



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES IZTACALA

*“EFECTO DE LA BROMOCRIPTINA EN LA CITOLOGÍA DEL
ESTRIADO DE RATA EN UN MODELO DE LA ENFERMEDAD
DE PARKINSON CON 6-OHDA”*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

BIÓLOGO

PRESENTA

JUAN PABLO RICO ZAMBRANO

DIRECTORA DE TESIS: DRA. LAURA COLÍN BARENQUE



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

“HIJOMÍO, CONSAGRATE AL ESTUDIO
DESDE LA JUVENTUD, Y HASTA CUANDO
TENGA BLANCOS TUS CABELLOS

EN LA PROFESIÓN MERECE UNA ESPECIAL
CUIDADO DEL PLOMO LA ALEGRÍA; PERO
OTRA COSA QUE DEBE CONSIDERAR
COMO UN ADQUISICIÓN NECESARIA ES LA
ESPERANZA. B.P.

Gracias a Dios y a todas las personas que me ayudaron...

...este trabajo se concluyó. JP

- Gracias a Noemí, Paula y Juan por ser el principal motivo de este proyecto.
- Gracias a Gregorio y Teresa, mis padres por los ánimos, los regaños y los esfuerzos realizados para la culminación de este paso.
- Gracias a *Chelito*, por el cariño y apoyo que me dio durante su vida.
- Gracias a la Tía Anita y a la abuelita Juana.
- Al P. Salvador por sus enseñanzas.
- Agradezco a Teresa, Gregorio, Emmanuel y Ana por estar a mi lado cuando los necesite.
- Gracias por el cariño y apoyo de mis tíos Lourdes y Manuel junto con mis primos Manolo, Fernando y Lulú.
- Doy gracias a todos mis tíos, tías y a toda mi familia pues cada uno a contribuido con su granito de arena.
- Agradezco especialmente a la Dra. Laura Colín por sus consejos y guía para concluir con satisfacción esta investigación.
- Doy gracias a la Dra. Ma. Rosa por los conocimientos transmitidos y las recomendaciones hechas para realizar el trabajo en el laboratorio.
- También agradezco a Ana, José Luis, Erick, Chucho y Paty por la paciencia, experiencia y apoyo transmitido en el laboratorio.
- Agradezco a, Ivonne, Arnulfo Jesús y Diana por su amistad, por los momentos alegres que pasamos juntos y que no olvidaré.
- Mi agradecimiento para Alejandra y Tonatihu por estar detrás de mí para terminar esta etapa.

➤ De igual manera gracias a la familia Duran sobretodo a Jesús.

INDICE

	Pg.
INDICE	1
TABLA DE ABREVIATURAS	2
RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	4
1) Síntomas principales de la enfermedad de Parkinson	4
1.1) Temblor	4
1.2) Rigidez	4
1.3) Bradicinesia	5
1.4) Inestabilidad de la postura	5
2) Origen de la enfermedad	5
3) ANATOMIA PATOLÓGICA	9
4) LOS GANGLIOS BASALES	10
4.1) El cuerpo estriado	15
4.1.1) Citología del estriado	17
5) MODELOS EXPERIMENTALES DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON	22
5.1) 6-OHDA	22
5.2) MPTP	25
5.3) Otros modelos experimentales	27
6) FÁRMACOS EMPLEADOS EN LA ENFERMEDAD DE PARKINSON	28
6.1) Selegilina	28
6.2) Agentes anticolinérgicos	28
6.3) Amantadina	29
6.4) Levodopa	29
6.5) Agonistas dopaminérgicos	30
6.5.1) Bromocriptina	31
7) JUSTIFICACIÓN	35
8) OBJETIVO	35
8.1) Objetivos particulares	35
9) MÉTODO	36
10) RESULTADOS	38
11) DISCUSIÓN	44
12) CONCLUSIONES	48
13) ANEXO I	49
14) REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	50

TABLA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
O ₂	Ion superoxido
6-OHDA	6-hydroxidopamina
ATV	Área Tegmental Ventral
CE	Cuerpo estriado
DA	Dopamina
EP	Enfermedad de Parkinson
GB	Ganglios basales
H ₂ O ₂	Peroxido de hidrógeno
i.p.	Intraperitoneal
IMAO-B	Monoamino oxidasa tipo B
L-dopa	L-3,4-dihidroxifenilalanina
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
OH	Hidroxilo
SN	Sustancia nigra
SNc	Sustancia nigra pars compacta
SNr	Sustancia nigra pars reticulata

RESUMEN

La enfermedad de Parkinson se presenta cuando hay degeneración del 80% o más de neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra. La causa de esta muerte se desconoce, pero existen diversas teorías. Una teoría sostiene que radicales libres contribuyen a la muerte de las neuronas. Para estudiar la enfermedad se han desarrollado modelos animales orientados al estudio de los mecanismos implicados en la degeneración de las neuronas dopaminérgicas. La 6-OHDA es una de las neurotoxinas utilizadas ya que produce una destrucción selectiva de neuronas catecolaminérgicas. La Bromocriptina fue el primer agonista aprobado para la práctica clínica, su principal uso es como auxiliar de la levodopa, estudios previos reportan que este fármaco tiene propiedades neuroprotectoras y de barredor de radicales libres además de reducir la recaptura de dopamina y minimizar el daño causado por el estrés oxidativo. Así en el presente trabajo se estudio el efecto de la bromocriptina en las neuronas espinosas medianas del estriado en animales lesionados con 6-OHDA. Se determino el efecto de la bromocriptina en el número de espinas dendríticas de animales lesionados con 6-OHDA. Se utilizaron 20 ratas machos *Wistar*, separados en 4 grupos: 1) Lesión falsa con sol. salina y sin suministro de bromocriptina, 2) lesionado con 6-OHDA sin suministro de bromocriptina, 3) lesionado con 6-OHDA y tratado con bromocriptina, 4) sin lesión y tratado con bromocriptina. Se cuantificó el número de espinas en 20 μm de 5 dendritas de 20 neuronas espinosas medianas por cada rata. Los resultados mostraron que existe aumento significativo en el número de espinas dendríticas del grupo lesionado y tratado con bromocriptina comparado con el grupo lesionado y sin tratamiento. Este aumento podría explicarse por un efecto antioxidante y neuroprotector de la bromocriptina el cual atenúa el daño ocasionado por la 6-OHDA.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Parkinson (EP) fue descrita originalmente en 1817 por James Parkinson, un médico británico que publicó una ponencia sobre lo que él llamó "la parálisis temblorosa" (Parkinson, 1817). En ese documento, expuso los síntomas principales de la enfermedad que hoy lleva su nombre. Durante los casi dos siglos que han seguido, los científicos han luchado por identificar las causas y tratamientos de la enfermedad. Se ha definido su gama de síntomas, la distribución en la población y las posibilidades de cura.

La EP pertenece a un grupo de condiciones llamadas desórdenes del sistema motor. Los cuatro síntomas principales son el *temblor*; la *rigidez*; la *bradicinesia* y la *inestabilidad de postura* o balance o coordinación afectados. A medida que estos síntomas se hacen más pronunciados, los pacientes pueden tener dificultad de caminar, hablar y realizar otras tareas simples (Lang y Lozano, 1998(a); DeLong, 2000).

1. SÍNTOMAS PRINCIPALES DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

1.1. Temblor

El temblor asociado con la EP tiene un aspecto característico. Típicamente, adopta la forma de un movimiento del pulgar y el índice hacia atrás y hacia adelante, denominado "rodar de la píldora" por parecer que el enfermo está jugando con una píldora entre sus dedos (Lang y Lozano, 1998a).

1.2. Rigidez

La rigidez, o una resistencia al movimiento, afecta a la mayoría de los pacientes con EP. En esta enfermedad la rigidez sucede si se perturba el equilibrio de los músculos opuestos. Los músculos permanecen constantemente tensos o contraídos por lo que la persona siente dolor o se siente inflexible o débil. La rigidez se hace evidente cuando otra persona trata de mover el brazo del paciente, el cual se mueve lentamente con movimientos cortos y abruptos, conocidos como rigidez de "engranaje".

1.3. Bradicinesia

La Bradicinesia, o lentitud de movimiento espontáneo y automático, es particularmente frustrante porque es difícil de pronosticar. Durante un momento el paciente puede moverse con facilidad y al momento siguiente puede necesitar ayuda. Este es quizás el síntoma más incapacitante y perturbador de la enfermedad, porque el paciente no puede realizar con rapidez movimientos habituales, tales como lavarse o vestirse (Lang y Lozano, 1998b).

1.4. Inestabilidad de la postura.

Las alteraciones provocadas por la EP sobre la postura y la coordinación, hacen que los pacientes adquieran una inclinación hacia adelante o hacia atrás y se caigan con facilidad. Los pacientes pueden detenerse a mitad de su camino y "congelarse", e incluso caer o pueden caminar con una serie de pasos rápidos y pequeños como si estuviesen apresurándose hacia adelante para mantener el equilibrio. Esta forma de caminar se conoce como *festinación* (Lang y Lozano, 1998(b); National Institute of Neurological Disorders and Stroke, 2003).

2. Origen de la enfermedad

La EP se presenta cuando hay degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la *sustancia nigra*, (SN) (Lang y Lozano, 1998(a); Dunnett y Bjorklund, 1999; Olanow y Tatton, 1999, Mizuno et al, 1999; DeLong, 2000). Normalmente, estas neuronas producen dopamina. La dopamina es el neurotransmisor responsable de transmitir las señales de la SN al cuerpo estriado (CE). La pérdida de dopamina provoca que las neuronas del estriado actúen sin control, dejando a los pacientes incapaces de dirigir o controlar sus movimientos de forma normal. Estudios previos han demostrado que los pacientes con EP tienen una pérdida del 80% o más, de las células dopaminérgicas en la SN (Barzilai y Melamed, 2003). La causa de esta muerte o deterioro celular se desconoce, pero existen diversas teorías sobre la etiología de la enfermedad.

1) Una teoría sostiene que radicales libres (moléculas o compuestos inestables y potencialmente perjudiciales, generadas por acciones químicas normales en el cuerpo) pueden contribuir a la muerte de las neuronas dopaminérgicas conduciendo así a la EP (Chacon et al, 1987, Sinha et al, 1986; Shapira et al, 1990), esto se ha sustentado con estudios post mortem de pacientes con EP y por estudios en donde se ha demostrado que el estrés oxidativo y algunas toxinas oxidantes pueden inducir degeneración de neuronas de la SN (Olanow et al, 1998). Los radicales libres son inestables debido a que carecen de uno o más electrones. En un intento por reemplazar el electrón que falta, los radicales libres reaccionan con las moléculas circundantes. Por ejemplo el oxígeno, que presenta dos electrones no apareados, cuando este, acepta un electrón se convierte en el ion superóxido $\cdot\text{O}_2$ que es poco reactivo, pero si este ion acepta otro electrón y dos hidrógenos, se produce el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que aunque no se califica como radical puede ser hidrolizado por radicales provenientes de metales (como el ion ferroso Fe^{2+} o el ión cúprico Cu^{1+}), estos metales descomponen el H_2O_2 en el radical hidroxilo $\cdot\text{OH}$ que es altamente reactivo, por lo que una alta concentración de hierro en presencia de H_2O_2 , como ocurre durante el metabolismo de la dopamina, podría resultar en estrés oxidativo, al cual son altamente sensibles las neuronas (Chacon et al, 1987; Ischiropoulos y Beckman, 2003; Klein y Ackerman, 2003). lo

anterior explica por que la neuromelanina (presente en la SN) por su alta concentración de hierro es un efectivo pro-oxidante, lo que aumenta la posibilidad de que las neuronas de la SN sufran degeneración por estrés oxidativo (Faucheux et al, 2003). En condiciones normales los antioxidantes protegen a las células de este daño manteniendo bajo control la concentración de los radicales libres evitando el daño a las células, asumiendo que la insuficiencia de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa son una importante razón de la neurodegeneración en la EP (Kolesnikova y Serebrovskaya, 2003). La evidencia de que los mecanismos oxidativos pueden ocasionar o contribuir a la EP incluyen el hallazgo de hierro en niveles elevados en el cerebro de pacientes con la EP en especial en la SN, además de observar niveles decrecientes de ferritina, que sirve como mecanismo protector rodeando o formando un círculo alrededor del hierro y aislándolo (Pavon et al, 1998; Barzilai et al, 2000; Junn y Mouradian, 2001; National Institute of Neurological Disorders and Stroke. 2003).

2) Se ha sugerido que la EP puede ocurrir cuando una toxina endógena o exógena destruye selectivamente las neuronas dopaminérgicas. Un factor de riesgo ambiental tal como la exposición a pesticidas, o a alguna toxina en el suministro de alimentos, es un ejemplo de la clase de desencadenante externo que pudiera hipotéticamente ocasionar la EP. La teoría se basa en el hecho de que hay toxinas, como la 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) y medicamentos neurolépticos, que se saben inducen síntomas de la EP en los seres humanos, tales como el temblor y la rigidez (Langston et al, 1983, Naoi et al, 1993). Sin embargo, hasta la fecha, ninguna investigación ha proporcionado prueba definitiva de que una toxina sea el origen de la enfermedad.

3) Otra teoría, relativamente nueva, explora el papel de los factores genéticos en el desarrollo de la EP. De un 15 a un 25 por ciento de los pacientes con EP tienen un familiar cercano que ha experimentado síntomas de la enfermedad. Los investigadores se han interesado en la posibilidad de que el deterioro en el ADN de las mitocondrias pueda ser la causa de la enfermedad de Parkinson (Barzilai y Melamed, 2003). En otro

estudio con 116 pares de gemelos, cinco hermanos desarrollaron la EP, estos valores son los que se esperarían dentro de la población en general por lo que el autor concluye que los factores genéticos no juegan un papel esencial en la etiología de la EP (León, 1996). Por lo que el papel de la herencia en la EP aun no se tiene bien precisado pero se propone que los factores genéticos juegan un papel importante en su desarrollo. Además se ha visto que familias japonesas presentan mutaciones en el gen “parkin”, que fue el primero descubierto en autosomas recesivos en inicios de la EP (Kitada et al, 1998).

4) Una teoría más propone que la EP ocurre cuando, por causas desconocidas, el deterioro de las neuronas dopaminérgicas, relacionado con la edad, se anticipa en algunas personas. Esta teoría se sustenta en el conocimiento de que la pérdida de mecanismos protectores antioxidativos está asociada con la EP y el envejecimiento (National Institute of Neurological Disorders and Stroke, 2003).

En resumen, se ha propuesto que los mecanismos de daño oxidativo, toxinas ambientales, predisposición genética y envejecimiento acelerado, son los factores que podrían contribuir al desarrollo de la enfermedad (Davis et al, 1979; Gorell et al, 1998; Menegon et al, 1998; Dunnett y Bjorklund, 1999; DeLong, 2000) (Fig. 1).

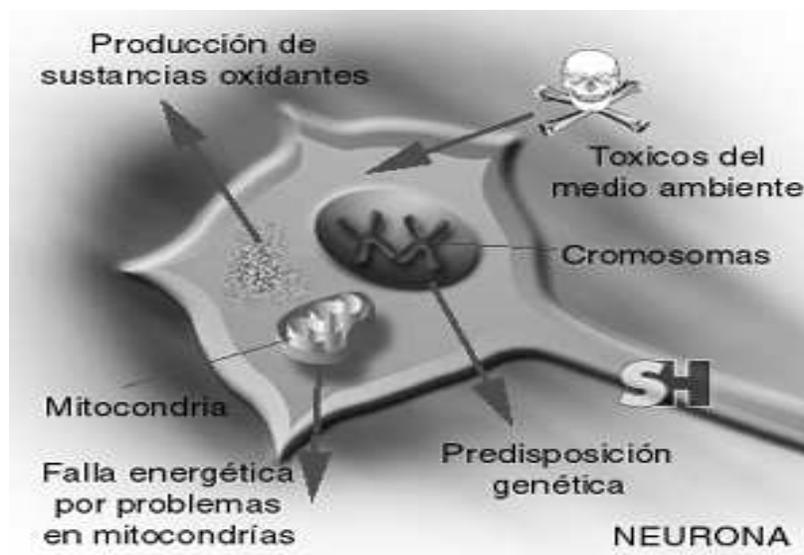


Fig. 1 Esquema de las posibles causas de la Enfermedad de Parkinson.

3. ANATOMÍA PATOLÓGICA DE LA EP

La EP se caracteriza por la disminución de dopamina en el cuerpo estriado, como resultado de la pérdida neuronal en la SN. El daño fundamental se localiza en la *pars compacta* (SNc), observándose en las neuronas sobrevivientes cuerpos de Lewy; que son inclusiones citoplasmáticas eosinófilas, esféricas, constituidas principalmente por neurofilamentos que se acumulan debido a una fragmentación y fosforilización defectuosas, están formados por una serie de proteínas entre las que destacan la ubiquitina, la cristalina, la gelsolina, las quinasas y la α -sinucleína. La palidez de la SN provocada por esta pérdida neuronal es evidente a simple vista si se compara un corte de mesencéfalo de un individuo con EP con el corte correspondiente a un cerebro de una persona de la misma edad sin daño neuronal (De Long, 2000; Grau y Kulisevsky, 2001; Shimohama et al, 2003) (Figura 2).

Pero hablar de la EP implica referirse a los sistemas involucrados en el control del movimiento lo que nos lleva a remitirnos a los ganglios basales (GB) especialmente al CE por ser la zona del sistema nervioso central mayormente involucrada en el control del movimiento (Najera et al, 1996).

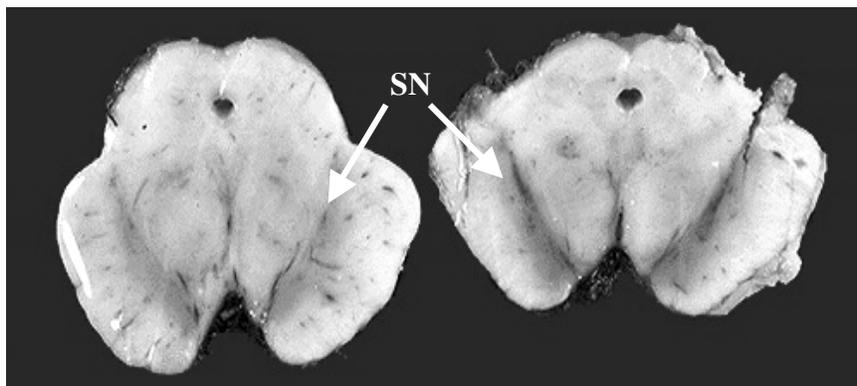


Fig.2. Cortes de mesencéfalos de pacientes con EP (izquierda) donde se aprecia la depigmentación de la sustancia negra (SN) -debido a la pérdida de neuronas dopaminérgicas- y de una persona sin daño neurológico (derecha).

4. GANGLIOS BASALES

Los GB son un grupo de núcleos situados en la base de los hemisferios cerebrales constituidos por el Estriado (caudado y putamen), el Globo Pálido (segmento interno y segmento externo), el Núcleo subtalámico, la SNc y la sustancia nigra pars reticulata (SNr) (Alvarez et al, 2001). La organización anatómica y funcional de los GB ha recibido una notable atención en las últimas dos décadas, por los aspectos neurofisiológicos de enfermedades neurodegenerativas como la EP (Blandini et al, 2000).

El núcleo de aferencias de los GB es el CE. La mayoría de estas vías se originan en todas las áreas de la corteza (sensorial, motora y de asociación) que proyectan aferencias excitadoras las cuales utilizan glutamato y aspartato, (Bargas y Galárraga, 2000). La mayor parte de estas vías llegan al caudado y al putamen, específicamente a las neuronas espinosas, evidenciado por la interacción funcional entre la dopamina y el glutamato en estas neuronas (Reynols y Wickens, 2002). Las proyecciones corticoestriatales representan el primer paso en la transposición del mapa cortico-funcional de los GB.

El estriado también recibe aferencias excitadoras de los núcleos intralaminares del tálamo, este tipo de fibras contiene pequeñas vesículas sinápticas que terminan en las espinas dendríticas de las neuronas espinosas. Sin embargo existe controversia sobre si este tipo de vías utilizan glutamato, aspartato o acetilcolina (Berendse y Groeneweger, 1990).

Otras aferencias son las nigroestriadas, estas fibras se originan en las células de la SNc. Estas fibras atraviesan la cápsula interna y parte del globo pálido en su recorrido hacia el caudado y el putamen, algunas de ellas terminan en el globo pálido. Además de la dopamina que es el neurotransmisor del 95% del tracto nigroestriado, existe un neuropéptido, la neurotensina y es probable que la colecistoquinina pueda también estar involucrada en las fibras nigroestriadas. Además se ha sugerido que un pequeño porcentaje de estas neuronas (5-8%) contienen GABA en lugar de dopamina (Rodríguez y González-Hernández, 1999). Así mismo la neuronas dopaminérgicas de la SN recibe aferencias del estriado de proyecciones GABAérgicas (Smith y Bolam, 1989).

Las fibras rafe estriadas forman parte de los sistemas aferentes noradrenérgico y serotoninérgico. Estas fibras corren rostralmente a los campos de Forel donde se extienden lateralmente a la zona incerta y entran a la cápsula interna y hacen contacto con el núcleo caudado y el putamen en la porción caudolateral (Azmitia y Segal, 1978; Najera et al, 1996). Mediante estudios inmunohistoquímicos y transporte retrogrado en rata, se estableció que el 33% de las neuronas serotoninérgicas del núcleo del rafé proyectan al caudado y putamen (Steinbush, et al 1981).

Los dos núcleos de eferencia de los GB son, el segmento interno del globo pálido y la SNr, ambos inhiben tónicamente a sus núcleos efectores situados en el tálamo y en el tronco encefálico. Se piensa que esta señal inhibitoria está regulada por dos vías paralelas que discurren desde el cuerpo estriado hasta los dos núcleos de eferencia: una directa y otra indirecta. La vía indirecta pasa primero al segmento externo del globo pálido y de allí al núcleo subtalámico, siguiendo una vía puramente GABAérgica y finalmente desde el núcleo subtalámico a los núcleos de eferencia mediante una proyección excitadora glutamatergica. La proyección del núcleo subtalámico es la única conexión excitadora intrínseca de los ganglios basales, las demás son GABAérgicas e inhibitorias (Fig. 3)(Kandel et al, 2000).

Cuando señales excitadoras fásicas activan transitoriamente la *vía directa* desde el CE hasta el globo pálido, las neuronas tónicamente activas de este último suprimen su actividad, lo que permiten que sean activados el tálamo y la corteza. En cambio la actividad fásica de la *vía indirecta* aumenta transitoriamente la inhibición del tálamo como puede determinarse si se tiene en cuenta la polaridad de las conexiones entre el cuerpo estriado y el segmento externo del globo pálido, entre el segmento externo y el núcleo subtalámico, y entre el núcleo subtalámico y el segmento interno del globo pálido (Kandel et al, 2000). Por lo tanto, la vía directa puede proporcionar una retroalimentación *positiva* y la vía indirecta una *negativa* en el circuito entre los GB y el tálamo.

Estas vías eferentes tienen efectos opuestos sobre los núcleos de eferencia de los GB y de esta forma sobre las zonas eefectoras de estos núcleos. La activación de la vía directa activa al tálamo y así aumenta la actividad talamocortical, mientras que la activación de la vía indirecta inhibe aún más las neuronas talamocorticales. En resumen como resultado la activación de la vía directa se facilita el movimiento mientras que la activación de la vía indirecta lo inhibe (Alvarez et al, 2001).

Como se mencionó, las dos vías de eferencia del CE se ven afectadas de forma diferente por la presencia o ausencia de dopamina en el CE, la razón fundamental es el hecho de que la acción de la dopamina sobre las células blanco depende del tipo de receptor presente en ellas y las dos vías presentan receptores dopaminérgicos diferentes (Bahena-Trujillo et al, 2000). Las neuronas del estriado que envían prolongaciones directas a los dos núcleos de eferencia tienen receptores de dopamina D1 que facilitan la transmisión, mientras que las de la vía indirecta tienen receptores D2 que reducen la transmisión (Kandel et al, 2000; Yung y Bolam, 2000). Para entenderlo mejor veamos el papel de la dopamina en cada una de las vías. En la vía directa la dopamina que proviene de la SNc activa principalmente los receptores D1 haciendo que aumente la excitación que ejerce la actividad cortical sobre las neuronas espinosas (Gonon, 1997); ésto aumenta la activación (desinhibición) de las neuronas tálamo corticales que activan a los músculos agonistas y por lo tanto facilita los movimientos (Alexander, 1995). La dopamina es excitadora de potenciales de membrana despolarizados, presentes cuando la neurona esta siendo activada y es inhibidora aumentando el umbral de disparo, a potenciales de membrana hiperpolarizados, presentes cuando la neurona esta en reposo. El que la dopamina sólo excite a las neuronas activadas, mientras que ayude a inhibir a las neuronas no activadas, hace que se separen mejor las neuronas que activan a los músculos agonistas de las neuronas que activan a los músculos antagonistas. Así cuando esta separación es deficiente, hay activación de ambos músculos, se provoca rigidez y oposición de las extremidades a desplazarse pasivamente, siendo estos signos característicos de la EP. Las neuronas involucradas en la vía indirecta expresan, en su mayoría, receptores dopaminérgicos D2. Su activación no favorece la excitación cortical, si no que la inhibe.

Así la dopamina inhibe el disparo de las neuronas de la vía indirecta que inhibe los movimientos. Ahora bien los receptores D2 tienen más afinidad por la dopamina que los D1, por lo que la vía indirecta serviría para regular las neuronas activadas y las no activadas, pero los mecanismos de control parece estar a varios niveles. Por lo tanto la deficiencia de dopamina provoca hiperactividad de la vía indirecta e hipoactividad de la vía directa, lo que resulta en acinesia y dificultad para realizar movimientos como ocurre en la EP (Bargas y Galárraga, 2000).

Así, la pérdida de estimulación por dopamina disminuye la actividad de la vía directa, mientras que la proyección al Globo pálido interno se encuentra hiperactiva, lo que provoca una disminución en la actividad inhibitoria del Globo pálido interno sobre el Globo pálido externo y el núcleo subtalámico. Los cambios de la vía directa y en los dos brazos de la vía indirecta resultan en una hiperactividad de los núcleos eferentes, Globo pálido externo, SNr, y sus proyecciones inhibitorias hacia el tálamo ventrolateral. De acuerdo con este modelo la actividad del Globo pálido externo en la EP está aumentada como consecuencia de la estimulación glutamatérgica incrementada proveniente del Núcleo subtalámico hiperactivo, de una disminución de la actividad inhibitoria que ejerce sobre él, el Globo pálido interno y una disminución del efecto inhibitorio de la vía directa, proveniente del estriado (Alvarez et al, 2001). Ahora podemos entender como la disminución de la dopamina en el cuerpo estriado (como sucede en la EP) puede inducir alteraciones en el movimiento (Fig. 3).

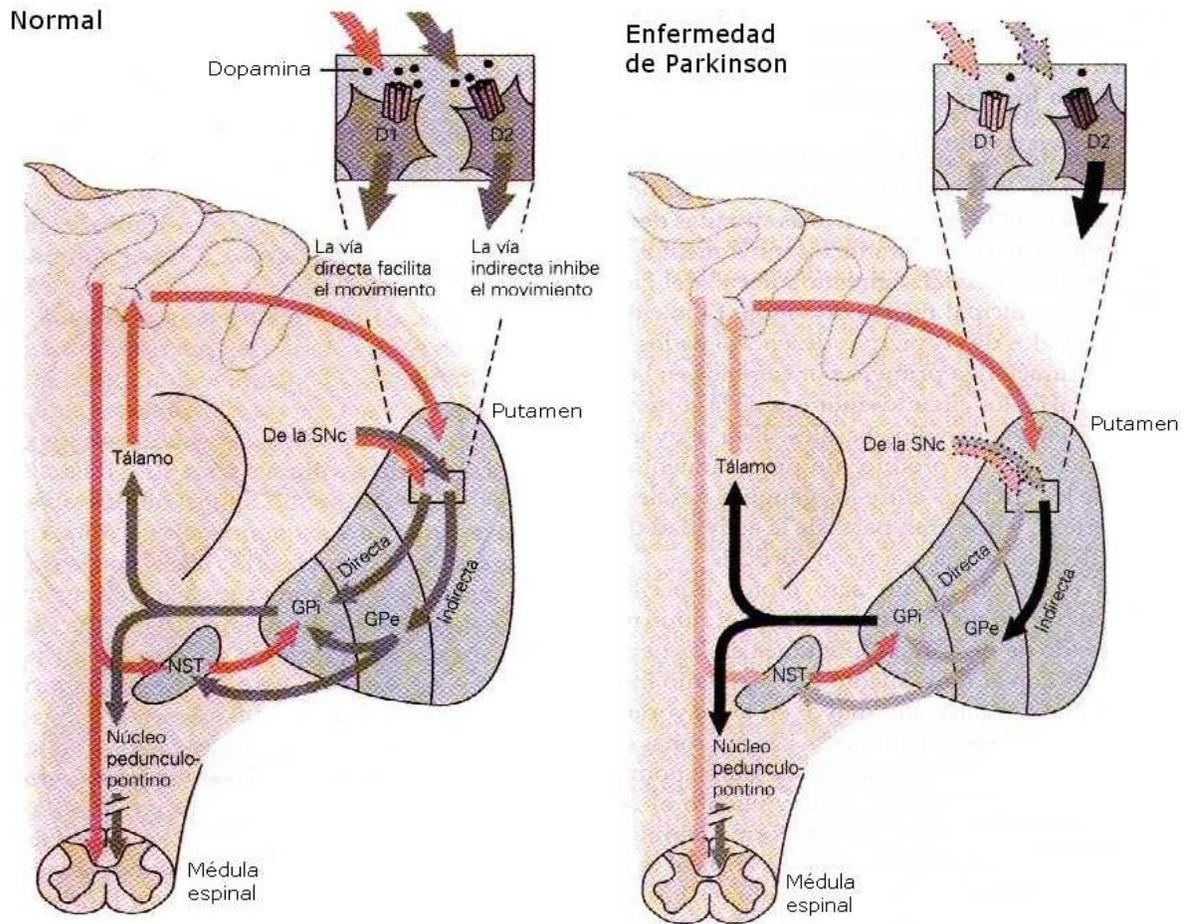


Fig. 3 Esquema comparativo de los circuitos entre ganglios basales, talamo y corteza en condiciones normales y en la enfermedad de Parkinson. **Gpe** = segmento externo del globo pálido; **Gpi** = segmento interno del globo pálido; **Snc** = parte compacta de la sustancia negra; **NST** = núcleo subtalámico; **D1** = receptor dopaminérgico tipo 1; **D2** receptor dopaminérgico tipo 2; **Flecha roja** = vía directa; **Flecha negra** = vía indirecta. Tomada de Kandel et al, 2000.

4.1. El cuerpo estriado

Anatómicamente el CE esta formado por: caudado, y putamen (Figura 4). Como se ha mencionado anteriormente el estriado es el principal receptor de aferencias de los GB procedentes de la corteza cerebral, el tálamo y el tronco encefálico. El estriado está

en el interior de los hemisferios cerebrales en la base de cada hemisferio y su función esta relacionada con el movimiento corporal. Consta de dos partes separadas denominadas compartimentos de la matriz y los estriosomas (también conocidos como parches), estos compartimentos difieren histoquímicamente entre si y sus receptores son diferentes. Los estriosomas reciben su principal información de la corteza límbica y se relaciona sobretodo con la SNc, se aprecian islas o parches en esta zona motivo por el que se le dio su nombre, aunque no está bien establecido el por qué de esté acomodo (Levesque y Parent, 1998; Kandel et al, 2000; Prensa y Parent, 2001; Levesque et al, 2003). La matriz es la parte con menos densidad celular en ella se observan fibras aferentes, principalmente de origen cortical (Graybiel et al, 1981). En monos y ratas algunas áreas de la corteza tienen preferentemente proyecciones a los estriosomas aunque no es absoluto, ya que algunas áreas corticales envían proyecciones por la matriz y el estriosoma, con proyecciones de neuronas más profundas hacia el estriosoma y de neuronas más superficiales hacia la matriz (Eblen y Graybiel, 1995). También se ha reportado que proyecciones talámicas proyectan hacia los estriosomas.

Se ha observado que las fibras de la SN se localizan en el límite de la matriz y el estriosoma, aunque en ratas hay dos juegos de neuronas dopaminérgicas nigroestriatales, las que inervan la matriz y las que inervan el estriosoma y se ha observado que neuronas del estriosoma tienen proyecciones hacia la SNc y las neuronas de la matriz proyectan hacia la parte reticulata (Gerfen, 1985; Langer y Graybiel, 1989). Citoquímicamente las células del estriosoma y la matriz son muy diferentes, por ejemplo la concentración de acetilcolinesterasa es muy fácil de encontrar en células de la matriz a diferencia de las células del estriosoma (Graybiel et al, 1981). Otro diferencia es que en el neuropilo del estriosoma hay una gran presencia de receptores opiáceos (Herkenham y Pert, 1981). De igual manera los peptidos, metaencefalinas y sustancia P, se encuentran en todo el estriado aunque hay regiones en que hay más abundancia en el estriosoma que en la matriz y viceversa. El significado funcional de todas estas diferencias en el estriado aun es desconocido pero

no se deja de lado para investigaciones futuras el poder conocer que relevancia tiene esta diferencia en el acomodo del cuerpo estriado (Wilson, 1998).

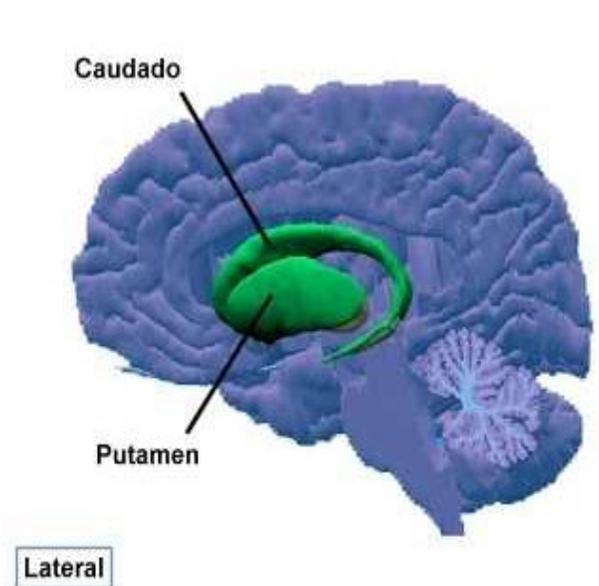


Fig. 4 Esquema del cuerpo estriado en vista lateral

Por otra parte, del 90 al 95% de las neuronas del estriado son espinosas medianas GABAérgicas de proyección (Kemp y Powell, 1971c; Graveland y Difiglia, 1985). Estas células son importantes objetivos de información cortical y la única fuente de eferencias. En los primates estas neuronas se subdividen en dos grupos: las que envían aferencias al segmento externo del globo pálido expresan los neuropéptidos encefalina y neurotensina, y las que lo hacen al segmento interno o a la SNr expresando sustancia P y dinorfina (Kandel et al, 2000).

4.1.1. Citología del estriado

Aunque la citología del CE ha sido bien descrita no hay una clasificación única. Por ejemplo Percheron et al, (1994) clasifican las neuronas del estriado de chimpancés por medio de una reconstrucción computarizada en tercera dimensión y dividieron al CE

y los diferentes tipos de neuronas, de acuerdo a su morfología, de la siguiente manera:

- 1) neuronas leptodendríticas: que ocupan alrededor del 2% de las neuronas del estriado; son inconfundibles por que son las neuronas más largas del globo pálido, tienen un promedio de longitud de 196 μm y llegan a tener dendritas hasta de 900 μm , presentan formas de disco, esférica, elíptica, cilíndrica y aplanadas (Yelnik et al, 1984; Francois et al, 1987).
- 2) Las neuronas enmarañadas: que representan el 1% de todas las neuronas estriatales, son las grandes interneuronas colinérgicas del estriado de primates, tienen un cuerpo celular voluminoso y globular. Poseen un gran número de dendritas que presentan muchas varicosidades y que se caracterizan por que las ramificaciones dendríticas retornan hacia el soma, a menudo no tiene su axon visible. Estas neuronas son específicas de primates ya que las neuronas colinérgicas de otros animales no suelen parecerse a este tipo de neuronas (Percheron et al, 1994).
- 3) Las microneuronas: son interneuronas de circuitería local que abarcan el 1% del estriado, tienen cuerpo celular pequeño y ramificaciones dendríticas finas. Dentro de las neuronas pequeñas están las neuronas que contienen somatostatina, neuropeptido y o sintetasas de óxido nítrico. Ambas interneuronas tienen numerosas colaterales axónicas que reducen la actividad de las neuronas eferentes del estriado y aunque escasas en número son las responsables de la mayor parte de la actividad tónica del cuerpo estriado (Francois, et al 1979).
- 4) Finalmente las neuronas espinosas medianas: caracterizadas por la gran cantidad de espinas dendríticas que poseen en toda su arborización dendrítica, forman más del 95% de la población neuronal del estriado, tienen un diámetro de 10-20 μm en su cuerpo celular, son gabaérgicas y proyectan al globo pálido y a la SN además de ser el blanco de la mayoría de las aferencias extrínsecas e intrínsecas y que constituyen el centro integrador de la información (Kemp y Powell, 1971a).

En el estriado de ratas se ha hecho una división de las neuronas presentes en el estriado quedando clasificadas en tres grupos: Las neuronas grandes (con un soma de más de 20 μm de diámetro), las neuronas medianas (con soma de 10 -20 μm de diámetro) y las neuronas pequeñas (menos de 10 μm de diámetro en su soma) (Figura 5). Cada uno de estos grupos a su vez está dividido en diferentes tipos de neuronas.

Por ejemplo las Neuronas Grandes se dividen en Tipo I: forma fusiforme y sin espinas; Tipo II: usualmente con pocas espinas somáticas. Las Neuronas Medianas muestran una amplia ramificación en sus dendritas además también son llamadas neuronas espinosas medianas por la gran cantidad de espinas dendríticas que muestran cuando se impregnan por medio de la técnica de Golgi y están divididas en, Tipo I: son las neuronas más comunes y las que más frecuentemente se impregnan con la técnica de Golgi, por ser el tipo de neuronas que tienen mayor presencia en el estriado; tiene el soma esférico y libre de espinas, pero las dendritas dístales (a partir de las dendritas secundarias) presentan una gran densidad de espinas. Tipo II: presentan algunas espinas en el soma y en las dendritas proximales y su densidad decrece en las demás dendritas. Tipo III: ocasionalmente tienen árbol dendrítico, sus dendritas generalmente lisas o presentan espinas esparcidas en toda la dendrita en corte sagital, este tipo de neuronas tienen soma en forma de estrella. La mayoría de los axones de estas neuronas no se impregnan con la técnica de Golgi, excepto el segmento inicial. Tipo IV: estas neuronas no tienen espinas en el soma. Algunas de estas neuronas presentan una terminal dendrítica ramificada y suelen presentar el soma dentro del rango de tamaño más bajo. Tipo V: estas neuronas tienen soma liso. Así como las dendritas primarias divididas cerca del soma y las dendritas secundarias infrecuentemente ramificadas presentan espinas en algunas dendritas. Las Neuronas pequeñas no presentan una subdivisión, estas neuronas son raramente impregnadas por la técnica de Golgi y presenta solo tres dendritas primarias (Chang et al, 1982; Figura 5).

Estudios electrofisiológicos han demostrado que las fibras nigroestriatales dopaminérgicas hacen sinapsis con las neuronas espinosas medianas que a su vez también reciben axones glutamatérgicos desde la corteza cerebral y aferencias gabaérgicas colaterales de neuronas espinosas (Bouyer et al, 1984).

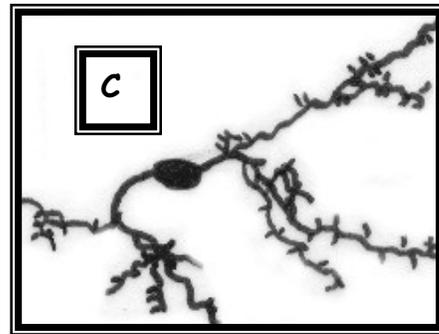
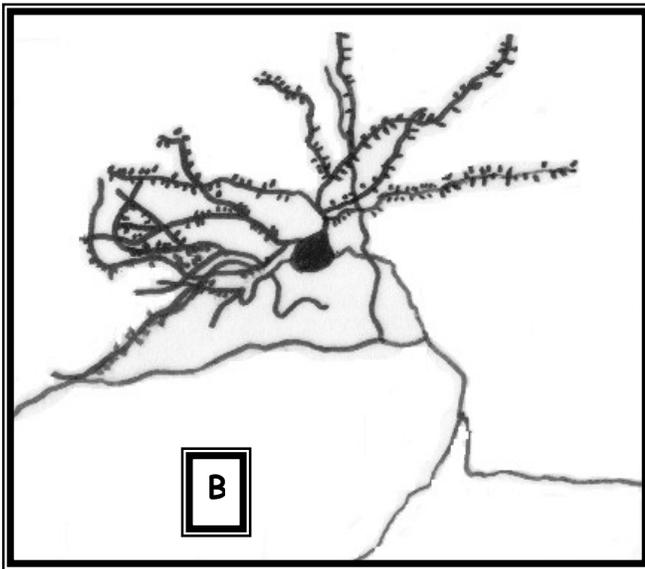
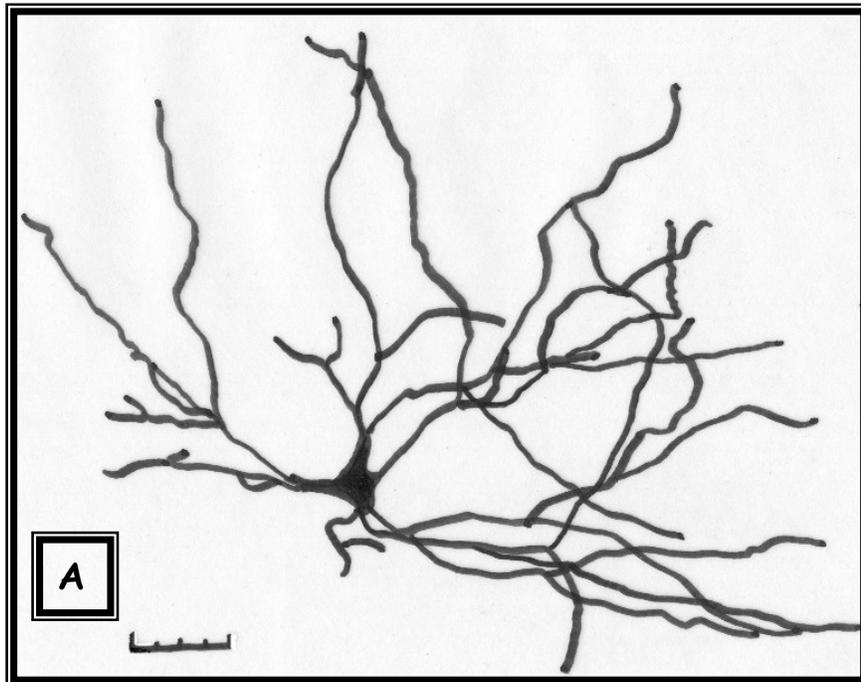


Fig. 5 Representación esquemática de los grupos de neuronas presentes en el estriado. A: neurona grande. B: neurona espinosa. C: neurona pequeña. Escala 50 μm . Modificado de Chang et al, 1982.

Estas sinapsis se realizan principalmente en las espinas de estas neuronas (Ingham et al, 1993). Por otra parte las interneuronas del estriado, a excepción de las interneuronas colinérgicas, contienen GABA y los diferentes tipos de interneuronas pueden distinguirse por la presencia o ausencia de diferentes péptidos involucrados en la neurotransmisión como la parvalbumina que está presente en algunas neuronas GABAérgicas, mucha de la inhibición observada en el estriado a causa de una excitación por la corteza, probablemente se deba a estas neuronas. Las interneuronas que contienen somatostatina realizan sinapsis con las neuronas espinosas y secundariamente con otras interneuronas (Kubota y Kawaguchi, 1993) como se mencionó, estas neuronas liberan somatostatina, neuropeptido γ y óxido nítrico, los efectos de la liberación de estas sustancias aún no están bien definidos; pero se sabe que el óxido nítrico puede difundirse a través de las membranas celulares y tiene efecto en axones del estriado sobre la liberación de glutamato, GABA, acetilcolina y dopamina (Kawaguchi et al, 1995).

Las interneuronas colinérgicas tienen una poderosa influencia en la descarga de las neuronas espinosas y en la salida del estriado, reducen la hiperpolarización de las neuronas espinosas, además de que pueden incrementar la insensibilidad de entradas y especialmente su habilidad para un rápido disparo y despolarización sostenida (Wilson, 1998).

En otro punto, la interacción entre el sistema dopaminérgico y colinérgico estriatal es esencial para el funcionamiento equilibrado del estriado, el balance de ambos sistemas está centrado en las neuronas espinosas medianas en las cuales la acetilcolina ejerce un efecto excitatorio mientras que la dopamina ejerce un efecto inhibitorio (Lehman y Langer 1983).

Para que esta transmisión se realice, las espinas dendríticas juegan un papel fundamental en las sinapsis existentes (Ramon y Cajal, 1909; Portera y Yuste, 2001) ya que la mayoría de contactos sinápticos se dan en las espinas, debido a que las espinas dendríticas son la unidad básica funcional de integración de los circuitos neuronales (Kemp y Powell, 1971(b); Chen y Hillman, 1990).

Las espinas fueron observadas por primera vez por Ramón y Cajal hace más de un siglo (Ramón y Cajal, 1888). Morfológicamente constan de una cabeza y un cuello que se une a la dendrita, generalmente miden menos de 2 μm . En su membrana se realiza el acoplamiento para las sinapsis, gracias a que en la espina se encuentran neurotransmisores, receptores y canales de calcio (Matus, 2000). Las espinas son bastantes complejas: su citoesqueleto consiste principalmente de actina y miosina presentes en microfilamentos y en los microtúbulos que ocasionalmente presentan; muestran aparato espinoso (retículo endoplasmico liso), y polirribosomas. (Spacek y Harris, 1997; Smart y Halpain, 2000; Zhang y Benson, 2000), presentan cinasas, fosfatasas, ATPasas, adenil ciclasas y calcio, entre otras moléculas (Zhang, y Benson, 2000) Fig. 6.

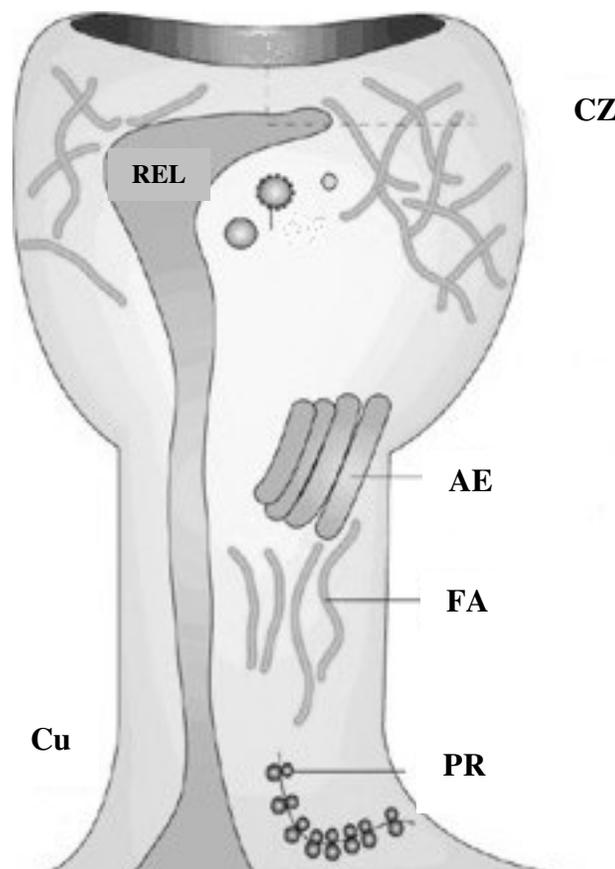


Figura 6. Esquema de una espina dendrítica donde se puede apreciar el cuello (Cu) y la cabeza (Cz) de la espina y algunos de sus componentes como el aparato espinoso (AE), los filamentos de actina (FA), los polirribosomas (PR) y el retículo endoplasmico liso (REL). Tomado de Spacek y Harris, 1997

Se sabe que las espinas son capaces de brotar, perderse y volver a brotar y que pueden llegar a experimentar cambios morfológicos (Matus, 1999). En cultivos *in vitro* de neuronas de hipocampo las espinas se presentan como estructuras casi permanentes y que nunca desaparecen por completo en condiciones optimas. (Ziv y Smith, 1996; Portera y Yuste, 2001) También se ha visto que espinas de la corteza visual en monos llegan a tener una vida media de hasta 13 meses, sin embargo, se presenta perdida de espinas en diversas condiciones como en el envejecimiento, estrés oxidativo, en enfermedades neurodegenerativas, etc. (Grutzandler et al, 2002).

En los modelos de la EP que utilizan 6-hydroxidopamina (6-OHDA) o MPTP, la denervación que se provoca a las neuronas dopaminérgicas de la SN (que tienen aferencia en las neuronas espinosas del estriado), provoca que haya una perdida en la densidad de espinas dendríticas de dichas neuronas (Ingham et al, 1998).

5. MODELOS EXPERIMENTALES DE ENFERMEDAD DE PARKINSON

La pérdida de neuronas dopaminérgicas de la SN en conjunto con la disminución de la dopamina estriatal, representan las alteraciones histológicas y neuroquímicas más importantes de la EP (Luquin y Saldisel, 1997; Shimohama et al, 2003). Por ello, el desarrollo de modelos animales de esta enfermedad se ha orientado al estudio de los mecanismos implicados en la degeneración de las neuronas dopaminérgicas y la eficacia de posibles tratamientos neuroprotectores, como sustancias antioxidantes, fármacos de nuevo uso o fármacos que ya se emplean en enfermedades neurodegenerativas.

5.1. 6-hidroxidopamina (6-OHDA)

La 6-OHDA es la neurotoxina más ampliamente utilizada en el desarrollo de modelos experimentales de EP en roedores. La inyección intracerebral de 6-OHDA produce una destrucción selectiva de neuronas catecolaminérgicas (Jonsson y Sachs, 1970). Esta especificidad es debida a su alta afinidad por el sistema de transporte de catecolaminas.

Ungerstedt (1968) describió por primera vez que la inyección estereotáxica de 6-OHDA en el haz nigroestriatal inducía una lesión selectiva de las neuronas dopaminérgicas de la SN.

Aunque existen estudios que demuestran que la 6-OHDA posee una potente acción inhibitoria de la cadena respiratoria mitocondrial (Glinka y Youdim, 1995) la muerte de las neuronas dopaminérgicas inducida por 6-OHDA está ligada fundamentalmente a la formación de OH, H₂O₂ y quinonas (Jonsson, 1976; Shimohama et al, 2003).

La administración de 6-OHDA en la SN o en el haz nigroestriado induce una degeneración estática, rápida y casi completa (en el lado ipsilateral a la lesión con la neurotoxina) de las neuronas dopaminérgicas de la SN es decir al menos un 90% (Ungerstedt; 1971(a); Lee et al, 1996; Luquin, 2000) asemejándose al porcentaje que presenta un paciente de la EP cuando se le declara la enfermedad. La pérdida de las

neuronas inicia dentro de las primeras 12 horas después de la lesión y la máxima degeneración se da entre el cuarto y sexto día post lesión (Alexi et al, 2000).

Desde el punto de vista conductual, los animales con lesión unilateral de la SN, inducida por inyección directa en el haz nigroestriado o en la SN, presentan inmediatamente después de la cirugía y de forma espontánea una conducta rotatoria ipsilateral a la lesión que se mantiene durante las 24 horas siguientes. Esta conducta rotatoria es debida al desequilibrio que existe entre el contenido de dopamina en el estriado ipsilateral y contralateral a la lesión dopaminérgica, de tal forma que el animal tiende a rotar siempre hacia el lado contralateral al estriado dominante (Zigmond et al, 1989).

Los animales con lesión unilateral de la vía nigroestriada, presentan una rotación ipsilateral a la lesión cuando se les administran sustancias que aumentan la liberación de dopamina tal como la anfetamina, y muestran una rotación contralateral al lado de la lesión cuando reciben agonistas dopaminérgicos como apomorfina (Shimohama et al, 2003). La rotación contralateral inducida por apomorfina u otros agonistas dopaminérgicos, es debida al incremento en el número de receptores dopaminérgicos que existe en el estriado ipsilateral a la lesión como consecuencia de la denervación. Por el contrario, la anfetamina al incrementar la liberación de dopamina en las terminales presinápticas incrementa la concentración de dopamina únicamente en estriado contralateral a la lesión, produciéndose un desequilibrio funcional a favor del estriado contralateral como puede se aprecia en la Fig. 7 (Deumens et al, 2002).

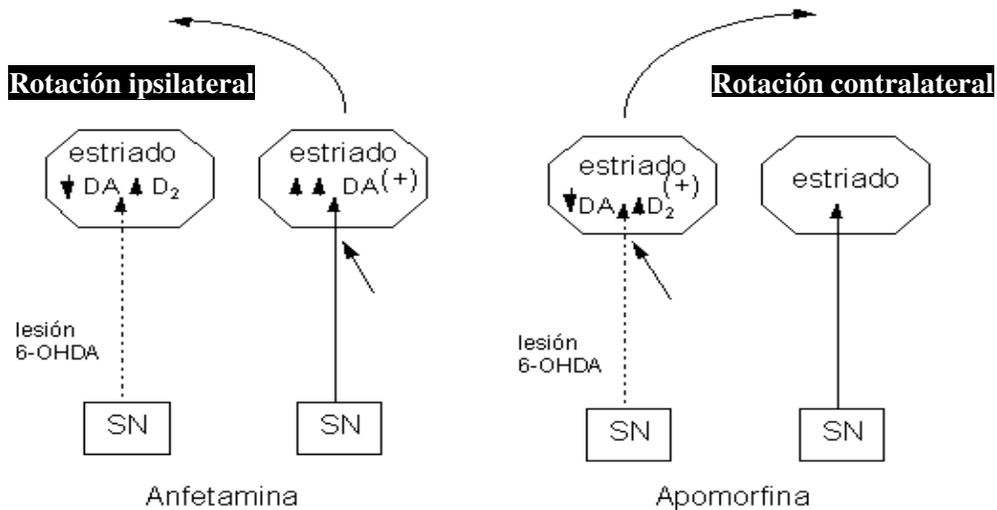


Fig. 7. Esquema de la evaluación de ratas lesionadas unilateralmente. Se observa la rotación insi o contralateralmente a la lesión de acuerdo a la sustancia empleada

Los giros dados por los animales lesionados son fácilmente apreciables y se pueden cuantificar, además de acuerdo al número de giros que de un animal se puede valorar el grado de denervación dopaminérgica. Conforme a esto se ha determinado que si a una rata lesionada unilateralmente con 6-OHDA se le administra apomorfina y realiza 200 giros o más en un periodo de 30 minutos se puede afirmar que la denervación de dopamina estriatal es al menos de un 95% (Ungersted, 1971(a); Deumens, 2002).

En otros estudios Nutt et al (1984) y Woodward et al (1993) han reportado que utilizando el modelo de 6-OHDA, el estriado presenta menor cantidad de vesículas de dopamina como le sucede a pacientes con EP.

Además de lo mencionado anteriormente en el modelo de la EP con 6-OHDA, se pueden estudiar animales lesionados unilateralmente o bilateralmente. Siendo más empleada la lesión unilateral por la ventajas de manejo y conservación de los animales (por ejemplo mayor índice de sobrevivencia, menor periodo de recuperación, una forma más práctica para evaluar, menor sufrimiento para el animal), que presenta la lesión unilateral contra la bilateral. Quizá por todo esto la mayoría de estudios sobre

substancias con propiedades neuroprotectoras o con fines de disminuir los síntomas de la EP se han realizado en modelos con lesión unilateral en el haz nigroestriado con 6-OHDA (Deumens et al, 2002).

Resumiendo, la administración de la 6-OHDA en el haz nigroestriado ofrece ventajas como la lesión selectiva y permanente de neuronas dopaminérgicas causando deterioro neurológico similar a la EP provocando acinesia y pérdida sensorial (Ungerstedt, 1971b), ofrece una gran depleción dopaminérgica como sucede en la EP (Zigmond et al, 1990; Smith y Zigmond, 2003) y por último las alteraciones ultraestructurales en el estriado que ofrece el modelo son equiparables a la que se presentan en la EP (Avila-Costa et al, 1998).

5.2. MPTP

La 1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina (MPTP) es un derivado meperidínico. Su capacidad de inducir un síndrome parkinsoniano fue descubierta de forma accidental en un grupo de heroinómanos que de forma accidental se inyectaron esta sustancia (Langston et al, 1983). Estos sujetos mostraban un síndrome parkinsoniano indistinguible desde el punto de vista semiológico de la EP y toda su sintomatología se revertía con L-dopa o agonistas dopaminérgicos. Posteriormente se comprobó que su administración a animales de laboratorio y fundamentalmente a primates (Burns et al, 1983; Langston et al, 1984) producía un síndrome parkinsoniano asociado a una degeneración selectiva de las neuronas dopaminérgicas de la SNc (Chiueh et al, 1984; Heikkila et al, 1984(a,b); Kopin y Markey, 1988; Seniuk et al, 1990).

Una gran variedad de primates no humanos desarrollan un síndrome parkinsoniano cuando se les administra MPTP. Estos animales muestran una reducción muy importante de la actividad espontánea, rigidez, bradicinesia y temblor. Muy pocos desarrollan el temblor en reposo característico de la EP. Los síntomas parkinsonianos son inicialmente transitorios, pero se hacen permanentes con la administración crónica de la toxina. Los mecanismos implicados en la recuperación espontánea que

experimentan los animales no se conocen, pero se cree que pueden estar relacionados con una alteración transitoria de otros sistemas de neurotransmisión, diferentes al nigroestriado (Elsworth et al, 1989).

Estudios realizados en primates han demostrado que la lesión inducida por MPTP no afecta de forma exclusiva a las neuronas dopaminérgicas de la SNc (Forno et al, 1986). Diversos autores han demostrado que en macacos de edad avanzada la administración de MPTP induce además una degeneración de las neuronas dopaminérgicas del Área Tegmental Ventral (ATV) y del locus coeruleus, donde se han descrito cuerpos de inclusión eosinofílicos que se asemejan a los cuerpos de Lewy que existen en los cerebros de los pacientes con EP (Forno et al, 1988). La degeneración del ATV aunque en menor grado, es evidente también en los primates jóvenes. Sin embargo, la pérdida neuronal es siempre de mayor intensidad en las neuronas dopaminérgicas de la SNc (German et al, 1988).

Desde un punto de vista neuroquímico existe una gran similitud entre el parkinsonismo inducido por MPTP y la EP. La acción neurotóxica del MPTP produce una gran variedad de cambios neuroquímicos, a nivel de la transmisión dopaminérgica y se caracteriza por una reducción de la concentración de dopamina y sus metabolitos, ácido 3,4-dihidroxifenilacético y ácido homovanílico, disminución de la actividad del enzima tirosina hidroxilasa y alteración en la densidad de receptores dopaminérgicos (Perez-Otaño et al, 1992; Perez-Otaño et al, 1994). Al contrario de lo que sucede en la EP donde la depleción de DA es más intensa en el putamen que en núcleo caudado, los primates expuestos en forma crónica a la acción del MPTP muestran una disminución homogénea y no selectiva del contenido de dopamina estriatal, siendo de igual intensidad en ambas estructuras.

5.3. Otros modelos experimentales

Las nuevas técnicas de biología molecular han permitido obtener cepas de ratones en los que se ha eliminado la expresión de determinados genes. Para el estudio

de la EP se dispone en la actualidad de ratones que carecen específicamente de un subtipo de receptor de Dopamina, lo cual ha ayudado a conocer su verdadera función en las respuestas motoras mediadas por DA, así como su posible acción moduladora en el funcionamiento de los ganglios basales (Baik et al, 1995; Luquin, 2000). Por ejemplo el análisis histológico de ratones que carecen de receptores dopaminérgicos D1 no muestran diferencias anatómicas significativas en relación a animales control, sin embargo la expresión de dinorfina está enormemente reducida en el estriado. Los animales muestran de forma espontánea una marcada hiperactividad motora que no se modifica por la acción de agonistas o antagonistas D1. Estos resultados sugieren que los receptores D1 modulan la estructura química de los ganglios basales (Xu et al 1994).

Además de diversos modelos *in vitro* empleados para el estudio detallado de los mecanismos de degeneración de las neuronas dopaminérgicas. Por ejemplo el cultivo de neuronas de mesencefalo de feto de rata y líneas celulares derivadas de neuronas dopaminérgicas, es empleado para el estudio detallado de mecanismos de degeneración neuronal dopaminérgica así como para el empleo de nuevos agentes farmacológicos (Shimohama et al, 2003). Otro ejemplo del empleo de modelos en cultivos de neuronas es el que se empleo para comprobar la resistencia de neuronas dopaminérgicas al oxido nítrico comparadas con neuronas no dopaminérgicas (Sawada et al, 1996).

De esta manera los modelos de la EP tienen gran relevancia para el ser humano y aunque no hay un modelo ideal de la enfermedad los modelos existentes contribuyen notablemente en el avance del conocimiento de la misma, en la prueba de posibles agentes atenuantes de los síntomas y en el conocimiento del modo de acción de los fármacos empleados para este padecimiento.

6. FÁRMACOS EMPLEADOS EN LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

El hecho de que en la EP se conserven las células del estriado en las que se encuentran los receptores dopaminérgicos, permite una terapéutica sustitutiva. El objetivo de la terapia sintomática es disminuir la incapacidad funcional.

6.1. Selegilina.

También conocida como deprenil, la selegilina se ha convertido en un medicamento comúnmente utilizado para la EP. Es un inhibidor selectivo de la monoamino oxidasa tipo B (IMAO-B). En algunos ensayos controlados con placebos se ha demostrado que el medicamento retrasa la necesidad de terapia con levodopa hasta en un año o más. Cuando la selegilina se administra con levodopa, parece realzar y prolongar la respuesta a la levodopa y por tanto puede reducir las fluctuaciones de pérdida de efecto. Los efectos colaterales más frecuentes son la excitación psicomotriz, insomnio y trastornos psiquiátricos (Goodman et al, 1996).

6.2. Agentes anticolinérgicos.

Estos medicamentos eran el principal tratamiento de la EP hasta la introducción de la levodopa. Su beneficio es limitado pero pueden ayudar a controlar el temblor y la rigidez. Los agentes anticolinérgicos parecen actuar bloqueando la acción de la acetilcolina, cuyos efectos se hacen más pronunciados cuando descienden los niveles de dopamina (National Institute of Neurological Disorders and Stroke, 2003).

6.3. Amantadina.

Es un medicamento antiviral, que se emplea en la profilaxis de la Influenza tipo A2 y que proporciona efectos antiparkinsonianos ya que ayuda a reducir los síntomas de la EP. Se sabe que el mecanismo de acción de la amantadina es el aumento de la liberación de dopamina. *In vitro* en dosis altas inhibe la recaptura de dopamina. A menudo se toma sólo en las etapas iniciales de la enfermedad indicado para retardar el uso de la L-Dopa, o con un medicamento anticolinérgico o con la levodopa.

Sus efectos tienden a declinar en 8 a 12 semanas de tratamiento continuo, por ello se emplea solo por 2-3 semanas. Puede producir disminución de la capacidad de concentración, confusión, insomnio, alucinaciones, mareos y letárgia entre otros síntomas (Kulisevsky, 2001).

6.4. Levodopa

Sin duda actualmente el tratamiento más empleado es el medicamento levodopa (llamado también L-dopa). L-dopa (de la abreviatura en inglés del nombre completo L-3,4-dihidroxifenilalanina) es un producto químico simple presente en las plantas y en los animales. Levodopa es el nombre genérico utilizado para este producto químico cuando se formula para utilización medicamentosa en los pacientes. Las neuronas DA en la EP utilizan levodopa para formar la dopamina y suplir el suministro decreciente de dopamina en la EP. La propia dopamina no puede administrarse ya que no cruza la barrera hematoencefálica. Usualmente, los pacientes reciben levodopa combinada con carbidopa. Cuando se añade a la levodopa, la carbidopa retrasa la conversión de levodopa a dopamina hasta que llega al cerebro, evitando o disminuyendo algunos de los efectos secundarios que acompañan a menudo al tratamiento con levodopa como náuseas y vómitos (National Institute of Neurological Disorders and Stroke, 2003).

En la década de 1960, la levodopa se utilizó en el tratamiento inicial de los síntomas debilitantes y permite a la mayoría de los pacientes de la EP extender el periodo de tiempo en el que pueden llevar vidas relativamente normales y productivas.

Aunque la levodopa ayuda al menos a tres cuartas partes de los casos con EP, no todos los síntomas responden igual al medicamento. La bradicinesia y la rigidez responden mejor a la levodopa, mientras que el temblor puede reducirse sólo marginalmente. Los problemas con el equilibrio y otros síntomas pueden no aliviarse en absoluto (National Institute of Neurological Disorders and Stroke, 2003).

Las personas que han utilizado otros medicamentos antes de iniciar el tratamiento con levodopa pueden tener que reducir o eliminar esos medicamentos a fin de obtener el beneficio completo de la levodopa. Una vez que comienza a administrarse la terapia con levodopa, las personas responden a menudo espectacularmente, pero pueden necesitar incrementar la dosis paulatinamente para obtener un beneficio

máximo y así evitar los periodos de “on-off” que se dan cuando la dosis de L-dopa ya no es suficiente, es decir los periodos de on se dan cuando la dosis es efectiva para disminuir la sintomatología de la EP y los periodos de off aparecen cuando el fármaco no disminuye estos síntomas e incluso los agrava (Kulisevsky, 2001).

6.5. Agonistas dopaminérgicos

Son drogas que estimulan directamente los receptores postsinápticos dopaminérgicos, como: bromocriptina (Parlodel 2.5 y 5 mg), Lisuride (Dopergin 0.2 y 1 mg), pergolide (Pharken 0.05, 0.1, 0.25 y 1 mg), ropinirole (Requip 0.25,1,2 y 5 mg) y pramipexol (Mirapexín 0.18 y 0.7 mg). Los tres primeros son derivados ergóticos, lo que implica que no se trata de agonistas dopaminérgicos puros, sino que también estimulan otro tipo de neuroreceptores (serotonérgicos y noradrenérgicos). El ropinirole y pramipexol son los dos agonistas dopaminérgicos (ambos no ergolínicos) mas recientemente comercializados (Kulisevsky, 2001).

En muchos pacientes con enfermedad de Parkinson, la eficacia de la levodopa disminuye con el tiempo. Dado que el agente debe ser convertido en dopamina en regiones de un encéfalo en el cual la patología básica incluye la pérdida de la capacidad para realizar esa función, se ha volcado mucho interés en el desarrollo de agonistas dopaminérgicos de acción directa. Se ha postulado que los agonistas dopaminérgicos pueden ser neuroprotectores debido a que estimulan los receptores D2 (Carter y Muller, 1991, Piercey et al, 1995).

Posteriormente, las investigaciones se centraron en una serie de derivados del cornezuelo del centeno, como bromocriptina, lisurida y pergolida. A pesar de que los tres compuestos difieren en sus propiedades farmacocinéticas y su espectro de actividades sobre las diferentes poblaciones de receptores dopaminérgicos, parecen muy similares en cuanto a su eficacia clínica. La bromocriptina ha sido estudiada con más detalle y se constituye el prototipo de las ergolínicas (Bergamasco et al, 1990;

Parkinson's Disease Research Group in the United Kingdom, 1993; Hely et al, 1994; Montrastruc et al, 1994).

6.5.1. Bromocriptina

La Bromocriptina fue el primer agonista aprobado para la práctica clínica, en 1974 Es un potente agonista dopaminérgico de los receptores D2 y leve antagonista de los receptores D1 (Barbieri y Ryan, 1983). Fue el primero que se adjunto a la terapia de la Levodopa y actualmente se sigue empleando adjunto o en monoterapia (Watts, 1997) siendo uno de los fármacos más recetados para el tratamiento de la EP (Van de Vijver, et al, 2001). Su principal uso es como auxiliar de la levodopa en el manejo de pacientes con parkinsonismo que experimentan fenómenos "on-off" excesivos o que no son bien controlados con la levodopa.

En pacientes que no pueden tolerar la levodopa, dosis altas de bromocriptina (50 a 100 mg) pueden inducir respuestas terapéuticas equivalentes (Pontificia Universidad Javeriana, 2000) a demás de que la mitad de los pacientes responden bien a la bromocriptina y pueden ser manejados hasta por dos años con monoterapia de bromocriptina (Parkinson's Disease Research Group in the United Kingdom, 1993; Hely et al, 1994; Montrastruc et al, 1994).

Su bio-viabilidad es menor al 10% y su vida media en plasma sanguíneo es de 6 a 8 horas. Las dosis usadas en el tratamiento inicial de la EP pueden ser bajas (menos de 10 mg/día), moderadas (10-30 mg/día) y altas (31-60 mg/día) sin embargo dosis menores de 30mg/d son mejor toleradas que dosis mayores a 50 mg/d (Fig. 7) (Anónimo, 2002).

Se ha comprobado su eficacia a corto plazo como monoterapia, pero su eficacia a largo plazo (más de 12 meses) es limitada y menor que la levodopa, y la mayoría de pacientes requieren la adición de levodopa para controlar los síntomas. También se ha reportado una significativa disminución en la incidencia de discinesias y fluctuaciones

motoras en los pacientes tratados precozmente con bromocriptina en comparación con los tratados con levodopa (Parkinson's Disease Research Group in the United Kingdom, 1993).

Estudios previos reportan que la bromocriptina tiene propiedades neuroprotectoras (Takashima et al, 1999) por actuar como barredor de radicales libres

además de reducir la recaptura de dopamina y minimizar el daño causado por el estrés oxidativo (Yoshikawa et al, 1994; Yamamoto, 1998; Muralikrishnan y Mohanakumar, 1998). Además de ser altamente eficaz en la disminución de síntomas en las primeras etapas de la EP (Bedard et al, 1986; Treseder et al, 2000). De igual manera Yoshikawa et al (1994) y Nishibayashi et al (1996) sugieren que la bromocriptina actúa directamente como barredor de radicales hidroxilo y/o óxido nítrico. Sawada et al (1998), propone que el efecto antioxidante de la bromocriptina estaría relacionado con una vía de receptores D2.

Un estudio con monos lesionados con 6-OHDA demostró que la bromocriptina resultó ser más efectiva que el manitol, el ácido ascórbico y el glutatión como barredor de radicales libres debido a la capacidad de reducir la recaptura de dopamina, estos resultados tienen implicaciones importantes para el tratamiento de la EP, ya que los radicales libres contribuyen al desarrollo de la enfermedad (Ogawa et al, 1994).

También se ha reportado que la bromocriptina reduce la intensidad del temblor provocado por MPTP en monos, de igual manera revierte la acinesia y rigidez. Además de atenuar la generación de radicales $\cdot\text{OH}$ y mantener la concentración de dopamina en la sustancia nigra después de la administración de MPTP, en cultivos *in vitro* y bloquea la generación de estos radicales hidroxilos cuando se suministra 30 minutos antes del MPTP *in vivo* (Muralikrishnan y Mohanakumar, 1998).

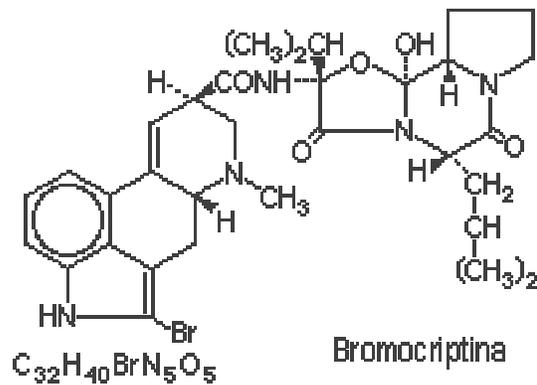


Figura 7. Estructura química de la bromocriptina

Además se ha demostrado en neuronas del mesencefalo *in vitro*, que la bromocriptina decreta la neurotoxicidad provocada por la L-Dopa en las neuronas dopaminérgicas. La toxicidad de la L-Dopa se debe a la producción de radicales libres ocasionando la muerte celular. Los autores sugieren que la propiedad neuroprotectora de la bromocriptina esta relacionada con su acción en los receptores D2, ya que con 2-(N-phenethyl-N-propyl)-amino-5-hydroxytetralin (PPHT), otro agonista dopaminérgico de receptores D2, también disminuye la neurotoxicidad. Esto debido a la estimulación de los autoreceptores que reduce la excitabilidad de las terminales dopaminérgicas e inhibe la síntesis y recaptura de dopamina. Además se observo la completa inhibición de la neuroprotección de la bromocriptina con antagonistas de los receptores D2 lo que apoya esta teoría. Aunque también se observo que con MPP la bromocriptina no redujo la neurotoxicidad en las neuronas dopaminérgicas como lo hace con la L-dopa, esto quizá se deba a que la producción de radicales libres con MPP no esta relacionada con la síntesis de dopamina (Takashima et al, 1999).

En otro estudio comparativo, Ogawa et al, (2000) demuestran que la adición de bromocriptina disminuye en más de dos tercios la recaptura de dopamina ocasionada por la L-dopa en el lado lesionado de ratas lesionadas unilateralmente con 6-OHDA, disminuyendo el daño neuronal.

En un estudio ultraestructural Montiel (2001) encontró que la bromocriptina atenuó algunas alteraciones producidas por la lesión con 6-OHDA, como la disminución en el diámetro de los botones presinápticos y el aumento del número de contactos sinápticos con espinas, con estos resultados propone que la bromocriptina ofrece un efecto protector a nivel ultraestructural, factor que sugiere que esta protección también ocurra a nivel citológico.

7. JUSTIFICACIÓN

Como se ha mencionado, la bromocriptina es uno de los agonistas dopaminérgicos con características antioxidantes que se utiliza en el tratamiento farmacológico de la EP, por lo que es importante estudiar si dicho fármaco, es capaz de atenuar las alteraciones citológicas producidas por lesión con 6-OHDA.

8. OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto de la bromocriptina en la citología del estriado de ratas empleando el modelo de la enfermedad de Parkinson con 6-hidroxidopamina.

8.1. Objetivos particulares

- Cuantificar el número de espinas dendríticas de las neuronas espinosas medianas del cuerpo estriado de animales lesionados con 6-hidroxidopamina tratados o sin tratar con bromocriptina.
- Realizar un análisis cuantitativo del número de espinas dendríticas de las neuronas espinosas medianas del cuerpo estriado de animales tratados con bromocriptina lesionados con solución salina.
- Comparar el promedio del número de espinas dendríticas de las neuronas espinosas medianas del lado ipsilateral y contralateral a la lesión.

9. MÉTODO

Los experimentos se llevaron a cabo en 20 ratas machos de la cepa *Wistar*, separados en 4 grupos (Tabla 1). Su peso promedio fue de 180-200 g al inicio del experimento, se mantuvieron con periodos de luz-oscuridad de 12 horas con libre acceso a comida y agua.

Las ratas de los grupos 2 y 3 se lesionaron quirúrgicamente de la siguiente manera: los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico, a una dosis de 35 mg/Kg vía intraperitoneal (i.p.), se fijaron en un estereotaxico y se lesionó unilateralmente el lado izquierdo en el haz medial del cerebro anterior, conforme a las coordenadas estereotaxicas a partir de la línea de Bregma según Paxinos y Watson, (1986) con 4 μ l de solución salina que contenía 8 μ g de 6-OHDA y 0.2 mg de ácido ascórbico. El grupo 1 (sham) se lesiono únicamente con 4 μ l de solución salina, y el grupo 4 no fue lesionado (Tabla 1).

Los grupos lesionados con 6-OHDA se evaluaron de acuerdo a la conducta de giro inducida con apomorfina, con dosis de 0.25 mg/Kg inyectada i.p; dos días después de la lesión, utilizando solo a aquellas ratas que realizaron 200 giros o más en treinta minutos. Dos días después de la evaluación los grupos 3 y 4 fueron tratados con 0.3 mg/Kg de bromocriptina vía oral durante treinta días. A los grupos 1 y 2 no se les suministro el fármaco, pero se mantuvieron el mismo periodo de tiempo y en las mismas condiciones que los grupos 3 y 4.

GRUPO	TRATAMIENTO
Grupo 1: <i>Sham</i>	Lesión falsa con solución salina y sin suministro de bromocriptina
Grupo 2:	Grupo lesionado con 6-OHDA sin suministro de bromocriptina
Grupo 3:	Grupo experimental lesionado con 6-OHDA y suministro de bromocriptina
Grupo 4:	Grupo experimental sin lesión y tratado con bromocriptina

Tabla 1: Muestra cada uno de los grupos con el tipo de tratamiento.

Posteriormente los animales fueron anestesiados con pentobarbital dosis letal (150 mg/kg) i.p. y perfundidos por vía intracárdica, con solución de glutaraldehído y paraformaldehído al 2%, se disecó y fragmentó el estriado, para procesarlo con la técnica de *Golgi rápido* (Ver anexo 1).

El análisis citológico se efectuó realizando el conteo de espinas dendríticas de las neuronas espinosas de los estriados ipsi y contralateral a la lesión con 6-OHDA; de cinco dendritas secundarias en veinte neuronas en cada rata, de cada uno de los grupos (Fig. 8). Se observó con microscopia de luz a seco débil para la localización de las neuronas y su cuantifico a seco fuerte. Se obtuvo el promedio de espinas de cada grupo graficando los resultados. La estadística se realizó con un análisis de varianza seguido de la prueba de Tukey con $P < 0.05$.

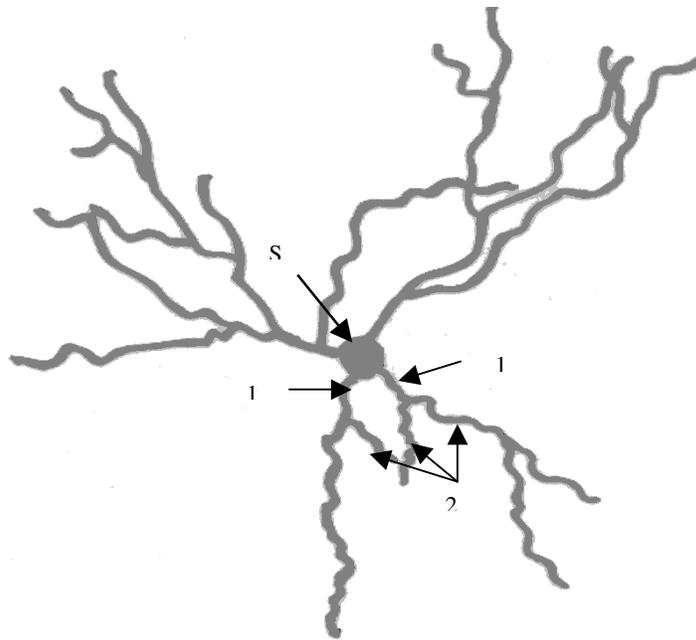


Figura 8. Esquema de una neurona espinosa mediana donde se ejemplifica el criterio para diferenciar la dendritas primarias (1) y secundarias (2). S: soma.

10. RESULTADOS

Nuestros resultados mostraron que las neuronas espinosas del estriado ipsilateral a la lesión con 6-OHDA sin tratamiento presentaron una disminución significativa ($P < 0.050$) en el número de espinas dendríticas (Fig. 9B, 10B) comparándolas con las del grupo sham (Figura 9A, 10A. Tabla 2). Sin embargo el grupo lesionado y tratado con bromocriptina (Fig. 9C; 10C, 10D) mostró una menor pérdida significativa ($P < 0.05$), que el grupo lesionado y sin tratamiento, pero al compararse con el grupo sham el decremento es significativo ($P < 0.05$). Por otra parte en el estriado ipsilateral del grupo sin lesión y tratado con bromocriptina (Fig. 9D; 10E) también se observó menor densidad de espinas que el grupo sham aunque la densidad es mayor que la de los grupos lesionados (Gráfico 1).

Con respecto a los estriados ipsi y contralateral a la lesión de los grupos sham y tratado con bromocriptina sin lesión, no presentaron diferencias significativas (Fig 9A, 11A y 9E, 11D, Gráfico 1). En contraste, los grupos lesionados con 6-OHDA con y sin tratamiento mostraron mayor densidad de espinas en el estriado contralateral comparado con el ipsilateral (Fig. 10B, 12B y 10C, 12C), como lo reporta Ingham et al (1993), pero este valor es menor al del estriado contralateral del grupo sham $P < 0.05$, (Fig. 10A, 12)

En cuanto a la comparación entre los grupos se observó que los tres grupos experimentales presentaron diferencias significativas en ambos estriados con respecto al grupo sham (Tabla 2 y Gráfico 1).

GRUPO	No de espinas dendríticas	
	Ipsilateral	Contralateral
SHAM	10.27 ± 0.10	10.36 ± 0.11
LESIONADO SIN TRATAMIENTO	5.85* ± 0.11	8.64 [#] ± 0.12
LESIONADO Y TRATADO CON BROMOCRIPTINA	6.81* ± 0.09	8.52 [#] ± 0.10
TRATADO CON BROMOCRIPTINA SIN LESIÓN	8.16* ± 0.09	8.2 [#] ± 0.09

TABLA 2. Promedio del número de espinas dendríticas en las neuronas espinosas medianas de los 3 grupos ipsilatera vs. Sham $l^* = P < 0.05$, y contralateral. $\# = P < 0.05$ vs. Sham

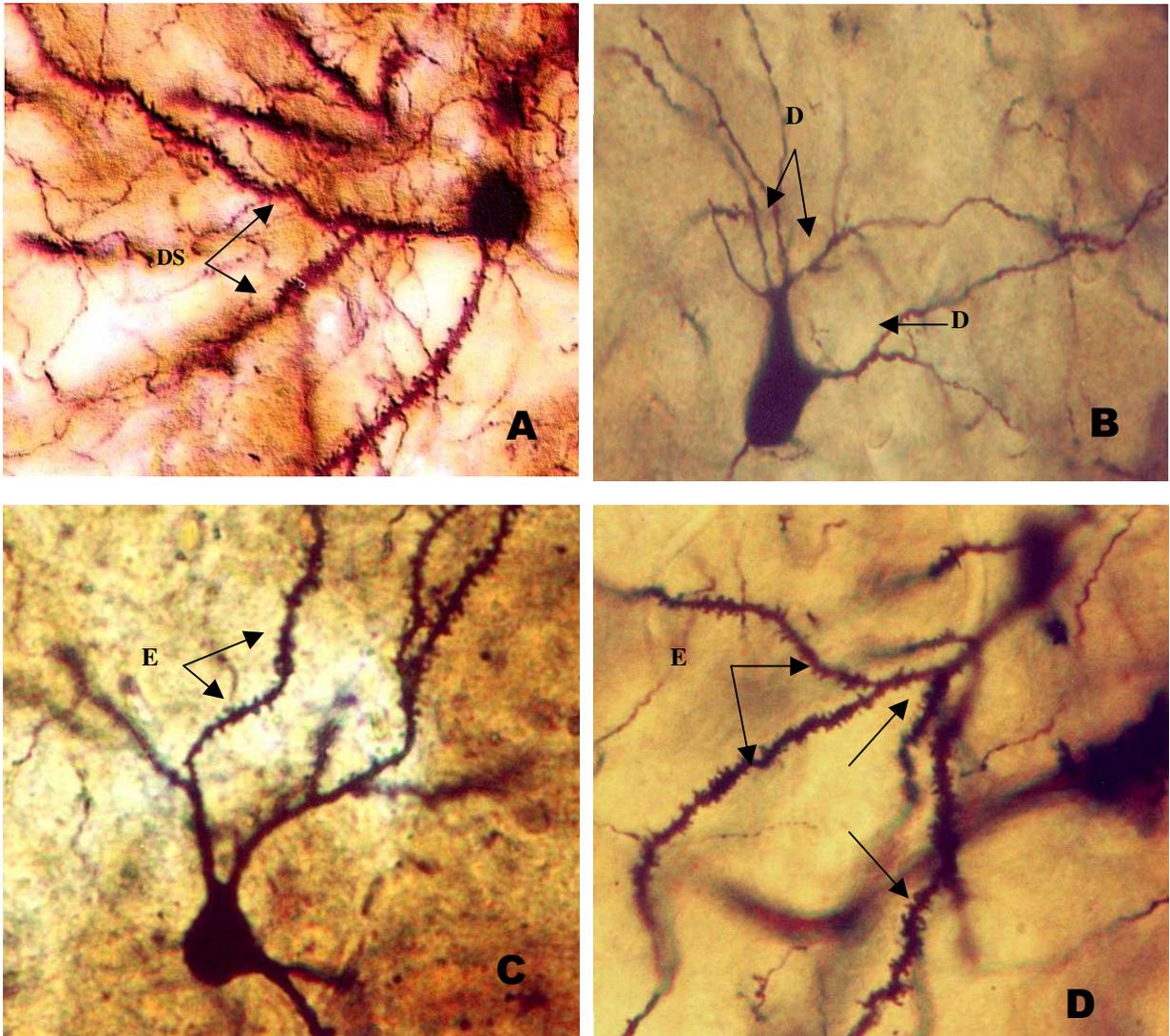


Figura 9. Microfotografías de neuronas del estriado ipsilateral a la lesión: **A)** Grupo control, se pueden apreciar las dendritas secundarias con gran densidad de espinas dendríticas. **B)** Neurona del grupo lesionado con 6-OHDA sin tratamiento con bromocriptina que muestra poca densidad espinosa. **C)** Neurona del grupo lesionado con 6-OHDA y tratado con bromocriptina que muestra mayor densidad de espinas que en el grupo lesionado sin tratamiento. **D)** Neurona del grupo sin lesión y tratado con bromocriptina donde se ve una alta densidad de espinas que similar al grupo control. DS: dendrita secundaria, D: dendrita, E: espinas dendríticas. 400X.

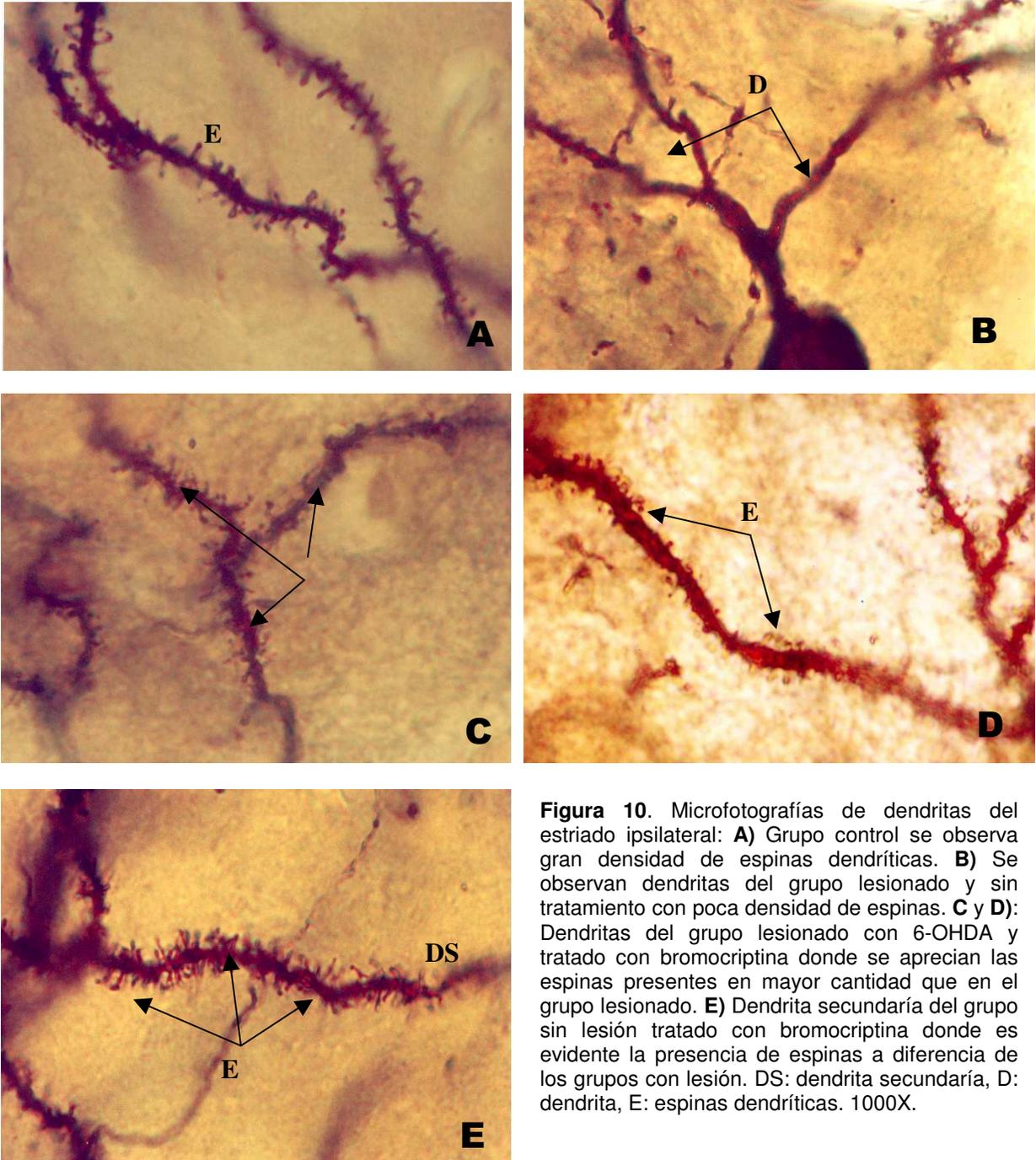


Figura 10. Microfotografías de dendritas del estriado ipsilateral: **A)** Grupo control se observa gran densidad de espinas dendríticas. **B)** Se observan dendritas del grupo lesionado y sin tratamiento con poca densidad de espinas. **C y D):** Dendritas del grupo lesionado con 6-OHDA y tratado con bromocriptina donde se aprecian las espinas presentes en mayor cantidad que en el grupo lesionado. **E)** Dendrita secundaria del grupo sin lesión tratado con bromocriptina donde es evidente la presencia de espinas a diferencia de los grupos con lesión. DS: dendrita secundaria, D: dendrita, E: espinas dendríticas. 1000X.

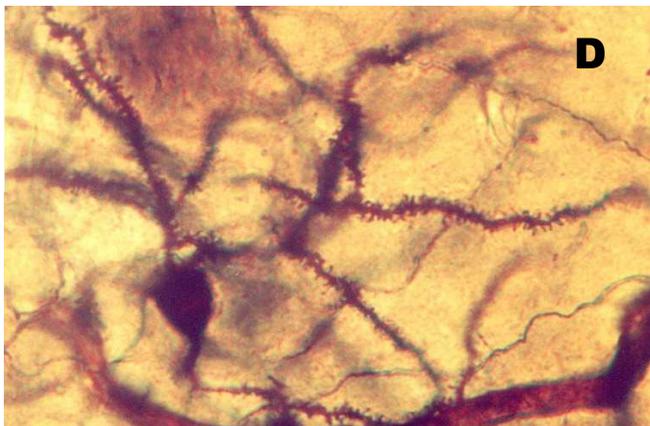
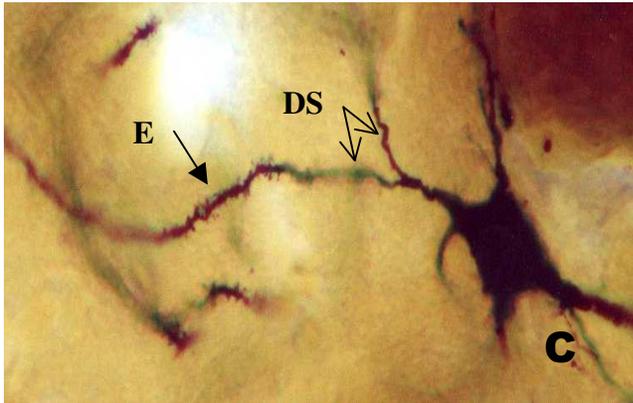
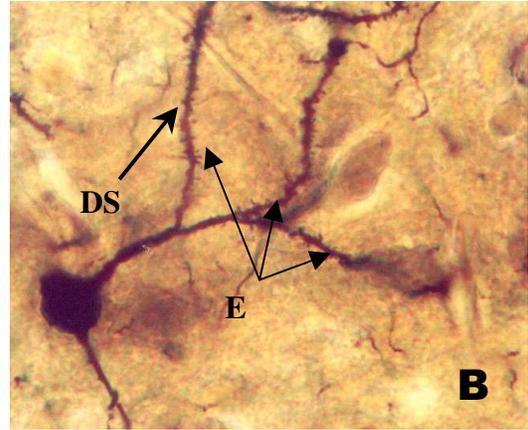
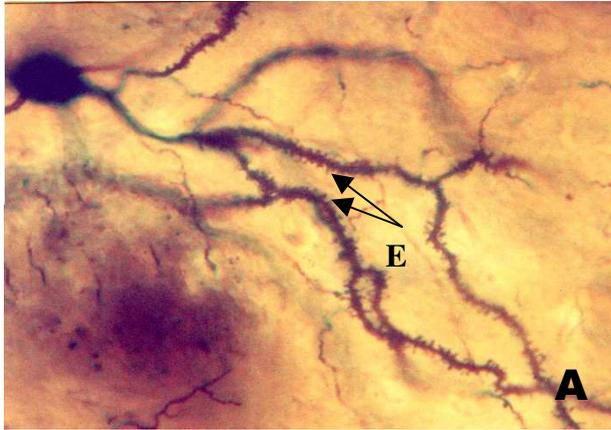


Figura 11. Neuronas espinosas del estriado contralateral a la lesión. **A)** Grupo control, se aprecia una alta densidad espinosa como en las anteriores imágenes control. **B)** Neurona del grupo lesionado, con menor densidad de espinas dendríticas que en el control. **C)** Neurona del grupo lesionado y tratado con bromocriptina. **D)** Neurona del grupo sin lesión tratado con bromocriptina que presenta una alta densidad de espinas semejante al control. DS: dendrita secundaria. E: espinas dendríticas. 400X.

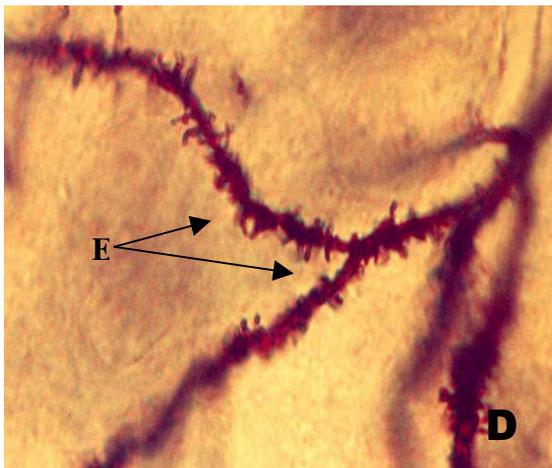
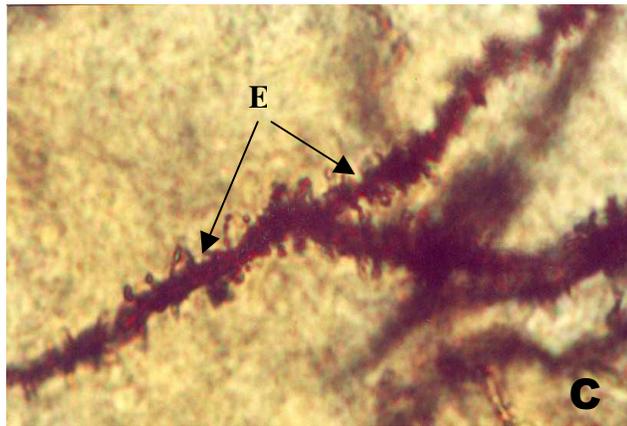
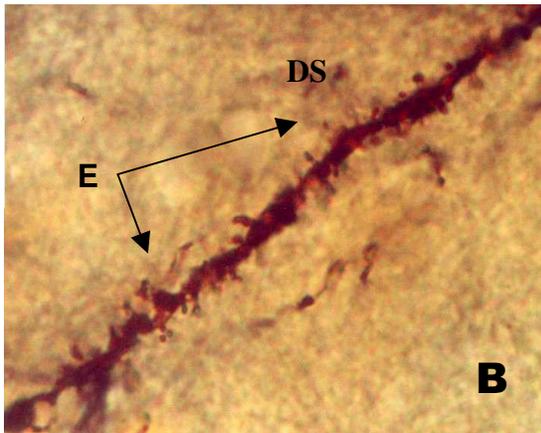
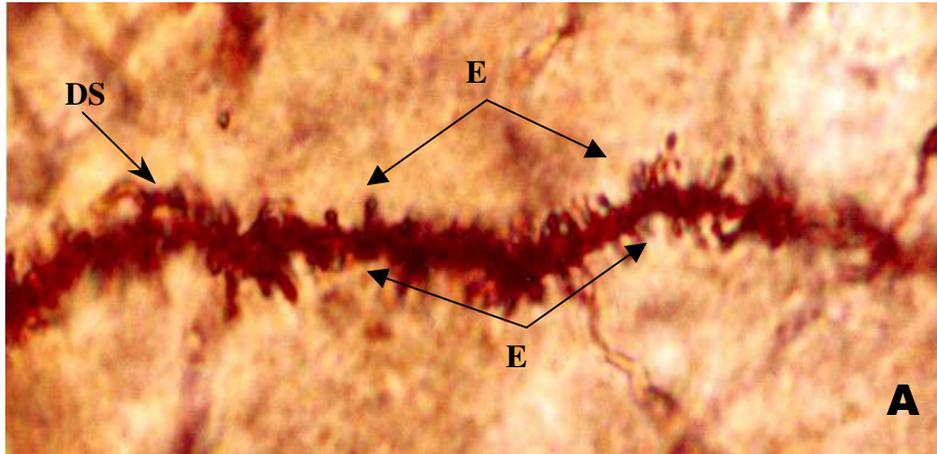
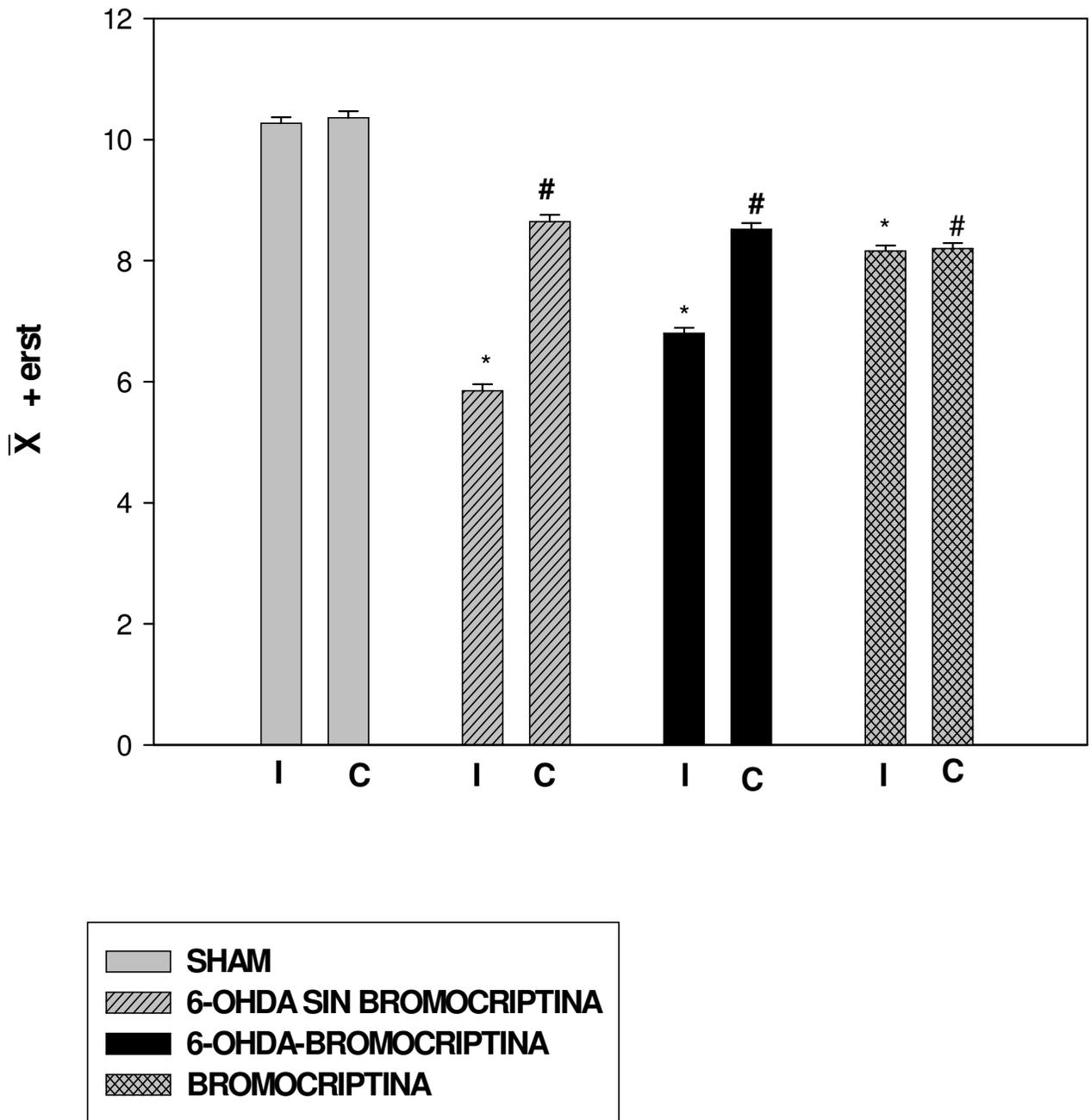


Figura 12. Microfotografías de dendritas del estriado contralateral. **A)** Dendrita secundaria del grupo control en la que se puede ver la gran densidad de espinas. **B)** Dendrita secundaria del grupo lesionado sin tratamiento donde se puede observar espinas dendríticas aunque en menor densidad que en el control. **C)** Dendrita secundaria del grupo lesionado y tratado con bromocriptina en la que se aprecia mayor densidad de espinas que en el grupo sin bromocriptina. **D)** Dendrita del grupo sin lesión y tratado con bromocriptina, con gran cantidad de espinas. DS: dendrita secundaria, E: espina dendrítica. 1000X.

NÚMERO DE ESPINAS DENDRÍTICAS



Gráfica 1 Promedio del número de espinas dendríticas en las neuronas espinosas medianas del estriado (I) Ipsilateral y (C) contralateral de cada grupo. ipsilatera vs. Sham I* = P<0.05 , y contralateral. # = P<0.05 vs. Sham

11. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se estudio el efecto de la bromocriptina en las neuronas espinosas medianas del estriado en animales lesionados con 6-OHDA, debido a que la bromocriptina presenta propiedades de antioxidante y neuroprotector (Kihara et al, 2002; Simpkins y Jankovic, 2003) por lo que considerando que una de las teorías del origen de la enfermedad de Parkinson esta relacionada con la producción de radicales libres, determinar el efecto de la bromocriptina nos proporciona información importante para observar el efecto de un antioxidante (bromocriptina) directamente en las neuronas en un modelo de la enfermedad de Parkinson que esta relacionado con la producción de radicales libres (6OHDA).

Tomando en cuenta lo anterior y recordando que las neuronas espinosas medianas son el principal sitio de entrada y salida del estriado (Kandel et al, 2000), pero que no pueden realizar una adecuada transmisión si sufren alguna alteración en sus espinas dendríticas, ya que estas son el principal sitio donde se realizan las sinapsis (Ramon y Cajal, 1909; Ingham, 1993; Portera y Yuste, 2001); nuestros resultados sugieren que la bromocriptina atenúa el daño provocado por la lesión con 6-OHDA.

Aunque en este modelo de la EP, cuando se realiza una lesión en el haz medial del cerebro anterior de forma unilateral con 6-OHDA se produce muerte celular de las neuronas dopaminérgicas de la SN por su efecto inhibitorio en la actividad enzimática de la cadena respiratoria mitocondrial (Glinka y Youdim, 1995; Soto-Otero, 2000), la causa principal de la muerte celular en el estriado esta relacionada con la formación de hidroxilo (OH), peroxido de hidrógeno (H₂O₂) y quinonas; es decir, la muerte neuronal esta determinada por el estrés oxidativo ocasionado por la 6-OHDA (Jonsson, 1976; Shimohama et al, 2003), esta muerte neuronal tiene como consecuencia disminución en los niveles de dopamina y la pérdida en el número de espinas en las neuronas espinosas estriatales (Glinka et.al, 1997), como se observó en el grupo lesionado sin tratamiento, brindando una situación semejante a lo que sucede en los pacientes con la enfermedad de Parkinson (Patt et.al, 1991).

Aprovechando esta situación se determinó el efecto de la bromocriptina en el número de espinas dendríticas de animales lesionados con 6-OHDA, y nuestros resultados mostraron un aumento significativo en el número de espinas dendríticas comparado con el grupo lesionado y sin tratamiento. Este cambio en el número de espinas podría explicarse como una consecuencia de un efecto neuroprotector de la bromocriptina específicamente actuando como barredor de radicales libres (Factor, 1999) como lo reportan Takashima et al, (1999), donde observan una mayor supervivencia neuronal en células expuestas a la neurotoxicidad causada por L-dopa *in vitro* y tratadas con bromocriptina; también Simpkins y Jankovic (2003) mencionan que neuronas de la sustancia nigra pre-tratadas con agonistas dopaminérgicos como la bromocriptina disminuyen la muerte celular por daño oxidativo, si tomamos en cuenta que la lesión con la 6-OHDA provoca radicales libres podría ser posible que la bromocriptina los disminuyan o elimine debido a su capacidad de eliminar radicales oxidrilo y superóxido (Yoshikawa et al, 1994; Yamamoto,1998; Muralikrishnan y Mohanakumar et al, 1998) atenuando el daño y favoreciendo la presencia de un mayor número de espinas dendríticas. Montiel, (2001) también estableció que la bromocriptina presenta efecto neuroprotector a nivel ultraestructural observándose una disminución del edema de los botones sinápticos inducido por lesión con 6-OHDA y sugiere que la bromocriptina estimula la inhibición de autorreceptores y promueve la formación de proteínas antioxidantes. Un estudio más que reafirma las propiedades antioxidantes de la bromocriptina es el que realizaron Kihara et al, (2002), en donde observan que la bromocriptina disminuye la muerte neuronal provocada por la excitotoxicidad del glutamato en cultivos de neuronas corticales. Las propiedades neuroprotectoras de la bromocriptina se basan en que el glutamato genera radicales libres que inducen muerte neuronal cuando es suministrado en el cultivo celular, pero si se agrega bromocriptina el daño provocado se atenúa considerablemente comparado con el grupo control ya que el fármaco elimina dichos radicales, posiblemente propiciado por la estimulación de los receptores D2. Por lo anterior se puede proponer que el efecto de la bromocriptina que se manifiesta en una mayor densidad de espinas, es debido a su capacidad antioxidante y neuroprotectora (Yoshikawa, et al, 1994; Nishibayashi et al, 1996; Sawada et al, 1998).

Además de lo anterior la bromocriptina también podría contribuir en la presencia de espinas por medio del estímulo de los receptores dopaminérgicos D2 (Sawada et al, 1998), que para captar una mayor cantidad del agonista dopaminérgico propicia la presencia de espinas. Esto podría explicarse como en un estudio *in vitro* en el que se observa que neuronas expuestas a L-dopa sufren toxicidad, que es atenuada por la bromocriptina pero se observa que cuando a las neuronas se les agrega un antagonista de los receptores D2 la protección de la bromocriptina disminuye. De la misma manera se observó que otro agonista de los receptores D2 ofrece una protección neuronal similar a la presentada por la bromocriptina, lo que comprueba que la bromocriptina actúa estimulando los receptores D2 (Takashima et al, 1999). Por lo tanto, sabemos que la bromocriptina actúa estimulando los receptores dopaminérgicos y también se sabe que cuando hay muerte neuronal, las células que sobreviven buscan compensar la ausencia de neuronas incrementando el área de contacto con el neurotransmisor, propiciando la formación de espinas dendríticas (Fiala et al, 2002), por lo que podría sugerirse que la neurona tratando de compensar la falta del neurotransmisor aumente el número de espinas para captar lo más posible del agonista dopaminérgico.

Otro factor que podría estar ayudando a las espinas es la facultad de la bromocriptina para disminuir la recaptura de dopamina, evitando toxicidad para la neurona, ya que durante el metabolismo y recaptura de la dopamina hay formación de radicales libres que al formarse en exceso producen daño y muerte celular (Ogawa et al, 1994; Muralikrishnan y Mohanakumar, 1998). Esta capacidad ha sido comprobada *in vivo* en animales con una alta recaptura de dopamina causada por el tratamiento con L-dopa, ya que al suministrar bromocriptina se redujo esta recaptura y al mismo tiempo hubo un decremento en los radicales libres (Ogawa et al, 2000).

Por otro lado la bromocriptina suministrada a ratas que no presentan lesión provoca daño a las neuronas, suscitando la pérdida de espinas. Esto podría explicarse por una oxidación provocada de forma indirecta por la bromocriptina, al ocupar receptores dopaminérgicos (especialmente los D2) por ser agonista dopaminérgico (Barbieri y Ryan, 1983; Missale, et al, 1998; Takashima et al, 1999; Simpkins y Jankovic, 2003; Kitamura et al, 2003) en lugar de la dopamina, que al estar presente de

forma normal en el organismo se podría estar presentando en exceso propiciando la generación de radicales libres que dañan las neuronas haciendo que pierdan espinas. Aunque también podría ser que la neurona estuviera reduciendo el área expuesta a la toxicidad disminuyendo la densidad de espinas, para atenuar el daño (Fiala et al, 2002).

Además de lo mencionado el número de espinas podría reducirse debido a que al existir un exceso de dopamina en las terminales sinápticas de las neuronas dopaminérgicas de la SN, estas reducen las aferencias hacia las neuronas espinosas provocando que haya un decremento en el número de espinas al perder dichas aferencias, lo anterior se basa en las observaciones realizadas por Parish et al (2002), donde obtienen evidencias de que la activación de los autoreceptores de las neuronas dopaminérgicas por exceso de dopamina provocada por agonistas dopaminérgicos reducen la arborización axonal de estas neuronas para buscar estabilizar la transmisión dopaminérgica.

Otro punto en los resultados, es la pérdida de espinas en el estriado contralateral de los grupos lesionados, tanto del grupo tratado con bromocriptina como del grupo sin tratamiento. Es posible que este efecto tenga su origen en la inervación cruzada del cerebro, es decir, la inyección unilateral de 6-OHDA estaría afectando algunas inervaciones que tienen aferencia hacia el estriado contralateral a la lesión provocando denervación dopaminérgica hacia algún área neuronal de este estriado (Fass y Butcher, 1981; Jedrzejewska et al, 1990), por lo que sería dudoso considerar este lado del estriado como control.

12. CONCLUSIONES

- ⌘ La lesión con 6-OHDA provoca pérdida de espinas dendríticas de las neuronas espinosas medianas del estriado de rata.
- ⌘ El tratamiento con bromocriptina después de la lesión atenúa el daño ocasionado por la 6-OHDA.
- ⌘ En las neuronas de ratas sin lesión con la 6-OHDA, la bromocriptina provoca disminución en la densidad de espinas.
- ⌘ En el estriado contralateral a la lesión también existe pérdida de espinas dendríticas debido a la inervación cruzada.

Finalmente podemos decir que el tratamiento con bromocriptina tiene efecto neuroprotector en el estriado de animales lesionados, debido probablemente a sus propiedades antioxidantes.

13. ANEXO I. TÉCNICA DE GOLGI RÁPIDO

Solución de Golgi

1gr. Tetraóxido de Osmio
8gr. Dicromato de potasio
300ml. De Agua destilada

Se lava la cápsula de osmio en ácido nítrico. Posteriormente se enjuaga con agua normal y destilada. Se coloca en un frasco ámbar y se agita hasta romperse. Finalmente se agrega el dicromato y el agua.

Procesamiento de muestras

- o Perfusión del animal con fijador Glutahaldehído-paraformaldehído 2%.
- o Disección del estriado.
- o Dejar en fijador por dos horas.
- o Pasar a la solución de Golgi, dejando la muestra durante siete días.
- o Pasar el tejido a una solución de Nitrato de plata al 0.75% durante veinticuatro horas.
- o Transcurrido el tiempo se encastra la muestra en parafina y se realizan cortes de 100-120 μm .
- o Se deshidratan los cortes con un tren de alcohol de 95°, alcohol absoluto, aceite esencia de clavo y xilol, dejándolos cortes durante diez minutos en cada solución.
- o Después del periodo en xilol se montan en portaobjetos y se cubren con resina para su observación en microscopio óptico.

NOTA

Las neuronas y sus prolongaciones deben quedar impregnadas de color café oscuro rojizo a negro.

14. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Alexander, G.E. 1995. Basal Ganglia. En: The Handbook of brain theory and neural networks. Arbid M.A Ed. The MIT Press, Cambridge, MA. 139-144.

Alexi, T; Borlang, CV; Faul, RLM; Williams, CE; Clark, RG; Gluckman, PD. y Hughes, PE. 2000. Neuroprotective strategies for basal ganglia degeneration Parkinson's and Huntington's disease. Progress in Neurobiology. 60: 409-470.

Alvarez, E; Alvarez, L; Macias, R. y Pavón, N. 2001. Conceptos actuales sobre la función de los ganglios basales y el papel del núcleo subtalámico (NST) en trastornos del movimiento. Re. Mex. de Neurociencia. 2 (2): 77-85.

Anónimo. 2002. DA Agonists-Ergot derivatives: Bromocriptine. Movement disorders. Vol.17. Suppl.4: S53-S67.

Avila-Costa, M.R; Colín-Barenque, L; Espinosa-Villanueva, J. y Machado-Salas, J. 1998. Degeneración del neurópilo del núcleo caudado en la enfermedad de Parkinson y en el modelo experimental provocado con 6-OHDA: Análisis ultraestructural comparativo. Patología. 36: 297-301.

Azmitia, E.C. y Segal, M. 1978. An autoradiographic análisis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. J. Comp. Neurol. 179: 641-668.

Bahena-Trujillo, R; Flores, G. y Arias-Montaño, J.A. 2000. Dopamina: síntesis, liberación y receptores en el sistema nervioso central. Rev Biomed. Vol.11. No. 1: 39-60.

Baik, J.H., Picetti, R., Salardi, A., Thiriet, G. y Dierich, A. 1995. Parkinsonian like locomotor impairment in mice lacking dopamine D2 receptors. Nature. 377: 424-8.

Barbieri, R.L. y Ryan, K.J. 1983. Bromocriptine: endocrine pharmacology and therapeutic applications. Fertil. Steril. 39: 727-741.

Bargas, J. y Galarraga, E. 2000. La acción neuromoduladora de la dopamina sobre los ganglios basales. Ciencia al día. Vol. 3 (2). Artículo6.
<http://www.ciencia.cl/CienciaAlDia/volumen3/numero2/articulos.html>

Barzilai, A. y Melamed, E. 2003. Molecular mechanisms of selective dopaminergic neuronal death in Parkinson's disease. Trends. Mol. Med. 9, (3): 126-132.

Barzilai, A; Zilkha-Falb, R; Daily, D; Stern, N; Offen, D; Ziv, I; Melamed, E. y Shirvan, A. 2000. The molecular mechanism of dopamine-induced apoptosis: identification and characterization of genes that mediate dopamine toxicity. J. Neural Transm. 60: 59-76.

Bedard, PJ; Dipaolo, T. y Falardeau, P. 1986. Chronic treatment with L-dopa, but not bromocriptine induces dyskinesia in MPTP parkinsonian monkeys-correlation with (H-3) spiperone binding. Brain Res. 379: 294-299.

Berendse, H.W. y Groenewegen, H.J. 1990. Organization of the thalamocortical projections in the rat, with special emphasis on the ventral striatum. J. Comp. Neurol. 229: 187-228.

Bergamasco, B; Benna, P. y Scarzalla, L. 1990. Long-term bromocriptine treatment of the novo patients with Parkinson's disease. A seven year follow up study. Acta Neurol. Scand. 81: 383-387.

Blandini, F; Nappi, G; Tassorelli, C. y Martignoni, E. 2000. Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. Progress in Neurobiology. 62: 6388.

Bouyer, J. J., Park, D. H., Joh, T. H. y Pickel, V. M. 1984. Chemical and structural analysis of the relation between cortical inputs and tyrosine hydroxylase-containing terminals in rat neostriatum. Brain Research 302, 267-275.

Burns, R S; Chiueh, C C; Markey, S P; Ebert, M H; Jacobowitz, D M. y Kopin, I J. 1983. A primate model of parkinsonism: selective destruction of dopaminergic neuron in the pars compacta of the substantia nigra by N-methyl-1-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 80: 4546-4550.

Carter, A.J. y Muller R.E. 1991. Pramipexole, a dopamine D2 receptors agonist, decrease the extracellular concentration of dopamine in vivo. Eur: J. Pharmacol. 200: 65-72.

Chacon, J.N., Chedekel, M.R. Land, E.J. y Truscott, T.G. 1987. Chemically induced Parkinson's disease: intermediates in the oxidation of 1-methyl-4-phenylpyridinium ion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 144: 957-964.

Chang, HT; Wilson, CJ. y Kitai, ST. 1982. A Golgi study of rat neostriatal neurons: light microscopic analysis. *J. Comparative Neurology.* 208: 107-126.

Chen, S. y Hillman, DE. 1990. Robust synaptic plasticity of striatal cells following partial deafferentation. *Brain. Res.* 520: 103-114.

Chiueh, C.C., Markey, S.P, Burns, R.S., Johannessen, J.N, Pert, A. y Kopin, I.J. 1984. Neurochemical and behavioral effects of systemic and intranigral administration of N-methyl-1-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 100: 189-194.

Davis, G.C., Williams, A.C., Markey, S.P., Heber, M.H., Calne, D.E., Richert, C.M. y Kopin, I.J. 1979. Chronic parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. *Psychiatry. Res.* 1: 249-51.

DeLong, M. 2000. Parkinson's Disease. *Neurobiology of Disease.* 7: 559-560.

Deumens, R; Blokland, A. y Prickaer, J. 2002. Modeling Parkinson's disease in rats: An evaluation of 6-OHDA Lesions of the nigrostriatal pathway. Review. *Experimental Neurology.* 175: 303-317.

Dunnett, S.B. y Bjorklund, A. 1999. Prospects for new restorative and neuroprotective treatments in Parkinson's disease. *Nature.* 399 (Suppl): A32A39.

Eblen, F. y Graybiel, A.M. 1995. Highly restricted origin of prefrontal cortical inputs to striosomes in the macaque monkey. *J. Neurosci.* 15: 5999-6013.

Elsworth, J.D., Deutch, D.E., Redmond Jr, J.R., Taylor, J.R., Sladek Jr. y Roth, R.H. 1989. Symptomatic and asymptomatic . 1-methyl-1-4-phenyl-1,2,3,6 tetrahydropyridine treated primates: biochemical changes in striatal regions. *Neuroscience.* 33: 323-31.

Factor, S.A. 1999. parkinson's disease and parkinsonian syndromes. Med. Clin. North America. 83(2): 415-445.

Fass, B. and Butcher, L.L. 1981. Evidence for a crossed nigrostriatal pathway in rats. Neurosci. Lett. 22: 109-113.

Feucheux, B.A; Martin, M; Beaumont, C; Hauw, J; Agid, Y. y Hirsch, E.C. 2003. Neuromelanin associated redox-active iron is increased in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease. J. Neurochemistry. 86: 1142-1148.

Fiala, J.C; Spacek, J. y Harris, K.M. 2002, Dendritic spine pathology: cause o consequence of neurological disorders?. Brain Research Reviews. 39: 29-54.

Forno, L.S., Langston, J.W., DeLanney, L.E., Irwin, I. y Ricaurte, A. 1986. Locus coeruleus lesions and eosinophilic inclusions in MPTP treated monkeys. Ann. Neurol. 20: 249-55.

Forno, L.S., Langston, J.W., DeLanney, L.E. y Irwin, I. 1988. An electronmicroscopic study of MPTP induced inclusion bodies in monkey. Brain. Res. 448: 150-7.

Francois, C; Percheron, G; Yelnik, J. y Heyner, S. 1979. Demonstration of the existence of local circuit neurons in the Golgi-stained primate substantia nigra. Brain Res. 172: 160-164

Francois, C; Yelnik, J. y Percheron, G. 1987. Golgi study of the primate substantia nigra II. Spatial organization of dendritic arborizations in relation to the cytoarchitectonic boundaries and to the striatonigral bundle. J. Comp. Neurol. 265: 473-493

Gerfen, C.R. 1985. The neostriatal mosaic. I. Compartmental organization of projections of the striatonigral system in the rat. J. Comp. Neurol. 236: 454-476.

German, D.C., Dubach, M., Askari, S., Speciales, S.G. y Bowden, D.M. 1988. 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 tetrahydropyridine induced parkinsonian syndrome in *Macaca Fascicularis*: which midbrain dopaminergic neurons are lost?. Neuroscience. 24: 161-74.

Glinka, Y. y Youdim, M.H.B. 1995. Inhibition of mitochondrial complexes I and IV by 6-hydroxydopamine. *Eur. J. Pharmacol-Environ Toxicol. Pharmacol.* 295: 329-32.

Glinka, Y; Gassen, M. y Youdim, M.B. 1997. mecanismo de 6-hidroxydopamina neurotoxicidad. *J. Neural. Transm. Suppl* 50: 35-66.

Gonon, F. 1997. Prolonged and extrasynaptic excitatory action of dopamine mediated by D1 receptors in the rat striatum in vivo. *J. Neurosci.* 17: 5972-5978.

Goodman GA; Hardman, JG; Limbird, LE; Molinoff, PB. y Rudodon, RW. 1996. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Mc Graw Hill. 9 Ed. Vol. 1. México. 548-549.

Gorell, J.M., Johnson, C C; Rybicki, B A; Peterson, E L. y Richardson, R J. 1998. The risk of Parkinson's disease with exposure to pesticidas, farming, well water, and rural living. *Neurology.* 50: 1346-1350.

Grau V; J.M. y Kulisevsky, J. 2001. American Academy of Neurology. Enfermedad de Parkinson: clínica. http://www.scn.es/cursos/tmovimiento/CAPITULO_IV.htm.

Graveland, G.A. y Difiglia, M. 1985. The frequency and distribution of medium-sized neurons with indented nuclei in the primate and rodent neostriatum. *Brain. Res.* 327: 307-311.

Graybiel, A.M; Ragsdale, C.W; Jr. Yoneoka, E.S. y Elde, R.P. 1981. An immunohistochemical study of enkephalin and other neuropeptides in the striatum of the cat with evidence that opiate peptides are arranged to form mosaic patterns in register with striosomal compartments visible by acetylcholinesterase staining. *Neuroscience.* 6: 377-397.

Grutzandler, J; Kasthuri, N. y Gan, W. 2002. Long-term dendritic spine stability in the adult cortex. *Nature.* 420 (19-26): 812-816.

Heikkila, R.E., Hess, A. y Duvoisin, R C. 1984(a). Dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-1-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mice. *Science.* 224: 1451-1453.

Heikkila, R.E; Manziol, L; Cabbat, F.S. y Douvoisin, R.C. 1984(b). Protection against the dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 tetrahydropyridine by monoamine oxidase inhibitors. *Nature*. 311: 467-9.

Hely, M.A., Morris, J.G.L. y Reid W.G.J. 1994. The Sidney Multicentre Study of Parkinson's disease: a randomised, prospective five year study comparing low dose bromocriptine with low dose levodopa-carbidopa. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 57: 903-910.

Herkenham, M. y Pert, C.B. 1981. Mosaic distribution of opiate receptors, parafascicular projections and acetylcholinesterase in the rat striatum. *Nature*. 291: 415-418.

Ingham, CA; Hood, SH; Maldegrem van B; Weenink, A. y Arbuthnott, GW. 1993. Morphological changes in the rat neostriatum after unilateral 6-hydroxydopamine injections into the nigrostriatal pathway. *Exp. Brain. Res.* 93: 17-27.

Ingham, CA; Hood, SH; Taggart, P y Arbuthnott, GW. 1998. Plasticity of synapses in the rat neostriatum after unilateral lesion of the nigrostriatal dopaminergic pathway. *J. Neurosci.* 18(12): 4732-4741.

Ischiropoulos, H. y Beckman, J.S. 2003. Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: Cause, effect, or association?. *J. Clinical Investigation*. 111 (2): 163-169.

Jedrzejewska, A; Wierzba-Bobrowicz, T; Olejniczak, P; Poszwinska, Z. and Dymecky, J. 1990. Ultrastructure and immunocytochemistry of left and right nigrostriatal system after lesion of right side of substantia nigra of rat. *Adv. in Neurol.* 53: 41-49.

Jonsson, G. 1976. Studies on the mechanisms of 6-hydroxydopamine cytotoxicity. *Med. Biol.* 54: 406-20.

Jonsson, G. y Sachs, Ch. 1970. Effects of 6-hydroxydopamine on the uptake and storage of noradrenaline in sympathetic adrenergic neurons. *Eur. J. Pharmacol.* 9: 141-55.

Junn, E. y Mouradian, MM. 2001. Apoptotic signaling in dopamine-induced cell death: the rol of the oxidative stress, p38 mitogen-activated protein kinase, cytochrome c and caspases. J. Neurochem. 78: 374-383.

Kandel, ER; Schwartz, JH. y Jessell, TM. 2000. Principios de Neurociencia. 4°Ed. McGraw Hill.

Kawaguchi, Y; Wilson, C.J; Augood, S.J. y Emerson, P.C. 1995. Striatal interneurons Chemical, physiological and morphological characterization. Trends Neurosci. 18: 527-535.

Kemp, JM. y Powell, TPS. 1971(a). The synaptic organization of the caudate nucleus. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 262: 403-412.

Kemp, JM. y Powell, TPS. 1971(b). The connexions of the estriado and globus pallidus: synthesis and speculation. Philos Trans R Soc London Ser B. 262: 441-457.

Kemp, JM. y Powell, TPS. 1971(c). The structure of the caudate nucleus of the cat: light and electron microscopy. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 262: 383-401.

Kihara, T; Shimohama, S; Sawada, H; Honda, K; Nakamizo, T; Kanki, R; Yamashita, H. y Akaike, A. 2002. Protective effect of dopamine D2 agonists in cortical neurons via the phosphatidylinositol 3 kinase cascade. J. of Neurosc. Res. 70(3): 274-272.

Kitada, T; Asakawa, S; Hattori, N; Matsumine, H; Yamamura, Y; Minoshima, S; Yokochi, M; Mizuno, Y. y Shimizu, N. 1998. Mutations in the *parkin* gene cause autosomal recessive juvenil parkinsonism. Nature. 392: 605-608.

Kitamura, Y; Taniguchi, T; Shimohama, S; Akaike, A. y Nomura, Y. 2003. Neuroprotective mechamisms of antiparkinsonian dopamine D2-receptor subfamily agonista. Neurochem. Res. 28(7): 1035-1040.

Klein, J.A. y Ackerman, S.L. 2003. Oxidative stress, cell cycle, and neurodegeneration. J. Clinical Investigation. 111 (6): 785-793.

Kolesnikova, E.E. y Serebrovskaya, T.V. 2003. Parkinson´ s disease: mechanisms of neuronal death. Neurophysiology. 35 (1): 54-66.

Kopin, I.J. y Markey, S.P. 1988. MPTP toxicity: implications for research in Parkinson's disease. *Annu. Rev. Neurosci.* 11: 81-96.

Kubota, Y. y Kawaguchi, Y. 1993. Neostriatal GABAergic interneurons contain NOS, calretinin or parvalbumin. *Neuroreport.* 5: 205-208.

Kulisevsky, B.J. 2001. Enfermedad de Parkinson. Guía terapéutica de la Sociedad Catalana de Neurología. Fundación de la Sociedad Catalana de Neurología., Servicio de Neurología, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. <http://www.scn.es/sp/form/guias/park/Parkinson.htm>

Lang, E. y Lozano, A.M. 1998(a). Parkinson's disease. First of two parts. *N. Engl. J. Med.* 339: 1044-1053.

Lang, E. y Lozano, A.M. 1998(b). Parkinson's disease. Second of two parts. *N. Engl. J. Med.* 339: 1130-1143.

Langer, F.L. y Graybiel, A.M. 1989. Distinct nigrostriatal projection systems innervate striosomes and matrix in the primate striatum. *Brain Res.* 498: 344-350.

Langston, J.W.; Ballard, P. y Tetrad, J.W. 1983. Chronic parkinsonism in humans due to a product of meperidine analog synthesis. *Science.* 219: 979-980.

Langston, J.W., Forno, L S; Rebert, C S. e Irwin, I. 1984. Selective nigral toxicity after systemic administration of 1-methyl-1-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the squirrel monkey. *Brain. Res.* 292: 390-394.

Lee, C.S; Saurer, H. y Björklund, A. 1996. Dopaminergic neuronal degeneration and motor impairment following axoteminal lesion by intrastriatal 6-hydroxydipamine in the rat. *Neuroscience.* 72: 641-653.

Lehman J. y Langer SZ. 1983. The striatal cholinergic interneurons; Synaptic target of dopaminergic terminals. *Neuroscience.* 10:1105-1120.

León F, LI. 1996. Etiología de la enfermedad de Parkinson. En Parkinson enfoque al futuro. Fondo de cultura económica. 1° Ed. México. 25-34.

Lévesque, M. y Parent, A. 1998. Axonal arborization of corticostriatal and corticothalamic fibers arising from prelimbic cortex in the rat. *Cereb. Cortex.* 8: 602-613.

Lévesque, M; Bédard, A; Cóssete, M. y Parent, A. 2003. Novel aspects of the chemical anatomy of the striatum and its efferents projections. *J. Chem. Neuroanatomy.* Vol:26 (4): 271-281.

Luquin MR. 2000. Modelos experimentales de enfermedad de Parkinson. *Rev neurol.* 31(1) 60-66. <http://neurologia.rediris.es/congreso-1/conferencias/t-movimiento-2.html>

Luquin, M.R., y Saldisel, L, 1997. Sistema dopaminérgico y muerte neuronal. *Rev. Neurol.* 25: S129-40.

Matus, A. 1999. Postsynaptic actin and neuronal plasticity. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9: 561-565.

Matus, A. 2000. Actin-based plasticity in dendritic spines. *Science.* 290 (5492): 754-758.

Menegon, A., Board, Philip G., Blackburn, Anneke C., Anneke C. Mellick, Anneke C. y Le Couteur, David G. 1998. Parkinson's disease, pesticides, and glutathione transferase polymorphisms. *Lancet.* 352: 1344-1346.

Missale, C; Russel, N.S; Robinson, S.W; Jaber, M. y Caron, M.G. 1998. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol. Rev.* 78: 189-125.

Mizuno, Y; Hattori, N. y Mori, H. 1999. Genetics of Parkinson's disease. *Bomed. Pharmacother.* 53: 109-116.

Montiel, E. 2001. Efecto de la bromocriptina sobre la ultraestructura del núcleo caudado de rata expuesta a un modelo de la enfermedad de Parkinson con 6-OHDA. Tesis para obtener el grado de maestro en neurociencias. ENEP Iztacala. UNAM.

Montrastruc, J.L.; Rascol, O; Senard, J.M. y Rascol, A. 1994. A randomised control study comparing bromocriptine to which levodopa was later added, with levodopa alone in previously untreated patients with Parkinson´s disease: a five year follow up. J. Neurol. Neurosurg. Psych. 57: 1034-1038.

Muralikrishnan, D. y Mohanakumar, P.K. 1998. Neuroprotection by bromocriptine against 1-methyl-4, phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity in mice. J. FASEB. Vol. 12: 905-912.

Najera, R; Otero-Siliceo, E. y Corzo, M. 1996. Anatomofisiología del movimiento y neurotransmisores involucrados. Cap. V. de Parkinson: Enfoque al futuro. Fondo de cultura económica. México. P 41-107.

Naoi, M; Dostert, P; Yoshida, M. y Nagatu, T. 1993. N-Methylated tetrahydroisoquinolines as dopaminergic neurotoxins. Ad Neurol. 60: 212-217.

National Institute of Neurological Disorders and Stroke. 2003. La Enfermedad de Parkinson: Esperanza en la Investigación.

http://www.ninds.nih.gov/health_and_medical/pubs/parkinson

Nishibayashi, S; Asunuma, M; Kohno, M; Gómez-Vargas, M. y Ogawa, N. 1996. Scavenging effects of dopamine agonista on nitric oxide radicals. J. Neurochem. 67: 2208-2211.

Nutt, J.G; Woodward, W.R; Hammerstand, J.P. y Carter, J.H. 1984. The on-off phenomenon in Parkinson´s disease. N. Engl. J. Med. 310: 483-488.

Ogawa, N; Tanaka, K; Asanuma, M; Kawai, M; Toshiki, M; Cono, M. y Mori, Akitane. 1994. bromocriptine protects mice against 6-hydroxydopamine and scavenges hydroxyl free radicals in vitro. Brain. Res. 657: 207-213.

Ogawa, N; Tanaka, K. y Asanuma, M. 2000. Bromocriptine markedly suppresses levodopa-induced abnormal increase of dopamine turnover in the parkinsonian striatum. Neurochem. Res. 25(6): 755-758.

Olanow, C.W.; Jenner, P; Tatton, N.A. y Tatton, W.G. 1998. Neurodegeneration and Parkinson´s disease. In: Jankovic, J; Tolosa, E. eds. Parkinson´s disease and movement disorders. Baltimore: Williams & Wilkins. 67-103.

Olanow, C.W., y Tatton, W.G. 1999. Etiology and pathogenesis of Parkinson´s disease. *Ann. Rev. Neurosci.* 22: 123-144.

Parish, C.L; Stanic, D; Drago, J; Borrelli, E; Finkelstein, D.I. y Horne, M.K. 2002. Effects of long-term treatment with dopamine receptor agonists and antagonists on terminal arbor size. *European J. Neurosci.* 16: 787-794.

Parkinson´s Disease Research Group in the United Kingdom. 1993. Comparison of therapeutic effects of levodopa, levodopa and selegiline, and bromocriptine in patients with early, mild Parkinson´s disease: three year interim report. *BMJ.* 307: 469472.

Parkinson, J. 1817. *An essay on the shaking palsy.* Sherwood. Neely and Jones, London.

Patt, S; Gertz, L; Gerhard, J, y Cervos-Navarro. 1991. Pathological changes in dendrites of substantia nigra neurons in Parkinson´s disease: a Golgi study, *Histol.* 6:373380. En: Fiala, J.C; Spacek, J. and Harris, K.M. (2002). Dendritic Spine pathology: cause or consequence of neurological Disorders? *Brain Research Review.* 39:29-54.

Pavon, N; Vidal, L; Blanco, L; Alvares Fonseca, P; Torres-Montoya, A. y Lorigados, L. 1998. Factores que desencadenan la muerte neuronal en enfermedades neurodegenerativas. *Rev. Neurol.* 26 (152): 554-560.

Paxinos, G y Watson, C. 1986. *The rat brain in stereotaxic coordinates.* 2º Ed. Academic Press. New York.

Perez-Otaño, Y; Herrero, M.T; Luquin, M.R; Obeso, J.A. y Del Rio, J. 1992. Chronic MPTP treatment reduces substance P and met-enkephalin content in the basal ganglia of the marmoset. *Brain. Res.* 585: 156-60.

Perez-Otaño, Y; Oset, C; Herrero, M.T; Luquin, M.R; Obeso, J.A. y Del Rio. 1994. MPTP induced parkinsonism in primates: pattern of striatal dopamineloss following acuteand chronic administration. Neurosci. Lett. 175: 121-5.

Percheron, G; Mckenzie, JS. y Féger, J. 1994. The basal ganglia IV. New ideas and data on structure and function. Plenum Press. New York. 43-50.

Piercey, F; Camacho-Ochoa, M. y Smith, W. 1995. Functional roles for dopamine-receptor subtypes. Clin. Neuropharmacol. 18: 34-42.

Pontificia Universidad Javeriana. 2000. Departamento de ciencias fisiológicas. <http://med.javeriana.edu.co/fisiologia/fw/c564.htm>.

Portera, C. y Yuste, R. 2001. Sobre la función de los filopodios dendríticos. Rev. Neurol. 33(12): 1158-1166.

Prensa, L. y Parent, A. 2001. The nigrastratial pathway in the rat: a single-axon stduy of the relationship between dorsal and ventral tier nigral neurons and the striosome/matrix striatal compartments. J. Neuroci. 21: 7247-7260.

Ramon y Cajal, S. 1888. Estructura de los centros nerviosos de las aves. Rev. Trim. Histol. Norm. Pat. 1-10.

Ramon y Cajal, S. 1909. Histologie du systeme nerveux de l´ homme et des vertebres. Paris: Maloine.

Reynols, J.N.J. y Wickens, JR. 2002. Dopamine-dependent plasticity of corticostriatal synapses. Neural Networks. 15: 507-521.

Rodríguez, M. y Gonzalez-Hernandez, T. 1999. Electrophysiological and morphological evidence for a GABAergic nigrostriatal pathway. J. Neuroci. 19: 4682-4694.

Sawada, H; Kawamura, T; Shimohama, S; Akaike, A. y Kimura, J. 1996. Different mechanisms of glutamate-induced neuronal death between dopaminergic and non-dopaminergic neurons in rat mesencephalic culture. *J. Neurosci. Res.* 43: 503-510.

Sawada, H; Ibi, M; Kihara, T; Urushitani, M; Akaike, A; Kimura, J. y Shimihama, S. 1998. Dopamine D2-type agonista protect mesencephalic neurons from glutamate neurotoxicity: mechanisms of neuroprotective tratment against oxidative stress. *Ann. Neurol.* 44: 110-119.

Seniuk, N.A., Tatton, W. G. y Greenwood, C. E. 1990. Dose-dependent destruction of the coeruleus-cortical and nigral-striatal projections by MPTP. *Brain. Res.* 527: 7-20.

Shapira, A.H; Cooper, J M; Dexter, D; Clark, J B; Jenner, P. y Marsden, C D. 1990. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson´ s disease. *J. Neurochem.* 54: 823827.

Shimohama, S; Sawada, H; Kitamura, Y y Taniguchi, T. 2003. Disease model: Parkinson´ s disease. *Trends Mol. Med. Rev.* 9 (8): 360-365.

Simpkins, N. y Jankovic, J. 2003. Neuroprotection in Parkinson disease. *Arch. Intern. Med.* 163: 1650-1654.

Sinha, B.K., Singh, Y. y Krishna, G., 1986. Formation of superoxid and hydroxyl radicals from 1-metyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺): reductive activation by NADPH cytochrome P45 reductase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 135: 583-586.

Smart, FM. y Halpain, S. 2000. Regulation of dendritic spine stability. *Hippocampus.* 10: 542-554.

Smith, Y. y Bolam, J.P. 1989. Neurons of the sustancia nigra reticulata receive a dense GABA-containig input from the globus palidus in the rat. *Brain Res.* 493: 160-167.

Smith, A.D. y Zigmond, M.J. 2003. Can the brain be protected through exercise? Lessons from an animal model of parkinsonism. *Experimental Neurology.* 184 (1): 31-39.

Soto-Otero, R; Méndez-Álvarez, E; Hermida-Ameijeiras, A; Muñoz-Patiño, A.M. y Labandeira-Garcia, J.L. 2000. Autoxidation and neurotoxicity of 6-hydroxydopamine in the presence of some antioxidants: potential implication in relation to the pathogenesis of Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 74: 1605-1612.

Spacek, J. y Harris, KM. 1997. Three-dimensional organization of smooth endoplasmic reticulum in hippocampal CA1 dendrites and dendritic spines of the immature and mature rat. *J. Neurosci.* 17: 190-203.

Steinbusch, H.W.M; Nieuwenhuys, R; Verhofstad, A.A.J. y Vander, K.D. 1981. The nucleus raphe dorsalis of the rat and its projection upon the caudate putamen: A combined cytoarchitectonic immunohistochemical and retrograde transport study. *J. Physiol. (Paris)* 77: 157-174

Takashima, H; Tsujihata, M; Kishikawa, M y Freed W.J. 1999. Bromocriptine Protects dopaminergic neurons from Levodopa-induced toxicity by stimulating D2 receptors. *Experimental Neurology.* 159: 98-104.

Treseder, SA; Smith, LA. y Jenner, P. 2000. *Movement Disorders.* 15 (5): 804-812.

Ungerstedt, U. 1968. 6-hydroxydopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur. J. Pharmacol.* 5: 107-10.

Ungerstedt, U. 1971(a). Postsynaptic supersensitivity after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigrostriatal dopamine system. *Acta Physiol Scand (Suppl)* 367: 69-93.

Ungerstedt, U. 1971(b). Adipsia and aphagia after 6-hydroxydopamine-induced degeneration of the nigrostriatal dopamine system. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 367: 95-122.

Van de Vijver, DAM; Stricker, BHCh; Breteler, MMB; Ross, RAC; Porsius, AJ. y de Boer, A. 2001. Evaluation of parkinsonian drugs in pharmacy records as a marker for Parkinson's disease. *Pharmacy World & Science.* 23(4): 148-152.

Watts, R. L. 1997. The role of dopamine agonists in early Parkinson's disease. *Neurology* 49(suppl.1): S34-S48.

Wilson, C.J. 1998. Basal ganglia. En The synaptic organization of the brain. Ed. Shepered G.M. 4 Ed. Oxford University. 329-375.

Woodward, W.R; Olanow, C.W; Becker, R.M; Hasser, R.A; Gauger, L.L; Cedabaum, J.M. y Nutt, J.G. 1993. The effect of levodopa infusion with and without phenylalanine challenges in parkinsonian patients: plasma and ventricular CSF levodopa levels and clinical responses. Neurology. 43: 1704-1708.

Xu, M; Moratalla, R; Gold, LH; Hiroi, N; Koob, GF; Graybiel, AM. y Tonewaga, S. 1994. Dopamine D1 receptor mutant mice are deficient in striatal expression of Dynorphin and in dopamine-mediated behavioural responses. Cell. 79: 945-955.

Yamamoto, M. 1998. Do dopamine agonist provide neuroprotection? Neurology. 51: (suppl 2): S10-12.

Yelnik, J; Percheron, G. y Francois, C. 1984. A Golgi analysis of the primate globus pallidus II. Quantitative morphology and spatial orientation of dendritic arborizations. J. Comp. Neurol. 227: 200-213.

Yoshikawa, T; Minamiyama, Y; Naito, Y. y Kondo, M. 1994. Antioxidant properties of bromocriptine, a dopamine agonist. J. Neurochem. 62: 1034-1038.

Yung, K.K.L. y Bolam, J.P. 2000. Localization of dopamine D1 and D2 receptors in the rat neostriatum: synaptic interaction with glutamate- and GABA-containing axonal terminal. Synapse. 38: 413-420.

Zhang, W. y Benson, DL. 2000. Development and molecular organization of dendritic spines and the synapses. Hippocampus. 10: 516-526.

Zigmond, M.J; Berger, T.W; Grace, A.A. y Stricker, E.M. 1989. Compensatory responses in nigrostriatal bundle injury studies with 6-hydroxydopamine in an animal model of parkinsonism. Mol. Chem. Neurophatol. 10: 185-200.

Zigmond, M.J; Abercrombie, E.D; Berger, T.W; Grace, A.A. y Stricker, E.M. 1990. Compensations after lesions of central dopaminergic neurons: some clinical and basic implications. TINS. 13(7): 290-296.

Ziv, N. y Smith, S. 1996. Evidence for a role of dendritic filipodia in synaptogenesis and spine formation. Neuron. 17: 91-102.