-5357-2.
- Schiavone, S. *et al.* (2013) 'Severe life stress and oxidative stress in the brain: From animal models to human pathology', *Antioxidants and Redox Signaling*, 18(12), pp. 1475–1490. doi: 10.1089/ars.2012.4720.
- Schmidt, M. V (2010) 'Molecular mechanisms of early life stress — Lessons from mouse models', *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 34, pp. 845–852. doi: 10.1016/j.neubiorev.2009.05.002.
- Selye, H. (1936) 'A syndrome produced by diverse nocuous agents', *Nature*, 138(32), p. 1.

Selye, H. (1956) *The stress of life*.

Selye, H. (1975) 'Confusion and Controversy in the Stress Field', *Journal of Human Stress*, 1(2), pp. 37–44. doi: 10.1080/0097840X.1975.9940406.

Sendrowski, K. *et al.* (2015) 'Pharmacological Reports Study of the protective effects of nootropic agents against neuronal damage induced by amyloid-beta (fragment 25 – 35) in cultured hippocampal neurons', *Pharmacological Reports*. Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences, 67(2), pp. 326–331. doi: 10.1016/j.pharep.2014.09.013.

Severcan, F. (2003) 'Fourier transform infrared spectroscopic studies of diabetic rat heart crude membranes', 17, pp. 569–577.

Shendelman, S. *et al.* (2004) 'DJ-1 Is a redox-dependent molecular chaperone that inhibits  $\alpha$ -synuclein aggregate formation', *PLoS Biology*, 2(11). doi: 10.1371/journal.pbio.0020362.

Shi, M. *et al.* (2011) 'Significance and confounders of peripheral DJ-1 and alpha-synuclein in Parkinson disease', *Neuroscience letters*, 480(1), pp. 78–82. doi: 10.1016/j.neulet.2010.06.009.Significance.

Sierra-Fonseca, J. A. and Gosselink, K. L. (2018) 'Tauopathy and neurodegeneration: A role for stress', *Neurobiology of Stress*, 9(July), pp. 105–112. doi: 10.1016/j.ynstr.2018.08.009.

Singh, S., Goswami, P., Swarnkar, S., Singh, S. P., *et al.* (2011) 'A study to evaluate the effect of nootropic drug-piracetam on DNA damage in leukocytes and macrophages.', *Mutation research*. Elsevier B.V., 726(1), pp. 66–74. doi: 10.1016/j.mrgentox.2011.08.009.

Singh, S., Goswami, P., Swarnkar, S., Pratap, S., *et al.* (2011) 'A study to evaluate the effect of nootropic drug — Piracetam on DNA damage in leukocytes and macrophages &', *Mutation Research*. Elsevier B.V., 726(1), pp. 66–74. doi: 10.1016/j.mrgentox.2011.08.009.

- Smith, L. K. *et al.* (2008) 'Stress accelerates neural degeneration and exaggerates motor symptoms in a rat model of Parkinson's disease', *European Journal of Neuroscience*, 27(8), pp. 2133–2146. doi: 10.1111/j.1460-9568.2008.06177.x.
- Solanki, P. *et al.* (2011) 'Preventive effect of Piracetam and Vinpocetine on hypoxia-reoxygenation induced injury in primary hippocampal culture', *Food and Chemical Toxicology*. Elsevier Ltd, 49(4), pp. 917–922. doi: 10.1016/j.fct.2010.12.015.
- Sprague, J. E. and Arbeláez, A. M. (2011) 'Glucose counterregulatory responses to hypoglycemia', *Pediatr Endocrinol Rev*, 9(1), pp. 463–475. doi: 10.1038/jid.2014.371.
- Stauch, K. L. *et al.* (2016) 'Loss of Pink1 modulates synaptic mitochondrial bioenergetics in the rat striatum prior to motor symptoms: concomitant complex I respiratory defects and increased complex II-mediated respiration', *Proteomics - Clinical Applications*, 10(12), pp. 1205–1217. doi: 10.1002/prca.201600005.
- Su, B. *et al.* (2010) 'Abnormal mitochondrial dynamics- A novel therapeutic target for Alzheimer's disease', *Molecular Neurobiology*, 41(2–3), pp. 87–96. doi: 10.1007/s12035-009-8095-7.Abnormal.
- Sulzer, D. and Surmeier, D. J. (2014) 'Neuronal vulnerability, pathogenesis and Parkinson's disease', *Mov Disord.*, 28(1), pp. 41–50. doi: 10.1002/mds.25095.Neuronal.
- Sun, L. *et al.* (2018) 'Lack of PINK1 alters glia innate immune responses and enhances inflammation-induced, nitric oxide-mediated neuron death', *Scientific Reports*, 8(1), pp. 1–16. doi: 10.1038/s41598-017-18786-w.
- Swathi, V. *et al.* (2015) 'Evaluation of nootropic activity of Acorpus Calamus against scopolamine induced Alzheimer's', *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(11), pp. 1743–1758.
- Szabo, S. (1998) 'Hans Selye and the development of the stress concept. Special reference to gastroduodenal ulcerogenesis.', *Annals of the New York Academy of*

*Sciences*, 851, pp. 19–27. doi: 10.1111/j.1749-6632.1998.tb08972.x.

Taira, T. *et al.* (2004) 'DJ-1 has a role in antioxidative stress to prevent cell death.', *EMBO reports*, 5(2), pp. 213–218. doi: 10.1038/sj.embor.7400074.

Tidy, R. J. *et al.* (2016) 'FTIR studies of the similarities between pathology induced protein aggregation in vivo and chemically induced protein aggregation ex vivo', *Vibrational Spectroscopy*. Elsevier B.V., 91, pp. 68–76. doi: 10.1016/j.vibspec.2016.09.016.

Tripathi, A., Paliwal, P. and Krishnamurthy, S. (2017a) 'Piracetam attenuates LPS-induced neuroinflammation and cognitive impairment in rats', *Cellular and Molecular Neurobiology*. Springer US, 37(8), pp. 1373–1386. doi: 10.1007/s10571-017-0468-2.

Tripathi, A., Paliwal, P. and Krishnamurthy, S. (2017b) 'Piracetam Attenuates LPS-Induced Neuroinflammation and Cognitive Impairment in Rats', *Cellular and Molecular Neurobiology*, pp. 1–14. doi: 10.1007/s10571-017-0468-2.

Truban, D. *et al.* (2017) 'PINK1, Parkin, and mitochondrial quality control: what can we learn about Parkinson's disease pathobiology?', *Journal of Parkinson's Disease*, 7(1), pp. 13–29. doi: 10.3233/JPD-160989.

Tuglu, D. *et al.* (2015) 'Protective effects of udenafil citrate , piracetam and dexmedetomidine treatment on testicular torsion / detorsion-induced ischaemia / reperfusion injury in rats', *Andrologia*, pp. 1–7. doi: 10.1111/and.12499.

Türker-Kaya, S. *et al.* (2016) 'Tianeptine, olanzapine and fluoxetine show similar restoring effects on stress induced molecular changes in mice brain: An FT-IR study', *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 161, pp. 178–185. doi: 10.1016/j.saa.2016.02.038.

Unger, B. S. and Himasaila, M. (2016) 'Pharmacological evaluation of Piracetam and Vanadyl sulfate on experimentally induced cerebral ischemia in rats', *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 8(9).

- Usami, Y. *et al.* (2011) 'DJ-1 associates with synaptic membranes', *Neurobiology of Disease*, 43(3), pp. 651–662. doi: 10.1016/j.nbd.2011.05.014.
- Valente, E. M. *et al.* (2004) 'PINK1 mutations are associated with sporadic early-onset parkinsonism', *Annals of Neurology*, 56(3), pp. 336–341. doi: 10.1002/ana.20256.
- Valko, M. *et al.* (2007) 'Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease', *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39, pp. 44–84.
- Vargas-Caraveo, A. *et al.* (2014) 'Preliminary studies of the effects of psychological stress on circulating lymphocytes analyzed by synchrotron radiation based-Fourier transform infrared microspectroscopy', *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. Elsevier B.V., 128, pp. 141–146. doi: 10.1016/j.saa.2014.02.148.
- Vargas-Caraveo, A., Perez-Ishiwara, D. G. and Martinez-Martinez, A. (2015) 'Chronic psychological distress as an inducer of microglial activation and leukocyte recruitment into the area postrema', *Neuroimmunomodulation*, 22, pp. 311–321. doi: 10.1159/000369350.
- Vargas-Caraveo, A., Pérez-Ishiwara, D. G. and Martínez-Martínez, A. (2015) 'Chronic psychological distress as an inducer of microglial activation and leukocyte recruitment into the area postrema', *Neuroimmunomodulation*, 22(5), pp. 311–321. doi: 10.1159/000369350.
- Vázquez-Mayorga, E. *et al.* (2016) 'Novel redox-dependent esterase activity (EC 3.1.1.2) for DJ-1: Implications for Parkinson's Disease', *International Journal of Molecular Sciences*, 17(1346), pp. 1–17. doi: 10.3390/ijms17081346.
- Verma, D. K. *et al.* (2015) 'Metabolic enhancer piracetam attenuates rotenone induced oxidative stress: a study in different rat brain regions', *Acta Neurobiol Exp*, 75, pp. 399–411.

- Vidrascu, E. M. *et al.* (2019) 'Effects of early- and mid-life stress on DNA methylation of genes associated with subclinical cardiovascular disease and cognitive impairment: A systematic review', *BMC Medical Genetics*, 20(1), pp. 1–12. doi: 10.1186/s12881-019-0764-4.
- Villanueva, P. J. *et al.* (2018) 'Pyronaridine exerts potent cytotoxicity on human breast and hematological cancer cells through induction of apoptosis', *PLoS ONE*, 13(11), pp. 1–18.
- Villeneuve, L. M. *et al.* (2016) 'Early expression of Parkinson's disease-related mitochondrial abnormalities in PINK1 knockout rats', *Molecular Neurobiology*, 53(1), pp. 171–186. doi: 10.1007/s12035-014-8927-y.
- Volpi, R. *et al.* (1997) 'ACTH/Cortisol involvement in the serotonergic disorder affecting the parkinsonian brain', *Neuropsychobiology*, 35, pp. 73–78. doi: 10.1159/000119394.
- Wang, P. P. *et al.* (2016) 'Racemic oleracein e increases the survival rate and attenuates memory impairment in D-galactose/NaNO<sub>2</sub>-induced senescent mice', *Phytomedicine*. Elsevier GmbH, 23(5), pp. 460–467. doi: 10.1016/j.phymed.2016.02.014.
- Wang, Y. *et al.* (2017) 'Association of low serum BDNF with depression in patients with Parkinson's disease', *Parkinsonism and Related Disorders*, 41, pp. 73–78. doi: 10.1016/j.parkreldis.2017.05.012.This.
- Wang, Y., Li, F. and Chen, X. (2016) 'Piracetam prevents memory deficit induced by postnatal propofol exposure in mice', *European Journal of Pharmacology*. Elsevier, 779, pp. 59–65. doi: 10.1016/j.ejphar.2016.03.013.
- Warburg, O. (1925) 'The metabolism of carcinoma cells', *The Journal of Cancer Research*, 9(1), pp. 148–163. doi: 10.1158/jcr.1925.148.
- Weiss, C., Maker, H. S. and Lehrer, G. M. (1980) 'Sensitive fluorometric assays for glutathione peroxidase and reductase', *Analytical Biochemistry*, 106(2), pp. 512–

516. doi: 10.1016/0003-2697(80)90556-4.

Wilson, M. A. (2011) 'The Role of Cysteine Oxidation in DJ-1 Function and Dysfunction', *Antioxidants & Redox Signaling*, 15(1), pp. 111–122. doi: 10.1089/ars.2010.3481.

Winblad, B. (2005) 'Piracetam: a review of pharmacological properties and clinical uses', *CNS Drugs Reviews*, 11(2), pp. 169–182.

Xavier, L. L. *et al.* (2005) 'A simple and fast densitometric method for the analysis of tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the substantia nigra pars compacta and in the ventral tegmental area', *Brain Research Protocols*, 16, pp. 58–64. doi: 10.1016/j.brainresprot.2005.10.002.

Xiu, M. H. *et al.* (2009) 'Decreased serum BDNF levels in chronic institutionalized schizophrenia on long-term treatment with typical and atypical antipsychotics', *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 33, pp. 1508–1512.

Xu, P. *et al.* (2015) 'The effects of piracetam on heroin-induced CPP and neuronal apoptosis in rats', *Drug and Alcohol Dependence*. Elsevier Ireland Ltd, 150, pp. 141–146. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2015.02.026.

Yin, F. *et al.* (2017) 'Energy metabolism and inflammation in brain aging and Alzheimer's Disease', *Free Radic Biol Med.*, 100, pp. 108–122. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.200.Energy.

Zaitone, S. A., Abo-elmatty, D. M. and Elshazly, S. M. (2012) 'Piracetam and vinpocetine ameliorate rotenone-induced Parkinsonism in rats', *Indian Journal of Pharmacology*, 44(6). doi: 10.4103/0253-7613.103300.

Zhang, B. *et al.* (2017) 'Chronic glucocorticoid exposure activates BK-NLRP1 signal involving in hippocampal neuron damage', *Journal of Neuroinflammation*. Journal of Neuroinflammation, 14(1), pp. 1–13. doi: 10.1186/s12974-017-0911-9.

Zhang, H., Zhao, Y. and Wang, Z. (2015) 'Chronic corticosterone exposure reduces

hippocampal astrocyte structural plasticity and induces hippocampal atrophy in mice', *Neuroscience Letters*. Elsevier Ireland Ltd, 592, pp. 76–81. doi: 10.1016/j.neulet.2015.03.006.

Zhang, J., Qin, L. and Zhao, H. (2013) 'Early repeated maternal separation induces alterations of hippocampus reelin expression in rats', *Journal of Biosciences*. doi: 10.1007/s12038-012-9286-3.

Zhang, L. *et al.* (2005) 'Mitochondrial localization of the Parkinson's disease related protein DJ-1: Implications for pathogenesis', *Human Molecular Genetics*, 14(14), pp. 2063–2073. doi: 10.1093/hmg/ddi211.

Zheng, J. (2012) 'Energy metabolism of cancer: Glycolysis versus oxidative phosphorylation (review)', *Oncology Letters*, 4(6), pp. 1151–1157. doi: 10.3892/ol.2012.928.

Zhi, L. *et al.* (2018) 'Loss of PINK1 causes age-dependent decrease of dopamine release and mitochondrial dysfunction', *Neurobiology of Aging*, 75, pp. 1–10. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2018.10.025.

Zhou, J. *et al.* (2019) 'Mitochondrial protein PINK1 positively regulates RLR signaling', *Frontiers in Immunology*, 10, pp. 1–14. doi: 10.3389/fimmu.2019.01069.

Zondler, L. *et al.* (2014) 'DJ-1 interactions with  $\alpha$ -synuclein attenuate aggregation and cellular toxicity in models of Parkinson's disease.', *Cell death & disease*, 5, p. e1350. doi: 10.1038/cddis.2014.307.

# ANEXO 1

Molecular Neurobiology  
<https://doi.org/10.1007/s12035-019-01838-9>



## Psychological Stress Phenocopies Brain Mitochondrial Dysfunction and Motor Deficits as Observed in a Parkinsonian Rat Model

Mariana Grigoruță<sup>1,2</sup>  · Alejandro Martínez-Martínez<sup>2</sup>  · Raul Y. Dagda<sup>1</sup> · Ruben K. Dagda<sup>1</sup> 

Received: 30 July 2019 / Accepted: 14 November 2019  
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2019

### Abstract

Psychological distress is a public health issue as it contributes to the development of human diseases including neuropathologies. Parkinson's disease (PD), a chronic, progressive neurodegenerative disorder, is caused by multiple factors including aging, mitochondrial dysfunction, and/or stressors. In PD, a substantial loss of *substantia nigra* (SN) neurons leads to rigid tremors, bradykinesia, and chronic fatigue. Several studies have reported that the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis is altered in PD patients, leading to an increase level of cortisol which contributes to neurodegeneration and oxidative stress. We hypothesized that chronic psychological distress induces PD-like symptoms and promotes neurodegeneration in wild-type (WT) rats and exacerbates PD pathology in PINK1 knockout (KO) rats, a well-validated animal model of PD. We measured the bioenergetics profile (oxidative phosphorylation and glycolysis) in the brain by employing an XF24<sup>o</sup> Seahorse Extracellular Flux Analyzer in young rats subjected to predator-induced psychological distress. In addition, we analyzed anxiety-like behavior, motor function, expression of antioxidant enzymes, mitochondrial content, and neurotrophic factors brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the brain. Overall, we observed that psychological distress diminished up to 50% of mitochondrial respiration and glycolysis in the prefrontal cortex (PFC) derived from both WT and PINK1-KO rats. Mechanistically, the level of antioxidant proteins, mitochondrial content, and BDNF was significantly altered. Finally, psychological distress robustly induced anxiety and Parkinsonian symptoms in WT rats and accelerated certain symptoms of PD in PINK1-KO rats. For the first time, our collective data suggest that psychological distress can phenocopy several aspects of PD neuropathology, disrupt brain energy production, as well as induce ataxia-like behavior.

**Keywords** PARK7 · SOD · CAT · Corticosterone · TOM20 · BDNF

## ANEXO 2

13/8/2019

Attendance Certificate



# ISN-ASN MEETING

## CERTIFICATE OF ATTENDANCE

Mariana Grigoruta

Universidad Autonoma de Ciudad Juarez

attended the  
ISN - ASN Meeting on August 4-8, 2019  
in Montréal, Canada.

and presented:

Alteration of brain energy induced by psychological stress affects motor function in a rat model of Parkinson's disease in session WTH09 Neurodegeneration and mental health (Session B)

mediate the uptake and the propagation of  $\alpha$ -syn by performing respectively pH-Rodo uptake assays and microfluid three chamber assays. This work will contribute to our better understanding of molecular mechanisms of  $\alpha$ -syn pathology and spreading, providing new molecular insight into PD and LBD.

### WTH09-11

#### Delayed onset and progression of amyotrophic lateral sclerosis in SOD1-G37R/THY1-YFP16 mouse model

**F. Fiore**

Université de Montréal, Neurosciences, Montréal, Canada

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is a fatal and rapidly progressing neurodegenerative disease characterized by neuromuscular junction (NMJ) denervation and motor neuron (MN) death. In order to study denervation mechanisms *in vivo*, we crossed SOD1<sup>G37R</sup> mice with thy1-YFP16 mice. Surprisingly, ALS onset occurred much later in SOD1-YFP mice compared to SOD1 mice. We therefore investigated SOD1-YFP disease progression and motor phenotype. We observed a delayed onset and slower disease progression in SOD1-YFP mice along with the preservation of their motor function for a longer period of time. We then looked at NMJ denervation and motor neuron survival. SOD1-YFP mice showed less denervation and postsynaptic disorganization, suggesting a better overall preservation of their NMJs. They also displayed increased motor neuron survival in lumbar spinal chord slices. Finally, we analyzed synaptic transmission at the NMI. Preliminary results show no difference in synaptic activity between SOD1-YFP

levels in the 5xFAD and HNE models. Using sharp electrode electrophysiology and calcium imaging (OGB-1), we are beginning to observe an attenuated AHP in the 4 month 5xFAD animals compared to 1.5 months. Analyses of behavior data (MWM) does not show deficit until later time points (6-7 months). These data support the notion that reduced neuronal calcium signaling could be a precipitating factor in the manifestation of behavioral deficits, rather than an increase in neuronal calcium seen in normal aging.

### WTH09-13

#### Alteration of brain energy induced by psychological stress affects motor function in a rat model of Parkinson's disease

**M. Grigoruta<sup>1,2</sup>, R. Dagda<sup>2</sup>, A. Martinez-Martinez<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Universidad Autonoma de Ciudad Juarez, Chemical Biology, Juarez, Mexico

<sup>2</sup>University of Nevada Reno, Pharmacology, Reno, USA

Parkinson's disease (PD) is a multifactorial progressive neurodegenerative disorder. A loss of *substantia nigra* (SN) neurons leads to clinical symptoms including rigid tremors and bradykinesia. In the brain, psychological stress can increase oxidative damage, neurodegeneration, and thereby contribute to neuropathologies. While the link between psychological stress and brain health has received high level of attention, the implication of psychological stress in the onset and progression of PD is not known.

**Hypothesis:** We hypothesized that distress alters energy production in the brain, elicits oxidative stress and affects

WTH09 Neurodegeneration and mental health (Session B)

motor function in wild-type (WT) and in Parkinsonian rats (PINK1-KO).

**Results:** By using an XF24<sup>e</sup> Extracellular Analyzer, we observed that psychological distress diminished up to 50% of mitochondrial respiration and glycolysis in the prefrontal cortex (PC) and concomitantly elicited an increase in mitochondrial respiration in SN from brains derived both WT and PINK1-KO rats. By performing immunohistochemical analysis of tyrosine hydroxylase neurons, we observed intrinsic neurodegeneration in PINK1-KO rats at two and a half months of age, neuropathology that was not enhanced by psychological distress. In addition, psychological distress induced motor deficits and significantly reduced hind leg strength in WT rats in a similar manner as PINK1-KO rats. Finally, Western blot analysis of brain lysates showed that the protein content of several mitochondrial antioxidants proteins, mitochondrial markers and of brain-derived neurotrophic factor were significantly reduced because of psychological distress.

**Conclusion:** Our data suggest that psychological distress can elicit alterations in brain bioenergetics, induce fatigue and motor deficits in a similar manner as in PD without inducing SN degeneration.

microglial cells over-expressing ChAT, NEP or SRA genes could be candidates for replacement therapy of AD.

WTH09-15

**NMDA-induced mitochondrial depolarization and subsequent neurodegeneration regulated by intracellular potassium levels**

**H. Higashi, T. Kinjo, K. Uno, N. Kuramoto**

*Setsunan University, Laboratory of Molecular Pharmacology,  
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hirakata-shi, Japan*

Intracellular potassium ion level is higher than extracellular space, which is regulated by basically sodium pump. Potassium ion generates a resting potential on the cell membrane by passing through the leak channels. Openings of the other potassium channels on the cell membrane induce hyperpolarization and it would cancel the excitation. ATP-sensitive potassium channel ( $K_{ATP}$ ) is an inwardly rectifying potassium channel that suppresses depolarization in both cell membrane and mitochondria, and has an important role to make and keep resting membrane potential. Minoxidil opens this channel. It has been reported that opening of  $K_{ATP}$  protected the

## ANEXO 3

Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 204 (2018) 475–483



Contents lists available at ScienceDirect

### Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/saa](http://www.elsevier.com/locate/saa)



## Blood mononuclear cells as speculum of emotional stress analyzed by synchrotron infrared spectroscopy and a nootropic drug



Mariana Grigoruță<sup>a</sup>, Alejandra Vargas-Caraveo<sup>b</sup>, Emmanuel Vázquez-Mayorga<sup>a</sup>, Hiram A. Castillo-Michel<sup>c</sup>, Ángel G. Díaz-Sánchez<sup>a</sup>, Juan Reyes-Herrera<sup>c</sup>, Alejandro Martínez-Martínez<sup>a,d,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Ciencias Químico Biológicas, Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez (UACJ), Anillo envolvente Pronaf y Estocolmo s/n, 32310 Cd. Juárez, México

<sup>b</sup> Departamento de Farmacología, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

<sup>c</sup> European Synchrotron Radiation Facility (ESRF), B.P. 220, Grenoble, France

<sup>d</sup> El Colegio de Chihuahua, Calle Partido Díaz 4723 esquina con Anillo Envolvente del PRONAF, colonia Progresista, Ciudad Juárez, Chihuahua C.P. 32310, México

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 6 March 2018

Received in revised form 20 June 2018

Accepted 20 June 2018

Available online 21 June 2018

#### Keywords:

Distress

Emotional stress

$\mu$ FTIR

Nootropics

Lipid peroxidation

### ABSTRACT

Chronic psychological stress is an important public health issue which generates behavioral changes, anxiety, immunosuppression and oxidative damage. Piracetam is a cognitive enhancer, at cellular level it protects from oxidative stress. The aim of this study was to evaluate the effect of psychological stress and of piracetam on circulating mononuclear cells by analyzing the biochemical spectrometry using Synchrotron Radiation Fourier Transform Infrared Microspectroscopy (SR- $\mu$ FTIR). Rats were exposed for five days to a stressor (cat odor) under oral administration of piracetam (600 mg/kg). SR- $\mu$ FTIR analysis showed a decrease in bands associated to the lipids region (2852  $\text{cm}^{-1}$ , 2923  $\text{cm}^{-1}$  and 2962  $\text{cm}^{-1}$ ) and an increase absorption of the amide I band (1654  $\text{cm}^{-1}$ ) under stress conditions. The principal component analysis showed increase oxidation of lipids (decrease of 3010  $\text{cm}^{-1}$ , 2923  $\text{cm}^{-1}$  and 2852  $\text{cm}^{-1}$  bands) as well as proteins denaturation (increase of 1610  $\text{cm}^{-1}$  and 1690  $\text{cm}^{-1}$  bands) under stress. Piracetam provided protection to polyunsaturated lipids ( $p \leq 0.001$ ) and lipids/proteins ratio ( $p \leq 0.001$ ). Behaviorally, this drug diminished fear and anxiety in stressed animals by the plus maze test ( $p \leq 0.002$ ). However, this drug induced oxidative stress in mononuclear cells from unstressed animals and altered their behavior.

© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

## ANEXO 4



# *Certificate of Participation*

*Awarded to*

M. Griguruta, K. Gosselink, A.G. Díaz-Sanchez, J.A. Nuñez-Gastélum A., M. Beristain-Ruiz, R. González-Fernández Martínez-Martínez with the work entitled  
EFFECT OF A NOOTROPIC IN THE MANAGEMENT OF STRESS BY FEMALE  
AND MALE RATS

---

*For participating at the*

**3<sup>rd</sup> BBRC Health Disparities Symposium:  
From Molecules to Disease  
Sept. 17-19, 2017**

ANEXO 5



***Certificate of Participation***

*Awarded to*

***Mariana Grigoruta***

*For oral presentation at the*

**2<sup>nd</sup> BBRC Health Disparities Symposium:  
From Molecules to Disease  
Sept. 27-29, 2015**