



REVISIÓN

El modelo de 6-hidroxidopamina y la fisiopatología parkinsoniana: nuevos hallazgos en un viejo modelo[☆]



D. Hernandez-Baltazar^{a,b,*}, L.M. Zavala-Flores^c y A. Villanueva-Olivo^d

^a Cátedra CONACyT, Dirección Adjunta de Desarrollo Científico CONACyT, México, D. F., México

^b Instituto de Neuroetología, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, México

^c Centro de Investigación Biomédica del Noreste, IMSS, Monterrey, Nuevo León, México

^d Departamento de Histología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México

Recibido el 27 de noviembre de 2014; aceptado el 15 de junio de 2015

Accesible en línea el 21 de agosto de 2015

PALABRAS CLAVE

Apoptosis;
Vía nigroestriatal;
Neurodegeneración;
Substantia nigra;
Neuroinflamación;
Estrés oxidativo

Resumen El neurotóxico 6-hidroxidopamina (6-OHDA) ha sido utilizado para generar modelos de la enfermedad de Parkinson (EP). A la fecha se ha establecido que si bien el modelo neurodegenerativo inducido por la 6-OHDA no reproduce la totalidad de síntomas de la enfermedad, sí replica procesos celulares tales como el estrés oxidativo, la neurodegeneración, la neuroinflamación y la muerte neuronal por apoptosis. En esta revisión se contempla el análisis de los factores que influyen en la vulnerabilidad de las neuronas dopaminérgicas, así como la estrecha relación entre el proceso neurodegenerativo, el neuroinflamatorio y la apoptosis ocasionada por la 6-OHDA. El conocimiento de los mecanismos involucrados en la neurodegeneración y la muerte celular en este modelo es relevante para definir posibles blancos terapéuticos para EP. © 2014 Sociedad Española de Neurología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

KEYWORDS

Apoptosis;
Nigrostriatal
pathway;
Neurodegeneration;
Substantia nigra;
Neuroinflammation;
Oxidative stress

The 6-hydroxydopamine model and parkinsonian pathophysiology: Novel findings in an older model

Abstract The neurotoxin 6-hydroxydopamine (6-OHDA) is widely used to induce models of Parkinson's disease (PD). We now know that the model induced by 6-OHDA does not include all PD symptoms, although it does reproduce the main cellular processes involved in PD, such as oxidative stress, neurodegeneration, neuroinflammation, and neuronal death by apoptosis. In this review we analyse the factors affecting the vulnerability of dopaminergic neurons as

[☆] Los autores hacemos constar que esta revisión o parte de la misma no ha sido presentada en la Reunión Anual de la SEN o en otras reuniones o congresos.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: dan.hernandez.baltazar@gmail.com (D. Hernandez-Baltazar).

well as the close relationships between neuroinflammation, neurodegeneration, and apoptosis in the 6-OHDA model. Knowledge of the mechanisms involved in neurodegeneration and cell death in this model is the key to identifying potential therapeutic targets for PD.

© 2014 Sociedad Española de Neurología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Generalidades

La enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno cronicodegenerativo que presenta síntomas motores y no motores¹. La EP afecta a gran variedad de núcleos en el sistema nervioso central, entre los que destacan el núcleo motor dorsal del vago, los núcleos del rafe, el *locus coeruleus*, el núcleo pedúnculo pontino, el núcleo retrorubral, núcleo parabranchial, el área ventral tegmental (VTA) y la *substancia nigra pars compacta* (SNpc)². A que la EP es multicausal, un signo indiscutible de la enfermedad es la degeneración progresiva de las neuronas dopaminérgicas de la vía nigroestriatal, la presencia de cuerpos de Lewy³ y daño generalizado de los circuitos neuronales que controlan el movimiento¹.

Para evaluar el proceso neurodegenerativo se han empleado modelos animales que reproducen los principales procesos celulares de la EP, tales como el estrés oxidativo, la neurodegeneración, la neuroinflamación y la muerte celular. Entre los neurotóxicos más empleados se encuentran: a) el 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridona (MPTP), que es convertido a 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP+) por la monoaminoxidasa B (MAOB)^{4,5}, y b) la 6-hidroxidopamina (6-OHDA)^{6,7}. El MPTP atraviesa la barrera hematoencefálica (BHE)⁸, por lo que además del daño a la vía nigroestriatal, provoca pérdida de neuronas gabaérgicas estriatales⁹, de neuronas del VTA, del núcleo retrorubral y gliosis reactiva^{10,11}. Dado que la 6-OHDA no atraviesa la BHE es más selectiva para las neuronas dopaminérgicas de la SNpc, ha sido el fármaco más utilizado para inducir la neurodegeneración del sistema nigroestriatal.

La 6-OHDA es un análogo de la dopamina altamente oxidable que puede ser capturado a través del transportador de dopamina, lo cual da especificidad al neurotóxico para afectar a las neuronas catecolaminérgicas, tales como las neuronas dopaminérgicas de la SNpc¹². Hasta la fecha se han propuesto 3 mecanismos para explicar el efecto citotóxico de la 6-OHDA. Estos mecanismos son: 1) auto-oxidación intra o extracelular de la 6-OHDA, que favorece la producción de peróxido de hidrógeno y de los radicales superóxido e hidroxilo⁸; 2) formación de peróxido de hidrógeno por efecto de la monoaminoxidasa¹³, y 3) inhibición directa del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial¹⁴. Estos mecanismos pueden actuar de manera independiente o de forma combinada para generar especies reactivas de oxígeno (ERO)¹⁵. El estrés oxidativo (EO) generado puede ser amplificado por el aumento de calcio libre en el citoplasma—producto de la excitotoxicidad de glutamato, o bien por la pérdida de permeabilidad de membrana mitocondrial—para conducir a la muerte celular¹⁶.

Ungerstedt demostró en 1968 que la inyección estereotáxica intracerebral de la 6-OHDA produce degeneración de la vía nigroestriatal⁶. Para evaluar los efectos y mecanismos neurodegenerativos de la 6-OHDA *in vivo* se han desarrollado 3 modelos de lesión: 1) la del haz medial del cerebro anterior^{17,18}; 2) la lesión intranigral^{19,20}, y 3) la lesión intraestriatal²¹⁻²⁴. La lesión del haz medial del cerebro anterior y la lesión intranigral, aunque útiles para evidenciar los efectos inmediatos del neurotóxico, tienen la desventaja de provocar degeneración rápida y generalizada del núcleo lesionado⁷, por lo que resultan modelos desfavorables para estudiar los mecanismos de neurotoxicidad—y de muerte—generados por estrés oxidativo a largo plazo (21 días post-lesión). No obstante, el modelo de lesión intraestriatal sí provoca la pérdida progresiva de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc, emulando al daño nigroestriatal observado en EP, por inyección intracraneal tanto unilateral²⁵⁻²⁸ como bilateral^{29,30}.

El núcleo estriado en la rata se ha subdividido, por convención, en 2 regiones, dorsomedial y ventrolateral, las cuales reciben inervación de núcleos específicos. La región ventrolateral recibe aferencias de las áreas motora y sensoriomotora de la corteza e inervación exclusiva de la SNpc^{23,31}. La región dorsomedial del estriado tiene una mezcla de inervación tanto de la SNpc, del VTA, del área cortical frontal y del sistema límbico²³. Por ello, las lesiones con 6-OHDA que involucran a la región dorsomedial tienen efectos generales en la locomoción y la conducta de giro inducida por fármacos (como la anfetamina y la apomorfina), mientras que las lesiones que afectan a la región ventrolateral muestran efectos pronunciados en el inicio del movimiento, la orientación sensoriomotora y la conducta motora fina, los cuales son signos típicos de la EP^{12,23}.

Kirik et al.²³ establecieron en 1998 los parámetros óptimos para la lesión unilateral del estriado ventrolateral con una dosis única de 20 µg, o una dosis de 6 µg de 6-OHDA inyectada en cada uno de 3 sitios del estriado. Concluyeron que el efecto de la inyección intraestriatal depende del sitio de lesión y de la dosis. Observaron que la dosis única administrada en un sitio del estriado causa una reducción del 80% en la inervación estriatal y una pérdida cercana al 90% de la población dopaminérgica nigral, mientras que una dosis administrada en varios sitios del estriado genera daño en núcleos de inervación extraestriatal, como el globo pálido²³.

A pesar de que el modelo de lesión intraestriatal afecta principalmente a neuronas dopaminérgicas de la SNpc, también genera disminución de neuronas dopaminérgicas en el VTA, las cuales forman la vía mesolímbica e inervan al núcleo *accumbens*^{32,33}. La pérdida de neuronas dopaminérgicas en

el VTA no excede el 20% de la población, y el daño no progresa con el tiempo, como lo observado en la SNpc. Por ello, la lesión intraestriatal ha sido la más empleada para evidenciar los mecanismos de neurodegeneración y muerte celular en un lapso de tiempo mayor, con la reserva de que el porcentaje de pérdida de neuronas dopaminérgicas de la SNpc y daños colaterales en VTA dependerán del sitio de la lesión y de la dosis empleada²³.

Dado que el modelo de 6-OHDA no reproduce la presencia de cuerpos de Lewy³⁴, se han establecido modelos murinos con alfa-sinucleína. Estos abordajes están basados en modelos knockout³⁵, o en la expresión génica³⁶ y en la inyección intracerebral de alfa-sinucleína³⁷. Dado que esta proteína es un componente clave de los cuerpos de Lewy, estos abordajes podrían ser clave en el conocimiento de la degeneración de la vía nigroestriatal y su impacto en otros núcleos cerebrales, pero aún se requiere más investigación al respecto.

El modelo de lesión con 6-OHDA ha sido utilizado para demostrar la prueba de principio de la terapia neurotrófica (TN). La TN consiste en el envío dirigido de genes que codifican para factores neurotróficos tales como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF)³⁸, el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF)³⁹⁻⁴², el factor neurotrófico conservado de dopamina (CDNF)^{43,44}, entre otros, a través de nanopartículas^{45,46}, o bien de vectores génicos de naturaleza viral o no viral^{2,3}. El propósito de la TN evaluada en el modelo de 6-OHDA es evitar el progreso de la neurodegeneración y estimular la regeneración funcional del sistema nigroestriatal^{47,48}. Por ello es importante continuar identificando los mecanismos de estrés oxidativo, neurodegeneración y muerte neuronal ocasionados por la 6-OHDA; este conocimiento es clave para determinar los mecanismos moleculares por los que actúan las novedosas terapias enfocadas a la EP.

Desarrollo

Vulnerabilidad de las neuronas dopaminérgicas a la 6-OHDA

Las neuronas dopaminérgicas de la SNpc son vulnerables al estrés oxidativo inducido por la 6-OHDA, debido a que poseen elevados niveles basales de especies reactivas de oxígeno (ERO), así como bajos niveles de glutatión-peroxidasa, enzima que reduce el peróxido de hidrógeno a agua evitando así el daño causado por ERO⁴⁹. A su vez, la dopamina tiene alta susceptibilidad a autooxidarse y convertirse en neuromelanina, la que propicia la formación de radicales hidroxilo (OH⁻), que al combinarse con el hierro acumulado normalmente en altas concentraciones en las neuronas dopaminérgicas^{50,51} afecta su capacidad de eliminación. Sin embargo, no todas las neuronas dopaminérgicas de la SNpc son vulnerables a la toxicidad de la 6-OHDA, debido a que hay subpoblaciones de neuronas dopaminérgicas en la SNpc que expresan proteínas que unen calcio, como son la calretinina (CR) y calbindina (CB), las cuales impiden la acumulación de calcio intracelular, evitando la consecuente excitotoxicidad debida al glutamato, por lo que evitan la acción citotóxica de la 6-OHDA^{52,53}. A la fecha, se desconoce

el número exacto de neuronas que constituyen estas subpoblaciones dopaminérgicas dentro de la SNpc; se sugiere que la presencia de estas subpoblaciones podría explicar la persistencia de un 10%²³ de neuronas dopaminérgicas en la SNpc posterior al tratamiento con 6-OHDA, independientemente de la dosis y del sitio de inyección del neurotóxico²².

Diversos estudios *in vivo* han demostrado la mediación del estrés oxidativo en el efecto citotóxico de la 6-OHDA. Estudios de microdiálisis y HPLC en el núcleo caudado en ratas adultas muestran que una concentración de 100 μM de 6-OHDA perfundida a través de la cánula de microdiálisis durante 60 min genera un aumento en la producción de radicales libres. En estas condiciones, también se provoca daño al ADN de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc⁵⁴. En abordajes recientes, se demostró que la administración de una dosis de 6 μg de 6-OHDA en el estriado dorsal de ratas incrementa en función del tiempo los niveles de oxidación de proteínas y de productos de la lipoperoxidación⁵⁵. Por lo tanto, se ha propuesto que esos procesos bioquímicos originados por el estrés oxidativo mitocondrial conducen tanto a la neuroinflamación como a la muerte celular por apoptosis¹.

Neuroinflamación

El proceso neuroinflamatorio ha sido evaluado a través de marcadores de células gliales, tales como la GFAP para astrocitos^{56,57} y OX-42 para microglía^{58,59}. Se ha determinado el curso temporal de la activación de estas poblaciones gliales, por efecto del neurotóxico, a partir del día 3 posterior a la lesión²², e incluso su activación se ha observado hasta 3 semanas posterior a la lesión con 6-OHDA⁵⁷. Se ha demostrado que el proceso neuroinflamatorio precede a la muerte de las neuronas dopaminérgicas nigrales (2 semanas posterior a la lesión)⁵⁷, probablemente como un mecanismo para contener el daño celular. Otro cuerpo de evidencia sugiere que el incremento en la activación de las células gliales, y la consecuente liberación de citosinas proinflamatorias y antiinflamatorias en el sitio de daño, podría incrementar la citotoxicidad de la 6-OHDA⁶⁰. El estudio del proceso neuroinflamatorio en el modelo de 6-OHDA es de suma relevancia para definir blancos terapéuticos alternativos para la EP.

Apoptosis en la SNpc

La tirosina hidroxilasa (TH) es la enzima limitante de la síntesis de dopamina, por lo cual es uno de los marcadores de fenotipo dopaminérgico²³. La noción de que la inyección de 6-OHDA causa muerte de las neuronas dopaminérgicas en la SNpc está basada en la disminución en el número de neuronas TH(+)^{19,61}. La mayoría de los autores que emplean la 6-OHDA *in vivo* destacan que este neurotóxico produce muerte celular^{22,62-65}; no obstante, un número reducido de autores no detectan indicadores de muerte celular^{23,66}, lo que podría sugerir pérdida de fenotipo, sin embargo esto depende de la dosis y del modelo de lesión empleado.

La muerte celular ha destacado como el efecto final de la citotoxicidad debida a la 6-OHDA. Algunos estudios tratan de sustentar la activación de la apoptosis en la SNpc usando la tinción de plata, o el marcaje final con biotina-dUTP

mediado por el ensayo de desoxinucleotidiltransferasa terminal (TUNEL), después de la inyección intraestriatal de 6-OHDA^{64,67,68}. Sin embargo, estos estudios no emplean otros marcadores de apoptosis adicionales a la técnica de TUNEL para apoyar la participación de la apoptosis en el efecto de la 6-OHDA. Además, la técnica de TUNEL también reconoce las células necróticas y, por lo tanto, sus resultados no son concluyentes de la participación de la apoptosis, principalmente cuando los estudios *in vitro* han demostrado que la 6-OHDA causa necrosis a la dosis comúnmente usada *in vivo*^{69,70}. Un estudio reciente evidenció que además de la pérdida de TH, la 6-OHDA administrada en el estriado de rata produce la pérdida de integridad del citoesqueleto en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc²², evidenciándose con ello la participación de la muerte celular por apoptosis. Aunque la mayoría de autores coinciden en que la apoptosis es el principal tipo de muerte celular involucrado, también se ha evaluado la participación de necrosis y autofagia⁷¹⁻⁷³ como procesos de muerte inducidos por la 6-OHDA *in vivo*. Dada la variedad de modelos experimentales no es posible aún determinar la proporción de neuronas dopaminérgicas de la SNpc afectadas por uno u otro tipo de muerte; sin embargo, la convergencia de varios tipos de muerte podría explicar la activación del proceso neuroinflamatorio, evento que debería ser explorado.

Apoptosis: caspasa-3 y cinasa de glucógeno sintasa tipo 3β

La apoptosis es un proceso de muerte celular regulado que se desencadena mediante 2 vías de señalización: la intrínseca y la extrínseca⁷⁴. La vía intrínseca involucra daño mitocondrial y la consecuente liberación de citocromo C, lo cual favorece la activación de proteínas proapoptóticas. La vía extrínseca requiere la activación de receptores de muerte en la membrana celular y la posterior activación de una compleja cascada de señalización^{11,74}. Sin embargo, aunque estas vías son independientes, convergen en la activación de las caspasas efectoras 3, 6 o 7^{75,76}.

La caspasa-3 es la principal caspasa efectora en las neuronas y su activación ha sido demostrada aplicando neurotóxicos *in vitro* e *in vivo*^{75,77,78}. En este último caso, su presencia ha sido evidenciada una semana después de la inyección intraestriatal de 6-OHDA en ratas^{55,57}. La mayoría de los estudios *in vivo* han demostrado la expresión de caspasa-3 en diferentes modelos de muerte celular, por lo que sugieren que la activación de la caspasa-3 participa en la muerte celular programada de neuronas de la SNpc⁷⁸⁻⁸⁰. Sin embargo, algunos estudios recientes no han podido confirmar la presencia de la caspasa-3 ni la caspasa-9 activas y, con base a esto, afirman que estas caspasas no están involucradas en la apoptosis de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc^{81,82}. Esta controversia se agudiza aún más por los recientes hallazgos que demuestran la participación de la caspasa-3 en funciones de índole no apoptótica, como la activación de la microglía^{83,84}. Si bien la mayor parte de los autores coinciden en la participación de la caspasa-3 en la neurodegeneración inducida por la 6-OHDA, se mantiene la duda si su expresión solo conduce a muerte neuronal. Por lo tanto, ha sido necesario explorar otros marcadores del proceso apoptótico, y en este sentido ha

destacado el estudio de la cinasa de glucógeno sintasa tipo 3β (GSK-3β).

La GSK-3β está implicada en la vía de señalización de la apoptosis neuronal activada por el estrés oxidativo⁸⁵, un factor central en el proceso neuropatológico de la EP⁸⁶. La GSK-3β se activa por fosforilación del residuo de tirosina 216 (Y216), ubicado en el dominio cinasa, y se inactiva por la fosforilación de la serina 9 (S9)⁸⁵. Un estudio reciente evidenció que la caspasa-3 y la GSK-3β están involucradas en el proceso apoptótico inducido por la 6-OHDA *in vivo*²². Se observó que una única dosis de 20 μg administrada en el núcleo estriado de la rata produce pérdida de la integridad del citoesqueleto, pérdida de inmunorreactividad a TH y disminución progresiva de inmunorreactividad a NeuN (marcador de linaje neuronal) en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc²².

Por otra parte, Kim et al.⁸² demostraron la atrofia y muerte progresiva de las neuronas dopaminérgicas dependiente de la translocación al núcleo del factor inductor de apoptosis (FIA), en la que no se observó activación de la caspasa-3 ni liberación de citocromo C o signos de apoptosis. Estos autores además demuestran que la muerte inducida por la 6-OHDA en las neuronas dopaminérgicas está mediada por la activación de FIA dependiente DEBax⁸². En este trabajo, la activación de FIA sugiere la participación de necrosis regulada. La controversia entre la muerte dependiente o independiente de caspasa-3 podría explicarse por la dosis, el modelo de estudio y el sitio de lesión empleado.

Pese a que la mayor parte de evidencia involucra la participación de la caspasa-3 en el proceso apoptótico inducido por la 6-OHDA, los estudios que contradicen este hecho dan pauta a considerar que la 6-OHDA también podría generar muerte neuronal por apoptosis (independiente de caspasa-3) u otros procesos de muerte celular (necrosis y autofagia) *in vivo*.

Conclusión

El modelo de 6-OHDA reproduce varios de los procesos celulares identificados en la EP, por lo tanto es un modelo clave para explorar las bases moleculares de la citotoxicidad, así como para el estudio de los procesos celulares activados por estrés oxidativo (neuroinflamación y muerte neuronal), y en consecuencia un modelo útil para entender los mecanismos de novedosas terapias para la EP.

Financiación

Este trabajo fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y el Instituto de Neuroetología de la Universidad Veracruzana, México, mediante la asignación de la «Cátedra CONACyT» en el proyecto No. 1840 a Daniel Hernández-Baltazar.

Conflicto de intereses

Los autores hacemos constar que esta revisión no presenta conflicto de intereses.

Bibliografía

- Dexter DT, Jenner P. Parkinson disease: From pathology to molecular disease mechanisms. *Free Radic Res Med*. 2013;62:132–44.
- Sulzer D, Surmeier DJ. Neuronal vulnerability, pathogenesis, and Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2013;28:41–50.
- Double KL. Neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2012;18(Suppl 1):S52–4.
- Chiueh CC, Miyake H, Peng MT. Role of dopamine autoxidation, hydroxyl radical generation, and calcium overload in underlying mechanisms involved in MPTP-induced parkinsonism. *Adv Neurol*. 1993;60:251–8.
- Langston JW, Ballard PA Jr. Parkinson's disease in a chemist working with 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *N Engl J Med*. 1983;309:310.
- Ungerstedt U. 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J Pharmacol*. 1968;5:107–10.
- Blesa J, Phani S, Jackson-Lewis V, Przedborski S. Classic and new animal models of Parkinson's disease. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:845618.
- Blum D, Torch S, Lambeng N, Nissou M, Benabid AL, Sadoul R, et al. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: Contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*. 2001;65:135–72.
- Altar CA, Heikkilä RE, Manzano L, Marien MR. 1-Methyl-4-phenylpyridine (MPP+): Regional dopamine neuron uptake, toxicity, and novel rotational behavior following dopamine receptor proliferation. *Eur J Pharmacol*. 1986;131:199–209.
- Ter Horst GJ, Knigge MF, van der Wal A. Neurochemical lesioning in the rat brain with iontophoretic injection of the 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP+). *Neurosci Lett*. 1992;141:203–7.
- Blesa J, Przedborski S. Parkinson's disease: Animal models and dopaminergic cell vulnerability. *Front Neuroanat*. 2014;8:155.
- Blandini F, Armentero MT. Animal models of Parkinson's disease. *FEBS J*. 2012;279:1156–66.
- Chiba K, Trevor A, Castagnoli N Jr. Metabolism of the neurotoxic tertiary amine, MPTP, by brain monoamine oxidase. *Biochem Biophys Res Commun*. 1984;120:574–8.
- Jenner P, Schapira AH, Marsden CD. New insights into the cause of Parkinson's disease. *Neurology*. 1992;42:2241–50.
- Harrison JF, Hollensworth SB, Spitz DR, Copeland WC, Wilson GL, LeDoux SP. Oxidative stress-induced apoptosis in neurons correlates with mitochondrial DNA base excision repair pathway imbalance. *Nucleic Acids Res*. 2005;33:4660–71.
- Singh S, Kumar S, Dikshit M. Involvement of the mitochondrial apoptotic pathway and nitric oxide synthase in dopaminergic neuronal death induced by 6-hydroxydopamine and lipopolysaccharide. *Redox Rep*. 2010;15:115–22.
- Perese DA, Ulman J, Viola J, Ewing SE, Bankiewicz KS. A 6-hydroxydopamine-induced selective parkinsonian rat model. *Brain Res*. 1989;494:285–93.
- Venero JL, Revuelta M, Cano J, Machado A. Time course changes in the dopaminergic nigrostriatal system following transection of the medial forebrain bundle: Detection of oxidatively modified proteins in substantia nigra. *J Neurochem*. 1997;68:2458–68.
- Stanic D, Finkelstein DI, Bourke DW, Drago J, Horne MK. Timecourse of striatal re-innervation following lesions of dopaminergic SNpc neurons of the rat. *Eur J Neurosci*. 2003;18:1175–88.
- Stanic D, Parish CL, Zhu WM, Krstew EV, Lawrence AJ, Drago J, et al. Changes in function and ultrastructure of striatal dopaminergic terminals that regenerate following partial lesions of the SNpc. *J Neurochem*. 2003;86:329–43.
- Decressac M, Mattsson B, Bjorklund A. Comparison of the behavioural and histological characteristics of the 6-OHDA and alpha-synuclein rat models of Parkinson's disease. *Exp Neurol*. 2012;235:306–15.
- Hernandez-Baltazar D, Mendoza-Garrido ME, Martinez-Fong D. Activation of GSK-3beta and caspase-3 occurs in nigral dopamine neurons during the development of apoptosis activated by a striatal injection of 6-hydroxydopamine. *PLoS One*. 2013;8:e70951.
- Kirik D, Rosenblad C, Bjorklund A. Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat. *Exp Neurol*. 1998;152:259–77.
- Mercanti G, Bazzu G, Giusti P. A 6-hydroxydopamine in vivo model of Parkinson's disease. *Methods Mol Biol*. 2012;846:355–64.
- Da Rocha JT, Pinton S, Gai BM, Nogueira CW. Diphenyl diselenide reduces mechanical and thermal nociceptive behavioral responses after unilateral intrastriatal administration of 6-hydroxydopamine in rats. *Biol Trace Elem Res*. 2013;154:372–8.
- Healy-Stoffel M, Ahmad SO, Stanford JA, Levant B. A novel use of combined tyrosine hydroxylase and silver nucleolar staining to determine the effects of a unilateral intrastriatal 6-hydroxydopamine lesion in the substantia nigra: A stereological study. *J Neurosci Methods*. 2012;210:187–94.
- Kelsey JE, Langelier NA, Oriol BS, Reedy C. The effects of systemic, intrastriatal, and intrapallidal injections of caffeine and systemic injections of A2A and A1 antagonists on forepaw stepping in the unilateral 6-OHDA-lesioned rat. *Psychopharmacology*. 2009;201:529–39.
- Heuer A, Smith GA, Lelos MJ, Lane EL, Dunnett SB. Unilateral nigrostriatal 6-hydroxydopamine lesions in mice I: Motor impairments identify extent of dopamine depletion at three different lesion sites. *Behav Brain Res*. 2012;228:30–43.
- Roedter A, Winkler C, Samii M, Walter GF, Brandis A, Nikkiah G. Comparison of unilateral and bilateral intrastriatal 6-hydroxydopamine-induced axon terminal lesions: evidence for interhemispheric functional coupling of the two nigrostriatal pathways. *J Comp Neurol*. 2001;432:217–29.
- Amalric M, Moukhlès H, Nieoullon A, Daszuta A. Complex deficits on reaction time performance following bilateral intrastriatal 6-OHDA infusion in the rat. *Eur J Neurosci*. 1995;7:972–80.
- Deumens R, Blokland A, Prickaerts J. Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *Exp Neurol*. 2002;175:303–17.
- Brichta L, Greengard P. Molecular determinants of selective dopaminergic vulnerability in Parkinson's disease: An update. *Front Neuroanat*. 2014;8:152.
- Walsh JJ, Han MH. The heterogeneity of ventral tegmental area neurons: Projection functions in a mood-related context. *Neuroscience*. 2014;282C:101–8.
- Lindgren HS, Lelos MJ, Dunnett SB. Do alpha-synuclein vector injections provide a better model of Parkinson's disease than the classic 6-hydroxydopamine model. *Exp Neurol*. 2012;237:36–42.
- Tai Y, Chen L, Huang E, Liu C, Yang X, Qiu P, et al. Protective effect of alpha-synuclein knockdown on methamphetamine-induced neurotoxicity in dopaminergic neurons. *Neural Regen Res*. 2014;9:951–8.
- He Q, Koprach JB, Wang Y, Yu WB, Xiao BG, Brotchie JM, et al. Treatment with trehalose prevents behavioral and neurochemical deficits produced in an AAV alpha-synuclein rat model of Parkinson's disease. *Mol Neurobiol*. 2015.
- Roostae A, Beaudoin S, Staskevicius A, Roucou X. Aggregation and neurotoxicity of recombinant alpha-synuclein aggregates initiated by dimerization. *Mol Neurodegener*. 2013;8:5.
- Razgado-Hernandez LF, Espadas-Alvarez AJ, Reyna-Velazquez P, Sierra-Sanchez A, Anaya-Martinez V, Jimenez-Estrada I, et al. The transfection of BDNF to dopamine neurons potentiates the

- effect of dopamine d3 receptor agonist recovering the striatal innervation, dendritic spines and motor behavior in an aged rat model of Parkinson's disease. *PLoS One*. 2015;10:e0117391.
39. Chen SS, Yang C, Hao F, Li C, Lu T, Zhao LR, et al. Intra-striatal GDNF gene transfer by inducible lentivirus vectors protects dopaminergic neurons in a rat model of parkinsonism. *Exp Neurol*. 2014;261:87–96.
 40. Herran E, Requejo C, Ruiz-Ortega JA, Aristieta A, Igartua M, Bengoetxea H, et al. Increased antiparkinson efficacy of the combined administration of VEGF- and GDNF-loaded nanospheres in a partial lesion model of Parkinson's disease. *Int J Nanomedicine*. 2014;9:2677–87.
 41. Deng X, Liang Y, Lu H, Yang Z, Liu R, Wang J, et al. Co-transplantation of GDNF-overexpressing neural stem cells and fetal dopaminergic neurons mitigates motor symptoms in a rat model of Parkinson's disease. *PLoS One*. 2013;8:e80880.
 42. Gonzalez-Barríos JA, Lindahl M, Bannon MJ, Anaya-Martínez V, Flores G, Navarro-Quiroga I, et al. Neurotensin polyplex as an efficient carrier for delivering the human GDNF gene into nigral dopamine neurons of hemiparkinsonian rats. *Mol Ther*. 2006;14:857–65.
 43. Nadella R, Voutilainen MH, Saarma M, Gonzalez-Barríos JA, Leon-Chavez BA, Jiménez JM, et al. Transient transfection of human CDNF gene reduces the 6-hydroxydopamine-induced neuroinflammation in the rat substantia nigra. *J. Neuroinflammation*. 2014;11:209.
 44. Cordero-Llana O, Houghton BC, Rinaldi F, Taylor H, Yáñez-Muñoz RJ, Uney JB, et al. Enhanced efficacy of the CDNF/MANF family by combined intranigral overexpression in the 6-OHDA rat model of Parkinson's disease. *Mol Ther*. 2015;23:244–54.
 45. Kulkarni AD, Vanjari YH, Sancheti KH, Belgamwar VS, Surana SJ, Pardeshi CV. Nanotechnology-mediated nose to brain drug delivery for Parkinson's disease: A mini review. *J Drug Target*. 2015:1–14.
 46. Iqbal A, Ahmad I, Khalid MH, Nawaz MS, Gan SH, Kamal MA. Nanoneurotoxicity to nanoneuroprotection using biological and computational approaches. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*. 2013;31:256–84.
 47. Pardo J, Morel GR, Astiz M, Schwerdt JI, León ML, Rodríguez SS, et al. Gene therapy and cell reprogramming for the aging brain: achievements and promise. *Current gene therapy*. 2014;14:24–34.
 48. Allen PJ, Feigin A. Gene-based therapies in Parkinson's disease. *Neurotherapeutics*. 2014;11:60–7.
 49. Hirsch EC, Faucheux B, Damier P, Mouatt-Prigent A, Agid Y. Neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *J. Neural Transm*. 1997;50:79–88.
 50. Double KL, Gerlach M, Schunemann V, Trautwein AX, Zecca L, Gallorini M, et al. Iron-binding characteristics of neuromelanin of the human substantia nigra. *Biochem Pharmacol*. 2003;66:489–94.
 51. Gerlach M, Riederer P, Double KL. Neuromelanin-bound ferric iron as an experimental model of dopaminergic neurodegeneration in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2008;14(Suppl 2):S185–8.
 52. Nemoto C, Hida T, Arai R. Calretinin and calbindin-D28k in dopaminergic neurons of the rat midbrain: A triple-labeling immunohistochemical study. *Brain Res*. 1999;846:129–36.
 53. Tsuboi K, Kimber TA, Shults CW. Calretinin-containing axons and neurons are resistant to an intra-striatal 6-hydroxydopamine lesion. *Brain Res*. 2000;866:55–64.
 54. Ferger B, Rose S, Jenner A, Halliwell B, Jenner P. 6-hydroxydopamine increases hydroxyl free radical production and DNA damage in rat striatum. *Neuroreport*. 2001;12:1155–9.
 55. Sanchez-Iglesias S, Rey P, Mendez-Alvarez E, Labandeira-García JL, Soto-Otero R. Time-course of brain oxidative damage caused by intra-striatal administration of 6-hydroxydopamine in a rat model of Parkinson's disease. *Neurochem Res*. 2007;32:99–105.
 56. Middeldorp J, Hol EM. GFAP in health and disease. *Prog Neurobiol*. 2011;93:421–43.
 57. Walsh S, Finn DP, Dowd E. Time-course of nigrostriatal neurodegeneration and neuroinflammation in the 6-hydroxydopamine-induced axonal and terminal lesion models of Parkinson's disease in the rat. *Neuroscience*. 2011;175:251–61.
 58. Aguzzi A, Barres BA, Bennett ML. Microglia: scapegoat, saboteur, or something else. *Science*. 2013;339:156–61.
 59. Rodrigues RW, Gomide VC, Chadi G. Astroglial and microglial activation in the wistar rat ventral tegmental area after a single striatal injection of 6-hydroxydopamine. *Int J Neurosci*. 2004;114:197–216.
 60. Stott SR, Barker RA. Time course of dopamine neuron loss and glial response in the 6-OHDA striatal mouse model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci*. 2014;39:1042–56.
 61. Sauer H, Oertel WH. Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intra-striatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: A combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. *Neuroscience*. 1994;59:401–15.
 62. Tobon-Velasco JC, Limon-Pacheco JH, Orozco-Ibarra M, Macías-Silva M, Vázquez-Victorio G, Cuevas E, et al. 6-OHDA-induced apoptosis and mitochondrial dysfunction are mediated by early modulation of intracellular signals and interaction of Nrf2 and NF-kappaB factors. *Toxicology*. 2013;304:109–19.
 63. Bernstein AI, Garrison SP, Zambetti GP, O'Malley KL. 6-OHDA generated ROS induces DNA damage and p53- and PUMA-dependent cell death. *Mol Neurodegener*. 2011;6:2.
 64. Marti MJ, Saura J, Burke RE, Jackson-Lewis V, Jiménez A, Bonastre M, et al. Striatal 6-hydroxydopamine induces apoptosis of nigral neurons in the adult rat. *Brain Res*. 2002;958:185–91.
 65. Ichitani Y, Okamura H, Nakahara D, Nagatsu I, Ibata Y. Biochemical and immunocytochemical changes induced by intra-striatal 6-hydroxydopamine injection in the rat nigrostriatal dopamine neuron system: Evidence for cell death in the substantia nigra. *Exp Neurol*. 1994;130:269–78.
 66. Kostrzewa RM. Review of apoptosis vs necrosis of substantia nigra pars compacta in Parkinson's disease. *Neurotox Res*. 2000;2:239–50.
 67. Blandini F, Levandis G, Bazzini E, Nappi G, Armentero MT. Time-course of nigrostriatal damage, basal ganglia metabolic changes and behavioural alterations following intra-striatal injection of 6-hydroxydopamine in the rat: New clues from an old model. *Eur J Neurosci*. 2007;25:397–405.
 68. Zuch CL, Nordstroem VK, Briedrick LA, Hoernig GR, Granholm AC, Bickford PC. Time course of degenerative alterations in nigral dopaminergic neurons following a 6-hydroxydopamine lesion. *J Comp Neurol*. 2000;427:440–54.
 69. Charriaut-Marlangue C, Ben-Ari Y. A cautionary note on the use of the TUNEL stain to determine apoptosis. *Neuroreport*. 1995;7:61–4.
 70. Ito Y, Shibata MA, Kusakabe K, Otsuki Y. Method of specific detection of apoptosis using formamide-induced DNA denaturation assay. *J Histochem Cytochem*. 2006;54:683–92.
 71. In S, Hong CW, Choi B, Jang BG, Kim MJ. Inhibition of mitochondrial clearance and Cu/Zn-SOD activity enhance 6-hydroxydopamine-induced neuronal apoptosis. *Mol Neurobiol*. 2015.
 72. Marin C, Aguilar E. In vivo 6-OHDA-induced neurodegeneration and nigral autophagic markers expression. *Neurochem Int*. 2011;58:521–6.
 73. Giordano S, Darley-Usmar V, Zhang J. Autophagy as an essential cellular antioxidant pathway in neurodegenerative disease. *Redox Biology*. 2014;2:82–90.
 74. Jellinger KA. Cell death mechanisms in neurodegeneration. *J Cell Mol Med*. 2001;5:1–17.

75. D'Amelio M, Sheng M, Cecconi F. Caspase-3 in the central nervous system: Beyond apoptosis. *Trends Neurosci.* 2012;35:700–9.
76. Han BS, Hong HS, Choi WS, Markelonis GJ, Oh TH, Oh YJ. Caspase-dependent and -independent cell death pathways in primary cultures of mesencephalic dopaminergic neurons after neurotoxin treatment. *J Neurosci.* 2003;23:5069–78.
77. Cutillas B, Espejo M, Gil J, Ferrer I, Ambrosio S. Caspase inhibition protects nigral neurons against 6-OHDA-induced retrograde degeneration. *Neuroreport.* 1999;10:2605–8.
78. Oo TF, Siman R, Burke RE. Distinct nuclear and cytoplasmic localization of caspase cleavage products in two models of induced apoptotic death in dopamine neurons of the substantia nigra. *Exp Neurol.* 2002;175:1–9.
79. Hanrott K, Gudmunsen L, O'Neill MJ, Wonnacott S. 6-hydroxydopamine-induced apoptosis is mediated via extracellular auto-oxidation and caspase 3-dependent activation of protein kinase Cdelta. *J Biol Chem.* 2006;281:5373–82.
80. Jeon BS, Kholodilov NG, Oo TF, Kim SY, Tomaselli KJ, Srinivasan A, et al. Activation of caspase-3 in developmental models of programmed cell death in neurons of the substantia nigra. *J Neurochem.* 1999;73:322–33.
81. Ebert AD, Hann HJ, Bohn MC. Progressive degeneration of dopamine neurons in 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease does not involve activation of caspase-9 and caspase-3. *Neurosci Res.* 2008;86:317–25.
82. Kim TW, Moon Y, Kim K, Lee JE, Koh HC, Rhyu IJ, et al. Dissociation of progressive dopaminergic neuronal death and behavioral impairments by Bax deletion in a mouse model of Parkinson's diseases. *PLoS One.* 2011;6:e25346.
83. Burguillos MA, Deierborg T, Kavanagh E, Persson A, Hajji N, Garcia-Quintanilla A, et al. Caspase signalling controls microglia activation and neurotoxicity. *Nature.* 2011;472:319–24.
84. Venero JL, Burguillos MA, Joseph B. Caspases playing in the field of neuroinflammation: Old and new players. *Dev Neurosci.* 2013;35:88–101.
85. Gomez-Sintes R, Hernandez F, Lucas JJ, Avila J. GSK-3 mouse models to study neuronal apoptosis and neurodegeneration. *Front Mol Neurosci.* 2011;4:45.
86. Golpich M, Amini E, Hemmati F, Ibrahim NM, Rahmani B, Mohamed Z, et al. Glycogen synthase kinase-3 beta (GSK-3beta) signaling: Implications for Parkinson's disease. *Pharmacol Res.* 2015;97:16–26.